Analyse de classes et espèces moléculaires lipidiques, issues d'une souche de diatomée, en fonction de la phase de croissance et de la trophie du milieu

Cassandra Pouysegur

▶ **To cite this version:**

Cassandra Pouysegur. Analyse de classes et espèces moléculaires lipidiques, issues d'une souche de diatomée, en fonction de la phase de croissance et de la trophie du milieu. Chimie. 2021. hal-04291848

HAL Id: hal-04291848
https://hal.inrae.fr/hal-04291848v1

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.

UNIVERSITÉ DE BORDEAUX
FACULTE DE SCIENCE ET TECHNIQUE DE TALENCE

Rapport de stage de fin de licence 3 chimie 2020/2021
par Cassandra Pouysegur

Spécialité: toxicologie et chimie de l'environnement

Analyse de classes et espèces moléculaires lipidiques, issues d'une souche de diatomée, en fonction de la phase de croissance et de la trophie du milieu

Date de l'oral : 14 Juin 2021
Jury :
Monsieur O. Toulemonde
Monsieur G. Naulet

Encadrement sur le site de l'INRAE par :
Monsieur N.Mazzella
Madame A.Moreira

REMERCIEMENTS

Je tiens très sincèrement à remercier Monsieur Nicolas Mazzella, tout d'abord pour avoir accepté d'encadrer mon stage malgré une situation sanitaire complexe, mais aussi pour sa grande compréhension et pour ses explications de qualité, qui ont su éclairer mon travail du début à la fin.

Je tiens également à remercier Madame Aurélie Moreira, pour son encadrement, sa grande pédagogie et sa bonne humeur.

Enfin, merci à toute l'équipe ECOVEA, pour son accueil et son climat chaleureux, grâce à qui j'ai passé des journées à la fois enrichissantes, productives et toujours très positives.

SOMMAIRE

A) Introduction……3
- Un besoin urgent d'identification des risques et des pollutions aquatiques existantes, pour mieux maîtriser leurs conséquences sur l'environnement.

B) Analyse de l'état de l'art…….3
1) Les micro-algues diatomées
2) Les lipides
3) Effets anthropiques et conséquences sur le milieu
4) Les méthodes d'analyse

C) Démarches expérimentales……8
1) Elaboration de la méthode
2) Élaboration des solutions lipidiques
3) Infusion de vérification
4) Elaboration de la gamme
5) Echantillonnage et analyses

D) Résultats……..….10

E) Discussion et analyses des résultats…….……14

F) Conclusion de l'étude et ouverture……..…14

G) Bibliographie……15

H) Hygiène et Sécurité au sein du laboratoire……16

I) Annexes supplémentaires……...17

a) L'INRAE, l'EABX, c'est qui ? C'est quoi ?

b) Quelques étapes supplémentaires réalisées durant le stage :
- Réalisation de la méthode par tableau Excel
- Exploitation de la droite d'étalonnage et explications
- Mises en solution, échantillonnage, techniques d'analyse

c) English Abstract

A) Introduction :

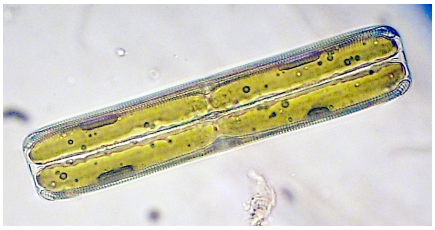
<u>Un besoin urgent d'identification des risques et des pollutions aquatiques existantes, pour mieux maîtriser leurs conséquences sur l'environnement.</u>

Depuis ces dernières années, avec le réchauffement climatique, les dérèglements de la faune comme de la flore en réponse à toutes sortes de pollutions anthropiques, pollutions qui ne cessent d'augmenter mais aussi de se complexifier avec les avancées scientifiques ; les défis des pesticides, du dérèglement climatique et de la détérioration des sites sont des enjeux devenus prédominants dans notre société.
Ainsi, les laboratoires de recherche du monde entier s'intéressent tout particulièrement aux conséquences des polluants, substances naturelles ou de synthèse provoquant une modification du milieu, qui se révélera nuisible pour l'écosystème.
C'est justement ces conséquences de modifications de milieu (de température, de présence de Phosphore notamment susceptible de modifier la trophie…) que j'ai l'occasion d'étudier durant ces deux mois au sein du laboratoire Biomarqueurs d'exposition et au travers du sujet suivant : **l'analyse de classes et espèces moléculaires <u>lipidiques</u>, issues d'une souche de <u>diatomée</u>, en fonction de la <u>phase de croissance et de la trophie du milieu</u>.**

B) Etat de l'art

1) Les micro-algues diatomées :

Les diatomées ou Bacillariophycées sont des algues microscopiques unicellulaires (dont la taille varie entre 5 µm et 500 µm). Chaque cellule est constituée d'un exosquelette siliceux de protection, le frustule et de matière organique végétale. Les diatomées jouent un rôle important en contribuant à la production d'oxygène, étant considérées comme des producteurs primaires (êtres vivants autotrophes, c'est-à-dire capables de produire de la matière organique à partir de matière minérale et qui se trouvent donc tout en bas de la chaîne alimentaire).



(Figure1) diatomée vue au microscope

Leur développement est fortement influencé par :
• La température
• Les nutriments (surtout le phosphore P, mais aussi l'azote N)
• La lumière (pour la photosynthèse)

<u>Avantages d'utiliser les diatomées comme **bio-indicateur** :</u>
• Les algues ont habituellement un cycle de vie rapide, ce qui en fait un bio-indicateur efficace pour les impacts qui ont lieu sur une courte période.
• L'échantillonnage est facile, peu coûteux, requiert peu de main d'œuvre et minimise les impacts sur la faune en place.
• Dotées d'un frustule fait de silice protectrice, il est facile de les préserver à basse température (-80°c durant ce stage).
• Elles ont une bonne capacité d'adaptation et de tolérance face aux pollutions du type nutriments, en revanche un peu moins pour les pesticides.

Les diatomées sont donc des bio-indicateurs limités. Le but de ce stage est d'aller étudier les effets au niveau moléculaire et intra-cellulaire, plus précisément au niveau des lipides des diatomées, pour palier ces limitations de l'approche basée sur la bio-indication.

Les lipides étudiés seront donc considérés comme des bio-marqueurs caractéristiques de l'espèce Diatomée.

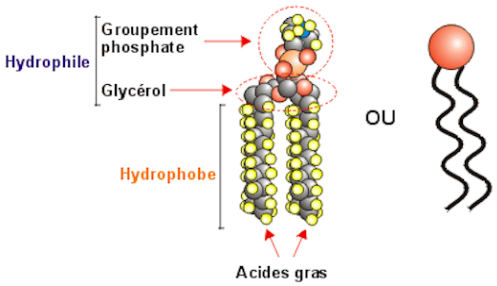
2) Les lipides :

La composition biochimique des diatomées est représentée par quatre classes de métabolites primaires : les protéines, les sucres, les acides nucléiques et les lipides.

Les lipides (illustrés en figure 2) sont les constituants majeurs des membranes biologiques. Ces membranes sont constituées d'une bicouche lipidique qui régule l'entrée de molécules polaires ou d'ions dans la cellule (Lehninger, 2004).

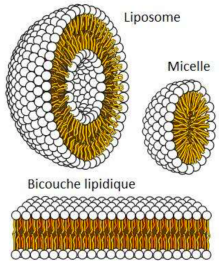
Un Lipide est un corps gras, une molécule dite amphiphathique qui possède une partie qualifiée de « tête hydrophile » et une partie dite « queue hydrophobe » qui se compose d'acides gras (AG).

Un acide gras est un acide carboxylique à longue chaîne carbonée (de 4 à 36 carbones). Cette chaîne peut être saturée (que des liaisons simples) ou non (présence d'au moins une liaison double).



