



**HAL**  
open science

# Modulation par la température des profils d'acides gras de deux espèces de diatomées en réponse à une contamination

I. Elfeky

► **To cite this version:**

I. Elfeky. Modulation par la température des profils d'acides gras de deux espèces de diatomées en réponse à une contamination. Sciences de l'environnement. 2018. hal-02607598

**HAL Id: hal-02607598**

**<https://hal.inrae.fr/hal-02607598v1>**

Submitted on 16 May 2020

**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.

## RAPPORT DE STAGE

*Stage effectué de Janvier à Juillet 2018*

**Modulation par la température des profils d'acides gras  
de deux espèces de diatomées en réponse à une  
contamination.**

**ELFEKY Imane**

Master 2 – Écotoxicologie et Chimie de l'Environnement

Université de Bordeaux

*Année universitaire 2017-2018*

**Encadrantes :**

DEMAILLY Floriane

MORIN Soizic

**IRSTEA Bordeaux**

Unité Ecosystèmes Aquatiques et Changements Globaux

Equipe ECOVEA (Ecologie des Végétaux Aquatiques et impact des stress multiples)

50 Avenue de Verdun, 33612 Cestas

## *Remerciements*

Dans un premier temps, je souhaite remercier Monsieur SAUDUBRAY Frédéric et Monsieur ROCHARD Éric de m'avoir permis d'effectuer ce stage de Master 2 au sein de IRSTEA dans l'unité EABX. Je tiens également à remercier ROSEBERY Juliette, responsable de l'équipe ECOVEA, pour son accueil.

Un très grand merci à mes encadrantes, SOIZIC Morin et DEMAILLY Floriane. Un merci pour leur aide, leur bonne humeur et leur suivi tout au long de mon stage. Tutrice et collègue de bureau, je remercie Floriane pour ses conseils, sa confiance, ses explications et ses réponses à mes questions.

Je remercie l'ensemble du personnel IRSTEA ainsi que tous les membres de l'unité EABX et, plus précisément tous les membres de l'équipe ECOVEA, pour leur accueil.

Egalement, je remercie Mélissa pour son aide et ses bons conseils, Gwilherm et Sylvia pour leurs solutions aux problèmes techniques, David et Marie pour leurs conseils en statistiques, Brigitte pour son soutien et sa bonne humeur. Je tiens aussi à remercier LE GUEDARD Marina de nous accueillir au LBM pour les acides gras.

Un grand merci à tout le groupe « pause-café » : Floriane, Mélissa, Brigitte, Marie, Morgane, Thibault, David, Sébastien, pour leur gentillesse et leur soutien. Merci pour la bonne ambiance et les bons moments que nous avons partagés.

## Résumé

Les acides gras jouent un rôle important dans la structure des membranes biologiques et dans les réserves énergétiques. Il existe différentes classes d'acides gras, en fonction de leur degré d'insaturation : les acides gras saturés, mono-insaturés, polyinsaturés et fortement polyinsaturés. Certains acides gras sont dits essentiels et ne peuvent pas être synthétisés *de novo* en proportions suffisantes chez les animaux. Les diatomées, organismes unicellulaires photosynthétiques, sont riches en acides gras essentiels tel que l'acide écosapentaénoïque (EPA). Ces organismes sont des producteurs primaires à la base de la chaîne trophique. Le transfert des acides gras essentiels vers des maillons trophiques supérieurs se fait *via* ces microalgues. Le but de cette étude est d'observer l'impact d'une contamination par deux herbicides (le diuron et le S-métolachlore) combinée à une augmentation de la température sur deux espèces de diatomées d'eau douce : *Gomphonema gracile* et *Nitzschia palea*. La concentration testée en herbicide est de 10 µg/L, pour une température de 17,5°C puis de 20,5°C, sur une semaine d'exposition. La variabilité des profils d'acides gras a été étudiée en tant que descripteur afin d'évaluer l'effet modulateur de la température sur l'impact des herbicides. En complément de ce descripteur, la photosynthèse, la croissance cellulaire et la concentration en chlorophylle a ont été suivies. Pour les deux espèces, l'augmentation de la température a entraîné une augmentation de la photosynthèse pour les échantillons témoins. Concernant les échantillons contaminés, l'augmentation de la température a atténué l'effet du diuron (inhibiteur de la photosynthèse pour les deux expériences). En ce qui concerne les acides gras, l'augmentation de température s'est traduite par une augmentation des acides gras polyinsaturés pour les témoins. L'effet combiné température et herbicides a été observé avec une modulation de l'effet du diuron à 20,5°C. Aucun effet significatif sur la proportion en acides gras n'a été observé avec le S-métolachlore.

## Abstract

Fatty acids play an important role in the structure of biological membranes and in energy reserves. There are different classes of fatty acids, depending on the unsaturation degree: saturated, monounsaturated, polyunsaturated and highly polyunsaturated fatty acids. Some of them are called essential since they cannot be synthesized *de novo* in sufficient proportions by animals. Diatoms, unicellular photosynthetic organisms, are rich in essential fatty acids, such as ecosapentaenoic acid (EPA). These organisms are primary producers and are the base of the food chain. They allow the transfer of essential fatty acid to higher trophic level. The aim of this study is to observe the impact of a contamination by two herbicides (diuron and S-metolachlor) combined with an increase in temperature on two freshwater diatom species: *Gomphonema gracile* and *Nitzschia palea*. A concentration of 10 µg/L is tested during a one week exposure, at 17,5°C and at 20,5°C. The variability of fatty acid profiles has been studied as a descriptor in order to assess the modulatory effect of temperature on the impact of herbicides. Moreover, photosynthesis, cell growth and concentration of chlorophyll a were monitored. For both species, an increase of temperature resulted in an increase of photosynthesis for the control samples. Concerning the contaminated samples, an increase of temperature attenuated the effect of diuron (which inhibited photosynthesis for both experiments). About fatty acids, an increase in temperature lead to an increase of polyunsaturated fatty acids, for the controls samples. The combined effect of temperature and herbicide was observed with a modulation of the effect of diuron at 20,5 ° C. No significant effects on the proportion of fatty acid were observed with S-metolachlor.

## TABLE DES MATIERES

Liste des tables et des figures.....	6
Abréviations.....	8
INTRODUCTION.....	9
SYNTHESE BIBLIOGRAPHIQUE.....	11
<b>1. Les diatomées.....</b>	<b>11</b>
a) Définition et généralités.....	11
b) Métabolisme des microalgues.....	12
i. La photosynthèse.....	12
ii. Reproduction des diatomées.....	12
c) Facteurs influençant leur développement.....	12
d) Importance des diatomées dans l'écosystème aquatique.....	13
e) Les acides gras chez les diatomées.....	14
i. Localisation dans la cellule.....	14
ii. Notations.....	15
iii. Les différentes classes d'acides gras.....	16
iv. Formation des acides gras.....	17
v. Acides gras majoritaires chez les diatomées.....	17
vi. Importance des acides gras des diatomées.....	18
vii. Variabilité des acides gras.....	19
1) Stress environnemental.....	19
2) Stress toxique.....	20
<b>2. Les herbicides.....</b>	<b>21</b>
a) Contamination des cours d'eau par les herbicides.....	21
b) Caractéristiques et mode d'action des pesticides étudiés sur les microalgues.....	22
<b>3. Impact d'un stress multiple : effet combiné.....</b>	<b>23</b>
a) Température et herbicides.....	23
b) Intensité lumineuse et herbicides.....	23
<b>RESULTATS.....</b>	<b>25</b>
<b>1. Démarche expérimentale.....</b>	<b>25</b>
<b>2. Activité photosynthétique croissance cellulaire et chlorophylle a.....</b>	<b>26</b>
<b>3. Variabilité des profils d'acides gras.....</b>	<b>32</b>
i. Evolution des profils d'acide gras en fonction du stade de croissance.....	32
ii. Variabilité interspécifique.....	33
iii. Effet de la température seule.....	34
iv. Modulation des effets toxiques par la température.....	36

<b>DISCUSSION</b> .....	40
<b>CONCLUSION ET PERSPECTIVES</b> .....	44
<b>HYGIENE ET SECURITE</b> .....	46
<b>Annexe 1</b> .....	47
<b>Annexe 2</b> .....	48
<b>Annexe 3</b> .....	52
<b>Annexe 4</b> .....	53
<b>Annexe 5</b> .....	54
<b>BIBLIOGRAPHIE</b> .....	55

## Liste des figures et des tables

<b>Figure 1</b> : Observation au microscope ( $\times 1000$ ) des cultures étudiées pour cette étude : l'espèce <i>Gomphonema gracile</i> à gauche et <i>Nitzschia palea</i> à droite .....	11
<b>Figure 2</b> : Composition des lipides membranaires et des lipides de réserve (Lehninger et al, 2004) .....	14
<b>Figure 3</b> : Exemple d'un acide gras saturé (acide stéarique, en haut, noté 18:0) et acide gras insaturé (acide oléique, en bas, note 18:1n9) .....	15
<b>Figure 4</b> : Formation des acides arachidonique (20:4n6), écosapentanoïque (20:5n3) et docosahexaénoïque (22:6n3) à partir des acides linoléique et linoléinique .....	17
<b>Figure 5</b> : Teneur des dix pesticides les plus quantifiés en 2014 dans les cours d'eaux français (Agences de l'eau ; SoeS 2017) .....	21
<b>Figure 6</b> : Ballons de 100 ml dans l'armoire thermostatée (culture + milieu Dauta) .....	25
<b>Figure 7</b> : Activité photosynthétique après 1,2 et 7 jours de contamination au diuron et S-métolachlore pour l'espèce <i>Gomphonema gracile</i> .....	27
<b>Figure 8</b> : Activité photosynthétique après 1,2 et 7 jours de contamination au diuron et S-métolachlore pour l'espèce <i>Nitzschia palea</i> .....	27
<b>Figure 9</b> : Ballons de culture de <i>Gomphonema gracile</i> avec de gauche à droite : témoin, S-métolachlore puis diuron .....	29
<b>Figure 10</b> : Ballons de culture de <i>Nitzschia palea</i> avec de gauche à droite : témoin, S-métolachlore puis diuron .....	29
<b>Figure 11</b> : Croissance cellulaire sur une semaine de l'espèce <i>Gomphonema gracile</i> .....	29
<b>Figure 12</b> : Croissance cellulaire sur une semaine de l'espèce <i>Nitzschia palea</i> .....	30
<b>Figure 13</b> : Concentration en chlorophylle a à $t_7$ <i>Gomphonema gracile</i> .....	31
<b>Figure 14</b> : Concentration en chlorophylle a à $t_7$ <i>Nitzschia palea</i> .....	31
<b>Figure 15</b> : Variation des profils d'acides gras sur une semaine chez <i>Gomphonema gracile</i> ( $T^\circ$ de $20,5^\circ\text{C}$ ) .....	32
<b>Figure 16</b> : Variation des profils d'acides gras sur une semaine chez <i>Nitzschia palea</i> ( $T^\circ$ de $20,5^\circ\text{C}$ ) .....	33
<b>Figure 17</b> : Composition en acide gras des deux espèces de diatomées étudiées ( $20,5^\circ\text{C}$ ) .....	34
<b>Figure 18</b> : Profils d'acides gras à $17,5^\circ\text{C}$ et à $20,5^\circ\text{C}$ pour <i>Gomphonema gracile</i> .....	35
<b>Figure 19</b> : Profils d'acides gras à $17,5^\circ\text{C}$ et à $20,5^\circ\text{C}$ pour <i>Nitzschia palea</i> .....	35

<b>Figure 20 :</b> Profils d'acides gras à 17,5°C et à 20,5°C représentant l'impact du diuron sur <i>Gomphonema gracile</i> .....	36
<b>Figure 21 :</b> Profils d'acides gras à 17,5°C et à 20,5°C représentant l'impact du diuron sur <i>Nitzschia palea</i> .....	37
<b>Figure 22 :</b> Profils d'acides gras à 17,5°C et à 20,5°C représentant l'impact du S-métolcahlore sur <i>Gomphonema gracile</i> .....	38
<b>Figure 23 :</b> Profils d'acides gras à 17,5°C et à 20,5°C représentant l'impact du S-métolachlore sur <i>Nitzschia palea</i> .....	38
<b>Figure 24 :</b> Evolution de la proportion en PUFA, MUFA et SFA sous l'impact du diuron et du s-métolachlore à 17,5°C et à 20,5°C chez les espèces <i>Gomphonema gracile</i> (droite) et <i>Nitzschia palea</i> (gauche) .....	39
<b>Figure 25 :</b> CE50 du diuron pour <i>Nitzschia palea</i> (Roubeix et al. 2011) .....	41
<b>Figure 25 :</b> Hypothèse concernant la température optimale dans cette étude.....	43
<b>Figure 26 :</b> Tubes de <i>Gomphonema gracile</i> après centrifugation.....	50
<b>Figure 27 :</b> Chromatogramme d'un étalon de PUFA.....	54
<b>Figure 28 :</b> Chromatogramme et tableau de valeurs d'un échantillon témoin de <i>Gomphonema gracile</i> .....	54
<b>Tableau 1 :</b> Les acides gras (Fatty Acid FA) majoritaires et biomarqueurs pour chaque classe algale ; ceux des diatomées faisant partie de la classe "Bacillariophyceae" (Taipale et al. 2013) ...	18
<b>Tableau 2 :</b> Significativité des évolutions de proportions des acides gras chez <i>Gomphonema gracile</i> entre t <sub>0</sub> et t <sub>7</sub> .....	33



## **Abréviations**

**CE50** : Concentration efficace à 50%

**DHA** : Acide docosahexaénoïque

**DPA** : Acide docosapentaénoïque

**EPA** : Acide écosapentaénoïque

**EPSPS** : 5-énolpyruvylshikimate-3-phosphate synthase

**HUFA**: Highly Unsaturated Fatty Acid : acides gras hautement insaturés

**IBD** : Indice Biologique Diatomées

**IPS** : Indice de Polluosensibilité Spécifique

**MGDG** : Monogalactosyldiacylglycérol

**MUFA** : Monounsaturated Fatty Acid : acides gras monoinsaturés

**PS II** : Photosystème II

**PUFA** : Polyunsaturated Fatty Acid: acides gras polyinsaturés

**SFA**: Saturated Fatty Acid: acides gras saturés

**SOeS** : Service de l'Observation et des Statistiques

**SQDG** : Sulfoquinovosyldiacylglycérol

**TAG** : Triacylglycérol

## INTRODUCTION

Les diatomées sont des algues microscopiques présentes dans les zones humides, les océans et les eaux douces. Elles sont retrouvées soit en suspension dans l'eau ou rattachées à un biofilm sur un substrat. Ces organismes microscopiques jouent un rôle très important dans la production primaire. En effet, les diatomées contribuent à environ 43% de la production primaire des océans et à un quart de la production primaire globale (Lavoie et al. 2008). Ces microalgues sont aussi caractérisées par une très grande variété d'espèces, une diversité de formes mais aussi une diversité des milieux colonisés. Les diatomées sont à la base de la chaîne trophique et sont donc des organismes importants pour les maillons trophiques supérieurs. Elles sont notamment caractérisées par une composition en acides gras riche en acides gras « essentiels » pour les maillons trophiques supérieurs. En plus de son intérêt biologique, l'étude des diatomées est intéressante pour le suivi de la qualité de l'eau des rivières.

Des altérations et impacts sur les producteurs primaires, comme les diatomées, sont susceptibles d'engendrer une rupture de l'équilibre de l'écosystème entier. Un effet néfaste sur ces communautés peut induire un déséquilibre biologique et donc un déclassement des cours d'eau (mauvais état écologique, biologique et chimique). C'est pourquoi les diatomées sont souvent utilisées en tant que bioindicateurs de la qualité des cours d'eau, dans le suivi réglementaire des masses d'eau (par exemple en France, par application de la Directive Cadre sur l'Eau).

Les organismes vivants aquatiques sont impactés par la présence de substances toxiques dans l'eau. Par exemple, la contamination des cours d'eau et des nappes souterraines par les pesticides reste un sujet de préoccupation majeur. Les pesticides sont des substances qui regroupent les produits phytosanitaires et les biocides. Les produits phytosanitaires sont destinés à protéger les cultures des organismes nuisibles et indésirables (champignons, insectes, mauvaises herbes, etc.). Cependant, les substances actives et les molécules métabolites sont retrouvées dans les divers compartiments de l'environnement. Par ruissellement, elles contaminent notamment le milieu aquatique.

Des points de surveillance de la qualité de l'eau sont présents sur tout le territoire français. D'après le Service de l'Observation et des Statistiques (SOeS), la quasi-totalité des cours d'eau français contiennent des pesticides. Dans ces cours d'eau, ce sont surtout des herbicides qui sont retrouvés, à des concentrations variables : parmi les 15 pesticides les plus détectés dans les cours d'eau en 2013, 13 sont des substances à mode d'action herbicide (SOeS 2013).

Ces herbicides peuvent être toxiques vis-à-vis des diatomées : des effets néfastes peuvent être observés à différents niveaux (individu, population et communauté). Un effet à un simple niveau

peut enchaîner des effets en cascade sur d'autres niveaux : des effets moléculaires et cellulaires peuvent induire des altérations physiologiques (Moisset et al. 2015). Ainsi, pour une meilleure compréhension de l'impact des herbicides, des études à différentes échelles complémentaires sont nécessaires. Parmi les recherches écotoxicologiques étudiant l'impact des pesticides sur divers indicateurs, les effets éventuels de ces substances sur les acides gras ont peu été explorés.

De plus, dans le milieu naturel, les communautés aquatiques ne sont pas soumises à un seul facteur de stress : les communautés de microalgues peuvent aussi être soumises additionnellement à un stress d'origine environnementale. En effet, des facteurs tels que la température, l'intensité lumineuse ou la composition de l'eau en nutriments peuvent modifier le fonctionnement normal de ces organismes (Colijn et Van Buurt 1975). La réponse des organismes à la combinaison de stress environnementaux et anthropiques est difficilement prévisible et mérite des études dédiées. Les études qui se sont intéressées à cette combinaison de stress se focalisent souvent à l'échelle physiologique (photosynthèse comme descripteur) (Bonnineau et al. 2012).

Les organismes aquatiques étant soumis à divers facteurs de stress, la question est de savoir si la sensibilité des microalgues aux herbicides pourrait dépendre des conditions environnementales, en ciblant l'effet température.

### Contexte et objectifs de l'étude

Ce stage se déroule dans le cadre du projet LIPID (Lipids as Indicators of Pollution In Diatoms) financé par le LabEx COTE (ANR-10-LABX-45), qui a pour objectif de développer l'utilisation d'un biomarqueur lipidique pour évaluer la toxicité de divers polluants vis-à-vis des diatomées. Plus précisément dans cette étude, il s'agit d'observer la variabilité des profils d'acides gras en réponse à différents stress. Pour étudier l'interaction de ces différents stress, deux espèces de diatomées, dont l'écologie diffère, sont étudiées : *Gomphonema gracile* et *Nitzschia palea*.

L'objectif du stage est donc de voir si des modifications des profils d'acides gras chez les diatomées peuvent mettre en évidence une exposition à un toxique et un stress dû à des modifications de paramètres abiotiques et de caractériser la variabilité de ces réponses entre deux espèces de diatomées.

Dans cette étude nous nous intéressons à deux herbicides, ayant des cibles cellulaires différentes : le diuron et le S-métolachlore. En plus du descripteur acides gras, d'autres descripteurs plus classiques en écotoxicologie vont être également étudiés : la croissance cellulaire, l'activité photosynthétique ainsi que la concentration en chlorophylle. Cette combinaison de descripteurs permettra d'observer les effets à différentes échelles : au niveau de la structure cellulaire et au niveau physiologique.

