

Proposition de thèse dans le domaine de l'écotoxicologie aquatique

Sujet de la thèse : Evaluation des effets écoToxicologiques de cyanotoxines et cyanopeptides émergents sur des lignées Cellulaires de poissons

1. Contexte

L'eutrophisation des écosystèmes aquatiques en lien avec les apports de nutriments dans les bassins versants, associée au bouleversement climatique, entraîne des proliférations de cyanobactéries de plus en plus fréquentes et intenses à l'échelle mondiale^[1]. Ces organismes photosynthétiques produisent des endotoxines (dermatotoxines, hépatotoxines et neurotoxines) qui constituent un réel danger pour les organismes cibles dont l'Homme^[2,3]. La surveillance des cyanobactéries et des cyanotoxines dans les eaux de surface constitue donc un enjeu majeur pour les autorités sanitaires. Les microcystines (MCs) sont les cyanotoxines les plus couramment rencontrées en milieu naturel, y compris en France où elles sont retrouvées dans 80% des eaux stagnantes soumises aux proliférations de cyanobactéries^[4]. Les MCs sont des hépatotoxines présentant un risque avéré pour l'Homme, avec de nombreux cas d'intoxications aiguës après baignade dans des milieux contaminés, après ingestion d'eau potable ou d'organismes aquatiques contaminés. Les MCs, ainsi que d'autres cyanotoxines comme les neurotoxines anatoxines font l'objet d'une réglementation quant à leurs teneurs dans les eaux récréatives et de boisson. Cependant, de récentes recherches ont montré que des cyanobactéries non productrices de cyanotoxines réglementées pouvaient également induire des effets toxiques. En effet, les cyanobactéries peuvent produire environ 600 oligopeptides appartenant à différentes familles structurales (e.g. anabaenopeptines, aeruginosines, microginines, microcyclamides)^[5,6]. Ainsi, en milieu naturel, une importante diversité de métabolites (cyanotoxinome et cyanopeptidome) peut être retrouvée lors d'un bloom. Les effets des différentes familles de cyanopeptides sur le biote ont été peu étudiés, en partie à cause du manque de standard analytique commercialisé, mais de récentes études suggèrent des niveaux de toxicité au moins similaires à ceux des cyanotoxines réglementées^[5]. Ceci peut poser un problème à la fois écologique et sanitaire dans la mesure où ces cyanopeptides ne sont pas recherchés lors des suivis des proliférations de cyanobactéries. Il est donc primordial d'évaluer la toxicité de certains cyanopeptides émergents d'intérêt, et de la comparer à celles des cyanotoxines actuellement réglementées.

2. Objectifs de la thèse et méthodes

Le projet de thèse proposé est adossé au projet ANR MC-Tox (MNHN/URCA/PASTEUR, 2023-2026) centré sur les cyanopeptides émergents avec 3 objectifs principaux : i) évaluer la chemodiversité des métabolites produits par le genre de cyanobactéries *Microcystis*, très présent en France, et identifier les clusters de gènes de biosynthèse associés aux différentes familles de cyanopeptides; ii) purifier des cyanopeptides d'intérêt, caractériser leur structure chimique et produire des standards analytiques actuellement indisponibles, iii) évaluer les effets toxicologiques des cyanopeptides émergents et les comparer aux effets induits par les cyanotoxines réglementées MCs.

Le projet de thèse s'inscrit donc dans ce 3^{ème} volet avec pour objectif de produire des données de toxicité cellulaire nouvelles et fondamentales portant sur différentes familles de cyanopeptides afin de les comparer à ceux de cyanotoxines déjà réglementées, les MCs, et d'évaluer la pertinence de leur considération dans une future évolution réglementaire. Pour cela, une approche originale de type EDA (*Effect directed analysis*) est proposée afin de répondre successivement à 4 questions scientifiques qui jalonnent le déroulé de la thèse :

- I. Quelles souches de cyanobactéries du genre ubiquiste *Microcystis* présentent les cyanopeptidomes les plus toxiques ?
- II. Parmi les souches les plus toxiques, quelles fractions moléculaires contiennent les familles de cyanopeptides les plus toxiques ?

- III. Quels sont les niveaux de toxicité des cyanopeptides d'intérêt identifiés et purifiés à partir des fractions toxiques ?
- IV. Quels sont les niveaux globaux de toxicité (de la souche productrice à la molécule purifiée) des cyanopeptides émergents en comparaison des MCs réglementées, et doit-on les intégrer dans les futures réglementations ?