(Figure 2) Schéma d'un lipide, de sa tête polaire hydrophile et de sa queue d'AG hydrophobe

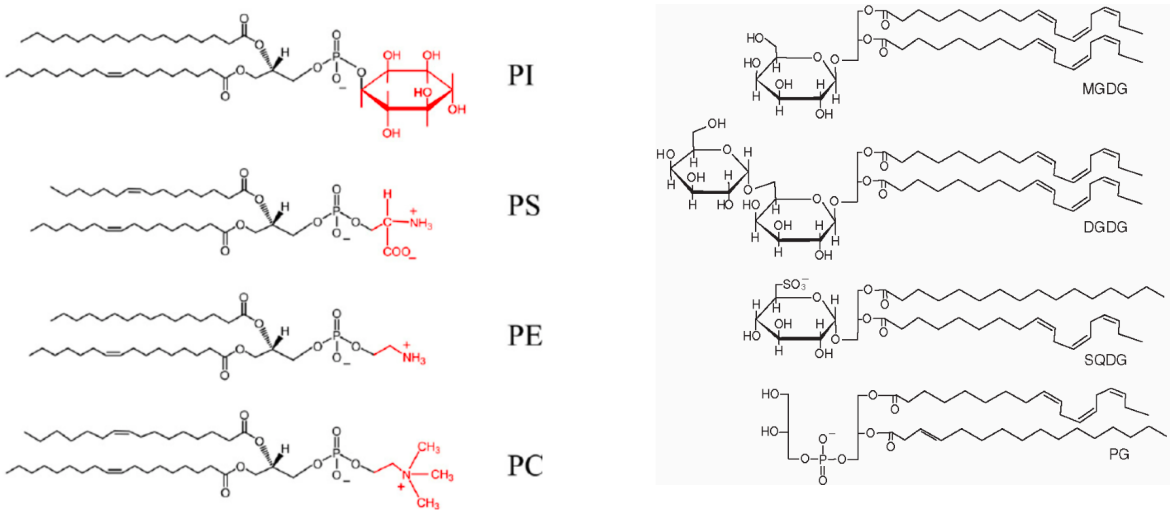
Ce côté amphiphatique des lipides les pousse à s'associer entre eux pour éviter le contact avec l'eau. Les parties hydrophiles (en blanc) restent en contact avec l'eau, alors que les parties hydrophobes (en jaune) restent associées. C'est ce phénomène qui conduit à la formation de liposomes, de micelles, ou de la bicouche lipidique des membranes cellulaires (figure 3).



(Figure 3) Schéma de formations lipidiques

Chez les diatomées, les lipides constitutifs des membranes sont essentiellement les phospholipides et les galactolipides (figure 4).

- Les phospholipides **PE (phosphatidyléthanolamine), PS (phosphatidylsérine), PI (phosphatidylinositol), PG (phosphatidylglycerol)** et **PC (phosphatidylcholine)** sont importants dans la structure des membranes cellulaires du fait de leur rôle de barrière à perméabilité sélective (Sharma et al., 2012).



(Figure 4) représentations moléculaires de lipides

- Les glycolipides (plus précisément les galactolipides) sont prédominants (90 % des lipides de ce compartiment) dans les membranes internes des chloroplastes, appelées membranes thylacoïdes. Ces membranes sont composées de monogalactosyldiacylglycerol (**MGDG**), de digalactosyldiacylglycerol (**DGDG**) et de sulfoquinovosyldiacylglycerol (**SQDG**), ainsi que de phosphatidylglycerol (**PG)**.
Ces lipides sont donc indispensables à la réalisation de la photosynthèse (Mizusawa and Wada, 2012).

Nomenclature des acides gras :

Nombre d'insaturations

C 18 : 1

Nombre de carbones

Par exemple le 18:1 correspond en général à l'acide oléique, et représente un acide gras mono-insaturé.

Nomenclature des lipides :

Tête polaire

PC (16:0_18:1)

Chaines acyles

Ci-dessus, il s'agit par exemple de la notation pour la phosphatidylcholine (PC) ayant pour chaînes acyles 2 acides gras du type palmitoyl (16:0) et oleyl (18:1).

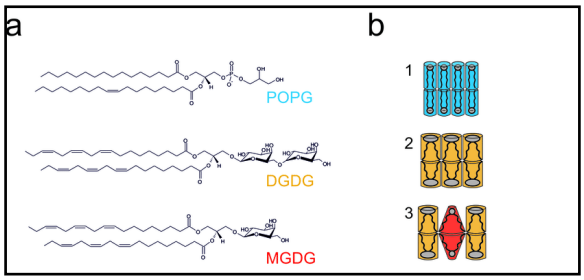
3) Effets anthropiques et conséquences sur le milieu :
Ces lipides vont être particulièrement impactés par des changements globaux, notamment par les modifications de température ou par la présence de nutriments comme le phosphate et le nitrate, issus d'engrais utilisés couramment dans l'agriculture.
Cette modification des lipides, par leur chaîne d'acides gras, mais aussi de leur tête polaire, va induire des perturbations du mécanisme et donc des fonctions de la cellule toute entière.

Cette problématique de modification cellulaire chez les diatomées est encore peu étudiée mais pourrait avoir des conséquences dramatiques sur l'écosystème et sur la chaîne alimentaire toute entière.
Il existe donc encore peu d'informations concernant les effets des contaminants sur la composition lipidique des diatomées d'eau douce, même si en 2020 toutes les recherches semblent s'accélérer à ce sujet, comme les travaux de recherche de Floriane Demailly. Ce que l'on sait aujourd'hui c'est que plusieurs facteurs vont jouer un rôle déterminant lors des modifications lipidiques : la température, le phosphore (P) et le nitrate (N) issus d'engrais, et également la présence de polluants organiques ou de métaux (issus de pesticides ou de rejets d'eaux domestiques).

- **La température** aura tendance à modifier les têtes polaires et leur composition.

En effet, une baisse de température tendra à la transformation de têtes polaires phospholipidiques, en glycolipides. En s'appuyant sur la figure 5, on voit nettement que cette modification lipidique engendre une modification de la structure membranaire.
Mais ce n'est pas tout, la chaîne des acides gras va elle aussi être modifiée.
Au contraire, plus la température sera élevée dans le milieu, plus la membrane cellulaire de l'algue va s'épaissir, devenir visqueuse dans le but de protéger la cellule en s'adaptant au milieu. Pour cela, la chaîne d'acide gras des lipides qui constituent cette membrane en bicouche, va augmenter son degré de saturation. Ce phénomène aura permis à la membrane de devenir plus compacte, donc avec une protection plus efficace face aux élévations de température qui auraient pu détériorer la cellule.

La (figure 5) illustre l'effet de la tête polaire et/ou des chaînes d'AG sur la compacité et donc sur la fluidité/viscosité membranaire.



1 : Phospholipides membrane très compacte. 2 et 3 : Glycolipides, membrane moins compacte

- **Quant aux micropolluants, aux métaux ou aux macro-polluants (phosphate/nitrate)**, ils modifieront principalement les chaînes d'acides gras, un constat de plus qui nous permet de dire que ces chaînes représentent un biomarqueur pertinent de toxicité.

Aujourd'hui, c'est dans ce domaine que je poursuis les recherches, dont le but est d'étudier les potentielles modifications des lipides chez la diatomée, variant selon les caractéristiques de son milieu de culture.

Pour étudier dans un premier temps l'influence des conditions nutritives sur la physiologie des micro-algues diatomées benthiques et leur réponses lipidiques, je vais principalement utiliser deux méthodes bien connues en chimie analytique : l'analyse HPLC (Chromatographie Liquide Haute Performance) couplée à l'analyse MS/MS (Spectrométrie de Masse en tandem).

4) Les Méthodes d'analyse

Principe de la Chromatographie Liquide Haute Performance – HPLC
La Chromatographie Liquide Haute Performance (HPLC), est une technique d'analyse qui permet de réaliser la séparation, l'identification et la quantification de nombreux composés.