## SYNTHESE BIBLIOGRAPHIQUE

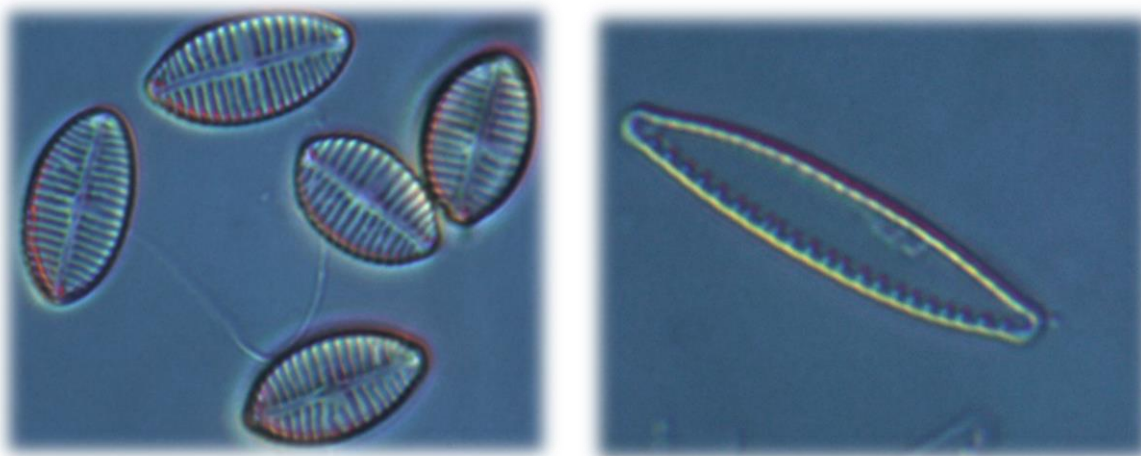
### 1. Les diatomées

#### a) Définition et généralités

Les microalgues sont divisées en plusieurs classes, en fonction de divers critères comme le métabolisme ou bien la pigmentation : les Bacillariophycées, les Chlorophycées, les Chlorodendrophycées, les Chrysophycées, etc. (Guiry 2012). Les Bacillariophycées sont par exemple des microalgues brunes tandis que les Chlorophycées sont des algues vertes.

Les diatomées sont des microalgues brunes qui font partie de la classe des *Bacillariophycées*, qui regroupe environ 200 000 espèces (Guiry 2012). Ce sont des organismes unicellulaires photosynthétiques. Ces microalgues sont présentes dans le milieu aquatique sous forme planctonique (phytoplancton dans la colonne d'eau), ou bien de façon benthique (sur un substrat).

Ces algues microscopiques brunes sont caractérisées par un squelette siliceux, appelé frustule. Ce frustule est composé de deux valves qui s'emboîtent : l'hypovalve et l'épivalve.



**Figure 1** : Observation au microscope ( $\times 1000$ ) des cultures étudiées pour cette étude : l'espèce *Gomphonema gracile* à gauche et *Nitzschia palea* à droite

## **b) Métabolisme des microalgues**

### *i. La photosynthèse*

Les microalgues sont des producteurs primaires : elles utilisent l'énergie lumineuse, le dioxyde de carbone et les éléments minéraux pour synthétiser leur propre matière organique (processus de photosynthèse). Ces organismes vivants sont dits autotrophes.

La photosynthèse a lieu dans des organites en particuliers : les chloroplastes. La réaction se déroule au niveau de la membrane des chloroplastes, appelée membrane thylakoïde. Les chloroplastes renferment des pigments chlorophylliens, nécessaires à la photosynthèse. Ces pigments photosynthétiques sont la chlorophylle a, b et c et des pigments caroténoïdes (Roy et al, 2011). C'est la chlorophylle qui capte l'énergie lumineuse et qui la transforme en énergie chimique (synthèse de sucres).

En physiologie et écotoxicologie, la photosynthèse est souvent utilisée en tant que descripteur. Pour cela, l'activité photosynthétique est souvent étudiée via des méthodes de fluorimétrie en lumière modulée (annexe 2). La quantité de chlorophylle est aussi un descripteur complémentaire à la photosynthèse puisqu'elle informe sur la biomasse photosynthétique. La chlorophylle peut être dosée grâce à des méthodes de spectrophotométrie d'absorption moléculaire (annexe 2).

### *ii. Reproduction des diatomées*

Les diatomées ont un cycle de reproduction spécifique : elles sont caractérisées par une reproduction asexuée (multiplication végétative), qui donne deux cellules dont l'une inférieure à la taille de la cellule mère (réduction de la taille des valves). Le cycle de vie de ces microalgues est assez court : de 3h à 3 jours. Par la suite, lorsque la taille de l'espèce atteint sa valeur minimale, une reproduction sexuée a lieu. Elles alternent donc phase de reproduction asexuée (phase majoritaire et privilégiée) et phase de reproduction sexuée (Lavoie et al. 2008). La cinétique de croissance d'une culture de diatomée est de type exponentiel.

## **c) Facteurs influençant leur développement**

Toutes les espèces ne présentent pas les mêmes écologies et capacités de réponses aux différentes pressions du milieu. Les effets observés peuvent être très variables selon l'espèce étudiée.

Le métabolisme des microalgues peut être influencé par des facteurs environnementaux ou chimiques. En effet, une modification des conditions optimales de température, de lumière et de nutriments, ou encore une pollution de l'eau est capable d'impacter le métabolisme normal de ces organismes vivants.

Les microalgues sont des organismes photosynthétiques et répondent directement aux fluctuations de la lumière. Pour les diatomées, l'optimum de croissance est à des intensités lumineuses moyennement élevées, mais elles peuvent aussi s'adapter aux faibles intensités (Lavoie et al. 2008). En terme de températures, les diatomées sont fortement présentes dans le milieu aquatique entre 5 et 20 °C (Lavoie et al. 2008). En raison de ces optimums de température et d'intensité lumineuse, les diatomées sont souvent retrouvées au début du printemps (qui est aussi une période riche en nutriments, et notamment en silice, qui est un des éléments les plus importants pour la croissance). Ainsi, une variation de ces paramètres environnementaux entraînerait une modification du métabolisme cellulaire.

Par exemple, des études ont démontré qu'une température et/ou intensité lumineuse trop élevées diminuaient le taux de croissance des diatomées (teneur en chlorophylle et activité photosynthétique en tant que descripteurs). Au contraire, à faible température, la densité de la population augmentait (Admiraal 1977, Admiraal et Peletier 1980).

Egalement, il a été largement démontré qu'un stress chimique affecte le développement des microalgues. Par exemple, l'étude de Debenest et al. (2009) a montré qu'une contamination en isoproturon (à 30 µg/L) ou en s-métolachlore (5 puis 30 µg/L) inhibait significativement la densité cellulaire et la concentration en pigments chlorophylliens.

#### **d) Importance des diatomées dans l'écosystème aquatique**

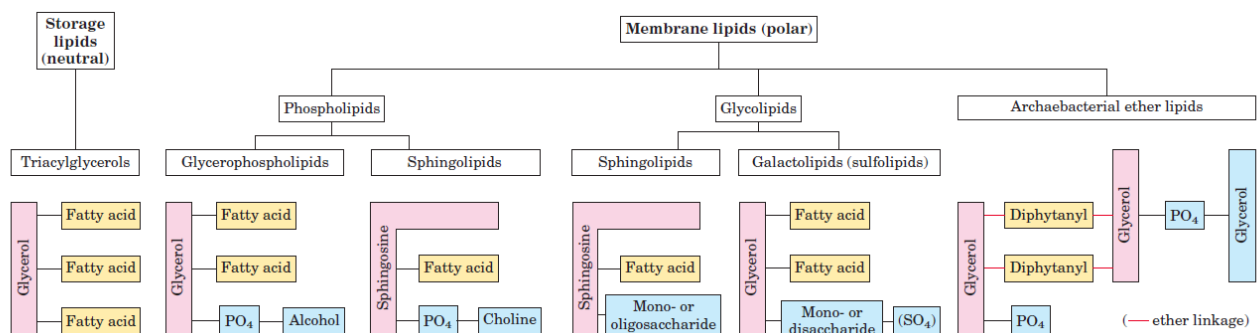
Dans l'environnement, les diatomées jouent un rôle important car elles contribuent à la production d'oxygène et à la fixation de carbone. En effet, elles peuvent fixer jusqu'à 20% du CO<sub>2</sub> global, qui est alors converti en hydrates de carbone ou en lipides (Zulu et al. 2018) ; et elles sont responsables d'environ 20% de la production d'oxygène atmosphérique (Lavoie et al. 2008).

De plus, les diatomées sont considérées comme producteurs primaires. Elles sont à la base de la chaîne trophique et réagissent assez rapidement aux perturbations. Un impact sur les diatomées entraîne un effet sur tous les maillons trophiques supérieurs et perturbe donc tout l'écosystème aquatique. L'étude de cette classe de microalgues est donc pertinente et importante.

## e) Les acides gras des diatomées

### i. Localisation dans la cellule

Chez les organismes vivants, les acides gras prennent part dans la composition des lipides membranaires. Les membranes biologiques sont sous forme d'une bicouche lipidique. Ces lipides présentent une partie hydrophile, polaire et une partie hydrophobe, apolaire. Cette bicouche protège la cellule de l'entrée de molécules polaires ou d'ions dans la cellule. Il y a 5 types de lipides membranaires : les *glycérophospholipides*, les *galactolipides et sulfolipides*, les *tetraétherlipides*, les *sphingolipides* et les *stérols* (Lehninger et al. 2004). Chez les microalgues, les lipides constitutifs des membranes sont les **phospholipides**, **galactolipides** et **stérols**.



**Figure 2 :** Composition des lipides membranaires et des lipides de réserve (Lehninger et al. 2004)

Les lipides produits chez les microalgues peuvent être classés en deux catégories : les lipides polaires (**structure de la membrane**) et les lipides non polaires, neutres (**lipides de stockage**)(Sharma et al. 2012). Les lipides de stockage sont souvent des triacylglycérols (TAG), composés principalement d'acides gras. Ces TAG peuvent représenter jusqu'à 80% de la composition en lipides et 25% de la biomasse des diatomées (Zulu et al. 2018). Les lipides polaires, tels que les phospholipides et stérols, sont importants dans la structure des membranes cellulaires du fait de leur rôle de « barrières perméables » (Sharma et al. 2012).

Chaque membrane a une composition spécifique en lipides. Par exemple, les membranes des chloroplastes (appelées membranes thylakoïdes) sont composées de monogalactosyldiacylglycérol (MGDG), de digalactosyldiacylglycérol (DGDG) et de sulfoquinovosyldiacylglycérol (SQDG) et de phosphatidylglycérol (PG). Ces lipides sont indispensables à la photosynthèse (Mizusawa et Wada 2012).

## ii. Notations

Un acide gras est un acide carboxylique à longue chaîne carbonée (de 4 à 36 carbones). Cette chaîne peut être saturée ou non, la double liaison étant en configuration cis. Pour préciser la longueur et le nombre de doubles liaisons d'un acide gras, les notations utilisées sont les suivantes (Lehninger et al. 2004) :



$X$  = nombre de carbones

$Y$  = nombre de doubles liaisons

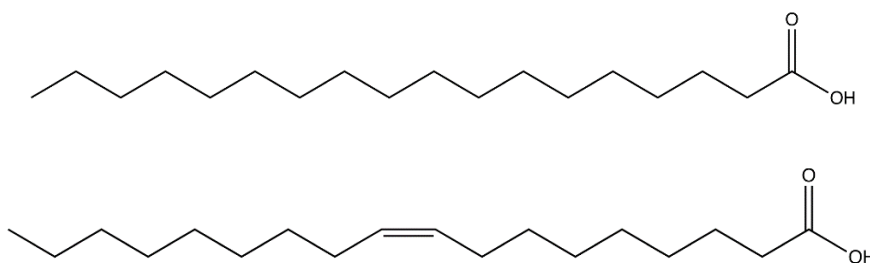
$a,b,c,..$  = la position des doubles liaisons ;

Ou bien  $\mathbf{X:Y \omega Z}$  ou  $\mathbf{X:Y n Z}$

$X$  = nombre de carbones

$Y$  = nombre de doubles liaisons

$Z$  = information à propos de la position de la première double liaison à partir du groupe méthyl.



**Figure 3:** Exemple d'un acide gras saturé (acide stéarique, en haut, noté 18:0) et acide gras insaturé (acide oléique, en bas, note 18:1n9)

La position de la double liaison est déterminée par l'activité de l'enzyme désaturase (Gonçalves et al. 2017) : cette enzyme introduit les doubles liaisons dans les acides gras, dont la position est indiquée dans la notation  $\Delta(\text{position})$ -désaturase. La chaîne d'acide gras peut aussi s'allonger sous l'action de l'enzyme élongase, qui ajoute deux atomes de carbone en fin de l'acide carboxylique (Gonçalves et al. 2017).

La longueur de la chaîne carbonée et le degré d'insaturation jouent un rôle important dans les propriétés physico-chimiques des acides gras. Par exemple, leur solubilité dans l'eau diminue quand



la chaîne carbonée est plus longue et/ou quand le nombre de doubles liaisons diminue (Lehninger et al. 2004).

### *iii. Les différentes classes d'acides gras*

Il existe quatre types d'acides gras :

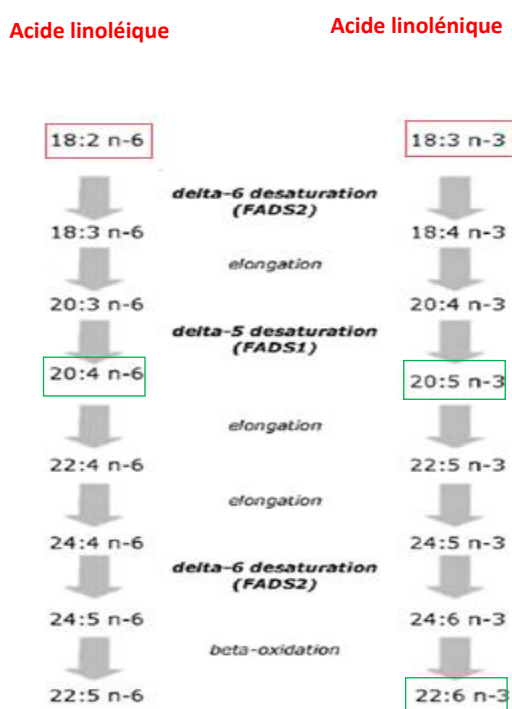
- **SFA** : *Saturated Fatty Acids*. Ce sont les acides gras saturés, ne présentant aucune double liaison.
- **MUFA** : *Monounsaturated Fatty Acids*. Ce sont les acides gras mono insaturés, avec une seule double liaison.
- **PUFA** : *Polyunsaturated Fatty Acids*. Ce sont les acides gras polyinsaturés, avec au minimum 2 doubles liaisons.
- **HUFA**: *Highly Unsaturated Fatty Acids*. Ce sont les acides gras fortement insaturés, composés de 20 carbones au minimum et plus de 3 doubles liaisons. Ces acides gras sont dits essentiels et sont parfois notés EFA dans la littérature correspondant à Essential Fatty Acids (Saito et Aono 2014).

Les acides gras saturés (SFA) et les mono-insaturés (MUFA) jouent un rôle important dans le stockage énergétique ; et les acides gras polyinsaturés (PUFA) et fortement insaturés (HUFA) agissent davantage sur la structure de la membrane biologique (Li et al. 2014, Gonçalves et al. 2017). Ainsi, en termes de répartition dans les lipides, les PUFA et HUFA sont surtout présents dans les lipides membranaires. Par exemple, ils sont retrouvés en forte proportion au niveau des membranes thylakoïdes (MGDG et SQDG riches en EPA par exemple) (Abida et al. 2015). Les SFA et MUFA sont en importante proportion dans les lipides neutres, tels que les TAG (Abida et al. 2015). Cela confirme les deux rôles majeurs de ces acides gras : les PUFA et HUFA sont essentiels à la structure membranaire tandis que les MUFA et SFA interviennent au niveau de la réserve énergétique de la cellule.

Egalement, il a été démontré de nombreuses fois que les acides gras insaturés assuraient la fluidité membranaire : en raison de leur géométrie (présence de doubles liaisons carbone-carbone), ces acides gras ne sont pas très condensés, ce qui augmente la fluidité de la membrane (Sharma et al. 2012). A faible température, il a été observé qu'en réponse à une diminution de la fluidité membranaire, une adaptation avait lieu par une production accrue d'acides gras insaturés (Thompson 1996).

#### iv. Formation des acides gras

Les 2 catégories principales de PUFA sont les PUFA n6 et les PUFA n3. L'acide linoléique (18:2n6) et l'acide linoléique (18:3n3) sont les précurseurs de ces deux séries de PUFA. Ces 2 acides gras permettent la formation de plusieurs métabolites (dont des métabolites appelés acides gras essentiels). Ces métabolites sont l'acide arachidonique AA (20:4n6) et l'acide docosapentaénoïque DPA (22 : 5n6) pour la « famille » n6 ; et l'acide docosahexaénoïque DHA (22:6n3) et l'acide écosapentaénoïque EPA (20:5n3) pour la « famille » n3. Ces métabolites sont formés suite à une série d'élongations et désaturations, par les enzymes élongase et désaturase.



**Figure 4 :** Formation des acides arachidonique (20:4n6), écosapentaénoïque (20:5n3) et docosahexaénoïque (22:6n3) à partir des acides linoléique et linoléique

#### v. Acides gras majoritaires chez les diatomées

De façon générale, la composition en acides gras des diatomées ressemble à celle des végétaux supérieurs. Selon Taipale et al. (2013), il y a des similarités de composition en acides gras au sein d'une même classe de microalgue, mais d'importantes différences entre les classes de microalgues (Tableau 1). Les diatomées sont caractérisées par une abondance en acides gras à 14, 16 et 20 carbones, notamment les acides gras **14:0**, **16:0**, **16:1n7** et **20:5n3** (EPA) (Taipale et al. 2013). Une étude de dix espèces de diatomées a montré que ces quatre acides gras représentaient entre 62 et 70% de la composition totale en acides gras (Volkman et al. 1989). L'EPA présent en forte

proportion chez les diatomées, n'est pas présent chez les chlorophycées par exemple (Hu et al. 2008).

D'autres acides gras, présents en plus faible proportion, peuvent être utilisés en tant que biomarqueurs d'après l'étude de Taipale et al en 2013 (Tableau 1).

Phytoplankton group	Major FA	FA biomarker
Chlorophyceae	ALA, 16:0, 18:1 $\omega$ 9, LIN	16:4 $\omega$ 3, 16:3 $\omega$ 3, 16:2 $\omega$ 6
Trebouxiophyceae	ALA, 16:0, 18:1 $\omega$ 9, LIN	16:4 $\omega$ 3, 16:3 $\omega$ 3, 16:2 $\omega$ 6
Cryptophyceae	ALA, 16:0, SDA	22:5 $\omega$ 6, 18:4 $\omega$ 3
Synuraphyceae	SDA, 14:0, ALA, 16:0	22:5 $\omega$ 6, 18:4 $\omega$ 3
Ochromonadales	16:1 $\omega$ 7c, 16:0, LIN, 18:1 $\omega$ 7	16:3 $\omega$ 1, 18:4 $\omega$ 3, 22:5 $\omega$ 6
Raphidophyceae	16:0, EPA, SDA, ALA	16:2 $\omega$ 4, 16:3 $\omega$ 4, 16:3 $\omega$ 1, 20:3 $\omega$ 3
Bacillariophyceae	16:1 $\omega$ 7c, EPA, 16:0, 14:0	16:2 $\omega$ 7, 16:2 $\omega$ 4, 16:3 $\omega$ 4, 16:4 $\omega$ 1, 18:4 $\omega$ 4
Euglenophyceae	16:0, ALA, EPA, DHA	15:3 $\omega$ 3, 15:3 $\omega$ 1, 15:4 $\omega$ 3, 17:3 $\omega$ 2, 17:2 $\omega$ 7/5, 20:4 $\omega$ 3, 20:2 $\omega$ 6, 20:3 $\omega$ 6, 22:4 $\omega$ 6

**Tableau 1:** Les acides gras (Fatty Acid FA) majoritaires et biomarqueurs pour chaque classe algale; ceux des diatomées faisant partie de la classe “Bacillariophyceae” (Taipale et al. 2013)

#### vi. *Importance des acides gras des diatomées*

Dans le réseau trophique aquatique, les acides gras représentent un des groupes les plus importants de molécules transférées de plante à animal (Filimonova et al. 2016).

