



HAL
open science

Analyse de lipides extraits de biofilms après exposition à un ammonium quaternaire

Thiffany Loizeau

► **To cite this version:**

Thiffany Loizeau. Analyse de lipides extraits de biofilms après exposition à un ammonium quaternaire. Sciences de l'environnement. 2021. hal-04291827

HAL Id: hal-04291827

<https://hal.inrae.fr/hal-04291827v1>

Submitted on 17 Nov 2023

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.

Public Domain

RAPPORT DE STAGE

Université de Bordeaux
Master 1 Écotoxicologie et Chimie de l'Environnement

par Thiffany LOIZEAU

**Analyse de lipides extraits de biofilms après
exposition à un ammonium quaternaire**

Stage co-encadré par Nicolas MAZZELLA DI BOSCO et Aurélie
MOREIRA

À l'INRAE – Unité de Recherche Ecosystèmes Aquatiques et
Changements globaux

Du 1er juillet au 31 août 2021

REMERCIEMENTS

Je tiens à remercier tous les membres du laboratoire Biomarqueurs d'exposition des milieux aquatiques pour leur accueil chaleureux et leur sympathie tout au long de ce stage. J'aimerais remercier particulièrement mes tuteurs Nicolas Mazzella et Aurélie Moreira pour m'avoir accueillie malgré les conditions, pour leur écoute et surtout pour m'avoir guidée durant ces deux mois. Je remercie également Débora Millan-Navarro pour sa joie de vivre ainsi que mes collègues stagiaires Manon Karolkowski et Martin Menigoz pour leur gentillesse et pour tous ces fous rires.

Ce stage a été effectué à l'Institut National de Recherche pour l'Agriculture, l'Alimentation et l'Environnement (INRAE) qui est né en janvier 2020 de la fusion de l'Institut National de la Recherche Agronomique (INRA) et de l'Institut national de Recherche en Sciences et Technologies pour l'Environnement et l'Agriculture (IRSTEA). Cette structure possède de nombreuses Unités de Recherche dont l'Unité Écologie Aquatique et Changements Globaux (EABX).

L'unité EABX mène des recherches sur la caractérisation et la compréhension des réponses de la biodiversité aquatique continentale aux changements globaux à différentes échelles biologiques. Elle est constituée de 2 équipes : Écologie des Communautés Végétales Aquatiques et impact des pressions multiples (ECOVEA) et Fonctionnement et Restauration des Écosystèmes Estuariens et des populations de Migrateurs Amphihalins (FREEMA).

L'équipe de recherche ECOVEA est centrée sur la connaissance de la biodiversité et le fonctionnement des communautés végétales dans des milieux aquatiques d'eaux douces et sur leurs réponses aux perturbations naturelles et anthropiques.

Ce stage s'est déroulé au sein de l'équipe ECOVEA dans le laboratoire Biomarqueurs d'exposition aquatiques et a été co-encadré par Nicolas Mazzella, Ingénieur de recherche HDR en chimie de l'environnement et Aurélie Moreira, Assistante Ingénieure en analyse des micropolluants et lipidomique.

SOMMAIRE

Liste des figures et tableaux	4
Liste d'abréviations.....	5
I - Introduction	6
II- Généralités	6
II- 1. Les lipides	6
II- 2. Les lipides d'intérêt	7
II- 2. a. Les triglycérides	7
II- 2. b. Les diglycérides	7
II- 2. c. Une bétaine lipide : le DGTS	8
III - Matériels et méthodes	8
III - 1. Développement d'une méthode analytique	8
III- 1. a. Paramètres de la source	8
III- 1. b. Paramètres de la chromatographie	9
III- 1. c. Préparation d'une gamme d'étalonnage.....	9
III - 2. Analyse de lipides.....	9
III- 2. a. Préparation d'échantillons.....	9
III- 2. b. Analyse chromatographique.....	10
IV - Résultats et discussion	10
IV- 1. Méthode analytique, optimisation des paramètres.....	10
IV- 1. a. Optimisation des paramètres de la source.....	10
IV- 1. b. Optimisation des paramètres de la chromatographie.....	10
IV- 2. Analyse de lipides dans des échantillons de biofilm	11
IV- 2.a. Les diacylglyceryltrimethylhomo-serines	11
IV- 2.b. Les diglycérides	13
IV- 2.c. Les triglycérides	13
V - Conclusion et perspectives	15
Annexes	16
Bibliographie	19
Résumé	21

LISTE DES FIGURES ET TABLEAUX

Tableau

Tableau 1. Valeurs optimales des paramètres de source

Figures

Figure 1. Schéma simplifié d'un lipide avec la tête polaire et la queue apolaire

Figure 2. Nomenclature des Acides Gras

Figure 3. Schéma explicatif d'un spectromètre de masse en tandem

Figure 4. Chromatogramme test de l'huile de colza

Figure 5. Évolution de la concentration en DGTS totaux (en μmol) au temps initial et final en fonction d'une contamination ou non, et d'une exposition en lumière continue ou non

Figure 6. Évolution de la concentration en DG totaux (en μmol) au temps initial et final en fonction d'une contamination ou non, et d'une exposition en lumière continue ou non

Figure 7. Évolution de la concentration en TG totaux (en μmol) au temps initial et final en fonction d'une contamination ou non, et d'une exposition en lumière continue ou non

Figure 8. Évolution de la concentration en TG majoritaire (48:1_16:1) (en μmol) au temps initial et final en fonction d'une contamination ou non, et d'une exposition en lumière continue ou non

Figure 9. Distribution des glycérides (DG et TG) (en μmol) au temps initial et final en fonction d'une contamination ou non, et d'une exposition en lumière continue ou non

LISTE D'ABRÉVIATIONS

ACN : ACétoNitrile
AG : Acide Gras
BAC : Chlorure de BenzAlkonium
BAC 12 : Chlorure de dodécylbenzylméthylammonium
CE : Énergie de Collision
DG : DiGlycérides
DP : Declustering Potential
DGTS : DiacylGlycerylTrimethylhomo-Serines
EUP : Eau Ultra Pure
ESI : Ionisation par ElectroSpray
HPLC : Chromatographie Liquide Haute Performance
IPA : IsoPropAnol
LC : Chromatographie Liquide
MGDG : MonoGalactosylDiacylGlycérol
MRM : Multi Reaction Monitoring
MS : Spectrométrie de Masse
MTBE : Méthyl Tert-Butyl Éther
PC : PhosphatidylCholine
TG : TriGlycérides
tr : Temps de Rétention

I- INTRODUCTION

Le compartiment aquatique est en proie à une contamination due aux activités anthropiques. La pollution environnementale par des composés organiques et des métaux s'est aggravée à partir du XIX^{ème} siècle, lors de l'essor des activités industrielles (Torres Moacir et al., 2008). Les contaminations ont des origines variées, l'une d'entre elles est due aux biocides qui sont utilisés dans l'agriculture, dans les produits ménagers ou encore dans les produits pharmaceutiques.

Pour donner un exemple, depuis la crise sanitaire de 2020, l'utilisation des produits de désinfection a augmenté et ceux-ci pourraient se retrouver en plus grande concentration dans les compartiments environnementaux. Plus particulièrement le chlorure de benzalkonium (BAC) qui se décline sous de nombreuses formes notamment le chlorure de dodécylbenzylméthylammonium (BAC12) est utilisé comme agent actif.