Ce type de chromatographie repose sur l'utilisation de deux phases : une phase mobile appelée éluant (liquide), et une phase stationnaire composée de particules solides finement divisées, appelée colonne (voir annexe). Les composés à analyser sont mis en solution dans un solvant. Ce mélange est ensuite introduit dans la phase mobile par le biais d'un injecteur. L'éluant, poussé par un système de pompe haute pression, va parcourir le système chromatographique et ainsi traverser la phase stationnaire.
Le principe d'un tel système chromatographique se base sur la nature des molécules analysées (leur polarité), en fonction de leurs différences de distribution entre les deux phases citées précédemment. Les composés analysés vont donc se répartir suivant leurs affinités entre les deux phases et vont être retenus de manière sélective par la phase stationnaire.
Pour ce type de chromatographie, il existe plusieurs méthodes de rétention qui sont :

- l'adsorption par Phases normales
- le partage/absorption par Phases inverses
- l'absorption par Phases HILIC (chromatographie liquide d'interactions hydrophiles)

Dans le cadre de ce stage, le mécanisme de rétention utilisé est la chromatographie par **mode HILIC.** Cette méthode se base sur une phase Mobile polaire et une phase stationnaire elle aussi polaire, mais recouverte d'une couche aqueuse. On appelle « partitioning » le phénomène permettant aux molécules les plus polaires et solubles, de s'agripper à cette couche aqueuse polaire et ainsi de sortir plus ou moins tard lors de la séparation.
Un détecteur placé en sortie de colonne couplé avec un enregistreur, va permettre d'obtenir des signaux caractéristiques des molécules étudiées.

Principe de la spectrométrie de masse (MS/MS)
Dans le cadre de ce stage, le détecteur situé en sortie de colonne, est un spectromètre de masse à analyseur triple quadripôle.
La spectrométrie de masse est une technique permettant d'identifier des composés par l'étude de leurs fragments. Des particules chargées (ions, électrons, photons suivant le type de source utilisée) viennent frapper la molécule analysée dans le but de fragmenter cette dernière en plusieurs morceaux (de masse moléculaire variable). Par la suite, ces fragments sont soumis à des champs magnétiques et/ou électrostatiques qui vont permettre de déterminer un rapport masse sur charge : m/z, par l'étude des trajectoires suivies par ces derniers. L'identification des différents fragments obtenus et leur assemblage permet par la suite de caractériser la molécule de départ.

Couplage des deux techniques : LC-MS/MS
Dans le cadre de ce stage, les performances de l'HPLC et de la spectrométrie de masse sont combinées. Le système HPLC va permettre la séparation des molécules qui vont ainsi se présenter en sortie de colonne HPLC à des temps différents et seront donc détectées séparément par le spectromètre de masse.
Le soluté en sortie de colonne est transformé en ions à l'aide d'une source d'ions electrospray (ESI). Pour cela, le soluté traverse un fin capillaire pourvu d'un potentiel électrique, ce qui va charger la solution. Cette dernière va ensuite s'accumuler au bout du capillaire en formant un cône (dit le cône deTaylor). Par la suite, le cône va s'allonger jusqu'à détacher des gouttelettes par répulsion. Ces gouttes vont progressivement être réduites en ions désolvatés.
Les ions produits sont filtrés en fonction de leur rapport masse sur charge (m/z) dans le premier quadripôle Q1, pour qu'un ion choisi dit ion « père », traverse la cellule de collision Q2.
Un gaz de collision entraîne alors la fragmentation de l'ion « père » en plusieurs ions « fils ». Les masses de ces fragments sont ensuite triées par l'analyseur de masse quadripolaire Q3 et enfin détectées.
Afin de limiter d'éventuels effets de matrice, la technique de l'étalonnage interne est utilisée.

Technique de l'étalon interne) dans notre cas d'analyses lipidiques :
A l'aide de lipides dits étalons, aux transitions lipidiques connues (17:0) qui ressemblent à celles des lipides de nos échantillons de diatomée mais qu'on ne retrouvera pas dans ces mêmes échantillons, on élabore la solution étalon interne (EI). Ce mélange EI aura une concentration constante et servira de traceur, à normaliser les résultats, corriger les dérèglements de l'appareil et à compenser les éventuels effets de matrice.
On obtient alors automatiquement une droite d'étalonnage (voir en annexe) de l'adsorption A/A(EI) en fonction de la concentration C/C(EI), corrigée par le logiciel grâce à l'étalon interne, à partir de laquelle on en déduira les bonnes valeurs pour le dosage des solutions différemment diluées.

C) Démarches expérimentales

1) Elaboration de la méthode : Compléter la méthode avec les bonnes transitions**.** On commencera par compléter la méthode initialement développée au laboratoire, car la base de données fournie par le fournisseur n'est pas complète pour nos applications, nous avons besoin de toutes les transitions lipidiques possibles. *Méthode : paramètres que l'on indique à l'instrument HPLC, sur lesquels il va se baser pour la détection.*
Le nombre de transition étant trop élevé nous avons dû diviser la méthode en 2, une partie pour les Phospholipides PE, PI, PS, PC, PG et une partie pour les Glycolipides DGDG, MGDG et SQDG.
Mais faute de temps, nous nous focaliserons sur les Phospholipides.

Une fois cette nouvelle méthode rentrée, nous avons préparé des vials de solution EI (Étalons Internes 17:0) et d'Étalons mix car les anciens sont restés trop longtemps en conservation depuis le précédent stage et on ne veut pas biaiser nos résultats.

2) Elaboration des solutions lipidiques : Pour réaliser le mix d'étalons Internes à la transition 17:0 connue, il faut tout d'abord faire toutes les solution lipidiques internes en prélevant la bonne masse (si le lipide est sous forme de poudre), ou tout simplement en prélevant la bonne quantité liquide afin de réaliser une solution de concentration adaptée.
Le souci récurrent avec les lipides est en lien direct avec leur hydrophobie, on se trouve face a un problème de miscibilité : ils se solubilisent très difficilement à cause de leurs acides gras. Il faut donc choisir le solvant adapté pour assurer l'homogénéité de la solution, sinon cela va biaiser sa concentration.
La plupart de nos lipides se sont bien dissous dans le Méthanol (MeOH), mais le phosphatidyléthanolamine PE posa plus de problème en présentant des dépôts gras insolubles, à la fois dans le Méthanol mais un peu moins dans le MTBE (Méthyl Tert-Butyl Ether). Après de nombreux essais, on utilisera finalement l'isopropanol comme solvant, avec lequel PE sort parfaitement en analyse HPLC-MS/MS.
Autre point de vigilance avec les évaporations, pratiquées généralement pour changer de solvant afin de diminuer les « interférences » lors de l'analyse, qui peuvent aussi altérer les solutions. Nous avons décidé de les éviter dans la mesure du possible, en faisant l'hypothèse que les petites quantités de solvant ajoutées n'auraient pas de conséquences.

Vial d'EI	Volume en µL	Volume en µL
PG 17:0 100 ppm [MeOH]	10	20
PE 17:0 100 ppm [IsoPropanol]	200	400
PS 17:0 10 ppm [MeOH]	200	400
PC 17:0 100 ppm [MeOH]	10	20
PI 17:0 10 ppm [MeOH]	100	200
Volume intermédiaire	520	1040
Volume Isopropanol	480	960
Volume Final	1000	2000

(Figure 6) tableau récapitulatif du protocole de préparation de la solution d'étalons internes

Vial de Mix Etalons	Volume dans Solution idéale en µL	Volume dans Mix (sans PS et sans les glycolipides) en µL
PG 100 ppm [MeOH]	10	10
PE10ppm [Isopropanol]	100	100
PS 10 ppm [MeOH]	100	0
PC 100 ppm [MeOH]	10	10
PI 100 ppm [MeOH]	10	10
MGDG 100ppm [MeOH]	10	0
SQDG 100 ppm [MeOH]	10	0
DGDG 100 ppm [MeOH]	10	0
Volume en µL	260	130
Volume Solvant Isopropanol ajouté	740	870
Volume Total	1000	1000

(Figure 7) tableau récapitulatif du protocole de préparation de la solution d'étalons (normaux)

Remarque : 1ppm = $1 mg.L^{-1}$
1ppb = $1 \mu g. L^{-1}$

3) Infusion de vérification : Pour vérifier la qualité de nos mélanges et étalons internes, on va les analyser en HPLC-MS/MS.
Le but est de retrouver tous les Lipides injectés, avec un "signal" significatif, en d'autres termes qu'ils répondent bien.
On obtient des pics de masse moléculaire caractéristiques.
PC et PG sortent, mais on ne retrouve pas les autres donc on procède à des infusions pour vérifier les transitions déterminées auparavant et les paramètres d'acquisition:
On infuse les Etalons internes purs de PS, PI et PE (avec à moitié d'eau) pour vérifier qu'ils sortent bien, sans évaporation comme auparavant.