Les acides gras essentiels ne peuvent pas être synthétisés par les mammifères, d'où leur importance dans le transfert trophique. Par exemple, les acides gras EPA et DHA, qui sont 2 acides gras dits essentiels ne peuvent pas être synthétisés *de novo* en quantité suffisante chez les animaux. Ils sont synthétisés par les microalgues et s'accumulent le long de la chaîne trophique (Filimonova et al. 2016, Gonçalves et al. 2017). Par exemple, d'importantes proportions en acide palmitique (16:1n7) et en acide écosapentanoïque (20:5n3) ont été retrouvées dans la composition lipidique des copépodes se nourrissant de diatomées (tandis que ceux se nourrissant de cyanobactéries présentent une forte proportion en acides gras 18:1n9 et 18:2n6) (Caramujo et al. 2007). La composition en acides gras peut donc être un bon indicateur du régime alimentaire des animaux.

Les diatomées présentent une forte proportion d'EPA. Or, cet acide gras essentiel fait partie de la famille oméga 3. C'est une excellente source d'énergie. Il est important pour la croissance et la reproduction chez les organismes vivants (Taipale et al. 2013). Les microalgues présentant une proportion importante de cet acide essentiel, comme les diatomées, sont donc une très bonne source d'alimentation pour les consommateurs primaires (Brett et Müller-Navarra 1997).

Une variation des proportions en acides gras chez les diatomées en conditions de stress est ainsi susceptible de modifier la qualité nutritive de ces organismes et donc d'impacter tout le réseau trophique.

### *vii. Variabilité des acides gras*

Il a déjà été démontré que les composés lipidiques étaient très sensibles aux facteurs environnementaux de stress (Gonçalves et al. 2012, Saito et Aono 2014). Par conséquent, les lipides, notamment la composition en acides gras, peuvent être utilisés comme bioindicateurs d'un stress ou biomarqueurs d'une contamination (Taipale et al. 2013, Filimonova et al. 2016). L'équilibre entre les SFA/MUFA et PUFA/HUFA, c'est-à-dire entre les acides gras de la réserve et de la structure, peut en effet être modifié par un stress.

#### *1. Stress environnemental*

De nombreuses études démontrent que les conditions abiotiques du milieu tels qu'un manque ou un excès de nutriments, de lumière, une température trop faible ou trop élevée pouvaient modifier le métabolisme des microalgues (Lavoie et al. 2008). En impactant la croissance des micro algues, ceux-ci moduleraient également la composition en lipides et en acides gras (Zulu et al. 2018).

- Température

La température a un effet majeur sur la composition des microalgues en acides gras. De nombreuses études ont été réalisées déterminant l'impact de ce facteur. De façon générale, une augmentation de la température engendre une augmentation de la proportion des SFA. A l'inverse, quand celle-ci diminue, une augmentation des PUFA est observée (Sharma et al. 2012). Ces modifications sont expliquées par l'augmentation de la fluidité membranaire avec la température (Gonçalves et al. 2018).

Chez les diatomées benthiques marines, une accumulation en PUFA a été observée à faible température (Li et al. 2014). Ceci a par exemple été étudié sur la diatomée *Phaeodactylum tricorutum* par (Jiang et Gao 2004), soumise à différente température (25, 20, 15 puis 10°C). Le passage de 25 à 10°C s'est marqué par une baisse de 30% de l'acide saturé 16:0 et une augmentation de 85% de l'acide EPA (Jiang et Gao 2004). Plus la température diminue et plus la proportion des PUFA augmente.

- Intensité lumineuse

Il a été démontré dans plusieurs études que la composition en pigments, la biomasse mais aussi la composition en acides gras des microalgues, étaient modulés par l'intensité lumineuse (Admiraal 1977, Li et al. 2014).

En effet, pour des intensités lumineuses élevées, un dommage oxydatif des PUFA et une augmentation des lipides neutres de stockage riches en SFA et MUFA sont observés. Ce stress peut être utilisé comme technique d'induction des lipides pour la production de biocarburant : en raison de leur teneur riche en lipides, les microalgues sont en effet utilisées dans ce domaine bioénergétique (Sharma et al. 2012). A l'inverse, une faible intensité lumineuse induit la formation de PUFA (Sharma et al. 2012). Par exemple, des études sur la diatomée *Phaeodactylum tricorutum* ont prouvé l'augmentation de la production d'acide écosapentanoïque (20:5n3) à faible intensité lumineuse.

## 2. *Stress toxique*

Une exposition à un stress chimique (substances toxiques telles que les pesticides et les métaux) peut induire une modification dans le profil des acides gras chez les diatomées. Ceci a été démontré dans plusieurs études. Robert et al. (2007) ont réalisé une étude sur la diatomée *Melosira moniliformis* exposée à un herbicide inhibiteur de l'élongation des acides gras (métolachlore) : une diminution en acide gras saturés (14:0, 16:0 et 18:0) et en acide gras essentiel EPA (20:5n3) a été observé, tandis qu'il y a eu une augmentation de l'acide monoinsaturé 16:1 et des acides polyinsaturés à 16 et 18 carbones (Robert et al. 2007). Une autre étude sur l'exposition de la diatomée *Thalassiosira weissflogii* à deux types de contamination a aussi montré une modification des profils d'acides gras : une exposition au Primextra® (mélange de terbuthylazine et de métolachlore) a induit une diminution des HUFA (donc diminution des acides gras essentiels), alors qu'une exposition au cuivre s'est traduit par une augmentation des MUFA et PUFA et diminution des SFA (Filimonova et al. 2016).

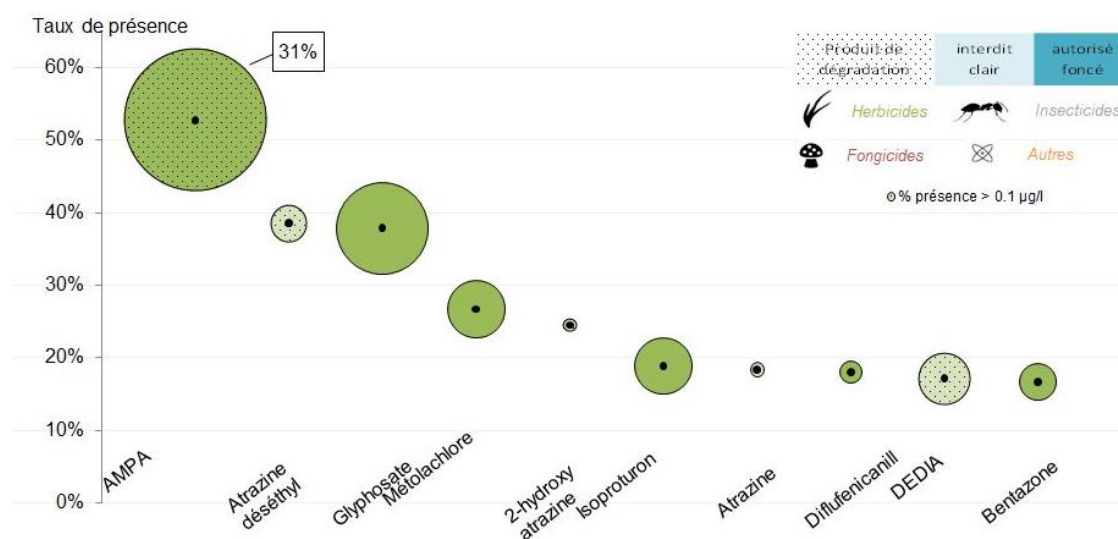
## 2. Les herbicides

### a) Contamination des cours d'eau par les herbicides

Un pesticide est une substance chimique utilisée pour la prévention ou l'élimination d'un organisme indésirable. Ces composés chimiques sont alors utilisés par agriculteurs pour lutter contre les insectes, les mauvaises herbes et les champignons, qui sont nuisibles aux cultures et plantations. On distingue plusieurs types de pesticides, selon leur cible : les herbicides, les insecticides et les fongicides (mais aussi les nématicides, les rodenticides, etc.)

La France est le 4<sup>ème</sup> consommateur mondial de produits phytosanitaires, et le 1<sup>er</sup> consommateur européen de pesticides. Ces substances se retrouvent alors dans tous les compartiments environnementaux, et surtout dans les écosystèmes aquatiques.

A ce jour, la quasi-totalité des cours d'eaux contient des pesticides, et notamment des herbicides (d'après SOeS : Service de l'Observation des Statistiques).



**Figure 5 :** Teneur des dix pesticides les plus quantifiés en 2014 dans les cours d'eaux français (Agences de l'eau ; SoeS 2017)

Les dix pesticides les plus quantifiés sont retrouvés dans 60% des cours d'eau contaminés et sont tous des herbicides. Leur usage est assez répandu, notamment pour les activités agricoles.

Les pesticides sont retrouvés dans les trois compartiments de la biosphère, mais s'accumulent surtout dans les sols et écosystèmes aquatiques qui en sont les récepteurs finaux, suite au drainage, au ruissellement et à l'infiltration (Wood et al. 2016). Le transfert dans l'environnement dépend

donc de la nature et des caractéristiques du milieu étudié (caractéristiques du bassin hydrographique, conditions climatiques, le relief du milieu qui peut plus ou moins faciliter le ruissellement, etc.), ainsi que des propriétés physico-chimiques des substances. En effet, les pesticides organiques persistants sont caractérisés par : une faible solubilité dans l'eau, un temps de demi-vie élevée dans les différents compartiments ; ils sont aussi lipophiles et peu biodégradables, etc.

#### **b) Caractéristiques et modes d'action des herbicides étudiés sur les microalgues**

Cette étude s'intéresse à une contamination par deux herbicides : le diuron et le S-métolachlore, impactant des cibles cellulaires distinctes. La concentration testée ici est de 10 µg/L, soit une concentration relativement au-dessus de la concentration environnementale mais susceptible d'être retrouvée dans un cours d'eau contaminé.

##### **▪ Diuron**

Le diuron est un herbicide de la famille chimique des urées substituées. Il est interdit pour tout usage agricole et biocide depuis 2008, mais reste cependant utilisé dans les traitements antisalissures.

Cet herbicide agit sur la photosynthèse ; c'est un inhibiteur spécifique de l'appareil photosynthétique. Cette inhibition a lieu au niveau du photosystème II (PS II). Une étude déterminant l'impact de cet herbicide à une concentration de 10 µg/L sur trois espèces de diatomées d'eau douce a montré une diminution d'environ 50% du rendement quantique optimal du photosystème II (Moisset et al. 2015).

En effet, le PS II est un des deux complexes protéines-cofacteurs présents au niveau de la membrane thylakoïde (Mizusawa et Wada 2012). L'herbicide se lie à la protéine D1 du PSII, ce qui bloque le transfert de la quinone A à la quinone B. L'inhibition du transport d'électrons peut en plus entraîner une formation d'espèces réactives de l'oxygène qui vont alors endommager les pigments, les protéines et les lipides autour de l'appareil photosynthétique (Gonzalez-Barreiro et al. 2004, Chalifour et Juneau 2011).

##### **▪ S-métolachlore**

Le S-métolachlore est un herbicide de la famille des chloroacétamides. C'est un isomère du métolachlore, qui est toujours autorisé sur le marché à ce jour.

Il est connu pour être un inhibiteur de la synthèse des acides gras longues chaînes (Liu et Xiong 2009). En effet, il se lie à l'enzyme nécessaire à l'allongement des acides gras à 16, 18 et 20

carbones : une inhibition des élongases est observée (Götz et Böger 2008). La diminution importante de la proportion en EPA après une contamination en métolachlore dans l'étude réalisée par Robert et al. (2007) peut alors s'expliquer par une inhibition de l'élongation des acides gras chez *Melosira moniliformis*, et donc une accumulation en acides gras saturés.

### **3. Impact d'un stress multiple – effet combiné**

Un stress en milieu aquatique peut être multiple : plusieurs facteurs de stress (chimiques et/ou abiotiques) peuvent intervenir simultanément. Un facteur de stress 1 peut moduler (compenser ou exacerber) la réponse des organismes vivants au facteur de stress 2 (Bonnineau et al. 2012).

#### **a) Température et herbicides**

Une étude réalisée sur la diatomée *Navicula pelliculosa*, soumise à de l'atrazine (connue pour inhiber le photosystème II), a montré une modulation possible de l'effet « atrazine » par la température (Chalifour et Juneau 2011). Pour des descripteurs tels que le taux de croissance, la teneur en pigments et la photosynthèse, la diatomée s'est montrée plus sensible à l'atrazine à basse température. De nombreuses autres études ont suggéré qu'une température élevée pouvait réduire la toxicité des herbicides (Guasch et al. 1997, Larras et al. 2013).

#### **b) Intensité lumineuse et herbicides**

L'étude de Bonnineau et al. (2012) sur l'impact du glyphosate sur le biofilm à différentes intensités lumineuses a démontré que la lumière modulait la réponse du biofilm au glyphosate, particulièrement au niveau de l'activité photosynthétique (Bonnineau et al. 2012).

Une autre étude évaluant la toxicité de l'atrazine sur une communauté de périphyton à différentes intensités lumineuses a démontré que l'inhibition de la photosynthèse était plus importante à forte intensité lumineuse (Guasch et al. 1997). Cette étude suggère alors que la lumière influence la réponse des communautés à l'atrazine : contrairement à Bonnineau et al. (2012), une faible intensité lumineuse diminue la toxicité de la substance toxique.

D'autres études ont observé une influence, non significative, de l'intensité lumineuse sur la réponse des microalgues aux contaminants. A titre d'exemple, sur 26 taxons de diatomées benthiques exposées au glyphosate et à l'atrazine sous faible/forte intensité, aucune interaction significative entre la lumière et l'effet herbicide n'a été observée pour 22 taxons (Wood et al. 2016). Seulement quelques taxons ont été plus sensibles à l'herbicide à faible intensité lumineuse.



Objectif du stage :

Le nombre d'études analysant les effets combinés entre les stress environnementaux et le stress chimique sur les acides gras des diatomées étant restreint, la problématique de ce stage est de savoir dans quelle mesure une variation de facteurs environnementaux (ici la température) peut moduler les modifications des profils d'acides gras induits par une exposition aux herbicides.

Pour répondre à la question précédente la variabilité des profils d'acides gras des deux diatomées d'eau *Gomphonema gracile* et *Nitzschia palea* sera étudiée en réponse à une contamination par deux herbicides (diuron et S-métolachlore), en fonction de la température.

En complément des profils d'acides gras, d'autres descripteurs seront étudiés : l'activité photosynthétique, la croissance cellulaire et la concentration en chlorophylle a.

## RESULTATS

### 1. Démarche expérimentale

Afin de répondre à la problématique, les expériences ont été réalisées sur deux espèces de diatomées d'eau douce : *Gomphonema gracile* et *Nitzschia palea*. Ces espèces ont été cultivées dans une armoire de culture thermostatée à 17,5°C sous une intensité lumineuse de 67  $\mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$ .

Pour chaque expérience, les espèces de diatomées ont été cultivées dans des ballons de 100 ml (contenant de la culture et du milieu de culture Dauta (Dauta, 1982)), sur une période de 7 jours. En plus des témoins, deux conditions de contamination ont été testées sur chaque espèce : la première par le diuron et la deuxième par le S-métolachlore, à 10  $\mu\text{g}/\text{L}$  chacune. Chaque condition est répétée 4 fois.

Une première température  $T_1$  de  $17,5 \pm 0,5^\circ\text{C}$  a été testée, puis à une seconde,  $T_2$  de  $20,5 \pm 0,6^\circ\text{C}$ . Une semaine d'adaptation est réalisée pour chaque ballon à la température considérée avant la contamination. L'intensité lumineuse, identique pour les deux manipulations, est de 67  $\mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$ , avec une photopériode de 16h (jour) /8h (nuit).



**Figure 6:** Ballons de 100 ml dans l'armoire thermostatée (culture + milieu Dauta)

Dans le but d'étudier le stress combiné herbicide x température sur les deux espèces de diatomées, plusieurs descripteurs ont été utilisés tels que l'inhibition de la croissance cellulaire, l'inhibition de l'activité photosynthétique, la concentration en chlorophylle a et la composition en acides gras.

Concernant l'inhibition de la croissance cellulaire, le nombre de cellules par millilitre a été déterminé par un comptage cellulaire sur cellule de Nageotte (annexe 2).

L'activité photosynthétique quant à elle a pu être déterminée par des techniques de mesure de fluorescence chlorophyllienne en lumière modulée (utilisation du fluorimètre PhytoPAM) (annexe 2).

La composition en acides gras est déterminée par chromatographie gazeuse. En amont de l'analyse il est nécessaire de préparer les échantillons ; une transestérification est réalisée permettant de rendre les composés à analyser volatils et détectables par GC/FID (annexe 2). Par la suite une extraction à l'hexane est réalisée afin d'extraire les composés apolaires. Une fois les échantillons préparés ceux-ci sont injectés en GC/FID et les chromatogrammes obtenus sont comparés à un chromatogramme standard d'acides gras (annexe 5).

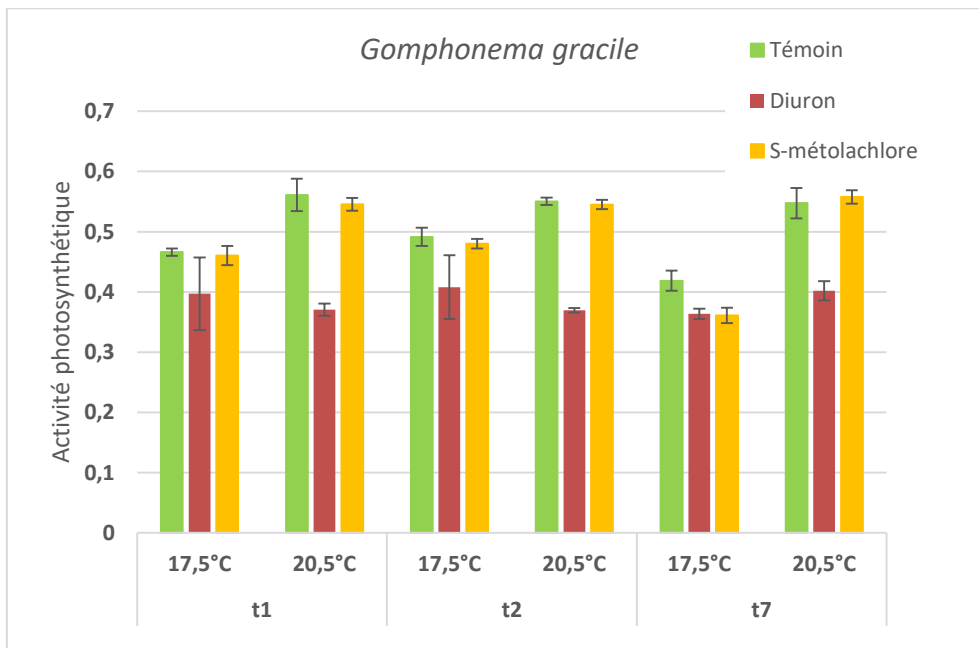
Pour interpréter les résultats, différentes analyses statistiques ont été réalisées sur le logiciel Studio R. Des analyses de variance (test ANOVA) ont été réalisées après avoir vérifié la normalité des résidus (test de Shapiro-Wilk) et l'homogénéité des variances (test de Levene). Pour la comparaison entre 2 échantillons (4 réplicats pour chaque échantillon), un test t de Student a été réalisé, après avoir vérifié l'homoscédasticité (test de Fisher).