L'évaluation de la pression exercée par les cyanobactéries productrices de différentes familles de cyanopeptides sur le biote se fera via l'utilisation de trois lignées cellulaires de poissons représentatifs de nos cours d'eau (rainbow trout liver RTL-W1, carp leucocyte culture CLC, common carp brain CCB) et la mesure de plusieurs réponses cellulaires (viabilité, ERO, activité de phagocytose, capacité de cicatrisation...) par cytométrie en flux et/ou microscopie. A chacune des étapes (extraits bruts de cultures de cyanobactéries, fractions et métabolites purifiés), un travail d'intégration de données quantitative de type Weight-of-evidence (WOE)^[8] permettra d'obtenir un interclassement des niveaux de toxicité des familles de cyanopeptides, pour comparaison avec les MCs réglementées et d'identifier les plus toxiques. Le dernier volet de la thèse consistera en une analyse intégrative de l'ensemble des données de toxicité acquises (de la souche productrice à la molécule purifiée) incluant à la fois un aspect environnemental avec les données issues des tests cellulaires poissons et un volet santé humaine avec les tests cellulaires sur modèles mammifères réalisés dans le cadre du projet MC-Tox (prestataire PCBIS).

Le projet ToxCel a ainsi pour objectif de produire des données d'écotoxicité cruciales pour des cyanopeptides émergents (LC50, NOAEC), afin d'évaluer la pertinence d'une future évolution réglementaire. De plus, le travail mené sur l'intégration de données pourra déboucher sur le développement d'un outil pertinent pour l'interprétation de données toxicologiques multiples, avec de potentielles applications par des questionnaires du milieu ou en évaluation des risques.

3. Compétences souhaitées

Diplôme de master 2 en biologie cellulaire, écotoxicologie ou sciences environnementales. Des compétences en culture cellulaire, cytométrie en flux et biostatistiques seront appréciées. Des connaissances sur la problématique environnementale des cyanobactéries seraient un plus.

4. Equipe d'encadrement du projet de thèse

La thèse est en co-direction entre l'UMR-I-02 Stress Environnementaux et BIOSurveillance des milieux aquatiques (SEBIO, site de Reims) et le Muséum National d'Histoires Naturelles (MNHN, UMR Molécules de Communication et Adaptation des Micro-organismes MCAM) de Paris. L'équipe d'encadrement comprend donc deux directeurs de thèse, Pr Claudia COSIO (SEBIO) et Dr Benjamin MARIE, CR CNRS (MCAM), ainsi que 3 encadrants scientifiques Dr Emilie LANCE, Dr Iris BARJHOUX et Dr Damien RIOULT (SEBIO). La thèse se déroulera intégralement au sein de l'UMR-I-02 SEBIO sur son site de Reims (Université de Reims Champagne-Ardenne). Le projet de thèse s'inscrit totalement dans le projet ANR MC-Tox, assurant financièrement le fonctionnement de la thèse.

5. Candidature (Date limite de candidature : 26 avril 2023)

Le dossier de candidature doit comprendre un CV, une lettre de motivation, les relevés de notes de M1 et M2 (si disponible) et au moins une lettre de recommandation. Le dossier est à envoyer par mail, en un seul fichier, aux adresses suivantes : claudia.cosio@univ-reims.fr, emilie.lance@univ-reims.fr, iris.barjhoux@univ-reims.fr, damien.rioult@univ-reims.fr.

Le.a candidat.e retenue devra passer le concours de l'école doctorale ABIES, à laquelle sera inscrite le.a doctorant.e en cas de réussite, prévu du 5 au 7 Juin.

Thesis title: Evaluation of ecotoxicological effects of cyanotoxins and emerging cyanopeptides on fish cell lines