Ils sortent sauf PE, nous changeons donc de solvant en supposant que l'acétone pose problème.
On refait donc la solution de PE dans le MTBE, puis avec de l'isopropanol, en utilisant une solution intermédiaire dans de l'éthanol.
On injecte 50 microL, une plus grande quantité qu'auparavant (20 µL), pour être sûr de tout détecter.
De plus, après réflexion on se rend compte qu'il est nécessaire d'élargir le temps d'analyse pour observer PE sortir en HPLC-MS/MS.
On voit PE, ainsi que tous les autres lipides.

4) Elaboration de la gamme :
La gamme va permettre de quantifier nos échantillons, c'est-à-dire de mesurer ce qui est présent dedans.

Concentration en ppb	0	5	10	20	50	100	200	500	1000
solution étalons mix en microlitre (µL)	0	2,5	5	10	25	50	100	250	500
solution étalons internes (µL)	50	50	50	50	50	50	50	50	50 (évaporation)
Solvant isopropanol (µL)	450	447,5	445	440	425	400	350	200	0
volume total (en µL)	500	500	500	500	500	500	500	500	500

(Figure 8) tableau récapitulatif du protocole de préparation de la gamme

5) Échantillonnage et analyses : à partir d'expérimentations issues des cultures de diatomées en conditions DAUTA et DAPNA.

Les échantillons proviennent d'une culture de diatomées dans deux milieux, nommés DAN et DAPNA, aux caractéristiques différentes :

- **DAN** = Milieu **Da**uta (en référence à son scientifique Pr Dauta pour ses recherches de 1982) **N**ormal. C'est un milieu de culture extrêmement favorable au développement puisque très riche en nutriments, dont le phosphore P, et cela bien plus que dans un milieu naturel.

- **DAPNA** = milieu **Da**uta MAIS **a**ppauvrit en **P**hosphore (non acclimaté).

Préparation des échantillons, pour chaque, introduire dans un vial :	Volumes (en µL)
Extrait culture diatomée spécifique [MTBE]	200
Eau ultra pure (EUP)	10
Solution d'étalons Internes (EI) [isopropanol]	20
Solvant Isopropanol	180

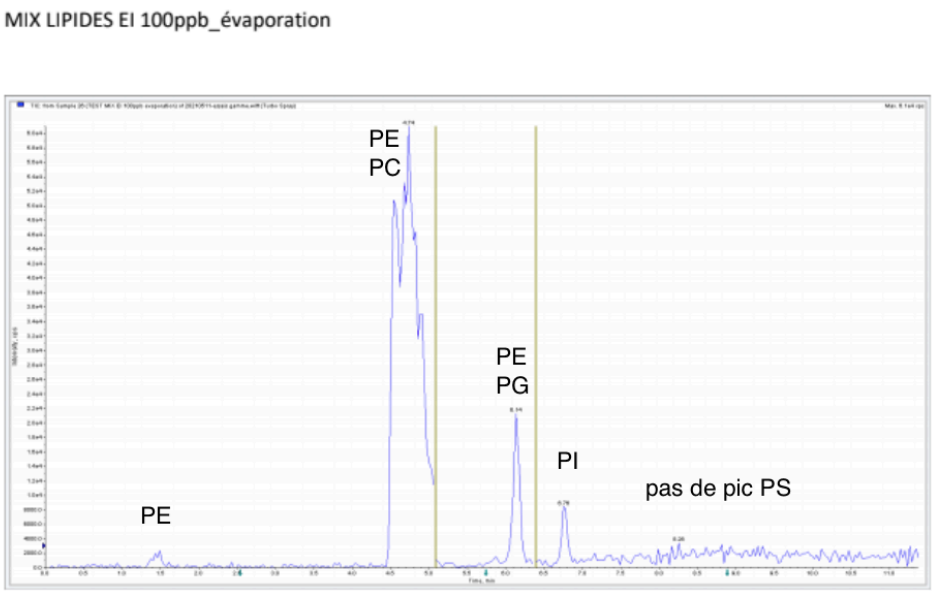
(Figure 9) tableau récapitulatif du protocole de préparation des échantillons

<u>Au total, c'est une cinquantaine d'échantillons qui vont être préparés puis analysés par HPLC-MS/MS</u>

Compte tenu du contexte sanitaire exceptionnel (cas de Covid-19 au sein de l'équipe, réapprovisionnement en espèces lipidiques ralenti, télétravail…) et des soucis techniques imprévus lors des injections, le temps nous a manqué pour finaliser la partie analyse des échantillons. Je me contenterais donc de présenter les premiers chromatogrammes lipidiques après analyse HPLC-MS/MS, ainsi que les premières mesures pour quelques échantillons que nous avons eu le temps d'injecter.

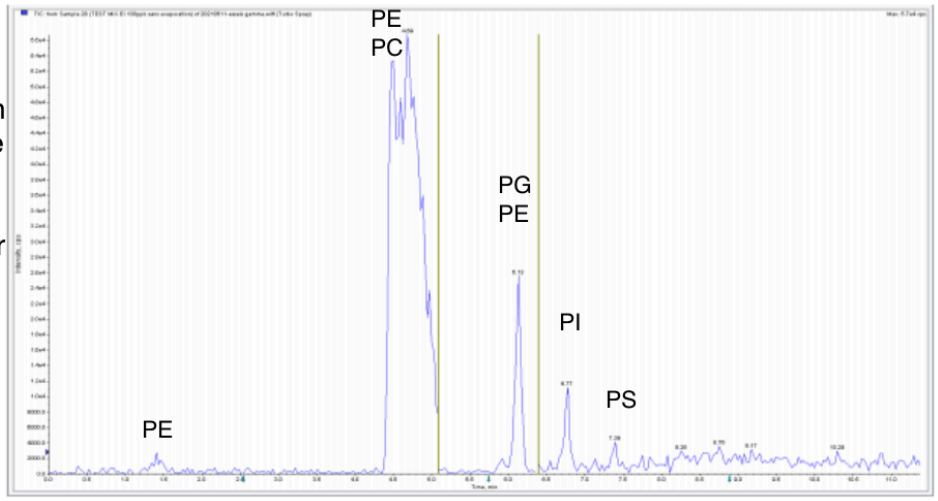
D) Résultats :

Les pics sont moins intenses si on fait une évaporation.