## **2. Activité photosynthétique, croissance cellulaire et chlorophylle a**

### *Activité photosynthétique*

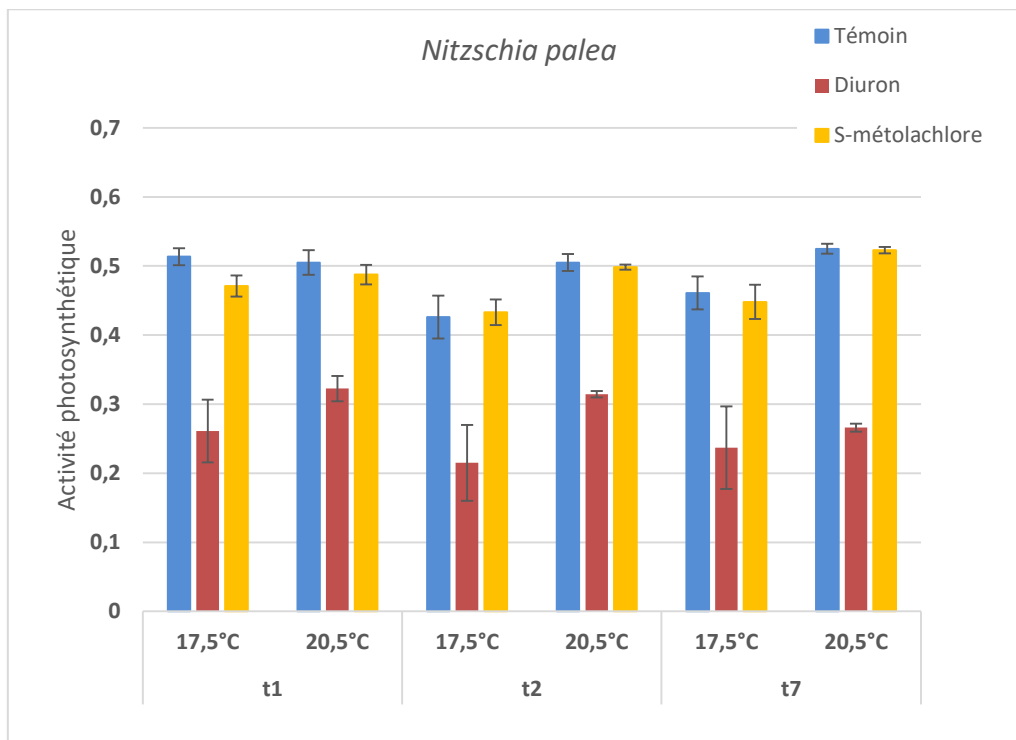
L'activité photosynthétique a été mesurée tous les jours durant la semaine de manipulation, au PhytoPAM (annexe 2). L'activité photosynthétique est exprimée sous forme de rendement photosynthétique, soit entre 0 et 1. Plus la valeur est proche de 1 et plus les diatomées sont dans un état physiologique favorable à leur croissance.

Les résultats d'activité photosynthétique sont représentés sur les deux figures suivantes pour les deux espèces et les deux températures. Ces deux figures présentent les effets du diuron et du S-métolachlore sur l'activité photosynthétique des espèces considérées sur trois jours de prélèvement t1, t2 et t7. Les premières barres correspondent à l'expérience réalisée à une température de 17,5°C et les secondes à une température de 20,5°C.



**Figure 7 :** Activité photosynthétique après 1, 2 et 7 jours de contamination au diuron et S-métolachlore pour l'espèce *Gomphonema gracile*

Pour *Gomphonema gracile* : Les échantillons témoins aux deux températures montrent que l'activité photosynthétique a augmenté à 20,5°C. Le diuron a inhibé la photosynthèse dès le premier jour aux deux températures étudiées. Le S-métolachlore quant à lui a diminué l'activité photosynthétique seulement à t<sub>7</sub> à 17,5 °C.



**Figure 8 :** Activité photosynthétique après 1, 2 et 7 jours de contamination au diuron et S-métolachlore pour l'espèce *Nitzschia palea*

Pour *Nitzschia palea* : Les échantillons témoins aux deux températures montrent que l'activité photosynthétique a augmenté à 20,5°C à partir de  $t_2$ . Le diuron a fortement inhibé la photosynthèse dès le premier jour aux deux températures. Le S-métolachlore quant à lui a diminué l'activité photosynthétique seulement à  $t_1$  à 17,5 °C.

En résumé,

- *Effet de la température* : En comparant l'activité photosynthétique des témoins à 17,5°C et à 20,5°C, il ressort que l'activité photosynthétique augmente significativement avec la température pour *Gomphonema gracile* et pour *Nitzschia palea* à partir de  $t_2$  (*p-value* de  $1,142e-11$ ).
- *Effet des herbicides* : En comparant l'activité photosynthétique des témoins à celles des conditions contaminées, il ressort que celle-ci diminue significativement dans le cas du diuron (*p-value*  $< 2,2e-16$ ), pour les deux espèces. Le S-métolachlore quant à lui n'a pas eu d'effets significatifs (*p-value* de 0,60).
- *Variabilité interspécifique* : Les réponses n'ont pas été similaires pour les deux espèces. Le test ANOVA indique une différence significative en fonction de l'espèce (*p-value* de  $3,407e-08$ ). Il existe aussi un effet significatif en fonction de la combinaison espèce/contamination (*p-value* de  $3,136e-06$ ). Le test post-hoc indique que *Nitzschia palea* a été plus sensible au diuron que *Gomphonema gracile*.
- *Effet combiné température × herbicides* : L'effet de la combinaison de ces deux facteurs est significatif (*p-value* de 0,008). Les deux espèces sont plus sensibles à la contamination à 17,5°C qu'à 20,5°C.

### Croissance cellulaire

La concentration cellulaire a été évaluée à  $t_0$  avant d'inoculer les ballons et à  $t_7$ , grâce à un comptage sur cellule de Nageotte. A  $t_0$ , tous les ballons ont été inoculés à 300 000 cellules/mL (comptage sur cellule de Nageotte de la culture puis calcul théorique des volumes à introduire dans les ballons pour être à cette concentration cellulaire).

Des différences sont visibles à l'œil nu dans les ballons au bout de quelques jours, entre les témoins et les échantillons contaminés. Par exemple, les ballons contaminés au diuron paraissent moins concentrés en cellules que les autres ballons (figure 9 et 10).

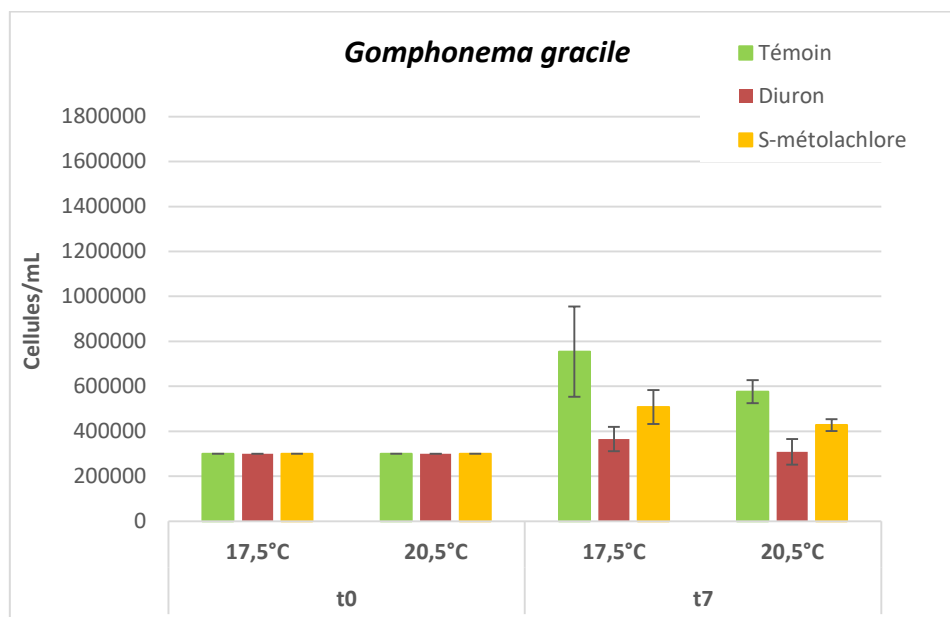


**Figure 9:** Ballons de culture de *Gomphonema gracile* avec de gauche à droite: témoin, S-métolachlore puis diuron



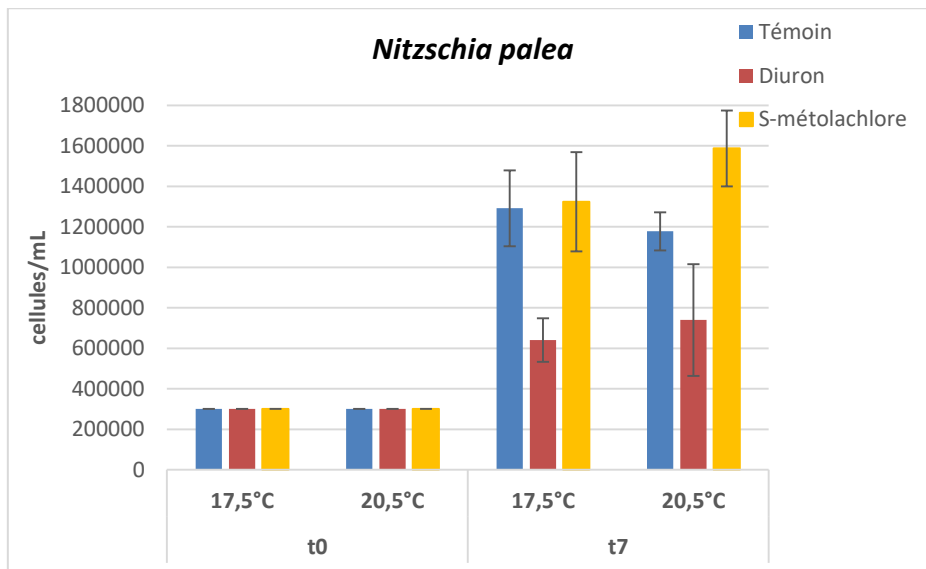
**Figure 10:** Ballons de culture de *Nitzschia palea* avec de gauche à droite: témoin, S-métolachlore puis diuron

Les résultats du comptage cellulaires sont les suivants :



**Figure 11 :** Croissance cellulaire sur une semaine de l'espèce *Gomphonema gracile*

Pour *Gomphonema gracile* : Entre t0 et t7 et aux 2 températures la concentration cellulaire pour les échantillons témoins a augmenté traduisant la pousse significative des cultures. Aux 2 températures et à t7, le diuron a inhibé la croissance cellulaire. Quant au S-métolachlore, celui-ci a inhibé la croissance cellulaire à t7 seulement à 20,5 °C.



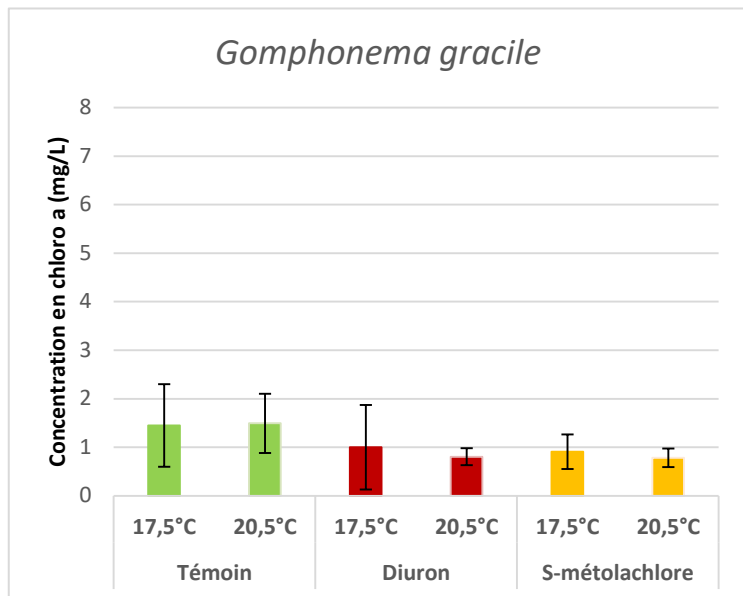
**Figure 12 :** Croissance cellulaire sur une semaine de l'espèce *Nitzschia palea*

Pour *Nitzschia palea* : De la même façon, la concentration cellulaire a fortement augmenté entre t0 et t7 pour les échantillons témoins. A t7 et aux 2 températures le diuron a inhibé la croissance cellulaire. Quant au S-métolachlore celui-ci n'a pas eu d'effet à t7 à 17,5°C mais a augmenté la concentration cellulaire à t7 à 20,5°C.

En résumé,

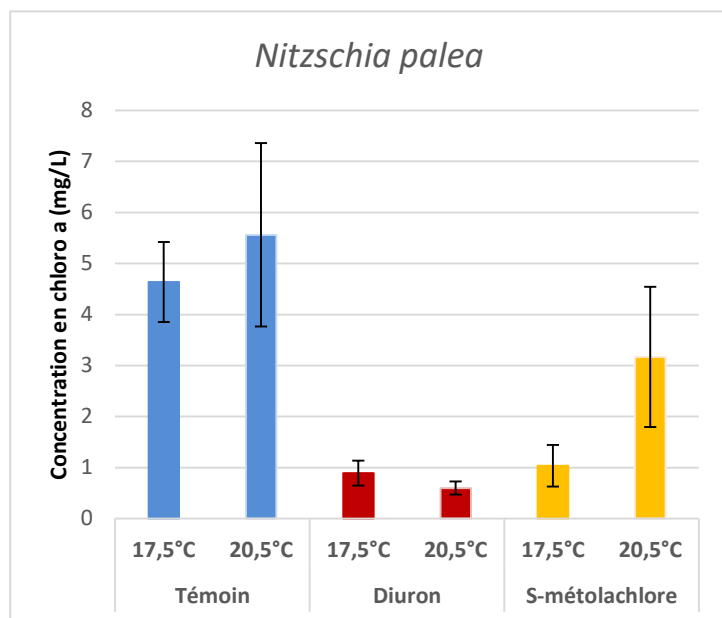
- *Effet de la température* : Il n'y a pas de différences significatives entre les deux températures, pour les deux espèces pour les échantillons témoins (pas de différence significative entre Témoin t7 17,5°C et Témoin t7 20,5°C).
- *Effet des herbicides* : La concentration cellulaire diminue significativement suite à une contamination au diuron pour les deux espèces et pour les deux températures. Le diuron a donc inhibé la croissance cellulaire après une semaine de contamination. Cependant, le S-métolachlore ne provoque qu'un effet sur la croissance à t7 à 20,5°C.
- *Effet combiné température × herbicides* : Entre 17,5°C et 20,5°C, le pourcentage d'inhibition de croissance en réponse au diuron diminue. L'effet de cette substance semble plus marqué à basse température. En effet :
  - ➔ 51,5% puis 46,4% d'inhibition pour *Gomphonema gracile* respectivement à 17,5°C et 20,5°C.
  - ➔ 50,5% puis 37,2% d'inhibition pour *Nitzschia palea* respectivement à 17,5°C et 20,5°C.

En complément à ce descripteur de croissance, la chlorophylle **a** a été dosée à  $t_7$ . Les résultats pour les deux espèces sont les suivants :



Pour *Gomphonema gracile* : L'augmentation de la température ne semble pas impacter les concentrations en chlorophylle **a** des témoins, en effet celle-ci est similaire aux deux températures. Le diuron diminue la concentration en chlorophylle **a** à 20,5°C. La même tendance est observée pour le S-métolachlore.

**Figure 13** : Concentration en chlorophylle **a** à  $t_7$  *Gomphonema gracile*



Pour *Nitzschia palea* : L'augmentation de la température ne semble pas impacter les concentrations en chlorophylle **a** des échantillons témoins, en effet celle-ci est similaire aux 2 températures. Le diuron inhibe la concentration en chlorophylle **a** aux 2 températures. Quant au S-métolachlore celui-ci inhibe la concentration en chlorophylle **a** seulement à 17,5°C.

**Figure 14** : Concentration en chlorophylle **a** à  $t_7$  *Nitzschia palea*



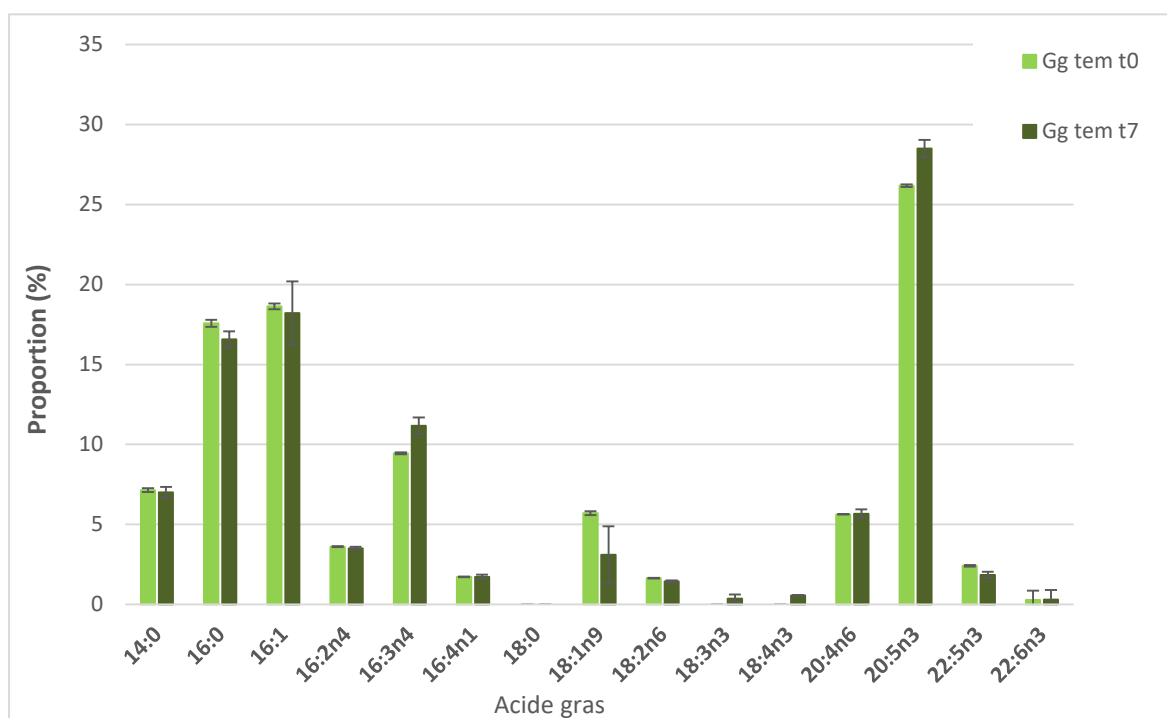
Ces résultats sont ainsi en accord avec ceux de la croissance cellulaire. Suite à une corrélation linéaire entre ces deux paramètres (chlorophylle en fonction de la croissance cellulaire), l'analyse de variance sur cette régression indique une p-value significative de 0,02.

### 3. Variabilité des profils d'acides gras

#### i. *Evolution des profils d'acides gras en fonction du stade de croissance*

La comparaison entre les échantillons témoins  $t_0$  (repiquage de la culture) avec ceux à  $t_7$  (7ème jour de croissance) permet de détecter d'éventuelles différences des profils d'acides gras des diatomées en fonction de leur stade de croissance.