1. Background

Eutrophication of aquatic ecosystems combined with climate change, is leading to increasingly frequent and intense blooms of cyanobacteria all over the world^[1]. These photosynthetic organisms produce endotoxins (dermatotoxins, hepatotoxins, and neurotoxins) that represent a real hazard to target organisms including humans^[2,3]. Monitoring of cyanobacteria and cyanotoxins in surface waters is therefore a major challenge for health authorities. Microcystins (MCs) are the most common cyanotoxins found in nature, including in France, where they are found in 80% of stagnant waters subject to cyanobacterial blooms^[4]. MCs are hepatotoxins that pose a proven risk to humans, with many cases of acute intoxication after bathing in contaminated environments, or ingestion of drinking water or contaminated aquatic organisms. MCs, as well as other cyanotoxins such as neurotoxic anatoxins, are regulated for their levels in recreational and drinking water. However, recent research has shown that cyanobacteria that do not produce regulated cyanotoxins can also induce toxic effects. Indeed, cyanobacteria can produce about 600 oligopeptides belonging to different structural families (e.g. anabaenopeptins, aeruginosines, microginins, microcyclamides)^[5,6]. In the natural environment, a large diversity of metabolites (cyanotoxinome and cyanopeptidome) can thus be found during a bloom. The effects of different cyanopeptide families on biota have been poorly studied, in part because of a lack of available analytical standards, but recent studies suggest levels of toxicity at least similar to those of regulated cyanotoxins^[5]. This can pose both an ecological and a health problem as these cyanopeptides are not measured in cyanobacterial bloom surveys. It is therefore essential to assess the toxicity of some emerging cyanopeptides of interest and compare them with the currently regulated cyanotoxins.

2. Thesis Objectives and Methods

The thesis project is associated with the ANR MC-Tox project (MNHN/URCA/PASTEUR, 2023-2026) aiming at addressing this problem with 3 main objectives: i) to evaluate the chemodiversity of the metabolites produced by the cyanobacterial genus *Microcystis*, widely present in France, and to identify clusters of biosynthesis genes associated with different cyanopeptide families; ii) to purify cyanopeptides of interest, to characterize their chemical structure and to produce analytical standards currently unavailable, iii) to evaluate the toxicological effects of emerging cyanopeptides and to compare them to the effects induced by regulated cyanotoxins.

This PhD thesis project is included in this 3rd objective by aiming to produce new and fundamental cell toxicity data on different families of cyanopeptides and to compare them with those of cyanotoxins already regulated, MCs, and assess the relevance of their consideration in future regulatory developments. For this, an original EDA (*Effect directed analysis*) approach is proposed to answer successively 4 scientific questions that will mark the thesis progress:

- I. Which cyanobacteria strains of the ubiquitous genus *Microcystis* present the most toxic cyanopeptidomes?
- II. Among the most toxic strains, which molecular fractions contain the most toxic cyanopeptide families?
- III. What are the toxicity levels of the cyanopeptides of interest purified from the toxic fractions?
- IV. What are the overall levels of toxicity (from the producing strain to the purified molecule) of emerging cyanopeptides compared to regulated MCs, and should they be considered in future regulations?

The evaluation of the pressure exerted by cyanobacteria producing different families of cyanopeptides on biota will be carried out using three cell lines of fish representative of our fresh waters (rainbow trout liver RTL-W1, carp leucocyte culture CLC, common carp brain CCB) and the measurement of several cellular responses (viability, ERO, phagocytosis activity, scarring capacity, etc.) by flow cytometry and/or microscopy. At each stage (raw

extracts of cyanobacteria cultures, purified fractions, and metabolites), a quantitative data integration step will be performed using a Weight-of-evidence (WOE) approach^[8] and result in the inter-ranking of the cyanopeptide families regarding their toxicity level, in comparison with the regulated MCs, and the identification of the most toxic ones. The last part of the thesis will consist of an integrative analysis of all acquired toxicity data (from the producing strain to the purified molecule) including both an environmental aspect with data from fish cell tests and a human health component with mammalian cell tests carried out as part of the MC-Tox project (PCBIS provider).

The ToxCel project's objective is to produce critical ecotoxicity data for emerging cyanopeptides (LC50, NOAEC), to assess the relevance of their consideration in future regulatory developments. In addition, the work on the data integration approach may lead to the development of a relevant tool for the interpretation of multiple toxicological data, with potential applications by environmental managers and/or in risk assessment processes.

3. Profile and Skills required

Master's degree in cell biology, ecotoxicology, and/or environmental sciences. Skills in cell culture, flow cytometry, and biostatistics will be appreciated. Knowledge of the environmental issues of cyanobacteria would be a plus.