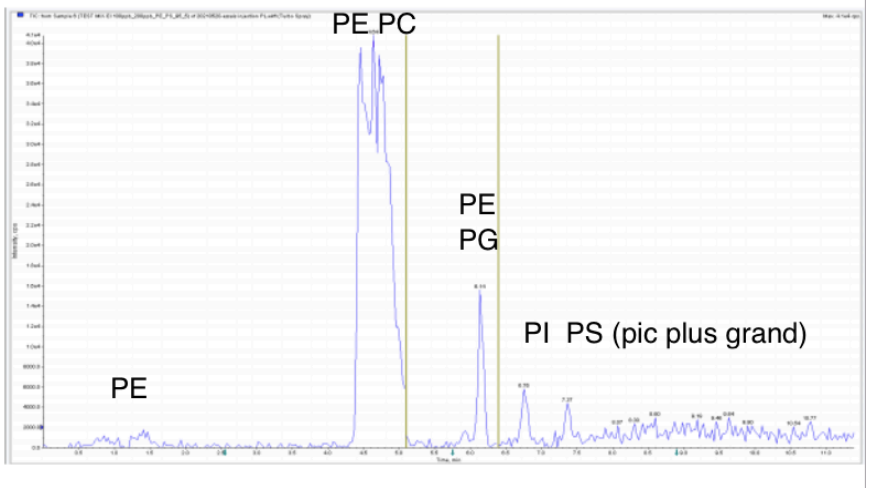
MIX LIPIDES EI 100ppb_sans évaporation

Sans évaporation on constate des pics de meilleure intensité, ce qui nous permet de mieux les voir sur le chromatogramme

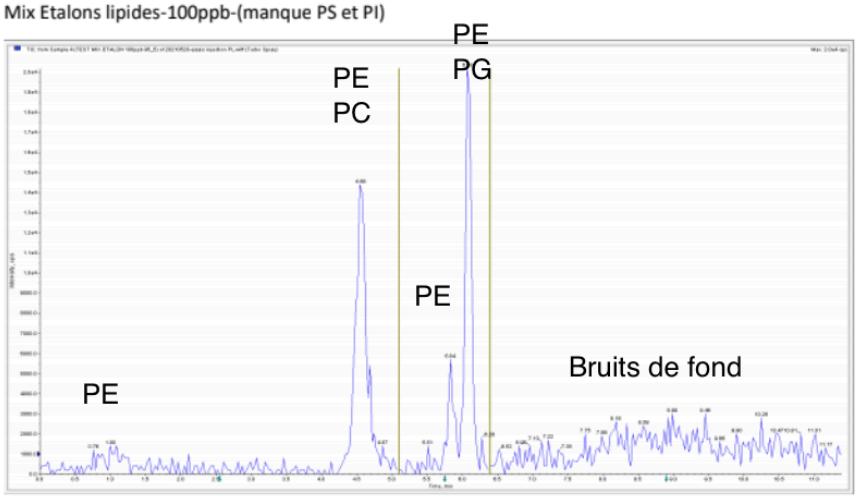


Mix EI-100ppb-PS et PE à 200ppb

on met de plus grandes quantité de PI et PS pour améliorer les intensités de leurs pics



Mix Etalons lipides-100ppb-(manque PS et PI)



<u>Remarques:</u>

- Il n'y a ni PI ni PS ici car il n'y en avait plus en stock au laboratoire.

- Plus le temps d'acquisition est long, plus l'analyse et les pics sont précis et plus on aura de bruit de fond.

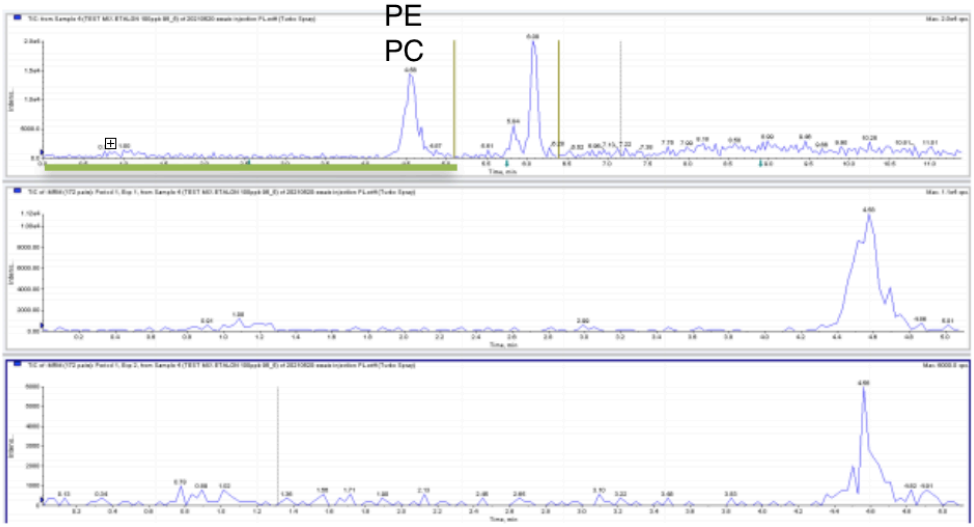
Mix Etalons lipides-100ppb-(manque PS et PI) : Zoom 1ere periode

Sur la première période on voit :

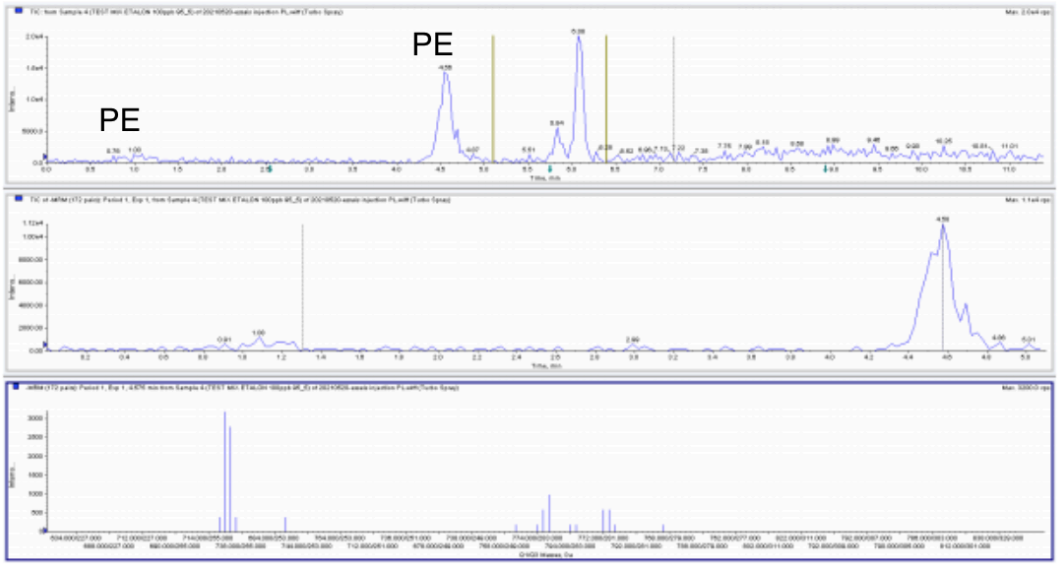
PE

et

PC



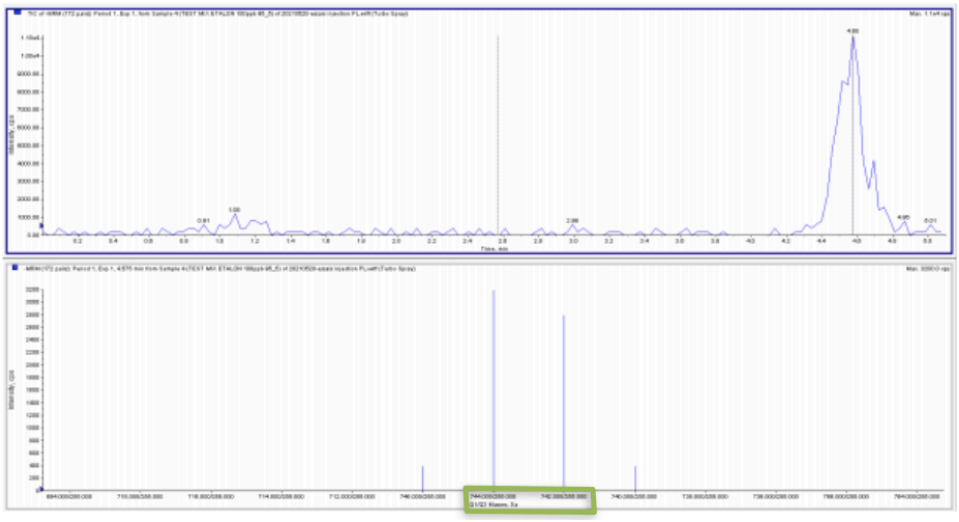
Mix Etalons lipides-100ppb-(manque PS et PI) : Zoom 1ere periode : spectre de masse PE