Les profils d'acides gras des deux espèces entre le début et la fin de la manipulation sont les suivants :

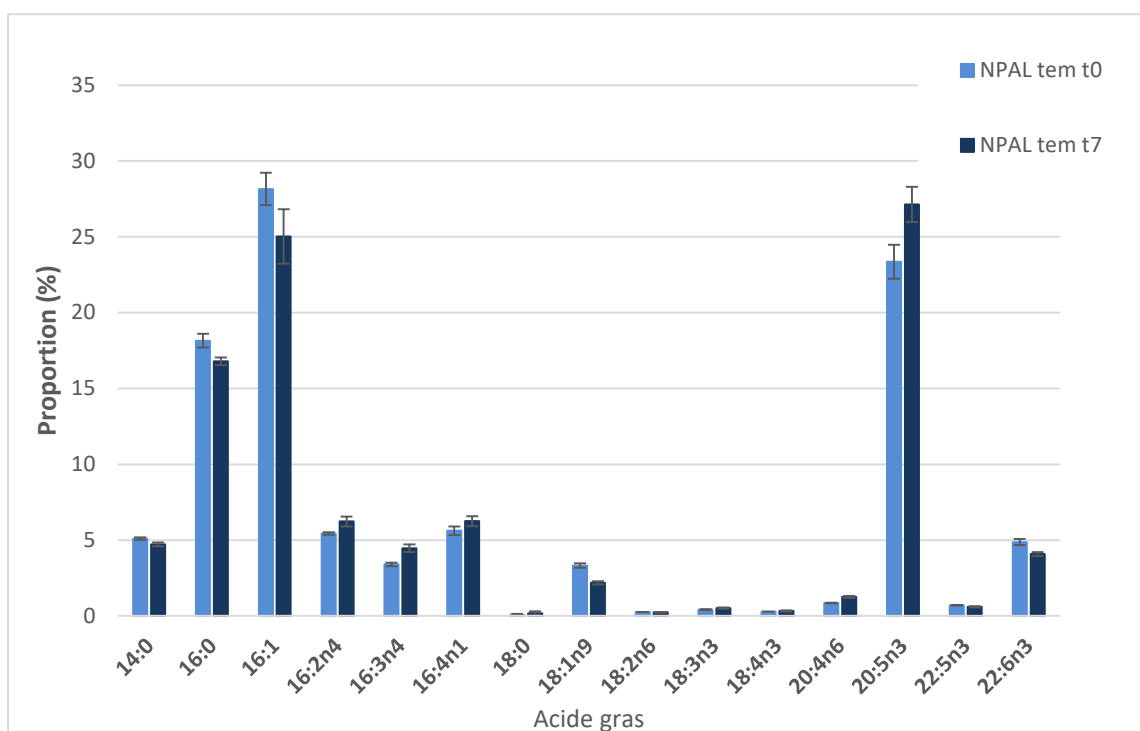


**Figure 15 :** Variation des profils d'acides gras en une semaine chez *Gomphonema gracile* ( $T^\circ$  de  $20,5^\circ\text{C}$ )

Pour *Gomphonema gracile*, une diminution significative ( $p\text{-value} < 0,05$  avec le test de Student) des proportions des acides gras 16:0 et 22:5n3 est notée entre  $t_0$  et  $t_7$  ; tandis qu'à  $t_7$  les proportions en 16:3n4 et en 20:5n3 ont augmenté significativement ( $p\text{-value} < 0,05$ ). La diminution du 18:1n9 est visible sur le graphe mais statistiquement non significative (tableau 2).

Evolution de la proportion d'acides gras	p-value (significativité)
Diminution du 16:0	<b>0,02</b>
Diminution du 18:1n9	0,0609
Diminution du 22:5n3	<b>0,0088</b>
Augmentation du 20:5n3	<b>0,0028</b>
Augmentation du 16:3n4	<b>0,0067</b>

**Tableau 2:** Significativité des évolutions de proportions des acides gras chez *Gomphonema gracile* entre  $t_0$  et  $t_7$



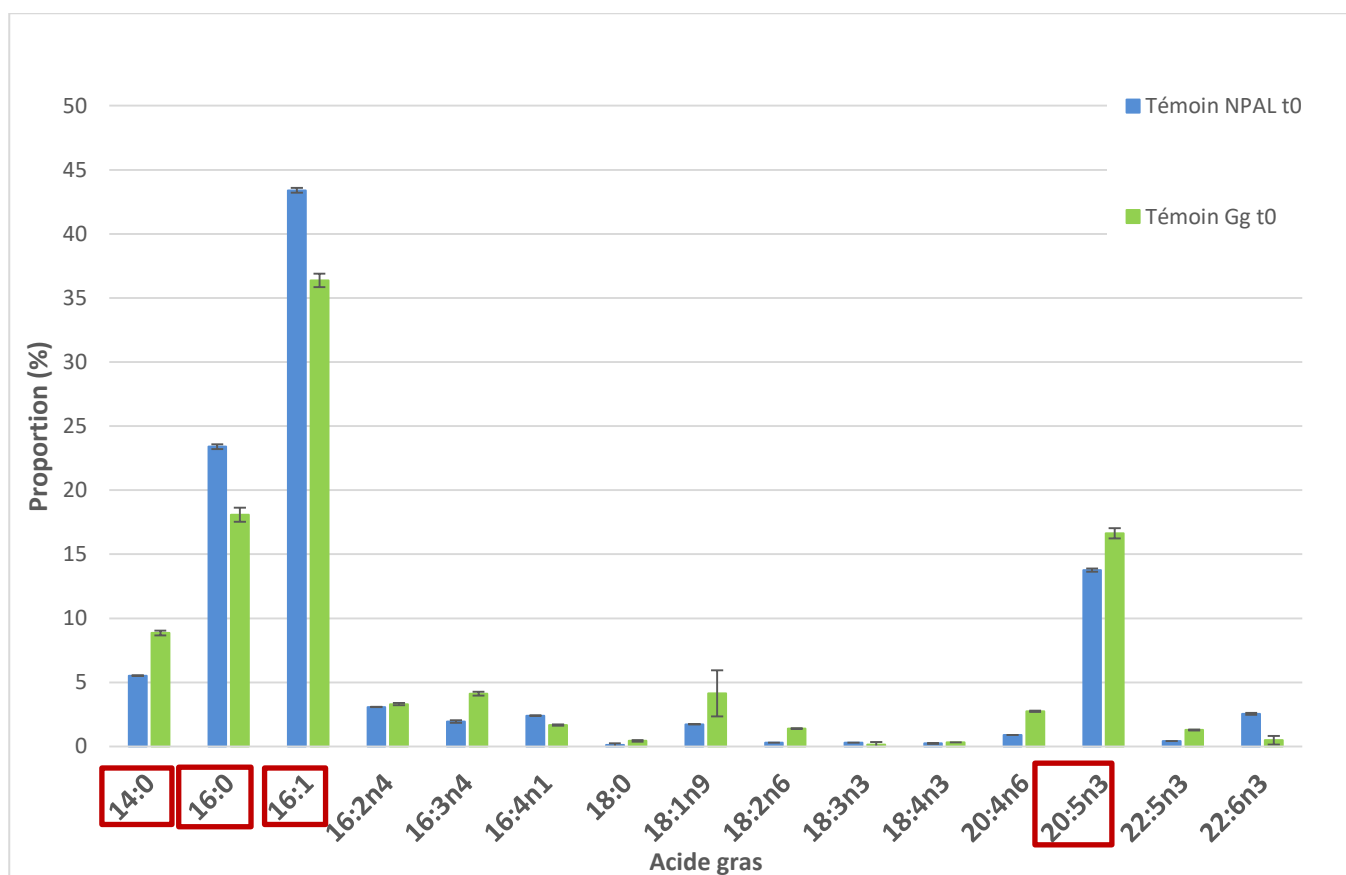
**Figure 16 :** Variation des profils d'acides gras en une semaine chez *Nitzschia palea* ( $T^\circ$  de  $20,5^\circ\text{C}$ )

Pour *Nitzschia palea*, une diminution des proportions des acides gras 16:0, 16 :1, 18:1n9 et 22 :6n3 est notée entre  $t_0$  et  $t_7$ . Celles en 16:2n4, 16:3n4 et 20:5n3 sont quant à elles plus importantes à  $t_7$  qu'à  $t_0$ .

Les acides gras intervenant dans les lipides de stockage (tel que le 16:0) sont donc plus présents à  $t_0$ ; tandis que certains acides gras polyinsaturés (tel que l'EPA 20:5n3, qui est un acide essentiel) augmentent après une semaine de croissance.

#### *i. Variabilité interspécifique*

Dans le but de d'étudier la variabilité interspécifique des profils d'acides gras et notamment celle entre *Gomphonema gracile* et *Nitzschia palea*, leur profil d'acides gras ont été établis pour les conditions témoins.



**Figure 17 :** Composition en acide gras des deux espèces de diatomées étudiées (20,5°C)

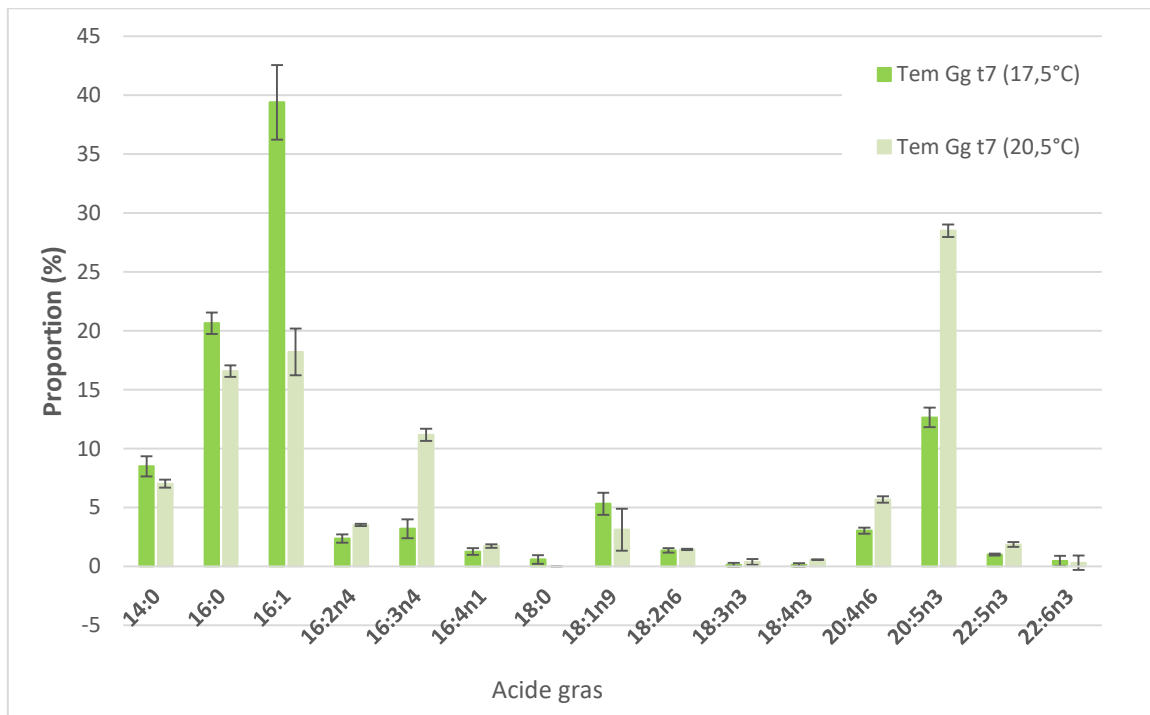
Les acides gras majoritaires retrouvés chez *Gomphonema gracile* et *Nitzschia palea* sont bien caractéristiques des acides gras de la classe Bacillariophycées (encadrés rouges). Cependant, les proportions de certains acides gras sont différentes entre les deux espèces : par exemple, *Nitzschia palea* présente plus d'acides gras 16:0, 16:1, 16:4n1 et 22:6n3 (DHA, acide gras essentiel) par rapport à *Gomphonema gracile*, tandis que cette dernière présente plus de 14:0, 16:3n4, 18:1n9, 18:2n6, 20:4n6, 20:5n3 (EPA, acide gras essentiel) et 22:5n3.

De plus, il est intéressant de noter que l'évolution sur 7 jours des proportions en acides gras (figures 15 et 16) est similaire pour les deux espèces.

#### *i. Effet de la température*

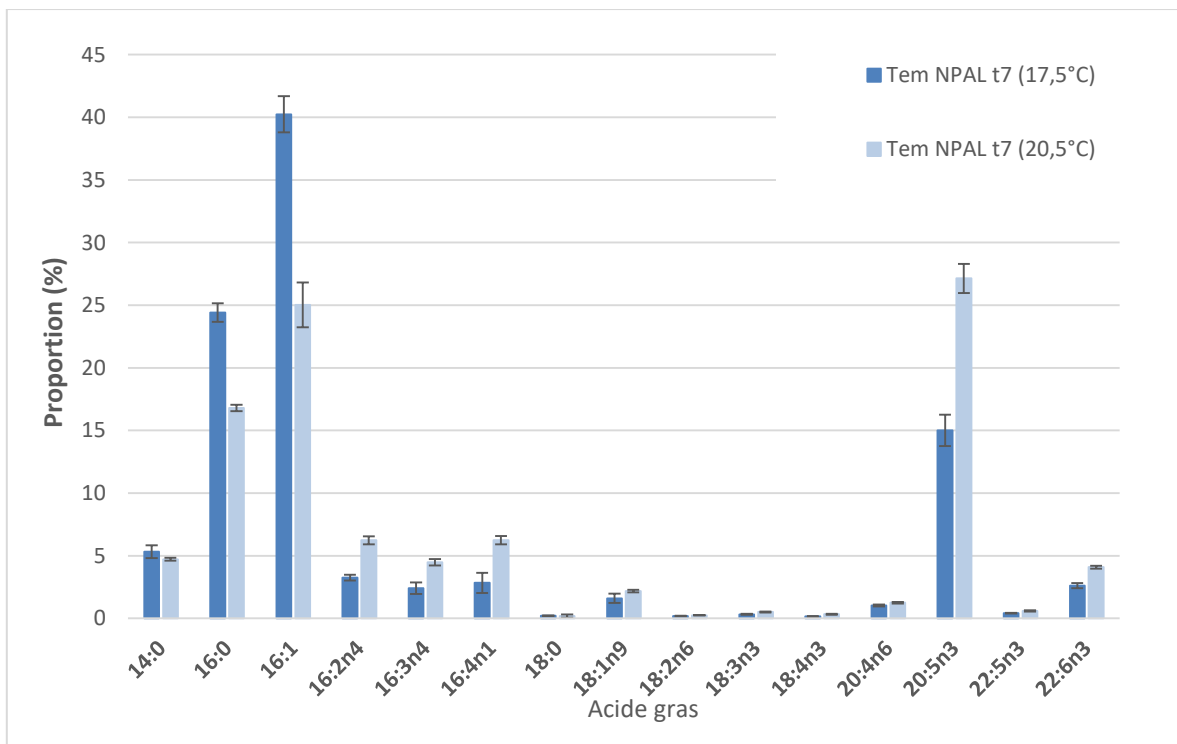
Une modification des facteurs abiotiques et notamment de la température, peut modifier la composition en lipides et en acides gras des diatomées.

En effet, les échantillons témoins de la manipulation à 17,5 °C (T1) et ceux de celle à 20,5°C (T2) ne présentent pas les mêmes profils d'acides gras :



**Figure 18 :** Profils d'acides gras à 17,5°C et à 20,5°C pour *Gomphonema gracile*

Une augmentation de la température a provoqué une augmentation significative des acides gras 16:2n4, 16:3n4, 20:5n3, 20:4n6 et 22:5n3 et une diminution significative du 16:0 et du 16:1 chez l'espèce *Gomphonema gracile*.



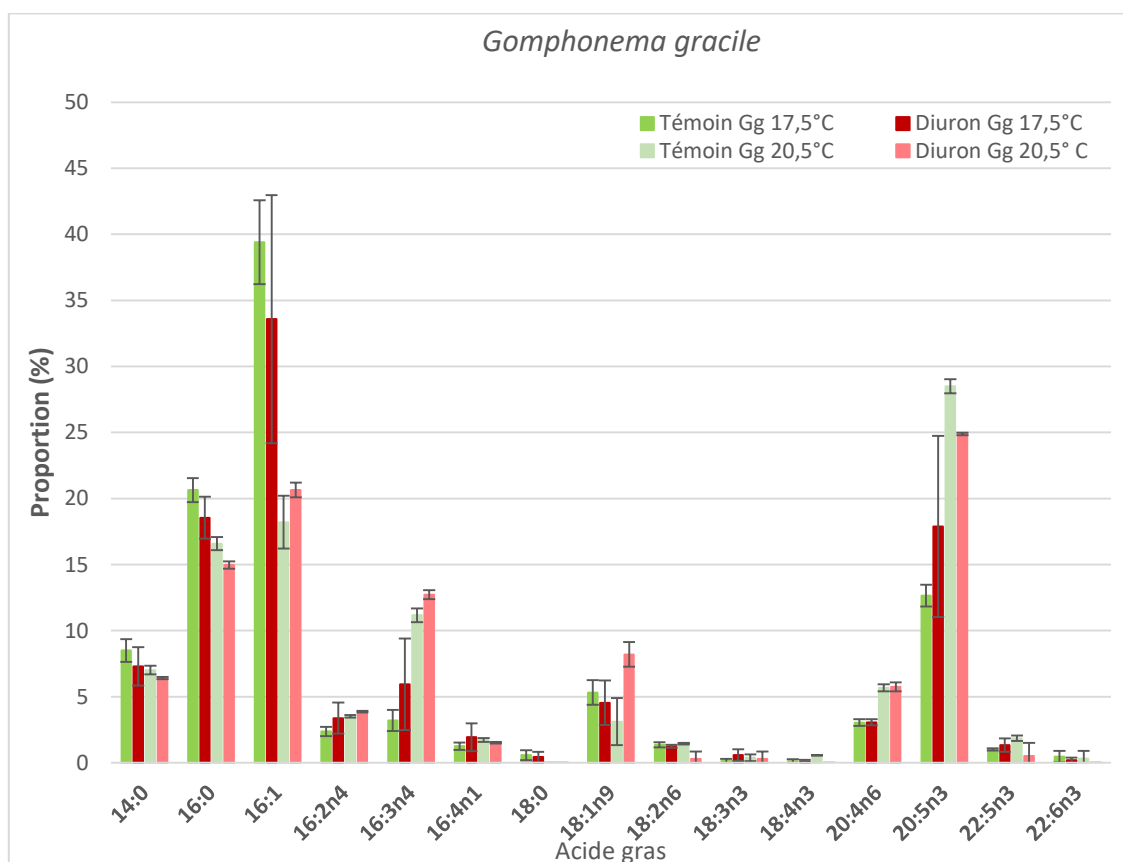
**Figure 19 :** Profils d'acides gras à 17,5°C et à 20,5°C pour *Nitzschia palea*

Chez l'espèce *Nitzschia palea*, une augmentation de la température a provoqué une augmentation significative des acides gras 16:2n4, 16:3n4, 16:4n1, 20:5n3 et 22:6n3 et une diminution significative du 16:0 et du 16:1.

