



Recherche de composés bioactifs et étude de l'effet du statut azoté sur le métabolome de *Tetraselmis suecica* en biofilm

Julien Lopez

► To cite this version:

Julien Lopez. Recherche de composés bioactifs et étude de l'effet du statut azoté sur le métabolome de *Tetraselmis suecica* en biofilm. Sciences du Vivant [q-bio]. Sorbonne Université, 2024. Français. ⟨NNT : 2024SORUS492⟩. ⟨tel-04754294v3⟩

HAL Id: tel-04754294

<https://hal.science/tel-04754294v3>

Submitted on 4 Apr 2025

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.



HAL Authorization



Sorbonne Université

École Doctorale des Sciences de l'Environnement d'Île-de-France (ED 129)

Laboratoire d'Océanographie de Villefranche

UMR 7093 – SU – CNRS

Recherche de composés bioactifs et étude de l'effet du statut azoté sur le métabolome de *Tetraselmis suecica* en biofilm

Thèse présentée par **Julien LOPEZ**

Pour l'obtention du grade de Docteur de Sorbonne Université

Spécialité : Ecologie Marine

Thèse dirigée par Antoine Sciandra

Soutenue publiquement le 05 décembre 2024

au Laboratoire d'Océanographie de Villefranche

Devant le jury composé de :

Pr. Rodolphe Lemée (Sorbonne Université, France)

Pr. Cédric Hubas (MNHN, France)

Dr. Soizic Morin (INRAE, France)

Dr. Joséphine Leflaive (Université de Toulouse, France)

Dr. Annick Ortalo-Magné (Université de Toulon, France)

Dr. Olivier Bernard (INRIA, France)

Dr. Eva Ternon (Sorbonne Université, France)

Dr. Antoine Sciandra (LOV, UMR 7093 CNRS, France)

Président

Rapporteur

Rapporteuse

Examinatrice

Examinatrice

Invité

Invitée

Directeur de thèse

LISTE DES PUBLICATIONS ET COMMUNICATIONS

Articles parus dans des revues

Mougin, J., Pavaux, A.S., Fanesi, A., **Lopez, J.**, Pruvost, E., Guihéneuf, F., Sciandra, A., Briandet, R., Lopes, F. (2024). Bacterial adhesion inhibition by microalgal EPSs from *Cylindrotheca closterium* and *Tetraselmis suecica* biofilms. **Appl Microbiol Biotechnol.** Jan 23;108(1):168. doi: <https://doi.org/10.1007/s00253-023-12960-z>. PMID: 38261095.

Articles en préparation

Lopez J., Ternon E., Sciandra A. (in prep.). Effects of nitrogen source and concentration on the production of toxic and allelopathic compounds in microalgae and cyanobacteria: a synthetic review. **Journal of Chemical Ecology.**

Lopez J., Talec A., Krichen E., Simmler C., Greff S., Fanesi A., Bernard O., Sciandra A. (in prep.). Study of the effect of nitrogen limitation on the metabolome of *Tetraselmis suecica* biofilms.

REMERCIEMENTS

En premier lieu, je tiens à remercier messieurs Rodolphe Lemée, directeur du LOV lors de mon arrivée en thèse, et Frédéric Gazeau, actuel directeur, pour m'avoir permis de réaliser cette thèse au sein du Laboratoire d'Océanographie de Villefranche. Merci à Rodolphe d'avoir accepté de présider mon jury de thèse. Au plaisir de vous recroiser, pour discuter de façon professionnelle comme pour une partie de pétanque épique ou un apéro.

Je remercie les membres de mon jury, Cédric Hubas et Soizic Morin qui ont accepté d'être les rapporteurs de cette thèse, Joséphine Leflaive et Annick Ortalo-Magné qui ont bien voulu y participer en tant qu'examinatrices.

Je tiens à exprimer toute ma gratitude à mon encadrant Antoine Sciandra pour m'avoir fait confiance pour porter ce projet de thèse. Merci de m'avoir accompagné tout au long de cette aventure et, en particulier, la rédaction. Tu as toujours été disponible pour répondre à toutes mes questions et me conseiller dans les moments opportuns. Ta grande expérience dans la recherche m'a permis de progresser. Je te suis reconnaissant de m'avoir choisi comme dernier doctorant pour clôturer ta carrière et l'histoire de l'équipe Pisco.

Je tiens à remercier les membres de mon comité de suivi de thèse, Éric Fouilland, Filipa Lopes, Gérald Culioli et Christophe Migon, pour leurs critiques, leurs conseils et leur soutien au cours de ces trois années. Éric, Filipa, merci pour les discussions qu'on a pu avoir lors des réunions du projet *Photobiofilm Explorer*, vos travaux m'ont fortement enrichi. Christophe, merci pour tes passages à mon bureau pour prendre des nouvelles et m'encourager. Gérald, et également Annick, vous m'aviez fait l'honneur de me prendre en stage de M2 en 2019 et aujourd'hui d'être respectivement membre du comité et jury de ma thèse. Mon stage avec vous a été l'une des expériences que j'ai le plus appréciée au cours de mes études, je vous remercie d'être encore présents.

Mes remerciements s'adressent aussi à Olivier Bernard, superviseur du projet ANR *Photobiofilm Explorer*, pour m'avoir accordé sa confiance et m'avoir permis de participer à ce projet. Merci à tous les collaborateurs du projet PBEx, ce fut formateur de travailler avec vous tous.

Je tiens à grandement remercier Charlotte Simmler et Stéphane Greff de la Station Marine d'Endoume pour leur chaleureux accueil à la plateforme, ainsi que pour leur

collaboration qui m'a permis de réorienter efficacement mes travaux de thèse. Malgré le fait qu'il se soit écoulé trop rapidement, le temps passé avec vous a été très enrichissant, et je vous prie de m'excuser pour le peu de nouvelles que je vous ai fait parvenir au cours de ces derniers mois... Au plaisir de vous revoir !

Je remercie également Benjamin Musnier du laboratoire LIENSs pour son aide à la recherche de composés anticancéreux. Merci également à Andréa Fanesi du LGPM pour la réalisation des analyses ATR-FTIR et pour ses conseils. Au plaisir de travailler à nouveau avec vous.

Enfin, pour terminer ces remerciements un peu solennels, je tiens à remercier toutes les personnes avec lesquelles j'ai travaillé de près comme de loin !

Chloé, merci pour tous ces moments passés au cours de ces cinq dernières années, dont certains sont les plus beaux de ma vie. Nos chemins, malheureusement, se séparent mais mon dernier message vaut toujours. Bu.

Chère équipe PISCO, que dire de ces trois années avec vous... Que de moments mémorables ! À mon ami Éric, aka Papa'ltine, aka le MacGyver sifflotant (mais une musique par jour, attention), la thèse sans toi n'aurait pas valu le coup ! Tu ne peux pas savoir à quel point tu nous manques à tous ! Dès que j'ai l'opportunité de venir vous voir, je saute sur l'occasion (ça doit manquer de bras et d'ambiance sans moi là-bas aha). Merci à toi et ta petite famille, vous êtes géniaux ! Caro, merci pour ton accueil chaleureux à chaque fois. Les filles, je compte sur vous pour rendre fou le daron. Épanouissez-vous le plus possible dans votre nouvelle vie !

Amélie, mon message/dédicace de la dernière fois vaut tous les mots : merci d'avoir été là..! Nos petits cafés/thés du matin et ton sourire H24 vont terriblement me manquer. Après, je peux toujours passer prendre des pains au chocolat, comme ça, pour l'occasion haha ! Durant cette thèse, tu as été là dès le premier jour pour me soutenir. Tu vas me manquer...

Merci à ma chère Chacha pour toutes les bêtises, chansons et autres vocalises émises au cours de cette thèse ! Mon oreille est capable de te repérer à plusieurs kilomètres maintenant ! Tu as été une sorte de co-encadrante officieuse, que dis-je, de grande sœur durant ces trois années. Merci d'avoir été là toi aussi !

Un énorme merci à Emna pour nos discussions sur tout et n'importe quoi, professionnelles comme de type « quelle est la meilleure recette de couscous ??! ». Merci pour tes conseils, cette thèse a avancé aussi grâce à toi. J'espère que ton nouveau job te convient et qu'on se recroisera !

Je remercie mes stagiaires, Domitille et Louise, bravo pour votre travail qui m'a soulagé d'un poids durant toutes mes périodes de rush. J'espère que vous avez trouvé votre voie après vos études. N'hésitez pas à me donner des nouvelles de temps en temps. Merci à tous les autres stagiaires : Erika, Oscar, Fanny, Auréline.

Eva, tout a commencé grâce à toi lorsque tu m'as pris en stage de M1 dans cette même station marine pour me faire découvrir notre science à nous, l'écologie chimique marine. Je te dois plus que beaucoup et j'espère pouvoir te rendre la pareille un de ces jours. :)

Un grand merci à ma râleuse préféré (et je sais qu'elle va râler en lisant ces mots :3), Sophie ! Tu m'as dit « plus jamais je m'attache à un doctorant, plus jamais » alors je compte faire des apparitions spontanées (en enlevant bien-sûr l'écriteau sur la porte de l'Open Space, pour respecter l'endroit). Tu vas me manquer également. PS : quand je reviens, ça veut dire Mékong ! Je remercie également Hubert pour les discussions intéressantes (mais surtout « hypo-béotiennes ») et son sens fin de l'humour ! :)

OOOOOOOoooooh mon Raph' !! Mon *mate* ! Le roi ! Attends... Je viens de me rappeler des remerciements sur ton rapport de stage envers ma personne... Ouais, mouais, j'hésite à écrire un truc sérieux d'un seul coup, à toi, « l'expert en culture de microalgues et génomique ». Descends plus souvent sur Nice, tu me manques grand fou !

À côté de ce cher Raphaël, je me dois de citer et remercier Amandine Avouac, pour sa bonne humeur et son humour constant. À ton avis, ce message compte comme l'une de nos reprises de contact tous les 6 mois ? Il faut absolument qu'on se retrouve tous les trois une nouvelle fois. ;)

Un grand merci à toute l'équipe des services aquarium et plongée : Axel, Julien, Dany, Mayélé, Laure, Laurent, Cyril, pour autant de bons moments avec un café à la main. Axel, je pense que notre discussion il y a peu résume tout, hâte de partager plus de pastis avec toi ! Mon homonyme, Julien Lopez (Pardo), une rencontre surprenante qui, j'espère, partagera également les pastis cités plus haut ! Ne changez rien les gars ! ;) Dany, merci pour ta zénitude quel que

soit le temps. Merci à toi Mayélé pour ces fous rires et ton invitation à cette journée/soirée déjantée !

Une dédicace spéciale à Laure qui est le sang ! Il n'y a pas plus drôle que toi ! Merci pour ta carte, je la garderai précieusement (pas la CB, l'autre, quoique la CB aussi tiens). T'es ma « P » à jamais ! A nos futures soirées !

Mais il y a également le grand et incroyable Olivier, doué du sens de l'humour le plus exquis, bref un humour de beauf ! Je t'aime, espèce de sandwich Sodebo thon-mayo !

Dédicace aussi au « A », aka Alice. L'Open Space n'est plus pareil sans ton arrivée babacool chaque matin... J'espère qu'on se recroisera le « A ».

Je tiens à profondément remercier Jenifer Croce pour sa gentillesse, j'ai aimé tous nos échanges ! Merci à Jérémy pour son soutien durant ces derniers mois. Merci à Mahé et Victoria pour les quelques baignades, soirées et fous rires malaisants réalisés dernièrement (pas invitées à la soutenance mais dans les remerciements, ce n'est déjà pas mal !). Sandra, merci pour ta sympathie et ta disponibilité, on ne se croisera plus les weekends (ce qui est en partie une bonne nouvelle, aha). Merci également à Mohammed pour ta gentillesse. Samir, merci cher camarade de quartier sans le savoir. Jean-M... ichel, oui Jean-Michel, t'enquiquiner tous les jours va me manquer héhé !

Merci à toute l'équipe temporaire de la vieille forge. Maryline, qui est le frrrr, merci pour toutes tes visites à mon bureau. J'attends la dédicace de ton livre ! Un merci et un bon courage à Audrey qui, je sais, rend son manuscrit en même temps que moi. On fêtera ça comme il se doit ! Merci à Thierry pour ses conseils et son soutien. Merci Marc pour toutes tes histoires. Un merci à Laury également pour les quelques cafés partagés.

Je remercie également l'équipe d'Inalve, Freddy, Coline, Nina, Fabien, Osvaldo et Thibault. J'ai apprécié de travailler à vos côtés et d'échanger avec vous. Merci Freddy pour tes conseils et les échantillons que tu m'as passé. Coline, Nina, Fabien, vous êtes vraiment des personnes que j'apprécie.

Merci aux gestionnaires du LOV pour leur travail et leur aide remarquable à chaque demande : Isabelle, Anne, Amandine et Nadège. Merci à l'équipe de la cantine, Thierry, Jocelyne et Didier, pour ces repas tous les midis servis avec votre bonne humeur.

Je tiens à remercier l'ensemble des personnes ayant partagé mon bureau de l'Open Space, durant ces trois ans et que je n'ai pas citées plus haut : Ana-Luzia, Louis, Camille, Zoé,

Alexandre, Corine, Paul, Constanza, Aru et toutes les autres personnes que j'oublie. Un remerciement particulier à Ana-Luzia, le soleil du LOV, toujours à apporter la bonne humeur ! Louis, j'ai commencé mes études dans le même amphi que toi, je les finis dans le même bureau. C'est beau. Zoé, désolé pour les 28 653 coups de pied. Courage pour la dernière année à Camille et Zoé ! :)

Merci à tous les autres doctorants et anciens doctorants (ou plutôt, nouveaux docteurs) que j'ai pu croiser. Bon courage pour vos thèses respectives. Je dois également oublier d'autres personnes à remercier, veuillez m'excuser pour cela ...

Merci au restaurant Le Mekong et à ses propriétaires pour leur gentillesse, leur soutien et leurs merveilleux plats au cours de ces cinq dernières années. Fred, ta soudaine disparition nous rend tous tristes ; ne plus te voir chaque soir en rentrant laisse un grand vide.

Enfin, la réalisation d'une thèse est la fin d'un parcours bien plus long, qui a commencé pour moi il y a déjà 10-11 ans. Je tiens à remercier l'ensemble de mes camarades et amis de la fac (Nice comme Toulon), que je vois encore ou non. Manon (Nonam), Louis, Livio, Ophélie, Adèle, Mélanie, Bastien, Julien, Hugo, Alexandre, Camille, Marina, Lucile, Aymen, Giovanni, vous me manquez tous, terriblement...

Mes amis, Clarisse, Tanguy, Remy, Julie, Anna, Gauthier, Dahmien, Sandrine, Marion D., Marion A., Lucas, Marwane, Valentin, merci d'être là, pour la plupart depuis notre enfance dans cette même région, je vous aime tous !

Merci à mon frère, Jonathan, et sa femme, Laura. Merci à mes grands-parents, toujours présents. Durant cette thèse, je suis devenu également trois fois Tonton, deux fois par ma famille de sang et une autre par ma famille de cœur, ce qui me fait profondément plaisir malgré mes absences. Merci à ma fille, mon chat, Delly, 16 ans à vivre à mes côtés et j'espère pour encore longtemps.

Et enfin, merci à Denis, mon père. Papa, si je ne devais écrire qu'une seule fois la phrase « tu as toujours été là », elle te serait destinée. Cette thèse, c'est en grande partie la tienne. Rien, que ce soit mes études ou le reste, ne serait arrivé sans ta présence. Cette thèse n'est malheureusement pas aussi réussie à mes yeux que je l'aurais souhaité, mais j'espère que tu seras aussi fier de moi que, moi, je suis fier d'être ton fils.

A ton souvenir qui me hante, ma petite sœur.

TABLE DES MATIERES

Liste des publications et communications	3
Remerciements	5
Table des matières	12
Liste des figures	16
Liste des tableaux	21
Liste des annexes	23
Liste des abréviations	25
Introduction générale	34
Avant-propos	35
1. Écologie chimique marine	36
1.1. Historique et définitions	36
1.1.1. Histoire de l'écologie chimique marine	36
1.1.2. Définitions utilisées en écologie chimique	37
1.2. Théories	43
1.3. Applications	45
2. Microalgues et biofilms phototrophes	49
2.1. Définitions et phylogénie	49
2.2. Phycosphère	50
2.3. Microalgues et métabolisme azoté	52
2.3.1. Absorption, transport et catabolisme	52
2.3.2. Anabolisme	55
2.4. Cultures en laboratoire	56
3. Biofilms phototrophes	59
3.1. Définition	59
3.2. Formation	61
3.3. Composition chimique des EPS	65
3.4. Interactions médiées chimiquement	66
3.5. Applications	68
4. Modèle d'étude : <i>Tetraselmis suecica</i>	69
5. Objectifs de ce travail de thèse	72
Chapitre I : Influences de la source et de la concentration d'azote sur la production de composés toxiques et allélopathiques chez les microalgues et les cyanobactéries : une revue de synthèse	74
Résumé	75
1. Introduction	76
2. Toxines azotées	79
2.1. Cyclindrospermopsine et les cyanobactéries <i>Raphidiopsis</i> et <i>Aphanizomenon</i>	79
2.2. Toxines paralytiques, les dinoflagellés <i>Alexandrium</i> , <i>Gymnodinium</i> et la cyanobactérie <i>Raphidiopsis</i>	82
2.3. Microcystines, Nodularines et les cyanobactéries	89
2.3.1. Microcystines et les cyanobactéries <i>Microcystis</i> , <i>Planktothrix</i> et <i>Nostoc</i>	91
2.3.2. Nodularines et le genre <i>Nodularia</i> (cyanobactérie)	97
2.4. Palytoxines, ovatoxines et le dinoflagellé <i>Ostreopsis</i>	97
3. Toxines peu azotées	100

3.1.	Acide domoïque et la diatomée <i>Pseudo-nitzschia</i>	100
3.2.	Azaspiracides et le dinoflagellé <i>Azadinium spinosum</i>	103
3.3.	Anatoxine-a et les cyanobactéries <i>Anabaena</i> et <i>Aphanizomenon</i>	105
3.4.	Spirolides et le dinoflagellé <i>Alexandrium</i>	105
4.	Toxines non-azotées	107
4.1.	Ciguatoxines et le dinoflagellé <i>Gambierdiscus</i>	107
4.2.	Intoxication diarrhéique par les fruits de mer et les dinoflagellés	108
4.2.1.	Acide okadaïque, dinophysistoxines, pecténotoxines et les genres <i>Dinophysis</i> et <i>Prorocentrum</i>	108
4.2.2.	Yessotoxines et le dinoflagellé <i>Protoceratium reticulatum</i>	112
4.3.	Brévéttoxines et l'espèce <i>Karenia brevis</i>	113
4.4.	Karlotoxines et le dinoflagellé <i>Karlodinium veneficum</i>	114
5.	Allélopathie et azote	116
5.1.	Le cas des composés organiques volatiles de la cyanobactérie <i>Microcystis</i>	117
5.2.	Le cas de l'activité hémolytique de l'haptophyte <i>Prymnesium parvum</i>	118
5.3.	Le cas d'une présence d'activité allélopathique dépendant de l'N chez <i>Synechococcus</i>	121
6.	Observations	122
7.	Conclusion	127
Chapitre II : Recherche de composés bioactifs antibactériens et anticancéreux issus de biofilms des microalgues <i>Tetraselmis suecica</i> et <i>Cylindrotheca closterium</i> par criblage phytochimique		129
1.	Introduction	130
2.	Matériel et méthodes	132
2.1.	Souches de microalgues utilisées et production de biofilm	132
2.2.	Souches bactériennes et milieu de culture bactérien	133
2.3.	Lignées cellulaires	138
2.4.	Extractions	136
2.5.	Tests de sensibilité, optimisation et tests de diffusion sur cibles bactériennes	139
2.6.	Viabilité cellulaire	141
3.	Résultats & discussion	143
3.1.	Courbes de croissance bactérienne	143
3.2.	Antibiogrammes et tests de sensibilité aux solvants organiques	144
3.3.	Tests de diffusion	146
3.4.	Bioessais sur cellules cancéreuses	149
4.	Discussion	152
4.1.	Activités antibactériennes	152
4.2.	Activités anticancéreuses	156
5.	Conclusion & perspectives	159
Chapitre III : Etude de l'effet d'une limitation en azote sur le métabolome de biofilms de <i>Tetraselmis suecica</i>		163
1.	Introduction	164
2.	Matériel et méthodes	167
2.1.	Souche utilisée	167
2.2.	Conception du système de culture de biofilm en erlenmeyer	167
2.2.1.	Systèmes de culture imaginés	168
2.2.2.	Optimisation du système de culture	171
2.2.3.	Validation du système de culture	179
2.2.4.	Détermination des conditions de culture et d'échantillonnage	185
2.3.	Protocole expérimental	189
2.3.1.	Milieus de culture et incubation	189
2.3.2.	Extraction des métabolites pour l'analyse métabolique	190

2.3.3.	Analyse métabolomique et acquisition de données LC-ESI-MS et MS/MS	190
2.3.4.	Traitement et analyse des données métabolomiques	191
2.3.5.	Analyses biochimiques	192
3.	Résultats	196
3.1.	Salinité et pH	196
3.2.	Azote résiduel et statut azoté	197
3.3.	Concentration cellulaire, diamètre cellulaire et biovolume	199
3.4.	Cytométrie en flux	203
3.5.	Activité photosynthétique et pigments	203
3.6.	ATR-FTIR	206
3.7.	Analyses métabolomiques	208
4.	Discussion	212
4.1.	Validation du protocole utilisé	212
4.2.	Influence de la limitation en nitrate sur la production macromoléculaire des biofilms	214
4.3.	Diversité des métabolites lors d'une limitation par le nitrate	216
5.	Conclusion	220
Conclusion générale et Perspectives		223
Un projet de défrichage		224
Une multitude de contraintes inhérentes...		227
Aux biofilms phototrophes		227
Aux interactions entre les microalgues et leur environnement		229
Aux essais biologiques		230
Qui nécessitent des recherches spécifiques		231
Une première étude contrôlée sur l'effet de l'azote : s'éloigner du sujet initial pour mieux y revenir		232
Bibliographie		236
Annexes		267
Abstract		332
Résumé		356

LISTE DES FIGURES

INTRODUCTION GENERALE

Figure 1 : Schéma des grandes catégories du métabolisme d'un organisme.	38
Figure 2 : Catégories de composés sémiocchimiques et infochimiques utilisée en écologie chimique.	41
Figure 3 : Interactions possibles dans des contextes tritrophique ou bitrophique en écologie chimique.	42
Figure 4 : Schéma des principales théories utilisées en écologie chimique pour l'investissement en composés de défense.	44
Figure 5 : Démarche dans la création d'un protocole en écologie chimique. A) Types d'essai biologique. B) Démarche classique pour l'identification d'une molécule bioactive dans une interaction sémiocchimique.	47
Figure 6 : Arbre phylogénétique représentant les principales lignées de microalgues. Les couleurs indiquent les groupes taxonomiques considérés comme des microalgues.	49
Figure 7 : Analogie entre la rhizosphère d'une plante supérieure et la phycosphère d'une cellule de phytoplancton.	51
Figure 8 : Différents procédés de formation et de maintien des bactéries au sein de la phycosphère du phytoplancton.	51
Figure 9 : Représentation non-exhaustive des interactions mutualistes (à gauche) et algicides (à droite) entre le phytoplancton et les bactéries qui peuvent se produire dans la phycosphère.	52
Figure 10 : Schéma simplifié des voies d'absorption et de transport de l'azote inorganique et organique.	54
Figure 11 : Voies de biosynthèse du métabolisme primaire et secondaire/spécialisé.	55
Figure 12 : Exemple schématique de systèmes de culture de microalgues.	58
Figure 13 : A) Comparaison de cultures de microalgues en suspension et en biofilm. B) Composition de la matrice d'EPS dans un biofilm.	60
Figure 14 : Diversité de formes des biofilms et des agrégats microbiens.	60
Figure 15 : Étapes d'encrassement biologique, ou biofouling, dans un milieu aquatique.	62
Figure 16 : Développement d'un biofilm phototrophe plurispécifique.	64
Figure 17 : Représentation infographique des cellules du genre <i>Tetraselmis</i>	70
Figure 18 : Représentation schématique de la phycosphère de la microalgue <i>Tetraselmis suecica</i> F&M-M33 et des potentielles interactions avec deux souches bactériennes isolées de la phycosphère.	71

CHAPITRE I : INFLUENCES DE LA SOURCE ET DE LA CONCENTRATION D'AZOTE SUR LA PRODUCTION DE COMPOSES TOXIQUES ET ALLELOPATHIQUES CHEZ LES MICROALGUES ET LES CYANOBACTERIES : UNE REVUE DE SYNTHESE

Figure 19 : Structure moléculaire de la cylindrospermopsine (CYN).	79
Figure 20 : Structure moléculaire des TPFs.	83

Figure 21 : Structures moléculaires des A) microcystines (MCs), B) nodularines (NODs), et C) acides aminés associés.	90
Figure 22 : Structures moléculaires de la palytoxine (PLTX) et de l'ovatoxine-a (OVTX-a).	98
Figure 23 : Structure moléculaire de l'acide domoïque (AD).	100
Figure 24 : Structures moléculaires des azaspiracides (AZAs).	104
Figure 25 : Structure moléculaire de l'anatoxine-a (ATX-A).	105
Figure 26 : Structures moléculaires des spirolides (SPXs).	106
Figure 27 : Structures moléculaires des ciguatoxines (CTXs).	108
Figure 28 : Structures moléculaires des toxines diarrhéiques des fruits de mer (TDFs).	109
Figure 29 : Structures moléculaires des brevétocines (PbTx).	113
Figure 30 : Structures moléculaires des karlotoxines (KmTx).	115

CHAPITRE II : RECHERCHE DE COMPOSES BIOACTIFS ANTIBACTERIENS ET ANTICANCEREUX ISSUS DE BIOFILMS DES MICROALGUES *TETRASELMIS SUECICA* ET *CYLINDROTHECA CLOSTERIUM* PAR CRIBLAGE PHYTOCHIMIQUE

Figure 31 : (A) Biofilm de <i>Cylindrotheca closterium</i> se développant sur un cylindre rotatif. (B) Pâte fraîche de biofilm de <i>C. closterium</i> récolté. (C) Lyophilisat de biofilm de <i>Tetraselmis suecica</i>	133
Figure 32 : Schéma récapitulatif du protocole appliqué pour estimer la croissance cellulaire des souches bactériennes cibles.	135
Figure 33 : (A) Tableau récapitulatif des gammes d'extraits réalisés avec les biofilms de <i>T. suecica</i> et <i>C. closterium</i> . (B) photographies de la gamme d'extraits de <i>C. closterium</i> , et (C) solvants utilisés.	137
Figure 34 : Dispositif mis au point pour la prise d'image des tests de diffusion.	141
Figure 35 : Courbes de croissance des souches bactériennes cibles pathogènes issues du BCCM, incubées à 25°C et à l'obscurité, estimées d'après la densité optique à 600 nm (A) , et la concentration cellulaire (B)	143
Figure 36 : Antibiogrammes sur les bactéries cibles issues du BCCM.	145
Figure 37 : Test de sensibilité au diméthylsulfoxyde (DMSO) dilué ou non avec de l'eau milliQ (EMQ) sur les bactéries cibles issues du BCCM.	146
Figure 38 : Tests de diffusion d'extrait <i>Tetraselmis suecica</i> sur les bactéries cibles issues du BCCM.	147
Figure 39 : Tests de diffusion d'extrait de <i>Tetraselmis suecica</i> sur les bactéries cibles issues du BCCM, réalisés par l'intermédiaire de disques de diffusion ou de puits.	148
Figure 40 : Effets relatifs de différents extraits aqueux, éthanolique et acétoniques de biofilms de <i>Tetraselmis suecica</i> AC254 resolubilisés dans du DMSO sur la viabilité cellulaire de lignées saines (HEK-293) et cancéreuses (A2058 et MDA-MB-231) humaines par rapport aux contrôles.	149
Figure 41 : Effets relatifs de différents extraits de biofilms de <i>Cylindrotheca closterium</i> AC170 sur la viabilité cellulaire de lignées saine (CCD45 SK) et cancéreuse (MDA-MB-231) humaines par rapport à leurs contrôles respectifs.	151
Figure 42 : Schéma récapitulatif du protocole réalisé au cours de nos travaux (A) et d'un protocole envisagé pour de futurs travaux (B)	161

CHAPITRE III : ETUDE DE L'EFFET D'UNE LIMITATION EN AZOTE SUR LE METABOLOME DE BIOFILMS DE *TETRASELMIS SUECICA*

Figure 43 : Représentation schématique des différents systèmes de culture envisagés pour une étude métabolomique en conditions contrôlées de laboratoire.....	169
Figure 44 : Représentation schématique des différents dispositifs d'incubation de cultures de biofilm de microalgues en erlenmeyers qui ont été à l'étude.	170
Figure 45 : Exemple de distributions obtenues avec le compteur optique de particules HIAC.	175
Figure 46 : Évolution de la densité cellulaire (A) et du biovolume (B) de la microalgue <i>Tetraselmis suecica</i> cultivée dans différentes conditions afin d'identifier les paramètres pouvant limiter sa croissance.....	176
Figure 47 : A) Représentation schématique du système de culture optimisé de biofilm de <i>Tetraselmis suecica</i> à l'intérieur d'une chambre d'incubation SANYO MLR-351.....	178
Figure 48 : Concentration cellulaire (A,B,C) et biovolume (D,E,F) à t_0 et t_7 de la totalité et des différentes fractions du biofilm de <i>Tetraselmis suecica</i> incubée durant 7 jours.....	182
Figure 49 : Évolutions de la densité (A) et du biovolume (B) cellulaires dans les différentes fractions et dans la totalité du biofilm de <i>Tetraselmis suecica</i> durant 8 jours d'incubation.....	183
Figure 50 : Évolution de la salinité (trait plein) et pH (trait hachuré) dans des cultures de biofilm de <i>Tetraselmis suecica</i> durant 8 jours d'incubation.	184
Figure 51 : Évolution du nitrate résiduel (en μM) au cours du temps dans des cultures de biofilm de <i>Tetraselmis suecica</i> durant 8 jours d'incubation. Les valeurs moyennes sont représentées par des points et les écarts-types par des barres. La courbe d'étalonnage est en Annexe 6	184
Figure 52 : Ajustement du modèle de Droop (trait continu) à des données (cercles) de densité cellulaire et d'azote résiduel mesurés dans une culture en batch de <i>T. suecica</i>	187
Figure 53 : La figure ci-dessus montre qu'en utilisant les conditions initiales indiquées dans les tableaux de droite pour chaque condition, il est possible d'obtenir au bout de trois jours (bande jaune) des biofilms qui respectent les critères énoncés dans le texte. Ce sont donc ces conditions initiales qui seront utilisées dans notre expérience.....	188
Figure 54 : Salinité mesurée à partir de la fraction Fr-SN de chaque culture et blanc.	196
Figure 55 : pH mesuré en fin d'expérience dans le surnageant des cultures limitées en N (LA) ou non (NLA)..	196
Figure 56 : Rapport C:N mesuré dans les différentes fractions de biofilms de <i>T. suecica</i> AC254 dans des cultures limitées en N (LA) ou non (NLA).....	198
Figure 57 : Concentration cellulaire mesurée dans les différentes fractions de biofilms de <i>T. suecica</i> AC254 dans des cultures limitées en N (LA) ou non (NLA).....	200
Figure 58 : Biovolume cellulaire mesuré dans les différentes fractions de biofilms de <i>T. suecica</i> AC254 dans des cultures limitées en N (LA) ou non (NLA).....	201
Figure 59 : Diamètre cellulaire moyen mesuré dans les différentes fractions de biofilms de <i>T. suecica</i> AC254 dans des cultures limitées en N (LA) ou non (NLA).....	202

Figure 60 : Rendement quantique (□) mesuré dans les différentes factions de biofilms de <i>T. suecica</i> AC254 dans des cultures limitées en N (LA) ou non (NLA).....	203
Figure 61 : Pigments par unité de biovolume cellulaire mesurés dans les différentes factions de biofilms de <i>T. suecica</i> AC254 dans des cultures limitées en N (LA) ou non (NLA).	205
Figure 62 : Compositions relatives en carbohydrates, lipides et protéines dans les biofilms de <i>T. suecica</i> AC254 pour des cultures limitées en N (LA) ou non (NLA).....	207
Figure 63 : Analyse multivariée des données UHPLC-ESI(+)-QToF-MS provenant d'extraits MeOH de biofilms de <i>T. suecica</i> AC254 cultivés dans des conditions limitées en N (LA) ou non (NLA).	210
Figure 64 : A) Liste des VIPs obtenues à partir de l'analyse des données UHPLC-ESI(+)-QToF-MS/MS issues de biofilms de <i>T. suecica</i> AC254 cultivés dans des conditions limitées en N (LA) ou non (NLA). B) Structures moléculaires supposées des métabolites identifiés et caractérisés.	211
Figure 65 : Schéma du mécanisme d'adhérence supposé chez <i>T. suecica</i> AC254 impliquant l'oxyde nitrique (NO) et dépendant de la concentration en nitrate (NO ₃ ⁻).	221

LISTE DES TABLEAUX

INTRODUCTION GENERALE

Tableau 1 : Exemples de fonctions existant au sein de la matrice des biofilms (repris de [Xiao & Zheng 2016](#)). 66

CHAPITRE II : RECHERCHE DE COMPOSES BIOACTIFS ANTIBACTERIENS ET ANTICANCEREUX ISSUS DE BIOFILMS DES MICROALGUES *TETRASELMIS SUECICA* ET *CYLINDROTHECA CLOSTERIUM* PAR CRIBLAGE PHYTOCHIMIQUE

Tableau 2 : Liste et caractéristiques des bactéries pathogènes d'aquaculture commandées au BCCM..... 134

CHAPITRE III : ETUDE DE L'EFFET D'UNE LIMITATION EN AZOTE SUR LE METABOLOME DE BIOFILMS DE *TETRASELMIS SUECICA*

Tableau 3 : Composition et concentrations molaires (en M) en éléments nutritifs des différentes variantes du milieu f/2 ([Guillard & Ryther 1962](#), [Guillard 1975](#)) utilisés au cours de l'expérience..... 167

Tableau 4 : Conditions nécessaires à la réalisation d'une étude métabolomique dans des conditions contrôlées en laboratoire..... 168

Tableau 5 : Paramètres du modèle de Droop estimés après ajustement du modèle aux données expérimentales (voir **Figure 52**)..... 186

Tableau 6 : Analyses (métabolomiques et biochimiques) réalisées sur les différentes fractions des 20 biofilms de *Tetraselmis suecica* et sur les 4 blancs durant l'expérience. 194

LISTE DES ANNEXES

Annexe 1 : Suivis de la température (°C) et du pH du biofilm de la diatomée <i>Cylindrotheca closterium</i> AC170	267
Annexe 2 : Tests de diffusion réalisés avec les extraits de (A) la gamme TS1 (biofilm de <i>Tetraselmis suecica</i> AC254) et (B) la gamme CC1 (biofilm de <i>Cylindrotheca closterium</i> AC170) sur la bactérie <i>Alteromonas</i> sp.	268
Annexe 3 : Calcul du rapport PUR/PAR pour <i>T. suecica</i> et les différentes sources lumineuses du laboratoire.	269
Annexe 4 : Effets du bullage sur des biofilms de <i>T. suecica</i> cultivés en erlenmeyer	270
Annexe 5 : Photographies d'un biofilm de <i>Tetraselmis suecica</i> prises au microscope optique.....	271
Annexe 6 : Courbe d'étalonnage de la concentration en nitrate (NO ₃ ⁻) mesurée au Technicon, obtenue par ajustement d'un polynôme de degré 2 passant par 0.....	272
Annexe 7 : Paramètres sélectionnés lors du workflow utilisé pour le pré-traitement des données métabolomiques, le traitement des données métabolomiques et des analyses statistiques.	273
Annexe 8 : Analyses statistiques multivariées et les différentes filtrations réalisées sur les données métabolomiques.....	274
Annexe 9 : Photographies du premier système de culture de biofilm de <i>Tetraselmis suecica</i> imagé et utilisé dans un photobioréacteur vertical	289
Annexe 10 : Article soumis à Journal of Chemical Ecology (Springer) basé sur les données du chapitre I (« Influences de la source et de la concentration d'azote sur la production de composés toxiques et allélopathiques chez les microalgues et les cyanobactéries : une revue de synthèse »).....	290
Annexe 11 : Article en préparation basé sur les données du chapitre III (« Etude de l'effet d'une limitation en azote sur le métabolome de biofilms de <i>Tetraselmis suecica</i> »)	324

LISTE DES ABREVIATIONS

AALDs	Acides aminés libres dissous
AAs	Acides aminés
Ac	Acétone
Ac_1, 2, 3	Extraits acétoniques de biofilms de <i>Tetraselmis suecica</i>
ACP	Analyse en composantes principales
AD	Acide domoïque
AGMIs	Acides gras monoinsaturés
AGPIs	Acides gras polyinsaturés
AGs	Acides gras
AGSs	Acides gras saturés
Ala	Alanine
ANR	Agence nationale de la recherche
AnthexaX	Anthéroxanthine
AO	Acide okadaïque
aoaA	Gène codant pour une amidinotransférase impliquée dans la biosynthèse de cylindrospermopsine
aoaC	Gène codant pour une polykétide synthase impliquée dans la biosynthèse de cylindrospermopsine
APase	Phosphatase alcaline
Arg	Arginine
Asp	Acide aspartique
ATR-FTIR	Spectroscopie Infrarouge à transformée de Fourier à réflectance totale atténuée
ATX-A	Anatoxine-a
AZAs	Azaspiracides
B₁	Thiamine
B₁₂	Cyanocobalamine
BCCM	<i>Belgian Coordinated Collections of Microorganisms</i>
BChl <i>a</i>	Bactériorhodospirille <i>a</i>
BIOCORE	<i>Modelling and Control of Renewable Resources</i>
BMAA	β-N-méthylamino-L-alanine
C	Carbone
CC1, 2	Gamme d'extraits de biofilms de <i>Cylindrotheca closterium</i>
CEBs	Composés extracellulaires bioactifs
CFP	Ciguatera ou intoxication ciguatérique
CFU	<i>Colony Forming Unit (unité formatrice de colonie)</i>
CLSM	<i>Confocal Laser Scanning Microscopy</i>
CMI	Concentration minimale inhibitrice
CN	Contrôle négatif
CNBH	<i>Carbon-Nutrient Balance Hypothesis</i>

COD	Carbone organique dissous
COVs	Composés organiques volatiles
C_p	Carbones particulaire
CTXs	Ciguatoxines
CV	Coefficient de variation
CYN	Cylindrospermopsine
DAB	Acide α - γ , -diaminobutyrique
DCM	Dichlorométhane
dcSTX	Décarbamoysaxitoxine
Dha	Acide 3-deoxy-lyxo-2-heptulosarique
DMSO	Diméthylsulfoxyde
DO_{680nm}	Densité optique à 680 nm
DTXs	Dinophysistoxines
EANs	Efflorescences d'algues nocives de grande ampleur
EC	Écologie chimique
ECM	Écologie Chimique Marine
ED 129	École Doctorale des Sciences de l'Environnement d'Île-de-France
EdM_f	Eau de mer filtrée
ELL	Extraction liquide-liquide
EMQ	Eau milliQ
EMQ_1, 2, 3	Extraits aqueux de biofilms de <i>Tetraselmis suecica</i>
EPA	Acide eicosapentaénoïque
EPS	<i>Extracellular Polymeric Substances</i>
EtOH	Éthanol
Fr-BF	Fraction du biofilm de <i>Tetraselmis suecica</i> constituée de cellules fortement adhérentes
Fr-L1	Fraction du biofilm de <i>Tetraselmis suecica</i> constituée de cellules moyennement adhérentes après un premier lavage
Fr-L123	Fraction du biofilm de <i>Tetraselmis suecica</i> constituée de cellules moyennement adhérentes. Somme des fractions Fr-L1, Fr-L2 et Fr-L3
Fr-L2	Fraction du biofilm de <i>Tetraselmis suecica</i> constituée de cellules moyennement adhérentes après un deuxième lavage
Fr-L3	Fraction du biofilm de <i>Tetraselmis suecica</i> constituée de cellules moyennement adhérentes après un troisième lavage
Fr-SN	Fraction du biofilm de <i>Tetraselmis suecica</i> constituée de cellules restées planctoniques ou non-adhérentes
GC	Chromatographie gazeuse
GDBH	<i>Growth-Differentiation Balance Hypothesis</i>
GenM	Gentamycine
GLU	L-glutamine
Glu	Acide glutamique
GOGAT	Glutamate synthase
GS	Glutamine synthétase
GTX-2	Gonyautoxine 2

GTX-4	Gonyautoxine 4
GTXs	Gonyautoxines
H	Biotine
HCl	Acide chlorhydrique
HexCer	Glycosphingolipides
HPLC	Chromatographie liquide haute performance
IAEA	Agence internationale de l'énergie atomique
IAF	Intoxication aux fruits de mer
IDF	Intoxication diarrhéique par des fruits de mer
IMBE	Institut Méditerranéen de Biodiversité et d'Ecologie
IMEV	Institut de la mer de Villefranche
IR	Spectroscopie infrarouge
ISCE	<i>International Society of Chemical Ecology</i>
ISF	Fragment <i>In-Source</i>
JCE	<i>Journal of Chemical Ecology</i>
Kdo	Acide 3-déoxy-d-manno-oct-2-ulosonique
KmTx	Karlotoxines
LA	<i>Listonella anguillarum</i> LMG 11684 (uniquement dans le chapitre II)
LA	Conditions limitées en NO ₃ ⁻ (uniquement dans le chapitre III et la conclusion générale)
LC	Chromatographie liquide
Leu	Leucine
LGPM	Laboratoire de Génies des Procédés et Matériaux
LIENNs	Laboratoire Littoral Environnement et Sociétés
LOV	Laboratoire d'Océanographie de Villefranche
Lys	Lysine
MARBEC	<i>Marine Biodiversity, Exploitation & Conservation</i>
MB	Marine Broth
MB 2%	Milieu MB gélosé avec 2% d'agar-agar
MC-LR	Microcystine-LR
MC-RR	Microcystine-RR
MCs	Microcystines
<i>mcvABC</i>	Gènes codants pour des peptides synthétases impliqués dans la biosynthèse de microcystines
<i>mcvD</i>	Gène codant pour une polycétide synthase impliqués dans la biosynthèse de microcystines
<i>mcvEG</i>	Gènes codants pour des enzymes chimériques impliquées dans la biosynthèse de microcystines
<i>mcvH</i>	Gène codant pour un transporteur ABC putatif impliqué dans la biosynthèse de microcystines
<i>mcvJ</i>	Gène codant pour une enzyme putative de modification des peptides impliquée dans la biosynthèse de microcystines
<i>mcvT</i>	Gène codant pour une thioestérase putative impliquée dans la biosynthèse de microcystines

MeOH	Méthanol
MGDG	Monogalactosyldiacylglycérols
MICALIS	Microbiologie de l'Alimentation au service de la Santé
MS	Spectrométrie de masse
MTT	Bromure de 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium
N	Azote
N₂	Diazote
NaHCO₃	Bicarbonate de sodium
NaOH	Soude
NAR	Perméase permettant le transport de nitrite dans le chloroplaste
NCS	<i>Nucleobase cation symporter</i>
NéoM	Néomycine
NeoX	Néoxanthine
N-Evap	Evaporateur à soufflette
NH₃	Ammoniac
NH₄⁺	Ammonium
NID	Azote inorganique dissous
N_{inorga}	Azote inorganique
NLA	Conditions non limitées en NO ₃ ⁻
NO	Oxyde nitrique
NO₂⁻	Nitrite
NO₃⁻	Nitrate
NODs	Nodularines
N_{orga}	Azote organique
NOS	Synthases d'oxyde nitrique
N_p	Nitrates particuliers
N_R	Nitrates résiduels
NR	Nitrates réductases
NSP	Intoxication neurotoxique
OA	Acide okadaïque
OCT	<i>Optical Coherence Tomography</i>
ODT	<i>Optimal Defense Theory</i>
OVTX-a	Ovatoxine-a
OVTXs	Ovatoxines
P	Phosphore
PAR	<i>Photosynthetically Active Radiation</i>
PAT	<i>Plant Apparency Theory</i>
PBEx	<i>Photobiofilm Explorer</i> (projet ANR)
PBRp	Photobioréacteur plat
PBRr	Photobioréacteur rotatif
PBRs	Photobioréacteurs

PBRv	Photobioréacteur vertical
PbTx	Brévétotoxines
PKS	Polycétides synthases
PLS-DA	Analyse discriminante des moindres carrés partiels
PLTX	Palytoxine
PMA_s	Polyméthoxy-1-alcènes
PO₄³⁻	Phosphate
PSII	Photosystème II
PTX_s	Pecténotoxines
PUR	<i>Photosynthetically Usable Radiation</i>
QC	<i>Quality control</i>
QS	<i>Quorum sensing</i>
RAH	<i>Resource Availability Hypothesis</i>
RMN	Spectroscopie à résonance magnétique
ROS	Espèces réactives de l'oxygène
SAPIGH	Service d'Analyses de Pigments par HPLC
Ser	Sérine
SPX_s	<i>Spirolides</i>
StM	<i>Streptomycine</i>
STX	<i>Saxitoxine</i>
TChl a	Chlorophylle <i>a</i>
TChl b	Chlorophylle <i>b</i>
TDF_s	Toxines diarrhéiques des fruits de mer
THG	Transfert horizontal de gènes
Thr	Thréonine
TS1, 2	Gamme d'extraits de biofilms de <i>Tetraselmis suecica</i>
TS3_Em:Dm	Extraits MeOH:DCM (1:1) de biofilm de <i>Tetraselmis suecica</i> resolubilisés dans un mélange MeOH:DMSO (1:1) pour obtenir une concentration de 50,4 mg.mL ⁻¹
TS3_Em:M	Extrait TS3_M dilué avec de l'EMQ (concentré 18,6 mg.mL ⁻¹)
TS3_Et	Extrait éthanolique de biofilm de <i>Tetraselmis suecica</i> (concentré à environ 50 mg.mL ⁻¹)
TS3_M	Extraits MeOH:DCM (1:1) de biofilm de <i>Tetraselmis suecica</i> resolubilisé dans du MeOH pour une concentration finale de 57,1 mg.mL ⁻¹
TS3_M:Dc	Extraits MeOH:DCM (1:1) de biofilm de <i>Tetraselmis suecica</i> resolubilisé dans un mélange MeOH:DCM (1:1) pour obtenir une concentration de 50,4 mg.mL ⁻¹
VA	<i>Vibrio aestuarianus</i> LMG 24517
Val	Valine
VanM	Vancomycine
VC	<i>Vibrio campbelli</i> LMG 22888
VF	<i>Vibrio fortis</i> LMG 21557
VH	<i>Vibrio harveyi</i> LMG 13949
VI	<i>Vibrio ichthyenteri</i> LMG 19664
ViolaX	Violaxanthine

VIPs	<i>Variable importance in projection</i>
VK	<i>Vibrio kanaloae</i> LMG 21522
VO	<i>Vibrio owensii</i> LMG 20370
VP	<i>Vibrio penaeicida</i> LMG 19663
VS	<i>Vibrio splendidus</i> LMG 19031
YTXs	Yessotoxines
ZeaX	Zéaxanthine

*"Nous avons besoin du sud à tout prix, d'accents limpides, innocents,
joyeux, heureux et délicats"*

*Friedrich Nietzsche
Correspondances*

INTRODUCTION GENERALE

Avant-propos

Mes travaux de thèse sont une contribution au projet *Photobiofilm Explorer* (PBEx, [ANR](#)), auquel plusieurs laboratoires (BIOCORE, LPGM, MARBEC, MICALIS, Inalve)¹ ont apporté leur expertise. Le but de ce projet était d'améliorer les connaissances sur les biofilms de microalgues, avec notamment l'hypothèse principale suivante : la résistance à la contamination biologique plus importante observée dans les biofilms de microalgues par rapport aux cultures planctoniques est due à une exacerbation des effets de composés allélopathiques d'intérêt, notamment ceux impliqués dans la défense, exacerbation résultant du confinement des micro-organismes au sein la matrice des biofilms.

¹ BIOCORE : *Modelling and Control of Renewable Resources*, INRIA (PI du projet).

LPGM : Laboratoire de Génies des Procédés et Matériaux, CentraleSupélec.

MARBEC : *Marine Biodiversity, Exploitation & Conservation*, Ifremer, CNRS, IRD, Univ. de Montpellier.

MICALIS : Microbiologie de l'Alimentation au service de la Santé, INRAE.

INALVE : Startup accueillie à l'Institut de la mer de Villefranche (IMEV).

1.Écologie chimique marine

Dans le monde du vivant, il existe une multitude de modes de communication. Parmi ces derniers, les signaux chimiques qui transmettent diverses informations entre individus ou groupes d'individus appartenant ou non à la même espèce, sont fréquemment utilisés chez les végétaux, les insectes et les microorganismes ([Howse et al. 1998](#), [Harborne 2001](#), [Brown et al. 2019](#)). Ayant, au cours de son évolution, davantage développé les modes de communication visuelle et sonore au détriment des échanges olfactifs médiés chimiquement, l'espèce humaine a cependant conservé quelques réceptivités aux signaux chimiques. Par exemple, des indices d'une reconnaissance mère-enfant impliquant des signaux olfactifs ont été mis en évidence chez l'humain ([Vaglio 2009](#)). Alors qu'ils sont relativement peu développés chez les êtres humains qui interagissent davantage par d'autres moyens (parole, vision, toucher...), les signaux chimiques sont omniprésents dans le monde du vivant. La discipline portant sur l'étude de ce type de communication se dénomme Écologie chimique (EC). Elle se désigne comme la science qui étudie la structure, la fonction, l'origine et le mode d'action des substances chimiques naturelles servant de médiateurs aux interactions intra- ou interspécifiques entre des organismes émetteurs et récepteurs, dont le comportement et la physiologie peuvent être modifiés ([Drijfhout 2017](#)). L'application des principes de l'écologie chimique aux spécificités du monde aquatique (variations des conditions nutritives, lumineuses ou thermiques dans la colonne d'eau et la proximité des côtes, salinité, forte viscosité favorisant la persistance des composés chimiques dans le milieu) constitue la discipline dénommée Écologie Chimique Marine (ECM), dont l'intérêt porté par la communauté scientifique a été croissant depuis les années 90 ([Pohnert et al. 2007](#), [Paul & Ritson-Williams 2008](#), [Hay 2009](#)).

1.1. Historique et définitions

1.1.1. Histoire de l'écologie chimique marine

La naissance de l'EC en tant que discipline scientifique remonte à la découverte en 1959 de la première substance sémiochimique, le bombykol, une phéromone sexuelle produite par la femelle du ver à soie *Bombyx mori*, dont la caractérisation a nécessité 20 années de travaux et le sacrifice d'un grand nombre d'individus ([Butenandt 1959](#), [Drijfhout 2017](#)). Plusieurs autres dates ont marqué la progression cette discipline : le lancement du premier journal spécialisé

Journal of Chemical Ecology (JCE) en 1975, la première réunion internationale sur la chimie des insectes en 1979 organisée à Borgholm (Suède), la création de la Société Internationale d'Écologie Chimique (*International Society of Chemical Ecology*, ISCE) en 1984 ou encore la création de l'Institut Max Planck d'écologie chimique à Iéna (Allemagne) (Drijfhout 2017). La sous-discipline que représente l'ECM est le fruit, après les années 80, de collaborations entre chimistes et écologues qui, auparavant, travaillaient séparément : les chimistes découvraient de nouvelles molécules bioactives mais utilisaient des bioessais sans fondements écologiques cohérents, tandis que les écologues réalisaient des expériences dont les résultats suggéraient la présence de composés chimiques de médiation sans forcément qu'ils en déterminent la structure (Hay 2014).

Dans les écosystèmes aquatiques, les médiateurs chimiques sont omniprésents. Ils agissent sur l'alimentation des organismes, leur habitat (abri, territoire), leur aspect, leurs stades de vie (ex : métamorphose, mue), leur reproduction, la gestion de leur descendance ou encore la compétition entre individus. Ces composés de médiation peuvent être émis et réceptionnés par tout type d'organismes, macro- ou microscopiques, eucaryotes ou procaryotes, et à n'importe quel niveau trophique (Hay 2009). Par exemple, un concept important en EC et en ECM est l'odeur de la mort (*the smell of death* en anglais). Elle est due à des composés et des toxines produites par les bactéries décomposant une carcasse par exemple. Étant répulsifs pour d'autres microbes ou animaux charognards (Burkepile *et al.* 2006), ils confèrent aux bactéries émettrices un avantage compétitif. D'une façon générale, les médiateurs chimiques, en agissant sur le comportement des individus, participent à l'organisation des communautés et au fonctionnement des écosystèmes aquatiques (Hay 2009). Toutefois, les études d'ECM ont majoritairement porté sur des composés de défense produits pour dissuader des prédateurs, des pathogènes ou des concurrents, et restent lacunaires sur les composés susceptibles de stimuler l'alimentation et la reproduction (Hay 2009).

1.1.2. Définitions utilisées en écologie chimique

Comme toutes sciences du vivant, l'EC étudie le fonctionnement des organismes à différents niveaux de leur machinerie cellulaire : le génome (ensemble des séquences d'ADN), le transcriptome (ensemble des transcrits ou ARNm), le protéome (ensemble des protéines) et le métabolome (ensemble des métabolites, c'est-à-dire toutes les « petites » molécules n'appartenant pas aux catégories précédentes) (Horgan & Kenny 2011). Le métabolisme d'un

organisme est traditionnellement divisé en 3 groupes : (i) le métabolisme primaire, qui implique tout métabolite (généralement des macromolécules) jouant un rôle dans la croissance et le développement de l'organisme, (ii) le métabolisme spécialisé (ou secondaire), comportant tout métabolite (généralement des petites molécules) impliqué dans les interactions de l'organisme avec son environnement biotique et abiotique, et (iii) les hormones, qui régulent les processus physiologiques entre deux types de cellules présentes dans l'organisme étudié (Erb & Kliebenstein 2020) (Figure 1). L'EC se concentre davantage sur les métabolites secondaires. Toutefois, un métabolite n'appartient pas toujours exclusivement à l'un des 3 groupes précités, et son assignation à l'un d'eux peut être délicate en fonction de l'organisme étudié. Par exemple, l'utilisation du terme *hormone* pour les organismes unicellulaires a fait l'objet d'un consensus difficile (Lenard 1992).

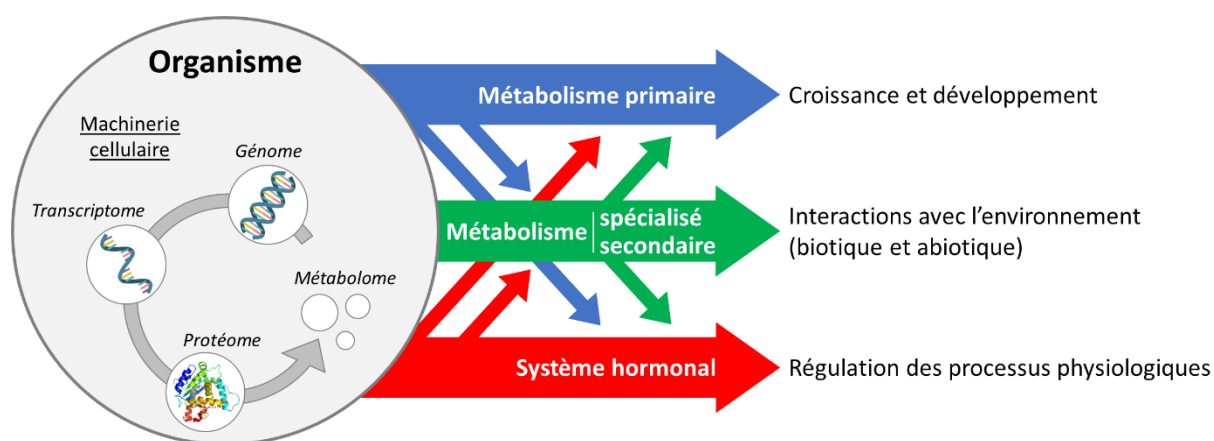


Figure 1 : Schéma des grandes catégories du métabolisme d'un organisme.

Les composés sémiochimiques (du grec *simeon*, une marque ou un signal) désignent tout produit chimique impliqué dans les interactions entre organismes, quel que soient le contexte écologique¹ ou le niveau trophique considéré (Nordlund & Lewis 1976, Dicke & Sabelis 1988). Initialement utilisé par Law & Regnier (1971), le terme *sémiochimie* désignait « des signaux chimiques qui transmettent des informations entre des individus ». Toutefois, les termes *signaux* et *transmettre* sous-entendent que le composé chimique est émis volontairement par un individu afin d'établir une communication avec un autre, excluant la possibilité

¹ Désigne les relations complexes entre les organismes vivants, ainsi qu'entre ces derniers et leur environnement physique. Dans le cadre d'une étude en écologie chimique, un contexte écologique peut être considéré comme cohérent et valide lorsque les organismes étudiés sont capables d'interagir chimiquement *in situ*.

d'interactions non-souhaitées par l'organisme émetteur. Nordlund & Lewis (1976) ont ainsi remplacé le terme *signal* par *produit chimique* et *transmission d'information* par *médiation*.

Les composés sémiochimiques sont subdivisés en deux catégories : (i) les toxines et les nutriments, et (ii) les composés infochimiques. La distinction entre ces catégories dépend du contexte de l'étude. En effet, on utilise les termes *toxines* et *nutriments* lorsque l'on s'intéresse aux effets respectivement délétères ou bénéfiques de ces composés sur un organisme, en dehors de tout contexte écologique. À l'inverse, *composé infochimique* est utilisé lorsque l'on considère le rôle de vecteur d'information de la substance chimique étudiée dans un contexte écologique précis (Dicke & Sabelis 1988). Un composé infochimique se définit ainsi comme une substance qui, en véhiculant une information d'un organisme émetteur vers un organisme récepteur, provoque une réponse comportementale et/ou physiologique chez l'un ou les deux organismes (Dicke & Sabelis 1988). Ainsi, une toxine peut également être un composé infochimique selon le contexte de l'étude, tandis qu'un composé infochimique peut avoir une fonction totalement différente d'une activité toxique ou nutritive.

Les composés infochimiques sont eux-mêmes subdivisés en deux sous-catégories : (i) les composés allélopathiques (ou allélopathie), et (ii) les phéromones. Ces sous-catégories, notamment l'allélopathie, se subdivisent également selon un critère coût-bénéfice¹ (Figure 2).

A l'origine, le terme *allélopathie*, parfois nommée xénomone (du grec *xenos*, étranger) (Chernin 1970), désigne selon Whittaker & Feeny (1971) tout produit chimique émis par un organisme qui est important pour les organismes d'une autre espèce, pour des raisons autres que l'alimentation en tant que telle. Sa définition a cependant été précisée ultérieurement, principalement par Nordlund & Lewis (1976) puis par Dicke & Sabelis (1988). Aujourd'hui, l'allélopathie (du grec *allêlôn*, réciproque, et *pathos*, souffrance) désigne l'action des composés infochimiques qui médient une interaction positive ou négative entre des organismes appartenant à des espèces différentes (interspécifique) (Dicke & Sabelis 1988). L'allélopathie comprend les allomones² (composés favorables pour l'émetteur, défavorables pour le récepteur) (Brown 1968), les kairomones³ (composés défavorables pour l'émetteur, favorables pour le récepteur) (Brown et al. 1970) et les synomones⁴ (composés favorables pour l'émetteur et le

¹ C'est-à-dire le fait qu'un composé infochimique soit bénéfique ou délétère pour l'organisme émetteur et/ou récepteur.

² Du grec *allos*, autre. Dérive du terme *alloiohormone* (Bethe 1932).

³ Du grec *kairos*, opportuniste ou exploiteur.

⁴ Du grec *syn*, avec ou conjointement.

récepteur) (Nordlund & Lewis 1976). Il existe également les apneumones¹, composés similaires aux kairomones, donc favorables à un organisme récepteur, mais qui sont émis par la matière non-vivante sur ou dans laquelle l'organisme subissant le préjudice se situe (Nordlund & Lewis 1976). Ces composés allélopathiques sont représentés par une grande variété de groupes chimiques (acides, aldéhydes, alcaloïdes, peptides, phénols, quinones, terpènes, stéroïdes, etc.) (Drijfhout 2017).

Identifiées pour la première fois par Butenandt (1959) avec la découverte du bombykol chez le ver à soie *Bombyx muri*, les phéromones (du grec *phereum*, porter, et *horman*, exciter ou stimuler) désignent tout composé infochimique qui, à l'inverse des substances allélopathiques, médie une interaction entre organismes de la même espèce (intraspécifique) (Dicke & Sabelis 1988). À ce jour, aucun terme n'a été attribué à des phéromones ayant un critère coût-bénéfice différent, la littérature se limitant à l'utilisation de phéromone (+, +), (+, -) et (-, +)² (Dicke & Sabelis 1988). Les phéromones sont toutefois catégorisées selon le type d'information véhiculée : on retrouve par exemple les phéromones sexuelles (médiation pour une interaction sexuelle entre deux individus), territoriales (marquage de territoire), d'alarme (alerte pour une stratégie de défense commune), épidéictiques (signalement de l'appartenance d'une ressource), de chemin (signalisation de la localisation d'une ressource) ou encore d'agrégation (attirance des adultes des deux sexes, immatures compris, pour l'accouplement ou la défense contre un prédateur), etc (Law & Regnier 1971, Howse *et al.* 1998, Drijfhout 2017). Les phéromones peuvent également être catégorisées en fonction de la dynamique de déclenchement du comportement chez l'organisme récepteur, avec un déclenchement soit immédiat pour les phéromones dites libératrices (*releasers* en anglais), soit différé pour les phéromones d'amorce (*primers* en anglais) (Law & Regnier 1971, Drijfhout 2017).

Ces différentes catégories et sous-catégories ne sont pas mutuellement exclusives et dépendent des contextes écologiques étudiés, un même composé infochimique pouvant avoir différentes fonctions biologiques. Ainsi, une phéromone peut à la fois être une allomone et avoir un rôle dans la physiologie de l'organisme producteur.

¹ Du grec *a-pneum*, essoufflé ou sans vie.

² Notons que les phéromones caractérisées par un critère coût-bénéfice asymétrique entre les deux organismes sont théoriquement possibles d'un point de vue évolutionniste, bien que des divergences de fonction doivent exister selon l'organisme étudié (macro vs. micro, espèce sociale, etc.). Par exemple, une phéromone impliquant une interaction mutualiste est plus probable chez une espèce fortement sociale.

De même, la dénomination de phéromone ou d'allélopathie nécessite de définir préalablement ce qu'est une espèce, point non abordé ici, mais fortement sujet à débat.

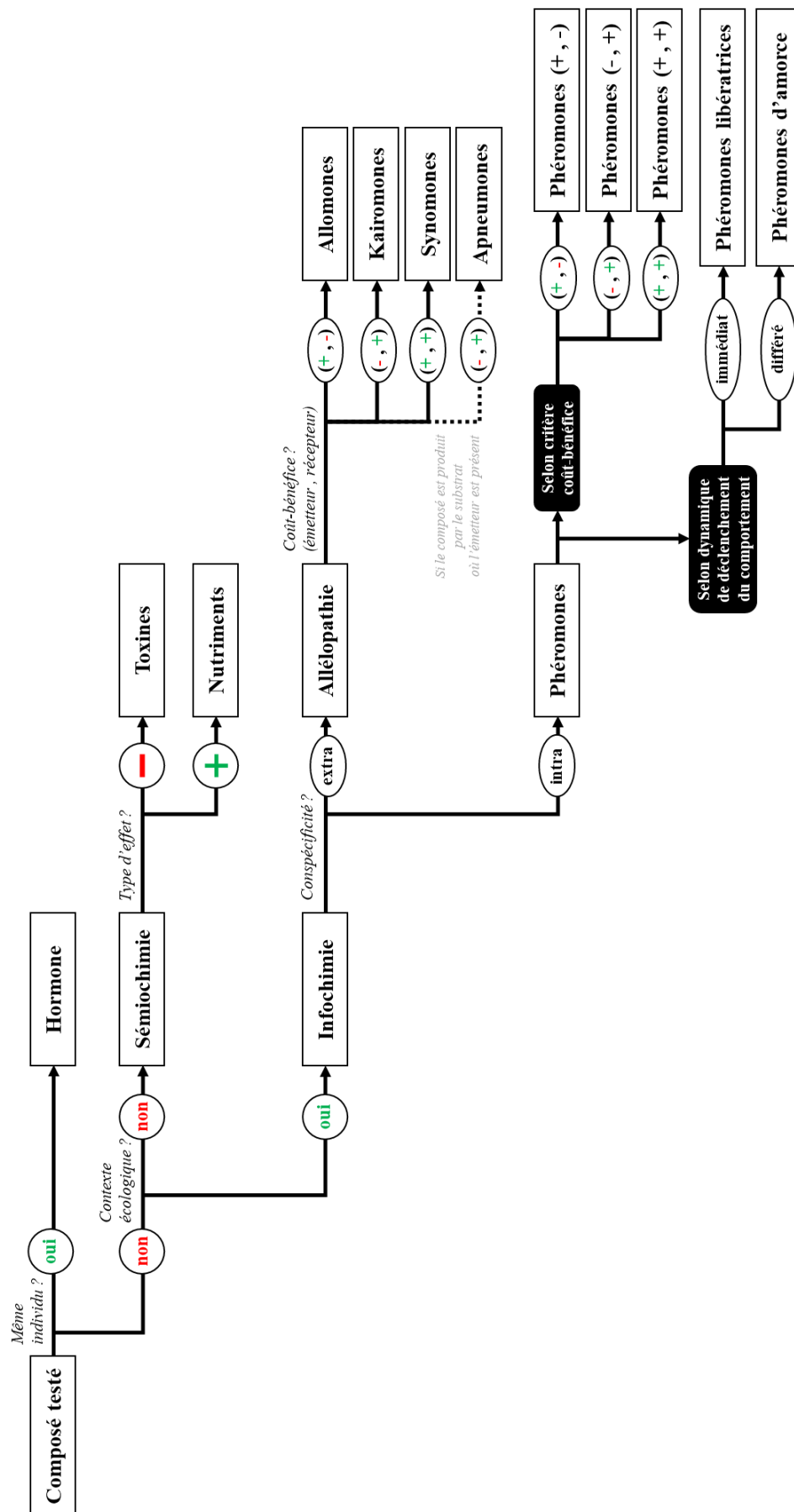


Figure 2 : Catégories de composés sémiochimiques et infochimiques utilisée en écologie chimique.

Les terminologies *sémiochimiques* et *infochimiques* utilisées par Nordlund & Lewis (1976) se basent sur 3 critères dans un contexte exclusivement bitrophique : (i) l'origine du composé, (ii) la conspécificité ou non des deux organismes impliqués (organismes émetteur et récepteur), et (iii) le coût-bénéfice de l'interaction. La possibilité que l'origine du composé soit ambiguë — celui-ci pouvant par exemple être émis par un autre organisme associé à l'organisme initialement qualifié d'émetteur car bénéficiaire de l'interaction — a conduit à considérer des relations tritrophiques plutôt que bitrophiques (Dicke & Sabelis 1988, Vet & Dicke 1992). Celles-ci impliquent un passage de 2 à 5 catégories d'organismes, pas forcément exclusifs entre eux, impliquées dans l'interaction : (i) l'émetteur qui émet le composé infochimique mais ne le produit pas, (ii) le récepteur qui reçoit le composé infochimique, lequel va produire une réponse comportementale et/ou physiologique, (iii) le producteur qui produit le composé infochimique mais ne l'émet pas, (iv) l'acquéreur qui, dans le cas de la présence d'un organisme producteur, acquiert le composé infochimique sans le produire et va donc se confondre avec l'organisme émetteur (ex : acquisition d'un composé issu d'organismes symbiotiques vivants au sein de l'organisme), et (v) l'inducteur, qui affecte la production du composé infochimique (Dicke & Sabelis 1988) (Figure 3). Par exemple, dans le cadre d'une interaction médiée entre deux microalgues, l'origine et les dynamiques de production, d'émission et d'acquisition d'un composé infochimique ne peuvent être établies que si l'on prend en considération les bactéries vivant à leur surface.

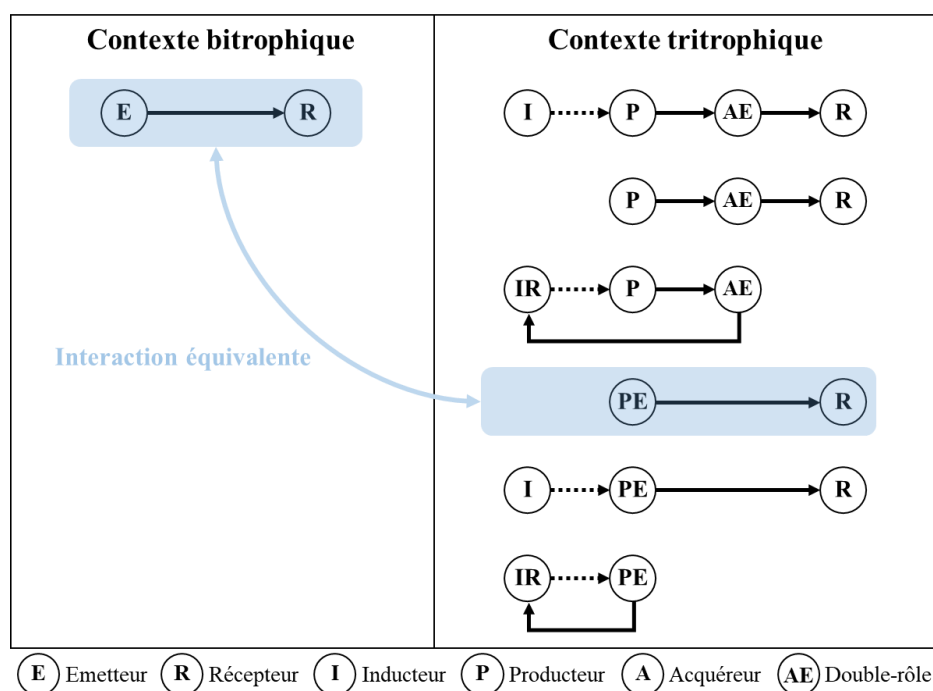


Figure 3 : Interactions possibles dans des contextes tritrophique ou bitrophique en écologie chimique (modifié à partir de Dicke & Sabelis (1988)).

Ainsi, les sources de signaux chimiques sont variées : organisme lui-même, ses produits (ex : fèces, cuticules, exuvies, sécrétions, *etc.*), sa nourriture (ex : feuilles, fleurs, charognes, *etc.*), les organismes associés à sa présence (ex : microorganismes) ou encore les interactions entre diverses sources (ex : indices chimiques issus d'un végétal en train d'être consommé par un herbivore) (Vet & Dicke 1992). Bien qu'éloignées de nos travaux de recherche, la prise en compte des spécificités qu'implique une relation entre deux niveaux trophiques différents, telle que la prédation, reste utile. Dans la relation proie-prédateur, le prédateur est confronté à une grande variété de *stimuli* dont l'utilisation dépend, selon Vet & Dicke (1992), de deux facteurs : (i) sa faculté à indiquer la présence, l'accessibilité et l'adéquation avec sa proie, et (ii) le degré auquel les *stimuli* peuvent être détectés. De ce fait, il est nécessaire de prendre en compte la proximité évolutive de organismes impliqués pour comprendre leurs interactions. Un problème dit de fiabilité-détectabilité se pose alors, avec des considérations sur le caractère inné ou acquis de la réponse des organismes aux composés infochimiques.

La dissémination des composés sémiochimiques diffère également dans l'air et dans l'eau. Dans l'air où leur volatilité doit être favorisée, leur poids moléculaire doit être faible. La plupart des phéromones aéroportées ont un faible poids moléculaire. Dans l'eau, cette contrainte est moindre. Par opposition aux phéromones sexuelles d'insectes, principalement des dérivés d'hydrocarbures comportant 5 à 30 atomes de carbones, les phéromones d'organismes aquatiques ont généralement une masse moléculaire plus élevée qui favorise leur solubilité dans l'eau, une grande partie des phéromones aquatiques connues étant de nature protéique et stéroïdienne (Law & Regnier 1971, Drijfhout 2017).

1.2. Théories

Plusieurs théories et concepts existent dans les disciplines d'EC et d'ECM. On retrouve 5 théories sur la production de composés spécialisés, tels que les composés bioactifs : la théorie de la défense optimale (*Optimal Defense Theory*, ODT), l'hypothèse d'équilibre croissance-différenciation (*Growth-Differentiation Balance Hypothesis*, GDBH), l'hypothèse de l'équilibre carbone-nutriments (*Carbon-Nutrient Balance Hypothesis*, CNBH), la théorie de l'apparence des plantes (*Plant Apparency Theory*, PAT), et l'hypothèse de disponibilité en ressources (*Resource Availability Hypothesis*, RAH) (**Figure 4**) (Loomis 1953, Feeny 1976, McKey 1979, Bryant *et al.* 1983, Coley *et al.* 1985). Ces théories, initialement élaborées pour

les plantes, peuvent s'appliquer à d'autres types d'organismes tels que les microalgues (Allen *et al.* 2018).

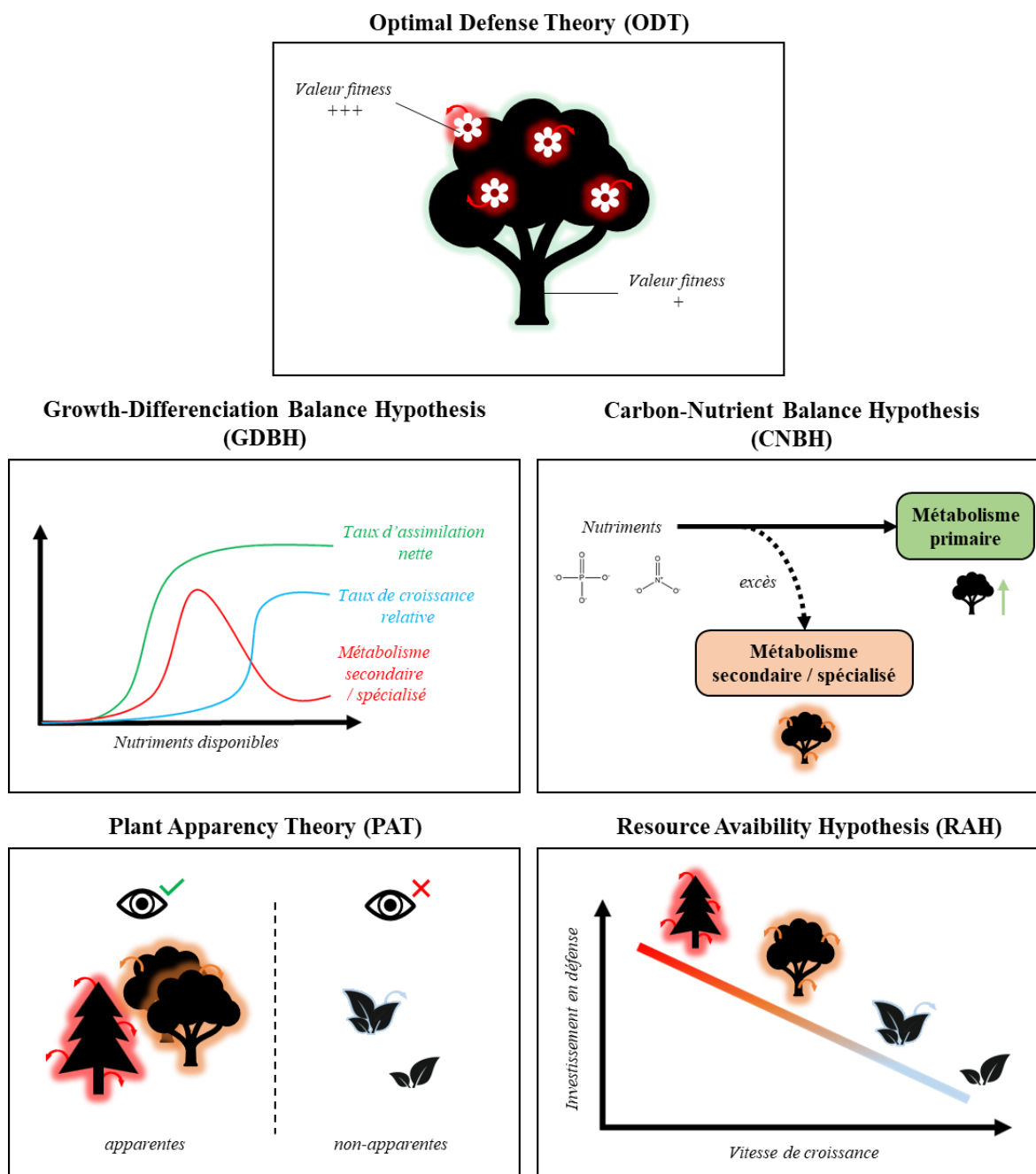


Figure 4 : Schéma des principales théories utilisées en écologie chimique pour l'investissement en composés de défense.

La production de composés de défense étant coûteuse mais bénéfique pour la lutte contre les prédateurs et/parasites, l'ODT suppose que les organismes ajustent le niveau de cette production en fonction de la partie de l'organisme qui est ciblée. Les parties de l'organisme qui

ont une plus grande valeur en termes de fitness, tels que le germen, seraient d'avantage défendus que les autres (McKey 1979). Par opposition avec l'ODT, la GDBH suppose que les organismes répartissent les produits de leur métabolisme entre les processus liés à la défense et ceux liés à la croissance, en fonction des conditions environnementales. Par exemple, une situation où le taux photosynthétique excède transitoirement le taux de croissance peut se traduire par une accumulation de ressources pouvant être investies dans la synthèse de métabolites secondaires (Loomis 1953). La CNBH considère que les organismes réallouent les ressources acquises en excès vers la production de métabolites secondaires (Bryant *et al.* 1983). Proche de l'ODT, la PAT théorise que l'investissement dans la production de composés de défense d'un organisme est modulé par la facilité avec laquelle un prédateur ou un parasite peut le détecter. Les plantes vivaces ou encore les arbres présentent ainsi un fort investissement dans leur défense car ces derniers sont présents toute l'année et donc facilement détectables par leurs prédateurs/parasites (Feeny 1976). Dérivant de la PAT, la RAH suppose que les espèces à croissance rapide investissent davantage dans des composés de défense que les espèces à croissance lente (Coley *et al.* 1985). Allen *et al.* (2018) considèrent qu'il est encore nécessaire aujourd'hui d'envisager de nouvelles théories en écologie chimique.

1.3. Applications

En écologie chimique, les études expérimentales débutent par l'énonciation d'une hypothèse d'interaction médiée par un signal chimique. Par exemple, l'organisme émetteur produit un composé qui modifie le comportement de l'organisme récepteur. La méthodologie utilisée doit prendre en compte le degré de réalisme de l'expérience ainsi que le type et les limites des conclusions attendues (Gross *et al.* 2007) (**Figure 5A**). A ce jour, deux procédés expérimentaux sont principalement utilisés dans la découverte de bioactivités et des molécules associées : (i) le fractionnement guidé par essais biologiques (ou bioessais), et (ii) le profilage par approche métabolomique (Prince & Pohnert 2010).

Dans le cas des bioessais, le procédé consiste à concevoir un modèle expérimental adapté à l'excrétion de molécules d'intérêt par l'organisme émetteur et à leur réception par un ou plusieurs organismes récepteurs. Ainsi, la conceptualisation des bioessais est une étape critique du procédé expérimental, permettant ou non l'attribution d'un terme infochimique aux composés étudiés. Pour cela, la conception du bioessai est guidée par la fonction supposée du ou des composés d'intérêt présents, moyennant des conditions expérimentales les plus réalistes

possibles, ce qui implique une multitude de contraintes expérimentales. Ainsi, pour l'étude d'un composé ayant une fonction supposée d'allomone par exemple, les conditions de culture des organismes émetteurs et récepteurs (la cible) doivent être le plus proches possibles de celles de leur milieu naturel (ce qui suppose que les organismes récepteurs et émetteurs appartiennent au même environnement). Le test doit être conçu afin de limiter l'interférence avec tout autre type d'interactions (ex : compétition pour une ressource), les concentrations des extraits testés doivent être écologiquement pertinentes, le composé doit être excrété dans le milieu par l'organisme émetteur, *etc...*

Un procédé de fractionnement bioguidé, qui commence avec la détection d'une bioactivité manifestée par l'organisme récepteur et se termine par l'isolement du ou des composés chimiques impliqués, doit être mis en place. Le protocole suit plusieurs étapes : (1) la collecte ou la culture de l'organisme émetteur, (2) la ou les extractions du matériel biologique, (3) le fractionnement des extraits, (4) la purification des fractions et (5) l'identification de composés d'intérêt. Chaque étape comprend un test de bioactivité, avec une particularité entre l'étape n°1 et l'étape n°2 où les bioessais nécessitent des protocoles différents, bien que ces bioessais soient souvent éclipsés (**Figure 5B**). Les extractions sont généralement réalisées avec des solvants organiques, dilués ou non, tandis que le fractionnement des extraits peut être réalisé par extraction liquide-liquide (ELL ; ajout d'un solvant organique non miscible avec le solvant utilisé pour l'extraction, formant ainsi deux fractions) ou par l'utilisation de colonnes chromatographiques (telles que les colonnes SPE, pour *Solid Phase Extraction*). L'identification du composé est généralement obtenue à l'aide d'une méthode de séparation par chromatographie liquide (LC) ou gazeuse (GC), couplée à une méthode de détection par spectrométrie de masse (MS), spectroscopie infrarouge (IR) ou à résonance magnétique (RMN). Les méthodes utilisées sont adaptées à la nature chimique du composé d'intérêt et aux conditions matérielles disponibles. Différents problèmes peuvent cependant survenir, comme la perte d'activité d'une molécule due à l'absence d'une autre molécule agissant en synergie ou la dénaturation d'une molécule d'intérêt difficile à purifier.

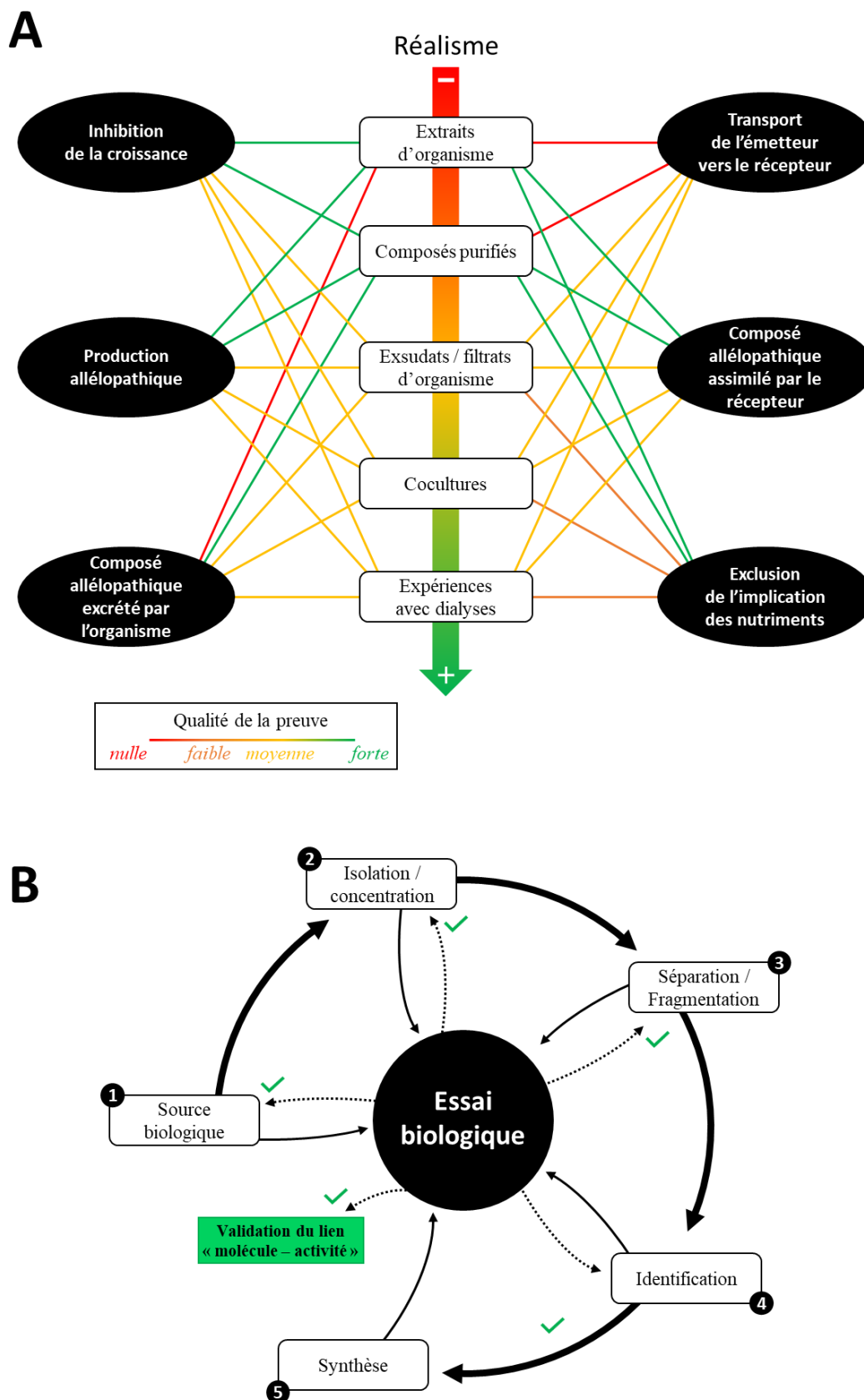


Figure 5 : Démarche dans la création d'un protocole en écologie chimique. **A)** Types d'essai biologique (modifié à partir de [Gross et al. \(2007\)](#), également repris dans [Allen \(2016\)](#)). **B)** Démarche classique pour l'identification d'une molécule bioactive dans une interaction sémiochimique (modifié à partir de [Howse et al. \(1998\)](#)).

Ainsi, nombreuses sont les difficultés rencontrées lors de l'identification de composés infochimiques (Pohnert *et al.* 2007) : (i) des médiateurs chimiques (donc actifs) insuffisamment concentrés et des composés non-actifs trop concentrés peuvent engendrer la même réponse chez un organisme donné, (ii) l'activité peut résulter de la synergie de plusieurs molécules, (iii) des bioessais inadaptés peuvent être la cause d'identifications erronées de composés chimiques de médiation, et (iv) la méthode d'identification guidée par bioessais est chronophage et coûteuse (d'où l'utilisation aujourd'hui de techniques à haut débit).

L'écologie chimique marine présente un intérêt croissant dans le domaine des biotechnologies, notamment dans la découverte et le développement de nouveaux produits pharmaceutiques (pour plus de détails, voir Tan 2023 et les articles associés). La multitude d'interactions médiées par des composés chimiques entre macro- et microorganismes, de même que celles impliquées dans les processus de défense provoquée par la présence de symbiotes ou celles qui existent entre organismes au sein d'un holobionte¹, offre, en termes de structure et de propriété, une diversité de molécules dont la découverte peut être valorisée en santé humaine, et plus généralement en biotechnologie. Par exemple, le *quorum quenching*² des furanones halogénées issues de l'algue rouge *Delisea pulchra* présente des applications dans la prévention du biofouling et de l'infection par divers microorganismes pathogènes (Hentzer *et al.* 2002, Harder *et al.* 2012, Muñoz-Cázares *et al.* 2022) tandis que le psammaline A, un composé qui diminue l'appétit et qui est produit par l'éponge *Aplysinella rhax* lorsqu'elle est prédatée, présente également des activités antibactériennes (Thoms & Schupp 2008, Jing *et al.* 2019).

¹ Entité biologique impliquant un organisme dit hôte et un ensemble d'organismes associés, nommés symbiotes, vivant en codépendance (symbiose) (Simon *et al.* 2019).

² Inhibition du mécanisme de communication chimique bactérienne nommés *quorum sensing*.

2. Microalgues et biofilms phototrophes

2.1. Définitions et phylogénie

Les algues sont un groupe polyphylétique très diversifié, allant d'organismes macroscopiques pluricellulaires de grande taille jusqu'aux micro-organismes unicellulaires. Les microalgues regroupent tous les protistes photosynthétiques (protistes eucaryotes photoautotrophes) unicellulaires ou coloniaux (Singh & Saxena 2015). Elles se classifient en une douzaine de groupes¹ selon des critères pigmentaires, métaboliques, et morphologiques (Figure 6). Les cyanobactéries, bactéries photosynthétiques historiquement nommées algues bleues-vertes, sont souvent associées aux microalgues (Tan *et al.* 2020), et le terme *phytoplankton* regroupe les microalgues *sensu stricto* et les cyanobactéries (Karlusich *et al.* 2020). Par la suite, nous citerons de manière distincte les microalgues et les cyanobactéries afin d'éviter toute confusion.

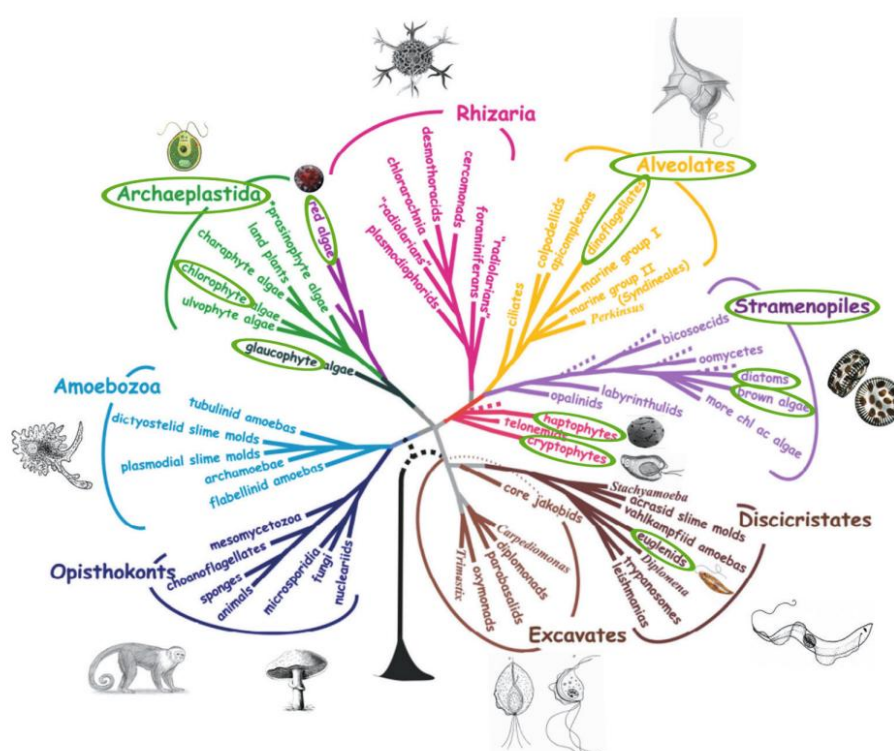


Figure 6 : Arbre phylogénétique représentant les principales lignées de microalgues. Les couleurs indiquent les groupes taxonomiques considérés comme des microalgues (figure issue de Bonnefond *et al.* 2019, initialement modifiée à partir de Baldauf 2008).

¹ Apicomplexanes, Charophytes, Chlorarachniophytes, Chlorophytes, Cryptophytes, Dinoflagellés, Glaucophytes, Euglénoides, Haptophytes, Hétérocontophytes, Rhodophytes.

La grande diversité du phytoplancton en fait un groupe ubiquiste, planétairement disséminé. Ces microorganismes peuvent se développer en eau douce comme salée, sur des surfaces humides immergées et émergées, naturelles comme artificielles, dans des environnements chauds comme froids (Singh & Saxena 2015). Par exemple, les picocyanobactéries des genres *Prochlorococcus* et *Synechococcus* sont détectées dans tous les océans du globe (Doré *et al.* 2023), alors que certaines espèces du genre *Chlamydomonas* peuvent se développer sur la neige des milieux alpins (Remias *et al.* 2005).

2.2. Phycosphère

Les interactions entre microalgues et bactéries sont nombreuses et variées, allant de la coopération à la compétition. Dans un exemple souvent cité de coopération, les bactéries consomment le carbone fixé photosynthétiquement par le phytoplancton et en contrepartie excrètent (reminéralisent) des nutriments nécessaires à la croissance du phytoplancton. Mais ces deux types de micro-organismes peuvent aussi entrer en compétition pour l'utilisation de nutriments inorganiques (Seymour *et al.* 2017).

Équivalente à la rhizosphère des plantes terrestres, la phycosphère désigne le voisinage immédiat d'une microalgue, au sein duquel les exsudats organiques qu'elle excrète favorisent la colonisation par une communauté de bactéries (Rolland *et al.* 2016, Seymour *et al.* 2017) (**Figure 7**). Sa formation est régie par 3 critères : (i) les rencontres aléatoires entre bactérie et microalgue, (ii) la chémotaxie, et (iii) la transmission verticale entre cellule mère et cellules filles (Seymour *et al.* 2017) (**Figure 8**). La concentration bactérienne dans la phycosphère est bien plus importante que dans l'eau environnante (Rolland *et al.* 2016). Pour une espèce de microalgue donnée, une part de la diversité des bactéries de la phycosphère semble rester stable en dépit de conditions environnementales changeantes, contrairement à leur abondance qui peut varier, ce qui suggère que ces bactéries sont le fruit d'une sélection par la microalgue. On parle alors de « noyau » de la phycosphère (Piampiano *et al.* 2019). La phycosphère est un lieu de compétition (entre la microalgue et les bactéries, et entre les bactéries elles-mêmes) et de mutualisme (par le biais d'échanges nutritifs notamment), médiés ou non par des composés infochimiques qui complexifient encore plus la compréhension du fonctionnement de ce micro-écosystème (**Figure 9**). Par exemple, on peut penser que des phycosphères abritent des microalgues capables de détecter des molécules de communication spécifiques aux bactéries, nommées *quorum sensing* (QS), et d'interférer avec leur signal (*quorum quenching*) (Teplitski

et al. 2004, Rajamani *et al.* 2011). De plus, le confinement important des micro-organismes dans la phycosphère est une condition qui accroît leur proximité et donc favorise l'échange de composés infochimiques hydrophobes qui diffusent mal dans l'eau (Rolland *et al.* 2016, Seymour *et al.* 2017).

Ainsi, la phycosphère est une région vitale pour le phytoplancton, qui outre les échanges nutritifs qu'elle procure, est le siège d'une production de composés infochimiques potentiellement fortement sélectionnés pour les informations qu'ils transmettent, que leurs effets soient bénéfiques ou délétères pour les organismes en présence.

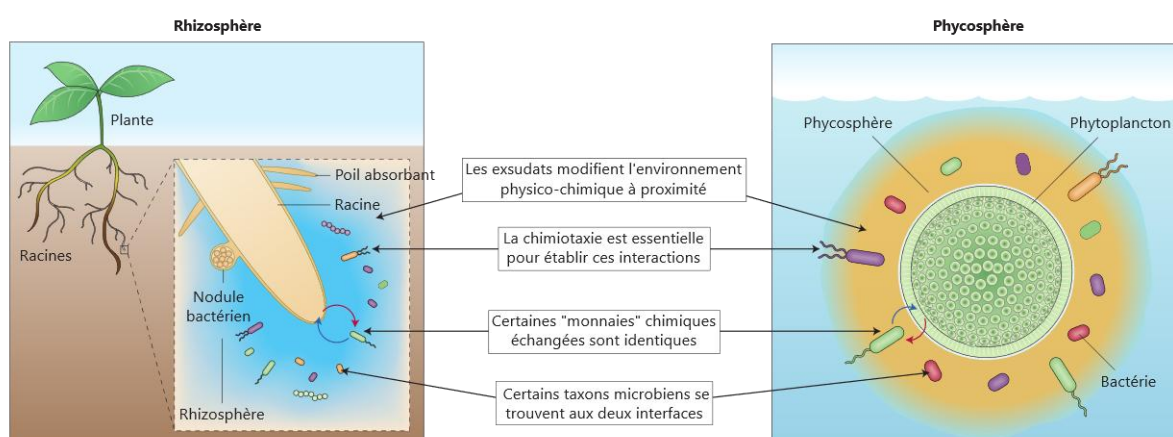


Figure 7 : Analogie entre la rhizosphère d'une plante supérieure et la phycosphère d'une cellule de phytoplancton (repris et traduit de Seymour *et al.* (2017)).

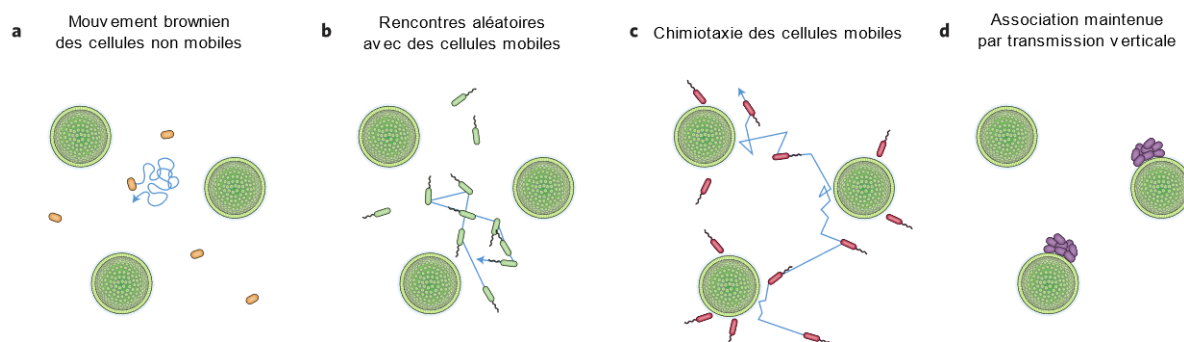


Figure 8 : Différents procédés de formation et de maintien des bactéries au sein de la phycosphère du phytoplancton (repris et traduit de Seymour *et al.* (2017)). **(a)** Les cellules non mobiles se déplacent dans l'environnement de manière aléatoire par mouvement brownien et « heurtent » rarement les cellules de phytoplancton. **(b)** L'augmentation des capacités de déplacement des bactéries mobiles accroît leur taux de rencontre du phytoplancton. **(c)** De nombreuses bactéries marines mobiles présentent également une chimiotaxie envers les exsudats de phytoplancton, ce qui augmente encore leur capacité à migrer vers la phycosphère, puis à y rester. **(d)** Les populations de bactéries non mobiles qui se fixent aux cellules de phytoplancton peuvent conserver un contact prolongé par transmission verticale.

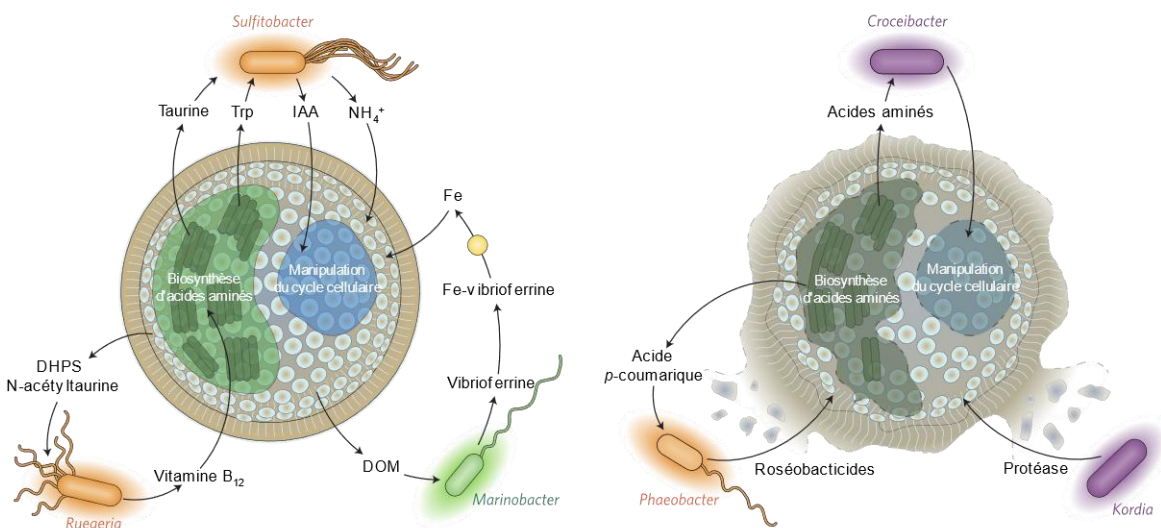


Figure 9 : Représentation non-exhaustive des interactions mutualistes (à gauche) et algicides (à droite) entre le phytoplancton et les bactéries qui peuvent se produire dans la phycosphère (repris et traduit de Seymour et al. (2017)). Les bactéries sont colorées selon leur phylogénie : *Rhodobacteraceae* en orange, *Alteromonadaceae* en vert et *Flavobacteriaceae* en violet. Les ombres autour du phytoplancton et des bactéries représentent les gradients de molécules diffusant hors des cellules. Des interactions mutualistes (à gauche) se produisent entre le phytoplancton et *Sulfitobacter*, *Ruegeria* et *Marinobacter*. Tryptophane, Trp. Acide indole-3-acétique, IAA. 2,3-dihydroxypropane-1-sulfonate, DHPS. Matière organique dissoute, DOM. Des interactions algicides (à droite) se produisent entre le phytoplancton et *Croceibacter*, *Phaeobacter* et *Kordia*.

2.3. Microalgues et métabolisme azoté

Comme tout organisme, les microalgues ont besoins de différents macro- (carbone, azote, phosphore, silice pour les diatomées) et micronutriments (vitamines, métaux, etc.). Parmi ces éléments, l'azote (N) est essentiel car il est le deuxième élément le plus abondant dans les microalgues après le carbone (C) (Andersen 2005). Il existe plusieurs formes d'N nutritif : (i) l'N inorganique (N_{inorga}) tel que le diazote (N_2), l'ammonium (NH_4^+), l'ammoniac (NH_3), le nitrate (NO_3^-) et le nitrite (NO_2^-), et (ii) l'N organique (N_{orga}) tel que l'urée, les acides aminés (AAs), les purines, etc.

2.3.1. Absorption, transport et catabolisme

Le NH_4^+ est l'une des briques de plusieurs molécules importantes du vivant (acides nucléiques, acides aminés et donc protéines, etc.). Il provient de différentes sources : la réduction du NO_3^- , la fixation de N_2 , la photorespiration, la dégradation de protéines ou encore à partir de composés transporteurs d'N (par exemple, la décomposition de l'asparagine) (Vega 2019). Il est transporté dans la cellule puis dans le chloroplaste à l'aide de protéines

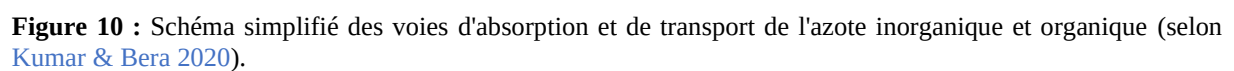
transmembranaires nommées AMT (pour *AMmonium Transporter*), également capables de transporter le NH_3 . Dans le chloroplaste, le NH_4^+ est ensuite associé à un squelette carboné à l'aide de deux enzymes, la glutamine synthétase (GS) et la glutamate synthase (GOGAT), pour former du L-glutamine (GLU) (**Figure 10**). En règle générale, le NH_4^+ est utilisé préférentiellement aux NO_3^- et NO_2^- , son assimilation étant énergétiquement plus économique car ne nécessitant pas de réduction (Vega 2019, Kumar & Bera 2020), bien que des différences existent entre les espèces (voir par exemple Yan *et al.* 2015, Erratt *et al.* 2018, Zuo *et al.* 2018, Chen *et al.* 2019). Son utilisation à fortes concentrations et à pH élevé peut être délétère pour la croissance des microalgues, car ces conditions favorisent sa conversion en NH_3 qui est toxique (voir par exemple Azov & Goldman 1982 et Gutierrez *et al.* 2016).

Les oxydes d'N utilisés par le phytoplancton, le NO_3^- et le NO_2^- , sont assimilés grâce à des perméases membranaires spécifiques, suivant 4 étapes : (i) transport du NO_3^- dans la cellule à travers sa membrane cytoplasmique à l'aide d'un système de perméases dépendant de l'ATP, (ii) réduction du NO_3^- en NO_2^- dans le cytosol par une NAD(P)H-nitrate réductase (pour les microalgues) ou une ferrédoxine-nitrate réductase (pour les cyanobactéries), (iii) transport du NO_2^- dans le chloroplaste *via* une autre perméase (NAR), (iv) réduction du NO_2^- en NH_4^+ par une ferrédoxine-nitrite réductase, et (v) incorporation du NH_4^+ (directement absorbé ou issu des étapes de réduction) dans des acides aminés par la production de GLU *via* l'action des enzymes GOGAT et la GS (Vega 2019, Kumar & Bera 2020) (**Figure 10**). L'assimilation du NO_3^- est régulée à plusieurs niveaux (Vega 2019).

Aucun eucaryote capable de fixer le N_2 n'est connu à ce jour, ou du moins, sans l'aide de symbiotes cyanobactériens. Chez les procaryotes diazotrophes, la fixation du N_2 a lieu dans les hétérocystes, structures spécialisées comportant un complexe enzymatique nommé nitrogénase. Cette réaction enzymatique très énergivore permet de rompre la triple liaison du N_2 puis de le réduire en NH_4^+ . Trois hydrogénases (-1, -2, et -3) existent, codées par des séquences génétiques différentes et dépendant de différents métaux (fer, molybdène et/ou vanadium) (Kumar & Bera 2020). De la même manière, les enzymes GS et GOGAT permettent d'associer au squelette carboné le NH_4^+ formé (**Figure 10**).

L'urée est absorbée par un co-transporteur puis transformée en NH_3 et carbamate *via* l'action de l'uréase (chez certaines espèces, l'uréase est extracellulaire et c'est le NH_3 qui est absorbé). L'uréase va également transformer le carbamate en acide carbonique, permettant de donner un proton au NH_3 pour former du NH_4^+ . Les purines sont absorbées à l'aide d'un transporteur NCS (*Nucleobase cation symporter*) puis converties en urate par l'urate oxydase,

Des différences existent cependant selon le groupe taxonomique ou l'espèce étudiée (par exemple pour les microalgues vertes, voir [Hellebust & Ahmad \(1989\)](#)).



2.3.2. Anabolisme

A partir du GLU formé, les microalgues vont métaboliser plusieurs molécules azotées via diverses voies de biosynthèse. Par exemple, les microalgues sont capables de produire des toxines riches en N et/ou dont la biosynthèse nécessite spécifiquement de l'N.

Les métabolismes primaire et secondaire utilisent différentes voies métaboliques (voies acétate, shikimate, mévalonate, méthylérythritol phosphate) à partir du glucose couplé à la glycolyse et/ou le cycle de Krebs pour produire une multitude de métabolites permettant de construire ou non des molécules plus complexes (principe du *Building Blocks*) (Dewick 2009) (Figure 11).

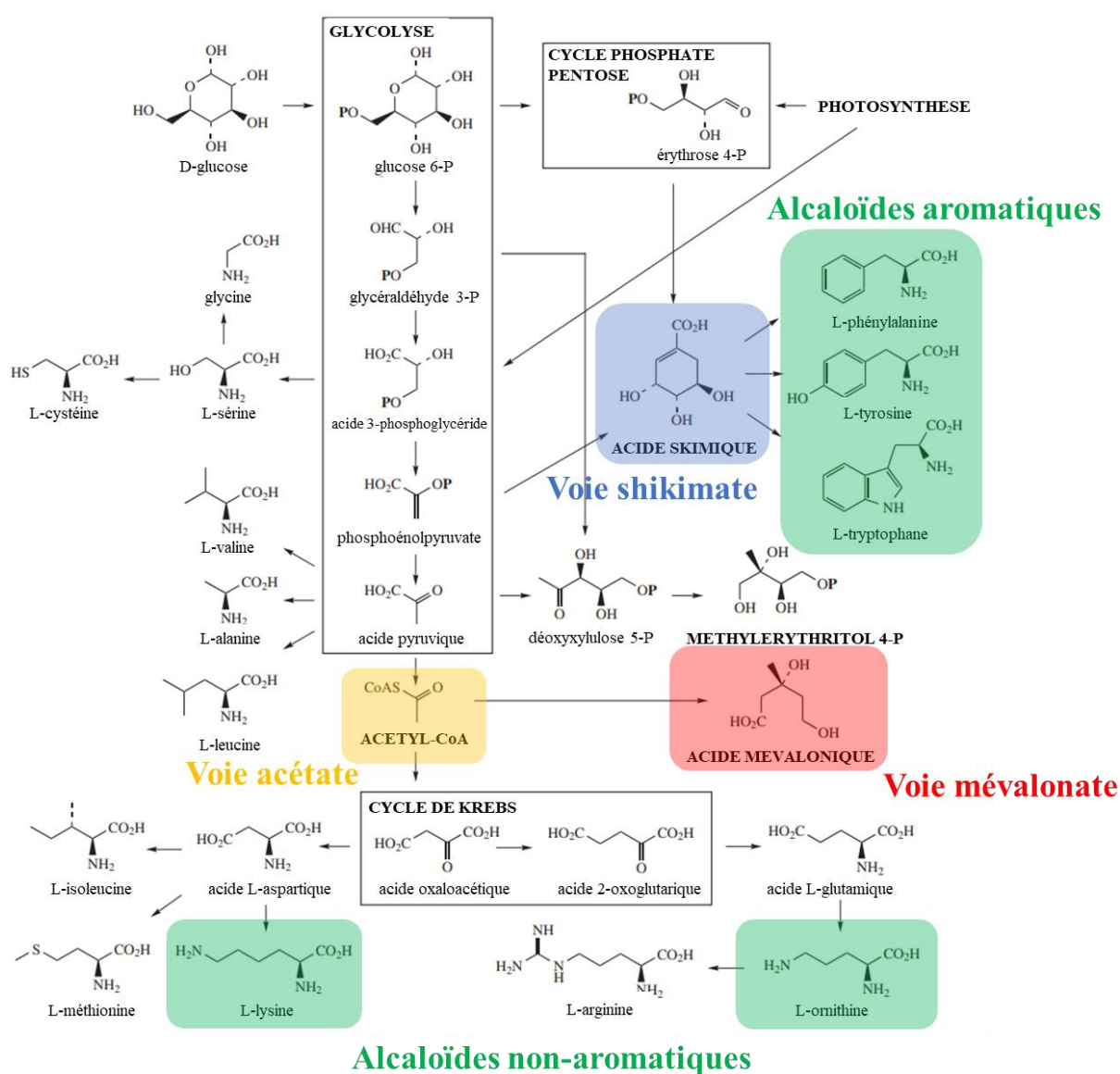


Figure 11 : Voies de biosynthèse du métabolisme primaire et secondaire/spécialisé (modifié à partir de Dewick 2009).

2.4. Cultures en laboratoire

L'utilisation de cultures de microalgues en laboratoire est courante et variée ([Andersen 2005](#)). A l'instar d'autres microorganismes (bactéries, levures), les principaux types de cultures sont le *batch*, le *fedbatch* et la culture continue ([Koller 2018](#), [Peter et al. 2022](#)). La culture en *batch* est la plus simple : elle consiste à inoculer un milieu de culture enrichi avec une souche microbienne et à l'incuber dans des conditions préalablement déterminées. Il n'y a pas d'échanges avec le milieu extérieur (culture fermée), sauf éventuellement des échanges gazeux à travers le bouchon. La croissance suit alors les phases classiques d'une culture microbienne (phase de latence, phase exponentielle, phase stationnaire et phase de déclin). La culture en *fedbatch* est une culture en *batch* dont une partie est remplacée par du milieu nutritif neuf à des temps différents, ce qui a pour effet de la réalimenter en nutriments et de limiter l'accumulation de cellules. Enfin, la culture continue est une culture *fedbatch* dont le renouvellement est continu. La concentration cellulaire se stabilise à un niveau où l'apport de nutriments est équilibré par leur consommation ([Peter et al. 2022](#)). Deux grands types de systèmes de cultures continues sont utilisés : le chémostat où l'équilibre de la population est atteint naturellement quand son taux de croissance est égal au taux de dilution ([Novick & Szilard 1950](#), [Monod 1978](#), [Sciandra & Ramani 1994](#)) et le turbidostat où l'équilibre est obtenu soit en ajustant le taux de dilution au taux de croissance maximum de la population, soit lorsque la lumière devient un facteur limitant à cause de l'auto-ombrage ([Sorgeloos et al. 1976](#)).

Les microalgues peuvent être cultivées à différentes échelles suivant les systèmes de culture. Outre les cultures de laboratoire de petits volumes réalisés en flasque, en erlenmeyer ou dans tout autre récipient de petite taille, les microalgues peuvent être cultivées à grande échelle dans des systèmes adaptés tels que les photobioréacteurs (hélicoïdaux, verticaux, plats) ou les bassins (*raceway*, circulaires) ([Mantzorou & Ververidis 2019](#)) (**Figure 12**). Chaque système a ses avantages et ses inconvénients. Par exemple, les *raceways* sont simples à mettre en place et à faire fonctionner, moyennant un coût relativement faible (structures simples, énergie solaire gratuite...). Cependant, ils présentent un fort risque de contaminations, une productivité médiocre, une dépendance aux aléas climatiques, un besoin en eau élevé (évaporation), une récolte difficile et un besoin conséquent en espace. A l'inverse, les systèmes fermés ont l'avantage de permettre un meilleur contrôle des paramètres environnementaux et de limiter les risques de contamination mais sont plus fastidieux à mettre en place. De plus, leur productivité est également médiocre bien que plus importante de celle des *raceways*, leur besoin en eau reste important et leur récolte difficile ([Mantzorou & Ververidis 2019](#)).

Ces facteurs pénalisent la rentabilité de l'exploitation industrielle des microalgues. C'est pourquoi d'autres procédés de culture différents des cultures planctoniques ont émergé ces dernières années, comme les biofilms où les microalgues se développent sur un support (Katarzyna *et al.* 2015). L'utilisation de biofilm de microalgues offre plusieurs avantages par rapport aux cultures en suspension : (i) des besoins en eaux inférieurs¹, (ii) des coûts de construction et d'entretien moins importants, (iii) une productivité accrue (augmentation de 302% de la production de biomasse), (iv) une concentration cellulaire par volume de culture plus importante, (v) une récolte plus simple², permettant également de limiter la consommation d'eau, (vi) une disponibilité en lumière plus importante, et (vii) une meilleure résistance et résilience aux contaminations biologiques (Mantzorou & Ververidis 2019). Les biofilms phototrophes présenteraient également des avantages dans le traitement des eaux usées et la bioremédiation (Mantzorou & Ververidis 2019, Hu *et al.* 2021). Toutefois, la formation des biofilms de microalgues reste encore mal comprise (Katarzyna *et al.* 2015). Le fort intérêt industriel qu'ils suscitent a cependant conduit à la réalisation de nouveaux systèmes de cultures en biofilms (pour plus de précision, voir les revues de Wang *et al.* 2018 et Hu *et al.* 2021).

¹ 17 tonnes d'eau pour 1 tonne de biomasse de microalgues dans des cultures attachées à un substrat contre 200 tonnes d'eau pour des cultures en suspension.

² Récolte mécanique, par raclage du support colonisé.

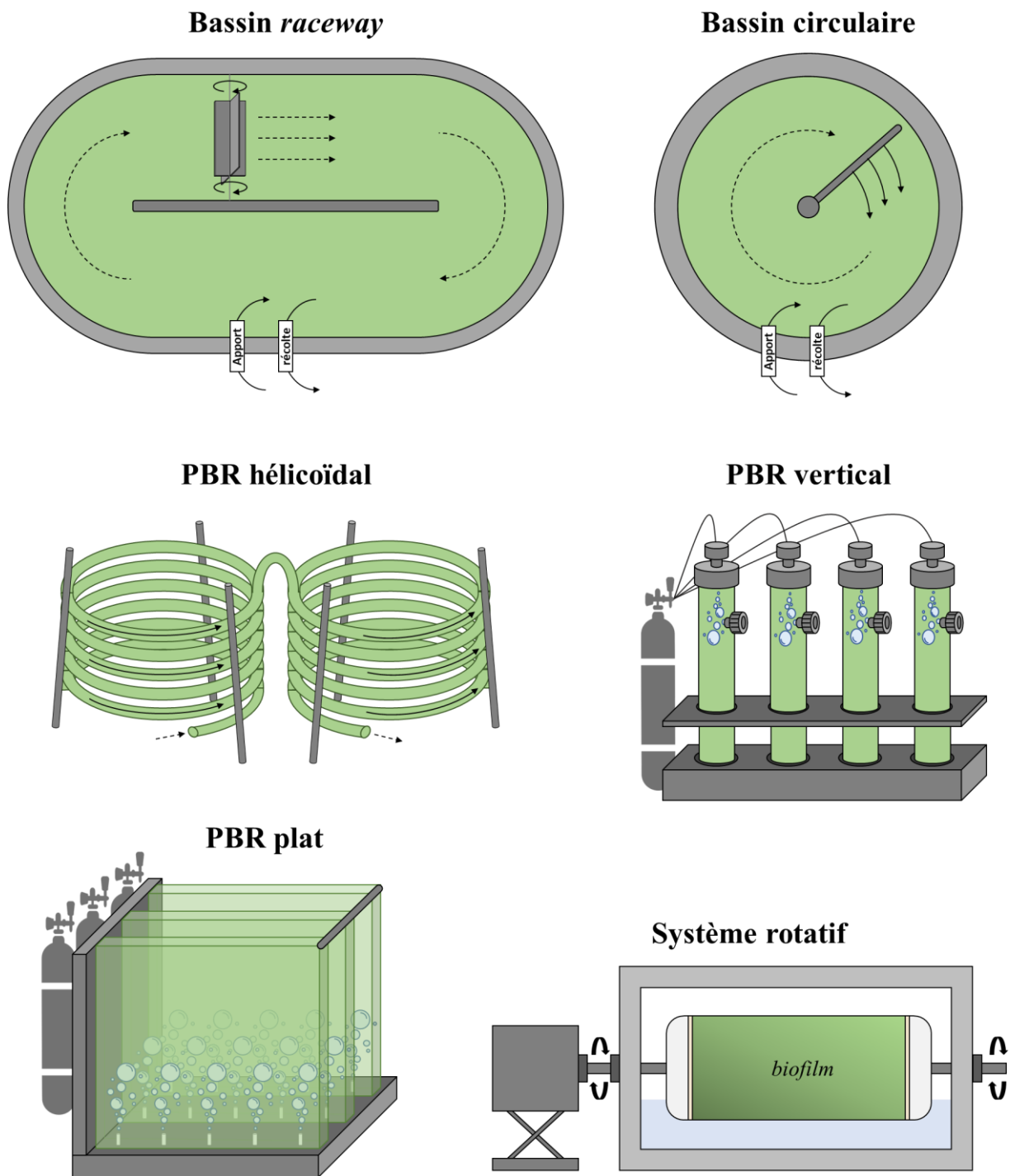


Figure 12 : Exemple schématique de systèmes de culture de microalgues (modifié à partir de [Mantzorou & Ververidis 2019](#) et [Sanchez et al. 2024](#)). PBR : photobioréacteur.

3. Biofilms phototrophes

3.1. Définition

Les biofilms sont des communautés microbiennes encastrées dans une matrice de substances polymériques extracellulaires (*Extracellular Polymeric Substances*, EPS) autoproduites et adhérentes à une surface humide (Flemming & Wingender 2010) (**Figure 13**), bien que la nécessité d'un support soit actuellement remise en cause¹ (Sauer *et al.* 2022). En effet, les phénotypes des agrégats cellulaires bactériens en suspension sont similaires à ceux des biofilms attachés à une surface (Alhede *et al.* 2011) (**Figure 14**). Sur les $1,2 \cdot 10^{30}$ cellules procaryotes (bactéries et archées) vivant sur Terre, on estime qu'entre 40 et 80% se développent dans des biofilms (Flemming & Wuertz 2019). La structure atypique des biofilms en fait un modèle d'étude pour le concept d'individualité² des organismes (Ereshchfsky & Pedroso 2013). De par la présence d'interactions de natures coopératives et compétitives qui structurent la dynamique des biofilms, des débats existent sur la nature de ce mode de vie : le biofilm représente-t-il un ensemble de cellules individuelles ou un individu multicellulaire à part entière ? De plus, les biofilms favorisent les diversités génotypique et phénotypique des individus qui les composent. En effet, d'une part la proximité des organismes favorisent le brassage génétique *via* la reproduction sexuée et les transferts latéraux de gènes et d'autre part, les diverses résistances physico-chimiques aux variations environnementales spécifiques aux biofilms ainsi que les protections contre les agressions biotiques extérieures (ex : résistance aux antibiotiques) sont des conditions qui favorisent la survie des descendants, même ceux qui présentent des mutations délétères en dehors de la matrice (Penesyan *et al.* 2021).

Les biofilms ont principalement été étudiés pour les bactéries, mais d'autres microorganismes sont capables d'adopter ce mode de vie. Les biofilms phototrophes (ou photosynthétiques) se démarquent des biofilms bactériens par la mixité de leur communauté microbienne qui comprend des microorganismes phototrophes et hétérotrophes, eucaryotes et procaryotes (microalgues et bactéries au minimum) (Bharti *et al.* 2017). Ces organismes vivent en symbiose — les hétérotrophes produisent du CO₂ par respiration, lequel est utilisé par les organismes photosynthétiques pour produire leur propre biomasse et de l'O₂ qui est utilisé par

¹ Sans surface, le terme « agrégat » peut convenir.

² Dans le sens « qu'est-ce qu'un individu en biologie ? Les organismes pluricellulaires sont-ils *des* individus ou *un* individu constitué d'un ensemble d'individus ? Comment situer les biofilms au regard de ces spécificités ? »

la respiration hétérotrophe (Schnurr & Allen 2015) — mais peuvent aussi être en compétition pour des ressources inorganiques (Guariento *et al.* 2011). *In situ*, les biofilms phototrophes sont dénommés périphyton (ou biofilms périphytiques) ou microphytobenthos selon l'écosystème étudié, ces termes présentant toutefois des spécificités propres (Larned 2010, Hubas *et al.* 2018). Nos travaux portant sur des biofilms artificiels, nous utiliserons par la suite les termes *biofilm phototrophe* ou *biofilm de microalgues*.

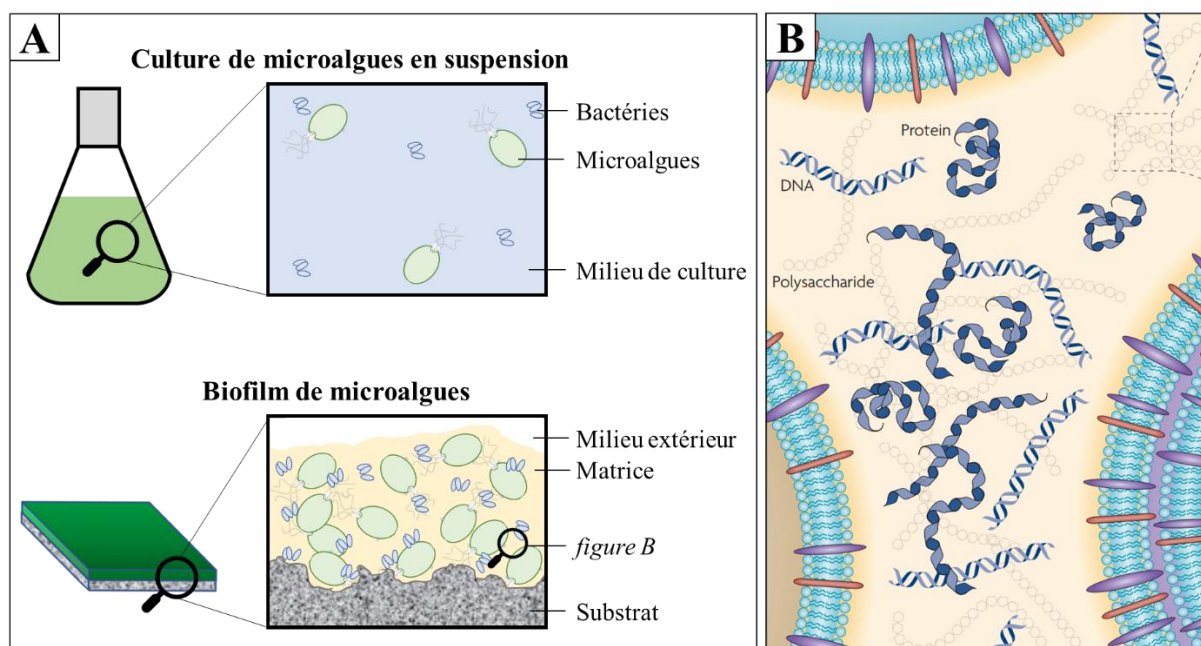


Figure 13 : A) Comparaison de cultures de microalgues en suspension et en biofilm. B) Composition de la matrice d'EPS dans un biofilm (image issue de Flemming & Wingender 2010).

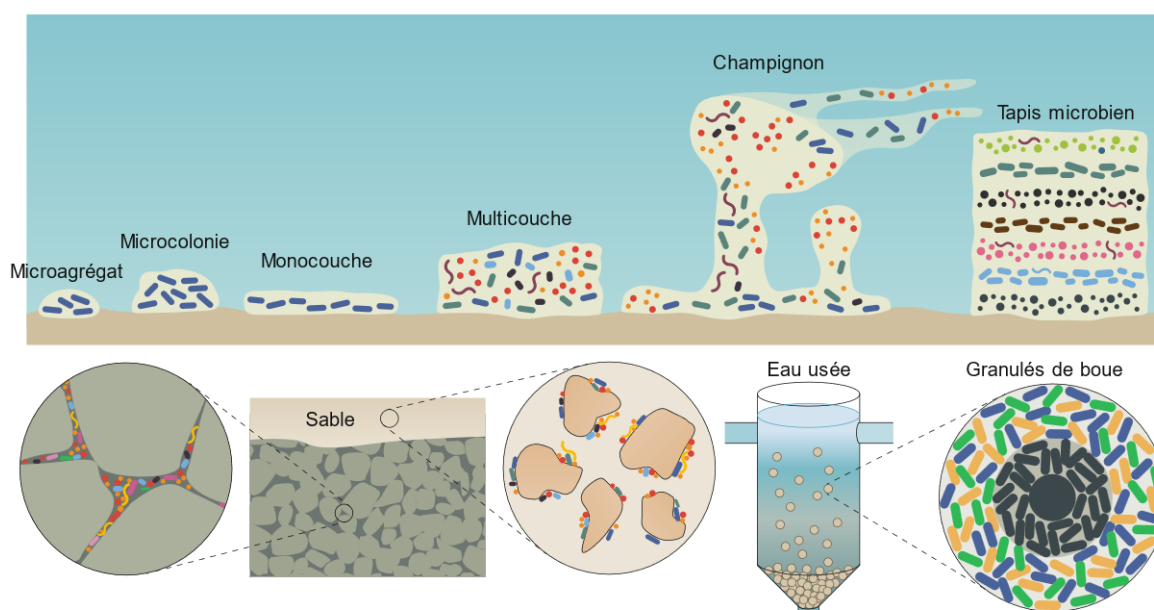


Figure 14 : Diversité de formes des biofilms et des agrégats microbiens (issue de Flemming & Wuerzt (2019) ; pour plus de détails, voir la description dans l'article cité).

3.2. Formation

L'encrassement biologique, ou *biofouling* en anglais, est un phénomène de colonisations successives de surfaces immergées par une multitude d'organismes, procaryotes comme eucaryotes, microscopiques comme macroscopiques. Le *biofouling* suit 3 étapes de colonisation aux durées variables : (i) apparition d'un film conditionnant, (ii) développement du biofilm et (iii) macro-encrassement (Martin-Jézéquel *et al.* 2015) (**Figure 15**). Après son immersion, la surface va se charger en diverses molécules organiques présentes dans le milieu. Cette étape de conditionnement est très rapide et offre des conditions nutritives favorables à l'installation des colonisateurs primaires représentés par les bactéries. Ces bactéries vont adhérer de manière réversible puis irréversible au substrat. La matrice d'EPS qu'elles produisent alors leur permet de former des micro-colonies. C'est le début du biofilm. Dès cette étape, les bactéries communiquent entre elles en sécrétant des molécules de signalisation (ex : les N-acylhomosérine lactones, ou AHL, chez les bactéries avec leur QS). Vient ensuite une deuxième colonisation par d'autres micro-organismes tels que des microalgues et/ou champignons, désignés comme colonisateurs secondaires. Ceux-ci vont intégrer le biofilm pour le densifier et le complexifier. Le biofilm va ensuite être l'objet d'une troisième vague de colonisation par des larves, des œufs et/ou des spores de macroorganismes (mollusques, phanérogames, macroalgues, *etc.*). L'arrivée de ces colonisateurs dits tertiaires marque le début du macro-encrassement. Au bout de plusieurs mois, ce dernier formera une communauté macroscopique d'organismes aquatiques (Martin-Jézéquel *et al.* 2015).

En laboratoire, le cycle de vie des biofilms monospécifiques a été fortement étudié. Les biofilms suivent un modèle de développement en 5 étapes : (i) attachement réversible, (ii) attachement irréversible, (iii) formation de « grappes » (1^{ère} étape de maturation), (iv) formation de micro-colonies (2^{ème} étape de maturation), et (v) dispersion (Sauer *et al.* 2022). Toutefois, ce modèle ne décrit que le développement de biofilms bactériens et ne prend pas en compte la complexité des processus internes du biofilm (Rendueles & Ghigo 2012, Sauer *et al.* 2022). De plus, ce modèle se base sur la bactérie *Pseudomonas aeruginosa* alors qu'il existe des différences dans les diverses étapes en fonction de l'organisme étudié (Penesyan *et al.* 2021, Sauer *et al.* 2022).

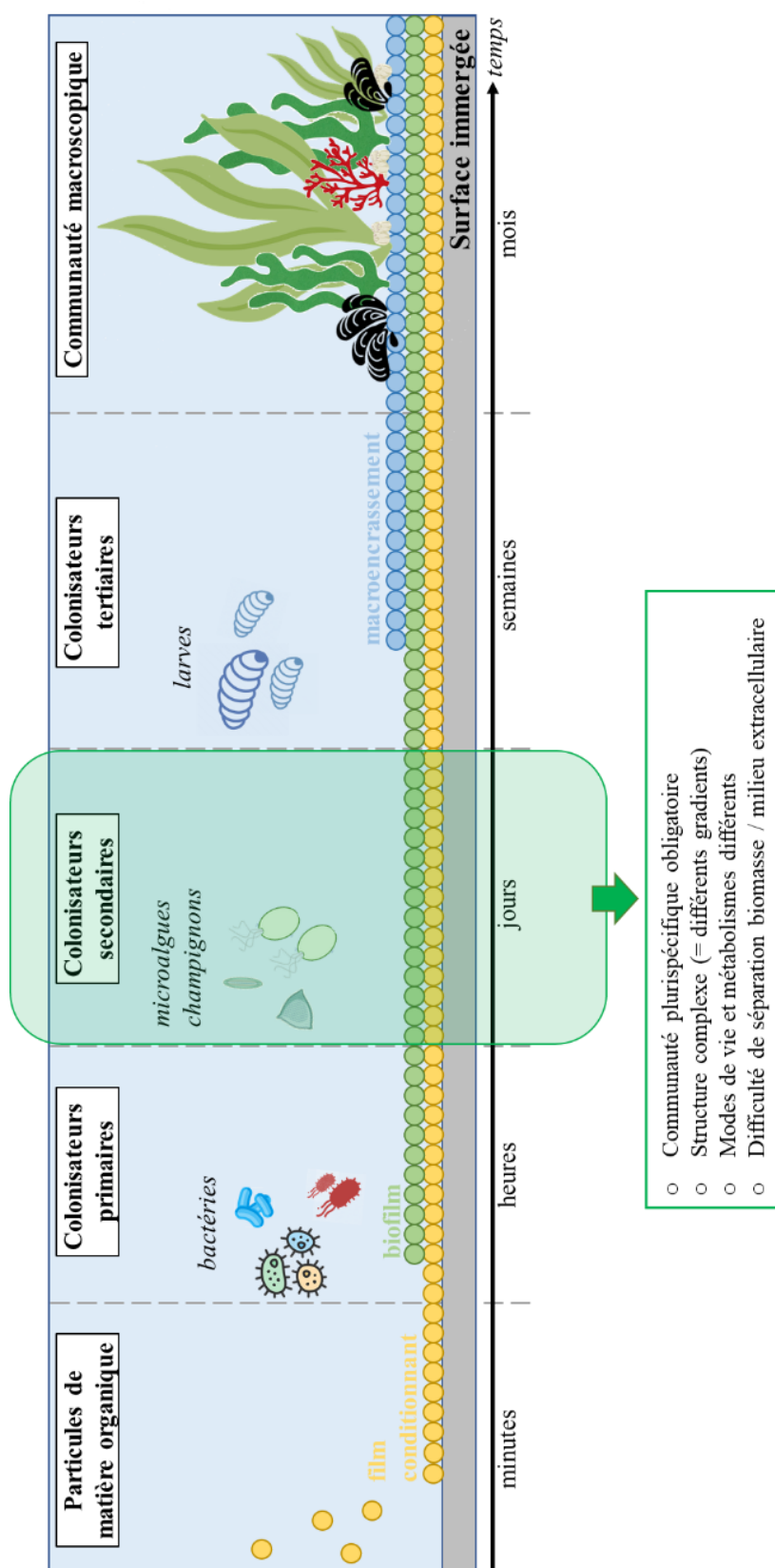


Figure 15 : Étapes d'encrassement biologique, ou biofouling, dans un milieu aquatique (modifié à partir de [Martin-Jézéquel et al. 2015](#)).

Le développement des biofilms phototrophes est peu connu (Bharti *et al.* 2017). À ce jour, on ne considère que 2 étapes de développement dans les biofilms phototrophes : (i) l'attachement initial des microalgues (et autres organismes associés, tels que les bactéries et champignons), et (ii) l'épaississement du biofilm (Hu *et al.* 2021) (**Figure 16**). Différents facteurs peuvent impacter la formation des biofilms de microalgues : le substrat (matériaux, rugosité, propriétés hydrophile/hydrophobe), la souche de microalgue (forme, mixotrophie, type d'EPS produits, hydrophobicité), et les conditions environnementales (lumière, source et concentration en nutriments, CO₂, densité cellulaire initiale, turbulence/débit) (Schnurr & Allen 2015, Wang *et al.* 2018, Zhuang *et al.* 2018b, Hu *et al.* 2021). Historiquement, la recherche scientifique s'est surtout orientée vers l'étude du film conditionnant et des biofilms bactériens (colonisateurs primaires) pour leurs applications industrielles (ex : antifouling) et dans le domaine de la santé, ainsi que sur le macro-encrassement pour la compréhension des écosystèmes aquatiques benthiques. Outre les travaux consacrés à la compréhension des communautés microbiennes associées aux biofilms de microalgues *in situ* et de leurs interactions, certaines études se sont focalisées sur des aspects plus appliqués comme la structure 3D des biofilms algaux artificiels, l'effet de la nature du support, l'optimisation des facteurs opérationnels et de la productivité, et l'utilisation des biofilms dans le traitement de l'eau (Hu *et al.* 2021).

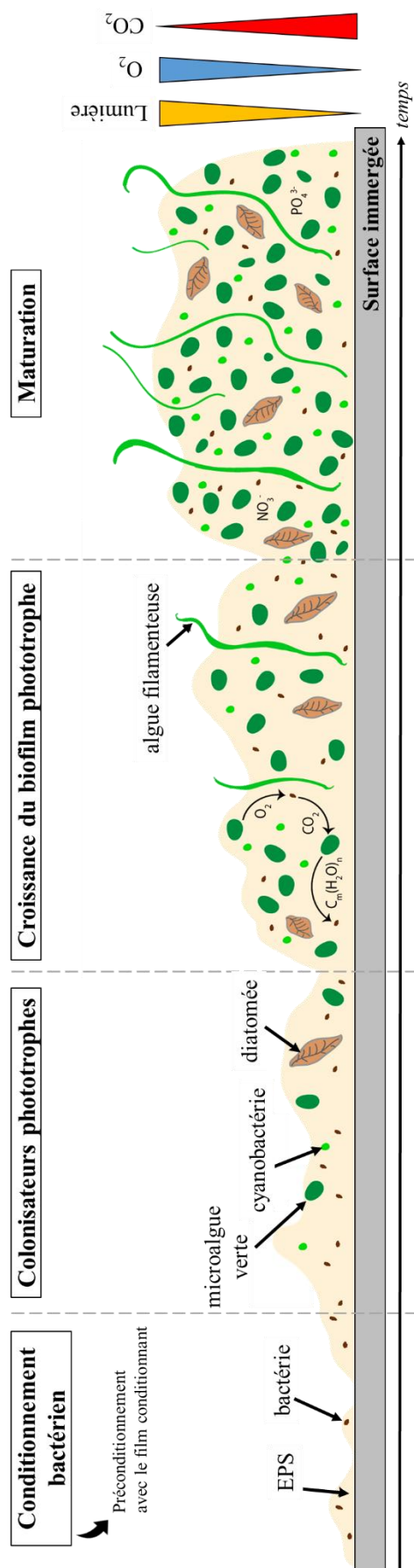


Figure 16 : Développement d'un biofilm phototrophe plurispécifique (modifié à partir de Schnurr & Allen 2015).