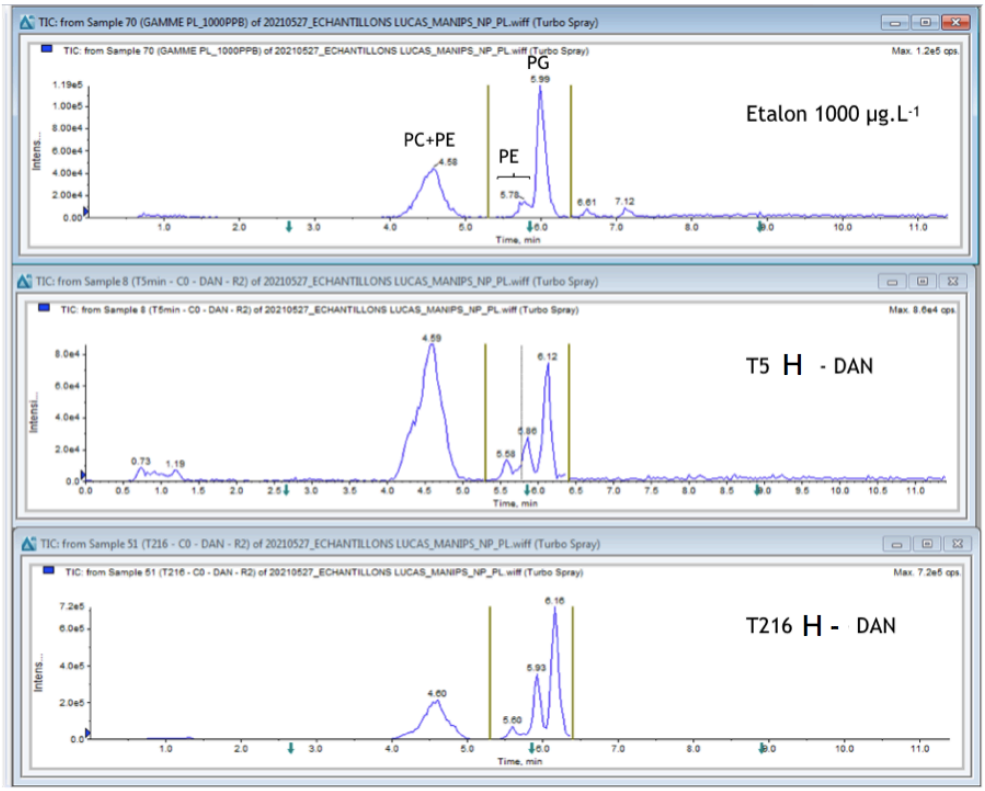
Mix Etalons lipides-100ppb-(manque PS et PI) : Zoom 1ere periode : zoom spectre de masse PE

Transition 742/255 : PE 16:0_20:2

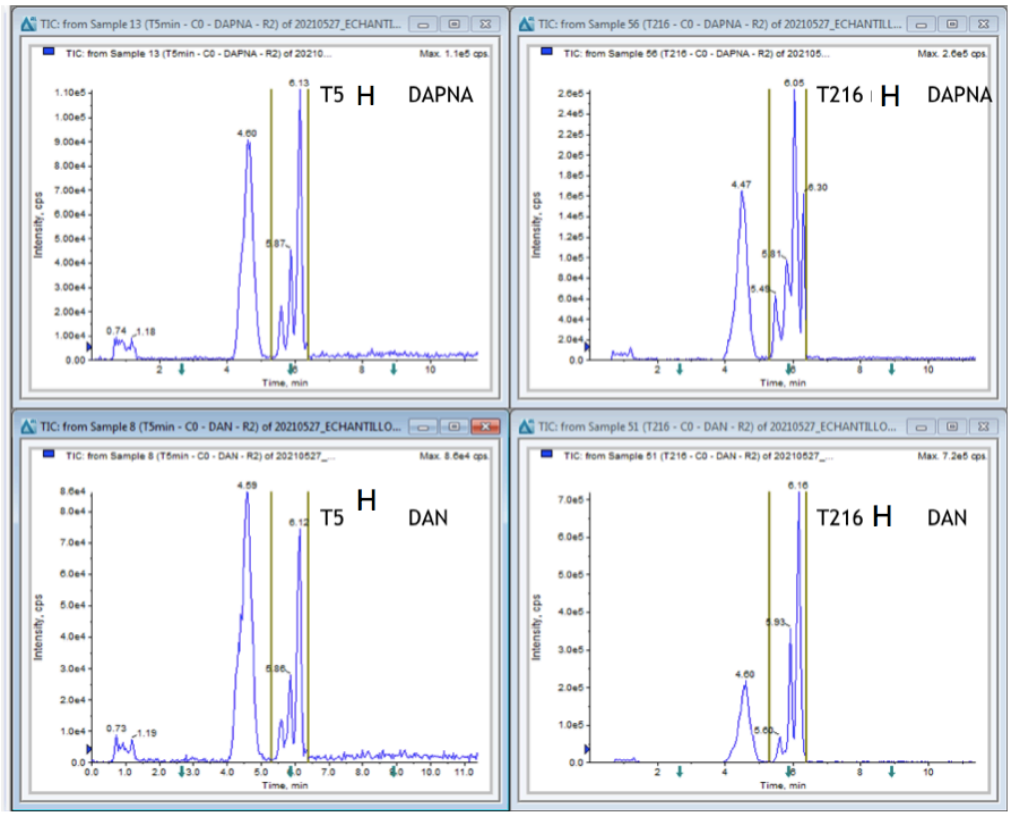
744/255 : PE 16:0_20:1



En zoomant sur PE on obtient ainsi les transitions



Chromatogrammes d'analyses d'échantillons qui confirment bien les temps de rétention caractéristiques



Chromatogrammes des phospholipides à t=5 Heures puis à t=216 Heures

(H)

E) Discussion et analyses des résultats :

Sur ces quatre derniers chromatogrammes issus des premiers échantillons passés en analyse HPLC-MS/MS, on peut étudier deux facteurs : l'effet du temps et l'effet du phosphore.
En effet si on compare deux échantillons de milieux similaires, au temps initial t=5H et au temps final t=216H, on constate que la quantité de phospholipides augmentent avec le temps. En effet, après 216H, ils ont eu le temps de se développer en culture, leur croissance peut être qualifiée d'exponentielle.
On remarquera surtout l'enrichissement en PE, des PC mais surtout en PG qui semblent particulièrement augmenter si l'on observe les intensités de leur pics : on passe d'une intensité d'environ 7.10^4 à 7.10^5 (soit un facteur 10) en milieu DAN. Nous pouvons émettre l'hypothèse que si les PG augmentent encore plus que les autres phospholipides, c'est parce que, rappelons le, ils composent les thylacoïdes, autrement dit les membranes des chloroplastes où a lieu la photosynthèse, un compartiment qui est donc riche en énergie et idéal pour le développement lipidique.
Quant aux effets du Phosphore, on peut comparer les milieux DAN (riche en phosphore) et DAPNA (appauvrit en phosphore). On constate ainsi qu'avec moins de phosphore, nutriment nécéssaire à la croissance, cette dernière est donc plus lente. Le plus affecté est une nouvelle fois PG : un appauvrissement en phosphore pourrait peut-être avoir des conséquences sur les membranes thylacoïdes, donc sur la photosynthèse elle même.