Pour les deux espèces, ce sont donc plutôt les acides gras SFA et MUFA qui ont diminué tandis que ceux de type PUFA ont augmenté entre 17,5°C et 20,5°C.

ii. *Modulation des effets toxiques par la température*

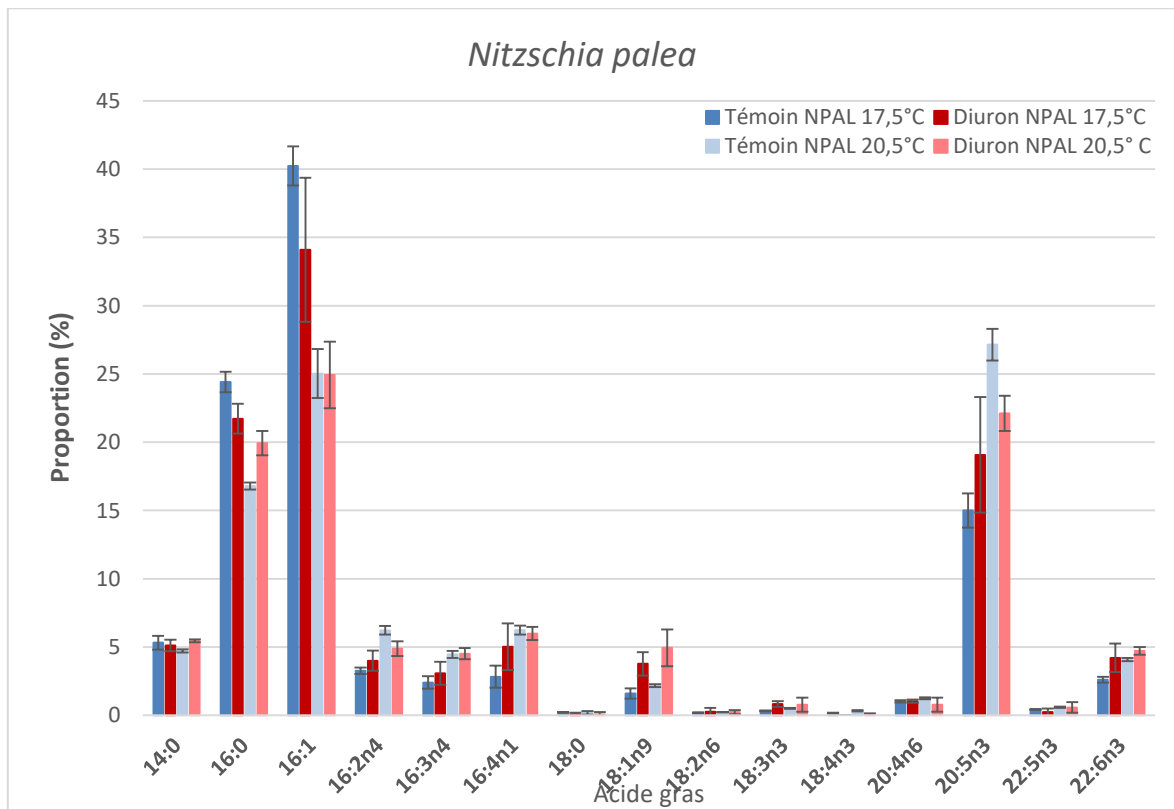
**Impact du diuron et de la température**



**Figure 20 :** Profils d'acides gras à 17,5°C et à 20,5°C représentant l'impact du diuron sur *Gomphonema gracile*

L'impact du diuron sur les profils d'acides gras de *Gomphonema gracile* varie en fonction des deux températures testées.

A 17,5°C, la présence de diuron n'a pas induit de modification significative des proportions en acides gras. A 20,5°C des effets sont visibles sur les acides gras 20:5n3 et 16:1, notamment avec la diminution significative du 20:5n3 (EPA).

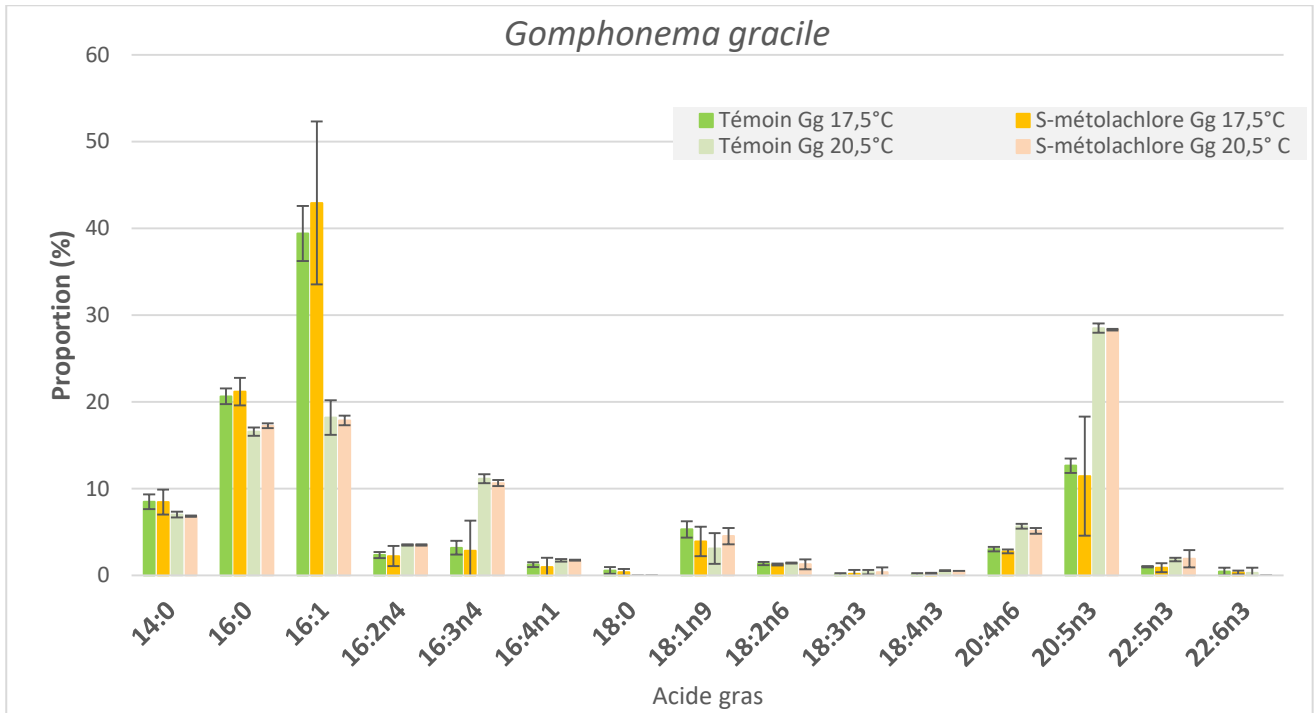


**Figure 21** : Profils d'acides gras à 17,5°C et à 20,5°C représentant l'impact du diuron sur *Nitzschia palea*

Pour *Nitzschia palea* : A 17,5°C, le diuron entraîne une diminution significative de l'acide gras 16:0 et une augmentation significative de 18:1n9 et 22:6n3. A 20,5 °C cette évolution est inversée avec l'augmentation significative de l'acide gras 16 :0 et la diminution significative de 20 :5n3.

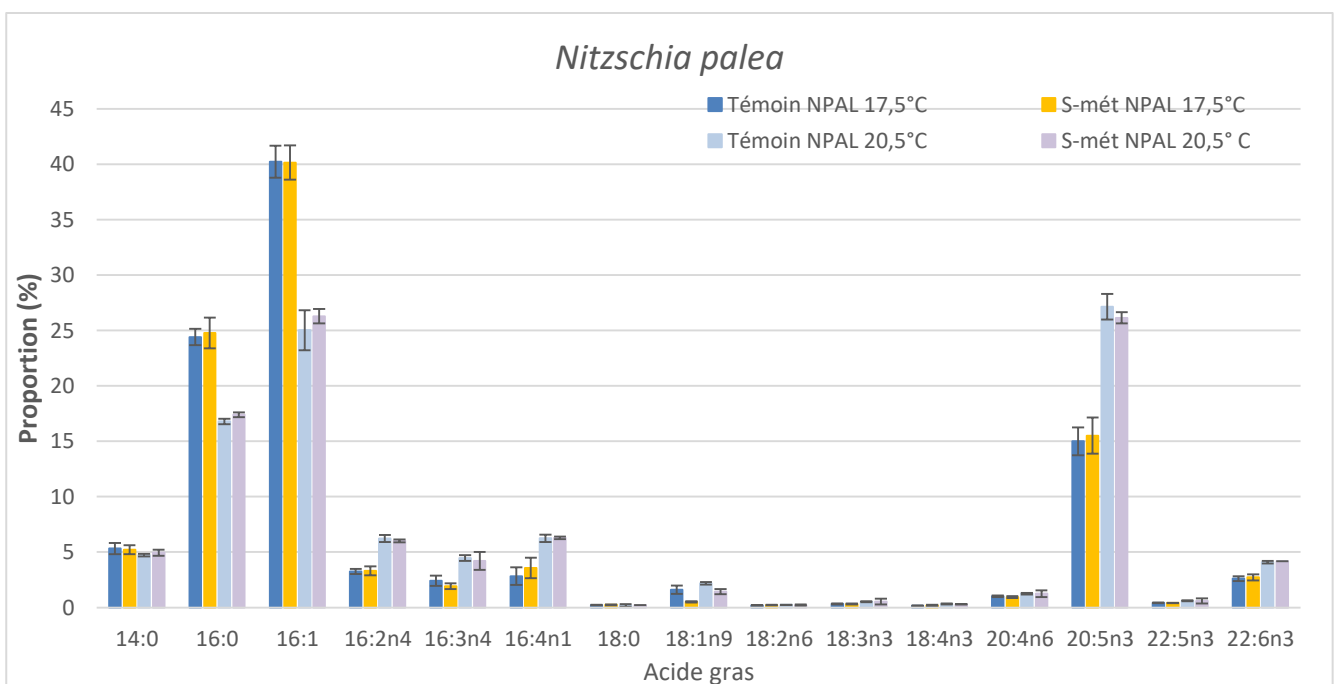
Pour les deux espèces de diatomées un impact de la température est démontré sur l'effet du diuron vis-à-vis de leur composition en acides gras.

**Impact du S-métolachlore et de la température**



**Figure 22 :** Profils d'acides gras à 17,5°C et à 20,5°C représentant l'impact du S-métolachlore sur *Gomphonema gracile*

Chez *Gomphonema gracile*, à 17,5°C et 20,5°C, aucune évolution significative n'est observée pour la composition en acides gras. En effet, les proportions des acides gras des témoins sont similaires aux conditions contaminées.

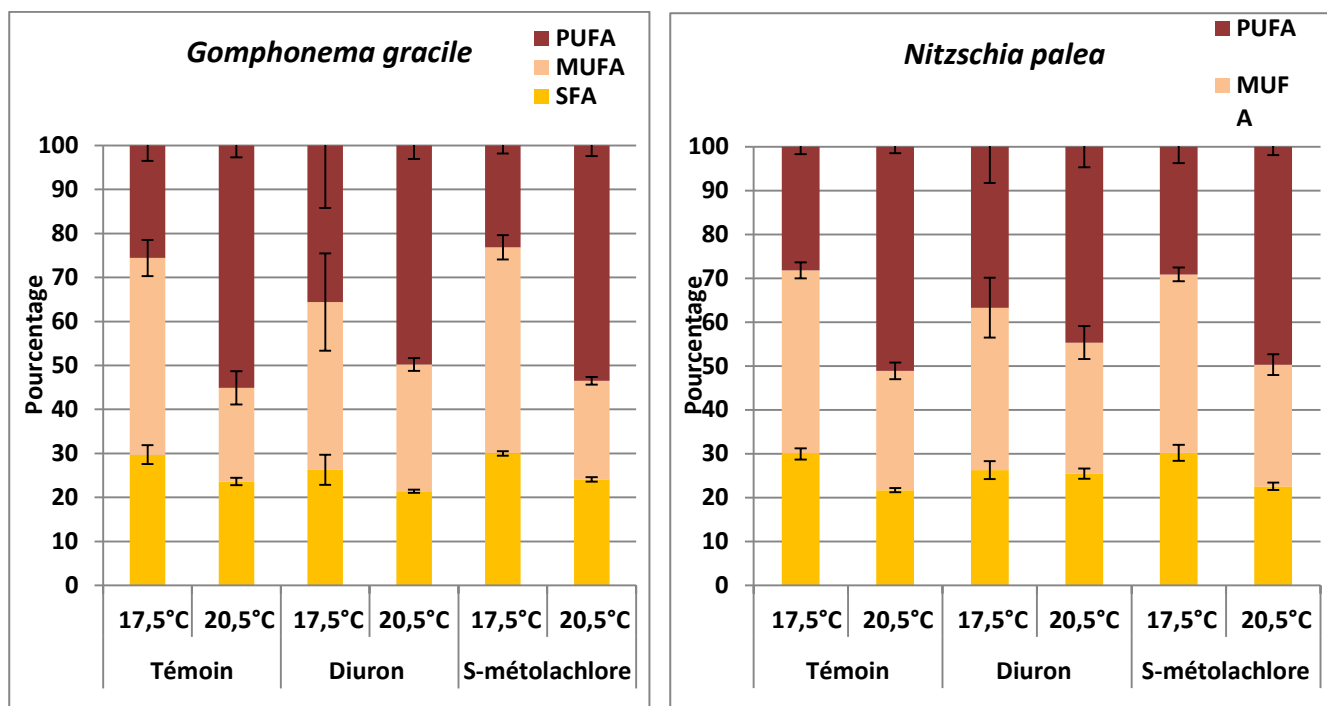


**Figure 23 :** Profils d'acides gras à 17,5°C et à 20,5°C représentant l'impact du S-métolachlore sur *Nitzschia palea* 38

Pour *Nitzschia palea*, de même que pour *Gomphonema gracile*, les évolutions observées sont non significatives.

### Récapitulatif de l'évolution des types d'acides gras

Pour mieux comprendre l'impact des herbicides combinés à la température, il est intéressant de regrouper la proportion de tous les acides gras types PUFA, MUFA et SFA.



**Figure 24 :** Evolution de la proportion en PUFA, MUFA et SFA sous l'impact du diuron et du S-métolachlore à 17,5°C et à 20,5°C chez les espèces *Gomphonema gracile* et *Nitzschia palea*

Les deux graphes ci-dessus représentent la proportion en PUFA, MUFA et SFA pour chaque condition. Pour chaque condition, la première barre de l'histogramme représente les proportions à 17,5°C et la deuxième celle à 20,5°C.

- Impact de la température : la comparaison entre les témoins à 17,5°C et ceux à 20,5°C montre une augmentation significative de la proportion en PUFA pour les deux espèces (p-value < 0,05, elle vaut 0,00069 pour *Gomphonema gracile* par exemple)
- Impact du diuron aux deux températures :

Pour *Nitzschia palea* : à **17,5°C**, le diuron entraîne une augmentation en PUFA, et une diminution en MUFA et SFA. A l'inverse, à **20,5°C**, la proportion de MUFA augmente, et celle en PUFA diminue.



Pour *Gomphonema gracile* : à **17,5°C**, le diuron entraîne, de même, une augmentation en PUFA, et une diminution en MUFA et SFA. Cependant, à **20,5°C**, la proportion en PUFA diminue et celle en MUFA augmente.

- Impact du S-métolachlore aux deux températures :

Le S-métolachlore n'a pas eu d'effets significatifs sur la variabilité des proportions en PUFA/MUFA/SFA, et cela pour les deux espèces : en effet les proportions en PUFA, MUFA et SFA des échantillons contaminés sont très similaires aux témoins, pour les deux températures. Une faible variabilité, pour *Gomphonema gracile* par exemple, est une légère diminution en PUFA en présence de S-métolachlore (passage de 25 à 23% de PUFA à **17,5°C** et passage de 55 à 53% de PUFA à **20,5°C**).

Ainsi, la modulation par la température de l'effet du contaminant est davantage visible avec le diuron qu'avec le S-métolachlore, notamment avec des effets significatifs du diuron à 20,5°C.

## DISCUSSION

### *Croissance des deux espèces étudiées*

De façon générale, la croissance cellulaire des deux espèces a augmenté pendant la semaine de manipulation, *Nitzschia palea* ayant eu un taux de croissance plus rapide.

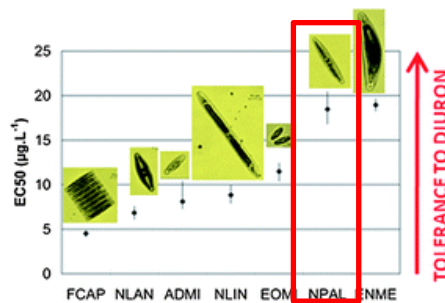
Pour les deux espèces, le diuron a inhibé la croissance cellulaire aux 2 températures alors que le S-métolachlore n'a pas eu d'effet sur ce descripteur. L'inhibition de la croissance cellulaire par le diuron peut s'expliquer par son action sur le photosystème II, ce qui a été prouvé par de nombreuses études (Mizusawa et Wada 2012, Moisset et al. 2015).

Cependant, il apparaît qu'une augmentation de la température fasse augmenter l'activité photosynthétique (plus élevée à 20,5°C). Les diatomées paraîtraient alors en meilleur état physiologique à 20,5°C qu'à 17,5°C. Cela devrait normalement se traduire par une stimulation de la croissance. Or, le comptage cellulaire sur cellule de Nageotte des échantillons témoins ne montre pas une augmentation significative de la concentration cellulaire entre les deux températures. Cela pourrait s'expliquer par le fait que, les ballons étant déjà assez concentrés dès  $t_0$  (inoculation à 300 000 cellules/mL), les diatomées aient rapidement consommé les nutriments et notamment la silice (Annexe 4). En effet, la comparaison entre la concentration à  $t_0$  en silice et celle à  $t_7$  dans les ballons montre la consommation importante de cet élément : dans les ballons témoins et S-métolachlore, très peu de silice est retrouvée dans les ballons à  $t_7$ , tandis que ceux contaminés au diuron sont plus

riches en silice. Ceci est la conséquence de l'inhibition de croissance par le diuron : les diatomées s'étant peu développées, celles-ci n'ont consommé que très peu de silice.

### Variabilité interspécifique

Physiologiquement, *Nitzschia palea* a été plus sensible au diuron que *Gomphonema gracile*, contrairement à ce qui pouvait être attendu. En effet, *Nitzschia palea* est connue pour être polluo-résistante tandis que l'autre espèce étudiée est polluo-sensible. Une étude a évalué la sensibilité de diverses espèces au diuron, dont la diatomée *Nitzschia palea*, par des tests écotoxicologiques basés sur l'inhibition de la croissance à court terme sur une culture monospécifique et donc par le calcul d'une concentration efficace 50% (CE<sub>50</sub>). Cette dernière a été estimée à environ 18 µg/L (Roubeix et al. 2011) (figure 24).



**Figure 24:** CE<sub>50</sub> du diuron pour *Nitzschia palea* (Roubeix et al. 2011)

En termes d'acides gras, cette étude a démontré une différence des profils en fonction des espèces : *Nitzschia palea* présente plus de SFA et MUFA que *Gomphonema gracile*. Elle est aussi caractérisée par une plus importante proportion en acide essentiel DHA alors que *Gomphonema gracile* est plus riche en EPA. Il semblerait que ces deux espèces n'aient pas les mêmes qualités nutritives. Cette variabilité interspécifique est souvent démontré dans la littérature (Aussant et al. 2018).

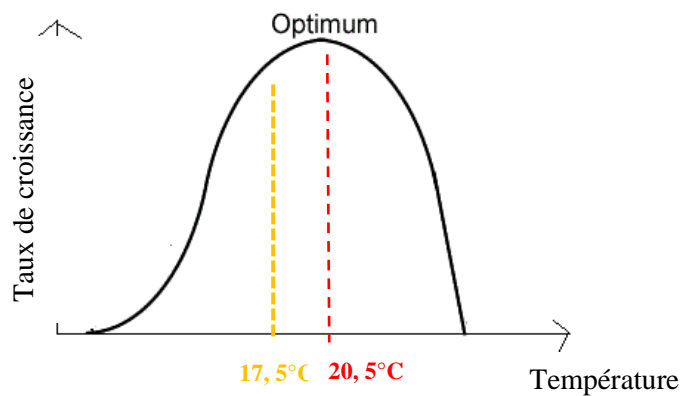
### Variabilité des acides gras dans le temps

Dans cette étude, les profils d'acides gras d'une même espèce ne sont pas identiques à t<sub>0</sub> et t<sub>7</sub>. Cette variabilité pourrait s'expliquer par une modification des proportions en fonction du stade de croissance. Cette variabilité a déjà été évoquée dans de nombreuses études, notamment dans celle de Li et al. (2014). Cette dernière explique qu'à un faible taux de croissance, les microalgues ont

tendance à accumuler des lipides neutres qui sont riches en SFA et MUFA (comme par exemple de 16:0 et le 16:1), tandis qu'à un taux de croissance plus élevé, une augmentation en PUFA se produisait. En effet, ceci peut s'expliquer par le fait qu'à des taux de croissance plus élevés, les microalgues ont besoin d'acides gras intervenant dans la structure de la cellule et moins pour le stockage énergétique (Li et al. 2014). Ceci est confirmé dans notre étude avec une diminution du 16:0 et 16:1 et une augmentation du 20:5n3 en une semaine.