C'est pourquoi des études écotoxicologiques sont nécessaires pour identifier ces contaminations et observer les répercussions sur les organismes vivants dans les milieux aquatiques. Afin d'estimer les effets d'une contamination sur des organismes et d'étudier l'impact sur des communautés notamment aquatiques, les biomarqueurs de toxicité sont des outils écotoxicologiques largement utilisés (Sanchez et al., 2012). En vue d'étudier la probable contamination des communautés aquatiques, il serait intéressant de choisir des organismes sur lesquels reposent la chaîne trophique. L'un des premiers maillons de la chaîne trophique est le biofilm qui est constitué d'un amas de bactéries, micro-algues, champignons, virus, micro et méiofaune mais aussi de larves aquatiques (Neury-Ormanni, 2019). Les cellules forment des agrégats qui sont enfermés dans une matrice extracellulaire confectionnée par les bactéries elles-mêmes (López et al. 2010). En raison de son temps de vie court, le biofilm est un indicateur écologique avantageux.

De nombreuses méthodes de détermination et d'analyse de contamination sont utilisées à l'échelle physiologique ou encore à l'échelle cellulaire. Une méthode pertinente est l'étude des lipides et plus particulièrement de l'organisation des lipides comme outil de surveillance et indicateur de stress environnemental. L'organisation des lipides membranaires et de réserve est un biomarqueur de choix pour examiner l'impact d'une contamination aux nanoplastiques sur les organismes marins (González-Fernández et al., 2020). Ainsi, l'étude écotoxicologique des lipides totaux en réponse à une contamination est assez documentée mais peu de recherches s'intéressent en revanche à la réponse de chaque classe lipidique. Or, ceci permettrait d'identifier quelles fonctions de la cellule sont affectées selon le polluant impliqué dans la contamination.

Dans le cadre de ce stage, une méthode analytique est développée en s'appuyant sur les glycérides puisqu'une méthode pour les phospholipides et les glycolipides a déjà été mise en œuvre au laboratoire. Deux classes de glycérides sont étudiées : les triacylglycérides (TG), les diglycérides (DG) ainsi qu'une classe de bêtaïnes lipides : les diacylglyceryltrimethylhomo-serines (DGTS) qui, pour des raisons pratiques, est analysé en même temps. Puis, cette méthode est utilisée sur des échantillons de biofilm contaminés au BAC 12. Cette méthode contribuera à déterminer si les lipides et leur organisation constituent un biomarqueur pertinent mais également à observer l'impact d'une contamination au BAC 12 sur ces organismes aquatiques.

II- GÉNÉRALITÉS

II- 1. Les lipides

Les lipides jouent un rôle très important dans le monde du vivant, ils sont indispensables à l'organisme. En effet, ils sont impliqués dans de nombreuses fonctions cellulaires, ils sont les constituants majeurs des membranes plasmiques, ils permettent ainsi de réguler la fluidité et la structure de celles-ci (DeLegge, 2015), mais ils servent également de stockage d'énergie dans la cellule. Les lipides sont caractérisés notamment par leur insolubilité dans l'eau due à leur structure chimique (Baeza Ariño,

2015). Ils sont généralement constitués d'une tête polaire ainsi que d'une queue apolaire comme décrit dans la Figure 1 ci-dessous, ce qui leur confère un caractère amphiphile.

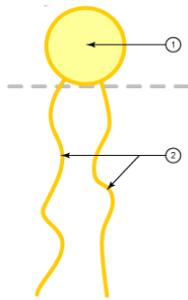


Figure 1. Schéma simplifié d'un lipide avec ① la tête polaire et ② la queue apolaire

Une bicouche lipidique forme les membranes et les lipides s'installent de façon à ce que la tête polaire soit orientée vers les extérieurs de la membrane et la queue apolaire vers l'intérieur, conférant un caractère semi-perméable à la membrane. Ainsi, il existe plusieurs types de lipides dont les fonctions sont bien définies tels que les phospholipides et les glycolipides dans les membranes, ou encore les triglycérides dans les réserves d'énergie. Les lipides mis en jeu lors des expérimentations et leur nomenclature sont décrits postérieurement.

II- 2. Les lipides d'intérêt

II- 2.a. Les triglycérides (TG)

Les triglycérides sont constitués d'un glycérol (surligné en orange) associé à 3 chaînes acyles (R_1 , R_2 et R_3) correspondant à des acides gras dont la nomenclature est résumée dans la Figure 2. Ces acides gras peuvent être identiques, il s'agit donc d'un TG homogène, ou différents pour les TG hétérogènes (Vaique, 2009). Les triglycérides sont de grandes réserves d'énergie. Les acides gras sont convertis en acétyl-CoA qui vont alimenter le cycle de Krebs permettant la formation entre autres de l'adénosine triphosphate (ATP), source d'énergie nécessaire au bon fonctionnement de la cellule.

Les triglycérides s'organisent selon la formule chimique suivante :

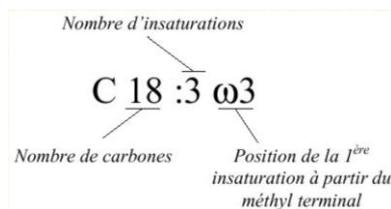
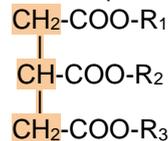
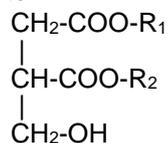


Figure 2. Nomenclature des Acides Gras

Pour les triglycérides, la nomenclature note le nombre total de carbones et d'insaturations, puis l'acide gras perdu lors de la fragmentation durant l'analyse par spectrométrie de masse. Par exemple TG(48:1_16:1) avec la perte d'un acide gras monoinsaturé (16:1) parmi l'ensemble des 3 chaînes acyles totalisant 48 atomes de carbone et une seule insaturation.

II- 2.b. Les diglycérides (DG)

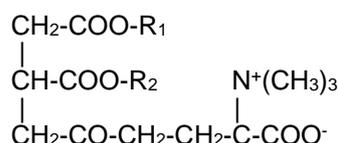
Les diglycérides sont également constitués d'un glycérol mais associé à 2 acides gras uniquement. Le site de liaison restant laisse place à un groupement hydroxyle (Nicholson et Marangoni, 2019). Les DG ont une fonction essentielle puisqu'ils sont des intermédiaires dans la voie de synthèse des TG. Ils sont aussi impliqués dans la signalisation cellulaire. Les diglycérides s'organisent de façon similaire aux triglycérides selon la formule chimique suivante :



Seuls deux acides gras composent les diglycérides, ainsi la nomenclature renseigne le nombre de carbones et d'insaturations de chaque acide gras, par exemple DG(16:0_18:0). Dans ce cas, la position relative R₁ ou R₂ n'est pas déterminée.

II- 2.c. Une bétaine lipide : DGTS

Les diacylglyceryltrimethylhomo-serines font partie des bétaines lipides qui représentent une grande classe de lipides structuraux. Ils possèdent un squelette glycérol et deux acides gras mais la troisième liaison ester présente dans les triglycérides est remplacée par une fraction alcool amine quaternaire (Cañavate et al. 2016). Il s'agit d'un lipide abondant dans les membranes de nombreuses algues, et pour la plupart de celles-ci, le DGTS remplace la phosphatidylcholine lors d'une privation de phosphore (Moore et al. 2001). Les DGTS se présentent sous cette forme, avec des acides gras R₁ et R₂ pouvant varier.