4. Thesis Supervision

The thesis is co-directed by UMR-I-02 *Environmental Stress and Aquatic Biomonitoring* (SEBIO, site of Reims) and the National Museum of Natural History (UMR Molecules of Communication and Adaptation of Microorganisms MCAM, MNHN) of Paris. The management team, therefore, includes two thesis directors, Pr. Claudia COSIO (SEBIO) and Dr. Benjamin MARIE, (CR CNRS MCAM), as well as 3 scientific supervisors Drs. Emilie LANCE, Iris BARJHOUX and Damien RIOULT (SEBIO). The entire thesis will take place at UMR-I-02 SEBIO in Reims (University of Champagne-Ardenne). The thesis project is fully associated with the ANR MC-Tox project, ensuring the financial functioning of the thesis.

5. Application (Application deadline: April 26th, 2023)

The application file must include a CV, a cover letter, M1 and M2 transcripts (if available), and at least one recommendation letter. It must be sent by e-mail, as a single file, to the following addresses: claudia.cosio@univ-reims.fr, emilie.lance@univ-reims.fr, iris.barjhoux@univ-reims.fr, damien.rioult@univ-reims.fr.

The selected applicant will have to pass the ABIES doctoral school examination, to which the doctoral student will be registered if successful, scheduled from 5 to 7 June.

Bibliographie/Bibliography :

- [1] Paerl, H. W.; Otten, T. G.; Kudela, R. Mitigating the Expansion of Harmful Algal Blooms Across the Freshwater-to-Marine Continuum. *Environ. Sci. Technol.* **2018**, 52 (10), 5519–5529. <https://doi.org/10.1021/acs.est.7b05950>.
- [2] Buratti, F. M.; Manganelli, M.; Vichi, S.; Stefanelli, M.; Scardala, S.; Testa, E.; Funari, E. Cyanotoxins: Producing Organisms, Occurrence, Toxicity, Mechanism of Action and Human Health Toxicological Risk Evaluation. *Archives of Toxicology*. 2017. <https://doi.org/10.1007/s00204-016-1913-6>.
- [3] Svirčev, Z.; Lalić, D.; Bojadžija Savić, G.; Tokodi, N.; Drobac Backović, D.; Chen, L.; Meriluoto, J.; Codd, G. A. *Global Geographical and Historical Overview of Cyanotoxin Distribution and Cyanobacterial Poisonings*; Springer Berlin Heidelberg, 2019; Vol. 93. <https://doi.org/10.1007/s00204-019-02524-4>.
- [4] Anses. Evaluation Des Risques Liés Aux Cyanobactéries et Leurs Toxines Dans Les Eaux Douces. *Avis l'Anses Rapp. d'expertise Collect.* **2020**, Saisines « 1–56.
- [5] Janssen, E. M. L. Cyanobacterial Peptides beyond Microcystins – A Review on Co-Occurrence, Toxicity, and Challenges for Risk Assessment. *Water Research*. 2019. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2018.12.048>.
- [6] Welker, M.; Von Döhren, H. Cyanobacterial Peptides - Nature's Own Combinatorial Biosynthesis. *FEMS Microbiology Reviews*. FEMS Microbiol Rev July 2006, pp 530–563. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6976.2006.00022.x>.
- [7] Breinlinger, S.; Phillips, T. J.; Haram, B. N.; Mareš, J.; Martínez Yereña, J. A.; Hrouzek, P.; Sobotka, R.; Henderson, W. M.; Schmieder, P.; Williams, S. M.; Lauderdale, J. D.; Wilde, H. D.; Gerrin, W.; Kust, A.; Washington, J. W.; Wagner, C.; Geier, B.; Liebecke, M.; Enke, H.; Niedermeyer, T. H. J.; Wilde, S. B. Hunting the Eagle Killer: A Cyanobacterial Neurotoxin Causes Vacuolar Myelinopathy. *Science* (80-.). **2021**, 371 (6536), eaax9050. <https://doi.org/10.1126/science.aax9050>.
- [8] Barjhoux, I.; Fechner, L. C.; Lebrun, J. D.; Anzil, A.; Ayrault, S.; Budzinski, H.; Cachot, J.; Charron, L.; Chaumot, A.; Clérandeau, C.; Dedouge-Geffard, O.; Faburé, J.; François, A.; Geffard, O.; George, I.; Labadie, P.; Lévi, Y.; Munoz, G.; Noury, P.; Oziol, L.; Quéau, H.; Servais, P.; Uher, E.; Urien, N.; Geffard, A. Application of a Multidisciplinary and Integrative Weight-of-Evidence Approach to a 1-Year Monitoring Survey of the Seine River. *Environ. Sci. Pollut. Res.* **2018**, 25 (24), 23404–23429. <https://doi.org/10.1007/s11356-016-6993-6>.