3.3. Composition chimique des EPS

Les EPS sont un mélange de biopolymères hydrophobes. Composés de polysaccharides, de protéines, d'acides nucléiques, de lipides et de substances humiques, les EPS peuvent représenter jusqu'à 90% de la masse sèche d'un biofilm. Ils constituent l'échafaudage du biofilm, ou sa matrice. Celle-ci favorise de nombreuses fonctions utiles au biofilm : adhésion au substrat, agrégation des cellules, cohésion du biofilm, rétention d'eau, barrière de protection, sorption de composés organiques et d'ions inorganiques, lieu de conservation d'enzymes offrant un système digestif extracellulaire polyvalent, source de nutriments, échange d'informations génétiques, donneur ou accepteur d'électrons (réactions d'oxydo-réduction), export de composants cellulaires, stockage d'excès d'énergie, protection contre l'environnement biotique et abiotique (Flemming & Wingender 2010) (**Tableau 1**). Toutefois, il est impossible d'attribuer l'une de ces fonctions à une famille d'EPS en particulier (**Tableau 1**). La diversité des EPS engendre une diversité des propriétés des biofilms et de leur morphologie (Flemming & Wingender 2010).

Les polysaccharides jouent un rôle indispensable dans les biofilms de bactéries comme de microalgues, que ces derniers soient mono- ou plurispécifiques (Flemming & Wingender 2010, Xiao & Zheng 2016). Les exopolysaccharides microalgaux semblent être constitués d'hétéropolysaccharides principalement (bien que des homopolysaccharides puissent également être présents). La production et la diversité de ces carbohydrates dépendent fortement de l'organisme producteur et des conditions environnementales. De plus, une grande diversité de propriétés bioactives (antibactériens, antivirales, antioxydantes, *etc.*) est associée aux exopolysaccharides (Salimi & Farrokh 2023). Rapportées à la masse sèche, les protéines représentent également une composante importante des EPS chez les bactéries. Les protéines peuvent être liées ou non à un glucide (glycoprotéines), modifier ou non les autres EPS, être associées à la synthèse de métabolites (enzymes), et finalement participer à la formation et la stabilisation de la matrice (protéines structurales) (Flemming & Wingender 2010, Xiao & Zheng 2016). De l'ADN extracellulaire existe également dans la matrice et peut contribuer à la cohésion des cellules entre elles (Flemming & Wingender 2010).

Tableau 1 : Exemples de fonctions existant au sein de la matrice des biofilms (repris de [Xiao & Zheng 2016](#)).

Fonction dans les biofilms	Composants des EPS associés
Adhésion, cohésion du biofilm et agrégation cellulaire	Polysaccharides, protéines et ADN
Rétention d'eau	Polysaccharides, protéines
Sorption de composés organiques et d'ions inorganiques	Polysaccharides chargés et protéines
Source de nutriments	Tous les EPS
Source d'énergie	Polysaccharides (dégradées par des enzymes)
Activité enzymatique	Protéines
Génération d'enzymes	Polysaccharides et enzymes
Antivirus, antioxydant, antitumoral et anti-inflammatoire	Polysaccharides
Tensioactif, émulsifiant	Substituants (groupe méthyle et acétyle liés aux polysaccharides) et lipides
Export de composants cellulaires	Acides nucléiques, enzymes, lipopolysaccharides et phospholipides

La formation de la matrice d'EPS est un phénomène dynamique qui aboutit à la constitution d'un environnement unique et hétérogène, aussi bien spatialement que temporellement, pour les organismes qui y vivent ([Flemming & Wingender 2010](#)). La proximité prolongée des microorganismes au sein du biofilm favorise les interactions telles que la communication chimique, le transfert horizontal de gènes et la formation de consortiums microbiens ([Flemming & Wingender 2010](#)). En outre, les changements de la composition des EPS observés dans les biofilms phototrophes en fonction des variations environnementales suggèrent des mécanismes de réponses adaptés aux contraintes extérieures ([Xiao & Zheng 2016](#)). Par exemple, l'algue verte *Scenedesmus* LX1 présente une matrice d'EPS capable d'absorber et stocker les macronutriments, l'N et le phosphore (P). Cette réserve lui permet de maintenir une teneur en protéines plus importante que les cellules en suspension quand les nutriments du milieu s'amenuisent ([Zhuang et al. 2018a](#)). La composition en EPS des biofilms phototrophes reste cependant peu connue. L'isolement et l'analyse des EPS restent des tâches difficiles et nécessitent des méthodes spécifiques qui, actuellement, les dénaturent en partie ([Xiao & Zheng 2016](#)).

3.4. Interactions médiées chimiquement

La forte proximité des organismes dans les biofilms bactériens comme phototrophes favorise le développement d'interactions médiées chimiquement ([Allen et al. 2016](#)). Par exemple, les bactéries sont connues pour utiliser un mécanisme de médiation chimique qui leur

est propre, le QS, impliqué dans diverses fonctions biologiques, dont la formation du biofilm (Miller & Bassler 2001). Il a été démontré que le périphyton est capable de produire des composés allélopathiques pour lutter contre la prolifération de cyanobactéries, en plus de permettre une stratégie spécifique d'utilisation de nutriments potentiellement limitants pour leur prolifération (Wu *et al.* 2011). S'il existe une médiation chimique « volontaire », la vie microbienne en suspension nécessite une forte production de composés infochimiques solubles dans l'eau en raison de l'importante dilution dans le milieu qui pourrait rendre caduque le signal émis vers les cellules cibles. Au sein d'un biofilm, les composés allélopathiques parcourent une distance moindre, peuvent s'accumuler, étant lipophiles au regard de la matrice d'EPS (Allen *et al.* 2016). Quelques composés allélopathiques ont été identifiés chez les microalgues adhérentes à un support (pour plus de détails, voir les tableaux dans Allen *et al.* 2016). Toutefois, les interactions médiées chimiquement sont difficiles à identifier et à comprendre dans les biofilms phototrophes : (i) la méthodologie utilisée pour les organismes en suspension est inadaptée aux biofilms (concentration des composés étudiés, réalisation d'une coculture avec membrane perméable) ; (ii) différenciation difficile entre interactions chimiques et compétition pour les nutriments (Allen *et al.* 2016) ; et (iii) identification difficile des organismes émetteurs et récepteurs du composé d'intérêt (microalgues ? bactéries ?).

Bien qu'inexistants dans le milieu naturel, les biofilms bactériens monospécifiques peuvent être cultivés en laboratoire (par exemple, Mion *et al.* 2021). Cela est *a priori* impossible pour les biofilms phototrophes pour trois raisons : (i) les étapes de conditionnement du support et de l'adhésion bactérienne précèdent la colonisation par les microalgues (voir **Introduction, partie 3.2**) ; (ii) pour des raisons pratiques, les biofilms phototrophes sont principalement étudiés à l'aide de systèmes ouverts et/ou sensibles à la contamination biologique (Katarzyna *et al.* 2015, Mantzourou & Ververidis 2019) ; et (iii) des bactéries sont présentes dans l'inoculum de la microalgue, celles qui appartiennent à sa phycosphère (voir **Introduction, partie 2.2**). L'axénisation d'une souche de microalgues, procédé fastidieux et qui plus est stressant pour l'organisme, connaît un grand taux d'échec (Fernandez-Valenzuela *et al.* 2021). De plus, elle n'est souvent que partielle. À notre connaissance, il n'existe à ce jour aucune expérience de culture de microalgues en biofilm axénique. L'étude des biofilms de microalgues reste encore aujourd'hui celle d'une communauté microbienne plurispécifique.

3.5. Applications

La grande diversité de productions moléculaires des microalgues en font une importante source d'intérêt industriel pour l'alimentation, la pharmacologie, la nutraceutique, la cosmétique, les biocarburants, le traitement des eaux, *etc.* ([Cardozo et al. 2007](#), [Singh & Saxena 2015](#), [Abdelfattah et al. 2023](#)). Parmi les composés d'intérêt, on retrouve une grande diversité d'acides gras (AGs), notamment des acides gras polyinsaturés (AGPIs) (ex : l'acide eicosapentaénoïque, ou EPA) ([Maltsev & Maltseva 2021](#)), de lipides ([Morales et al. 2021](#)), de stérols ([Randhir et al. 2020](#)), de caroténoïdes (carotènes, xanthophylles), ([Guedes et al. 2011](#)), de polysaccharides ([Moreira et al. 2022](#)), d'AAs et de protéines ([Wang et al. 2021](#)). Des composés catégorisés comme toxines sont également présents ([Assunção et al. 2017](#)). Ces groupes moléculaires présentent une multitude d'intérêts industriels et/ou pharmacologiques (par exemple, des activités antioxydantes ou antibactériennes) selon la molécule étudiée, faisant des microalgues une source renouvelable, durable et à fort intérêt économique ([Khan et al. 2018](#)).

Les biofilms phototrophes offrent également des applications prometteuses dans le traitement des eaux usées, la bioremédiation, les biocarburants, l'aquaculture, l'agriculture ou encore la production de composés d'intérêt pour la santé ([Bharti et al. 2017](#)). Les EPS des biofilms phototrophes sont une source importante de composés d'intérêts pour les industries pharmaceutique (activités antivirale, antitumorale, antioxydante, anticoagulante, anti-inflammatoire, immunomodulatrice) et alimentaire (biolubrifiants, épaississants, conservateurs) du fait de leur abondance et leurs diversités structurelle et fonctionnelle ([Xiao & Zheng 2016](#)).

4. Modèle d'étude : *Tetraselmis suecica*

Au cours de ce travail de thèse, la souche *Tetraselmis suecica* AC254 (Algobank Caen, Université de Caen Normandie) a été utilisée dans l'ensemble des expériences en laboratoire. Une deuxième souche, *Cylindrotheca closterium* AC170 (Algobank Caen, Université de Caen Normandie) a également été utilisée dans une expérience réalisée au LOV en collaboration avec d'autres laboratoires. Ci-dessous, seule la microalgue *T. suecica*, initialement prévue dans ce travail de thèse, est décrite.

La microalgue *Tetraselmis suecica* est une chlorophyte¹ caractérisée par des cellules mobiles ovoïdes légèrement aplaties (taille : L=9-11 µm, l=7-8 µm et P=4,5-6 µm) possédant une paroi rigide d'épaisseur moyenne et 4 flagelles de tailles égales à celle de la cellule et partant d'un sillon apical peu profond (Hori *et al.* 1986). *T. suecica* se distingue principalement des autres espèces du même genre par un contour relativement simple et symétrique, par un sillon très large et peu profond, par un stigmate sub-médian près du pyrénioïde et par son aspect granuleux (Hori *et al.* 1986) (Figure 17).

T. suecica est principalement connue pour son utilisation dans l'industrie alimentaire à destination de l'aquaculture de mollusques (Ibarrola *et al.* 2000a, b, 2008, Patiño Suárez & Aldana Aranda 2000, Blanco *et al.* 2003, Delaporte *et al.* 2003, 2005, Barrera-Escorcía *et al.* 2010, Jo *et al.* 2011) et crustacés (Fábregas *et al.* 2001, Maldonado-Montiel & Rodríguez-Canché 2005, Dahl *et al.* 2009, Castro-Mejía *et al.* 2011). Il existe aussi des applications dans la biorémédiation et le traitement des eaux usées (Pérez-Rama *et al.* 2002, 2006, 2010, Jo *et al.* 2011, Goswami *et al.* 2022), comme biomarqueurs de pollutions aquatiques (Millán de Kuhn *et al.* 2006, Soto-Jiménez *et al.* 2011a, b), comme biocarburant à base d'amidon (ex : bioéthanol) (Jiang *et al.* 2008, Bondioli *et al.* 2012, San Pedro *et al.* 2013) ou dans la production de composés d'intérêt (Carballo-Cárdenas *et al.* 2003, Shakibaie *et al.* 2010). De plus, elle présente un potentiel pour l'industrie pharmaceutique puisque des activités antibactériennes (Austin & Day 1990, Austin *et al.* 1992, Guzmán *et al.* 2019), anticancéreuses (Hussein *et al.* 2020a, Parra-Riofrío *et al.* 2020), antiangiogénique (Rentería-Mexía *et al.* 2022) et antioxydantes (Lee *et al.* 2009, Jo *et al.* 2012, Norzagaray-Valenzuela *et al.* 2017, Haoujar *et*

¹ Eucaryote (empire), Plantae (règne), Viridiplantae (sous-règne), Chlorophyta (embranchement) Chlorophytina (sous-embranchement), Chlorodendrophyceae (classe), Chlorodendrales (ordre), Chlorodendraceae (famille), *Tetraselmis* (genre) (algaebase.org).

al. 2019) ont été observées chez cette espèce. Jusqu'à présent cultivée en suspension, *T. suecica* est aujourd'hui produite en biofilm par la startup Inalve. Toutefois, rares sont les travaux qui ont été dédiés spécifiquement à l'étude des biofilms de *T. suecica* (Delran 2023, Delran *et al.* 2023, Mata *et al.* 2023, Mougin *et al.* 2024).

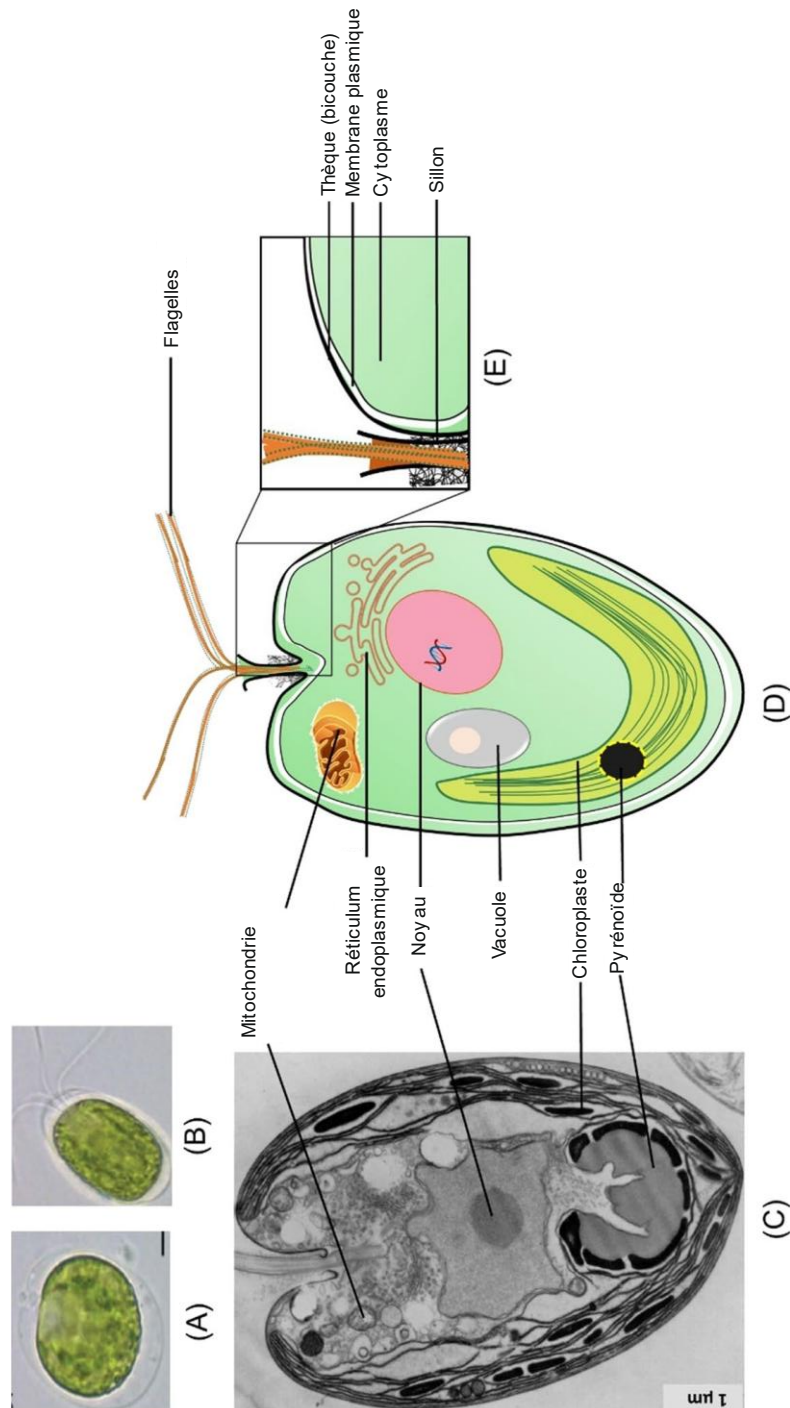


Figure 17 : Représentation infographique des cellules du genre *Tetraselmis* (repris et traduit de Goswami *et al.* (2022)). (A) *Tetraselmis* sp. au repos. (B) *Tetraselmis* sp. motile. (C) Micrographie par microscopie électronique à transmission de *Tetraselmis* sp. (D) Structure cellulaire de *Tetraselmis* et de ses organelles. (E) Ultrastructure de la paroi cellulaire de *Tetraselmis*.

Des récentes études ont été consacrées sur la phycosphère de *T. suecica* (Biondi *et al.* 2017, 2018, Piampiano *et al.* 2019, 2021, Park *et al.* 2021). Elles mettent en évidence : (i) l'existence d'une communauté bactérienne fortement associée, nommée phycosphère « noyau », pouvant varier en abondance mais peu en diversité en fonction des conditions de culture (Biondi *et al.* 2017, Piampiano *et al.* 2019), (ii) l'existence d'une autre communauté bactérienne associée, plus variable que la précédente en fonction des saisons et du système de culture employé (Biondi *et al.* 2017), (iii) la présence d'interactions variées et complexes entre les cellules de *T. suecica* et les bactéries qui lui sont étroitement associées, dont la probable implication de synomones (Biondi *et al.* 2018, Park *et al.* 2021, Piampiano *et al.* 2021) (Figure 18). À ce jour, aucune activité allélopathique de défense n'a cependant été identifiée chez *T. suecica*. Toutefois, Apostolopoulou *et al.* (2022) ont récemment montré que les filtrats d'une espèce du genre *Tetraselmis*, considérée comme non-toxique, présentaient une activité antialgale envers trois autres microalgues¹, dont deux considérées comme toxiques (*Heterosigma akashiwo* et *Phaeocystis* sp.). L'analyse métabolomique suggère que cette bioactivité est due à la production de L-histidinal putative (C₆H₉N₃O), un métabolite relativement riche en N.

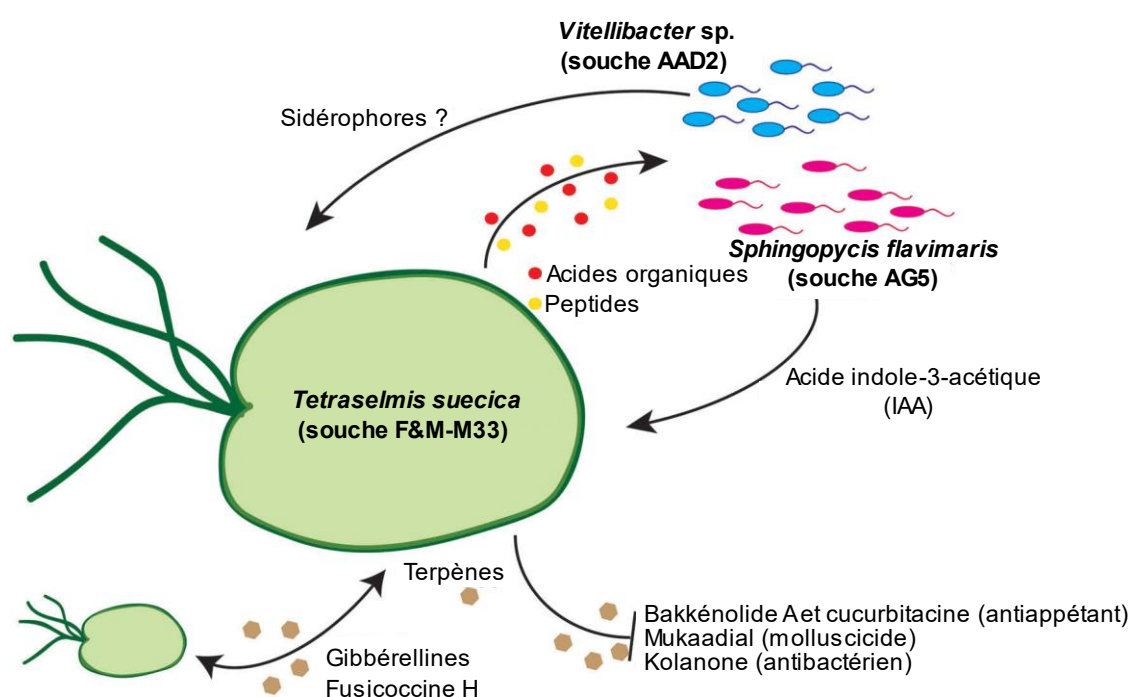


Figure 18 : Représentation schématique de la phycosphère de la microalgue *Tetraselmis suecica* F&M-M33 et des potentielles interactions avec deux souches bactériennes isolées de la phycosphère (*Vitellibacter* AAD2 et *Sphingopyxis flavimaris* AG5) (repris et traduit de Piampiano *et al.* (2021))

¹ *Heterosigma akashiwo*, *Phaeocystis* sp. et *Thalassiosira* sp.

5. Objectifs de ce travail de thèse

Les travaux de cette thèse avaient, initialement, trois objectifs principaux : (1) rechercher des activités biologiques d'intérêt, allélopathiques ou non, dans les biofilms de microalgues, (2) identifier et caractériser la ou les molécules impliquées dans ces bioactivités, et (3) comprendre l'influence de l'environnement azoté sur ces bioactivités. Pour atteindre ces objectifs, un travail de recherche bibliographique a, dans un premier temps, été effectué sur l'influence de la source et de la concentration d'azote sur la production de toxines et de composés allélopathiques chez les microalgues et les cyanobactéries (**Chapitre I**). Dans un second temps, des essais biologiques ont été réalisés afin de rechercher différentes activités biologiques pouvant notamment présenter des applications pharmaceutiques. Pour cela, des productions de moyenne envergure de biofilms de *Tetraselmis suecica* AC254 et *Cylindrotheca closterium* AC170 avec différents systèmes de culture ouverts expérimentaux suivi de plusieurs extractions chimiques ont été réalisées. Une collection de bactéries pathogènes d'aquaculture a été commandée et utilisée comme cible dans des tests de diffusion (**Chapitre II**). À l'issue de ces deux premiers volets, les objectifs de cette thèse ont été orientés vers l'amélioration des connaissances de la physiologie des biofilms phototrophes en réponse à un stress azoté. Un système de culture fermé et contrôlé a été conçu afin de répondre aux contraintes inhérentes à l'étude des biofilms de microalgues (**Chapitre I Chapitre II**). Une étude métabolomique portant sur l'effet de la limitation en azote sur le métabolome du biofilm de *T. suecica* a enfin été réalisée (**Chapitre III**).

CHAPITRE I

INFLUENCES DE LA SOURCE ET DE LA CONCENTRATION D'AZOTE SUR LA PRODUCTION DE COMPOSES TOXIQUES ET ALLELOPATHIQUES CHEZ LES MICROALGUES ET LES CYANOBACTERIES : UNE REVUE DE SYNTHESE

“On est obligé à présent de regarder l'imposant spectacle de l'évolution de la vie comme un ensemble d'événements extraordinairement improbables, impossibles à prédire et tout à fait non reproductibles.”

Stephen Jay Gould

Wonderful Life: The Burgess Shale and the Nature of History

Résumé

Les microalgues et les cyanobactéries sont des microorganismes qui produisent divers composés bioactifs, dont certains sont désignés comme toxines. Ces toxines sont diversifiées aussi bien d'un point de vue fonctionnel que structurel. Parmi elles, certaines sont riches en azote (N), ce qui suppose une dépendance de leur biosynthèse à la disponibilité de l'N dans l'environnement. Lorsque les conditions sont favorables, des efflorescences d'algues nocives de grande ampleur (EANs) apparaissent et provoquent des dégradations de l'environnement, de l'économie et de la santé humaine. L'eutrophisation anthropique des eaux douces et des milieux marins côtiers, due par exemple à l'utilisation intensive d'engrais azotés de synthèse, favorise l'apparition des EANs. Dans cette revue, nous synthétisons l'ensemble des données publiées à ce jour sur l'effet de la source et de la concentration d'N sur la production de toxines par les microalgues et les cyanobactéries. Nous discutons également des variations des composés allélopathiques, généralement inconnus et différents de phycotoxines et cyanotoxines, selon ces mêmes conditions. La littérature scientifique suggère que : (i) il existe de fortes variabilités intra- et interspécifiques de la réponse des microalgues et des cyanobactéries aux conditions azotées en termes de biosynthèse de toxines, (ii) la théorie de la stœchiométrie cellulaire devrait prendre en compte l'ensemble de la production des métabolites et non pas seulement celle des toxines, (iii) il existe des preuves de composés allélopathiques différents des toxines connues dont la production dépend également de la disponibilité en N.

1. Introduction

Le phytoplancton désigne l'ensemble des microorganismes aquatiques capables de photosynthèse. C'est un groupe polyphylétique très diversifié, principalement composé de protistes à plastes nommés microalgues et de cyanobactéries (aussi connues sous le terme d'« algues bleues ») (Salmaso *et al.* 2015). Ces microorganismes sont ubiquistes en eau douce comme en mer, colonisant une multitude de niches écologiques (Singh & Saxena 2015). Leur vaste répartition est due à leur grande capacité d'adaptation physiologique (photosynthèse oxygénique ou anoxygénique, grande variété pigmentaire, mixotrophie ou hétérotrophie passagère, diazotrophie, vésicules de gaz, *etc.*), morphologique (unicellulaire ou colonie, mucilage, filaments, diverses protections, *etc.*) et à leur production de métabolites bioactifs (Friedl *et al.* 2012, Nandagopal *et al.* 2021). Cette diversité font de microalgues et des cyanobactéries des organismes importants pour l'étude des écosystèmes et la recherche en biotechnologies (Nandagopal *et al.* 2021, Saide *et al.* 2021). Par exemple, les yessotoxines peuvent présenter un intérêt dans la recherche contre la maladie d'Alzheimer (Botelho *et al.* 2022).

Les microalgues et les cyanobactéries sont capables de produire des composés toxiques, nommés respectivement phycotoxines et cyanotoxines, dont le poids et la structure moléculaires sont très variables (Cusick & Sayler 2013, Solter & Beasley 2013). Ces toxines peuvent être classées en fonction de leurs propriétés. Parmi les cyanotoxines par exemple, on retrouve : (i) les hépatotoxiques tels que les microcystines, qui provoquent des lésions hépatiques, les nodularines ou la cylindrospermopsine, (ii) les neurotoxiques tels que l'anatoxine-a et la saxitoxine et ses analogues, qui altèrent la transmission neuromusculaire, et (iii) les dermatotoxiques (pour plus de détails, voir les revues de Kaebernick & Neilan 2001, Merel *et al.* 2013). Leur biosynthèse dépend de plusieurs facteurs environnementaux tels que la lumière (Chia *et al.* 2017), la température (Kilcoyne *et al.* 2019), la salinité (Lim & Ogata 2005), la présence de compétiteurs (Chia *et al.* 2018) ou de prédateurs (Brown *et al.* 2022). Les phycotoxines et des cyanotoxines peuvent être riches en N. Selon la théorie de la stœchiométrie cellulaire qui stipule une dépendance de la production métabolique à la disponibilité en nutriments, la biosynthèse de toxines dépend de leur teneur en atomes d'N ainsi que de la source et de la concentration en N dans l'environnement (Merel *et al.* 2013, Van de Waal *et al.* 2014, 2015).

Lorsque les conditions sont réunies, ces micro-organismes peuvent proliférer et engendrer des EANs (Wells *et al.* 2020). Ces proliférations sont connues pour dépendre de plusieurs paramètres tels que la température, l'exposition à la lumière et le statut trophique de l'environnement (Merel *et al.* 2013), bien que les études concernant l'effet des rapports nutritifs sur leur formation fassent défaut (Davidson *et al.* 2012). La révolution industrielle ainsi que l'accroissement de l'utilisation d'engrais synthétiques et l'intensification de l'agriculture et de l'élevage qui ont accompagné la révolution verte à travers le globe, ont contribué à augmenter drastiquement les rejets anthropiques dans les milieux aquatiques, enrichissant les zones côtières et les fleuves de composés chimiques, notamment azotés. Ces apports nutritifs ont augmenté la fréquence, l'étendue spatiale et la durée des proliférations d'espèces toxiques, impactant à la fois l'environnement et l'économie (Howarth 2008). Par exemple, les nouvelles technologies permettant de faire face à l'augmentation des EANS nécessitent des investissements financiers trop importants pour les fermes conchilicoles de petite taille présentes sur les côtes atlantiques françaises, ce qui déstabilise l'économie locale (Pérez Agúndez *et al.* 2013). L'eutrophisation d'origine anthropique et le changement climatique constituent ainsi des causes importantes de multiplication des EANs (Paerl & Paul 2012, Merel *et al.* 2013).

Plusieurs revues de synthèse ont été consacrées à la prolifération des espèces phytoplanctoniques productrices de toxines, dont elles décrivent le mode (Davidson *et al.* 2012, Paerl & Paul 2012), la prévention et la gestion (Merel *et al.* 2013, Coyne *et al.* 2022). D'autres se focalisent sur les applications des toxines en biotechnologie et pharmacologie (Assunção *et al.* 2017, Botelho *et al.* 2022), les mécanismes séquenciques¹, le rôle écologique des toxines (Kaebernick & Neilan 2001) ou enfin l'influence de l'environnement sur leur biosynthèse (Neilan *et al.* 2013). La méta-analyse réalisée par Brandenburg *et al.* (2020) montre que la

¹ J'utilise ici le terme « séquencique » après avoir lu l'ouvrage *Théorie inclusive de l'Evolution* (Danchin 2022) dans lequel E. Danchin écrit que le mot « gène » (et par extension, le mot « génétique ») revêt deux significations distinctes :

- a) celle exprimée par C. Darwin avant la découverte de la molécule d'ADN (paradigme de la théorie de la sélection naturelle), où ce terme désigne tout critère phénotypiquement transmis à la descendance, sans forcément être en lien avec l'ADN.
- b) celle de la recherche actuelle après la découverte de l'ADN et après l'association de la sélection naturelle et des lois de Mendel (paradigme de la théorie synthétique/moderne de l'Evolution), où ce terme assimile strictement les gènes à des séquences d'ADN.

Paradoxalement, le deuxième sens réduit les caractères transmis au seul réplicateur biologique irréversible qu'est l'ADN alors que le premier sens inclut les autres réplicateurs biologiques (ou pseudo-réplicateurs) comme l'épigénétique (méthylation de certaines séquences, prions, structures des nucléosomes, conformation 3D et 4D, microbiote, mèmes, etc.).

production de toxines varie très fortement en fonction des limitations nutritives, avec une légère tendance à l'augmentation des toxines riches en N lors d'une limitation en P et une tendance à la baisse lors d'une limitation en N. La stœchiométrie cellulaire semble également influencer la biosynthèse des phycotoxines et des cyanotoxines. De plus, des composés allélopathiques différant des toxines connues semblent également être affectés par la disponibilité en nutriment, ce qui est aujourd'hui peu considéré lors des EANs (Granéli *et al.* 2008).

Ici, nous passons en revue l'ensemble de la littérature consacrée aux effets de la source et de la concentration d'azote sur la biosynthèse de composés bioactifs du phytoplancton, qu'ils soient toxiques et/ou allélopathiques. Les différentes toxines ont été catégorisées en fonction de leur richesse en N – azotée où le nombre d'atomes d'azote $n > 1$, peu azotée ($n = 1$) et non azotée ($n = 0$) – puis décrites successivement avec les espèces qui les produisent. La dernière partie de cette revue porte sur les effets de l'N sur la production de composés allélopathiques distincts des phycotoxines connues. Enfin, l'effet de l'N sur la biosynthèse de ces composés fait l'objet d'une discussion générale, et des perspectives de recherche dans ce domaine sont proposées.

2. Toxines azotées

2.1. Cylindrospermopsine et les cyanobactéries *Raphidiopsis* et *Aphanizomenon*

La cylindrospermopsine (CYN, $C_{15}H_{21}N_5O_7S$) (**Figure 19**) est un composé cytotoxique, neurotoxique, dermatotoxique et hépatotoxique découvert à Palm Island (Queensland, Australie) en 1979 lors d'un incident majeur d'empoisonnement d'humains (pour plus de détails, voir les revues de [Griffiths & Saker 2003](#), [Kinnear 2010](#), de [la Cruz et al. 2013](#)). C'est un composé persistant dans l'eau, en raison de sa lente vitesse de dégradation, ce qui accroît les risques liés à sa dissémination. De plus, sa libération dans l'eau semble être principalement liée à la lyse cellulaire plutôt qu'à l'excrétion, ce qui se traduit par une forte toxicité en fin d'efflorescence ([Wiedner et al. 2008](#)). On trouve cette toxine principalement chez les cyanobactéries du genre *Raphidiopsis*, *Aphanizomenon*, *Anabaena*, *Umezakia* et *Lyngbya* ([Kinnear 2010](#)). La CYN présente un fort potentiel de propriété allélopathique. En effet, elle peut avoir des effets sur la densité cellulaire, la teneur en chlorophylle, le stress oxydatif et la réponse antioxydante de certaines espèces phytoplanctoniques comme la cyanobactérie *Microcystis aeruginosa* et la chlorophycée *Acutodesmus acuminatus* ([Chia et al. 2017](#)). La présence de CYN en grandes quantités peut favoriser la production des toxines microcystines chez *M. aeruginosa*, réponse qui suppose un rôle interactif compétitif entre cyanobactéries toxiques dans le milieu naturel et qui semble être co-influencée par d'autres variables telles que la lumière et la concentration en N ([Chia et al. 2017](#)).

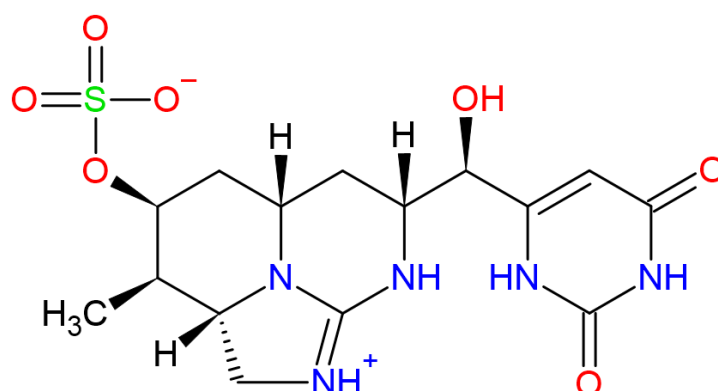


Figure 19 : Structure moléculaire de la cylindrospermopsine (CYN).

Parfois associé au genre *Anabaena* (voir la revue de Padisák 1997) et récemment classifié avec *Cylindrospermopsis* (Aguilera *et al.* 2018), *Raphidiopsis* est un genre de cyanobactérie cosmopolite probablement d'origine tropicale et caractérisé par une grande capacité de propagation, et dont le principal représentant est *R. raciborskii*. Cette espèce est capable de produire soit de la CYN cytotoxique et ses analogues, soit de la saxitoxine neurotoxique et ses analogues (voir la revue de Antunes *et al.* 2015). Chez *Raphidiopsis*, CYN est associée au groupe de gènes *cyr* (Mihali *et al.* 2008) tandis que STX est associé au groupe de gènes *stx* (Vico *et al.* 2016). Le rôle de CYN est encore peu connu chez *Raphidiopsis*, bien que certains auteurs lui prêtent une fonction anti-broutage (Antunes *et al.* 2015). Quant à la STX, elle favoriserait le maintien de l'homéostasie lors de changements de salinité (Pomati *et al.* 2004, Antunes *et al.* 2015, Brentano *et al.* 2016, Vico *et al.* 2016), mais ne jouerait aucun rôle dans les interactions avec d'autres microorganismes photosynthétiques (Vargas *et al.* 2020). De plus, la libération de CYN dans le milieu semble d'avantage être le fait d'une lyse cellulaire que d'un processus d'excrétion (Davis *et al.* 2014) bien que, dans des conditions nutritives différentes, il existe des variations de la proportion entre CYN extra- et intracellulaires durant la phase de croissance exponentielle (Yang *et al.* 2018).

R. raciborskii est considérée comme une espèce généraliste de par sa capacité à réaliser de la diazotrophie, c'est-à-dire à fixer le diazote (N_2), bien que cela semble être d'avantage un moyen de soutenir une croissance faible en conditions limitées en N qu'un avantage compétitif (Burford *et al.* 2006, Vico *et al.* 2016, Willis *et al.* 2016). À l'origine, le genre *Raphidiopsis* était différencié du genre *Cylindrospermopsis* en raison de sa diazotrophie (Aguilera *et al.* 2018). L'N est l'élément qui détermine en premier lieu sa dynamique, les efflorescences étant favorisées lors de périodes de faibles concentrations en cet élément et relativement indépendantes du P, contrairement aux autres cyanobactéries (Figueredo *et al.* 2014). Néanmoins, Willis *et al.* (2015) ont observé que les taux de croissance de *R. raciborskii* augmentent avec l'ajout d'N et diminuent avec l'apport de phosphate (PO_4^{3-}), quel que soit l'écotype. *R. raciborskii* assimile l'ammonium (NH_4^+) préférentiellement par rapport au nitrate (NO_3^-) (Ammar *et al.* 2014, Burford *et al.* 2014), l'urée n'étant pas assimilable (Saker *et al.* 1999, Burford *et al.* 2006). De plus, la diazotrophie est partiellement inhibée en présence de NO_3^- et totalement inhibée en présence de fortes concentrations en NH_4^+ (Kenesi *et al.* 2009), le nombre d'hétérocystes étant régulé par la concentration en N dissous (Willis *et al.* 2016). La forte affinité de *R. raciborskii* pour le NH_4^+ lui offre un avantage compétitif sur d'autres compétiteurs tels que la cyanobactérie *Planktothrix agardhii*, indépendamment de toutes

propriétés toxiques et/ou allélopathiques (Ammar *et al.* 2014). Cependant, des études ont montré une corrélation négative entre la forte biomasse de *R. raciborskii* et la disponibilité en NO_3^- (Karadžić *et al.* 2013, Mohamed & Al-Shehri 2013) ainsi qu'une dominance des souches toxiques de *R. raciborskii* par rapport aux souches non toxiques en fonction de la concentration en P plutôt qu'en N, la concentration intracellulaire en CYN et la proportion de gène *cyrA* augmentant avec l'ajout de PO_4^{3-} quel que soit l'apport de NO_3^- (Burford *et al.* 2014).

Les études portant sur l'effet de l'N sur la production de CYN et de ses homologues (ex : désoxyCYN) fournissent des résultats contradictoires. Certaines études considèrent que la source d'N et sa concentration n'influencent que partiellement la biosynthèse de CYN, laquelle biosynthèse peut être totalement indépendante du taux de croissance (Saker *et al.* 1999, Saker & Neilan 2001, Mohamed & Al-Shehri 2013, Burford *et al.* 2014, Yang *et al.* 2018), tandis que d'autres suggèrent que la production CYN est nécessairement associée à l'assimilation d'N et à la croissance de la microalgue (Davis *et al.* 2014, Stucken *et al.* 2014, Pierangelini *et al.* 2015, Willis *et al.* 2015). Dans le premier cas de figure, les premières études ont montré que sept souches de *R. raciborskii* présentaient une affinité plus forte pour le NH_4^+ que pour le NO_3^- , et que les souches toxiques présentaient des teneurs cellulaires de CYN plus importantes sous limitation azotée et avec diazotrophie, exceptée une souche (CR3) (Saker *et al.* 1999, Saker & Neilan 2001). Une étude a récemment montré que les fluctuations d'N n'altèrent pas la fitness et les taux de croissance de *R. raciborskii* CHAB 3438, mais peuvent entraver la biosynthèse de CYN et modifier les proportions entre les CYN intra- et extracellulaires (Yang *et al.* 2018). Selon les partisans de la seconde hypothèse, la privation d'N ou la cytotoxicité de l'ammoniac (NH_3) affectent négativement la biosynthèse de CYN de manière indirecte, car il n'existe à ce jour aucune preuve qu'une variation des conditions azotées induise une régulation transcriptionnelle de la production de toxines (Stucken *et al.* 2014). La seule étude qui a porté sur l'effet du NO_3^- sur la transcription des gènes de toxines, et qui n'a montré aucun lien entre biosynthèse de toxines et disponibilité en N, concernait les gènes *sxtU* et *sxtI* impliqués dans la biosynthèse de la STX (Vico *et al.* 2016). L'hypothèse proposée par Mihali *et al.* (2008) stipule que l'augmentation de la production de CYN lorsque le NO_3^- ou le NH_4^+ sont absents du milieu serait due à une régulation indirecte du groupe de gènes *cyn* par l'N. En effet, ce groupe est encadré par des homologues du gène *hyp* ayant un rôle dans la maturation des hydrogénases. Chez *Nostoc* sp. PCC73102, une autre cyanobactérie, ces gènes sont régulés par le régulateur universel de l'N, NtcA. Ainsi, par effet de cascades, les gènes *cyn* sont, par le biais des gènes *hyp*, potentiellement régulés par l'N (Mihali *et al.* 2008).

Le genre *Aphanizomenon* est un groupe de cyanobactéries également composé d'espèces productrices de CYN et analogues, notamment la désoxyCYN, et/ou d'anatoxine-a, et dont le principal représentant est *A. ovalisporum* (Rapala *et al.* 1993, Banker *et al.* 1997). Contrairement au groupe de gènes *cyr* identifié chez *R. raciborskii*, la biosynthèse de CYN chez *A. ovalisporum* implique le groupe de gènes *aoa* composés d'un amidinotransférase (*aoaA*) et d'une polykétide synthase (*aoaC*) dont l'expression est affectée par la disponibilité en N et par l'intensité lumineuse (Shalev-Alon *et al.* 2002, Shalev-Malul *et al.* 2008). Bien que peu d'études aient porté sur *Aphanizomenon*, la dynamique de production de CYN semble également similaire à celle de son homologue cyanobactérien ci-dessus. En effet, chez différentes souches d'*Aphanizomenon* sp., des conditions riches en N et limitées en P favorisent la biosynthèse et la libération active de CYN dans le milieu, ainsi qu'une augmentation de la proportion de désoxyCYN extracellulaire (Preußel *et al.* 2014). En cas de limitation par l'N, la libération extracellulaire est moins importante et une accumulation intracellulaire se produit (Preußel *et al.* 2014).

Ils convient de noter que ces divergences peuvent cependant provenir des différences de méthodes utilisées pour l'analyse des CYN intra- et extracellulaires et pour le calcul de leurs concentrations (Pierangelini *et al.* 2015). Par exemple, pour estimer la production de CYN, Pierangelini *et al.* (2015) conseillent d'utiliser la concentration volumétrique intracellulaire plutôt que la quantité intracellulaire par unité de poids sec lyophilisé (voir par exemple Saker & Neilan (2001)). La diversité des réponses observées chez *R. raciborskii*, allant d'une absence à une forte toxicité, ne permet pas de conclure sur un profil type de réponse. Des recherches plus approfondies sont donc nécessaires.

2.2. Toxines paralytiques, les dinoflagellés *Alexandrium*, *Gymnodinium* et la cyanobactérie *Raphidiopsis*

L'intoxication paralytique est une maladie provoquée par la consommation de produits de la mer contaminés par un groupe de neurotoxines riches en N, nommées toxines paralytiques des fruits de mer (« *Paralytic shellfish toxins* », TPFs), dont la principale représentante est la saxitoxine (STX, C₁₀H₁₇N₇O₄) (**Figure 20**) (Etheridge 2010). Les TPFs ont une action inhibitrice des canaux sodium dépendants du voltage, qui sont constitués de protéines transmembranaires responsables de l'initiation et de la propagation des potentiels d'action chez

l'Homme (pour d'information, voir les revues de [Cestèle & Catterall 2000](#), [Stevens et al. 2011](#), [Thottumkara et al. 2014](#)). Historiquement, la première TPF découverte a été la STX identifiée par H. Sommer en 1937 à la suite d'un empoisonnement de grande envergure par des moules au large des côtes californiennes lors d'une prolifération du dinoflagellé *Alexandrium catenella* (anciennement *Gonyaulax catenella*) (voir la revue de [Thottumkara et al. 2014](#)). Les TPFs sont connues pour être produites par des dinoflagellés du genre *Alexandrium*, *Gymnodinium* et *Pyrodinium* ainsi que par des cyanobactéries du genre *Raphidiopsis*, *Cylindrospermopsis*, *Aphanizomenon* et *Anabaena* ([Orr et al. 2013](#)). Toutefois, les études ayant porté sur les effets de l'N sur leur production par ces microorganismes ont principalement concerné *Alexandrium*, *Gymnodinium*, *Raphidiopsis* et *Lyngbya*.

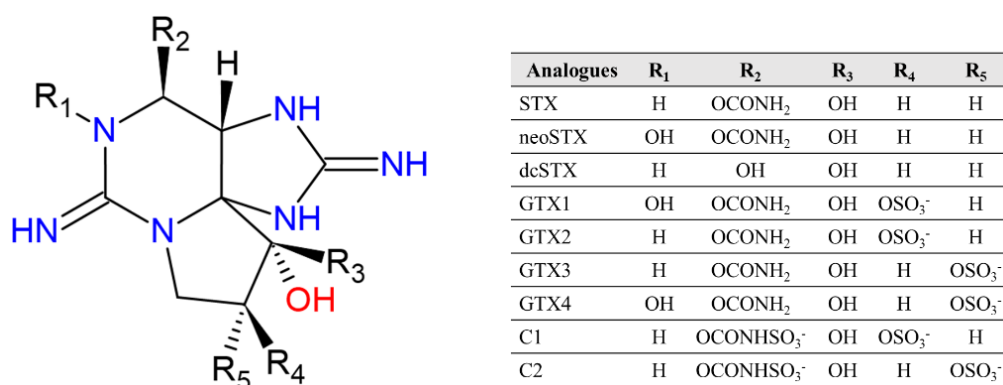


Figure 20 : Structure moléculaire des TPFs.

La production de TPFs est à la fois liée à des processus transcriptionnels *via* le groupe de gènes *stx* et post-transcriptionnels ([Boyer et al. 1986](#), [Geffroy et al. 2021](#)). Les gènes *stx*, principalement impliqués dans la synthèse de STX, peuvent également être impliqués dans d'autres voies de biosynthèse et varient en fonction de l'organisme producteur. Leur acquisition (par de possibles transferts horizontaux) à la fois par les cyanobactéries et par les dinoflagellés font toujours l'objet de débats (voir la revue de [Akbar et al. 2020](#) et les articles associés). Par exemple, l'origine des TPFs chez les dinoflagellés suscite trois hypothèses : (i) la présence de bactéries intracellulaires productrices de STX, (ii) une évolution convergente entre cyanobactéries et dinoflagellés, ou (iii) un transfert horizontal de gènes (THG) provenant des cyanobactéries. Bien que les bactéries semblent jouer un rôle important dans la modulation de la biosynthèse de STX chez les dinoflagellés, l'encodage séquentiel rend peu probable la première hypothèse tandis que celle d'une évolution convergente est contestée. Le THG semble aujourd'hui être la piste la plus probable (voir review [Orr et al. 2013](#)). Récemment, l'analyse

métabolomique des TPFs chez *A. catenella* par marquage à l' ^{15}N a permis de mettre en évidence la présence d'intermédiaires proches de la STX entre différents organismes producteurs, ce qui suppose des dynamiques de production similaires dans les mêmes conditions environnementales (Cho *et al.* 2019).

Auparavant placé dans le groupe *Protogonyaulax*, le genre *Alexandrium* est un groupe de dinoflagellés toxiques ubiquistes dont plusieurs espèces sont connues pour leur capacité à produire des TPFs, que ce soit la STX ou ses analogues tels que les gonyautoxines (GTxs) (Boyer *et al.* 1986, Wyatt & Jenkinson 1997, Anderson *et al.* 2012, Long *et al.* 2021). Toutes les espèces ou souches ne sont cependant pas toxiques (Orr *et al.* 2011). Différentes hypothèses ont été émises sur le(s) rôle(s) des TPFs des souches toxiques d'*Alexandrium*. Par exemple, elles serviraient de répulsif agissant contre le broutage des copépodes, afin que leur pression de broutage soit redirigée vers des espèces non ou moins toxiques, ce qui aurait comme effet secondaire de réduire la compétition pour les ressources nutritives, notamment lorsqu'elles sont limitantes, un avantage particulièrement bénéfique pour *Alexandrium* dont les capacités d'assimilation de nutriment sont relativement faibles (Guisande *et al.* 2002, Frangópulos *et al.* 2004, Selander *et al.* 2008, Murata *et al.* 2012, Griffin *et al.* 2019, Brown *et al.* 2022, Christou *et al.* 2023). Elles pourraient aussi être des phéromones favorisant la rencontre entre gamètes et régulant la formation de kystes (Wyatt & Jenkinson 1997), une réserve d'N cellulaire (Hall 1982) ou encore un détoxifiant environnemental des milieux riches en NH_4^+ (Hii *et al.* 2016). Cependant, leur origine et leur(s) rôle(s) exact(s) restent encore méconnus car pouvant interférer avec d'autres composés bioactifs connus ou inconnus chez ce genre (voir la revue de Long *et al.* 2021). Par exemple, l'hypothèse de l'exaptation (Gould & Vrba 1982) d'une fonction initiale inconnue vers une nouvelle fonction ne doit pas être écartée.

La dynamique d'expression du gène *stx* chez *Alexandrium* dépend de son cycle cellulaire (Siu *et al.* 1997). Elle dépend aussi de la concentration en N, car le métabolisme azoté régule la biosynthèse de STX et de ses analogues par l'intermédiaire de multiples boucles de rétroaction (Zhuang *et al.* 2015, Abassi *et al.* 2023, Saldivia *et al.* 2023), ce qui suppose des régulations fines de la production de TPFs selon les conditions nutritives. De plus, les différentes espèces d'*Alexandrium* sont polyvalentes vis-à-vis des différentes sources azotées (NO_3^- , NO_2^- , NH_4^+ , l'urée, cyanate), propriété qui leur confère probablement un avantage compétitif sur les autres dinoflagellés pour l'initiation des EANs et leur développement (Leong *et al.* 2004, Zhuang *et al.* 2015). *In situ*, la fréquence des EANs d'*Alexandrium* et les teneurs cellulaires en toxines semblent liées à la teneur cellulaire et à la disponibilité en nutriments,

notamment celle du NH_4^+ (Penna *et al.* 2002, Poulton *et al.* 2005, Hattenrath *et al.* 2010), ce qui est en accord avec la préférence d'*Alexandrium* pour cette source d'N (Leong & Taguchi 2004). Ses capacités de migration lui permettent également de consommer du NO_3^- en profondeur et ainsi de prolonger les épisodes de EANs (MacIntyre *et al.* 1997). Ainsi, les activités anthropiques conduisant à l'eutrophisation des milieux favorisent-elles les efflorescences toxiques d'*Alexandrium*. Par exemple, les EANs d'*A. taylori* en Mer Méditerranée pourraient probablement résulter du tourisme de masse (Penna *et al.* 2002) tandis que les efflorescences toxiques d'*A. fundyense* dans la baie de Northport-Huntington (New-York, États-Unis) bénéficieraient de la proximité des stations d'épuration (Hattenrath *et al.* 2010). De plus, Zhuang *et al.* (2015) ont montré à l'aide d'une étude métatranscriptomique que les gènes associés au piégeage de l'N et à la production de STX sont davantage exprimés lors d'efflorescences d'*A. fundyense*, ce qui est en accord avec les observations précédentes. À noter que la production de TPFs peut également interférer avec d'autres variables environnementales telles que la salinité ou la lumière (Parkhill & Cembella 1999, Hamasaki *et al.* 2001, Wang & Hsieh 2005).

La biosynthèse de TPFs chez *Alexandrium* a principalement lieu lors de la phase de croissance exponentielle (Flynn *et al.* 1994, Xu *et al.* 2012) lorsque l'N est abondant, une limitation en cet élément ne permet ni la production de TPFs ni la croissance d'*Alexandrium* (Boyer *et al.* 1987, Anderson *et al.* 1990b, MacIntyre *et al.* 1997, Siu *et al.* 1997, John & Flynn 2000, Wang & Hsieh 2002, Touzet *et al.* 2007, Selander *et al.* 2008, Yang *et al.* 2011, Lee *et al.* 2012, Jiang *et al.* 2015). Cependant, d'autres études constatent chez ces deux espèces une absence de relation entre biosynthèse de TPFs et concentration en N (le NO_3^- pour *A. tamarense* Pr18b (Parkhill & Cembella 1999), l'urée et le NH_4^+ pour *A. catenella* BF-5 (Griffin *et al.* 2019)). Flynn *et al.* (1996) et Hu *et al.* (2006) rapportent qu'un réapprovisionnement d'N à la suite d'une carence induit une augmentation forte, bien que passagère, de TPFs. Quant à *Gymnodinium catenatum*, un autre dinoflagellé cosmopolite découvert en 1943 dans le golfe de Californie, unique représentant des Gymnodiales et capable de produire des TPFs et des EANs (Graham 1943, Oshima *et al.* 1987, 1993, Band-Schmidt *et al.* 2010), il excrète ses toxines principalement lors de la phase de latence dans des cultures enrichies avec du NO_3^- et lors de la phase de croissance exponentielle dans des cultures enrichies avec de l' NH_4^+ , bien que, d'une manière générale, il semble moins influencé par le régime nutritif qu'*Alexandrium* (Lin *et al.* 2022).

Les effets de l'N sur la biosynthèse de STX ont été peu étudiés chez la cyanobactérie *Raphidiopsis*, contrairement à ses effets sur la biosynthèse de la CYN. [Vargas et al. \(2020\)](#) suggèrent que les milieux oligotrophes favorisent la production de STX par *R. raciborskii* ITUC01 tandis que [Casali et al. \(2017\)](#) établissent des relations positives entre concentration totale en STX, concentration cellulaire et concentration en nutriments dissous. [Yunes et al. \(2009\)](#) trouvent une relation positive entre concentration de NO_3^- et production de STX chez *R. brookii* FURGCY001, tandis que son analogue, la décarbamoylsaxitoxine (dcSTX), présente une relation inverse. A l'instar d'*Alexandrium*, la privation d'N et la cytotoxicité de l'ammoniaque semblent affecter négativement la production de STX chez *Raphidiopsis brookii* D9, mais il a également été suggéré que cette modification de la biosynthèse serait une conséquence indirecte d'une variation du taux de croissance ([Stucken et al. 2014](#)). L'absence de relation entre disponibilité en NO_3^- et abondance des gènes *sxtU* et *sxtI* transcrits semble confirmer cette hypothèse ([Vico et al. 2016](#)).

Chez *Alexandrium*, une limitation en P induit une augmentation du volume cellulaire et une diminution du taux de croissance. Toutefois, les réponses de la production de TPFs chez diverses espèces sont généralement moins reproductibles que celles induites par une limitation en N, car elles varient en fonction du statut azoté, de l'espèce ou de la souche, ainsi que de leur toxicité ([Boyer et al. 1987](#), [Anderson et al. 1990b](#), [Flynn et al. 1994, 1995](#), [Siu et al. 1997](#), [Béchemin et al. 1999](#), [John & Flynn 2000](#), [Wang & Hsieh 2002, 2005](#), [Selander et al. 2008](#), [Xu et al. 2012](#), [Jiang et al. 2015](#), [Han et al. 2016](#)). Par exemple, une colimitation en P et en N de cultures d'*A. fundyense* CCMP 1846 initialement enrichies en NO_3^- se traduit par une augmentation de la teneur cellulaire en TPFs équivalente à celle observée dans des cultures limitées en P mais enrichies en NH_4^+ ([John & Flynn 2000](#)). Les réponses d'*A. minutum* limitée en P divergent également en fonction de la souche : certaines présentent une augmentation de leur teneur cellulaire en TPFs lors d'une grande disponibilité en NO_3^- ou en NH_4^+ (souches AM89BM, 83, CK.A02, AmKB02 et AmKB06) ([Béchemin et al. 1999](#), [Touzet et al. 2007](#), [Selander et al. 2008](#), [Lim et al. 2010](#), [Hii et al. 2016](#)), également observable chez *A. catenella* ([Xu et al. 2012](#)), tandis que d'autres ne voient aucun changement de cette teneur même lors d'une colimitation en P et N (souches AL1V, AL2V et A5) ([Flynn et al. 1994, 1995](#), [Selander et al. 2008](#)). Les TPFs cellulaires de la souche chinoise HK9301 d'*A. tamarense* limitée en P augmentent sous NO_3^- mais diminuent sous NH_4^+ ([Wang & Hsieh 2005](#)), tandis que les TPFs cellulaires des souches japonaise (ATKR-020415) et chinoise (ATCI01) augmentent avec ces deux sources d'N inorganique ([Leong et al. 2004](#), [Murata et al. 2012](#), [Jiang et al. 2015](#)). Un

même rapport N:P avec des concentrations différentes en N et P peut donc engendrer des réponses différentes selon la souche étudiée (Selander *et al.* 2008, Christou *et al.* 2023). Ces différences de réponse de la production de TPFs aux limitations azotée et phosphorée chez *Alexandrium* pourraient provenir des différences de dégradation des voies de biosynthèse de la STX et/ou de celles impliquées dans la division cellulaire (Anderson *et al.* 1990b). Ainsi, une forte concentration d'N associée une faible disponibilité en P provoquerait un ralentissement de la division cellulaire s'accompagnant d'une accumulation de composés intracellulaires riches en N tels que les TPFs. Le modèle de John & Flynn (2002) permet de considérer comme plausible l'hypothèse selon laquelle l'accumulation de toxines dans la cellule lors d'une limitation en P résulterait d'un défaut de transporteur ATP-dépendant nécessaire à leur excrétion. Ces différences suggèrent : (i) des effets synergétiques de la disponibilité en N et P sur la biosynthèse des toxines, et (ii) un rôle de P dans la régulation du métabolisme des toxines (Anderson *et al.* 1990b, Flynn *et al.* 1994, John & Flynn 2000).

Au-delà des effets résultant des interactions entre l'N et le P, la source d'N elle-même peut également influencer la production de TPFs. Par exemple, celle-ci est moins importante lorsque *A. fundyense* et *A. catenella* sont cultivées sous urée plutôt que sous NO_3^- (Dyhrman & Anderson 2003) tandis que la teneur en TPFs chez *A. minutum* est plus importante sous NH_4^+ que sous NO_3^- , notamment lors d'un faible rapport N:P (Lim *et al.* 2010, Hii *et al.* 2016), de même que chez *G. catenatum* (Flynn *et al.* 1996, Lin *et al.* 2022). Ces résultats corroborent ceux obtenus avec *A. tamarense* et *A. catenella* où l'augmentation de la teneur en TPFs dans le temps est plus importante sous NH_4^+ que sous NO_3^- ou urée, avec des différences plus ou moins marquées en fonction de la souche et de la phase de croissance (Leong *et al.* 2004, Xu *et al.* 2012). Des corrélations positives existent chez *A. tamarense* ATKR-020415 entre la teneur cellulaire en toxines et la concentration en N inorganique, mais pas avec l'urée (Leong *et al.* 2004). À noter que les TPFs cellulaires sous NH_4^+ augmentent jusqu'à un seuil critique puis diminuent à cause de la toxicité d'un excès de NH_4^+ sur cette même espèce (Hamasaki *et al.* 2001), ce qui a également été observé chez *A. pacificum* sous NO_3^- où la STX diminue au-delà de 8,82 mM (Abassi *et al.* 2023). De plus, la dynamique de production de toxines en fonction du rapport N:P varie également selon la source d'N. Par exemple, les cultures d'*A. minutum* sous NH_4^+ présente une forte diminution du taux de production de toxine quand le P augmente alors qu'elle n'augmente que légèrement sous NO_3^- (Lim *et al.* 2010). Les voies d'assimilation de ces trois formes azotées étant différentes, leurs effets sur la biosynthèse doivent également l'être (Leong & Taguchi 2004). Fait intéressant, les cultures sous NO_3^- présentent une variation

journalière des TPFs cellulaires qui augmentent la nuit et diminuent le jour, ce qui n'a pas été observé sous NH_4^+ (Flynn *et al.* 1996). La biosynthèse de TPFs est également associée à la teneur intracellulaire d'arginine (Arg), un acide aminé (AA) riche en N, ce qui suppose que les facteurs favorisant le métabolisme associé à l'Arg tels qu'un apport d'N peut favoriser la production de toxines (Flynn *et al.* 1995). De plus, l'Arg a été identifiée comme un précurseur des TPFs chez les cyanobactéries (Kellmann & Neilan 2007). L'étude protéomique de Jiang *et al.* (2015) sur la production de TPFs en conditions appauvries en N ou en P conforte la relation entre leur synthèse et la présence de protéines impliquées dans le métabolisme de l'Arg mais également de la méthionine, la cystéine, de l'ornithine et la proline. À notre connaissance, aucune étude concernant l'effet de l'ajout de ces différents AAs sur la biosynthèse de TPFs n'a été réalisée chez *Alexandrium*.

Les études qui se sont intéressées au profil des toxines chez les dinoflagellés produisant des TPFs présentent des résultats contradictoires. Alors que certaines concluent à un profil toxique indépendant des conditions azotées (Parkhill & Cembella 1999, John & Flynn 2000, Touzet *et al.* 2007), d'autres soutiennent que la composition des TPFs varie en fonction du taux de croissance, de la phase de croissance, ainsi que de la concentration et de la source d'azote (Anderson *et al.* 1990a, Leong *et al.* 2004, Poulton *et al.* 2005, Wang & Hsieh 2005, Lee *et al.* 2012, Murata *et al.* 2012, Xu *et al.* 2012, Jiang *et al.* 2015, Han *et al.* 2016, Hernández-Sandoval *et al.* 2022). Par exemple, Leong *et al.* (2004) avancent que le NO_3^- , qui est la forme la plus oxydée de la ressource azotée, induirait davantage la synthèse des toxines C1 et C2 que celle des GTXs, alors l' NH_4^+ qui est la forme la plus réduite, aurait l'effet contraire. S'il s'avère que le profil des toxines dépend de la disponibilité et/ou de la source en nutriments, il pourrait alors être utilisé à la fois comme biomarqueur de l'espèce présente lors d'efflorescences et de son statut nutritif. Le cas échéant, cela nécessiterait d'avantage d'études sur la variation du profil toxique conduites en cultures continues (Poulton *et al.* 2005, Murata *et al.* 2012). À l'inverse, Touzet *et al.* (2007) suggèrent qu'un profil toxique stable pourrait servir de biomarqueur permettant d'identifier différentes souches, car celui-ci diffère selon les espèces et les souches. Par exemple, la gonyautoxine 2 (GTX-2) est la toxine la plus exprimée chez *A. fundyense* (John & Flynn 2000), de même que la GTX-4 ou la GTX-2 chez *A. minutum*, en fonction des souches (Oshima *et al.* 1989, Flynn *et al.* 1994, Touzet *et al.* 2007), ou la C2 chez *A. tamarense* (Parkhill & Cembella 1999, Wang & Hsieh 2001, Lee *et al.* 2012, Murata *et al.* 2012, Jiang *et al.* 2015) et *A. catenella* (Xu *et al.* 2012). Les toxines d'*A. pacificum* sont majoritairement composées de GTXs, avec un effet de la concentration de NO_3^- sur les proportions relatives de GTX-1+4 et

de GTX-2+3 (Abassi *et al.* 2023). Chez *G. catenatum*, la forme N-sulfocarbamoyl des TPFs est majoritaire, bien que sa contribution diminue au profit des formes carbamoyl et décarbamoyl lors de cultures prolongées (Hernández-Sandoval *et al.* 2022).

Ces résultats dans leur ensemble révèlent une dynamique similaire de la synthèse des TPFs chez les différents représentants du genre *Alexandrium*, avec néanmoins une diversité de réponses en termes d'intensité et de composition en TPFs en fonction des conditions nutritives azotées. Les études portées sur *G. catenatum* et *R. raciborskii* suggèrent également une dynamique générale similaire, c'est-à-dire une augmentation des TPFs consécutive à une limitation en N. Dans les futures études, un usage plus intensif de techniques d'analyse comme les approches omiques (transcriptomique, métabolomique) et le marquage à l'¹⁵N nous aidera à mieux cerner les mécanismes d'assimilation et de métabolisation de l'N ainsi que son utilisation dans les voies de biosynthèse des TPFs.

2.3. Microcystines, Nodularines et les cyanobactéries

Les microcystines (MCs) et les nodularines (NODs) sont des peptides cycliques hépatotoxiques respectivement composés de sept (D-Ala - X - D-MeAsp - Z - Adda - D-γ-Glu - Mdha ; où X et Z sont des positions dont la composition moléculaire peut varier) et cinq AAs (Mdhb - D-MeAsp - Z - Adda - D-γ-Glu) (**Figure 21**), et structurellement proches en raison de leur origine commune, bien que leur ordre d'apparition soit encore débattu (Christiansen *et al.* 2003, Rantala *et al.* 2004). Ces différences de composition influencent leur toxicité : par exemple, la microcystine-LR (MC-LR, C₄₉H₇₄N₁₀O₁₂) est plus toxique que la microcystine-RR (MC-RR, C₄₉H₇₅N₁₃O₁₂), ce qui résulte du remplacement d'une leucine (Leu) pauvre en N, par une Arg riche en N (Tonk *et al.* 2008).

Ces toxines sont très répandues chez les cyanobactéries du genre *Microcystis*, *Planktothrix*, *Anabaena* et *Oscillatoria* pour les MCs (voir review Krishnan & Mou 2021), et sont spécifiques du genre *Nodularia* pour les NOD (voir la revue de Etheridge 2010). Leur structure peptidique est très riche en N. À l'instar des CYN et des TPFs, l'origine et les rôles exacts des MCs et des NOD sont encore peu connus. Schatz *et al.* (2007) ont émis l'hypothèse que les MCs ont joué un rôle de phéromone au cours de leur évolution, permettant aux organismes qui en produisent d'estimer la mort cellulaire au sein de leur population et d'émettre une réponse de défense adéquate qui peut également se traduire par une production

supplémentaire de MC. Cette hypothèse est corroborée par une origine évolutive commune de la microcystine synthétase chez les différentes cyanobactéries productrices de MCs et par le fait que l'apparition d'un ancêtre commun des cyanobactéries productrices de MCs est antérieure à celle des métazoaires et donc de leur prédateurs boteurs (copépodes et cladocères) ([Rantala et al. 2004](#)). Ces dernières observations confortent l'hypothèse d'une possible exaptation au cours de l'évolution chez ces microorganismes ([Gould & Vrba 1982](#)).

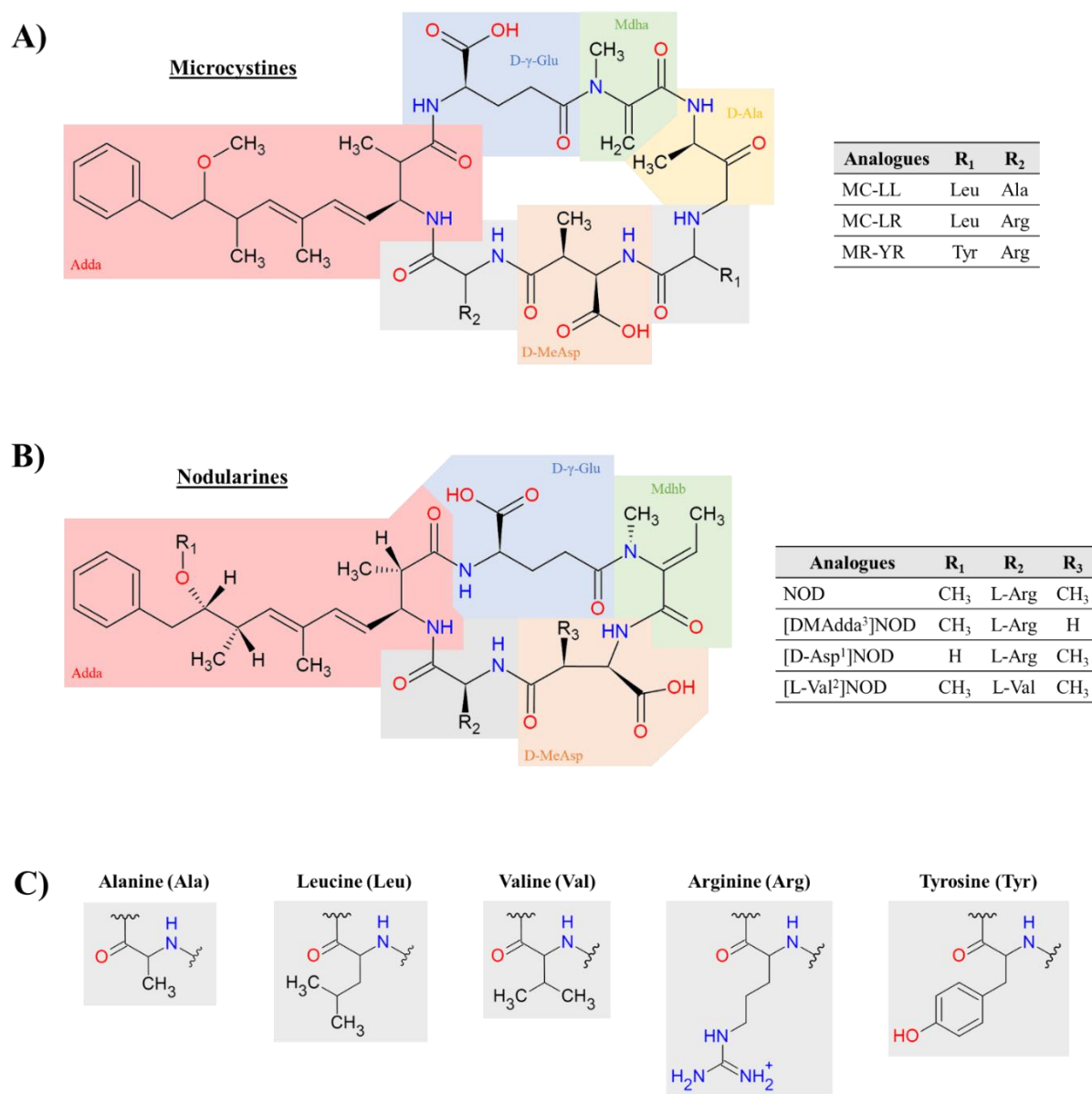


Figure 21 : Structures moléculaires des **A)** microcystines (MCs), **B)** nodularines (NODs), et **C)** acides aminés associés.

2.3.1. Microcystines et les cyanobactéries *Microcystis*, *Planktothrix* et *Nostoc*

Le genre *Microcystis* comporte des cyanobactéries non diazotrophes capables ou non de produire des MCs, les souches toxiques et non-toxiques pouvant cohabiter (Rinta-Kanto *et al.* 2009), tandis que *Planktothrix agardhii* est une cyanobactérie productrice de MCs (et plus particulièrement des formes LR et RR) et de TPFs, bien qu'à notre connaissance aucune étude de l'effet de l'N sur la production de TPFs n'ait été réalisée à ce jour (Tonk *et al.* 2008). La production de MCs est non-ribosomique et est soumise à l'expression du cluster de gènes *mcy* composé de 10 sous-unités de synthétase peptidique (long ORFs : *mcyA-E* et *G* ; petit ORFs : *mcyF* et *H-J*), où *mcyA* et *mcyD* sont fortement impliqués dans la biosynthèse de la MCs (Dittmann *et al.* 1997, Tillett *et al.* 2000). On retrouve les modules suivants : les peptides synthétases (*mcyABC*), les polycétides synthases (PKS ; *mcyD*), les enzymes chimériques composées de modules peptide-synthétases et PKS (*mcyEG*), une thioestérase putative (*mcyT*), un transporteur ABC putatif (*mcyH*) et une enzyme putative de modification des peptides (*mcyJ*) (Christiansen *et al.* 2003). Ces gènes ne sont pas présents chez les souches non toxiques (Dittmann *et al.* 1997, Tillett *et al.* 2000) et des différences de séquences et de dispositions existent entre les clusters de gènes *mcy* de ces deux cyanobactéries (Christiansen *et al.* 2003). Le rôle des MCs chez ces souches est encore inconnu mais leur production a un coût métabolique important qui peut être délétère si les organismes récepteurs sont insensibles à ces toxines, ce qui suppose un rôle important de ces molécules dans la physiologie des souches toxiques (Briand *et al.* 2012).

Divers auteurs ont rapporté que l'enrichissement en N, notamment en N inorganique dissous (NID), favorise la prolifération de souches toxiques de *Microcystis* par rapport aux souches non-toxiques (Vézie *et al.* 2002, Yoshida *et al.* 2007, Jiang *et al.* 2008, Ha *et al.* 2009, Moisander *et al.* 2009, Davis *et al.* 2010). À l'inverse, Beversdorf *et al.* (2013) rapportent que, lorsque le NID est totalement consommé, l'absence de fixation d'N défavorise la croissance des souches toxiques de *Microcystis* au profit des cyanobactéries diazotrophes du genre *Aphanizomenon*. Des relations positives entre teneur cellulaire en MCs chez *M. aeruginosa* et concentration de NO_3^- dans le milieu ont été mises en évidence dans des lacs du Michigan (USA) (Horst *et al.* 2014).

D'après certaines études, *M. aeruginosa* aurait une préférence pour le NO_3^- et, dans une moindre mesure, pour l'urée, mais a peu d'appétence pour le NH_4^+ (Yan *et al.* 2015, Erratt *et al.* 2018, Zuo *et al.* 2018, Chen *et al.* 2019), alors que d'autres études ne mentionnent aucune

préférence (Chaffin *et al.* 2018). De la même manière, *P. agardhii* possède une forte affinité pour le NO_3^- , ce qui, dans certaines conditions, lui procure un avantage concurrentiel sur certaines espèces de cyanobactéries telles que *R. raciborskii* (Ammar *et al.* 2014). Toutefois, Yang *et al.* (2022) montrent que la croissance de *M. aeruginosa* FACHB-905 limitée en N est davantage stimulée par un apport d' NH_4^+ que par un apport de NO_3^- , bien que les dommages du photosystème II (PSII) provoqués par l' NH_4^+ se traduisent par une densité cellulaire maximale plus faible, ce qui corrobore les résultats de Chen *et al.* (2019). Un apport d'urée seule à une concentration élevée (aux alentours de $3,6 \text{ mmol.L}^{-1}$) semble également inhiber la croissance (Huang *et al.* 2014, Wu *et al.* 2015). Hormis la lysine (Lys), *M. aeruginosa* est également capable d'assimiler plusieurs AAs libres dissous (AALDs), notamment ceux qui sont riches en N, tels que l'alanine (Ala), la Leu, l'Arg, l'acide glutamique (Glu) et l'acide aspartique (Asp) (Dai *et al.* 2009, Yan *et al.* 2015, Zuo *et al.* 2018). Cependant, Glu et Asp peuvent favoriser la croissance de *M. aeruginosa* jusqu'à des concentrations critiques au-delà desquelles ces deux AALDs peuvent également provoquer une déformation cellulaire (Dai *et al.* 2009). Cependant, ces résultats sont contradictoires avec ceux de Yan *et al.* (2004) qui observent que l' NH_4^+ favorise la croissance de *M. aeruginosa* DC-1 tandis que l'Arg l'inhibe.

Les études conduites en laboratoire sur l'effet de l'N sur la production de MCs sont variées, et souvent contradictoires en fonction des espèces et des souches étudiées. Chez *M. aeruginosa*, une limitation par l'N diminue la production de MCs avec des variations de leur profil toxique (Lee *et al.* 2000, Dai *et al.* 2008, Krüger *et al.* 2012, Horst *et al.* 2014, Harke et Gobler 2015, Chia *et al.* 2016, 2017, 2018), l'N étant nécessaire à la fois à la biosynthèse des AAs entrant dans la composition des MCs mais aussi à celle des enzymes potentiellement impliqués dans leur biosynthèse (Dai *et al.* 2008, Harke & Gobler 2015). Kameyama *et al.* (2002) font les mêmes observations chez *M. viridis* NIES 102, contrairement à Sevilla *et al.* (2010) qui ne mettent en évidence aucune relation entre la concentration de NO_3^- et la teneur cellulaire en MC-LR de *M. aeruginosa* PCC7806. Pimentel & Giani (2014) ont quant à eux observé une augmentation de la teneur cellulaire lors de fortes limitations en NO_3^- et NH_4^+ . Récemment, l'analyse transcriptomique de *M. aeruginosa* FACHB-905 réalisée à différentes concentrations d'urée a montré, lors d'une limitation en N, une augmentation de la teneur cellulaire en MCs ainsi qu'une augmentation de l'expression des gènes impliqués dans la biosynthèse de ces toxines (*mcyABCDEFHIJ*) et dans le métabolisme azoté (Zhou *et al.* 2019), ce qui est en contradiction avec les résultats précédents. De même, le gène *mcyB* de *M. aeruginosa* FACHB-905 cultivée sous NO_3^- est positivement régulé quand le milieu devient

limité en N (Peng *et al.* 2017). Ces résultats n'ont cependant pas été retrouvés chez *M. aeruginosa* LE-3 où la privation d'N, quelle que soit sa forme (NO_3^- , NH_4^+ , urée), diminue sa teneur en MCs ainsi que l'expression des gènes impliqués dans la synthèse peptidique des MCs (*mcyACDE*) (Harke & Gobler 2015). Toutefois, les gènes *mcyHIJ*, qui sont impliqués dans l'assemblage de la structure moléculaire et le transport des MCs, sont régulés positivement, ce qui suggère une fonction interne de ces toxines lors d'un stress azoté (Harke & Gobler 2015). Notons que ces différences peuvent être dues à la forme de MCs considérée. Par exemple, Lee *et al.* (2000) ont établi chez *M. aeruginosa* UTEX 2388 des corrélations différentes entre MCs totaux, MC-RR, MC-LR et microcystine-YR (MC-YR) d'une part et la chlorophylle-a d'autre part. L'effet du rapport N:P sur la production de MCs varie également d'une souche à l'autre, la corrélation entre ces deux termes étant forte pour certaines (Vézie *et al.* 2002, Downing *et al.* 2005) et moins évidente pour d'autres, comme *M. aeruginosa* UTEX 2388 (Lee *et al.* 2000). Finalement, la stœchiométrie cellulaire semble également être une donnée importante pour la production de MC. Par exemple, Van de Waal *et al.* (2009) montrent qu'une augmentation du rapport N:C provoque une augmentation de la teneur en MCs et de ses analogues MC-RR et MC-YR, plus riches en N.

Certaines études émettent l'hypothèse que la concentration et la nature du NID ne peuvent avoir d'effets sur la production de MCs que de façon indirecte, notamment par le biais d'une modification du taux de croissance. Par exemple, Briand *et al.* (2012) ont observé que la biosynthèse de MCs chez *M. aeruginosa* est proportionnelle à son taux de croissance, ce qui corrobore les travaux de Orr & Jones (1998) et Long *et al.* (2001) qui ont établi des relations linéaires positives entre le taux de croissance et le quota cellulaire en MC-LR dans des cultures continues limitées par l'N. Ces observations sont étayées par le fait que l'expression du gène *mcyD* de l'opéron *mcy* est indépendante de la disponibilité en NO_3^- , alors que l'augmentation du taux de croissance induite par l'ajout d'N semble affecter cette expression (Sevilla *et al.* 2010). Chez d'autres organismes producteurs de MCs, tels que les cyanobactéries benthiques du genre *Nostoc* productrices d'une autre toxine hexapeptidique cyclique nommée Nostophycine (Fujii *et al.* 1999), la production de toxines semble également être davantage influencée par le cycle cellulaire, la variation de P, de lumière et de température que par une limitation en N (Kurmayer 2011). Cependant, à notre connaissance, aucune étude spécifiquement dédiée aux effets de l'N sur la production de MCs chez ce groupe n'a été réalisée. Toutefois, plusieurs auteurs affirment que le taux de production de MCs chez

Microcystis n'est pas uniquement expliqué par son taux de croissance (Vézie *et al.* 2002, Yan *et al.* 2004, Downing *et al.* 2005, Horst *et al.* 2014).

La régulation de la production de MCs par l'N semble être liée au métabolisme azoté via le facteur de transcription NtcA, le régulateur universel de l'N. Chez *M. aeruginosa* PCC 7806, NtcA se lie aux régions promotrices *mcxDA*, *mcxE* et *mcxH* des MCs, ce qui suppose une régulation (au moins partielle) par l'N des gènes de la microcystine synthétase (Ginn *et al.* 2010, Kuniyoshi *et al.* 2011). L'étude protéomique comparative d'Alexova *et al.* (2011) sur différentes souches de *M. aeruginosa* confirme ce lien entre NtcA et biosynthèse de MCs. De plus, Kuniyoshi *et al.* (2011) montrent que la présence du 2-oxoglutarate, molécule indicatrice de l'équilibre C:N cellulaire, augmente 2,5 fois l'affinité de NtcA pour les régions promotrices des gènes *mcxDA*, *mcxE* et *mcxH*, ce qui suggère un rôle des MCs dans l'équilibre des métabolismes carboné et azoté. Des études plus récentes sur *M. aeruginosa* FACHB-905 ont montré que l'expression des gènes *ntxA*, *pipX* et *glnB* associés au métabolisme azoté ainsi que celle des gènes *mcxA* et *mcxD* présentent des dynamiques différentes selon la concentration et la forme d'N utilisée (Chen *et al.* 2019). Une concentration élevée de NO_3^- a tendance à réduire la transcription de l'ensemble de ces gènes, tandis qu'une concentration élevée de NH_4^+ favorise la transcription de *mcxA* et *mcxD* mais régule négativement l'expression des gènes *ntxA*, *pipX* et *glnB* (Chen *et al.* 2019). Ces observations corroborent partiellement celles de Pimentel & Giani (2014) selon lesquelles l'expression des gènes *ntxA* et *mcxD* des souches Ma19 et Ma26 de *M. aeruginosa* augmente dans des cultures limitées en N, que ce soit par le NO_3^- ou l' NH_4^+ . Chen *et al.* (2019) observent qu'une diminution de la concentration en urée s'accompagne d'une augmentation de l'expression des gènes associés au métabolisme azoté, et d'aucune variation de ceux associés à la biosynthèse de MCs, tandis que Zhou *et al.* (2019) observent une augmentation de la transcription de l'ensemble du cluster de gènes *mcy* (alors que l'expression du gène *ntxA* reste stable), que ce gène soit associé à la synthèse peptidique (*mcxABDCDEF*) ou à l'adaptation et au transport (*mcyHFIJ*).

La seule étude conduite sur les effets de l'N sur la synthèse de CYN de différentes souches d'*Aphanizomenon* sp. montre que des conditions riches en N et limitées en P favorisent la biosynthèse de CYN puis sa libération active dans le milieu, ainsi qu'une augmentation de la proportion de désoxyCYN extracellulaire (Preußel *et al.* 2014). En cas de limitation par l'N, la libération est moins importante et une accumulation intracellulaire se produit (Preußel *et al.* 2014).

La structure peptidique modulable des MCs suppose une influence des AALDs sur la production de toxines et l'expression du profil toxique. Plusieurs auteurs ont ainsi étudié l'effet de la disponibilité en AAs sur la production de MCs par *Microcystis* (Yan *et al.* 2004, 2015, Dai *et al.* 2008, Sano *et al.* 2011, Wu *et al.* 2015, Chen *et al.* 2019) et *P. agardhii* (Tonk *et al.* 2008, Van de Waal *et al.* 2010). Par exemple, l'effet des différents AALDs sur la production de MCs par *Microcystis* varie fortement : des AAs constitutifs de la structure moléculaire des MCs tels que l'Ala, la Leu et l'Arg favorisent la production de MC-LR tandis que le Glu, l'Asp ou la Lys ne favorisent aucunement sa production. Ces différences peuvent provenir d'une perturbation de la biosynthèse de MCs due à une déformation cellulaire induite par certains AAs (Glu, Asp), ou d'un défaut de croissance cellulaire (comme c'est le cas avec la Lys) (Dai *et al.* 2009). Cependant, il a aussi été montré que la Leu et l'Arg peuvent inhiber la production de MC-LR chez *M. aeruginosa* DC-1 (Yan *et al.* 2004). De même, des études de marquage des MCs par de l' ^{15}N ont montré une production plus importante de MC-LR sous NH_4^+ que sous Ala, mais une meilleure synthèse de l'Ala en MC-LR (Sano *et al.* 2011, Yan *et al.* 2015). En marquant de l'urée avec de l' ^{15}N , Wu *et al.* (2015) montrent que cette source d'N est en premier lieu synthétisée sous forme de résidus d'Ala ou de Leu tandis que le Mdha est le dernier composant de la MC-LR à assimiler l'urée marquée. Enfin, une corrélation positive entre les teneurs intracellulaires en MCs et en AAs associés à la structure des MCs a été mise en évidence chez *M. aeruginosa* FACHB-905 (Chen *et al.* 2019). Les variations de Leu et d'Arg dans le milieu modifient le profil toxique de *P. agardhii* : une augmentation de la Leu augmente le rapport MC-LR/RR tandis que l'ajout d'Arg provoque l'inverse (Tonk *et al.* 2008), bien qu'une quantité négligeable d'AAs disponibles ($< 0,5\%$ du pool total d'AAs) soit allouée à la biosynthèse de MCs (Van de Waal *et al.* 2010). De plus, Tonk *et al.* (2008) et Van de Waal *et al.* (2010) ont montré qu'une limitation en N inorganique diminue la concentration cellulaire en AAs riches en N tels que la Leu et l'Arg ainsi que la production de MCs, mais ne modifie ni le rapport Leu/Arg, ni le rapport MC-LR/RR. Un apport de NO_3^- consécutif à une carence azotée provoque une augmentation progressive des teneurs en AAs, notamment Leu et Arg, ainsi que des teneurs en MC-RR, tandis que la production de MC-LR réaugmente plus lentement (Van de Waal *et al.* 2010). Cela proviendrait d'une synthèse spécifique d'Arg et d'Asp via la cyanophycine, une molécule de stockage dont les composants principaux sont l'Arg et l'Asp (Van de Waal *et al.* 2010). La production de MCs chez *P. agardhii* dépend donc directement des sources d'N inorganique et organique dans le milieu ainsi que de leur disponibilité.

Chaffin *et al.* (2018) montrent que la production de MCs par des communautés naturelles de *Microcystis* et de *Planktothrix* enrichies avec des apports répétés de NO_3^- ou d'urée est plus importante qu'avec des apports d' NH_4^+ , ce qui n'est pas le cas avec un apport unique. En laboratoire, une culture de *M. aeruginosa* FACHB-905 enrichie avec de l' NH_4^+ libère davantage de MCs que lorsqu'elle est enrichie avec du NO_3^- (Chen *et al.* 2019, Yang *et al.* 2022). Cette libération est toutefois plus importante à de faibles ou fortes concentrations en NH_4^+ (Chen *et al.* 2019). Cependant, Chen *et al.* (2019) observent que l' NH_4^+ favorise davantage la synthèse d'AAs précurseurs de MCs que le NO_3^- , tandis que Yang *et al.* (2022) montrent qu'un milieu enrichi en NH_4^+ s'accompagne d'une teneur cellulaire en MCs moins élevée qu'un milieu enrichi en NO_3^- . Une concentration d'urée trop élevée peut également inhiber la production de MC-LR ainsi que la croissance cellulaire (Wu *et al.* 2015), bien que cette inhibition disparaisse si du NO_3^- est ajouté simultanément (Huang *et al.* 2014). La concentration en urée ne modifie néanmoins pas les proportions entre les analogues de la MC (Huang *et al.* 2014). Pimentel & Giani (2014) rapportent qu'une limitation en N induit une augmentation de la teneur cellulaire en MCs chez deux souches brésiliennes de *Microcystis*. La souche Ma26, plus toxique, connaît une augmentation 6 fois plus importante sous NO_3^- que sous NH_4^+ , alors que dans la souche Ma19, moins toxique, aucune différence significative n'apparaît. Des différences intraspécifiques de la réponse à la source d'N existent donc à la fois dans la production de MCs et dans l'expression des gènes associés.

Enfin, Vézie *et al.* (2002), Jiang *et al.* (2008), Chia *et al.* (2016, 2017) et Chaffin *et al.* (2018) ont montré que des interactions entre l'N, le P, la lumière et le fer pouvaient avoir des effets sur la croissance et la production de MCs. La possibilité de lyse cellulaire (Schatz *et al.* 2007), et la mise en contact des cellules ciblées de *M. aeruginosa* avec d'autres phycotoxines telles que la CYN (principalement), l'anatoxine-a ou les MCs elles-mêmes (Chia *et al.* 2016, 2017), et/ou avec un compétiteur tels qu'*Anabaena* (Chia *et al.* 2018), peuvent également interagir avec les effets de l'N dans la production de MCs, ce qui montre la nécessité de coupler les approches réductionniste et holistique.

La production de MCs chez *Microcystis* et *Planktothrix* présente des dynamiques différentes en fonction de la concentration et de la source d'N, de l'espèce mais également de la souche étudiée. Des doutes subsistent encore sur le fait que l'effet de l'N sur la production de MCs soit indépendant de son effet sur le taux de croissance, bien que des résultats plus récents supposent une synergie et interdépendance entre ces deux effets, non seulement sur la

production de MCs, mais aussi sur le profil toxique en fonction de la source d'N, notamment lorsque cette dernière comporte des AAs constitutifs de la molécule de la MC.

2.3.2. Nodularines et le genre *Nodularia* (cyanobactérie)

Peu d'études ont été réalisées sur l'impact des sources azotées sur la production de NODs par *Nodularia*. Les premières ont cependant montré que des niveaux élevés de température, de lumière et de concentration en PO_4^{3-} favorisent la production de NODs intracellulaire, tandis que l'effet inverse résulte de fortes concentrations en N et de faibles salinités (Lehtimäki *et al.* 1997). Ensuite, des corrélations entre limitation en nutriments et production de NODs ont été mises en évidence dans des cultures discontinues, avec les plus fortes concentrations de NODs mesurées pour des niveaux faibles d'N (Repka *et al.* 2001). Cette augmentation de la production de NODs dans le milieu extérieur, consécutive à une limitation par l'N, a été vérifiée quelques années plus tard chez *Nodularia spumigena* par Pattanaik *et al.* (2010). En effet, ces auteurs ont montré que : (i) les concentrations maximales en NODs sont mesurées dans des conditions limitées en N, riches en P, sans rayonnement UV et sans la présence du potentiel compétiteur *Aphanizomenon* sp. ; (ii) il n'y a pas d'effets allélopathiques délétères de *N. spumigena* sur *Aphanizomenon* sp. ; (iii) l'accumulation intracellulaire de NODs et sa libération dans le milieu sont interdépendants et nécessitent d'être étudiées simultanément ; et (iv) des interactions entre la lumière, les éléments nutritifs et la présence d'autres organismes influencent la production de toxines. Aucune différence significative de production de NODs n'a cependant été observée pour différentes sources d'N (NO_3^- , NH_4^+ , N_2) (Stolte *et al.* 2002). Ainsi, des analyses multifactorielles sont nécessaires pour comprendre la production et la libération des toxines (Pattanaik *et al.* 2010).

2.4. Palytoxines, ovatoxines et le dinoflagellé *Ostreopsis*

La palytoxine (PLTX, $\text{C}_{129}\text{H}_{223}\text{N}_3\text{O}_{54}$) est une toxine marine thermostable de poids moléculaire élevé (entre 2659 et 2680 Da) dont le squelette aliphatique polyhydroxylé est partiellement insaturé (Figure 22). Isolée pour la première fois en 1971 à Hawaï (USA) dans le corail mou *Palythoa* sp., puis caractérisée en 1981 (Ramos & Vasconcelos 2010), cette toxine, très répandue dans le vivant, agit sur la pompe Na,K-ATPase en la transformant en canal ionique (efflux K^+ , afflux Na^+) et dépolarise les membranes cellulaires (pour plus de détails,

voir la revue de [Wu 2009](#)). Depuis le début des années 2000, des analogues de la PLTX nommés ovatoxines (OVTXs) ont été identifiés spécifiquement chez *Ostreopsis* cf. *ovata*, un dinoflagellé responsable d'intoxications respiratoires, notamment sur les côtes méditerranéennes ([Ciminiello et al. 2006, 2008](#)).

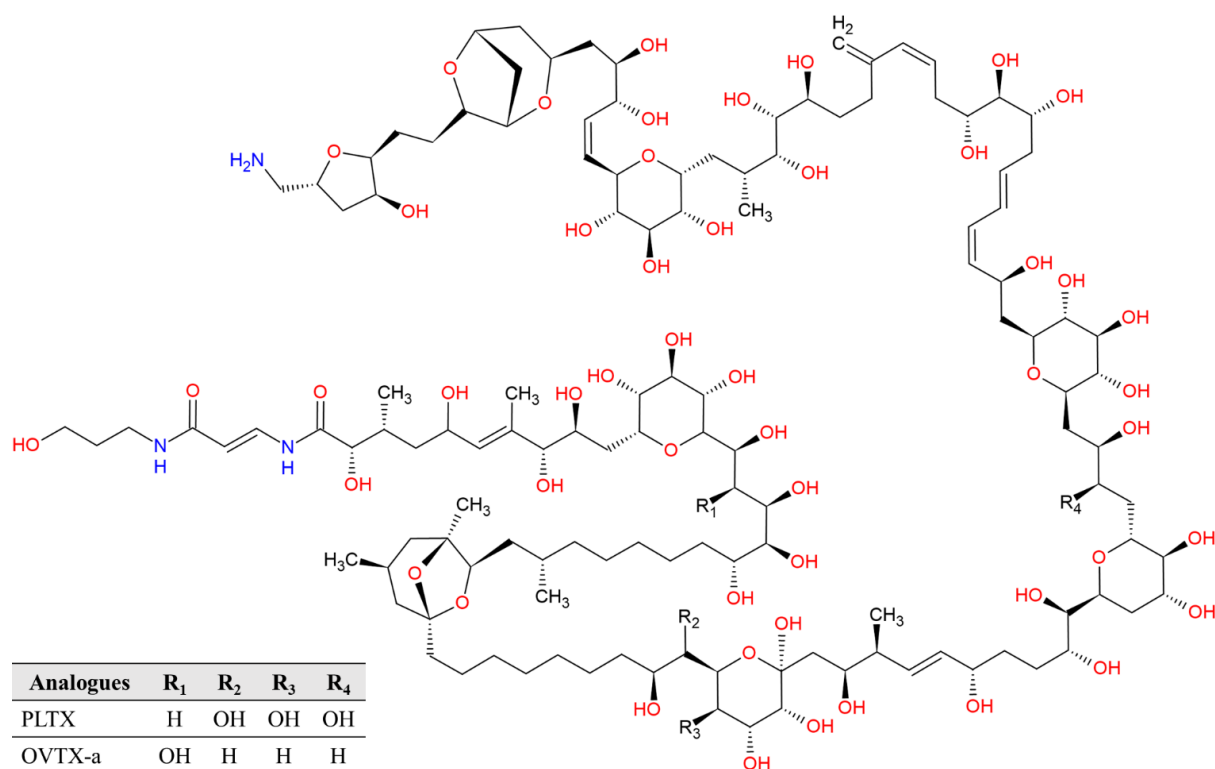


Figure 22 : Structures moléculaires de la palytoxine (PLTX) et de l'ovatoxine-a (OVTX-a).

Le genre *Ostreopsis* comprend des organismes épibenthiques producteurs de composés toxiques variés tels que la PLTX putative et les OVTX-a,b,c,d,e. Il est responsable d'efflorescences toxiques récurrentes, initialement tropicales, qui s'étendent progressivement dans les eaux tempérées ([Pavaux et al. 2020](#)). Le principal représentant de ce groupe, *Ostreopsis* cf. *ovata*, engendre des efflorescences toxiques dont l'origine est multifactorielle, celles-ci étant étroitement liées aux températures et salinités élevées de l'eau, à un faible hydrodynamisme et à la composition initiale en nutriments ([Pistocchi et al. 2011, 2014](#), [Cohu et al. 2013](#), [Vidyarathna & Granéli 2013](#), [Accoroni et al. 2015](#)).

Le profil toxique d'*O. cf. ovata* est, quelles que soient les conditions nutritives, stable dans le temps et est dominé par l'OVTX-a (C₁₂₉H₂₂₃N₃O₅₂) qui s'accumule dans la cellule lors de la phase stationnaire, bien que les résultats diffèrent en fonction de l'étude et la normalisation utilisée ([Vanucci et al. 2012](#), [Pezzolesi et al. 2014, 2016](#), [Medina-Pérez et al. 2023](#)). La

production de toxines est relativement constante dans le temps mais est moins importante dans des conditions limitées en N comme en P (Vanucci *et al.* 2012, Pezzolesi *et al.* 2014, 2016). Dans ces conditions, la biosynthèse des PLTX putatives et OVTXs s'interrompt simultanément à la diminution des rapports C:N et C:P (Pezzolessi *et al.* 2016), ce qui conforte l'hypothèse d'une réorientation du métabolisme vers la production de composés à haute teneur en carbone (C) lors d'une limitation en nutriments (Ianora *et al.* 2006). La toxicité exprimée en taux d'activité hémolytique augmente également consécutivement à une limitation en macronutriments, particulièrement durant les phases stationnaires et de déclin de l'efflorescence, quelle que soit la normalisation appliquée (concentration cellulaire, biovolume), ce qui est en accord avec la bioaccumulation de la PLTX et des OVTXs observée dans des conditions similaires par Vidyarthna & Granéli (2013). Cependant, cette activité hémolytique n'est pas nécessairement associée à PLTX et OVTXs, ce qui laisse présager la présence d'autres composés potentiellement toxiques et sensibles aux variations nutritives. Un modèle basé sur les résultats de Pezzolesi *et al.* (2014) suggère que la régulation des toxines riches en C chez *Ostreopsis* est davantage influencée par le C disponible et le stress en P que par le stress en N, bien que ces auteurs précisent que les effets respectifs de l'N et du P soient difficiles à différencier puisque ces ressources ont été épuisées simultanément et que l'ensemble des processus biotiques influençant la production de toxines n'ont pas été pris en compte (Pinna *et al.* 2015).

Les teneurs en PLTX putative et OVTXs dépendent également de la source d'N utilisée. En effet, les cultures sous urée présentent une teneur totale en toxine plus faible que celles cultivées avec du NO_3^- , de NH_4^+ ou de l'N contenu dans des engrais commerciaux (Medina-Pérez *et al.* 2023). L'apport anthropique d'N dans les eaux côtières sujettes aux proliférations d'*O. cf. ovata* peut donc favoriser la récurrence des efflorescences toxiques et les risques sanitaires des populations à proximité.

3. Toxines peu azotées

3.1. Acide domoïque et la diatomée *Pseudo-nitzschia*

L'acide domoïque (AD) ($C_{15}H_{21}NO_6$) est un AA polaire neurotoxique responsable d'amnésies consécutives à une intoxication aux fruits de mer (IAF) (**Figure 23**). Responsable de plusieurs hospitalisations et décès survenus au Canada en 1987, il est traditionnellement utilisé au Japon comme remède contre les parasites intestinaux et comme insecticide. Initialement associé à l'algue rouge *Chondria armata* après sa première découverte en 1958 au Japon, puis à l'algue rouge *Digenea simplex*, on mesure aujourd'hui de l'AD chez plusieurs diatomées telles que le genre *Pseudo-nitzschia* ou les espèces *Amphora coffeaeformis*, *Nitzschia navis-varingica* et *N. bizertensis* (La Barre *et al.* 2014, Zabaglo *et al.* 2016). Les études sur la relation entre l'N et production d'AD ont porté uniquement sur le groupe *Pseudo-nitzschia*, un genre cosmopolite producteur d'AD et d'IAF (Amérique du nord, Amérique du sud, Afrique du sud, Australie, Asie, Europe) (Rao *et al.* 1988, Bates *et al.* 1998, Trainer *et al.* 2012). Les rôles physiologiques et écologiques de l'AD chez *Pseudo-nitzschia* sont encore peu compris à ce jour. Plusieurs hypothèses supposent une fonction d'osmolyte lors de fortes salinités, d'action dissuasive contre le broutage, de phéromone dans la signalisation de la reproduction sexuelle, de quenching photosynthétique ou encore de chélateur de métaux traces pour augmenter la biodisponibilité du fer et détoxifier l'environnement en cuivre (pour plus de détails, voir les revues de Trainer *et al.* 2012 et Zabaglo *et al.* 2016).

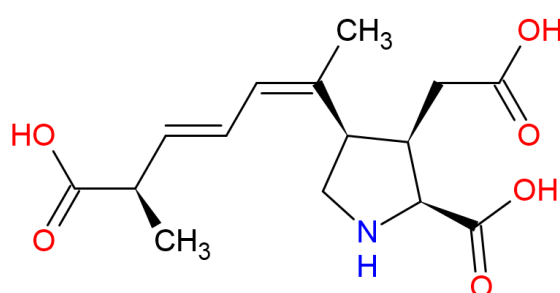


Figure 23 : Structure moléculaire de l'acide domoïque (AD).

Pseudo-nitzschia utilise différentes sources d'N organique (urée, AAs) et inorganique (NO_3^- , NH_4^+) (Howard *et al.* 2007, Cochlan *et al.* 2008, Trainer *et al.* 2012, Martin-Jézéquel *et al.* 2015) avec des préférences intra- et interspécifiques très variables (Kudela *et al.* 2003, Martin-Jézéquel *et al.* 2015, Radan & Cochlan 2018). La conjugaison d'une importante capacité

d'assimilation avec une diversité d'affinités accroît la probabilité d'efflorescences toxiques dans les eaux eutrophisées par des rejets anthropiques (Howard *et al.* 2007, Kudela *et al.* 2008). Lors des EANs survenues en Californie du Sud à la fin du printemps 2004-2005, l'abondance de *P. australis* ainsi que ses teneurs cellulaires en AD étaient inversement corrélées avec les concentrations en acide silicique, NO_3^- et PO_4^{3-} (Anderson *et al.* 2006, Schnetzer *et al.* 2007). Des observations similaires ont été faites avec *Pseudo-nitzschia* sp. dans le nord du Golfe du Mexique à partir de carottes sédimentaires (Parsons & Dortch 2002). Enfin, Radan & Cochlan (2018) ont montré que des enrichissements d'assemblages naturels d'eaux du large de l'Ouest de l'état de Washington (USA) avec du NO_3^- , de NH_4^+ ou de l'urée provoquent une augmentation de l'abondance de *Pseudo-nitzschia* ainsi que de la toxicité totale, avec des effets plus prononcés avec l'urée et le NH_4^+ .

Une multitude d'études a été réalisée sur les effets de la source et de la concentration en éléments nutritifs, dont l'N, sur la production d'AD (Bates *et al.* 1991, 1993, Kudela *et al.* 2003, Howard *et al.* 2007, Thessen *et al.* 2009, Calu *et al.* 2010, Hagström *et al.* 2011, Auro & Cochlan 2013, Terseleer *et al.* 2013, Martin-Jézéquel *et al.* 2015, Lema *et al.* 2017, Radan & Cochlan 2018). Les premières études concluaient que la production d'AD nécessite trois conditions : (i) l'absence de division cellulaire, (ii) une disponibilité en N durant la phase stationnaire, et (iii) la présence de lumière durant la phase stationnaire (Bates *et al.* 1991). Contrairement aux limitations en Si et P, la limitation en N restreint la biosynthèse d'AD chez *Pseudo-nitzschia*, les conditions favorables à une importante production d'AD étant une limitation en Si et/ou en P, associée à un excès d'N et de lumière (Bates *et al.* 1991, 1998, Pan *et al.* 1998, Kudela *et al.* 2003, Hagström *et al.* 2011, Terseleer *et al.* 2013). À noter que ces résultats varient entre les différentes souches de *Pseudo-nitzschia* (Auro & Cochlan 2013).

D'après Hagström *et al.* (2011) et Lema *et al.* (2017), le P semble jouer un rôle plus important que l'N dans la production d'AD. En effet, une faible concentration de PO_4^{3-} avec n'importe quelles concentrations d'N et de Si (donc indépendamment du ratio N:P:Si) induit dans des cultures continues de *P. australis* des concentrations totale et particulière d'AD élevées et une diminution de la densité cellulaire, tandis que des concentrations faibles en N et Si avec une concentration forte en PO_4^{3-} ne produisent qu'une diminution de la densité cellulaire (Lema *et al.* 2017). Des résultats similaires sur l'effet de la limitation en P ont également été rapportés par Hagström *et al.* (2011) chez *P. multiseriata*, avec des concentrations en AD totale et particulière d'autant plus importantes que le rapport N:P est élevé.

Des différences existent en fonction de la souche et de la source d'N utilisée. Les études menées dans les années 90 par [Bates et al. \(1993\)](#), [Hillebrand & Sommer \(1996\)](#) et [Pan et al. \(1998\)](#) convergeaient vers la conclusion que l' NH_4^+ favorise davantage que le NO_3^- la production d'AD cellulaire chez *P. multiseriis* et *P. pungens*, ce qui peut être dû à un moindre coût énergétique d'assimilation du NH_4^+ ou au stress physiologique qu'il induit, bien que le NO_3^- permette une meilleure croissance et donc une concentration totale en AD finalement supérieure à celle mesurée dans les cultures sous NH_4^+ . Cependant les observations plus récentes de [Martin-Jézéquel et al. \(2015\)](#) semblent contredire cette hypothèse énergétique, notamment chez *P. multiseriis* CLN47 où la teneur totale en AD est plus importante avec du NO_3^- qu'avec de l' NH_4^+ . Ces divergences peuvent se retrouver chez la même espèce, comme pour les deux souches CLN47 et Pn-1 de *P. multiseriis*, où les teneurs totales en AD mesurées au même taux de croissance étaient plus importantes pour la première sous NO_3^- et pour la seconde sous NH_4^+ ([Thessen et al. 2009](#)). La production d'AD semble en particulier être favorisée par une forme d'N organique, l'urée, quelle que soit la souche ou le système de culture utilisé ([Howard et al. 2007](#), [Calu et al. 2010](#)). Par exemple, *P. multiseriis* CCL70 en culture discontinue présente une teneur en AD légèrement plus importante en présence d'urée qu'en présence de NO_3^- ([Calu et al. 2010](#), [Martin-Jézéquel et al. 2015](#)). Plus récemment, [Radan & Cochlan \(2018\)](#) ont montré que, au même taux de croissance, la teneur en toxines (càd. l'AD particulaire normalisée par l'abondance cellulaire) de *P. multiseriis* NWFSC-245 était respectivement 1,3 et 3,4 fois supérieures sous urée que sous NH_4^+ ou NO_3^- en culture discontinue, et 3,5 et 4,3 fois supérieure en culture continue. Si une limitation par l'N ne semble pas modifier les proportions des différentes toxines produites chez *P. multiseriis*, la nature de l'élément limitant semble par contre important puisque les teneurs cellulaires en AD sous urée sont respectivement 5 et 13 fois supérieures à celles mesurées sous NO_3^- et NH_4^+ ([Radan & Cochlan 2018](#)). De même, la substitution du NO_3^- par de l'urée dans des cultures continues de *P. pungens* D10 provoque une augmentation de l'AD cellulaire et une diminution de la concentration cellulaire ([Calu et al. 2010](#)). Des résultats similaires ont été obtenus sur des cultures discontinues d'échantillons naturels de la baie Bolinas (San Francisco, Californie, USA) comportant une population de *Pseudo-nitzschia*, ainsi que sur des cultures discontinues de *P. australis* AU221-a, où les teneurs en AD cellulaire et totale mesurées en fin de phase de croissance exponentielle étaient entre 2 et 3 fois plus importantes avec de l'urée qu'avec du NO_3^- ou du NH_4^+ ([Howard et al. 2007](#)). Néanmoins, [Martin-Jézéquel et al. \(2015\)](#) ont montré que la production d'AD par la souche PNC1 de *P. australis* est plus importante avec du glutamate et du NH_4^+ qu'avec de l'urée. De plus, [Auro & Cochlan \(2013\)](#) ont montré que *P. cuspidata*

NWFSC-221 répond différemment de *P. multiseriis* et *P. pungens* puisque l'utilisation du NO_3^- puis du NH_4^+ comme sources d'N se traduit par des teneurs cellulaires en AD plus importantes qu'avec l'urée, bien que cela n'ait été observé que pendant la phase de croissance exponentielle. Cette variabilité inter- et intraspécifique de la production d'AD et du taux de croissance en fonction de la forme d'N utilisé (NO_3^- , NH_4^+ , urée) a également été rapportée par [Thessen et al. \(2009\)](#), ce qui confirme la nécessité d'étudier plus en profondeur les mécanismes d'assimilation et d'utilisation de l'N chez *Pseudo-nitzschia*.

[Cochlan et al. \(2023\)](#) ont remis en question le paradigme d'une toxicité accrue par une limitation en macroéléments ainsi que les équations utilisées pour calculer les taux de production d'AD selon le type de culture utilisée. En effet, les proportions relatives d'AD extra- et intracellulaire varient en fonction du taux de croissance et de la disponibilité en nutriments, la proportion intracellulaire étant plus importante lors de la phase exponentielle que pendant la phase stationnaire, induite par l'appauvrissement en nutriments. Il convient cependant de considérer le rôle potentiel de bactéries susceptibles de diminuer la concentration d'AD dans le milieu en l'incorporant et de souligner la nécessité de les prendre en considération dans l'étude de la toxicité de *Pseudo-nitzschia* (Stewart 2008).

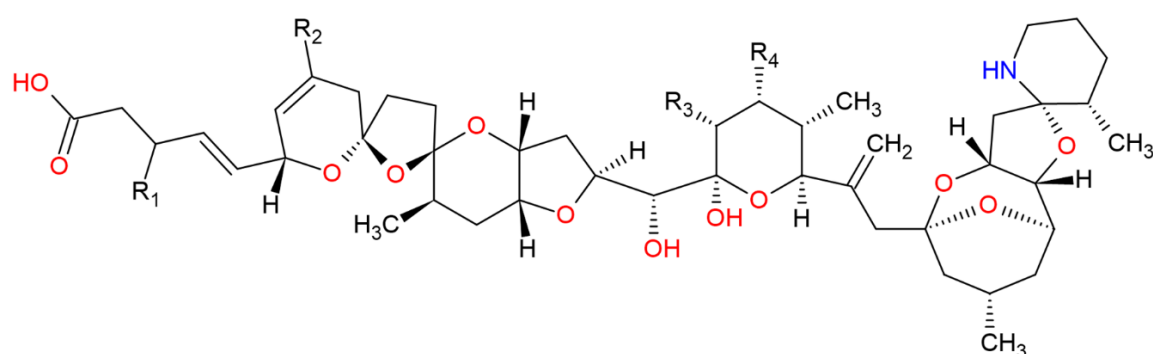
L'ensemble de ces observations montre que la réponse de la toxicité de *Pseudo-nitzschia* à l'utilisation de différentes sources d'N est diverse, ce qui complexifie notre compréhension des efflorescences toxiques. L'origine de cette diversité, encore mal cernée, nécessite des études plus approfondies. Par exemple, la compréhension des processus de régulations génétique comme non-génétique selon les formes d'N utilisé devrait nous donner des informations clefs. Les interactions avec la phycosphère de *Pseudo-nitzschia*, telles que l'effet des bactéries sur la transformation et l'assimilation de l'N environnant ou dans la dynamique de dégradation de l'AD, sont également des pistes de recherche prometteuses.

3.2. Azaspiracides et le dinoflagellé *Azadinium spinosum*

Initialement isolées chez la moule *Mytilus edulis* en 1998 et dénommées *Killary toxin-3* (ou KT-3), les azaspiracides (AZAs) sont des toxines marines polyéther (**Figure 24**) associées des intoxications gastro-intestinales typiques consécutives à une consommation de fruits de mer contaminés. Elles sont répertoriées depuis 1995 sur les côtes de l'Europe de l'Ouest (Pays-Bas, Irlande, Royaume-Uni, Italie, France), les côtes atlantiques de l'Amérique du Nord (Canada) et

de l'Afrique du Nord-Ouest (Maroc) (voir la revue de [Twiner et al. 2008](#)). Leur nom provient de la structure moléculaire du premier composé, l'AZA-1 ($C_{47}H_{71}NO_{12}$) qui comprend une amine cyclique (groupe aza), un unique tri-spiro-assemblage et un groupe acide carboxylique (soit « aza-spir-acid »). Les AZAs se différencient uniquement par le nombre de groupements méthyles et sont connues pour être produites en particulier par les dinoflagellés du genre *Protoperdium*, notamment *P. cassipes* (voir la revue de [Twiner et al. 2008](#)). Nous ne discuterons ici que de l'espèce *Azadinium spinosum* ([Tillmann et al. 2009](#)).

A. spinosum est un dinoflagellé capable de se développer dans des conditions variées, et qui préfère le NO_3^- à l'urée ou à l' NH_4^+ ([Jauffrais et al. 2013](#), [Li et al. 2016](#)). Les effets des nutriments sur la production d'AZAs par *A. spinosum* ont peu été étudiés. [Li et al. \(2016\)](#), ainsi que plus tard [Kilcoyne et al. \(2019\)](#), ont observé qu'une modification du milieu de culture induit des variations opposées de densité cellulaire et de quota de toxines, bien que leurs résultats varient d'une souche à l'autre. En outre, leurs travaux ne permettent pas d'identifier les effets spécifiques de chaque élément nutritif sur la production de toxines. Il semble que le quota cellulaire en AZAs augmente avec une baisse de la température et une limitation en P, mais qu'il reste insensible aux variations de concentrations d'N et des sources d'N testées ([Jauffrais et al. 2013](#), [Li et al. 2016](#)). [Jauffrais et al. \(2013\)](#) et [Kilcoyne et al. \(2019\)](#) préconisent de prendre en compte la variation de micronutriments tels que le sélénium ainsi que la synergie entre variables environnementales comme facteur pouvant modifier la production des AZAs par *A. spinosum*.



Analogues	R ₁	R ₂	R ₃	R ₄
AZA1	H	H	CH ₃	H
AZA2	H	CH ₃	CH ₃	H
AZA3	H	H	H	H
AZA4	OH	H	H	CH ₃
AZA5	H	H	H	OH

Figure 24 : Structures moléculaires des azaspiracides (AZAs).

3.3. Anatoxine-a et les cyanobactéries *Anabaena* et *Aphanizomenon*

L'anatoxine-a (ATX-A, $C_{10}H_{15}NO$) est un alcaloïde neurotoxique des cyanobactéries telles que *Microcystis*, *Aphanizomenon*, *Acutodesmus* ou encore *Anabaena* (**Figure 25**). À l'instar des toxines précédentes, leur rôle écologique reste totalement inconnu et les hypothèses restent cantonnées à une action anti-broutage et/ou inhibitrice des compétiteurs (pour plus d'information, voir la revue de [Colas et al. 2021](#)). Des propriétés allélopathiques dépendant des conditions azotées et lumineuses sont toutefois suspectées, des effets de l'ATX-A sur la teneur en pigments, l'activité antioxydante et la production de ROS ayant été observés chez la cyanobactérie *Microcystis aeruginosa* et la diatomée *Acutodesmus acuminatus* ([Chia et al. 2016](#)).

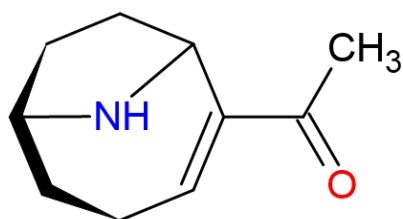


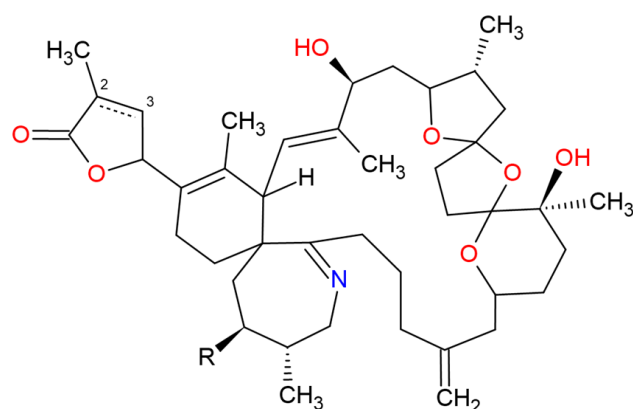
Figure 25 : Structure moléculaire de l'anatoxine-a (ATX-A).

À notre connaissance, seules deux études ont porté sur l'effet de l'N sur la production d'ATX-A chez les cyanobactéries. [Rapala et al. \(1993\)](#) observent une augmentation de la production d'ATX-A chez *Anabaena flos-aquae* (souche 14) et *Aphanizomenon flos-aquae* (souche 3) quand elles deviennent diazotrophes consécutivement à un épuisement de l'N inorganique, avec des variations interspécifiques selon la forme d'N utilisée, tandis que [Gagnon & Pick \(2012\)](#) rapportent une augmentation de la concentration totale et du contenu cellulaire en ATX-A chez *Aphanizomenon issatschenkoi* (souche CAWBG02) uniquement lorsque le stress azoté est modéré. Les connaissances sur les liens entre l'N et l'ATX-A sont trop éparpillées pour que puisse se dégager une réponse générale.

3.4. Spirolides et le dinoflagellé *Alexandrium*

Les spirolides (SPXs) sont des imines macrocycliques (**Figure 26**), phycotoxines lipophiles que l'on trouve chez le dinoflagellé *Alexandrium ostenfeldii* et dont la production ne semble pas être influencée par des variations de NO_3^- ([Maclean et al. 2003](#)). À notre

connaissance, aucune autre étude traitant de l'effet de l'N sur la production de SPXs n'a été réalisée.



Analogues	Double liaison 2-3	R
SPX-A	Oui	H
SPX-B	Non	H
SPX-C	Oui	Me
SPX-D	Non	Me

Figure 26 : Structures moléculaires des spirolides (SPXs).

4. Toxines non-azotées

4.1. Ciguatoxines et le dinoflagellé *Gambierdiscus*

La ciguatera ou intoxication ciguatérique (« *Ciguatera Poisoning* », CFP) est une maladie non infectieuse transmise par la consommation de fruits de mer contaminés par les ciguatoxines (CTXs), des toxines polyéthers non azotées (par exemple, la formule moléculaire de CTX1 est $C_{60}H_{86}O_{19}$), liposolubles insipides, incolores, inodores et thermostables (**Figure 27**). Elle est produite notamment par les dinoflagellés benthiques du genre *Gambierdiscus* et *Fukuyoa*. Initialement associée à des communautés humaines insulaires isolées et dépendantes de la pêche, la CFP s'est fortement répandue géographiquement à cause du commerce international et du tourisme pour devenir aujourd'hui l'intoxication liée aux produits de la mer la plus répandue dans le monde (Australie, Hawaï, USA, Mexique, Caraïbes, Japon, Vietnam, Inde, Espagne, Portugal, Polynésie française, Taïwan, Cuba), touchant entre 10 000 et 50 000 personnes chaque année. Elle provoque des symptômes gastro-intestinaux, neurologiques et cardiaques. Relativement peu de décès ont néanmoins été signalés (pour plus d'informations, voir les revues de [Friedman et al. 2017](#), [Chinain et al. 2021](#)).

À ce jour, seules deux études ont concerné l'effet de l'N sur la production de toxines par *Gambierdiscus*, plus précisément de CTX chez *G. polynesiensis*. La source d'N ainsi que le rapport N:P ne semblent pas influencer la teneur cellulaire de CTX chez *G. polynesiensis*, bien qu'une accumulation de CTX ait été observée durant la phase de croissance stationnaire ([Lartigue et al. 2009](#), [Longo et al. 2020](#)). Des variations inter- et intraspécifiques de la production de ces toxines sont, une fois de plus, la règle ([Lartigue et al. 2009](#)). La source d'N peut également changer le profil toxique. Ainsi, l'urée favorise une diversification des analogues de la CTX produits par *G. polynesiensis*, dont certains sont plus toxiques ([Longo et al. 2020](#)). Ces résultats demandent cependant à être complétés pour d'autres formes d'N et d'autres espèces. De plus, le rôle des CTXs chez les dinoflagellés tropicaux et subtropicaux du genre *Gambierdiscus* reste toujours méconnu à ce jour (pour plus d'information, voir la revue de [Wang et al. 2022](#)).

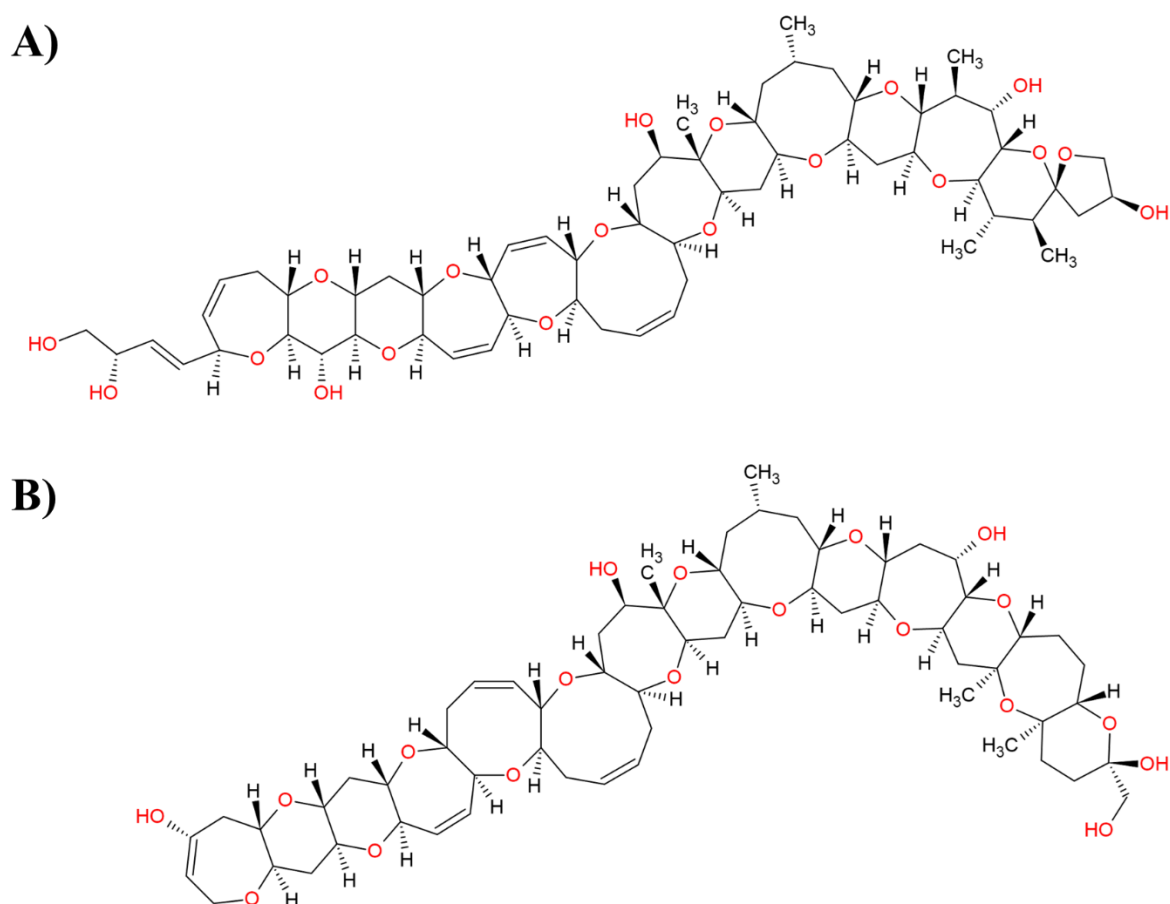


Figure 27 : Structures moléculaires des ciguatoxines (CTXs). **A)** P-CTX-1. **B)** C-CTX-1.

4.2. Intoxication diarrhéique par les fruits de mer et les dinoflagellés

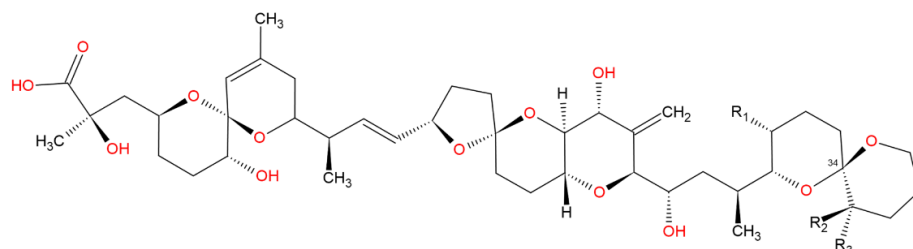
4.2.1. Acide okadaïque, dinophysistoxines, pecténotoxines et les genres

Dinophysis et Prorocentrum

Enregistrée pour la première fois en 1961 aux Pays-Bas, l'intoxication diarrhéique par des fruits de mer (IDF) est largement répandue à travers le monde (Europe, Japon, Amérique du Sud, Canada, Mexique, Inde, Thaïlande, Chine et Australie). Elle résulte de la consommation de produits de la mer (fruits de mer, poissons) contaminés par l'acide okadaïque (AO, $C_{44}H_{68}O_{13}$) et ses analogues, les dinophysistoxines (DTXs), des polyesters thermostables et lipophiles (**Figure 28A**) qui provoquent des troubles gastro-intestinaux aigus (pour plus d'information, voir la revue de [Valdiglesias et al. 2013](#) et les articles associés). D'autres toxines marines sont également associées à l'IDF telles que les yessotoxines (YTXs) et les pecténotoxines (PTXs) (**Figure 28B,C**), qu'on nomme plus communément toxines diarrhéiques des fruits de mer (TDFs) ([Cetinkaya & Elal Mus 2012](#)). Décrite pour la première fois en 1981

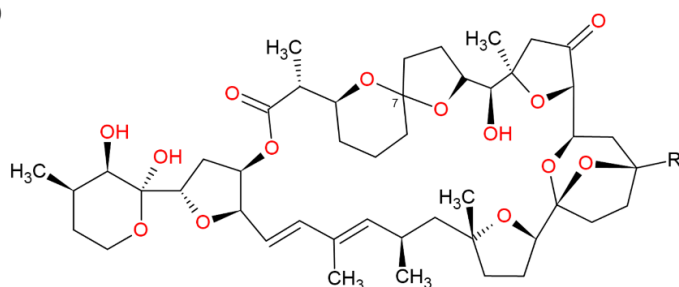
chez l'éponge *Halichondria okadai*, l'AO est principalement produite par les dinoflagellés des genres *Dinophysis* et *Prorocentrum*, à l'instar de ses analogues, et inhibe certaines protéines phosphatases, ce qui peut provoquer diverses altérations cellulaires et moléculaires (pour plus d'information, voir la revue de [Valdiglesias et al. 2013](#) et les articles associés).

A)



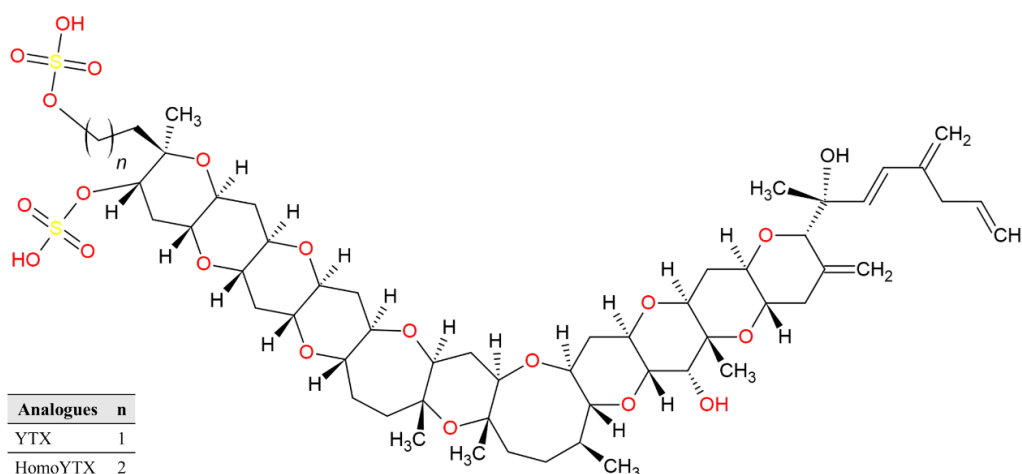
Analogues	R ₁	R ₂	R ₃	Séréométrie relative du C34
OA	CH ₃	H	H	S
DTX-1	CH ₃	CH ₃	H	R
DTX-2	H	H	CH ₃	R

B)



Analogues	R ₁	Séréométrie relative du C7
PTX-1	CH ₃ OH	R
PTX-2	CH ₃	R
PTX-3	CHO	R
PTX-4	CH ₃ OH	S
PTX-6	COOH	R
PTX-7	COOH	S

C)



Analogues	n
YTX	1
HomoYTX	2

Figure 28 : Structures moléculaires des toxines diarrhéiques des fruits de mer (TDFs). **A)** Acide okadaïque (OA) et ses dérivés dinophysistoxines (DTXs). **B)** Pecténotoxines (PTXs). **C)** Yessotoxines (YTXs).

Prorocentrum, principalement représenté par l'espèce *P. lima*, est un genre très étudié pour sa toxicité, bien que celle-ci présente des variabilités intra- et interspécifiques (voir les revues de [Lee et al. 2016](#), [Camacho-Muñoz et al. 2021](#)). Les rôles écologiques de l'AO et des DTXs chez *Prorocentrum* sont encore peu compris. Par exemple, [Gu et al. \(2019\)](#) ont observé que la production d'AO par *P. lima* augmente en présence d'organismes tels qu'*Artemia salina*, ce qui laisse supposer que l'AO pourrait jouer un rôle anti-broutage, mais davantage d'études sont nécessaires. À noter que la toxicité de *P. lima* n'est pas uniquement associée à la production d'AO, mais peut également être associée à d'autres composés encore inconnus ([Reguera et al. 2014](#)).

Le genre *Dinophysis* est un groupe de dinoflagellés mixotrophes capables de kleptoplastie – capacité à récupérer et utiliser les chloroplastes de leur proie – et susceptibles de produire plusieurs toxines lipophiles : l'AO, les DTXs et les PTXs. *Dinophysis*, dont toutes les espèces ne sont pas *a priori* toxiques, est à l'origine de plusieurs épidémies d'IDF à travers le monde (Chili, Europe, Japon) (voir la revue de [Reguera et al. 2014](#)). Historiquement, la toxicité de *Dinophysis* a mis du temps avant d'être reconnue. En effet, *Prorocentrum*, un autre dinoflagellé toxique, a été injustement considéré comme responsable des premières IDF, car ce dernier dominait dans les prélèvements d'eau. La confusion s'est accrue après que des productions d'AO et de DTXs aient été identifiées chez plusieurs souches de *Prorocentrum* (voir la revue de [Reguera et al. 2014](#)). En outre, la difficulté de maintenir *Dinophysis* en culture (des cocultures cryptophyte-cilié-dinoflagellé sont en effet nécessaires) a retardé la mise en évidence de sa toxicité (voir la revue de [Reguera et al. 2014](#)). À l'instar de *Prorocentrum*, les rôles écologiques des TDFs chez *Dinophysis* n'ont pas encore été complètement élucidés.

Prorocentrum sp. utilise différentes sources d'N telles que le NO_3^- , l' NH_4^+ , l'urée et les AAs au moyen de voies métaboliques différentes, avec une préférence pour l' NH_4^+ malgré sa toxicité ([Pan et al. 1999a](#), [Lee et al. 2016](#)). De son côté, *Dinophysis* ne peut assimiler le NO_3^- , ce qui a été interprété par [García-Portela et al. \(2020\)](#) comme résultant d'une voie de réduction et d'assimilation incomplète. Cette hypothèse est corroborée par des corrélations respectivement positive et négative entre d'une part les concentrations de NH_4^+ et de NO_3^- , et la croissance et la teneur totale en toxines de *D. acuminata* d'autre part ([Hattenrath-Lehmann et al. 2015](#)). L'absorption des différentes formes d'N varie d'une espèce à l'autre. La capacité d'absorption de l'urée par *D. acuminata* est supérieure à celle de l' NH_4^+ , tandis que *D. acuta* n'a aucune préférence pour l'une ou l'autre de ces deux formes ([García-Portela et al. 2020](#)). La présence de certains AAs (Leu, Val, Lys, Thr, Ser) peuvent également augmenter jusqu'à 2,2

fois la teneur cellulaire en AO de *P. lima*, ce qui suggère que ces AAs sont impliqués dans les voies de biosynthèse de l'AO chez cette espèce (Souto *et al.* 2001).

Globalement, la littérature s'accorde sur le fait que la concentration et la nature de la source d'N (mais également de P) a un effet sur la production de TDFs chez *Prorocentrum*, bien que les premières études aient mis en évidence une production constante d'AO et de DTX-1 qui dépend de la croissance cellulaire lorsque *Prorocentrum* est cultivé sous NO_3^- (Morlaix & Lassus 1992, McLachlan *et al.* 1994). Ces toxines s'accumulent au cours de la phase stationnaire quand celle-ci est induite par un épuisement d'N autant que de P (McLachlan *et al.* 1994, Vanucci *et al.* 2010, Varkitzi *et al.* 2010, Hou *et al.* 2016, Gu *et al.* 2019, Lee *et al.* 2020). Une concentration initiale minimale de NO_3^- semble toutefois être nécessaire pour activer la ou les voies enzymatiques associées à la production de TDFs (McLachlan *et al.* 1994). Notamment, Vanucci *et al.* (2010) observent que, dans une culture de *Prorocentrum* limitée en NO_3^- , la teneur cellulaire en AO augmente de façon significative alors que la teneur en DTX-1 augmente de manière non-significative. Ce rapport varie cependant en fonction des espèces, *P. hoffmannianum* n'étant pas capable de produire du DTX-1 et comportant des souches non-toxiques (Lee *et al.* 2020). La forme nutritive azotée est également importante vis à vis de la production de TDFs. En effet, les teneurs cellulaires de *P. lima* en AO sont plus faibles lorsqu'elle est cultivée avec de l' NH_4^+ que lorsqu'elle est cultivée avec du NO_3^- , la formation de NH_3 inhibant probablement la croissance et le métabolisme associé à la production de cette toxine, tandis que l'urée présente un profil intermédiaire (Varkitzi *et al.* 2010, Gu *et al.* 2019). Pan *et al.* (1999) ont également émis l'hypothèse selon laquelle l'augmentation de la demande de pouvoir réducteur nécessaire à la réduction du NO_3^- en NH_4^+ peut augmenter la phosphorylation et ainsi fournir des composés phosphorylés à haute énergie nécessaires à la biosynthèse de cette phycotoxine. L'effet direct de carences en N ou en P sur la production de TDFs reste encore un sujet de discussion. Lee *et al.* (2020) évoquent quant à eux un effet indirect résultant d'une modification du cycle cellulaire provoquée par ces limitations nutritives.