Ils sont notés comme les diglycérides selon le nombre de carbones et d'insaturations de chaque acide gras (position indéterminée également), par exemple DGTS(18:0_18:0).

III- MATÉRIELS ET MÉTHODES

III- 1. Développement d'une méthode analytique

Une méthode analytique est développée afin d'observer les spectres de masse de tous les lipides des classes précédemment définies, dans le but de pouvoir ensuite les qualifier et quantifier dans un échantillon de matrices complexes.

III- 1.a. Paramètres de la source

Des étalons sont mis en solution dans plusieurs solvants en vue d'être analysés au spectromètre de masse. Cette première étape correspond à l'infusion, elle consiste en l'injection directe de l'analyte dans la source. Elle permet de sélectionner les meilleures conditions d'injection pour obtenir les intensités de pic les plus importantes possibles.

L'infusion est réalisée par MS/MS (spectrométrie de masse en tandem), ici le modèle est API 2000, Sciex. Tout d'abord, les étalons sont ionisés par une source electrospray ESI (electrospray ionization). Puis le spectromètre de masse disposant d'une technologie de type triple quadripôle fractionne les ions formés. Dans le premier quadripôle, dit Q1, les ions précurseurs sont sélectionnés par rapport à leur valeur de masse sur charge (m/z), ils sont ensuite envoyés dans le deuxième quadripôle (Q2), aussi appelé cellule de collision, où ces ions sont fragmentés en ions "fils". Les ions "fils" sont envoyés au troisième quadripôle, dit Q3, et filtrés selon leur valeur de masse sur charge et sont captés par le détecteur. Les transitions Q1-Q3 permettent ainsi de reconnaître spécifiquement un composé. La Figure 3 ci-dessous illustre la technologie triple quadripôle utilisée ici.

L'analyse est lancée en mode MRM (Multi Reaction Monitoring), qui est plus sélectif et sensible qu'un balayage en mode SIM. Il permet une quantification simultanée d'un très grand nombre de composés, ce qui est très utile pour les échantillons composés de matrices complexes. C'est une méthode sélective et sensible.

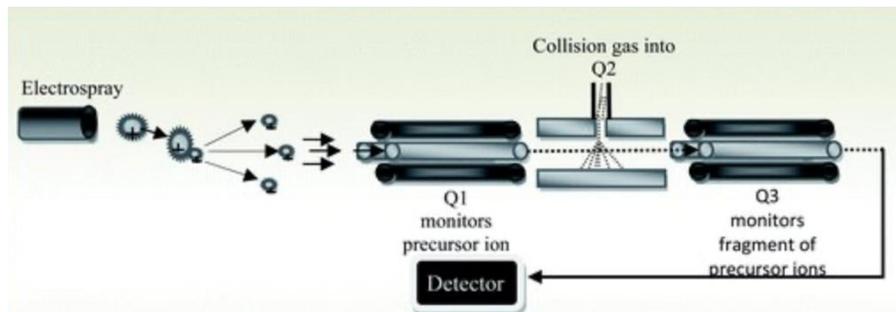


Figure 3. Schéma explicatif d'un spectromètre de masse en tandem

Un étalon est utilisé pour chaque classe de lipide : le 18:0 DG pour les diglycérides, la Tristéarine pour les triglycérides et le DGTS (16:0_16:0) pour les DGTS. Ces composés ont servi d'étalons pour l'infusion et les premiers essais de séparation chromatographiques. Les mêmes composés avec du 17:0 pour les DG et du 15:0 pour les DGTS ont servi d'étalons internes pour la suite, que ce soit dans la gamme ou dans les échantillons.

III- 1.b. Paramètres de la chromatographie

Après la détermination des paramètres optimaux pour la spectrométrie de masse, ceux de la chromatographie sont étudiés. Les paramètres de la méthode d'Isaac et al. (2020) sont testés et optimisés. La colonne utilisée est une Kinetex® 2,6 µm C8 100 Å. Taille : 100 x 2,1 mm. Phenomenex. Cette colonne repose sur le principe de phase inverse, elle est greffée avec des chaînes carbonées de 8 carbones, ce qui la rend peu polaire. L'éluion s'effectue alors du composé le plus polaire, qui n'est pas retenu sur la phase stationnaire et entraîné avec la phase mobile, au composé le moins polaire. La température de la colonne est ajustée à 55°C tandis que les échantillons sont préservés à 10°C. Le volume d'injection est fixé à 20 µL et le débit est régulé à 300 µL/min. Un gradient est instauré, mettant en jeu deux phases mobiles : la phase mobile A constituée d'un mélange 600/390/10 d'ACN/EUP/acétate d'ammonium 1M et la phase mobile B constituée de 900/90/10 d'IPA/ACN/acétate d'ammonium 1M. Les conditions du gradient sont détaillées dans le tableau 1 en Annexe 1.

Les transitions Q1-Q3 de chaque espèce moléculaire appartenant aux classes de triglycérides, diglycérides et DGTS sont répertoriées dans le logiciel Analyst® afin de les qualifier et quantifier à partir des chromatogrammes obtenus après analyse des échantillons.

III- 1.c. Préparation d'une gamme d'étalonnage

Une gamme d'étalonnage est réalisée afin de déterminer les concentrations des lipides d'intérêt des échantillons analysés. Le graphique Aire du composé/Aire de l'étalon interne=f(Concentration composé/Concentration de l'étalon interne) est réalisé pour chaque type de lipide et est disponible en Annexe 2. La gamme d'étalonnage est effectuée dans les concentrations décrites dans le tableau 2 en Annexe 1. Les étalons internes sont ajoutés en concentration constante tandis que les étalons suivent les concentrations croissantes de la gamme. Un mélange 50/50 des deux phases mobiles A et B complète les vials à 500 µL. L'étalonnage interne consiste à ajouter en concentration connue un composé pour effectuer un dosage en quantité relative, c'est-à-dire en utilisant le rapport du signal du composé cible sur le signal de l'étalon interne.

III- 2. Analyse de lipides

III- 2.a. Préparation des échantillons

Une expérimentation a été menée sur des échantillons de biofilm sous diverses conditions (Vrba, 2021) :

- exposition ou non au BAC 12 avec une contamination à 30 mg/L,
- sous lumière naturelle ou continue.

Le schéma et la photo du montage expérimental sont réunis dans l'annexe 3.

Afin d'analyser l'impact de ces facteurs sur les biofilms, les concentrations en glycérides et bétaine lipides sont déterminées. Ainsi, 50 µL de chaque étalon interne sont ajoutés à 50 µL d'échantillon conservés dans du MTBE. Ces échantillons sont ensuite évaporés à sec pour éliminer le MTBE. Puis, 500 µL d'un mélange des tampons des phases mobiles A et B (50/50) sont ajoutés et les échantillons peuvent être analysés. Ils sont identifiés selon la notation suivante :

- T0 : échantillons au temps 0
- T10-CTRL-LN : échantillons non contaminés au 10^{ème} jour avec lumière naturelle (photopériode alternée)
- T10-CONT-LN : échantillons contaminés au 10^{ème} jour avec lumière naturelle
- T10-CTRL-LC : échantillons non contaminés au 10^{ème} jour avec lumière continue
- T10-CONT-LC : échantillons contaminés au 10^{ème} jour avec lumière continue

On ne s'intéresse ici qu'aux temps initiaux et finaux mais des échantillons au 1^{er} et 2^{ème} jour et des blancs sont aussi analysés.