### *Variabilité des acides gras en fonction de la température*

Les études citées dans la synthèse bibliographique évoquant l'effet de ce facteur abiotique seul (Sharma et al. 2012, Li et al. 2014) ont démontré une augmentation des PUFA à basse température. Dans notre étude, l'inverse a été observé pour les deux espèces : la proportion en PUFA était plus importante à 20,5°C qu'à 17,5°C. Une récente étude a étudié l'impact de la température sur les acides gras de 8 espèces de microalgues (Aussant et al. 2018). Celle-ci explique qu'il faut prendre en compte le fait que les effets sur la production optimale de lipides pourraient dépendre des conditions optimales de croissance. En effet, pour les espèces étudiées dans cet article, la production maximale de EPA a été observée pour les températures optimales de croissance (températures pour lesquelles la croissance cellulaire est maximale). Des températures entre 8 et 26°C ont été testées : la proportion en PUFA était plus élevée pour les températures intermédiaires de 14°C et 20°C qui correspondait à des températures idéales pour la croissance. Cette approche pourrait expliquer les résultats obtenus dans notre étude ici. Le passage de 17,5°C à 20,5°C s'est en effet traduit par un meilleur état physiologique des diatomées, avec l'augmentation de l'activité photosynthétique. La deuxième température testée pourrait donc être plus idéale à leur croissance (figure 25), et à la production de PUFA. Les diatomées auraient donc tendance à diminuer leur proportion en acides gras saturés et augmenter celle en insaturés lorsqu'elles sont exposées à des températures optimales à leur croissance cellulaire. La diminution des PUFA due à un stress de température pourrait donc être observée à des températures plus extrêmes.



**Figure 25** : Hypothèse concernant la température optimale dans cette étude

### *Variabilité des acides gras en fonction de l'effet combiné : contamination en herbicide et température*

Avant d'étudier l'effet combiné, il est important de noter que l'action des deux herbicides seuls sur les acides gras s'est montrée différente. Contrairement à ce qui a été démontré dans de nombreuses études concernant l'inhibition des acides gras à longues chaînes par le S-métolachlore (Götz et Böger 2008, Liu et Xiong 2009), cette tendance n'a pas été observée dans cette étude. Ceci est peut être dû à une concentration trop faible pour observer ces effets.

Le diuron quant à lui a des effets, différents aux deux températures, comme par exemple l'augmentation de l'EPA à 17,5°C et sa diminution à 20,5°C chez les deux espèces. Il y a donc eu une modulation des profils d'acides gras par la température suite à une contamination au diuron.

De plus, le dosage des nutriments n'est fait qu'à  $t_0$  et  $t_7$  (en raison des contraintes liées aux volumes nécessaires) et les résultats à  $t_7$  indiquent une consommation quasiment totale des nutriments (et notamment la silice, cf annexe 4) pour les échantillons non contaminés au diuron. Les ballons ayant été inoculés à une très forte concentration à  $t_0$  (de manière à pouvoir quantifier les acides gras à  $t_0$ ), il est probable que la consommation des éléments nutritifs se soit faite rapidement. Il n'est donc pas possible d'estimer ici à quel moment exactement la concentration en éléments nutritifs a été limitante pour les diatomées. Or de nombreuses études ont montré qu'un stress (manque ou excès) dû aux nutriments impacte la composition en acides gras : ce stress pourrait induire l'augmentation de production de lipides (Zulu et al. 2018). En effet, en tant que mécanisme de protection, la cellule pourrait plus ou moins modifier son équilibre entre la proportion en acides gras saturés (pour le stockage) et celle en insaturés (pour la structure et la croissance). Par conséquent, il se peut que lors des analyses d'acides gras (qui se déroulent à  $t_7$ ), l'effet visible sur les profils d'acides gras ne soit pas uniquement dû à un stress herbicide et température.

## CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES

Dans cette étude, les diatomées ont répondu aux stress environnemental et toxique. L'augmentation de la température de 17,5 °C à 20,5°C a stimulé leur activité photosynthétique. Le diuron a impacté de manière importante la croissance et l'activité photosynthétique des diatomées. Ces effets sont confirmés par les résultats de chlorophylle a. Le S-métolachlore à l'inverse n'a eu que peu d'effets sur ces descripteurs.

En plus de ces descripteurs classiques, le descripteur « acides gras », assez innovant pour l'étude d'effets combinés chez les diatomées, a été étudié. Dans cette étude, ce descripteur a été variable en fonction du stade de croissance des espèces étudiées, des espèces étudiées entre elles (variabilité interspécifique), des températures testées et des conditions de contamination. L'augmentation de la température s'est traduite par une augmentation des PUFA. L'effet combiné température et herbicides a été visible pour une contamination au diuron : une modulation de la proportion en acide essentiel EPA a eu lieu entre 17,5°C et 20,5°C. Le S-métolachlore quant à lui a eu peu d'effets sur ce descripteur.

Peu de travaux ont été réalisés sur la réponse de ces descripteurs aux stress toxiques et combinés pour les diatomées d'eau douce, alors que la variabilité des acides gras semble assez sensible et serait donc intéressante à suivre en complément des autres descripteurs plus classiques. Cette sensibilité pourrait être plus marquée avec des conditions différentes de celles étudiées ici (concentration plus élevée, température plus basse/ ou plus élevée), ou avec d'autres stress environnementaux. En effet, de nombreuses études prouvent la variabilité des acides gras suite à un stress dû à la température, à l'intensité lumineuse ou même à la composition en nutriments. Des techniques innovantes utilisent ces différents stress pour induire la production de certains lipides chez les microalgues.

Concernant le choix des températures dans cette étude, il serait peut-être pertinent de sélectionner des températures s'éloignant des températures optimales de croissance. Par exemple, Jiang et Gao (2004) ont testé 4 températures dans leur étude (10, 15, 20 et 25°C) afin de valider leur conclusion vis-à-vis de la variabilité des acides gras. Il serait donc intéressant de compléter les résultats obtenus dans cette étude en réalisant la même expérience à une température plus basse (aux alentours de 12°C par exemple), et une plus élevée (aux alentours de 25°C par exemple).

De plus, le protocole mis en place dans cette étude a permis de tester une seule concentration pour chaque herbicide, qui n'a parfois pas induit d'effet significatif sur certains descripteurs. Afin de confirmer les conclusions concernant la toxicité de herbicides étudiés, il serait judicieux de tester

plusieurs concentrations, et notamment une concentration plus élevée pour le S-métolachlore qui a eu très peu d'effet dans cette étude.

Enfin, des améliorations techniques sont envisageables, notamment en ce qui concerne le protocole d'extraction des acides gras. Par exemple, une étape de centrifugation est réalisée dans cette étude dans le but de retirer le maximum de milieu de culture et d'isoler toutes les cellules avant l'ajout du mélange méthanol/acide sulfurique pour l'étape de transestérification (annexe 2). Une limite de cette méthode est, qu'en éliminant l'eau, il est possible de retirer du matériel. Il est à noter qu'il est très important de retirer le plus possible de milieu de culture car l'eau s'y trouvant engendre le processus inverse de la transestérification biaisant les résultats obtenus sur les chromatogrammes. D'autres études utilisent une autre technique pour cette étape : la lyophilisation. Cette méthode consiste à solidifier l'échantillon et éliminer l'eau par sublimation. Cette technique permettrait d'éviter d'éliminer du matériel vivant, d'éventuellement casser les cellules et d'éliminer toute l'eau. De plus, une autre limite du protocole pourrait concerner la solubilité du diuron. La solubilité du diuron dans l'eau étant faible à température ambiante il est nécessaire de chauffer la solution afin de dissoudre le diuron dans l'eau. Le choix de l'eau et non d'un autre solvant s'explique par le fait que l'utilisation d'un autre solvant pourrait affecter le métabolisme lipidique des diatomées. Par conséquent, il est probable que la solubilité de cette substance ne soit pas totale dans ces conditions, induisant une variabilité de la concentration en diuron d'un échantillon à un autre.

Enfin, le descripteur acide gras étudié ici nécessite le suivi d'autres descripteurs afin de mieux comprendre l'effet du toxique et sa cible cellulaire. Ici, la photosynthèse et la croissance cellulaire ont été étudiées et ont permis de comprendre que les échantillons témoins et contaminés au S-métolachlore ont été en bon état physiologique tout au long de l'expérience tandis que ceux contaminés au diuron ont été impactés. L'utilisation d'autres biomarqueurs, notamment au niveau génétique, serait très intéressante, notamment pour évaluer le contrôle des acides gras *via* les différentes enzymes nécessaires à leur formation. Cette étude fait l'objet d'un autre stage et apportera des informations complémentaires aux résultats exposés dans ce rapport.

## HYGIENE ET SECURITE

1

### S'informer

- ❖ Au début du stage, un **livret** reprenant toutes les règles de sécurité a été distribué et signé. Un livret d'accueil nommé « Votre quotidien » a notamment été remis à chaque personne dès son arrivée à IRSTEA, qui reprend les consignes générales de sécurité, l'emplacement des armoires à pharmacies et défibrillateur, etc.
- ❖ Les **fiches de données de sécurité** de toutes les substances présentes au laboratoire sont également disponibles et rangées dans un classeur au laboratoire.

2

### Manipuler en sécurité

- ❖ Manipuler au laboratoire en utilisant des solutions chimiques potentiellement toxiques nécessite un minimum de protection individuelle avec le port d'une blouse, de lunettes et de gants pour éviter tout contact avec la peau et les yeux, et donc éviter toute brûlure ou irritation. Au laboratoire, des **équipements** sont mis en place pour limiter les risques et effectuer les premiers secours en cas de problèmes, tels que les douches de sécurité et rince-œil.
- ❖ Trois solutions de pesticides sont utilisées dans cette étude : le **diuron**, le **S-métolachlore**. De l'**éthanol**, du **méthanol** et de l'**acide sulfurique** sont aussi utilisés. Un classeur présent au laboratoire comprend la liste des produits chimiques, avec leur **localisation** ainsi que toutes les **fiches de données de sécurité** de ces produits.  
Les pesticides utilisés ici peuvent présenter des risques pour la santé, notamment pour le foie, les reins, le sang et le système endocrinien à la suite de longues expositions répétées. Au contact des yeux ou de la peau, ils peuvent aussi provoquer des irritations. Il faut donc éviter toute voie d'exposition : ingestion, inhalation ou même exposition cutanée.
- ❖ Dans cette étude, la plupart des manipulations doivent être réalisées en milieu stérile, d'où l'utilisation d'un **bec Bunsen (gaz butane)**. L'utilisation de ce dernier reste dangereuse : il y a un risque d'incendie, d'explosion ou de brûlure. Il faut alors être très vigilant lors de son utilisation : travailler sur une paillasse non inflammable, fermer le robinet du bec/de la bouteille même pour un arrêt temporaire, manipuler loin de tout produit inflammable, éviter de porter des gants en travaillant près du bec (peut provoquer de fortes brûlures), etc.

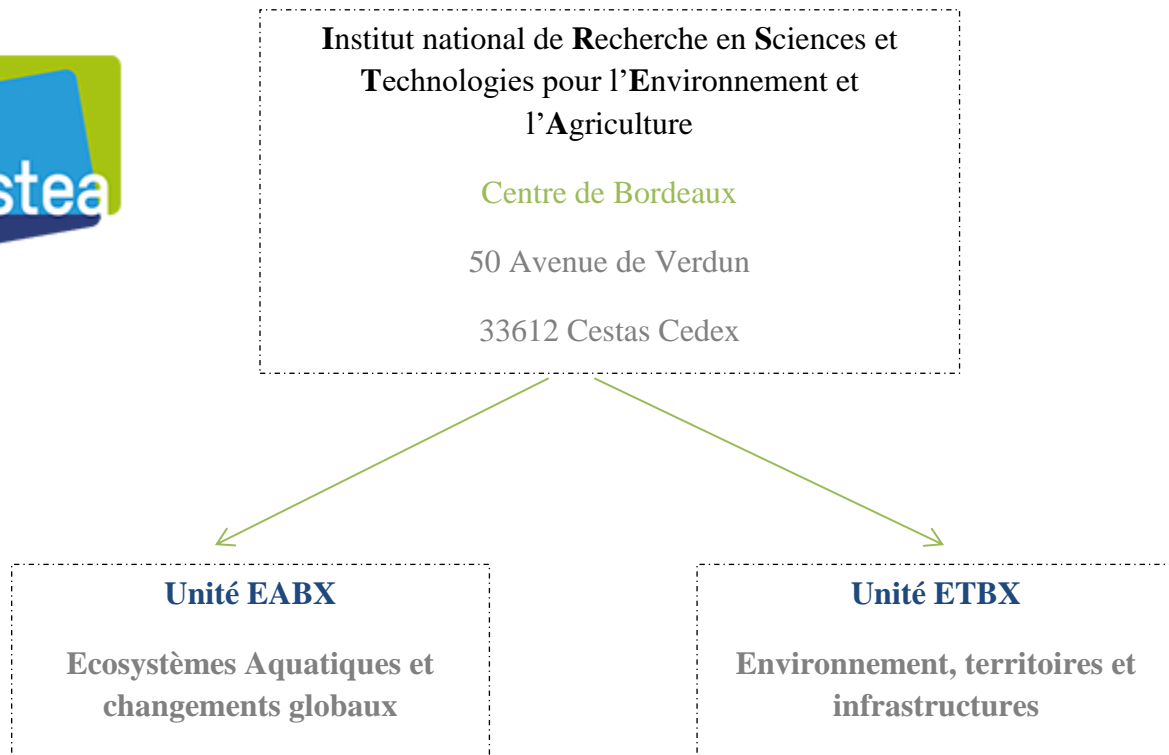
3

### Trier et Stocker

- ❖ Après utilisation, les solutions de pesticides sont stockées à 4°C dans un réfrigérateur spécifique pour les substances toxiques. Les **pictogrammes** de dangers physico-chimiques et de dangers pour la santé sont affichés sur tous les réfrigérateurs ainsi que les armoires contenant des substances chimiques toxiques (qui sont bien **étiquetées**).
- ❖ En ce qui concerne les déchets, les produits chimiques et solutions à jeter sont collectés dans des bidons spécifiques. Une entreprise spécialisée est ensuite responsable du **traitement** et de l'**élimination** de ces **déchets**. Les objets souillés sont rejetés dans des poubelles dédiées et étiquetées disponibles au laboratoire (une poubelle pour le verre et une pour le plastique). De même, le traitement et la destruction de ces déchets sont réalisés par une société agréée.

## ANNEXE 1

### *Présentation de la structure d'accueil*



Ce stage, au sein d'IRSTEA Bordeaux, a été effectué dans l'unité EABX, et plus précisément dans l'équipe **ECOVEA** (Ecologie des communautés végétales aquatiques et impact des pressions multiples).



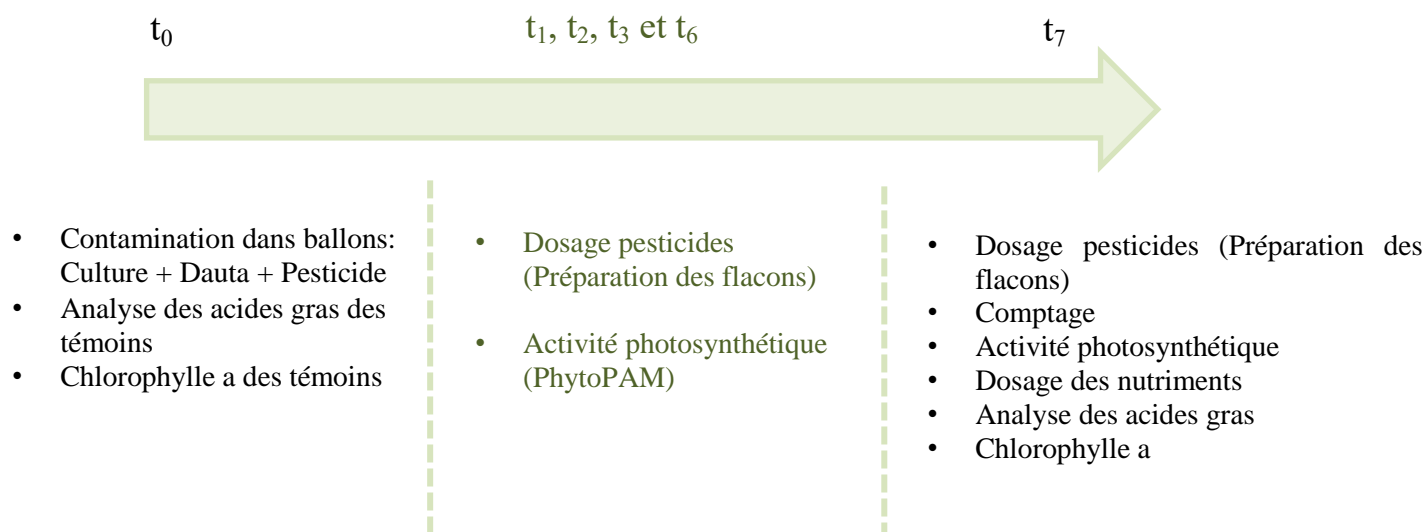
## ANNEXE 2

### *Matériels et Méthodes*

Une manipulation s'effectue sur une semaine (de  $t_0$  à  $t_7$ ), dans des ballons de volume total de 100 ml. Une semaine avant la contamination, les cultures sont acclimatées dans les ballons (Volume final = 80 ml : 30 mL de culture + 50 mL de milieu de culture Dauta) dans le but de diminuer au maximum le stress lié au contenant.

A  $t_0$ , avant de contaminer les ballons en herbicides, une concentration d'inoculation en cellules est choisie et les volumes théoriques de culture et de Dauta sont calculés (pour que tous les ballons soient à la même concentration cellulaire).

La semaine de manipulation se déroule de la façon suivante :



### **1. Activité photosynthétique**

L'activité photosynthétique des diatomées a été mesurée grâce à la technique de fluorescence chlorophyllienne en lumière modulée. L'appareil utilisé est un fluorimètre appelé Phyto-PAM (Pulse Amplitude Modulation) (Heinz Walz, GmbH, Allemagne). Cet appareil permet de mesurer la fluorescence des microorganismes photosynthétiques soumis à plusieurs éclaircissements. En effet, lors de la photosynthèse, le photon est transporté jusqu'au photosystème II et les pigments chlorophylliens, et notamment la chlorophylle a, sont excités et passent dans un état instable. Suite à cette excitation, l'énergie accumulée prend soit la voie photochimique, soit est dissipée sous forme de chaleur.

Le Phyto-PAM applique donc une lumière modulée pour provoquer la réémission de fluorescence par les cellules vivantes. Un flash de lumière saturante (SatPULSE) entraîne la fermeture des centres de réaction du photosystème II (PS II saturé) pour provoquer le blocage de la voie chimique et privilégier la dissipation de l'énergie sous forme de fluorescence.

La valeur donnée par l'appareil est alors le rendement quantique effectif de fluorescence du PS II (appelé Yield ou activité photosynthétique) et défini par la formule suivante :

$$\Phi_m = \frac{F'm - F}{F'm}$$

Avec :  $F'_m$  la fluorescence maximale suite au pulse saturant SatPULSE

$F$  le niveau de fluorescence constant et minimal obtenu sous une lumière modulée (dite actinique).

Pour chaque échantillon, 5 valeurs de Yield sont mesurées avec cet appareil pour en faire une moyenne. Cette activité photosynthétique a été mesurée tous les jours pendant la durée de l'expérimentation.

## **2. Comptage cellulaire**

Le comptage cellulaire s'est fait sur une cellule de Nageotte. Cette cellule est dotée d'un quadrillage constitué de 40 bandes, chaque bande ayant un volume de 1,25  $\mu\text{L}$ . Dix mêmes bandes sont comptées pour chaque échantillon, au microscope à l'objectif  $\times 40$ . Pour passer au nombre de cellules par microlitre (et puis par millilitre), le nombre d'individus comptés est divisé par le volume de comptage (soit 12,5  $\mu\text{L}$  ici).