La nécessité d'utiliser un système de coculture et l'existence de kleptoplastie chez *Dinophysis* compliquent l'étude de l'effet des sources d'N sur sa toxicité. Nielsen *et al.* (2013) ont montré que la production de TDFs semble suivre le taux de croissance tant que les substrats organiques sont abondants, puisque les toxines s'accumulent dans les cellules et dans le milieu lorsqu'ils arrivent à épuisement. La présence de Glu a pour effet d'augmenter les quotas cellulaires de DTX-1, AO et PTXs chez *D. acuminata*, avec des taux de 80, 60 et 40% respectivement plus élevés que leurs teneurs initiales, un effet qui n'est peut-être que la

conséquence d'une augmentation du taux de croissance (Hattenrath-Lehmann *et al.* 2015). Bien que le NO_3^- ne puisse être consommé par *Dinophysis* et qu'il ne puisse donc affecter directement sa production de toxines, une concentration élevée de ce substrat peut néanmoins provoquer une accumulation de toxines dans le milieu. Par exemple, le NO_3^- , en favorisant le développement des proies de *D. acuminata* capables de l'assimiler, telles que *Mesodinium rubrum*, accroît la production de toxines de *D. acuminata* (Tong *et al.* 2015), notamment par le biais d'une augmentation de son taux de croissance (Nielsen *et al.* 2013). Ceci n'exclut pas que certaines proies peuvent elles-mêmes induire de la toxicité, ainsi que le suggèrent Nagai *et al.* (2011) qui, en observant dans le milieu une augmentation des toxines concomitante avec celles de débris cellulaires et de substances organiques provenant d'une proie telle que *Myrionecta rubra*, font l'hypothèse qu'un ou plusieurs composés allélopathiques issus des proies de *Microcystis* puissent favoriser la production de toxines.

4.2.2. Yessotoxines et le dinoflagellé *Protoceratium reticulatum*

Isolées pour la première fois au Japon en 1987 dans la coquille Saint-Jacques *Patinopecten yassoensis*, les YTXs sont des éthers polycycliques disulfatés fortement cytotoxiques et structurellement proches des CTXs et des brevétoxines (PbTx), bien que catégorisées avec les TDFs. Elles ont été identifiées principalement chez les dinoflagellés *Protoceratium reticulatum*, *Lingulodinium polyedrum* et *Gonyaulax spinifera* (pour plus d'information, voir les revues de Paz *et al.* 2008, Alfonso *et al.* 2016).

À notre connaissance, seul *Protoceratium reticulatum* a fait l'objet d'études concernant l'effet de l'N sur la production d'YTXs. Les résultats de ces études divergent en fonction du mode de culture utilisé. Gallardo Rodríguez *et al.* (2009) montrent qu'un apport de NO_3^- peut influencer positivement le teneur cellulaire des YTXs dans des cultures semi-continues, contrairement à un apport de PO_4^{3-} , mais qu'un apport trop important de NO_3^- n'a aucun effet. Au contraire, Guerrini *et al.* (2007) observent dans des cultures discontinues qu'une limitation en NO_3^- modifie très peu le quota cellulaire des YTXs de *P. reticulatum*, mais augmente la proportion des YTXs extracellulaires, probablement en raison d'une lyse cellulaire accrue. Cette divergence de résultats est difficile à expliquer d'autant qu'il est difficile de faire la part entre une possible augmentation de la synthèse de toxine stimulée par une limitation en N et une libération accrue de toxines dans le milieu résultant d'une lyse cellulaire favorisée par la limitation azotée (Gallardo Rodríguez *et al.* 2009).

4.3. Brévéttoxines et l'espèce *Karenia brevis*

Les PbTx sont des polyéthers polycycliques liposolubles et thermostables dont la structure moléculaire est proche de la CTX (**Figure 29**). Elles sont à l'origine d'intoxications neurotoxiques (NSP) provoquées par la consommation de crustacés contaminés, engendrant nausées, vomissements, diarrhées, paresthésie, crampes, bronchoconstriction, paralysie, convulsions et coma. Les NSP peuvent également être provoquées par inhalation d'ÉANs et/ou contact avec la peau ou les muqueuses. Bien que les cas de NSP se limitent au Golfe du Mexique, à la côte Est des USA et à la Nouvelle-Zélande, des risques de propagation dans le reste du globe sont suspectés (pour plus d'informations, voir [Fleming et al. 2011](#), [Hort et al. 2021](#)).

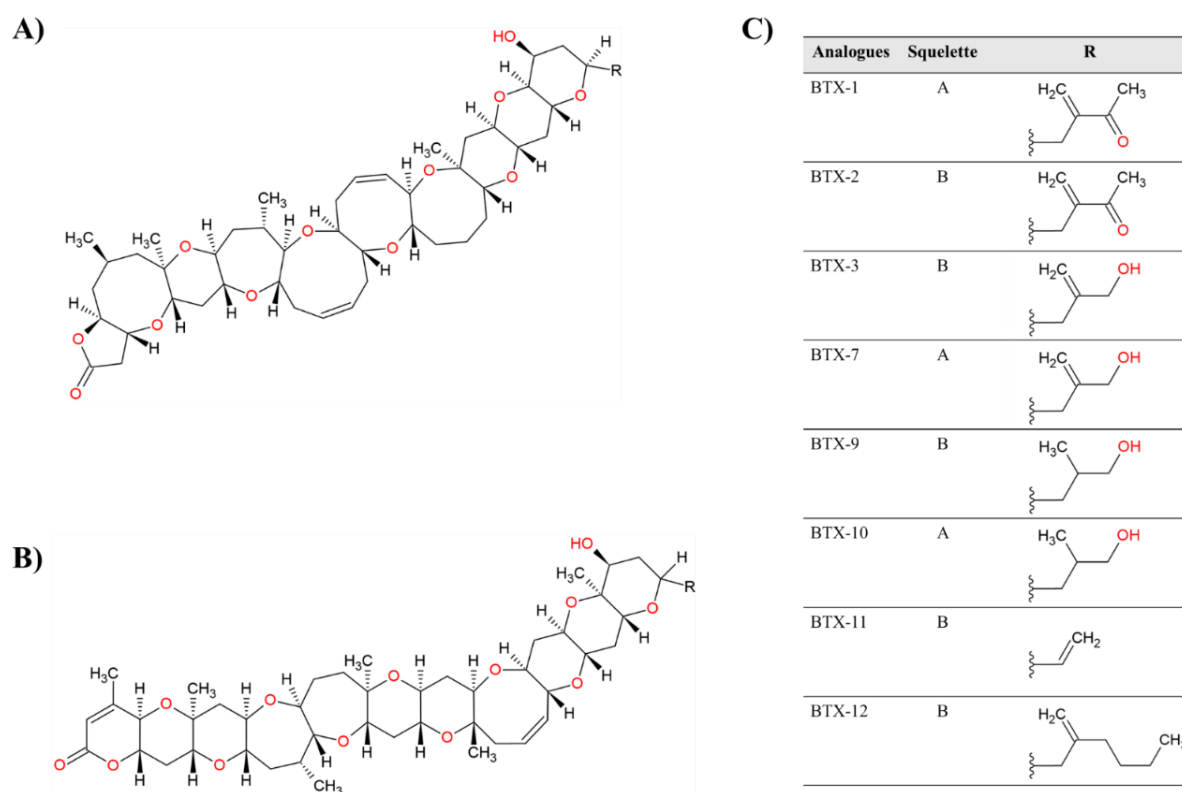


Figure 29 : Structures moléculaires des brevéttoxines (PbTx). **A) et B)** squelettes. **C)** tableau des analogues.

Karenia brevis est un dinoflagellé qui produit de la PbTx, dont la principale forme est la PbTx-2 (C₅₀H₇₀O₁₄) ([Fleming et al. 2011](#) et articles associés, [Corcoran et al. 2014](#)). Cette espèce exerce également des effets allélopathiques négatifs sur des diatomées concurrentes (*Asterionellopsis glacialis* et *Thalassiosira pseudonana*), avec des nuisances physiologiques qui varient selon la cible. Par exemple, *A. glacialis* semble mieux résister que *T. pseudonana*,

ce qui peut résulter de mécanismes de défense plus développés, la fréquentation d'*A. glacialis* et de *K. brevis* étant plus grande (Poulson-Ellestad *et al.* 2014). Cependant, aucun lien n'a pu être établi entre ces observations et la production de PbTx.

Les études consacrées à l'effet de l'N sur la production de PbTx divergent. Les premières n'ont montré aucun effet significatif (Lekan & Tomas 2010) tandis que les suivantes mettent en évidence une relation de cause à effet (Ransom Hardison *et al.* 2012, Corcoran *et al.* 2014). En utilisant des cultures continues, Corcoran *et al.* (2014) ont montré que la teneur cellulaire en PbTx dépend à la fois du taux de croissance et de la concentration d'N dans le milieu de renouvellement, et ce, de façon indépendante. Pour cela, des cultures en chémostat ont été utilisées et plusieurs taux de dilution couplés à différents rapports N:P du milieu de renouvellement ont été testés. Une diminution par deux du taux de dilution a provoqué une augmentation de 2,5 à 5 fois du contenu cellulaire en toxines tandis qu'un plus faible ratio N:P provoquant un stress azoté a diminué les toxines cellulaires d'environ d'un tiers par rapport au rapport de Redfield, et ce pour tous les taux de dilution. Ces résultats sont en contradiction avec l'étude de Ransom Hardison *et al.* (2012) qui montrent avec des cultures semi-continues qu'une limitation azotée augmente la teneur en PbTx cellulaire et diminue le taux de croissance et le volume cellulaire. L'absence d'N dans la PbTx autoriserait, lors d'une limitation azotée, une plus grande allocation du C à sa biosynthèse, conformément à l'hypothèse de l'équilibre carbone-nutriment (CNBH) de Ransom Hardison *et al.* (2012). À noter aussi que les divergences entre ces études (une fois de plus) peuvent provenir d'une différence de normalisation des données, des normalisations par la concentration cellulaire ou par le biovolume pouvant fortement impacter l'interprétation des résultats. De plus, l'utilisation de modes de culture différents (batch, fed-batch, continu) peut aussi engendrer des suivis des toxines différents, la physiologie des microorganismes photosynthétiques étant différente à un instant donné.

4.4. Karlotoxines et le dinoflagellé *Karlodinium veneficum*

Les karlotoxines (KmTx) sont des toxines polycétides (**Figure 30**) qui présentent des propriétés hémolytiques et cytotoxiques, et des ichtyotoxines similaires aux prymnésines (Deeds *et al.* 2002, 2015, Place 2002). Elles sont produites par le dinoflagellé mixotrophe *Karlodinium veneficum* (Place *et al.* 2012). Leur rôle écologique serait anti-broutage (Adolf *et al.* 2007), inhibiteur des concurrents et/ou d'aide à la capture des proies (Adolf *et al.* 2006).

Peu de travaux se sont consacrés à l'effet de la concentration et de la source azotée sur la production de karlotoxine par *K. veneficum*. Néanmoins, [Adolf et al. \(2009\)](#) ont montré que l' NH_4^+ favorise entre 2 et 3 fois plus la teneur cellulaire en KmTx-1 ($\text{C}_{69}\text{H}_{126}\text{O}_{24}$) chez *K. veneficum* CCMP 1974 que le NO_3^- ou l'urée, sans toutefois en améliorer la croissance. Cela n'a cependant pas été démontré chez la souche CCMP 2064, où l'urée favorise de 2 à 3 fois plus la teneur cellulaire en KmTx-2 ($\text{C}_{67}\text{H}_{121}\text{ClO}_{24}$) que les autres sources d'N. La teneur en KmTx augmente surtout durant la phase stationnaire et est donc négativement corrélée avec le taux de croissance ([Adolf et al. 2009](#)). À noter que l'ingestion de cryptophytes favorise l'initiation des proliférations de *K. veneficum* et en augmente la toxicité vis-à-vis d'organismes filtreurs telle que l'huître *Crassostrea virginica*. L'assimilation mixotrophe de sources organiques par les dinoflagellés peut donc aussi constituer un facteur d'augmentation de la toxicité et doit davantage être prise en considération dans les études à venir ([Adolf et al. 2008](#), [Lin et al. 2017](#)).

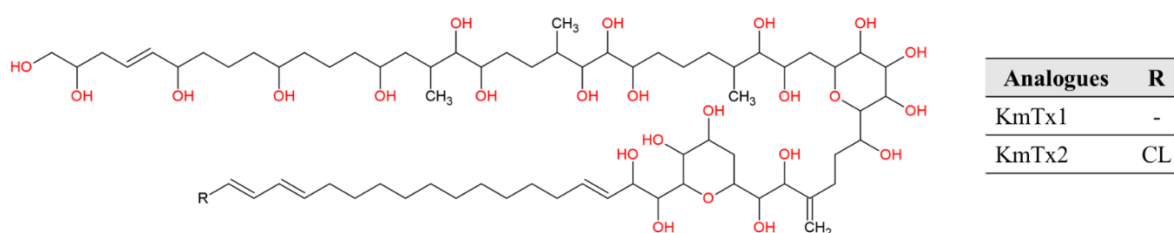


Figure 30 : Structures moléculaires des karlotoxines (KmTx).

5. Allélopathie et azote

Au cours des précédentes années, la recrudescence des EANs et leurs impacts sur l'économie et la santé humaine a amené à la multiplication d'études sur la découverte des organismes qui en sont à l'origine, des composés toxiques présents ainsi que des conditions qui favorisent leurs apparitions (Wells *et al.* 2020). L'eutrophisation des eaux par les activités humaines, notamment celles qui enrichissent l'eau en composés azotés, est en partie responsable de l'accentuation des fréquences des EANs (Howarth 2008). Plusieurs molécules (ainsi que leurs dérivés) responsables des intoxications et des empoisonnements ont ainsi été identifiées puis caractérisées (Cusick & Sayler 2013). Comme vu précédemment, les diverses études réalisées rapportent des productions de toxines très différentes en fonction de l'espèce, de la souche, de la structure moléculaire des toxines produites et de différentes variables, notamment l'N, ce qui implique que des efforts supplémentaires doivent être faits pour mieux comprendre les dynamiques de production de toxines et leurs mécanismes physiologiques sous-jacents.

Toutefois, la toxicité des microorganismes photosynthétiques a paradoxalement été réduite aux diverses familles de toxines connues, une espèce étant souvent associée à une ou deux familles de toxines. De plus, les rôles écologiques de ces toxines n'ont toujours pas été identifiés malgré les nombreuses pistes de recherche possibles. Les réponses de toxicité des organismes (humains compris) peuvent n'être qu'une conséquence fortuite de l'évolution du microorganisme producteur de toxines, la fonction des toxines qui a été sélectionnée par l'évolution pouvant être totalement différente d'une propriété allélopathique. Par exemple, Long *et al.* (2021) mentionnent dans leur revue la présence de composés extracellulaires bioactifs (CEBs) non caractérisés chez *Alexandrium*, dont l'activité est encore trop souvent associée aux TPFs. À ce jour, seul un CEB avec des propriétés potentiellement allélopathiques, nommé alexandrolide, a été identifié chez *A. catenella* (Satake *et al.* 2019).

Il existe donc des composés allélopathiques encore inconnus chez le phytoplancton toxique dont les dynamiques de production peuvent dépendre des facteurs environnementaux dont l'N (Granéli *et al.* 2008). À notre connaissance, trois groupes comportent des exemples de CEBs dont la production varie selon la source et/ou la concentration d'N dans le milieu (voir ci-dessous).

5.1. Le cas des composés organiques volatiles de la cyanobactérie

Microcystis

Bien que *Microcystis* soit principalement connue pour sa production de MCs, d'autres composés toxiques sont suspectés chez cette espèce, mais dont les structures moléculaires demeurent inconnues (Falconer 2007). Par exemple, on trouve dans des extraits de *Microcystis* des polyméthoxy-1-alcènes qui ont des propriétés tératogènes sur les embryons du poisson zèbre *Danio rerio* (Jaja-Chimedza *et al.* 2012), mais qui exercent aussi des activités antibactériennes sur *Bacillus subtilis*, *Bacillus cereus*, *Aeromonas hydrophila* et *Escherichia coli* (Ostensvik *et al.* 1998). Des interactions allélopathiques d'inhibition réciproque de la croissance cellulaire ont également été identifiées entre *Microcystis* sp. et *Peridinium gatunense*. Ces interactions dépendent de la densité cellulaire et semblent indépendantes des nutriments (Sukenik *et al.* 2002, Vardi *et al.* 2002).

M. aeruginosa et *M. flos-aquae* sont également capables de produire des composés organiques volatiles (COVs) dont certains peuvent être toxiques pour d'autres organismes, notamment des macro- et microalgues (Hasegawa *et al.* 2012, Xu *et al.* 2017, Zuo *et al.* 2018). On retrouve différentes familles moléculaires chez les COVs : furanes, sulfo-composés, terpénoïdes, benzènes, hydrocarbures, aldéhydes et esters (Xu *et al.* 2017, Zuo *et al.* 2018)¹. De plus, l'émission de ces COVs dépend de variables environnementales puisque des variations de la source et de la concentration de nutriments induisent des modifications de la production et de la composition des COVs. Les émissions augmentent lorsque la teneur en NO₃⁻ est faible ou inexistante (Xu *et al.* 2017, Zuo *et al.* 2018). À noter que des limitation en P induisent des effets similaires (Ye *et al.* 2018).

Les COVs produits par des cultures de *M. flos-aquae* carencées en N ont également des effets significatifs sur des cultures de la microalgue verte *Chlorella vulgaris* dont la densité cellulaire, la teneur en chlorophylles *a* et *b* et l'activité photosynthétique (*maximum quantum yield of PSII photochemistry*, Fv/Fm) sont réduits (Xu *et al.* 2017). Xu *et al.* (2017) et Zuo *et al.* (2018) ont attribué cette bioactivité aux composés D-limonène et eucalyptol présents dans

¹ Par exemple, on retrouve le disulfure de bis(1-méthyléthyle) (C₆H₁₄S₂, CAS : 4253-89-8), le D-limonène (C₁₀H₁₆, CAS : 5989-27-5), l'eucalyptol (C₁₀H₁₈O, CAS. : 470-82-6), le β-cyclocitral (C₁₀H₁₆O, CAS : 432-25-7), le longifolène (C₁₅H₂₄, CAS : 475-20-7), le 1H-1-méthylène-indène (C₁₀H₈, CAS : 2471-84-3), le (Z)-3-dodecene (C₁₂H₂₄, CAS : 7239-23-8), le tétradécane (C₁₄H₃₀, CAS : 629-59-4), ou encore le ester bis(2-méthylpropylique) de l'acide 1,2-benzènedicarboxylique (C₁₆H₂₂O₄, CAS : 84-69-5).

les COVs de *M. flos-aquae* et de *M. aeruginosa*, qui peuvent, chacun, inhiber la production de pigments (Chl a et b, caroténoïdes), le *quenching* non-photochimique et le transport d'électrons au sein du photosystème PSII de *C. vulgaris*. Les bioactivités de ces molécules sur *C. vulgaris*, déjà observées par Zhao *et al.* (2016), augmentent avec leurs concentrations. De plus, la concentration en D-limonène chez *M. flos-aquae* est multipliée par trois en condition appauvrie en N, ce qui corrobore la plus forte bioactivité des COVs sur *C. vulgaris* (Xu *et al.* 2017). Aucune variation de l'effet de l'eucalyptol n'a cependant été observée entre les différentes conditions azotées, la concentration de ce composé restant élevée quelle que soit la condition (Xu *et al.* 2017, Zuo *et al.* 2018). L'eucalyptol et le limonène sont connus aussi pour leurs propriétés antibactériennes, mais présentent également diverses propriétés intéressantes en pharmacologie (Kazyoba & Viljoen 2008, Cai *et al.* 2021). D'autres composés COVs (le β -cyclocitral, le methyl isopropyldisulfide, et le bis(1-méthylethyl)) qui augmentent avec une diminution de l'N pourraient intervenir dans des interactions allélopathiques (Hasegawa *et al.* 2012, Zuo *et al.* 2018). De plus, une limitation en N induit une expression positive de gènes codant pour l'enzyme malique, la pyruvate kinase et la phosphotransacétylase, tous impliqués dans la voie de biosynthèse des différents composés toxiques précédents (Zuo *et al.* 2018).

Parallèlement aux COVs, la mise en contact d'*Anabaena* avec des cellules ou des filtrats de *Microcystis* inhibe sa croissance et sa production d'ATX-A, avec des taux d'inhibition d'autant plus importants que la concentration en N est grande et que celle en P est faible (Chia *et al.* 2018). Bien que la teneur en MCs de *Microcystis* suive cette dynamique, il est possible que d'autres composés à propriétés allélopathiques soient impliqués (Chia *et al.* 2018).

Ces résultats montrent l'importance de prendre en compte l'ensemble des molécules excrétées dans le milieu extérieur par une espèce donnée pour en comprendre les effets toxiques, ainsi que l'effet des conditions azotées dans le milieu pour appréhender et lutter contre la prolifération de cyanobactéries.

5.2. Le cas de l'activité hémolytique de l'haptophyte *Prymnesium parvum*

Prymnesium parvum est une haptophyte d'eau douce, mixotrophe, toxique car produisant deux polyoxy-polyène-polyesters hémolytiques, les prymnésines 1 et 2 (voir review de Granéli & Salomon 2010). Les efflorescences de cette espèce semblent dépendre du

rapport N:P, et sa toxicité, de facteurs biotiques (gènes, phase de croissance, densité cellulaire, bactéries associées) et abiotiques (lumière, température, salinité, pH, aération de la culture, rapport N:P, source et concentration des macronutriments) (voir la revue de [Granéli & Salomon 2010](#)).

[Johansson & Granéli \(1999b\)](#) ont été les premiers à observer une augmentation de l'activité hémolytique (exprimée en équivalent saponine par cellule) lorsqu'on s'éloigne du rapport de Redfield (N:P = 16:1) pour atteindre une limitation en N ou en P, avec une activité plus importante lors d'une limitation par le P, observations confirmées plus tard par [Barreiro Felpeto et al. \(2005\)](#) et [Uronen et al. \(2005\)](#). L'activité hémolytique de *P. parvum* envers *R. salina* en cultures semi-continues semble dépendre à la fois du rapport N:P et de la densité cellulaire ([Uronen et al. 2005](#)). D'autres études n'ont cependant montré aucune augmentation de l'activité hémolytique lors d'une limitation en P, mais plutôt une diminution lors d'une limitation par l'N ([Carvalho & Granéli 2010](#)). Les filtrats de culture de *P. parvum* limitée en N ou en P possèdent également une activité toxique sur *Thalassiosira weissflogii*, *Prorocentrum minimum* et *Rhodomonas* cf. *baltica* ainsi que sur *Artemia salina*, mais pas envers une autre espèce de *Prymnesium*, *P. patelliferum*, capable également de produire des prymnésines, ce qui suggère des mécanismes de résistance à cette toxine chez les organismes qui la produisent ([Granéli & Johansson 2003](#)). Le modèle mathématique de [Chakraborty et al. \(2008\)](#) basé sur les travaux de [Granéli & Johansson \(2003\)](#) prédit qu'une limitation nutritive favorise les espèces phytoplanctoniques toxiques qui vont alors exercer un contrôle négatif sur les espèces phytoplanctoniques non-toxiques. La mixotrophie de *P. parvum* lui permet de compenser une limitation en N par de l'hétérotrophie, en phagocytant des débris cellulaires, des cellules sénescents ou des proies. Cependant, l'état nutritionnel de la proie (*Rhodomonas salina*) semble peu affecter la toxicité de *P. parvum*, l'activité hémolytique diminuant quand *R. salina* est limitée en N ou en P mais pas quand le rapport N:P est faible ([Lundgren et al. 2016](#)). La capacité de *P. parvum* à utiliser différentes sources nutritives (dont l'N), organiques comme inorganiques, rend l'eutrophisation des milieux aquatiques par l'apport d'eaux usées d'autant plus problématique ([Lindehoff et al. 2009](#)). En effet, l'excès de nutriments issus d'eaux usées (comme des fertilisants) augmente la croissance de *P. parvum* sans en augmenter la toxicité ([Kurten et al. 2007](#)). Cependant, dans le cas d'un apport exclusif ou d'une consommation totale de l'N ou du P susceptibles de modifier le rapport N:P et de provoquer une limitation, sa toxicité augmente ([Lindehoff et al. 2009](#)). Une augmentation de la toxicité couplée à une concentration

cellulaire élevée dans les eaux concernées peut provoquer d'importants changements dans la structure des écosystèmes d'eau douce et/ou une augmentation du risque de contamination.

Cependant, des études qui semblent démontrer l'existence de composés toxiques aux propriétés non-hémolytiques remettent en question le lien entre prymnésines et toxicité chez *P. parvum* (Skovgaard & Hansen 2003, Barreiro Felpeto *et al.* 2005, Uronen *et al.* 2005). En effet, des filtrats de culture de cette espèce qui sont toxiques pour sa proie *R. salina* (Cryptophyte) et son prédateur *Brachionus plucatilis* (Rotifère) n'ont montré aucune activité hémolytique mesurable, ce qui suggèrent soit que les concentrations en composés hémolytiques sont sous les limites de détection, soit que des composés toxiques non-hémolytiques sont présents (Barreiro Felpeto *et al.* 2005, Uronen *et al.* 2005). La toxicité de *P. parvum* envers *R. salina* et *B. plucatilis* est également accentuée par une limitation en N (Barreiro Felpeto *et al.* 2005), bien que d'autres études montrent une diminution des effets négatifs de nature allélopathique d'une carence en N sur *Rhodomonas*, mais leur augmentation lors d'une carence en P (Beszteri *et al.* 2012).

Par ailleurs, *P. parvum* semble exercer divers effets allélopathiques sur une multitude d'organismes (phytoplancton, ciliés, bactéries) — bien que l'attribution de ces effets à une ou plusieurs molécules restent à démontrer — et jouer un rôle important dans la dynamique des écosystèmes d'eau douce (Fistarol *et al.* 2003). En effet, *P. parvum* excréterait des composés susceptibles d'immobiliser et ou de lyser des proies (Skovgaard & Hansen 2003) ou des prédateurs (Tillmann 2003) quand les conditions sont favorables. D'autres auteurs suggèrent que de nombreux acides gras insaturés ainsi que des galactoglycérolipides, notamment l'acide stéaridonique (ainsi que d'autres composés encore non-caractérisés), seraient liés à l'activité ichtyotoxique de cette haptophyte (Henrikson *et al.* 2010). Les propriétés allélopathiques de *P. parvum* auraient également un effet indirect sur la boucle microbienne. En effet, la libération de carbone organique dissous (COD) consécutive à la lyse cellulaire de *Rhodomonas salina* favorisée par l'action de composés allélopathiques encore non identifiés produits par *P. parvum* stimulerait la croissance de bactéries consommées par *P. parvum* (Uronen *et al.* 2007).

Ainsi, l'attribution d'une activité toxique (ici l'activité hémolytique) à une toxine spécifique sans évaluer ses variations ni la présence d'autres composés d'intérêt peut amener à des conclusions biaisées sur l'effet de variations environnementales sur la diversité et la production des molécules impliquées dans les phénomènes de toxicité.

5.3. Le cas d'une présence d'activité allélopathique dépendant de l'N chez *Synechococcus*

Le genre *Synechococcus* est un groupe de picocyanobactéries présents dans tous les océans du monde et figurant parmi les organismes les plus anciens. Ce genre est particulièrement étudié pour son rôle dans la production primaire océanique et une forte capacité d'adaptation conférée par les phycobilisomes, qui sont des complexes protéiques pigmentaires essentiels de leur appareil photosynthétique (pour plus de détails, voir la revue de [Callieri 2017](#)).

Bien que *Synechococcus* sp. BA-124 ne soit pas connu pour produire des toxines, il a été observé que le filtrat d'une culture de cette espèce diminue la croissance des diatomées *Bacillaria paxillifer* et *Skeletonema marinoi* ainsi que de l'algue verte *Chlorella vulgaris*. Cette diminution s'accompagne d'une réduction de l'efficacité quantique maximale du PSII et de la capacité photosynthétique, à des niveaux variables selon la cible. De plus, cette activité allélopathique diminue lorsque *Synechococcus* est limité en N ([Śliwińska-Wilczewska & Latała 2018](#)). La découverte d'activités allélopathiques chez un taxon aussi répandu permettrait d'accroître très significativement notre connaissance des écosystèmes océaniques.

6. Observations

Les études consacrées aux effets de l’N sur la production de composés toxiques, voire allélopathiques, fournissent, selon l’organisme étudié, des résultats très hétérogènes qualitativement et quantitativement. En outre, des genres tels que *Raphidiopsis*, *Alexandrium*, *Microcystis*, *Ostreopsis*, *Pseudo-nitzschia* et *Prorocentrum* sont largement étudiés en comparaison d’autres groupes. Bien que des tendances à la réponse de l’N émergent chez certaines espèces comme *Alexandrium*, la grande hétérogénéité intra- et interspécifiques des réponses ne permet pas de conclure dans la majorité des cas étudiés. De plus, l’existence ou l’absence de toxicité chez des souches de la même espèce est une observation encore inexpliquée.

La diversité des approches utilisées peut en partie expliquer cette hétérogénéité. L’utilisation de méthodes indirectes d’analyse des toxines, comme par exemple la mesure de l’activité hémolytique, peut ne pas être représentative des variations réelles de la toxine étudiée (voir la **partie 5.2**). Des techniques d’analyse directe de la teneur en toxines et du profil toxique sont donc nécessaires. De plus, le mode de normalisation des mesures, qui peut se faire en fonction de la concentration cellulaire, du biovolume, du volume de culture ou de la biomasse, peut conduire à des interprétations différentes. Par exemple, [Pierangelini et al. \(2015\)](#) ont montré que l’utilisation de la concentration volumétrique intracellulaire est plus représentative de la production de CYN chez *Raphidiopsis* que l’utilisation de la quantité par unité de poids sec lyophilisé comme chez [Saker & Neilan \(2001\)](#). La prise en compte de la seule teneur cellulaire en toxines peut également biaiser les conclusions. En effet, une source azotée peut induire une accumulation de toxines dans les cellules par rapport à une autre source mais peut dans le même temps réduire la densité cellulaire, comme cela a été suggéré avec *Pseudo-nitzschia* ([Bates et al. 1993](#), [Hillebrand & Sommer 1996](#), [Pan et al. 1998](#)). Ainsi, des cellules peu toxiques mais abondantes peuvent représenter un risque plus important pour l’environnement et les humains que des cellules très toxiques mais peu abondantes. La dynamique de croissance et de production de composés toxiques est donc à prendre en compte dans les phénomènes d’EANs associés ou non aux phénomènes d’eutrophisation des eaux. À cela s’ajoute le manque de prise en compte des différents compartiments d’accumulation des toxines (milieux intra- et extracellulaire) dans une même étude, la majorité privilégiant la

concentration intracellulaire en toxines. À notre connaissance, seulement quelques études¹ ont étudié les fluctuations des toxines entre différents compartiments en fonction des variations d’N. Ce manque d’information ne permet pas de bien appréhender la dynamique de libération, active comme passive (lyse cellulaire incluse), des toxines dans le milieu selon les conditions azotées.

L’estimation de la toxicité totale, intracellulaire et extracellulaire, ainsi que l’utilisation de plusieurs types de normalisation des données, notamment par la concentration cellulaire, le biovolume et le volume de culture, doivent à l’avenir être mieux prises en compte pour interpréter les dynamiques de production et d’accumulation des toxines dans les cellules et dans l’environnement en fonction des conditions azotées. Une meilleure compréhension des mécanismes d’assimilation et d’utilisation de l’N dans les voies de biosynthèse de ces toxines, par exemple *via* le marquage à l’¹⁵N de la source d’N (Sano *et al.* 2011, Harke & Gobler 2015, Wu *et al.* 2015, Yan *et al.* 2015, Cho *et al.* 2019), et de l’expression des séquences ADN associées peut nous aider à mieux comprendre le fonctionnement de ces microorganismes.

Van de Waal *et al.* (2014, 2015) ont montré que la production des toxines riches en N dépend des concentrations d’N et de P dans l’environnement. Cependant, l’ensemble des résultats issus de la littérature relatifs à la relation entre stœchiométrie cellulaire et toxicité varient beaucoup en fonction de l’espèce, de la souche et de la teneur en N des toxines. Cette hétérogénéité suggère que la stœchiométrie cellulaire ne suffit pas à expliquer à elle seule le déterminisme de la toxicité, et qu’il est nécessaire d’étudier simultanément le protéome et le métabolome azotés. En effet, on peut penser *a priori* qu’une limitation en N va impacter tous les composés azotés de la cellule. Cependant, l’allocation des ressources azotées dans la cellule n’est pas nécessairement homogène car elle dépend d’une multitude de paramètres, aussi bien environnementaux qu’évolutifs. Par exemple, la biosynthèse d’une toxine riche en N pourrait, en cas de limitation d’N, être quand-même favorisée aux dépens d’autres métabolites azotés si la fonction de cette toxine a été sélectionnée pour répondre à un stress azoté.

Les rôles écologiques des toxines précédemment citées restent encore largement inconnus. Quelques études ont validé l’hypothèse d’un rôle allélopathique de répulsion contre les

¹ Chen *et al.* (2019) et Yang *et al.* (2022) sur la production de MCs par *Microcystis aeruginosa*, Yang *et al.* (2018) et Preußel *et al.* (2014) sur la production de CYN par *Raphidiopsis raciborskii* et *Aphanizomenon* sp. respectivement, Guerrini *et al.* (2007) et Gallardo Rodríguez *et al.* (2009) sur la production de YTXs par *Protoceratium reticulatum*, et Gagnon & Pick (2012) sur celle de ATX-A par *Aphanizomenon issatschenkoi*.

brouteurs, (par exemple, [Guisande et al. 2002](#), [Frangópulos et al. 2004](#), [Adolf et al. 2007](#), [Selander et al. 2008](#), [Murata et al. 2012](#), [Antunes et al. 2015](#), [Griffin et al. 2019](#), [Gu et al. 2019](#), [Colas et al. 2021](#), [Brown et al. 2022](#), [Christou et al. 2023](#)), bien que d'autres hypothèses aient été proposées comme par exemple, des rôles de phéromones, de stockage d'N, de détoxification de l'environnement, etc. (voir [Hall 1982](#), [Wyatt & Jenkinson 1997](#), [Pomati et al. 2004](#), [Schatz et al. 2007](#), [Trainer et al. 2012](#), [Antunes et al. 2015](#), [Brentano et al. 2016](#), [Hii et al. 2016](#), [Vico et al. 2016](#), [Zabaglo et al. 2016](#)). Plusieurs auteurs privilégient l'hypothèse d'un rôle physiologique sur celle d'un rôle allélopathique (par exemple, [Hall 1982](#), [Trainer et al. 2012](#), [Hii et al. 2016](#), [Zabaglo et al. 2016](#)). La toxicité de ces molécules pourrait alors n'être qu'une propriété secondaire résultant de leur structure moléculaire, mais ni sélectionnée, ni en cours de sélection. L'hypothèse d'une exaptation de leur fonction initiale vers une nouvelle fonction, que ce soit d'une fonction physiologique vers une fonction allélopathique ou inversement, doit être prise en compte. Cette hypothèse est soutenue par l'étude de [Rantala et al. \(2004\)](#) qui démontrent que l'ancêtre commun des cyanobactéries productrices de MCs est apparu avant les métazoaires (et donc les copépodes brouteurs).

Mais alors, comment expliquer la toxicité des exsudats de ces espèces ? Comme précisé plus haut, la diversité des molécules toxiques a été peu étudiée du fait de l'attribution du caractère toxique d'une microalgue ou d'une cyanobactérie à une ou deux familles de toxines déjà connues. Cette réduction des origines possibles de la toxicité d'une souche donnée a été décrite par exemple en détails chez *Alexandrium* dans la revue de synthèse de [Long et al. \(2021\)](#) où la présence de nombreux CEB encore non-caractérisés a souvent été attribuée à la STX et ses analogues. La potentielle diversité des molécules toxiques résulte probablement des différentes réponses des microalgues aux variations environnementales telles que la source ou la concentration d'N, du fait de leurs différentes structures moléculaires et/ou des voies de biosynthèse impliquées. Cela est peut-être le cas chez les cyanobactéries du genre *Microcystis* où la production de COVs aux propriétés toxiques envers *C. vulgaris* varient avec la concentration d'N ([Xu et al. 2017](#), [Zuo et al. 2018](#)).

Les sections précédentes décrivent une liste aussi exhaustive que possible de groupes de toxines et autres composés bioactifs, potentiellement allélopathiques, pour lesquels un effet de la source azotée et/ou de sa concentration a pu être mis en évidence ou non. Toutefois, la richesse des composés bioactifs produits ne se limite pas aux toxines citées plus haut. Chez les autres microorganismes à photosynthèse oxygénique cités plus haut, plusieurs études mettent en évidence l'existence d'autres composés bioactifs. Par exemple, les filtrats de souches non-

toxiques de *Raphiopsis raciborskii* ont différents effets négatifs sur *Microcystis aeruginosa* (Figueredo *et al.* 2007, Mello *et al.* 2012, Rzymiski *et al.* 2014), *Coelastrum sphaericum*, *Monoraphidium contortum*, *Microcystis wesenbergii* (Figueredo *et al.* 2007) et *Ankistrodesmus falcatus* (Antunes *et al.* 2012). De nombreuses souches présentent également une écotoxicité sur la crevette *Thamnocephalus platyurus* (Ács *et al.* 2013), le crustacé *Daphnia magna* (Nogueira *et al.* 2006, Ács *et al.* 2013) et des embryons de *Danio rerio* (poisson zèbre) (Ács *et al.* 2013, Jaja-Chimedza *et al.* 2015), ainsi qu'un stress oxydatif sur des neutrophiles humains (Rzymiski *et al.* 2017). De même, des extraits méthanoliques présentent des propriétés antibactériennes envers *Bacillus subtilis*, *Bacillus cereus* et *Aeromonas hydrophila* (Ostensvik *et al.* 1998). Ces composés sont encore pour la plupart inconnus, bien que des polyméthoxy-1-alcènes (PMAs) aient été identifiés chez *C. raciborskii*, qui pourraient jouer un rôle dans ces interactions allélopathiques (Jaja-Chimedza *et al.* 2015). La biosynthèse de ces composés semble également dépendre des conditions environnementales (densité cellulaire, lumière, température, nutriments) (Leão *et al.* 2009, Antunes *et al.* 2012). Chez *Aphanizomenon gracile*, des exsudats induisent un stress oxydatif sur des neutrophiles humains (Rzymiski *et al.* 2017), et des activités antibactériennes ont été observées sur *Bacillus subtilis*, *Bacillus cereus*, *Aeromonas hydrophila* et *Escherichia coli* à partir de tests de diffusion (Ostensvik *et al.* 1998), tandis qu'*A. ovalisporum* produit des polyméthoxy-1-alcènes qui sont tératogènes vis à vis des embryons du poisson zèbre *Danio rerio* (Jaja-Chimedza *et al.* 2012). Des effets de composés toxiques encore non-identifiés ont également été observés sur la crustacé *Daphnia magna* (Nogueira *et al.* 2006). De l'acide α - γ , -diaminobutyrique (DAB), un isomère de l'acide aminé neurotoxique β -N-méthylamino-L-alanine (BMAA), a également été identifié dans une souche polonaise de *A. gracile* (Rzymiski *et al.* 2017). La présence de composés allélopathiques favorisant la production de phosphatase alcaline (APase), enzyme transformant le PO_4^{3-} organique inutilisable en PO_4^{3-} inorganique assimilable, chez d'autres organismes photosynthétiques (*Chlamydomonas reinhardtii*, *Debarya* sp.) lorsque le milieu est pauvre en PO_4^{3-} inorganique, ainsi qu'une modification des gènes impliqués dans l'assimilation du PO_4^{3-} inorganique, a également été observée chez une souche toxique d'*A. ovalisporum* (Bar-Yosef *et al.* 2010). Au-delà des COVs précédemment cités, d'autres composés toxiques sont suspectés chez *Microcystis* mais dont les structures moléculaires sont encore inconnues (Falconer 2007). Par exemple, des extraits de *Microcystis* comportent des polyméthoxy-1-alcènes aux propriétés tératogènes sur les embryons du poisson zèbre *Danio rerio* (Jaja-Chimedza *et al.* 2012) mais présentent également des activités antibactériennes sur *Bacillus subtilis*, *Bacillus cereus*, *Aeromonas hydrophila* et *Escherichia coli* (Ostensvik *et al.* 1998). Des interactions

allélopathiques d'inhibition réciproque de la croissance cellulaire ont été également identifiées entre *Microcystis* sp. et *Peridinium gatunense*. Ces interactions dépendent de la densité cellulaire et semblent indépendantes des nutriments (Sukenik *et al.* 2002, Vardi *et al.* 2002). Ces bioactivités dont l'origine est encore inconnue sont le fait d'une multitude de composés dont l'étude est nécessaire pour une meilleure compréhension du fonctionnement des écosystèmes et pour des applications dans les domaines de la pharmaceutique et de la nutraceutique.

Les futures recherches concernant les effets de l'N sur la production de composés bioactifs chez les microalgues et cyanobactéries, qu'il s'agisse de toxines et/ou des CEBs, devront nécessairement prendre en compte des bioessais standardisés et cohérents, c'est-à-dire mettre en œuvre des bioessais portant : (i) sur des cibles biologiques issues d'un même écosystème dans le but d'identifier une potentielle interaction allélopathique, ou (ii) sur des modèles biologiques suffisamment bien connus pour permettre la compréhension des mécanismes d'action de ces molécules. La compréhension des rôles écologiques de ces composés bioactifs est également indispensable pour mieux appréhender la complexité des interactions entre ces organismes. L'utilisation de techniques à haut débit telles que la métabolomique ou la protéomique peut également permettre l'identification de nouvelles molécules impliquées dans la toxicité des microalgues.

7. Conclusion

La source d'N et sa concentration dans le milieu ainsi que les rapports N:P et N:C ont des effets divers sur la production de toxines chez les microorganismes à photosynthèse oxygénique. Cette diversité, qui se manifeste entre autres au niveau de la structure moléculaire des toxines, dépend de l'espèce et de la souche étudiée. Afin de mieux prévenir les phénomènes d'EANs, des études supplémentaires sur le métabolisme de l'N et des toxines, allant de l'assimilation de l'N au fonctionnement de la voie de biosynthèse associée aux toxines, sont nécessaires.

Les rôles écologiques de ces toxines sont encore peu connus et nécessitent donc des recherches supplémentaires pour comprendre les avantages qu'elles ont été susceptibles de procurer aux différentes espèces de microalgues au cours de leurs évolutions. La compréhension de leurs fonctions actuelles et/ou passées permettra de mieux appréhender l'utilisation de l'N pour leur biosynthèse. De plus, la (ou les) fonction(s) d'une toxine donnée peut provenir de pressions de sélection qui diffèrent de celle favorisée pour l'assimilation d'N dans une condition environnementale donnée. La compréhension de la toxicité d'une souche doit également prendre en compte la présence potentielle d'autres composés bioactifs encore non caractérisés.

Dans les futures études traitant de l'effet de l'N sur la production de toxines et/ou de composés allélopathiques chez les microalgues et les cyanobactéries, nous conseillons : (i) de considérer simultanément les concentrations intracellulaire, extracellulaire et totale, (ii) d'utiliser plusieurs types de normalisation des données, (iii) d'utiliser des mesures directes des teneurs en toxines, et (iv) d'associer l'étude à au moins un essai biologique standardisé et cohérent.

CHAPITRE II

RECHERCHE DE COMPOSES BIOACTIFS
ANTIBACTERIENS ET ANTICANCEREUX
ISSUS DE BIOFILMS DES MICROALGUES
TETRAELMIS SUECICA ET *CYLINDROTHECA CLOSTERIUM*
PAR CRIBLAGE PHYTOCHIMIQUE

*"On ne saurait entrer deux fois dans le même fleuve, car toutes les choses
s'écoulent et rien ne demeure."*

Héraclite d'Éphèse

1. Introduction

Les organismes marins constituent une extraordinaire source de composés chimiques aux structures moléculaires et bioactivités variées, qui présentent des applications thérapeutiques prometteuses (Kiuru *et al.* 2014). Plusieurs composés d'origine marine sont aujourd'hui utilisés dans diverses recherches sur le cancer, la schizophrénie ou encore la douleur. D'autres composés bioactifs marins peuvent également trouver des applications industrielles dans la nutraceutique, la cosmétique, les biocapteurs ou encore l'agriculture (régulateurs des plantes, herbicides, biocides) (Kiuru *et al.* 2014). Par ailleurs, diverses problématiques relatives à la santé émergent. Par exemple, la capacité des bactéries Gram - à devenir résistantes à des médicaments courants devient préoccupante, et nécessite la découverte de nouveaux antibiotiques (pour plus d'informations, voir la revue d'Exner *et al.* 2017).

Les microalgues représentent potentiellement une grande source de composés bioactifs pouvant servir les recherches en pharmaceutique et nutraceutique (Chu & Phang 2019). On a découvert chez certaines espèces des activités antibactériennes (voir les revues de Gacheva & Gigova (2014) et Stirk & van Staden (2022) ainsi que les articles associés), le premier composé antibactérien, la chlorelline, ayant été caractérisé en 1944 chez le genre *Chlorella* (Pratt *et al.* 1944).

Les biofilms abritent une communauté d'organismes microbiens adhérents à un substrat, qui produisent une matrice de substances polymériques au sein de laquelle ils se développent (López *et al.* 2010). On peut s'attendre à ce que, dans les années à venir, le mode de production de microalgues sous forme de biofilms prenne rapidement de l'ampleur, car ceux-ci présentent plusieurs avantages par rapport aux cultures traditionnelles planctoniques : besoins en eau plus faibles, systèmes de production moins coûteux, meilleur rendement de production, efficacité accrue pour le traitement des eaux usées, concentration cellulaire plus importante par unité de volume de culture, récolte plus simple, cultures plus résilientes et résistantes aux contaminations biologiques (Mantzorou & Ververidis 2019). Cette dernière propriété pourrait être due à une exacerbation des activités allélopathiques résultant de la proximité, dans le biofilm, des microalgues et des bactéries inféodées ou non à leur phycosphère (Allen *et al.* 2016). L'hypothèse selon laquelle les biofilms de microalgues seraient une source potentiellement importante de molécules susceptibles de trouver des applications pour la santé humaine est donc digne d'intérêt, bien qu'il n'existe à ce jour aucune évaluation de leur

bioactivité. En effet, contrairement à leurs homologues bactériens, les biofilms de microalgues ont été peu étudiés en laboratoire (Bharti *et al.* 2017, Hubas *et al.* 2018).

Les travaux d'Austin & Day (1990) et Austin *et al.* (1992), qui sont parmi les premiers à avoir recherché une activité antibactérienne chez *T. suecica*, ont, à l'aide de tests de diffusion, montré qu'une préparation commerciale de cette espèce produite en hétérotrophie inhibe la croissance de plusieurs bactéries du genre *Vibrio*¹ et de différents pathogènes de poissons. Bien plus tard, Guzmán *et al.* (2019) ont également réussi à mettre en évidence des activités sur d'autres souches bactériennes pathogènes de l'homme, Gram + comme Gram -². Toutefois, Alsenani *et al.* (2020) n'ont pas détecté de bioactivité sur d'autres souches bactériennes, quel que soit le type de Gram. Par ailleurs, *T. suecica* peut également exercer des activités anticancéreuses sur diverses cellules souches des cancers du sang, du poumon ou du sein (Hussein *et al.* 2020a, Parra-Riofrío *et al.* 2020) bien que les résultats concernant les cellules d'adénocarcinome pulmonaire humain et d'hépatocarcinome soient plus nuancés ou contradictoires (Custódio *et al.* 2014, Sansone *et al.* 2017, Silva *et al.* 2022). Contrairement à *T. suecica*, les activités antibactériennes de *Cylindrotheca closterium* n'ont jamais fait l'objet d'études, exceptées celles de Lauritano *et al.* (2020) qui ont testé, sans succès, l'activité anticancéreuse de *C. closterium* sur différentes lignées cancéreuses.

La divergence des résultats publiés dans la littérature concernant *T. suecica* et l'absence de travaux réalisés avec *C. closterium* ont conduit les partenaires du projet *Photobiofilm Explorer* (ANR) à considérer qu'il était nécessaire de rechercher l'existence d'activités antibactériennes dans des biofilms de chacune de ces 2 espèces. C'est dans ce cadre que j'ai été amené à réaliser des tests de diffusion de différents extraits des biofilms de *Tetraselmis suecica* et de *Cylindrotheca closterium* sur des bactéries pathogènes d'aquaculture, du genre *Vibrio* principalement, ainsi que sur des lignées cancéreuses humaines.

¹ *Vibrio* spp. BA 130 et BA 132, *V. alginolyticus* BA 133, *V. anguillarum* BA 134, *V. parahaemolyticus* BA 135, *V. vulnificus* BA 136, *Aeromonas hydrophila* 152, *A. salmonicida* NG et LL, *Lactobacillus* sp., *Serratia liquefaciens* K2, *Staphylococcus epidermidis*, *V. anguillarum*, *V. salmonicida* et *Yersinia ruckeri* type I

² *Escherichia coli* ATCC 25922, *Salmonella typhimurium* ATCC 14028, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, *Bacillus cereus* ISP B7/13, *Staphylococcus aureus* ATCC 25933, *Listeria monocytogenes* ATCC 19115, et *Micrococcus luteus* ATCC 9341

2. Matériel et méthodes

2.1. Souches de microalgues utilisées et production de biofilm

Tetraselmis suecica AC254 et *Cylindrotheca closterium* AC170 ont été obtenues à partir de la souchothèque Alcobank Caen (Université de Caen Basse-Normandie, France).

L'expérience concernant *Cylindrotheca closterium* s'est déroulée dans le cadre du projet *Photobiofilm Explorer*. Cette diatomée est d'abord cultivée axéniquement au laboratoire par repiquages successifs de batch cultures de volume croissant de 0,5, 1 et 10 L, dans des conditions contrôlées de température (25°C) et de lumière continue (150 $\mu\text{mol photons.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$). Ces cultures, enrichies avec du milieu f/2 (Guillard & Ryther 1962, Guillard 1975) sont barbotées avec de l'air filtré additionné de CO₂. La culture de 10 L permet ensuite d'inoculer des cultures sous serre de grands volumes (cylindres translucides en fibre de verre (PENTAIR, USA) de 100 et 300 L) bullées avec de l'air enrichi en CO₂. Ces cultures planctoniques, une fois concentrées, servent ensuite à inoculer le biofilm de *C. closterium* qui a été entretenu sous serre dans des conditions non axéniques durant 3 mois (22 avril au 22 juillet 2022) au moyen d'un système de cylindre rotatif (Morales *et al.* 2020, Penaranda *et al.* 2022) breveté (WO 2021180713A1). Ce cylindre (5 mètres de long, 1 mètre de diamètre), recouvert d'un tissu textile permettant l'adhésion des microalgues, flotte et tourne dans un bassin rempli initialement avec de l'eau de mer naturelle filtrée (1, 0,5 et 0,2 μm) puis traitée aux UV (BIOUV, UV-C 254 nm, 225 mj.cm^{-2}) (Figure 31A). Un système de régulation de la température de l'eau du bassin permet de limiter ses fluctuations entre 20°C et 35°C (moyenne 25,0 $\pm$ 2,0 °C) malgré les températures extrêmes atteintes dans la serre. Le pH est maintenu proche de 8,5 grâce à bullage contrôlé de CO₂ (Annexe 1). Du milieu f/2 modifié (double dose de nitrate et de phosphate, supplément de silicate) est ajouté tous les 7 jours dans le bassin pour prévenir toute limitation nutritive. Le biofilm a été récolté tous les 14 ou 21 jours par simple raclage (Figure 31B). 250 g de cette pâte humide sont disposés dans une barquette alimentaire en aluminium recouverte de papier aluminium, puis flash-congelés à l'azote liquide avant conservation à -80°C. Du fait de la proximité de la mer, le biofilm de *C. closterium* a été contaminé au bout d'un mois par divers organismes (principalement une cyanobactérie, mais aussi des euplotes, des larves d'insectes...) (Figure 31A).

Les biofilms de *T. suecica* ont été produits en continu par la société Inalve (Nice, France) de septembre 2021 à juillet 2022, suivant un procédé et un conditionnement similaires à ceux

décrits pour *C. closterium*. Plusieurs récoltes ont été réalisées par la startup Inalve durant cette période, et utilisées pour des extractions.

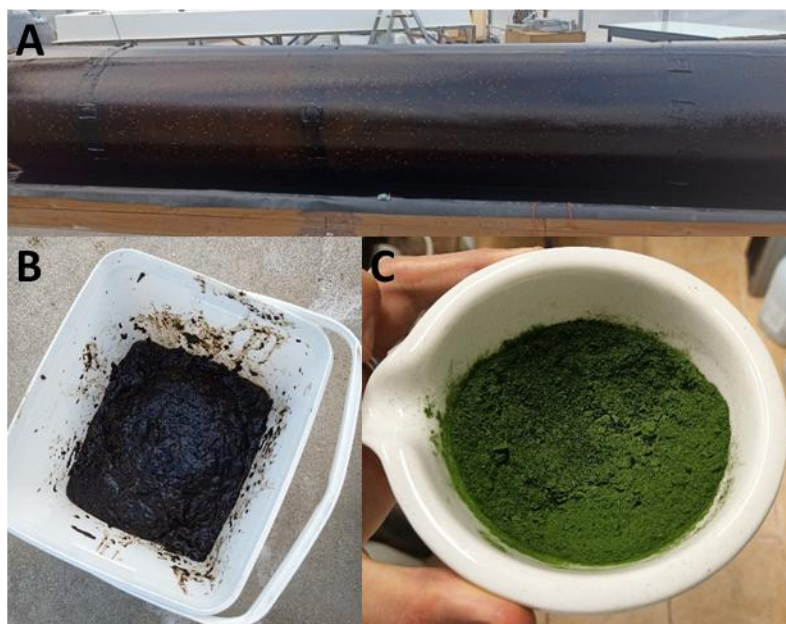


Figure 31 : (A) Biofilm de *Cylindrotheca closterium* se développant sur un cylindre rotatif. Les petites tâches blanchâtres sont des contaminations apparues au bout d'un mois de culture. (B) Pâte fraîche de biofilm de *C. closterium* récolté. (C) Lyophilisat de biofilm de *Tetraselmis suecica*.

2.2. Souches bactériennes et milieu de culture bactérien

La recherche de composés bioactifs issus d'extraits biologiques requiert des organismes spécifiques, dit « cibles », cohérents avec les objectifs de l'étude. Le projet *Photobiofilm Explorer* avait, entre autres, deux objectifs distincts mais interconnectés : (i) la recherche de composés bioactifs antibactériens présentant des intérêts pharmaceutiques et biotechnologiques, et (ii) la recherche de composés chimiques médiateurs (c'est-à-dire des composés allélopathiques) présents dans la phycosphère des microalgues du biofilm. Pour répondre au premier objectif, une dizaine de bactéries pathogènes d'aquaculture ont été commandées pour servir d'organismes cibles lors des tests de diffusion.

Les souches répertoriées dans le **Tableau 2**, fournies par le *Belgian Coordinated Collections of Microorganisms* (BCCM), ont été choisies sur la base de 5 critères : (i) le milieu de culture *Marine Broth* (MB) leur convient, (ii) elles sont cultivables entre 20 et 30°C, (iii)

elles doivent être des pathogènes d'organismes aquatiques (hors cnidaires et ascidies¹), et (iv) elles doivent présenter un risque biologique de niveau 1 maximum. Les souches réceptionnées ont été revitalisées par repiquages successifs dans du milieu MB (Marine Broth, Millipore®, ref. 76448, Sigma Aldrich). Seule la bactérie *Tenacibaculum maritimum* LMG 11612 n'a pas pu être revitalisée. Une souche supplémentaire, *Alteromonas* sp., a également été fournie par l'UMR MARBEC.

Tableau 2 : Liste et caractéristiques des bactéries pathogènes d'aquaculture commandées au BCCM

Bactéries cibles			Caractéristiques					
Souche	Genre	Espèce	Milieu	T°	Respiration	Niv. risque	Hôte	Lien
LMG 11684	<i>Listonella</i>	<i>anguillarum</i>	MB	25°C	Aérobic	1	Poisson	Lien
LMG 24517	<i>Vibrio</i>	<i>aestuarianus</i>	MB	20°C	Aérobic	1	Huître	Lien
LMG 22888	<i>Vibrio</i>	<i>campbelli</i>	MB	25°C	Aérobic	1	Crevette	Lien
LMG 21557	<i>Vibrio</i>	<i>fortis</i>	MB	28°C	Aérobic	1	Crevette	Lien
LMG 13949	<i>Vibrio</i>	<i>harveyi</i>	MB	25°C	Aérobic	1	Crevette	Lien
LMG 19664	<i>Vibrio</i>	<i>ichthyoenteri</i>	MB	28°C	Aérobic	1	Poisson	Lien
LMG 21522	<i>Vibrio</i>	<i>kanaloae</i>	MB	28°C	Aérobic	1	Crevette	Lien
LMG 20370	<i>Vibrio</i>	<i>owensii</i>	MB	28°C	Aérobic	1	Crevette	Lien
LMG 19663	<i>Vibrio</i>	<i>penaeicida</i>	MB	20°C	Aérobic	1	Crevette	Lien
LMG 19031	<i>Vibrio</i>	<i>splendidus</i>	MB	25°C	Aérobic	1	Poisson	Lien
/	<i>Alteromonas</i>	sp.	MB	25°C	Aérobic	/	/	/

Après revitalisation, les souches sont cultivées dans 10 mL de milieu MB dans des tubes Falcon, puis mises à incuber dans des tubes Falcon de 50 mL sous agitation constante (SK-O330-PRO Digital-LCD Orbital Shaker, DLAB) durant 28h (25°C, obscurité, 150 rpm). La courbe de croissance de chaque souche est obtenue par une mesure de DO_{600nm} réalisée toutes les 2 heures (LAMBDA 365 UV/Vis Spectrophotometer, PerkinElmer). Un aliquote de chaque culture bactérienne en phase de croissance exponentielle est mélangé avec un volume équivalent de glycérol pour être réparti dans plusieurs cryotubes stockés à -80°C. Deux dilutions sérielles avec un facteur de dilution de 10 jusqu'à obtenir une dilution par 10⁷ sont réalisées à partir d'un aliquote de 0,5 mL lorsque la DO_{600nm} atteint une valeur de 0,6. 100 µL des quatre dernières dilutions (10⁴ à 10⁷) sont étalés de manière homogène sur des boîtes de Pétri comportant du milieu MB gélosé avec 2% d'agar-agar (MB 2%). Ces boîtes sont ensuite incubées à 25°C durant 24h à l'obscurité. Après incubation, la moyenne pondérée des

¹ Les bactéries pathogènes de cnidaires et d'ascidies disponibles au BCCM ont été écartées pour des raisons sanitaires. D'autres équipes présentes à l'IMEV étudient des organismes appartenant à ces taxons.

2.3. Extractions

Une poudre fine de biofilm est obtenue après lyophilisation des échantillons congelés (voir **Chapitre 2, partie 2.1**), et broyage du lyophilisat à l'aide d'un mortier (**Figure 31C**). 500 mg de cette poudre sont ajoutés dans 7 tubes Falcon et extraits avec 15 mL des différents solvants et mélanges de solvant testés (voir **Figure 33A, C**). Les tubes sont ensuite rapidement placés dans un bain à ultrasons durant 15 min, puis centrifugés (10 min, 4500 rpm) (Centrifugeuse Sorvall™ ST 40R, ref. 75004525, Thermo Scientific)¹. Les surnageants sont ensuite délicatement transvasés à l'aide de pipettes Pasteur dans des flacons pré-pesés et stockés à -80°C sous gaz inerte (N₂) (gamme TS1 et CC1). Les concentrations de ces extraits, qui n'ont pas pu être déterminées, ont cependant été jugées suffisantes pour des tests de diffusion compte tenu de leur forte coloration et de la quantité de biomasse utilisée (voir **Figure 33B**). Ces extraits ont également été envoyés aux partenaires du projet PBEx pour leurs propres analyses².

Des échantillons supplémentaires du biofilm de *T. suecica* préalablement évaporés (par rotavap, N-evap ou lyophilisation) et extraits avec de l'eau milliQ (EMQ), de l'éthanol (EtOH) et de l'acétone (Ac) (gamme TS2) ainsi que deux aliquotes d'extraits EMQ (de dates différentes) et un aliquote d'extrait MeOH:EMQ (1:1) de biofilm de *C. closterium* (gamme CC2) ont été dédiés aux tests anticancéreux³. Les extraits secs de *T. suecica* ont été resolubilisés dans un volume équivalent de diméthylsulfoxyde (DMSO) pour une concentration finale de 1 mg.mL⁻¹. L'ajout de DMSO n'a pas permis de resolubiliser la totalité des extraits qui formaient une pâte visqueuse. Seul le surnageant a été conservé après centrifugation. Avant utilisation, les extraits secs d'EMQ de *C. closterium* ont été resolubilisés dans un volume équivalent d'EMQ pour des concentrations de 183,7 et 62,2 mg.mL⁻¹ tandis que l'extrait sec de MeOH:EMQ (1:1) a été resolubilisé avec un mélange EMQ:DMSO (1:1) pour une concentration finale de 170,5 mg.mL⁻¹.

¹ L'extrait EMQ a été centrifugé par erreur une deuxième fois après sa remise en suspension.

² Les extraits doivent être utilisés pour des bioessais sur d'autres cibles microbiennes, bactéries comme microalgues, vis-à-vis de potentielles propriétés (antibactériens, herbicides, antiadhésifs). Bien que ces extraits n'aient pas été utilisés, des articles en liens avec nos travaux ont été publiés ([Mougin et al. 2024](#), [Sanchez et al. 2024](#)).

³ Les extractions et évaporations ont été réalisées au LOV puis les extraits envoyés au LIENSs avant d'être resolubilisés.

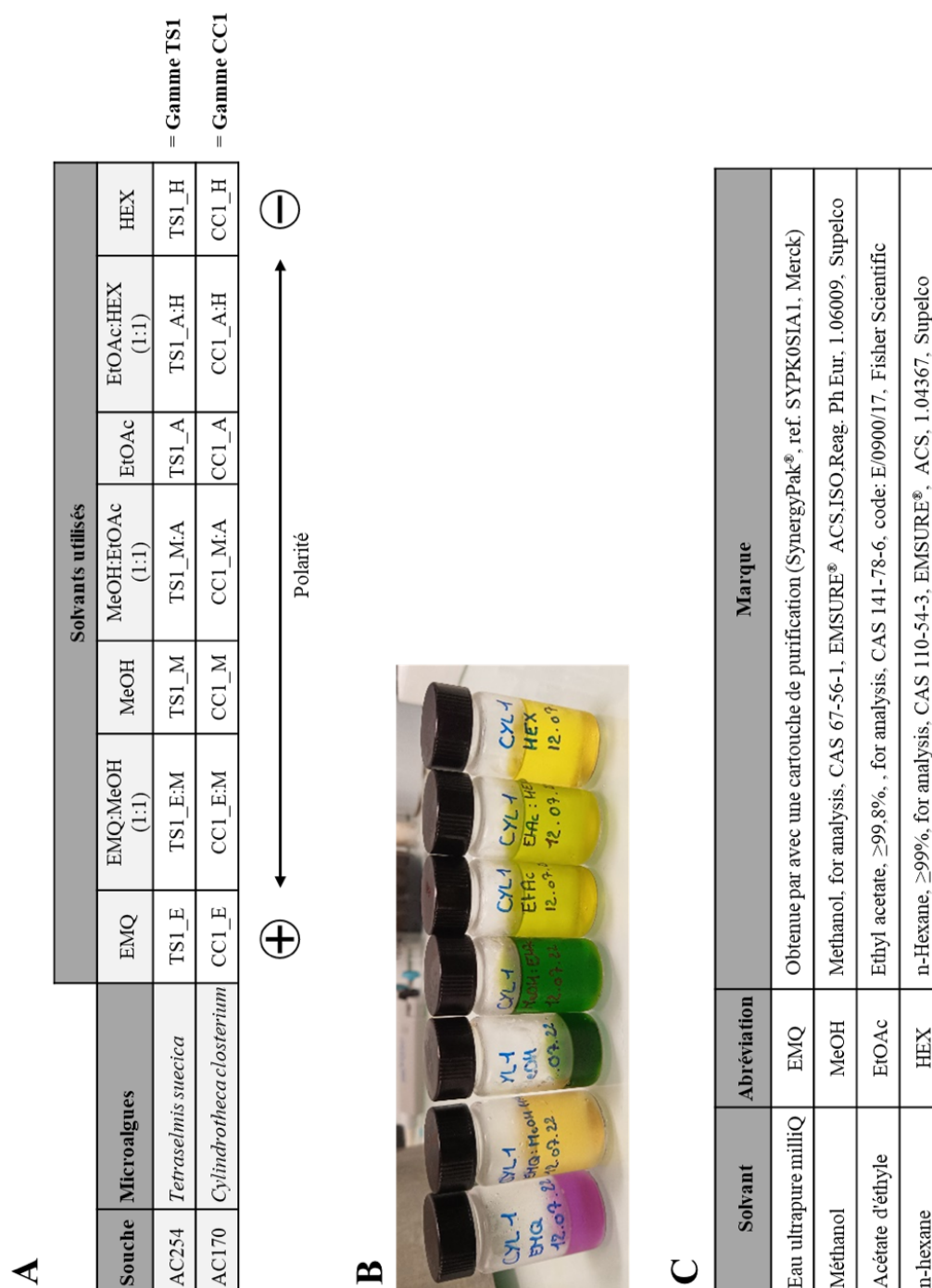


Figure 33 : (A) Tableau récapitulatif des gammes d'extraits réalisés avec les biofilms de *T. suecica* et *C. closterium*. (B) photographies de la gamme d'extraits de *C. closterium*, et (C) solvants utilisés.

Des extraits supplémentaires de biofilm de *T. suecica* ont été réalisés à l'aide d'un mélange MeOH et dichlorométhane (DCM, ≥99,9%, for HPLC, code : 23373.320, CAS 75-09-2, VWR) afin de pouvoir disposer d'un unique extrait conséquent. Pour cela, 200 g de biofilm frais sont flash-congelés, lyophilisés et broyés comme précédemment. 5 g de poudre fine sont

ajoutés dans un tube Falcon puis extraits avec 20 mL d'un mélange MeOH:DCM (1:1) placés dans un bain à ultrasons (20 min). Après centrifugation (4000 rpm, 10 min), le surnageant est transvasé dans un flacon à l'aide d'une pipette Pasteur. L'extraction est réalisée 3 fois afin d'extraire le maximum de composés, puis l'extrait est réparti dans 3 flacons pré-pesés. Après conservation des extraits à -80°C sous N₂, le solvant de chaque flacon est totalement évaporé par N-Evap, et les masses d'extraits secs sont pesées. Le premier extrait est resolubilisé dans un mélange MeOH:DCM (1:1) pour obtenir une concentration de 50,4 mg.mL⁻¹ (extrait TS3_M:Dc), tandis que le second est resolubilisé dans du MeOH puis transféré dans un nouveau flacon pré-pesé. La totalité de l'extrait sec obtenu avec du MeOH:DCM (1:1) avant solubilisation dans du MeOH n'a pas pu être récupérée. Le solvant a donc de nouveau été évaporé pour obtenir la masse exacte d'extrait sec, avant que ce dernier soit resolubilisé dans du MeOH pour une concentration finale de 57,1 mg.mL⁻¹ (extrait TS3_M). Au cours de l'évaporation, un extrait MeOH:EMQ (1:1) a été obtenu en prélevant 1 mL d'extrait TS3_M et en le diluant dans 1 mL d'EMQ (extrait TS3_Em:M). Afin d'estimer la concentration de cet extrait, 500 µL d'extrait TS3_M en cours d'évaporation ont également été disposés dans une coupelle pré-pesée et laissée à l'air ambiant sous sorbonne jusqu'à évaporation totale. L'extrait MeOH:EMQ (1:1) a ainsi pu être concentré à 18,6 mg.mL⁻¹. Enfin, le dernier extrait a été resolubilisé dans un mélange EMQ:DMSO (1:1) mais l'extrait ayant formé une solution visqueuse et visuellement hétérogène, il n'a pas été possible de déterminer la concentration exacte de chaque dépôt sur les disques de diffusion (extrait TS3_Em:Dm).

Un autre extrait éthanolique a été fourni par la start-up Inalve (gamme Feal LIPIDS). Il a été transvasé dans un flacon pré-pesé, concentré au N-Evap et resolubilisé avec de l'EtOH pour obtenir une concentration d'environ 50 mg.mL⁻¹ (extrait TS3_Et).

2.4. Lignées cellulaires

La recherche d'activités anticancéreuses a été sous-traitée au laboratoire Littoral Environnement et Sociétés (LIENSs, Université de La Rochelle). Les lignées cellulaires cancéreuses¹ ont été cultivées, soit dans un milieu de culture DMEM avec 10% de sang de veau

¹ A2058 (peau humaine, métastases des ganglions ; Merck) et MDA-MB-231 (cellules épithéliales de glande mammaire de femme atteinte d'adénocarcinome ; American Type Culture Collection, ATCC) et non-cancéreuses HEK-293 (cellules épithéliales isolées d'un rein d'embryon humain ; ATCC) et CCD45 SK (fibroblastes primaires d'humain ; ATCC).

foetal (SVF, GIBCO Life Technology) et 1% d'antibiotiques (pénicilline/streptomycine, GIBCO Life Technology), soit dans un milieu OPTIMEM avec 10% de SVF (GIBCO Life Technology) et 1% d'antibiotiques (pénicilline/streptomycine, GIBCO Life Technology) pour la lignée MDA-MB-231 (uniquement avec les extraits de *T. suecica*) dans une enceinte à 37°C et 5% de CO₂ humidifié.

2.5. Tests de sensibilité, optimisation et tests de diffusion sur cibles bactériennes

Une culture de chaque souche bactérienne de la collection précédemment créée est inoculée à partir de précultures liquides pré-acclimatées dans du milieu MB, elles-mêmes obtenues par prélèvement d'une colonie de la souche correspondante sur une gélose MB 2%. Chaque culture est réalisée dans un tube Falcon de 50 mL avec 10 mL de milieu MB comme décrit précédemment. Les cultures sont organisées par lots de souche bactérienne selon la similarité de leur dynamique de croissance. Lorsque la DO_{600nm} atteint une valeur comprise entre 0,8 et 1 – valeurs optimales permettant d'obtenir un tapis bactérien homogène pour chaque souche – 250 µL de culture sont étalés sur une gélose MB 2%. Entre 5 et 7 disques de diffusion stériles sont déposés de manière équidistante en fonction des tests à réaliser. Des puits sont également formés à l'aide d'une tige en verre stérile à la place de certains disques de diffusion. Ensuite, des volumes connus de solutions d'antibiotique, de solvants ou d'extraits sont ajoutés sur les 7 emplacements, avec de concentrations variables.

En premier lieu, des pré-tests de la sensibilité d'*Alteromonas* sp. aux gammes d'extraits TS1 et CC1 ont été réalisés avec l'ajout de 10 µL des différents extraits sur les disques de diffusion (voir **Annexe 2**)¹.

Ensuite, 10 µL de différentes solutions d'antibiotique (néomycine, vancomycine, streptomycine, gentamycine) à 10 µg.µL⁻¹ sont déposés sur les disques de diffusion. Après sélection de la néomycine comme contrôle positif — car étant l'antibiotique le plus efficace vis-à-vis de l'ensemble des souches bactériennes cibles — un test de sensibilité au DMSO (ACS

¹ D'autres pré-tests d'optimisation du protocole ne sont pas décrits ici, incluant par exemple l'ajout de disques préchargés d'extraits, l'évaporation préalable du solvant sur les disques de diffusion, la sensibilité aux différents solvants utilisés, le volume d'extrait à déposer, ou encore le volume de culture et la DO_{600nm} optimaux à ajouter sur la gélose pour chaque souche bactérienne.

grade spectrophotométrique, $\geq 99,9\%$, CAS 67-68-5, code: 154938) a été réalisé. 10 μL de différentes concentrations de DMSO dilué avec de l'EMQ (1:0, 1:1, 1:3, 1:9, 1:19, 1:99 et 1:999) sont déposés sur les disques. Un test de sensibilité au MeOH et au DCM a également été réalisé. Pour cela, 6 disques de diffusion sont déposés sur des géloses préalablement inoculées avec chacune des souches précitées, et 10 μL de solutions de solvant MeOH:DCM (1:1), MeOH 100%, MeOH:EMQ (1:1), MeOH:EMQ (3:1) et MeOH:EMQ (9:1) sont ajoutés sur les disques. Un léger halo d'inhibition est apparu uniquement avec le DMSO 100% et le MeOH 100%, ce qui a nécessité l'utilisation d'extraits dilués par deux avec de l'EMQ.

Puis les extraits TS3_Em:Dm, TS3_ET, TS3_M:Dc et TS3_Em:M ont été testés sur les 10 souches bactériennes. Pour cela, les disques ont été disposés sur les géloses de deux façons différentes, avec 5 bactéries cibles pour chaque disposition. Dans le premier cas, 5 disques de diffusion sont ajoutés sur les géloses inoculées avec *L. anguillarum*, *V. campbelli*, *V. fortis*, *V. kanaloae* et *V. owensii* (groupe 1) et 10 μL des extraits TS3_Em:Dm et TS3_Et sont déposés sur deux d'entre eux, les trois autres servant de contrôles négatifs et positif. Dans le second cas, trois disques de diffusion sont déposés sur des géloses des souches restantes (*V. aestuarianus*, *V. harveyi*, *V. ichthyenteri*, *V. penaeicida*, et *V. splendidus*) et 10 μL d'extrait TS3_Em:M sont ajoutés sur l'un d'eux, les deux autres servant de contrôles négatif et positif. Trois puits supplémentaires sont ajoutés et l'un d'eux reçoit 50 μL d'extrait MeOH:DCM (1:1), un autre servant pour le contrôle négatif.¹

Pour l'ensemble de ces expériences, 10 μL d'une solution de néomycine à 10 $\mu\text{g}.\mu\text{L}^{-1}$ sont déposés sur un disque de diffusion pour servir de contrôle positif (hormis lors des tests de sensibilité aux antibiotiques). Des contrôles négatifs sont réalisés pour chaque extrait utilisé, avec l'ajout de 10 μL de solvants ou mélanges de solvants correspondants. Chaque expérience a été réalisée en triplicata. Les boîtes de Pétri sont ensuite incubées 48h à 25°C et à l'obscurité, et photographiées au bout de 24 et 48h à l'aide d'un dispositif *ad hoc* (**Figure 34**). L'existence ou non d'une activité antibactérienne est mise en évidence par la présence ou non d'un halo d'inhibition autour des disques ou des trous.

¹ Le dernier puits reçoit de l'EtOH destiné aux tests d'une autre expérience non décrite ici. Un puits supplémentaire rempli avec 50 μL d'extrait TS3_Et a été ajouté pour le test de diffusion sur *V. penaeicida* dans le cadre d'une reproduction d'expérience antérieure.

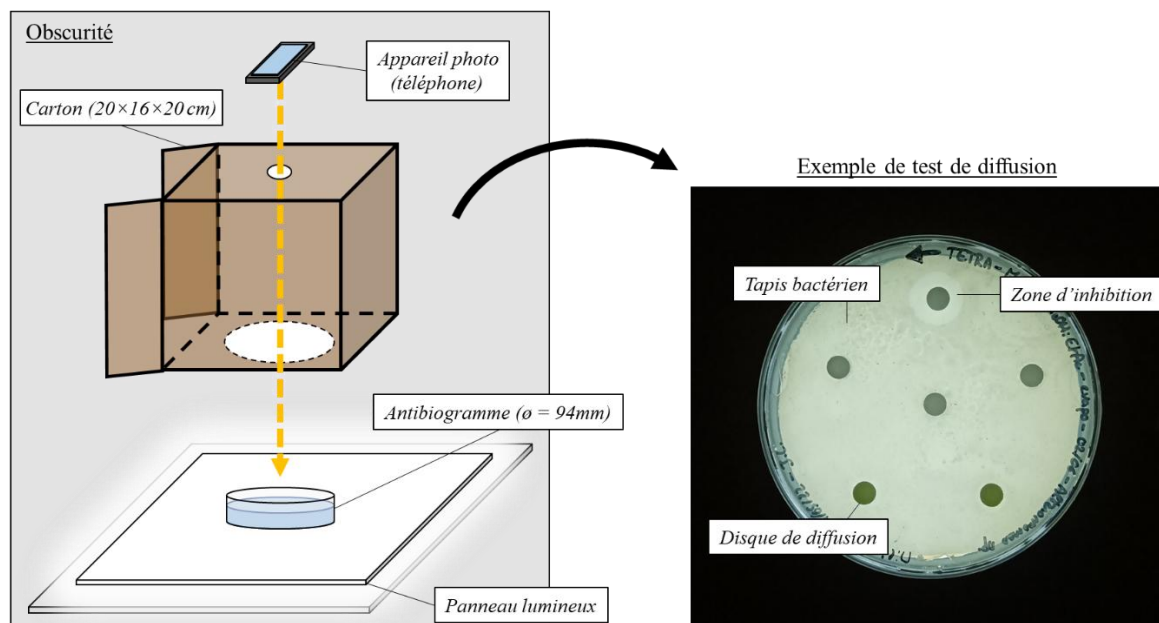


Figure 34 : Dispositif mis au point pour la prise d'image des tests de diffusion.

2.6. Viabilité cellulaire

Pour les extraits de biofilm de *T. suecica*, les lignées A2058, MDA-MB-231 et HEK-293 sont cultivées dans une plaque 96 puits (Sarstedt) avec 100 μL de milieux correspondants (voir plus haut) à partir d'une concentration cellulaire initiale de $10^5 \text{ cell.mL}^{-1}$, et incubées à 37°C dans une enceinte avec 5% de CO_2 humidifié. Après 24 h d'incubation, le milieu de culture est remplacé par un mélange d'extrait de *T. suecica* et de milieu frais (gamme TS2, dilué 100 fois). 4 répliquas par extrait sont réalisés. Un contrôle négatif est réalisé avec une dilution à 1/100 de DMSO dans le milieu correspondant. Un marqueur de viabilité cellulaire (Alamar Blue HS, ThermoFisher) est ajouté avant incubation des plaques à 37°C et à l'obscurité. Après 4 h d'incubation, les absorbances à 570 et 600 nm sont mesurées à l'aide d'un lecteur de plaque (Omega Spectrostar) et des images prises au microscope en champ clair ($\times 20$, 4 champs par puits) permettent de contrôler la concentration et la forme des cellules. Le taux d'inhibition de la croissance par rapport au contrôle négatif (CN) est estimé par la formule suivante :

$$\% \text{ inhibition} = \frac{\text{moyenne des CN} - \text{valeur brute}}{\text{moyenne des CN}}$$

où la valeur brute correspond à la normalisation de l'absorbance à 570 nm (forme réduite de l'Alamar Blue HS) par l'absorbance à 600 nm (forme oxydée de l'Alamar Blue HS).

Pour tester les extraits des biofilms de *C. closterium*, les lignées MDA-MB-231 et CCD45 SK sont cultivées dans trois plaques 96 puits (Sarstedt) avec 100 μL de milieu DMEM, à partir d'une concentration cellulaire initiale de $5 \cdot 10^4 \text{ cell.mL}^{-1}$, et incubées 37°C dans une enceinte avec 5% de CO_2 humidifié. Après 24 h d'incubation, le milieu de culture est remplacé par une solution d'extrait de la gamme TS2 dilué 100 fois avec du milieu frais, puis les plaques sont de nouveau incubées. Des triplicatas sont réalisés pour chaque extrait. Un contrôle négatif est réalisé avec une dilution au $1/100^{\text{ème}}$ de DMSO ou de EMQ:DMSO dans le milieu DMEM. Après 24 h d'incubation, 20 μL de MTT (bromure de 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium, Sigma Aldrich) sont ajoutés. Après 4 h d'incubation, le milieu est remplacé par 200 μL de DMSO. Enfin, l'absorbance à 550 nm est mesurée au bout de 30 min à l'aide d'un lecteur de plaque (Fluostar Omega microplate), l'intensité de la couleur violette formée étant proportionnelle à la quantité de mitochondries présentes, donc de cellules vivantes, dans la culture (ainsi que l'activité métabolique de chaque cellule). L'absorbance de chaque puits est comparée à l'absorbance moyenne des conditions contrôles de la plaque multi-puits. Un absorbance relative supérieure à 100% indique une amélioration de la viabilité et du développement cellulaires, et inversement.

3. Résultats

3.1. Courbes de croissance bactérienne

La croissance des souches bactériennes présente une phase de latence suivie d'une phase exponentielle jusqu'à 12 h d'incubation. Les dernières mesures effectuées sur chaque culture indiquent que la phase stationnaire commence généralement après 23 h d'incubation (**Figure 35**). En moyenne, les DO_{600nm} entre 0,8 et 1 sont atteintes au bout de 6 h d'incubation. Toutefois, les temps d'incubation nécessaires et les densités maximales sont très variables d'une souche à l'autre. Par exemple, environ 4 h d'incubation sont nécessaires à *V. harveyi* LMG 13949 pour atteindre une DO_{600nm} de 0,8 tandis qu'il faut 10 h pour *V. paraeicida* LMG 19663. En conséquence, deux groupes de 5 souches ont été considérés en fonction du temps d'incubation nécessaire pour atteindre une DO_{600nm} comprise entre 0,8 et 1 à des temps différents : d'un côté *L. anguillarum*, *V. campbelli*, *V. fortis*, *V. kanaloae* et *V. owensii* (groupe 1) et de l'autre *V. aestuarianus*, *V. harveyi*, *V. ichthyenteri*, *V. paraeicida*, et *V. splendidus* (groupe 2).

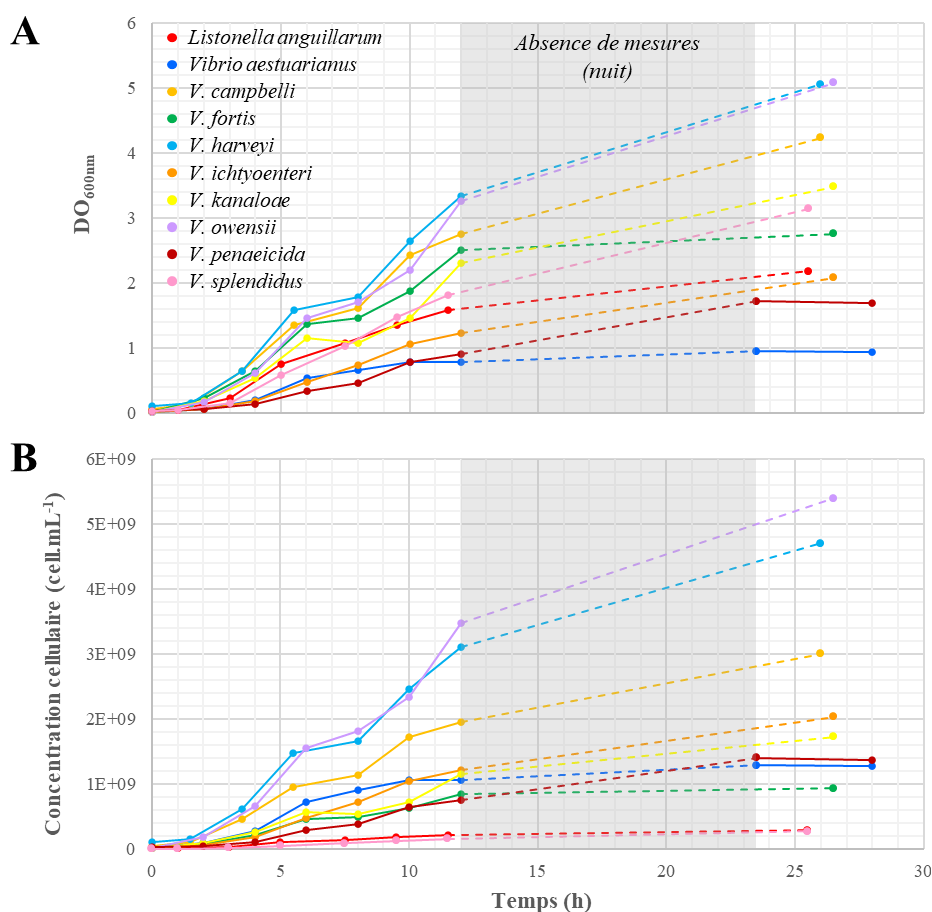


Figure 35 : Courbes de croissance des souches bactériennes cibles pathogènes issues du BCCM, incubées à 25°C et à l'obscurité, estimées d'après la densité optique à 600 nm (**A**), et la concentration cellulaire (**B**).

3.2. Antibiogrammes et tests de sensibilité aux solvants organiques

Les tests de sensibilité aux antibiotiques (antibiogrammes) donnent des résultats similaires pour l'ensemble des souches bactériennes cibles utilisées (**Figure 36**). L'ajout de néomycine et gentamycine à $10 \mu\text{g}.\mu\text{L}^{-1}$ produit d'importants halos d'inhibition autour des disques de diffusion. La streptomycine provoque des inhibitions similaires, sauf sur les souches *L. anguillarum* LMG 11684 et *V. campbelli* LMG 22888 où les halos sont fortement réduits. Un léger effet d'inhibition de la vancomycine est observé sur *V. ichthyoenteri* LMG 19664 et *V. penaeicida* LMG 19663. Aucune sensibilité à la vancomycine n'est observée sur les autres souches bactériennes.

Les souches *V. campbelli* LMG 22888, *V. owensii* LMG 20370, *V. harveyi* LMG 13949 et *V. splendidus* LMG 19031 présentent un très léger halo d'inhibition autour des disques de diffusion chargés avec $10 \mu\text{L}$ de DMSO 100% (**Figure 37**). Des observations similaires sont obtenues avec le MeOH (résultats non présentés ici). Afin de limiter la faible toxicité du DMSO et du MeOH sur ces souches, les extraits resolubilisés avec ces solvants ont préalablement été dilués par deux avec de l'EMQ.

3.3. Tests de diffusion

Aucune souche du groupe 1 n'a montré de sensibilité à l'extrait TS3_Em:Dm. Des halos d'inhibition après dépôt de l'extrait TS3_Et sont également visibles dans les contrôles négatifs, ce qui laisse supposer une absence d'activité antibactérienne de l'extrait sur ces cibles ou un effet inhibiteur équivalent à celui de l'EtOH sur l'ensemble des souches de ce groupe (**Figure 38**). De la même manière, les extraits TS3_Em:M et TS3_M:Dc n'ont induit aucun halo d'inhibition sur les souches bactériennes du groupe 2. Une absence de tapis bactérien est observable autour de certains contrôles négatifs, sur les disques de diffusion comme dans les puits, ce qui peut s'expliquer par un débordement du solvant autour de sa zone de dépôt lors du déplacement des boîtes jusqu'à leur zone d'incubation. Ce débordement n'a pas été observé avec les extraits TS3_Em:M et TS3_M:Dc, ces derniers étant plus denses et visqueux que les solvants en raison de leur concentration (**Figure 39**). Dans les deux expériences, un halo d'inhibition autour du contrôle positif (néomycine) a été observé (**Figure 38, Figure 39**).

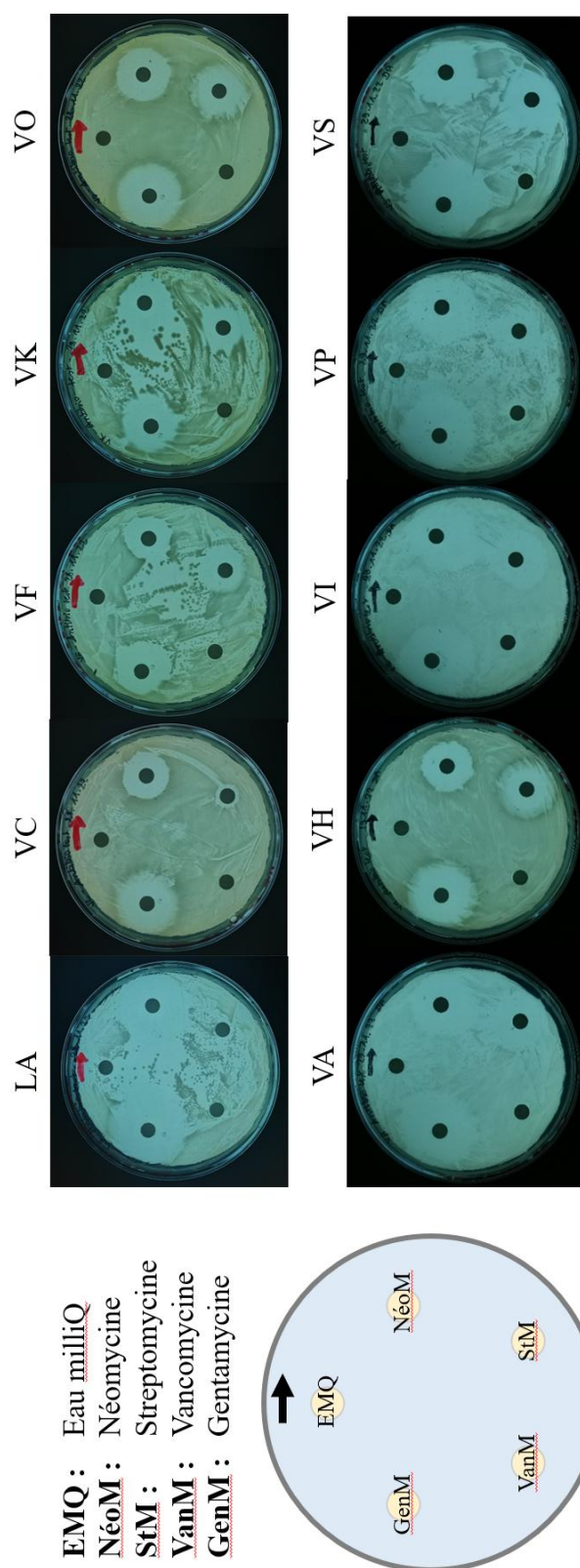


Figure 36 : Antibiogrammes sur les bactéries cibles issues du BCCM. Concentrations testées en néomycine (NéoM), streptomycine (StM), vancomycine (VanM) et gentamycine (GenM) : $10 \mu\text{g}.\mu\text{L}^{-1}$. Bactéries cibles utilisées : *Listonella anguillarum* LMG 11684 (LA), *Vibrio campbelli* LMG 22888 (VC), *V. fortis* LMG 21557 (VF), *V. kanaloae* LMG 21522 (VK), *V. owensii* LMG 20370 (VO), *V. aestuarianus* LMG 24517 (VA), *V. harveyi* LMG 13949 (VH), *V. ichthyenteri* LMG 19664 (VI), *V. penaeicida* LMG 19663 (VP), et *V. splendidus* LMG 19031 (VS). Photos réalisées après 48h d'incubation à 25°C .

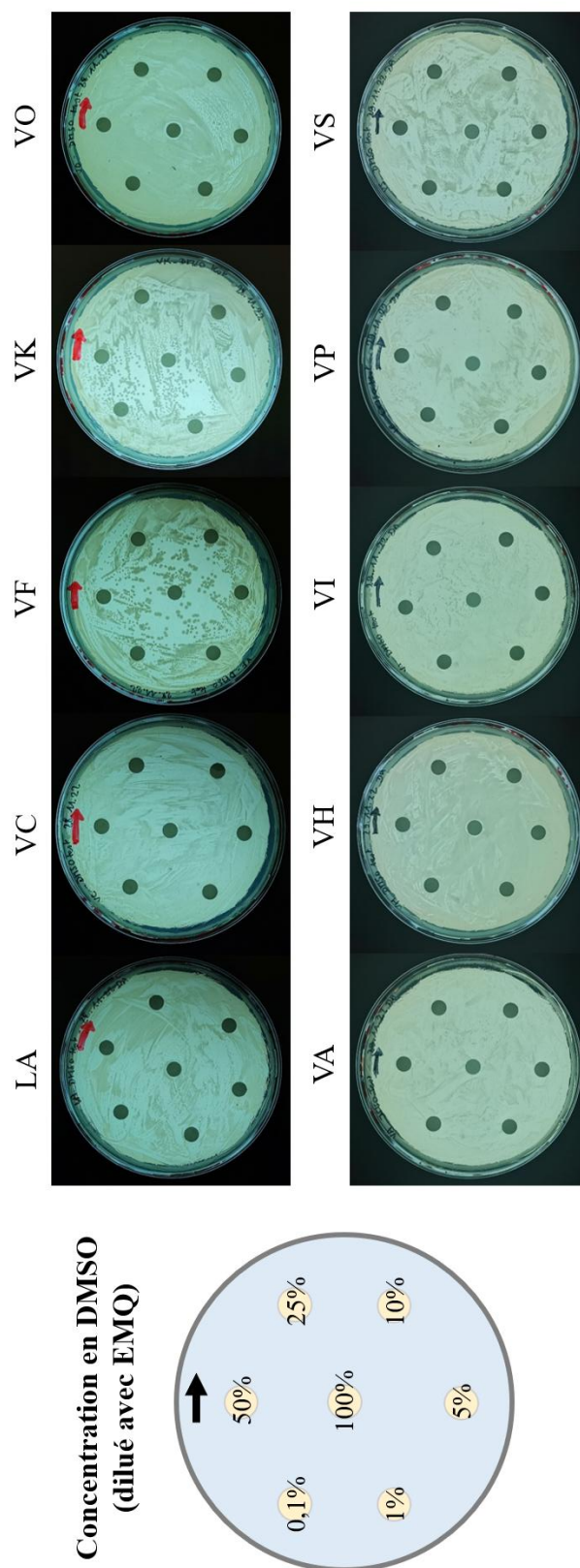


Figure 37 : Test de sensibilité au diméthylsulfoxyde (DMSO) dilué ou non avec de l'eau milliQ (EMQ) sur les bactéries cibles issues du BCCM. Bactéries cibles utilisées : *Listonella anguillarum* LMG 11684 (LA), *Vibrio campbelli* LMG 22888 (VC), *V. fortis* LMG 21557 (VF), *V. kanaloae* LMG 21522 (VK), *V. owensii* LMG 20370 (VO), *V. aestuarianus* LMG 24517 (VA), *V. harveyi* LMG 13949 (VH), *V. ichthyenteri* LMG 19664 (VI), *V. penaeicida* LMG 19663 (VP), et *V. splendidus* LMG 19031 (VS). Photos réalisées après 48h d'incubation à 25°C.

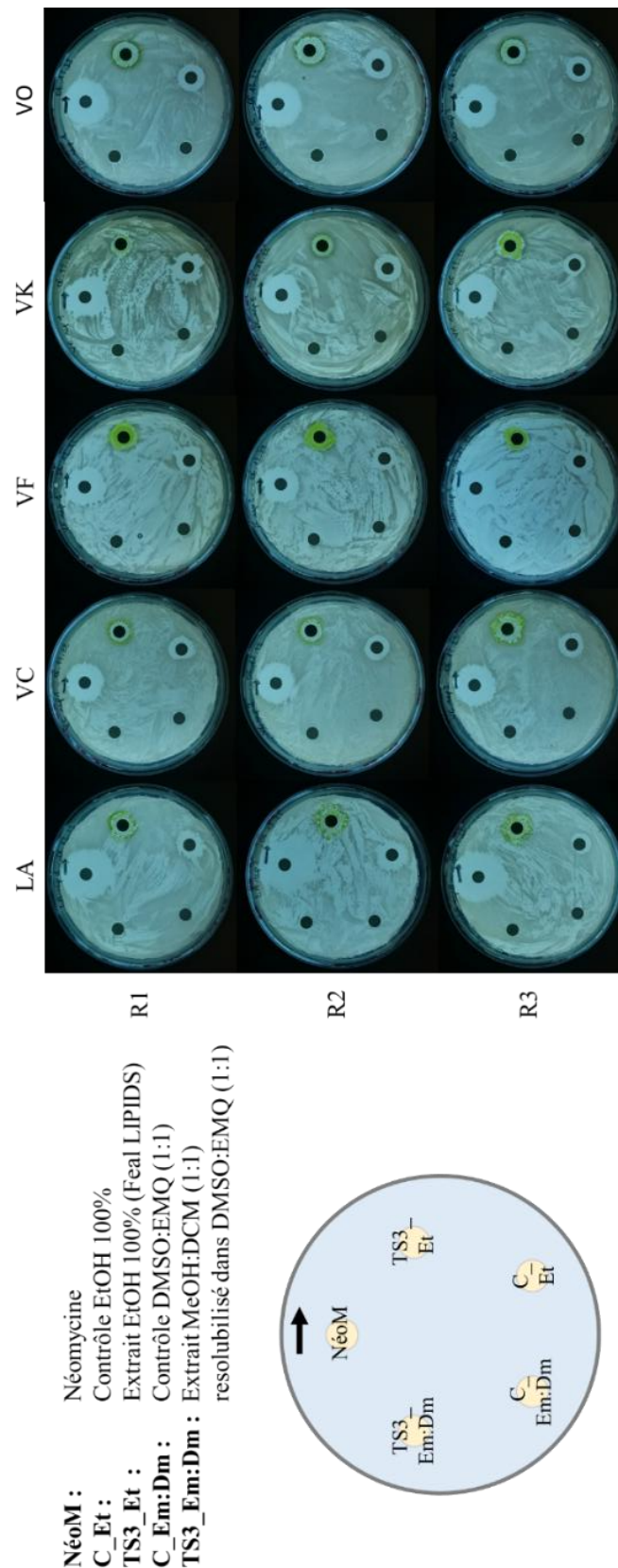


Figure 38 : Tests de diffusion d'extrait éthanolique 100% "Feal LIPIDS" (TS3_Et) et d'extrait MeOH:DCM (1:1) resolubilisé dans du DMSO:EMQ (1:1) (TS3_Em:Dm) de *Tetraselmis suecica* sur les bactéries cibles issues du BCCM. Bactéries cibles utilisées : *Listonella anguillarum* LMG 11684 (LA), *Vibrio campbelli* LMG 22888 (VC), *V. fortis* LMG 21557 (VF), *V. kanaloae* LMG 21522 (VK), et *V. owensii* LMG 20370 (VO). Photos réalisées après 44h d'incubation à 25°C.

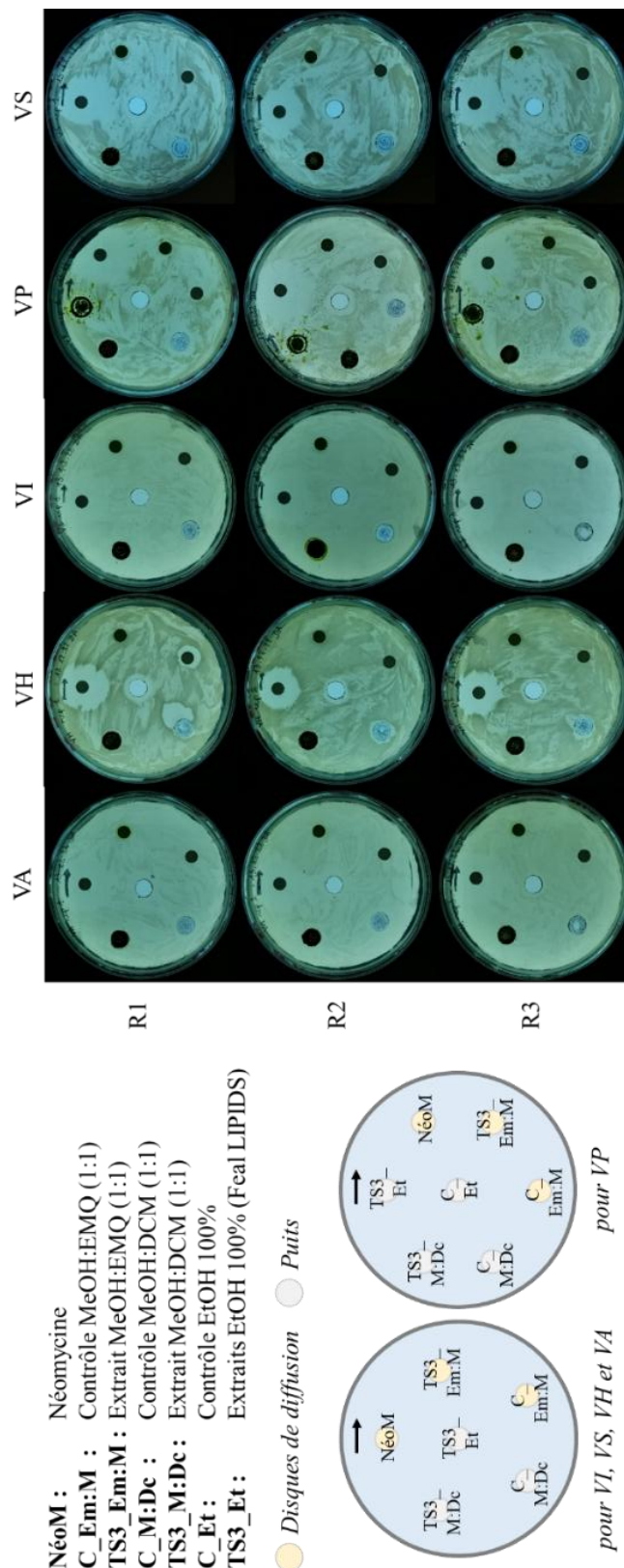


Figure 39 : Tests de diffusion d'extrait éthanolique 100% "Feal LIPIDS" (TS3_Et), d'extrait MeOH:DCM (1:1) resolubilisé dans du DMSO:EMQ (1:1) (TS3_M:De) ou dans du MeOH:EMQ (1:1) (TS3_Em:M) de *Tetraselmis suecica* sur les bactéries cibles issues du BCCM, réalisés par l'intermédiaire de disques de diffusion ou de puits. Bactéries cibles utilisées : *V. aestuarianus* LMG 24517 (VA), *V. harveyi* LMG 13949 (VH), *V. ichthyenteri* LMG 19664 (VI), *V. penaeicida* LMG 19663 (VP), et *V. splendidus* LMG 19031 (VS). Photos réalisées après 44 h d'incubation à température ambiante. Les disques E-MD et E-ME de VH R1 sont inversés.

3.4. Bioessais sur cellules cancéreuses

Globalement, les extraits de la gamme TS2 n'inhibent que modérément la croissance des lignées cancéreuses MDA-MB-231 et A2058, et n'améliorent que faiblement la croissance de la lignée saine HEK-293 (**Figure 40**). Seul un des extraits EMQ améliore la croissance de la lignée cancéreuse A2058. Bien qu'une tendance à l'inhibition des lignées cancéreuses, sans que ne soit affectée la lignée saine, valide l'un des critères de sélection recherchés par le LIENSs, l'ensemble des variations de la croissance cellulaire, positives comme négatives, ne dépassent pas 20% par rapport aux contrôles et présentent de surcroît une très grande variabilité entre les échantillons. En raison de cette forte variabilité, il n'a pas été jugé nécessaire d'appliquer de test statistique. Tous ces éléments suggèrent que les bioessais ne permettent pas de conclure sur l'existence d'une activité, de sorte que nous ne les avons pas poursuivis avec *T. suecica*.

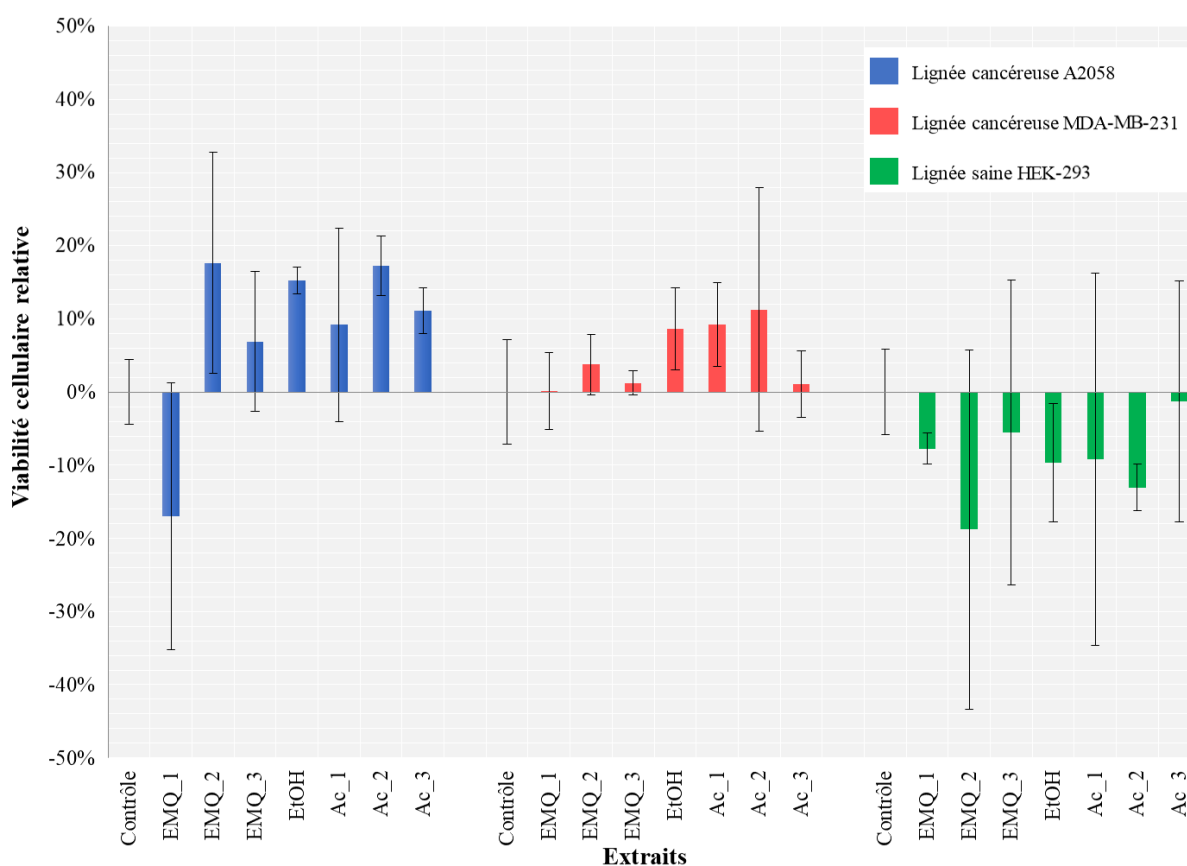


Figure 40 : Effets relatifs de différents extraits aqueux (EMQ_1, EMQ_2 et EMQ_3), éthanolique (EtOH) et acétoniques (Ac_1, Ac_2 et Ac_3) de biofilms de *Tetraselmis suecica* AC254 resolubilisés dans du DMSO sur la viabilité cellulaire de lignées saines (HEK-293) et cancéreuses (A2058 et MDA-MB-231) humaines par rapport aux contrôles. EMQ et Ac sont des extraits successifs d'un même échantillon biologique. La resolubilisation dans du DMSO étant difficile et variable, les extraits sont hypothétiquement concentrés à 1 mg.mL⁻¹ au maximum. Lignée HEK-293 : cellules épithéliales isolées d'un rein d'embryon humain. Lignée A2058 : métastases de ganglions de la peau humaine. Lignée MDA-MB-231 : cellules épithéliales de glande mammaire de femme atteinte d'adénocarcinome. Solvants utilisés : eau MilliQ (EMQ), éthanol (EtOH), acétone (Ac), et diméthylsulfoxyde (DMSO).

Les extraits de la gamme CC2 présentent le même profil d'action sur les deux lignées saine et cancéreuse selon l'extrait et la concentration utilisés (**Figure 41A,B**). À forte concentration (25 mg.mL⁻¹), l'extrait EMQ:MeOH (1:1) diminue la viabilité cellulaire relative de CCD45 SK et MDA-MB-231 mais, à des concentrations plus basses, l'augmente fortement. Les extraits EMQ de 2 biofilms de *C. closterium* peu et fortement contaminés par d'autres organismes, et récoltés à deux dates différentes, ne présentent pas de différences notables. Pour ces deux échantillons, plus la concentration d'extrait est importante, plus la viabilité cellulaire est réduite, jusqu'à obtenir un effet inhibiteur à haute concentration. Les extraits peu concentrés semblent néanmoins présenter un effet positif sur la lignée cancéreuse, contrairement à la lignée saine où aucune variation de viabilité cellulaire relative n'a été observée. Enfin, la viabilité cellulaire relative de la lignée saine CCD45 SK semble être plus sensible aux effets négatifs que celle de la lignée cancéreuse MDA-MB-231 pour laquelle les effets bénéfiques sont accrus. Bien que la forte augmentation de viabilité cellulaire observée pour une faible concentration de l'extrait EMQ:MeOH (1:1) suscite un intérêt, ces résultats ne sont pas en adéquation avec les objectifs scientifiques du LIENSs sur la recherche de composés bioactifs contre les cellules cancéreuses. Ces bioessais avec *C. closterium* n'ont donc pas été poursuivis. À l'instar des essais biologiques précédents avec *T. suecica*, aucun test statistique n'a été appliqué en raison de résultats peu concluants.

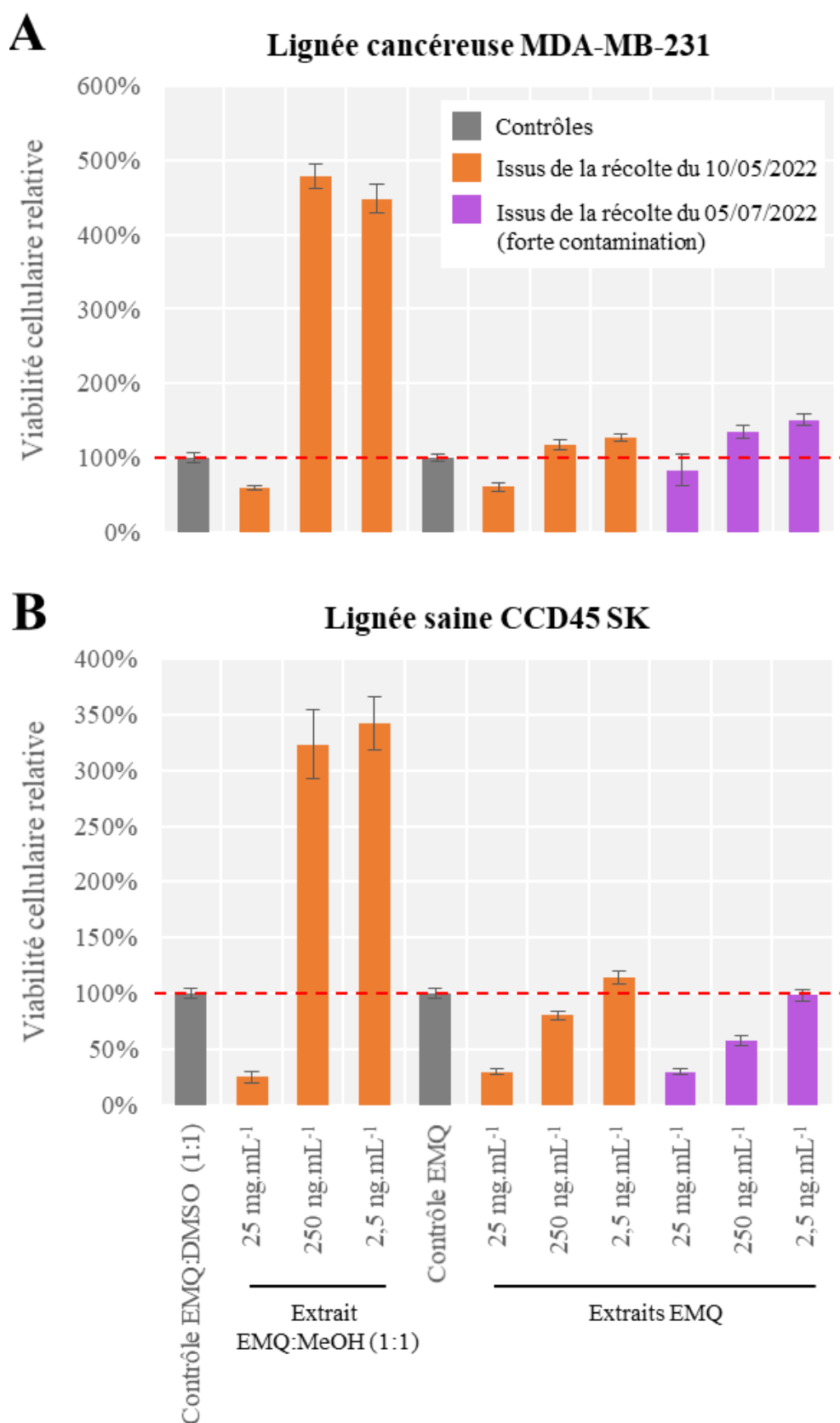


Figure 41 : Effets relatifs de différents extraits aqueux (EMQ) et d'un mélange EMQ:MeOH (1:1) de biofilms de *Cylindrotheca closterium* AC170 respectivement resolubilisés dans de l'EMQ et un mélange EMQ:DMSO (1:1) sur la viabilité cellulaire de lignées cancéreuse (MDA-MB-231) (**A**) et saine (CCD45 SK) (**B**) humaines par rapport à leurs contrôles respectifs. Solvants utilisés : eau MilliQ (EMQ), méthanol (MeOH) et diméthylsulfoxyde (DMSO).

4. Discussion

Ces expériences sont, à notre connaissance, les premiers tests d'activité biologique réalisés à partir de biofilms de microalgues. Malheureusement, elles n'ont pas permis de montrer que des extraits de biofilms de *Tetraselmis suecica* et *Cylindrotheca closterium* exercent des activités antibactérienne ou anticancéreuse significatives sur les cibles testées.

4.1. Activités antibactériennes

Nos tests de diffusion ont principalement porté sur des cibles pathogènes d'aquaculture du genre *Vibrio*. En effet, de rares travaux avaient rapporté que diverses souches du genre *Vibrio* ainsi que des pathogènes de poissons et d'humains présentaient une sensibilité à différents extraits de *Tetraselmis suecica* (Austin & Day 1990, Austin *et al.* 1992, Guzmán *et al.* 2019). Malheureusement, nous n'avons mis en évidence aucune inhibition de la croissance des *Vibrio* pathogènes d'aquaculture, ce qui, par ailleurs, corrobore les résultats plus récents d'Alsenani *et al.* (2020) qui notent l'absence d'activités antimicrobiennes de *Tetraselmis suecica*, *T. astigmatica* et *T. chui*. En effet, contrairement à ce qu'ils observent avec les microalgues *Chlorella* sp. FN1 et *Scenedesmus* sp. NT8c, Alsenani *et al.* (2020) ne décèlent chez ces trois espèces de *Tetraselmis* aucune activité sur les bactéries Gram + testées¹. De même, aucune activité issue de toutes ces microalgues n'a été observée sur des bactéries Gram –². Des peptides antimicrobiens ont toutefois été découverts dans des extraits acides de *T. suecica*, obtenus avec de l'acide acétique, un solvant relativement polaire, couplé à un cocktail d'inhibiteurs de protéases (Guzmán *et al.* 2019). Ici, nous avons utilisé des solvants d'extraction différents, ce qui a pu dénaturer les peptides d'intérêt présents dans les échantillons.

La plupart des extraits utilisés lors de nos expériences étaient de polaires à modérément polaires. Les rares extraits apolaires que nous avons utilisés, tels que les extraits hexanoïques des gammes TS1 et CC1, n'ont provoqué aucun halo d'inhibition chez *Alteromonas* sp. au début de nos pré-tests (Annexe 2), et n'ont donc pas été utilisés par la suite sur les bactéries cibles

¹ *Listeria monocytogenes* ATCC 7644, *Staphylococcus aureus* ATCC 25925 et ATCC 9144, *Bacillus subtilis* ATCC 6633 et ATCC 6051, *Staphylococcus epidermidis*, *Enterococcus faecalis* et *Clavibacter michiganensis*.

² *Escherichia coli* ATCC 25922, *Salmonella typhoid* ATCC 14028, *Pseudomonas syringae* et *Proteus vulgaris*.

commandées. Lors de leurs premiers tests biologiques sur le genre *Tetraselmis*, [Duff et al. \(1966\)](#) rapportent que des halos d'inhibition de la souche bactérienne marine *Corynebacterium* C-1a et des souches terrestres *Staphylococcus aureus* E et M, *Staphylococcus peoria*, et *Streptococcus fecalis* apparaissent après l'ajout de disques de diffusion chargés d'extrait chloroformique de *T. maculata* (mais également d'extrait MeOH:CHCl₃ (1:1)). De même, [Kellam & Walker \(1989\)](#) rapportent que des extraits hexanoïques de différentes espèces de *Tetraselmis*¹ et des souches CCAP 66/4 et CCAP 66/22D de *T. suecica* provoquent une inhibition de la croissance de *Staphylococcus aureus* HP B3 et/ou *Bacillus subtilis* HP B30 autour du dépôt, ce qui n'a pas été observé avec des extraits méthanoliques. Toutefois, 30 ans plus tard, [Alsenani et al. \(2020\)](#) rapportent que des extraits de *T. suecica*, *T. astigmatica* et *T. chui* n'ont aucune incidence ni sur les bactéries Gram +² ni sur les bactéries Gram –³, et ce, quelle que soit la méthode d'extraction (solvant polaire ou apolaire) ou le type de test (disque de diffusion ou méthode *spot-on-lawn*⁴) utilisés. Bien que les premières études ([Duff et al. 1966](#), [Kellam & Walker 1989](#)) laissaient entendre que des extraits apolaires de *Tetraselmis* présentent des indices de bioactivité vis-à-vis de différents pathogènes bactériens pouvant intéresser la recherche pharmaceutique, celle d'[Alsenani et al. \(2020\)](#) ne suscite au contraire que peu d'intérêt pour ces mêmes extraits. L'absence de travaux récents concernant les effets antibactériens d'extraits apolaires du genre *Tetraselmis*, et en particulier *T. suecica*, relativement aux nombreux travaux menés sur d'autres microalgues (voir [Dewi et al. 2018](#) et [Stirk & van Staden 2022](#) et les articles associés) peut être interprétée soit comme un désintéressement pour ce genre d'espèce au profit d'autres, soit comme l'impossibilité de reproduire des résultats positifs (et donc de les publier), comme c'est le cas avec *Staphylococcus aureus* et *Bacillus subtilis* dans l'étude d'[Alsenani et al. \(2020\)](#). Les extraits apolaires de *Tetraselmis* ayant principalement été testés sur des bactéries Gram +, très peu sur des bactéries Gram –, et sur aucune *Vibrio*, et nos bactéries cibles étant majoritairement composées de souches du genre *Vibrio*, il serait intéressant de refaire nos expériences en utilisant des solvants apolaires. Il convient cependant de noter que les bactéries Gram + sont généralement plus sensibles aux extraits naturels de microalgues et de plantes que les bactéries Gram –, et que les

¹ *Tetraselmis* sp. CCAP 66, *T. chui* CCAP 8/6, *T. hazeni* CCAP 66/7, *T. impelagicus* CCAP 66/32, *T. marina* CCAP 163/1B, *T. striata* CCAP 66/5 et *T. tetrathele* CCAP 66/1C

² *Listeria monocytogenes* ATCC 7644, *Staphylococcus aureus* ATCC 25925 et ATCC 9144, *Bacillus subtilis* ATCC 6633 et ATCC 6051, *Staphylococcus epidermidis*, *Enterococcus faecalis* et *Clavibacter michiganensis*

³ *Escherichia coli* ATCC 25922, *Salmonella typhoid* ATCC 14028, *Pseudomonas syringae* et *Proteus vulgaris*

⁴ Méthode similaire sans disque de diffusion avec dépôt direct sur le milieu gélosé préalablement inoculé.

extraits apolaires (hexane, éther de pétrole, acétate d'éthyle) sont généralement moins bioactifs que les extraits polaires (méthanol, dichlorométhane) ([Stirk & van Staden 2022](#)).

Le fait que la majorité des études s'accordent généralement sur une absence de composés d'intérêt antibactériens chez *Tetraselmis* ne doit pas occulter la possibilité que la méthodologie utilisée pour nos expériences n'était peut-être pas tout à fait adaptée pour révéler leur activité. En effet, les tests biologiques réalisés par [Hernández-Urcera et al. \(2024\)](#) sur des cultures bactériennes liquides dans des microplaques 96 puits ont montré que des extraits méthanoliques de *T. convolutae* pouvaient inhiber de la croissance de *Micrococcus luteus* au bout de 14h d'incubation. De même, des tests MTT¹ réalisés par [Lykov et al. \(2023\)](#) avec des extraits de *Tetraselmis (Platymonas) viridis* obtenus à partir d'eau et de DMSO ont également révélé un effet antibactérien sur des souches bactériennes, notamment résistantes, isolées sur des patients atteints de tuberculose pulmonaire, telles que *Klebsiella pneumoniae*, *Enterococcus faecalis*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus* et *Acinetobacter baumannii*. Parmi tous les tests de sensibilité aux antimicrobiens (tests de diffusion, bio-autographie, méthode de dilutions, *time-kill test*², bioluminescence de l'ATP, cytométrie en flux), les tests de diffusion qui sont simples à mettre en œuvre et peu onéreux sont largement utilisés dans la recherche de composés naturels d'intérêt chez les microalgues (pour plus de détails, voir les revues de [Balouri et al. 2016](#), [Benkova et al. 2020](#)). Cependant, toutes les méthodes (disques de papier-filtre, puits) mettant en œuvre des tests de diffusion présentent deux inconvénients majeurs : (i) les composés apolaires diffusent difficilement à travers l'agar, et (ii) les composés volatiles peuvent s'évaporer durant le test, notamment quand les disques sont préalablement chargés avant d'être déposés sur la boîte de Pétri (voir la revue de [Stirk & van Staden 2022](#)). Ces inconvénients peuvent être la source de biais aussi bien qualitatifs (catégories sensible, intermédiaire et résistant) que quantitatifs (concentration minimale inhibitrice, CMI³), puisque des faux positifs ou négatifs peuvent apparaître. Par exemple, des composés peu actifs mais qui diffusent efficacement peuvent produire de grandes "zones d'inhibition" autour du disque, et inversement ([Eloff 2019](#), [Stirk & van Staden 2022](#)). De plus, cette méthode ne permet pas de

¹ La méthode colorimétrique quantitative permet d'évaluer l'activité métabolique et la quantité de cellules vivantes. Le test MTT repose sur un sel de tétrazolium jaune qui, en présence d'enzymes mitochondriales fonctionnelles, est réduit en formazan de couleur violacée. La coloration violette obtenue est directement proportionnelle à l'activité métabolique des cellules de la culture ([Mosmann 1983](#)).

² Méthode impliquant l'ajout de l'extrait testé dans une suspension bactérienne puis son incubation. Des étalements sur boîtes et une détermination de la concentration cellulaire par comptage du nombre de CFU sur les géloses sont réalisés à plusieurs intervalles de temps d'incubation.

³ Concentration minimale inhibitrice (CMI) : « La plus faible concentration d'un antimicrobien qui inhibe la croissance visible d'un micro-organisme après une nuit d'incubation » ([Andrews 2001](#)).

distinguer les effets bactéricides d'une substance (sa faculté de tuer la cible bactérienne) de ses effets bactériostatiques (sa faculté de ralentir ou d'arrêter la croissance bactérienne) (Balouiri *et al.* 2016). Il est aujourd'hui recommandé, pour les tests antibactériens comme antifongiques, de remplacer la méthode de diffusion sur gélose par une méthode de micro-dilution en milieu liquide, plus sensible et plus reproductible bien que par ailleurs plus coûteuse et chronophage (Eloff 2007, Scorzoni *et al.* 2007, Klančnik *et al.* 2010). Par exemple, Eloff (2007) a montré que les activités antibactériennes d'extraits de plantes révélées par un test de diffusion sur gélose d'agar sont 3 à 20 fois inférieures à celles révélées par une méthode de dilution en série sur microplaques¹. À noter que ces tests sont de plus en plus souvent accompagnés par une chromatographie liquide réalisée en amont pour fragmenter les extraits et/ou par des techniques de spectrométrie de masse réalisées en aval pour mieux identifier les composés d'intérêt dans les fractions (Kiuru *et al.* 2014). Généralement, les extraits naturels sont considérés comme intéressants quand la CMI est inférieure à 0,1 g.L⁻¹ (Eloff 2019, Stirk & van Staden 2022). Même si nos tests avaient révélé une bioactivité, l'impossibilité de pouvoir déterminer une CMI fiable avec la méthodologie que nous avons utilisée aurait rendu notre expérience difficile à interpréter.

D'autres éléments peuvent influencer le résultat des tests biologiques tels que la densité cellulaire de l'inoculum bactérien déposé sur la gélose (Bidlas *et al.* 2008), ou les conditions de culture de la microalgue (Gacheva & Gigova 2014). Les cultures non axéniques de *T. suecica* et de *C. closterium* utilisées pour les tests de bioactivité et les conditions environnementales du biofilm de *C. closterium* entretenu sous serre constituaient une source de variabilité rendant délicate la comparaison de nos résultats avec ceux de la littérature. Au-delà de ces différences, il convient de souligner celles des conditions des cultures planctoniques et en biofilm ayant servi à la préparation de nos extraits. À notre connaissance, aucun bioessai n'a été réalisé à partir de biofilm de microalgues, quelle que soit l'espèce, ce qui nous prive de pouvoir comparer nos résultats avec ceux de la littérature. Notre hypothèse initiale selon laquelle les biofilms de microalgues constituent une source privilégiée de composés allélopathiques aux propriétés antibactériennes n'est donc pas vérifiée, mais elle n'est pas infirmée non plus.

Nous avons utilisé une méthode d'extraction solide-liquide, qui peut être source d'artefacts variables en fonction de la polarité et la thermolabilité des composés extraits ou en

¹ Des composés tels que le tétrazolium qui agit comme récepteur d'électrons dans la chaîne de transport d'électrons des microorganismes et qui passe d'un état incolore à un autre état insoluble coloré (formozan) lors du processus de réduction, peuvent être utilisés. Il est conseillé d'utiliser du violet de p-iodonitrotétrazolium (Eloff 2019).

fonction du niveau de toxicité, de volatilité, de polarité, de viscosité et de pureté du ou des solvants utilisés (Grosso *et al.* 2015). Lorsque, pour réduire les biais potentiels inhérents à la toxicité des solvants, nous avons resolubilisé les extraits MeOH:DCM (1:1) avec du EMQ:DMSO (1:1) ou du EMQ:MeOH (1:1), une pâte visqueuse s'est formée au fond des flacons, traduisant peut-être une mauvaise resolubilisation. Cette pâte résultait probablement de la présence de grandes quantités d'EPS apolaires ou faiblement polaires constitutifs de la matrice des biofilms de microalgues, non solubles dans l'EMQ qui est un solvant polaire. De plus, la concentration de extraits utilisés, c'est-à-dire des « surnageants » de ces extraits, n'a pas pu être estimée. Nous pensons donc *a posteriori* qu'il sera préférable pour de futures expériences d'utiliser plusieurs solvants (mais pas de mélanges) dont la toxicité a préalablement été testée sur chacune des souches cibles et de réaliser les essais biologiques avec des extraits concentrés au maximum à 10 g.L⁻¹ (Eloff 2019).

4.2. Activités anticancéreuses

Malgré la très forte hétérogénéité de nos résultats ainsi que la forte variabilité observée entre les extraits, l'ensemble des bioessais réalisés avec des extraits de *T. suecica* semblent s'accorder pour révéler que la croissance des cellules cancéreuses a été légèrement altérée et, qu'à l'inverse, celle des souches saines a été modérément améliorée (excepté pour l'extrait EMQ_1 testé sur la lignée A2058).

Des travaux menés dans le cadre de la recherche contre le cancer ont montré l'existence de bioactivités associées au genre *Tetraselmis*, et notamment *T. suecica*, avec néanmoins des résultats contrastés. Par exemple, bien que faible, une activité antiangiogénique (inhibition de la formation de nouveaux vaisseaux sanguins autour d'une tumeur) vis-à-vis de cellules d'adénocarcinome de la prostate a été associée à des extraits méthanoliques d'une souche espagnole de *T. suecica* (Rentería-Mexía *et al.* 2022). Hussein *et al.* (2020) ont, quant à eux, observé un effet cytotoxique des différents extraits aqueux, méthanolique, hexanoïque et chloroformique d'une souche malaisienne de *T. suecica* sur des souches cancéreuses du sein MCF-7, mais pas sur la souche saine Vero issue de cellules épithéliales rénales du singe vert africain *Chlorocebus*. Ces résultats corroborent nos propres tests. L'extrait chloroformique présente également une activité sur la souche cancéreuse du sein hautement tumorigène 4 T1, les principaux composés identifiés dans l'extrait étant le tétracontane, l'eicosane, l'hexatriacontane, l'acide hexanedioïque bis(2-éthylhexyl)ester, et le néophytadiène. Aucune

activité anticancéreuse n'a toutefois été observée à ce jour avec de l'eicosane ([PubChem BioAssay AID 248, 256, 328, 330, 1259407, 1259410](#)) ni le hexatriacontane ([PubChem BioAssay AID 155, 157, 161, 165, 167, 175](#)), tandis qu'à notre connaissance les autres composés n'ont pas été testés. Dans le même temps, [Parra-Riofrío et al. \(2020\)](#) ont mis en évidence une activité cytotoxique des EPS acides de *T. suecica* UMA-260920 sur diverses lignées humaines cancéreuses (lignée leucémique HL-60, d'un cancer du sein MCF-7 et d'un cancer du poumon NCI-H460) et saines (lignée de fibroblastes gingivaux HGF-1). Cette activité cytotoxique a également été identifiée, bien que moins intense, dans les EPS totaux et en condition de croissance hétérotrophe ([Parra-Riofrío et al. 2020](#)). À notre connaissance, aucune recherche n'a porté sur la composition des EPS, acides comme totaux, des biofilms de microalgues. Ces activités anticancéreuses pourraient également être attribuées à un peptide dont l'activité antibactérienne a été identifiée par [Guzmán et al. \(2019\)](#), également dans un extrait acide. Des recherches supplémentaires sur les EPS de la matrice du biofilm de *T. suecica* sont donc nécessaires pour identifier l'origine de ces bioactivités anticancéreuses.

Par ailleurs, [Sansone et al. \(2017\)](#) ont montré que des extraits eau/éthanol de *T. suecica* CCMP 906 n'exercent aucune inhibition sur les cellules d'adénocarcinome pulmonaire humain A549, excepté à de très fortes concentrations (400 µg.mL⁻¹) où une légère réduction de la viabilité cellulaire a pu être observée. Au contraire, des concentrations plus faibles favorisent la viabilité cellulaire des cellules A529. À noter que divers extraits d'autres espèces de *Tetraselmis*, obtenus avec des solvants polaires (eau, éthanol) ou modérément polaires (acétate d'éthyle), ont provoqué une amélioration ou n'ont eu aucun effet sur la viabilité de la lignée cellulaire de carcinome hépatique humain HepG2 ([Custódio et al. 2014](#), [Silva et al. 2022](#)).

Dans le cas de notre expérience, les extraits utilisés étaient polaires. En plus des activités cytotoxiques d'extraits obtenus avec des solvants apolaires comme l'hexane et le chloroforme vis-à-vis des lignées cancéreuses MCF-7 et/ou 4 T1 ([Hussein et al., 2020](#)), une diminution de la viabilité de cellules humaines de carcinome hépatique (lignée HepG2) a également été attribuée à des extraits hexanoïques de *Tetraselmis* sp. par [Custódio et al. \(2014\)](#) (à noter qu'un effet similaire a été observé sur la lignée saine S17). Il est donc possible que des composés apolaires d'intérêt aient été écartés lors de nos extractions.

La littérature consacrée¹ aux propriétés anticancéreuses de *T. suecica* fait état de résultats très différents. A l'instar des tests de diffusion, ces différences peuvent provenir des méthodes de culture, d'extraction et de bioessai. Par exemple, des variations du contenu protéique impliqué dans l'expression du facteur de croissance endothélial vasculaire, paramètre utilisé pour estimer l'activité antiangiogénique, ont été attribuées à la méthode d'extraction utilisée (solvants, extraction physique, etc.) (Rentería-Mexía *et al.* 2022). Afin de conforter nos résultats, qui sont peu significatifs, il serait nécessaire de recommencer nos expériences avec un protocole standardisé. Il est par ailleurs possible que d'autres composés cytotoxiques d'intérêt révèlent tout leur intérêt pharmaceutique s'ils bénéficient des effets synergiques d'extraits de *Tetraselmis*. Par exemple, Hussein *et al.* (2020, 2022) ont montré qu'un extrait de *T. suecica* augmente la cytotoxicité du tamoxifène ou des nanoparticules d'argent vis-à-vis des lignées cancéreuses tout en la réduisant vis-à-vis des cellules saines.

À notre connaissance, aucune activité anticancéreuse n'a été trouvée chez *C. closterium*, malgré les bioessais réalisés sur les lignées ATCC A549, ATCC A2058 et HepG2 à différentes concentrations d'extraits ou de fractions (Lauritano *et al.* 2020). Toutefois, une activité antiproliférative des cellules de mélanome humain ATCC A2058 a été attribuée à une fraction MeOH:DCM (1:9) quand celle-ci était associée à du phéophorbide a, un produit de dégradation de la chlorophylle, après photoactivation² (Saide *et al.* 2023). A l'instar de *Tetraselmis*, les extraits de *Cylindrotheca* pourraient présenter un intérêt pour la recherche contre le cancer lorsqu'ils sont utilisés en synergie avec ceux d'autres composés cytotoxiques. L'amélioration observée de la viabilité des lignées cancéreuses comme saines après l'ajout d'extraits de *C. closterium* n'encourage pas l'utilisation de cette espèce comme moyen de lutte contre le cancer. Toutefois, cette amélioration suscite un intérêt dans des domaines favorisant l'amélioration de la viabilité des cellules non-cancéreuses, qui peut déboucher sur des applications dans d'autres domaines de la santé tels que la nutraceutique ou la cosmétique.

¹ Un nombre non-négligeable d'articles portant sur cette thématique, non-cités ici, ont été publiés dans des revues dites « prédatrices ».

² Ce procédé est utilisé lors de la thérapie photodynamique employée contre certains cancers. Elle permet l'activation d'un agent photosensibilisant, ici le phéophorbide a, qui catalyse la production d'espèces réactives de l'oxygène (ROS) en cas d'exposition à une lumière de longueur spécifique. Cette production de ROS induit une cytotoxicité dans les cellules cancéreuses qui ont assimilé l'agent photosensibilisant (Lee *et al.* 2004).

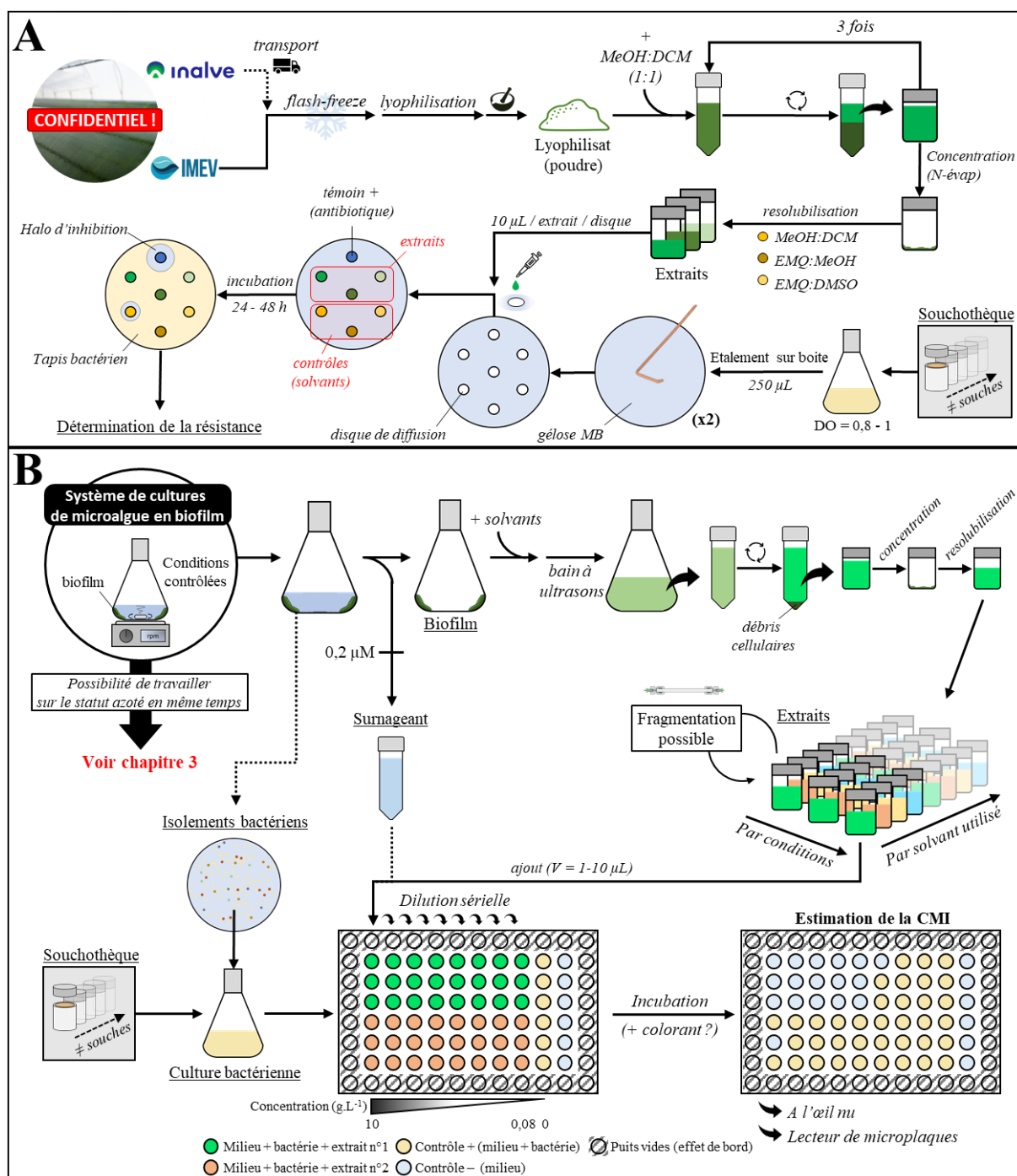
5. Conclusion & perspectives

Bien que nos expériences ne nous aient pas permis de clairement mettre en évidence des activités antibactériennes propres à *T. suecica* et *C. closterium*, il nous est pour autant difficile de conclure sur une réelle absence de bioactivité chez ces espèces. Afin de trancher, il sera nécessaire de réaliser des bioessais standardisés sur des cibles bactériennes variées mais mieux connues, en utilisant une méthode de microdilution en milieu liquide couplée à plusieurs extractions et fractions, telles qu'un fractionnement contrôlé comme proposé par [Cutignano et al. \(2015\)](#). Il serait aussi préférable d'utiliser des biofilms de microalgues de plus petites tailles mais contrôlés au laboratoire, un environnement qui permet à la fois de diversifier les conditions de croissance tout en les maîtrisant mieux (**Figure 42**). Les extraits et fractions de ces microalgues pourraient également être testés sur d'autres lignées cancéreuses afin de confirmer les faibles indices d'activité que nous avons pu déceler. Une autre voie de recherche, qui n'a été considérée que récemment, mais qui mérite d'être privilégiée dans le cadre des travaux menés pour lutter contre le cancer, est l'étude de l'action des extraits de ces microalgues en synergie avec d'autres composés. Finalement, les futures expérimentations devront également mieux prendre en compte les défis inhérents à la recherche phytopharmacologique, tels qu'énumérés par [Heinrich et al. \(2020\)](#)¹.