III- 2.b. Analyse chromatographique

L'analyse des lipides est réalisée par HPLC-MS/MS avec les paramètres définis précédemment. Les 47 échantillons préparés sont analysés. Le temps d'acquisition pour chaque échantillon est de 10 minutes pour permettre à tous les lipides d'être correctement séparés et détectés.

IV- RÉSULTATS ET DISCUSSION

IV- 1. Méthode analytique, paramètres

IV- 1.a. Optimisation des paramètres de la source

Plusieurs solvants ont été testés : un mélange 90/10 d'ACN/EUP, un mélange 90/10 d'ACN/EUP à 40mM d'acétate d'ammonium pH 10, un mélange 900/90/10 d'IPA/ACN/EUP à 10mM d'acétate d'ammonium, un mélange 900/90/10 d'IPA/ACN/EUP à 100mM d'acétate d'ammonium et un mélange 900/90/10 d'IPA/ACN/EUP à 10mM d'acétate d'ammonium acidifié à 0,1% avec de l'acide formique.

Ce dernier est le plus adapté pour déterminer certains paramètres importants tels que l'énergie de collision (CE) et le "declustering potential" (DP). Le DP est une tension qui est appliquée pour éviter que les ions ne se regroupent. Les valeurs optimales de ces paramètres pour les étalons sont regroupées dans le Tableau 1 ci-dessous.

Tableau 1. Valeurs optimales des paramètres de source

Nom	Transition Q1	Transition Q3	DP (V)	CE (V)
Tristéarine (TG)	909	608	50	37
18:0 DG	642	341	36	26
16:0 DGTS	712	474	121	43

IV- 1.b. Optimisation des paramètres de la chromatographie et test sur une huile alimentaire

Comme cité précédemment, les conditions analytiques de la méthode d'Isaac et al.(2020) sont testées et optimisées. Elles présentent des résultats satisfaisants. Le rapport signal/bruit vaut 661,9, ce qui est bien au-dessus des limites acceptables (un ratio de 10 ou plus est considéré comme acceptable). Plusieurs volumes d'injection sont testés : 10 µL et 20 µL, ce dernier est conservé pour la méthode.

Étant donné la colonne utilisée, on note que le temps d'élution augmente avec le nombre de carbone et diminue lorsqu'il y a des insaturations. En effet, le nombre de carbone fait augmenter l'apolarité du

composé, il est donc plus retenu sur la colonne. Au contraire, les insaturations accentuent la polarité d'un composé puisqu'elles peuvent interagir avec la phase mobile via des interactions faibles du type Van Der Waals.

Un test impliquant une huile de colza alimentaire a été mis en place et permis de déterminer les zones d'élution de chaque type de composés cibles (DGTS, TG et DG), on observe une séparation selon :

- temps de rétention = 2,73 min pour DGTS
- tr = 3,08 min pour DG
- tr = 4,96 min pour TAG

L'huile alimentaire est composée principalement d'acides gras polyinsaturés, notamment de triglycérides polyinsaturés, car ils sont essentiels mais difficilement synthétisés par le corps, c'est pourquoi ils sont retrouvés en grand nombre lors de cette chromatographie dont les résultats sont exposés dans la figure 4 ci-dessous. Ce type d'huile étant essentiellement composée de TG, les DGTS et DG sont très peu représentés.

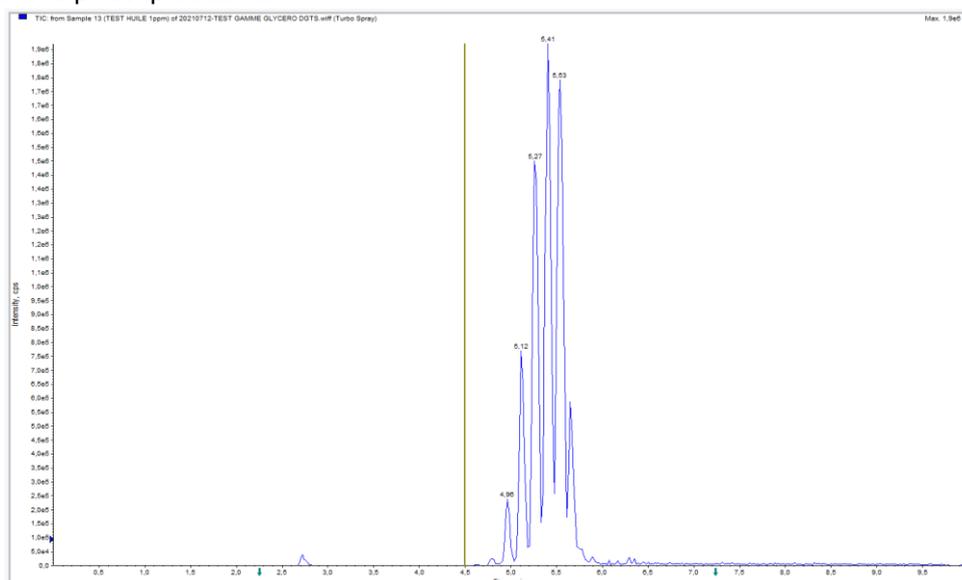


Figure 4. Chromatogramme test de l'huile de colza

IV- 2. Analyse de lipides dans des échantillons de biofilm

IV- 2.a. Les diacylglyceryltrimethylhomo-serines

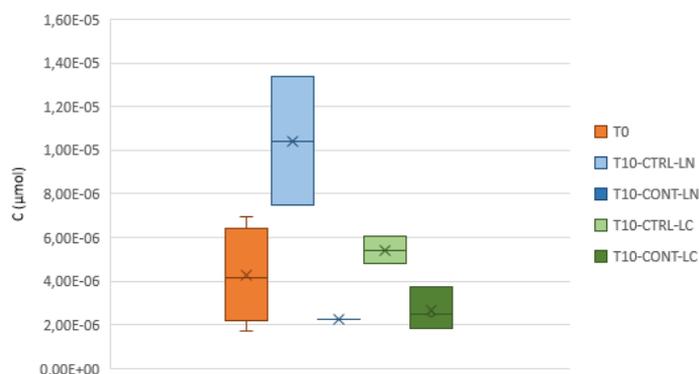


Figure 5. Évolution de la concentration en DGTS totaux (en µmol) au temps initial et final en fonction d'une contamination ou non, et d'une exposition en lumière continue ou non

La quantité totale de DGTS est très faible aux T0 et T10, elle avoisine les 10^{-5} et 10^{-6} µmol. On observe une tendance à l'augmentation de la quantité de DGTS en conditions "normales" : sans contamination et avec une lumière naturelle. Cette quantité semble très légèrement augmenter également sans

contamination et sous lumière continue. Au contraire, elle paraît diminuer avec contamination au BAC 12 que ce soit sous lumière naturelle ou continue. Le DGTS majoritairement retrouvé est le DGTS (16:0_16:0) avec un pourcentage relatif qui vaut quasiment 100%.

La Figure 6 ci-dessous représente la quantité de phosphatidylcholines (PC) en fonction de la quantité de DGTS. Aucun lien semble exister entre ces deux classes lipidiques dans le cadre de notre expérimentation au BAC 12.