F) Conclusion de l'étude et Ouverture :

Bien que nous pouvons en déduire que le phosphore possède divers rôles, structurel chez les têtes phospholipidiques, fonctionnel car il affecte la physiologie des membranes et de croissance car c'est une grande source d'énergie, cette étude n'est pas achevée. Afin de vérifier nos hypothèses il nous faudrait d'avantage de temps pour poursuivre nos recherches, notamment en réalisant une quantification en parallèle des phospholipides et des glycolipides, ce qui permettrait de doser chaque espèce lipidique et ainsi d'étudier plus en profondeur l'accroissement de PG et les conséquences des différents changements globaux sur le développement lipidique.
La continuité de nos recherches nous permettraient alors de mieux comprendre les changements physiologiques des membranes des diatomées en fonction des changements au sein du milieu, pouvant être dus à des pollutions anthropiques (engrais riches en nutriments) ou même au réchauffement climatique (élévation des températures), qui sont de lourdes problématiques d'actualité.
En plus de m'avoir formé aux manipulations et de m'avoir permis d'appliquer mes cours théoriques au sein d'un laboratoire, ce stage de fin de licence m'a permis de comprendre le réel sens et les réels enjeux du métier de Chercheur : mieux comprendre pour mieux avancer.

G) Bibliographie

(figure 1) diatomée vue au microscope ; Les diatomées, algues unicellulaires, nanostructures électro-optiques de demain ?http://mavoiescientifique.onisep.fr/les-diatomees-algues-unicellulaires-nanostructures-electro-optiques-de-demain
(figure 2) Schéma d'un lipide, de sa tête polaire hydrophile et de sa queue d'AG hydrophobe
(figure 3) Schéma de formations lipidiques ; Futura. « Lipide ». Futura, https://www.futura-sciences.com/sante/definitions/medecine-lipide-184
(figure 4) représentations moléculaires de lipides
(figure 5) effet de la tête polaire et/ou des chaînes d'AG sur la compacité et donc sur la fluidité/ viscosité membranaire. « ResearchGate | Find and Share Research ». ResearchGate, https://www.researchgate.net
(figure 6) tableau récapitulatif du protocole de préparation de la solution d'étalons internes
(figure 7) tableau récapitulatif du protocole de préparation de la solution d'étalons (normaux)
(figure 8) tableau récapitulatif du protocole de préparation de la gamme
(figure 9) tableau récapitulatif du protocole de préparation des échantillons

Annexe :
(figure 10) Réalisation de la méthode par tableau Excel
(figure 11) Droite d'étalonnage
(figure 12) Photographie de la manipulation de mise en solution
(figure 13) Photographie de la manipulation d'échantillonnage
(figure 14) Composition du milieu Dauta normal
(figure 15) Photographie de l'instrument analytique HPLC au laboratoire
(figure 16) Photographie d'une colonne pour HPLC
(figure 17) Photographie de l'instrument de spectrographie de masse au laboratoire
(figure 18) Photographie des instruments LC MS/MS couplés

Supports supplémentaires :
(1)SITE UR EABX - EABX. https://www6.bordeaux-aquitaine.inrae.fr/eabx/EABX
(2) Les fondamentaux de la chimie analytique par F.J Holler et S.R Crouch,Skoog et al. 2013
(3))https://www.afblum.be/bioafb/acidgras/acidgras.htm
(4) These Floriane Demailly
(5) Mizusawa and Wada, 2012
(6) Sharma et al, 2012
(7) Dauta A (1982) Conditions for phytoplankton development, a compara tive study of the behaviour of eight species in culture. II Role of nutriments: assimilation and intracellular storage.Annls Limnol 18: 217 268
(8)https://fr.wikipedia.org/wiki/Sécurité_en_laboratoire

H) Hygiène et sécurité au sein du laboratoire

A mon arrivée, j'ai suivi un point Hygiène et Sécurité avec l'agent de prévention du site. On m'a également remis le guide d'utilisation du laboratoire, où les principaux points suivant sont cités :

- Se laver soigneusement les mains en entrant/sortant du laboratoire, avant de prendre un repas, ou avant d'aller aux toilettes.
- Repérer les emplacements des matériels de sécurité : douche fixe de premiers secours, extincteur, rince-œil, défibrillateur cardiaque(...).
- Porter une blouse en coton et non en polyester (le polyester fond et adhère à la peau).
- Se protéger pendant les manipulations (porter lunettes de protection, masque, gants). La protection contre les produits chimiques comme les solvants (de type méthanol, MTBE, isopropanol) se fait par des gants en nitrile, et la protection contre les températures extrêmement basses (congélateur à -80°C pour préserver les échantillons de diatomées) par gants de protection thermique.
- Travailler sous hotte aspirante car nous manipulons des solvants volatiles toxiques et potentiellement cancérigènes, comme l'ammoniac NH3 dont l'odeur est très prononcée.
- Ne rien laisser traîner au sol ou sur les paillasses, vérifier la fermeture des flacons avant son départ.
- Ne pas stocker des contenants dangereux près d'un bord de paillasse, ou sur un bord d'étagère.
- Éviter les accumulations de grandes quantités (solvants, emballages, déchets) au laboratoire et les stocker dans un local spécifique adapté.
- Ranger le matériel dès qu'il n'est plus nécessaire afin de ne pas être gêné lors des prochaines manipulations, apprendre également à gérer l'espace de travail et le temps dont on dispose pour ne pas gêner les autres membres de l'équipe.
- Tous les flacons et emballages doivent sans exception avoir une étiquette sur laquelle on retrouve le nom, la formule, les pictogrammes et les codes de sécurité définis par le Système général harmonisé (SGH), la date de péremption.
- Si on ouvre un nouveau flacon il est nécéssaire de bien noter la date d'ouverture.
- Lire les instructions d'un matériel ou d'un flacon du commerce (lipides et solvants dans notre cas) avant toute manipulation.
- Vérifier le matériel en verre avant utilisation (éliminer tout verre fêlé, sale...).
- Bien laver la verrerie utilisée à l'eau ultra pure, à l'éthanol et aux ultrasons si nécessaire, pour éviter toutes contaminations.
- Mettre les matières dangereuses, les acides, les bases, les liquides inflammables, les solvants ou les produits périmés, dans des endroits protégés tels les armoires de sécurité dédiées et clairement identifiées.
- Installer une poubelle pour la verrerie et une pour les plastiques contaminés, afin qu'ils puissent être triés et traités. Une poubelle de déchets liquides toxiques est également mise en place pour traitements, rien n'est jeté dans les éviers.
- Attacher ses cheveux pour qu'ils ne touchent pas de produits chimiques.
- Veiller au bon respect des gestes barrières et du port du masque dans le cas de cette situation sanitaire atypique liée à l'épidémie de Covid-19.

I) Annexes

A) L'INRAE, l'EABX, c'est qui ? C'est quoi ?

INRAE : Institut national de recherche pour l'agriculture, l'alimentation et l'environnement.

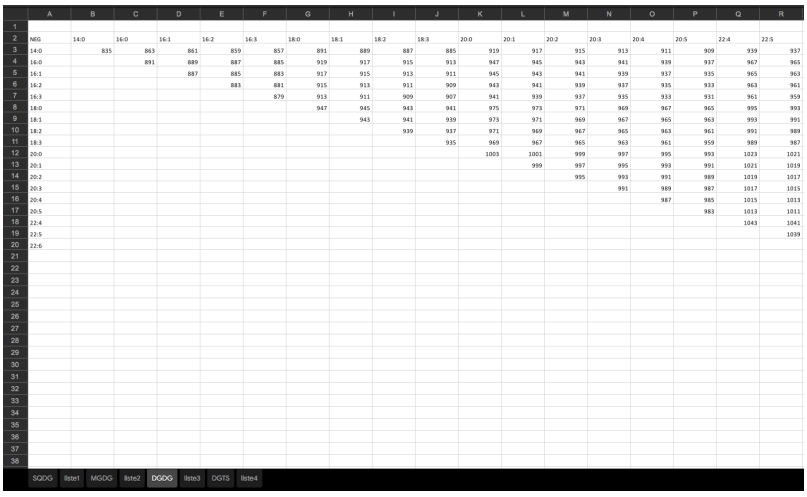
Sur le plan international, l'INRAE est le premier organisme mondial de recherche spécialisé dans les domaines de l'agriculture, de l'alimentation et de l'environnement. En France, l'INRAE devient le premier acteur de la recherche sur l'eau, grâce à sa fusion entre les laboratoires de l'INRA et de l'IRSTEA en Janvier 2020.