Initialement, le projet *Photobiofilm Explorer* avait, parmi ses objectifs, celui de découvrir des composés d'intérêt dans les biofilms de microalgues et de mieux comprendre les interactions microalgues-bactéries. En plus des cibles bactériennes choisies en raison de leur intérêt dans les domaines de la pharmaceutique et de l'aquaculture, il avait également été envisagé de tester la bioactivité d'extraits de *T. suecica* sur des bactéries isolées du biofilm, dans le but d'identifier des interactions allélopathiques entre ces microorganismes. L'isolement et l'identification de ces bactéries est, au moment de la rédaction de ce manuscrit, en cours de réalisation par le laboratoire MARBEC, partenaire du projet. Une meilleure compréhension de la structure et du fonctionnement des biofilms de microalgues est toutefois nécessaire,

¹ On y trouve : (i) l'adéquation des modèles utilisés, en tant qu'extraits et cibles, pour comprendre et prédire l'effet recherché et/ou observé, (ii) la description biologique complète du matériel de départ ainsi qu'une caractérisation précise de l'extrait utilisé, (iii) une meilleure prise en compte de la littérature scientifique, afin de mieux préciser les tests et l'intérêt des modèles utilisés, (iv) une prévision des résultats, certains composés pouvant être jugés biologiquement non pertinents sans tests auxiliaires, (v) la prise en compte du fait que la présence de composés actifs ne se traduit pas forcément en bénéfices thérapeutiques, (vi) une meilleure prise en compte de la pertinence pharmacologique et physiologique lors de la mise en place du bioessai, au-delà de la simple recherche d'une significativité statistique.

parallèlement aux bioessais. Des efforts sont à fournir pour identifier les EPS bioactifs trouvés par [Parra-Riofrío et al. \(2020\)](#) chez *T. suecica*, correspondants ou non au peptide bioactif identifié par [Guzmán et al. \(2019\)](#), ainsi que leur répartition entre cultures planctoniques et biofilms. De même, la caractérisation de la phycosphère et des propriétés spécifiques à la matrice d'EPS des biofilms de microalgues peut donner des pistes de réponse sur la forte résistance et résilience de ces biofilms. Des efforts sont encore à fournir dans cette voie de recherche.



CHAPITRE III

ETUDE DE L'EFFET D'UNE LIMITATION EN AZOTE SUR LE METABOLOME DE BIOFILMS DE *TETRASELMIS SUECICA*

*"Toutes les méthodologies ont leurs limites, et la seule « règle » qui survit,
c'est « tout est bon »"*

Paul Feyerabend

Contre la méthode, Esquisse d'une théorie anarchiste de la connaissance

1. Introduction

Les objectifs initiaux de ma thèse étaient : **(1)** d'identifier des activités antibactériennes dans les biofilms de *Tetraselmis suecica*, **(2)** de mesurer les effets de la source et la concentration d'azote (N) sur ces bioactivités, et **(3)** d'identifier et de caractériser la ou les potentielles molécules impliquées dans ces bioactivités. Aucune activité antibactérienne n'ayant pu être détectée à partir d'extraits de biofilm de *T. suecica* (voir **Chapitre II**), nous avons choisi d'orienter la suite de mes recherches vers l'étude du métabolome de biofilms de *T. suecica* produits sous différentes conditions azotées.

L'N est un élément nutritif majeur de la composition des diverses familles de molécules des micro-organismes (protéines, ADN, pigments, *etc...*). Ses effets sur la croissance et le métabolome des microalgues sont généralement étudiés au laboratoire sous 3 volets : (i) l'effet des différentes sources d'N, qu'elles soient inorganiques comme le nitrate (NO_3^-) et l'ammonium (NH_4^+) ou organiques comme l'urée et les acides aminés (AAs) (par exemple [Dai et al. 2009](#) ou [Chen et al. 2019](#)), (ii) l'effet de la concentration d'N dans le milieu pouvant placer les microalgues dans un état de satiété, ou au contraire de limitation, voire de carence, et ce, dans des régimes stables ou fluctuants ([Chia et al. 2016](#)), et (iii) l'effet des rapports entre éléments nutritifs, principalement le rapport N:P ([Uronen et al. 2005](#)). Les études peuvent porter sur les paramètres de croissance des microalgues (par exemple [Martin-Jézéquel et al. 2015](#)), la production de composés d'intérêts ([Zhu et al. 2014](#)), le fonctionnement des voies métaboliques ([Wu et al. 2015](#)), *etc.* La limitation par l'N a généralement comme conséquence une réorientation du métabolisme associé à la synthèse des protéines vers celles des glucides et/ou des lipides ([de Carvalho Silvello et al. 2022](#)). Actuellement, les études portant sur l'influence de l'N sur les biofilms de microalgues sont majoritairement conduites dans le cadre du traitement des eaux usées (par exemple [Posadas et al. 2013](#), [Zhu et al. 2018](#), [González et al. 2020](#), [Li et al. 2024](#), [Sun et al. 2024](#)), et celles s'intéressant à l'influence de l'N sur métabolisme des biofilms phototrophes en laboratoire sont, à notre connaissance, plus rares ([Domozych 2007](#), [Cheng et al. 2013, 2014](#), [Schnurr et al. 2013](#), [Morgado et al. 2024](#)).

Les biofilms sont des communautés microbiennes inféodées à une matrice de substances polymériques extracellulaires (*Extracellular Polymeric Substances*, EPS) autoproduites et adhérentes à une surface humide ([Flemming & Wingender 2010](#)). Ce sont donc des modèles biologiques de choix qui, en raison de leur diversité biologique et de la possibilité de les contrôler en laboratoire, et malgré leur complexité, permettent d'aborder l'étude des

interactions médiées chimiquement. Leur développement dépend de diverses variables environnementales. Par exemple, la concentration de certains nutriments peut affecter la structure tridimensionnelle et le métabolome des biofilm bactériens (Cherifi *et al.* 2017, Carriot *et al.* 2022). En comparaison avec les biofilms bactériens, les études conduites sur les biofilms phototrophes, et par extension sur leur production de composés d'intérêt, sont peu nombreuses. Concernant les effets de l'N, divers travaux ont montré que la production d'EPS ou d'autres molécules d'intérêt sont sensibles à la source et la concentration d'N dans le milieu (Domozych 2007, Cheng *et al.* 2013, 2014, Schnurr *et al.* 2013, Morgado *et al.* 2024). Vohra *et al.* (2024) ont récemment plaidé pour une utilisation plus importante des techniques omiques qui ouvrent la voie à une étude plus approfondie du fonctionnement des biofilms.

Les techniques à haut débit, dites « omiques », sont des outils récents en biologie et de plus en plus accessibles (Manzoni *et al.* 2016). A l'inverse de l'approche réductionniste, les techniques omiques cherchent à étudier le vivant par une approche plus holistique. On retrouve parmi ces techniques la génomique, la transcriptomique, la protéomique et la métabolomique, ainsi que des variantes (métagénomique, épigénomique, lipidomique, *etc.*) (Manzoni *et al.* 2016). La métabolomique désigne l'étude du métabolome, c'est-à-dire l'ensemble des métabolites produits par l'activité cellulaire. Ces molécules, généralement d'un poids moléculaire modeste (≤ 1500 Dalton), peuvent être étudiées par chromatographie couplée à une spectrométrie de masse (Reverter *et al.* 2020, Chakdar *et al.* 2021). Le métabolome comprend : l'endométabolome, qui comporte l'ensemble des métabolites intracellulaires, et l'exométabolome, qui décrit les métabolites excrétés ou déjà présents dans le milieu extérieur (Kuhlish & Pohnert 2015). Ainsi, suivant l'hypothèse à vérifier, l'étude portera sur l'endométabolome, l'exométabolome ou le métabolome dans son ensemble. Par exemple, l'examen de l'exométabolome sera privilégiée dans le cadre d'une étude en écologie chimique afin d'identifier des médiateurs chimiques (Kuhlish & Pohnert 2015).

Afin de conduire une analyse consistante de l'influence d'un facteur déterminé sur le métabolome d'une microalgue, un certain nombre de critères expérimentaux doivent être respectés : le système de culture doit permettre (i) de contrôler et de mesurer le facteur en question tout en maintenant les autres constants ou « égaux par ailleurs » (ii) de mesurer avec précision la variable microalgue, et (iii) une extraction appropriée des métabolites, c'est-à-dire rapide et non polluée. Les caractéristiques des biofilms phototrophes (influence de l'épaisseur sur la photosynthèse, diversité des microorganismes présents, *etc.*) rendent le critère (i) difficile à respecter, en tout cas plus difficile que dans le cas des cultures planctoniques. Les critères (ii)

et (iii) sont également difficiles à respecter car la mesure de la concentration cellulaire d'un biofilm nécessite un prélèvement intrusif qui en détruit une partie, ce qui peut faire varier son métabolome. En outre, cette estimation peut être biaisée si le biofilm est hétérogène sur la surface qu'il occupe. Enfin, les cultures de biofilms présentent deux types d'exométabolome, celui qui est présent de la matrice d'EPS et celui qui est dans le surnageant. De plus, les cellules étant étroitement associées à la matrice d'EPS, il est impossible de séparer l'endo- d'une partie de l'exométabolome (risque de rupture des cellules, techniques de séparation longue et fastidieuse à mettre en place, risque de dénaturation des métabolites).

La chlorophyte *T. suecica* est une microalgue utilisée de façon industrielle, principalement pour la production de denrées alimentaires destinées à l'aquaculture (Muller-Feuga *et al.* 2003) et de biocarburants (Montero *et al.* 2011). Des propriétés bioactives sont rapportées chez *T. suecica*, que ce soit des activités antibactériennes (Kellam & Walker 1989, Austin & Day 1990, Austin *et al.* 1992, Guzmán *et al.* 2019, Hussein *et al.* 2020), antioxydantes (Lee *et al.* 2009, Norzagaray-Valenzuela *et al.* 2017, Haoujar *et al.* 2019), antitumorales (Custódio *et al.* 2014, Sansone *et al.* 2017, Hussein *et al.* 2020a, Parra-Riofrío *et al.* 2020, Rentería-Mexía *et al.* 2022) et antifongiques (Kellam *et al.* 1988) (pour plus de détails, voir **Chapitre II**). Toutefois, seul un peptide bioactif a pu être identifié et caractérisé malgré le nombre de bioactivités recensées chez cette microalgue (Guzmán *et al.* 2019). *T. suecica* présente un grand intérêt pour la production de biocarburant. En effet, une limitation en N favorise grandement l'accumulation de carbohydrates dans les cellules, notamment l'amidon (D'Souza & Kelly 2000, Rodolfi *et al.* 2009, Kermanshahi-pour *et al.* 2014), lequel peut être utilisé pour une production de bioéthanol (Lam & Lee 2015, Lakatos *et al.* 2019). D'autres facteurs peuvent améliorer cette production, tels que la salinité (Yao *et al.* 2013a), le phosphate (Rodolfi *et al.* 2009, Bondioli *et al.* 2012, Dammak *et al.* 2017), les métaux et les vitamines (Dammak *et al.* 2017). L'étude du transcriptome de *T. suecica* a montré qu'une limitation par l'N a pour effets de réduire le taux de dégradation des sucres ainsi que celles des polycétides synthases et lipoxygénases impliqués dans la biosynthèse de métabolites secondaires aux propriétés bioactives (Lauritano *et al.* 2019).

Dans ce chapitre, nous présentons les résultats d'une analyse métabolomique conduite sur des biofilms de la microalgue *Tetraselmis suecica* AC254 limitée ou non par l'N. Cette étude a nécessité la mise en place d'un système de culture de biofilm adapté aux critères requis par cette analyse, lequel système a été validé par de nombreuses expériences préliminaires.

2. Matériel et méthodes

2.1. Souche utilisée

La souche de *Tetraselmis suecica* AC254 (Algobank Caen, Université de Caen Normandie), fournie par la startup INALVE, a été maintenue par repiquages successifs de cultures placées dans un incubateur réfrigéré à éléments Peltier (IPP260, MEMMERT), à une température de 20°C et une intensité lumineuse continue de 56 $\mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$. Le milieu de culture était constitué d'eau de mer prélevée en subsurface dans la rade de Villefranche-sur-Mer, vieillie pour être débarrassée des éléments nutritifs résiduels, filtrée sur 1 puis 0,22 μM (Cartouches de filtration Milligard, MILLIPORE) à l'aide d'une pompe (Masterflex L/S modèle 7518-10) avant d'être autoclavée puis enrichie stérilement avec du milieu f/2 (Guillard & Ryther 1962, Guillard 1975) sans silicate. L'ensemble des milieux de culture utilisés au cours de cette expérience sont dans le **Tableau 3**.

Tableau 3 : Composition et concentrations molaires (en M) en éléments nutritifs des différentes variantes du milieu f/2 (Guillard & Ryther 1962, Guillard 1975) utilisés au cours de l'expérience.

Composants	Formules moléculaires	Concentration molaire (M) des éléments des différents milieux de culture utilisés				
		f/2	f/4'	2f	f/2 ^{BS}	f/4*
Nitrate (de sodium)	NaNO ₃	8,82.10 ⁻⁴	4,41.10 ⁻⁴	3,53.10 ⁻³	8,82.10 ⁻⁴	4,41.10 ⁻⁴
Phosphate (monosodique)	NaH ₂ PO ₄ • H ₂ O	3,62.10 ⁻⁵	3,62.10 ⁻⁵	2,90.10 ⁻⁴	7,24.10 ⁻⁵	7,24.10 ⁻⁵
Solution de métaux traces	FeCl ₃ • 6 H ₂ O	1,17.10 ⁻⁵	1,17.10 ⁻⁵	1,17.10 ⁻⁵	1,17.10 ⁻⁵	1,17.10 ⁻⁵
	Na ₂ EDTA • 2 H ₂ O	1,17.10 ⁻⁵	1,17.10 ⁻⁵	1,17.10 ⁻⁵	1,17.10 ⁻⁵	1,17.10 ⁻⁵
	MnCl ₂ • 4 H ₂ O	9,10.10 ⁻⁷	9,10.10 ⁻⁷	9,10.10 ⁻⁷	9,10.10 ⁻⁷	9,10.10 ⁻⁷
	ZnSO ₄ • 7 H ₂ O	7,65.10 ⁻⁸	7,65.10 ⁻⁸	7,65.10 ⁻⁸	7,65.10 ⁻⁸	7,65.10 ⁻⁸
	CaCl ₂ • 6 H ₂ O	4,20.10 ⁻⁸	4,20.10 ⁻⁸	4,20.10 ⁻⁸	4,20.10 ⁻⁸	4,20.10 ⁻⁸
	CuSO ₄ • 5 H ₂ O	3,93.10 ⁻⁸	3,93.10 ⁻⁸	3,93.10 ⁻⁸	3,93.10 ⁻⁸	3,93.10 ⁻⁸
	Na ₂ MoO ₄ • 2 H ₂ O	2,60.10 ⁻⁸	2,60.10 ⁻⁸	2,60.10 ⁻⁸	2,60.10 ⁻⁸	2,60.10 ⁻⁸
Solution de vitamines	Thiamine • HCl (B ₁)	2,96.10 ⁻⁷	2,96.10 ⁻⁷	2,96.10 ⁻⁷	2,96.10 ⁻⁷	2,96.10 ⁻⁷
	Biotine (H)	2,05.10 ⁻⁹	2,05.10 ⁻⁹	2,05.10 ⁻⁹	2,05.10 ⁻⁹	2,05.10 ⁻⁹
	Cyanocobalamine (B ₁₂)	3,69.10 ⁻¹⁰	3,69.10 ⁻¹⁰	3,69.10 ⁻¹⁰	3,69.10 ⁻¹⁰	3,69.10 ⁻¹⁰
Tampon	HEPES	0	0	0	6,25.10 ⁻³	0
Bicarbonate de sodium	NaHCO ₃	0	0	0	1,0.10 ⁻²	0

2.2. Conception du système de culture de biofilm en erlenmeyer

Afin d'étudier les effets du statut azoté sur le métabolome de *T. suecica*, nous avons dû concevoir et réaliser un nouveau système de culture qui remplisse les conditions nécessaires à ce type d'expérience. Nous présentons ici le système que nous avons cherché à optimiser pour

l'étude métabolomique de biofilms de *T. suecica* composés de cellules limitées ou non en N. Nous avons choisi le NO_3^- comme élément azoté limitant.

2.2.1. Systèmes de culture imaginés

Le système de culture de biofilm de microalgues adapté à notre étude métabolomique dans des conditions contrôlées en laboratoire doit satisfaire huit conditions : (1) absence de contaminations biologiques et chimiques, (2) contrôle du statut azoté des microalgues, (3) contrôle et stabilité des autres conditions de croissance (température, lumière, nutriments), (4) un nombre suffisant de répliques (au minimum cinq par condition expérimentale), (5) un volume de culture pas trop important, (6) une récolte des biofilms aisée, rapide et peu destructive, et (7) une bonne reproductibilité. Quatre systèmes de culture de biofilm ont été envisagés ou testés (voir **Figure 43**) : des photobioréacteurs (PBRs) verticaux, rotatifs et plats et une culture en erlenmeyer (voir **Tableau 4**).

Les PBRs verticaux, plats et rotatifs existant au LOV ne respectaient pas ou peu les conditions précédentes (voir **Tableau 4**). En particulier, le fait d'être des systèmes ouverts ainsi que leur mise en œuvre difficile (nombres limités de répliques, grand volume de culture, tailles imposantes, besoin d'un tissu pour support du biofilm) ont été jugées rédhibitoires. À l'inverse, la technique de culture de biofilms en erlenmeyers, bien que peu testée auparavant, offrait l'avantage de la simplicité et respectait les conditions citées précédemment, avec cependant une méconnaissance du niveau de reproductibilité.

Tableau 4 : Conditions nécessaires à la réalisation d'une étude métabolomique dans des conditions contrôlées en laboratoire. La couleur des cases indique le niveau de validité du système de culture : respecte la condition (**vert**), respecte partiellement la condition (**orange**), et ne respecte pas la condition (**rouge**). Les cases non-colorées correspondent à un manque d'information sur la condition.

Conditions		Systèmes de culture envisagés			
		PBRs verticaux	PBRs plats	PBRs rotatifs	Erlenmeyers
1	Risque de contaminations biologiques/chimiques	Fort	Fort	Fort	Faible
2	Contrôle du statut azoté	Difficile	Difficile	Moyen	Facile
3	Contrôle et stabilité des variables non-azotées	Difficile	Difficile	Difficile	Facile
4	Nombre de répliques	Faible	Moyen	Moyen	Grand
5	Volume nécessaire	Grand	Grand	Intermédiaire	Faible
6	Difficulté de la récolte	Difficile	Facile	Intermédiaire	Facile
7	Reproductibilité	Inconnu	Inconnu	Moyenne	Inconnu
8	Disponibilité du système	Disponible	Disponible	Indisponible	Disponible

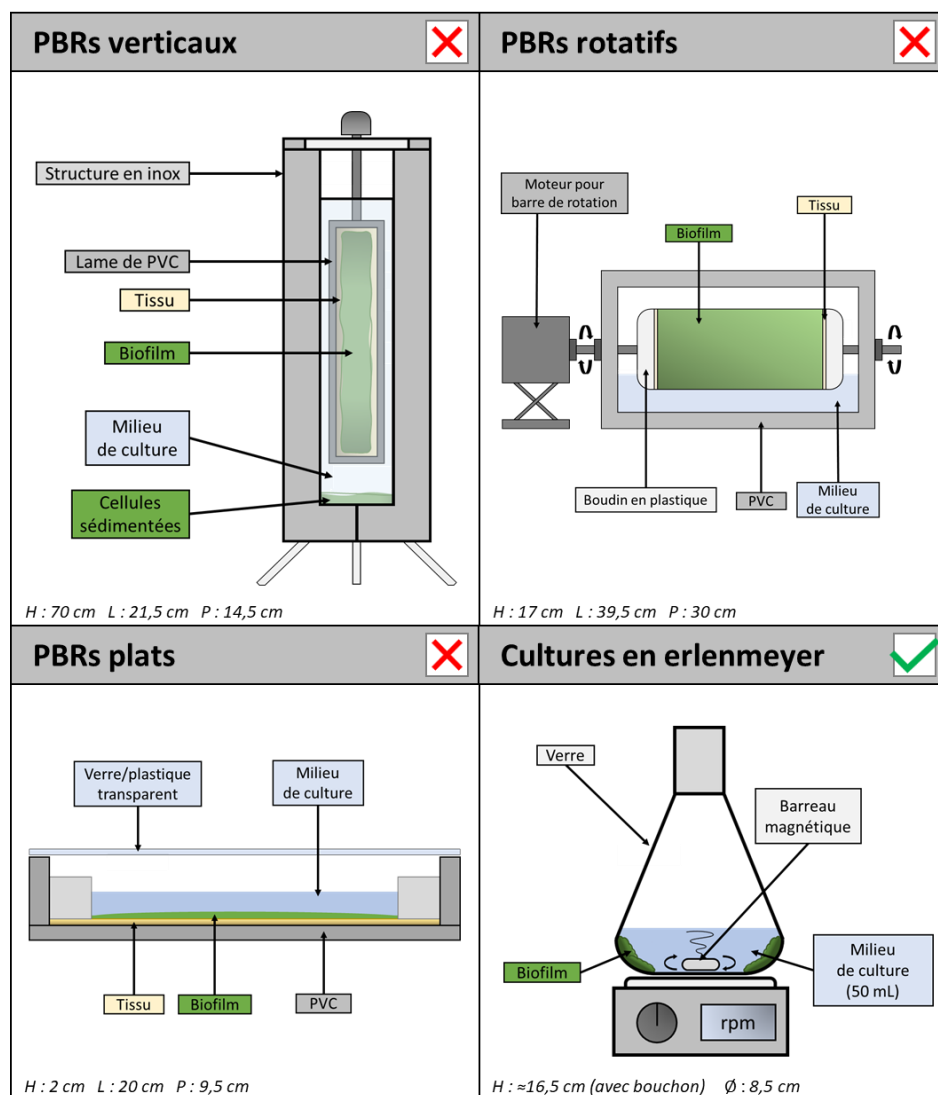


Figure 43 : Représentation schématique des différents systèmes de culture envisagés pour une étude métabolomique en conditions contrôlées de laboratoire. Le système de culture de biofilm en erlenmeyers (en bas à droite) a été sélectionné pour l'étude métabolomique.

Plusieurs dispositifs d'incubation ont ensuite été envisagés pour le contrôle des conditions de croissance : (i) une chambre d'incubation (MLR-351, SANYO), (ii) des erlenmeyers thermorégulés à double-paroi (créés sur mesure), et (iii) une enceinte thermorégulée (**Figure 44**). La chambre d'incubation a finalement été choisie car elle offrait un espace suffisant pour de multiples répliques ainsi qu'une thermorégulation et une source de lumière modulable déjà intégrées. Chaque erlenmeyer, en verre borosilicaté, conique à col étroit, d'un volume de 250 mL (ISO 1773, H: 135 mm, Ø: 34-79 mm, ref. FB33171, Fisherbrand™), fermé à l'aide d'un bouchon stérile en silicone (Silicosen® T-type, H: 60 mm, Ø: 32 mm, ref. 8905532, Schott Hirschmann) et muni d'un barreau magnétique lisse en PTFE avec un anneau central (L : 25 mm, Ø : 6 mm, ref. 442-4505, VWR Collection), était posé sur un agitateur magnétique rotatif

réglable (*colour squid white*, ref. 0003671000, IKA®). Au total, vingt-quatre agitateurs ont pu être distribués sur les quatre niveaux de la chambre d'incubation, équidistants sur la verticale. Chaque niveau comportait donc deux rangées de trois plateaux d'agitation.

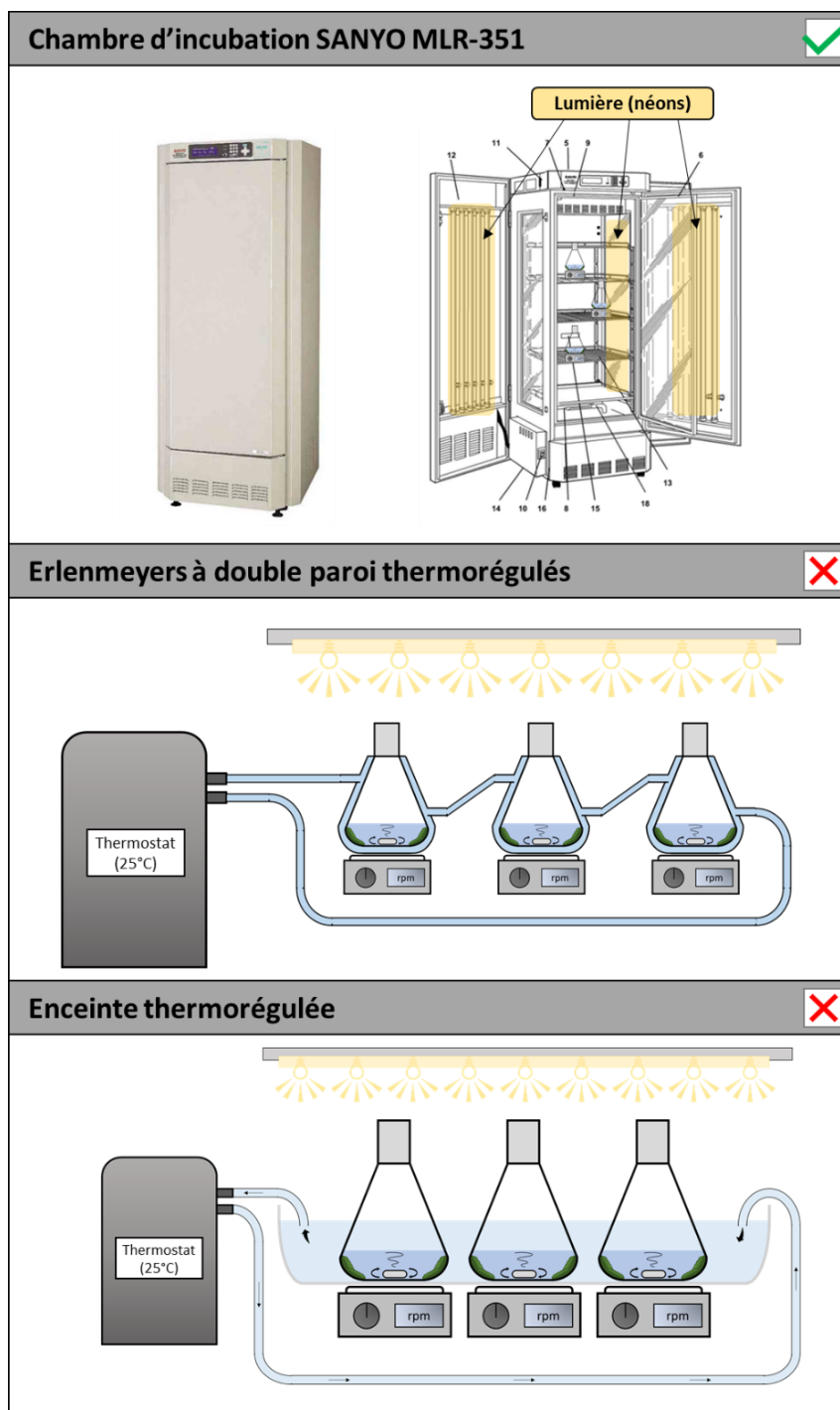


Figure 44 : Représentation schématique des différents dispositifs d'incubation de cultures de biofilm de microalgues en erlenmeyers qui ont été à l'étude. La chambre d'incubation (MLR-351, SANYO) comprend 4 étages matérialisés par des grilles espacées de manière équidistante, un système intégré de thermorégulation ainsi qu'une source lumineuse composée de 3 rangées de 5 néons (sur les côtés et sur la porte). Chaque étage peut recevoir 9 agitateurs magnétiques rotatifs. Les deux autres dispositifs sont équipés d'une dalle à LED comme source lumineuse. Leur régulation thermique (individuel avec des erlenmeyers à double-paroi ou commune avec une baignoire) est assurée par une circulation d'eau thermostatée. C'est finalement le SANYO qui a été retenu.

2.2.2. Optimisation du système de culture

Les paramètres de la chambre ont été réglés pour correspondre aux conditions optimales de croissance de *T. suecica*, c'est-à dire une intensité lumineuse relativement élevée (Montes-González *et al.* 2021) et une température autour de 25°C (Weiss *et al.* 1985, Sas *et al.* 2021). Les nombreuses expériences conduites pour optimiser le dispositif et les conditions de croissance de *T. suecica* ne sont pas présentées ici, seules le sont les différentes conditions de croissance finalement retenues (lumière, température, agitation, milieu de culture et bullage). La recherche de conditions expérimentales optimales a été réalisée avec des cultures planctoniques en *batch* qui sont plus faciles à mettre en œuvre que les cultures en biofilms, mais surtout dont l'échantillonnage n'est pas destructif, sur des durées de 6 à 10 jours en fonction du volume initial de la culture et du facteur à tester.

Lumière

Les spectres d'émission des néons du SANYO (Lumilux Cool white, L 36W/940, 120 cm, OSRAM), d'une dalle d'éclairage à LED (40W, 300×1200×9 mm, ref. LEDDAL40BNLGP, VISIOLed) fréquemment utilisée au LOV pour la culture de microalgues et des sources lumineuses de l'incubateur MEMMERT ont été obtenus à l'aide d'un radiomètre muni d'une fibre optique (USB4000 *Fiber Optic Spectrometer*, Ocean Optics). Le spectre d'absorption de *T. suecica* dans le visible a été obtenu à l'aide d'un spectrophotomètre (Perkin Elmer, US/VIS, Lambda 2) équipé d'une sphère d'intégration. Le rapport PUR/PAR (*Photosynthetically Usable Radiation / Photosynthetically Active Radiation*) (Combe 2016), qui correspond à la proportion du spectre radiatif absorbée par les pigments, est de 0,26 pour les néons du SANYO, 0,29 pour la dalle d'éclairage à LED, et 0,31 pour la lumière blanche du MEMMERT (**Annexe 3**). Ces différences ont été considérées comme négligeables au regard de l'efficacité photosynthétique, ce qui est conforté par le fait qu'aucune différence significative de la production de microalgues n'a été mise en évidence entre les néons du SANYO et la dalle d'éclairage à LED (**Figure 46A,B**). Les néons déjà installés dans le SANYO ont donc été utilisés. Par ailleurs, malgré l'hétérogénéité du champ lumineux dans cet incubateur, un éclairement de $\sim 540 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ (photomètre UML-500 *Universal Light Meter & Data Logger*, WALZ) mesurée au centre des 24 erlenmeyers remplis d'eau de mer filtrée (capsule de filtration Sartobran® 300, 0,2 μm , Sartorius) (EdMr) a néanmoins pu être obtenu en n'allumant que 10 néons sur 15 et en ajustant manuellement l'emplacement exact de chaque agitateur (**Figure 47A,B**).

Température

La température moyenne à l'intérieur du SANYO MLR-351 a été réglée à ~25°C, avec un léger gradient du bas (23,8°C) vers le haut (26,3°C) (**Figure 47B**), causé par une convection inhérente à l'utilisation simultanée de plusieurs néons, gradient qui ne semble cependant pas avoir engendré de différences significatives de la concentration cellulaire et du biovolume mesurés dans les cultures tests (**Figure 48C,F**).

Agitation

Elle a été fixée à 600 rpm pour homogénéiser les cultures planctoniques. Il est apparu qu'une agitation était également nécessaire pour permettre la formation des biofilms, car elle favorisait l'adhésion des cellules de *T. suecica* sur la paroi en verre des erlenmeyers. La nécessité d'une contrainte de cisaillement favorisant la formation d'un biofilm a été précédemment observée chez les bactéries (Stoodley *et al.* 1998, Beyenal & Lewandowski 2002, Moreira *et al.* 2022, Tsagkari *et al.* 2022) et la microalgue *Chlorella vulgaris* (Fanesi *et al.* 2021). Nos essais ont permis de montrer qu'une vitesse de 250 rpm permettait l'attachement des cellules tout en restant suffisamment modérée pour ne pas détacher le biofilm une fois celui-ci formé.

Comptage cellulaire et taux de croissance

Entre 1 et 10 ml de culture planctonique (suivant la concentration cellulaire) sont prélevés quotidiennement grâce à une seringue connectée à une canule (microtube PFTE, ID: 1,32 mm, OD: 1,93 mm, Adtech Polymer Engineering) passée à travers le bouchon. Après dilution avec de l'EdM_f, 1 mL d'HCl à 10% (v/v) (acide chlorhydrique, 37 %, extra pur, d=1,18, SLR, ref. 10000180, Fisher Chemical) dilué dans de l'eau ultrapure Milli-Q (Cartouche de purification SynergyPak®, ref. SYPK0SIA1, Merck ; EMQ) a été ajouté pour un volume final de 50 mL, pour déliter d'éventuels agrégats cellulaires. Les échantillons sont analysés par les compteurs à particules PAMAS (OLS403, PAMAS Partikelmess- und Analysesysteme GmbH) ou HIAC (Royco, modèle 9703, Pacific Scientific), selon disponibilité. Ces deux granulomètres, qui mesurent la section efficace de chaque particule comptée, fournissent la distribution en taille de la population (voir **Figure 45**) ainsi que sa concentration (cell.L⁻¹) dans une gamme de taille déterminée, données qui permettent de calculer son diamètre moyen (µm) et son biovolume (somme des volumes cellulaires, µm³.L⁻¹).

Ainsi, concentration et biovolume sont deux descripteurs différents de la même population, le premier décrivant la dynamique de multiplication cellulaire, le second prenant en outre la croissance somatique des cellules. Il convient donc de souligner que le taux de croissance μ (jour^{-1}) de chacun de ces descripteurs, calculé à l'aide de la formule $\mu = \ln(N_2/N_1)/(t_2 - t_1)$ où N_x est la concentration cellulaire ou le biovolume au temps t_x lors de la phase exponentielle de croissance, peut être différent si le diamètre moyen de la population varie. A noter également que ces compteurs optiques mesurent toutes les particules au sein d'une gamme de taille donnée, sans distinction des particules vivantes ou détritiques. Le mode d'échantillonnage et le comptage cellulaire des biofilms est présenté plus loin (voir **chapitre 3, partie 2.2.3**).

Milieu de culture, bullage et source de carbone inorganique

En dépit des concentrations relativement élevées de carbone inorganique naturellement présent dans l'eau de mer, le milieu de culture devait en être enrichi afin de prévenir toute limitation par cet élément de la croissance de cultures denses. Une variante du milieu f/2 supplémenté avec $6,25 \cdot 10^{-3} \mu\text{M}$ de bicarbonate de sodium (NaHCO_3), utilisé comme source de carbone pour permettre l'économie d'un système de bullage, et du tampon HEPES puis stabilisé à pH 8,10-8,20 avec de la soude (NaOH) (milieu f/2^{BS}) a été testée. Malheureusement, en plus du fait que cet élément perturbait le dosage photométrique des NO_3^- (Collos *et al.* 1999), il ne permettait pas d'obtenir des taux de croissance comparables à ceux précédemment mesurés au laboratoire pour *T. suecica*. Des cultures planctoniques en *batch* ont donc été réalisées pour tester différentes hypothèses pouvant expliquer cette déficience : (i) *T. suecica* n'est pas capable d'assimiler le NaHCO_3 , (ii) le pH est trop élevé pour permettre l'assimilation du NaHCO_3 , (iii) la concentration élevée de NaHCO_3 inhibe la croissance, (iv) les solutions stocks de nutriments ne sont pas optimales, et (v) le spectre lumineux des néons ne convient pas à *T. suecica*. La **Figure 46** montre que le seul moyen d'obtenir la production attendue de *T. suecica* est de buller les cultures avec de l'air, ce qui suggère qu'une culture dense *T. suecica*, si elle ne peut pas utiliser le NaHCO_3 comme source de carbone inorganique, peut se satisfaire du CO_2 de l'air bullé qui se dissout dans l'eau.

Un système de bullage d'air filtré (Midisart® 2000, PTFE, 0,2 μm , 64 mm, 17805-----UPN, Sartorius) a donc finalement été mis en place (**Figure 47A**). Chaque culture est alimentée par des tuyaux en silicone transparent de diamètre décroissant (ISO 1183-1A, Labbox) mais de longueurs égales. Une étape d'humidification de l'air a été rajoutée afin d'éviter l'évaporation

du milieu de culture observée au cours de l'optimisation du dispositif de culture (voir **chapitre 3, partie 2.2.3**). Avant chaque expérience, la totalité du circuit d'air est stérilisé avec de l'éthanol. Le risque de formation de bouchons de condensation dans les tuyaux a été réduit par une surveillance visuelle régulière. Enfin des tests ont permis de démontrer qu'un bullage dans le ciel de la culture était aussi efficace pour la croissance qu'un bullage dans la culture elle-même (pour plus de détails, voir **Annexe 4**). C'est donc ce premier mode qui a été utilisé pour la culture des biofilms dont le développement pouvait localement être entravé par les bulles sortant de la canule.

La **Figure 47** récapitule l'ensemble des optimisations du système de culture.

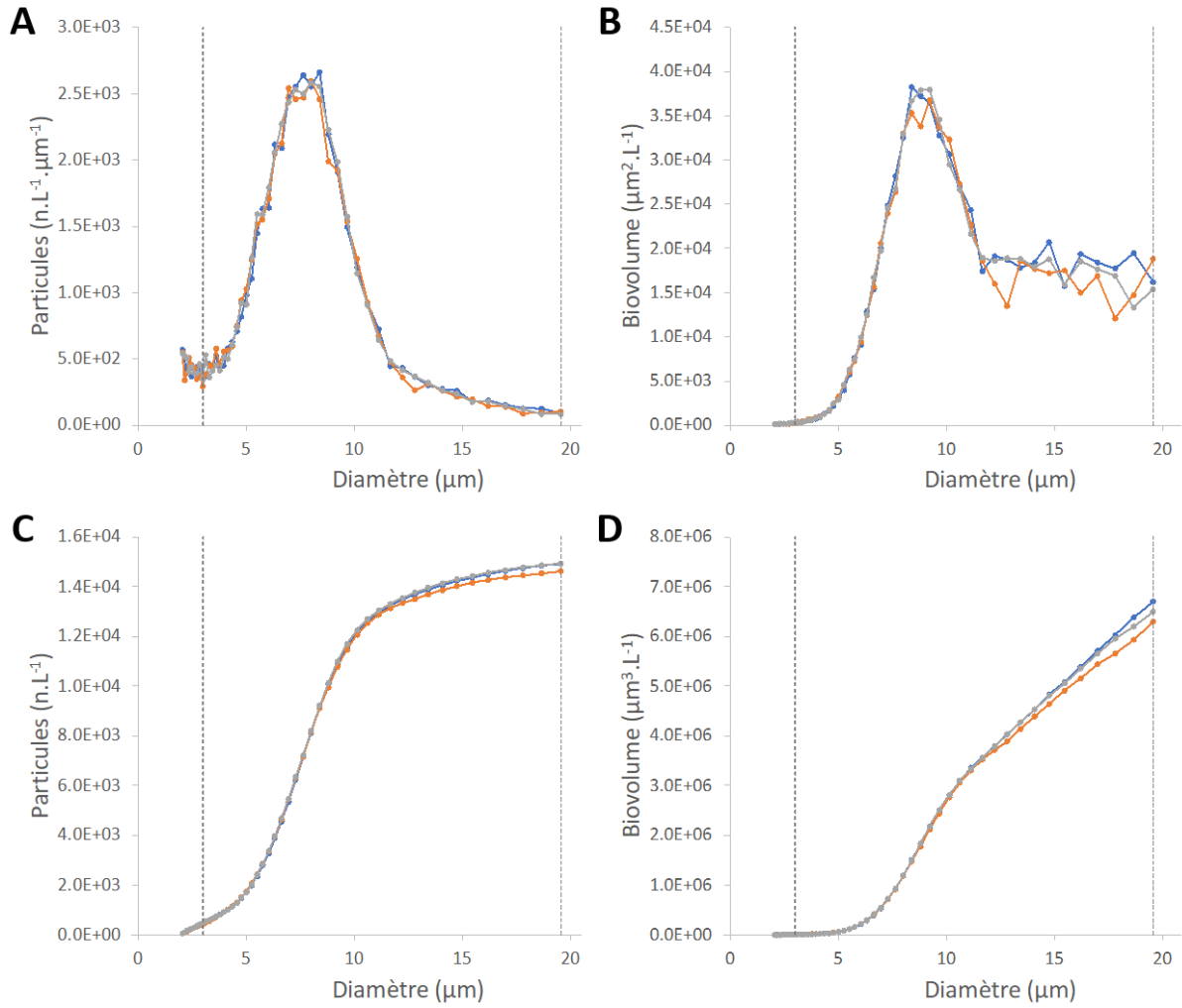
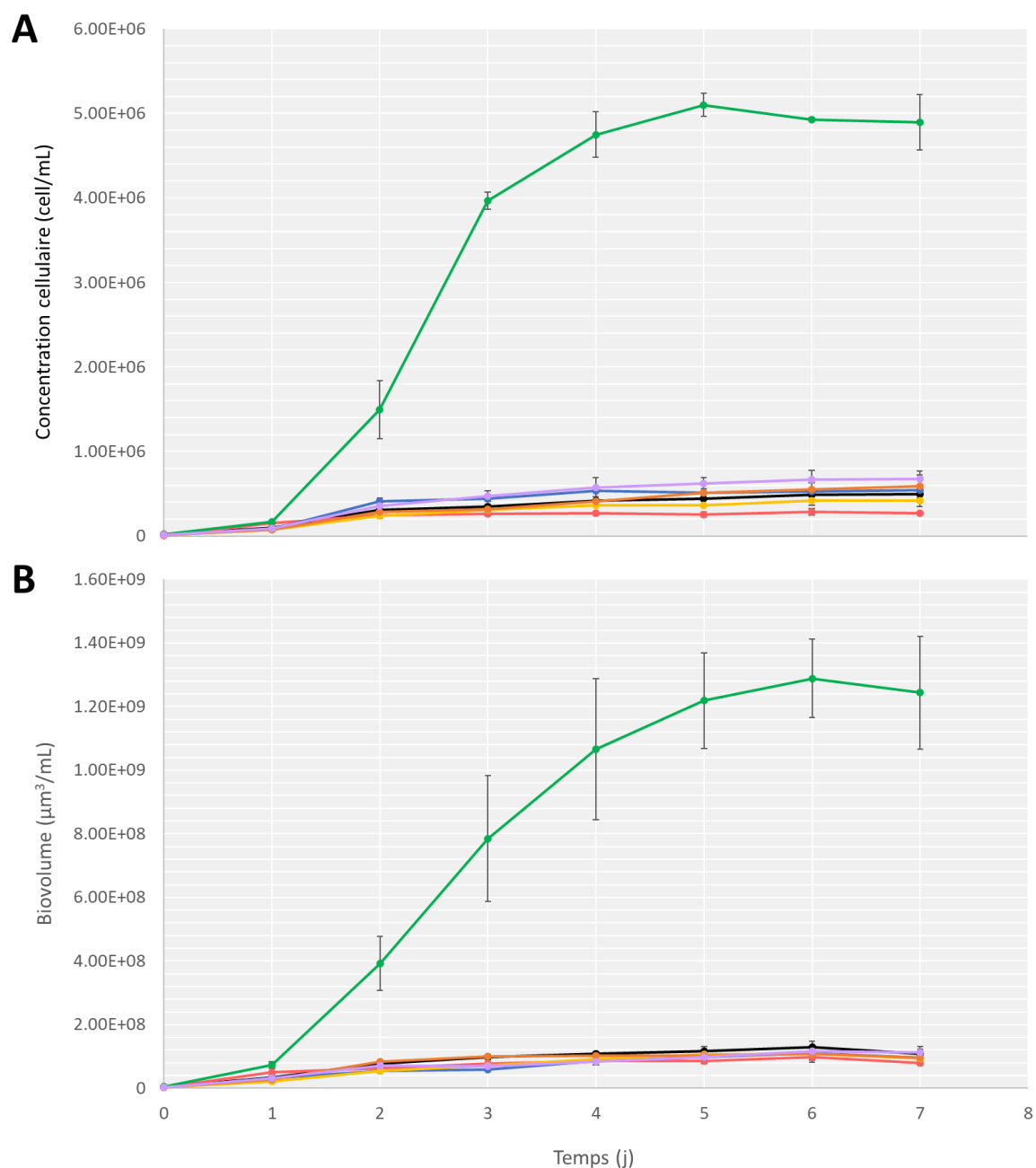


Figure 45 : Exemple de distributions obtenues avec le compteur optique de particules HIAC, pour 3 réplicas sur une culture. **(A)** Densité spectrale de la distribution de particules, et **(B)** du biovolume ; concentration **(C)** et biovolume **(D)** cumulés. Les traits verticaux délimitent la gamme de taille au sein de laquelle les calculs ci-dessous sont effectués. Ces distributions sont caractérisées par une dissymétrie accentuée à droite, qui apparaît plus nettement sur la distribution du biovolume. Les particules qui composent la partie droite des distributions peuvent être des grosses cellules mères sur le point de se diviser, des amas de cellules, ou des particules détritiques. Nous avons choisi de considérer qu'elles faisaient toutes partie de la population de *T. suecica*. Les figures **(C)** et **(D)** montrent que si une petite variation de la limite inférieure choisie ne modifie pas radicalement les calculs de la concentration et du biovolume, il n'en est pas de même pour le choix de la limite supérieure, notamment pour ce qui concerne le calcul du biovolume **(D)**.

En fonction de sa concentration, l'échantillon est dilué D fois pour éviter tous risques de coïncidence durant le comptage, puis homogénéisé. Un volume connu V de cette suspension est compté 3 fois, avec une bonne reproductibilité comme le montre l'ensemble des figures. Les particules en suspension passent une à une à travers un faisceau laser, générant un signal proportionnel à leur ombre projetée (ou section efficace). Le diamètre des particules est donc assimilé à celui d'un disque de section efficace équivalente. La distribution en taille de la population représente la répartition du nombre de particules n_i (cell.L⁻¹) par classe de taille i , dont le diamètre moyen d_i (μm) correspond à la moyenne des limites inférieure et supérieure de la classe i , et dont le volume moyen (μm³) $v_i = (4\pi/3) (d_i/2)^3$.

$N = (D/V) \sum_{i=a}^{i=b} n_i$ est la concentration des particules dans la gamme de tailles comprises entre d_a et d_b , où a et b sont les numéros des classes inférieure et supérieure de la gamme considérée.

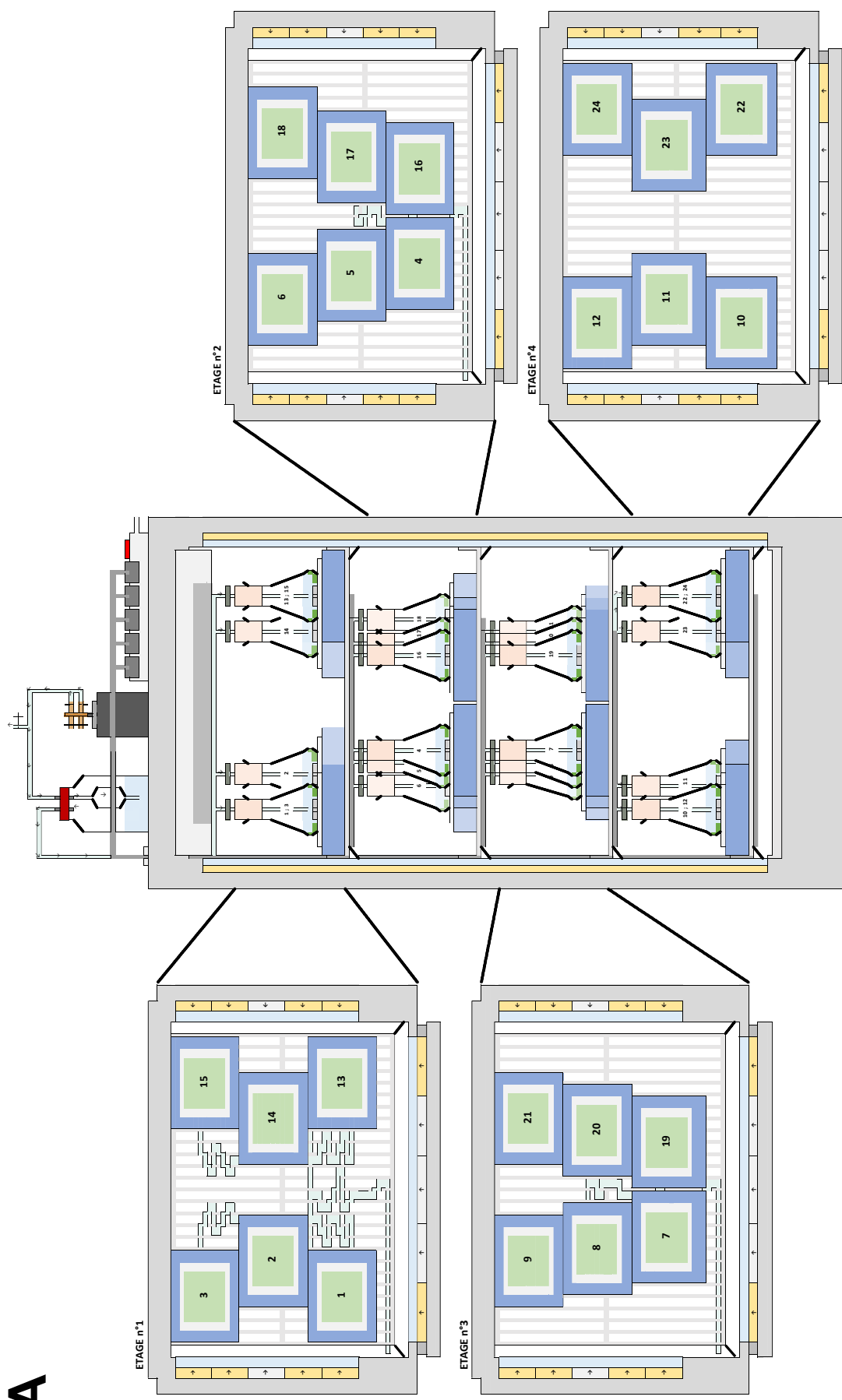
Le diamètre moyen des particules dans la gamme de taille considérée est $\bar{d} = (1/N) \sum_{i=a}^{i=b} n_i d_i$, et le biovolume (μm³.L⁻¹) qu'elles représentent est égal à : $B = (D/V) \sum_{i=a}^{i=b} n_i v_i$.



Conditions	Milieu	pH	bullage	Solutions stocks	Lumière	(contrôle)
	F/2 ^{BS}	8,1-8,2	non	ancienne	néons	
	F/2 ^{BS}	7,0	non	ancienne	néons	
	f/2	8,1-8,2	non	ancienne	néons	
	F/2 ^{BS}	8,1-8,2	oui	ancienne	néons	
	F/2 ^{BS}	8,1-8,2	non	neuves	néons	
	F/2 ^{BS}	8,1-8,2	non	ancienne	dalle LED	
	F/2^{BS} avec [NaHCO₃]/10	8,1-8,2	non	ancienne	néons	

Figure 46 : Évolution de la densité cellulaire (**A**) et du biovolume (**B**) de la microalgue *Tetraselmis suecica* cultivée dans différentes conditions afin d'identifier les paramètres pouvant limiter sa croissance. Les valeurs moyennes sont représentées par des points et les écarts-types par des barres.

A



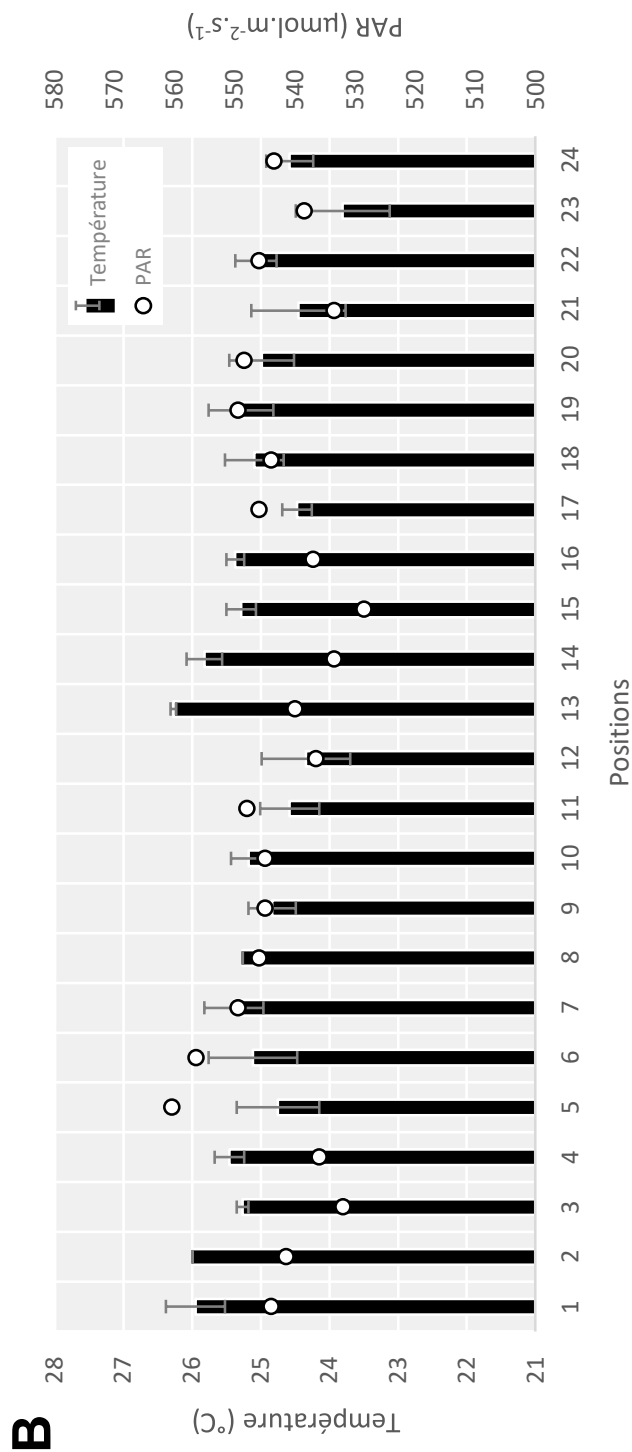


Figure 47 : A) Représentation schématique du système de culture optimisé de biofilm de *Tetraselmis suecica* à l'intérieur d'une chambre d'incubation SANYO MLR-351. **B)** Température (°C) (barres noires) et mesure PAR (lumière, en $\mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$) (ronds blancs) en fonction de la position. **C)** Photographies de biofilms de *T. suecica* cultivés en erlenmeyers (des photographies au microscope optique figurent en **Annexe 5**).

2.2.3. Validation du système de culture

Pour répondre aux besoins de l'expérience, le système de culture mis en place doit encore respecter deux conditions non vérifiées : 1) le développement du biofilm est identique dans les 24 erlenmeyers, c'est-à-dire indépendant de leur position dans le SANYO ; et 2) il doit être possible de suivre la croissance du biofilm de *T. suecica* et de contrôler son statut azoté. Une variante du milieu f/4' avec une augmentation de la concentration attendue en phosphate (PO_4^{3-}) à 72,4 μM a été utilisée (milieu f/4*) afin de s'assurer qu'aucune limitation en P ne puisse advenir.

Pour vérifier la première condition, on a procédé comme suit. Les 24 cultures sont inoculées de façon identique à partir d'une même préculture (55 mL de milieu f/4*, concentration cellulaire initiale de 10^7 cell.L^{-1} , 250 rpm, 25°C, 540 $\mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ de lumière continue) et les 24 biofilms formés au bout de 7 jours sont récupérés. Pour cela, chaque erlenmeyer est sorti délicatement de la chambre d'incubation, le barreau magnétique est soigneusement enlevé à l'aide d'une tige magnétique en prenant soin qu'elle ne touche pas le milieu de culture, puis 5 fractions du biofilm sont successivement récupérées. La fraction Fr-SN qui comporte les cellules restées planctoniques dans la culture surnageante ou non adhérees à la paroi en verre est délicatement récupérée par simple transvasement. Puis, trois fois de suite, 50 mL d'EdM_f sont ajoutés puis récupérés après une agitation manuelle des erlenmeyers, donnant les fractions Fr-L1 (lavage 1), Fr-L2 (lavage 2) et Fr-L3 (lavage 3). La dernière fraction, constituée des cellules fortement adhérees qui forment la couche profonde du biofilm (Fr-BF) est récupérée après ajout de 50 mL d'EdM_f suivi d'une agitation vigoureuse avec un barreau magnétique lisse durant environ 5 min. Les cinq fractions sont conservées dans des tubes coniques en attendant d'être analysées : comptage cellulaire (voir plus haut), salinité (réfractomètre *Digital Salinity Refractometer* MA887, Milwaukee) et pH (pH-mètre FP20 New FiveEasy, Mettler Toledo, couplé à une électrode pH Bioblock Scientific, ref. 84907, Fisherbrand™). La salinité et le pH ont également été mesurés sur un aliquote du milieu de culture à t_0 et sur la fraction Fr-SN à t_7 . L'augmentation de la salinité due à l'évaporation a été prise en compte pour corriger son effet sur la détermination des concentrations cellulaires via la formule $X'_t = X_t \times (S_t/S_0)$, où X'_t et X_t sont respectivement les concentrations cellulaires (ou biovolumes) corrigées et mesurées au temps t , et S_t et S_0 les salinités mesurées aux temps t et t_0 .

Pour vérifier la seconde condition, une expérience a été mise en place dans les mêmes conditions que précédemment. Chaque jour, 3 cultures choisies aléatoirement sur les 24 sont

"sacrifiées" pour des mesures de particules, de salinité et de pH, comme précédemment. A t_0 , 3 cultures supplémentaires ont été sacrifiées. En outre, 10 mL de filtrat (Minisart® NML Stérile - 0.2 μm , SFCA, ref. 16534-----K, Sartorius) des fractions Fr-SN sont stockés dans des cryotubes à -80°C en attendant une analyse des nitrates résiduels (N_R) par la méthode colorimétrique de [Treguer et al. \(1975\)](#) à l'autoanalyseur *Technicon*. 10 mL des fractions Fr-L1, Fr-L2 et Fr-L3 sont mélangés dans un tube conique de 50 mL et centrifugés à 1500 rpm pendant 10 min (Centrifugeuse Sorvall™ ST 40R, ref. 75004525, Thermo Scientific). Après élimination du surnageant, le culot est remis en suspension dans 10 mL d'EdM_f pour former la fraction « lavages » Fr-L123. Ensuite après filtration de 5 ou 10 mL des fractions Fr-SN, Fr-L123 et Fr-BF (GF/C glass microfibre filters, Ø: 25 mm, circle, ref. 1822-025, Whatman®), les filtres sont conservés dans des tubes à hémolyse fermés avec de l'aluminium et conservés dans une étuve à 60°C jusqu'à mesure de l'azote et du carbone particuliers (N_P , C_P) au CHN. Ces analyses n'ont pas pu être réalisées sur ces tests mais le seront au cours de l'expérience.

Bien que mesurées chaque jour sur des cultures différentes, les concentrations de microalgues suivent assez fidèlement la dynamique attendue d'une croissance logistique, sauf peut-être le jour 7 où la concentration est inférieure à celle attendue (**Figure 49A**). L'arrêt de la croissance à partir du 5^{ème} jour peut être attribuée à une limitation par l' N , le N_R étant épuisé entre le 1^{er} et le 2^{ème} jour (**Figure 51**). La **Figure 49** montre que la proportion des cellules libres est, dès le début, très faible, et que la majorité ($> 95\%$) des cellules (Fr-L1+Fr-L2+Fr-L3+Fr-BF) sont constitutives des biofilms, ce qui laisse penser que la technique adoptée pour leur formation est efficace. Le biovolume suit une évolution similaire à celle de la concentration cellulaire (**Figure 48D,E,F** et **Figure 49B**). La croissance du biofilm de *T. suecica* montre une productivité suffisante pour les analyses envisagées ($1,36 \pm 0,08 \cdot 10^9 \text{ cell.L}^{-1}$ à t_7) (**Figure 48A**) et une bonne reproductibilité (coefficient de variation compris entre 3,57 et 6,14% de t_2 à t_6) tout au long de l'expérience (**Figure 49A**). En effet, on n'observe pas de différences significatives de la densité cellulaire entre les 24 biofilms répartis sur la hauteur ou la profondeur de la chambre d'incubation, qui auraient pu être dues aux petites différences de température et d'éclairement enregistrées (**Figure 48C,D,E,F**).

Après avoir augmenté jusqu'au jour 2, le pH diminue ensuite progressivement, ce qui traduit une évolution de la demande en carbone organique dissous, qui est modérée au début quand la biomasse est faible ainsi qu'à la fin quand la croissance ralentit. Mais le pH est resté en moyenne supérieur à 8, ce qui indique que le bullage d'air a été suffisant pour prévenir une limitation de la croissance par le carbone inorganique (**Figure 50**). Cependant l'évaporation engendrée par

ce bullage a entraîné une augmentation de la salinité, variable d'une culture à l'autre (**Figure 50**). Il sera donc nécessaire d'installer un humidificateur de l'air bullé au cours de l'expérience afin de réduire les biais potentiels inhérents à une augmentation de la salinité (voir **chapitre 3, partie 2.2.2**). Moyennant cet aménagement, nous pouvons considérer que le dispositif de culture de biofilm de microalgues en erlenmeyer répond aux exigences d'une analyse métabolomique.

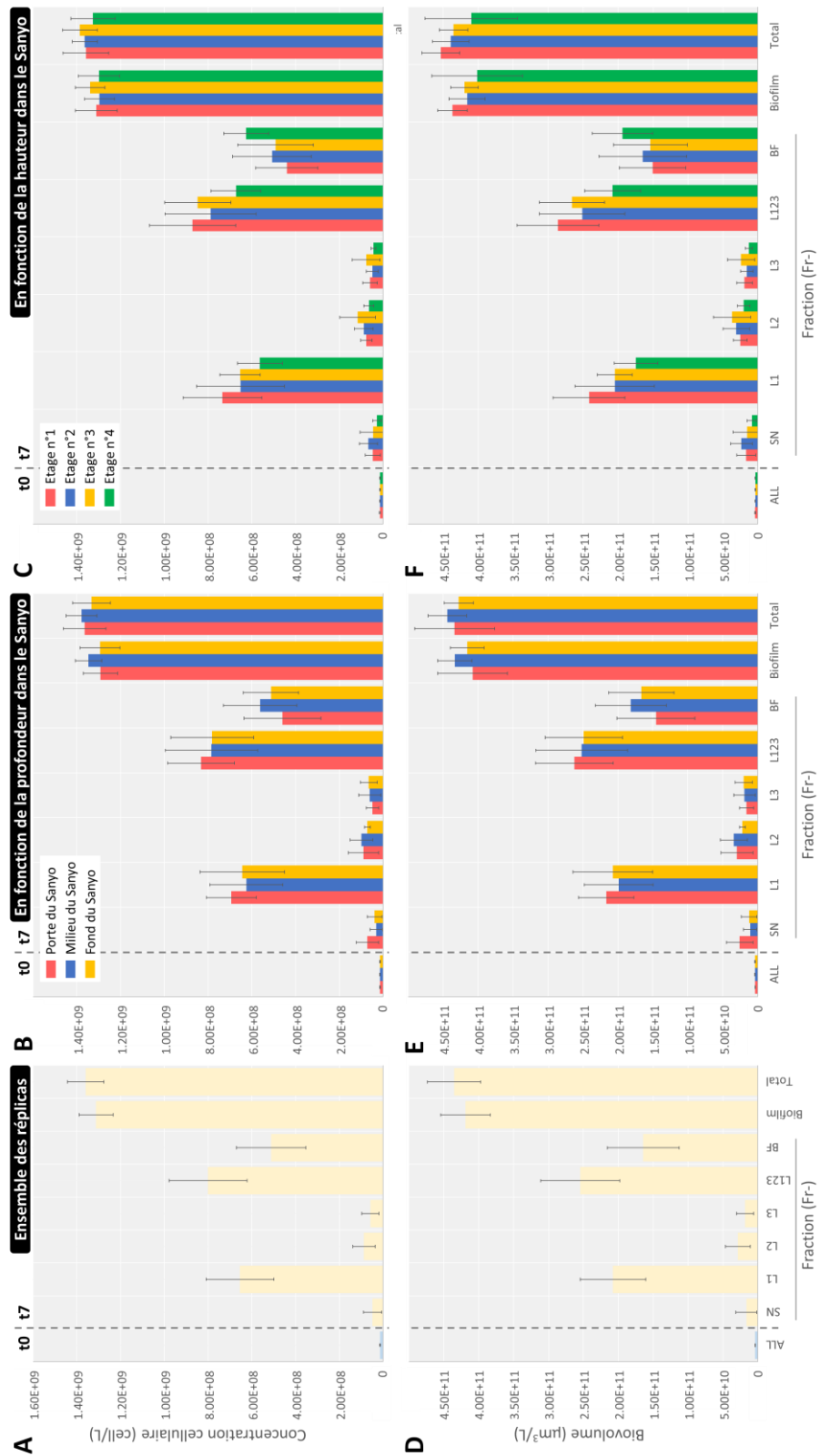


Figure 48 : Concentration cellulaire (A,B,C) et biovolume (D,E,F) à t₀ et t₇ de la totalité et des différentes fractions du biofilm de *Tetraselmis suecica* incubée durant 7 jours. (A,D) Données totales. (B,E) Données réparties en fonction de la profondeur dans le SANYO MLR-351. (C,F) Données réparties en fonction des différents étages dans le SANYO MLR-351. Les étages sont définis comme dans la **Figure 47A**. Les valeurs moyennes sont représentées par des points et les écarts-types par des barres.

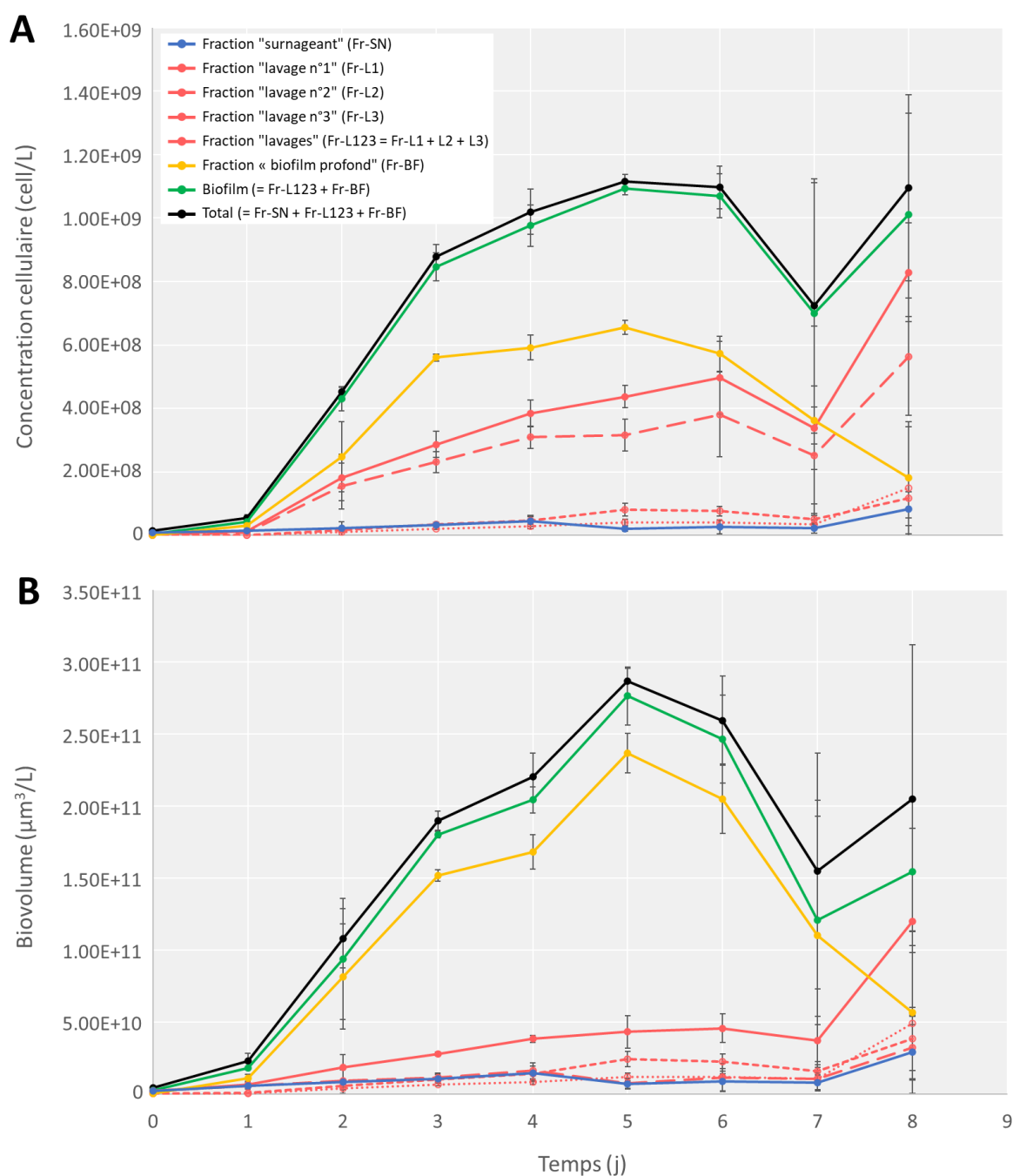


Figure 49 : Évolutions de la densité **(A)** et du biovolume **(B)** cellulaires dans les différentes fractions et dans la totalité du biofilm de *Tetraselmis suecica* durant 8 jours d'incubation. Les valeurs moyennes sont représentées par des points et les écarts-types par des barres.

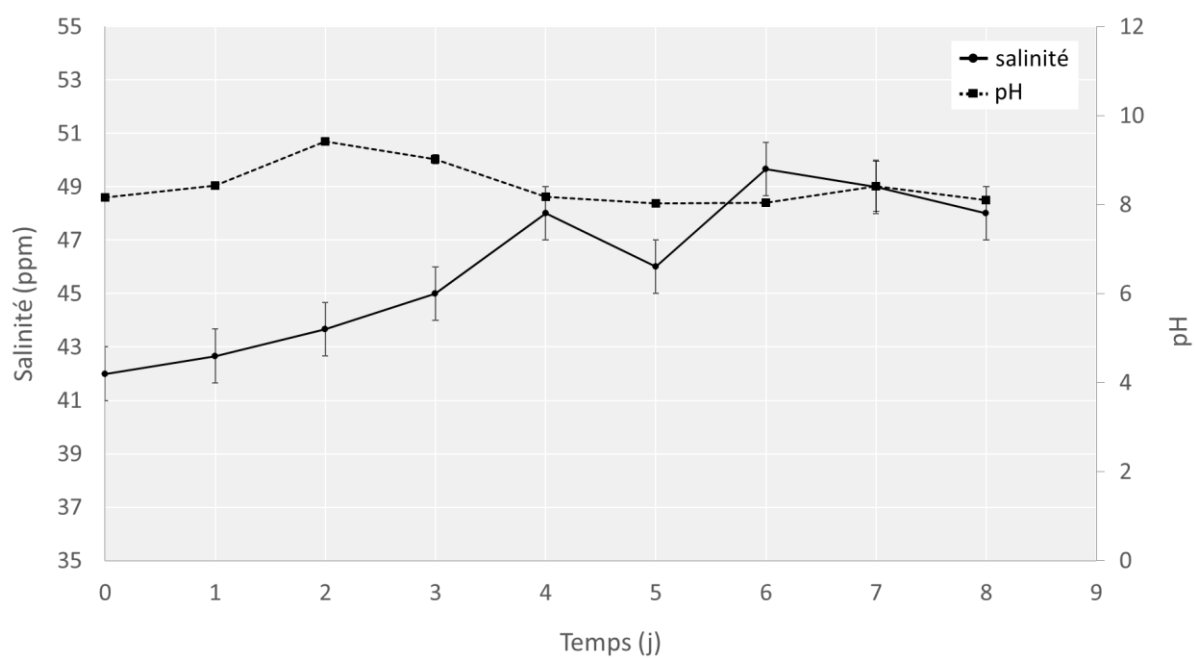


Figure 50 : Évolution de la salinité (trait plein) et pH (trait hachuré) dans des cultures de biofilm de *Tetraselmis suecica* durant 8 jours d’incubation. Les valeurs moyennes sont représentées par des points et les écarts-types par des barres.

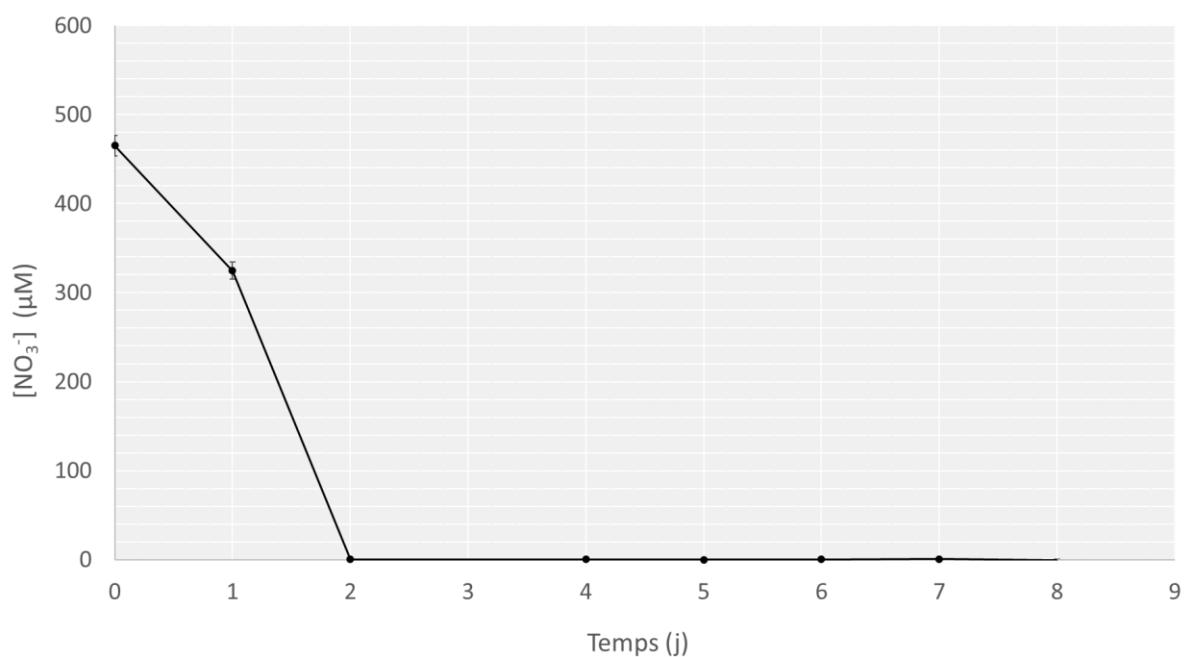


Figure 51 : Évolution du nitrate résiduel (en µM) au cours du temps dans des cultures de biofilm de *Tetraselmis suecica* durant 8 jours d’incubation. Les valeurs moyennes sont représentées par des points et les écarts-types par des barres. La courbe d’étalonnage est en **Annexe 6**.

2.2.4. Détermination des conditions de culture et d'échantillonnage

Notre objectif étant de connaître la réponse métabolomique de *T. suecica* à une modification de son statut azoté, nous avons choisi de comparer les métabolomes de biofilms non limités et limités par l'N. Pour ce faire, il faut que les conditions initiales en N et en cellules soient telles que l'on obtienne au bout d'un certain temps deux lots de biofilms, limités et non limités, dont les biomasses soient suffisantes pour assurer les analyses désirées. Par ailleurs, pour que la comparaison du métabolome de ces lots ait un sens, il est nécessaire que le statut azoté soit le seul paramètre qui induise la différence de réponse métabolomique, autrement dit que toutes les autres conditions soient "égales par ailleurs". Ces autres conditions sont la température, les nutriments autres que l'N, le pH et la lumière. De toutes ces conditions, seule la température n'est pas affectée par le développement du biofilm. Le flux de photons moyen intégré dans l'épaisseur du biofilm diminue avec son épaissement, quant aux nutriments, leur concentration diminuent au fur et à mesure de leur consommation. Pour les nutriments autres que l'N, nous faisons l'hypothèse que des différences de concentration entre les lots n'ont pas de répercussion sur la physiologie des microalgues tant que ces nutriments restent en abondance. Pour que les conditions lumineuses soient le plus similaires possibles au moment de la récolte des biofilms dans les deux lots, il est nécessaire que leurs épaisseurs dans les cultures limitées et non limitées soient voisines, autrement dit que les biomasses de biofilm obtenues pour chaque condition azotée soient similaires.

Pour déterminer les conditions initiales de densité cellulaire et de NO_3^- qui vérifient les conditions précédentes, nous avons choisi d'utiliser les sorties d'un modèle de la dynamique des cultures plutôt que de réaliser des expériences préliminaires très lourdes et très chronophages. Nous avons utilisé le modèle de Droop à quota ([Droop 1968](#)) qui présente l'avantage de prendre en compte le statut azoté de la cellule. En effet, l'hypothèse majeure de ce modèle est que la croissance μ (j^{-1}) dépend de la quantité d'élément limitant présent dans la cellule (en l'occurrence tout l'N cellulaire), également appelé quota interne q ($\mu\text{mole N.cell}^{-1}$) selon l'expression :

$$\mu(q) = \bar{\mu} \left(1 - \frac{q_0}{q} \right)$$

où q_0 est le quota minimum de subsistance en dessous duquel la croissance n'est plus possible et $\bar{\mu}$, le taux de croissance maximum théorique atteint pour un quota q infini.

L'absorption ρ ($\mu\text{mole N.cell}^{-1}.\text{j}^{-1}$) des nitrates s ($\mu\text{mole.L}^{-1}$) est représentée par la loi de Michaelis-Menten :

$$\rho(s) = \rho_m \left(\frac{s}{s + k_s} \right)$$

où ρ_m est le taux d'absorption maximum et k_s la constante de demi-saturation.

Ainsi la dynamique de la densité cellulaire x (cell.L^{-1}), des nitrates s ($\mu\text{mole N.L}^{-1}$) et du quota interne d'azote q ($\mu\text{mole N.cell}^{-1}$) s'écrit :

$$\frac{dx}{dt} = \mu(q).x$$

$$\frac{ds}{dt} = -\rho(s).x$$

$$\frac{dq}{dt} = \rho(s) - \mu(q).q$$

L'intégration numérique de ce système d'équation a été réalisée par la fonction ODE23 de MATLAB. La valeur des paramètres (**Tableau 5**) a été obtenue par ajustement du modèle (fonction OPTIMSET) à des données de cultures planctoniques de *T. suecica* obtenues dans des conditions d'éclairement et de température voisines des nôtres, aimablement fournies par Emna Krichen (**Figure 52**).

Tableau 5 : Paramètres du modèle de Droop estimés après ajustement du modèle aux données expérimentales (voir **Figure 52**).

ρ_m	3,09E-06	$\mu\text{mol N.cell}^{-1}.\text{j}^{-1}$
k_s	0,52	μM
$\bar{\mu}$	2,34	j^{-1}
q_0	4,55E-07	$\mu\text{mol N.cell}^{-1}$

Cette simulation montre qu'une culture en batch passe progressivement par 3 phases successives de croissance : une phase de croissance maximale (strictement exponentielle) tant que les nitrates résiduels ne sont pas épuisés, suivie d'une phase de croissance limitée tant que le quota d'N reste supérieur au quota de subsistance, suivie une phase de croissance nulle (plateau) quand

le quota a atteint son niveau minimum. On peut considérer que l'état de carence correspond à un état de limitation très prononcée, bien que la délimitation entre ces deux états ne soit pas très précise. Cette simulation montre aussi que le statut azoté d'une culture ne peut pas être déduit de la simple présence ou absence de nitrate dans le milieu, et que le seul critère véritablement pertinent est la mesure du quota azoté.

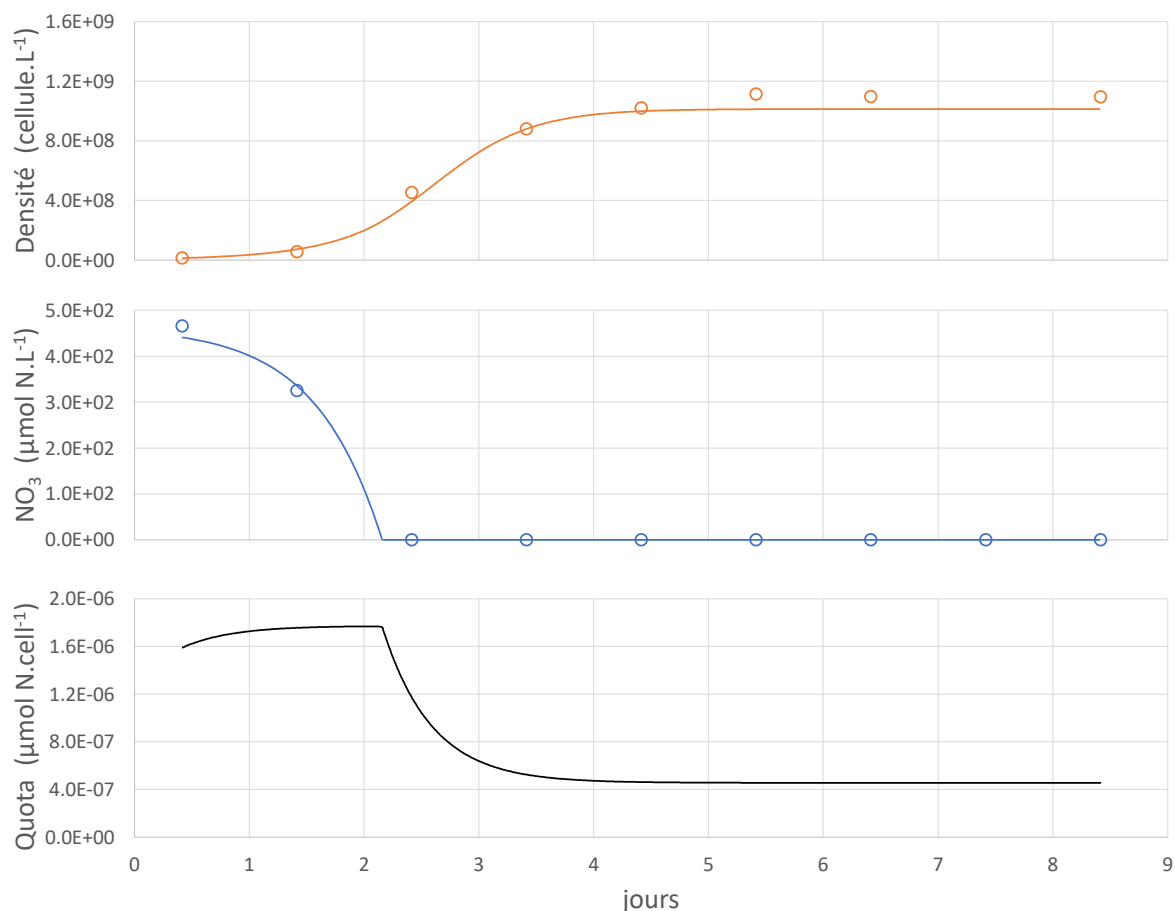
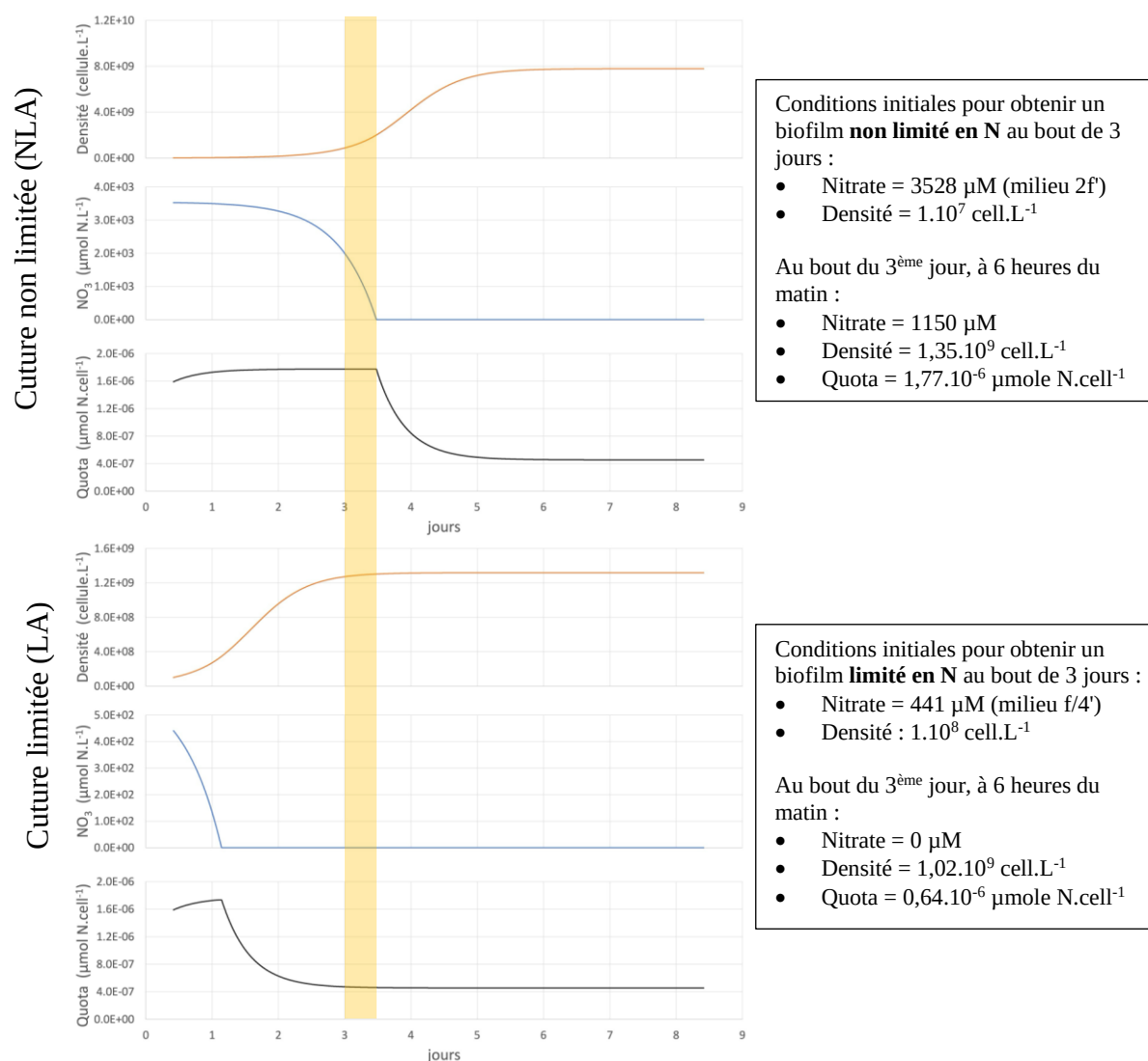


Figure 52 : Ajustement du modèle de Droop (trait continu) à des données (cercles) de densité cellulaire et d'azote résiduel mesurés dans une culture en batch de *T. suecica*. On a considéré que le quota d'azote initial (non mesuré pendant cette expérience) pour cette simulation était proche du quota maximal, l'inoculum cellulaire ayant été pris dans une préculture en phase de croissance exponentielle. Cette figure montre que la croissance est strictement exponentielle jusqu'au jour 2, et qu'elle continue après que les nitrates aient été totalement consommés durant une phase de limitation croissante durant laquelle le quota interne s'épuise jusqu'à son niveau minimum (jours 2 à 4). La carence à proprement parler est obtenue quand le quota a atteint sa valeur minimale q_0 .

En faisant l'hypothèse que ce modèle validé pour des cultures planctoniques prédise une dynamique de la biomasse similaire pour des cultures en biofilm, nous l'avons utilisé pour définir les conditions initiales de nitrate et de densité cellulaire ainsi que la durée de culture pour que les critères suivants soient remplis (**Figure 53**) : (1) les biofilms doivent être récupérés après des temps de culture identiques pour les cultures limitées et non limitées ; (2) au bout de

ce temps, les biomasses des biofilms limités et non limités doivent être similaires autant que possible ; et (3) au moment de leur récolte, les biofilms produits pour chaque condition doivent avoir des statuts azotés nettement différenciés (non limité pour le premier, très limité voire carencé pour le second).

Figure 53 : La figure ci-dessus montre qu'en utilisant les conditions initiales indiquées dans les tableaux de droite pour chaque condition, il est possible d'obtenir au bout de trois jours (bande jaune) des biofilms qui respectent les critères énoncés dans le texte. Ce sont donc ces conditions initiales qui seront utilisées dans notre expérience.



2.3. Protocole expérimental

Nous décrivons ici le protocole mis en place pour l'étude du métabolome de biofilms de *T. suecica* limités (LA) et non-limités en N (NLA), et utilisant le dispositif de culture précédemment présenté.

2.3.1. Milieux de culture et incubation

A partir de la modélisation des conditions optimales d'échantillonnage (voir **chapitre 3, partie 2.2.4**), nous avons décidé d'utiliser deux variantes du milieu f/2. Pour la condition LA, le milieu f/4' est du milieu f/2 dont la concentration en NO_3^- est réduite de moitié. Pour la condition NLA, le milieu 2f' est du milieu f/2 dont la concentration en NO_3^- est doublée et la concentration en PO_4^{3-} quadruplée (soit une concentration attendue 144,8 μM) afin de prévenir tout risque de limitation par cet élément. Dans les deux conditions, le rapport N:P initial est de 12:1.

Dix cultures de 50 mL de la condition LA sont inoculées avec une culture de *T. suecica* pré-acclimatée au milieu f/4' pour obtenir une concentration cellulaire initiale de 10^8 cell.L^{-1} , et 10 cultures de la condition NLA sont inoculées avec une culture pré-acclimatée au milieu 2f' pour obtenir une concentration cellulaire initiale de 10^7 cell.L^{-1} . Chaque condition comporte également 2 erlenmeyers non inoculés qui serviront de blancs pour les analyses métabolomiques. Au total, 20 cultures et 4 blancs sont incubés durant 3 jours à une température de 25°C, un éclairage continu de 540 $\mu\text{mol photons.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ et une agitation à 250 rpm. Dix cultures et les 4 blancs seront dédiés à l'analyse métabolomique (**chapitre 3, parties 2.3.2 et 2.3.3**). Les dix autres cultures seront dédiées aux analyses biochimiques (**chapitre 3, partie 2.3.5**).

La répartition des cultures dans le SANYO MLR-351 en fonction des conditions expérimentales (NLA ou LA) et du type d'analyse (métabolomique ou biochimique) a été définie manuellement afin d'obtenir qu'elle soit la plus homogène possible en termes de variation de lumière et de température (voir **Figure 47B**). La validité de ce protocole repose sur l'hypothèse que toutes les cultures d'une même condition sont interchangeables, c'est-à-dire qu'elles se développent de la même façon, hypothèse confortée par la forte reproductibilité observée lors de l'optimisation du dispositif de culture de biofilm (voir **chapitre 3, partie 2.2**).

2.3.2. Extraction des métabolites pour l'analyse métabolique

Le surnageant (fraction Fr-SN) de chaque culture, récupéré comme décrit dans le **chapitre 3, partie 2.3.2**, est utilisé pour des analyses complémentaires (**chapitre 3, partie 2.3.5**). Il est rapidement remplacé par 40 mL de méthanol grade LC-MS (MeOH, min. 99,9%, LC-MS Ultra CHROMASOLV™, Honeywell Riedel-de Haën™), après quoi les erlenmeyers sont placés dans un bain à ultrasons durant 20 minutes, ce qui permet d'extraire les métabolites du biofilm. Le fait de procéder à l'extraction dans le récipient même qui a servi à la culture du biofilm limite considérablement les risques de contamination. Après transvasement de l'extrait obtenu dans un tube conique (Nest® 50 mL, ref. 602051, GROSSERON), les débris cellulaires encore présents sont éliminés par centrifugation (4000 rpm, 15 min) et le surnageant est transvasé dans un tube conique neuf stocké à -80°C. Afin d'estimer sa masse, l'extrait est concentré à l'aide d'un évaporateur (N-Evap) à diazote (N₂), puis placé dans un vial HPLC pré-pesé (2 mL, amber, ref. 5190-4034, Agilent Technologies) à l'aide d'une pipette Pasteur (230 mm, ref. 612-1702, VWR INTERNATIONAL) avant de subir une évaporation finale du solvant résiduel sous N-Evap. L'extrait sec est ensuite pesé puis stocké à -80°C sous gaz inerte (N₂) jusqu'à son analyse métabolomique. Les blancs sont soumis au même traitement que les cultures.

2.3.3. Analyse métabolomique et acquisition de données LC-ESI-MS et MS/MS

Chaque extrait sec est préalablement resolubilisé dans 1,5 mL de MeOH grade LC-MS (ref. 414855, Carlo Erba « Reagent »)¹, puis filtré à l'aide d'une seringue (*Plastic Two-piece Syringe* S7515-3, 2mL, ref. MB9202545TF-LAB, Thermo Scientific) équipée d'une aiguille (22G×1 ¼"(0,7×32 mm), REGULAR BEVEL 11°, ref. AN*2232R1, AGANI NEEDLE) et d'un filtre (*Syringe Filter*, 13mm, 0,2 µm PTFE, Cat. #26142, RESTEK) dans un vial HPLC (Short Thread Vial 1.5 mL, 32×11,6 mm, ref. 11 09 0519, FISHERBAND) fermé avec bouchon à vis muni d'un septum (9 mm bleu UC Sil/PTFE, Cat. No. 11787567, FISHERBAND) pour une concentration finale de 4 mg.mL⁻¹ en moyenne. Afin de stabiliser l'appareil, un échantillon "QC" (*Quality control*) composé de 50 µL de chaque extrait et équipé d'un insert (Cat. No. 11762418, FisherBrand) est également injecté.

¹ Références des *tips* utilisés : (i) Tips de 5 mL : epT.I.P.S Standard/Bulk 100-500µL LOT F164880H, Cat. No. : 022492080 ; (ii) SORENSON BioScience, MultiFit Pipette Tips, 1-200µL, Cat# 10180, Lot# 679953-E 23460

Les échantillons ont été analysés par chromatographie liquide (Dionex Ultimate 3000 Rapid Separation, Thermo Fisher Scientific) couplée à un spectromètre de masse (QToF Impact II, Bruker Daltonics, Mannheim) équipé d'une source d'ionisation par électrospray (ESI) en mode positif (UHPLC-ESI(+)-QToF-MS/MS), au plateau technique MALLABAR de la Station Marine d'Endoume (IMBE, Marseille).

La séparation chromatographique a été réalisée à l'aide d'une colonne Kinetex® XB-C18 (150 x 2,1, 1.7 μ m, Phenomenex) à 42°C. De l'eau (A) et de l'acétonitrile (B) acidifiés avec 0,1 % d'acide formique ont été utilisés comme solvants d'élution pour les phases mobiles. Le débit de la phase mobile était de 0,5 mL.min⁻¹. Le mélange de solvant d'élution pour la chromatographie est le suivant : 10% B durant 2,5 min, une augmentation linéaire jusqu'à 90 % B durant 16,5 min, maintenu à 90 % durant 5,5 min, puis suivi par une diminution jusqu'à 10 % durant 3 minutes. Au total, l'analyse a duré 28 min.

Les données de spectrométrie de masse ont été obtenues avec un m/z entre 55 et 1200, en mode positif uniquement. Les paramètres MS suivants ont été utilisés pour le Q-ToF : *end plate offset* à 500 V, pression du gaz nébuliseur (N₂) à 3,5 bar, débit du gaz sec (N₂) à 12,0 L/min, température de séchage à 200°C, fréquence d'acquisition à 5 Hz, et la tension capillaire à 4500 V. Les spectres de fragmentation MS/MS ont été obtenus automatiquement pour les 3 ions précurseurs les plus abondants. Le mode d'acquisition des données MS/MS a été défini avec une fréquence de balayage de 8,0 Hz et une énergie de collision de 40.0 eV (50 % de temps à chaque énergie de collision, mode pas à pas (*stepping mode*)).

2.3.4. Traitement et analyse des données métabolomiques

Après acquisition des données UHPLC-ESI(+)-QToF-MS/MS, la très grande quantité d'ions (c'est-à-dire de métabolites ionisés au cours de l'analyse) obtenue ne permet pas d'exploiter directement les données brutes. Il est nécessaire de réaliser un *workflow* de traitement de données et d'analyses statistiques spécifiques aux jeux de données métabolomiques pour permettre d'identifier, sélectionner et caractériser les ions dont l'intensité est fonction des différents statuts azotés à l'aide de plusieurs logiciels spécialisés et guidés étape par étape par l'utilisateur.

Pour cela, les données brutes LC-MS ont été calibrées avec le logiciel Bruker DataAnalysis (version 5.0) et converties au format .mzXML à l'aide du protocole MSConvert

(version 3.0.23345-eb399e3) (Chambers *et al.* 2012). Le décalage des ions précurseurs obtenus lors de la conversion est ensuite corrigé à l'aide du script <https://github.com/elNurgar/mzxml-precursor-corrector> (version 0.5 ; pour plus de détails, voir Breaud *et al.*, 2023). Les données .mzXML ont été prétraitées à l'aide du logiciel MZmine3 (version 3.9.0). Les paramètres sélectionnés pour l'importation des fichiers, la détection de masse (*mass detection*), la création de chromatogrammes (*chromatogram builder*), la déconvolution du chromatogramme (*chromatogram resolving*), la filtration des isotopes (*¹³C isotop filter*), l'alignement des répétitions analytiques et les filtrations appliquées sont récapitulés dans l'**Annexe 7** et l'**Annexe 8**. Deux jeux de données traitées, avec et sans soustraction des blancs, ont été exportés sous format .csv et .mgf. Une filtration manuelle pour conserver les ions dont le coefficient de variation (CV) est inférieur à 25% a été réalisée avant l'application de tests statistiques.

Plusieurs analyses statistiques multivariées (ACP, PLS-DA, VolcanoPlot, Heatmap) sont réalisées avec la plateforme Web MetaboAnalyst (version 6.0 ; <https://www.metaboanalyst.ca/>) afin d'identifier les possibles contaminants et les ions les plus discriminants (*Variable importance in projection*, VIPs) entre les conditions LA et NLA. Des contaminants ont été identifiés à partir de l'ACP et éliminés manuellement. Un des réplicas de la condition NLA (R09) qui présentait un profil intermédiaire dans l'ACP entre les deux conditions a été écarté (voir **Annexe 8**). Les VIPs ont été identifiés et caractérisés à l'aide de bases de données (Scifinder, LipidMaps, GNPS, MetFrag) et du logiciel SIRIUS (version 5.8.5).

2.3.5. Analyses biochimiques

Le **Tableau 6** indique les analyses effectuées sur les différentes fractions, comme indiqué précédemment (voir **chapitre 3, partie 2.2.3**), à ceci près qu'un autre compteur de particules (S 4031 GO, PAMAS Partikelmess- und Analysesysteme GmbH), fonctionnant sur le même principe que les autres, a été utilisé. Les analyses élémentaires de l'N et du C particulières ont été réalisées par les Laboratoires de l'Environnement Marin (IAEA, Monaco) à l'aide d'un analyseur CHN Carlo Erba (modèle 1602). Des analyses au cytomètre en flux (BD Accuri™ C6, BD Biosciences) ont également été réalisées dans le but d'évaluer le rapport bactéries/microalgues dans les biofilms. Pour ce faire, 10 µL d'un mélange de glutaraldéhyde et de poloxamère (10:1) sont ajoutés à 990 µL d'échantillon dans un tube Eppendorf qui est refroidi à 4°C durant 15 min à l'obscurité, puis stocké à -30°C en attendant l'analyse.

L'analyse pigmentaire, qui porte sur des échantillons de 3 mL filtrés (GF/F glass microfibre filters, Ø: 25 mm, circle, ref. 1825-025, Whatman®) puis flash-congelés à l'azote liquide avant conservation à -80°C, a été réalisée par chromatographie liquide haute performance (HPLC) par la plateforme SAPIGH (IMEV). Le rendement quantique (ϕ) (estimé à partir de l'efficacité du photosystème II) a été estimé par la mesure de la fluorescence variable à l'aide de l'AquaPen-C AP110 (PSI Photon Systems Instruments), qui permet aussi de mesurer la densité optique à 680 nm (DO_{680nm}). On considère généralement que la valeur maximale théorique que peut atteindre ϕ chez les eucaryotes photosynthétiques bien portants est de l'ordre de 0,7.

Enfin, les proportions relatives de carbohydrates, lipides et protéines dans les biofilms ont été estimées par Spectroscopie Infrarouge à transformée de Fourier à réflectance totale atténuée (ATR-FTIR) par le Laboratoire de Génie des Procédés et Matériaux (LGPM, CentraleSupélec, France). Des culots de 15 mL d'échantillon centrifugés (1500 pm, 10 min) sont lavés deux fois avec 10 mL d'une solution de NaCl à 36 g.L⁻¹ puis stockés à -80°C jusqu'à l'envoi des échantillons. La suite du protocole est décrite dans [Fanesi et al. \(2019\)](#). En bref, les culots sont remis en suspension dans 5 à 10 µL de NaCl et 1,5 µL sont transférés sur un cristal plat ZeSe à 45° avant séchage à température ambiante durant 20 min. Les spectres, obtenus à l'aide d'un spectromètre PerkinElmer Spectrum-two (PerkinElmer, Waltham, MA, États-Unis), sont enregistrés dans un mode de réflectance entre 4000 et 400 cm⁻¹. Les spectres sont établis à l'aide de l'algorithme de la bande élastique et normalisés à la bande Amide I. Les rapports entre les principales familles de macromolécules (carbohydrates/protéines et lipides/protéines) sont calculés en prenant en compte les valeurs d'absorption maximale pour les plages spectrales suivantes : protéines (Amide I ; 1700-1630 cm⁻¹), lipides (C=O ; 1750-1700 cm⁻¹) et carbohydrates (C-O-C, C-C et Si-O-Si ; 1200-950 cm⁻¹)¹. Le matériel utilisé pour les analyses ATR-FTIR est composé de cellules de *T. suecica* pour la fraction Fr-SN et de cellules de

¹ L'association des bandes sur le spectre ATR-FTIR situées entre 1800 cm⁻¹ et 900 cm⁻¹ à un type de vibration et à un groupe fonctionnel est récapitulée dans [Mougin et al. \(2024\)](#). En bref, le pic situé à 1730 cm⁻¹ est supposé correspondre à un étirement de la liaison C=O des esters, potentiellement associés aux lipides membranaires et aux acides gras. La bande de vibration située à 1635 cm⁻¹ est associée à l'étirement des liaisons C=O des protéines (Amide I) tandis que le pic localisé à 1545 cm⁻¹ résulte d'une flexion de la liaison N-H et de l'étirement de la liaison C-N des protéines (Amide II). Les bandes à 1405 cm⁻¹ sont liées à une vibration d'étirement des liaisons C-O des groupements carboxyles tandis que les bandes entre 1275 et 1185 cm⁻¹ correspondent plus à des liaisons S=O d'un groupement sulfate ou P=O des acides nucléiques ou des sucres phosphorylés. Enfin, les différentes bandes situées entre 1180 et 950 cm⁻¹ correspondent à des étirements symétriques des liaisons C-O-C et asymétriques des liaisons P=O des polysaccharides et des acides nucléiques, tandis que celles situées entre 1100 et 900 cm⁻¹ correspondent à un étirement C-O de l'amidon ou de la cellulose.

microalgues, de bactéries et de matrice d'EPS pour les fractions du biofilm. Toutefois, les lavages et centrifugations successifs réalisés lors de la préparation des échantillons a très probablement modifié la composition biologique des échantillons avant analyse. Des pertes de bactéries et d'EPS dans les fractions Fr-L123 et Fr-BF sont possibles.

Tableau 6 : Les croix symbolisent les analyses (métabolomiques et biochimiques) réalisées sur les différentes fractions des 20 biofilms de *Tetraselmis suecica* et sur les 4 blancs durant l'expérience.

		Fractions du biofilm						Blancs
		Fr-SN	Fr-L1	Fr-L2	Fr-L3	Fr-L123	Fr-BF	
Analyse métabolomique (5 réplicas et 2 blancs par conditions)	Métabolome (UHPLC-ESI(+)-QToF-MS/MS)							
	Salinité (Réfractomètre)							
	pH (pH-mètre)							
Analyses biochimiques (5 réplicas par conditions)	Comptage de particules (PAMAS GO)							
	N résiduel (Technicon)							
	N et C particulaires (CHN)							
	Rapport bactéries/microalgues (cytomètre en flux)							
	Rendement quantique (QY) (AquaPen)							
	Densité optique (DO _{600nm}) (AquaPen)							
	Pigments (HPLC, plateforme SAPIGH)							
	Salinité (Réfractomètre)							
	pH (pH-mètre)							

2.3.6. Tests statistiques

Les tests statistiques sur les données biochimiques ont été réalisés en tenant compte des 5 réplicas de chaque condition expérimentale. La normalité de la distribution des données biochimiques a été évaluée à l'aide du test de Shapiro-Wilk. La majorité des données suivaient une distribution normale. Un test t a été utilisé pour comparer les données entre les conditions NL et L. Pour les fractions ne suivant pas une distribution normale, un test de Wilcoxon a été appliqué. Toutefois, aucune différence significative n'a été observée, que ce soit avec le test t ou avec le test de Wilcoxon. Une analyse de variance (ANOVA) à un facteur, suivie d'un test post-hoc de Tukey, a été réalisée pour comparer les fractions au sein d'une même condition.

Les analyses statistiques et la création des figures ont été effectuées sous RStudio (version 2024.04.2 +764) puis les figures ont été modifiées manuellement (couleurs, taille de la police, ajout des valeurs de significativité, organisation des éléments sur une même figure) à l'aide du logiciel Inkscape (version 1.3.2). La significativité statistique a été retenue pour une p-value inférieure à 0,05.

3. Résultats

3.1. Salinité et pH

La salinité de l'ensemble des cultures et des blancs a varié entre 38 et 41 ppm, sans différence significative entre les conditions limitées et non limitées (**Figure 54**). Ces faibles variations de salinité traduisent des petites différences d'évaporation (et donc de bullage) d'une culture à l'autre qui ont été prises en compte dans le calcul final des concentrations cellulaires.

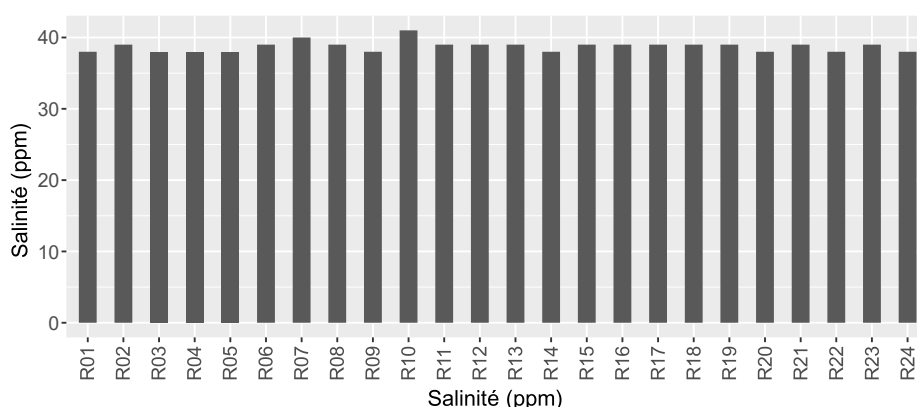


Figure 54 : Salinité mesurée à partir de la fraction Fr-SN de chaque culture et blanc.

Le pH mesuré dans le surnageant des cultures en fin d'expérience est, pour la majorité des cultures limitées et non limitées, resté inférieur à 9, soit un niveau où la concentration en CO_2 n'est pas limitante pour la croissance des microalgues (**Figure 55**). Il est cependant significativement plus élevé dans les cultures non limitées, ce qui est un résultat attendu en raison d'une plus grande utilisation du CO_2 dans ces dernières.

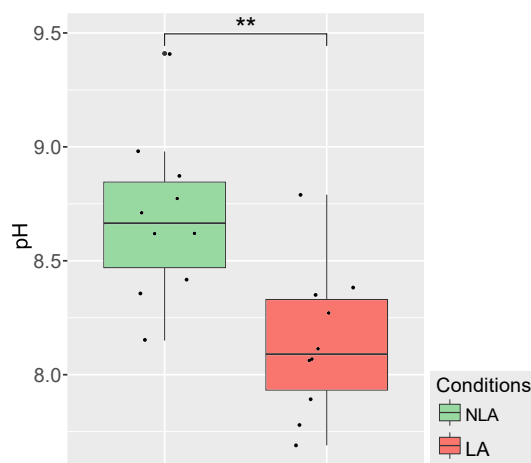


Figure 55 : pH mesuré en fin d'expérience dans le surnageant des cultures limitées en N (**LA**) ou non (**NLA**). Différence significative **: p-value < 0,01.

3.2. Azote résiduel et statut azoté

Les mesures de nitrate résiduel réalisées en fin d'expérience sont conformes à ce qui était attendu, c'est-à-dire indiquant des concentrations supérieures à 100 μM dans les cultures non limitées et des niveaux indétectables dans les cultures limitées.

Cependant, comme signalé plus haut, ces mesures ne permettent pas de connaître précisément le statut azoté des cellules, ce que permet par contre la mesure du rapport C:N. Il convient toutefois de souligner que le rapport C:N mesuré dans notre expérience, qui est la moyenne des rapports de toutes les particules retenues sur le filtre pondérée par leur contribution relative, ne concernent pas uniquement, pour les fractions Fr-L123 et Fr-BF, les cellules algales, mais aussi les bactéries et autres molécules constitutives de la matrice, principalement des EPS riches en C. Moyennant cette remarque, les **Figure 56B et C** montrent que les rapport C:N sont très différents entre les cultures limitées et non limitées, et ce pour toutes les fractions appartenant aux biofilms (**Figure 56A**). Ceci confirme que notre protocole a permis d'échantillonner le métabolome de biofilms ayant des statuts azotés très contrastés (limités versus non limités), même si les données du rapport C:N ne permettent pas d'établir quel processus a le plus contribué à ce contraste : modification du statut azoté des cellules algales ou modification de la production d'EPS. Les rapports C:N mesurés dans le surnageant des cultures limitées et non limitées en N présentent une différence (respectivement $4,1 \pm 1,4$ et $5,3 \pm 3,1$ en moyenne) qui, bien que non significative, est conforme avec la modification attendue du statut azoté des cellules. Cette différence, plus marquée dans les fractions Fr-L123 et Fr-BF, est significative, mais la présence d'EPS dans ces fractions rend impossible de l'interpréter comme résultant seulement de la réponse du statut azoté des cellules algales. Le fait que ce rapport soit plus important dans les couches les plus profondes du biofilm (Fr-BF vs. Fr-L123) peut cependant être interprété comme résultant d'un gradient de disponibilité du NO_3^- , celle-ci décroissant dans l'épaisseur du biofilm.

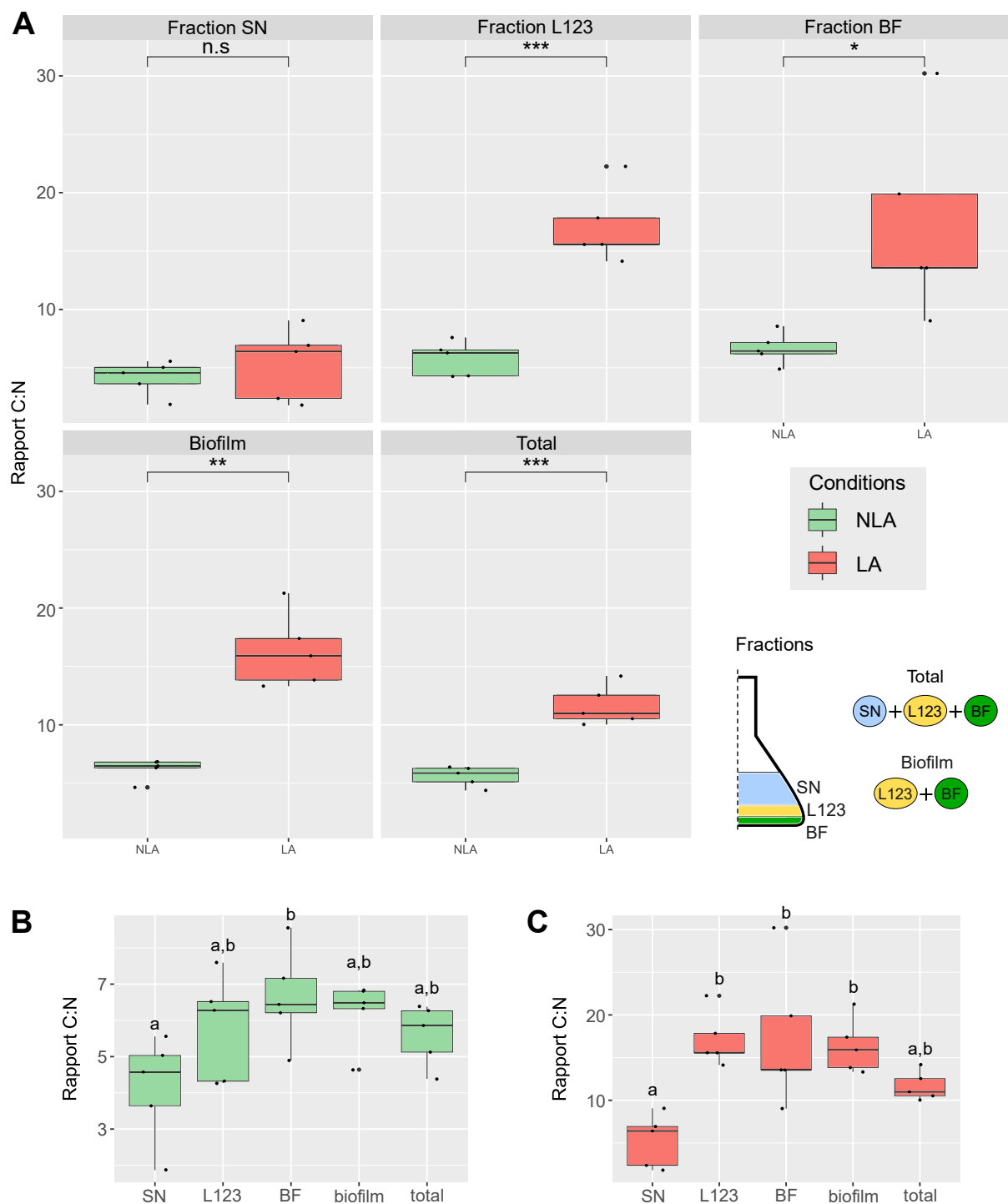


Figure 56 : A) Rapport C:N mesuré dans les différentes fractions de biofilms de *T. suecica* AC254 dans des cultures limitées en N (LA) ou non (NLA). SN : cellules dans le surnageant ; L123 : cellules moyennement adhérentes ; BF : cellules fortement adhérentes ; biofilm : somme des fractions L123 et BF ; total : somme des fractions SN et biofilm. (n.d.) : pas de différence significative, (*) : p-value < 0,05, (**) p-value < 0,01 et (***) p-value < 0,001. **B)** Rapport C :N dans les fractions des cultures NLA. **C)** Rapport C :N dans les fractions des cultures LA. Dans les figures **B)** et **C)**, les différences sont significatives quand les lettres minuscules au-dessus des boîtes à moustaches sont différentes.

3.3. Concentration cellulaire, diamètre cellulaire et biovolume

Les cellules adhérentes, c'est-à-dire appartenant aux fractions Fr-L123 et Fr-BF, représentent environ 80% de la totalité des cellules des cultures en erlenmeyer, ce qui signifie que la grande majorité des cellules produites sont dans les biofilms, et que seule une petite proportion demeure en suspension (**Figure 57B,C**)¹. Ceci nous rassure sur le fait que le mode de production de biofilm en erlenmeyer doté d'un agitateur que nous avons expérimenté était approprié. La prédominance des cellules adhérentes par rapport aux cellules en suspension se vérifie pour les cultures limitées et non limitées, et pour les deux descripteurs des microalgues (concentration cellulaire (**Figure 57B,C**) et biovolume (**Figure 58B,C**). Des différences notables existent cependant entre les deux conditions azotées, la concentration cellulaire des biofilms étant significativement plus importante dans les cultures non limitées (**Figure 57A**). Il est également intéressant de voir que cette différence n'existe pas pour les biovolumes qui ne sont pas significativement différents dans les cultures limitées et non limitées (**Figure 58A**). Le corolaire de ces deux dernières observations est que le diamètre moyen des cellules est significativement plus élevé dans les cultures limitées, et ce pour toutes les fractions (**Figure 59A,B,C**).

¹ Les différentes fractions ayant été remises en suspension dans le même volume d'eau de mer avant comptage, les concentrations représentées sur les figures peuvent être comparées comme le serait le nombre total de cellules par fraction.

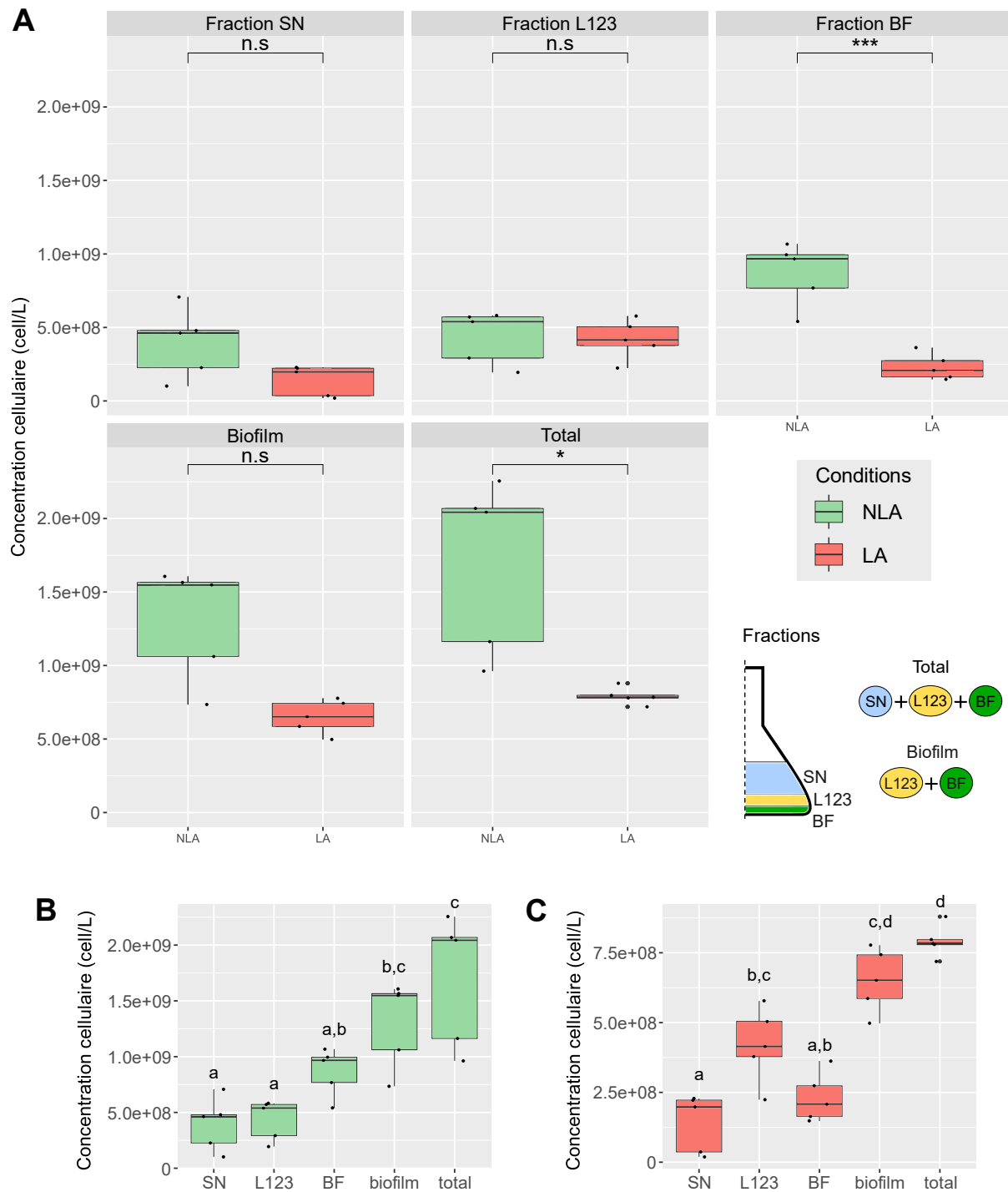


Figure 57 : A) Concentration cellulaire mesurée dans les différentes fractions de biofilms de *T. suecica* AC254 dans des cultures limitées en N (LA) ou non (NLA). SN : cellules dans le surnageant ; L123 : cellules moyennement adhérentes ; BF : cellules fortement adhérentes ; biofilm : somme des fractions L123 et BF ; total : somme des fractions SN et biofilm. (n.d.) : pas de différence significative, (*) : p-value < 0,05, (**) p-value < 0,01 et (***) p-value < 0,001. **B)** Concentration cellulaire dans les fractions des cultures NLA. **C)** Concentration cellulaire dans les fractions des cultures LA. Dans les figures B) et C), les différences sont significatives quand les lettres minuscules au-dessus des boîtes à moustaches sont différentes.

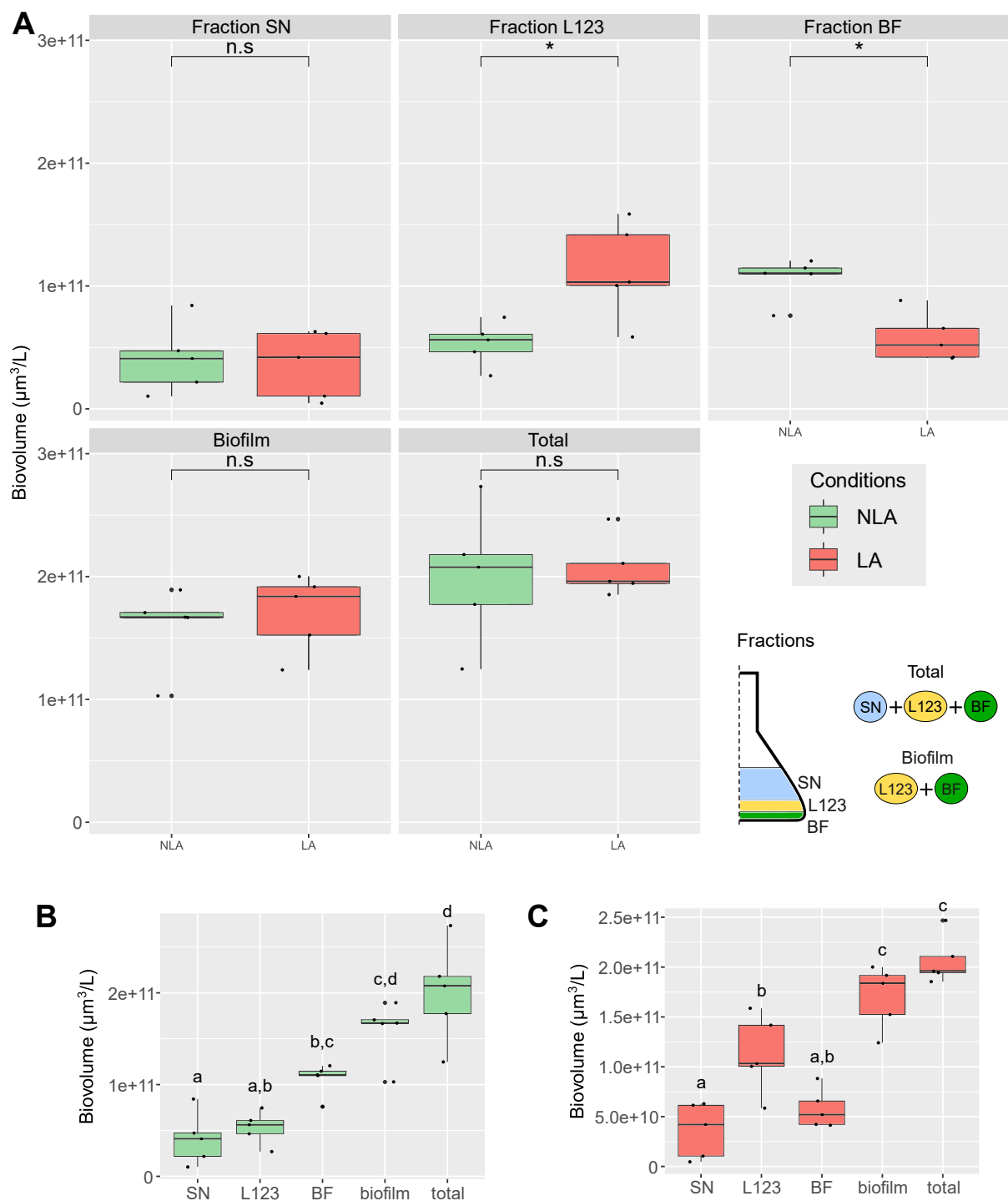


Figure 58 : A) Biovolume cellulaire mesuré dans les différentes fractions de biofilms de *T. suecica* AC254 dans des cultures limitées en N (LA) ou non (NLA). SN : cellules dans le surnageant ; L123 : cellules moyennement adhérentes ; BF : cellules fortement adhérentes ; biofilm : somme des fractions L123 et BF ; total : somme des fractions SN et biofilm. (n.d.) : pas de différence significative, (*) : p-value < 0,05, (**) p-value < 0,01 et (***) p-value < 0,001. **B)** Biovolume cellulaire dans les fractions des cultures NLA. **C)** Concentration cellulaire dans les fractions des cultures LA. Dans les figures B) et C), les différences sont significatives quand les lettres minuscules au-dessus des boîtes à moustaches sont différentes.

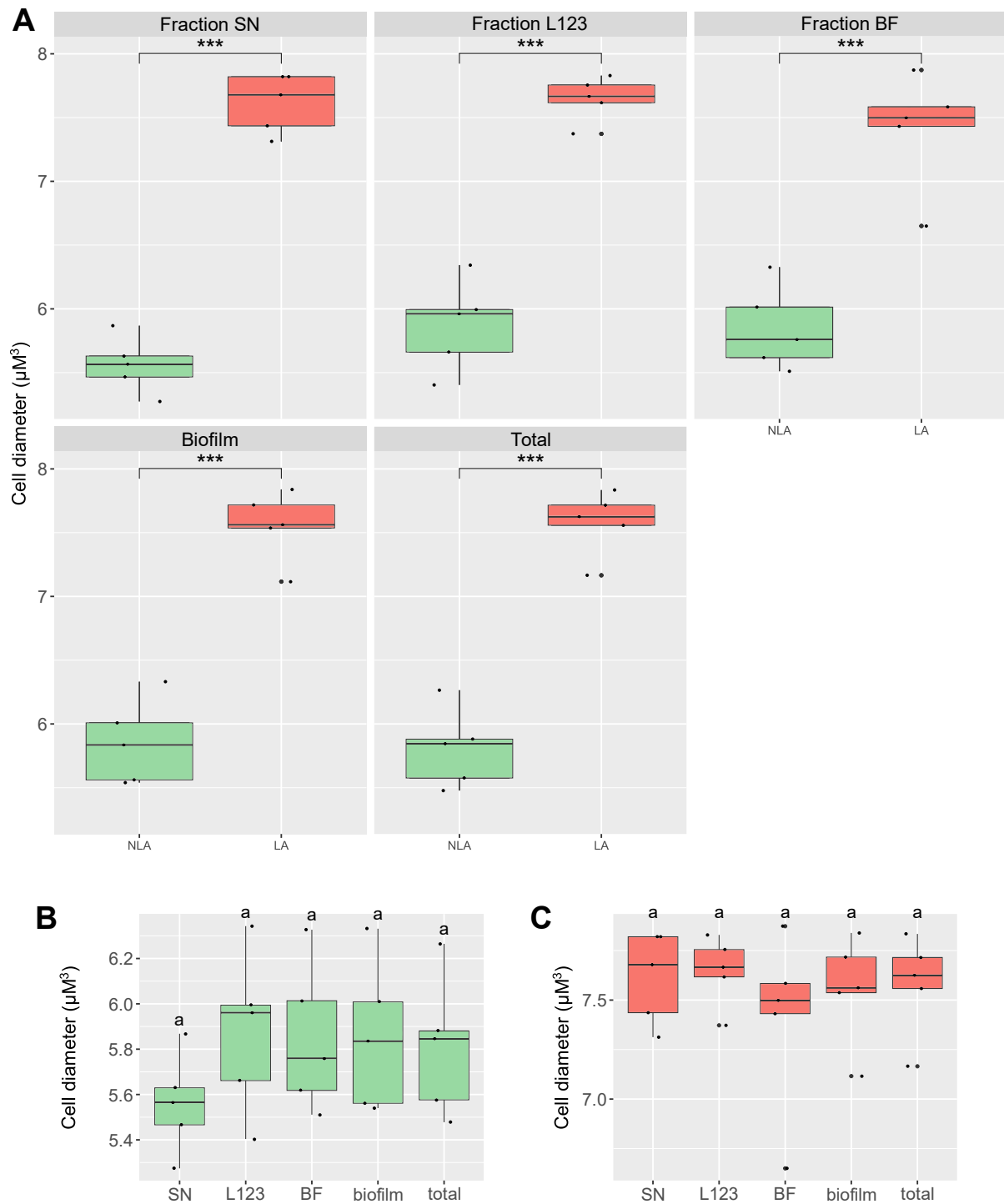


Figure 59 : A) Diamètre cellulaire moyen mesuré dans les différentes fractions de biofilms de *T. suecica* AC254 dans des cultures limitées en N (LA) ou non (NLA). SN : cellules dans le surnageant ; L123 : cellules moyennement adhérentes ; BF : cellules fortement adhérentes ; biofilm : somme des fractions L123 et BF ; total : somme des fractions SN et biofilm. (n.d.) : pas de différence significative, (*) : p-value < 0,05, (**) p-value < 0,01 et (***) p-value < 0,001. **B)** Diamètre cellulaire moyen dans les fractions des cultures NLA. **C)** Diamètre cellulaire moyen dans les fractions des cultures LA. Dans les figures B) et C), les différences sont significatives quand les lettres minuscules au-dessus des boîtes à moustaches sont différentes.

3.4. Cytométrie en flux

Une analyse des échantillons au cytomètre en flux a été réalisée pour estimer les proportions respectives de bactéries et de microalgues dans les biofilms. Les premières mesures n'étant pas en accord avec les concentrations cellulaires de *T. suecica* mesurées au compteur de particules, une nouvelle analyse des échantillons a été programmée mais trop tard pour être utilisée dans cette thèse.

3.5. Activité photosynthétique et pigments

Le rendement quantique de la photosynthèse (ϕ) mesuré en fin d'expérience varie entre 0,6 et 0,7 parmi les différentes fractions des biofilms non limitées par l'N (**Figure 60**). Ces différences entre fractions ne sont pas significatives, ce qui suggère que les légères différences de statut azoté observées entre ces mêmes fractions (**Figure 56**) ne se sont pas répercutées sur leur efficacité photosynthétique, qui approche la valeur théorique optimale de 0,7. Ces valeurs contrastent significativement (p-value < 0,05, test t) avec celles mesurées dans les fractions des cultures limitées en N qui sont pour la plupart inférieures à 0,5, traduisant une capacité photosynthétique altérée par la limitation en N.

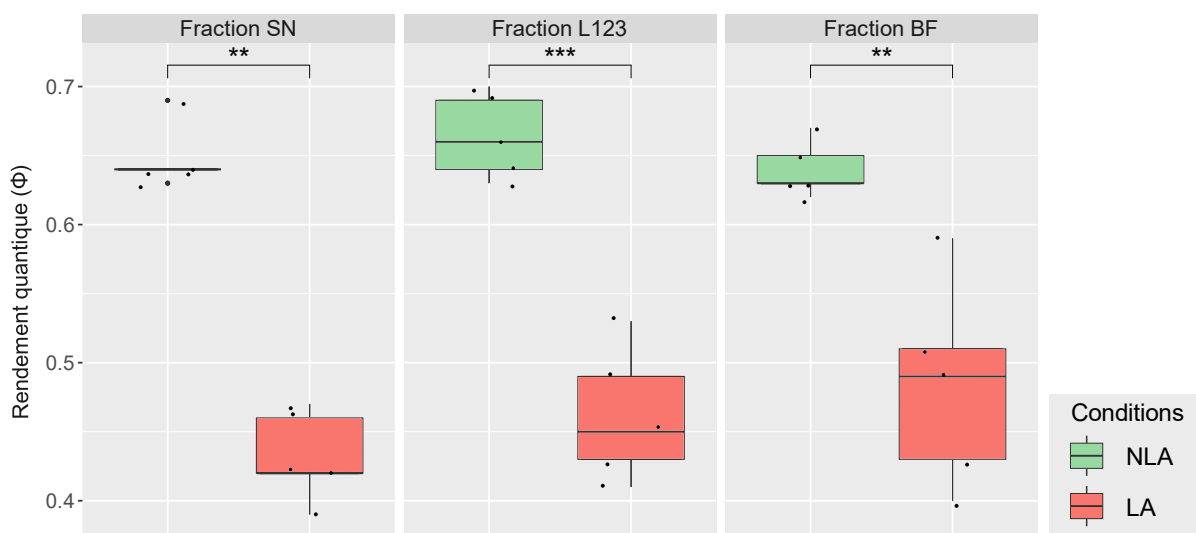


Figure 60 : Rendement quantique (ϕ) mesuré dans les différentes fractions de biofilms de *T. suecica* AC254 dans des cultures limitées en N (LA) ou non (NLA). SN : cellules dans le surnageant ; L123 : cellules moyennement adhérentes ; BF : cellules fortement adhérentes ; ** : p-value < 0,01 ; *** : p-value < 0,001.