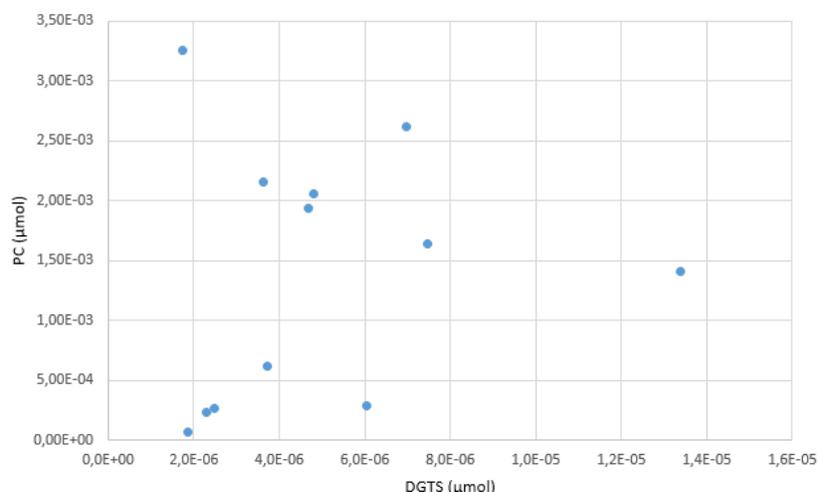


Figure 6. Corrélation entre les phosphatidylcholines et les DGTS (en μmol) lors de l'expérimentation

Les DGTS sont des lipides structuraux qui ont généralement une proportion inverse aux phosphatidylcholines (Moore et al. 2001), ils semblent ainsi remplacer ces composés lors d'une privation de phosphore. D'après les résultats de Vrba (2021), la contamination au BAC 12 semble avoir un effet sur les concentrations en phosphatidylcholine qui sont diminuées. Or, la quantité de DGTS ici n'est pas augmentée et aucune corrélation claire n'est mise en évidence. On peut supposer qu'un composé, autre que la DGTS, est venu remplacer la phosphatidylcholine lors du stress encouru. Il est également possible que l'abondante quantité de triglycérides contenue dans les échantillons soit venue écraser les signaux de DGTS et que les quantités pourraient donc être plus élevées. En effet, une étude suggère que le DGTS serait un précurseur dans la voie de synthèse des TG et qu'une contribution du glycolipide MGDG (monogalactosyldiacylglycérols) n'est pas exclue (Pokpo et al. 2016). Cette constatation est survenue après une privation d'azote chez plusieurs espèces d'algues. Alors que la contamination au BAC 12 semble impacter les quantités de DGTS qui se trouvent réduites, on pourrait conjecturer sur une consommation des DGTS pour la synthèse des gouttelettes de TG. D'après les expérimentations de Vrba (2021), les valeurs de MGDG sont, par ailleurs, inférieures à T10 et même nulles à T10 avec contamination.

La lumière semble être un paramètre qui affecte les quantités de DGTS puisqu'en l'absence de contamination, la quantité de DGTS est beaucoup plus élevée pour les biofilms placés à la lumière naturelle. Cette remarque coïncide avec les résultats de Sukačová et al (2015) dans lesquels la biomasse algale est largement augmentée lors d'une exposition à une lumière artificielle continue, on présume que ceci serait dû à la photosynthèse qui est en lien avec la luminosité.

Aucun effet synergique entre les conditions de contamination et de lumière n'est observé lors de ces expérimentations.

IV- 2.b. Les diglycérides

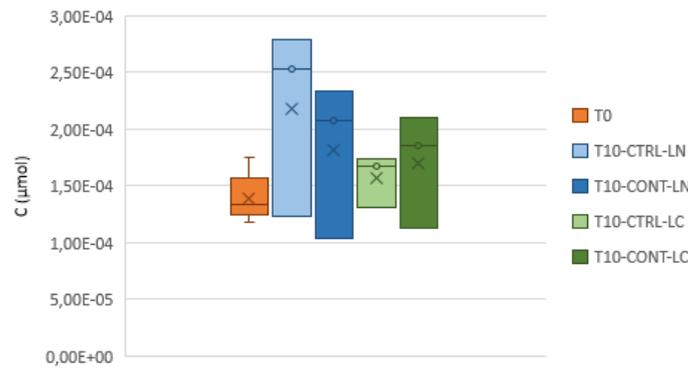


Figure 7. Évolution de la concentration en DG totaux (en μmol) au temps initial et final en fonction d'une contamination ou non et d'une exposition en lumière continue ou non

La quantité totale de DG durant toute la cinétique de cette expérimentation se situe aux alentours de 1 à $2,8 \times 10^{-4} \mu\text{mol}$. On observe une légère tendance à la hausse de la quantité moyenne de DG en conditions "normales" : sans contamination et avec une lumière naturelle. Cette quantité semble augmenter faiblement également sans contamination et sous lumière continue. Les résultats sont sensiblement les mêmes pour les échantillons contaminés au BAC 12 que ce soit sous lumière naturelle ou continue, la quantité de DG augmente faiblement aussi. Le DG (16:0_16:1) est légèrement majoritaire avec un pourcentage relatif de 20% environ, une valeur assez faible toutefois étant donné que les diglycérides sont assez dispersés.

Les diglycérides font partie de la voie de synthèse de plusieurs lipides notamment des triglycérides, ils sont donc retrouvés en plus petite quantité puisque consommés lors de ce processus. En effet, ce dernier comporte 3 étapes : deux acides gras activés sont condensés sur un glycérol grâce à l'action de deux enzymes (GPAT et AGPAT) et forment l'acide phosphatidique, le diglycéride est formé par hydrolyse du groupement phosphate et enfin, un troisième acide gras activé est estérifié sur le diglycéride pour former le triglycéride (Alligier et al., 2013).

Nos résultats concernant les diglycérides sont difficilement exploitables en raison de leurs valeurs quasiment identiques, les différences observées sont négligeables. Leur quantité paraît à l'équilibre, ce qui est sûrement explicable par sa présence dans la synthèse de tous les lipides contenant un squelette glycérol tels que les phospholipides, les triglycérides et les glycérolipides.

On observe tout de même une perte de diversité lors d'un épisode de contamination au BAC 12. C'est-à-dire qu'il y a moins de diglycérides différents après exposition des biofilms au BAC 12.

IV- 2.c. Les triglycérides

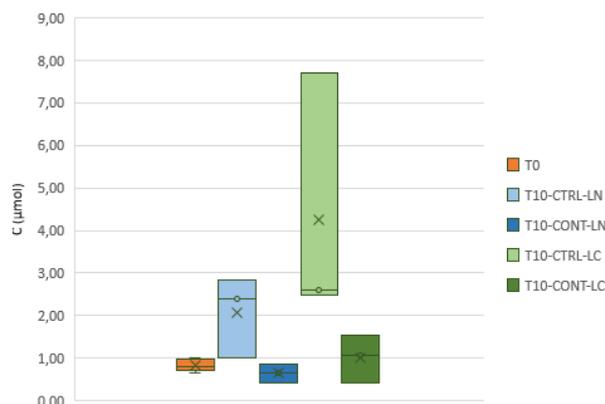


Figure 8. Évolution de la concentration en TG totaux (en μmol) au temps initial et final en fonction d'une contamination ou non et d'une exposition en lumière continue ou non

La quantité totale en TG lors de cette expérience est très élevée, les échantillons ont dû être dilués au centième pour ne pas se retrouver hors gamme. Les valeurs se situent aux alentours de 1 à 10 μmol . On observe une tendance à l'augmentation d'un facteur 2 de la quantité moyenne de DG au T10 en conditions "normales" : sans contamination et avec une lumière naturelle. Cette quantité paraît augmenter de façon plus importante sans contamination et sous lumière continue, d'un facteur 3 à 7. Pour les échantillons contaminés au BAC 12 dans les deux conditions de lumière différente, la quantité de TG reste plutôt stable, il n'y a pas de différence significative. Le TG majoritaire est le TG(48:1_16:1) avec une proportion aux alentours de 50% dans les échantillons. On peut d'ailleurs en déduire qu'il s'agit d'une composition univoque entre deux acides gras 16:0 et un 16:1.