Ce comptage a été réalisé à  $t_0$  avant d'inoculer les ballons, puis à  $t_7$  pour estimer la croissance des cultures en 7 jours.

## **3. Dosage de la chlorophylle a (*Lichtenthaler et Wellburn 1983*)**

La chlorophylle **a** a été dosée pour les échantillons témoins à  $t_0$  et pour tous les échantillons à  $t_7$ . Pour cela, un volume précis d'échantillon est filtré sous vide (Büchner) sur papier Whatman GF/C. Ce papier filtre, contenant tout le matériel vivant, est récupéré dans un tube et peut être stocké jusqu'à un mois à  $-20^\circ\text{C}$ .

L'analyse de la chlorophylle se fait en premier lieu par son extraction à l'acétone. Après ajout de 10 mL d'acétone à 80% dans les tubes, ces derniers sont enveloppés de papier aluminium pour

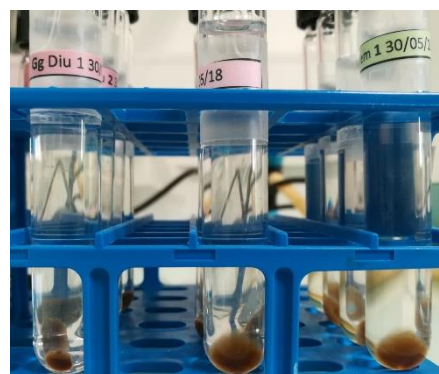
rester au maximum à l'obscurité (afin d'éviter la dégradation de la chlorophylle) et sont passés aux ultrasons pendant 20 min.

Le contenu est ensuite filtré sur papier Whatman GF/C. Le filtrat est passé au spectrophotomètre. La lecture se fait à 2 longueurs d'onde différentes : 663 nm et 648 nm. La lecture de l'absorbance à ces 3 longueurs d'onde permet de calculer la quantité de chlorophylle grâce à la formule suivante :

$$[\text{Chlorophylle a}] = 12,21 \times \text{Abs}(663 \text{ nm}) - 2,81 \times \text{Abs}(648 \text{ nm})$$

#### 4. Analyse des acides gras

Pour l'analyse des acides gras, il est nécessaire en amont d'extraire de l'échantillon à analyser toutes les cellules dans un volume de 20 mL. Pour ce faire, les 20 ml d'échantillon sont centrifugés 5 min à 5000 rotations par minute. L'eau est éliminée à la pipette pasteur et les cellules sont culotées au fond des tubes en verre (figure).



**Figure 26 :** Tubes de *Gomphonema gracile* après centrifugation

Par la suite, il est nécessaire de fractionner les lipides afin d'extraire les acides gras. Pour cela, 1 mL d'un mélange méthanol/acide sulfurique est ajouté. Cette étape permet de transformer les acides gras estérifiés (liaison avec le glycérol) en ester méthylique : c'est le processus de transestérification. Le mélange est chauffé pour accélérer cette étape. Après la transestérification, les composés apolaires sont extraits par de l'hexane (ajout de 1,5 mL d'eau et de 750  $\mu$ L d'hexane dans les tubes, puis agitation et passage à la centrifugeuse pendant 2 minutes à 5000 rotations par minute).

L'analyse des acides gras se fait par chromatographie gazeuse à l'aide d'un détecteur à ionisation de flamme (GC/FID). Celle-ci est réalisée au Laboratoire de Biogénèse Membranaire (LBM) à Villenave d'Ornon.

## **5. Dosage des nutriments**

Les nutriments sont dosés à  $t_0$  pour connaître la concentration en éléments nutritifs dans les bouteilles de Dauta qui sont utilisées pour repiquer les ballons avant la contamination. Ces nutriments sont dosés à  $t_7$  à la fin de la manipulation afin d'estimer la consommation de ces éléments par les cellules. Le dosage des anions et des cations est réalisé par chromatographie ionique (Metrohm compact 881). La silice quant à elle est dosée par des méthodes de spectrométrie d'absorption moléculaire (spectrophotomètre).

## ANNEXE 3

### Composition du milieu de culture Dauta ((Dauta 1982))

Le milieu de culture est préparé en condition stérile.

Pour un 1 litre de Dauta, ajout à l'aide d'une seringue et d'un filtre, de :

- 1 mL de  $\text{FeSO}_4, 7 \text{H}_2\text{O}$  à 1 g/L
- 1 mL de  $\text{NaHCO}_3$  à 50 g/L
- 1 mL de  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  à 5 g/L
- 1 mL de  $\text{MgSO}_4, 7 \text{H}_2\text{O}$  à 25 g/L
- 1 mL de  $\text{CaCl}_2, 2 \text{H}_2\text{O}$  à 25 g/L
- 3,6 mL de  $\text{Na}_2\text{SiO}_3, 9 \text{H}_2\text{O}$  à 28,42 g/L
- 1 mL de  $\text{KNO}_3$  à 200 g/L
- 1 mL de  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  à 25 g/L
- 1 mL de solution d'oligoéléments contenant :
  - $\text{ZnSO}_4, 7 \text{H}_2\text{O}$  à 20 mg/L
  - $\text{CuCl}_2, 2 \text{H}_2\text{O}$  à 20mg/L
  - $\text{MnCl}_2, 4 \text{H}_2\text{O}$  à 400 mg/L
  - $\text{CoCl}_2, 2 \text{H}_2\text{O}$  à 10 mg/L
  - $\text{H}_3\text{BO}_3$  à 1 mg/L
  - $\text{Na}_2\text{MoO}_4$  à 35 mg/L

Après avoir mis ces éléments, la bouteille est complétée avec de l'eau déminée (jusqu'à 1 L). Quelques gouttes de HCl sont ajoutées pour ajuster le pH entre 7,5 et 8. La bouteille est passée à l'autoclave et est ensuite stockée au réfrigérateur.

## ANNEXE 4

### Concentrations en silice à t<sub>0</sub> et t<sub>7</sub> pour les deux expériences (17,5°C et 20,5°C)

Echantillons	Concentration en silice (mg/L)	Concentration en silice (mg/L)
	Manipulation 1 : 17,5°C	Manipulation 2 : 20,5°C
TEMOIN 1 t <sub>0</sub>	29,10	35,25
TEMOIN 2 t <sub>0</sub>	30,39	37,35
TEMOIN 3 t <sub>0</sub>	32,64	41,32
TEMOIN 4 t <sub>0</sub>	28,43	34,67
Gg témoin 1 t <sub>7</sub>	0,01	0,45
Gg témoin 2 t <sub>7</sub>	0,36	0,46
Gg témoin 3 t <sub>7</sub>	0,38	1,51
Gg témoin 4 t <sub>7</sub>	0,33	0,585
Gg diuron 1 t <sub>7</sub>	0,52	9,61
Gg diuron 2 t <sub>7</sub>	0,41	11,16
Gg diuron 3 t <sub>7</sub>	0,47	12,38
Gg diuron 4 t <sub>7</sub>	0,33	10,01
Gg S-métolachlore 1 t <sub>7</sub>	0,47	0,48
Gg S-métolachlore 2 t <sub>7</sub>	0,41	0,49
Gg S-métolachlore 3 t <sub>7</sub>	0,44	0,55
Gg S-métolachlore 4 t <sub>7</sub>	0,47	0,49
NPAL témoin 1 t <sub>7</sub>	0,40	1,6
NPAL témoin 2 t <sub>7</sub>	0,52	2,56
NPAL témoin 3 t <sub>7</sub>	0,41	1,07
NPAL témoin 4 t <sub>7</sub>	0,43	0,82
NPAL diuron 1 t <sub>7</sub>	18,8	21,71
NPAL diuron 2 t <sub>7</sub>	19,5	21,52
NPAL diuron 3 t <sub>7</sub>	18,8	23,81
NPAL diuron 4 t <sub>7</sub>	16,6	22,87
NPAL S-métolachlore 1 t <sub>7</sub>	0,25	0,59
NPAL S-métolachlore 2 t <sub>7</sub>	0,27	0,385
NPAL S-métolachlore 3 t <sub>7</sub>	0,25	1,42
NPAL S-métolachlore 4 t <sub>7</sub>	0,57	0,74

## ANNEXE 5

### Exemple de chromatogrammes

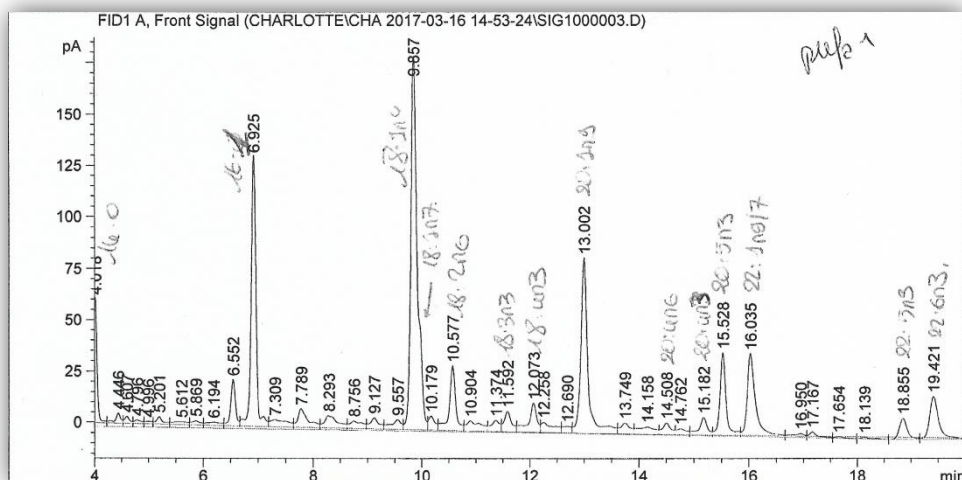
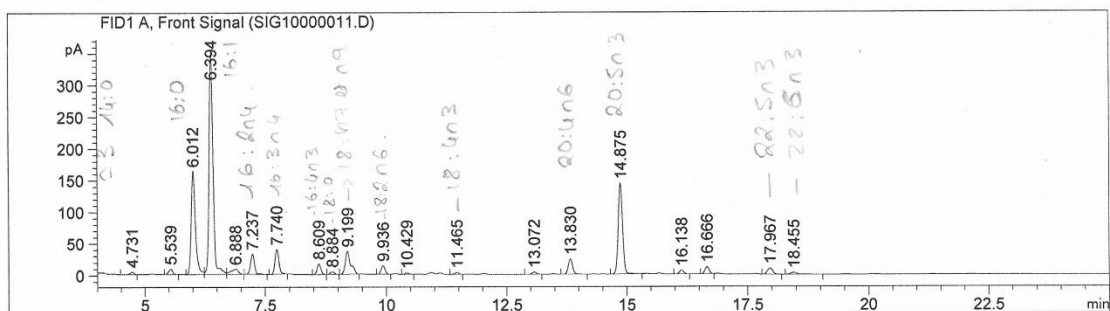


Figure 27 : Chromatogramme d'un étalon de PUFA



Peak #	RetTime [min]	Type	Width [min]	Area [pA*s]	Height [pA]	Area %
1	3.632	BB	0.0909	481.38251	85.20042	8.28062
2	4.731	BB	0.0848	19.73446	3.60686	0.33947
3	5.539	BB	0.0868	45.90440	8.01796	0.78964
4	6.012	BV	0.0943	996.60425	163.08267	17.14332
5	6.394	VV	0.0874	2005.55798	352.40823	34.49908
6	6.888	VB	0.1467	86.21520	8.06762	1.48305
7	7.237	BB	0.0886	178.73830	31.31093	3.07461
8	7.740	BB	0.0906	220.58112	38.66408	3.79438
9	8.609	BB	0.0849	89.59682	16.35493	1.54122
10	8.884	BB	0.0886	22.23721	3.89716	0.38252
11	9.199	BB	0.1154	282.54272	35.67477	4.86023
12	9.936	BB	0.0921	76.98018	13.18537	1.32419
13	10.429	BB	0.0870	12.70702	2.24568	0.21858
14	11.465	BB	0.0952	17.43079	2.93983	0.29984
15	13.072	BB	0.0992	22.47463	3.58133	0.38660
16	13.830	BB	0.0978	149.41798	23.61535	2.57025
17	14.875	BB	0.0995	902.63721	143.26093	15.52693
18	16.138	BB	0.0978	35.81821	5.82310	0.61614
19	16.666	BB	0.0918	66.01167	11.03087	1.13552
20	17.967	BB	0.1165	70.78953	9.54825	1.21770
21	18.455	BB	0.1523	30.00426	3.06136	0.51613

Figure 28 : Chromatogramme et tableau de valeurs d'un échantillon témoin de *Gomphonema gracile*

## **BIBLIOGRAPHIE**

Abida, H., et al. (2015). "Membrane glycerolipid remodeling triggered by nitrogen and phosphorus starvation in *Phaeodactylum tricornutum*." Plant Physiol **167**(1): 118-136.

Admiraal, W. (1977). "Influence of Light and Temperature on the Growth Rate of Estuarine Benthic Diatoms in Culture " Marine Biology **39**: 1-9.

Admiraal, W. and H. Peletier (1980). " Influence of Seasonal Variations of Temperature and Light on the Growth Rate of Cultures and Natural Populations of Intertidal Diatoms." Marine Ecology- Progress series **2**: 33-43.

Aussant, J., et al. (2018). "Impact of temperature on fatty acid composition and nutritional value in eight species of microalgae." Appl Microbiol Biotechnol **102**(12): 5279-5297.

Bonnineau, C., et al. (2012). "Light history modulates antioxidant and photosynthetic responses of biofilms to both natural (light) and chemical (herbicides) stressors." Ecotoxicology **21**(4): 1208-1224.

Brett, M. T. and D. C. Müller-Navarra (1997). "The role of highly unsaturated fatty acids in aquatic foodweb processes." Freshwater Biology **38**: 483-499.

Caramujo, M.-J., et al. (2007). "Fatty acid profiles of algae mark the development and composition of harpacticoid copepods." Freshwater Biology **0**(0): 77-90.

Chalifour, A. and P. Juneau (2011). "Temperature-dependent sensitivity of growth and photosynthesis of *Scenedesmus obliquus*, *Navicula pelliculosa* and two strains of *Microcystis aeruginosa* to the herbicide atrazine." Aquat Toxicol **103**(1-2): 9-17.

Colijn, F. and G. Van Buurt (1975). "Influence of Light and Temperature on the Photosynthetic Rate of Marine Benthic Diatoms." Marine Biology(31): 209-214.

Dauta, A. (1982). "Conditions de développement du phytoplancton. Etude comparative du comportement de huit espèces en culture. I. Détermination des paramètres de croissance en fonction de la lumière et de la température." Annales de Limnologie **18**(3): 217-262.

Filimonova, V., et al. (2016). "Biochemical and toxicological effects of organic (herbicide Primextra((R)) Gold TZ) and inorganic (copper) compounds on zooplankton and phytoplankton species." Aquat Toxicol **177**: 33-43.

Filimonova, V., et al. (2016). "Fatty acid profiling as bioindicator of chemical stress in marine organisms: A review." Ecological Indicators **67**: 657-672.

Gonçalves, A. M. M., et al. (2012). "Fatty acid profiling reveals seasonal and spatial shifts in zooplankton diet in a temperate estuary." Estuarine, Coastal and Shelf Science **109**: 70-80.



- Gonçalves, A. M. M., et al. (2017). Fatty Acids' Profiles of Aquatic Organisms: Revealing the Impacts of Environmental and Anthropogenic Stressors. Fatty Acids.
- Gonçalves, S., et al. (2018). "Assessing Cu impacts on freshwater diatoms: biochemical and metabolomic responses of *Tabellaria flocculosa* (Roth) Kützing." Science of The Total Environment **625**: 1234-1246.
- Gonzalez-Barreiro, O., et al. (2004). "Atrazine-Induced Chlorosis in *Synechococcus elongatus* Cells." Archives of Environmental Contamination and Toxicology **46**(3): 301-307.
- Götz, T. and P. Böger (2008). "The Very-Long-Chain Fatty Acid Synthase Is Inhibited by Chloroacetamides" Z. Naturforsch **59**: 549-553.
- Guasch, H., et al. (1997). "Changes in atrazine toxicity throughout succession of stream periphyton communities." Journal of Applied Phycology **9**(2): 137-146.
- Guiry, M. D. (2012). "How Many Species of Algae Are There?" J Phycol **48**(5): 1057-1063.
- Hu, Q., et al. (2008). "Microalgal triacylglycerols as feedstocks for biofuel production: perspectives and advances." Plant J **54**(4): 621-639.
- Jiang, H. and K. Gao (2004). "Effects of Lowering Temperature during Culture on the Production of Polyunsaturated Fatty Acids in the Marine Diatom *Phaeodactylum Tricornutum* (Bacillariophyceae)1." Journal of Phycology **40**(4): 651-654.
- Larras, F., et al. (2013). "The effect of temperature and a herbicide mixture on freshwater periphytic algae." Ecotoxicol Environ Saf **98**: 162-170.
- Lavoie, I., et al. (2008). Guide d'identification des diatomées des rivières de l'est du Canada, Presses de l'Université du Québec.
- Lehninger, A. L., et al. (2004). "Principles of Biochemistry." (Chapter 10 - Lipids): 345-357.
- Li, H. Y., et al. (2014). "Biochemical and genetic engineering of diatoms for polyunsaturated fatty acid biosynthesis." Mar Drugs **12**(1): 153-166.
- Lichtenthaler, H. K. and A. R. Wellburn (1983). "Determinations of total carotenoids and chlorophylls a and b of leaf extracts in different solvents." Biochemical Society Transactions: 603.
- Liu, H. and M. Xiong (2009). "Comparative toxicity of racemic metolachlor and S-metolachlor to *Chlorella pyrenoidosa*." Aquat Toxicol **93**(2-3): 100-106.
- Mizusawa, N. and H. Wada (2012). "The role of lipids in photosystem II." Biochim Biophys Acta **1817**(1): 194-208.

- Moisset, S., et al. (2015). "Genetic and physiological responses of three freshwater diatoms to realistic diuron exposures." Environ Sci Pollut Res Int **22**(6): 4046-4055.
- Robert, S., et al. (2007). "Metolachlor-mediated selection of a microalgal strain producing novel polyunsaturated fatty acids." Mar Biotechnol (NY) **9**(2): 146-153.
- Roubeix, V., et al. (2011). "Variations of periphytic diatom sensitivity to the herbicide diuron and relation to species distribution in a contamination gradient: implications for biomonitoring." J Environ Monit **13**(6): 1768-1774.
- Saito, H. and H. Aono (2014). "Characteristics of lipid and fatty acid of marine gastropod *Turbo cornutus*: high levels of arachidonic and n-3 docosapentaenoic acid." Food Chem **145**: 135-144.
- Sharma, K. K., et al. (2012). "High Lipid Induction in Microalgae for Biodiesel Production." Energies **5**(5): 1532-1553.
- Taipale, S., et al. (2013). "Fatty acid composition as biomarkers of freshwater microalgae: analysis of 37 strains of microalgae in 22 genera and in seven classes." Aquatic Microbial Ecology **71**(2): 165-178.
- Thompson, G. A. (1996). "Lipids and membrane function in green algae " Biochimica et Biophysica Acta **1302**(1): 14-45.
- Volkman, J. K., et al. (1989). "Fatty acid and lipid composition of 10 species of microalgae used in mariculture " Journal of Experimental Marine Biology and Ecology **128**(3): 219-240.
- Wood, R. J., et al. (2016). "How benthic diatoms within natural communities respond to eight common herbicides with different modes of action." Sci Total Environ **557-558**: 636-643.
- Wood, R. J., et al. (2016). "The influence of reduced light intensity on the response of benthic diatoms to herbicide exposure." Environ Toxicol Chem **35**(9): 2252-2260.
- Zulu, N. N., et al. (2018). "Current trends to comprehend lipid metabolism in diatoms." Prog Lipid Res **70**: 1-16.