Une analyse par chromatographie liquide a permis de détecter 9 pigments. Les pigments photosynthétiques : chlorophylle *a* (TChl *a*) et phéophytine *a*, accessoires : chlorophylle *b* (TChl *b*), caroténoïdes intervenant dans la photoprotection (le cycle des xanthophylles (quenching non photochimique), propriétés antioxydantes) : néoxanthine (NeoX), violaxanthine (ViolaX), anthéroxanthine (AntheraX), zéaxanthine (ZeaX), lutéine) et des carotènes non spécifiés. À noter que l'ensemble des fractions NLA comportait de très petites quantités de bactériochlorophylle *a* (BChl *a*, de $3,73 \cdot 10^{-6}$ à $5,50 \cdot 10^{-5}$ pg. μm^{-3}), laquelle était indétectable dans les fractions LA (concentration inférieure à la limite de détection de $2,4 \cdot 10^{-10}$ pg. μm^{-3}).

La **Figure 61** montre que les teneurs cellulaires de la plupart de pigments mesurés en fin d'expérience sont significativement plus faibles dans les biofilms limités par l'N, et ce pour toutes les fractions. Cette réduction, de l'ordre de 18% pour TChl *a* et TChl *b*, est similaire dans les différentes fractions (TChl*a* : p-values < 0,01, TChl*b* : p-values < 0,05, test t). Il est également à noter que les teneurs cellulaires en TChl *a* et TChl *b* mesurées dans les cultures LA et NLA ne sont pas significativement différentes d'une fraction à l'autre.

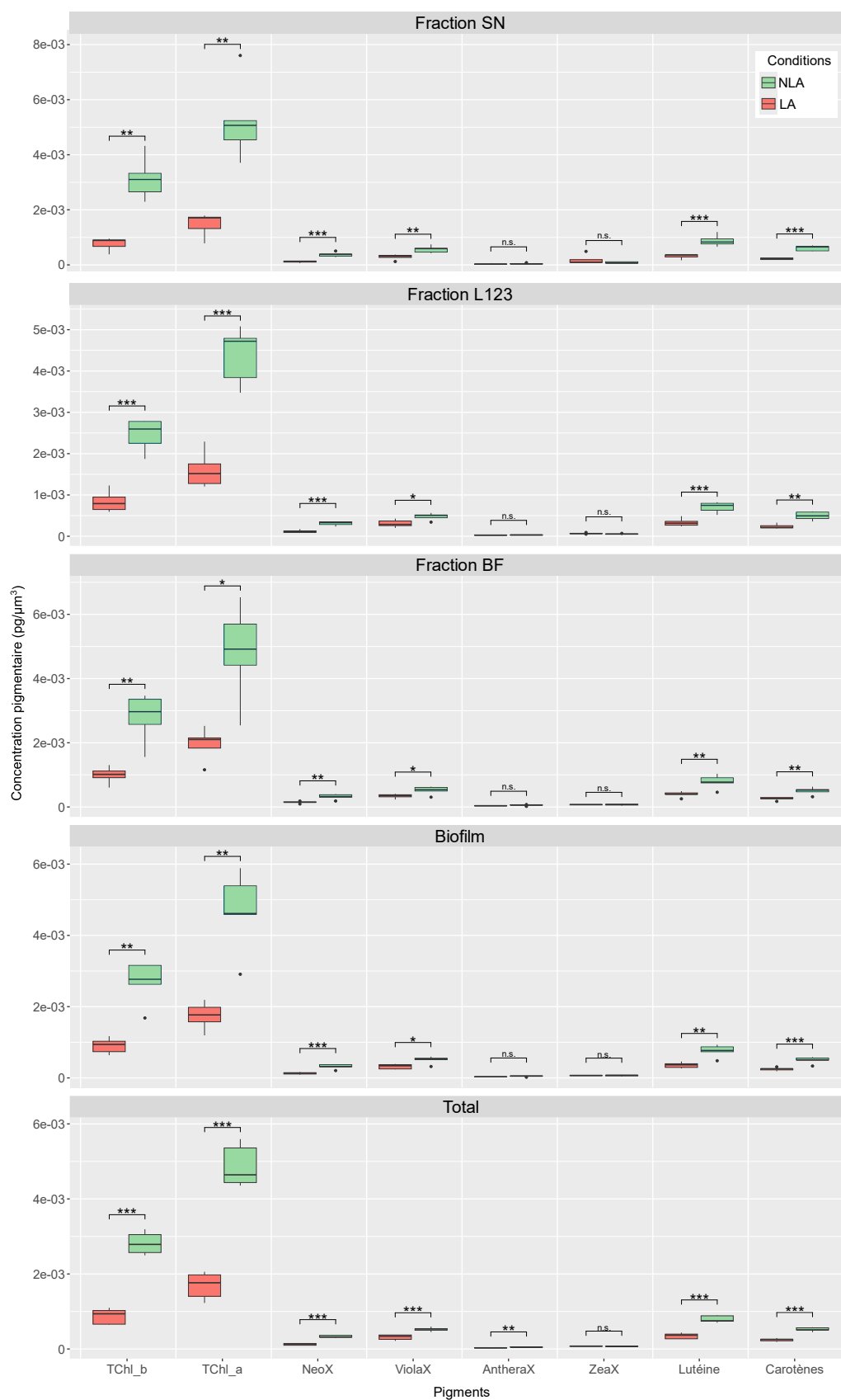


Figure 61 : Pigments par unité de biovolume cellulaire mesurés dans les différentes fractions de biofilms de *T. suecica* AC254 dans des cultures limitées en N (LA) ou non (NLA). SN : cellules dans le surnageant ; L123 : cellules moyennement adhérentes ; BF : cellules fortement adhérentes ; Biofilm : somme des fractions L123 et BF ; Total : somme des fractions SN et biofilm ; n.s. : pas de différence significative ; * : p-value < 0,05 ; ** : p-value < 0,01 ; *** : p-value < 0,001.

3.6. ATR-FTIR

Si les mesures ATR-FTIR ne permettent pas de connaître les valeurs absolues des teneurs cellulaires des différentes familles de molécules, elles renseignent néanmoins sur leurs proportions relatives.

Dans nos mesures, la bande amide I présente un décalage vers 1640 cm^{-1} pour les fractions de la condition LA et vers 1650 cm^{-1} pour celles de la condition NLA. Dans l'ensemble, les différents spectres suivent une même dynamique : une bande vers $1650\text{-}1640\text{ cm}^{-1}$ (amide I), une autre vers 1545 cm^{-1} (amide II), une ondulation sans pic différencié entre 1480 et 1190 cm^{-1} , et 3 pics localisés autour de 1150 , 1075 et 1015 cm^{-1} (carbohydrates) (**Figure 62A**). Les pics à 1745 cm^{-1} , correspondant probablement à des lipides et acides gras, sont cependant peu prononcés dans la condition NLA mais bien visibles pour toutes les fractions de la condition LA. Toutefois, l'intensité relative de la fraction Fr-SN et, dans une moindre mesure de la fraction Fr-L123, sont similaires pour les conditions NLA et LA. De plus, la fraction Fr-BF de la condition LA présente l'intensité relative la plus grande (1745 cm^{-1}) tandis que cette même fraction présente l'intensité la plus faible pour la condition NLA. Les intensités des bandes amide II des fractions Fr-SN et Fr-L123 sont plus faibles que les autres. Enfin, la condition LA présente des pics situés entre 1180 et 950 cm^{-1} plus importants que ceux de la condition NLA. Pour la condition LA et à l'exception du pic à visible 1150 cm^{-1} , les fractions Fr-SN présentent les intensités relatives les plus grandes, ce qui suggère une teneur en carbohydrate plus élevée par rapport au biofilm.

La **Figure 62B** montre que dans les biofilms limités en N (condition LA), les carbohydrates et les lipides sont, relativement aux protéines, plus importants que dans les biofilms non limités (condition NLA). Ces différences, qui sont significatives dans les fractions Fr-L123 et Fr-BF¹, sont, bien que logiques, difficiles à interpréter car elles peuvent résulter de diverses réponses de cellules faisant face à une limitation de la ressource azotée (condition LA). Celles-ci peuvent en effet soit voir leur pool de protéines se réduire, soit voir leurs réserves de carbohydrates augmenter (le carbone fixé, ne pouvant s'associer à de l'N fraîchement incorporé pour former des AAs, est transitoirement stocké sous forme de sucres et de lipides), et ces deux réponses peuvent aussi coexister.

¹ Durant l'expérience, cinq échantillons appartenant à la fraction Fr-SN ont été perdus ou n'ont pas pu être analysés par manque de matière. Aucune statistique n'a pu être effectuée avec la fraction Fr-SN de la condition LA (liste des échantillons : NL1_R14_SN, NLA_R17_SN, CA_R20_SN et CA_R21_SN, NLA_R24_SN).

La **Figure 62C** montre aussi que le rapport lipides/protéines des cultures non limitées en N (condition NLA), est significativement plus élevé dans le surnageant que dans le biofilm, et que le rapport carbohydrates/protéines des cultures limitées en N semble augmenter avec la profondeur du biofilm. Bien que cette tendance ne soit pas statistiquement significative, elle est en accord avec l'évolution du rapport C:N mesuré (voir **Figure 56**).

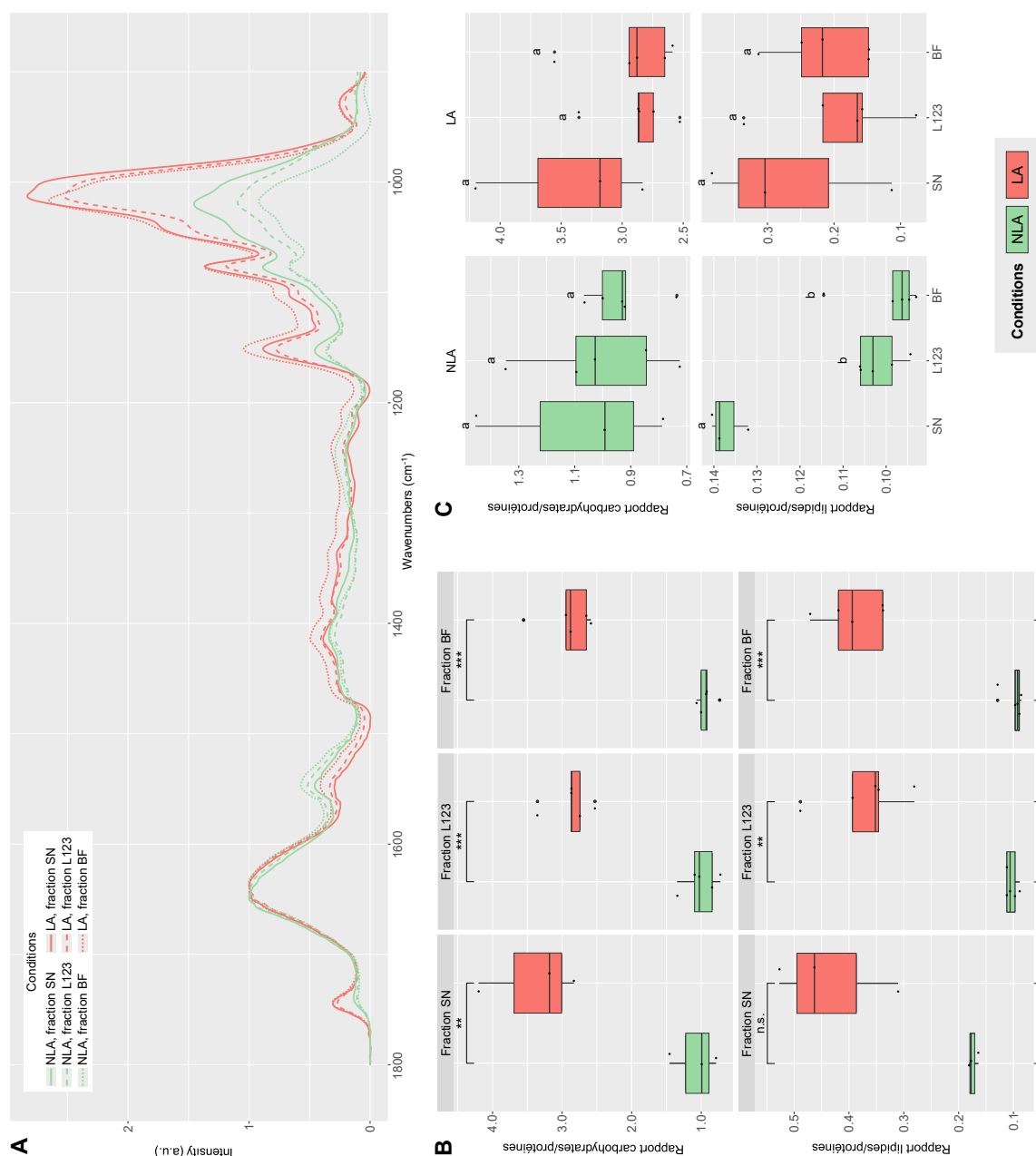


Figure 62 : Compositions relatives en carbohydrates, lipides et protéines dans les biofilms de *T. suecica* AC254 pour des cultures limitées en N (LA) ou non (NLA) estimées par spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier (ATR-FTIR). **A)** Exemple de spectres d'ATR-FTIR acquis entre 900 et 1800 cm⁻¹ et normalisés par la valeur maximale de la bande Amide I (1700-1600 cm⁻¹), afin de faciliter leur comparaison. SN : cellules en suspension dans le surnageant, L123 : cellules moyennement adhérentes, BF cellules fortement adhérentes. **B)** Rapports carbohydrates/protéines et lipides/protéines pour les conditions NLA et LA. (n.d.) pas de différences significatives, (*) p-value < 0,05, (**) p-value < 0,01 et (***) p-value < 0,001. **C)** Rapports carbohydrates/protéines et lipides/protéines pour les conditions NLA et LA. Les différences sont significatives quand les lettres minuscules au-dessus des boîtes à moustaches sont différentes.

3.7. Analyses métabolomiques

A l'issue de l'analyse des échantillons par LC-MS et de leur traitement statistique, un total de 2306 ions ont été identifiés, dont seulement 120 ont été conservés après filtrations (soustraction des blancs, identification et suppression des contaminants, élimination de QC et échantillons incohérents ; pour plus de détails, voir **Annexe 7** et **Annexe 8**). Trois méthodes d'analyses statistiques multivariées ont ensuite été utilisées : (i) l'analyse en composantes principales (ACP), (ii) l'analyse discriminante des moindres carrés partiels (PLS-DA), et (iii) la *heatmap*.

Initialement, les QCs se localisent entre les groupes d'échantillons NLA et LA sur l'ACP, avec un léger décalage sur le deuxième axe de la projection. Ce décalage a permis d'identifier la présence d'un grand nombre de contaminants dans les QCs et de les éliminer manuellement. Les QCs sont tous localisés au même endroit, critère d'une bonne qualité de l'analyse et de la projection, à l'exception du QC n°5. Ce dernier QC analysé a montré un profil anormal par rapport aux autres, probablement dû à une évaporation de l'extrait durant l'analyse. Ce QC a donc été supprimé avant la poursuite des analyses statistiques. L'ACP différencie très nettement les groupes de chaque traitement azoté, avec une bonne représentativité de la projection (les deux premières dimensions représentent 66,1% et 77,9% de la variance totale avant et après l'élimination de l'échantillon R09, respectivement)¹ (**Figure 63A**). La distinction se fait majoritairement sur la première dimension (PC 1) avec une variance de 56%. Ces résultats nous rassurent sur le fait que la limitation en N a une signature significative au niveau du métabolome de *T. suecica* en biofilm.

La PLS-DA est une méthode d'analyse statistique supervisée qui est utilisée pour détecter les variables, ici les métabolites, les plus impliquées dans la discrimination entre les groupes d'échantillons (*Variable Importance in Projection*, VIPs). Appliquée à notre jeu de données, la projection de la PLS-DA montre logiquement une distinction entre les échantillons des condition NLA et LA, ce qui est en accord avec les conclusions de l'ACP, avec en outre une représentativité (les deux premières dimensions représentent 66,5% de la variance totale) et une fiabilité statistique satisfaisante (test de permutation : $R^2 > 0,99$, $Q^2 = 0,90$) (**Figure 63B**). Quelques-uns des métabolites les plus discriminants (VIP score > 1,3) sont identifiés et

¹ L'échantillon R09 de la condition NCA a été éliminé de la suite des analyses du fait de sa position intermédiaire entre les deux conditions azotées.

caractérisés grâce à l'analyse de leur spectre MS/MS. Au total, 36 métabolites d'intérêt sont sélectionnés et leur représentation sous forme de carte thermique (ou *heatmap*) combinant variables, conditions et échantillons, montre que 26 métabolites sont sur-exprimés dans la condition NLA contre 10 dans la condition LA (**Figure 63C**). Parmi les 36 métabolites d'intérêt, plusieurs sont identiques, mais soit présentent des adduits différents (tels que $[M + H]^+$, $[M - H + H_2O]^+$, $[M + NH_4]^+$ ou $[M + Na]^+$), soit correspondent à des fragments *In-Source* (ISF). Après prise en compte de ces doublons, 26 métabolites sont finalement identifiés, dont 16 sont sur-exprimés en condition NLA et 9 en condition LA.

À partir des données MS/MS, 5 glycosyldiacylglycérols et 2 glycosphingolipides¹ (HexCer) sont partiellement caractérisés (voir **Figure 64**). Les glycosyldiacylglycérols comprennent 3 monogalactosyldiacylglycérols (MGDG)² et 2 digalactosyldiacylglycérols³. Les positions des doubles liaisons dans les chaînes carbonées des groupes d'acides gras ou des sphingosines de chacune de ces molécules n'ont encore été localisées. L'ensemble de ces métabolites sont sur-exprimés dans la condition NLA. Aucun des métabolites surexprimés dans la condition LA n'a pu être identifié.

¹ HexCer(d18:1/16:1(2O)) (VIP n°5) et le HexCer(d18:2/16:1(2O)) (VIP n°15)

² MGDG (20:5/16:4) (VIP n°17), MGDG (18:4/16:4) (VIP n°19) et MGDG (18:3/16:4) (VIP n°26)

³ DGDG (DGDG (18:3/16:4) (VIP n°3) et DGDG (18:3/16:3) (VIP n°20))

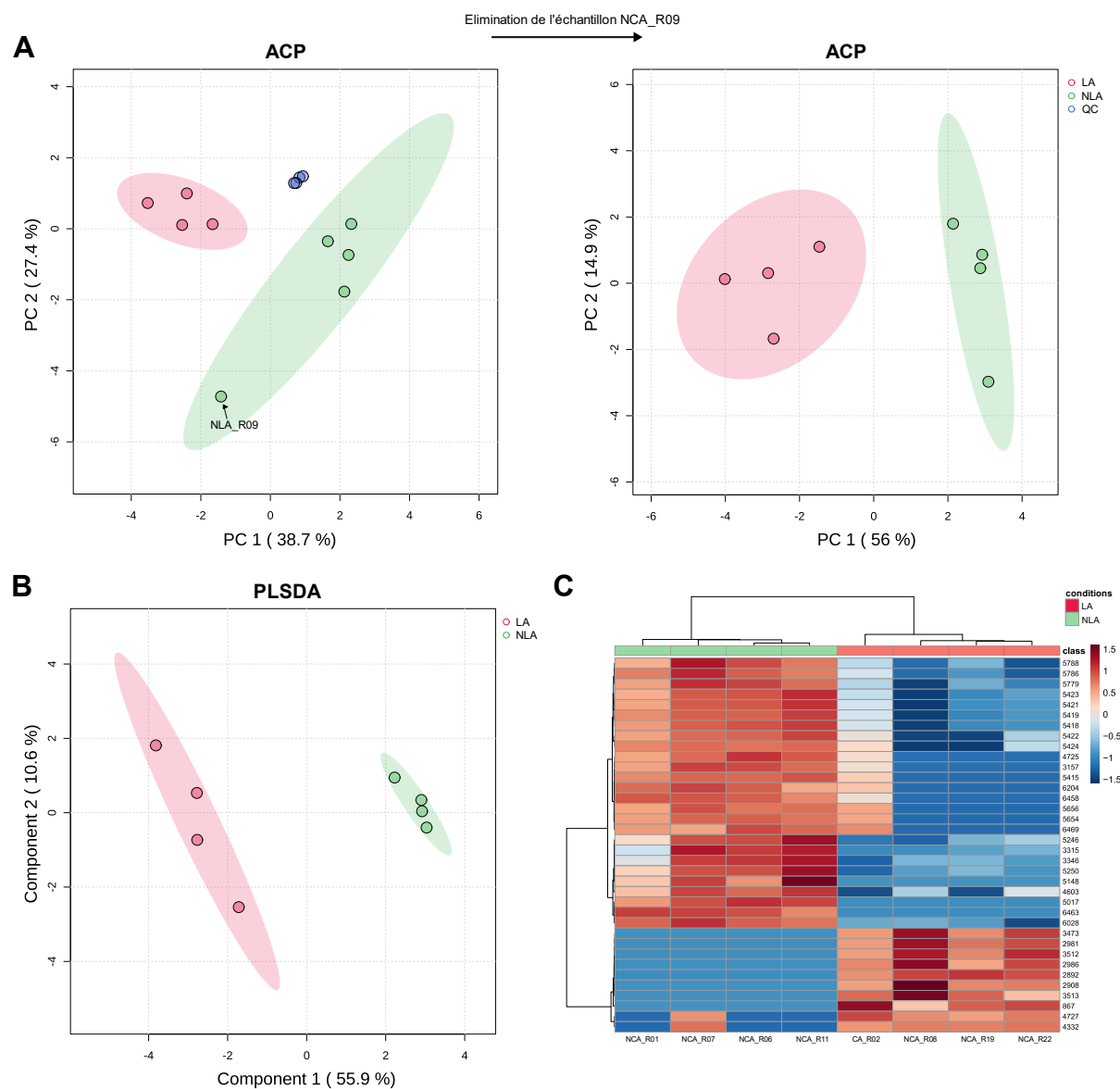


Figure 63 : Analyse multivariée des données UHPLC-ESI(+)-QToF-MS provenant d'extraits MeOH de biofilms de *T. suecica* AC254 cultivés dans des conditions limitées en N (LA) ou non (NLA). **A)** ACP avant et après élimination de l'échantillon NLA_R09. **B)** PLS-DA. **C)** Carte thermique (heatmap). Seules les 36 variables, ici des métabolites, les plus discriminantes dans l'analyse (VIPs) y sont représentées. Les nuances de couleur rouge et bleu indiquent respectivement une sur-expression et une sous-expression relative de la variable. Les analyses et les graphiques ont été réalisés à l'aide de MetaboAnalyst (ver. 6.0).

A

N° VIP	Nom de l'ion	Score VIP	Mass isotopique	Type d'ion	Formule moléculaire	Famille chimique	Molécule	Fold change
1	6463	1.86	732.5799	[M + H] ⁺	C ₅₁ H ₇₅ NO ₂ ou C ₄₄ H ₇₉ NO ₇			
2	2892	1.8146	348.2025 (*)	[M + H] ⁺ (*)	C ₁₆ H ₂₉ NO ₇ ou C ₁₇ H ₂₅ N ₅ O ₃ (*)			
3	5017	1.7887	929.5184	[M + Na] ⁺	C ₄₉ H ₇₈ O ₁₅	Glycosyldiacylglycérols	DGDG (18:3/16:4)	
4	3512	1.6705	617.5235	[2M + Na] ⁺	C ₁₈ H ₃₅ NO ₂			
5	6458	1.6208	714.5502	[M + H] ⁺	C ₄₀ H ₇₃ NO ₉	Glycosphingolipides	HexCer(d18:1/16:1(20))	
6	2981	1.6158	252.2346	[M - H ₂ O + H] ⁺	C ₁₆ H ₃₁ NO ₂			
7	3473	1.5914	318.2414	[M + Na] ⁺	C ₁₈ H ₃₃ NO ₂			
8	867	1.5448	430.9137					
9	2986	1.539	292.2256	[M + Na] ⁺	C ₁₆ H ₃₁ NO ₂			
10	3157	1.5263	599.4102	[M + H] ⁺	C ₄₀ H ₅₄ O ₄			
11	3315	1.4871	648.45					
12	4725	1.4759	593.279					
13	6204	1.4439	551.4255	[M + H] ⁺	C ₄₀ H ₅₄ O	Carotènes	?	
14	5148	1.4326	423.317					
15	6028	1.4202	712.5365	[M + H] ⁺	C ₄₀ H ₇₃ NO ₉	Glycosphingolipides	HexCer(d18:2/16:1(20))	
16	2908	1.4142	310.2388	[M + H] ⁺	C ₁₈ H ₃₁ NO ₃			
17	5656	1.4128	786.5176	[M + NH ₄] ⁺	C ₄₃ H ₆₈ O ₁₀	Glycosyldiacylglycérols	MGDG (20:5/16:4) (**)	
18	4332	1.3932	777.5356					
19	5418	1.351	760.5020	[M + NH ₄] ⁺	C ₄₃ H ₆₆ O ₁₀	Glycosyldiacylglycérols	MGDG (18:4/16:4)	
20	5250	1.3499	926.5851	[M + NH ₄] ⁺	C ₄₀ H ₈₀ O ₁₅	Glycosyldiacylglycérols	DGDG (18:3/16:3)	
21	4727	1.3278	411.0658					
22	6469	1.3259	716.0328					
23	5424	1.3175	400.2026					
24	4603	1.314	750.5307					
25	3346	1.3065	760.4989					
26	5788	1.3064	745.4873	[M + H] ⁺	C ₄₃ H ₆₈ O ₁₀	Glycosyldiacylglycérols	MGDG (18:3/16:4)	

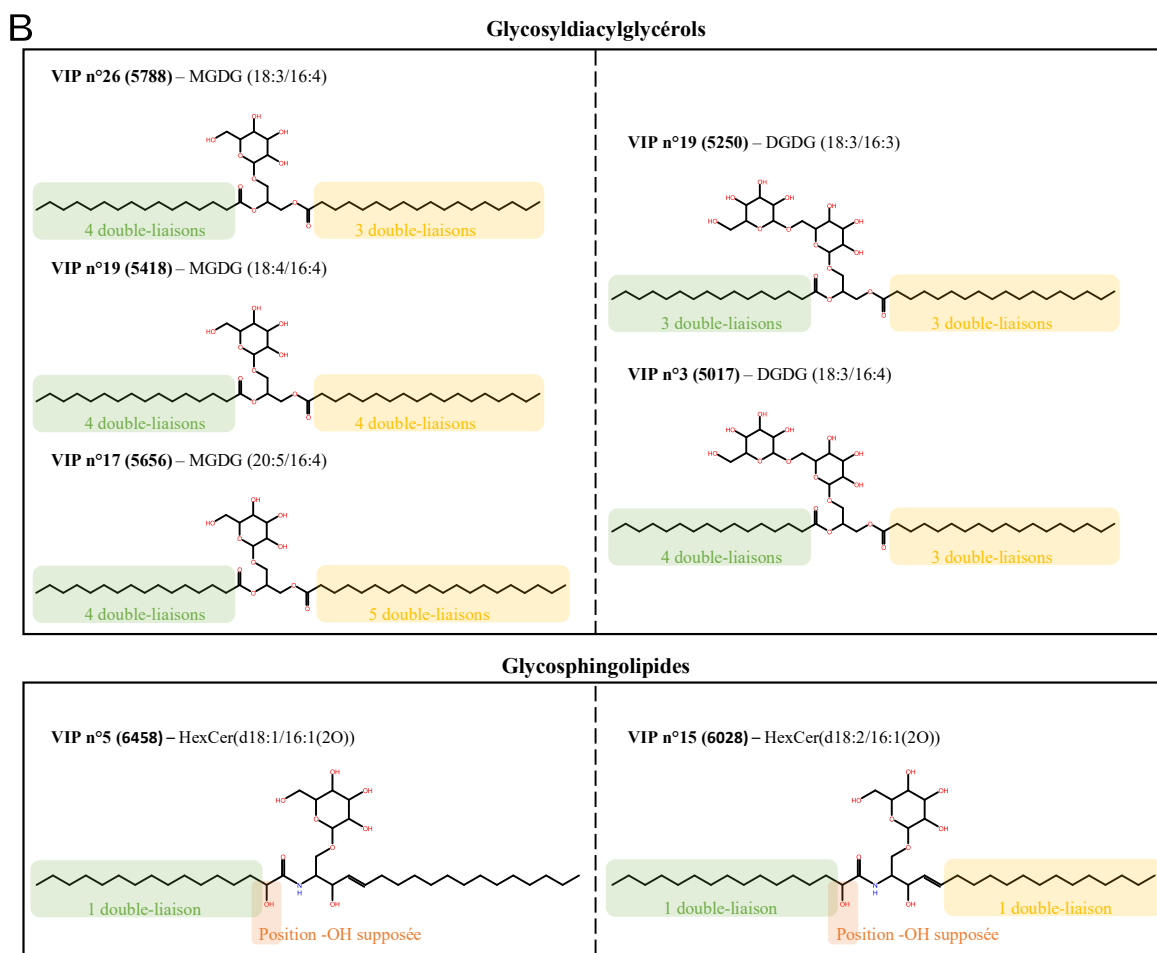


Figure 64 : A) Liste des VIPs obtenues à partir de l'analyse des données UHPLC-ESI(+)-QToF-MS/MS issues de biofilms de *T. suecica* AC254 cultivés dans des conditions limitées en N (LA) ou non (NLA). La formule moléculaire ainsi que la famille et le nom des molécules sont précisées. **B)** Structures moléculaires supposées des métabolites identifiés et caractérisés. (*) Identifié à partir d'un fragment In-Source (ISF). (**) Structure moléculaire supposée, présence de pics non correspondants.

4. Discussion

4.1. Validation du protocole utilisé

Afin de procéder à une analyse correcte de la réponse métabolomique de *T. suecica* en biofilm à une variation de son statut azoté, il était nécessaire qu'*a minima* trois conditions soient remplies : (1) l'analyse métabolomique doit porter sur deux lots de cultures dont le statut azoté est nettement différent ; (2) les autres facteurs de croissance susceptibles d'interagir avec la réponse métabolomique (température, salinité, pH, autres nutriments que l'N, lumière) doivent autant que possible être « égaux par ailleurs », c'est-à-dire identiques dans les cultures limitées et non limitées ; (3) les échantillons dédiés à cette analyse doivent être prélevés sur des lots de cultures d'âges identiques.

Les mesures de NO_3^- résiduel, abondant dans les cultures non limitées et indétectable dans les cultures limitées, constituent le premier indice d'une différence de statut azoté entre les lots NLA et LA. Mais seule la connaissance du quota d'N, dont le rapport C:N est un bon *proxi*, permet de mesurer l'ampleur de cette différence. Ce rapport mesuré dans les biofilms non limités et limités vaut respectivement 0,14 et 0,06 ce qui signifie que les cellules non limitées sont plus de 2 fois plus riches en N que les cellules limitées. L'état de limitation azotée des cultures LA est également corroboré par les valeurs de rendement quantique de la photosynthèse (ϕ), qui sont largement en dessous des valeurs optimales (**Figure 60**). La condition (1) est donc pleinement satisfaite.

Les autres mesures montrent que l'on peut considérer que la condition (2) a été remplie pour la température et la salinité. Pour le pH, une petite différence existe entre les conditions LA (pH $\approx$ 8,69) et NLA (pH $\approx$ 8,14) (**Figure 55**), mais elle se situe dans une gamme où le CO_2 dissous reste abondant (Zeebe & Wolf-Gladrow 2001), et où la photosynthèse reste donc optimale. Si l'on peut raisonnablement supposer que cette différence n'a eu aucun effet sur la photosynthèse, on ne peut cependant pas totalement exclure qu'elle ait eu une répercussion directe sur la physiologie des microalgues et donc sur leur métabolome.

Pour ce qui concerne les nutriments autres que l'N, nous avons pris soin de conserver les mêmes rapports de concentration en micronutriments (métaux traces, vitamines) dans les diverses variantes du milieu f/2 utilisées. Bien que faibles, ces concentrations restent largement en excès par rapport à celles du milieu naturel (Sohrin & Bruland 2011, Pinedo-González *et al.*

2015). De même, les rapports $\text{NO}_3^-/\text{PO}_4^{3-}$ ont été identiques dans les deux conditions LA et NLA. Il a en effet été rapporté que le rapport N:P peut affecter divers composés tels que les pigments ou les lipides chez les microalgues (Song *et al.* 2016). Le PO_4^{3-} résiduel n'ayant pas été mesuré, nous avons veillé à ce que le PO_4^{3-} des milieux de culture soit en excès par rapport au NO_3^- (comparativement au rapport de Redfield) pour s'assurer que le P ne pouvait devenir un facteur limitant. Qu'en est-il du rapport $\text{NO}_3^-/\text{PO}_4^{3-}$ au moment des prélèvements, est-il très différent entre les conditions LA et NLA ? Nous n'avons pas de réponse précise à cette question, bien que l'on puisse raisonnablement penser qu'il ne doit pas être très différent. En effet, il a par exemple été démontré que des cellules de *Chlamydomonas reinhardtii* privées d'N diminuait dans le même temps leur absorption de PO_4^{3-} (Kamalanathan *et al.* 2016).

Pour ce qui concerne la lumière, nous avons fait l'hypothèse que la concentration des cellules devaient être voisines au moment des prélèvements dans les biofilms de chaque condition LA et NLA (en supposant que l'épaisseur d'un biofilm est corrélée en première approximation avec la concentration cellulaire), pour que le gradient lumineux à travers ces derniers soient aussi proches l'un de l'autre que possible. Le modèle de Droop prévoyait des densités algales voisines dans les conditions LA et NLA après 3 jours (**Figure 52**), temps que nous avons donc choisi pour prélever les biofilms – condition (3) remplie – et qui permettaient en outre d'obtenir une biomasse suffisante pour nos analyses. Il convient cependant de remarquer qu'au jour 3, la concentration cellulaire dans les cultures NLA toujours en phase de croissance exponentielle évolue très rapidement (**Figure 53**), et que c'était un pari risqué que de chercher à obtenir des densités algales voisines dans les 2 lots de culture. De fait, nos mesures montrent qu'elle est environ deux fois plus importante dans les cultures NLA que dans les cultures LA au jour 3 (**Figure 57**). Mais fort heureusement, le biovolume cellulaire est voisin dans les deux lots de culture (**Figure 58**), ce qui valide tout de même la condition d'un gradient lumineux comparable entre les deux conditions azotées. Le paradoxe apparent de mesurer des densités cellulaires différentes et des biovolumes identiques sur les lots de cultures LA et NLA s'explique par le fait que le diamètre moyen des populations de microalgues diffère d'un lot à l'autre. Il est en effet plus grand dans les cultures LA (**Figure 59**). Entre le stade de la cellule fille qui est issue d'une division cellulaire et le stade de la cellule mère qui est sur le point de se diviser, la croissance somatique permet à la cellule d'augmenter sa taille tout en accomplissant son cycle cellulaire. Le diamètre moyen des cellules d'une population non synchronisée dont la croissance n'est limitée par aucun facteur va donc se situer entre les diamètres moyens des cellules filles et des cellules mères. Lorsqu'un facteur devient limitant

pour la croissance, un nombre croissant de cellules ne pouvant plus se diviser se bloquent dans la phase de leur cycle cellulaire qui précède la mitose et la division cellulaire, où elles ont une taille voisine de celle d'une cellule mère. Dans cette situation, le diamètre moyen de la population est plus élevé que celui d'une population dont la croissance n'est pas limitée. L'augmentation du diamètre cellulaire a fréquemment été observée chez des microalgues dont la croissance devient limitée par un nutriment ([Mocquet et al. 2013](#), [Yap et al. 2016](#)). Il convient donc de garder en mémoire que notre protocole de limitation azotée non seulement impacte différemment les métabolismes du C et de l'N dans chaque lot, mais induit aussi des distributions différentes des positions dans leur cycle cellulaire.

4.2. Influence de la limitation en nitrate sur la production macromoléculaire des biofilms

La diminution des protéines et l'accumulation des lipides sont des réponses couramment observées chez les microalgues limitées par l'N ([Kamalanathan et al. 2016](#), [Tarazona Delgado et al. 2021](#), [Yaakob et al. 2021](#)), avec cependant des disparités entre les différentes espèces. [Lim et al. \(2017\)](#) observent que *Tetraselmis* sp. M8 privée d'N voit dans un premier temps une réduction de sa consommation de lipides, suivie par une production active et une accumulation intracellulaire d'acides gras (AGs) saturés (AGSs) et monoinsaturés (AGMIs). Ces résultats corroborent ceux d'[Adarme-Vega et al. \(2014\)](#) qui observent que les voies de biosynthèse des AGs de cette espèce sont positivement régulées quand celle-ci est co-limitée par l'N et le P. Cependant, *T. suecica* présente une réponse physiologique différente. A l'instar de la chlorophyte *Isochrysis zhangjiangensis* ([Feng et al. 2011](#)), *T. suecica* favorise la production de lipides ou de carbohydrates suivant qu'elle est non limitée ou limitée par l'N. En effet, [D'Souza & Kelly \(2000\)](#) rapportent que des conditions appauvries en N multiplient par trois la teneur en glucides chez la souche CS-187, tandis que les protéines et les lipides diminuent légèrement, tendance également observée par [Lourenço et al. \(1997\)](#) chez *T. gracilis* C1. De la même manière, une colimitation par l'N et le P ne semble pas avoir d'effets sur la teneur en lipides de *T. suecica* F&M-M33, alors qu'une augmentation des carbohydrates de plus 50% est observée ([Rodolfi et al. 2009](#), [Bondioli et al. 2012](#)). Chez *T. suecica* CCMP906, ces réponses physiologiques se manifestent également par la baisse des transcrits impliqués dans la synthèse d'AAs et par la dégradation des glucides ([Lauritano et al. 2019](#)). À l'inverse, les transcrits impliqués dans la biosynthèse des lipides ne sont pas influencés par une limitation en N

(Lauritano *et al.* 2019). L'amidon est la forme principale d'accumulation des carbohydrates (Kermanshahi-pour *et al.* 2014), ce qui a également été observé chez *T. subcordiformis* (Yao *et al.* 2012, 2013b, Meng *et al.* 2014, Jiang *et al.* 2017). L'augmentation des teneurs en lipides exclusivement dans un milieu riche en N est également observé chez *T. marina* CTM 20015 (Dahmen-Ben Moussa *et al.* 2017) et *Tetraselmis* sp. KCTC 12236BP (Kim *et al.* 2016).

Dans notre expérience, les mesures ATR-FTIR qui fournissent une indication sur les rapports des grandes familles de macromolécules sont difficiles à interpréter lorsqu'elles concernent l'entièreté du biofilm de *T. suecica* AC254 (fractions Fr-L123 et Fr-BF) qui comprend des cellules algales, des bactéries, ainsi qu'une multitude de macromolécules constitutives de la matrice (essentiellement des EPS), autant d'acteurs dont les proportions relatives nous sont inconnues. Il est en effet difficile de savoir dans quelles proportions chacun de ces acteurs est présent dans le biofilm et est retenu par le filtre. Il est par conséquent difficile de comparer ces rapports à ceux de la littérature, communément mesurés sur des cultures planctoniques composées essentiellement de cellules algales, car les compositions en lipides, carbohydrates et protéines des cellules et bactéries adhérentes et de la matrice dans laquelle elles cohabitent se confondent dans nos résultats.

Il est donc normal que la réponse des rapports macromoléculaires à la différence de statut azoté diffère entre les fractions Fr-SN (cellules planctoniques) et Fr-L123 et Fr-BF (biofilm). En effet, alors que la limitation azotée induit une augmentation des rapports carbohydrates/protéines et lipides/protéines dans les fractions Fr-L123 et Fr-BF, seul le rapport carbohydrates/protéines augmente significativement dans la fraction Fr-SN. Les différences de rapport lipides/protéines entre les cellules en suspension et les cellules du biofilm dans la condition non limitée en N indique que les cellules adhérentes sont soit moins riches en lipides, soit plus riches en protéines, soit les deux. Toutefois, le matériel analysé diffère entre les fractions comme précisé plus haut : la présence de la matrice d'EPS et des bactéries associées à *T. suecica* doivent être pris en compte pour les échantillons du biofilm. Les matrices des biofilms sont connues pour leurs fortes teneurs en polysaccharides, enzymes et lipides (Flemming & Wingender 2010, Bharti *et al.* 2017), ce qui explique en partie les différences observées. De même, la seule présence de bactéries, supposément en plus grand nombre dans le biofilm que dans le surnageant, peut modifier les rapports macromoléculaires du fait de leur propre composition, leurs exsudats et leur diversité taxonomique. Bien que la limitation en N diminue la teneur en protéines en raison de leur groupement amide, la matrice d'EPS reste un milieu aux propriétés spécifiques. Dans les biofilms, la matrice peut être considérée comme un

système digestif externe grâce à la rétention d'enzymes excrétés par les cellules, assurant diverses fonctions (séquestration et utilisation des nutriments dissous et particulaires, libération des cellules sous forme planctonique, modification de la structure et composition du biofilm) (Flemming & Wingender 2010). Ces enzymes sont produites à la fois par les microalgues, comme les AA oxydases (Kumar & Bera 2020), mais également par les bactéries associées. Des réponses à la limitation par l'N propres aux bactéries des biofilms peuvent donc aussi modifier la composition en macromolécules. Une limitation azotée peut induire une modification des molécules excrétées par *T. suecica*, substrats des bactéries, qui peut elle-même induire des réponses spécifiques chez les bactéries, telles que la production de nouvelles enzymes par exemple. Cette dynamique de la composition moléculaire nécessite des analyses plus ciblées sur les différents groupes macromoléculaires présents, mais également sur la diversité bactérienne. Des efforts supplémentaires sont encore à fournir pour améliorer les techniques permettant de séparer la matrice d'EPS des cellules, tout en conservant leur intégrité et en limitant la dénaturation des molécules présentes.

Ceci dit, nos mesures indiquent que la limitation en N a entraîné une diminution des rapports lipides/protéines et glucides/protéines des biofilms ce qui peut être interprété comme une réduction des protéines, une augmentation des lipides et des sucres, ou les deux. L'augmentation de la teneur en lipides chez *T. suecica* semble nécessiter un temps de carence en N assez long, ce qui n'est pas le cas dans notre expérience (Rodolfi *et al.* 2009). À l'inverse, la biosynthèse d'amidon se produit très rapidement après le début de la limitation d'N, pour diminuer progressivement par la suite (Yao *et al.* 2012). Ces informations suggèrent un ralentissement macroscopique de la synthèse de protéines et une accumulation de carbohydrates sous forme d'amidon dans nos biofilms limités par l'N. L'augmentation relative des lipides par rapport aux protéines est très probablement le signe d'une diminution des protéines, le manque d'N limitant la biosynthèse d'AAs. Le contrôle du statut azoté des biofilms de *T. suecica* semble donc être une méthode intéressante pour orienter la production de molécules vers des familles précises, pour lesquelles il existe un potentiel d'applications dans l'industrie des biocarburants.

4.3. Diversité des métabolites lors d'une limitation par le nitrate

Nos données métabolomiques mettent en évidence une différence entre les profils lipidiques de biofilms de *T. suecica* AC254 limités en N ou non. Notamment, 7 glycolipides identifiés dans les biofilms non limités par l'N ne l'ont pas été dans les biofilms limités.

D'Souza & Kelly (2000) ont également observé qu'une limitation en macronutriments provoquait une modification de la composition lipidique de *T. suecica* F&M, et plus précisément qu'elle augmentait la proportion des AGSs et AGMIs par rapport aux AGPIs. Parmi ces AGs, l'acide palmitique (16:0), l'acide oléique (18:1 *n*-9), l'acide linoléique (18:2 *n*-6), l'acide linolénique (18:3 *n*-3) et l'acide eicosapentaénoïque (20:5 *n*-3) sont fortement représentés (D'Souza & Kelly 2000, Bondioli *et al.* 2012), avec une dominance de l'acide palmitique chez les cellules limitées en N (Go *et al.* 2012). La synthèse de glycosyldiacylglycérols et de glycosphingolipides pourraient être détournée au profit d'autres lipides tels que les AGs. En parallèle, ces glycolipides pourraient être dégradés au fur et à mesure de la limitation, les glucides servant de têtes polaires pouvant intégrer l'amidon synthétisé. Toutefois, la modification de la composition en lipides ne suit pas forcément une conversion des lipides polaires en lipides neutres. En effet, les teneurs en AGs 16:0, 18:1 *n*-7, 18:2 *n*-6 et 20:4 *n*-6 chez *T. suecica* F&M-M33 augmentent en conditions limitées en N à l'inverse des AGs 16:1 *n*-9, 16:4 *n*-3, 18:3 *n*-3 et 18:4 *n*-3. D'autres AGs tels que le 20:5 *n*-3 ne semblent pas affectés (D'Souza & Kelly 2000). Chez d'autres microalgues, l'absence de NO₃⁻ a augmenté la teneur en MGDGs et DGDGs (Wang *et al.* 2016). Des analyses supplémentaires dans l'étude des lipides restent nécessaires.

A l'inverse, bien qu'il y ait une augmentation de la teneur totale en carbohydrates avec une surreprésentation de l'amidon, la composition en monosaccharides ne semble pas varier. Celle-ci est composée majoritairement de l'acide 3-déoxy-d-manno-oct-2-ulose (également nommé Kdo), suivi d'acide 3-déoxy-lyxo-2-heptulosarique (Dha) et d'acide galacturonique, et enfin de galactose (Kermanshahi-pour *et al.* 2014).

Parmi les glycolipides identifiés et caractérisés, le MGDG(18:4/16:4) (ion n°5418, VIP n°19) correspond très probablement au MGDG(18:4(6Z,9Z,12Z,15Z)/16:4(4Z,7Z,10Z,13Z))¹ précédemment identifié dans des extraits méthanoliques de *T. chui* (Banskota *et al.* 2013). Ce glycolipide présente une activité inhibitrice de l'oxyde nitrique (NO) (Banskota *et al.* 2013). L'NO est un gaz ayant une fonction de signalisation dans divers tissus de mammifères, permettant de réguler de multiples processus physiologiques mais étant aussi à l'origine de diverses maladies (Lundberg & Weitzberg 2022). Chez les plantes, le NO joue divers rôles dans la régulation des réponses hormonales, la maturation, la sénescence, la germination, le

¹ Lien LipidMaps : [LMGL05010057](https://www.lipidmaps.org/entry/LMGL05010057). Nom systématique : 1-(6Z,9Z,12Z,15Z-octadecatetraenoyl)-2-(4Z,7Z,10Z,13Z-hexadecatetraenoyl)-3-O-β-D-galactosyl-sn-glycerol

développement des racines, le fonctionnement des stomates, les mécanismes de défense contre les pathogènes ou encore de l'apoptose (Beligni & Lamattina 2001, del Río *et al.* 2004, Wendehenne *et al.* 2004). Sa production se fait *via* des synthèses d'oxyde nitrique (NOS) mais également des nitrates réductases (NR) ou des mécanismes non-enzymatiques tels que la réduction du NO_3^- et du NO_2^- induite par une baisse du pH (Beligni & Lamattina 2001, del Río *et al.* 2004, Wendehenne *et al.* 2004). L'activité NR favorisant la production de NO existe également chez les microalgues (Mallick *et al.* 1999, Sakihama *et al.* 2002, Astier *et al.* 2021). Des concentrations élevées de NO_3^- influencent positivement la teneur en NO (Mallick *et al.* 2000). Bien que la littérature soit encore lacunaire chez les microalgues, le rôle du NO dans la régulation de l'absorption des nutriments azotés et la production de certains métabolites est fortement suspecté (Astier *et al.* 2021). Fait très intéressant dans le cadre de notre étude, le NO semble également jouer un rôle dans l'adhésion des microalgues aux surfaces (Thompson *et al.* 2008, Vardi *et al.* 2008, Leflaive & Ten-Hage 2011a, Allen *et al.* 2015). Par exemple, Thompson *et al.* (2008) ont montré que les concentrations cellulaires en NO sont 4 fois plus élevées chez *Seminavis robusta* F3-61B lorsque la surface est peu adaptée à son adhérence, telles que les surfaces hydrophiles, comme le verre lavé à l'acide utilisé dans nos expériences. L'augmentation artificielle des teneurs intracellulaires de NO chez *S. robusta* F3-61B est également associée à une réduction de sa faculté d'adhésion (Thompson *et al.* 2008). De même, (Vardi *et al.* 2008) ont montré que la suppression du gène PtNOA chez la diatomée *Phaeodactylum tricornutum* augmente sa production de NO tout en diminuant sa capacité d'adhérence. Une inhibition de l'adhérence associée à une augmentation du NO intracellulaire a également été observée chez la diatomée *Fistulifera saprophila* (Allen *et al.* 2015).

Dans notre expérience, nous supposons que les conditions riches en NO_3^- associées aux propriétés de surface hydrophile du verre borosilicaté lavé à l'HCl 10% ont favorisé une forte production de NO cellulaire dans les biofilms, possiblement par l'action d'une NR. En parallèle, ou en réponse à cette augmentation de la teneur en NO, des MGDGs inhibiteurs de NO sont produits afin d'éviter la perte d'adhérence. Nos résultats suggèrent également que dans les biofilms de *T. suecica* AC254 limités par l'N, la biosynthèse de ces MGDGs s'arrête. Nous supposons également que le taux intracellulaire de NO perdure au-dessus d'un certain seuil dans les biofilms limités par l'N, ce qui a pour effet de diminuer leur adhérence. Cette hypothèse permettrait d'expliquer que dans les biofilms limités en N, la couche de cellules moyennement adhérentes (Fr-L123) augmente au détriment de la couche la plus adhérente (Fr-BF).

Des mécanismes de médiation chimique chez les microalgues impliquant le NO sont également soupçonnés. En effet, des auteurs ont montré que l'aldéhyde 2E,4E-décadiénal produit par des diatomées induit la production de NO ainsi qu'une diminution de l'adhérence d'autres diatomées (Vardi *et al.* 2006, Leflaive & Ten-Hage 2011a, b). Notons que des effets négatifs (déformation des cellules, augmentation de la perméabilité membranaire) ont déjà été observés sur *T. suecica* en présence de 2E,4E-décadiénal (Ribalet *et al.* 2007). D'autres composés issus de l'algue filamenteuse *Uronema confervicolum*, supposés infochimiques mais encore non identifiés, provoquent des réactions similaires chez *F. saprophila* (Allen *et al.* 2015). Ainsi, la formation des biofilms phototrophes pourrait faire intervenir des médiateurs chimiques entre microalgues et bactéries induisant des variations des niveaux de NO chez les microalgues en fonction des conditions environnementales.

Un deuxième MGDG, présentant une insaturation en moins sur la chaîne carbonée à 18 carbones (MGDG(18:3(9Z,12Z,15Z)/16:4(4Z,7Z,10Z,13Z)) et qui pourrait correspondre au MGDG(18:3/16:4) (ion n°5788, VIP n°26) de nos données, a été identifié par Banskota *et al.* (2013) comme inhibiteur de l'NO. Toujours selon ces auteurs, l'augmentation des insaturations des chaînes carbonées permettrait d'améliorer l'activité inhibitrice de l'NO. Ainsi, les autres MGDG identifiés pourraient également présenter cette propriété. Des essais plus ciblés sont donc nécessaires pour confirmer cette hypothèse. La ou les fonctions écologiques de ces glycolipides au sein du biofilm n'ont toutefois pas été identifiées. Des bioactivités sont supposées pour les MGDG et les DGDG (Alves *et al.* 2020), bien qu'à notre connaissance, aucune n'ait été observée chez *T. suecica*. Des études supplémentaires portant sur les potentielles autres propriétés de ces molécules sont donc également nécessaires.

5. Conclusion

En conclusion, nous avons montré que dans des biofilms de la chlorophyte *Tetraselmis suecica* AC254 limités par l’N, un ralentissement de la synthèse des protéines et une accumulation des carbohydrates sous forme d’amidon sont fortement suspectés. La composition chimique des lipides est également impactée : nous avons ainsi observé une forte diminution des glycolipides, notamment des monogalactosyldiacylglycérols (MGDGs), au profit d’autres lipides encore non identifiés. En particulier, le MGDG(18:3(9Z,12Z,15Z)/16:4(4Z,7Z,10Z,13Z)), que nous avons pu détecter en abondance dans les biofilms non-limités par l’N présente, contrairement aux biofilms limités, une activité inhibitrice de l’action de l’NO, un composé qui joue un rôle de signalisation et de régulation de diverses voies de biosynthèse et dont la production est favorisée par la réduction des nitrate et nitrite. La teneur intracellulaire en NO des microalgues est par ailleurs corrélée à leurs facultés d’adhérence. Nous en déduisons que l’effet du statut azoté sur le métabolome de *T. suecica*, et en particulier sur sa production de MGDG est de nature à expliquer ses répercussions sur l’adhérence des biofilms de cette espèce (**Figure 65**).

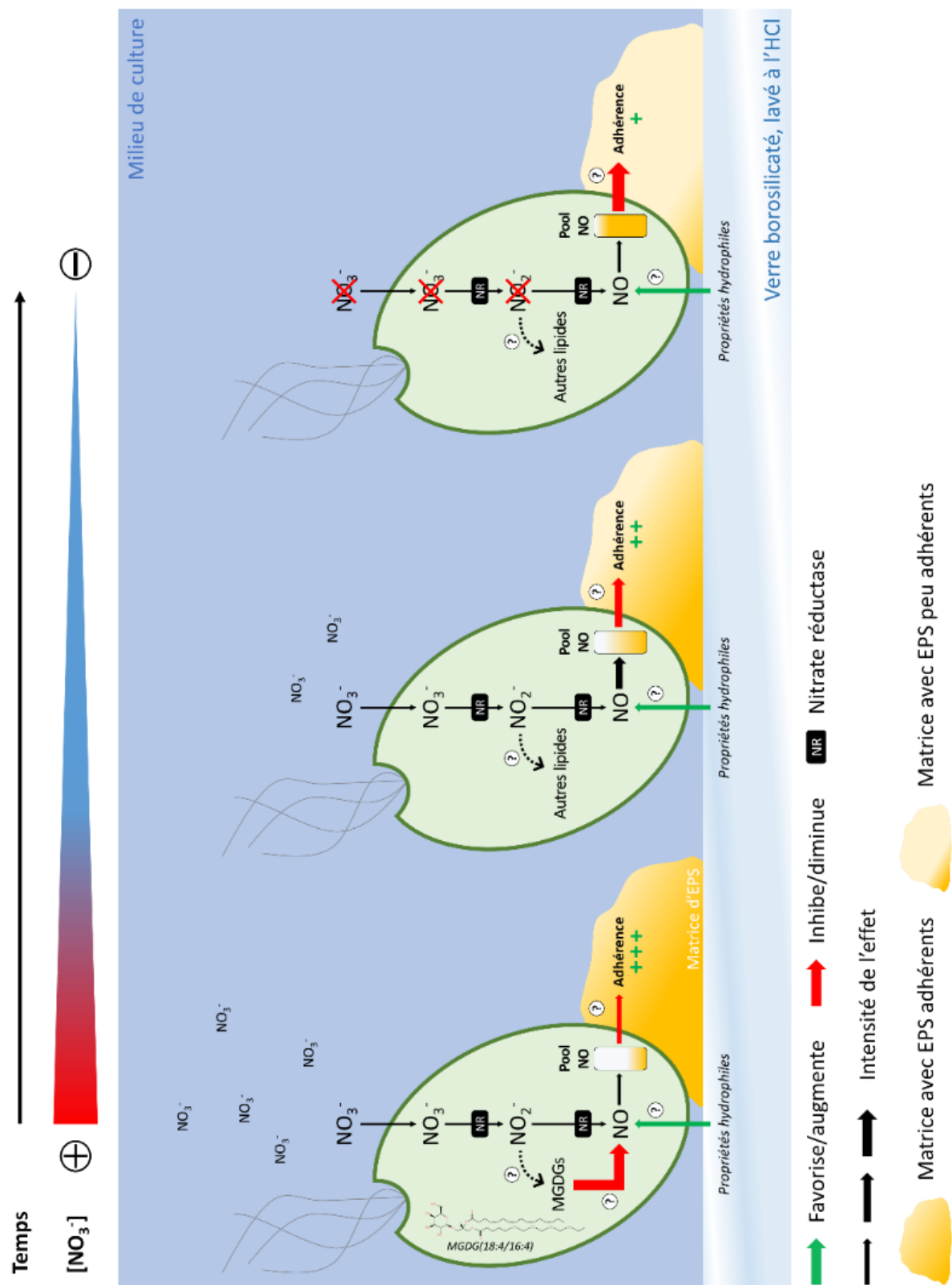


Figure 65 : Schéma du mécanisme d'adhérence supposé chez *T. suecica* AC254 impliquant l'oxyde nitrique (NO) et dépendant de la concentration en nitrate (NO₃⁻). Nitrite, NO₂⁻. Nitrate réductase, NR. Monogalactosyldiacylglycérols, MGDGs. Substances polymériques extracellulaires, EPS. Acide chlorhydrique, HCl. Les points d'interrogation représentent le manque de connaissances des mécanismes moléculaires entre deux étapes.

CONCLUSION GENERALE ET PERSPECTIVES

Un projet de défrichage

Mes travaux de thèse sont une contribution au projet *Photobiofilm Explorer* (PBEx, [ANR](#)), auquel plusieurs laboratoires (BIOCORE, LPGM, MARBEC, MICALIS, Inalve)¹ ont apporté leur expertise. Le principal objectif de ce projet était d'améliorer nos connaissances sur les biofilms phototrophes, et plus particulièrement d'identifier les raisons pour lesquelles ces biofilms présentent généralement, par rapport aux cultures planctoniques, une meilleure résistance et résilience à la contamination biologique. Cette observation avait été faite de façon récurrente sur les installations de la startup Inalve, ainsi que sur les cultures expérimentales de biofilms mises en œuvre au LOV. Aussi, une des hypothèses centrales du projet était que cette propriété traduisait une exacerbation des processus de médiation chimique résultant de la proximité des micro-organismes confinés dans une matrice d'EPS, laquelle médiation était susceptible de produire des composés de défense contre de potentiels concurrents et/ou pathogènes extérieurs, ces composés pouvant par ailleurs présenter des applications pharmaceutiques (antibiotiques, antiviraux) et/ou nutraceutique. La recherche et l'identification de tels composés constituent l'objectif principal de ma thèse.

Notre modèle d'étude principal, la chlorophyte *Tetraselmis suecica* AC254, a été choisie par les partenaires du projet pour plusieurs raisons. D'abord pour sa forte résistance contre les contaminants, comme évoqué précédemment. Ensuite, *T. suecica*, une microalgue très utilisée en aquaculture (par exemple, [Ibarrola et al. 2000](#), [Delaporte et al. 2003](#), [Maldonado-Montiel & Rodríguez-Canché 2005](#), [Barrera-Escorcía et al. 2010](#)), est l'espèce principalement produite par la startup Inalve, et dont la culture en biofilm était également maîtrisée au LOV. Enfin, des activités bactériennes, antivirales et antioxydantes avaient également été décelées chez cette espèce (pour plus de détails, voir **Chapitre II**). Dans le cadre du projet PBEx, j'ai également été amené à participer à des expériences sur des biofilms de la diatomée *Cylindrotheca closterium* AC170 pour laquelle des activités allélopathiques anti-algues avaient aussi été identifiées ([Xu et al. 2019, 2020](#)).

¹ BIOCORE : *Modelling and Control of Renewable Resources*, INRIA (PI du projet)

LPGM : Laboratoire de Génies des Procédés et Matériaux, CentraleSupélec

MARBEC : *Marine Biodiversity, Exploitation & Conservation*, Ifremer, CNRS, IRD, Univ. de Montpellier

MICALIS : Microbiologie de l'Alimentation au service de la Santé, INRAE

INALVE : Startup accueillie à l'Institut de la mer de Villefranche (IMEV).

Dans le but d'identifier des activités émanant des biofilms, nous avons choisi de mettre en œuvre des essais biologiques (ou bioessais) sur divers extraits de biofilm (voir **Introduction générale**). Cette approche, pierre angulaire du projet PBEx et des travaux de cette thèse, peut faire appel à des méthodologies plus ou moins adaptées : (i) l'obtention d'extraits avec différents solvants, (ii) l'utilisation de filtrats de cultures, et/ou (iii) la mise en place de cocultures. Les biofilms, du fait de leur matrice d'EPS, ne se prêtent pas, selon nous, à l'utilisation de filtrats et de cocultures. Dans le premier cas de figure, la séparation de la matrice et des micro-organismes est une entreprise difficile, voire impossible, et l'utilisation de filtres, courante avec des cultures en suspension, est peu efficace en raison de leur colmatage rapide. L'utilisation d'un filtrat de la culture surnageante¹ présente aussi le risque que les composés bioactifs soient insuffisamment concentrés, voire absents, ou qu'ils se mélangent avec l'exométabolome des cellules en suspension. La mise en œuvre de cocultures passe la plupart du temps par l'utilisation d'une membrane entre deux cultures de micro-organismes différents, perméable aux molécules de petites tailles. Or, bien que l'émission de composés bioactifs soit possible à l'extérieur du biofilm, les composés qui nous intéressent se concentrent très probablement dans la matrice d'EPS de la culture n°1 et risquent de ne produire aucun effet sur la culture n°2 (à l'exception de celui résultant de la compétition pour les nutriments). En outre, un système permettant de co-cultiver un biofilm et une culture en suspension est difficile à mettre en place. Malgré une réflexion conduite sur quelques idées de systèmes de culture², nous n'avons entrepris aucune expérience préliminaire pour les tester. Notre choix de bioessai s'est donc orienté vers l'utilisation d'extraits de biofilms, obtenus à l'aide de solvants organiques. Les tests de diffusion sur milieu gélosé ont été sélectionnés pour 3 raisons : (i) la facilité de leur utilisation, du moins par rapport aux autres méthodes, (ii) l'utilisation du même type de bioessai par le laboratoire partenaire MARBEC, qui en avait une expérience de longue date (sur du matériel biologique au lieu d'extraits), et (iii) leur faible coût, permettant de multiplier les essais réalisés³.

Le choix des cibles bactériennes a été plusieurs fois discuté : dans le cadre d'une recherche d'activités antibactériennes, devait-on privilégier (i) les bactéries issues du biofilm, (ii) des bactéries connues pour interagir avec nos microalgues dans leur milieu naturel, ou (iii)

¹ C'est-à-dire ce que l'on a considéré comme fraction Fr-SN dans le **Chapitre III**.

² Par exemple : (1) croissance de deux biofilms sur chacune des faces d'une membrane perméable jusqu'à rencontre des deux au bout de x temps de co-culture, ou (2) croissance d'un biofilm sur la membrane perméable avec un flux dirigé de la face colonisée vers la face non-colonisée, où se localise la deuxième culture.

³ Le LOV n'avait jamais mis en pratique cette technique de bioessais avant ma thèse.

des bactéries issues de cultures denses planctoniques contaminées ? Initialement, nous nous sommes orientés vers la recherche d'interactions allélopathiques au sein du biofilm. L'option (i) présentait les avantages d'être écologiquement pertinente, et que la probabilité de mettre en évidence une interaction médiée chimiquement était forte. De fait, le laboratoire partenaire MARBEC a réalisé l'identification et la conservation de bactéries isolées des biofilms de *T. suecica* et de *C. closterium*. Toutefois, l'utilisation comme cible de bactéries des biofilms présente deux inconvénients majeurs. D'abord, les interactions chimiques entre microalgues et bactéries ne sont pas uniquement de nature antibactérienne, ce qui nécessite des essais biologiques différents de tests de diffusion. Ensuite, dans les biofilms phototrophes, des composés endo- et exo-métabolomiques sont produits par les microalgues mais également par les bactéries, lesquelles sont utilisées comme cibles. Si une activité est identifiée, quelle que soit sa nature, comment déterminer l'organisme producteur du ou des composés impliqués ? Comment, dans cette configuration, mettre en évidence une interaction allélopathique cohérente ? Finalement, c'est le manque d'information et de publications dans le domaine qui nous a conduit à privilégier l'option (iii) sur les options (i) et (ii)¹.

Nos recherches se sont donc principalement concentrées sur des cibles bactériennes pathogènes d'aquaculture pour des raisons pratiques et de cohérence. Parmi elles, la bactérie *Alteromonas* sp., fournie par MARBEC, ainsi que la *Vibrio penaeicida* (Belgian Coordinated Collections of Microorganisms, BCCM) avaient déjà montré une sensibilité à des dépôts biologiques ou des extraits de *T. suecica* et/ou *C. closterium* (comm. pers.). La mise en évidence d'activités sur des bactéries pathogènes d'aquaculture présentait aussi un intérêt d'ordre industriel. De même que les bioessais conduits sur des souches cancéreuses humaines par l'intermédiaire de notre partenariat avec le LIENSs², étaient l'opportunité d'identifier des composés d'intérêt en pharmacologie.

¹ Des cyanobactéries contaminatrices ont toutefois été isolées durant le projet par la start-up Inalve, mais trop tardivement pour être utilisées comme cibles.

² Littoral ENvironnement et Sociétés, UMR 7266, Université de La Rochelle, CNRS.

Une multitude de contraintes inhérentes...

Aux biofilms phototrophes

La littérature sur les biofilms de microalgues étudiés au laboratoire est rare, faisant du projet PBEx et de ma thèse un travail de défrichage, bien que des propriétés communes existent entre biofilms bactériens, très étudiés, et biofilms phototrophes, comme par exemple les propriétés connues de la matrice d'EPS des biofilms bactériens (rétention d'eau, sorption de composés organiques et inorganiques, sources de nutriments et d'énergie, système digestif externe par la conservation d'enzymes, propriétés bioactifs et rédox, *etc.*) ([Flemming & Wingender 2010](#), [Xiao & Zheng 2016](#)) qui existent aussi très probablement dans les biofilms de microalgues. Au cours de ce travail de thèse, nous avons identifié plusieurs contraintes expérimentales nouvelles car inhérentes aux biofilms de microalgues, et qui sont inexistantes dans les cultures planctoniques :

(i) Le besoin d'un support adapté :

Contrairement aux cultures planctoniques, les biofilms nécessitent un support pour se développer¹. Les flacons en verre borosilicaté, généralement lavés à l'HCl et autoclavés, sont fréquemment utilisés pour mettre en cultures des microalgues en suspension. À noter que les propriétés hydrophiles du verre borosilicaté lavé à l'acide ne sont pas forcément favorables à l'adhérence des bactéries ([Weaver et al. 2021](#)) ni des microalgues (voir [Thompson et al. 2008](#) et articles associés). Le choix d'un support adapté à la formation des biofilms est donc un élément supplémentaire à prendre en compte dans l'étude des biofilms phototrophes. De plus, dans un système de culture fermé, la surface d'adhérence doit être stérilisée avant inoculation, ce qui limite leur choix, d'autant qu'un procédé manuel permettant à l'expérimentateur de faire adhérer artificiellement les cellules (par exemple avec l'utilisation d'un pinceau) est difficile à mettre en place sans contamination biologique, voire impossible. Une solution possible est l'utilisation de milieux gélosés, à l'instar des tapis bactériens sur boîte de Pétri.

(ii) Mécanismes d'adhérence inconnus :

L'adhérence des microorganismes est un processus complexe qui a été très étudié chez les bactéries ([Garrett et al. 2008](#)), contrairement aux microalgues. Lors de nos premières

¹ Des exceptions existent, comme précisé dans l'**Introduction générale** ([Alhede et al. 2011](#), [Sauer et al. 2022](#)).

tentatives de production de biofilms de *T. suecica* à l'aide de photobioréacteurs verticaux (voir **Annexe 9**), qui se sont révélées infructueuses, nous avons pu observer qu'un stress alcalin augmentait l'adhérence des cellules et le développement du biofilm. Plusieurs auteurs, à l'instar de [Fanesi et al. \(2021\)](#), ont montré qu'un certain niveau de cisaillement favorisait l'adhérence des micro-organismes. Bien que des variations interspécifiques existent vraisemblablement, la mise en culture d'une souche sans agitation ne permet pas de produire un biofilm significatif ou du moins d'observer une adhérence rapide. Dans notre étude, l'utilisation d'erlenmeyers en verre pour expérimenter sur des biofilms de *T. suecica* résulte du pur hasard, celui-ci nous ayant permis d'observer inopinément la formation d'un biofilm dans une culture de microalgue moyennement agitée.

(iii) Une récolte paradoxalement plus compliquée :

D'un point de vue industriel, l'un des principaux avantages des biofilms phototrophes sur les cultures planctoniques réside dans la facilité de leur récolte, un simple grattage du support étant le plus souvent suffisant pour récupérer de la biomasse humide. Cette pratique est valable uniquement pour des systèmes de production ouverts où l'on peut s'accommoder d'un certain niveau de risques de contaminations biologiques. Dans le cadre d'expériences de laboratoire conduites avec des systèmes fermés et contrôlés, cet avantage disparaît : le prélèvement partiel d'un biofilm de microalgues n'est pas une solution viable car d'une part il l'expose à une contamination, et d'autre part il n'est pas représentatif de son intégralité puisque son épaisseur peut varier sur sa surface de développement. Ainsi, alors que l'échantillonnage d'une petite quantité de culture planctonique agitée suffit à estimer sa concentration, il est nécessaire dans le cas d'un biofilm d'en récupérer la totalité, et donc de stopper sa culture.

(iv) Une prise en compte obligatoire de la phycosphère :

Les microalgues peuvent être considérées comme des holobiontes, abritant dans leur voisinage immédiat une communauté bactérienne, nommé phycosphère (voir **Introduction générale**). Dans les biofilms phototrophes, ces bactéries, bien plus nombreuses que les cellules de microalgues, sont nécessaires à leur formation et stabilisation. Une vision plus globale de l'étude du vivant, non réduite aux seules espèces en présence, est à adopter pour l'étude des biofilms phototrophes. Pour cela,

une étude différenciée de la phycosphère « noyau »¹ (Piampiano et al. 2019) d'une part et des communautés bactériennes plus variables d'autre part doit être réalisée pour mieux comprendre les dynamiques internes du biofilm. L'axénisation des microalgues avant leur mise en culture sous forme de biofilms phototrophes est également une piste de recherche qui permet de mieux appréhender leur formation. À noter que la plurispécificité obligatoire des biofilms de microalgues rend difficile l'association entre un composé identifié et son producteur.

(v) Séparation de la matrice d'EPS :

La matrice, un compartiment à part entière des biofilms, est constituée d'EPS et, très probablement, de métabolites. Une étude appropriée de la matrice nécessite qu'elle soit préalablement débarrassée des micro-organismes qu'elle abrite. Malheureusement, les rares méthodes permettant d'y parvenir dénaturent les EPS et empêchent de connaître la composition exacte de la matrice. De plus, il est nécessaire d'utiliser des techniques de séparation qui préservent l'intégrité des micro-organismes afin que les milieux intra- et extracellulaire ne se mélangent pas. L'utilisation de techniques de microscopie avancées², utilisées par le partenaire CentraleSupélec du projet PBEx, ont permis pour mieux comprendre la structuration des biofilms en fonction de leur épaisseur.

Aux interactions entre les microalgues et leur environnement

Le travail de recherche bibliographique effectué sur l'influence de la source et la concentration d'N sur la production de toxines et de composés allélopathiques chez les microalgues et les cyanobactéries (voir **Chapitre I**) a permis de faire ressortir quatre constats : (1) la littérature accorde trop souvent une fonction de médiation chimique (allélopathie) aux toxines, ce qui, dans les faits, n'est pas forcément le cas, les propriétés toxiques d'une molécule donnée pouvant être une fonction supplémentaire non sélectionnée qui diffère drastiquement de la fonction initiale sélectionnée. (2) Il existe une réponse des microalgues à leur environnement azoté qui a un effet sur leur production de toxines et/ou de composés allélopathiques. (3) La production de toxines et/ou de composés allélopathiques présente une grande diversité inter- et intraspécifique en fonction de la source et la concentration d'N. (4) La toxicité d'une microalgue donnée est trop souvent réduite à une toxine ou une famille de toxines

¹ La phycosphère « noyau » comprend des communautés bactériennes récurrentes et pérennes.

² Optical Coherence Tomography (OCT), Confocal Laser Scanning Microscopy (CLSM).

déjà connues et mesurée, ce qui éclipse la grande diversité des autres métabolites bioactifs qu'elle peut également produire.

Aussi, la mise en évidence d'une bioactivité et la caractérisation de la ou des molécules impliquées ne peuvent se satisfaire d'une simple extraction du matériel biologique suivie d'un essai biologique, sans que soient considérées en même temps les conditions environnementales dans lesquelles le matériel a été échantillonné. En effet, les conditions qui président à la production d'un composé bioactif sont multifactorielles, chez un organisme qui doit en outre répondre de façon optimale aux variations de son environnement. Par exemple, la production d'un composé allélopathique de défense contre la prédation entraîne une consommation d'énergie inutile si aucun prédateur n'est présent. Pour être efficace, la recherche de composés bioactifs doit alors prendre en considération : (i) la souche étudiée et ses spécificités, (ii) le type de culture et les paramètres utilisés (dont la contamination biologique volontaire), (iii) l'état physiologique de la microalgue lors de l'échantillonnage, et (iv) la diversité mais aussi l'état physiologique des autres organismes présents.

Aux essais biologiques

Les très nombreux bioessais que nous avons réalisés pour essayer de mettre en évidence une bioactivité dans les extraits de biofilm de microalgues sur des bactéries pathogènes d'aquaculture n'ont donné aucun résultat probant. Aussi, l'utilisation intensive des tests de diffusion nous a conduit à en mettre d'importantes réserves sur cette technique (voir **Chapitre II**), de sorte qu'il nous est difficile de conclure définitivement sur l'absence de composés bioactifs dans les biofilms de *T. suecica* et de *C. closterium*. De même, le type d'extraction réalisée peut aussi être mis en cause, que ce soit le choix des solvants organiques ou le protocole utilisé. D'autres criblages phytochimiques avec des protocoles optimisés et standardisés devront être mis en œuvre pour confirmer ou infirmer nos résultats.

L'hypothèse initiale expliquant la résistance observée des biofilms de microalgues aux contaminations biologiques était que les activités de médiation chimique dans ce type d'écosystème confiné sont exacerbées. Si cette hypothèse n'était définitivement pas vérifiée, il faudrait alors considérer que d'autres facteurs confèrent à ces biofilms leur résistance et leur résilience. Par exemple, les propriétés physiques de la matrice d'EPS pourraient également expliquer la résistance des biofilms de microalgues aux contaminations biologiques,

l'organisme exogène ayant plus de difficultés à se mouvoir dans la matrice d'EPS. En effet, l'équipe MICALIS, partenaire du projet PBEx, a observé des capacités de nage différentes parmi les micro-organismes du biofilm.

Qui nécessitent des recherches spécifiques

Les futures études devront, en amont ou en parallèle de nouveaux bioessais plus cohérents, porter en priorité sur la diversité et la dynamique des bactéries associées aux biofilms phototrophes. Afin d'identifier des cibles écologiquement pertinentes, l'isolement, le séquençage et le suivi de la communauté bactérienne sur différents systèmes de cultures, ouverts comme fermés, sont à privilégier. L'étude de ces dynamiques, associée à la mesure des paramètres abiotiques, pourra permettre d'identifier les cibles bactériennes pertinentes dans des conditions qui favorisent ou non une potentielle activité antibactérienne. Par exemple, si la diversité de la phycosphère est connue et stable dans le temps, notamment celle de la phycosphère « noyau » (voir [Piampiano et al. 2019](#)), une alternance entre apparition et disparition d'un taxon bactérien au cours du temps pourrait être associée à l'arrivée d'une bactérie exogène finalement repoussée par le biofilm phototrophe. Si l'on parvient à isoler ces bactéries, elles pourront alors être utilisées comme bactéries cibles dans des essais biologiques réalisés avec des extraits de biofilms. Les extraits utilisés devront provenir de biofilms cultivés dans conditions environnementales correspondantes, avec ou sans contamination volontaire par la ou les bactéries cibles sélectionnées. Des comparaisons pourront également être réalisées avec d'autres extraits dans des conditions différentes pour mieux comprendre les dynamiques des biofilms phototrophes.

L'amélioration des techniques de séparation de la matrice d'EPS et des micro-organismes, ainsi que la possibilité d'analyser séparément les différentes strates des biofilms, comme nous avons tenté de le faire dans nos expériences, constitueront des avancées majeures. Ces techniques devront être améliorées et éprouvées, de même que l'utilisation de systèmes fermés et contrôlés de culture de biofilm, encore trop peu fréquente aujourd'hui, devra se généraliser. Des comparaisons entre cultures d'une même espèce de microalgue en suspension et en biofilm dans des conditions expérimentales similaires peuvent également s'avérer un moyen efficace pour identifier des spécificités propres à ces deux modes de vie microbien. Enfin, l'étude de l'adhérence des microalgues à différents types de support et des facteurs y participant sont également des pistes de recherche importantes (voir par exemple [Li et al. 2024](#)).

Une première étude contrôlée sur l'effet de l'azote : s'éloigner du sujet initial pour mieux y revenir

L'étude décrite dans le **Chapitre III** a été conçue en tenant compte de la plupart des observations et réflexions précédentes. Elle constitue l'une des toutes premières études expérimentales du biofilm phototrophe de l'holobionte *T. suecica* AC254. Avec comme objectif principal d'identifier les effets des conditions azotées sur la synthèse de métabolites, et avec l'espoir d'identifier des molécules déjà connues pour leurs propriétés bioactives, nous avons réalisé une analyse métabolomique du biofilm en essayant de prendre en compte le maximum des contraintes énoncées précédemment. Ainsi, nous avons optimisé un dispositif de cultures fermées et contrôlées. Comme mentionné plus haut, le choix du mode de culture en erlenmeyer résulte d'expériences préliminaires sans lien avec l'expérience en question, où nous avons remarqué, par hasard, qu'une proportion significative des cellules de *T. suecica* en culture planctonique modérément agitée adhéraient au verre borosilicaté d'un erlenmeyer, ce qui ne se produisait pas avec une agitation inexistante ou trop importante. Ces cellules, bien qu'initialement peu nombreuses, étaient pour la plupart et de façon surprenante fortement fixées à la paroi en verre. Les cultures en erlenmeyers offrant par ailleurs d'importants avantages pour l'étude métabolomique envisagée (voir **Chapitre III**), nous avons donc décidé de les utiliser pour cette étude. La réussite de l'utilisation d'erlenmeyers pour l'étude des biofilms de *T. suecica* met en exergue la nécessité de multiplier les pré-tests et de croiser les premières observations entre différentes expériences, les unes pouvant offrir une solution aux autres.

Une fois les biofilms de *T. suecica* optimisés en termes d'adhérence et de biomasse, nous avons dû trouver des techniques de récolte les moins intrusives possibles. Les techniques de lavage progressif des biofilms que nous avons expérimentés et qui permettent de mesurer des propriétés sur différentes couches sont, à notre connaissance, les premières du genre. En augmentant progressivement l'intensité des moyens mécaniques de récupération¹, nous avons pu conduire la première étude des différentes fractions d'une culture en biofilm : cellules en

¹ Agitation douce puis vigoureuse après ajout d'eau, augmentation de la vitesse de cisaillement, puis grattage à l'aide du barreau magnétique.

suspension ou peu adhérees (fraction Fr-SN), moyennement adhérees (fraction Fr-L1, -L2, -L3) et fortement adhérees (fraction Fr-BF). Ce mode d'échantillonnage ne s'appliquant pas aux biofilms épais, des efforts supplémentaires devront être faits pour échantillonner les différentes strates de biofilms plus épais. Par exemple, un découpage ultrafin à l'aide d'outils spécialisés en microscopie électronique ou l'utilisation de microsondes peuvent être envisagés.

L'analyse d'un biofilm nécessite de l'échantillonner entièrement, et donc de le sacrifier, ce qui interdit de répéter cette analyse dans le temps. Le seul moyen de suivre l'évolution temporelle de sa biomasse consiste à échantillonner plusieurs cultures parallèles à des temps différents, en supposant que ces cultures évoluent de façon identique. En multipliant les répliques et en optimisant le système pour minimiser les différences d'environnement entre chaque culture, nous avons pu efficacement contourner le problème de la récolte. La faible variabilité des différentes paramètres mesurés (concentration cellulaire, biovolume, statut azoté, N résiduel, activités photosynthétiques et concentrations pigmentaires, pH) au sein d'une même condition ont validé les protocoles utilisés. Nos choix ne nous ont cependant pas permis de séparer la matrice d'EPS des cellules mais ont offert une approche simple et efficace pour améliorer nos connaissances sur le biofilm dans sa globalité.

Bien que les conditions nécessaires à notre expérience ait été obtenues avec succès¹ (démontrant au passage l'intérêt d'utiliser des modèles mathématiques pour les définir), et que des différences de métabolomes et de teneurs en macromolécules aient effectivement été observées entre les deux conditions azotées, très peu de métabolites ont finalement été identifiés, et parmi eux, aucun ne présentaient une bioactivité recensée dans la littérature, mis à part le MGDG(18:4/16:4) (ion n°5418, VIP n°19) (voir **Chapitre III**), connu pour inhiber l'action du NO, un gaz médiateur de divers mécanismes chez les microalgues parmi lesquels l'adhérence, ce qui ouvre des pistes de recherche intéressantes. La sous-expression de ce glycolipide (et, très probablement, de ses analogues) dans les biofilms limités en N, couplée à une diminution des cellules fortement adhérees au profit des cellules moyennement adhérees, suggère fortement un effet du statut azoté du biofilm sur l'adhérence des microalgues. Plus précisément, une forte teneur en NO défavorise l'adhérence à une surface donnée. L'augmentation du NO intracellulaire semble être favorisée par de fortes concentrations en NO₃⁻ et par les propriétés hydrophiles des surfaces à adhérer. Une haute teneur cellulaire en NO

¹ Cellules adhérees majoritaires, biofilms de même biovolume entre les deux conditions LA et NLA, limitation effective par l'N dans la condition LA, en contraste avec la condition NLA.

indique probablement à la microalgue des conditions défavorables à l'adhérence et à la formation d'un biofilm par l'intermédiaire d'une série de processus en cascades encore inconnus. La surexpression du MGDG(18:4/16:4) dans un environnement riche en NO_3^- , condition pourtant favorable à l'augmentation du NO cellulaire et donc à la diminution de l'adhérence, suggère des boucles de rétroaction au sein de la cellule. De même, des composés allélopathiques semblent influencer la teneur en NO. Nous supposons qu'à l'instar de ce qui a été observé chez d'autres macroorganismes, le NO est un médiateur de réponses physiologique et comportementale important chez les microalgues, et des recherches plus approfondies sur son rôle dans la formation des biofilms sont donc nécessaires.

Enfin, bien que non décrites dans ce manuscrit, des expériences préliminaires sur l'effet de phytohormones sur la croissance de cultures en suspension et en biofilm de *T. suecica* ont donné des résultats prometteurs. L'orientation de la recherche sur les biofilms de microalgues vers l'étude des médiateurs intra- et interspécifiques autres que ceux impliqués dans la défense est également une option de recherche à défricher.

BIBLIOGRAPHIE

- Abassi, S.; Kim, H.-S.; Bui, Q.T.N.; Ki, J.-S. 2023. Effects of nitrate on the saxitoxins biosynthesis revealed by sxt genes in the toxic dinoflagellate *Alexandrium pacificum* (group IV). *Harmful Algae* 127: 102473.
- Abdelfattah, A.; Ali, S.S.; Ramadan, H.; El-Aswar, E.I.; Eltawab, R.; Ho, S.-H.; et al. 2023. Microalgae-based wastewater treatment: Mechanisms, challenges, recent advances, and future prospects. *Environmental Science and Ecotechnology* 13: 100205.
- Accoroni, S.; Glibert, P.M.; Pichierri, S.; Romagnoli, T.; Marini, M.; Totti, C. 2015. A conceptual model of annual *Ostreopsis cf. ovata* blooms in the northern Adriatic Sea based on the synergic effects of hydrodynamics, temperature, and the N:P ratio of water column nutrients. *Harmful Algae* 45: 14–25.
- Ács, A.; Kovács, A.W.; Csepregi, J.Z.; Törő, N.; Kiss, G.; Győri, J.; et al. 2013. The ecotoxicological evaluation of *Cylindrospermopsis raciborskii* from Lake Balaton (Hungary) employing a battery of bioassays and chemical screening. *Toxicon* 70: 98–106.
- Adarme-Vega, T.C.; Thomas-Hall, S.R.; Lim, D.K.Y.; Schenk, P.M. 2014. Effects of Long Chain Fatty Acid Synthesis and Associated Gene Expression in Microalga *Tetraselmis* sp. *Marine Drugs* 12: 3381–3398.
- Adolf, J.; Bachvaroff, T.; Krupatkina, D.; Nonogaki, H.; Brown, P.; Lewitus, A.; et al. 2006. Species specificity and potential roles of *Karlodinium micrum* toxin. *African Journal of Marine Science* 28: 415–419.
- Adolf, J.E.; Bachvaroff, T.; Place, A.R. 2008. Can cryptophyte abundance trigger toxic *Karlodinium veneficum* blooms in eutrophic estuaries? *Harmful Algae* 8: 119–128.
- Adolf, J.E.; Bachvaroff, T.R.; Place, A.R. 2009. Environmental Modulation of Karlotoxin Levels in Strains of the Cosmopolitan Dinoflagellate, *Karlodinium Veneficum* (dinophyceae)1. *Journal of Phycology* 45: 176–192.
- Adolf, J.E.; Krupatkina, D.; Bachvaroff, T.; Place, A.R. 2007. Karlotoxin mediates grazing by *Oxyrrhis marina* on strains of *Karlodinium veneficum*. *Harmful Algae* 6: 400–412.
- Aguilera, A.; Berrendero Gómez, E.; Kaštovský, J.; Echenique, R.O.; Salerno, G.L. 2018. The polyphasic analysis of two native *Raphidiopsis* isolates supports the unification of the genera *Raphidiopsis* and *Cylindrospermopsis* (Nostocales, Cyanobacteria). .
- Akbar, M.A.; Mohd Yusof, N.Y.; Tahir, N.I.; Ahmad, A.; Usup, G.; Sahrani, F.K.; et al. 2020. Biosynthesis of Saxitoxin in Marine Dinoflagellates: An Omics Perspective. *Marine Drugs* 18: 103.
- Alexova, R.; Haynes, P.A.; Ferrari, B.C.; Neilan, B.A. 2011. Comparative Protein Expression in Different Strains of the Bloom-forming Cyanobacterium *Microcystis aeruginosa**. *Molecular & Cellular Proteomics* 10: M110.003749.
- Alfonso, A.; Vieytes, M.R.; Botana, L.M. 2016. Yessotoxin, a Promising Therapeutic Tool. *Marine Drugs* 14: 30.
- Alhede, M.; Kragh, K.N.; Qvortrup, K.; Allesen-Holm, M.; van Gennip, M.; Christensen, L.D.; et al. 2011. Phenotypes of Non-Attached *Pseudomonas aeruginosa* Aggregates Resemble Surface Attached Biofilm. *PLoS ONE* 6: e27943.
- Allen, J. 2016. *Interactions allélopathiques au sein de biofilms phototrophes de rivière : étude multi-approche d'une interaction ciblée*. phd, Université de Toulouse, Université Toulouse III - Paul Sabatier, (<http://thesesups.ups-tlse.fr/3466/>).
- Allen, J.L.; Ten-Hage, L.; Leflaive, J. 2015. Impairment of benthic diatom adhesion and photosynthetic activity by allelopathic compounds from a green alga: involvement of free fatty acids? *Environmental Science and Pollution Research* 22: 13669–13680.
- Allen, J.L.; Ten-Hage, L.; Leflaive, J. 2016. Allelopathic interactions involving benthic phototrophic microorganisms. *Environmental Microbiology Reports* 8: 752–762.
- Allen, J.L.; Ten-Hage, L.; Leflaive, J. 2018. Regulation of Fatty Acid Production and Release in Benthic Algae: Could Parallel Allelopathy Be Explained with Plant Defence Theories? *Microbial Ecology* 75: 609–621.

- Alsenani, F.; Tupally, K.R.; Chua, E.T.; Eltanahy, E.; Alsufyani, H.; Parekh, H.S.; et al. 2020. Evaluation of microalgae and cyanobacteria as potential sources of antimicrobial compounds. *Saudi Pharmaceutical Journal* 28: 1834–1841.
- Alves, E.; Dias, M.; Lopes, D.; Almeida, A.; Domingues, M. do R.; Rey, F. 2020. Antimicrobial Lipids from Plants and Marine Organisms: An Overview of the Current State-of-the-Art and Future Prospects. *Antibiotics* 9: 441.
- Ammar, M.; Comte, K.; Tran, T.D.C.; Bour, M.E. 2014. Initial growth phases of two bloom-forming cyanobacteria (*Cylindrospermopsis raciborskii* and *Planktothrix agardhii*) in monocultures and mixed cultures depending on light and nutrient conditions. *Annales de Limnologie - International Journal of Limnology* 50: 231–240.
- Andersen, R. 2005. Algal culturing techniques. .
- Anderson, C.R.; Brzezinski, M.A.; Washburn, L.; Kudela, R. 2006. Circulation and environmental conditions during a toxigenic *Pseudo-nitzschia australis* bloom in the Santa Barbara Channel, California. *Marine Ecology Progress Series* 327: 119–133.
- Anderson, D.M.; Kulis, D.M.; Sullivan, J.J.; Hall, S. 1990a. Toxin composition variations in one isolate of the dinoflagellate *Alexandrium fundyense*. *Toxicon* 28: 885–893.
- Anderson, D.M.; Kulis, D.M.; Sullivan, J.J.; Hall, S.; Lee, C. 1990b. Dynamics and physiology of saxitoxin production by the dinoflagellates *Alexandrium* spp. *Marine Biology* 104: 511–524.
- Anderson, D.M.; Alpermann, T.J.; Cembella, A.D.; Collos, Y.; Masseret, E.; Montresor, M. 2012. The globally distributed genus *Alexandrium*: multifaceted roles in marine ecosystems and impacts on human health. *Harmful Algae* 14: 10–35.
- Andrews, J.M. 2001. Determination of minimum inhibitory concentrations. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 48: 5–16.
- Antunes, J.T.; Leão, P.N.; Vasconcelos, V.M. 2012. Influence of Biotic and Abiotic Factors on the Allelopathic Activity of the Cyanobacterium *Cylindrospermopsis raciborskii* Strain LEGE 99043. *Microbial Ecology* 64: 584–592.
- Antunes, J.T.; Leão, P.N.; Vasconcelos, V.M. 2015. *Cylindrospermopsis raciborskii*: review of the distribution, phylogeography, and ecophysiology of a global invasive species. *Frontiers in Microbiology* 6.
- Apostolopoulou, N.G.; Smeti, E.; Lamorgese, M.; Varkitzi, I.; Whitfield, P.; Regnault, C.; et al. 2022. Microalgae show a range of responses to exometabolites of foreign species. *Algal Research* 62: 102627.
- Assunção, J.; Guedes, A.C.; Malcata, F.X. 2017. Biotechnological and Pharmacological Applications of Biotoxins and Other Bioactive Molecules from Dinoflagellates. *Marine Drugs* 15: 393.
- Astier, J.; Rossi, J.; Chatelain, P.; Klinguer, A.; Besson-Bard, A.; Rosnoblet, C.; et al. 2021. Nitric oxide production and signalling in algae. *Journal of Experimental Botany* 72: 781–792.
- Auro, M.E.; Cochlan, W.P. 2013. Nitrogen Utilization and Toxin Production by Two Diatoms of the *Pseudo-nitzschia pseudodelicatissima* Complex: *P. cuspidata* and *P. fryxelliana*. *Journal of Phycology* 49: 156–169.
- Austin, B.; Day, J.G. 1990. Inhibition of prawn pathogenic *Vibrio* spp. by a commercial spray-dried preparation of *Tetraselmis suecica*. *Aquaculture* 90: 389–392.
- Austin, B.; Baudet, E.; Stobie, M. 1992. Inhibition of bacterial fish pathogens by *Tetraselmis suecica*. *Journal of Fish Diseases* 15: 55–61.
- Azov, Y.; Goldman, J.C. 1982. Free Ammonia Inhibition of Algal Photosynthesis in Intensive Cultures. *Applied and Environmental Microbiology* 43: 735–739.
- Baldauf, S.L. 2008. An overview of the phylogeny and diversity of eukaryotes. *Journal of Systematics and Evolution* 46: 263.
- Balouiri, M.; Sadiki, M.; Ibsouda, S.K. 2016. Methods for *in vitro* evaluating antimicrobial activity: A review. *Journal of Pharmaceutical Analysis* 6: 71–79.
- Band-Schmidt, C.J.; Bustillos-Guzmán, J.J.; López-Cortés, D.J.; Gárate-Lizárraga, I.; Núñez-Vázquez, E.J.; Hernández-Sandoval, F.E. 2010. Ecological and Physiological Studies of *Gymnodinium catenatum* in the Mexican Pacific: A Review. *Marine Drugs* 8: 1935–1961.

- Banker, R.; Carmeli, S.; Hadas, O.; Teltsch, B.; Porat, R.; Sukenik, A. 1997. Identification of Cylindrospermopsin in *Aphanizomenon ovalisporum* (cyanophyceae) Isolated from Lake Kinneret, Israel. *Journal of Phycology* 33: 613–616.
- Banskota, A.H.; Gallant, P.; Stefanova, R.; Melanson, R.; O’Leary, S.J.B. 2013. Monogalactosyldiacylglycerols, potent nitric oxide inhibitors from the marine microalga *Tetraselmis chui*. *Natural Product Research* 27: 1084–1090.
- Barreiro Felpeto, A.; Guisande, C.; Maneiro Estraviz, I.; Lien, T.; Legrand, C.; Tamminen, T.; et al. 2005. Relative importance of the different negative effects of the toxic haptophyte *Prymnesium parvum* on *Rhodomonas* and *Brachionus plicatilis*. *Aquatic Microbial Ecology* 38: 259–267.
- Barrera-Escorcia, G.; Vanegas-Perez, C.; Wong-Chang, I. 2010. Filtration rate, assimilation and assimilation efficiency in *Crassostrea virginica* (Gmelin) fed with *Tetraselmis suecica* under cadmium exposure. *Journal of Environmental Science and Health. Part A, Toxic/Hazardous Substances & Environmental Engineering* 45: 14–22.
- Bar-Yosef, Y.; Sukenik, A.; Hadas, O.; Viner-Mozzini, Y.; Kaplan, A. 2010. Enslavement in the Water Body by Toxic *Aphanizomenon ovalisporum*, Inducing Alkaline Phosphatase in Phytoplanktons. *Current Biology* 20: 1557–1561.
- Bates, S.; Garrison, D.; Horner, R. 1998. Bloom Dynamics and Physiology of Domoic-Acid- Producing *Pseudo-nitzschia* Species. *Bloom Dynamics and Physiology of Domoic Acid Producing Pseudo-nitzschia Species* 41.
- Bates, S.S.; Worms, J.; Smith, J.C. 1993. Effects of Ammonium and Nitrate on Growth and Domoic Acid Production by *Nitzschia pungens* in Batch Culture. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences* 50: 1248–1254.
- Bates, S.S.; Freitas, A.S.W. de; Milley, J.E.; Pocklington, R.; Quilliam, M.A.; Smith, J.C.; et al. 1991. Controls on Domoic Acid Production by the Diatom *Nitzschia pungens* f. multiseriis in Culture: Nutrients and Irradiance. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences* 48: 1136–1144.
- Béchemin, C.; Grzebyk, D.; Hachame, F.; Hummert, C.; Maestrini, S.Y. 1999. Effect of different nitrogen/phosphorus nutrient ratios on the toxin content in *Alexandrium minutum*. *Aquatic Microbial Ecology* 20: 157–165.
- Beligni, M.V.; Lamattina, L. 2001. Nitric oxide in plants: the history is just beginning. *Plant, Cell & Environment* 24: 267–278.
- Benkova, M.; Soukup, O.; Marek, J. 2020. Antimicrobial susceptibility testing: currently used methods and devices and the near future in clinical practice. *Journal of Applied Microbiology* 129: 806–822.
- Beszteri, S.; Yang, I.; Jaekisch, N.; Tillmann, U.; Frickenhaus, S.; Glöckner, G.; et al. 2012. Transcriptomic response of the toxic prymnesiophyte *Prymnesium parvum* (N. Carter) to phosphorus and nitrogen starvation. *Harmful Algae* 18: 1–15.
- Bethe, A. 1932. Vernachlässigte Hormone. *Naturwissenschaften* 20: 177–181.
- Beversdorf, L.J.; Miller, T.R.; McMahon, K.D. 2013. The Role of Nitrogen Fixation in Cyanobacterial Bloom Toxicity in a Temperate, Eutrophic Lake. *PLOS ONE* 8: e56103.
- Beyenal, H.; Lewandowski, Z. 2002. Internal and External Mass Transfer in Biofilms Grown at Various Flow Velocities. *Biotechnology Progress* 18: 55–61.
- Bharti, A.; Velmourougane, K.; Prasanna, R. 2017. Phototrophic biofilms: diversity, ecology and applications. *Journal of Applied Phycology* 29: 2729–2744.
- Bidlas, E.; Du, T.; Lambert, R.J.W. 2008. An explanation for the effect of inoculum size on MIC and the growth/no growth interface. *International Journal of Food Microbiology* 126: 140–152.
- Biondi, N.; Cheloni, G.; Tatti, E.; Decorosi, F.; Rodolfi, L.; Giovannetti, L.; et al. 2017. The bacterial community associated with *Tetraselmis suecica* outdoor mass cultures. *Journal of Applied Phycology* 29: 67–78.
- Biondi, N.; Cheloni, G.; Rodolfi, L.; Viti, C.; Giovannetti, L.; Tredici, M.R. 2018. *Tetraselmis suecica* F&M-M33 growth is influenced by its associated bacteria. *Microbial Biotechnology* 11: 211–223.

- Blanco, J.; Reyero, M.I.; Franco, J. 2003. Kinetics of accumulation and transformation of paralytic shellfish toxins in the blue mussel *Mytilus galloprovincialis*. *Toxicon: Official Journal of the International Society on Toxinology* 42: 777–784.
- Bondioli, P.; Della Bella, L.; Rivolta, G.; Chini Zittelli, G.; Bassi, N.; Rodolfi, L.; et al. 2012. Oil production by the marine microalgae *Nannochloropsis* sp. F&M-M24 and *Tetraselmis suecica* F&M-M33. *Bioresource Technology* 114: 567–572.
- Bonnefond, H.; Combe, C.; Cadoret, J.-P.; Sciandra, A.; Bernard, O. 2019. *Potentiel des microalgues*. .
- Botelho, M.J.; Milinovic, J.; Bandarra, N.M.; Vale, C. 2022. Alzheimer’s Disease and Toxins Produced by Marine Dinoflagellates: An Issue to Explore. *Marine Drugs* 20: 253.
- Boyer, G.L.; Sullivan, J.J.; Andersen, R.J.; Harrison, P.J.; Taylor, F.J.R. 1987. Effects of nutrient limitation on toxin production and composition in the marine dinoflagellate *Protogonyaulax tamarens*. *Marine Biology* 96: 123–128.
- Boyer, G.L.; Sullivan, J.J.; Andersen, R.J.; Taylor, F.J.R.; Harrison, P.J.; Cembella, A.D. 1986. Use of high-performance liquid chromatography to investigate the production of paralytic shellfish toxins by *Protogonyaulax* spp. in culture. *Marine Biology* 93: 361–369.
- Brandenburg, K.; Siebers, L.; Keuskamp, J.; Jephcott, T.G.; Van de Waal, D.B. 2020. Effects of Nutrient Limitation on the Synthesis of N-Rich Phytoplankton Toxins: A Meta-Analysis. *Toxins* 12: 221.
- Breaud, C.; Lallemant, L.; Mares, G.; Mabrouki, F.; Bertolotti, M.; Simmler, C.; et al. 2023. LC-MS Based Phytochemical Profiling towards the Identification of Antioxidant Markers in Some Endemic Aloe Species from Mascarene Islands. *Antioxidants* 12: 50.
- Brentano, D.M.; Giehl, E.L.H.; Petrucio, M.M. 2016. Abiotic variables affect STX concentration in a meso-oligotrophic subtropical coastal lake dominated by *Cylindrospermopsis raciborskii* (Cyanophyceae). *Harmful Algae* 56: 22–28.
- Briand, E.; Bormans, M.; Quiblier, C.; Salençon, M.-J.; Humbert, J.-F. 2012. Evidence of the Cost of the Production of Microcystins by *Microcystis aeruginosa* under Differing Light and Nitrate Environmental Conditions. *PLOS ONE* 7: e29981.
- Brown, E.R.; Moore, S.G.; Gaul, D.A.; Kubanek, J. 2022. Predator cues target signaling pathways in toxic algal metabolome. *Limnology and Oceanography* 67: 1227–1237.
- Brown, E.R.; Cepeda, M.R.; Mascuch, S.J.; Poulson-Ellestad, K.L.; Kubanek, J. 2019. Chemical ecology of the marine plankton. *Natural Product Reports* 36: 1093–1116.
- Brown, William L. 1968. An Hypothesis Concerning the Function of the Metapleural Glands in Ants. *The American Naturalist* 102: 188–191.
- Brown, W.L., Jr.; Eisner, T.; Whittaker, R.H. 1970. Allomones and Kairomones: Transspecific Chemical Messengers. *BioScience* 20: 21.
- Bryant, J.P.; Chapin, F.S.; Klein, D.R. 1983. Carbon/Nutrient Balance of Boreal Plants in Relation to Vertebrate Herbivory. *Oikos* 40: 357–368.
- Burford, M.A.; Mcneale, K.L.; Mckenzie-Smith, F.J. 2006. The role of nitrogen in promoting the toxic cyanophyte *Cylindrospermopsis raciborskii* in a subtropical water reservoir. *Freshwater Biology* 51: 2143–2153.
- Burford, M.A.; Davis, T.W.; Orr, P.T.; Sinha, R.; Willis, A.; Neilan, B.A. 2014. Nutrient-related changes in the toxicity of field blooms of the cyanobacterium, *Cylindrospermopsis raciborskii*. *FEMS Microbiology Ecology* 89: 135–148.
- Burkepile, D.E.; Parker, J.D.; Woodson, C.B.; Mills, H.J.; Kubanek, J.; Sobecky, P.A.; et al. 2006. Chemically Mediated Competition Between Microbes and Animals: Microbes as Consumers in Food Webs. *Ecology* 87: 2821–2831.
- Butenandt, A. 1959. *Über den Sexual-Lockstoff des Seidenspinners Bombyx mori: Reindarstellung und Konstitution*. Verlag d. Zeitschr. f. Naturforschung, bookp.
- Cai, Z.-M.; Peng, J.-Q.; Chen, Y.; Tao, L.; Zhang, Y.-Y.; Fu, L.-Y.; et al. 2021. 1,8-Cineole: a review of source, biological activities, and application. *Journal of Asian Natural Products Research* 23: 938–954.
- Callieri, C. 2017. *Synechococcus* plasticity under environmental changes. *FEMS Microbiology Letters* 364: fnx229.

- Calu, G.; Martin-Jezequel, V.; Lefau, E.; Sechet, V.; Patrick, L.; Weigel, P.; et al. 2010. *The influence of nitrogen speciation on growth and toxicity of Pseudo-nitzschia multiseries and P. pungens in batch and continuous cultures.* .
- Camacho-Muñoz, D.; Praptiwi, R.A.; Lawton, L.A.; Edwards, C. 2021. High Value Phycotoxins From the Dinoflagellate Prorocentrum. *Frontiers in Marine Science* 8.
- Carballo-Cárdenas, E.C.; Tuan, P.M.; Janssen, M.; Wijffels, R.H. 2003. Vitamin E (alpha-tocopherol) production by the marine microalgae *Dunaliella tertiolecta* and *Tetraselmis suecica* in batch cultivation. *Biomolecular Engineering* 20: 139–147.
- Cardozo, K.H.M.; Guaratini, T.; Barros, M.P.; Falcão, V.R.; Tonon, A.P.; Lopes, N.P.; et al. 2007. Metabolites from algae with economical impact. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology* 146: 60–78.
- Carriot, N.; Barry-Martinet, R.; Briand, J.-F.; Ortalo-Magné, A.; Culioli, G. 2022. Impact of phosphate concentration on the metabolome of biofilms of the marine bacterium *Pseudoalteromonas lipolytica*. *Metabolomics: Official Journal of the Metabolomic Society* 18: 18.
- de Carvalho Silvello, M.A.; Severo Gonçalves, I.; Patrícia Held Azambuja, S.; Silva Costa, S.; Garcia Pereira Silva, P.; Oliveira Santos, L.; et al. 2022. Microalgae-based carbohydrates: A green innovative source of bioenergy. *Bioresource Technology* 344: 126304.
- Carvalho, W.F.; Granéli, E. 2010. Contribution of phagotrophy versus autotrophy to *Prymnesium parvum* growth under nitrogen and phosphorus sufficiency and deficiency. *Harmful Algae* 9: 105–115.
- Casali, S.P.; Dos Santos, A.C.A.; de Falco, P.B.; Calijuri, M. do C. 2017. Influence of environmental variables on saxitoxin yields by *Cylindrospermopsis raciborskii* in a mesotrophic subtropical reservoir. *Journal of Water and Health* 15: 509–518.
- Castro-Mejía, J.; Castro-Barrera, T.; Hernández-Hernández, L.H.; Arredondo-Figueroa, J.L.; Castro-Mejía, G.; de Lara-Andrade, R. 2011. Effects of salinity on growth and survival in five *Artemia franciscana* (Anostraca: Artemiidae) populations from Mexico Pacific Coast. *Revista De Biología Tropical* 59: 199–206.
- Cestèle, S.; Catterall, W.A. 2000. Molecular mechanisms of neurotoxin action on voltage-gated sodium channels. *Biochimie* 82: 883–892.
- Cetinkaya, F.; Elal Mus, T. 2012. Shellfish Poisoning and Toxins. *Journal of Biological and Environmental Sciences* 6: 115–119.
- Chaffin, J.D.; Davis, T.W.; Smith, D.J.; Baer, M.M.; Dick, G.J. 2018. Interactions between nitrogen form, loading rate, and light intensity on *Microcystis* and *Planktothrix* growth and microcystin production. *Harmful Algae* 73: 84–97.
- Chakdar, H.; Hasan, M.; Pabbi, S.; Nevalainen, H.; Shukla, P. 2021. High-throughput proteomics and metabolomic studies guide re-engineering of metabolic pathways in eukaryotic microalgae: A review. *Bioresource Technology* 321: 124495.
- Chakraborty, S.; Roy, S.; Chattopadhyay, J. 2008. Nutrient-limited toxin production and the dynamics of two phytoplankton in culture media: A mathematical model. *Ecological Modelling* 213: 191–201.
- Chambers, M.C.; Maclean, B.; Burke, R.; Amodi, D.; Ruderman, D.L.; Neumann, S.; et al. 2012. A cross-platform toolkit for mass spectrometry and proteomics. *Nature Biotechnology* 30: 918–920.
- Chee Yew Leong, S.; Taguchi, S. 2004. Response of the dinoflagellate *Alexandrium tamarense* to a range of nitrogen sources and concentrations: growth rate, chemical carbon and nitrogen, and pigments. *Hydrobiologia* 515: 215–224.
- Chen, Q.; Wang, M.; Zhang, J.; Shi, W.; Mynett, A.E.; Yan, H.; et al. 2019. Physiological effects of nitrate, ammonium, and urea on the growth and microcystins contamination of *Microcystis aeruginosa*: Implication for nitrogen mitigation. *Water Research* 163: 114890.
- Cheng, P.; Wang, J.; Liu, T. 2014. Effects of nitrogen source and nitrogen supply model on the growth and hydrocarbon accumulation of immobilized biofilm cultivation of *B. braunii*. *Bioresource Technology* 166: 527–533.
- Cheng, P.; Ji, B.; Gao, L.; Zhang, W.; Wang, J.; Liu, T. 2013. The growth, lipid and hydrocarbon production of *Botryococcus braunii* with attached cultivation. *Bioresource Technology* 138: 95–100.

- Cherifi, T.; Jacques, M.; Quessy, S.; Fravallo, P. 2017. Impact of Nutrient Restriction on the Structure of *Listeria monocytogenes* Biofilm Grown in a Microfluidic System. *Frontiers in Microbiology* 8.
- Chernin, E. 1970. Interspecific Chemical Signals. *BioScience* 20: 845–845.
- Chia, M.A.; Cordeiro-Araújo, M.K.; Lorenzi, A.S.; Bittencourt-Oliveira, M. do C. 2016. Does anatoxin-a influence the physiology of *Microcystis aeruginosa* and *Acutodesmus acuminatus* under different light and nitrogen conditions? *Environmental Science and Pollution Research* 23: 23092–23102.
- Chia, M.A.; Cordeiro-Araújo, M.K.; Lorenzi, A.S.; Bittencourt-Oliveira, M. do C. 2017. Cylindrospermopsin induced changes in growth, toxin production and antioxidant response of *Acutodesmus acuminatus* and *Microcystis aeruginosa* under differing light and nitrogen conditions. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 142: 189–199.
- Chia, M.A.; Jankowiak, J.G.; Kramer, B.J.; Goleski, J.A.; Huang, I.-S.; Zimba, P.V.; et al. 2018. Succession and toxicity of *Microcystis* and *Anabaena* (*Dolichospermum*) blooms are controlled by nutrient-dependent allelopathic interactions. *Harmful Algae* 74: 67–77.
- Chinain, M.; Gatti, C.M.I.; Darius, H.T.; Quod, J.-P.; Tester, P.A. 2021. Ciguatera poisonings: A global review of occurrences and trends. *Harmful Algae* 102: 101873.
- Cho, Y.; Tsuchiya, S.; Omura, T.; Koike, K.; Oikawa, H.; Konoki, K.; et al. 2019. Metabolomic study of saxitoxin analogues and biosynthetic intermediates in dinoflagellates using ¹⁵N-labelled sodium nitrate as a nitrogen source. *Scientific Reports* 9: 3460.
- Christiansen, G.; Fastner, J.; Erhard, M.; Börner, T.; Dittmann, E. 2003. Microcystin Biosynthesis in *Planktothrix*: Genes, Evolution, and Manipulation. *Journal of Bacteriology* 185: 564–572.
- Christou, E.D.; Varkitzi, I.; Maneiro, I.; Zervoudaki, S.; Pagou, K. 2023. The Influence of the Toxic Dinoflagellate *Alexandrium minutum*, Grown under Different N:P Ratios, on the Marine Copepod *Acartia tonsa*. *Toxins* 15: 287.
- Chu, W.-L.; Phang, S.-M. 2019. Bioactive Compounds from Microalgae and Their Potential Applications as Pharmaceuticals and Nutraceuticals. In: Hallmann, A.; Rampelotto, P.H. (Eds.), *Grand Challenges in Algae Biotechnology*, Springer International Publishing, Cham, p.429–469.
- Ciminiello, P.; Dell’Aversano, C.; Fattorusso, E.; Forino, M.; Magno, G.S.; Tartaglione, L.; et al. 2006. The Genoa 2005 Outbreak. Determination of Putative Palytoxin in Mediterranean *Ostreopsis ovata* by a New Liquid Chromatography Tandem Mass Spectrometry Method. *Analytical Chemistry* 78: 6153–6159.
- Ciminiello, P.; Dell’Aversano, C.; Fattorusso, E.; Forino, M.; Tartaglione, L.; Grillo, C.; et al. 2008. Putative palytoxin and its new analogue, ovatoxin-a, in *Ostreopsis ovata* collected along the Ligurian coasts during the 2006 toxic outbreak. *Journal of the American Society for Mass Spectrometry* 19: 111–120.
- Cochlan, W.P.; Herndon, J.; Kudela, R.M. 2008. Inorganic and organic nitrogen uptake by the toxigenic diatom *Pseudo-nitzschia australis* (Bacillariophyceae). *Harmful Algae* 8: 111–118.
- Cochlan, W.P.; Bill, B.D.; Cailipan, A.B.; Trainer, V.L. 2023. Domoic acid production by *Pseudo-nitzschia australis*: Re-evaluating the role of macronutrient limitation on toxigenicity. *Harmful Algae* 125: 102431.
- Cohu, S.; Mangialajo, L.; Thibaut, T.; Blanfuné, A.; Marro, S.; Lemée, R. 2013. Proliferation of the toxic dinoflagellate *Ostreopsis cf. ovata* in relation to depth, biotic substrate and environmental factors in the North West Mediterranean Sea. *Harmful Algae* 24: 32–44.
- Colas, S.; Marie, B.; Lance, E.; Quiblier, C.; Tricoire-Leignel, H.; Mattei, C. 2021. Anatoxin-a: Overview on a harmful cyanobacterial neurotoxin from the environmental scale to the molecular target. *Environmental Research* 193: 110590.
- Coley, P.D.; Bryant, J.P.; Chapin, F.S. 1985. Resource availability and plant antiherbivore defense. *Science (New York, N.Y.)* 230: 895–899.
- Collos, Y.; Mornet, F.; Sciandra, A.; Waser, N.; Larson, A.; Harrison, P.J. 1999. An optical method for the rapid measurement of micromolar concentrations of nitrate in marine phytoplankton cultures. *Journal of Applied Phycology* 11: 179–184.
- Combe, C. 2016. *Effets quantitatifs et qualitatifs de la lumière sur la croissance des microalgues en culture dense et sur leur production de molécules d'intérêt : vers l'optimisation des procédés de production de microalgues*. phdthesis, Université Pierre et Marie Curie - Paris VI, (<https://theses.hal.science/tel-01395588>).

- Corcoran, A.A.; Richardson, B.; Flewelling, L.J. 2014. Effects of nutrient-limiting supply ratios on toxin content of *Karenia brevis* grown in continuous culture. *Harmful Algae* 39: 334–341.
- Coyne, K.J.; Wang, Y.; Johnson, G. 2022. Algicidal Bacteria: A Review of Current Knowledge and Applications to Control Harmful Algal Blooms. *Frontiers in Microbiology* 13.
- de la Cruz, A.A.; Hiskia, A.; Kaloudis, T.; Chernoff, N.; Hill, D.; Antoniou, M.G.; et al. 2013. A review on cylindrospermopsin: the global occurrence, detection, toxicity and degradation of a potent cyanotoxin. *Environmental Science. Processes & Impacts* 15: 1979–2003.
- Cusick, K.D.; Sayler, G.S. 2013. An overview on the marine neurotoxin, saxitoxin: genetics, molecular targets, methods of detection and ecological functions. *Marine Drugs* 11: 991–1018.
- Custódio, L.; Soares, F.; Pereira, H.; Barreira, L.; Vizetto-Duarte, C.; Rodrigues, M.J.; et al. 2014. Fatty acid composition and biological activities of *Isochrysis galbana* T-ISO, *Tetraselmis* sp. and *Scenedesmus* sp.: possible application in the pharmaceutical and functional food industries. *Journal of Applied Phycology* 26: 151–161.
- Cutignano, A.; Nuzzo, G.; Ianora, A.; Luongo, E.; Romano, G.; Gallo, C.; et al. 2015. Development and Application of a Novel SPE-Method for Bioassay-Guided Fractionation of Marine Extracts. *Marine Drugs* 13: 5736–5749.
- Dahl, U.; Lind, C.R.; Gorokhova, E.; Eklund, B.; Breitholtz, M. 2009. Food quality effects on copepod growth and development: implications for bioassays in ecotoxicological testing. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 72: 351–357.
- Dahmen-Ben Moussa, I.; Chtourou, H.; Karray, F.; Sayadi, S.; Dhoub, A. 2017. Nitrogen or phosphorus repletion strategies for enhancing lipid or carotenoid production from *Tetraselmis marina*. *Bioresource Technology* 238: 325–332.
- Dai, R.; Liu, H.; Qu, J.; Zhao, X.; Hou, Y. 2009. Effects of amino acids on microcystin production of the *Microcystis aeruginosa*. *Journal of Hazardous Materials* 161: 730–736.
- Dai, R.; Liu, H.; Qu, J.; Zhao, X.; Ru, J.; Hou, Y. 2008. Relationship of energy charge and toxin content of *Microcystis aeruginosa* in nitrogen-limited or phosphorous-limited cultures. *Toxicon* 51: 649–658.
- Dammak, M.; Hadrich, B.; Miladi, R.; Barkallah, M.; Hentati, F.; Hachicha, R.; et al. 2017. Effects of nutritional conditions on growth and biochemical composition of *Tetraselmis* sp. *Lipids in Health and Disease* 16: 41.
- Danchin, É. 2022. *La Synthèse Inclusive De L'évolution: L'HÉRÉDITÉ AU-DELÀ DU GÈNE ÉGOÏSTE*. Actes Sud Nature, 313p.
- Davidson, K.; Gowen, R.J.; Tett, P.; Bresnan, E.; Harrison, P.J.; McKinney, A.; et al. 2012. Harmful algal blooms: How strong is the evidence that nutrient ratios and forms influence their occurrence? *Estuarine, Coastal and Shelf Science* 115: 399–413.
- Davis, T.W.; Orr, P.T.; Boyer, G.L.; Burford, M.A. 2014. Investigating the production and release of cylindrospermopsin and deoxy-cylindrospermopsin by *Cylindrospermopsis raciborskii* over a natural growth cycle. *Harmful Algae* 31: 18–25.
- Davis, T.W.; Harke, M.J.; Marcoval, M.A.; Goleski, J.; Orano-Dawson, C.; Berry, D.L.; et al. 2010. Effects of nitrogenous compounds and phosphorus on the growth of toxic and non-toxic strains of *Microcystis* during cyanobacterial blooms. *Aquatic Microbial Ecology* 61: 149–162.
- Deeds, J.; Terlizzi, D.; Adolf, J.; Stoecker, D.; Place, A. 2002. Toxic activity from cultures of *Karlodinium micrum* (= *Gyrodinium galatheanum*) (Dinophyceae) - A dinoflagellate associated with fish mortalities in an estuarine aquaculture facility. *Harmful Algae* 1: 169–189.
- Deeds, J.R.; Hoesch, R.E.; Place, A.R.; Kao, J.P.Y. 2015. The cytotoxic mechanism of karlotoxin 2 (KmTx 2) from *Karlodinium veneficum* (Dinophyceae). *Aquatic toxicology (Amsterdam, Netherlands)* 159: 148–155.
- Delaporte, M.; Soudant, P.; Moal, J.; Lambert, C.; Quéré, C.; Miner, P.; et al. 2003. Effect of a mono-specific algal diet on immune functions in two bivalve species--*Crassostrea gigas* and *Ruditapes philippinarum*. *The Journal of Experimental Biology* 206: 3053–3064.
- Delaporte, M.; Soudant, P.; Moal, J.; Kraffe, E.; Marty, Y.; Samain, J.-F. 2005. Incorporation and modification of dietary fatty acids in gill polar lipids by two bivalve species *Crassostrea gigas* and *Ruditapes*

- philippinarum. *Comparative Biochemistry and Physiology. Part A, Molecular & Integrative Physiology* 140: 460–470.
- Delran, P. 2023. *Développement de procédés durables de bioraffinage de microalgues marines pour l'obtention de molécules d'intérêt : analyse de procédés physiques de lyse cellulaire appliqués à Tetraselmis suecica*. These de doctorat, Toulouse, INPT, (<https://theses.fr/2023INPT0035>).
- Delran, P.; Frances, C.; Guihéneuf, F.; Peydecastaing, J.; Pontalier, P.-Y.; Barthe, L. 2023. *Tetraselmis suecica* biofilm cell destruction by high-pressure homogenization for protein extraction. *Bioresource Technology Reports* 21: 101372.
- Dewi, I.C.; Falaise, C.; Hellio, C.; Bourgougnon, N.; Mouget, J.-L. 2018. Chapter 12 - Anticancer, Antiviral, Antibacterial, and Antifungal Properties in Microalgae. In: Levine, I.A.; Fleurence, J. (Eds.), *Microalgae in Health and Disease Prevention*, Academic Press, p.235–261.
- Dewick, P.M. 2009. Secondary Metabolism: The Building Blocks and Construction Mechanisms. In: *Medicinal Natural Products*, John Wiley & Sons, Ltd, p.7–38.
- Dicke, M.; Sabelis, M.W. 1988. Infochemical Terminology: Based on Cost-Benefit Analysis Rather than Origin of Compounds? *Functional Ecology* 2: 131–139.
- Dittmann, E.; Neilan, B.A.; Erhard, M.; von Döhren, H.; Börner, T. 1997. Insertional mutagenesis of a peptide synthetase gene that is responsible for hepatotoxin production in the cyanobacterium *Microcystis aeruginosa* PCC 7806. *Molecular Microbiology* 26: 779–787.
- Doré, H.; Guyet, U.; Leconte, J.; Farrant, G.K.; Alric, B.; Ratin, M.; et al. 2023. Differential global distribution of marine picocyanobacteria gene clusters reveals distinct niche-related adaptive strategies. *The ISME Journal* 17: 720–732.
- Downing, T.G.; Meyer, C.; Gehringer, M.M.; van de Venter, M. 2005. 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.
- Drijfhout, F. 2017. Chemical Ecology. In: *eLS*, John Wiley & Sons, Ltd, p.1–11.
- Droop, M.R. 1968. Vitamin B12 and Marine Ecology. IV. The Kinetics of Uptake, Growth and Inhibition in *Monochrysis Lutheri*. *Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom* 48: 689–733.
- D'Souza, F.M.L.; Kelly, G.J. 2000. Effects of a diet of a nitrogen-limited alga (*Tetraselmis suecica*) on growth, survival and biochemical composition of tiger prawn (*Penaeus semisulcatus*) larvae. *Aquaculture* 181: 311–329.
- Duff, D.C.; Bruce, D.L.; Antia, N.J. 1966. The antibacterial activity of marine planktonic algae. *Canadian Journal of Microbiology* 12: 877–884.
- Dyhrman, S.T.; Anderson, D.M. 2003. Urease activity in cultures and field populations of the toxic dinoflagellate *Alexandrium*. *Limnology and Oceanography* 48: 647–655.
- Eloff, J.N. 2007. A Sensitive and Quick Microplate Method to Determine the Minimal Inhibitory Concentration of Plant Extracts for Bacteria. *Planta Medica* 64: 711–713.
- Eloff, J.N. 2019. Avoiding pitfalls in determining antimicrobial activity of plant extracts and publishing the results. *BMC Complementary and Alternative Medicine* 19: 106.
- Erb, M.; Kliebenstein, D.J. 2020. Plant Secondary Metabolites as Defenses, Regulators, and Primary Metabolites: The Blurred Functional Trichotomy. *Plant Physiology* 184: 39–52.
- Ereshefsky, M.; Pedroso, M. 2013. Biological individuality: the case of biofilms. *Biology & Philosophy* 28: 331–349.
- Erratt, K.J.; Creed, I.F.; Trick, C.G. 2018. Comparative effects of ammonium, nitrate and urea on growth and photosynthetic efficiency of three bloom-forming cyanobacteria. *Freshwater Biology* 63: 626–638.
- Etheridge, S.M. 2010. Paralytic shellfish poisoning: Seafood safety and human health perspectives. *Toxicon* 56: 108–122.
- Exner, M.; Bhattacharya, S.; Christiansen, B.; Gebel, J.; Goroncy-Bermes, P.; Hartemann, P.; et al. 2017. Antibiotic resistance: What is so special about multidrug-resistant Gram-negative bacteria? *GMS Hygiene and Infection Control* 12: Doc05.

- Fábregas, J.; Otero, A.; Domínguez, A.; Patiño, M. 2001. Growth Rate of the microalga *Tetraselmis suecica* changes the biochemical composition of *Artemia* species. *Marine Biotechnology (New York, N.Y.)* 3: 256–263.
- Falconer, I.R. 2007. Cyanobacterial toxins present in *Microcystis aeruginosa* extracts—More than microcystins! *Toxicon* 50: 585–588.
- Fanesi, A.; Paule, A.; Bernard, O.; Briandet, R.; Lopes, F. 2019. The Architecture of Monospecific Microalgae Biofilms. *Microorganisms* 7: 352.
- Fanesi, A.; Lavayssière, M.; Breton, C.; Bernard, O.; Briandet, R.; Lopes, F. 2021. Shear stress affects the architecture and cohesion of *Chlorella vulgaris* biofilms. *Scientific Reports* 11: 4002.
- Feeny, P. 1976. Plant Apparency and Chemical Defense. In: Wallace, J.W.; Mansell, R.L. (Eds.), *Biochemical Interaction Between Plants and Insects*, Springer US, Boston, MA, p.1–40.
- Feng, D.; Chen, Z.; Xue, S.; Zhang, W. 2011. Increased lipid production of the marine oleaginous microalgae *Isochrysis zhangjiangensis* (Chrysophyta) by nitrogen supplement. *Bioresource Technology* 102: 6710–6716.
- Fernandez-Valenzuela, S.; Ruvalcaba, F.; Beltrán-Rocha, J.; Claudio, P.; Reyna, G. 2021. Isolation and Culturing Axenic Microalgae: Mini-Review. *The Open Microbiology Journal* 15: 111–119.
- Figueredo, C.C.; Giani, A.; Bird, D.F. 2007. Does Allelopathy Contribute to *Cylindrospermopsis Raciborskii* (cyanobacteria) Bloom Occurrence and Geographic Expansion?1. *Journal of Phycology* 43: 256–265.
- Figueredo, C.C.; Von Rückert, G.; Cupertino, A.; Pontes, M.A.; Fernandes, L.A.; Ribeiro, S.G.; et al. 2014. Lack of nitrogen as a causing agent of *Cylindrospermopsis raciborskii* intermittent blooms in a small tropical reservoir. *FEMS Microbiology Ecology* 87: 557–567.
- Fistarol, G.; Legrand, C.; Granéli, E. 2003. Allelopathic Effect of *Prymnesium parvum* on a Natural Plankton Community. *Marine Ecology-progress Series - MAR ECOL-PROGR SER* 255: 115–125.
- Fleming, L.E.; Kirkpatrick, B.; Backer, L.C.; Walsh, C.J.; Nierenberg, K.; Clark, J.; et al. 2011. Review of Florida Red Tide and Human Health Effects. *Harmful algae* 10: 224–233.
- Flemming, H.-C.; Wingender, J. 2010. The biofilm matrix. *Nature Reviews Microbiology* 8: 623–633.
- Flemming, H.-C.; Wuertz, S. 2019. Bacteria and archaea on Earth and their abundance in biofilms. *Nature Reviews Microbiology* 17: 247–260.
- Flynn, K.; Franco, J.; Fernandez, P.; Reguera, B.; Zapata, M.; GJ, W. 1994. Changes in toxin content, biomass and pigments of the dinoflagellate *Alexandrium minutum* during nitrogen refeeding and growth into nitrogen or phosphorus stress. *Marine Ecology-progress Series - MAR ECOL-PROGR SER* 111: 99–109.
- Flynn, K.; Franco, J.; Fernandez, P.; Reguera, B.; Zapata, M.; Flynn, K.J. 1995. Nitrogen And Phosphorus Limitation In Cultured *Alexandrium minutum* Halim Does Not Promote Toxin Production. .
- Flynn, K.; Fynn, K.; John, E.; Reguera, B.; Reyero, I.; Franco, J. 1996. Changes in toxins, intracellular and dissolved free amino acids of the toxic dinoflagellate *Gymnodinium catenatum* in response to changes in inorganic nutrients and salinity. *Journal of Plankton Research* 18.
- Frangópulos, M.; Guisande, C.; deBlas, E.; Maneiro, I. 2004. Toxin production and competitive abilities under phosphorus limitation of *Alexandrium* species. *Harmful Algae* 3: 131–139.
- Friedl, T.; Rybalka, N.; Kryvenda, A. 2012. 2 Phylogeny and systematics of microalgae: An overview. In: *Microalgal Biotechnology: Potential and Production*, De Gruyter, p.11–38.
- Friedman, M.A.; Fernandez, M.; Backer, L.C.; Dickey, R.W.; Bernstein, J.; Schrank, K.; et al. 2017. An Updated Review of Ciguatera Fish Poisoning: Clinical, Epidemiological, Environmental, and Public Health Management. *Marine Drugs* 15: 72.
- Fujii, K.; Sivonen, K.; Kashiwagi, T.; Hirayama, K.; Harada, K. 1999. Nostophycin, a Novel Cyclic Peptide from the Toxic Cyanobacterium *Nostoc* sp. 152. *The Journal of Organic Chemistry* 64: 5777–5782.
- Gacheva, G.V.; Gigova, L.G. 2014. Biological activity of microalgae can be enhanced by manipulating the cultivation temperature and irradiance. *Central European Journal of Biology* 9: 1168–1181.
- Gagnon, A.; Pick, F.R. 2012. Effect of Nitrogen on Cellular Production and Release of the Neurotoxin Anatoxin-A in a Nitrogen-Fixing Cyanobacterium. *Frontiers in Microbiology* 3.

- Gallardo Rodríguez, J.J.; Sánchez Mirón, A.; Cerón García, M. del C.; Belarbi, E.H.; García Camacho, F.; Chisti, Y.; et al. 2009. Macronutrients requirements of the dinoflagellate *Protoceratium reticulatum*. *Harmful Algae* 8: 239–246.
- García-Portela, M.; Reguera, B.; Gago, J.; Le Gac, M.; Rodríguez, F. 2020. Uptake of Inorganic and Organic Nitrogen Sources by *Dinophysis acuminata* and *D. acuta*. *Microorganisms* 8: 187.
- Garrett, T.R.; Bhakoo, M.; Zhang, Z. 2008. Bacterial adhesion and biofilms on surfaces. *Progress in Natural Science* 18: 1049–1056.
- Geffroy, S.; Lechat, M.-M.; Le Gac, M.; Rovillon, G.-A.; Marie, D.; Bigeard, E.; et al. 2021. From the sxtA4 Gene to Saxitoxin Production: What Controls the Variability Among *Alexandrium minutum* and *Alexandrium pacificum* Strains? *Frontiers in Microbiology* 12: 613199.
- Ginn, H.P.; Pearson, L.A.; Neilan, B.A. 2010. NtcA from *Microcystis aeruginosa* PCC 7806 Is Autoregulatory and Binds to the Microcystin Promoter. *Applied and Environmental Microbiology* 76: 4362–4368.
- Go, S.; Lee, S.-J.; Jeong, G.-T.; Kim, S.-K. 2012. Factors affecting the growth and the oil accumulation of marine microalgae, *Tetraselmis suecica*. *Bioprocess and Biosystems Engineering* 35: 145–150.
- González, I.; Herrero, N.; Siles, J.Á.; Chica, A.F.; Martín, M.Á.; Izquierdo, C.G.; et al. 2020. Wastewater nutrient recovery using twin-layer microalgae technology for biofertilizer production. *Water Science and Technology: A Journal of the International Association on Water Pollution Research* 82: 1044–1061.
- Goswami, R.K.; Agrawal, K.; Mehariya, S.; Verma, P. 2022. Current perspective on wastewater treatment using photobioreactor for *Tetraselmis* sp.: an emerging and foreseeable sustainable approach. *Environmental Science and Pollution Research* 29: 61905–61937.
- Gould, S.J.; Vrba, E.S. 1982. Exaptation—a Missing Term in the Science of Form. *Paleobiology* 8: 4–15.
- Graham, H.W. 1943. *Gymnodinium catenatum*, a New Dinoflagellate from the Gulf of California. *Transactions of the American Microscopical Society* 62: 259–261.
- Granéli, E.; Johansson, N. 2003. Increase in the production of allelopathic substances by *Prymnesium parvum* cells grown under N- or P-deficient conditions. *Harmful Algae* 2: 135–145.
- Granéli, E.; Salomon, P.S. 2010. Factors Influencing Allelopathy and Toxicity in *Prymnesium parvum*1. *JAWRA Journal of the American Water Resources Association* 46: 108–120.
- Granéli, E.; Weberg, M.; Salomon, P.S. 2008. Harmful algal blooms of allelopathic microalgal species: The role of eutrophication. *Harmful Algae* 8: 94–102.
- Griffin, J.E.; Park, G.; Dam, H.G. 2019. Relative importance of nitrogen sources, algal alarm cues and grazer exposure to toxin production of the marine dinoflagellate *Alexandrium catenella*. *Harmful Algae* 84: 181–187.
- Griffiths, D.J.; Saker, M.L. 2003. The Palm Island mystery disease 20 years on: A review of research on the cyanotoxin cylindrospermopsin. *Environmental Toxicology* 18: 78–93.
- Gross, E.M.; Hilt (nee Körner), S.; Lombardo, P.; Mulderij, G. 2007. Searching for allelopathic effects of submerged macrophytes on phytoplankton—state of the art and open questions. *Hydrobiologia* 584: 77–88.
- Grosso, C.; Valentão, P.; Ferreres, F.; Andrade, P.B. 2015. Alternative and Efficient Extraction Methods for Marine-Derived Compounds. *Marine Drugs* 13: 3182–3230.
- Gu, S.; Xiao, S.-W.; Zheng, J.-W.; Li, H.-Y.; Liu, J.-S.; Yang, W.-D. 2019. ABC Transporters in *Prorocentrum lima* and Their Expression Under Different Environmental Conditions Including Okadaic Acid Production. *Marine Drugs* 17: 259.
- Guariento, R.D.; Carneiro, L.S.; Caliman, A.; Bozelli, R.L.; Esteves, F.A. 2011. How light and nutrients affect the relationship between autotrophic and heterotrophic biomass in a tropical black water periphyton community. *Aquatic Ecology* 45: 561–569.
- Guedes, A.C.; Amaro, H.M.; Malcata, F.X. 2011. Microalgae as Sources of Carotenoids. *Marine Drugs* 9: 625–644.
- Guerrini, F.; Ciminiello, P.; Dell’Aversano, C.; Tartaglione, L.; Fattorusso, E.; Boni, L.; et al. 2007. Influence of temperature, salinity and nutrient limitation on yessotoxin production and release by the dinoflagellate *Protoceratium reticulatum* in batch-cultures. *Harmful Algae* 6: 707–717.

- Guillard, R.R.L. 1975. Culture of Phytoplankton for Feeding Marine Invertebrates. In: Smith, W.L.; Chanley, M.H. (Eds.), *Culture of Marine Invertebrate Animals: Proceedings — 1st Conference on Culture of Marine Invertebrate Animals Greenport*, Springer US, Boston, MA, p.29–60.
- Guillard, R.R.L.; Ryther, J.H. 1962. Studies of marine planktonic diatoms: i. *cyclotella nana* hustedt, and *detonula confervacea* (cleve) gran. *Canadian Journal of Microbiology* 8: 229–239.
- Guisande, C.; Frangópulos, M.; Maneiro, I.; Vergara, A.; Riveiro, I. 2002. Ecological advantages of toxin production by the dinoflagellate *Alexandrium minutum* under phosphorus limitation. *Marine Ecology Progress Series* 225: 169–176.
- Gutierrez, J.; Kwan, T.A.; Zimmerman, J.B.; Peccia, J. 2016. Ammonia inhibition in oleaginous microalgae. *Algal Research* 19: 123–127.
- Guzmán, F.; Wong, G.; Román, T.; Cárdenas, C.; Álvarez, C.; Schmitt, P.; et al. 2019. Identification of Antimicrobial Peptides from the Microalgae *Tetraselmis suecica* (Kylin) Butcher and Bactericidal Activity Improvement. *Marine Drugs* 17: 453.
- Ha, J.H.; Hidaka, T.; Tsuno, H. 2009. Quantification of Toxic *Microcystis* and Evaluation of Its Dominance Ratio in Blooms Using Real-Time PCR. *Environmental Science & Technology* 43: 812–818.
- Hagström, J.A.; Granéli, E.; Moreira, M.O.P.; Odebrecht, C. 2011. Domoic acid production and elemental composition of two *Pseudo-nitzschia* multiseries strains, from the NW and SW Atlantic Ocean, growing in phosphorus- or nitrogen-limited chemostat cultures. *Journal of Plankton Research* 33: 297–308.
- Hall, S. 1982. Toxins And Toxicity Of *Protogonyaulax* From The Northeast Pacific. .
- Hamasaki, K.; Horie, M.; Tokimitsu, S.; Toda, T.; Taguchi, S. 2001. Variability in Toxicity of the Dinoflagellate *Alexandrium Tamarense* Isolated from Hiroshima Bay, Western Japan, as a Reflection of Changing Environmental Conditions. *Journal of Plankton Research* 23: 271–278.
- Han, M.; Lee, H.; Anderson, D.M.; Kim, B. 2016. Paralytic shellfish toxin production by the dinoflagellate *Alexandrium pacificum* (Chinhae Bay, Korea) in axenic, nutrient-limited chemostat cultures and nutrient-enriched batch cultures. *Marine Pollution Bulletin* 104: 34–43.
- Haoujar, I.; Cacciola, F.; Abrini, J.; Mangraviti, D.; Giuffrida, D.; Oulad El Majdoub, Y.; et al. 2019. The Contribution of Carotenoids, Phenolic Compounds, and Flavonoids to the Antioxidative Properties of Marine Microalgae Isolated from Mediterranean Morocco. *Molecules (Basel, Switzerland)* 24: 4037.
- Harborne, J.B. 2001. Twenty-five years of chemical ecology. *Natural Product Reports* 18: 361–379.
- Harder, T.; Campbell, A.H.; Egan, S.; Steinberg, P.D. 2012. Chemical Mediation of Ternary Interactions Between Marine Holobionts and Their Environment as Exemplified by the Red Alga *Delisea pulchra*. *Journal of Chemical Ecology* 38: 442–450.
- Harke, M.J.; Gobler, C.J. 2015. Daily transcriptome changes reveal the role of nitrogen in controlling microcystin synthesis and nutrient transport in the toxic cyanobacterium, *Microcystis aeruginosa*. *BMC Genomics* 16: 1068.
- Hasegawa, M.; Nishizawa, A.; Tsuji, K.; Kimura, S.; Harada, K. 2012. Volatile Organic Compounds Derived from 2-Keto-Acid Decarboxylase in *Microcystis aeruginosa*. *Microbes and Environments* 27: 525–528.
- Hattenrath, T.K.; Anderson, D.M.; Gobler, C.J. 2010. The influence of anthropogenic nitrogen loading and meteorological conditions on the dynamics and toxicity of *Alexandrium fundyense* blooms in a New York (USA) estuary. *Harmful Algae* 9: 402–412.
- Hattenrath-Lehmann, T.K.; Marcoval, M.A.; Middlesdorf, H.; Goleski, J.A.; Wang, Z.; Haynes, B.; et al. 2015. Nitrogenous Nutrients Promote the Growth and Toxicity of *Dinophysis acuminata* during Estuarine Bloom Events. *PLOS ONE* 10: e0124148.
- Hay, M.E. 2009. Marine Chemical Ecology: Chemical Signals and Cues Structure Marine Populations, Communities, and Ecosystems. *Annual Review of Marine Science* 1: 193–212.
- Hay, M.E. 2014. Challenges and Opportunities in Marine Chemical Ecology. *Journal of chemical ecology* 40: 216–217.
- Heinrich, M.; Appendino, G.; Efferth, T.; Fürst, R.; Izzo, A.A.; Kayser, O.; et al. 2020. Best practice in research – Overcoming common challenges in phytopharmacological research. *Journal of Ethnopharmacology* 246: 112230.