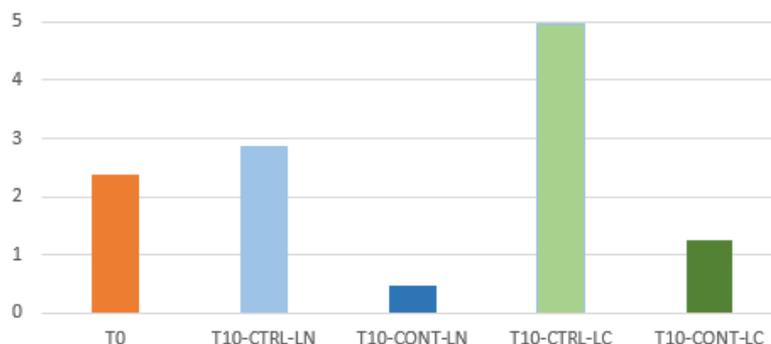


Figure 9. Évolution de la concentration en TG majoritaire (48:1_16:1) (en μmol) au temps initial et final en fonction d'une contamination ou non et d'une exposition en lumière continue ou non

En observant la Figure 9, on remarque que les variations observées pour les TG totaux suivent les concentrations du TG majoritaire (48:1_16:1). En effet, on constate une augmentation de la quantité de TG(48:1_16:1) dans les conditions normales et une augmentation plus importante sans contamination et sous lumière continue. Et au contraire, une stabilité voire une diminution de la quantité de TG(48:1_16:1) dans les échantillons contaminés dans les deux conditions de lumière.

Il a été suggéré que l'accumulation de triglycérides dans les algues ne se produit que dans des conditions de stress telles que la limitation de l'azote (Popko et al. 2016). Leurs résultats concernant la composition des espèces moléculaires de TG évoquent un remodelage principalement à partir du bêtaïne lipide DGTS puisque la quantité de TG a augmenté au détriment de cette classe lipidique. Au contraire, nos résultats montrent une stagnation des TG dans des échantillons contaminés. Ainsi, le BAC 12 ne semble pas avoir d'effet sur la production de TG qui reste constante. Les espèces moléculaires retrouvées en plus grand nombre sont TG (48:1), TG (48:2) et TG (48:3) (Popko et al. 2016). Ceci coïncide avec nos résultats puisque le triglycéride TG (48:1_16:1) est le plus abondamment retrouvé.

Au contraire, la luminosité semble impacter la production de triglycérides qui est amplifiée. Au 10^{ème} jour avec une lumière continue, la quantité de TG est la plus importante de l'expérimentation. Pour une autre micro-algue, *Scenedesmus obliquus*, les conditions de croissance de TG optimales ont été déterminées dans un milieu en manque d'azote. Il s'agirait donc d'un pH neutre aux alentours de 7, d'une température de 27,5°C et d'une faible intensité lumineuse continue (Breuer et al., 2013). Cette suggestion concernant la luminosité semble concorder avec nos résultats sous lumière continue.

CONCLUSION ET PERSPECTIVES

En conclusion, ces expérimentations montrent la possibilité d'utiliser les classes lipidiques et leur organisation en tant que biomarqueur d'une contamination. L'exposition au BAC 12 sur les biofilms a impacté ces différentes classes de lipides et une étude plus poussée aurait permis de déterminer les fonctions mises en danger par le BAC 12.

Dans le rapport de Vrba (2021), le BAC 12 semble avoir pour effet de modifier les proportions dans les classes lipidiques du biofilm puisqu'une diminution des phosphatidylcholine et une augmentation des phosphatidyléthanolamine et des phosphatidylglycérol a été observée dans les échantillons contaminés contrairement aux témoins qui ne notent aucun changement significatif, et ce quelle que soit la photopériode appliquée. Pour ce qu'il en est des glycérides et du bétaïne lipide étudiés, la contamination s'avère ne pas avoir d'effet significatif sur les diglycérides. À l'inverse, une tendance à l'augmentation pour les triglycérides et à la baisse pour les DGTS a été observée, mais celles-ci restent très faibles.

La lumière continue a, quant à elle, eu un effet sur les classes de lipides. Le rapport de Vrba indiquait un impact seulement sur la structure du biofilm mais nos résultats complémentaires présentent un probable impact de la lumière sur les triglycérides ainsi que DGTS. Cette hypothèse pourrait être affirmée grâce à une étude impliquant les biofilms et différentes conditions de luminosité.

Ainsi, quelle que soit la classe de lipide considérée ici, l'acide gras 16:0 paraît prédominer. Par ailleurs, les lipides membranaires tels que les phospholipides et glycolipides semblent contenir davantage d'acides gras insaturés à 18 ou 20 atomes de carbone (Meng et al., 2019; Demailly, 2020). Par conséquent, une étude approfondie des acides gras retrouvés après une contamination pourrait être effectuée et permettrait de déterminer les acides gras prenant le relai lors d'une contamination. C'est-à-dire regarder l'évolution de la composition des acides gras (longueur de chaîne et nombre d'insaturations) au sein de chaque classe car cela ne semble pas évoluer uniformément.

En plus de m'avoir permis de manipuler de façon autonome des instruments d'analyse, ce stage représente un premier pas dans le monde professionnel et d'un laboratoire de recherche publique plus précisément. J'ai ainsi pu mettre en pratique le métier de chercheur dans le domaine de l'écotoxicologie.

ANNEXES

Annexe 1. Paramètres du développement de la méthode

Tableau 1. Paramètres du gradient d'élution

Temps (min)	%A	%B
initial	50	50
0,3	50	50
5	1	99
7	1	99
8	50	50
10	50	50

Tableau 2. Gamme d'étalonnage

Gamme→ Volume (en µL)↓	0,02 ppm	0,05 ppm	0,1 ppm	0,5 ppm	1 ppm	2 ppm	5 ppm	10 ppm
EI	50	50	50	50	50	50	50	50
Étalons	10 (1ppm)	25 (1ppm)	50 (1ppm)	2,5 (100ppm)	5 (100ppm)	10 (100ppm)	25 (100ppm)	50 (100ppm)