- Hellebust, J.A.; Ahmad, I. 1989. Regulation of Nitrogen Assimilation in Green Microalgae. *Biological Oceanography* 6: 241–255.
- Henrikson, J.C.; Gharfeh, M.S.; Easton, A.C.; Easton, J.D.; Glenn, K.L.; Shadfan, M.; et al. 2010. Reassessing the ichthyotoxin profile of cultured *Prymnesium parvum* (golden algae) and comparing it to samples collected from recent freshwater bloom and fish kill events in North America. *Toxicon* 55: 1396–1404.
- Hentzer, M.; Riedel, K.; Rasmussen, T.B.; Heydorn, A.; Andersen, J.B.; Parsek, M.R.; et al. 2002. Inhibition of quorum sensing in *Pseudomonas aeruginosa* biofilm bacteria by a halogenated furanone compound. *Microbiology* 148: 87–102.
- Hernández-Sandoval, F.E.; Bustillos-Guzmán, J.J.; Band-Schmidt, C.J.; Núñez-Vázquez, E.J.; López-Cortés, D.J.; Fernández-Herrera, L.J.; et al. 2022. Effect of Different N:P Ratios on the Growth, Toxicity, and Toxin Profile of *Gymnodinium catenatum* (Dinophyceae) Strains from the Gulf of California. *Toxins* 14: 501.
- Hernández-Urcera, J.; Romero, A.; Cruz, P.; Vasconcelos, V.; Figueras, A.; Novoa, B.; et al. 2024. Screening of Microalgae for Bioactivity with Antiviral, Antibacterial, Anti-Inflammatory and Anti-Cancer Assays. *Biology* 13: 255.
- Hii, K.S.; Lim, P.T.; Kon, N.F.; Takata, Y.; Usup, G.; Leaw, C.P. 2016. Physiological and transcriptional responses to inorganic nutrition in a tropical Pacific strain of *Alexandrium minutum*: Implications for the saxitoxin genes and toxin production. *Harmful Algae* 56: 9–21.
- Hillebrand, H.; Sommer, U. 1996. Nitrogenous nutrition of the potentially toxic diatom *Pseudonitzschia pungens* f. multiseries Hasle. *Journal of Plankton Research* 18: 295–301.
- Horgan, R.P.; Kenny, L.C. 2011. ‘Omic’ technologies: genomics, transcriptomics, proteomics and metabolomics. *The Obstetrician & Gynaecologist* 13: 189–195.
- Hori, T.; Norris, R.E.; Chihara, M. 1986. Studies on the ultrastructure and taxonomy of the genus *Tetraselmis* (Prasinophyceae). *The botanical magazine = Shokubutsu-gaku-zasshi* 99: 123–135.
- Horst, G.P.; Sarnelle, O.; White, J.D.; Hamilton, S.K.; Kaul, R.B.; Bressie, J.D. 2014. Nitrogen availability increases the toxin quota of a harmful cyanobacterium, *Microcystis aeruginosa*. *Water Research* 54: 188–198.
- Hort, V.; Abadie, E.; Arnich, N.; Dechraoui Bottein, M.-Y.; Amzil, Z. 2021. Chemodiversity of Brevetoxins and Other Potentially Toxic Metabolites Produced by *Karenia* spp. and Their Metabolic Products in Marine Organisms. *Marine Drugs* 19: 656.
- Hou, D.; Liang, J.; Zou, C.; Li, H.; Liu, J.; Yang, W. 2016. MRP functional activity and character in the dinoflagellate *Prorocentrum lima*. *Journal of Applied Phycology* 28: 1667–1676.
- Howard, M.D.A.; Cochlan, W.P.; Ladizinsky, N.; Kudela, R.M. 2007. Nitrogenous preference of toxigenic *Pseudo-nitzschia australis* (Bacillariophyceae) from field and laboratory experiments. *Harmful Algae* 6: 206–217.
- Howarth, R.W. 2008. Coastal nitrogen pollution: A review of sources and trends globally and regionally. *Harmful Algae* 8: 14–20.
- Howse, P.E.; Stevens, I.D.R.; Jones, O.T. 1998. *Insect Pheromones and their Use in Pest Management*. Springer Netherlands, Dordrecht, .
- Hu, H.; Chen, W.; Shi, Y.; Cong, W. 2006. Nitrate and phosphate supplementation to increase toxin production by the marine dinoflagellate *Alexandrium tamarense*. *Marine Pollution Bulletin* 52: 756–760.
- Hu, Y.; Xiao, Y.; Liao, K.; Leng, Y.; Lu, Q. 2021. Development of microalgal biofilm for wastewater remediation: from mechanism to practical application. *Journal of Chemical Technology & Biotechnology* 96: 2993–3008.
- Huang, W.; Bi, Y.; Hu, Z. 2014. Effects of fertilizer-urea on growth, photosynthetic activity and microcystins production of *Microcystis aeruginosa* isolated from Dianchi Lake. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology* 92: 514–519.
- Hubas, C.; Passarelli, C.; Paterson, D.M. 2018. Microphytobenthic Biofilms: Composition and Interactions. In: Beninger, P.G. (Ed.), *Mudflat Ecology*, Springer International Publishing, Cham, p.63–90.

- Hussein, H.A.; Mohamad, H.; Ghazaly, M.M.; Laith, A.A.; Abdullah, M.A. 2020a. Cytotoxic effects of Tetraselmis suecica chloroform extracts with silver nanoparticle co-application on MCF-7, 4 T1, and Vero cell lines. *Journal of Applied Phycology* 32: 127–143.
- Hussein, H.A.; Kassim, M.N.I.; Maulidiani, M.; Abas, F.; Abdullah, M.A. 2022. Cytotoxicity and ¹H NMR metabolomics analyses of microalgal extracts for synergistic application with Tamoxifen on breast cancer cells with reduced toxicity against Vero cells. *Heliyon* 8: e09192.
- Hussein, H.A.; Syamsumir, D.F.; Radzi, S.A.M.; Siong, J.Y.F.; Zin, N.A.M.; Abdullah, M.A. 2020b. Phytochemical screening, metabolite profiling and enhanced antimicrobial activities of microalgal crude extracts in co-application with silver nanoparticle. *Bioresources and Bioprocessing* 7: 39.
- Ianora, A.; Boersma, M.; ASOTTI, R.; ONTANA, A.; ARDER, J.; OFFMANN, F.; et al. 2006. THE H. T. ODUM SYNTHESIS ESSAY New Trends in Marine Chemical Ecology. .
- Ibarrola, I.; Navarro, E.; Urrutia, M.B. 2000a. Acute and acclimated digestive responses of the cockle Cerastoderma edule (L.) to changes in food quality and quantity. I. Feeding and absorption of biochemical components. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* 252: 181–198.
- Ibarrola, I.; Etxeberria, M.; Iglesias, J.I.; Urrutia, M.B.; Angulo, E. 2000b. Acute and acclimated digestive responses of the cockle Cerastoderma edule (L.) to changes in the food quality and quantity. II. Enzymatic, cellular and tissular responses of the digestive gland. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* 252: 199–219.
- Ibarrola, I.; Larretxea, X.; Navarro, E.; Iglesias, J.I.P.; Urrutia, M.B. 2008. Effects of body-size and season on digestive organ size and the energy balance of cockles fed with a constant diet of phytoplankton. *Journal of Comparative Physiology. B, Biochemical, Systemic, and Environmental Physiology* 178: 501–514.
- Jaja-Chimedza, A.; Gantar, M.; Gibbs, P.D.L.; Schmale, M.C.; Berry, J.P. 2012. Polymethoxy-1-alkenes from Aphanizomenon ovalisporum Inhibit Vertebrate Development in the Zebrafish (Danio rerio) Embryo Model. *Marine Drugs* 10: 2322–2336.
- Jaja-Chimedza, A.; Saez, C.; Sanchez, K.; Gantar, M.; Berry, J.P. 2015. Identification of teratogenic polymethoxy-1-alkenes from Cylindrospermopsis raciborskii, and taxonomically diverse freshwater cyanobacteria and green algae. *Harmful algae* 49: 156–161.
- Jauffrais, T.; Séchet, V.; Herrenknecht, C.; Truquet, P.; Véronique, S.; Tillmann, U.; et al. 2013. Effect of environmental and nutritional factors on growth and azaspiracid production of the dinoflagellate Azadinium spinosum. *Harmful Algae* 27: 138–148.
- Jiang, J.; Yao, C.; Cao, X.; Liu, Y.; Xue, S. 2017. Characterization of starch phosphorylase from the marine green microalga (Chlorophyta) Tetraselmis subcordiformis reveals its potential role in starch biosynthesis. *Journal of Plant Physiology* 218: 84–93.
- Jiang, X.-W.; Wang, J.; Gao, Y.; Chan, L.L.; Lam, P.K.S.; Gu, J.-D. 2015. Relationship of proteomic variation and toxin synthesis in the dinoflagellate Alexandrium tamarense CI01 under phosphorus and inorganic nitrogen limitation. *Ecotoxicology (London, England)* 24: 1744–1753.
- Jiang, Y.; Ji, B.; Wong, R.N.S.; Wong, M.H. 2008. Statistical study on the effects of environmental factors on the growth and microcystins production of bloom-forming cyanobacterium—*Microcystis aeruginosa*. *Harmful Algae* 7: 127–136.
- Jing, Q.; Hu, X.; Ma, Y.; Mu, J.; Liu, W.; Xu, F.; et al. 2019. Marine-Derived Natural Lead Compound Disulfide-Linked Dimer Psammaphin A: Biological Activity and Structural Modification. *Marine Drugs* 17: 384.
- Jo, Q.; Kim, S.-K.; Lee, C.S.; Lee, P.Y. 2011. Live algae as a vector candidate for hydrophobic polychlorinated biphenyls translocation to bivalve filter feeders for laboratory toxicity test. *Journal of Environmental Biology* 32: 787–791.
- Jo, W.S.; Yang, K.M.; Park, H.S.; Kim, G.Y.; Nam, B.H.; Jeong, M.H.; et al. 2012. Effect of Microalgal Extracts of Tetraselmis suecica against UVB-Induced Photoaging in Human Skin Fibroblasts. *Toxicological Research* 28: 241–248.
- Johansson, N.; Granéli, E. 1999. Influence of different nutrient conditions on cell density, chemical composition and toxicity of *Prymnesium parvum* (Haptophyta) in semi-continuous cultures. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* 239: 243–258.

- John, E.H.; Flynn, K.J. 2000. Growth dynamics and toxicity of *Alexandrium fundyense* (Dinophyceae): the effect of changing N:P supply ratios on internal toxin and nutrient levels. *European Journal of Phycology* 35: 11–23.
- John, E.H.; Flynn, K.J. 2002. Modelling changes in paralytic shellfish toxin content of dinoflagellates in response to nitrogen and phosphorus supply. *Marine Ecology Progress Series* 225: 147–160.
- Kaebernick, M.; Neilan, B.A. 2001. Ecological and molecular investigations of cyanotoxin production. *FEMS Microbiology Ecology* 35: 1–9.
- Kamalanathan, M.; Pierangelini, M.; Shearman, L.A.; Gleadow, R.; Beardall, J. 2016. Impacts of nitrogen and phosphorus starvation on the physiology of *Chlamydomonas reinhardtii*. *Journal of Applied Phycology* 28: 1509–1520.
- Kameyama, K.; Sugiura, N.; Isoda, H.; Inamori, Y.; Maekawa, T. 2002. Effect of nitrate and phosphate concentration on production of microcystins by *Microcystis viridis* NIES 102. *Aquatic Ecosystem Health & Management* 5: 443–449.
- Karadžić, V.; Simić, G.S.; Natić, D.; Ržanićanin, A.; Ćirić, M.; Gačić, Z. 2013. Changes in the phytoplankton community and dominance of *Cylindrospermopsis raciborskii* (Wolosz.) Subba Raju in a temperate lowland river (Ponjavica, Serbia). *Hydrobiologia* 711: 43–60.
- Karlusich, J.J.P.; Ibarbalz, F.M.; Bowler, C. 2020. Exploration of marine phytoplankton: from their historical appreciation to the omics era. *Journal of Plankton Research* 42: 595–612.
- Katarzyna, L.; Sai, G.; Singh, O.A. 2015. Non-enclosure methods for non-suspended microalgae cultivation: literature review and research needs. *Renewable and Sustainable Energy Reviews* 42: 1418–1427.
- Kazyoba, P.; Viljoen, A. 2008. Limonene - a Review: Biosynthetic, Ecological and Pharmacological Relevance. *Natural Product Communications* 3: 1193–1202.
- Kellam, S.J.; Walker, J.M. 1989. Antibacterial activity from marine microalgae in laboratory culture. *British Phycological Journal* 24: 191–194.
- Kellam, S.J.; Cannell, R.J.P.; Owsianka, A.M.; Walker, J.M. 1988. Results of a large-scale screening programme to detect antifungal activity from marine and freshwater microalgae in laboratory culture. *British Phycological Journal* 23: 45–47.
- Kellmann, R.; Neilan, B.A. 2007. Biochemical Characterization of Paralytic Shellfish Toxin Biosynthesis in *Vitro*1. *Journal of Phycology* 43: 497–508.
- Kenesi, G.; Shafik, H.M.; Kovács, A.W.; Herodek, S.; Présing, M. 2009. Effect of nitrogen forms on growth, cell composition and N₂ fixation of *Cylindrospermopsis raciborskii* in phosphorus-limited chemostat cultures. *Hydrobiologia* 623: 191–202.
- Kermanshahi-pour, A.; Sommer, T.J.; Anastas, P.T.; Zimmerman, J.B. 2014. Enzymatic and acid hydrolysis of *Tetraselmis suecica* for polysaccharide characterization. *Bioresource Technology* 173: 415–421.
- Khan, M.I.; Shin, J.H.; Kim, J.D. 2018. The promising future of microalgae: current status, challenges, and optimization of a sustainable and renewable industry for biofuels, feed, and other products. *Microbial Cell Factories* 17: 36.
- Kilcoyne, J.; McCoy, A.; Burrell, S.; Krock, B.; Tillmann, U. 2019. Effects of Temperature, Growth Media, and Photoperiod on Growth and Toxin Production of *Azadinium spinosum*. *Marine Drugs* 17: 489.
- Kim, G.; Bae, J.; Lee, K. 2016. Nitrate repletion strategy for enhancing lipid production from marine microalga *Tetraselmis* sp. *Bioresource Technology* 205: 274–279.
- Kinnear, S. 2010. *Cylindrospermopsin*: A Decade of Progress on Bioaccumulation Research. *Marine Drugs* 8: 542–564.
- Kiuru, P.; D'Auria, M.V.; Muller, C.D.; Tammela, P.; Vuorela, H.; Yli-Kauhaluoma, J. 2014. Exploring Marine Resources for Bioactive Compounds. *Planta Medica* 80: 1234–1246.
- Klančnik, A.; Piskernik, S.; Jeršek, B.; Možina, S.S. 2010. Evaluation of diffusion and dilution methods to determine the antibacterial activity of plant extracts. *Journal of Microbiological Methods* 81: 121–126.
- Koller, M. 2018. A Review on Established and Emerging Fermentation Schemes for Microbial Production of Polyhydroxyalkanoate (PHA) Biopolyesters. *Fermentation* 4: 30.

- Krishnan, A.; Mou, X. 2021. A Brief Review of the Structure, Cytotoxicity, Synthesis, and Biodegradation of Microcystins. *Water* 13: 2147.
- Krüger, T.; Hölzel, N.; Luckas, B. 2012. Influence of Cultivation Parameters on Growth and Microcystin Production of *Microcystis aeruginosa* (Cyanophyceae) Isolated from Lake Chao (China). *Microbial Ecology* 63: 199–209.
- Kudela, R.; Roberts, A.; Armstrong, M. 2003. Laboratory Analyses of Nutrient Stress and Toxin Production in *Pseudo-nitzschia* spp. from Monterey Bay, California. .
- Kudela, R.M.; Lane, J.Q.; Cochlan, W.P. 2008. The potential role of anthropogenically derived nitrogen in the growth of harmful algae in California, USA. *Harmful Algae* 8: 103–110.
- Kuhlish, C.; Pohnert, G. 2015. Metabolomics in chemical ecology. *Natural Product Reports* 32: 937–955.
- Kumar, A.; Bera, S. 2020. Revisiting nitrogen utilization in algae: A review on the process of regulation and assimilation. *Bioresource Technology Reports* 12: 100584.
- Kuniyoshi, T.M.; Gonzalez, A.; Lopez-Gomollon, S.; Valladares, A.; Bes, M.T.; Fillat, M.F.; et al. 2011. 2-oxoglutarate enhances NtcA binding activity to promoter regions of the microcystin synthesis gene cluster. *FEBS Letters* 585: 3921–3926.
- Kurmayer, R. 2011. THE TOXIC CYANOBACTERIUM NOSTOC SP. STRAIN 152 PRODUCES HIGHEST AMOUNTS OF MICROCYSTIN AND NOSTOPHYCIN UNDER STRESS CONDITIONS. *Journal of phycology* 47: 200–207.
- Kurten, G.L.; Barkoh, A.; Fries, L.T.; Begley, D.C. 2007. Combined Nitrogen and Phosphorus Fertilization for Controlling the Toxigenic Alga *Prymnesium parvum*. *North American Journal of Aquaculture* 69: 214–222.
- La Barre, S.; Bates, S.; Quilliam, M. 2014. Domoic Acid. In: *Outstanding Marine Molecules: Chemistry, Biology, Analysis*, p.189–215.
- Lakatos, G.E.; Ranglová, K.; Manoel, J.C.; Grivalský, T.; Kopecký, J.; Masojídek, J. 2019. Bioethanol production from microalgae polysaccharides. *Folia Microbiologica* 64: 627–644.
- Lam, M.K.; Lee, K.T. 2015. Chapter 12 - Bioethanol Production from Microalgae. In: Kim, S.-K. (Ed.), *Handbook of Marine Microalgae*, Academic Press, Boston, p.197–208.
- Larned, S.T. 2010. A prospectus for periphyton: recent and future ecological research. *Journal of the North American Benthological Society* 29: 182–206.
- Lartigue, J.; Jester, E.L.E.; Dickey, R.W.; Villareal, T.A. 2009. Nitrogen source effects on the growth and toxicity of two strains of the ciguatera-causing dinoflagellate *Gambierdiscus toxicus*. *Harmful Algae* 8: 781–791.
- Lauritano, C.; De Luca, D.; Amoroso, M.; Benfatto, S.; Maestri, S.; Racioppi, C.; et al. 2019. New molecular insights on the response of the green alga *Tetraselmis suecica* to nitrogen starvation. *Scientific Reports* 9: 3336.
- Lauritano, C.; Helland, K.; Riccio, G.; Andersen, J.H.; Ianora, A.; Hansen, E.H. 2020. Lysophosphatidylcholines and Chlorophyll-Derived Molecules from the Diatom *Cylindrotheca closterium* with Anti-Inflammatory Activity. *Marine Drugs* 18: 166.
- Law, J.H.; Regnier, F.E. 1971. Pheromones. *Annual Review of Biochemistry* 40: 533–548.
- Leão, P.N.; Vasconcelos, M.T.S.D.; Vasconcelos, V.M. 2009. Allelopathic activity of cyanobacteria on green microalgae at low cell densities. *European Journal of Phycology* 44: 347–355.
- Lee, S. j.; Jang, M.-H.; Kim, H.-S.; Yoon, B.-D.; Oh, H.-M. 2000. Variation of microcystin content of *Microcystis aeruginosa* relative to medium N:P ratio and growth stage. *Journal of Applied Microbiology* 89: 323–329.
- Lee, S.-H.; Chang, D.-U.; Lee, B.-J.; Jeon, Y.-J. 2009. Antioxidant Activity of Solubilized *Tetraselmis suecica* and *Chlorella ellipsoidea* by Enzymatic Digests. *Preventive Nutrition and Food Science* 14: 21–28.
- Lee, T.; Chan, P.; Xu, S.; Lee, F. 2020. Comparison of growth and toxicity responses between non-toxic and toxic strains of *Prorocentrum hoffmannianum*. *Aquatic Biology* 29: 59–70.
- Lee, T.C.-H.; Kwok, O.-T.; Ho, K.-C.; Lee, F.W.-F. 2012. Effects of different nitrate and phosphate concentrations on the growth and toxin production of an *Alexandrium tamarense* strain collected from Drake Passage. *Marine Environmental Research* 81: 62–69.

- Lee, T.C.-H.; Fong, F.L.-Y.; Ho, K.-C.; Lee, F.W.-F. 2016. The Mechanism of Diarrhetic Shellfish Poisoning Toxin Production in *Prorocentrum* spp.: Physiological and Molecular Perspectives. *Toxins* 8: 272.
- Lee, W.-Y.; Lim, D.-S.; Ko, S.-H.; Park, Y.-J.; Ryu, K.-S.; Ahn, M.-Y.; et al. 2004. Photoactivation of pheophorbide *a* induces a mitochondrial-mediated apoptosis in Jurkat leukaemia cells. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology* 75: 119–126.
- Leflaive, J.; Ten-Hage, L. 2011a. Effects of 2E,4E-decadienal on motility and aggregation of diatoms and on biofilm formation. *Microbial Ecology* 61: 363–373.
- Leflaive, J.; Ten-Hage, L. 2011b. Impairment of benthic diatom adhesion and photosynthetic activity by 2E,4E-decadienal. *Research in Microbiology* 162: 982–989.
- Lehtimäki, J.; Moisander, P.; Sivonen, K.; Kononen, K. 1997. Growth, nitrogen fixation, and nodularin production by two baltic sea cyanobacteria. *Applied and Environmental Microbiology* 63: 1647–1656.
- Lekan, D.K.; Tomas, C.R. 2010. The brevetoxin and brevenal composition of three *Karenia brevis* clones at different salinities and nutrient conditions. *Harmful Algae* 9: 39–47.
- Lema, K.A.; Latimier, M.; Nézan, É.; Fauchot, J.; Le Gac, M. 2017. Inter and intra-specific growth and domoic acid production in relation to nutrient ratios and concentrations in *Pseudo-nitzschia*: phosphate an important factor. *Harmful Algae* 64: 11–19.
- Lenard, J. 1992. Mammalian hormones in microbial cells. *Trends in Biochemical Sciences* 17: 147–150.
- Leong, S.C.Y.; Murata, A.; Nagashima, Y.; Taguchi, S. 2004. Variability in toxicity of the dinoflagellate *Alexandrium tamarense* in response to different nitrogen sources and concentrations. *Toxicon* 43: 407–415.
- Li, A.; Jiang, B.; Chen, H.; Gu, H. 2016. Growth and toxin production of *Azadinium poporum* strains in batch cultures under different nutrient conditions. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 127: 117–126.
- Li, S.; Fanesi, A.; Martin, T.; Lopes, F. 2024a. Physiological transition of *Chlorella vulgaris* from planktonic to immobilized conditions. *Algal Research* 77: 103354.
- Li, Y.; Wu, X.; Liu, Y.; Taidi, B. 2024b. Immobilized microalgae: principles, processes and its applications in wastewater treatment. *World Journal of Microbiology & Biotechnology* 40: 150.
- Lim, D.K.Y.; Schuhmann, H.; Thomas-Hall, S.R.; Chan, K.C.K.; Wass, T.J.; Aguilera, F.; et al. 2017. RNA-Seq and metabolic flux analysis of *Tetraselmis* sp. M8 during nitrogen starvation reveals a two-stage lipid accumulation mechanism. *Bioresource Technology* 244: 1281–1293.
- Lim, P.-T.; Ogata, T. 2005. Salinity effect on growth and toxin production of four tropical *Alexandrium* species (Dinophyceae). *Toxicon* 45: 699–710.
- Lim, P.-T.; Leaw, C.-P.; Kobiyama, A.; Ogata, T. 2010. Growth and toxin production of tropical *Alexandrium minutum* Halim (Dinophyceae) under various nitrogen to phosphorus ratios. *Journal of Applied Phycology* 22: 203–210.
- Lin, C.-H.; Accoroni, S.; Glibert, P. 2017. *Karlodinium veneticum* feeding responses and effects on larvae of the eastern oyster *Crassostrea virginica* under variable nitrogen:phosphorus stoichiometry. *Aquatic Microbial Ecology* 79: 101–114.
- Lin, Z.-R.; Geng, H.-X.; Zhang, Q.-C.; Chen, Z.-F.; Dai, L.; Yu, R.-C. 2022. Toxin production of dinoflagellate *Gymnodinium catenatum* isolated from the East China Sea. *Harmful Algae* 113: 102188.
- Lindehoff, E.; Granéli, E.; Granéli, W. 2009. Effect of tertiary sewage effluent additions on *Prymnesium parvum* cell toxicity and stable isotope ratios. *Harmful Algae* 8: 247–253.
- Long, B.M.; Jones, G.J.; Orr, P.T. 2001. Cellular Microcystin Content in N-Limited *Microcystis aeruginosa* Can Be Predicted from Growth Rate. *Applied and Environmental Microbiology* 67: 278–283.
- Long, M.; Krock, B.; Castrec, J.; Tillmann, U. 2021. Unknown Extracellular and Bioactive Metabolites of the Genus *Alexandrium*: A Review of Overlooked Toxins. *Toxins* 13: 905.
- Longo, S.; Sibat, M.; Darius, H.T.; Hess, P.; Chinain, M. 2020. Effects of pH and Nutrients (Nitrogen) on Growth and Toxin Profile of the Ciguatera-Causing Dinoflagellate *Gambierdiscus polynesiensis* (Dinophyceae). *Toxins* 12: 767.
- Loomis, W.E. 1953. *Growth and Differentiation in Plants*. Iowa State College Press, 492p.

- López, D.; Vlamakis, H.; Kolter, R. 2010. Biofilms. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology* 2: a000398.
- Lourenço, S.O.; Marquez, U.M.L.; Mancini-Filho, J.; Barbarino, E.; Aida, E. 1997. Changes in biochemical profile of *Tetraselmis gracilis* I. Comparison of two culture media. *Aquaculture* 148: 153–168.
- Lundberg, J.O.; Weitzberg, E. 2022. Nitric oxide signaling in health and disease. *Cell* 185: 2853–2878.
- Lundgren, V.M.; Glibert, P.M.; Granéli, E.; Vidyarthna, N.K.; Fiori, E.; Ou, L.; et al. 2016. Metabolic and physiological changes in *Prymnesium parvum* when grown under, and grazing on prey of, variable nitrogen:phosphorus stoichiometry. *Harmful Algae* 55: 1–12.
- Lykov, A.; Salmin, A.; Gevorgiz, R.; Zheleznova, S.; Rachkovskaya, L.; Surovtseva, M.; et al. 2023. Study of the Antimicrobial Potential of the *Arthrospira platensis*, *Planktothrix agardhii*, *Leptolyngbya* cf. *ectocarpii*, *Roholtiella mixta* nov., *Tetraselmis viridis*, and *Nanofrustulum shiloi* against Gram-Positive, Gram-Negative Bacteria, and Mycobacteria. *Marine Drugs* 21: 492.
- MacIntyre, J.G.; Cullen, J.J.; Cembella, A.D. 1997. Vertical migration, nutrition and toxicity in the dinoflagellate *Alexandrium tamarense*. *Marine Ecology Progress Series* 148: 201–216.
- Maclean, C.; Cembella, A.; Quilliam, M. 2003. Effects of Light, Salinity and Inorganic Nitrogen on Cell Growth and Spirolide Production in the Marine Dinoflagellate *Alexandrium ostenfeldii* (Paulsen) Balech et Tangen. *Botanica Marina - BOT MAR* 46: 466–476.
- Maldonado-Montiel, T.D.N.J.; Rodríguez-Canché, L.G. 2005. Biomass production and nutritional value of *Artemia* sp. (Anostraca: Artemiidae) in Campeche, México. *Revista De Biología Tropical* 53: 447–454.
- Mallick; Mirupama; Mohn, F.H.; Rai, L.; Soeder, C.J. 2000. Impact of Physiological Stresses on Nitric Oxide Formation by Green Alga, *Scenedesmus obliquus*. 10: 300–306.
- Mallick, N.; Rai, L.C.; Mohn, F.H.; Soeder, C.J. 1999. Studies on nitric oxide (NO) formation by the green alga *Scenedesmus obliquus* and the diazotrophic cyanobacterium *Anabaena Doliolum*. *Chemosphere* 39: 1601–1610.
- Maltsev, Y.; Maltseva, K. 2021. Fatty acids of microalgae: diversity and applications. *Reviews in Environmental Science and Bio/Technology* 20: 515–547.
- Mantzorou, A.; Ververidis, F. 2019. Microalgal biofilms: A further step over current microalgal cultivation techniques. *Science of The Total Environment* 651: 3187–3201.
- Manzoni, C.; Kia, D.A.; Vandrovcova, J.; Hardy, J.; Wood, N.W.; Lewis, P.A.; et al. 2016. Genome, transcriptome and proteome: the rise of omics data and their integration in biomedical sciences. *Briefings in Bioinformatics* 19: 286–302.
- Martin-Jézéquel, V.; Calu, G.; Candela, L.; Amzil, Z.; Jauffrais, T.; Séchet, V.; et al. 2015. Effects of Organic and Inorganic Nitrogen on the Growth and Production of Domoic Acid by Pseudo-nitzschia multiseriales and P. australis (Bacillariophyceae) in Culture. *Marine Drugs* 13: 7067–7086.
- Mata, M.T.; Cameron, H.; Avalos, V.; Riquelme, C. 2023. Identification and Characterization of a Novel Microalgal Strain from the Antofagasta Coast Tetraselmis marina AC16-MESO (Chlorophyta) for Biotechnological Applications. *Plants (Basel, Switzerland)* 12: 3372.
- McKey, D. 1979. The distribution of secondary compounds within plants. In: Academic Press, New York, p.55–133.
- McLachlan, J.L.; Marr, J.C.; Conlon-Keily, A.; Adamson, A. 1994. Effects of nitrogen concentration and cold temperature on DSP-toxin concentrations in the dinoflagellate *Prorocentrum lima* (prorocentrales, dinophyceae). *Natural Toxins* 2: 263–270.
- Medina-Pérez, N.I.; Cerdán-García, E.; Rubió, F.; Viure, L.; Estrada, M.; Moyano, E.; et al. 2023. Progress on the Link between Nutrient Availability and Toxin Production by *Ostreopsis* cf. *ovata*: Field and Laboratory Experiments. *Toxins* 15: 188.
- Mello, M.M. e; Soares, M.C.S.; Roland, F.; Lüring, M. 2012. Growth inhibition and colony formation in the cyanobacterium *Microcystis aeruginosa* induced by the cyanobacterium *Cylindrospermopsis raciborskii*. *Journal of Plankton Research* 34: 987–994.
- Meng, Y.; Yao, C.; Xue, S.; Yang, H. 2014. Application of Fourier transform infrared (FT-IR) spectroscopy in determination of microalgal compositions. *Bioresource Technology* 151: 347–354.

- Merel, S.; Walker, D.; Chicana, R.; Snyder, S.; Baurès, E.; Thomas, O. 2013. State of knowledge and concerns on cyanobacterial blooms and cyanotoxins. *Environment International* 59: 303–327.
- Mihali, T.K.; Kellmann, R.; Muenchhoff, J.; Barrow, K.D.; Neilan, B.A. 2008. Characterization of the Gene Cluster Responsible for Cylindrospermopsin Biosynthesis. *Applied and Environmental Microbiology* 74: 716–722.
- Millán de Kuhn, R.; Streb, C.; Breiter, R.; Richter, P.; Neesse, T.; Häder, D.-P. 2006. Screening for unicellular algae as possible bioassay organisms for monitoring marine water samples. *Water Research* 40: 2695–2703.
- Miller, M.B.; Bassler, B.L. 2001. Quorum sensing in bacteria. *Annual Review of Microbiology* 55: 165–199.
- Mion, S.; Carriot, N.; Lopez, J.; Plener, L.; Ortalo-Magné, A.; Chabrière, E.; et al. 2021. Disrupting quorum sensing alters social interactions in *Chromobacterium violaceum*. *NPJ biofilms and microbiomes* 7: 40.
- Mocquet, C.; Sciandra, A.; Talec, A.; Bernard, O. 2013. Cell cycle implication on nitrogen acquisition and synchronization in *Thalassiosira weissflogii* (Bacillariophyceae). *Journal of Phycology* 49: 371–380.
- Mohamed, Z.A.; Al-Shehri, A.M. 2013. Assessment of cylindrospermopsin toxin in an arid Saudi lake containing dense cyanobacterial bloom. *Environmental Monitoring and Assessment* 185: 2157–2166.
- Moisander, P.H.; Ochiai, M.; Lincoff, A. 2009. Nutrient limitation of *Microcystis aeruginosa* in northern California Klamath River reservoirs. *Harmful Algae* 8: 889–897.
- Monod, J. 1978. LA TECHNIQUE DE CULTURE CONTINUE THÉORIE ET APPLICATIONS. : 184–204.
- Montero, M.F.; Aristizábal, M.; García Reina, G. 2011. Isolation of high-lipid content strains of the marine microalga *Tetraselmis suecica* for biodiesel production by flow cytometry and single-cell sorting. *Journal of Applied Phycology* 23: 1053–1057.
- Montes-González, O.; Gonzalez-Silvera, A.; Valenzuela-Espinoza, E.; Santamaría-del-Angel, E.; Lopez-Calderon, J. 2021. Effect of light intensity and nutrient concentration on growth and pigments of the green microalga *Tetraselmis suecica*. *Latin American Journal of Aquatic Research* 49: 431–441.
- Morales, M.; Bonnefond, H.; Bernard, O. 2020. Rotating algal biofilm versus planktonic cultivation: LCA perspective. *Journal of Cleaner Production* 257: 120547.
- Morales, M.; Aflalo, C.; Bernard, O. 2021. Microalgal lipids: A review of lipids potential and quantification for 95 phytoplankton species. *Biomass and Bioenergy* 150: 106108.
- Moreira, J.B.; Vaz, B. da S.; Cardias, B.B.; Cruz, C.G.; Almeida, A.C.A. de; Costa, J.A.V.; et al. 2022. Microalgae Polysaccharides: An Alternative Source for Food Production and Sustainable Agriculture. *Polysaccharides* 3: 441–457.
- Morgado, D.; Fanesi, A.; Martin, T.; Tebbani, S.; Bernard, O.; Lopes, F. 2024. Exploring the dynamics of astaxanthin production in *Haematococcus pluvialis* biofilms using a rotating biofilm-based system. *Biotechnology and Bioengineering* 121: 991–1004.
- Morlaix, M.; Lassus, P. 1992. Influence de l'azote et du phosphore sur la croissance et la toxicité de *Prorocentrum lima* (Ehrenberg) Dodge. *Cryptogamie Algologie* 13: 187–195.
- Mosmann, T. 1983. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: Application to proliferation and cytotoxicity assays. *Journal of Immunological Methods* 65: 55–63.
- Mougin, J.; Pavaux, A.-S.; Fanesi, A.; Lopez, J.; Pruvost, E.; Guihéneuf, F.; et al. 2024. Bacterial adhesion inhibition by microalgal EPSs from *Cylindrotheca closterium* and *Tetraselmis suecica* biofilms. *Applied Microbiology and Biotechnology* 108: 168.
- Muller-Feuga, A.; Robert, R.; Cahu, C.; Robin, J.; Divanach, P. 2003. Uses of Microalgae in Aquaculture. In: *Live Feeds in Marine Aquaculture*, John Wiley & Sons, Ltd, p.253–299.
- Muñoz-Cázares, N.; Castillo-Juárez, I.; García-Contreras, R.; Castro-Torres, V.A.; Díaz-Guerrero, M.; Rodríguez-Zavala, J.S.; et al. 2022. A Brominated Furanone Inhibits *Pseudomonas aeruginosa* Quorum Sensing and Type III Secretion, Attenuating Its Virulence in a Murine Cutaneous Abscess Model. *Biomedicine* 10: 1847.
- Murata, A.; Nagashima, Y.; Taguchi, S. 2012. N:P ratios controlling the growth of the marine dinoflagellate *Alexandrium tamarense*: Content and composition of paralytic shellfish poison. *Harmful Algae* 20: 11–18.

- Nagai, S.; Suzuki, T.; Nishikawa, T.; Kamiyama, T. 2011. DIFFERENCES IN THE PRODUCTION AND EXCRETION KINETICS OF OKADAIC ACID, DINOPHYSISTOXIN-1, AND PECTENOTOXIN-2 BETWEEN CULTURES OF DINOPHYSIS ACUMINATA AND DINOPHYSIS FORTII ISOLATED FROM WESTERN JAPAN(1). *Journal of Phycology* 47: 1326–1337.
- Nandagopal, P.; Steven, A.N.; Chan, L.-W.; Rahmat, Z.; Jamaluddin, H.; Mohd Noh, N.I. 2021. Bioactive Metabolites Produced by Cyanobacteria for Growth Adaptation and Their Pharmacological Properties. *Biology* 10: 1061.
- Neilan, B.A.; Pearson, L.A.; Muenchhoff, J.; Moffitt, M.C.; Dittmann, E. 2013. Environmental conditions that influence toxin biosynthesis in cyanobacteria. *Environmental Microbiology* 15: 1239–1253.
- Nielsen, L.T.; Krock, B.; Hansen, P.J. 2013. Production and excretion of okadaic acid, pectenotoxin-2 and a novel dinophysistoxin from the DSP-causing marine dinoflagellate *Dinophysis acuta* – Effects of light, food availability and growth phase. *Harmful Algae* 23: 34–45.
- Nogueira, I.C.G.; Lobo-da-Cunha, A.; Vasconcelos, V.M. 2006. Effects of *Cylindrospermopsis raciborskii* and *Aphanizomenon ovalisporum* (cyanobacteria) ingestion on *Daphnia magna* midgut and associated diverticula epithelium. *Aquatic Toxicology* 80: 194–203.
- Nordlund, D.A.; Lewis, W.J. 1976. Terminology of chemical releasing stimuli in intraspecific and interspecific interactions. *Journal of Chemical Ecology* 2: 211–220.
- Norzagaray-Valenzuela, C.D.; Valdez-Ortiz, A.; Shelton, L.M.; Jiménez-Edeza, M.; Rivera-López, J.; Valdez-Flores, M.A.; et al. 2017. Residual biomasses and protein hydrolysates of three green microalgae species exhibit antioxidant and anti-aging activity. *Journal of Applied Phycology* 29: 189–198.
- Novick, A.; Szilard, L. 1950. Description of the Chemostat. *Science* 112: 715–716.
- Orr, P.T.; Jones, G.J. 1998. Relationship between microcystin production and cell division rates in nitrogen-limited *Microcystis aeruginosa* cultures. *Limnology and Oceanography* 43: 1604–1614.
- Orr, R.J.S.; Stüken, A.; Murray, S.A.; Jakobsen, K.S. 2013. Evolution and Distribution of Saxitoxin Biosynthesis in Dinoflagellates. *Marine Drugs* 11: 2814–2828.
- Orr, R.J.S.; Stüken, A.; Rundberget, T.; Eikrem, W.; Jakobsen, K.S. 2011. Improved phylogenetic resolution of toxic and non-toxic *Alexandrium* strains using a concatenated rDNA approach. *Harmful Algae* 10: 676–688.
- Oshima, Y.; Blackburn, S.I.; Hallegraeff, G. 1993. Comparative study on paralytic shellfish toxin profiles of the dinoflagellate *Gymnodinium catenatum* from three different countries. *Marine Biology* 116: 471–476.
- Oshima, Y.; Hasegawa, M.; Yasumoto, T.; Hallegraeff, G.; Blackburn, S. 1987. Dinoflagellate *Gymnodinium catenatum* as the source of paralytic shellfish toxins in Tasmanian shellfish. *Toxicon* 25: 1105–1111.
- Oshima, Y.; Hirota, M.; Yasumoto, T.; Hallegraeff, G.M.; Blackburn, S.I.; Steffensen, D.A. 1989. Production of paralytic shellfish toxins by the dinoflagellate *Alexandrium minutum* Halim from Australia. *Bulletin of the Japanese Society of Scientific Fisheries* 55: 925–925.
- Ostensvik, O.; Skulberg, O.M.; Underdal, B.; Hormazabal, V. 1998. Antibacterial properties of extracts from selected planktonic freshwater cyanobacteria--a comparative study of bacterial bioassays. *Journal of Applied Microbiology* 84: 1117–1124.
- Padisák, J. 1997. *Cylindrospermopsis raciborskii* (Woloszynska) Seenayya et Subba Raju, an expanding, highly adaptive cyanobacterium : worldwide distribution and review of its ecology. .
- Paerl, H.W.; Paul, V.J. 2012. Climate change: Links to global expansion of harmful cyanobacteria. *Water Research* 46: 1349–1363.
- Pan, Y.; Bates, S.S.; Cembella, A.D. 1998. Environmental stress and domoic acid production by *Pseudo-nitzschia*: a physiological perspective. *Natural Toxins* 6: 127–135.
- Pan, Y.; Cembella, A.D.; Quilliam, M.A. 1999a. Cell cycle and toxin production in the benthic dinoflagellate *Prorocentrum lima*. *Marine Biology* 134: 541–549.
- Pan, Y.; Cembella, A.D.; Quilliam, M.A. 1999b. Cell cycle and toxin production in the benthic dinoflagellate *Prorocentrum lima*. *Marine Biology* 134: 541–549.

- Park, B.S.; Choi, W.-J.; Guo, R.; Kim, H.; Ki, J.-S. 2021. Changes in Free-Living and Particle-Associated Bacterial Communities Depending on the Growth Phases of Marine Green Algae, *Tetraselmis suecica*. *Journal of Marine Science and Engineering* 9: 171.
- Parkhill, J.P.; Cembella, A. 1999. Effects of salinity, light and inorganic nitrogen on growth and toxigenity of the marine dinoflagellate *Alexandrium tamarense* from northeastern Canada. *J. Plankton Res* 21.
- Parra-Riofrío, G.; García-Márquez, J.; Casas-Arrojo, V.; Uribe-Tapia, E.; Abdala-Díaz, R.T. 2020. Antioxidant and Cytotoxic Effects on Tumor Cells of Exopolysaccharides From *Tetraselmis suecica* (Kyllin) Butcher Grown Under Autotrophic and Heterotrophic Conditions. *Marine Drugs* 18: 534.
- Parsons, M.L.; Dortch, Q. 2002. Sedimentological evidence of an increase in *Pseudo-nitzschia* (Bacillariophyceae) abundance in response to coastal eutrophication. *Limnology and Oceanography* 47: 551–558.
- Patiño Suárez, V.; Aldana Aranda, D. 2000. [Ingestion and digestion of seven species of microalgae by larvae of *Strombus gigas* (Mesogastropoda: Strombidae)]. *Revista De Biología Tropical* 48 Suppl 1: 87–93.
- Pattanaik, B.; Wulff, A.; Roleda, M.Y.; Garde, K.; Mohlin, M. 2010. Production of the cyanotoxin nodularin—A multifactorial approach. *Harmful Algae* 10: 30–38.
- Paul, V.J.; Ritson-Williams, R. 2008. Marine chemical ecology. *Natural Product Reports* 25: 662–695.
- Pavaux, A.-S.; Berdalet, E.; Lemée, R. 2020. Chemical Ecology of the Benthic Dinoflagellate Genus *Ostreopsis*: Review of Progress and Future Directions. *Frontiers in Marine Science* 7.
- Paz, B.; Daranas, A.H.; Norte, M.; Riobó, P.; Franco, J.M.; Fernández, J.J. 2008. Yessotoxins, a Group of Marine Polyether Toxins: an Overview. *Marine Drugs* 6: 73–102.
- Penaranda, D.; Bonnefond, H.; Guihéneuf, F.; Morales, M.; Bernard, O. 2022. Life cycle assessment of an innovative rotating biofilm technology for microalgae production: An eco-design approach. *Journal of Cleaner Production* 384: 135600.
- Penesyan, A.; Paulsen, I.T.; Kjelleberg, S.; Gillings, M.R. 2021. Three faces of biofilms: a microbial lifestyle, a nascent multicellular organism, and an incubator for diversity. *Npj Biofilms and Microbiomes* 7: 1–9.
- Peng, G.; Lin, S.; Fan, Z.; Wang, X. 2017. Transcriptional and Physiological Responses to Nutrient Loading on Toxin Formation and Photosynthesis in *Microcystis Aeruginosa* FACHB-905. *Toxins* 9: 168.
- Penna, A.; Giacobbe, M.G.; Penna, N.; Andreoni, F.; Magnani, M. 2002. Seasonal Blooms of the HAB Dinoflagellate *Alexandrium taylori* Balech in a New Mediterranean Area (Vulcano, Aeolian Islands). *Marine Ecology* 23: 320–328.
- Pérez Agúndez, J.A.; Raux, P.; Girard, S.; Mongruel, R. 2013. Technological Adaptation to Harmful Algal Blooms: Socioeconomic Consequences for the Shellfish Farming Sector in Bourgneuf Bay (France). *Aquaculture Economics & Management* 17: 341–359.
- Pérez-Rama, M.; Torres Vaamonde, E.; Abalde Alonso, J. 2006. Composition and production of thiol constituents induced by cadmium in the marine microalga *Tetraselmis suecica*. *Environmental Toxicology and Chemistry* 25: 128–136.
- Pérez-Rama, M.; Alonso, J.A.; López, C.H.; Vaamonde, E.T. 2002. Cadmium removal by living cells of the marine microalga *Tetraselmis suecica*. *Bioresource Technology* 84: 265–270.
- Pérez-Rama, M.; Torres, E.; Suárez, C.; Herrero, C.; Abalde, J. 2010. Sorption isotherm studies of Cd(II) ions using living cells of the marine microalga *Tetraselmis suecica* (Kyllin) Butch. *Journal of Environmental Management* 91: 2045–2050.
- Peter, A.P.; Koyande, A.K.; Chew, K.W.; Ho, S.-H.; Chen, W.-H.; Chang, J.-S.; et al. 2022. Continuous cultivation of microalgae in photobioreactors as a source of renewable energy: Current status and future challenges. *Renewable and Sustainable Energy Reviews* 154: 111852.
- Pezzolesi, L.; Pistocchi, R.; Fratangeli, F.; Dell'Aversano, C.; Dello Iacovo, E.; Tartaglione, L. 2014. Growth dynamics in relation to the production of the main cellular components in the toxic dinoflagellate *Ostreopsis cf. ovata*. *Harmful Algae* 36: 1–10.
- Pezzolesi, L.; Vanucci, S.; Dell'Aversano, C.; Dello Iacovo, E.; Tartaglione, L.; Pistocchi, R. 2016. Effects of N and P availability on carbon allocation in the toxic dinoflagellate *Ostreopsis cf. ovata*. *Harmful Algae* 55: 202–212.

- Piampiano, E.; Pini, F.; Biondi, N.; Pastorelli, R.; Giovannetti, L.; Viti, C. 2019. Analysis of microbiota in cultures of the green microalga *Tetraselmis suecica*. *European Journal of Phycology* 54: 497–508.
- Piampiano, E.; Pini, F.; Biondi, N.; Garcia, C.J.; Decorosi, F.; Tomàs-Barberà, F.A.; et al. 2021. *Tetraselmis suecica* F&M-M33 phycosphere: associated bacteria and exo-metabolome characterization. *European Journal of Phycology* 56: 61–71.
- Pierangelini, M.; Sinha, R.; Willis, A.; Burford, M.A.; Orr, P.T.; Beardall, J.; et al. 2015. Constitutive *Cylindrospermopsin* Pool Size in *Cylindrospermopsis raciborskii* under Different Light and CO₂ Partial Pressure Conditions. *Applied and Environmental Microbiology* 81: 3069–3076.
- Pimentel, J.S.M.; Giani, A. 2014. Microcystin Production and Regulation under Nutrient Stress Conditions in Toxic *Microcystis* Strains. *Applied and Environmental Microbiology* 80: 5836–5843.
- Pinedo-González, P.; West, A.J.; Tovar-Sánchez, A.; Duarte, C.M.; Marañón, E.; Cermeño, P.; et al. 2015. Surface distribution of dissolved trace metals in the oligotrophic ocean and their influence on phytoplankton biomass and productivity. *Global Biogeochemical Cycles* 29: 1763–1781.
- Pinna, A.; Pezzolesi, L.; Pistocchi, R.; Vanucci, S.; Ciavatta, S.; Polimene, L. 2015. Modelling the Stoichiometric Regulation of C-Rich Toxins in Marine Dinoflagellates. *PloS One* 10: e0139046.
- Pistocchi, R.; Pezzolesi, L.; Guerrini, F.; Vanucci, S.; Dell’aversano, C.; Fattorusso, E. 2011. A review on the effects of environmental conditions on growth and toxin production of *Ostreopsis ovata*. *Toxicon: Official Journal of the International Society on Toxinology* 57: 421–428.
- Pistocchi, R.; Pezzolesi, L.; Guidi, F.; Vanucci, S.; Guerrini, F.; Pinna, A. 2014. Inorganic nutrients uptake and organic phosphorus utilization by *Ostreopsis cf. ovata*.
- Place, A. 2002. Toxicity of *Karlodinium micrum* (Dinophyceae) associated with a fish kill in a South Carolina brackish retention pond. *Harmful Algae*.
- Place, A.R.; Bowers, H.A.; Bachvaroff, T.R.; Adolf, J.E.; Deeds, J.R.; Sheng, J. 2012. *Karlodinium veneficum*—The little dinoflagellate with a big bite. *Harmful Algae* 14: 179–195.
- Pohnert, G.; Steinke, M.; Tollrian, R. 2007. Chemical cues, defence metabolites and the shaping of pelagic interspecific interactions. *Trends in Ecology & Evolution* 22: 198–204.
- Pomati, F.; Rossetti, C.; Manarolla, G.; Burns, B.P.; Neilan, B.A. 2004. Interactions between intracellular Na⁺ levels and saxitoxin production in *Cylindrospermopsis raciborskii* T3. *Microbiology* 150: 455–461.
- Posadas, E.; García-Encina, P.-A.; Soltan, A.; Domínguez, A.; Díaz, I.; Muñoz, R. 2013. Carbon and nutrient removal from centrates and domestic wastewater using algal-bacterial biofilm bioreactors. *Bioresource Technology* 139: 50–58.
- Poulson-Ellestad, K.L.; Jones, C.M.; Roy, J.; Viant, M.R.; Fernández, F.M.; Kubanek, J.; et al. 2014. Metabolomics and proteomics reveal impacts of chemically mediated competition on marine plankton. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 111: 9009–9014.
- Poulton, N.J.; Keafer, B.A.; Anderson, D.M. 2005. Toxin variability in natural populations of *Alexandrium fundyense* in Casco Bay, Maine—evidence of nitrogen limitation. *Deep Sea Research Part II: Topical Studies in Oceanography* 52: 2501–2521.
- Pratt, R.; Daniels, T.C.; Eiler, J.J.; Gunnison, J.B.; Kumler, W.D.; Oneto, J.F.; et al. 1944. CHLORELLIN, AN ANTIBACTERIAL SUBSTANCE FROM CHLORELLA. *Science (New York, N.Y.)* 99: 351–352.
- Preußel, K.; Chorus, I.; Fastner, J. 2014. Nitrogen Limitation Promotes Accumulation and Suppresses Release of *Cylindrospermopsins* in Cells of *Aphanizomenon* Sp. *Toxins* 6: 2932–2947.
- Prince, E.K.; Pohnert, G. 2010. Searching for signals in the noise: metabolomics in chemical ecology. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 396: 193–197.
- Radan, R.L.; Cochlan, W.P. 2018. Differential toxin response of *Pseudo-nitzschia multiseries* as a function of nitrogen speciation in batch and continuous cultures, and during a natural assemblage experiment. *Harmful Algae* 73: 12–29.
- Rajamani, S.; Teplitski, M.; Kumar, A.; Krediet, C.J.; Sayre, R.T.; Bauer, W.D. 2011. N-ACYL HOMOSERINE LACTONE LACTONASE, AiiA, INACTIVATION OF QUORUM-SENSING AGONISTS PRODUCED BY *CHLAMYDOMONAS REINHARDTII* (CHLOROPHYTA) AND CHARACTERIZATION OF aiiA TRANSGENIC ALGAE(1). *Journal of Phycology* 47: 1219–1227.

- Ramos, V.; Vasconcelos, V. 2010. Palytoxin and Analogs: Biological and Ecological Effects. *Marine Drugs* 8: 2021–2037.
- Randhir, A.; Laird, D.W.; Maker, G.; Trengove, R.; Moheimani, N.R. 2020. Microalgae: A potential sustainable commercial source of sterols. *Algal Research* 46: 101772.
- Ransom Hardison, D.; Sunda, W.G.; Wayne Litaker, R.; Shea, D.; Tester, P.A. 2012. Nitrogen Limitation Increases Brevetoxins in *Karenia Brevis* (dinophyceae): Implications for Bloom Toxicity1. *Journal of Phycology* 48: 844–858.
- Rantala, A.; Fewer, D.P.; Hisbergues, M.; Rouhiainen, L.; Vaitomaa, J.; Börner, T.; et al. 2004. Phylogenetic evidence for the early evolution of microcystin synthesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 101: 568–573.
- Rao, D.V.S.; Quilliam, M.A.; Pocklington, R. 1988. Domoic Acid—A Neurotoxic Amino Acid Produced by the Marine Diatom *Nitzschia pungens* in Culture. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences* 45: 2076–2079.
- Rapala, J.; Sivonen, K.; Luukkainen, R.; Niemelä, S.I. 1993. Anatoxin-a concentration in *Anabaena* and *Aphanizomenon* under different environmental conditions and comparison of growth by toxic and non-toxic *Anabaena*-strains — a laboratory study. *Journal of Applied Phycology* 5: 581–591.
- Reguera, B.; Riobó, P.; Rodríguez, F.; Díaz, P.A.; Pizarro, G.; Paz, B.; et al. 2014. Dinophysins Toxins: Causative Organisms, Distribution and Fate in Shellfish. *Marine Drugs* 12: 394–461.
- Remias, D.; Lütz-Meindl, U.; Lütz, C. 2005. Photosynthesis, pigments and ultrastructure of the alpine snow alga *Chlamydomonas nivalis*. *European Journal of Phycology* 40: 259–268.
- Rendueles, O.; Ghigo, J.-M. 2012. Multi-species biofilms: how to avoid unfriendly neighbors. *FEMS Microbiology Reviews* 36: 972–989.
- Rentería-Mexía, A.; Ulloa-Mercado, G.; Gortáres-Moroyoqui, P.; González-Mercado, A.; Sánchez, M.; Sineiro, J.; et al. 2022. Antioxidant potential and antiangiogenic activity of *Tetraselmis suecica* grown in a semicontinuous culture. *Journal of Chemical Technology & Biotechnology* 97: 2528–2536.
- Repka, S.; Mehtonen, J.; Vaitomaa, J.; Saari, L.; Sivonen, K. 2001. Effects of Nutrients on Growth and Nodularin Production of *Nodularia* Strain GR8b. *Microbial Ecology* 42: 606–613.
- Reverter, M.; Rohde, S.; Parchemin, C.; Tapissier-Bontemps, N.; Schupp, P.J. 2020. Metabolomics and Marine Biotechnology: Coupling Metabolite Profiling and Organism Biology for the Discovery of New Compounds. *Frontiers in Marine Science* 7.
- Ribalet, F.; Berges, J.A.; Ianora, A.; Casotti, R. 2007. Growth inhibition of cultured marine phytoplankton by toxic algal-derived polyunsaturated aldehydes. *Aquatic Toxicology* 85: 219–227.
- Rinta-Kanto, J.M.; Konopko, E.A.; DeBruyn, J.M.; Bourbonniere, R.A.; Boyer, G.L.; Wilhelm, S.W. 2009. Lake Erie *Microcystis*: Relationship between microcystin production, dynamics of genotypes and environmental parameters in a large lake. *Harmful Algae* 8: 665–673.
- del Río, L.A.; Javier Corpas, F.; Barroso, J.B. 2004. Nitric oxide and nitric oxide synthase activity in plants. *Phytochemistry* 65: 783–792.
- Rodolfi, L.; Chini Zittelli, G.; Bassi, N.; Padovani, G.; Biondi, N.; Bonini, G.; et al. 2009. Microalgae for oil: Strain selection, induction of lipid synthesis and outdoor mass cultivation in a low-cost photobioreactor. *Biotechnology and Bioengineering* 102: 100–112.
- Rolland, J. luc; Stien, D.; Sanchez-Ferandin, S.; Lami, R. 2016. Quorum Sensing and Quorum Quenching in the Phycosphere of Phytoplankton: a Case of Chemical Interactions in Ecology. *Journal of Chemical Ecology* 42: 1201–1211.
- Rzymiski, P.; Poniedziałek, B.; Kokociński, M.; Jurczak, T.; Lipski, D.; Wiktorowicz, K. 2014. Interspecific allelopathy in cyanobacteria: *Cylindrospermopsis* and *Cylindrospermopsis raciborskii* effect on the growth and metabolism of *Microcystis aeruginosa*. *Harmful Algae* 35: 1–8.
- Rzymiski, P.; Poniedziałek, B.; Mankiewicz-Boczek, J.; Faassen, E.J.; Jurczak, T.; Gągała-Borowska, I.; et al. 2017. Polyphasic toxicological screening of *Cylindrospermopsis raciborskii* and *Aphanizomenon gracile* isolated in Poland. *Algal Research* 24: 72–80.

- S. Domozych, D. 2007. Exopolymer Production by the Green Alga *Penium margaritaceum*: Implications for Biofilm Residency. *International Journal of Plant Sciences*.
- Saïde, A.; Martínez, K.A.; Ianora, A.; Lauritano, C. 2021. Unlocking the Health Potential of Microalgae as Sustainable Sources of Bioactive Compounds. *International Journal of Molecular Sciences* 22: 4383.
- Saïde, A.; Riccio, G.; Ianora, A.; Lauritano, C. 2023. The Diatom *Cylindrotheca closterium* and the Chlorophyll Breakdown Product Pheophorbide a for Photodynamic Therapy Applications. *Applied Sciences* 13: 2590.
- Saker, M.L.; Neilan, B.A. 2001. Varied Diazotrophies, Morphologies, and Toxicities of Genetically Similar Isolates of *Cylindrospermopsis raciborskii* (Nostocales, Cyanophyceae) from Northern Australia. *Applied and Environmental Microbiology* 67: 1839–1845.
- Saker, M.L.; Neilan, B.A.; Griffiths, D.J. 1999. Two Morphological Forms of *Cylindrospermopsis Raciborskii* (cyanobacteria) Isolated from Solomon Dam, Palm Island, Queensland. *Journal of Phycology* 35: 599–606.
- Sakihama, Y.; Nakamura, S.; Yamasaki, H. 2002. Nitric Oxide Production Mediated by Nitrate Reductase in the Green Alga *Chlamydomonas reinhardtii*: an Alternative NO Production Pathway in Photosynthetic Organisms. *Plant and Cell Physiology* 43: 290–297.
- Saldivia, P.; Hernández, M.; Isla, A.; Fritz, R.; Varela, D.; González-Jartín, J.M.; et al. 2023. Proteomic and toxicological analysis of the response of dinoflagellate *Alexandrium catenella* to changes in NaNO₃ concentration. *Harmful Algae* 125: 102428.
- Salimi, F.; Farrokh, P. 2023. Recent advances in the biological activities of microbial exopolysaccharides. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* 39: 213.
- Salmaso, N.; Naselli-Flores, L.; Padisák, J. 2015. Functional classifications and their application in phytoplankton ecology. *Freshwater Biology* 60: 603–619.
- San Pedro, A.; González-López, C.V.; Acien, F.G.; Molina-Grima, E. 2013. Marine microalgae selection and culture conditions optimization for biodiesel production. *Bioresource Technology* 134: 353–361.
- Sanchez, L.; Avouac, A.; Le Floc'H, E.; Félix, C.; Leboulanger, C.; Gobet, A.; et al. 2024. Exploring the inhibition of targeted microalgae by a *Cylindrotheca closterium* nonaxenic biofilm. .
- Sano, T.; Takagi, H.; Nagano, K.; Nishikawa, M.; Kaya, K. 2011. Accurate LC-MS analyses for microcystins using per-15N-labeled microcystins. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 399: 2511–2516.
- Sansone, C.; Galasso, C.; Orefice, I.; Nuzzo, G.; Luongo, E.; Cutignano, A.; et al. 2017. The green microalga *Tetraselmis suecica* reduces oxidative stress and induces repairing mechanisms in human cells. *Scientific Reports* 7: 41215.
- Sas, A.A.; Turki, A.J.; Affan, A.; Al-Taisan, W.A.; Das, S.K.; Su, S.N.; et al. 2021. The influence of temperature and nutrient concentrations on growth rate, biomass, Chlorophyll-a, and biochemical compositions of *Tetraselmis suecica* (Chlorophyta). *IOP Conference Series: Earth and Environmental Science* 880: 012014.
- Satake, M.; Honma, D.; Watanabe, R.; Oshima, Y. 2019. Alexandrolide, a diatom growth inhibitor isolated from the dinoflagellate *Alexandrium catenella*. *Tetrahedron Letters* 60: 1341–1344.
- Sauer, K.; Stoodley, P.; Goeres, D.M.; Hall-Stoodley, L.; Burmølle, M.; Stewart, P.S.; et al. 2022. The biofilm life cycle– expanding the conceptual model of biofilm formation. *Nature reviews. Microbiology* 20: 608–620.
- Schatz, D.; Keren, Y.; Vardi, A.; Sukenik, A.; Carmeli, S.; Börner, T.; et al. 2007. Towards clarification of the biological role of microcystins, a family of cyanobacterial toxins. *Environmental Microbiology* 9: 965–970.
- Schnetzer, A.; Miller, P.E.; Schaffner, R.A.; Stauffer, B.A.; Jones, B.H.; Weisberg, S.B.; et al. 2007. Blooms of *Pseudo-nitzschia* and domoic acid in the San Pedro Channel and Los Angeles harbor areas of the Southern California Bight, 2003–2004. *Harmful Algae* 6: 372–387.
- Schnurr, P.J.; Allen, D.G. 2015. Factors affecting algae biofilm growth and lipid production: A review. *Renewable and Sustainable Energy Reviews* 52: 418–429.
- Schnurr, P.J.; Espie, G.S.; Allen, D.G. 2013. Algae biofilm growth and the potential to stimulate lipid accumulation through nutrient starvation. *Bioresource Technology* 136: 337–344.

- Sciandra, A.; Ramani, P. 1994. The steady states of continuous cultures with low rates of medium renewal per cell. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* 178: 1–15.
- Scorzoni, L.; Benaducci, T.; Almeida, A.M.F.; Silva, D.H.S.; Bolzani, V.S.; Mendes-Giannini, M.J.S. 2007. Comparative study of disk diffusion and microdilution methods for evaluation of antifungal activity of natural compounds against medical yeasts *Candida* spp and *Cryptococcus* sp. *Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada* 28.
- Selander, E.; Cervin, G.; Pavia, H. 2008. Effects of nitrate and phosphate on grazer-induced toxin production in *Alexandrium minutum*. *Limnology and Oceanography* 53: 523–530.
- Sevilla, E.; Martin-Luna, B.; Vela, L.; Teresa Bes, M.; Luisa Peleato, M.; Fillat, M.F. 2010. Microcystin-LR synthesis as response to nitrogen: transcriptional analysis of the *mcyD* gene in *Microcystis aeruginosa* PCC7806. *Ecotoxicology* 19: 1167–1173.
- Seymour, J.R.; Amin, S.A.; Raina, J.-B.; Stocker, R. 2017. Zooming in on the phycosphere: the ecological interface for phytoplankton–bacteria relationships. *Nature Microbiology* 2: 1–12.
- Shakibaie, M.; Forootanfar, H.; Mollazadeh-Moghaddam, K.; Bagherzadeh, Z.; Nafissi-Varcheh, N.; Shahverdi, A.R.; et al. 2010. Green synthesis of gold nanoparticles by the marine microalga *Tetraselmis suecica*. *Biotechnology and Applied Biochemistry* 57: 71–75.
- Shalev-Alon, G.; Sukenik, A.; Livnah, O.; Schwarz, R.; Kaplan, A. 2002. A novel gene encoding amidinotransferase in the cylindrospermopsin producing cyanobacterium *Aphanizomenon ovalisporum*. *FEMS microbiology letters* 209: 87–91.
- Shalev-Malul, G.; Lieman-Hurwitz, J.; Viner-Mozzini, Y.; Sukenik, A.; Gaathon, A.; Lebendiker, M.; et al. 2008. An AbrB-like protein might be involved in the regulation of cylindrospermopsin production by *Aphanizomenon ovalisporum*. *Environmental Microbiology* 10: 988–999.
- Silva, M.; Kamberovic, F.; Uota, S.T.; Kovan, I.-M.; Viegas, C.S.B.; Simes, D.C.; et al. 2022. Microalgae as Potential Sources of Bioactive Compounds for Functional Foods and Pharmaceuticals. *Applied Sciences* 12: 5877.
- Simon, J.-C.; Marchesi, J.R.; Mougél, C.; Selosse, M.-A. 2019. Host-microbiota interactions: from holobiont theory to analysis. *Microbiome* 7: 5.
- Singh, J.; Saxena, R.C. 2015. Chapter 2 - An Introduction to Microalgae: Diversity and Significance. In: Kim, S.-K. (Ed.), *Handbook of Marine Microalgae*, Academic Press, Boston, p.11–24.
- Siu, G.K.Y.; Young, M.L.C.; Chan, D.K.O. 1997. Environmental and nutritional factors which regulate population dynamics and toxin production in the dinoflagellate *Alexandrium catenella*. *Hydrobiologia* 352: 117–140.
- Skovgaard, A.; Hansen, P. 2003. Food Uptake in the Harmful Alga *Prymnesium parvum* Mediated by Excreted Toxins. *Limnology and Oceanography - LIMNOL OCEANOGR* 48: 1161–1166.
- Śliwińska-Wilczewska, S.; Latała, A. 2018. Allelopathic activity of the bloom-forming picocyanobacterium *Synechococcus* sp. on the coexisting microalgae: The role of eutrophication. *International Review of Hydrobiology* 103: 37–47.
- Sohrin, Y.; Bruland, K.W. 2011. Global status of trace elements in the ocean. *TrAC Trends in Analytical Chemistry* 30: 1291–1307.
- Solter, P.F.; Beasley, V.R. 2013. Chapter 38 - Phycotoxins. In: Haschek, W.M.; Rousseaux, C.G.; Wallig, M.A. (Eds.), *Haschek and Rousseaux's Handbook of Toxicologic Pathology (Third Edition)*, Academic Press, Boston, p.1155–1186.
- Song, D.; Xi, B.; Sun, J. 2016. Characterization of the growth, chlorophyll content and lipid accumulation in a marine microalgae *Dunaliella tertiolecta* under different nitrogen to phosphorus ratios. *Journal of Ocean University of China* 15: 124–130.
- Sorgeloos, P.; Van Outryve, E.; Persoone, G.; Cattoir-Reynaerts, A. 1976. New Type of Turbidostat with Intermittent Determination of Cell Density Outside the Culture Vessel. *Applied and Environmental Microbiology* 31: 327–331.
- Soto-Jiménez, M.F.; Arellano-Fiore, C.; Rocha-Velarde, R.; Jara-Marini, M.E.; Ruelas-Inzunza, J.; Páez-Osuna, F. 2011a. Trophic transfer of lead through a model marine four-level food chain: *Tetraselmis suecica*,

- Artemia franciscana, Litopenaeus vannamei, and Haemulon scudleri. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology* 61: 280–291.
- Soto-Jiménez, M.F.; Arellano-Fiore, C.; Rocha-Velarde, R.; Jara-Marini, M.E.; Ruelas-Inzunza, J.; Voltolina, D.; et al. 2011b. Biological responses of a simulated marine food chain to lead addition. *Environmental Toxicology and Chemistry* 30: 1611–1617.
- Souto, M.L.; Fernández, J.J.; Norte, M.; Fernández, M.L.; Martínez, A. 2001. Influence of amino acids on okadaic acid production. *Toxicon: Official Journal of the International Society on Toxinology* 39: 659–664.
- Stevens, M.; Peigneur, S.; Tytgat, J. 2011. Neurotoxins and Their Binding Areas on Voltage-Gated Sodium Channels. *Frontiers in Pharmacology* 2.
- Stewart, J. 2008. Bacterial involvement in determining domoic acid levels in Pseudo-nitzschia multiseries cultures. *Aquatic Microbial Ecology - AQUAT MICROB ECOL* 50: 135–144.
- Stirk, W.A.; van Staden, J. 2022. Bioprospecting for bioactive compounds in microalgae: Antimicrobial compounds. *Biotechnology Advances* 59: 107977.
- Stolte, W.; Karlsson, C.; Carlsson, P.; Granéli, E. 2002. Modeling the increase of nodularin content in Baltic Sea Nodularia spumigena during stationary phase in phosphorus-limited batch cultures. *FEMS Microbiology Ecology* 41: 211–220.
- Stoodley, P.; Dodds, I.; Boyle, J.D.; Lappin-Scott, H.M. 1998. Influence of hydrodynamics and nutrients on biofilm structure. *Journal of Applied Microbiology* 85: 19S–28S.
- Stucken, K.; John, U.; Cembella, A.; Soto-Liebe, K.; Vásquez, M. 2014. Impact of nitrogen sources on gene expression and toxin production in the diazotroph Cylandrospermopsis raciborskii CS-505 and non-diazotroph Raphidiopsis brookii D9. *Toxins* 6: 1896–1915.
- Sukenik, A.; Eshkol, R.; Livne, A.; Hadas, O.; Rom, M.; Tchernov, D.; et al. 2002. Inhibition of growth and photosynthesis of the dinoflagellate Peridinium gatunense by Microcystis sp. (cyanobacteria): A novel allelopathic mechanism. *Limnology and Oceanography* 47: 1656–1663.
- Sun, Y.; Li, P.; Huang, Y.; Xia, A.; Zhu, X.; Zhu, X.; et al. 2024. Synergistic treatment of digested wastewater with high ammonia nitrogen concentration using straw and microalgae. *Bioresource Technology* 412: 131406.
- Tan, J.S.; Lee, S.Y.; Chew, K.W.; Lam, M.K.; Lim, J.W.; Ho, S.-H.; et al. 2020. A review on microalgae cultivation and harvesting, and their biomass extraction processing using ionic liquids. *Bioengineered* 11: 116–129.
- Tan, L.T. 2023. Impact of Marine Chemical Ecology Research on the Discovery and Development of New Pharmaceuticals. *Marine Drugs* 21: 174.
- Tarazona Delgado, R.; Guarieiro, M. dos S.; Antunes, P.W.; Cassini, S.T.; Terreros, H.M.; Fernandes, V. de O. 2021. Effect of nitrogen limitation on growth, biochemical composition, and cell ultrastructure of the microalga Picocystis salinarum. *Journal of Applied Phycology* 33: 2083–2092.
- Teplitski, M.; Chen, H.; Rajamani, S.; Gao, M.; Merighi, M.; Sayre, R.T.; et al. 2004. Chlamydomonas reinhardtii Secretes Compounds That Mimic Bacterial Signals and Interfere with Quorum Sensing Regulation in Bacteria. *Plant Physiology* 134: 137–146.
- Terseleer, N.; Gypens, N.; Lancelot, C. 2013. Factors controlling the production of domoic acid by Pseudo-nitzschia (Bacillariophyceae): A model study. *Harmful Algae* 24: 45–53.
- Thessen, A.E.; Bowers, H.A.; Stoecker, D.K. 2009. Intra- and interspecies differences in growth and toxicity of Pseudo-nitzschia while using different nitrogen sources. *Harmful Algae* 8: 792–810.
- Thompson, S.E.M.; Taylor, A.R.; Brownlee, C.; Callow, M.E.; Callow, J.A. 2008. The Role of Nitric Oxide in Diatom Adhesion in Relation to Substratum Properties. *Journal of Phycology* 44: 967–976.
- Thoms, C.; Schupp, P.J. 2008. Activated Chemical Defense in Marine Sponges—a Case Study on Aplysinella rhax. *Journal of Chemical Ecology* 34: 1242–1252.
- Thottumkara, A.P.; Parsons, W.H.; Du Bois, J. 2014. Saxitoxin. *Angewandte Chemie International Edition* 53: 5760–5784.

- Tillett, D.; Dittmann, E.; Erhard, M.; von Döhren, H.; Börner, T.; Neilan, B.A. 2000. Structural organization of microcystin biosynthesis in *Microcystis aeruginosa* PCC7806: an integrated peptide–polyketide synthetase system. *Chemistry & Biology* 7: 753–764.
- Tillmann, U. 2003. Kill and Eat Your Predator: A Winning Strategy of the Planktonic Flagellate *Prymnesium parvum*. *Aquatic Microbial Ecology - AQUAT MICROB ECOL* 32: 73–84.
- Tillmann, U.; Elbrächter, M.; Krock, B.; John, U.; Cembella, A. 2009. *Azadinium spinosum* gen. et sp. nov. (Dinophyceae) identified as a primary producer of azaspiracid toxins. *European Journal of Phycology* 44: 63–79.
- Tong, M.; Smith, J.L.; Kulis, D.M.; Anderson, D.M. 2015. Role of dissolved nitrate and phosphate in isolates of *Mesodinium rubrum* and toxin-producing *Dinophysis acuminata*. *Aquatic microbial ecology: international journal* 75: 169.
- Tonk, L.; van de Waal, D.B.; Slot, P.; Huisman, J.; Matthijs, H.C.P.; Visser, P.M. 2008. Amino acid availability determines the ratio of microcystin variants in the cyanobacterium *Planktothrix agardhii*. *FEMS Microbiology Ecology* 65: 383–390.
- Touzet, N.; Franco, J.M.; Raine, R. 2007. Influence of inorganic nutrition on growth and PSP toxin production of *Alexandrium minutum* (Dinophyceae) from Cork Harbour, Ireland. *Toxicon* 50: 106–119.
- Trainer, V.; Bates, S.; Cochlan, W.; Lundholm, N.; Thessen, A.; Adams, et al. 2012. *Pseudo-nitzschia* physiological ecology, phylogeny, toxicity, monitoring and impacts on ecosystem health. *Harmful Algae* 14: 271–300.
- Treguer, P.; Le Corre, P.; Occidentale, U. de B. 1975. *Manuel d'analyse des sels nutritifs dans l'eau de mer*. 110 p.; ill. 30 cmp.
- Tsagkari, E.; Connelly, S.; Liu, Z.; McBride, A.; Sloan, W.T. 2022. The role of shear dynamics in biofilm formation. *Npj Biofilms and Microbiomes* 8: 1–10.
- Twiner, M.J.; Rehmann, N.; Hess, P.; Doucette, G.J. 2008. Azaspiracid Shellfish Poisoning: A Review on the Chemistry, Ecology, and Toxicology with an Emphasis on Human Health Impacts. *Marine Drugs* 6: 39–72.
- Uronen, P.; Kuuppo, P.; Legrand, C.; Tamminen, T. 2007. Allelopathic effects of toxic haptophyte *Prymnesium parvum* lead to release of dissolved organic carbon and increase in bacterial biomass. *Microbial Ecology* 54: 183–193.
- Uronen, P.; Lehtinen, S.; Legrand, C.; Kuuppo, P.; Tamminen, T. 2005. Haemolytic Activity and Allelopathy of the Haptophyte *Prymnesium parvum* in Nutrient-Limited and Balanced Growth Conditions. *Marine Ecology Progress Series* 299.
- Vaglio, S. 2009. Chemical communication and mother-infant recognition. *Communicative & Integrative Biology* 2: 279–281.
- Valdiglesias, V.; Prego-Faraldo, M.V.; Pásaro, E.; Méndez, J.; Laffon, B. 2013. Okadaic Acid: More than a Diarrheic Toxin. *Marine Drugs* 11: 4328–4349.
- Van de Waal, D.B.; Smith, V.H.; Declerck, S.A.J.; Stam, E.C.M.; Elser, J.J. 2014. Stoichiometric regulation of phytoplankton toxins. *Ecology Letters* 17: 736–742.
- Van de Waal, D.B.; Smith, V.H.; Declerck, S.A.J.; Stam, E.C.M.; Elser, J.J. 2015. Corrigendum to Van de Waal et al. 2014: stoichiometric regulation of phytoplankton toxins. *Ecology Letters* 18: 983–984.
- Van de Waal, D.B.; Verspagen, J.M.H.; Lürling, M.; Van Donk, E.; Visser, P.M.; Huisman, J. 2009. The ecological stoichiometry of toxins produced by harmful cyanobacteria: an experimental test of the carbon-nutrient balance hypothesis. *Ecology Letters* 12: 1326–1335.
- Van de Waal, D.B.; Ferreruela, G.; Tonk, L.; Van Donk, E.; Huisman, J.; Visser, P.M.; et al. 2010. Pulsed nitrogen supply induces dynamic changes in the amino acid composition and microcystin production of the harmful cyanobacterium *Planktothrix agardhii*. *FEMS Microbiology Ecology* 74: 430–438.
- Vanucci, S.; Guerrini, F.; Milandri, A.; Pistocchi, R. 2010. Effects of different levels of N- and P-deficiency on cell yield, okadaic acid, DTX-1, protein and carbohydrate dynamics in the benthic dinoflagellate *Prorocentrum lima*. *Harmful Algae* 9: 590–599.

- Vanucci, S.; Pezzolesi, L.; Pistocchi, R.; Ciminiello, P.; Dell'Aversano, C.; Iacovo, E.D.; et al. 2012. Nitrogen and phosphorus limitation effects on cell growth, biovolume, and toxin production in *Ostreopsis cf. ovata*. *Harmful Algae* 15: 78–90.
- Vardi, A.; Schatz, D.; Beerli, K.; Motro, U.; Sukenik, A.; Levine, A.; et al. 2002. Dinoflagellate-Cyanobacterium Communication May Determine the Composition of Phytoplankton Assemblage in a Mesotrophic Lake. *Current Biology* 12: 1767–1772.
- Vardi, A.; Formiggini, F.; Casotti, R.; De Martino, A.; Ribalet, F.; Miralto, A.; et al. 2006. A Stress Surveillance System Based on Calcium and Nitric Oxide in Marine Diatoms. *PLoS Biology* 4: e60.
- Vardi, A.; Bidle, K.D.; Kwityn, C.; Hirsh, D.J.; Thompson, S.M.; Callow, J.A.; et al. 2008. A Diatom Gene Regulating Nitric-Oxide Signaling and Susceptibility to Diatom-Derived Aldehydes. *Current Biology* 18: 895–899.
- Vargas, S.R.; dos Santos, P.V.; Bottino, F.; Calijuri, M. do C. 2020. Effect of nutrient concentration on growth and saxitoxin production of *Raphidiopsis raciborskii* (Cyanophyta) interacting with *Monoraphidium contortum* (Chlorophyceae). *Journal of Applied Phycology* 32: 421–430.
- Varkitzi, I.; Pagou, K.; Granéli, E.; Hatzianestis, I.; Pyrgaki, C.; Pavlidou, A.; et al. 2010. Unbalanced N:P ratios and nutrient stress controlling growth and toxin production of the harmful dinoflagellate *Prorocentrum lima* (Ehrenberg) Dodge. *Harmful Algae* 9: 304–311.
- Vega, J. 2019. Nitrogen and Sulfur Metabolism in Microalgae and Plants: 50 Years of Research. In: p.1–40.
- Vet, L.E.M.; Dicke, M. 1992. Ecology of Infochemical Use by Natural Enemies in a Tritrophic Context. *Annual Review of Entomology* 37: 141–172.
- Vézic, C.; Rapala, J.; Vaitomaa, J.; Seitsonen, J.; 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.
- Vico, P.; Aubriot, L.; Martigani, F.; Rigamonti, N.; Bonilla, S.; Piccini, C. 2016. Influence of nitrogen availability on the expression of genes involved in the biosynthesis of saxitoxin and analogs in *Cylindrospermopsis raciborskii*. *Harmful Algae* 56: 37–43.
- Vidyarathna, N.K.; Granéli, E. 2013. Physiological responses of *Ostreopsis ovata* to changes in N and P availability and temperature increase. *Harmful Algae* 21–22: 54–63.
- Vohra, M.; Kour, A.; Kalia, N.P.; Kumar, M.; Sharma, S.; Jaglan, S.; et al. 2024. A comprehensive review of genomics, transcriptomics, proteomics, and metabolomic insights into the differentiation of *Pseudomonas aeruginosa* from the planktonic to biofilm state: A multi-omics approach. *International Journal of Biological Macromolecules* 257: 128563.
- Wang, D.; Hsieh, D.P.H. 2001. Dynamics of C2 toxin and chlorophyll-a formation in the dinoflagellate *Alexandrium tamarense* during large scale cultivation. *Toxicon* 39: 1533–1536.
- Wang, D.-Z.; Hsieh, D. 2002. Effects of nitrate and phosphate on growth and C2 toxin productivity of *Alexandrium tamarense* CI01 in culture. *Marine Pollution Bulletin* 45: 286–289.
- Wang, D.-Z.; Hsieh, D.P.H. 2005. Growth and toxin production in batch cultures of a marine dinoflagellate *Alexandrium tamarense* HK9301 isolated from the South China Sea. *Harmful Algae* 4: 401–410.
- Wang, D.-Z.; Xin, Y.-H.; Wang, M.-H. 2022. Gambierdiscus and Its Associated Toxins: A Minireview. *Toxins* 14: 485.
- Wang, J.-H.; Zhuang, L.-L.; Xu, X.-Q.; Deantes-Espinosa, V.M.; Wang, X.-X.; Hu, H.-Y. 2018. Microalgal attachment and attached systems for biomass production and wastewater treatment. *Renewable and Sustainable Energy Reviews* 92: 331–342.
- Wang, X.; Shen, Z.; Miao, X. 2016. Nitrogen and hydrophosphate affects glycolipids composition in microalgae. *Scientific Reports* 6: 30145.
- Wang, Y.; Tibbetts, S.M.; McGinn, P.J. 2021. Microalgae as Sources of High-Quality Protein for Human Food and Protein Supplements. *Foods* 10: 3002.
- Weaver, J.L.; DePriest, P.T.; Plymale, A.E.; Pearce, C.I.; Arey, B.; Koestler, R.J. 2021. Microbial interactions with silicate glasses. *Npj Materials Degradation* 5: 1–18.

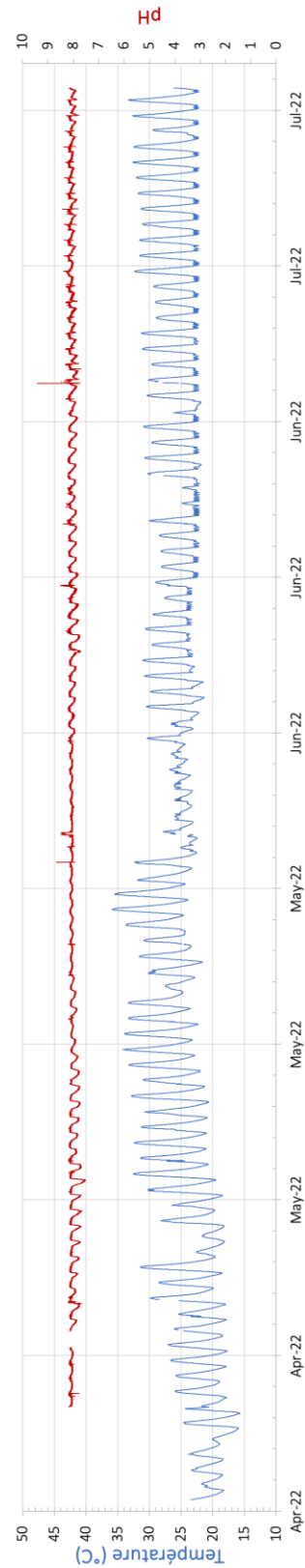
- Weiss, V.; Gromet-Elhanan, Z.; Halmann, M. 1985. Expériences de culture par lots et en continu sur les limitations en nutriments et les effets de la température chez l'algue marine *Tetraselmis suecica*. *Water Research* 19: 185–190.
- Wells, M.L.; Karlson, B.; Wulff, A.; Kudela, R.; Trick, C.; Asnaghi, V.; et al. 2020. Future HAB science: Directions and challenges in a changing climate. *Harmful Algae* 91: 101632.
- Wendehenne, D.; Durner, J.; Klessig, D.F. 2004. Nitric oxide: a new player in plant signalling and defence responses. *Current Opinion in Plant Biology* 7: 449–455.
- Whittaker, R.H.; Feeny, P.P. 1971. Allelochemicals: chemical interactions between species. *Science (New York, N.Y.)* 171: 757–770.
- Wiedner, C.; Rücker, J.; Fastner, J.; Chorus, I.; Nixdorf, B. 2008. Seasonal dynamics of cylindrospermopsin and cyanobacteria in two German lakes. *Toxicon* 52: 677–686.
- Willis, A.; Chuang, A.W.; Burford, M.A. 2016. Nitrogen fixation by the diazotroph *Cylindrospermopsis raciborskii* (Cyanophyceae). *Journal of Phycology* 52: 854–862.
- Willis, A.; Adams, M.P.; Chuang, A.W.; Orr, P.T.; O'Brien, K.R.; Burford, M.A. 2015. Production de toxines constitutives sous divers régimes d'azote et de phosphore de trois écotypes de *Cylindrospermopsis raciborskii* ((Wołoszyńska) Seenayya et Subba Raju). *Harmful Algae* 47: 27–34.
- Wu, C.H. 2009. Palytoxin: Membrane mechanisms of action. *Toxicon* 54: 1183–1189.
- Wu, X.; Yan, Y.; Wang, P.; Ni, L.; Gao, J.; Dai, R. 2015. Effect of urea on growth and microcystins production of *Microcystis aeruginosa*. *Bioresource Technology* 181: 72–77.
- Wu, Y.; Liu, J.; Yang, L.; Chen, H.; Zhang, S.; Zhao, H.; et al. 2011. Allelopathic control of cyanobacterial blooms by periphyton biofilms. *Environmental Microbiology* 13: 604–615.
- Wyatt, T.; Jenkinson, I.R. 1997. Notes on Alexandrium population dynamics. *Journal of Plankton Research* 19: 551–575.
- Xiao, R.; Zheng, Y. 2016. Overview of microalgal extracellular polymeric substances (EPS) and their applications. *Biotechnology Advances* 34: 1225–1244.
- Xu, J.; Ho, A.Y.T.; He, L.; Yin, K.; Hung, C.; Choi, N.; et al. 2012. Effects of inorganic and organic nitrogen and phosphorus on the growth and toxicity of two Alexandrium species from Hong Kong. *Harmful Algae* 16: 89–97.
- Xu, Q.; Yang, L.; Yang, W.; Bai, Y.; Hou, P.; Zhao, J.; et al. 2017. Volatile organic compounds released from *Microcystis flos-aquae* under nitrogen sources and their toxic effects on *Chlorella vulgaris*. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 135: 191–200.
- Xu, W.; Tan, L.; Guo, X.; Wang, J. 2020. Isolation of anti-algal substances from *Cylindrotheca closterium* and their inhibition activity on bloom-forming *Prorocentrum donghaiense*. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 190: 110180.
- Xu, W.; Wang, J.; Tan, L.; Guo, X.; Xue, Q. 2019. Variation in allelopathy of extracellular compounds produced by *Cylindrotheca closterium* against the harmful-algal-bloom dinoflagellate *Prorocentrum donghaiense*. *Marine Environmental Research* 148: 19–25.
- Yaakob, M.A.; Mohamed, R.M.S.R.; Al-Gheethi, A.; Aswathnarayana Gokare, R.; Ambati, R.R. 2021. Influence of Nitrogen and Phosphorus on Microalgal Growth, Biomass, Lipid, and Fatty Acid Production: An Overview. *Cells* 10: 393.
- Yan, H.; Pan, G.; Zou, H.; Song, L.; Zhang, M. 2004. Effects of nitrogen forms on the production of cyanobacterial toxin microcystin-IR by an isolated *Microcystis aeruginosa*. *Journal of Environmental Science and Health. Part A, Toxic/Hazardous Substances & Environmental Engineering* 39: 2993–3003.
- Yan, Y.; Dai, R.; Liu, Y.; Gao, J.; Wu, X. 2015. Comparative effects of inorganic and organic nitrogen on the growth and microcystin production of *Microcystis aeruginosa*. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* 31: 763–772.
- Yang, I.; Beszteri, S.; Tillmann, U.; Cembella, A.; John, U. 2011. Growth- and nutrient-dependent gene expression in the toxigenic marine dinoflagellate *Alexandrium minutum*. *Harmful Algae* 12: 55–69.

- Yang, X.; Bi, Y.; Ma, X.; Dong, W.; Wang, X.; Wang, S. 2022. Transcriptomic analysis dissects the regulatory strategy of toxic cyanobacterium *Microcystis aeruginosa* under differential nitrogen forms. *Journal of Hazardous Materials* 428: 128276.
- Yang, Y.; Chen, Y.; Cai, F.; Liu, X.; Wang, Y.; Li, R. 2018. Toxicity-associated changes in the invasive cyanobacterium *Cylindrospermopsis raciborskii* in response to nitrogen fluctuations. *Environmental Pollution* 237: 1041–1049.
- Yao, C.; Ai, J.; Cao, X.; Xue, S.; Zhang, W. 2012. Enhancing starch production of a marine green microalga *Tetraselmis subcordiformis* through nutrient limitation. *Bioresource Technology* 118: 438–444.
- Yao, C.-H.; Ai, J.-N.; Cao, X.-P.; Xue, S. 2013a. Salinity manipulation as an effective method for enhanced starch production in the marine microalga *Tetraselmis subcordiformis*. *Bioresource Technology* 146: 663–671.
- Yao, C.-H.; Ai, J.-N.; Cao, X.-P.; Xue, S. 2013b. Characterization of cell growth and starch production in the marine green microalga *Tetraselmis subcordiformis* under extracellular phosphorus-deprived and sequentially phosphorus-replete conditions. *Applied Microbiology and Biotechnology* 97: 6099–6110.
- Yap, B.H.J.; Crawford, S.A.; Dagastine, R.R.; Scales, P.J.; Martin, G.J.O. 2016. Nitrogen deprivation of microalgae: effect on cell size, cell wall thickness, cell strength, and resistance to mechanical disruption. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology* 43: 1671–1680.
- Ye, C.; Yang, Y.; Xu, Q.; Ying, B.; Zhang, M.; Gao, B.; et al. 2018. Volatile organic compound emissions from *Microcystis aeruginosa* under different phosphorus sources and concentrations. *Phycological Research* 66: 15–22.
- Yoshida, M.; Yoshida, T.; Takashima, Y.; Hosoda, N.; 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.
- Yunes, J.S.; De La Rocha, S.; Giroldo, D.; Silveira, S.B. da; Comin, R.; Bicho, M. da S.; et al. 2009. Release of Carbohydrates and Proteins by a Subtropical Strain of *Raphidiopsis Brookii* (cyanobacteria) Able to Produce Saxitoxin at Three Nitrate Concentrations1. *Journal of Phycology* 45: 585–591.
- Zabaglo, K.; Chrapusta-Srebrny, E.; Bober, B.; Kaminski, A.; Adamski, M.; Bialczyk, J. 2016. Environmental roles and biological activity of domoic acid: A review. *Algal Research* 13: 94–101.
- Zeebe, R.; Wolf-Gladrow, D. 2001. CO₂ in Seawater: Equilibrium, Kinetics, Isotopes. .
- Zhao, J.; Yang, L.; Zhou, L.; Bai, Y.; Wang, B.; Hou, P.; et al. 2016. Inhibitory effects of eucalyptol and limonene on the photosynthetic abilities in *Chlorella vulgaris* (Chlorophyceae). *Phycologia* 55: 696–702.
- Zhou, Y.; Zhang, X.; Li, X.; Jia, P.; Dai, R. 2019. Evaluation of changes in *Microcystis aeruginosa* growth and microcystin production by urea via transcriptomic surveys. *Science of The Total Environment* 655: 181–187.
- Zhu, S.; Wang, Y.; Huang, W.; Xu, J.; Wang, Z.; Xu, J.; et al. 2014. Enhanced accumulation of carbohydrate and starch in *Chlorella zofingiensis* induced by nitrogen starvation. *Applied Biochemistry and Biotechnology* 174: 2435–2445.
- Zhu, Y.; Tu, X.; Chai, X.-S.; Wei, Q.; Guo, L. 2018. Biological activities and nitrogen and phosphorus removal during the anabaena flos-aquae biofilm growth using different nutrient form. *Bioresource Technology* 251: 7–12.
- Zhuang, L.-L.; Azimi, Y.; Yu, D.; Wu, Y.-H.; Hu, H.-Y. 2018a. Effects of nitrogen and phosphorus concentrations on the growth of microalgae *Scenedesmus*. LX1 in suspended-solid phase photobioreactors (ssPBR). *Biomass and Bioenergy* 109: 47–53.
- Zhuang, L.-L.; Yu, D.; Zhang, J.; Liu, F.; Wu, Y.-H.; Zhang, T.-Y.; et al. 2018b. The characteristics and influencing factors of the attached microalgae cultivation: A review. *Renewable and Sustainable Energy Reviews* 94: 1110–1119.
- Zhuang, Y.; Zhang, H.; Hannick, L.; Lin, S. 2015. Metatranscriptome profiling reveals versatile N-nutrient utilization, CO₂ limitation, oxidative stress, and active toxin production in an *Alexandrium fundyense* bloom. *Harmful Algae* 42: 60–70.
- Zuo, Z.; Yang, L.; Chen, S.; Ye, C.; Han, Y.; Wang, S.; et al. 2018. Effects of nitrogen nutrients on the volatile organic compound emissions from *Microcystis aeruginosa*. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 161: 214–220.

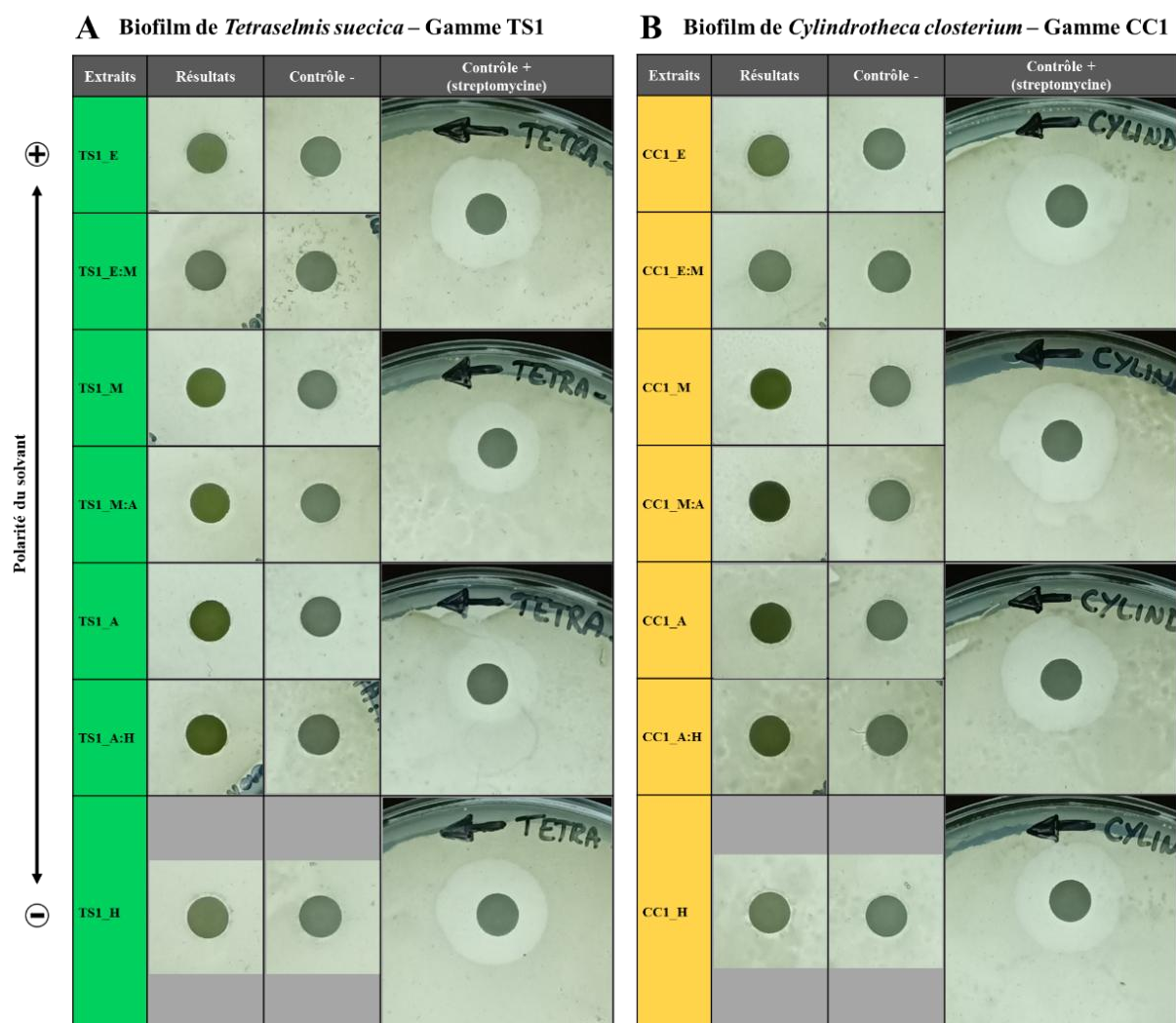
- a. AID 248 - NCI In Vivo Anticancer Drug Screen. Data for tumor model L1210 Leukemia (intraperitoneal) in B6D2F1 (BDF1) mice - PubChem. (<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/bioassay/248>). Accessed on 01 Jul. 2024.
- b. AID 256 - NCI In Vivo Anticancer Drug Screen. Data for tumor model L1210 Leukemia (intraperitoneal) in CD2F1 (CDF1) mice - PubChem. (<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/bioassay/256#section=Information-Sources>). Accessed on 01 Jul. 2024.
- c. AID 328 - NCI In Vivo Anticancer Drug Screen. Data for tumor model P388 Leukemia (intraperitoneal) in B6D2F1 (BDF1) mice - PubChem. (<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/bioassay/328>). Accessed on 01 Jul. 2024.
- d. AID 330 - NCI In Vivo Anticancer Drug Screen. Data for tumor model P388 Leukemia (intraperitoneal) in CD2F1 (CDF1) mice - PubChem. (<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/bioassay/330>). Accessed on 01 Jul. 2024.
- e. AID 1259407 - CCRIS mutagenicity studies - PubChem. (<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/bioassay/1259407>). Accessed on 01 Jul. 2024.
- f. AID 1259410 - CCRIS tumor promotion studies - PubChem. (<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/bioassay/1259410>). Accessed on 01 Jul. 2024.
- g. AID 155 - NCI Yeast Anticancer Drug Screen. Data for the rad50 strain - PubChem. (<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/bioassay/155>). Accessed on 01 Jul. 2024.
- h. AID 157 - NCI Yeast Anticancer Drug Screen. Data for the mec2-1 strain - PubChem. (<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/bioassay/157>). Accessed on 01 Jul. 2024.
- i. AID 161 - NCI Yeast Anticancer Drug Screen. Data for the sgs1 mgt1 strain - PubChem. (<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/bioassay/161>). Accessed on 01 Jul. 2024.
- j. AID 165 - NCI Yeast Anticancer Drug Screen. Data for the cln2 rad14 strain - PubChem. (<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/bioassay/165>). Accessed on 01 Jul. 2024.
- k. AID 167 - NCI Yeast Anticancer Drug Screen. Data for the bub3 strain - PubChem. (<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/bioassay/167>). Accessed on 01 Jul. 2024.
- l. AID 175 - NCI Yeast Anticancer Drug Screen. Data for the mlh1 rad18 strain - PubChem. (<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/bioassay/175>). Accessed on 01 Jul. 2024.

ANNEXES

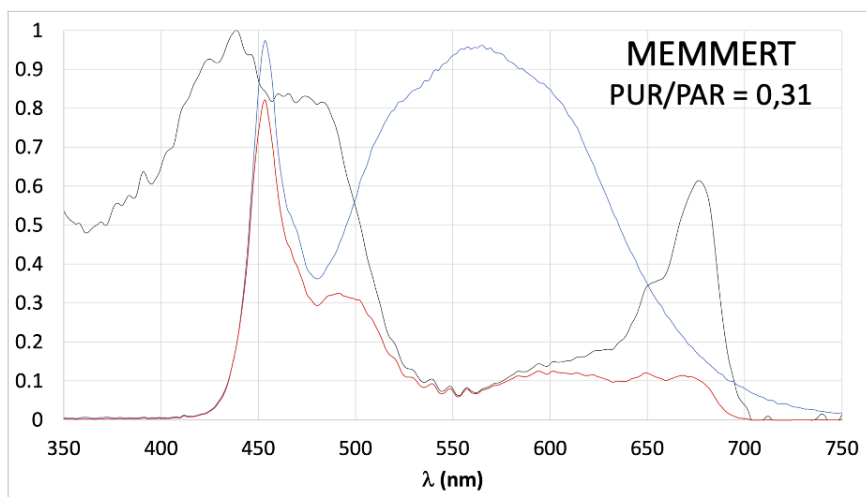
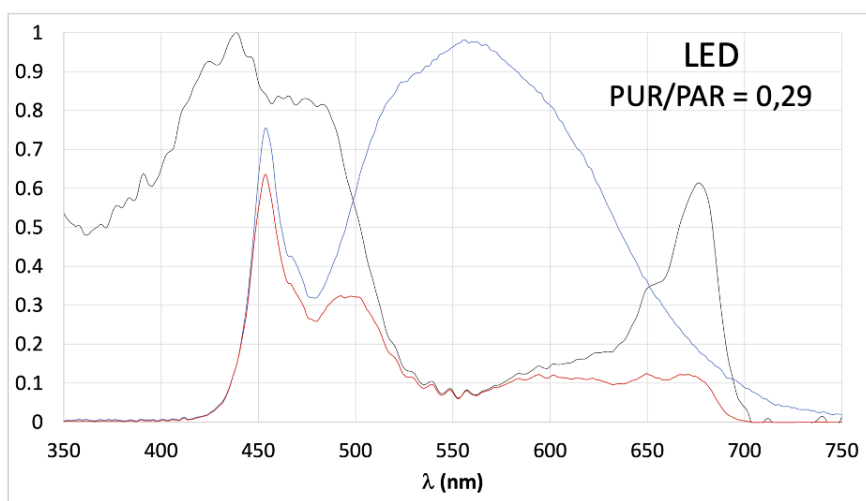
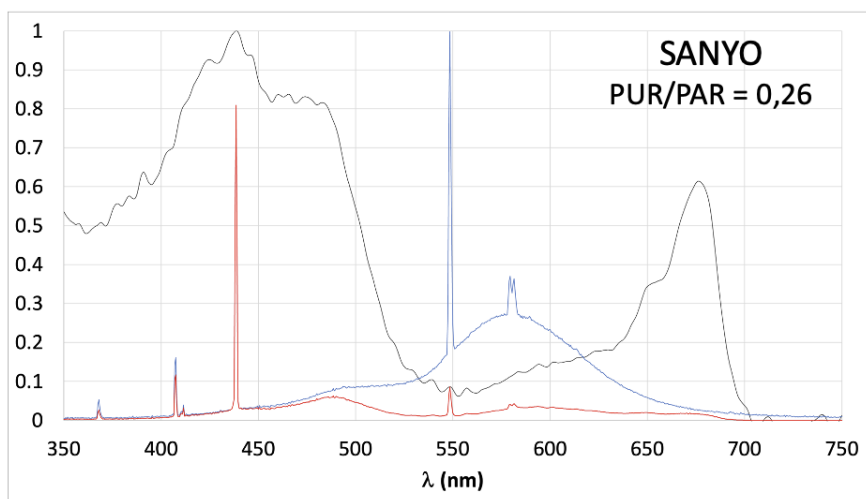
Annexe 1 : Suivis de la température (°C) et du pH du biofilm de la diatomée *Cylindrotheca closterium* AC170 entre Avril et Juillet 2022 sur un système de cylindre rotatif breveté de grande taille (WO 2021180713A1).



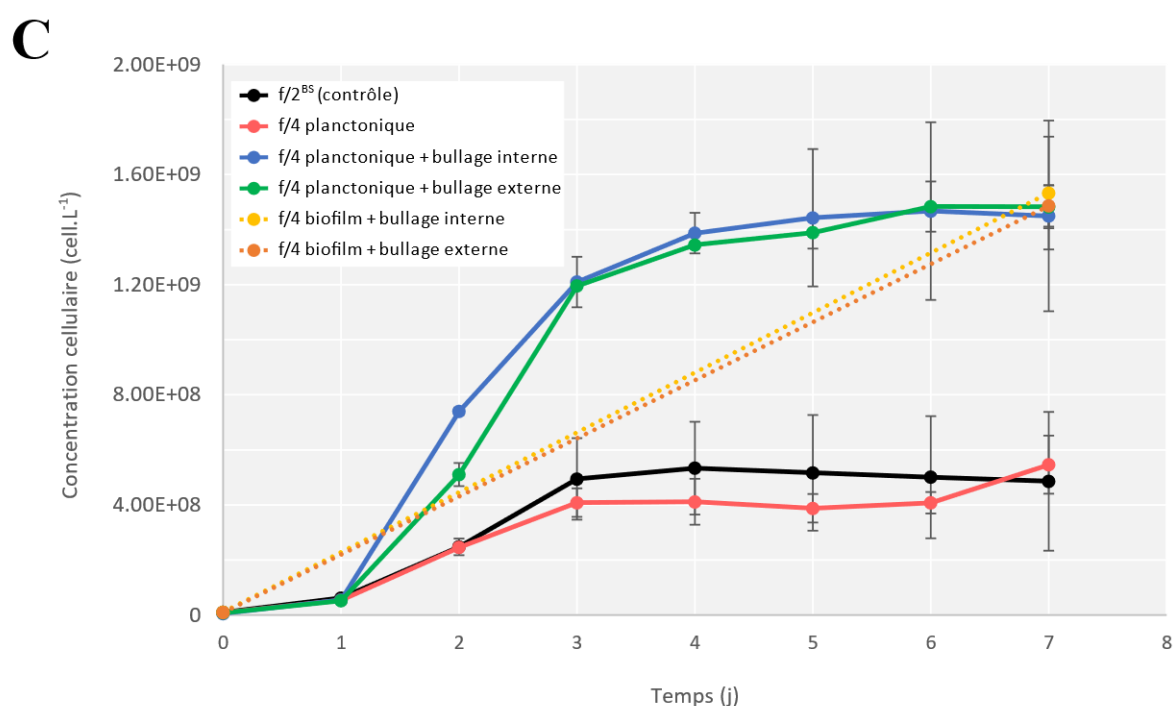
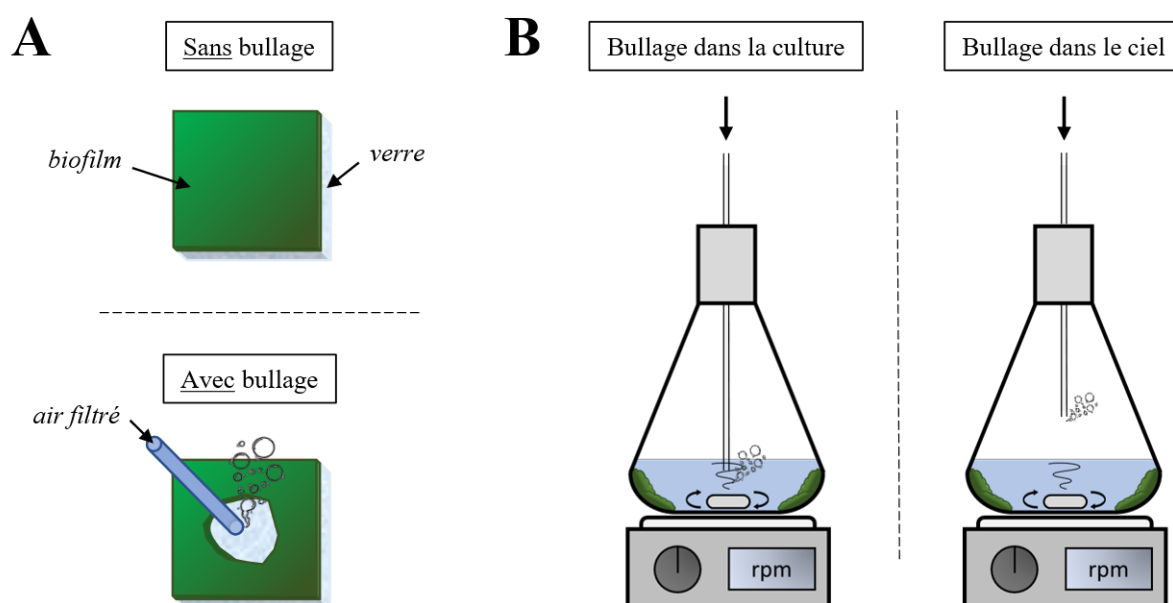
Annexe 2 : Tests de diffusion réalisés avec les extraits de **(A)** la gamme TS1 (biofilm de *Tetraselmis suecica* AC254) et **(B)** la gamme CC1 (biofilm de *Cylindrotheca closterium* AC170) sur la bactérie *Alteromonas* sp. fournie par l'UMR MARBEC. 10 µL de chaque extrait ont été déposés sur des disques de diffusion apposés sur un milieu MB gélifié à 2% d'agar-agar préalablement inoculé avec 100 µL de culture bactérienne d'*Alteromonas* sp. à une DO_{600nm} de 1,4. Les boîtes de Pétri ont été prises en photo après 24h d'incubation à 22°C et à l'obscurité.



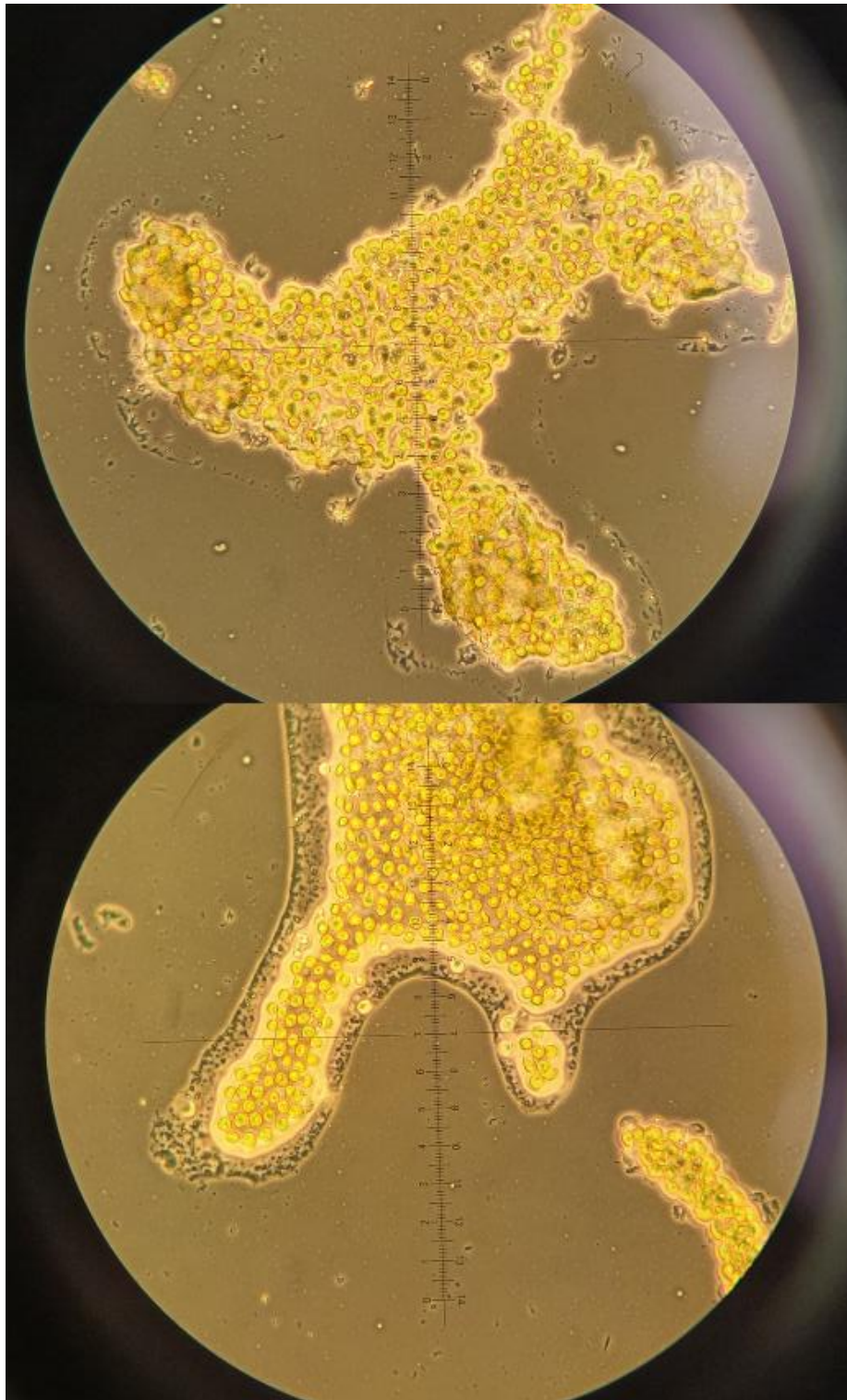
Annexe 3 : Calcul du rapport PUR/PAR pour *T. suecica* et les différentes sources lumineuses du laboratoire. Le rapport PUR/PAR indique la proportion de l'énergie émise par une source lumineuse qui est réellement absorbée par une espèce donnée, et qui est donc utilisable pour sa photosynthèse. Dans le cas présent, les mesures ont été faites avec *T. suecica*, et 3 sources lumineuses respectivement dénommées SANYO, LED et MEMMERT. Le trait noir représente le spectre d'absorption *in vivo* de *T. suecica* dans le visible normalisé par son maximum $a(\lambda)$, le trait bleu, le spectre d'émission de la source lumineuse PAR(λ) dont l'intégrale dans le domaine du visible (400-700nm) est le PAR (Photosynthetically Active Radiation). Le trait rouge est le PUR(λ), produit des deux spectres précédents pour chaque valeur de λ et dont l'intégrale dans le domaine du visible est le PUR (Photosynthetically Usable Radiation). $PAR = \int_{400}^{700} PAR(\lambda)d\lambda$; $PUR = \int_{400}^{700} PAR(\lambda)a(\lambda)d\lambda$



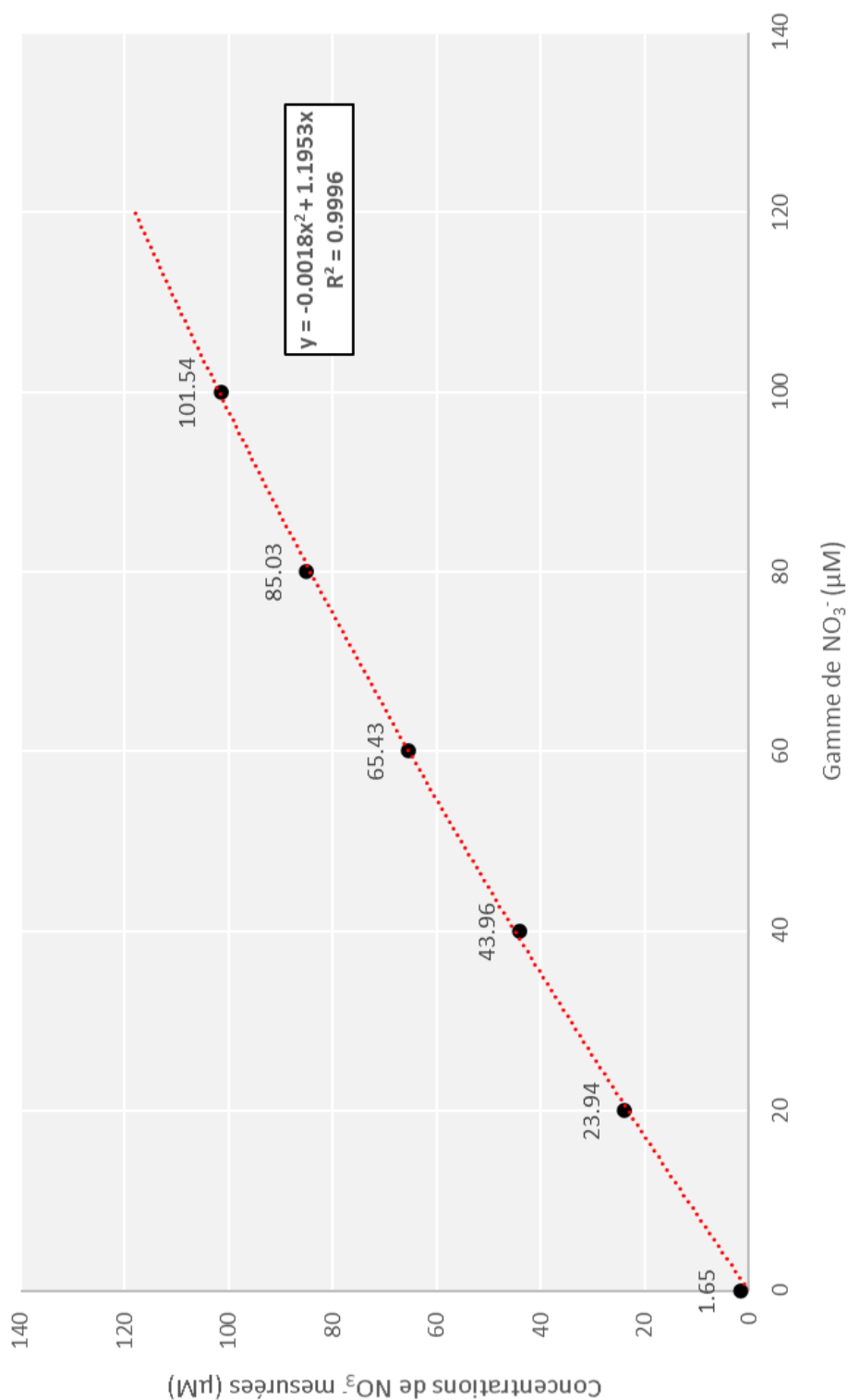
Annexe 4 : Le bullage pouvant engendrer un décollement localisé du biofilm au niveau de la sortie d'air (A), plusieurs manières de buller l'air à l'intérieur de la culture ont été expérimentées (B). La croissance planctonique et en biofilm de *T. suecica* dans du milieu f/4 a été suivie durant 7 jours sous trois conditions : sans bullage, avec bullage dans l'eau de la culture, avec bullage dans le ciel de la culture (C). Une canule d'arrivée d'air (microtubule PFTE, ID: 1,32 mm, OD: 1,93 mm, ref. 11959445, Adtech Polymer Engineering) passant à travers le bouchon en silicone a été ajoutée, son extrémité étant immergée ou non dans le milieu de culture. Une culture planctonique de *T. suecica* avec du milieu f/2^{BS} et sans bullage a été utilisée comme contrôle. Chaque culture a été réalisée en duplicata. Les concentrations cellulaires atteintes en phase stationnaire étaient, dans les cultures bullées, environ 2,9 fois supérieures à celles des cultures non bullées (environ $1,5 \cdot 10^9$ et $5,2 \cdot 10^8$ cell.L⁻¹, respectivement). Aucune différence n'a été observée entre les cultures avec un bullage à l'intérieur et à l'extérieur de culture. Aucune différence n'a été observée entre les cultures planctonique et en biofilm avec les deux types de bullage. Aucune différence n'a été observée entre le contrôle et la culture planctonique sans bullage. L'utilisation d'un bullage dans le ciel de la culture permet donc d'avoir une croissance cellulaire optimale sans décoller le biofilm.



Annexe 5 : Photographies d'un biofilm de *Tetraselmis suecica* prises au microscope optique. Le biofilm a été récupéré à l'aide d'une oese et déposé sur une lame en verre.

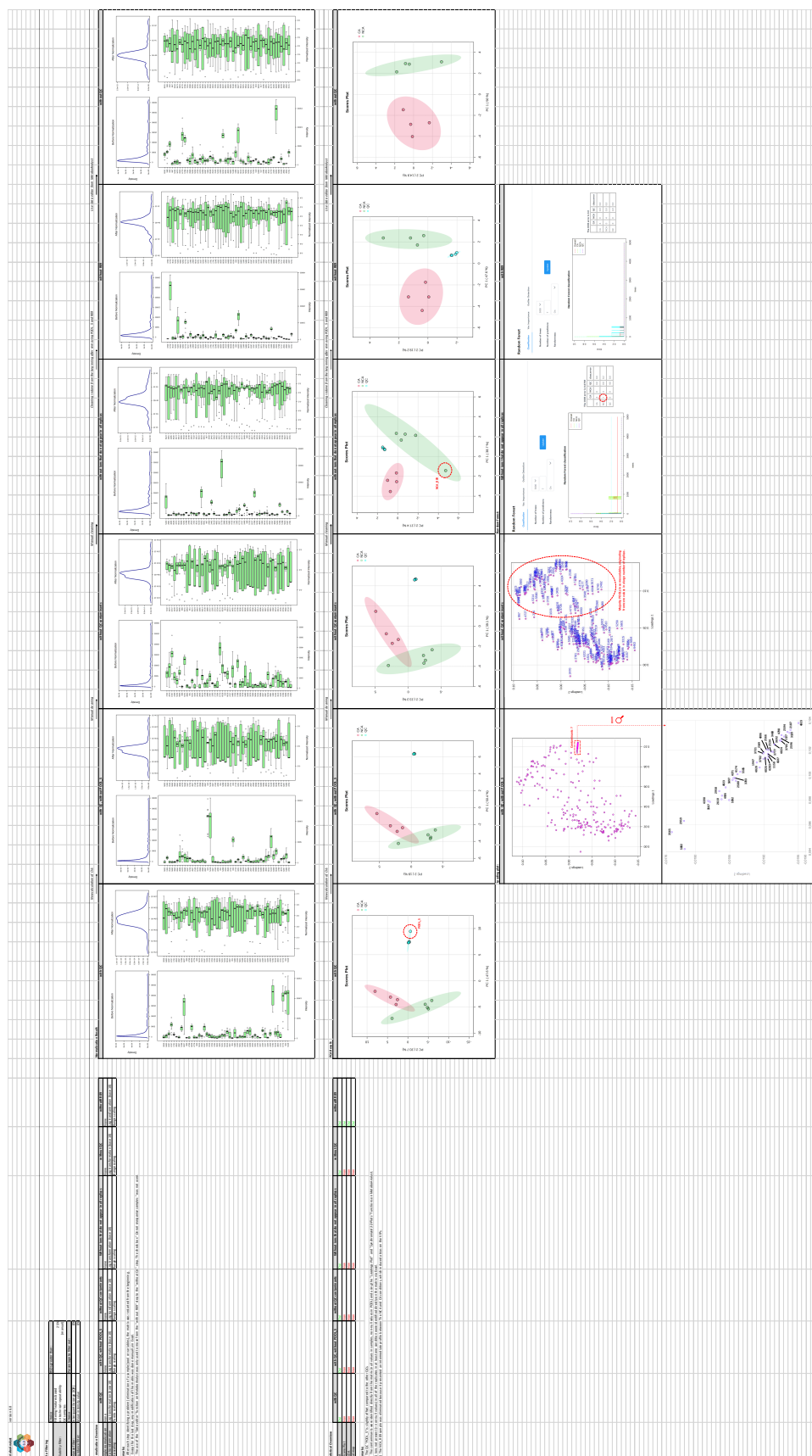


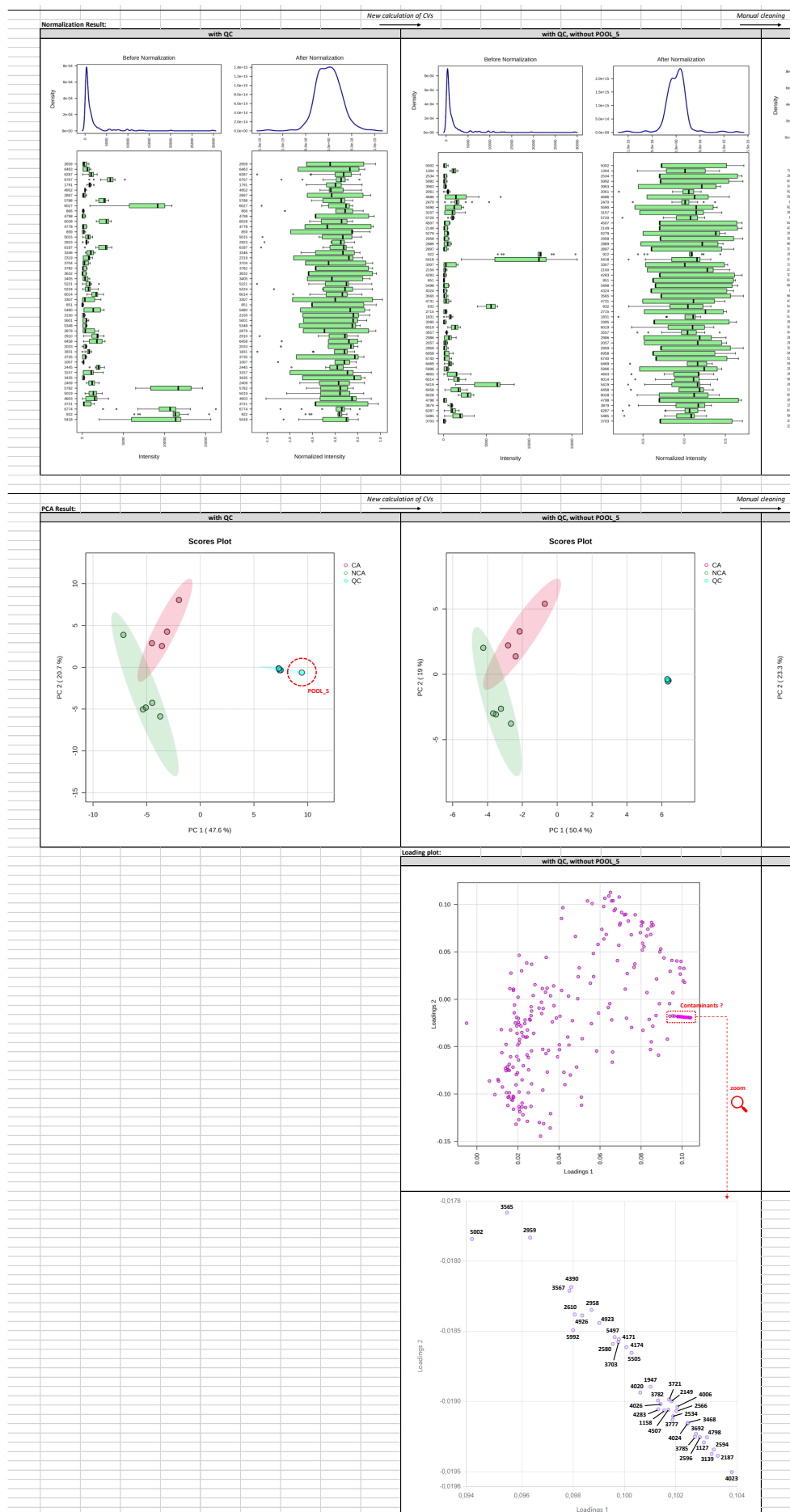
Annexe 6 : Courbe d'étalonnage de la concentration en nitrate (NO_3^-) mesurée au Technicon, obtenue par ajustement d'un polynôme de degré 2 passant par 0. Une légère saturation de la mesure est observée lorsque les concentrations en NO_3^- augmentent.

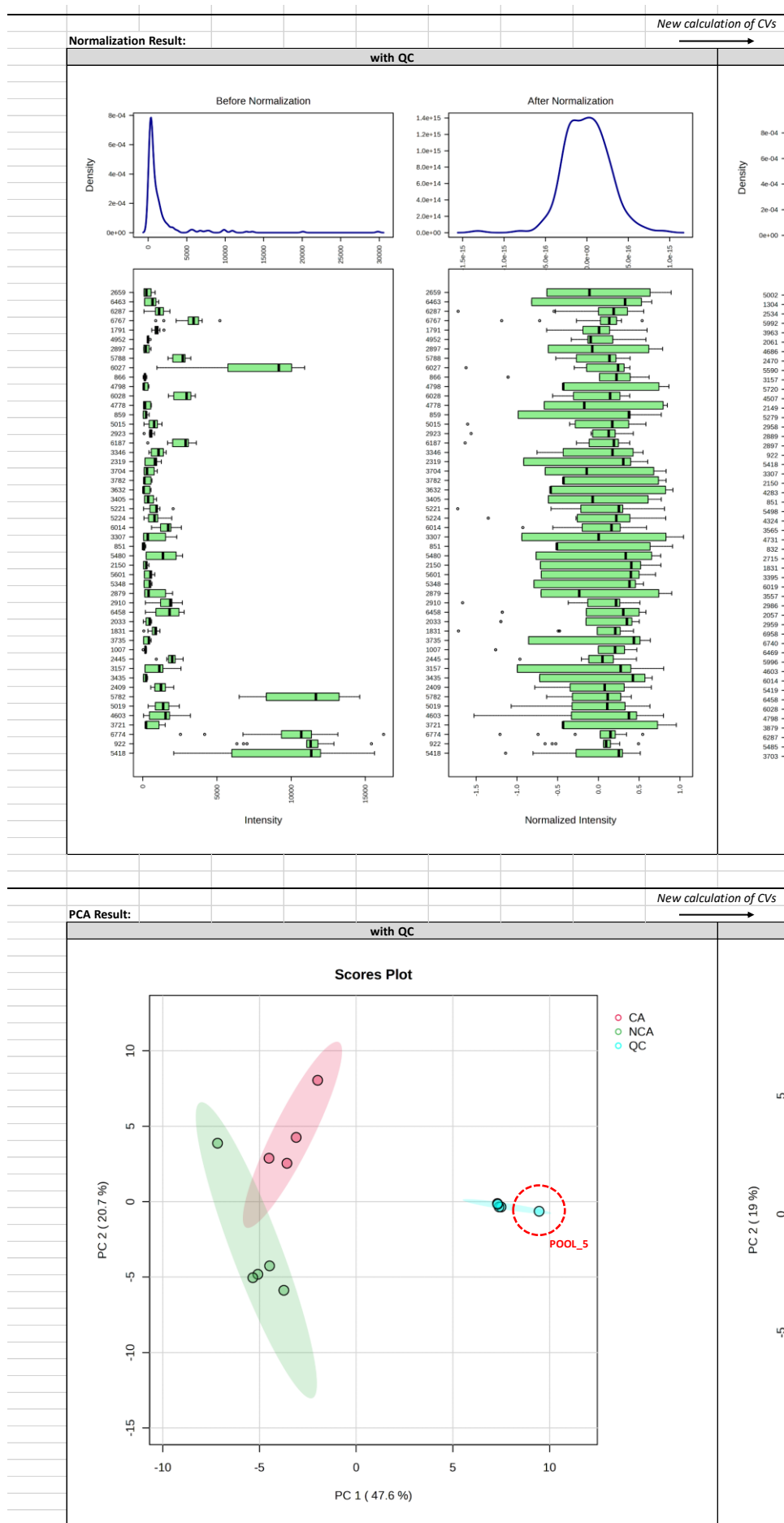


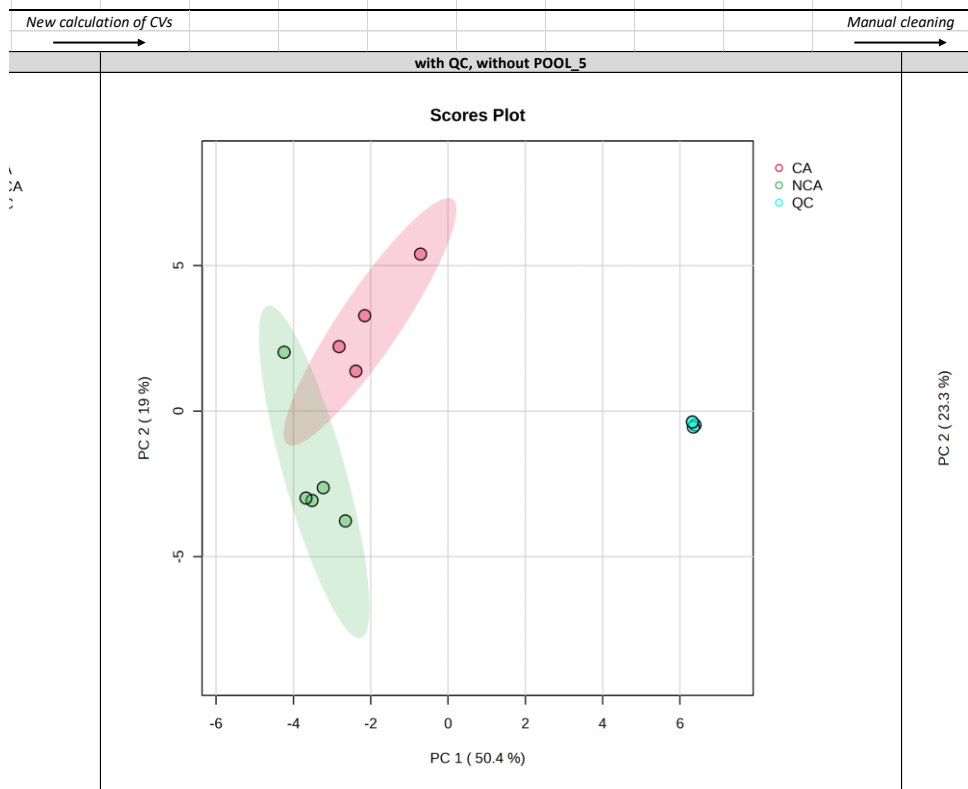
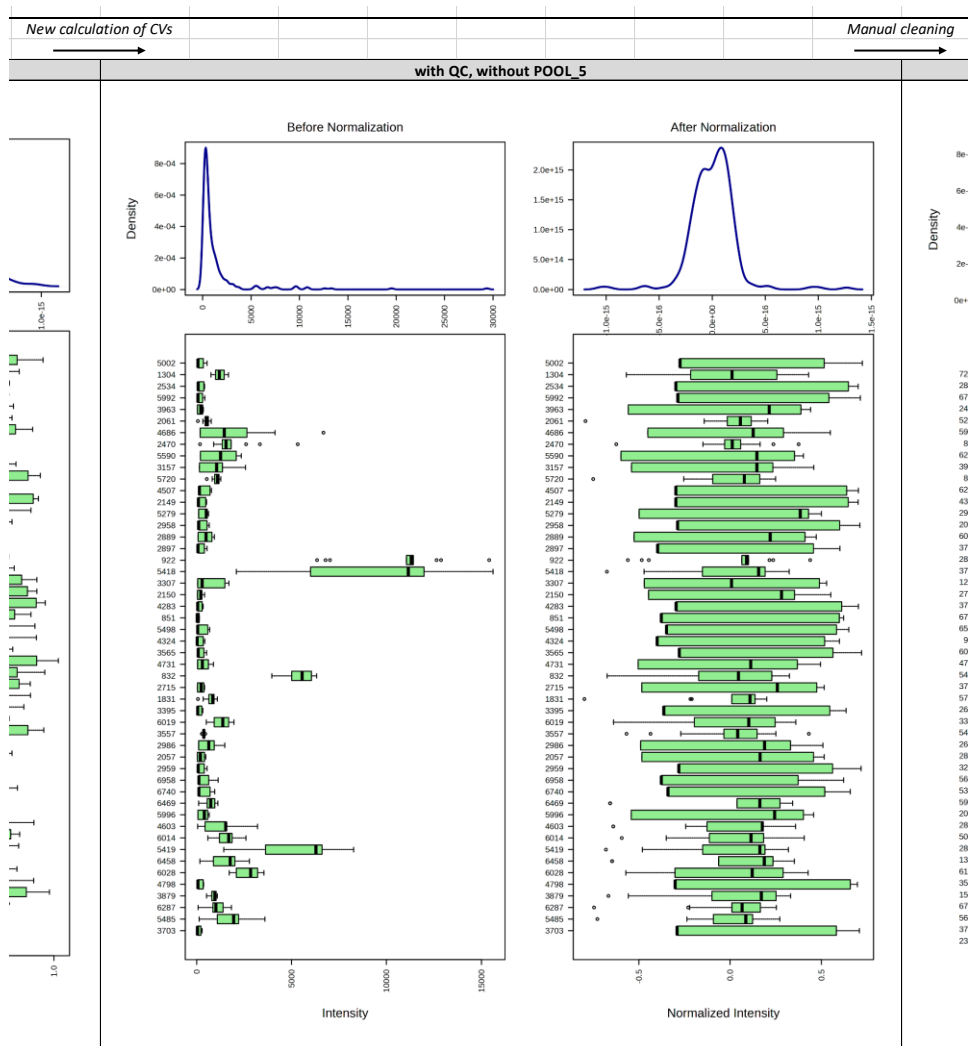
[illegible]

Annexe 8 : Analyses statistiques multivariées et les différentes filtrations réalisées sur les données métabolomiques.