Annexe 2. Graphiques des gammes de DG, DGTS et TG

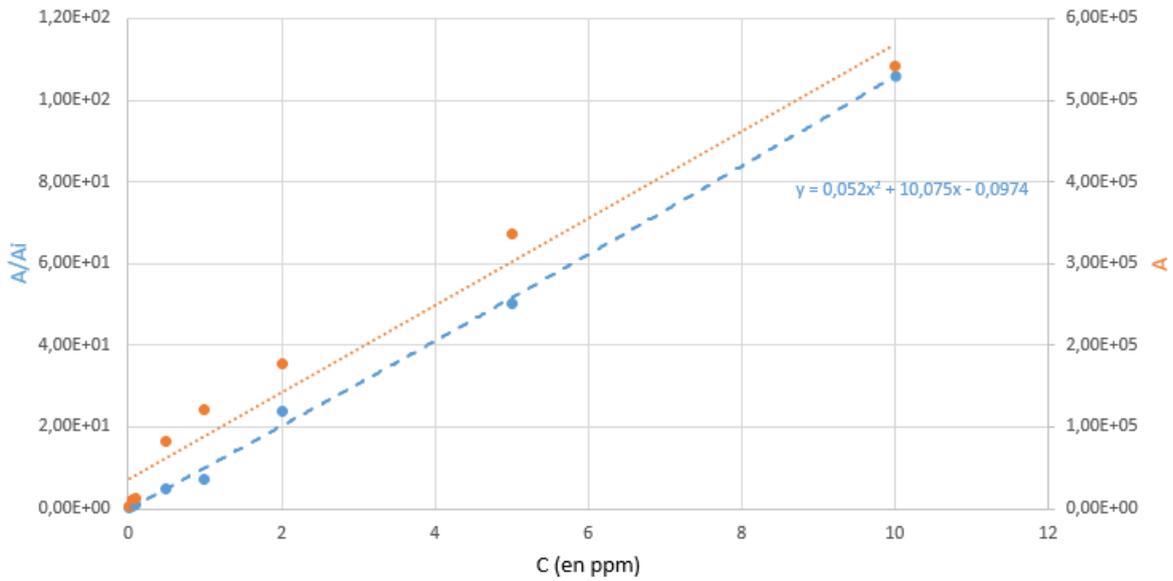


Figure 1. Graphique de la gamme de diglycérides. En orange, régression linéaire de l'aire A des pics en fonction de la concentration (échelle de droite). En bleu, régression polynomiale du rapport A/Ai en fonction de la concentration et quantité d'étalon interne (échelle de gauche).

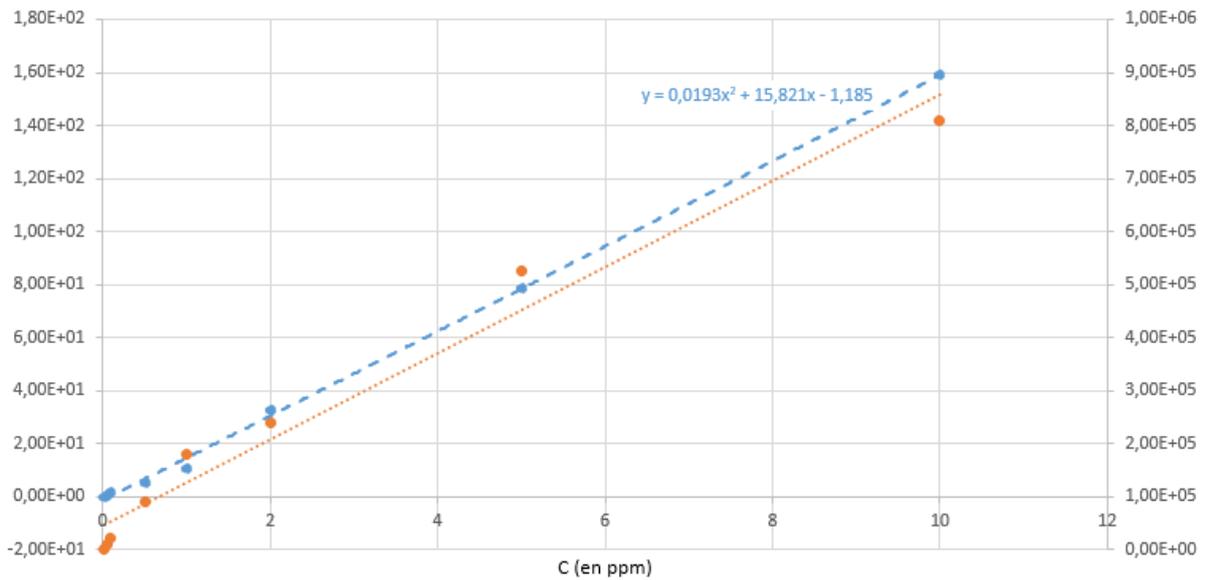


Figure 2. Graphique de la gamme de DGTS. En orange, régression linéaire de l'aire A des pics en fonction de la concentration. En bleu, régression polynomiale du rapport A/Ai en fonction de la concentration et quantité d'étalon interne.

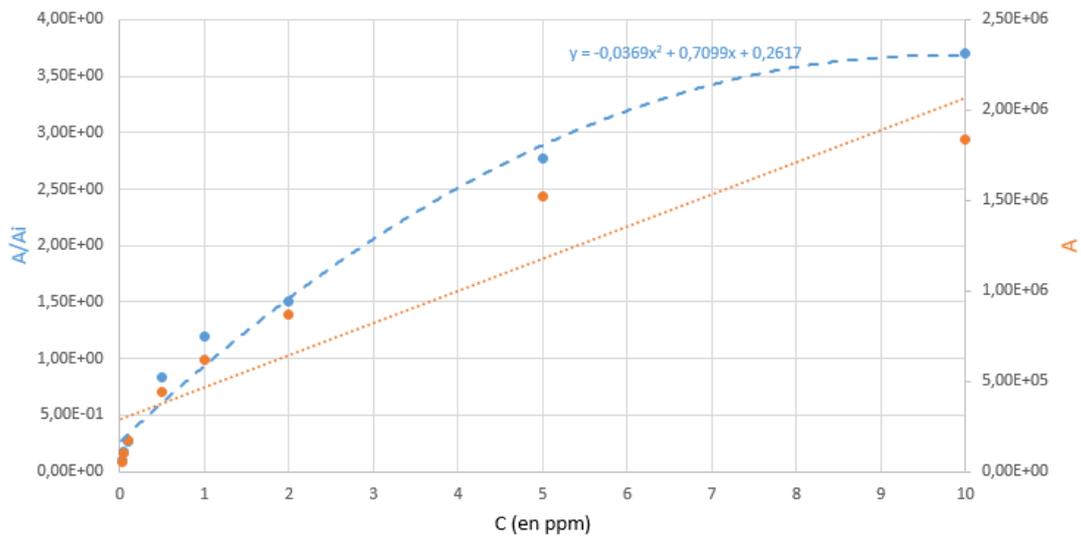


Figure 3. Graphique de la gamme de triglycérides. En orange, régression linéaire de l'aire A des pics en fonction de la concentration. En bleu, régression polynomiale du rapport A/Ai en fonction de la concentration et quantité d'étalon interne.

Annexe 3. Schéma et photo du montage expérimental

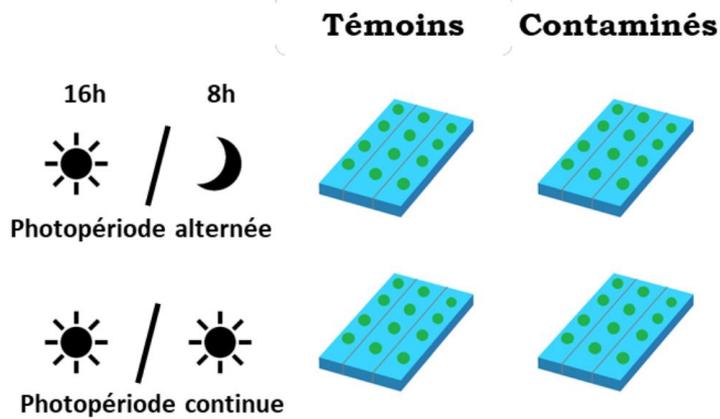


Figure 1. Schéma récapitulatif du montage expérimental en canaux artificiels

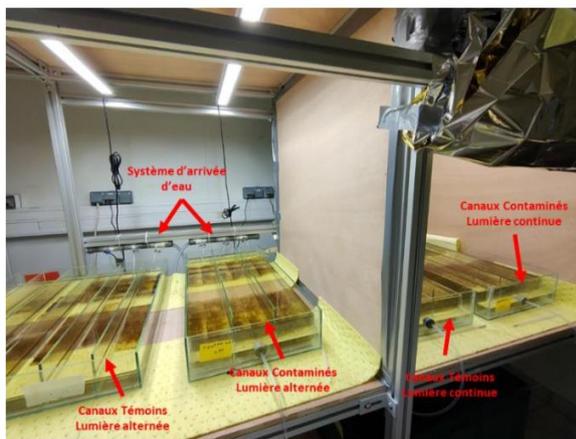


Figure 2. Photos du montage expérimental en canaux artificiels

BIBLIOGRAPHIE

- . Alligier M., Seyssel K, Disse E., Laville M. "Le tissu adipeux: couleur, localisation, fonctions et autres données nouvelles". Janvier 2013.
- . Baeza Ariño R. "Roles of lipids and fatty acids through the spermatogenesis of European eel (*Anguilla anguilla*)". Mars 2015
- . Breuer G., Lamersa P.P., Martensa D.E., Draaisma R.B., Wijffelsa R.H. "Effect of light intensity, pH, and temperature on triacylglycerol (TAG) accumulation induced by nitrogen starvation in *Scenedesmus obliquus*". *Bioresource Technology*, Volume 143, Pages 1-9, Septembre 2013. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2013.05.105>
- . DeLegge M. "Lipids: The Macronutrient That Deserves Some Respect and Airtime". *Journal of Parenteral and Enteral Nutrition*, Volume 39 Supplement 1, Septembre 2015. <https://doi-org.docelec.u-bordeaux.fr/10.1177/0148607115596519>
- . González-Fernández C., Le Grand F., Bideau A., Huvet A., Paul-Pont I., Soudant P. "Nanoplastics exposure modulate lipid and pigment compositions in diatoms". *Environmental Pollution*, Volume 262, Juillet 2020. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2020.114274>
- . Isaac G., Munjoma N., Gethings L. A., Mullin L., Plumb R. S. Application note. "A robust and reproducible reversed phase lipid profiling method for large sample sets". *Waters*, Juillet 2020. 720006959.
- . López D., Vlamakis H., Kolter R. "Biofilms". *Cold Spring Harbor perspectives in biology*, Volume 2, Juillet 2010. [10.1101/cshperspect.a000398](https://doi.org/10.1101/cshperspect.a000398)
- . Meng Y., Cao X., Yang M., Liu J., Yao C., Xue S. "Glycerolipid remodeling triggered by phosphorous starvation and recovery in *Nannochloropsis oceanica*". *Algal Research*, Volume 39, Mai 2019. <https://doi.org/10.1016/j.algal.2019.101451>
- . Moore, T., Zhirong Du, & Chen, Z. "Membrane Lipid Biosynthesis in *Chlamydomonas reinhardtii*. In vitro Biosynthesis of Diacylglyceryltrimethylhomoserine." *Plant Physiology*, Volume 125, Pages 423-429, Janvier 2001. <http://www.jstor.org/stable/4279663>
- . Neury-Ormanni J. "Impact de la saisonnalité et d'une contamination pesticide environnementale sur des relations biotiques entre la micro-méiofaune et les microalgues d'un biofilm d'eau douce". Thèse
- . Nicholson R. A., Marangoni A. G. "Diglyceride". *Encyclopedia of Food Chemistry*, Volume 1, Pages 70-73, 2019. <https://doi.org/10.1016/B978-0-08-100596-5.22343-3>
- . Popko J., Herrfurth C., Feussner K., Ischebeck T., Iven T., Haslam R., Hamilton M., Sayanova O., Napier J., Khozin-Goldberg I., Feussner I. "Metabolome Analysis Reveals Betaine Lipids as Major Source for Triglyceride Formation, and the Accumulation of Sedoheptulose during Nitrogen-Starvation of *Phaeodactylum tricornutum*". *PLOS ONE*, Octobre 2016. 10.1371/journal.pone.0164673

. Sanchez W., Bado-Nilles A., Porcher J.M. "Biomarqueurs chez le poisson : un outil d'intérêt pour le contrôle d'enquête". *La Houille Blanche*, Volume 98, Issue 2, Pages 49-54, 14 mai 2012. <https://doi.org/10.1051/lhb/2012015>

. Torres Moacir A., Barros Marcelo P., Campos Sara C.G., Pinto Ernani, Rajamani Satish, Sayre Richard T., Colepicolo Pio. "Synthèse : biomarqueurs biochimiques d'algues et pollution marine". *Bibliomer* n°43, Volume 71 (1) , Pages 1-15, Septembre 2008.

. Vaique E. "Synthèse de triglycérides structurés ou fluorescents pour l'étude du métabolisme lipidique". Décembre 2009

. Vrba R. "Effets interactifs du chlorure de benzalkonium et de la lumière nocturne sur les biofilms aquatiques". Rapport de stage. Juin 2021.

Photos :

. <https://www.afblum.be/bioafb/acidgras/acidgras.htm>

. Thèse de Bui Van Hoi. "Contribution à l'étude de la présence et du devenir des résidus pharmaceutiques dans les compartiments aquatiques". Novembre 2013. [10.13140/RG.2.1.5006.8008](https://doi.org/10.13140/RG.2.1.5006.8008)

. <https://fr.wikipedia.org/wiki/Lipide>

RÉSUMÉ

Dans un contexte de contamination croissante depuis la révolution industrielle du 19^{ème} siècle, les écosystèmes aquatiques sont en proie à cette pollution. La présente étude s'intéresse à l'impact du chlorure de dodécylbenzylméthylammonium (BAC 12) sur un organisme aquatique d'eau douce, le biofilm. Les effets néfastes de cette contamination seront suivis à partir des lipides et plus précisément de l'organisation des différentes classes lipidiques au sein d'une cellule. Le rôle des lipides dans nos cellules est primordial. Ils sont les majeurs constituants des membranes et servent également de réserve d'énergie. Ainsi, l'impact d'une exposition d'un biofilm à un biocide tel que le BAC 12 est examiné sur les glycérides et les diacylglyceryltrimethylhomo-serines. Des études antérieures ont porté sur les phospholipides et les glycolipides. Une condition de luminosité est également appliquée aux biofilms afin d'observer une éventuelle perturbation de la lumière artificielle la nuit. Les résultats montrent des différences pour chaque classe lipidique. Les glycérides et DGTS étudiés ici ne semblent pas être spécifiquement affectés par la contamination mais la quantité de triglycérides a tendance à augmenter sous lumière continue. Cette étude permet de mettre en évidence la possibilité d'utiliser un ensemble de lipides comme biomarqueurs après exposition à une contamination.