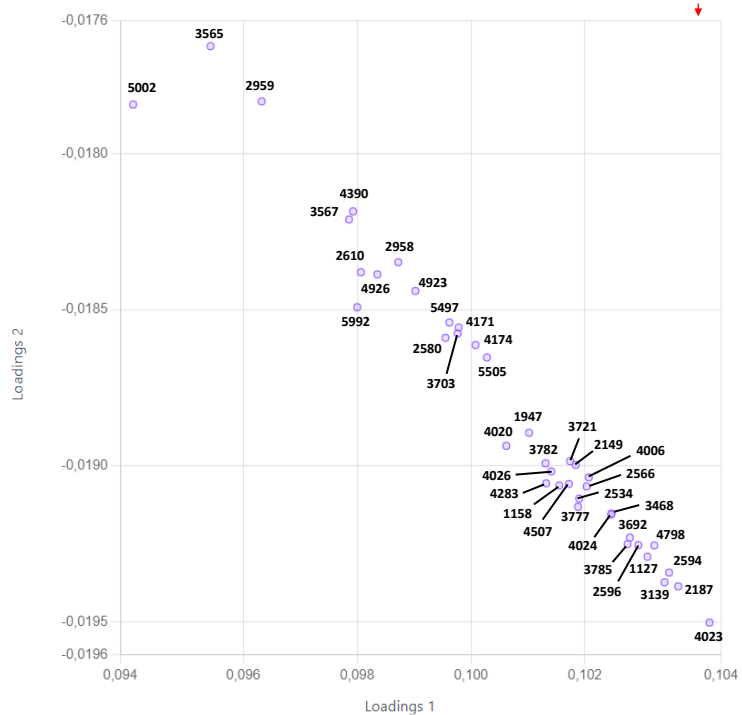
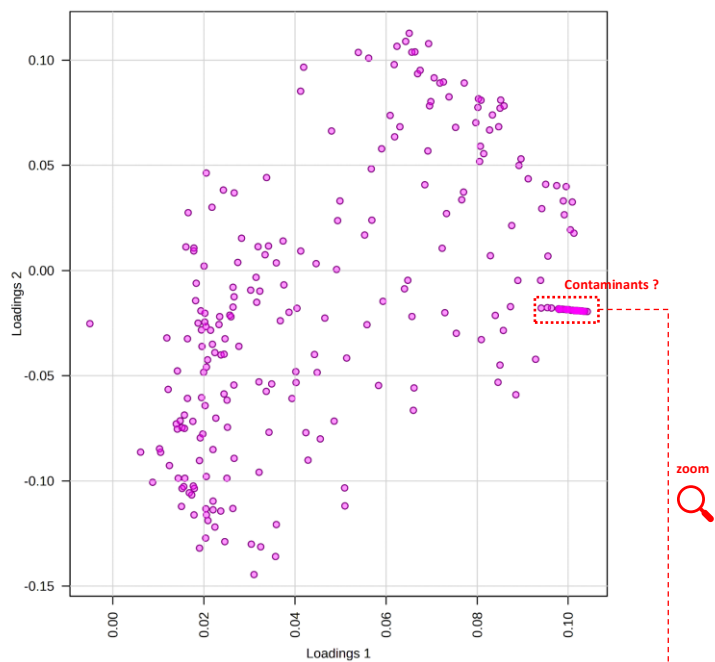


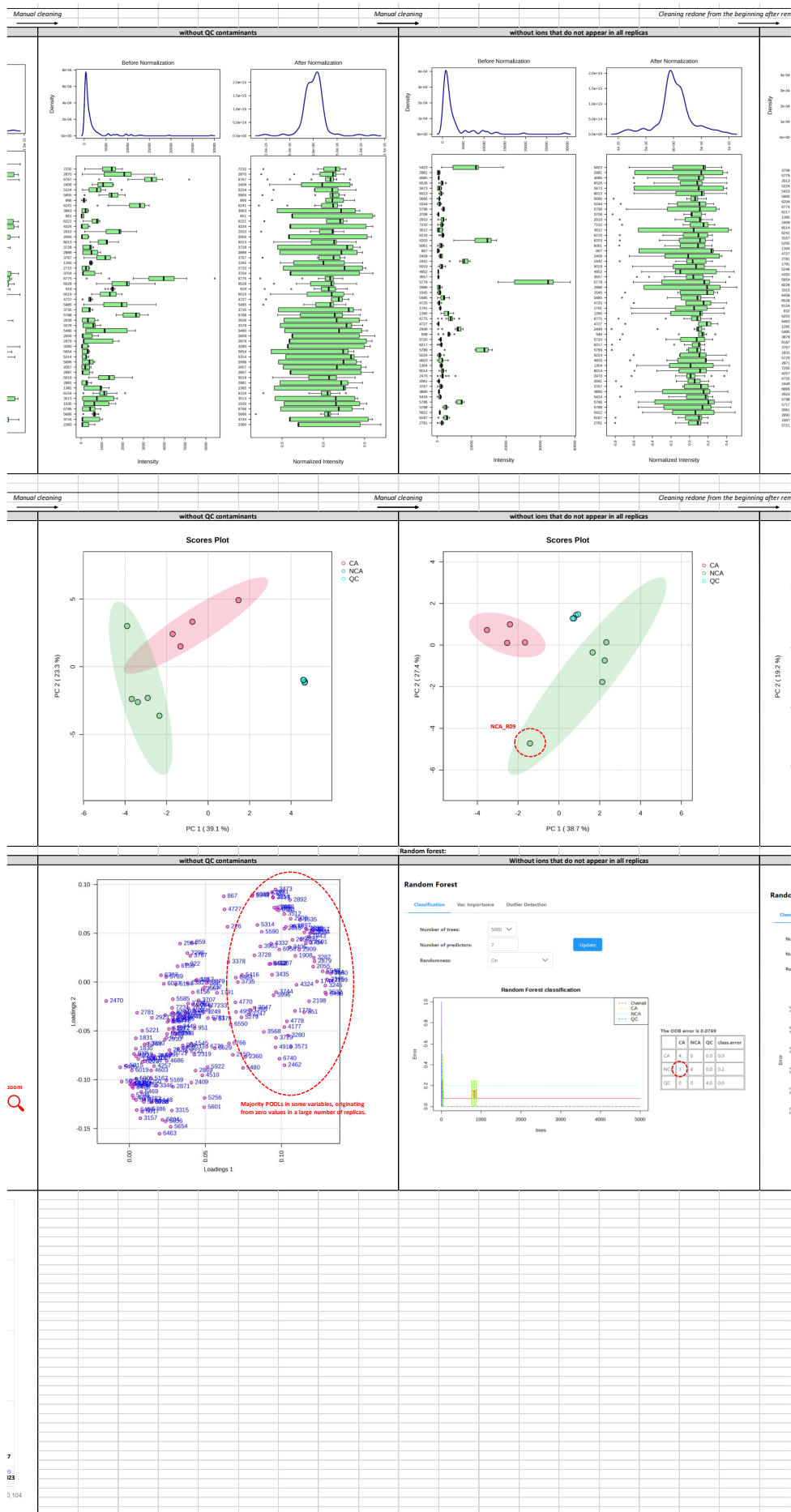




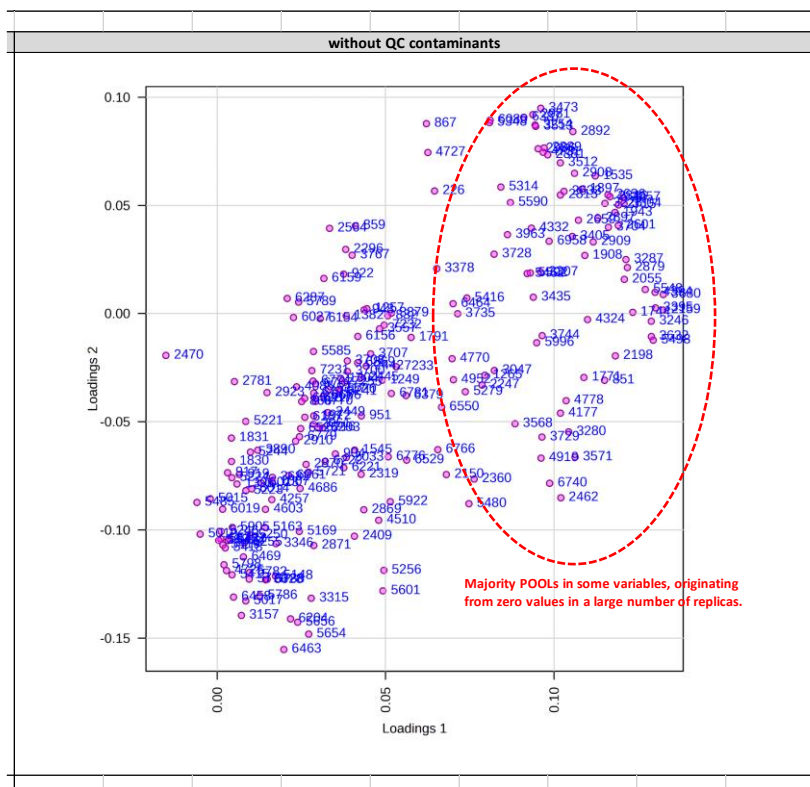
Loading plot:

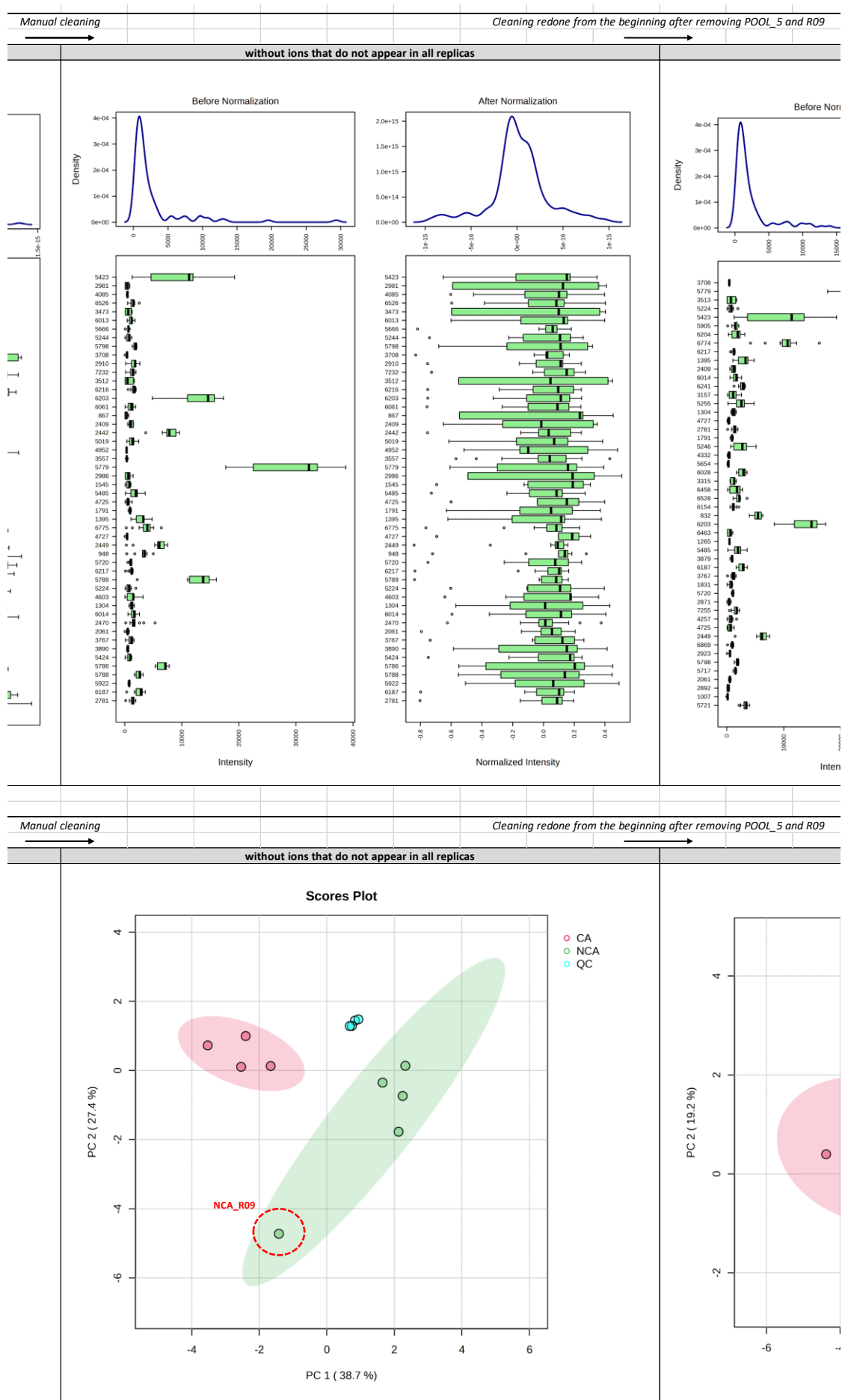
with QC, without POOL_5

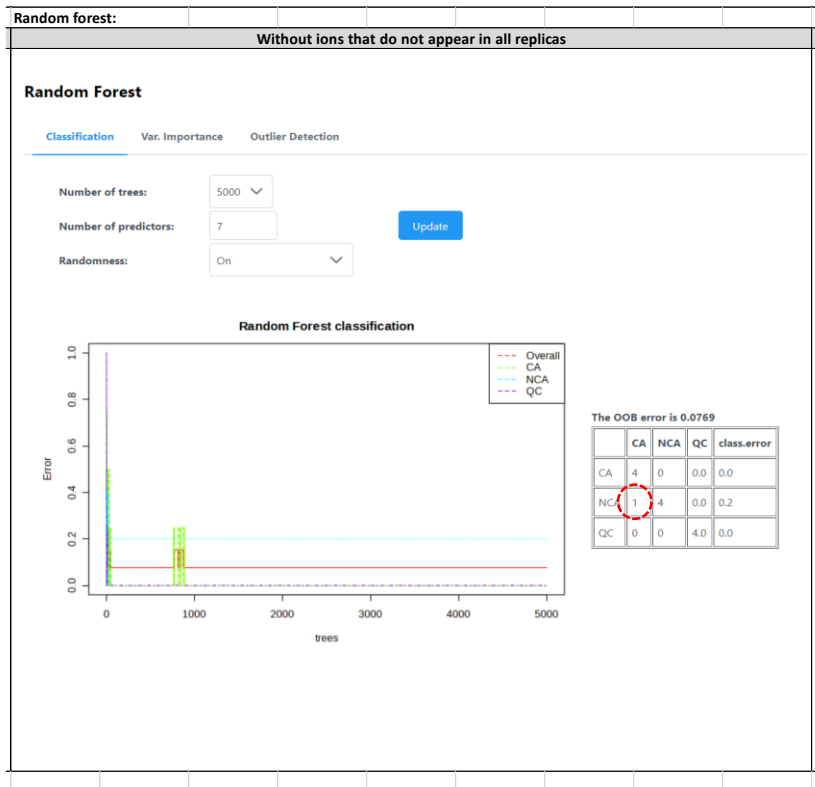


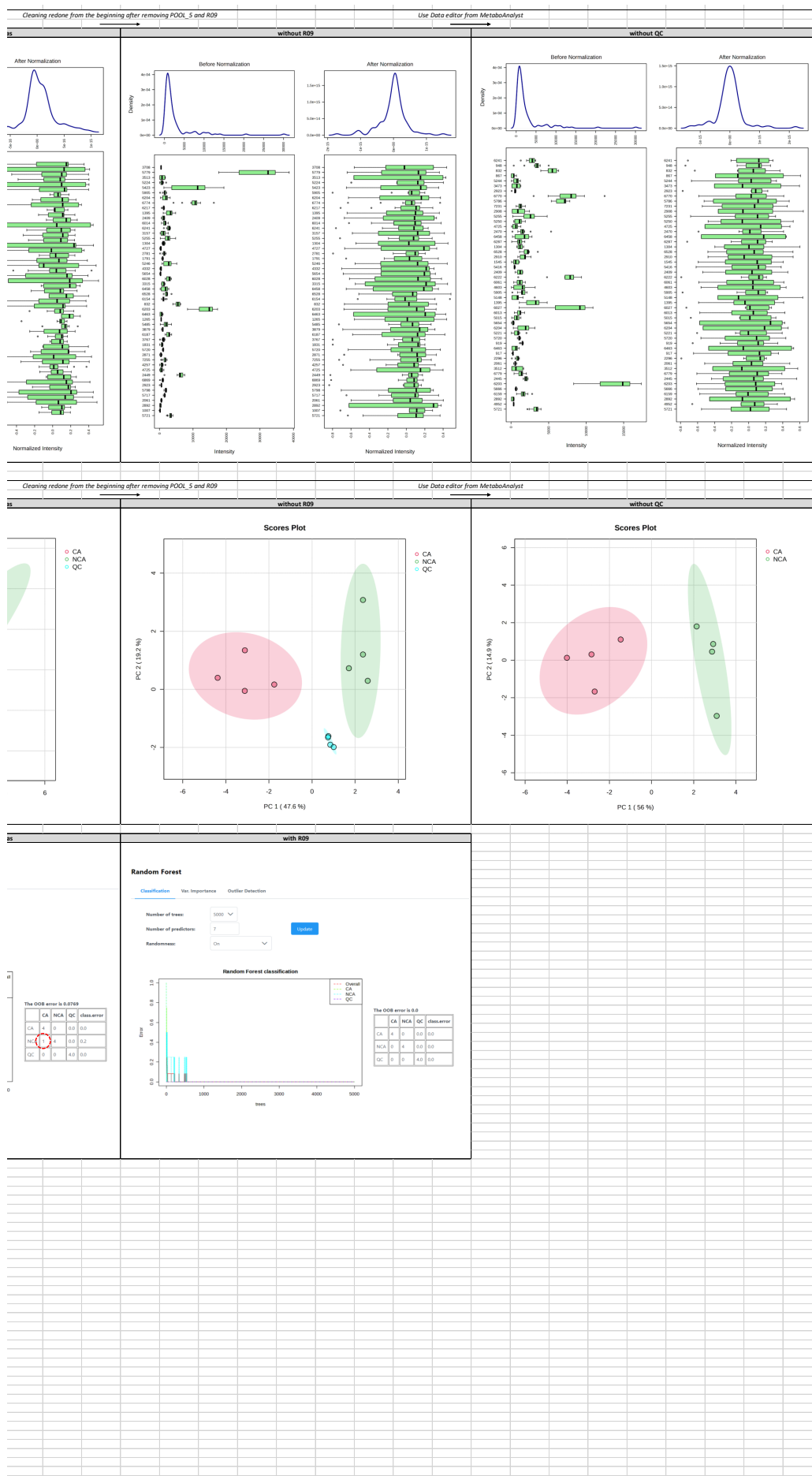






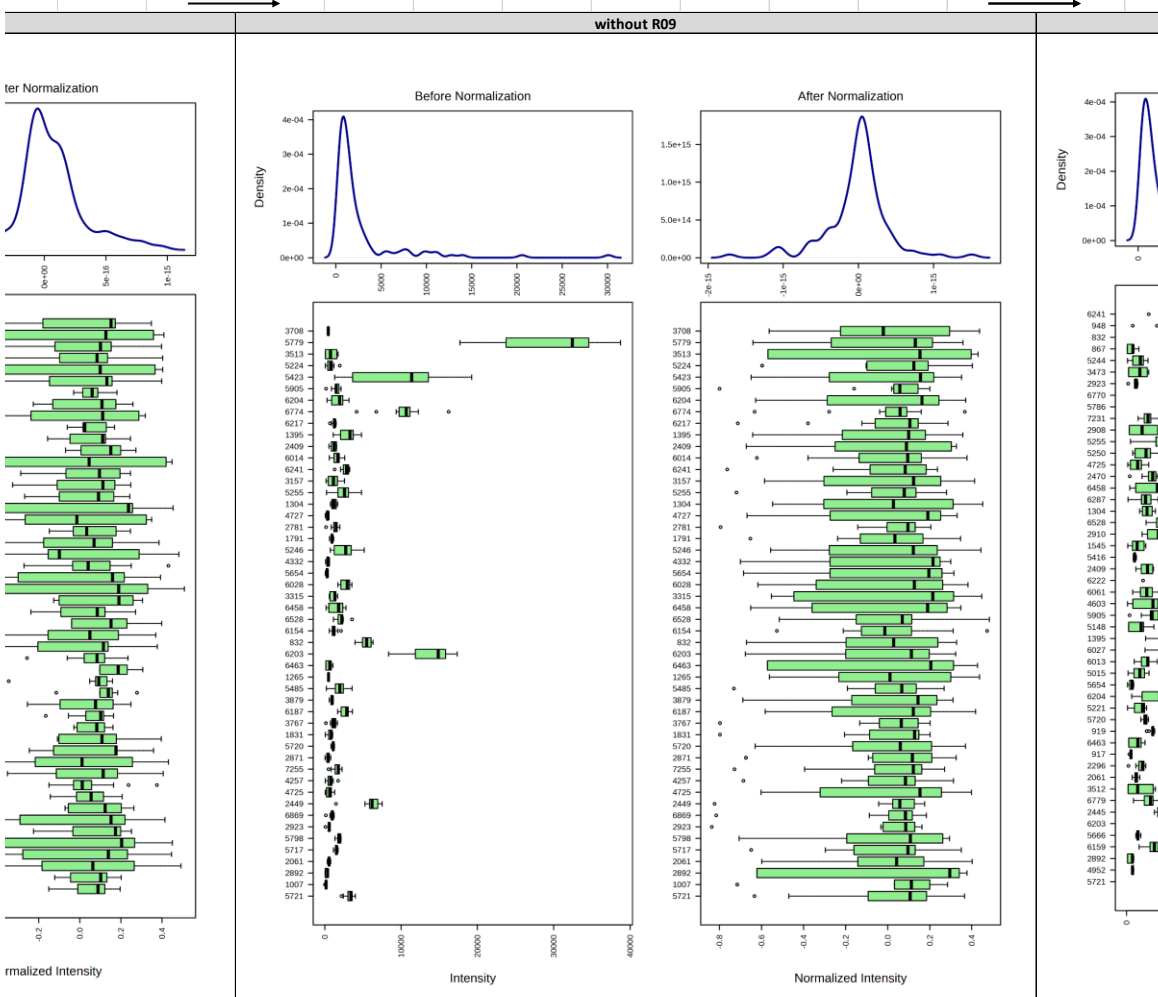






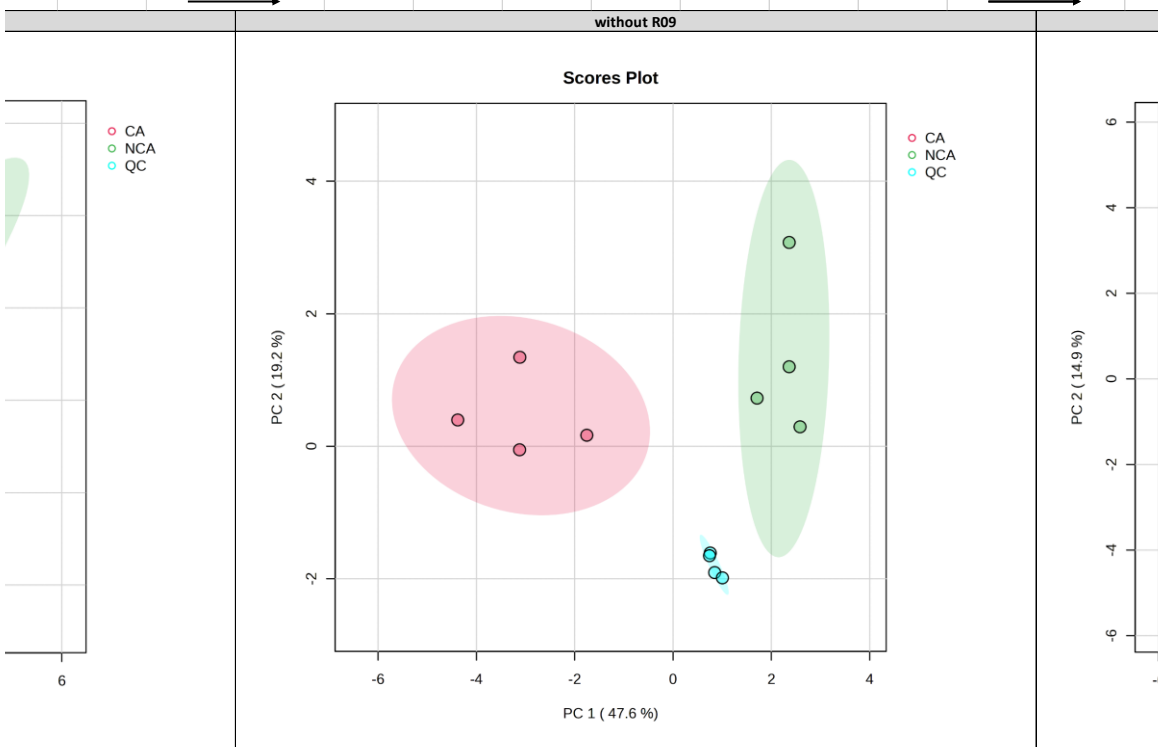
Cleaning redone from the beginning after removing POOL_5 and R09

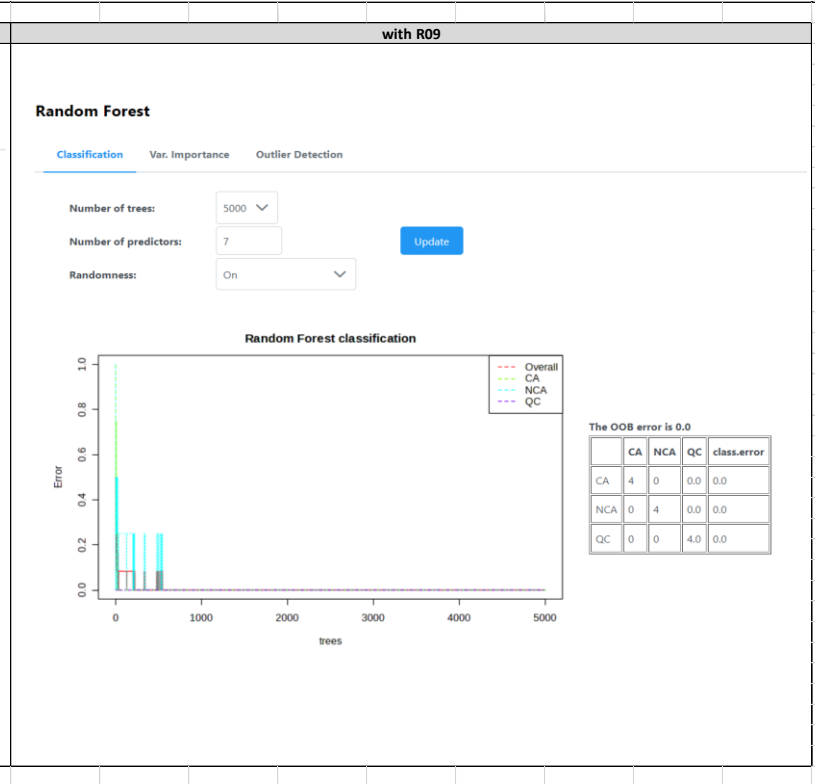
Use Data editor from MetaboAnalyst

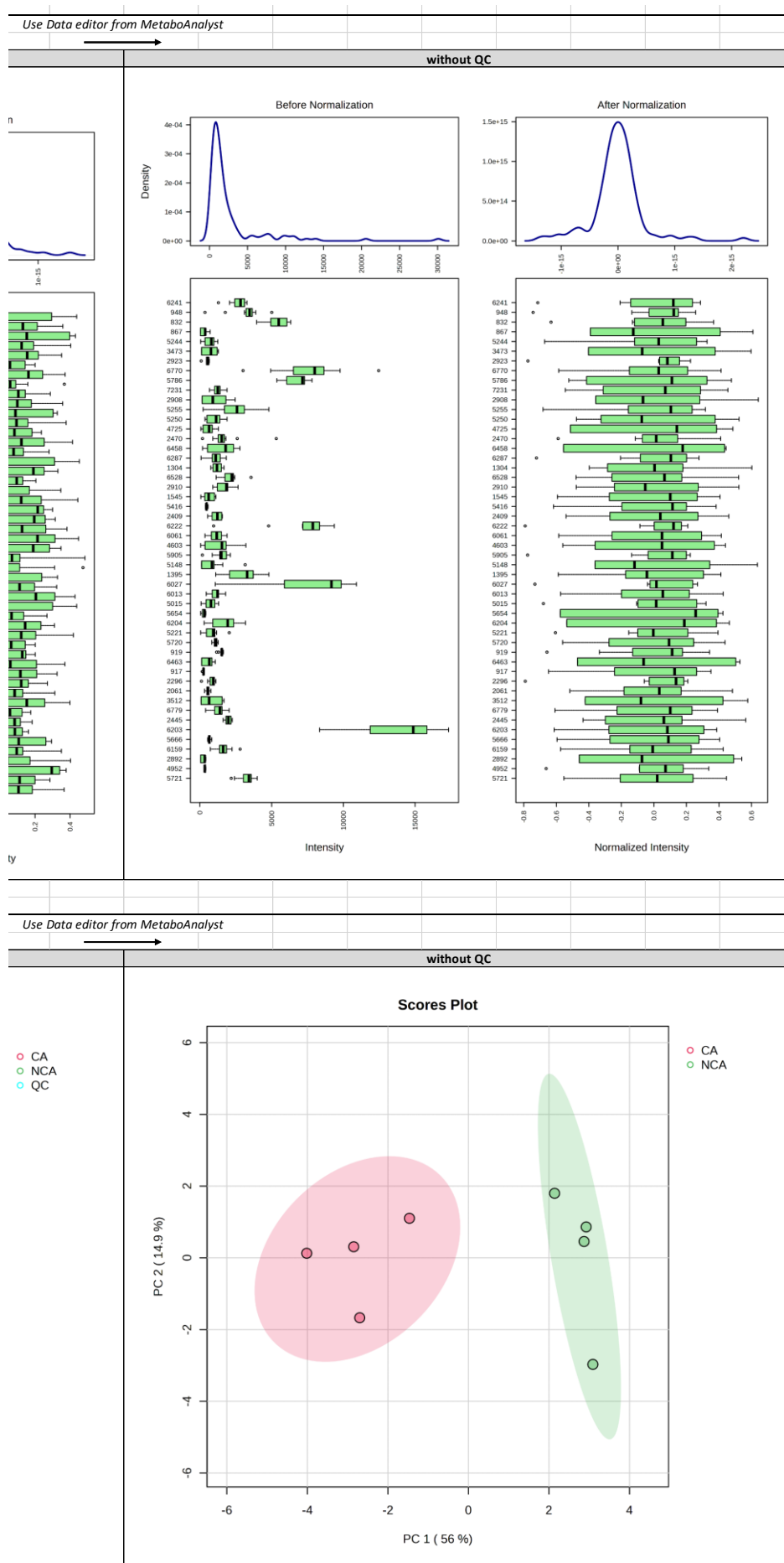


Cleaning redone from the beginning after removing POOL_5 and R09

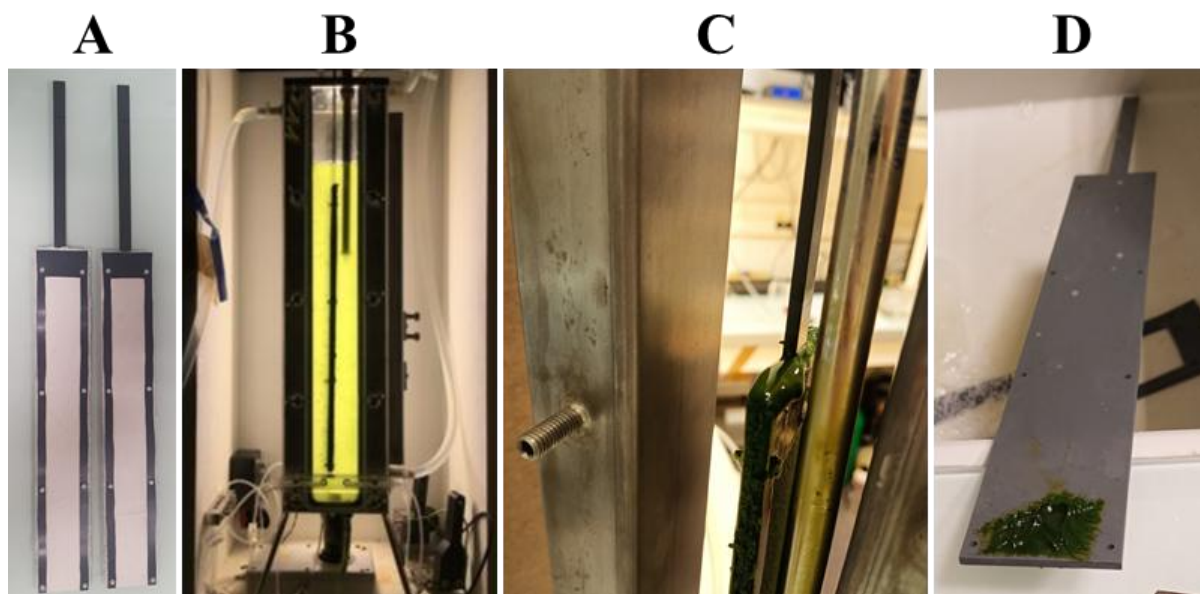
Use Data editor from MetaboAnalyst







Annexe 9 : Photographies du premier système de culture de biofilm de *Tetraselmis suecica* imagé et utilisé dans un photobioréacteur vertical (PBRv). (A) Support fabriqué sur mesure qui comporte un tissu utilisé comme surface pour l'adhérence de *T. suecica*. (B) Culture de *T. suecica* dans le PBRv, le support de l'image (A) se trouve au centre de la culture. (C) et (D) Biofilms de *T. suecica* obtenus à différents endroits du support immergé.



Annexe 10 : Article soumis à *Journal of Chemical Ecology* (Springer) basé sur les données du chapitre I (« Influences de la source et de la concentration d'azote sur la production de composés toxiques et allélopathiques chez les microalgues et les cyanobactéries : une revue de synthèse »). Le texte ci-dessous ne constitue pas la version finale.

Title: Effects of nitrogen source and concentration on the production of toxic and allelopathic compounds in microalgae and cyanobacteria: a synthetic review

Authors: Julien Lopez¹, Eva Ternon¹, Antoine Sciandra¹

¹ Sorbonne Université, CNRS, Laboratoire d'Océanographie de Villefranche, LOV, F-06230 Villefranche-sur-Mer, France

Introduction

Phytoplankton refers to all aquatic microorganisms capable of photosynthesis. It is a highly diverse polyphyletic group, consisting mainly of microalgae and cyanobacteria (also known as 'blue-green algae') (Salmaso et al. 2015). These microorganisms are ubiquitous in both freshwater and marine environments, colonizing a variety of ecological niches (Singh and Saxena 2015). Their wide distribution is due to their great capacity for physiological adaptation (oxygenic or non-oxygenic photosynthesis, a wide variety of pigments, mixotrophy or heterotrophy, diazotrophy, gas vesicles, etc.), morphology (unicellular or colonial, mucilaginous, filamentous, various forms of protection, etc.) and production of bioactive metabolites (Friedl et al. 2012; Nandagopal et al. 2021). This diversity makes microalgae and cyanobacteria important organisms for ecosystem studies and biotechnology research (Saide et al. 2021; Nandagopal et al. 2021).

Microalgae and cyanobacteria are capable of producing toxic compounds called phycotoxins and cyanotoxins, respectively, which vary widely in molecular weight and structure (Solter and Beasley 2013; Cusick and Sayler 2013). These toxins can be classified according to their properties. For example, cyanotoxins include: (i) hepatotoxins such as microcystins, which cause liver lesions, nodularins and cylindrospermopsin, (ii) neurotoxins such as anatoxin-a and saxitoxin and its analogues, which alter neuromuscular transmission, and (iii) dermatotoxins (for further details see reviews by Kaebernick and Neilan 2001; Merel et al. 2013). Their biosynthesis depends on several environmental factors such as light (Chia et al. 2017), temperature (Kilcoyne et al. 2019), salinity (Lim and Ogata 2005), the presence of competitors (Chia et al. 2018) or predators (Brown et al. 2022). Phycotoxins and cyanotoxins may be nitrogen-rich. According to the theory of cellular stoichiometry, which states that metabolic production depends on nutrient availability, the biosynthesis of toxins depends on their nitrogen (N) atom content and on the source and concentration of N in the environment (Merel et al. 2013; Van de Waal et al. 2014, 2015).

Under the right conditions, these microorganisms can proliferate and produce harmful algal blooms (HABs) (Wells et al. 2020). These proliferations are known to depend on several parameters such as temperature, light exposure, and trophic status of the environment (Merel et al. 2013), although studies on the effect of nutrient ratios on their formation are lacking (Davidson et al. 2012). The industrial revolution, along with the increased use of synthetic fertilizers and the intensification of agriculture and livestock production that accompanied the green

revolution worldwide, contributed to a dramatic increase in anthropogenic discharges to aquatic environments, enriching coastal zones and rivers with chemical compounds, especially N. These nutrient inputs have increased the frequency, spatial extent and duration of toxic species blooms, with both environmental and economic consequences (Howarth 2008). For example, new technologies to address the increase in HABs require financial investments that are too high for the small shellfish farms that exist on the French Atlantic coast, destabilizing the local economy (Pérez Agúndez et al. 2013). Anthropogenic eutrophication and climate change are also major causes of the proliferation of HABs (Paerl and Paul 2012; Merel et al. 2013).

Several reviews have been devoted to the proliferation of toxin-producing phytoplankton species, describing their mode (Paerl and Paul 2012; Davidson et al. 2012), prevention and management (Merel et al. 2013; Coyne et al. 2022). Others focus on toxin applications in biotechnology and pharmacology (Assunção et al. 2017; Botelho et al. 2022), sequencing mechanisms¹, the ecological role of toxins (Kaebernick and Neilan 2001) or the influence of the environment on their biosynthesis (Neilan et al. 2013). The meta-analysis by Brandenburg et al. (2020) shows that toxin production varies greatly with nutrient limitation, with a slight upward trend in N-rich toxins under P limitation and a downward trend under N limitation. Cell stoichiometry also appears to influence the biosynthesis of phycotoxins and cyanotoxins. Moreover, allelopathic compounds other than known toxins also seem to be affected by nutrient availability, something that is currently little considered in HABs (Granéli et al. 2008).

Here we review the literature on the effects of N source and concentration on the biosynthesis of phytoplankton bioactive compounds, whether toxic and/or allelopathic. The different toxins have been categorized according to their N-richness, where the number of N atoms $n > 1$, low-N ($n = 1$) and non-N ($n = 0$) – and then successively described with the species that produce them. In the final part of this review, the effects of N on the production of allelopathic compounds other than known phycotoxins are discussed. Finally, the effect of N on the biosynthesis of these compounds is discussed and research perspectives in this area are proposed.

Nitrogen toxins

Cylindrospermopsin and the cyanobacteria *Raphidiopsis* and *Aphanizomenon*

Cylindrospermopsin (CYN, $C_{15}H_{21}N_5O_7S$) (**Fig. 1**) is a cytotoxic, neurotoxic, dermatotoxic and hepatotoxic compound discovered in 1979 on Palm Island (Queensland, Australia) during a major human poisoning incident (for more details see reviews Griffiths and Saker 2003; Kinnear 2010; de la Cruz et al. 2013). It is a persistent compound in water due to its slow degradation rate, which increases the risks associated with its dispersion. In addition, its release to water appears to be mainly associated with cell lysis rather than excretion, resulting in high

¹ I use the term "sequential" here after having read the book *Théorie inclusive de l'Évolution* (Danchin 2022), in which E. Danchin writes that the word "gene" (and, by extension, the word "genetics") has two different meanings: a) that used by C. Darwin before the discovery of the DNA molecule (paradigm of the theory of natural selection), where the term refers to any criterion that is transmitted phenotypically to the offspring, without necessarily being linked to DNA.

b) that of current research after the discovery of DNA and the linking of natural selection and Mendel's laws (paradigm of the synthetic/modern theory of evolution), where the term strictly assimilates genes to DNA sequences.

toxicity at the end of the bloom (Wiedner et al. 2008). This toxin is mainly found in cyanobacteria of the genera *Raphidiopsis*, *Aphanizomenon*, *Anabaena*, *Umezakia* and *Lyngbya* (Kinnear 2010). CYN has a high potential for allelopathic properties. Indeed, it can affect the cell density, chlorophyll content, oxidative stress and antioxidant response of certain phytoplankton species, such as the cyanobacterium *Microcystis aeruginosa* and the diatom *Acutodesmus acuminatus* (Chia et al. 2017). The presence of CYN in large quantities can promote the production of microcystin toxins in *M. aeruginosa*, a response that suggests a competitive interactive role between toxic cyanobacteria in the natural environment and that appears to be co-influenced by other cyanobacteria (Chia et al. 2017).

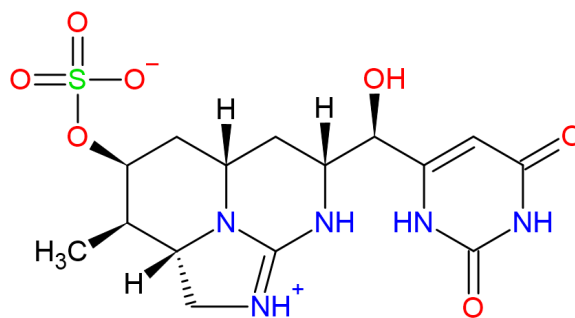


Fig. 1: Molecular structure of cylindrospermopsin (CYN).

Sometimes associated with the genus *Anabaena* (see review Padisák 1997) and recently classified with *Cylindrospermopsis* (Aguilera et al. 2018), *Raphidiopsis* is a genus of cyanobacteria that is probably tropical in origin and characterized by a high dispersal capacity, the main representative of which is *R. raciborskii*. This species is capable of producing either the cytotoxic CYN and its analogues or the neurotoxic saxitoxin and its analogues (see review by Antunes et al. 2015). In *Raphidiopsis*, CYN is associated with the *cyr* gene cluster (Mihali et al. 2008), while STX is associated with the *stx* gene cluster (Vico et al. 2016). The role of CYN is still poorly understood in *Raphidiopsis*, although some authors believe that it has an anti-grazing function (Antunes et al. 2015). As for STX, it is thought to help maintain homeostasis during salinity changes (Pomati et al. 2004; Antunes et al. 2015; Vico et al. 2016; Brentano et al. 2016), but does not play a role in interactions with other photosynthetic microorganisms (Vargas et al. 2020). Furthermore, the release of CYN into the environment appears to be the result of cell lysis rather than an excretion process (Davis et al. 2014), although there are variations in the ratio between extra- and intracellular CYN under different nutrient conditions during the exponential growth phase (Yang et al. 2018).

R. raciborskii is considered a generalist species due to its ability to diazotrophy, i.e. fix gaseous N (N_2), although this appears to be a means of maintaining low growth in N-limited conditions rather than a competitive advantage (Burford et al. 2006; Willis et al. 2016; Vico et al. 2016). Originally, the genus *Raphidiopsis* was differentiated from the genus *Cylindrospermopsis* due to its diazotrophy (Aguilera et al. 2018). N is the element that primarily determines its dynamics, with blooms favored during periods of low concentrations of this element and relatively independent of P, unlike other cyanobacteria (Figueredo et al. 2014). Nevertheless, Willis et al. (2015) observed that *R. raciborskii* growth rates increased with N addition and decreased with phosphate (PO_4^{3-}) addition, regardless of ecotype. *R. raciborskii* preferentially assimilates ammonium (NH_4^+) over nitrate (NO_3^-) (Ammar et al. 2014; Burford et al. 2014), while urea is not assimilable (Saker et al. 1999; Burford et al. 2006). In

addition, diazotrophy is partially inhibited in the presence of NO_3^- and completely inhibited in the presence of high NH_4^+ concentrations (Kenesi et al. 2009). The number of heterocysts is regulated by dissolved N concentration (Willis et al. 2016). The high affinity of *R. raciborskii* for NH_4^+ may give it a competitive advantage over other competitors, such as the cyanobacterium *Planktothrix agardhii*, regardless of any toxic and/or allelopathic properties (Ammar et al. 2014). However, studies have shown a negative correlation between high *R. raciborskii* biomass and NO_3^- availability (Mohamed and Al-Shehri 2013; Karadžić et al. 2013), as well as a dominance of toxic strains of *R. raciborskii* over non-toxic strains as a function of P rather than N concentration, intracellular CYN concentration, and the proportion of the *cyrA* augmenting gene with PO_4^{3-} addition, irrespective of NO_3^- supply (Burford et al. 2014).

Studies on the effect of N on the production of CYN and its homologues (e.g. deoxyCYN) have provided conflicting results. Some studies suggest that N source and concentration only partially influence CYN biosynthesis, which may be completely independent of growth rate (Saker et al. 1999; Saker and Neilan 2001; Mohamed and Al-Shehri 2013; Burford et al. 2014; Yang et al. 2018), while others suggest that CYN production is necessarily associated with N assimilation and microalgal growth (Davis et al. 2014; Stucken et al. 2014; Pierangelini et al. 2015; Willis et al. 2015). In the former case, early studies showed that seven *R. raciborskii* strains had a stronger affinity for NH_4^+ than for NO_3^- , and that toxic strains had higher CYN cell contents under N limitation and diazotrophy, except for one strain (CR3) (Saker et al. 1999; Saker and Neilan 2001). A recent study showed that N fluctuations do not alter the fitness and growth rates of *R. raciborskii* CHAB 3438, but may interfere with CYN biosynthesis and alter the ratio of intracellular to extracellular CYN (Yang et al. 2018). According to proponents of the second hypothesis, N deprivation or ammonia (NH_3) cytotoxicity indirectly negatively affects CYN biosynthesis, as there is no evidence to date that varying N conditions induce transcriptional regulation of toxin production (Stucken et al. 2014). The only study investigating the effect of NO_3^- on toxin gene transcription that did not show a relationship between toxin biosynthesis and N availability concerned the *sxtU* and *sxtI* genes involved in STX biosynthesis (Vico et al. 2016). The hypothesis proposed by Mihali et al. (2008) is that the increase in CYN production in the absence of NO_3^- or NH_4^+ is due to an indirect regulation of the *cyn* gene cluster by N. In *Nostoc* sp. PCC73102, another cyanobacterium, these genes are regulated by the universal N regulator NtcA. Thus, through a cascade effect, the *cyn* genes may be regulated by N via the *hyp* genes (Mihali et al. 2008).

The genus *Aphanizomenon* is a group of cyanobacteria that also includes species that produce CYN and analogues, in particular deoxyCYN and/or anatoxin-a, the most important representative of which is *A. ovalisporum* (Rapala et al. 1993; Banker et al. 1997). In contrast to the *cyr* gene cluster identified in *R. raciborskii*, CYN biosynthesis in *A. raciborskii*, CYN biosynthesis in *A. ovalisporum* involves the *aoa* gene cluster, consisting of an amidinotransferase (*aoaA*) and a polyketide synthase (*aoaC*), whose expression is affected by N availability and light intensity (Shalev-Alon et al. 2002; Shalev-Malul et al. 2008). Although few studies have focused on *Aphanizomenon*, the dynamics of CYN production appear to be similar to those of its cyanobacterial counterpart. Indeed, in different strains of *Aphanizomenon* sp. N-rich and P-limited conditions favor the biosynthesis and active release of CYN into the medium, as well as an increase in the fraction of extracellular deoxyCYN (Preußel et al. 2014). Under N limitation, extracellular release is lower and intracellular accumulation occurs (Preußel et al. 2014).

It should be noted, however, that these discrepancies may be due to differences in the methods used to analyze intracellular and extracellular CYN and its analogues and calculate their concentrations (Pierangelini et al. 2015). For example, to estimate CYN production, Pierangelini et al. (2015) recommend using the intracellular volumetric concentration rather than the intracellular amount per unit of freeze-dried dry weight (see, e.g., Saker and Neilan (2001)). The diversity of responses observed in *R. raciborskii*, ranging from no response to high toxicity, makes it impossible to infer a typical response profile. Further research is needed.

Paralytic toxins, the dinoflagellates *Alexandrium*, *Gymnodinium* and the cyanobacterium *Raphidiopsis*

Paralytic shellfish poisoning is a disease caused by consumption of seafood contaminated with a group of N-rich neurotoxins known as paralytic shellfish toxins (PSTs), the most important of which is saxitoxin (STX, C₁₀H₁₇N₇O₄) (**Fig. 2**) (Etheridge 2010). PSTs have an inhibitory effect on voltage-gated sodium channels, which are transmembrane proteins responsible for the initiation and propagation of action potentials in humans (for more information, see reviews by Cestèle and Catterall 2000; Stevens et al. 2011; Thottumkara et al. 2014). Historically, the first PST discovered was STX, which was identified by H. Sommer in 1937 following a large mussel stocking off the California coast during a bloom of the dinoflagellate *Alexandrium catenella* (formerly *Gonyaulax catenella*) (see review by Thottumkara et al. 2014). PSTs are known to be produced by dinoflagellates of the genera *Alexandrium*, *Gymnodinium*, and *Pyrodinium*, as well as cyanobacteria of the genera *Raphidiopsis*, *Cylindrospermopsis*, *Aphanizomenon*, and *Anabaena* (Orr et al. 2013). However, studies investigating the effects of N on its production by these microorganisms have mainly focused on *Alexandrium*, *Gymnodinium*, *Raphidiopsis* and *Lyngbya*.

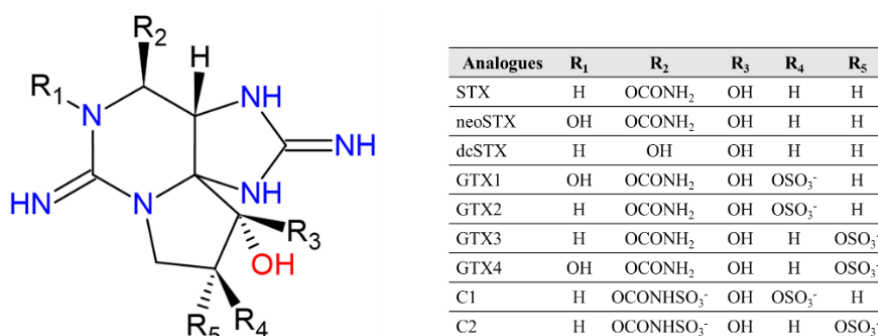


Fig. 2: Molecular structure of PSTs.

PST production is linked to both transcriptional processes *via* the *stx* gene cluster and post-transcriptional processes (Boyer et al. 1986; Geffroy et al. 2021). The *stx* genes, which are mainly involved in STX synthesis, may also be involved in other biosynthetic pathways and vary depending on the producing organism. Their acquisition (by possible horizontal transfer) by both cyanobacteria and dinoflagellates is still controversial (see review by Akbar et al. 2020 and related articles). For example, the origin of PSTs in dinoflagellates gives rise to three hypotheses: (i) the presence of intracellular STX-producing bacteria, (ii) convergent evolution between cyanobacteria and dinoflagellates, or (iii) horizontal gene transfer from cyanobacteria. Although bacteria appear to play an important role in modulating STX biosynthesis in dinoflagellates, sequence coding makes the first hypothesis unlikely, while convergent evolution is controversial. Horizontal gene transfer now seems to be the most likely pathway (see review by Orr et al. 2013). Recently, metabolomic analysis of PSTs in *A. catenella* using

¹⁵N labeling revealed the presence of STX-like intermediates between different producer organisms, suggesting similar production dynamics under the same environmental conditions (Cho et al. 2019).

The genus *Alexandrium*, formerly classified as *Protogonyaulax*, is a group of ubiquitous toxic dinoflagellates, several species of which are known to produce PSTs, either STX or its analogues such as gonyautoxins (GTXs) (Boyer et al. 1986; Wyatt and Jenkinson 1997; Anderson et al. 2012; Long et al. 2021). However, not all species or strains are toxic (Orr et al. 2011). Several hypotheses have been proposed for the role(s) of PSTs in toxic *Alexandrium* strains. For example, they could act as a repellent against copepod grazing, redirecting their grazing pressure to non-toxic or less toxic species, which would have the side effect of reducing competition for nutrient resources, especially when they are limited, a particularly beneficial advantage for *Alexandrium* whose nutrient assimilation capacities are relatively low (Guisande et al. 2002; Frangópulos et al. 2004; Selander et al. 2008; Murata et al. 2012; Griffin et al. 2019; Brown et al. 2022; Christou et al. 2023). They could also be pheromones that promote gamete-gamete encounters and regulate cyst formation (Wyatt and Jenkinson 1997), a cellular N reserve (Hall 1982), or an environmental detoxifier of NH₄⁺-rich environments (Hii et al. 2016). However, their origin and exact role(s) remain poorly understood, as they may interfere with other known or unknown bioactive compounds in this genus (see review by Long et al. 2021). For example, the hypothesis of exaptation (Gould and Vrba 1982) from an unknown initial function to a new one should not be ruled out.

The expression dynamics of the *stx* gene in *Alexandrium* is cell cycle dependent (Siu et al. 1997). It also depends on N concentration, as N metabolism regulates the biosynthesis of STX and its analogues through multiple feedback loops (Zhuang et al. 2015; Saldivia et al. 2023; Abassi et al. 2023), suggesting a fine-tuned regulation of PSTs production according to nutrient conditions. In addition, the different *Alexandrium* species are versatile towards different N sources (NO₃⁻, NO₂⁻, NH₄⁺, urea, cyanate), a property that probably gives them a competitive advantage over other dinoflagellates for the initiation of HABs and their development (Leong et al. 2004; Zhuang et al. 2015). *In situ*, the frequency of *Alexandrium* HABs and cellular toxin levels appear to be related to the cellular content and availability of nutrients, especially NH₄⁺ (Penna et al. 2002; Poulton et al. 2005; Hattenrath et al. 2010), consistent with *Alexandrium*'s preference for this N source (Chee Yew Leong and Taguchi 2004). Its ability to migrate also allows it to consume NO₃⁻ at depth, thereby prolonging episodes of HAB (MacIntyre et al. 1997). Anthropogenic activities that lead to eutrophication thus favor toxic *Alexandrium* blooms. For example, *A. taylori* HABs in the Mediterranean Sea may be caused by mass tourism (Penna et al. 2002), while toxic *A. fundyense* blooms in Northport-Huntington Bay (New York, USA) benefit from the proximity of wastewater treatment plants (Hattenrath et al. 2010). In addition, Zhuang et al. (2015) used a metatranscriptomics analysis to show that genes associated with N sequestration and STX production are more highly expressed during *A. fundyense* blooms, which is consistent with previous observations. PST production can also be affected by other environmental variables such as salinity or light (Parkhill and Cembella 1999; Hamasaki et al. 2001; Wang and Hsieh 2005).

PST biosynthesis in *Alexandrium* occurs mainly during the exponential growth phase (Flynn et al. 1994; Xu et al. 2012), when N is abundant, and N limitation does not allow PST production or *Alexandrium* growth (Boyer et al. 1987; Anderson et al. 1990a; MacIntyre et al. 1997; Siu et al. 1997; John and Flynn 2000; Wang and Hsieh 2002; Touzet et al. 2007; Selander et al. 2008; Yang et al. 2011; Lee et al. 2012; Jiang et al. 2015). However, other studies find a lack of relationship between PST biosynthesis and N concentration in these two species (NO₃⁻

for *A. tamarensis* Pr18b (Parkhill and Cembella 1999), urea and NH_4^+ for *A. catenella* BF-5 (Griffin et al. 2019). Flynn et al. (1996) and Hu et al. (2006) report that N supplementation after deficiency induces a strong, albeit transient, increase in PSTs. As for *Gymnodinium catenatum*, another cosmopolitan dinoflagellate discovered in the Gulf of California in 1943 and the only member of the Gymnodiales capable of producing PSTs and HABs (Graham 1943; Oshima et al. 1987, 1993; Band-Schmidt et al. 2010), it excretes its toxins mainly during the latent phase in NO_3^- enriched cultures and during the exponential growth phase in NH_4^+ enriched cultures, although in general it seems to be less influenced by the nutrient regime than *Alexandrium* (Lin et al. 2022).

The effects of N on STX biosynthesis have been little studied in the cyanobacterium *Raphidiopsis*, in contrast to its effects on CYN biosynthesis. (Vargas et al. 2020) suggest that oligotrophic environments favor STX production by *R. raciborskii* ITUC01, while Casali et al. (2017) find positive relationships between total STX concentration, cell concentration, and dissolved nutrient concentration. Yunes et al. (2009) find a positive relationship between NO_3^- concentration and STX production in *Raphidiopsis brookii* FURGCY001, while its analog, decarbamoylsaxitoxin (dcSTX), shows an inverse relationship. Like *Alexandrium*, N deprivation and ammonia cytotoxicity appear to negatively affect STX production in *R. brookii* D9, but it has also been suggested that this change in biosynthesis would be an indirect consequence of a change in growth rate (Stucken et al. 2014). The lack of a relationship between NO_3^- availability and the abundance of transcribed *sxtU* and *sxtI* genes seems to confirm this hypothesis (Vico et al. 2016).

In *Alexandrium*, P limitation induces an increase in cell volume and a decrease in growth rate. However, PST production responses in different species are generally less reproducible than those induced by N limitation, as they vary with N status, species or strain, and toxicity (Boyer et al. 1987; Anderson et al. 1990a; Flynn et al. 1994, 1995; Siu et al. 1997; Béchemin et al. 1999; John and Flynn 2000; Wang and Hsieh 2002, 2005; Selander et al. 2008; Xu et al. 2012; Jiang et al. 2015; Han et al. 2016). For example, P and N co-limitation of *A. fundyense* CCMP 1846 cultures initially enriched in NO_3^- results in an increase in cellular PST content similar to that observed in P-limited but NH_4^+ -enriched cultures (John and Flynn 2000). The responses of P-limited *A. minutum* also differ between strains: some show an increase in cellular PSTs content when NO_3^- or NH_4^+ is highly available (strains AM89BM, 83, CK.A02, AmKB02 and AmKB06) (Béchemin et al. 1999; Touzet et al. 2007; Selander et al. 2008; Lim et al. 2010; Hii et al. 2016), also observed in *A. catenella* (Xu et al. 2012), while others see no change in this content even during P and N colimitation (strains AL1V, AL2V and A5) (Flynn et al. 1994, 1995; Selander et al. 2008). Cellular PSTs of the P-limited Chinese *A. tamarensis* strain HK9301 increase under NO_3^- but decrease under NH_4^+ (Wang and Hsieh 2005), while cellular PSTs of the Japanese (ATKR-020415) and Chinese (ATCI01) strains increase under both inorganic N sources (Leong et al. 2004; Murata et al. 2012; Jiang et al. 2015). Therefore, the same N:P ratio at different N and P concentrations can produce different responses depending on the strain studied (Selander et al. 2008; Christou et al. 2023). These differences in the response of PST production to N and phosphorus (P) limitation in *Alexandrium* could be due to differences in the degradation of STX biosynthetic pathways and/or those involved in cell division (Anderson et al. 1990a). Thus, a high N concentration combined with low P availability would cause a slowing of cell division, accompanied by an accumulation of N-rich intracellular compounds such as PSTs. The model of John and Flynn (2002) allows us to consider as plausible the hypothesis that the accumulation of toxins in the cell during P limitation results from a defect in the ATP-dependent transporter required for their excretion. These differences suggest: (i) synergistic effects of N and P availability on

toxin biosynthesis, and (ii) a role for P in regulating toxin metabolism (Anderson et al. 1990a; Flynn et al. 1994; John and Flynn 2000).

In addition to effects resulting from interactions between N and P, the N source itself can also influence PST production. For example, PST production is lower when *A. fundyense* and *A. catenella* are grown under urea than under NO_3^- (Dyhrman and Anderson 2003), while PST content is higher in *A. minutum* under NH_4^+ than under NO_3^- , especially at low N:P ratios (Lim et al. 2010; Hii et al. 2016), as well as in *G. catenatum* (Flynn et al. 1996; Lin et al. 2022). These results corroborate those obtained in *A. tamarensis* and *A. catenella*, where the increase in PST content over time is greater under NH_4^+ than under NO_3^- or urea, with more or less pronounced differences depending on strain and growth phase (Leong et al. 2004; Xu et al. 2012). In *A. tamarensis* ATKR-020415, there are positive correlations between cellular toxin content and inorganic N concentration, but not with urea (Leong et al. 2004). It should be noted that cellular PSTs increase under NH_4^+ up to a critical threshold and then decrease due to the toxicity of excess NH_4^+ on the same species (Hamasaki et al. 2001), which was also observed in *A. pacificum* under NO_3^- , where STX decreases above 8.82 mM (Abassi et al. 2023). In addition, the dynamics of toxin production as a function of the N:P ratio also varies depending on the N source. For example, *A. minutum* cultures under NH_4^+ show a sharp decrease in toxin production rate with increasing P, whereas it increases only slightly under NO_3^- (Lim et al. 2010). Since the uptake pathways of these three forms of N are different, their effects on biosynthesis must also be different (Chee Yew Leong and Taguchi 2004). Interestingly, cultures grown under NO_3^- show a diurnal variation in cellular PSTs, increasing at night and decreasing during the day, which was not observed under NH_4^+ (Flynn et al. 1996). PST biosynthesis is also associated with the intracellular level of arginine (Arg), an N-rich amino acid (AA), suggesting that factors promoting Arg-associated metabolism, such as N supply, may favor toxin production (Flynn et al. 1995). In addition, Arg has been identified as a precursor of PSTs in cyanobacteria (Kellmann and Neilan 2007). The proteomic study by Jiang et al. (2015) on the production of PSTs under N- or P-deficient conditions confirms the relationship between their synthesis and the presence of proteins involved in Arg metabolism, as well as methionine, cysteine, ornithine, and proline. To our knowledge, no studies have been carried out in *Alexandrium* on the effect of the addition of these different AAs on PST biosynthesis.

Studies on the toxin profile of PST-producing dinoflagellates have yielded conflicting results. While some conclude that the toxic profile is independent of N conditions (Parkhill and Cembella 1999; John and Flynn 2000; Touzet et al. 2007), others claim that the composition of PSTs varies with growth rate, growth phase, N concentration and source (Anderson et al. 1990b; Leong et al. 2004; Wang and Hsieh 2005; Poulton et al. 2005; Xu et al. 2012; Lee et al. 2012; Murata et al. 2012; Jiang et al. 2015; Han et al. 2016; Hernández-Sandoval et al. 2022). For example, Leong et al. (2004) argue that NO_3^- , which is the most oxidized form of the N resource, would induce more synthesis of C1 and C2 toxins than GTXs, while NH_4^+ , which is the most reduced form, would have the opposite effect. If the toxin profile is found to be dependent on nutrient availability and/or source, it could be used as a biomarker for both the species present during blooms and their nutrient status. If so, this would require further studies on the variation of the toxic profile in continuous cultures (Poulton et al. 2005; Murata et al. 2012). Conversely, Touzet et al. (2007) suggest that a stable toxic profile could be used as a biomarker to identify different strains, as it differs between species and strains. For example, gonyautoxin 2 (GTX-2) is the most highly expressed toxin in *A. fundyense* (John and Flynn 2000), as well as GTX-4 or GTX-2 in *A. minutum*, depending on the strain (Oshima et al. 1989; Flynn et al. 1994; Touzet et al. 2007), or C2 in *A. tamarensis* (Parkhill and Cembella 1999;

Wang and Hsieh 2001; Lee et al. 2012; Murata et al. 2012; Jiang et al. 2015) and *A. catenella* (Xu et al. 2012). *A. pacificum* toxins are predominantly composed of GTXs, with an effect of NO_3^- concentration on the relative proportions of GTX-1+4 and GTX-2+3 (Abassi et al. 2023). In *G. catenatum*, the N-sulfocarbamoyl form of PSTs is in the majority, although its contribution decreases in favor of the carbamoyl and decarbamoyl forms during prolonged cultivation (Hernández-Sandoval et al. 2022).

Taken together, these results reveal a similar dynamic of PST synthesis in the different representatives of the genus *Alexandrium*, with a diversity of responses in terms of PST intensity and composition depending on N nutrient conditions. Studies on *G. catenatum* and *R. raiioborskii* also suggest a similar general dynamic, i.e. an increase in PSTs following N limitation. In future studies, more intensive use of analytical techniques such as omics (transcriptomics, metabolomics) and ^{15}N labeling will help us to better understand the mechanisms of N uptake and metabolism, as well as its utilization in PST biosynthetic pathways.

Microcystins, nodularins and cyanobacteria

Microcystins (MCs) and nodularins (NODs) are hepatotoxic cyclic peptides composed of seven (D-Ala - X - D-MeAsp - Z - Adda - D- γ -Glu - Mdha; where X and Z are positions whose molecular composition may vary) and five AAs (Mdhb - D-MeAsp - Z - Adda - D- γ -Glu), respectively (**Fig. 3**), and are structurally related due to their common origin, although their order of appearance is still debated (Christiansen et al. 2003; Rantala et al. 2004). These compositional differences influence their toxicity: for example, microcystin-LR (MC-LR, $\text{C}_{49}\text{H}_{74}\text{N}_{10}\text{O}_{12}$) is more toxic than microcystin-RR (MC-RR, $\text{C}_{49}\text{H}_{75}\text{N}_{13}\text{O}_{12}$), resulting from the replacement of an N-poor Leu by an N-rich Arg (Tonk et al. 2008).

These toxins are widespread in cyanobacteria of the genus *Microcystis*, *Planktothrix*, *Anabaena* and *Oscillatoria* for MCs (see review by Krishnan and Mou 2021) and specific for the genus *Nodularia* for NODs (see review by Etheridge 2010). Their peptide structure is very N-rich. Like CYNs and PSTs, the origin and exact roles of MCs and NODs are still poorly understood. Schatz et al. (2007) hypothesized that MCs may have played a pheromonal role during evolution, allowing pheromone-producing organisms to estimate cell death within their population and mount an appropriate defense response, which may also lead to additional MC production. This hypothesis is supported by the common evolutionary origin of microcystin synthetase in the various MC-producing cyanobacteria, and by the fact that the appearance of a common ancestor of MC-producing cyanobacteria predates that of metazoans and thus their predators (copepods and cladocerans) (Rantala et al. 2004). These recent observations support the hypothesis of a possible exaptation during the evolution of these microorganisms (Gould and Vrba 1982).

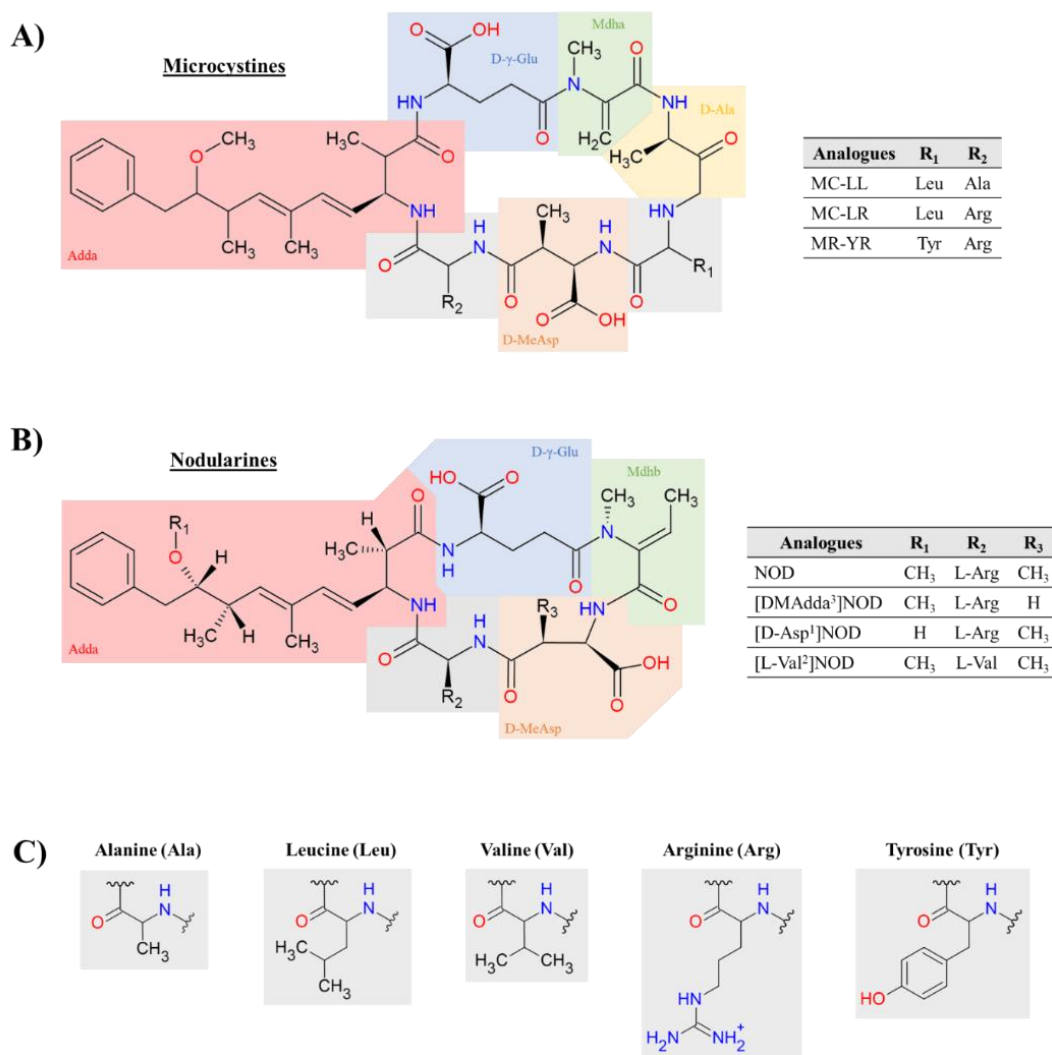


Fig. 3: Molecular structures of A) microcystins (MCs), B) nodularins (NODs), and C) associated amino acids.

Microcystins and the cyanobacteria *Microcystis*, *Planktothrix* and *Nostoc*

The genus *Microcystis* includes non-diazotrophic cyanobacteria that may or may not produce MCs, with toxic and non-toxic strains coexisting (Rinta-Kanto et al. 2009), while *Planktothrix agardhii* is a cyanobacterium that produces MCs (and more specifically LR and RR forms) and PSTs, although to our knowledge no study has been conducted on the effect of N on PST production (Tonk et al. 2008). The production of MCs is non-ribosomal and depends on the expression of the *mcy* gene cluster, which consists of 10 peptide synthetase subunits (long ORFs: *mcyA-E* and *G*; small ORFs: *mcyF* and *H-J*), where *mcyA* and *mcyD* are strongly involved in MC biosynthesis (Dittmann et al. 1997; Tillett et al. 2000). The following modules are found: peptide synthetases (*mcyABC*), polyketide synthases (PKS; *mcyD*), chimeric enzymes composed of peptide synthetase and PKS modules (*mcyEG*), a putative thioesterase (*mcyT*), a putative ABC transporter (*mcyH*), and a putative peptide-modifying enzyme (*mcyJ*) (Christiansen et al. 2003). These genes are not present in non-toxic strains (Dittmann et al. 1997; Tillett et al. 2000), and there are differences in sequence and arrangement between the *mcy* gene clusters of these two cyanobacteria (Christiansen et al. 2003). The role of MCs in these strains is still unknown, but their production has a significant metabolic cost that can be detrimental if recipient organisms are insensitive to CYN, suggesting an important role for these molecules in the physiology of toxic strains (Briand et al. 2012).

Several authors have reported that N enrichment, especially dissolved inorganic N (DIN), favors the proliferation of toxic strains of *Microcystis* over non-toxic strains (Vézie et al. 2002; Yoshida et al. 2007; Jiang et al. 2008; Ha et al. 2009; Moisander et al. 2009; Davis et al. 2010). Conversely, Beversdorf et al. (2013) report that when DIN is completely consumed, the absence of N fixation favors the growth of toxic strains of *Microcystis* in favor of diazotrophic cyanobacteria of the genus *Aphanizomenon*. Positive relationships between MCs cell content in *M. aeruginosa* and NO_3^- concentration in the medium have been demonstrated in lakes in Michigan (USA) (Horst et al. 2014).

According to some studies, *M. aeruginosa* has a preference for NO_3^- and, to a lesser extent, urea, but has little appetite for NH_4^+ (Yan et al. 2015; Erratt et al. 2018; Zuo et al. 2018; Chen et al. 2019), while other studies do not mention any preference (Chaffin et al. 2018). Similarly, *P. agardhii* has a strong affinity for NO_3^- , which gives it a competitive advantage over some cyanobacterial species such as *R. raciborskii* under certain conditions (Ammar et al. 2014). However, Yang et al. (2022) show that the growth of N-limited *M. aeruginosa* FACHB-905 is stimulated more by NH_4^+ than by NO_3^- , although NH_4^+ -induced photosystem II (PSII) damage results in a lower maximum cell density, confirming the findings of Chen et al. (2019). Urea supplementation alone at a high concentration (around 3.6 mmol.L^{-1}) also appears to inhibit growth (Huang et al. 2014; Wu et al. 2015). In addition to lysine (Lys), *M. aeruginosa* is also able to assimilate several soluble free AAs (AALDs), especially those rich in N, such as alanine (Ala), leucine (Leu), Arg, glutamic acid (Glu), and aspartic acid (Asp) (Dai et al. 2009; Yan et al. 2015; Zuo et al. 2018). However, Glu and Asp can promote *M. aeruginosa* growth up to critical concentrations, beyond which these two AALDs can also induce cell deformation (Dai et al. 2009). However, these results contradict those of Yan et al. (2004), who observed that NH_4^+ promotes *M. aeruginosa* DC-1 growth, while Arg inhibits it.

Laboratory studies on the effect of N on MCs production are varied and often contradictory, depending on the species and strains studied. In *M. aeruginosa*, N limitation decreases the production of MCs with variations in their toxic profile (Lee et al. 2000; Dai et al. 2008; Krüger et al. 2012; Horst et al. 2014; Harke and Gobler 2015; Chia et al. 2016, 2017, 2018). N is required both for the biosynthesis of AAs that enter the composition of MCs, and for that of enzymes potentially involved in their biosynthesis (Dai et al. 2008; Harke and Gobler 2015). Kameyama et al. (2002) make the same observations in *M. viridis* NIES 102, in contrast to Sevilla et al. (2010) who show no relationship between NO_3^- concentration and cellular MC-LR content in *M. aeruginosa* PCC7806. Pimentel and Giani (2014) observed an increase in cellular content under severe NO_3^- and NH_4^+ limitation. Recently, transcriptomic analysis of *M. aeruginosa* FACHB-905 at different urea concentrations showed an increase in the cellular content of MCs during N limitation, as well as an increase in the expression of genes involved in the biosynthesis of these toxins (mcyABCDEFHIJ) and in N metabolism (Zhou et al. 2019), contradicting previous results. Similarly, the mcyB gene of *M. aeruginosa* FACHB-905 grown under NO_3^- is up-regulated when the medium becomes N-limited (Peng et al. 2017). However, these results were not found in *M. aeruginosa* LE-3, where N deprivation in any form (NO_3^- , NH_4^+ , urea) decreases its MCs content as well as the expression of genes involved in MCs peptide synthesis (mcyACDE) (Harke and Gobler 2015). However, mcyHIJ genes involved in MCs molecular structure assembly and transport are upregulated, suggesting an internal function of these toxins during N stress (Harke and Gobler 2015). Note that these differences may be due to the form of MCs considered. For example, Lee et al. (2000) found different correlations between total MCs, MC-RR, MC-LR and MC-YR and chlorophyll-a in *M. aeruginosa* UTEX 2388. The effect of N:P ratio on MC production also varies

from strain to strain, with the correlation between these two terms being strong in some (Vézic et al. 2002; Downing et al. 2005) and less obvious in others, such as *M. aeruginosa* UTEX 2388 (Lee et al. 2000). Finally, cell stoichiometry also appears to be an important factor in MC production. For example, Van de Waal et al. (2009) show that an increase in the N:C ratio leads to an increase in the content of MCs and their more N-rich analogues MC-RR and MC-YR.

Some studies have hypothesized that the concentration and type of DIN may only indirectly affect MCs production through a change in growth rate. For example, Briand et al. (2012) observed that MCs biosynthesis in *M. aeruginosa* is proportional to its growth rate, confirming the work of Orr and Jones (1998) and Long et al. (2001), who found positive linear relationships between growth rate and cell quota in MC-LR in N-limited continuous cultures. These observations are supported by the fact that the expression of the *mcyD* gene of the *mcy* operon is independent of NO_3^- availability, whereas the increase in growth rate induced by N addition appears to affect this expression (Sevilla et al. 2010). In other MC-producing organisms, such as the benthic cyanobacteria of the genus *Nostoc*, which produce another cyclic hexapeptide toxin called nostophycin (Fujii et al. 1999), toxin production also seems to be more influenced by cell cycle, P, light and temperature variation than by N limitation (Kurmayer 2011). However, to the best of our knowledge, no studies have been conducted specifically on the effects of N on MC production in this group. However, several authors claim that the rate of MCs production in *Microcystis* is not solely explained by its growth rate (Vézic et al. 2002; Yan et al. 2004; Downing et al. 2005; Horst et al. 2014).

Regulation of MCs production by N appears to be linked to N metabolism via the transcription factor NtcA, the universal regulator of N. In *M. aeruginosa* PCC 7806, NtcA binds to the *mcxDA*, *mcxE* and *mcyH* promoter regions of MCs, implying (at least partial) N regulation of the microcystin synthetase genes (Ginn et al. 2010; Kuniyoshi et al. 2011). The comparative proteomic study by (Alexova et al. 2011) on different strains of *M. aeruginosa* confirms this link between NtcA and MCs biosynthesis. In addition, Kuniyoshi et al. (2011) show that the presence of 2-oxoglutarate, an indicator molecule of cellular C:N balance, increases the affinity of NtcA for the promoter regions of the *mcxDA*, *mcxE* and *mcyH* genes by a factor of 2.5, suggesting a role for MCs in the balance of carbon (C) and N metabolism. Recent studies in *M. aeruginosa* FACHB-905 have shown that the expression of the N metabolism-related genes *ntcA*, *pipX*, and *glnB*, as well as *mcyA* and *mcyD*, exhibit different dynamics depending on the concentration and form of N used (Chen et al. 2019). A high concentration of NO_3^- tends to decrease the transcription of all these genes, while a high concentration of NH_4^+ promotes the transcription of *mcyA* and *mcyD*, but negatively regulates the expression of *ntcA*, *pipX*, and *glnB* genes (Chen et al. 2019). These observations partially confirm those of Pimentel and Giani (2014), according to which the expression of the *ntcA* and *mcyD* genes of *M. aeruginosa* strains Ma19 and Ma26 increases in N-limited cultures, whether by NO_3^- or NH_4^+ . Chen et al. (2019) observe that a decrease in urea concentration is accompanied by an increase in the expression of genes associated with N metabolism and no change in those associated with MC biosynthesis, while Zhou et al. (2019) observe an increase in the transcription of the entire *mcy* gene cluster (while the expression of the *ntcA* gene remains stable), whether this gene is associated with peptide synthesis (*mcxABDCDEF*) or adaptation and transport (*mcyHFIJ*).

The only study conducted on the effects of N on CYN synthesis in different strains of *Aphanizomenon* sp. shows that N-rich and P-limited conditions favor CYN biosynthesis and then its active release into the medium,

as well as an increase in the proportion of extracellular deoxyCYN (Preußel et al. 2014). Under N limitation, release is lower and intracellular accumulation occurs (Preußel et al. 2014).

The modulable peptide structure of MCs implies an influence of AALDs on toxin production and expression of toxic profile. Several authors have investigated the effect of AAs availability on MCs production by *Microcystis* (Yan et al. 2004, 2015; Dai et al. 2008; Sano et al. 2011; Wu et al. 2015; Chen et al. 2019) and *P. agardhii* (Tonk et al. 2008; Van de Waal et al. 2010). For example, the effect of different AALDs on MC production by *Microcystis* varies widely: AAs that are constitutive for the molecular structure of MCs, such as Ala, Leu, and Arg, favor MC-LR production, whereas Glu, Asp, or Lys do not favor its production at all. These differences may be due to a disruption of MC biosynthesis due to cell deformation induced by certain AAs (Glu, Asp) or a cell growth defect (as is the case with Lys) (Dai et al. 2009). However, it has also been shown that Leu and Arg can inhibit MC-LR production in *M. aeruginosa* DC-1 (Yan et al. 2004). Similarly, studies labeling MCs with ^{15}N have shown greater MC-LR production under NH_4^+ than under Ala, but better synthesis of Ala into MC-LR (Sano et al. 2011; Yan et al. 2015). By labeling urea with ^{15}N , Wu et al. (2015) show that this N source is first synthesized as Ala or Leu residues, while Mdha is the last component of MC-LR to assimilate labeled urea. Furthermore, a positive correlation between intracellular levels of MCs and AAs associated with MC structure has been demonstrated in *M. aeruginosa* FACHB-905 (Chen et al. 2019). The toxic profile of *P. agardhii* is subject to alteration by variations in the concentration of Leu and Arg in the growth medium. An increase in the concentration of Leu results in an increase in the ratio of MC-LR to RR, whereas the addition of Arg has the opposite effect (Tonk et al. 2008). However, it should be noted that the amount of available AAs allocated to MC biosynthesis is negligible, representing less than 0.5% of the total AAs pool (Van de Waal et al. 2010). Moreover, Tonk et al. (2008) and Van de Waal et al. (2010) have demonstrated that inorganic N limitation reduces the cellular concentration of N-rich AAs, including Leu and Arg, while also decreasing MC production. However, this process does not alter the Leu/Arg ratio or the MC-LR/RR ratio. Following a N deficiency, the supply of NO_3^- causes a gradual increase in the levels of AAs, particularly Leu and Arg, as well as MC-RR levels, while MC-LR production increases more slowly (Van de Waal et al. 2010). This may be due to a specific synthesis of Arg and Asp via cyanophycin, a storage molecule whose main components are Arg and Asp (Van de Waal et al. 2010). Consequently, the production of MCs by *P. agardhii* is contingent upon the availability of inorganic and organic N sources in the surrounding environment.

As demonstrated by Chaffin et al. (2018), the production of MCs by natural *Microcystis* and *Planktothrix* communities that have been enriched with repeated inputs of NO_3^- or urea is greater than that observed with NH_4^+ inputs. This is in contrast to the results obtained with a single input. In laboratory settings, an *M. aeruginosa* FACHB-905 culture that has been enriched with NH_4^+ has been observed to release a greater quantity of MCs than a culture that has been enriched with NO_3^- (Chen et al. 2019; Yang et al. 2022). Nevertheless, this release is more pronounced at low or high NH_4^+ concentrations (Chen et al. 2019). However, Chen et al. (2019) observed that NH_4^+ promotes the synthesis of MCs precursor AAs to a greater extent than NO_3^- . Conversely, Yang et al. (2022) demonstrated that an NH_4^+ -enriched medium is accompanied by a lower cellular MCs content than a NO_3^- -enriched medium. An excess of urea can also impede the production of MC-LR and cellular growth (Wu et al. 2015). However, this inhibitory effect is reversed when NO_3^- is introduced concurrently (Huang et al. 2014). However, the concentration of urea does not affect the proportions of MC analogues (Huang et al. 2014). Pimentel and (Giani 2014) report that N limitation induces an increase in the cellular content of MCs in two Brazilian strains of

Microcystis. The more toxic Ma26 strain demonstrates a sixfold greater increase under NO_3^- than under NH_4^+ conditions, whereas in the less toxic Ma19 strain, no significant difference is apparent. Thus, intraspecific differences in response to the N source exist not only in the production of MCs but also in the expression of associated genes.

In conclusion, the studies conducted by Vézic et al. (2002), Jiang et al. (2008), Chia et al. (2016, 2017) and Chaffin et al. (2018) have demonstrated that the interactions between N, P, light, and iron can influence the growth and production of microcystins (MC). The possibility of cell lysis (Schatz et al. 2007) and the contact of targeted *M. aeruginosa* cells with other phycotoxins, such as CYN (mainly), anatoxin-a, or the MCs themselves (Chia et al. 2017), and/or with a competitor such as *Anabaena* (Chia et al. 2018), may influence the effects of N on MC production. These interactions show the need to combine reductionist and holistic approaches.

The production of MCs in *Microcystis* and *Planktothrix* exhibits disparate dynamics contingent on the concentration and provenance of N, the species in question, and the specific strain under examination. It is unclear whether the effect of N on MC production is independent of its effect on growth rate. However, recent results suggest a synergy and interdependence between these two effects, not only on MC production but also on the toxic profile as a function of N source. This is particularly evident when the latter includes AAs that constitute the MC molecule.

Nodularins and the genus *Nodularia* (cyanobacteria)

The impact of N sources on NOD production by *Nodularia* has been the subject of only a limited number of studies. The initial study demonstrated that elevated temperatures, light intensity, and PO_4^{3-} concentrations stimulate the formation of intracellular NODs, whereas high N concentrations and low salinities exert an inhibitory effect (Lehtimäki et al. 1997). Subsequently, correlations between nutrient limitation and NOD production were demonstrated in batch cultures, with the highest NOD concentrations measured at low N levels (Repka et al. 2001). The increase in NOD production in the external environment following N limitation was subsequently verified in *Nodularia spumigena* by Pattanaik et al. (2010). Indeed, these authors demonstrated that: (i) Maximum NOD concentrations are observed under N-limited, P-rich conditions, in the absence of UV radiation and the potential competitor *Aphanizomenon* sp.; (ii) no deleterious allelopathic effects of *N. spumigena* are evident; (iii) the intracellular accumulation of NODs and their release into the environment are interdependent and need to be studied simultaneously; and (iv) the interactions between light, nutrients, and the presence of other organisms influence toxin production. However, no significant differences in NOD production were observed for different N sources (NO_3^- , NH_4^+ , N_2) (Stolte et al. 2002). Therefore, multifactorial analyses are necessary to understand toxin production and release (Pattanaik et al. 2010).

Palytoxins, ovatoxins, and the dinoflagellate *Ostreopsis*

Palytoxin (PLTX, $\text{C}_{129}\text{H}_{223}\text{N}_3\text{O}_{54}$) is a thermostable marine toxin with a high molecular weight (between 2659 and 2680 Da) and a partially unsaturated polyhydroxylated aliphatic backbone (Fig. 4). This toxin was first isolated in 1971 in Hawaii (USA) from the soft coral *Palythoa* sp., then characterized in 1981 (Ramos and Vasconcelos 2010). PLTX is ubiquitous in living organisms and acts on the Na,K-ATPase pump, transforming it into an ion channel (K^+ efflux, Na^+ influx) and depolarizing cell membranes (for further details, see the review by Wu 2009). Since the early 2000s, PLTX analogues designated as ovatoxins (OVTXs) have been identified in

particular in *Ostreopsis* cf. *ovata*, a dinoflagellate known to cause respiratory intoxications, particularly on Mediterranean coasts (Ciminiello et al. 2006, 2008).

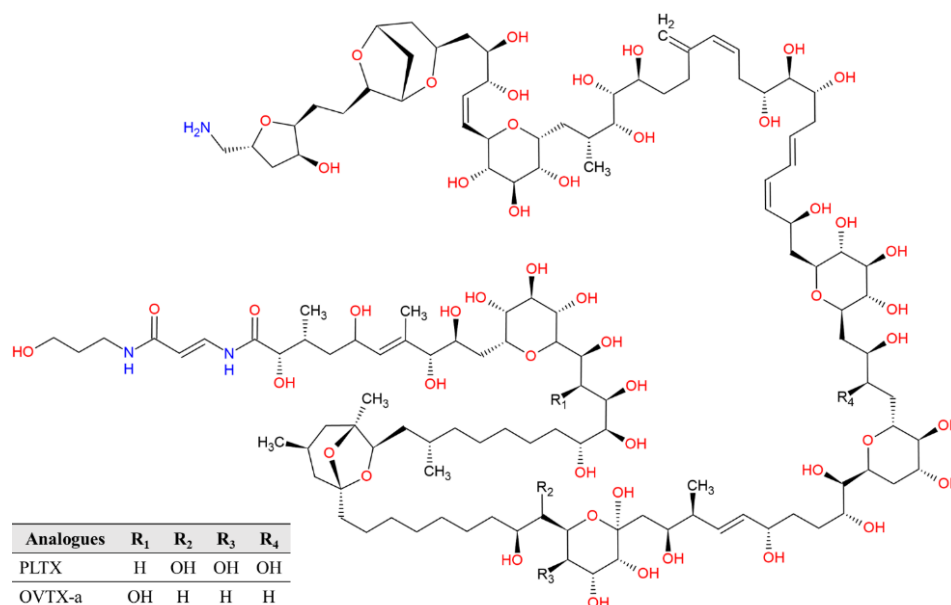


Fig. 4: Molecular structures of palytoxin (PLTX) and ovatoxin-a (OVTX-a).

The genus *Ostreopsis* comprises epibenthic organisms that produce a range of toxic compounds, including putative PLTX and OVTX-a, b, c, d, e. These organisms are responsible for recurrent toxic blooms, initially observed in tropical waters, which have subsequently spread to temperate regions (Pavaux et al. 2020). The most prominent member of this genus, *Ostreopsis* cf. *ovata*, is responsible for toxic blooms of multifactorial origin. These blooms are closely linked to high water temperatures and salinities, low hydrodynamics, and initial nutrient composition (Pistocchi et al. 2011, 2014; Vidyarathna and Granéli 2013; Cohu et al. 2013; Accoroni et al. 2015).

The toxic profile of *O. cf. ovata* remains consistent regardless of the nutrient conditions, exhibiting a stable temporal pattern. The profile is dominated by OVTX-a (C₁₂₉H₂₂₃N₃O₅₂), which accumulates in the cell during the stationary phase. It should be noted that the results of the studies vary depending on the methodology employed and the standards used for analysis. For example, the studies conducted by Vanucci et al. (2012), Pezzolesi et al. (2014, 2016) and Medina-Pérez et al. (2023) provide different outcomes. Toxin production is relatively constant over time, but is less significant under conditions of N and P limitation (Vanucci et al. 2012; Pezzolesi et al. 2014, 2016). In these conditions, the biosynthesis of putative PLTXs and OVTXs is simultaneously interrupted with a decrease in C:N and C:P ratios (Pezzolessi et al. 2016), supporting the hypothesis of a metabolic shift towards the production of high-C compounds during nutrient limitation (Ianora et al. 2006). Furthermore, the toxicity expressed as hemolytic activity rates also increases following macronutrient limitation, particularly during the stationary and bloom decline phases, regardless of the normalization applied (cell concentration, biovolume). This is in agreement with the bioaccumulation of PLTX and OVTXs observed under similar conditions by Vidyarathna and Granéli (2013). Nevertheless, this hemolytic activity is not inherently linked to PLTX and OVTXs, indicating the potential presence of additional toxic compounds susceptible to fluctuations in nutrients. A model based on the results of Pezzolesi et al. (2014) suggests that the regulation of C-rich toxins in *Ostreopsis* is influenced more by available C and P stress than by N stress. However, the authors of this model point out that

the respective effects of N and P are difficult to differentiate since these resources were depleted simultaneously and the full range of biotic processes influencing toxin production were not taken into account (Pinna et al. 2015).

The levels of putative PLTX and OVTXs are also contingent upon the N source utilized. Indeed, crops cultivated on urea exhibit a diminished total toxin content relative to those grown on NO_3^- , NH_4^+ , or N present in commercial fertilizers (Medina-Pérez et al. 2023). The anthropogenic input of N into coastal waters susceptible to *O. cf. ovata* blooms may, therefore, contribute to the recurrence of toxic blooms and health risks for nearby populations.

Low-nitrogen toxins

Domoic acid and the diatom *Pseudo-nitzschia*

Domoic acid (DA) ($\text{C}_{15}\text{H}_{21}\text{NO}_6$) is a polar AA that is neurotoxic and is responsible for amnesic shellfish poisoning (ASP) (**Fig. 5**). In 1987, it was responsible for several hospitalizations and deaths in Canada. Traditionally, it is used in Japan as a remedy for intestinal parasites and as an insecticide. Initially associated with the red alga *Chondria armata* following its initial discovery in Japan in 1958, DA is now measured in several diatoms, including the genus *Pseudo-nitzschia*. The species *Amphora coffeaeformis*, *Nitzschia navis-varingica*, and *N. bizertensis* (La Barre et al. 2014; Zabaglo et al. 2016). The majority of studies on the relationship between N and DA production have focused on the *Pseudo-nitzschia* group, a cosmopolitan genus that produces both DA and ASP (North America, South America, South Africa, Australia, Asia, Europe) (Rao et al. 1988; Bates et al. 1998; Trainer et al. 2012). The physiological and ecological roles of DA in *Pseudo-nitzschia* remain poorly understood. Several hypotheses have been proposed to explain its function, including an osmolytic role at high salinities, a deterrent action against grazing, a pheromone in sexual reproduction signaling, photosynthetic quenching, or even a trace metal chelator to increase iron bioavailability and detoxify the environment of copper. For further details, see the reviews by Trainer et al. (2012) and Zabaglo et al. (2016).

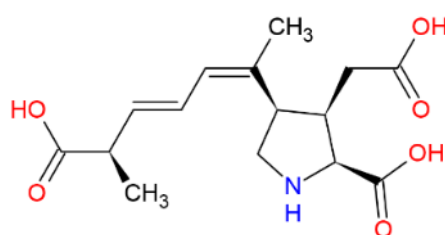


Fig. 5: Molecular structure of domoic acid (DA).

Pseudo-nitzschia employs a variety of sources for organic (urea, AAs) and inorganic N (NO_3^- , NH_4^+) (Howard et al. 2007; Cochlan et al. 2008; Trainer et al. 2012; Martin-Jézéquel et al. 2015) with markedly diverse intra- and interspecific preferences (Kudela et al. 2003; Martin-Jézéquel et al. 2015; Radan and Cochlan 2018). The combination of a high assimilative capacity and a diversity of affinities increases the likelihood of toxic blooms in waters that have been eutrophied by anthropogenic discharges (Howard et al. 2007; Kudela et al. 2008). In the context of the Southern California HABs that occurred in the late spring of 2004–2005, there was an inverse correlation between the abundance of *P. australis* and the cellular DA levels, as well as the concentrations of silicic acid, NO_3^- , and PO_4^{3-} (Anderson et al. 2006; Schnetzer et al. 2007). Similar observations were made with *Pseudo-nitzschia* sp. in the northern Gulf of Mexico from sediment cores (Parsons and Dortch 2002). Finally, Radan and

Cochlan (2018) demonstrated that enrichments of natural assemblages of waters off western Washington state (USA) with NO_3^- , NH_4^+ , or urea resulted in increased abundance of *Pseudo-nitzschia* and elevated total toxicity, with the effects being more pronounced with urea and NH_4^+ .

A substantial body of research has been conducted on the impact of nutrient source and concentration, including N, on DA production (Bates et al. 1991, 1993; Pan et al. 1998; Kudela et al. 2003; Howard et al. 2007; Thessen et al. 2009; Calu et al. 2010; Hagström et al. 2011; Auro and Cochlan 2013; Terseleer et al. 2013; Martin-Jézéquel et al. 2015; Lema et al. 2017; Radan and Cochlan 2018). The initial studies in this field concluded that the production of DA is contingent upon three conditions: (i) the absence of cell division, (ii) the availability of N during the stationary phase, and (iii) the presence of light during the stationary phase (Bates et al. 1991). In contrast to Si and P limitations, N limitation restricts DA biosynthesis in *Pseudo-nitzschia*. The conditions that favor high DA production are Si and/or P limitation, combined with excess N and light (Bates et al. 1991, 1998; Pan et al. 1998; Kudela et al. 2003; Hagström et al. 2011; Terseleer et al. 2013). It is noteworthy that these results varied between different strains of *Pseudo-nitzschia* (Auro and Cochlan 2013).

According to Hagström et al. (2011) and Lema et al. (2017), the role of P in DA production appears to be more significant than that of N. Indeed, a low concentration of PO_4^{3-} with any concentrations of N and Si (thus independently of the N:P:Si ratio) has been observed to induce high total and particulate DA concentrations and a decrease in cell density in continuous cultures of *P. australis* (Lema et al. 2017). Conversely, low concentrations of N and Si with a high concentration of PO_4^{3-} have only been observed to produce a decrease in cell density. Similar outcomes pertaining to the impact of P limitation were also documented by Hagström et al. (2011) in *P. multiseriis*, with total and particulate DA concentrations demonstrating an increase in conjunction with an elevated N:P ratio.

It should be noted that discrepancies exist contingent upon the specific strain and N source employed. The findings of studies conducted in the 1990s by Bates et al. (1993), Hillebrand and Sommer (1996), and Pan et al. (1998) collectively indicated that NH_4^+ exhibited a greater propensity for cellular DA production in comparison to NO_3^- . In *P. multiseriis* and *P. pungens*, this may be attributed to the reduced energetic expenditure associated with NH_4^+ assimilation or to the physiological stress it induces. However, NO_3^- facilitates higher growth and, consequently, a higher total DA concentration than that observed in NH_4^+ cultures. However, more recent observations by Martin-Jézéquel et al. (2015) appear to challenge this energetic hypothesis, particularly in the case of *P. multiseriis* CLN47, where the total DA content is higher with NO_3^- than with NH_4^+ . These inconsistencies are also evident within the same species. For instance, the two *P. multiseriis* strains CLN47 and Pn-1 exhibited higher total DA contents at the same growth rate when grown under NO_3^- (Thessen et al. 2009). In particular, DA production appears to be favored by one form of organic N, urea, regardless of the strain or cropping system employed (Howard et al. 2007; Calu et al. 2010). For instance, *P. multiseriis* CCL70 in batch culture exhibits a marginally elevated DA content when urea is present, as opposed to when NO_3^- is present (Calu et al. 2010; Martin-Jézéquel et al. 2015). In a recent study, Radan and Cochlan (2018) demonstrated that at an identical growth rate, the toxin content (i.e., particulate DA normalized by cell abundance) of *P. multiseriis* NWFSC-245 was 1.3 and 3.4 times higher under urea than under NH_4^+ or NO_3^- in batch culture, and 3.5 and 4.3 times higher in continuous culture. While N limitation does not appear to alter the proportions of the various toxins produced in *P. multiseriis*, the nature of the limiting element does seem to be a significant factor. Cellular DA contents under urea are,

respectively, 5 and 13 times higher than those measured under NO_3^- and NH_4^+ (Radan and Cochlan 2018). Similarly, the substitution of NO_3^- with urea in continuous cultures of *P. pungens* D10 has been observed to result in an increase in cellular DA and a concomitant decrease in cellular concentration (Calu et al. 2010). Similar outcomes were observed in batch cultures of natural samples from Bolinas Bay (San Francisco, California, USA) comprising a population of *Pseudo-nitzschia*. Additionally, in batch cultures of *P. australis* AU221-a, cellular and total DA levels at the conclusion of the exponential growth phase were between two and three times higher with urea than with NO_3^- or NH_4^+ (Howard et al. 2007). However, Martin-Jézéquel et al. (2015) demonstrated that DA production by *P. australis* strain PNC1 is greater with glutamate and NH_4^+ than with urea. Additionally, Auro and Cochlan (2013) demonstrated that *P. cuspidata* NWFSC-221 exhibits a distinct response compared to *P. multiseriata* and *P. pungens*. The utilization of NO_3^- followed by NH_4^+ as N sources resulted in elevated cellular DA levels compared to urea, although this phenomenon was observed exclusively during the exponential growth phase. The inter- and intraspecific variability in DA production and growth rate depending on the form of N used (NO_3^- , NH_4^+ , urea) has also been reported by Thessen et al. (2009), thereby confirming the need for further study of N assimilation and utilization mechanisms in *Pseudo-nitzschia*.

Cochlan et al. (2023) have presented a challenge to the prevailing paradigm of increased toxicity due to macroelement limitation, as well as to the equations used to calculate DA production rates according to the type of culture employed. Indeed, the relative proportions of extra- and intracellular DA vary according to growth rate and nutrient availability. The intracellular proportion is greater during the exponential phase than during the stationary phase, which is induced by nutrient depletion. However, the potential role of bacteria in reducing the concentration of DA in the medium by incorporating it should also be considered. Additionally, the need to take bacteria into account when studying the toxicity of *Pseudo-nitzschia* (Stewart 2008) should be acknowledged.

These observations collectively demonstrate that the toxicity response of *Pseudo-nitzschia* to the utilization of diverse N sources is highly variable, thereby complicating our understanding of the underlying mechanisms that give rise to toxic blooms. The origins of this diversity remain poorly understood and require further study. For example, elucidating the genetic and non-genetic regulatory processes, contingent on the form of N utilized, should provide crucial insights. Investigating the interactions with the *Pseudo-nitzschia* phycosphere, such as the impact of bacteria on the transformation and assimilation of surrounding N or in the dynamics of DA degradation, are additional avenues of research.

Azaspiracids and the dinoflagellate *Azadinium spinosum*

Initially isolated from the mussel *Mytilus edulis* in 1998 and named Killary toxin-3 (or KT-3), azaspiracids (AZAs) are polyether marine toxins (**Fig. 6**) associated with typical gastrointestinal intoxications following consumption of contaminated seafood. Since 1995, they have been recorded on the coasts of Western Europe (the Netherlands, Ireland, the United Kingdom, Italy, and France), the Atlantic coasts of North America (Canada), and North-West Africa (Morocco) (see Twiner et al. 2008). The name "azaspiracids" is derived from the molecular structure of the first compound, AZA-1 ($\text{C}_{47}\text{H}_{71}\text{NO}_{12}$), which comprises a cyclic amine (aza group), a unique tri-spiro-assembly, and a carboxylic acid group (i.e., "aza-spir-acid"). AZAs differ only in the number of methyl groups and are known to be produced in particular by dinoflagellates of the genus *Protoparidium*, notably *P. cassipes* (see review by Twiner et al. 2008). This discussion will focus on the species *Azadinium spinosum* (Tillmann et al. 2009).

A. spinosum is a dinoflagellate with the capacity to flourish in a range of environmental conditions, exhibiting a preference for NO_3^- over urea or NH_4^+ (Jauffrais et al. 2013; Li et al. 2016). The impact of nutrients on AZA production by *A. spinosum* has been insufficiently explored. Li et al. (2016) and subsequently Kilcoyne et al. (2019) observed that a change in culture medium resulted in opposing variations in cell density and toxin quota, although their results varied between strains. Moreover, their study does not elucidate the precise impact of each nutrient on toxin production. It seems that the cellular AZAs quota increases with a reduction in temperature and P limitation, but remains unaffected by alterations in N concentrations and N sources tested (Jauffrais et al. 2013; Li et al. 2016). Jauffrais et al. (2013) and Kilcoyne et al. (2019) recommend considering the influence of micronutrients, such as selenium, and the potential for synergistic interactions between environmental variables on AZA production by *A. spinosum*.

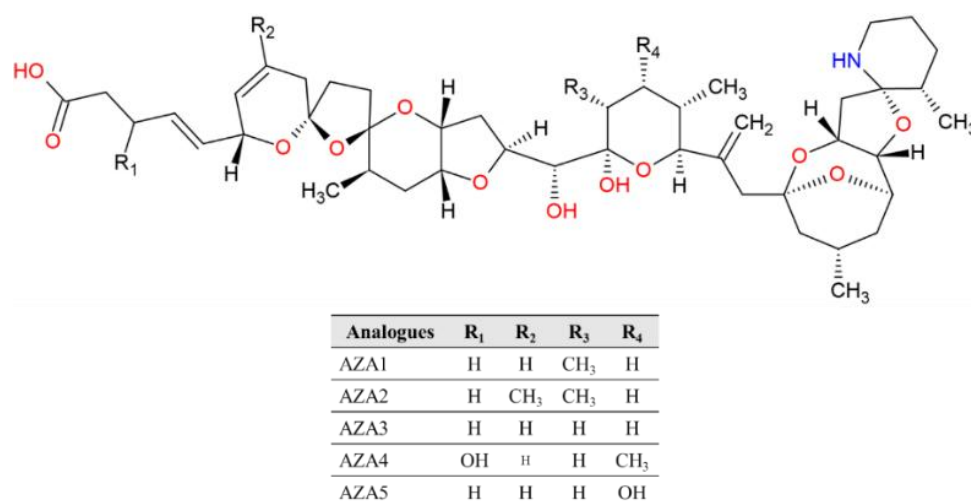


Fig. 66: Molecular structures of azaspiracids (AZAs).

Anatoxin-a and the cyanobacteria *Anabaena* and *Aphanizomenon*

Anatoxin-a (ATX-A, $\text{C}_{10}\text{H}_{15}\text{NO}$) is a neurotoxic alkaloid that is produced by cyanobacteria, including *Microcystis*, *Aphanizomenon*, *Acutodesmus*, and *Anabaena* (Fig. 7). As with the preceding toxins, their ecological role remains entirely unknown, and hypotheses are limited to an anti-grazing and/or competitor-inhibiting action (for further information, please see the review by Colas et al. 2021). Allelopathic properties dependent on N and light conditions are, however, suspected, with effects of ATX-A on pigment content, antioxidant activity, and reactive oxygen species production having been observed in the cyanobacterium *Microcystis aeruginosa* and the diatom *Acutodesmus acuminatus* (Chia et al. 2016).

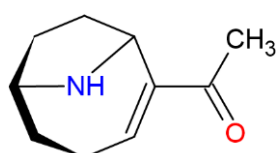


Fig. 67: Molecular structure of anatoxin-a (ATX-A).

To the best of our knowledge, only two studies have investigated the effect of N on ATX-A production in cyanobacteria. In a study conducted by Rapala et al. (1993), an increase in ATX-A production was observed in *Anabaena flos-aquae* (strain 14) and *Aphanizomenon flos-aquae* (strain 3) following the depletion of inorganic N.

The impact of N on ATX-A production in cyanobacteria exhibits interspecific variations contingent on the form of N utilized. Gagnon and Pick (2012) document an increase in the total concentration and cellular content of ATX-A in *Aphanizomenon issatschenkoi* (strain CAWBG02) exclusively when N stress is moderate. However, the current understanding of the associations between N and ATX-A remains insufficient to provide a comprehensive answer.

Spirolides and the dinoflagellate *Alexandrium*

Spirolides (SPXs) are macrocyclic imines (**Fig. 8**), lipophilic phycotoxins found in the dinoflagellate *Alexandrium ostenfeldii*. Their production does not appear to be influenced by variations in NO_3^- (Maclean et al. 2003). To our knowledge, no other studies have been carried out on the effect of N on SPX production.

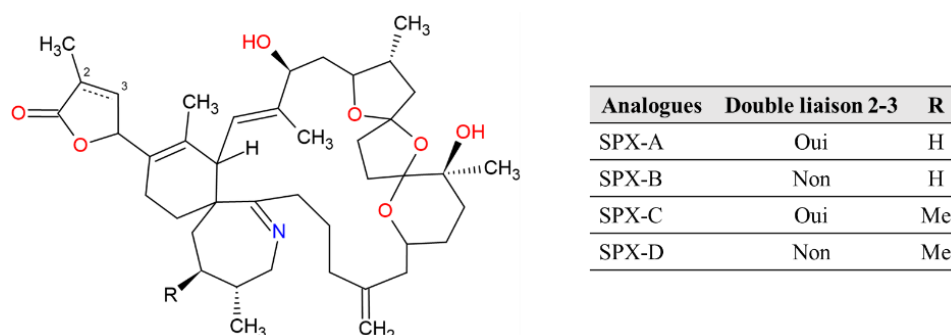


Fig. 68: Structures moléculaires des spirolides (SPXs).

Non-nitrogenous toxins

Ciguatoxins and the dinoflagellate *Gambierdiscus*

Ciguatera fish poisoning (CFP) is a non-infectious disease transmitted by the consumption of seafood contaminated with ciguatoxins (CTXs), non-nitrogenous polyether toxins (for example, the molecular formula of CTX1 is $\text{C}_{60}\text{H}_{86}\text{O}_{19}$), which are lipid-soluble, tasteless, colorless, odorless, and thermostable (**Fig. 9**). In particular, it is produced by benthic dinoflagellates of the genera *Gambierdiscus* and *Fukuyoa*. Initially associated with isolated, fishing-dependent human island communities, PSC has spread rapidly geographically as a result of international trade and tourism. As a consequence, it is now the most widespread seafood poisoning in the world, affecting between 10,000 and 50,000 people every year in countries including Australia, Hawaii, the USA, Mexico, the Caribbean, Japan, Vietnam, India, Spain, Portugal, French Polynesia, Taiwan, and Cuba. It causes a range of symptoms affecting the gastrointestinal, neurological, and cardiac systems. Nevertheless, the number of reported deaths is relatively low (for further details, please refer to the reviews by Friedman et al. 2017, and Chinain et al. 2021).

To date, only two studies have investigated the effect of N on the production of toxins by *Gambierdiscus*, with a specific focus on the production of CTXs in *G. polynesiensis*. The influence of N source and N:P ratio on the cellular content of CTXs in *G. polynesiensis* remains inconclusive. However, evidence suggests that CTX accumulation may occur during the stationary growth phase (Lartigue et al. 2009; Longo et al. 2020). Once more, inter- and intraspecific variations in the production of these toxins are the norm (Lartigue et al. 2009). Furthermore, the source of N can alter the toxic profile. For example, urea has been demonstrated to promote diversification of

the CTX analogues produced by *G. polynesiensis*, with some of these analogues exhibiting increased toxicity (Longo et al. 2020). Nevertheless, these findings require further investigation with regard to other forms of N and additional species. Moreover, the function of CTXs in tropical and subtropical dinoflagellates belonging to the genus *Gambierdiscus* remains largely unresolved (for additional insights, see the review by Wang et al. 2022).

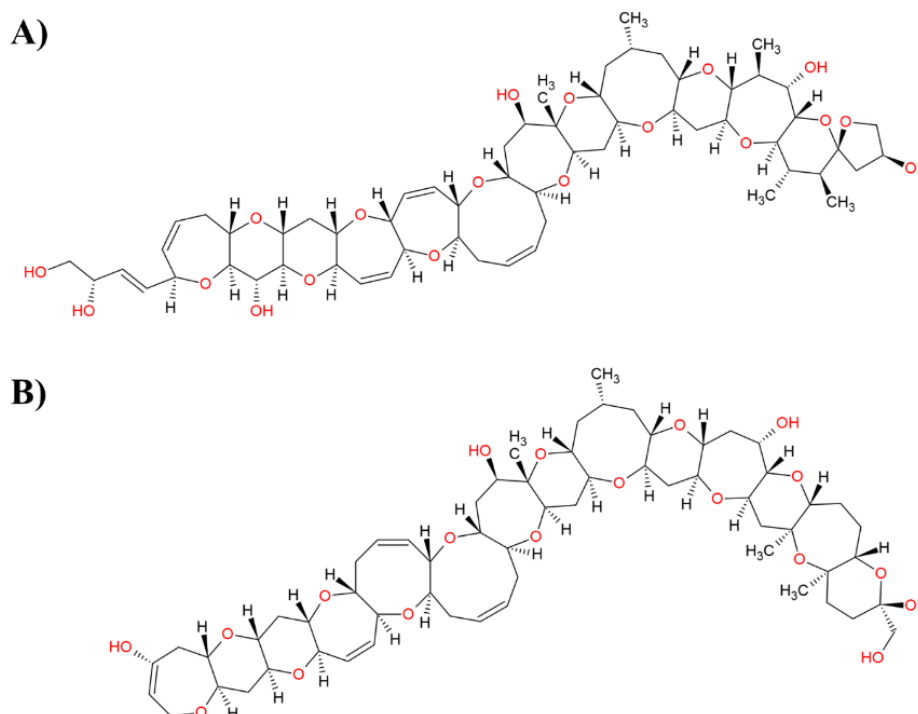


Fig. 69: Molecular structures of ciguatoxins (CTX). A) P-CTX-1. B) C-CTX-1.

Diarrheal poisoning by seafood and dinoflagellates

Okadaic acid, dinophysistoxins, pectenotoxins and the genera *Dinophysis* and *Prorocentrum*

Diarrhetic shellfish poisoning (DSP), first recorded in the Netherlands in 1961, is a globally distributed phenomenon, with documented cases in Europe, Japan, South America, Canada, Mexico, India, Thailand, China, and Australia. The consumption of seafood (seafood, fish) contaminated with okadaic acid (OA, $C_{44}H_{68}O_{13}$) and its analogues, dinophysistoxins (DTXs), thermostable and lipophilic polyesters (**Fig. 10A**), results in acute gastrointestinal disorders (for further information, see the review by Valdiglesias et al. 2013 and related articles). Additionally, other marine toxins are associated with DSP, including yessotoxins (YTXs) and pectenotoxins (PTXs) (**Fig. 10B,C**), which are more commonly referred to as diarrhetic shellfish toxins (DSTs) (Cetinkaya and Elal Mus 2012). First described in 1981 in the sponge *Halichondria okadai*, OA is primarily produced by dinoflagellates of the genera *Dinophysis* and *Prorocentrum*, as are its analogues. It inhibits certain protein phosphatases, which can result in a range of cellular and molecular alterations (for further details, please refer to the review by Valdiglesias et al. 2013 and related articles).

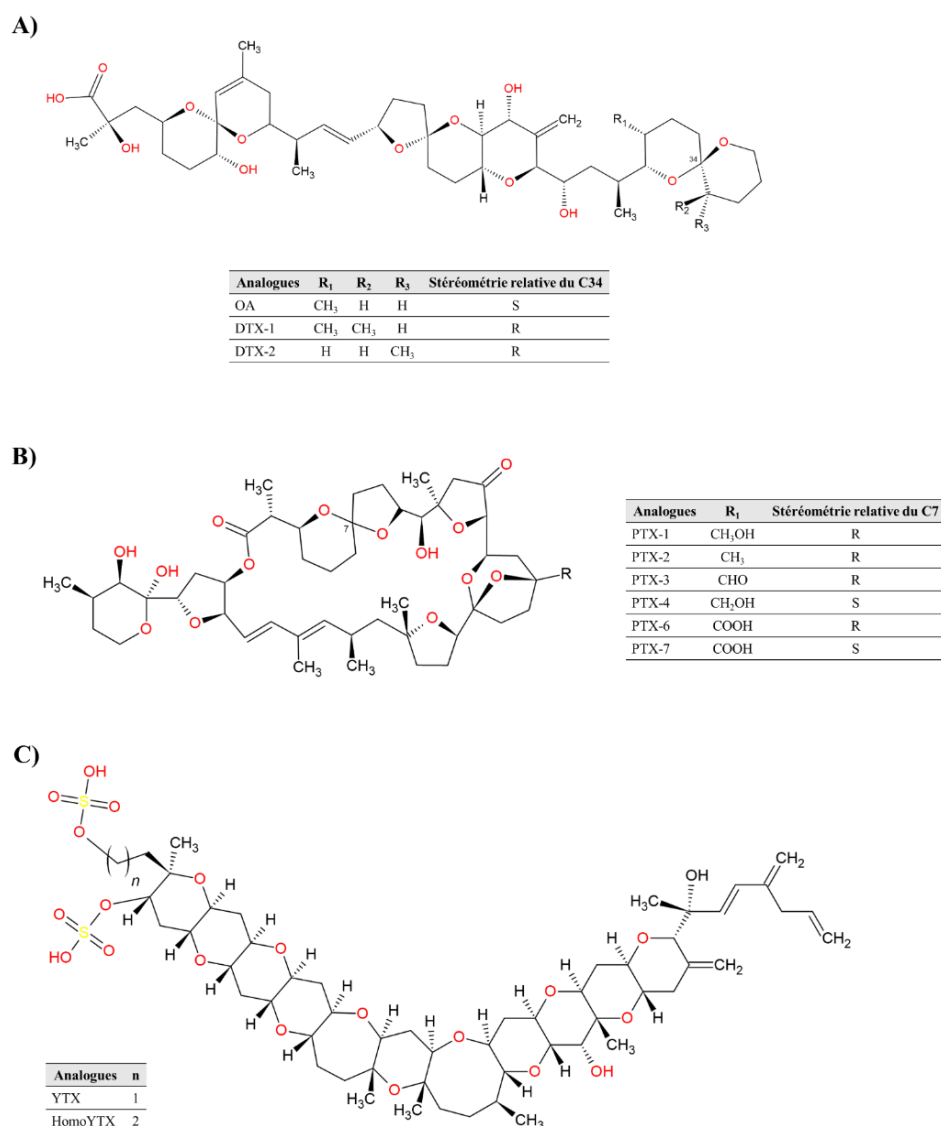


Fig. 70: Molecular structures of diarrhetic shellfish toxins (DSTs). A) Okadaic acid (OA) and its derivatives dinophysistoxins (DTXs). B) Pectenotoxins (PTXs). C) Yessotoxins (YTXs).

The genus *Prorocentrum*, most notably represented by the species *P. lima*, has been extensively investigated for its toxicity, though this phenomenon exhibits notable intra- and interspecific variabilities (for further insight, see the reviews by Lee et al. 2016, and Camacho-Muñoz et al. 2021). The ecological roles of OA and DTXs in *Prorocentrum* remain poorly understood. For instance, Gu et al. (2019) observed that OA production by *P. lima* increases in the presence of organisms such as *Artemia salina*, indicating that OA may play a role in preventing bruising. However, further studies are necessary to confirm this hypothesis. It is important to note that *P. lima* toxicity is not solely associated with OA production, but may also be linked to other compounds that have yet to be identified (Reguera et al. 2014).

The *Dinophysis* genus comprises a group of mixotrophic dinoflagellates that are capable of kleptoplasty, or the ability to recover and utilize the chloroplasts of their prey. Additionally, they are capable of producing a number of lipophilic toxins. OA, DTXs, and PTXs. While not all species of *Dinophysis* are inherently toxic, several DSP epidemics have been attributed to this genus worldwide, including in Chile, Europe, and Japan (see Reguera

et al. 2014). Historically, the toxicity of *Dinophysis* was not promptly acknowledged. Indeed, *Prorocentrum*, another toxic dinoflagellate, was erroneously identified as the causative agent of the initial DSPs, due to the dominance of this species in water sampling. The situation became further complicated following the identification of OA and DTXs in several *Prorocentrum* strains (see review by Reguera et al. 2014). Furthermore, the challenge of maintaining *Dinophysis* in culture (cryptophyte-ciliate-dinoflagellate cocultures are necessary) has contributed to the delayed demonstration of its toxicity (see review by Reguera et al. 2014). The ecological roles of DSTs in *Dinophysis*, like those of *Prorocentrum*, remain to be fully elucidated.

Prorocentrum sp. is capable of utilizing a variety of N sources, including NO_3^- , NH_4^+ , urea, and AAs, through distinct metabolic pathways. Despite the toxicity associated with NH_4^+ , this source of N is preferentially utilized (Pan et al. 1999; Lee et al. 2016). In contrast, *Dinophysis* is unable to assimilate NO_3^- , a phenomenon that García-Portela et al. (2020) postulate may result from an incomplete reduction and assimilation pathway. This hypothesis is corroborated by the observation of positive and negative correlations between NH_4^+ and NO_3^- concentrations on the one hand, and growth and total toxin content of *D. acuminata* on the other (Hattenrath-Lehmann et al. 2015). The uptake of different forms of N varies among species. *D. acuminata* has a greater capacity to absorb urea than NH_4^+ , while *D. acuta* has no preference for either form (García-Portela et al. 2020). The presence of specific AAs (Leu, valine, Lys, threonine, and serine) has been observed to increase cellular OA content in *P. lima* by up to 2.2-fold, indicating that these AAs may play a role in OA biosynthetic pathways in this species (Souto et al. 2001).

The existing literature indicates a consensus that the concentration and nature of the N (and also P) source exert an influence on the production of DTXs in *Prorocentrum*. However, early studies have identified a constant cell growth-dependent production of OA and DTX-1 when *Prorocentrum* is cultivated under NO_3^- (Morlaix and Lassus 1992; McLachlan et al. 1994). These toxins accumulate during the stationary phase when induced by N as well as P depletion (McLachlan et al. 1994; Varkitzi et al. 2010; Vanucci et al. 2010; Hou et al. 2016; Gu et al. 2019; Lee et al. 2020). Nevertheless, a minimum initial concentration of NO_3^- is necessary to initiate the enzymatic pathway(s) associated with DST production (McLachlan et al. 1994). It is noteworthy that Vanucci et al. (2010) observed a significant increase in cellular OA content and a non-significant increase in DTX-1 content in a NO_3^- -limited *Prorocentrum* culture. However, this ratio varies between species, with *P. hoffmannianum* unable to produce DTX-1 and containing non-toxic strains (Lee et al. 2020). The form of N nutrients is also a significant factor influencing the production of DSTs. Indeed, the cell contents of OA are demonstrably lower when the organism is grown with NH_4^+ than when it is grown with NO_3^- . This is likely due to the inhibitory effect of NH_3 formation on the growth and metabolism associated with the production of this toxin. In contrast, urea presents an intermediate profile (Varkitzi et al. 2010; Gu et al. 2019). Furthermore, Pan et al. (1999) postulated that the elevated demand for reducing power necessary for the reduction of NO_3^- to NH_4^+ may enhance phosphorylation, thereby supplying the high-energy phosphorylated compounds essential for the biosynthesis of this phycotoxin. The precise impact of N or P deficiencies on DST production remains a topic of ongoing debate. Lee et al. (2020) propose an indirect mechanism whereby these nutrient limitations influence the cell cycle, thereby affecting DST production.

The necessity of utilizing a coculture system and the presence of kleptoplasty in *Dinophysis* render the investigation of the impact of N sources on its toxicity a challenging endeavor. As demonstrated by Nielsen et al.

(2013), the production of DSTs appears to correlate with the growth rate, provided that organic substrates are in plentiful supply. This is because toxins tend to accumulate within the cells and the surrounding medium when they reach their limit of exhaustion. The presence of Glu has been observed to increase cellular quotas of DTX-1, OA, and PTXs in *D. acuminata*, with levels 80, 60, and 40% higher, respectively, than their initial levels. This effect may be a consequence of an increase in growth rate (Hattenrath-Lehmann et al. 2015). Although NO_3^- cannot be consumed by *Dinophysis* and therefore cannot directly affect its toxin production, a high concentration of this substrate can nevertheless cause toxins to accumulate in the medium. For example, NO_3^- has been observed to promote the development of *D. acuminata* prey capable of assimilating it, such as *Mesodinium rubrum*. This, in turn, has been shown to increase toxin production in *D. acuminata* (Tong et al. 2015), notably through an increase in its growth rate (Nielsen et al. 2013). This does not preclude the possibility that some prey may induce toxicity, as postulated by Nagai et al. (2011). They observed an increase in toxins in the environment concomitant with that of cellular debris and organic substances from a prey such as *Myrionecta rubra* and hypothesize that one or more allelopathic compounds from *Microcystis* prey may promote toxin production.

Yessotoxins and the dinoflagellate *Protoceratium reticulatum*

The first isolation of YTXs was in Japan in 1987 from the scallop *Patinopecten yessoensis*. These compounds are highly cytotoxic disulfated polycyclic ethers that are structurally related to CTXs and brevetoxins (PbTx), although they are categorized with DSTs. They have been identified primarily in the dinoflagellates *Protoceratium reticulatum*, *Lingulodinium polyedrum*, and *Gonyaulax spinifera* (for further details, please refer to the reviews by Paz et al. 2008, and Alfonso et al. 2016).

To the best of our knowledge, only *Protoceratium reticulatum* has been the subject of studies examining the impact of N on the production of YTXs. The results of these studies are dependent on the methodology employed for the cultivation process. Gallardo Rodríguez et al. (2009) demonstrated that NO_3^- can positively influence the cell content of YTXs in semi-continuous cultures, in contrast to PO_4^{3-} , but that excessive NO_3^- has no effect. In contrast, Guerrini et al. (2007) observed that NO_3^- limitation had a minimal impact on the cellular quota of *P. reticulatum* YTXs in discontinuous cultures, yet it increased the proportion of extracellular YTXs, likely due to elevated cell lysis. The discrepancy in results is challenging to elucidate, particularly given the difficulty in differentiating between a potential increase in toxin synthesis driven by N limitation and an elevated release of toxins into the environment due to cell lysis, which is favored by N limitation (Gallardo Rodríguez et al. 2009).

Brevetoxins and *Karenia brevis* species

PbTx are fat-soluble, thermostable polycyclic polyethers produced by the dinoflagellate *Karenia brevis*, with a molecular structure similar to CTXs (**Fig. 11**). Neurotoxic shellfish poisoning (NSP) results from the consumption of contaminated shellfish and presents with a range of symptoms, including nausea, vomiting, diarrhea, paresthesia, cramps, bronchoconstriction, paralysis, convulsions, and coma. NSP may also result from inhalation of the aerosolized neurotoxin, PbTx, and/or contact with the skin or mucous membranes. While cases of NSP have been documented in the Gulf of Mexico, the East Coast of the USA, and New Zealand, there is a risk of its spread to other regions of the world (for further details, see Fleming et al. 2011, and Hort et al. 2021).

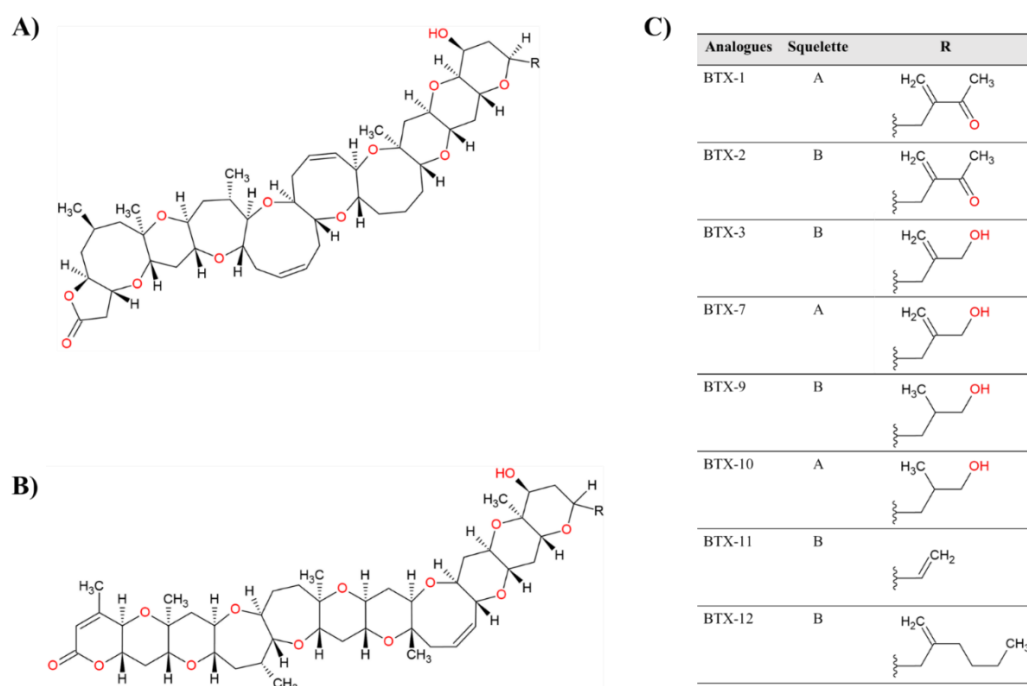


Fig. 71: Molecular structures of brevetoxins (PbTx). A) and B) skeletons; C) table of analogues

Karenia brevis is a dinoflagellate that produces PbTx, the main form of which is PbTx-2 (C₅₀H₇₀O₁₄) (Fleming et al. 2011; Corcoran et al. 2014). Additionally, this species exerts negative allelopathic effects on competing diatoms (*Asterionellopsis glacialis* and *Thalassiosira pseudonana*), resulting in physiological detriments that vary depending on the target. For example, *A. glacialis* appears to exhibit greater resilience than *T. pseudonana*, which may be attributed to its more advanced defense mechanisms, as it is more frequently encountered in conjunction with *K. brevis* (Poulson-Ellestad et al. 2014). Nevertheless, no correlation could be identified between these observations and PbTx production.

The literature on the impact of N on the production of PbTx is inconclusive. The former study indicated that there was no significant effect (Lekan and Tomas 2010), whereas the latter study emphasized the existence of a causal relationship (Ransom Hardison et al. 2012; Corcoran et al. 2014). In their study, Corcoran et al. (2014) employed continuous cultures to demonstrate that the cellular PbTx content is independently dependent on both the growth rate and the N concentration in the turnover medium. To this end, chemostat cultures were employed, and a series of dilution rates in conjunction with distinct N:P ratios of the renewal medium were evaluated. A two-fold reduction in dilution rate resulted in a 2.5- to 5-fold increase in cellular toxin content, whereas a lower N:P ratio induced N stress and reduced cellular toxins by approximately a third in comparison to the Redfield ratio, across all dilution rates. These findings are inconsistent with those of Ransom Hardison et al. (2012), who demonstrated that N limitation increases cellular PbTx content and decreases growth rate and cell volume using semi-continuous cultures. The absence of N in PbTx would permit a greater allocation of C to its biosynthesis during N limitation, in accordance with the C-nutrient balance hypothesis (or CNBH) proposed by Ransom Hardison et al. (2012). It is also important to note that discrepancies between these studies may be due to differences in data normalization. For example, normalization by cell concentration or biovolume can significantly impact the interpretation of results. Additionally, the use of different culture modes (batch, fed-batch, continuous)

can result in varying toxin monitoring, as the physiology of photosynthetic microorganisms is subject to change over time.

Karlotoxins and the dinoflagellate *Karlodinium veneficum*

Karlotoxins (KmTx) are polyketide toxins (**Fig. 12**) with hemolytic and cytotoxic properties. They are similar to ichthyotoxins, which have been classified as prymnesins (Deeds et al. 2002, 2015; Place 2002). They are produced by the mixotrophic dinoflagellate *Karlodinium veneficum* (Place et al. 2012). It is hypothesized that their ecological role is anti-grazing, inhibiting competitors and/or aiding prey capture (Adolf et al. 2006, 2007).

The effect of concentration and N source on karlotoxin production by *K. veneficum* has been the subject of only a limited number of studies. Nevertheless, (Adolf et al. 2009) demonstrated that NH_4^+ enhances the intracellular concentration of KmTx-1 ($\text{C}_{69}\text{H}_{126}\text{O}_{24}$) in *K. veneficum* CCMP 1974 by a factor of 2-3 relative to NO_3^- or urea, without affecting growth. However, this was not demonstrated in the CCMP 2064 strain, where urea increased cellular KmTx-2 ($\text{C}_{67}\text{H}_{121}\text{ClO}_{24}$) content by a factor of 2 to 3 compared with other N sources. The accumulation of KmTx is primarily observed during the stationary phase, exhibiting a negative correlation with the growth rate (Adolf et al. 2009). It is important to note that the ingestion of cryptophytes has been observed to promote the initiation of *K. veneficum* blooms and increase their toxicity to filter-feeding organisms such as the oyster *Crassostrea virginica*. The mixotrophic uptake of organic sources by dinoflagellates may therefore also be a factor in increasing toxicity, and should be taken into greater consideration.

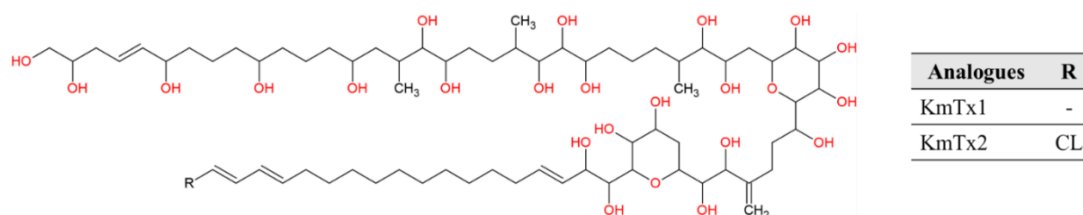


Fig. 72: Structures moléculaires des karlotoxines (KmTx).

Allelopathy and nitrogen

In recent years, the resurgence of HABs and their impact on the economy and human health has prompted a surge in research endeavors aimed at identifying the organisms responsible for their emergence, the toxic compounds they produce, and the environmental conditions that facilitate their proliferation (Wells et al. 2020). The enrichment of water with N compounds, a consequence of human activities, has been identified as a contributing factor to the increased prevalence of HABs (Howarth 2008). A number of molecules (and their derivatives) responsible for poisoning have been identified and characterized (Cusick and Sayler 2013). As previously discussed, the various studies conducted report disparate toxin production rates depending on the species, strain, and molecular structure of the toxins produced, as well as a range of variables, notably N. This highlights the necessity for further research to gain a deeper understanding of the dynamics of toxin production and their underlying physiological mechanisms.

However, the toxicity of photosynthetic microorganisms has been paradoxically reduced to the various known toxin families, with one species often associated with one or two toxin families. Moreover, the ecological roles of these toxins remain to be elucidated, despite the numerous potential avenues of research. The toxicity

responses of organisms, including humans, may be a mere fortuitous consequence of the evolution of the toxin-producing microorganism. The function of toxins selected by evolution may be totally different from an allelopathic property. For example, Long et al. (2021) cite the presence of uncharacterized bioactive extracellular compounds (BECs) in *Alexandrium*, whose activity is frequently associated with PSTs. To date, only one BEC with potential allelopathic properties, designated as alexandrolide, has been identified in *A. catenella* (Satake et al. 2019).

It is therefore evident that there are as yet unknown allelopathic compounds in toxic phytoplankton whose production dynamics may depend on environmental factors, including N (Granéli et al. 2008). To the best of our knowledge, three groups include examples of BECs whose production varies according to the source and/or concentration of N in the environment (see below).

The case of volatile organic compounds in *Microcystis cyanobacteria*

While *Microcystis* is primarily recognized for its production of MCs, other potentially toxic compounds are postulated to be present in this species. However, the molecular structures of these compounds remain unknown (Falconer 2007). For example, *Microcystis* extracts have been found to contain polymethoxy-1-alkenes (PMAs), which have been demonstrated to possess teratogenic properties on zebrafish (*Danio rerio*) embryos (Jaja-Chimedza et al. 2012). Additionally, these extracts have been shown to exhibit antibacterial activity against a range of bacterial species, including *Bacillus subtilis*, *Bacillus cereus*, *Aeromonas hydrophila*, and *Escherichia coli* (Ostensvik et al. 1998). Additionally, allelopathic interactions of reciprocal inhibition of cell growth have been identified between *Microcystis* sp. and *Peridinium gatunense*. These interactions are dependent on cell density and appear to be independent of nutrients (Sukenik et al. 2002; Vardi et al. 2002).

Additionally, *M. aeruginosa* and *M. floe-aquae* have the capacity to produce volatile organic compounds (VOCs), some of which have been demonstrated to possess toxic properties towards other organisms, including macro- and microalgae (Hasegawa et al. 2012; Xu et al. 2017; Zuo et al. 2018). There are numerous molecular families of VOCs, including furans, sulfo-compounds, terpenoids, benzenes, hydrocarbons, aldehydes, and esters (Xu et al. 2017; Zuo et al. 2018)¹. Furthermore, the emission of these VOCs is contingent upon environmental variables, as fluctuations in the source and concentration of nutrients give rise to alterations in the production and composition of VOCs. Emissions are observed to increase when NO₃⁻ content is low or non-existent (Xu et al. 2017; Zuo et al. 2018). It is noteworthy that P limitation induces analogous effects (Ye et al. 2018).

The VOCs produced by N-deficient cultures of *M. floe-aquae* also exert significant effects on cultures of the green microalga *Chlorella vulgaris*. These effects include a reduction in cell density, chlorophyll *a* and *b* content, and photosynthetic activity, specifically the maximum quantum yield of PSII photochemistry (Fv/Fm) (Xu et al. 2017). Xu et al. (2017) and Zuo et al. (2018) attributed this bioactivity to the compounds D-limonene and eucalyptol present in the VOCs of *M. floe-aquae* and *M. aeruginosa*, each of which has the capacity to inhibit

¹ Examples of these compounds include bis(1-methylethyl) disulfide (C₆H₁₄S₂, CAS: 4253-89-8), D-limonene (C₁₀H₁₆, CAS: 5989-27-5), eucalyptol (C₁₀H₁₈O, CAS: 470-82-6), β-Cyclocitral (C₁₀H₁₆O, CAS: 432-25-7), longifolene (C₁₅H₂₄, CAS: 475-20-7), 1H-1-methylene-indene (C₁₀H₈, CAS: 2471-84-3), (Z)-3-dodecene (C₁₂H₂₄, CAS: 7239-23-8), tetradecane (C₁₄H₃₀, CAS: 629-59-4), and 1,2-benzenedicarboxylic acid bis(2-methylpropyl) ester (C₁₆H₂₂O₄, CAS: 84-69-5).

pigment production (Chl *a* and *b*, carotenoids), non-photochemical quenching, and electron transport within the PSII photosystem of *C. vulgaris*. As observed by Zhao et al. (2016), the bioactivities of these molecules on *C. vulgaris* increase with their concentrations. Furthermore, the concentration of D-limonene in *M. floe-aquae* increased threefold under N-depleted conditions, which corroborates the higher bioactivity of VOCs on *C. vulgaris* (Xu et al. 2017). However, no variation in the effect of eucalyptol was observed between the different N conditions. The concentration of this compound remained high regardless of condition (Xu et al. 2017; Zuo et al. 2018). Eucalyptol and limonene are also known for their antibacterial properties, but they also exhibit various other properties of interest in pharmacology (Kazyoba and Viljoen 2008; Cai et al. 2021). Others VOCs, including β -Cyclocitral, methyl isopropyl disulfide, and bis(1-methylethyl), which increase with decreasing N levels, may play a role in allelopathic interactions (Hasegawa et al. 2012; Zuo et al. 2018). Moreover, N limitation has been observed to induce the positive expression of genes encoding malic enzyme, pyruvate kinase, and phosphotransacetylase, all of which are involved in the biosynthetic pathway of the aforementioned toxic compounds (Zuo et al. 2018).

In addition to VOCs, the interaction between *Anabaena* and *Microcystis* cells or filtrates has been observed to inhibit the growth and ATX-A production of *Anabaena*, with the inhibition rates increasing as the N concentration and decreasing as the P concentration rise (Chia et al. 2018). While the MC content of *Microcystis* exhibits a similar dynamic, it is possible that other compounds with allelopathic properties are involved (Chia et al. 2018).

These findings illustrate the necessity of considering the full range of molecules excreted into the external environment by a given species to comprehend its toxic impact, as well as the influence of N conditions in the environment to elucidate and address cyanobacterial proliferation.

The case of the hemolytic activity of the haptophyte *Prymnesium parvum*

Prymnesium parvum is a mixotrophic freshwater haptophyte that produces two hemolytic polyoxy-polyene-polyesters, prymnesins 1 and 2, which are toxic to humans and other animals (see review by Granéli and Salomon 2010). The occurrence of this species' blooms appears to be contingent upon the N:P ratio, while its toxicity is influenced by both biotic factors (genes, growth phase, cell density, associated bacteria) and abiotic factors (light, temperature, salinity, pH, culture aeration, N:P ratio, source and concentration of macronutrients) (see review by Granéli and Salomon 2010).

Johansson and Granéli (1999) were the first to observe an increase in hemolytic activity (expressed as saponin equivalents per cell) when moving away from the Redfield ratio (N:P = 16:1) to reach N or P limitation. This observation was later confirmed by Barreiro Felpeto et al. (2005) and Uronen et al. (2005). The hemolytic activity of *P. parvum* towards *R. salina* in semi-continuous cultures appears to be contingent upon both the N:P ratio and cell density (Uronen et al. 2005). Other studies, however, have demonstrated that there is no increase in hemolytic activity when P-limited, but rather a decrease when N-limited (Carvalho and Granéli 2010). Furthermore, filtrates from N- or P-limited cultures of *P. parvum* have been observed to possess toxic activity against *Thalassiosira weissflogii*, *Prorocentrum minimum*, *Rhodomonas* cf. *baltica*, and *Artemia salina*. However, no hemolytic activity was observed against another *Prymnesium* species, *P. patelliferum*, which is also capable of producing prymnesins. This suggests the existence of resistance mechanisms to this toxin in the organisms that

produce it (Granéli and Johansson 2003). The mathematical model of Chakraborty et al. (2008), which is based on the work of Granéli and Johansson (2003), predicts that nutrient limitation favors toxic phytoplankton species, which then exert negative control over non-toxic phytoplankton species. *P. parvum*'s mixotrophy allows it to overcome N limitation through heterotrophy, whereby it phagocytoses cell debris, senescent cells, or prey. However, the nutritional status of the prey (*Rhodomonas salina*) appears to have a minimal effect on *P. parvum* toxicity. The hemolytic activity of the parasite decreases when *R. salina* is N- or P-limited, but not when the N:P ratio is low (Lundgren et al. 2016). The capacity of *P. parvum* to utilize a range of nutrient sources (including N), both organic and inorganic, renders the problem of eutrophication in aquatic ecosystems due to wastewater input particularly challenging (Lindehoff et al. 2009). Indeed, the addition of excess nutrients from wastewater (such as fertilizers) has been observed to increase the growth of *P. parvum* without a corresponding increase in toxicity (Kurten et al. 2007). However, in the event of an exclusive supply or total consumption of N or P, which may result in alterations to the N:P ratio and cause limitation, its toxicity increases (Lindehoff et al. 2009). An increase in toxicity, when coupled with a high cellular concentration in the affected waters, can lead to significant changes in the structure of freshwater ecosystems and/or an increase in the risk of contamination.

Nevertheless, studies that appear to demonstrate the existence of toxic compounds with non-hemolytic properties challenge the established link between prymnesins and toxicity in *P. parvum* (Skovgaard and Hansen 2003; Barreiro Felpeto et al. 2005; Uronen et al. 2005). Indeed, culture filtrates of this species that are toxic to its prey, *R. salina* (cryptophyte) and its predator, *B. plucatilis* (rotifer), showed no measurable hemolytic activity. This suggests either that concentrations of hemolytic compounds are below detection limits or that non-hemolytic toxic compounds are present (Barreiro Felpeto et al. 2005; Uronen et al. 2005). The toxicity of *P. parvum* towards *R. salina* and *B. plucatilis* is also accentuated by N limitation (Barreiro Felpeto et al. 2005). However, other studies indicate a decrease in the negative allelopathic effects of N deficiency on *Rhodomonas*, but an increase in P deficiency (Beszteri et al. 2012).

In other respects, *P. parvum* has been observed to exert a range of allelopathic effects on diverse organisms, including phytoplankton, ciliates, and bacteria. However, the attribution of these effects to a specific molecule or group of molecules remains to be demonstrated. Additionally, *P. parvum* plays a significant role in the dynamics of freshwater ecosystems (Fistarol et al. 2003). Indeed, *P. parvum* is purported to excrete compounds that can immobilize and/or lyse prey (Skovgaard and Hansen 2003) or predators (Tillmann 2003) when conditions are favorable. Other authors have proposed that numerous unsaturated fatty acids and galactoglycerolipids, particularly stearidonic acid (along with other as yet uncharacterized compounds), are associated with the ichthyotoxic activity of this haptophyte (Henrikson et al. 2010). The allelopathic properties of *P. parvum* may also exert an indirect influence on the microbial loop. The release of dissolved organic C following the lysis of *Rhodomonas salina* cells, which is promoted by the action of as yet unidentified allelopathic compounds produced by *P. parvum*, would stimulate the growth of bacteria that are consumed by *P. parvum* (Uronen et al. 2007).

Consequently, ascribing a toxic activity (in this case, hemolytic activity) to a particular toxin without evaluating its variations or the presence of other pertinent compounds may result in biased conclusions regarding the impact of environmental variations on the diversity and production of molecules involved in toxicity phenomena.

The case of N-dependent allelopathic activity in *Synechococcus*

The genus *Synechococcus* is a group of picocyanobacteria that are ubiquitous in all the world's oceans and among the oldest known organisms. This genus has been the subject of considerable research interest due to its role in oceanic primary production and a strong adaptive capacity conferred by phycobilisomes, which are essential pigment-protein complexes of their photosynthetic apparatus (for further details, see the review by Callieri 2017).

While *Synechococcus* sp. BA-124 is not known to produce toxins, it has been observed that the filtrate from a culture of this species inhibits the growth of the diatoms *Bacillaria paxillifer* and *Skeletonema marinoi*, as well as the green alga *Chlorella vulgaris*. This decrease is accompanied by a reduction in the maximum quantum efficiency of PSII and photosynthetic capacity, with varying degrees of impact depending on the target. Furthermore, this allelopathic activity is observed to decrease when *Synechococcus* is N-limited (Śliwińska-Wilczewska and Latała 2018). The discovery of allelopathic activities in such a widespread taxon would significantly enhance our understanding of ocean ecosystems.

Observations

The effects of N on the production of toxic or allelopathic compounds have yielded disparate qualitative and quantitative results, contingent on the organism under examination. Moreover, genera such as *Raphidiopsis*, *Alexandrium*, *Microcystis*, *Ostreopsis*, *Pseudo-nitzschia*, and *Prorocentrum* have been the subject of extensive research in comparison to other groups. While trends in N response have been observed in certain species, such as *Alexandrium*, the significant intra- and interspecific heterogeneity of responses precludes the drawing of conclusions in the majority of cases studied. Furthermore, the existence or absence of toxicity in strains of the same species remains an unexplained observation.

The diversity of approaches used may partly explain this heterogeneity. The use of indirect methods of toxin analysis, such as the measurement of hemolytic activity, may not be representative of actual variations in the toxin studied. Therefore, techniques for direct analysis of toxin content and toxic profile are required. Furthermore, the way in which measurements are normalized, whether by cell concentration, biovolume, culture volume, or biomass, can lead to differing interpretations. For example, Pierangelini et al. (2015) demonstrated that the use of intracellular volumetric concentration is a more representative measure of CYN production in *Raphidiopsis* than the use of quantity per unit freeze-dried dry weight, as proposed by Saker and Neilan (2001). Furthermore, the consideration of cellular toxin content alone has the potential to introduce bias in the conclusions drawn. Indeed, one N source may induce an accumulation of toxins in the cells compared to another source, yet simultaneously reduce cell density. This phenomenon has been postulated in the context of *Pseudo-nitzschia* (Bates et al. 1993; Hillebrand and Sommer 1996; Pan et al. 1998). Therefore, it can be posited that low-toxicity but abundant cells may present a greater risk to the environment and humans than high-toxicity but low-abundance cells. It is therefore essential to consider the dynamics of growth and production of toxic compounds in HAB phenomena, regardless of whether they are associated with eutrophication. Furthermore, there is a dearth of studies that examine the different compartments of toxin accumulation (intra- and extracellular environments), with the majority focusing on the intracellular concentration of toxins. To the best of our knowledge, only a few studies have

investigated the fluctuations of toxins between different compartments as a function of N variations¹. This paucity of information makes it challenging to comprehend the dynamics of toxin release, both active and passive (including cell lysis), into the environment as a function of N conditions.

In order to interpret the dynamics of toxin production and accumulation in cells and in the environment as a function of N conditions, it is essential to consider the estimation of total, intracellular, and extracellular toxicity, as well as the use of several types of data normalization, notably by cell concentration, biovolume, and culture volume. A more comprehensive grasp of the mechanisms underlying N uptake and utilization in the biosynthetic pathways of these toxins, for instance through the use of ¹⁵N labeling of the N source (Sano et al. 2011; Harke and Gobler 2015), can facilitate a deeper understanding of the functioning of these microorganisms. Furthermore, studies by Wu et al. (2015), Yan et al. (2015), and Cho et al. (2019) have contributed to our understanding of the expression of associated DNA sequences, which in turn has facilitated a deeper comprehension of the functioning of these microorganisms.

As demonstrated by Van de Waal et al. (2014, 2015), the synthesis of N-rich toxins is contingent upon the concentrations of N and P in the surrounding environment. However, the results of studies on the relationship between cell stoichiometry and toxicity vary considerably depending on the species, strain, and N content of the toxins under investigation. This heterogeneity indicates that cell stoichiometry is an inadequate explanation for the determinism of toxicity. It is therefore necessary to study the N proteome and metabolome simultaneously. It would be reasonable to assume that N limitation would impact all N compounds in the cell. However, the allocation of N resources within the cell is not necessarily homogeneous, as it depends on a multitude of parameters, both environmental and evolutionary. For example, the biosynthesis of an N-rich toxin could, in the event of N limitation, still be favored at the expense of other nitrogenous metabolites if the function of this toxin has been selected to respond to N stress.

The ecological roles of the aforementioned toxins remain largely unknown. A number of studies have provided evidence to support the hypothesis that these toxins play an allelopathic role in repelling grazers (e.g. Guisande et al. 2002; Frangópulos et al. 2004; Adolf et al. 2007; Selander et al. 2008; Murata et al. 2012; Antunes et al. 2015; Griffin et al. 2019; Gu et al. 2019; Colas et al. 2021; Brown et al. 2022; Christou et al. 2023). However, other hypotheses have been put forth, including the possibility of their involvement in pheromone functions, N storage, and environmental detoxification (see Hall 1982; Wyatt and Jenkinson 1997; Pomati et al. 2004; Schatz et al. 2007; Trainer et al. 2012; Antunes et al. 2015; Vico et al. 2016; Brentano et al. 2016; Hii et al. 2016). A number of authors have proposed that the hypothesis of a physiological role should be preferred over that of an allelopathic one (e.g. Hall 1982; Trainer et al. 2012; Zabaglo et al. 2016; Hii et al. 2016). The toxicity of these molecules may therefore be regarded as a secondary property resulting from their molecular structure, rather than

¹ The studies by Chen et al. (2019) and Yang et al. (2022) examine the production of MCs by *Microcystis aeruginosa*, while the studies by Yang et al. (2018) and Preußel et al. (2014) investigate the production of CYN by *Raphidiopsis raciborskii* and *Aphanizomenon* sp. In addition, Guerrini et al. (2007) and Gallardo Rodríguez et al. (2009) investigated the production of YTXs by *Protoceratium reticulatum*, while Gagnon and Pick (2012) examined the production of ATX-A by *Aphanizomenon issatschenkoi*.

as a selected or under selection trait. The hypothesis of an exaptation of their initial function towards a new function, whether from a physiological function towards an allelopathic function or vice versa, must be taken into account. This hypothesis is corroborated by the study conducted by Rantala et al. (2004), which illustrates that the common ancestor of microcystin-producing cyanobacteria preceded metazoans (and, consequently, grazing copepods).

The question thus arises as to how we might explain the toxicity of these species' exudates. As previously stated, the diversity of toxic molecules has been insufficiently investigated due to the fact that the toxic character of a microalga or cyanobacterium is attributed to one or two families of toxins that are already known. This reduction in the possible origins of a given strain's toxicity has been described in detail in the case of *Alexandrium*, for example, in the review by Long et al. (2021). In this review, numerous as yet uncharacterized BECs have often been attributed to STX and its analogues. The potential diversity of toxic molecules is likely the result of the varying responses of microalgae to environmental fluctuations, such as N source or concentration, due to their distinct molecular structures and/or biosynthetic pathways involved. This phenomenon has been observed in cyanobacteria of the *Microcystis* genus, where the production of VOCs with toxic properties towards *C. vulgaris* exhibits a correlation with N concentration (Xu et al. 2017; Zuo et al. 2018).

The preceding chapters provide an exhaustive account of groups of toxins and other bioactive compounds, potentially allelopathic, for which an effect of the N source and/or its concentration has been demonstrated, or not, as the case may be. It should be noted, however, that the variety of bioactive compounds produced is not limited to the toxins mentioned above. In the other oxygenic photosynthetic microorganisms mentioned above, several studies have identified the presence of additional bioactive compounds. For example, the filtrates of non-toxic *Raphiopsis raciborskii* strains have been observed to exert various negative effects on *Microcystis aeruginosa* (Figueredo et al. 2007; Mello et al. 2012; Rzymiski et al. 2014). Furthermore, the following strains have been demonstrated to have the capacity to exert an allelopathic effect: *Coelastrum sphaericum*, *Monoraphidium contortum*, *Microcystis wesenbergii* (Figueredo et al. 2007) and *Ankistrodesmus falcatus* (Antunes et al. 2012). Furthermore, numerous strains have been demonstrated to exhibit ecotoxicity in the shrimp *Thamnocephalus platyurus* (Ács et al. 2013), as well as in the crustacean *Daphnia magna* (Nogueira et al. 2006; Ács et al. 2013). Furthermore, the strains have been observed to exert negative effects on *Danio rerio* (zebrafish) embryos (Ács et al. 2013; Jaja-Chimedza et al. 2015), as well as induce oxidative stress in human neutrophils (Rzymiski et al. 2017). Similarly, methanolic extracts have demonstrated antibacterial properties against *Bacillus subtilis*, *Bacillus cereus*, and *Aeromonas hydrophila* (Ostensvik et al. 1998). These compounds remain largely unstudied, although PMAs have been identified in *C. raciborskii*, which may play a role in these allelopathic interactions (Jaja-Chimedza et al. 2015). The biosynthesis of these compounds also appears to be contingent upon environmental conditions, including cell density, light, temperature, and nutrient availability (Leão et al. 2009; Antunes et al. 2012). In *Aphanizomenon gracile*, exudates induce oxidative stress on human neutrophils (Rzymiski et al. 2017), and antibacterial activities have been observed against *Bacillus subtilis*, *Bacillus cereus*, *Aeromonas hydrophila*, and *Escherichia coli* from diffusion assays (Ostensvik et al. 1998), while *A. ovalisporum* produces PMAs that are teratogenic to zebrafish (*Danio rerio*) embryos (Jaja-Chimedza et al. 2012). Furthermore, the effects of as yet unidentified toxic compounds have been observed on the crustacean *Daphnia magna* (Nogueira et al. 2006). The α,γ -diaminobutyric acid, an isomer of the neurotoxic AA β -N-methylamino-L-alanine (BMAA), has also been identified in a Polish strain of *A. gracile* (Rzymiski et al. 2017). Additionally, the C-terminal fragment of the

neurotoxic BMAA has been identified in a Polish strain of *A. gracile* (Rzymiski et al. 2017). The presence of allelopathic compounds has been observed to promote the production of alkaline phosphatase, an enzyme that transforms unusable organic PO_4^{3-} into assimilable inorganic PO_4^{3-} , in other photosynthetic organisms (*Chlamydomonas reinhardtii*, *Debarya* sp.). This phenomenon has been documented in environments where the concentration of inorganic PO_4^{3-} is low. Additionally, genetic modifications have been observed in a toxic strain of *A. ovalisporum* that result in alterations to the genes involved in the assimilation of inorganic PO_4^{3-} . Furthermore, the environment is deficient in inorganic PO_4^{3-} , and a modification of the genes involved in the assimilation of inorganic PO_4^{3-} has also been observed in a toxic strain of *A. ovalisporum* (Bar-Yosef et al. 2010). In addition to the aforementioned VOCs, other toxic compounds are suspected in *Microcystis*, but their molecular structures remain unknown (Falconer 2007). For example, *Microcystis* extracts contain PMAs with teratogenic properties on zebrafish (*Danio rerio*) embryos (Jaja-Chimedza et al. 2012), but also exhibit antibacterial activities on *Bacillus subtilis*, *Bacillus cereus*, *Aeromonas hydrophila*, and *Escherichia coli* (Ostensvik et al. 1998). Additionally, allelopathic interactions of reciprocal inhibition of cell growth have been identified between *Microcystis* sp. and *Peridinium gatunense*. These interactions are dependent on cell density and appear to be independent of nutrients (Sukenik et al. 2002; Vardi et al. 2002). The origin of these bioactivities remains unknown. However, they are the result of a multitude of compounds, the study of which is necessary for a better understanding of ecosystem functioning and for applications in the pharmaceutical and nutraceutical fields.

Future research into the effects of N on the production of bioactive compounds in microalgae and cyanobacteria, whether toxins and/or BECs, will necessarily have to take into account standardized and consistent bioassays. These bioassays should involve: (i) biological targets from the same ecosystem with the aim of identifying a potential allelopathic interaction, or (ii) biological models that are sufficiently well known to enable the mechanisms of action of these molecules to be understood. Furthermore, understanding the ecological roles of these bioactive compounds is essential to grasping the complexity of interactions between these organisms. The use of high-throughput techniques such as metabolomics and proteomics can also help identify new molecules involved in microalgae toxicity.

Conclusion

The source of N and its concentration in the medium, as well as the N:P and N:C ratios, exert diverse effects on toxin production in oxygenic photosynthesizing microorganisms. This diversity, which is reflected in the molecular structure of toxins, varies depending on the species and strain under study. To enhance the prevention of HABs, further research is required on N and toxin metabolism, from N uptake to the functioning of the toxin-associated biosynthetic pathway.

The ecological roles of these toxins remain poorly understood, necessitating further research to elucidate the benefits they may have conferred upon different microalgal species throughout their evolutionary history. A deeper comprehension of their current and/or historical functions will facilitate a more nuanced understanding of the utilization of N for their biosynthesis. Moreover, the function(s) of a specific toxin may emerge from selective pressures that diverge from those that favor N uptake in a given environmental context. When assessing a strain's toxicity, it is essential to consider the potential presence of other, as yet uncharacterized, bioactive compounds.

In future studies examining the impact of N on the production of toxins and/or allelopathic compounds in microalgae and cyanobacteria, we recommend the following: (i) considering intracellular, extracellular, and total concentrations simultaneously, (ii) utilizing multiple data normalization techniques, (iii) employing direct measurements of toxin levels, and (iv) integrating the study with at least one standardized and consistent bioassay.

Annexe 11 : Article en préparation basé sur les données du chapitre III (« Etude de l'effet d'une limitation en azote sur le métabolome de biofilms de *Tetraselmis suecica* »). Le texte ci-dessous ne constitue pas la version finale. Les figures de bonne qualité se trouvent dans le chapitre correspondant.

Title: Study of the effect of nitrogen limitation on the metabolome of *Tetraselmis suecica* biofilms

Authors: Julien Lopez¹, Amélie Talec¹, Emna Krichen¹, Charlotte Simmler², Stéphane Greff², Andrea Fanesi³, Olivier Bernard^{1,4}, Antoine Sciandra¹

¹ Sorbonne Université, CNRS, Laboratoire d'Océanographie de Villefranche, LOV, F-06230 Villefranche-sur-Mer, France

² IMBE, UMR CNRS 7263, IRD 237, Aix Marseille Université, Avignon Université, Station Marine d'Endoume, Chemin de la batterie des lions, 13007 Marseille, France

³ Laboratoire Génie des Procédés et Matériaux (LGPM), CentraleSupélec, Université Paris-Saclay, 91190, Gif-sur-Yvette, France

⁴ Greenowl, INRIA, Université Côte d'Azur, 06902, Sophia Antipolis Cedex, France

Introduction

Biofilms are microbial communities attached to a matrix of self-produced extracellular polymeric substances (EPS) adhered to a humid surface (Flemming & Wingender 2010). They are therefore biological models of choice and, because of their microbial diversity and the possibility of controlling them in the laboratory, they can be, despite their complexity, used to study chemically mediated interactions. Their development depends on various environmental variables. For example, the concentration of certain nutrients can affect the three-dimensional structure and metabolome of bacterial biofilms (Cherifi et al. 2017, Carriot et al. 2022). In comparison with bacterial biofilms, studies conducted on monospecific phototrophic biofilms, and by extension on their production of compounds of interest, are rather rare. Concerning the effects of nitrogen (N), various studies have shown that the production of EPS or other molecules of interest are sensitive to the source and concentration of this element in the medium (Domozych 2007, Cheng et al. 2013, 2014, Schnurr et al. 2013, Morgado et al. 2024).

Vohra et al. (2024) have recently argued in favour of greater use of omics techniques, which pave the way for a more in-depth study of how biofilms function. Among these various techniques (genomics, transcriptomics, proteomics, metabolomics, and their variants (metagenomics, epigenomics, lipidomics, etc.) (Manzoni et al. 2016), metabolomics makes it possible to study the metabolome, i.e. all the metabolites produced by cellular activity. The metabolome is further subdivided into the endometabolome and the exometabolome, which respectively include all intracellular metabolites, and those that are excreted or already present in the external environment (Kuhlish & Pohnert 2015). Examination of the exometabolome is favoured as part of a chemical ecology study in order to identify chemical mediators (Kuhlish & Pohnert 2015).

In order to conduct a consistent analysis of the influence of a given factor on the metabolome of a microalga, a certain number of experimental criteria must be met. In particular, the set-up must enable (i) the factor in question to be controlled and measured while keeping the others constant or 'equal' (ii) the microalgae variable

to be measured accurately, and (iii) the metabolites to be extracted correctly, i.e. quickly and without pollution. The particular characteristics of phototrophic biofilms, and in particular the effect of biofilm thickness on the radiation field and photosynthesis, make criterion (i) difficult to meet, and in any case more difficult than in the case of planktonic cultures. Criterion (ii) is also difficult to meet because measuring the cellular concentration of a biofilm requires intrusive sampling that destroys part of it, which can lead to a bias in its metabolomic response. In addition, estimating the total biomass of a biofilm from sub-sampling may be biased if the biofilm is heterogeneous over the surface it occupies. Finally, biofilm cultures have two types of exometabolome, that present in the EPS matrix and that in the supernatant. As the cells are closely associated with the EPS matrix, it is impossible to separate the endo- from the exometabolome (risk of cell rupture, time-consuming separation techniques, risk of metabolite denaturation).

The chlorophyte *T. suecica* is an industrially produced microalga, mainly for the production of biofuels (Montero et al. 2011) and foodstuffs for aquaculture (Muller-Feuga et al. 2003). Despite the diverse bioactivities observed in *T. suecica*, antibacterial (Kellam & Walker 1989, Austin & Day 1990, Austin et al. 1992, Guzmán et al. 2019, Hussein et al. 2020), antioxidant (Lee et al. 2009, Norzagaray-Valenzuela et al. 2017, Haoujar et al. 2019), antitumour (Custódio et al. 2014, Sansone et al. 2017, Hussein et al. 2020a, Parra-Riofrío et al. 2020, Rentería-Mexía et al. 2022) or antifungal (Kellam et al. 1988), only one peptide has been characterised (Guzmán et al. 2019). N limitation favours the accumulation of carbohydrates in the cells, particularly starch (D'Souza & Kelly 2000, Rodolfi et al. 2009, Kermanshahi-pour et al. 2014), which can be used for bioethanol production (Lam & Lee 2015, Lakatos et al. 2019). Other factors can improve this production, such as salinity (Yao et al. 2013a), phosphate (Rodolfi et al. 2009, Bondioli et al. 2012, Dammak et al. 2017), metals and vitamins (Dammak et al. 2017). Studies of the *T. suecica* transcriptome (Lauritano et al. 2019) have shown that N limitation reduces the rate of sugar degradation and the polyketide synthases and lipxygenases involved in the biosynthesis of secondary metabolites with bioactive properties.

The chlorophyte *T. suecica* is an industrially produced microalga, mainly for the production of biofuels (Montero et al. 2011) and foods for aquaculture (Muller-Feuga et al. 2003). Despite the diverse bioactivities observed in this species, i.e. antibacterial (Kellam & Walker 1989, Austin & Day 1990, Austin et al. 1992, Guzmán et al. 2019, Hussein et al. 2020), antioxidant (Lee et al. 2009, Norzagaray-Valenzuela et al. 2017, Haoujar et al. 2019), antitumour (Custódio et al. 2014, Sansone et al. 2017, Hussein et al. 2020a, Parra-Riofrío et al. 2020, Rentería-Mexía et al. 2022) or antifungal (Kellam et al. 1988), only one peptide has been characterised (Guzmán et al. 2019). N limitation favours the accumulation of carbohydrates in the cells, particularly starch (D'Souza & Kelly 2000, Rodolfi et al. 2009, Kermanshahi-pour et al. 2014), which can be used for bioethanol production (Lam & Lee 2015, Lakatos et al. 2019). Other factors can improve this production, such as salinity (Yao et al. 2013a), phosphate (Rodolfi et al. 2009, Bondioli et al. 2012, Dammak et al. 2017), metals and vitamins (Dammak et al. 2017). Studies of the *T. suecica* transcriptome have shown that N limitation reduces the rate of sugar degradation and the polyketide synthases and lipxygenases involved in the biosynthesis of secondary metabolites with bioactive properties (Lauritano et al. 2019).

In this study, we present the results of a metabolomic analysis carried out on biofilms of the N-limited or non-N-limited microalga *Tetraselmis suecica*. The choice of conducting this analysis on microalgal biofilms rather than on planktonic cultures is guided by several considerations. Firstly, we consider that the confinement of micro-

organisms within a biofilm gives them a much greater proximity than they normally have in a planktonic culture, and that this condition is likely to exacerbate the effect of chemical mediators, and therefore increase the probability of inducing potential bioactivities. This hypothesis stems from an observation made repeatedly on our culture systems, according to which microalgal biofilms show better resistance than planktonic cultures to biological contaminants, as well as greater resilience, despite the fact that they are exposed to air. It should also be remembered that the metabolomic analyses carried out to date have been devoted to bacterial biofilms and, to our knowledge, almost never to microalgal biofilms. The choice of N as a factor that could affect the metabolome is also based on several considerations. N is a major nutrient in the composition of the various families of molecules in micro-organisms (proteins, DNA, pigments, etc.). Its effects on the growth and metabolome of microalgae, and in particular on toxin production, have been extensively studied in the laboratory, generally from 3 angles: (i) the effect of different sources of N, whether inorganic such as nitrate (NO_3^-) and ammonium (NH_4^+) or organic such as urea and amino acids (AAs) (e.g. Dai et al. 2009 or Chen et al. 2019), (ii) the effect of N concentration in the environment, which can place microalgae in a state of satiation, or on the contrary of limitation, or even deficiency, in stable or fluctuating diets (Chia et al. 2016), and (iii) the effect of nutrient ratios, mainly the N/P ratio (Uronen et al. 2005). Studies can focus on microalgae growth parameters (e.g. Martin-Jézéquel et al. 2015), the production of compounds of interest (Zhu et al. 2014), the functioning of metabolic pathways (Wu et al. 2015), etc. N limitation generally results in a reorientation of the metabolism associated with protein synthesis towards carbohydrate and/or lipid synthesis (de Carvalho Silvello et al. 2022). Currently, studies on the effect of N on microalgal biofilms are mainly conducted in the context of wastewater treatment (e.g. Posadas et al. 2013, Zhu et al. 2018, González et al. 2020, Li et al. 2024, Sun et al. 2024), and those looking at the influence of N on the metabolism of phototrophic biofilms in the laboratory are, to our knowledge, much rarer (Domozych 2007, Cheng et al. 2013, 2014, Schnurr et al. 2013, Morgado et al. 2024).

Materials and methods

Development of the culture process. *Tetraselmis suecica* strain AC254 supplied by the Algalbank of Caen, (University of Caen, Normandy) was maintained in a refrigerated incubator (IPP260, MEMMERT), by successive subculturing of batch cultures maintained at a temperature of 20°C and a continuous light intensity of $56 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$. The culture medium was natural seawater taken from the subsurface in the bay of Villefranche-sur-Mer, aged to remove residual nutrients, filtered to 1 and then 0.22 μM (#1, see Table 1) using a pump (#2) before being autoclaved and sterile-enriched f/2 silicate-free medium (Guillard & Ryther 1962, Guillard 1975, Table 2).

In order to conduct a reliable study of the effects of N status on the metabolome of *T. suecica*, we developed a process designed and optimised for the metabolomic study of *T. suecica* biofilms whose growth is N-limited or not. To do this, the process had to satisfy the following conditions: (i) absence of biological and chemical contamination, (ii) a sufficient number of replicas (five for each N status), (iii) a culture volume that was not too large, (iv) easy and rapid harvesting of the biofilms, (v) control and stability of the other growth conditions (temperature, light, nutrients other than N, pH), (vi) good reproducibility between replicas, and (vii) control of the N status of the microalgae.

Formation of a *T. suecica* biofilm and collection of its different fractions. The use of a planktonic culture in an Erlenmeyer flask equipped with a bar magnet rotating at a given speed proved to be an effective

procedure for rapidly obtaining a significant biofilm. The effect of shear stress on biofilm formation had previously been observed in bacteria (Stoodley et al. 1998, Beyenal & Lewandowski 2002, Moreira et al. 2022, Tsagkari et al. 2022) and the microalga *Chlorella vulgaris* (Fanesi et al. 2021). Having observed the same phenomenon in *T. suecica* grown in Erlenmeyer flasks, we were able to determine that a rotation speed of 250 rpm allowed the cells to attach to the glass wall without detaching the biofilm once it was formed. By allowing the metabolites (see below) to be extracted from the biofilm in the same flask in which it was produced, the use of Erlenmeyer flasks reduced the risk of contamination (condition i). In order to have a sufficient number of replicates (condition ii), 24 cultures were placed in an incubation chamber (#3). Erlenmeyer flasks with a capacity of only 250 mL were chosen for this purpose (condition iii). Each borosilicate glass Erlenmeyer flask (#4), filled with 50 mL of seawater prepared as previously described and enriched with f/4' medium (Table 2), was fitted with a smooth PTFE magnetic bar with a central ring (#5) and a silicone stopper (#6) pierced through its centre for the passage of an air supply, and autoclaved. A low concentrated *T. suecica* inoculum (final concentration of 10^7 cells.L⁻¹) was then added, and the Erlenmeyer flask was placed in the incubation chamber on an rotary magnetic stirrer (#7). Once the biofilm formed, each Erlenmeyer flask is carefully removed from the incubation chamber, the magnetic bar is removed using a magnetic rod, taking care that it does not touch the culture medium, and 5 fractions of the biofilm are easily recovered (condition 4). The Fr-SN fraction, which contains the cells that have remained planktonic in the culture supernatant, is gently recovered by simple pouring. Then, three times in succession, 50 mL of filtered seawater were added to the Erlenmeyer flask and recovered after manual shaking, giving the fractions Fr-L1 (wash 1), Fr-L2 (wash 2) and Fr-L3 (wash 3). The last fraction, consisting of the strongly adhered cells that form the deeper layer of the biofilm (Fr-BF), was recovered after the addition of 50 mL of filtered seawater, followed by vigorous agitation with a magnetic bar for approximately 5 min. The five fractions are stored in conical tubes (#8) pending analysis.

Samples were analysed using an optical particle counter (#9). Between 1 and 10 ml of culture (depending on cell concentration) is withdrawn using a syringe connected to a cannula (#10) passed through the stopper. After dilution with filtered seawater, 1 mL of 10% (v/v) HCl (#11) diluted in Milli-Q ultrapure water (#12) was added for a final volume of 50 mL, to break up any cell aggregates. The optical counter measures the cross-section of each particle, whose diameter is therefore assimilated to that of a disc of equivalent cross-section. The distribution of the population within a given size range can be used to calculate its concentration, mean diameter and biovolume. These distributions are characterised by right-hand skewness, which appears more clearly in the biovolume distribution (**Figure 1**). Particles on the right-hand side of the distributions may be large mother cells ready to divide, cell aggregates, or other particles from EPS. We chose to consider that they were all part of the *T. suecica* population. Concentration and biovolume are therefore two different descriptors of the population, the first describing the dynamics of cell multiplication, the second taking into account the somatic growth of the cells. It should therefore be stressed that the growth rate μ (day⁻¹) of each of these descriptors, calculated using the formula $\mu = \ln(N_2 / N_1) / (t_2 - t_1)$ during the exponential growth phase, where N_x is the cell concentration or biovolume at time t_x , may be different if the average diameter of the population varies.

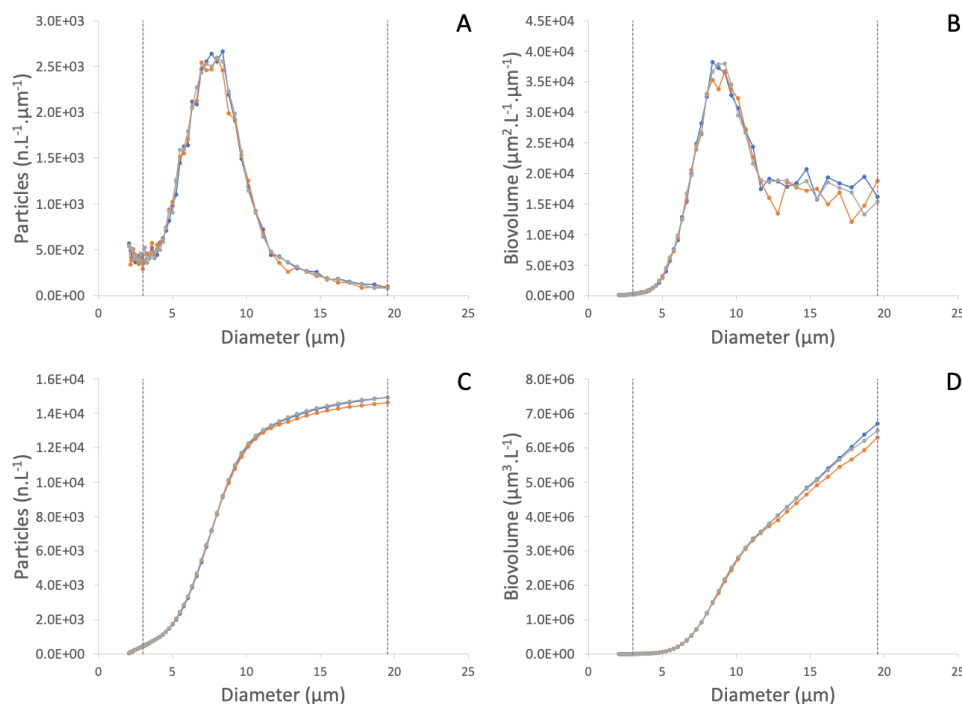


Fig. 1: Example of *T. suecica* population distributions measured 3 times with the HIAC optical particle counter. Spectral density of particle concentration **(A)** and biovolume **(B)**; cumulated concentration **(C)** and biovolume **(D)**. Dotted vertical lines indicate the size range for cell concentration, mean diameter and biovolume calculations.

The measurements carried out during our various experiments show that the adhered cells (L123 and BF fractions) always represent at least 90% of the total cells, indicating that the majority of the cells produced are in the biofilms, and that only a small proportion remain in suspension. This reassures us that the biofilm production method we experimented with was appropriate.

Incubation of *T. suecica* biofilms under controlled conditions (condition v). The incubator parameters were set to correspond to the optimal conditions for *T. suecica* growth, i.e. a relatively high light intensity of $540 \mu\text{mol quanta.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ (Montes-González et al. 2021) and a temperature close to 25°C (Weiss et al. 1985, Sas et al. 2021). As the light field was heterogeneous in the incubation chamber, a good uniformity of the light intensities ($\text{CV} = 0.06$) measured at the center of each Erlenmeyer flask using a photometer (#13) could nevertheless be obtained by adjusting their position and choosing to switch on only certain neon lights in the incubator. The temperature measured at different points in the incubation chamber showed a slight gradient from the bottom (23.8°C) to the top (26.3°C) caused by convection inherent in the simultaneous use of several neon lights (#14). Nevertheless, this slight temperature heterogeneity ($\text{CV} = 0.02$) did not cause any significant variation in the growth rate measured on 24 planktonic test cultures distributed throughout the incubation chamber (data not shown).

Despite the relatively high concentrations of inorganic carbon naturally present in natural seawater, the cultures had to be enriched to prevent growth being limited by this element. A supply of filtered air (#15), humidified to prevent possible evaporation, was therefore added above the cultures rather than in the culture to prevent any biofilm destruction. Measurements carried out on biofilm test cultures showed that these precautions enabled the pH (#16) to be maintained at levels below 9.0, levels where dissolved inorganic carbon is not limiting for photosynthesis, as well as preventing an increase in salinity (#17).

Replicate reproducibility (condition vi). To further verify that the positioning of the biofilm cultures in the incubation chamber was not a source of variability that could bias the metabolomic analysis, we compared different parameters measured on biofilm cultures distributed in height and depth throughout the incubator. **Figure 2** shows that the different biofilm fractions collected after 7 days showed no significant differences according to their location in the incubation chamber.

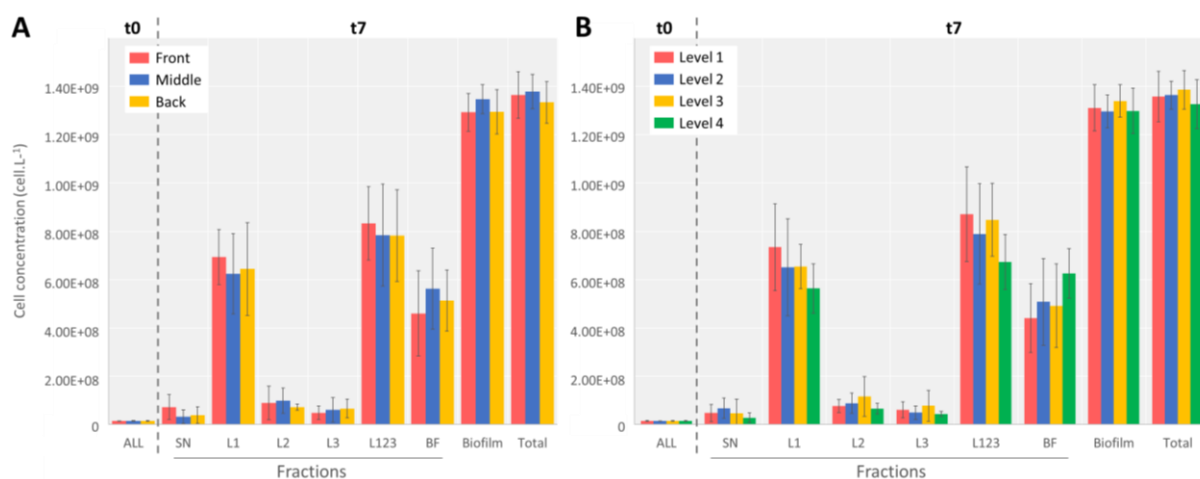


Fig. 2: Cell concentrations measured at the beginning (t0) and after 7 days of incubation (t7) in the different fractions of *T. suecica* biofilms arranged in the culture chamber as a function of depth **(A)** and height **(B)**. Each histogram bar is the mean of 3 replicates; standard deviations are shown as vertical bars.

Control of the N status of *T. suecica* biofilms (condition vii). As the aim of our study is to compare the metabolomes of N-limited and non N-limited biofilms, it is necessary to know beforehand the dynamics of the respective variations of the N resource and biofilm. It is expected that biofilms in batch culture will begin to be in a state of limitation once the N resource added initially has been completely exhausted. We must also ensure that the only factor responsible for limiting growth is N. While the growth dynamics of a planktonic culture can be easily determined by cell density measurements carried out on samples taken at different times, the growth dynamics of a biofilm cannot be determined in the same way, firstly because under-sampling of the biofilm is destructive, and secondly because the biomass of a biofilm is heterogeneous over the surface it occupies. The only way to accurately measure the cellular biomass of a biofilm is to measure its entirety and therefore to stop growing it. Its growth dynamics can therefore only be determined from measurements taken on biofilms initiated at the same time and under the same conditions, but sacrificed successively at increasing times, assuming that they all behave in the same way. To do this, a preliminary experiment was set up under the same conditions as above. At t0, particle size, salinity and pH were measured, as well as on the following 8 days on 3 cultures randomly selected from the 24. 10 mL of filtrate (#18) from the Fr-SN fractions were also stored in cryotubes at 80°C for subsequent analysis of residual nitrate using the colorimetric method of Treguer et al. (1975) with the autoanalyser (#19). Although measured each day on different cultures, the concentrations of microalgae followed fairly closely the expected dynamics of logistic growth, except on day 7 when the concentration was lower than expected (**Figure 3**). The culture conditions adopted enabled production of the *T. suecica* biofilm at t = 7 days, which was sufficient for the analyses planned later and which showed good reproducibility (coefficient of variation between 3.57 and

6.14% from t2 to t6) throughout the experiment. The cessation of growth from day 5 can be attributed to N limitation, as residual nitrate was exhausted between days 1 and 2.

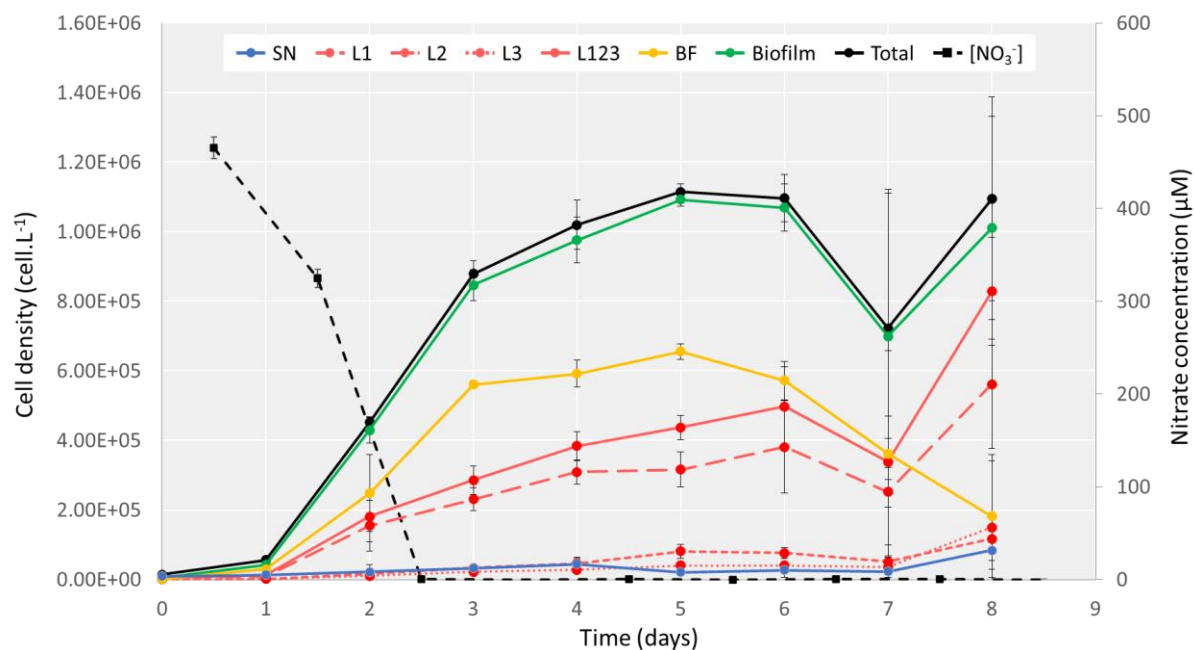


Fig. 3: Changes in cell number in different fractions of the *T. suecica* biofilm (black and coloured lines) and residual nitrate (black dashed line) measured during 8 days of incubation. Each point represents the mean of 3 cultures and standard deviations are shown by vertical bars.

After increasing until day 2, the pH then gradually decreased (Figure 4), reflecting a change in the demand for dissolved organic carbon, which was moderate at the beginning when biomass was low and at the end when growth slowed. However, the pH remained below 10 on average, indicating that the air bubbling was sufficient to prevent growth being limited by inorganic carbon.

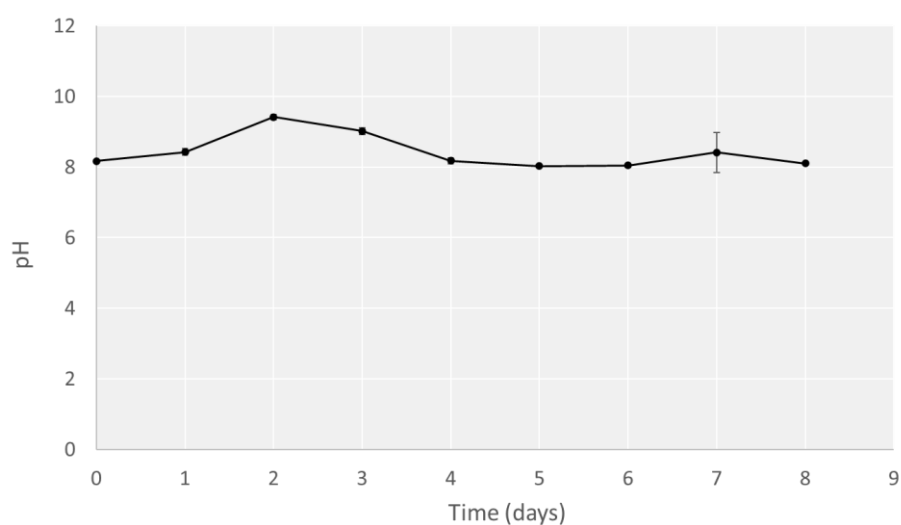


Fig. 4: Time change in pH measured in the supernatant of *T. suecica* biofilm cultures during 8 days of incubation. Each point represents the mean of 3 cultures and standard deviations are shown by vertical bars.

On the basis of these preliminary experiments, we can consider that the microalgal biofilm culture device in Erlenmeyer flasks meets the requirements of a metabolomic analysis.

Experimental protocol for the study of the metabolome of N-limited and N unlimited *T. suecica* biofilms

Culture and sampling conditions. One of the main requirements of our metabolomic analysis is that it must be performed on N-limited (L) and N-unlimited (UL) biofilms that are inoculated and sampled simultaneously. To do this, the initial concentrations of N nutrients and cells must be such that, after a period of time, L and UL biofilms with sufficient biomass can be harvested for the desired analyses. Furthermore, for the comparison of the metabolome of L and UL biofilms to be meaningful, it is necessary that N status is the only parameter responsible for the difference in metabolomic response, in other words that all other growth factors are not limiting or, alternatively, that they are equivalent for L and UL conditions. These other factors are temperature, nutrients other than N, pH and light. Of these, only temperature is not affected by biofilm development. The average photon flux integrated over the biofilm thickness decreases as the biofilm grows. We assume that the light conditions in harvested L and UL biofilms should be similar if they have the same thickness. The concentration of nutrients decreases as they are consumed. For nutrients other than nitrogen (micronutrients and phosphate), we assume that differences in concentration between L and UL cultures will not affect the physiology of the microalgae as long as they remain abundant.

In order to determine the initial conditions of cell density and NO_3^- that verify the above conditions, we chose to use the results of a growth model rather than carry out very tedious preliminary experiments. Droop's quota model (Droop 1968) has the advantage of taking into account the N status of the cell. The central hypothesis of this model is that growth μ (d^{-1}) depends on the amount of limiting element present in the cell (in this case all the cell N), also known as the internal quota q ($\mu\text{mole N.cell}^{-1}$), according to the expression :

$$\mu(q) = \bar{\mu} \left(1 - \frac{q_0}{q} \right)$$

where q_0 is the minimum subsistence N quota below which growth is no longer possible and $\bar{\mu}$ is the theoretical maximum growth rate achieved with an infinite q quota. The uptake rate ρ ($\mu\text{mole N.cell}^{-1}.\text{d}^{-1}$) of nitrate s ($\mu\text{mole.L}^{-1}$) is described by the Michaelis-Menten law:

$$\rho(s) = \rho_m \left(\frac{s}{s + k_s} \right)$$

where ρ_m is the maximum absorption rate and k_s is the half saturation constant. Thus, the dynamics of cell density x (cell.L^{-1}), nitrate s ($\mu\text{mol N.L}^{-1}$) and internal N quota q ($\mu\text{mol N.cell}^{-1}$) are as follows:

$$\frac{dx}{dt} = \mu(q) \cdot x ; \frac{ds}{dt} = -\rho(s) \cdot x ; \frac{dq}{dt} = \rho(s) - \mu(q) \cdot q$$

This system of equations was integrated numerically using the MATLAB function ODE23. The parameter values (Table 3) were obtained by fitting the model (OPTIMSET function) to data from planktonic cultures of *T. suecica* obtained under light and temperature conditions similar to our own (Figure 5).

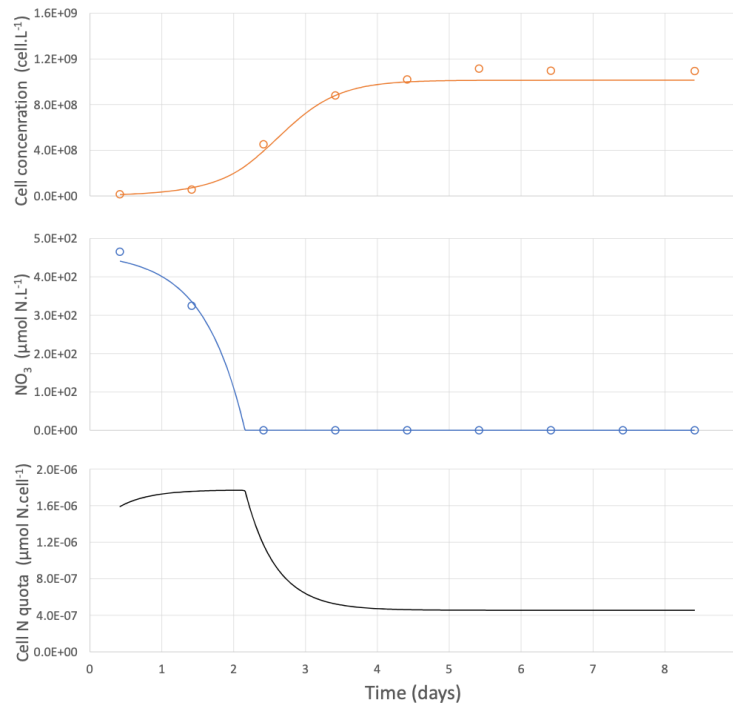


Fig. 5: Fitting of Droop's model (solid line) to cell density and residual N data (circles) measured in a planktonic batch culture of *T. suecica*. The initial N quota (not measured during this experiment) for this simulation was considered to be close to the maximum quota, since the cell inoculum was taken from a culture in the exponential growth phase.

This simulation shows that a batch culture gradually passes through a phase of maximum growth (strictly exponential) as long as the residual nitrates are not exhausted, followed by a phase of limited growth as long as the nitrogen quota remains above the subsistence quota, followed by a phase of zero growth (plateau) when the quota has reached its minimum level (q_0). We can assume that the deficiency state corresponds to a state of very pronounced limitation, although the demarcation between these two states is not very precise. This simulation also shows that the true N status of a culture cannot be deduced from the simple presence or absence of NO_3^- in the milieu and that the only really relevant criterion is the measurement of the N quota. Assuming that this model, validated for planktonic cultures, predicts similar biomass dynamics for biofilm cultures, we used it to determine the initial N and cell density conditions, as well as the culture duration, so that the above conditions are met (Figure 6).

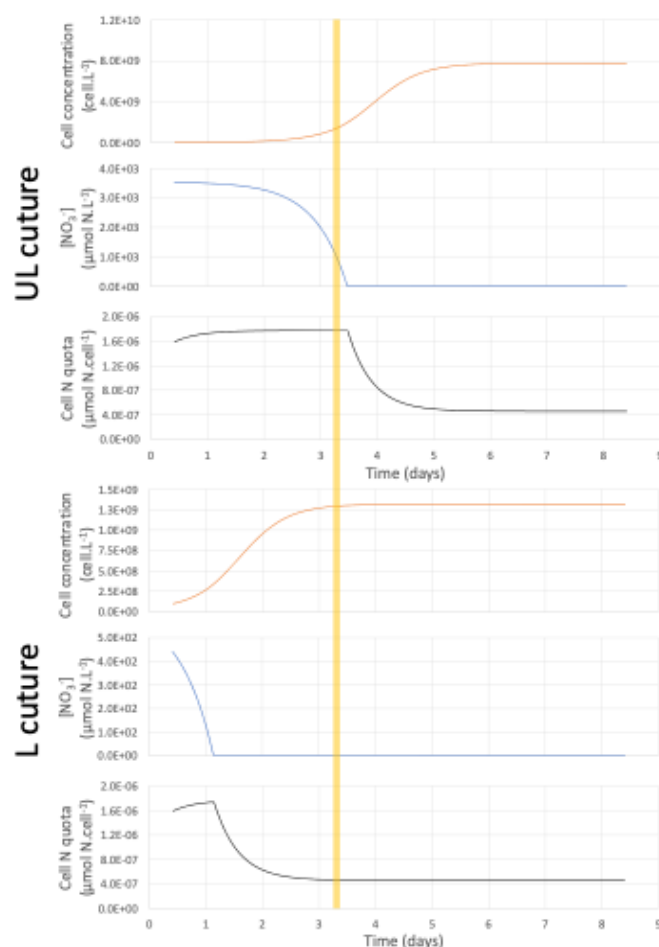


Fig. 6: Using the initial conditions given in the tables on the right for each L and UL conditions, it is possible to obtain biofilms after three days (yellow band) that meet the criteria given in the text.

Finally, ten 50 mL cultures of L condition were inoculated with a *T. suecica* culture pre-acclimated to medium f/4' (Table 2) to obtain an initial cell concentration of 10⁸ cells.L⁻¹, and 10 cultures of UL condition were inoculated with a culture pre-acclimated to medium 2f' (Table 2) to obtain an initial cell concentration of 10⁷ cells.L⁻¹. Each condition also included 2 uninoculated Erlenmeyer flasks to be used as blanks for metabolic analyses. A total of 20 cultures and 4 blanks were incubated for 3 days at 25°C with continuous illumination of 540 μmol photons.m⁻².s⁻¹ and stirring at 250 rpm. Ten cultures and the 4 blanks were used for metabolomic analysis, while the other ten were used for biochemical analysis (see below). Thus, there are 5 replicates per L and UL conditions for metabolomic and biochemical measurements, respectively (Table 4).

Extraction of metabolites for metabolomic analysis. At the end of the incubation, the supernatant (Fr-SN fraction) from each culture was used for biochemical analysis (Table 4), rapidly replaced with 40 mL of methanol (#20), and then the Erlenmeyer flasks were placed in an ultrasonic bath for 20 min to accelerate the extraction of metabolites from the biofilm. Performing the extraction in the same vessel in which the biofilm was grown greatly reduces the risk of contamination. After transferring the extract obtained to a conical tube (#7), the remaining cell debris was removed by centrifugation (4000 rpm, 15 min) and the supernatant was transferred to another conical tube and stored at -80°C. To estimate its mass, the extract was concentrated using a nitrogen evaporator (#21), then transferred to an HPLC vial (#22), pre-weighed using a Pasteur pipette (#23) and finally

evaporated to remove the residual solvent. The dry extract was then weighed and stored at 80°C under N₂ until metabolomic analysis. Blanks were treated in the same way as the cultures.

Metabolomic analysis and LC-ESI-MS and MS/MS data acquisition. Each dry extract was first solubilised in 1.5 mL MeOH (#24), then filtered using a syringe (#25) fitted with a needle (#26) and filter (#27) into an HPLC vial (#28) closed with a screw cap fitted with a septum (#29) to a final concentration of 4 mg.mL⁻¹ on average. The samples were analysed by liquid chromatography (#30) coupled to a mass spectrometer (#31) in positive mode (UHPLC-ESI(+)-QToF-MS/MS). In order to stabilise the instrument, a QC (quality control) sample of 50 µL of each extract was also injected using an insert (#32).

Processing and analysis of metabolomic Data. Once the UHPLC-ESI(+)-QToF-MS/MS data have been acquired, the raw data cannot be used directly due to the very large number of ions obtained (i.e. metabolites ionised during the analysis). A data processing and statistical analysis workflow specific to metabolomics datasets is required to identify, select and characterise the ions whose intensity is a function of the different N status experienced, using a number of specialised software packages and guided step-by-step by the user. For this purpose, raw LC-MS data were calibrated using Bruker DataAnalysis software (version 5.0) and converted to .mzXML format using the MSConvert protocol (version 3.0.23345-eb399e3) (Chambers et al., 2012). The offset obtained from the precursor ions during conversion was then corrected using the script <https://github.com/elnurgar/mzxml-precursor-corrector> (version 0.5; for details see Breaud et al., 2023). The .mzXML data were pre-processed using the MZmine3 software (version 3.9.0). Two sets of processed data, with and without blank subtraction, have been exported in .csv and .mgf formats. Manual filtration to retain ions with a coefficient of variation (CV) of less than 25% was performed prior to the application of statistical tests. Multivariate statistical analyses (PCA, PLS-DA, VolcanoPlot, Heatmap) were performed using the MetaboAnalyst web platform (version 6.0; <https://www.metaboanalyst.ca/>) to identify possible contaminants and the most discriminating ions (Variable Importance in Projection, VIPs) between the L and UL conditions. Contaminants were identified from the PCA and manually removed. One of the replicates of the UL condition, which showed an intermediate profile between the two conditions in the PCA, was eliminated. VIPs were identified and characterised using databases (Scifinder, LipidMaps, GNPS, MetFrag) and SIRIUS software (version 5.8.5). Finally, a molecular network was obtained after importing the data into GNPS (<https://gnps.ucsd.edu/ProteoSAFe/static/gnps-splash.jsp>) and then visualised using Cytoscape software (version 3.10.1).

Biogeochemical analysis

Particulate N and C. 10 mL of the Fr-L1, Fr-L2 and Fr-L3 fractions are mixed in a 50 mL conical tube and centrifuged at 1500 rpm for 10 minutes (#33). After removal of the supernatant, the pellet is resuspended in 10 mL of filtered sea water to form the Fr-L123 'wash' fraction. After filtration (#34) of 5 or 10 mL of the Fr-SN, Fr-L123 and Fr-BF fractions, the filters are placed in haemolysis tubes sealed with aluminium foil and kept in an oven at 60°C until analyses (#35).

Pigment analysis was performed by high-performance liquid chromatography (#36) on 3 mL samples filtered (#31), then snap frozen in liquid nitrogen before storage at -80°C.

Quantum yield (ϕ) was estimated by measuring the variable fluorescence using an AquaPen (#37). It is generally accepted that the maximum theoretical value that ϕ can reach in photosynthetic eukaryotes is of the order of 0.7.

FTIR. The relative proportions of carbohydrates, lipids and proteins in the biofilms were estimated by attenuated total reflectance Fourier transform infrared spectroscopy (ATR-FTIR). Pellets from 15 mL of centrifuged samples (1500 pm, 10 min) were washed twice with 10 mL of 36 g.L⁻¹ NaCl solution and then stored at -80°C until analyses. The rest of the protocol is described in Fanesi et al. (2019). Briefly, the pellets were resuspended in 5 to 10 μ L of NaCl and 1.5 μ L was transferred to a ZeSe flat crystal at 45° before drying at room temperature for 20 min. The spectra were recorded with a spectrometer (#38) in the reflection mode between 4000 and 400 cm⁻¹. The spectra were determined using the elastic band algorithm and normalised to the amide I band. The ratios between the main macromolecular families (carbohydrates/proteins and lipids/proteins) were calculated using the maximum absorption values for the following spectral regions: proteins (amide I; 1700-1630 cm⁻¹), lipids (C=O; 1750-1700 cm⁻¹) and carbohydrates (C-O-C, C-C and Si-O-Si; 1200-950 cm⁻¹). The material used for the ATR-FTIR analyses consisted of *T. suecica* cells for the SN fraction, and microalgal cells, bacteria and EPS matrix for the biofilm fractions. However, the successive washes and centrifugations carried out during sample preparation most likely altered the biological composition of the samples prior to analysis. Losses of bacteria and EPS in the L123 and BF fractions are expected.

Results

Validation of the metabolic analysis protocol. In order to correctly analyse the metabolomic response of *T. suecica* biofilms to a variation in its N status, at least three conditions had to be met: (a) the metabolomic analysis had to be performed on cultures with markedly different N status (L and UL); (b) the other growth factors likely to interact with the metabolomic response (light, temperature, salinity, pH, nutrients other than N) had to be non-limiting for growth or otherwise identical in the L and UL conditions; c) the samples used for this analysis had to be taken from L and UL cultures of identical age.

Residual NO₃⁻ concentrations at the end of the experiment were as expected above 100 μ M in UL cultures and undetectable in L cultures. The C:N ratio measured in UL and L biofilms (**Figure 7**) was 6.2 $\pm$ 1.4 and 17.2 $\pm$ 5.9 respectively, meaning that UL biofilms were more than 2 times richer in N than L biofilms. However, it should be emphasised that this ratio, which is the average of the ratios of all particles retained on the filter weighted by their relative abundance, does not only concern the algal cells for the L123 and BF fractions, but also the bacteria and other components of the matrix, mainly C-rich EPS. However, **Figures 7B and 7C** show that these ratios are very different between L and UL cultures for all fractions belonging to the biofilms (**Figure 7A**). This confirms that our protocol made it possible to sample the metabolome of biofilms with very contrasting N status (condition a), although the C:N ratio data do not allow us to determine which process contributed most to this contrast: modification of the N status of the algal cells or modification of EPS production. The C:N ratios measured in the supernatant of L and UL cultures showed a difference (average 4.1 $\pm$ 1.4 and 5.3 $\pm$ 3.1 respectively) which, although not significant, is consistent with the expected change in the N status of the cells. This difference, which is more marked in the L123 and BF fractions, is significant, but the presence of EPS in these fractions makes it impossible to interpret it as resulting solely from the response of the N status of the algal cells. However, the fact that this

ratio is greater in the deepest layers of the biofilm (BF vs. L123) can be interpreted as the result of a gradient in NO_3^- availability that decreases with the thickness of the biofilm.

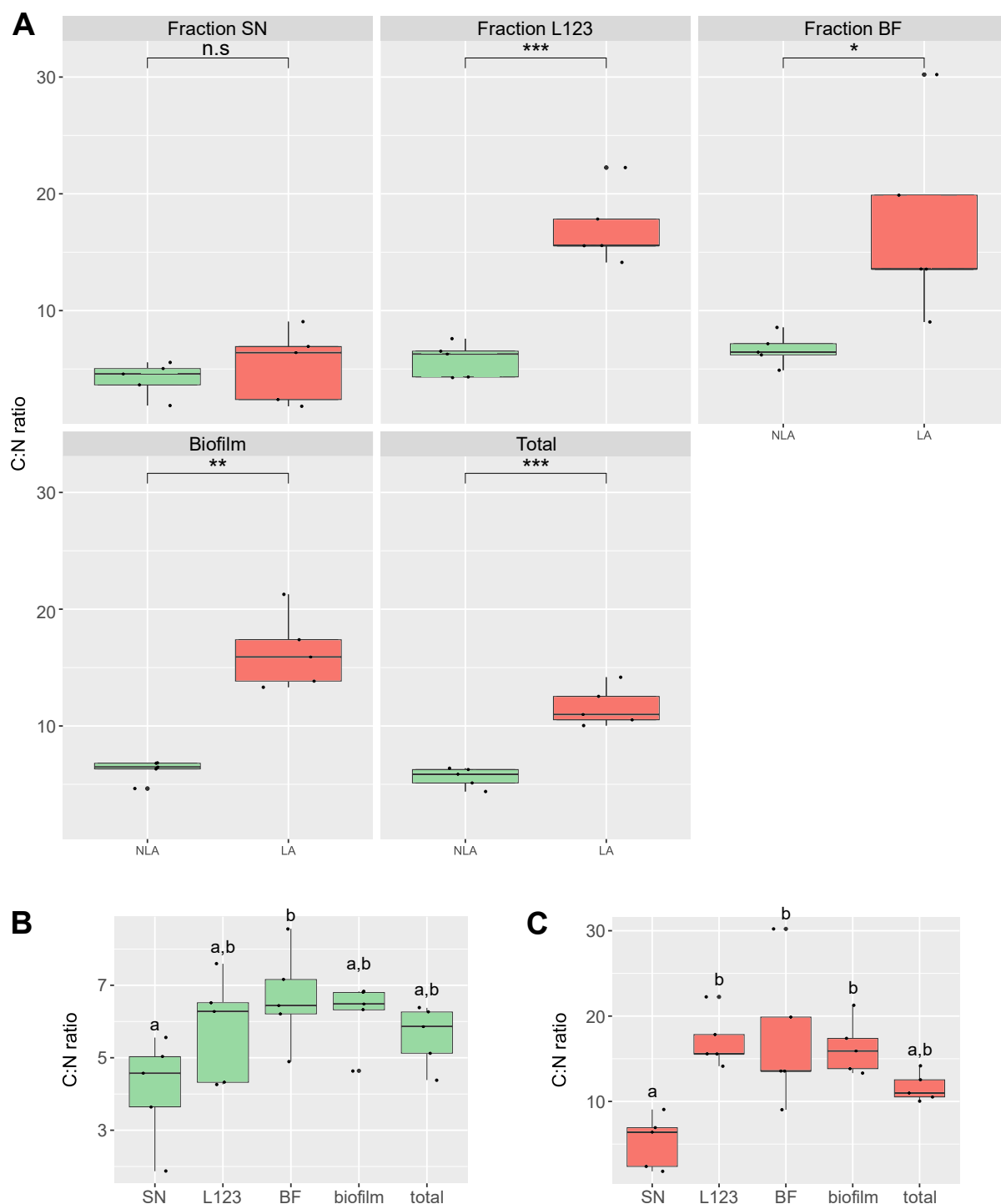
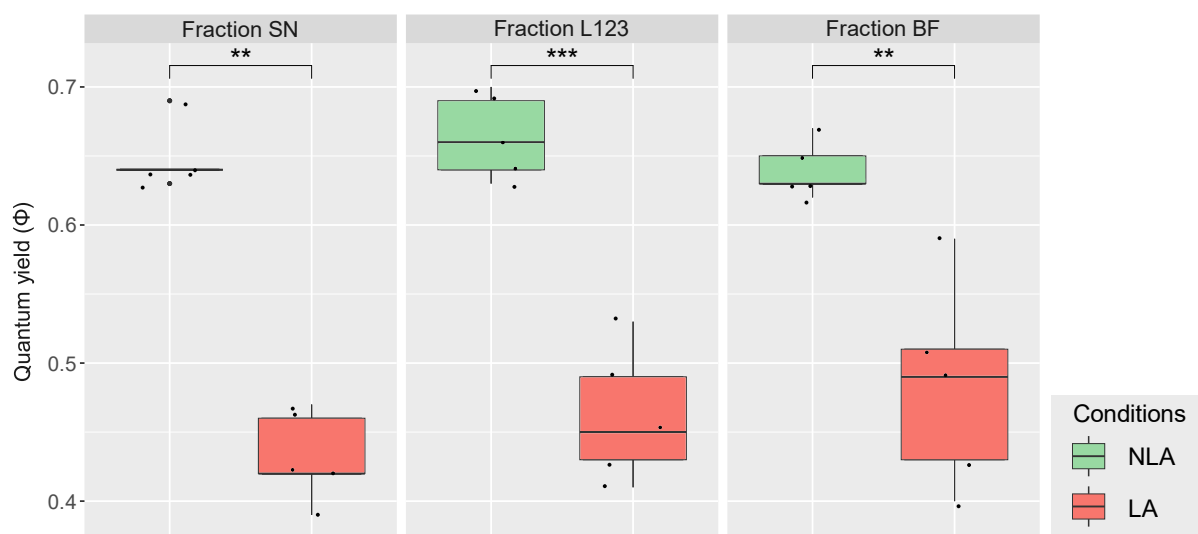


Fig. 7: C:N ratio of L (red) and UL (green) biofilm fractions (**A**). n.s.: no significant difference; *: p-value < 0.05; **: p-value < 0.01 and ***: p-value < 0.001. C/N ratio in fractions of UL (**B**) and L (**C**) cultures; differences are significant when lowercase letters above box plots are different.

The quantum yield of photosynthesis (ϕ) measured at the end of the experiment varied between 0.6 and 0.7 between the different fractions of UL biofilms (**Figure 8**). These differences between fractions were not significant, suggesting that the slight differences in C:N ratios observed between the same fractions (**Figure 7**) did

not affect their photosynthetic efficiency, which was close to the optimal theoretical value of 0.7. These values contrast significantly (p-value < 0.05, t-test) with those measured in the L fractions, which are mostly below 0.5, reflecting a photosynthetic capacity altered by N limitation.



Pigments measured by HPLC were: photosynthetic pigments (chlorophyll a (TChl a) and pheophytin a), accessory pigments (chlorophyll b (TChl b), carotenoids involved in photoprotection (the xanthophyll cycle (non-photochemical quenching), antioxidant properties: neoxanthin (NeoX), violaxanthin (ViolaX), antheraxanthin (AntheraX), zeaxanthin (ZeaX), lutein) and unspecified carotenenes. **Figure 9** shows that the cellular content of most pigments measured at the end of the experiment was significantly lower in L biofilms for all fractions. This reduction, about 18% for TChl a and TChl b, is similar in the different fractions (TChla: p-values < 0.01, TChlb: p-values < 0.05, t-test). It should also be noted that the cell contents of TChl a and TChl b measured in cultures L and UL were not significantly different from one fraction to the other.

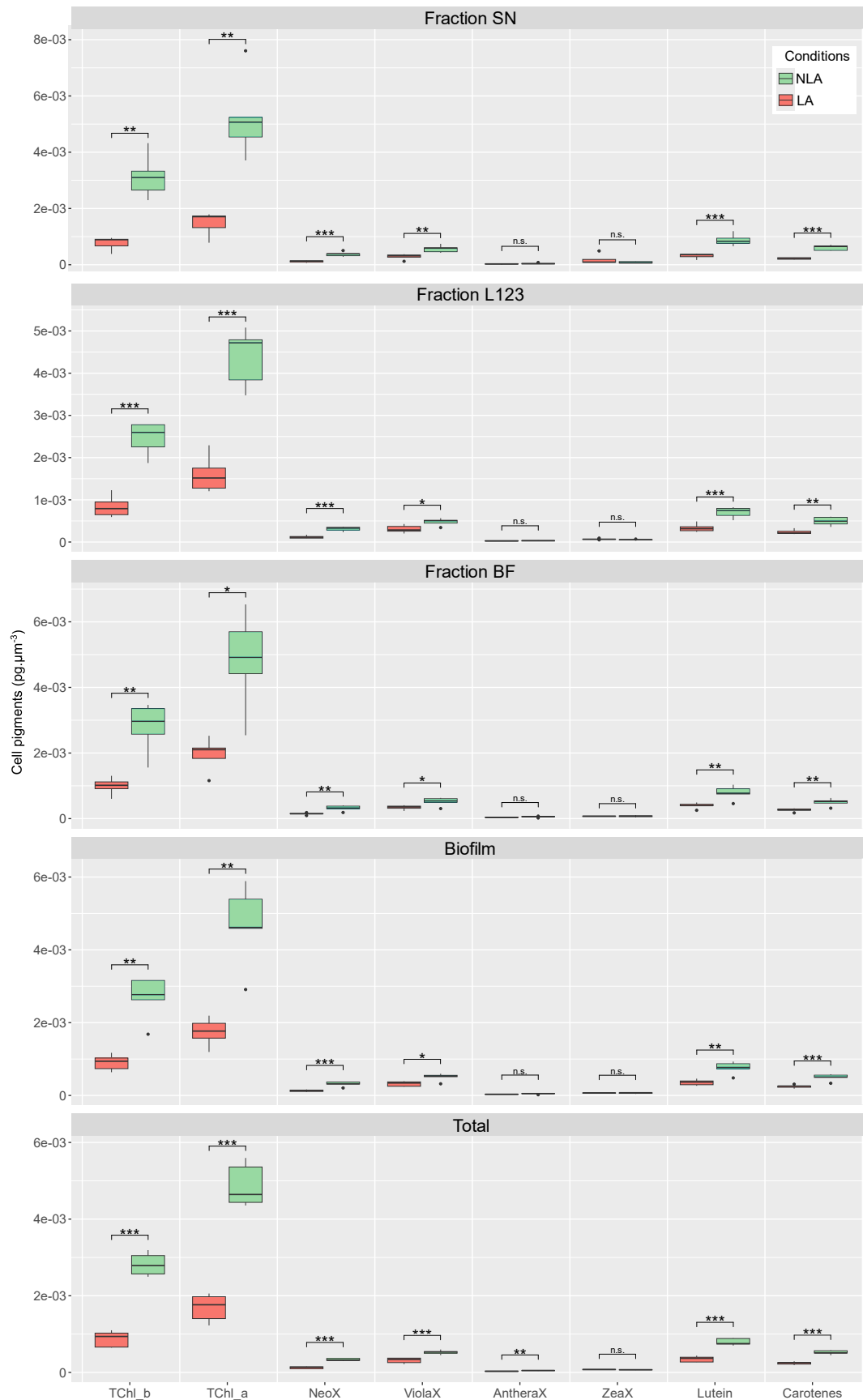


Fig. 9: Pigments (Total Chl b, Total Chla a, Neoxanthin, Violaxanthin, Antheraxanthin, Zeaxanthin, Lutein, Carotene) measured in L (red) and UL (green) biofilm fractions. n.s.: no significant difference; **: p-value < 0.01; ***: p-value < 0.001.

In conclusion, the data for residual NO_3^- , C:N ratio, quantum yield and pigments are consistent in showing that condition (a) is fully met. With regard to condition (b), only temperature, which was virtually identical in all cultures, had no effect on the results of the metabolomic analysis. Salinity varied between 38 and 41 g.L⁻¹, with no significant difference between conditions L and UL (data not shown). However, these small variations in salinity, which have no significant effect on growth, reflect small differences in evaporation (and therefore bubbling) from one culture to another, which were taken into account in the final calculation of cell concentrations. The pH measured in the culture supernatant at the end of the experiment remained below 9 in most L and UL cultures (**Figure 10**), i.e. a level at which the CO_2 concentration is not limiting for photosynthesis (Zeebe & Wolf-Gladrow 2001). However, it is significantly higher in UL crops, which is an expected result given the greater CO_2 consumption in the latter. While it is reasonable to assume that this difference had no effect on growth, it cannot be completely ruled out that it had an effect on the physiology of the microalgae and therefore on their metabolome.

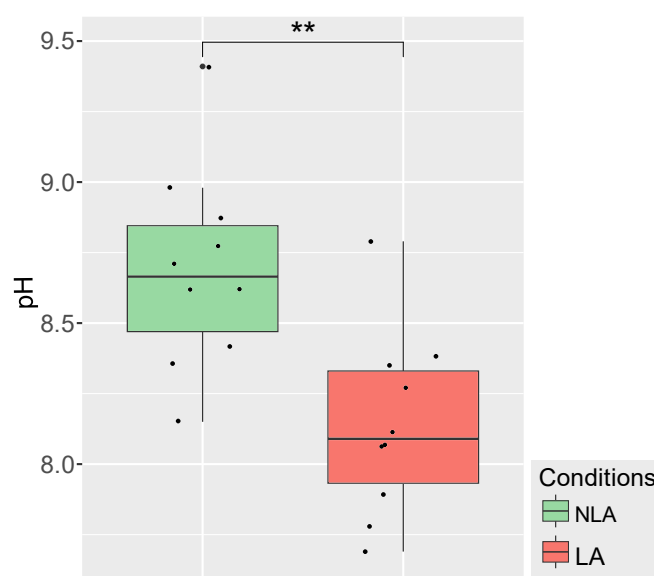


Fig. 10: pH measured in the supernatant of L (red) and UL (green) cultures at the end of the experiment. **: p-value < 0.01.

With regard to light, we hypothesised that the cell concentration in L and UL biofilms should be similar at the time of sampling (assuming that the thickness of a biofilm correlates to a first approximation with the cell concentration), so that the light gradient across the biofilms should be as similar as possible. Our measurements show that the cell concentration is twice as high in UL biofilms on day 3 (**Figure 11A**), in contrast to the biovolumes, which are not significantly different between L and UL biofilms (**Figure 12A**). The consequence of these last two observations is that the mean cell diameter is significantly higher in L biofilms for all fractions (**Figure 13 A, B and C**). Droop's model predicted similar algal densities in L and UL biofilms after 3 days of culture (**Figure 6**), the time we chose for sampling - condition (iii) fulfilled - and which also allowed sufficient biomass to be obtained for analysis. However, it should be noted that on day 3 the cell concentration of the UL cultures, which were still in an exponential growth phase, changed very rapidly and it was a risky gamble to try to obtain similar algal densities in the two cultures. Fortunately, however, the cell biovolumes measured in the L and UL biofilms were similar, confirming the condition of a comparable light gradient between the two N conditions.

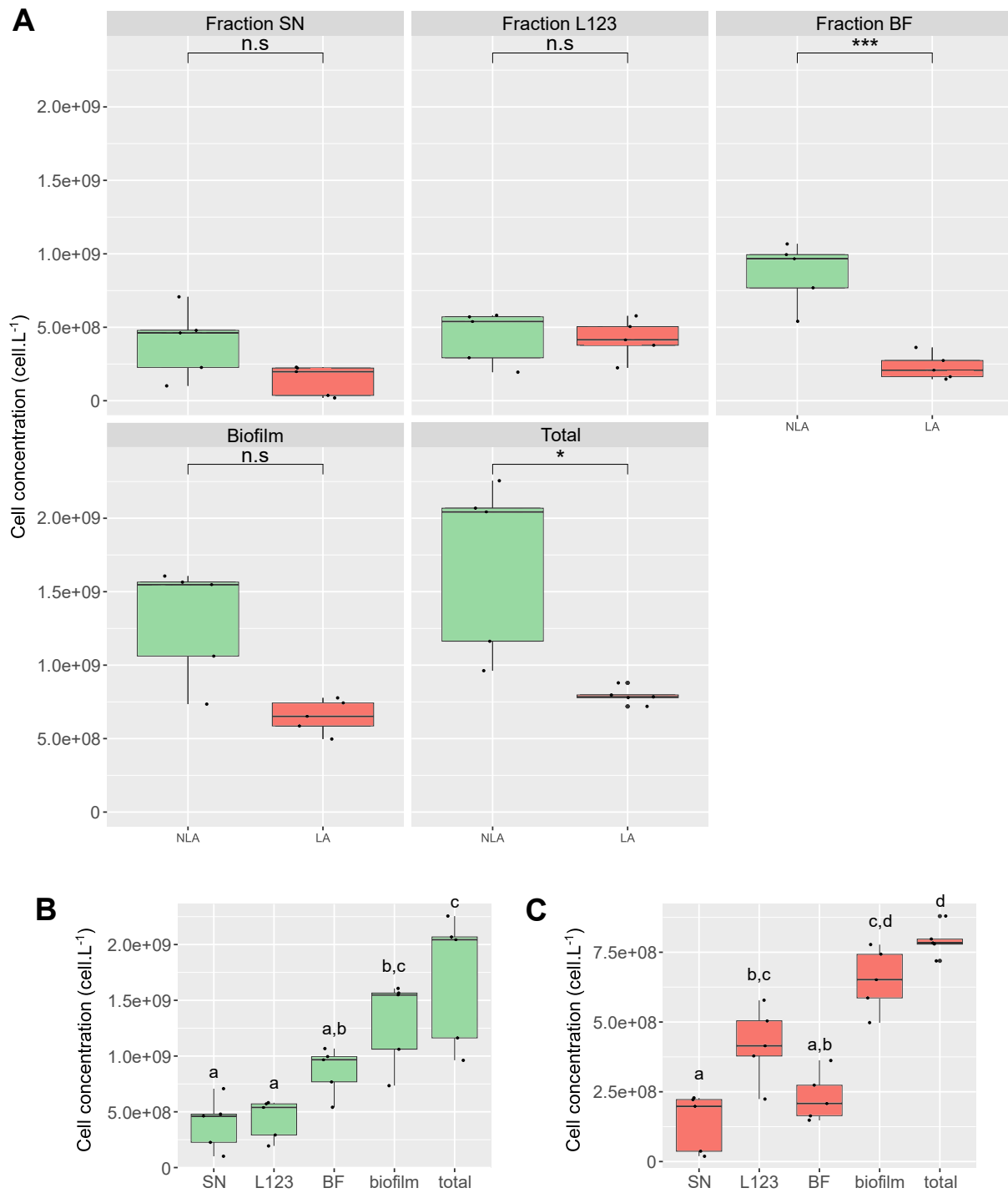


Fig. 11: A) Cell concentration measured in the different factions of L (red) and UL (green) biofilms. *: p-value < 0.05, **: p-value < 0.01 and ***: p-value < 0.001. Cell concentration in UL **(B)** and L **(C)** biofilm fractions; differences are significant when the lower-case letters above the block boxes are different.

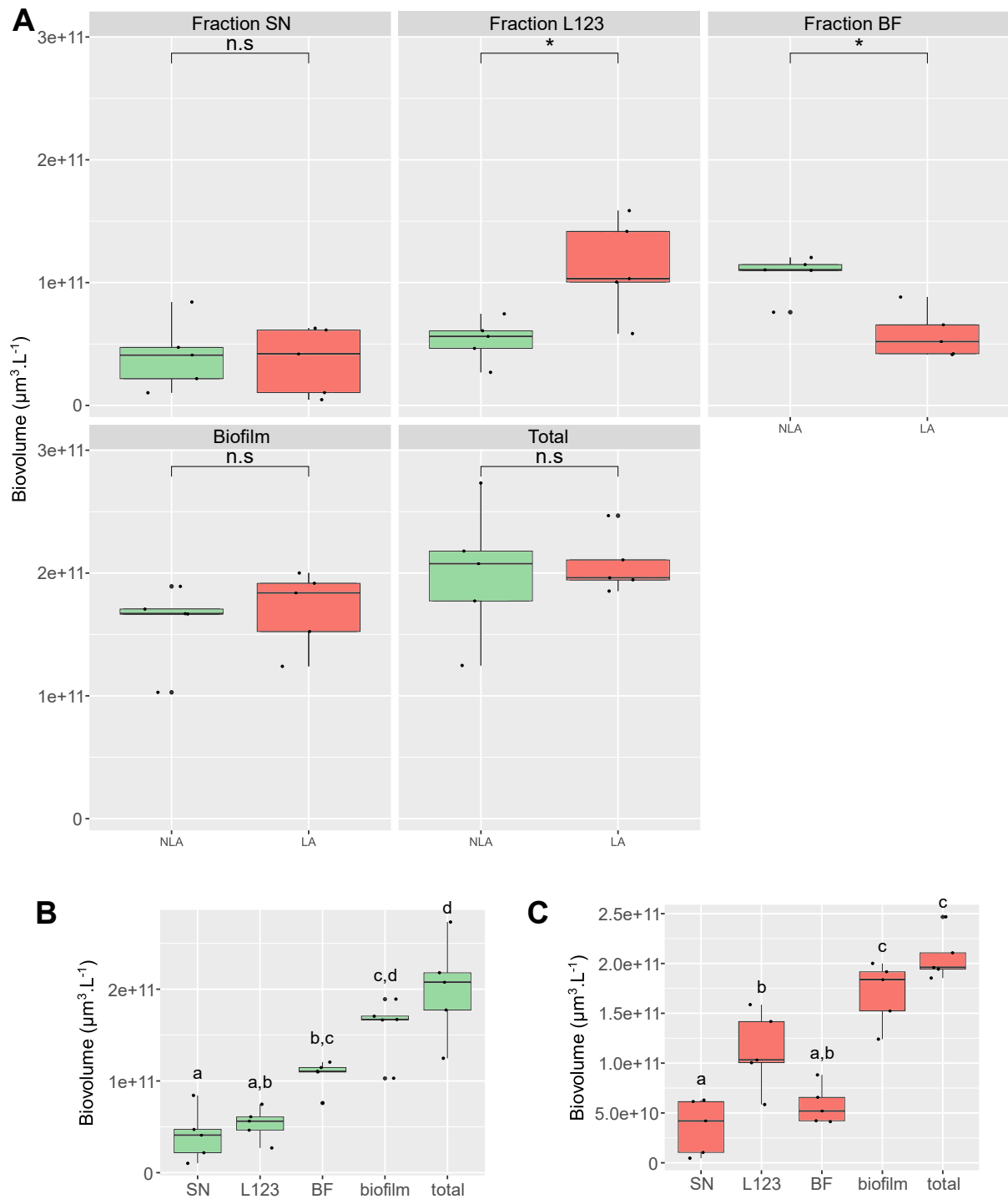


Fig. 12: A) Biovolume measured in the different biofilm fractions of L (red) and UL (green) biofilms. *: p-value < 0.05, **: p-value < 0.01 and ***: p-value < 0.001. Biovolume measured in UL (**B**) and L (**C**) biofilm fractions; differences are significant when the lower-case letters above the block boxes are different.

The apparent paradox of measuring different cell densities and identical biovolumes in L and UL biofilms can be explained by the fact that the average diameter of the microalgal populations differs from one condition to the other. It is larger in the L cultures (**Figure 13**). Between the daughter cell stage, which is the result of cell division, and the mother cell stage, which is about to divide, somatic growth allows the cell to increase in size as it completes its cell cycle. The average diameter of the cells in a non-synchronised population, whose growth is

not limited by any factor, will therefore be between the average diameter of the daughter cells and the average diameter of the mother cells. When a factor becomes growth-limiting, an increasing number of cells that can no longer divide become stuck in the phase of their cell cycle that precedes mitosis and cell division, where they are close to the size of a mother cell. In this situation, the average diameter of the population is larger than that of a population whose growth is not limited. The increase in cell diameter has often been observed in microalgae whose growth is limited by a nutrient (Mocquet et al. 2013, Yap et al. 2016). Therefore, it should be kept in mind that our N limitation protocol not only affects C and N metabolism differently in each L and UL condition, but also induces a different distribution of positions in their cell cycle.

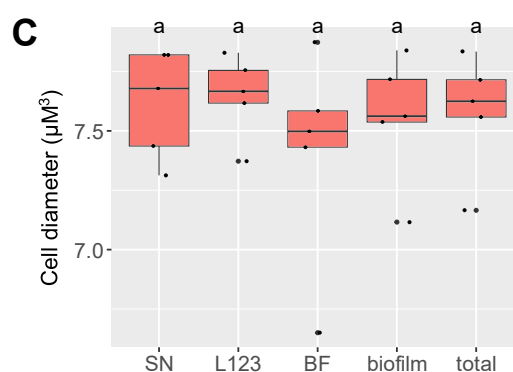
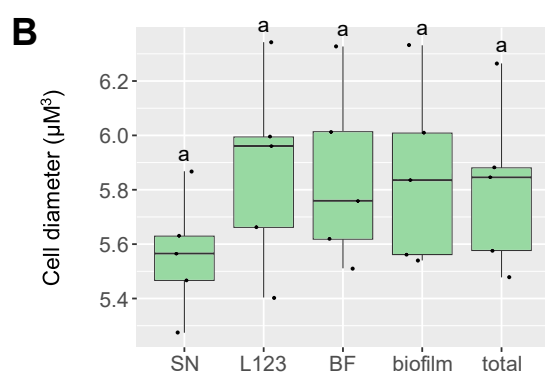
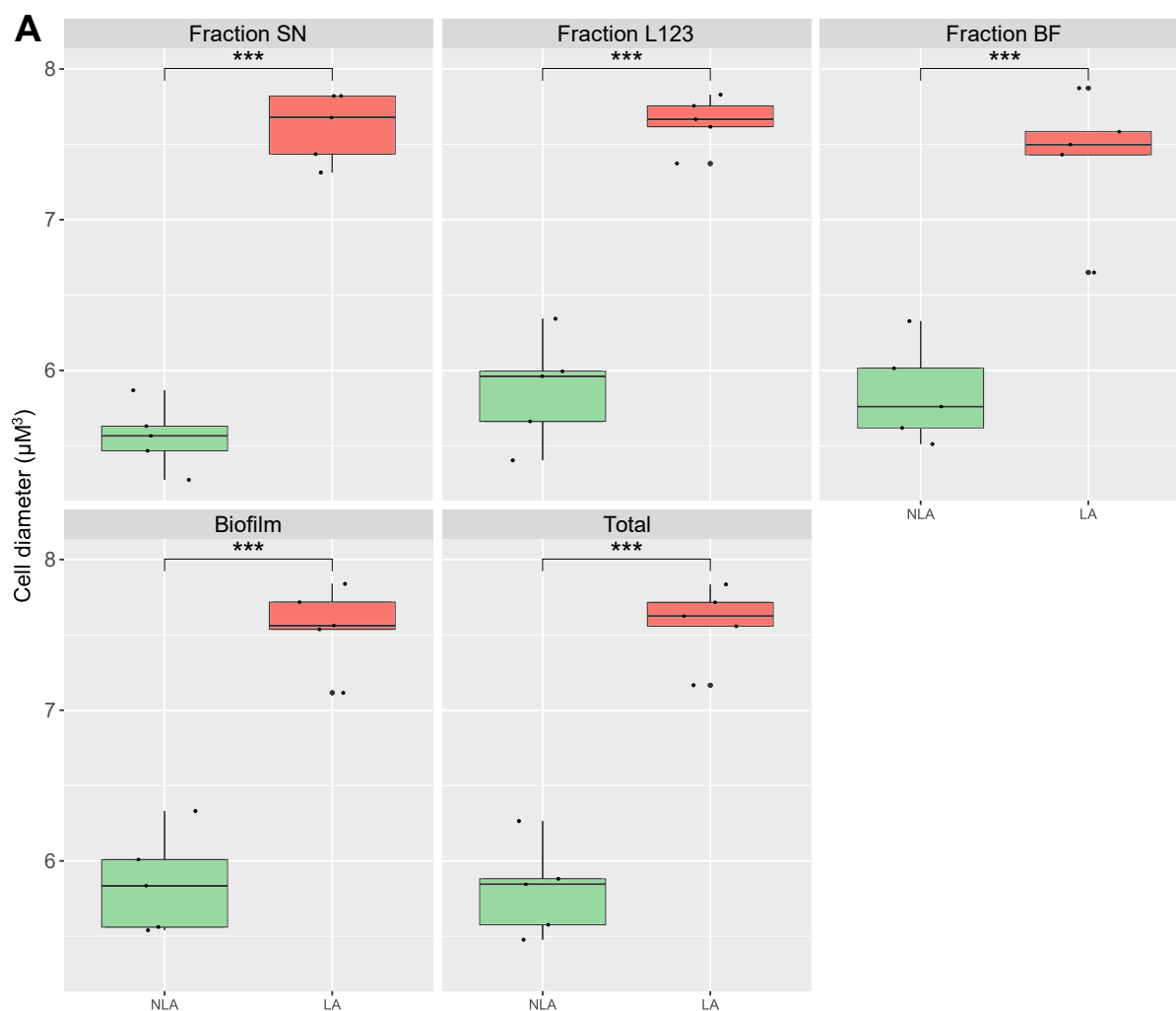


Fig. 13: A) Cell diameter measured in the different fractions of L (red) and UL (green) biofilms. *: $\hat{A}$ p-value < 0.05, **: p-value < 0.01 and ***: p-value < 0.001. Cell diameter measured in UL **(B)** and L **(C)** biofilm fractions; differences are significant when the lowercase letters above the block boxes are different.

For nutrients other than N, we took care to maintain the same concentration ratios of micronutrients (trace metals, vitamins) in the different media used. Although low, these concentrations remain largely above those in the natural environment (Sohrin & Bruland 2011, Pinedo-González et al. 2015). Similarly, the $\text{NO}_3^-:\text{PO}_4^{3-}$ ratios were identical in both L and UL conditions. Indeed, it has been reported that the N:P ratio can influence different compounds such as pigments or lipids in microalgae (Song et al. 2016). As residual PO_4^{3-} was not measured, we ensured that this compound in the culture media was in excess relative to NO_3^- (compared to the Redfield ratio) to ensure that P could not become a limiting factor. What about the $\text{NO}_3^- : \text{PO}_4^{3-}$ ratio at the time of sampling, was it very different between L and UL conditions? We do not have a precise answer to this question, although it is reasonable to assume that it should not be very different. For example, it has been shown that *Chlamydomonas reinhardtii* cells deprived of N reduce their PO_4^{3-} uptake at the same time (Kamalanathan et al. 2016). Finally, we can assume that condition (b) is almost completely fulfilled.

Macromolecules. The amide I band in the FTIR spectra shows a shift towards 1640 cm^{-1} for the L condition fractions and towards 1650 cm^{-1} for the UL condition fractions. Overall, the different spectra have the same shape: a band around $1650\text{-}1640\text{ cm}^{-1}$ (amide I), another around 1545 cm^{-1} (amide II), a waviness with no differentiated peak between 1480 and 1190 cm^{-1} and 3 peaks around 1150 , 1075 and 1015 cm^{-1} (carbohydrates) **(Figure 14)**.

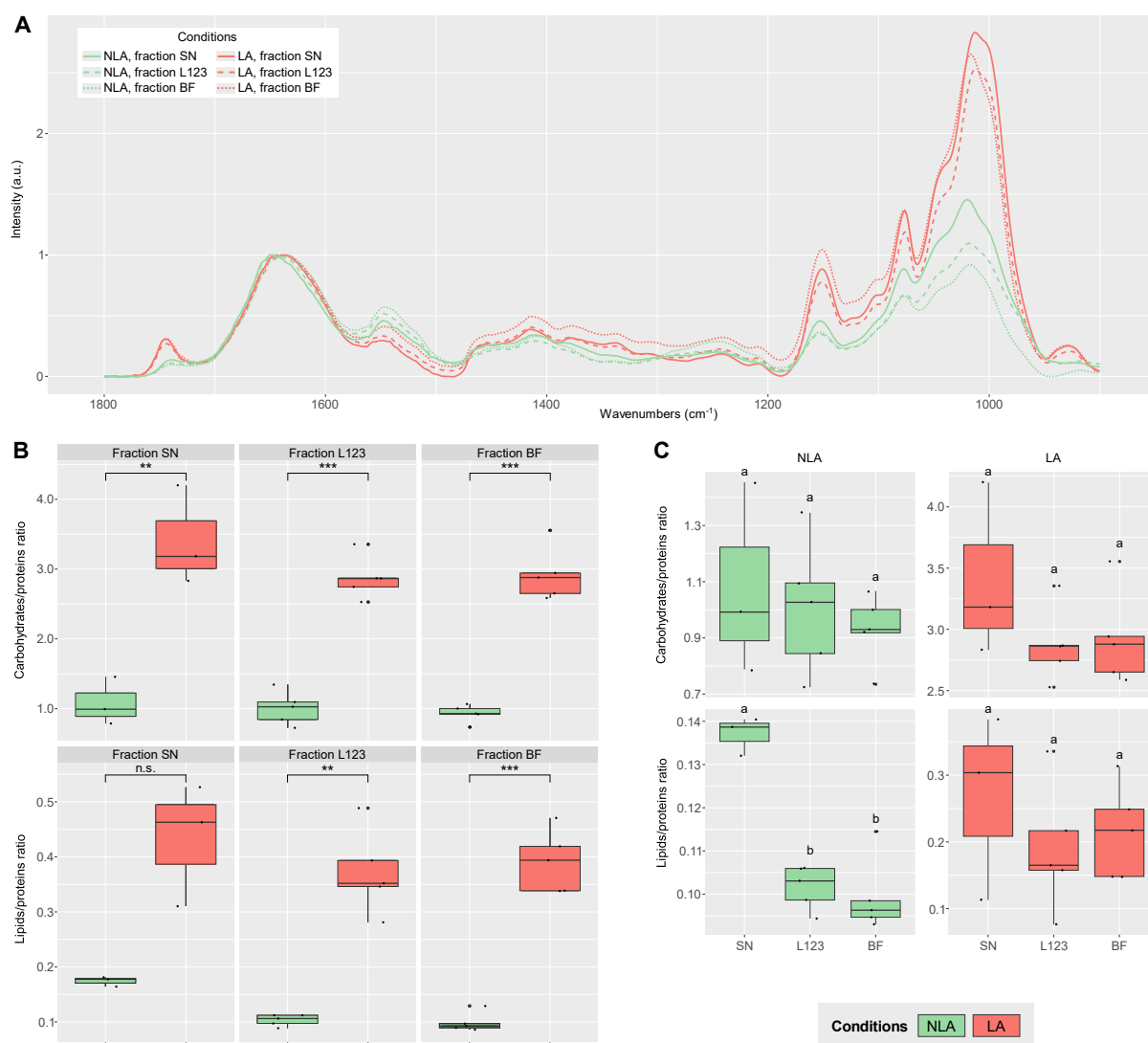


Fig. 14: Relative carbohydrate, lipid and protein compositions in biofilms L (red) and UL (green) estimated by Fourier transform infrared spectroscopy (ATR-FTIR). **A)** Spectra normalized to the maximum of the amide I band (1700-1600 cm⁻¹). **B)** Carbohydrate/protein and lipid/protein ratios for L (red) and UL (green) biofilms. (n.d.) no significant differences, *: p-value < 0.05, **: p-value < 0.01, and ***: p-value < 0.001. **C)** Carbohydrate/protein and lipid/protein ratios for L (red) and UL (green) biofilms. Differences are significant when the lowercase letters above the block boxes are different.

The peaks at 1745 cm⁻¹, probably corresponding to lipids and fatty acids, are not very pronounced in the UL condition, but are clearly visible for all fractions in the L condition. However, the relative intensity of the SN fraction and, to a lesser extent, the L123 fraction is similar for the UL and L conditions. The intensities of the amide II bands of the SN and L123 fractions are weaker than the others. Finally, the L condition shows stronger peaks between 1180 and 950 cm⁻¹ than the UL condition. For the L condition and with the exception of the peak at visible 1150 cm⁻¹, the SN fractions show the highest relative intensities, indicating a higher carbohydrate content compared to the biofilm. Although the FTIR measurements do not provide absolute values of the cellular content of the different families of molecules, they do provide information on their relative proportions. **Figure 16B** shows that in L biofilms, carbohydrates and lipids are more important relative to proteins than in UL biofilms. These

differences, which are significant in the L123 and BF fractions, are logical but difficult to interpret because they may result from different responses of cells faced with a limited nitrogen resource (L condition). These cells may either reduce their protein pool or increase their carbohydrate reserves (the fixed carbon, unable to associate with freshly incorporated nitrogen to form AAs, is temporarily stored in the form of sugars and lipids), and these two responses may also coexist. **Figure 16C** also shows that the lipid/protein ratio of UL cultures is significantly higher in the supernatant than in the biofilm, and that the carbohydrate/protein ratio of L cultures appears to increase with biofilm depth. Although this trend is not statistically significant, it is consistent with the evolution of the measured C:N ratio (**Figure 7**).

Metabolomic analysis. After analysis of the samples by LC-MS and their statistical processing, 2306 ions were identified, of which only 120 remained after filtration (subtraction of blanks, identification and removal of contaminants, elimination of QC and inconsistent samples). Three multivariate statistical analysis methods were then applied: (i) principal component analysis (PCA), (ii) partial least squares discriminant analysis (PLS-DA) and (iii) heat map.

Initially, the location of the QCs on the PCA was between the L and UL conditions on the second axis, but clearly shifted on the first axis. This shift allowed the presence of a large number of contaminants in the pools to be identified and manually eliminated. The PCA clearly distinguishes the groups of each L and UL condition, with a good representation of the projection. The first two axes account for 77.9% of the total variance (**Figure 15A**). The distinction is mainly made on the first axis (PC 1) with a variance of 56%. These results reassure us that N limitation has a significant signature on the metabolome of *T. suecica* in biofilm.

PLS-DA is a method of supervised statistical analysis used to identify the variables, in this case metabolites, that are most involved in discriminating between groups of samples (Variables Important in Projection, VIPs). Applied to our dataset, the PLS-DA projection logically shows a distinction between the L and UL samples, in line with the conclusions of the PCA, with satisfactory representativeness (the first two axes account for 66.5% of the total variance) and statistical reliability (permutation test: $R^2 > 0.99$, $Q^2 = 0.90$) (**Figure 15B**). Some of the most discriminating metabolites (VIP score > 1.3) were identified and characterised by analysis of their MS/MS spectra. A total of 36 metabolites of interest were selected and their representation in the form of a heat map combining variables, conditions and samples showed that 26 metabolites were over-expressed in the UL condition compared to 10 in the L condition (**Figure 15C**). Among the 36 metabolites of interest, several are identical but either represent different adducts (such as $[M + H]^+$, $[M - H + H_2O]^+$, $[M + NH_4]^+$ or $[M + Na]^+$) or correspond to *In-Source* fragments (ISF). After taking these duplicates into account, a total of 26 metabolites were finally identified, of which 16 were overexpressed in the UL condition and 9 in the L condition.

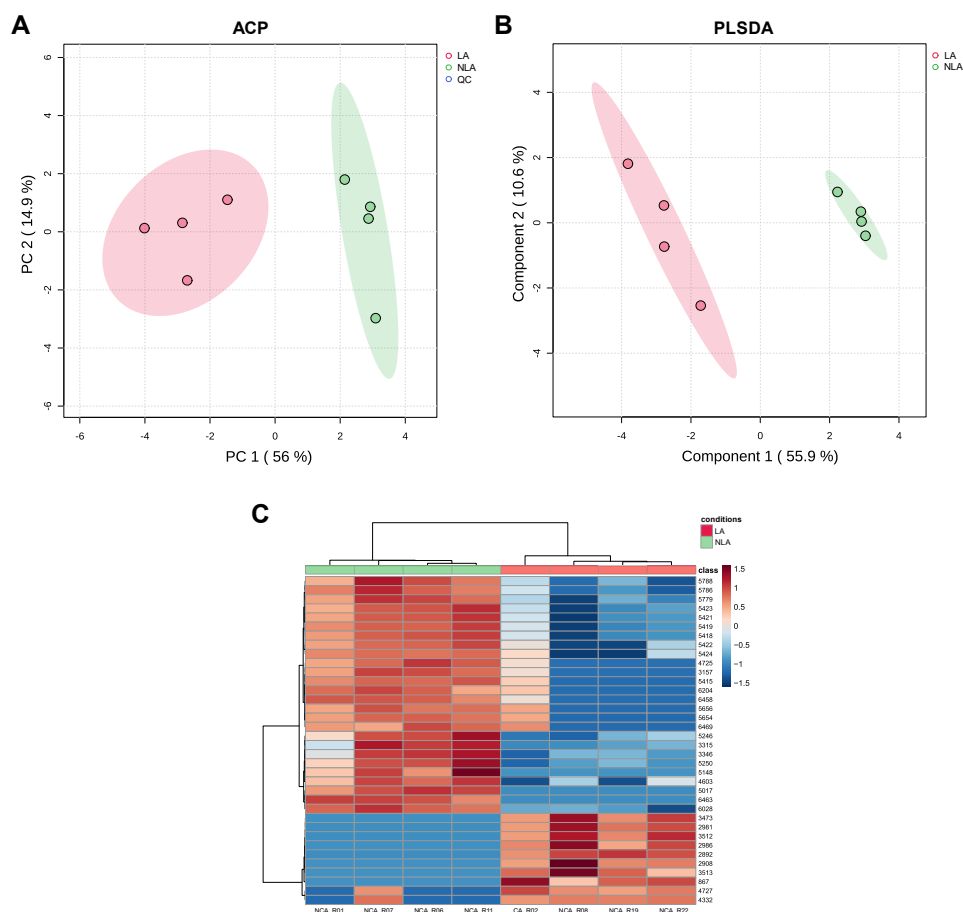
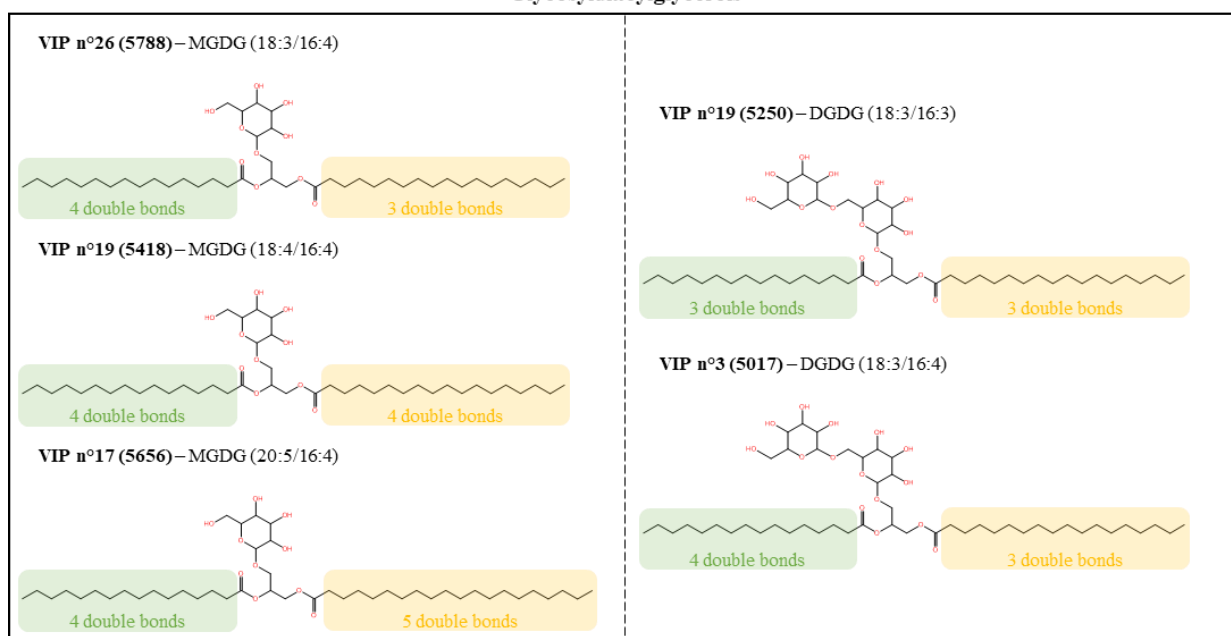


Fig. 15: Multivariate analysis of UHPLC-ESI(+)-QToF-MS data from MeOH extracts of L (red) and UL (green) biofilms. **A)** Principal Component Analysis. **B)** PLS-DA. **C)** Heatmap. Only the 36 variables, in this case metabolites, that were most discriminating in the analysis (VIPs) are shown. Red shades indicate relative overexpression of the variable, while blue shades indicate under expression. Analyses and graphs were generated using MetaboAnalyst (ver. 6.0).

From the MS/MS data, 5 glycosyldiacylglycerols and 2 glycosphingolipids (HexCer) were partially characterised (**Figure 16**). The glycosyldiacylglycerols consist of 3 monogalactosyldiacylglycerols (MGDG) and 2 digalactosyldiacylglycerols. The positions of the double bonds in the carbon chains of the fatty acid groups or sphingosines of each of these molecules have not yet been determined. All of these metabolites are overexpressed in the UL condition. None of the metabolites overexpressed in the L condition could be identified.

N° VIP	Name	Score VIP	Mass isotopic	Ion type	Molecular formula	Chemical family	Molecules	Fold change
1	6463	1.86	732.5799	[M + H] ⁺	C ₅₁ H ₇₅ NO ₂ ou C ₄₄ H ₇₉ NO ₇			
2	2892	1.8146	348.2025 (*)	[M + H] ⁺ (*)	C ₁₆ H ₂₉ NO ₇ ou C ₁₇ H ₂₅ N ₃ O ₃ (*)			
3	5017	1.7887	929.5184	[M + Na] ⁺	C ₄₉ H ₇₉ O ₁₅	Glycosyldiacylglycerols	DGDG (18:3/16:4)	
4	3512	1.6705	617.5235	[2M + Na] ⁺	C ₁₈ H ₃₃ NO ₂			
5	6458	1.6208	714.5502	[M + H] ⁺	C ₄₀ H ₇₃ NO ₉	Glycosphingolipids	HexCer(d18:1/16:1(2O))	
6	2981	1.6158	252.2346	[M - H ₂ O + H] ⁺	C ₁₆ H ₃₁ NO ₂			
7	3473	1.5914	318.2414	[M + Na] ⁺	C ₁₈ H ₃₃ NO ₂			
8	867	1.5448	430.9137					
9	2986	1.539	292.2256	[M + Na] ⁺	C ₁₆ H ₃₁ NO ₂			
10	3157	1.5263	599.4102	[M + H] ⁺	C ₄₀ H ₅₄ O ₄			
11	3315	1.4871	648.45					
12	4725	1.4759	593.279					
13	6204	1.4439	551.4255	[M + H] ⁺	C ₄₀ H ₅₄ O	Carotenes	?	
14	5148	1.4326	423.317					
15	6028	1.4202	712.5365	[M + H] ⁺	C ₄₀ H ₇₃ NO ₉	Glycosphingolipids	HexCer(d18:2/16:1(2O))	
16	2908	1.4142	310.2388	[M + H] ⁺	C ₁₈ H ₃₁ NO ₃			
17	5656	1.4128	786.5176	[M+NH ₄] ⁺	C ₄₅ H ₈₉ O ₁₀	Glycosyldiacylglycerols	MGDG (20:5/16:4) (**)	
18	4332	1.3932	777.5356					
19	5418	1.351	760.5020	[M + NH ₄] ⁺	C ₄₃ H ₈₉ O ₁₀	Glycosyldiacylglycerols	MGDG (18:4/16:4)	
20	5250	1.3499	926.5851	[M + NH ₄] ⁺	C ₄₉ H ₉₃ O ₁₅	Glycosyldiacylglycerols	DGDG (18:3/16:3)	
21	4727	1.3278	411.0658					
22	6469	1.3259	716.0328					
23	5424	1.3175	400.2026					
24	4603	1.314	750.5307					
25	3346	1.3065	760.4989					
26	5788	1.3064	745.4873	[M + H] ⁺	C ₄₃ H ₈₉ O ₁₀	Glycosyldiacylglycerols	MGDG (18:3/16:4)	

Glycosyldiacylglycerols



Glycosphingolipids

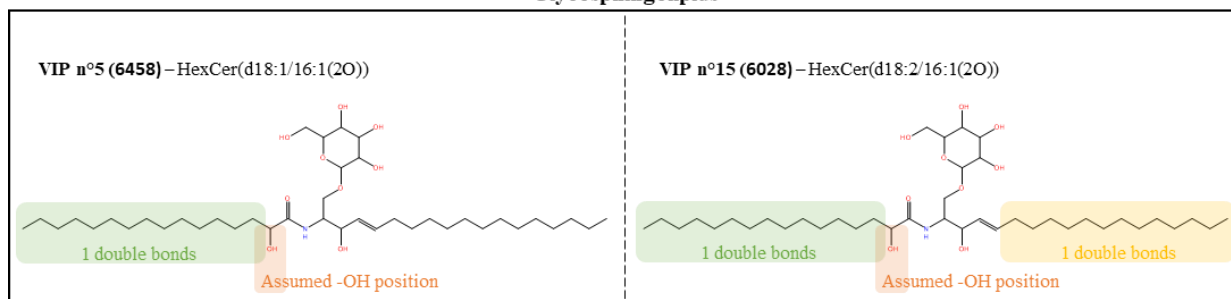


Fig. 16: A) List of VIPs obtained from the analysis of UHPLC-ESI(+)-QToF-MS/MS data for L (red) and UL (green) biofilms. Molecular formula, family and name are given. **B)** Presumed molecular structures of identified and characterized metabolites. *: identified from an In-Source Fragment (ISF), **: assumed molecular structure, presence of non-corresponding peaks.

Discussion

Effect of N limitation on macromolecule production in biofilms. Protein reduction and lipid accumulation are commonly observed responses in N-limited microalgae (Kamalanathan et al. 2016, Tarazona Delgado et al. 2021, Yaakob et al. 2021), albeit with differences between species. Lim et al. (2017) observed that N-deprived *Tetraselmis* sp. M8 initially showed a decrease in lipid consumption, followed by active production and intracellular accumulation of saturated fatty acids (SFAs) and monounsaturated fatty acids (MUFAs). These results corroborate those of Adarme-Vega et al. (2014), who observed that the GA biosynthetic pathways of this species are positively regulated when co-limited by N and P. However, *T. suecica* shows a different physiological response. Following the example of the chlorophyte *Isochrysis zhangjiangensis* (Feng et al. 2011), *T. suecica* favours the production of lipids or carbohydrates depending on whether it is colimited or not by N. Indeed, (D'Souza & Kelly 2000) report that N-deficient conditions increase carbohydrate content threefold in strain CS-187, while protein and lipid content decrease slightly, a trend also observed by (Lourenço et al. 1997) in *T. gracilis* C1. Similarly, in *T. suecica* F&M-M33, co-limitation by N and P seems to have no effect on lipid content, while an increase in carbohydrates of more than 50% was observed (Rodolfi et al. 2009, Bondioli et al. 2012). In *T. suecica* CCMP906, these physiological responses are also manifested by a decrease in transcripts involved in AA synthesis and carbohydrate degradation (Lauritano et al. 2019). Conversely, transcripts involved in lipid biosynthesis are not affected by N limitation (Lauritano et al. 2019). Starch is the main form of carbohydrate accumulation (Kermanshahi-pour et al. 2014), which has also been observed in *T. subcordiformis* (Yao et al. 2012, 2013b, Meng et al. 2014, Jiang et al. 2017). The increase in lipid content exclusively in a N-rich medium was also observed in *T. marina* CTM 20015 (Dahmen-Ben Moussa et al. 2017) and *Tetraselmis* sp. KCTC 12236BP (Kim et al. 2016).

In our experiment, the FTIR measurements, which give an indication of the proportions of the main families of macromolecules, are difficult to interpret when they concern the entire *T. suecica* biofilm (fractions L123 and BF), which contains algal cells, but also bacteria and a large number of macromolecules making up the matrix (essentially EPS), all players whose relative proportions are unknown to us. It is difficult to know in what proportions each of these players is present in the biofilm and retained by the filter. It is therefore difficult to compare these proportions with those reported in the literature, which are usually measured on planktonic cultures composed mainly of algal cells, because our results confound the lipid, carbohydrate and protein composition of the adherent cells and bacteria and of the matrix in which they coexist.

It is therefore expected that the response of macromolecular ratios to the different nitrogen status differs between the SN (algal cells) and L123 and BF (biofilm) fractions. While nitrogen limitation induced an increase in the carbohydrate/protein and lipid/protein ratios in the L123 and BF fractions, only the carbohydrate/protein ratio increased significantly in the SN fraction. Our differences in lipid/protein ratios between suspension and biofilm cells in the UL condition suggest that adherent cells are either less lipid-rich, more protein-rich, or both. However, the material analysed differs between the fractions as noted above: the presence of the EPS matrix and bacteria associated with *T. suecica* must be taken into account for the biofilm samples. Biofilm matrices are known to contain high levels of polysaccharides, enzymes and lipids (Flemming & Wingender 2010, Bharti et al. 2017), which partly explains the differences observed. Similarly, the mere presence of bacteria, which are thought to be more abundant in the biofilm than in the supernatant, may alter macromolecular ratios due to their own

composition, exudates and taxonomic diversity. Although N limitation reduces protein content due to their amide groups, the EPS matrix remains a medium with specific properties. In biofilms, the matrix can be considered as an external digestive system thanks to the retention of enzymes secreted by the cells, which perform several functions: sequestration and utilisation of dissolved and particulate nutrients, release of cells in planktonic form, modification of the structure and composition of the biofilm (Flemming & Wingender 2010). These enzymes are produced by both microalgae, such as AA oxidases (Kumar & Bera 2020), and associated bacteria. The responses of biofilm bacteria to N limitation may therefore also alter macromolecular composition. Nitrogen limitation can induce a change in the molecules excreted by *T. suecica*, the bacteria's substrates, which in turn can trigger specific responses in the bacteria, such as the production of new enzymes. This dynamic of molecular composition requires more targeted analyses of the different macromolecular groups present, but also of the bacterial diversity. Further efforts are needed to improve techniques for separating the EPS matrix from the cells, while preserving their integrity and limiting the denaturation of the molecules present.

Our measurements indicate that N limitation led to a decrease in the lipid/protein and carbohydrate/protein ratios of the biofilms, which can be interpreted as a decrease in proteins, an increase in lipids and sugars, or both. The increase in lipid content in *T. suecica* seems to require a relatively long N limitation time (Rodolfi et al. 2009), which is not the case in our experiment. Conversely, (Yao et al. 2012) reported that starch biosynthesis occurred very rapidly after the onset of N limitation and then gradually decreased. These results suggest a macroscopic slowdown of protein synthesis and an accumulation of carbohydrates in the form of starch in our N-limited biofilms. The relative increase in lipids compared to proteins is most likely a sign of a decrease in the latter, as N limitation slows down the biosynthesis of amino acids. Therefore, controlling the N status of *T. suecica* biofilms seems to be an interesting method to direct the production of molecules towards specific families with potential applications in the biofuel industry.

Metabolite diversity under nitrogen limitation. Our metabolomic data show a difference in the lipid profiles of *T. suecica* L and UL biofilms. In particular, 7 glycolipids identified in UL biofilms were not identified in L biofilms. D'Souza & Kelly (2000) also observed that macronutrient limitation caused a change in the lipid composition of *T. suecica* F&M-M33, in particular an increase in the proportion of saturated (SFAs) and monounsaturated (MUFAs) fatty acid compared to polyunsaturated fatty acid (PUFAs). Among these fatty acids (FAs), palmitic acid (16:0), oleic acid (18:1 n-9), linoleic acid (18:2 n-6), linolenic acid (18:3 n-3) and eicosapentaenoic acid (20:5 n-3) are highly represented (D'Souza & Kelly 2000, Bondioli et al. 2012), with palmitic acid dominating in N-limited cells (Go et al. 2012). The synthesis of glycosyldiacylglycerols and glycosphingolipids could be diverted to other lipids such as FAs. In parallel, these glycolipids could be degraded as N limitation progresses, with carbohydrates acting as polar heads that could incorporate the synthesised starch. However, the change in lipid composition does not necessarily follow a conversion of polar lipids into neutral lipids. In fact, the content of 16:0, 18:1 n-7, 18:2 n-6 and 20:4 n-6 FAs in *T. suecica* F&M-M33 increases under N-limited conditions, in contrast to 16:1 n-9, 16:4 n-3, 18:3 n-3 and 18:4 n-3 FAs. Other FAs such as 20:5 n-3 do not appear to be affected (D'Souza & Kelly 2000). In other microalgae, the lack of NO_3^- increases the levels of monogalactosyldiacylglycerols (MGDGs) and digalactosyldiacylglycerols (DGDGs) (Wang et al. 2016). Conversely, although the total carbohydrate content increased with a predominance of starch, the monosaccharide composition did not appear to change. This consists mainly of 3-deoxy-d-manno-oct-2-ulosonic acid (also known

as Kdo), followed by 3-deoxy-lyxo-2-heptulosaric acid (Dha) and galacturonic acid, and finally galactose (Kermanshahi-pour et al. 2014).

Among the characterised glycolipids, MGDG(18:3/16:4) (ion number 5788, VIP number 26) most likely corresponds to MGDG(18:3(9Z,12Z,15Z)/16:4(4Z,7Z,10Z,13Z)) previously identified in methanolic extracts of *T. chui* (Banskota et al. 2013). This glycolipid is of interest because of its nitric oxide (NO) inhibitory activity (Banskota et al. 2013). NO is a gas with a signalling function in various mammalian tissues, allowing it to regulate many physiological processes, but is also responsible for several diseases (Lundberg & Weitzberg 2022). In plants, NO plays various roles in the regulation of hormonal responses, maturation, senescence, germination, root development, stomatal function, pathogen defence mechanisms and apoptosis (Beligni & Lamattina 2001, del Río et al. 2004, Wendehenne et al. 2004). Its production is mediated by nitric oxide synthases (NOS), but also by nitrate reductases (NR) or non-enzymatic mechanisms such as the reduction of NO_3^- and NO_2^- induced by a drop in pH (Beligni & Lamattina 2001, del Río et al. 2004, Wendehenne et al. 2004). NR activity promoting NO production also exists in microalgae (Mallick et al. 1999, Sakihama et al. 2002, Astier et al. 2021). Mallick et al (2000) have shown that high concentrations of NO_3^- have a positive effect on NO levels. Although the literature is still incomplete for microalgae, the role of NO in regulating the uptake of nitrogenous nutrients and the production of certain metabolites is strongly suggested (Astier et al. 2021). Interestingly for our study, NO also appears to play a role in microalgal adhesion (Thompson et al. 2008, Vardi et al. 2008, Leflaive & Ten-Hage 2011a, Allen et al. 2015). For example, Thompson et al. (2008) showed that cellular NO concentrations in *Seminavis robusta* F3-61B are 4 times higher when the surface is poorly suited to its adhesion, such as hydrophilic surfaces like the acid-washed glass used in our experiments. Artificially increasing intracellular NO levels in *S. robusta* F3-61B was also associated with a reduction in its ability to adhere (Thompson et al. 2008). Similarly, Vardi et al (2008) showed that overexpression of the PtNOA gene in the diatom *Phaeodactylum tricornutum* increased its NO production while reducing its ability to adhere. Inhibition of adhesion associated with an increase in intracellular NO was also observed in the diatom *Fistulifera saprophila* (Allen et al. 2015).

These results lead us to hypothesise that the NO_3^- -rich conditions in our experiment, combined with the hydrophilic surface properties of borosilicate glass washed with 10% HCl, favoured a high production of cellular NO in the biofilms, possibly through the action of an NR. In parallel or in response to this increase in NO, NO-inhibiting MGDGs are produced to prevent loss of adhesion. Our results also suggest that the biosynthesis of these MGDGs stops in *T. suecica* L biofilms. We also hypothesise that the intracellular level of NO in L biofilms remains above a certain threshold, which has the effect of reducing their adhesion. This hypothesis would explain why the layer of moderately adherent cells (fraction L123) increases in L biofilms to the detriment of the most adherent layer (fraction BF).

Chemical mediation mechanisms involving NO in microalgae have also been suggested. Indeed, authors have shown that the aldehyde 2E,4E-decadialenal, synthesised by diatoms, induces NO production and a reduction in adhesion of other diatoms (Vardi et al. 2006, Leflaive & Ten-Hage 2011a, b). Other compounds from the filamentous alga *Uronema confervicolum*, thought to be infochemical but not yet identified, induce similar responses in *F. saprophila* (Allen et al. 2015). Thus, the formation of phototrophic biofilms may involve chemical mediators between microalgae and bacteria that induce variations in NO levels in microalgae depending on environmental conditions. A second MGDG with additional unsaturation on the 18-carbon chain

(MGDG(18:3(6Z,9Z,12Z,15Z)/16:4(4Z,7Z,10Z,13Z))), which might correspond to MGDG(18:4/16:4) (ion no. 5418, VIP no. 19) in our data, was identified as an NO inhibitor by Banskota et al. (2013). Again, according to these authors, increasing the unsaturation of the carbon chains would improve the inhibitory activity of NO. The other identified MGDGs may also have this property. More specific studies are needed to confirm this hypothesis. However, the ecological function(s) of these glycolipids within the biofilm have not been identified. Bioactivities have been suggested for MGDG and DGDG (Alves et al. 2020), although to our knowledge none have been observed in *T. suecica*. Further studies on the potential other properties of these molecules are therefore also required.

Conclusion

We have shown that in N-limited biofilms of the chlorophyte *Tetraselmis suecica* AC254, a slowing down of protein synthesis and an accumulation of carbohydrates in the form of starch are strongly suspected. The chemical composition of the lipids is also affected: we observed a sharp reduction in glycolipids, especially monogalactosyldiacylglycerols (MGDG), in favour of other as yet unidentified lipids. In particular, MGDG (18:3(9Z,12Z,15Z)/16:4(4Z,7Z,10Z,13Z)), which we detected in abundance in non-N-limited biofilms in contrast to N-limited biofilms, has an inhibitory activity on the synthesis of nitric oxide, a compound that plays a signalling and regulatory role in several biosynthetic pathways and whose production is promoted by the reduction of NO₃⁻ and NO₂⁻. The intracellular nitric oxide content of microalgae is also correlated with their ability to adhere. We conclude that the effect of N status on the metabolome of *T. suecica*, and in particular on the production of MGDG, is likely to explain its effects on the adhesion of biofilms of this species.

Tables

Table 1. References of equipment used

#1	Cartouches de filtration Milligard, MILLIPORE
#2	Masterflex L/S modèle 7518-10
#3	MLR-351, SANYO
#4	Erlenmeyer ISO 1773, H: 135 mm, Ø: 34-79 mm, ref. FB33171, Fisherbrand™
#5	L : 25 mm, Ø : 6 mm, ref. 442-4505, VWR Collection
#6	Silicosen® T-type, H: 60 mm, Ø: 32 mm, ref. 8905532, Schott Hirschmann
#7	Colour squid white, ref. 0003671000, IKA®
#8	Nest® 50 mL, ref. 602051, GROSSERON
#9	HIAC Royco, modèle 9703, Pacific Scientific
#10	microtube PFTE, ID: 1,32 mm, OD: 1,93 mm, Adtech Polymer Engineering
#11	acide chlorhydrique, 37 %, extra pur, d=1,18, SLR, ref. 10000180, Fisher Chemical
#12	Cartouche de purification SynergyPak®, ref. SYPK0SIA1, Merck ; EMQ
#13	UML-500 Universal Light Meter & Data Logger, WALZ
#14	Lumilux Cool white, L 36W/940, 120 cm, OSRAM
#15	Midisart® 2000, PTFE, 0,2 µm, 64 mm, 17805-----UPN, Sartorius
#16	pH-meter FP20 New FiveEasy, Mettler Toledo, electrode pH Bioblock Scientific, ref. 84907, Fisherbrand™
#17	Digital Salinity Refractometer MA887, Milwaukee
#18	Minisart® NML Stérile - 0.2 µm, SFCA, ref. 16534-----K, Sartorius

#19	Technicon
#20	Méthanol grade LC-MS (MeOH, min. 99,9%, LC-MS Ultra CHROMASOLV™, Honeywell Riedel-de Haën™)
#21	N-Evap
#22	2 mL, amber, ref. 5190-4034, Agilent Technologies
#23	230 mm, ref. 612-1702, VWR INTERNATIONAL
#24	LIEN_HYPERTEXTE "applewebdata://BE2AFF78-AA90-43C8-A4D8-FB9A95F779D8/"MeOH grade LC-MS, ref. 414855, Carlo Erba « Reagent »[1]
#25	Plastic Two-piece Syringue S7515-3, 2mL, ref. MB9202545TF-LAB, Thermo Scientific
#26	22G×1 ¼"(0,7×32 mm), REGULAR BEVEL 11°, ref. AN*2232R1, AGANI NEEDLE
#27	Syringue Filter, 13mm, 0,2 µm PTFE, Cat. #26142, RESTEK
#28	Short Thread Vial 1.5 mL, 32×11,6 mm, ref. 11 09 0519, FISHERBAND
#29	9 mm bleu UC Sil/PTFE, Cat. No. 11787567, FISHERBAND
#30	Dionex Ultimate 3000 Rapid Separation, Thermo Fisher Scientific
#31	QToF Impact II, Bruker Daltonics, Mannheim
#32	Cat. No. 11762418, FisherBrand
#33	Centrifuge Sorvall™ ST 40R, ref. 75004525, Thermo Scientific
#34	GF/F glass microfibre filters, Ø: 25 mm, circle, ref. 1825-025, Whatman®
#35	analyseur CHN Carlo Erba (modèle 1602)
#36	HPLC Agilent Technologies, série 1200 (plateforme SAPIGH)
#37	AquaPen-C AP110 (PSI Photon Systems Instruments)
#38	PerkinElmer Spectrum-two (PerkinElmer, Waltham, MA, États-Unis)

Table 2. Composition of the different media used

Medium	[NO ₃ ⁻] (µM)	[PO ₄ ³⁻] (µM)	N/P	Other nutrients
f/2	882	36.3	24.2	as in f/2
2f'	3528	290.4	12.1	as in f/2
f/4'	441	36.3	12.1	as in f/2

Table 3: Droop model parameters estimated after fitting the model to experimental data (see Figure 5)

Parameter	Value	Unit
ρ_m	3,09E-06	µmol N.cell ⁻¹ .d ⁻¹
k_s	0,52	µmol N
$\bar{\mu}$	2,34	d ⁻¹
q_0	4,55E-07	µmol N.cell ⁻¹

Table 4: The crosses symbolise the analyses (metabolomic and biochemical) carried out on the different fractions of *Tetraselmis suecica* L and UL biofilms and on the blank

		Biofilm fractions						Blanks
		SN	L1	L2	L3	L123	BF	
Metabolomic analysis	Metabolome							
	Salinité							
	pH							
Biochemical analysis	Particle counts							
	[NO ₃ ⁻]							
	Particulate N and C							
	Quantum yield (φ)							
	Pigments							
	Salinity							
	pH							

ABSTRACT

Biofilms comprise a microbial community growing in a matrix of self-produced extracellular polymeric substances (EPS), adhered to a submerged support. Compared with their bacterial homologue, microalgal biofilms are still little studied. The proximity of the microorganisms in these biofilms, composed of at least one species of microalgae and its phycosphere, suggests that the effect of the allelopathic compounds produced is exacerbated. The greater resistance to biological contamination and resilience of microalgal biofilms compared to planktonic cultures suggests the presence of compounds of interest with antibacterial properties, enabling, for example, the control of the associated bacterial community. The aim of this work is to identify bioactivities derived from biofilms of the haptophyte *Tetraselmis suecica* and to characterize the effects of nitrogen status (level of nitrogen limitation) on these bioactivities. Following a literature review on the influence of nitrogen on the production of phycotoxins and allelopathic compounds, antibacterial and anticancer bioassays were carried out on several aquaculture pathogenic bacterial strains and cancer cell strains. A metabolomic study of *T. suecica* biofilms grown with nitrate was also carried out to understand metabolome responses to nitrogen limitation.

Keywords : phototrophic biofilm, microalgae, nitrogen, semiochemical, marine chemical discovery, metabolomic.

RESUME

Les biofilms comprennent une communauté microbienne qui se développe dans une matrice de substances polymériques extracellulaires (ou EPS) autoproduite, adhérente à un support immergé. En comparaison avec leurs homologues bactériens, les biofilms de microalgues sont encore peu étudiés. La proximité des microorganismes dans ces biofilms, composés au minimum d'une espèce de microalgue et de sa phycosphère, suggère que l'effet des composés allélopathiques produits est exacerbé. La plus grande résistance à la contamination biologique et résilience des biofilms de microalgues par rapport aux cultures planctoniques laisse supposer la présence de composés d'intérêt aux propriétés antibactériennes permettant, par exemple, de contrôler la communauté bactérienne associée. L'objectif de ces travaux est d'identifier des bioactivités issues de biofilms de l'haptophyte *Tetraselmis suecica* et de caractériser les effets du statut azoté (niveau de limitation par l'azote) sur ces bioactivités. Après une revue bibliographique portant sur l'influence de l'azote sur la production des phycotoxines et de composés allélopathiques, des essais biologiques antibactériens et anticancéreux ont été réalisés sur plusieurs souches bactériennes pathogènes d'aquaculture et souches cellulaires cancéreuses. Une étude métabolomique des biofilms de *T. suecica* cultivée avec du nitrate a également été réalisée pour comprendre les réponses du métabolome à une limitation par l'azote.

Mots-clés : Biofilm phototrophe, microalgue, azote, sémiochimie, découverte de produits chimiques marins, métabolomique.