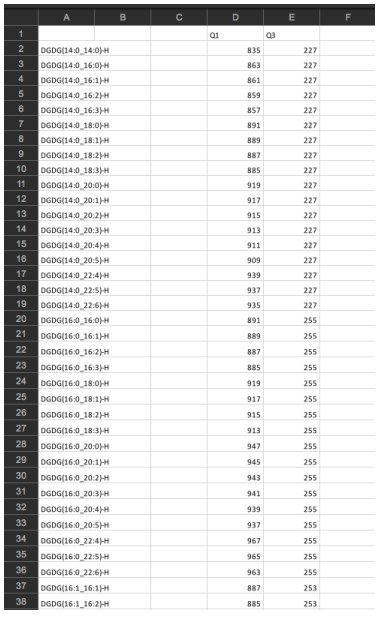
Au sein de l'unité de Recherche EABX (Ecologie Aquatique =, Bx pour Bordeaux), les recherches de l'équipe **ECOVEA** (**É**cologie des **CO**mmunautés **VÉ**gétales **A**quatiques) sont centrées sur la connaissance de la biodiversité et du fonctionnement des communautés végétales des cours d'eau, ainsi que leurs réponses aux perturbations naturelles et anthropiques (d'origine Humaine). Ces recherches visent à produire des outils pour le diagnostic de l'état chimique et écologique des plans d'eau et des cours d'eau.

Cette équipe se compose notamment de Monsieur Mazzella Nicolas (Responsable du laboratoire Biomarqueurs/Chimie de l'environnement), ainsi que de Madame Moreira Aurélie (chimie analytique micropolluants/Lipidomique), qui m'ont encadré durant ces 2 mois.

B) Quelques étapes supplémentaires réalisées durant le stage :

- **Réalisation de la méthode par tableau Excel :** rentrer toutes les données dans le logiciel d'analyse de transitions par HPLC MS/MS



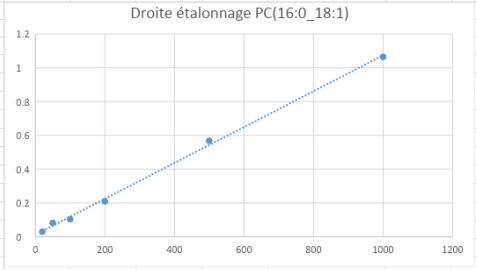


	Q1	Q3
DGDG(14:0_14:0)-H	835	227
DGDG(14:0_16:0)-H	863	227
DGDG(14:0_16:1)-H	861	227
DGDG(14:0_16:2)-H	859	227
DGDG(14:0_16:3)-H	857	227
DGDG(14:0_18:0)-H	891	227
DGDG(14:0_18:1)-H	889	227
DGDG(14:0_18:2)-H	887	227
DGDG(14:0_18:3)-H	885	227
DGDG(14:0_20:0)-H	919	227
DGDG(14:0_20:1)-H	917	227
DGDG(14:0_20:2)-H	915	227
DGDG(14:0_20:3)-H	913	227
DGDG(14:0_20:4)-H	911	227
DGDG(14:0_20:5)-H	909	227
DGDG(14:0_22:4)-H	939	227
DGDG(14:0_22:5)-H	937	227
DGDG(14:0_22:6)-H	935	227
DGDG(16:0_16:0)-H	891	255
DGDG(16:0_16:1)-H	889	255
DGDG(16:0_16:2)-H	887	255
DGDG(16:0_16:3)-H	885	255
DGDG(16:0_18:0)-H	919	255
DGDG(16:0_18:1)-H	917	255
DGDG(16:0_18:2)-H	915	255
DGDG(16:0_18:3)-H	913	255
DGDG(16:0_20:0)-H	947	255
DGDG(16:0_20:1)-H	945	255
DGDG(16:0_20:2)-H	943	255
DGDG(16:0_20:3)-H	941	255
DGDG(16:0_20:4)-H	939	255
DGDG(16:0_20:5)-H	937	255
DGDG(16:0_22:4)-H	967	255
DGDG(16:0_22:5)-H	965	255
DGDG(16:0_22:6)-H	963	255
DGDG(16:1_16:1)-H	887	253
DGDG(16:1_16:2)-H	885	253

(Figure 10) Réalisation de la méthode par tableau Excel

- **Exploitation de la droite d'étalonnage et explications :**

	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	K	L
1												
2	Sample Name	Sample Type	Analyte Peak N	Analyte Peak Ar	Analyte Concer	Analyte Retent	Analyte Expecte	IS Peak Area (counts)		A/Ais	[C]recalculées	
3	GAMME PL_0PPB	Unknown	PC(16:0_18:1)+	0,00E+00	N/A	0	4,68	0,00E+00		#DIV/0!		
4	GAMME PL_10PPB	Unknown	PC(16:0_18:1)+	0,00E+00	N/A	0	4,68	3,30E+04		0		
5	GAMME PL_20PPB	Standard	PC(16:0_18:1)+	1,46E+03	20	4,53	4,68	4,89E+04		0,0298568507	80%	
6	GAMME PL_50PPB	Standard	PC(16:0_18:1)+	3,78E+03	50	4,59	4,68	4,58E+04		0,0825327510	128%	
7	GAMME PL_100PPB	Standard	PC(16:0_18:1)+	4,16E+03	100	4,59	4,68	4,02E+04		0,1034825871	83%	
8	GAMME PL_200PPB	Standard	PC(16:0_18:1)+	8,65E+03	200	4,62	4,68	4,13E+04		0,2094430993	90%	
9	GAMME PL_500PPB	Standard	PC(16:0_18:1)+	2,34E+04	500	4,56	4,68	4,12E+04		0,567961165	101%	
10	GAMME PL_1000PPB	Standard	PC(16:0_18:1)+	4,26E+04	1000	4,59	4,68	4,00E+04		1,065	96%	
11												
12	Etalons passés en début de séquence											
13	GAMME PL_100PPB	Unknown	PC(16:0_18:1)+	4,64E+03	N/A	3,57	3,56	5,56E+04		0,0834532374	64,77567037	
14	GAMME PL_500PPB	Unknown	PC(16:0_18:1)+	2,90E+04	N/A	3,73	4,68	7,65E+04		0,3790849673	333,5317885	
15	GAMME PL_1000PPB	Unknown	PC(16:0_18:1)+	4,70E+04	N/A	4,19	4,68	1,08E+05		0,4351851852	384,5319865	
16												
17												
18												
19												
20											a	0,0011
21											b	0,0122
22												
23												
24												
25												
26												
27												
28												
29												
30												
31												
32												

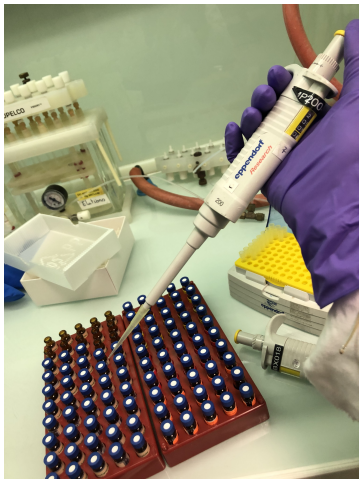


(Figure 11) Droite d'étalonnage

Explications : grâce à l'ordonnée à l'origine (b) et au coefficient directeur / pente de la droite (a), on peut en déduire automatiquement la concentration corrigée X = (Y-b)/a.

- Mises en solution, échantillonnage, techniques d'analyse

(Figure 12) photographie de la manipulation de mise en solution



(Figure 13) photographie de la manipulation d'échantillonnage

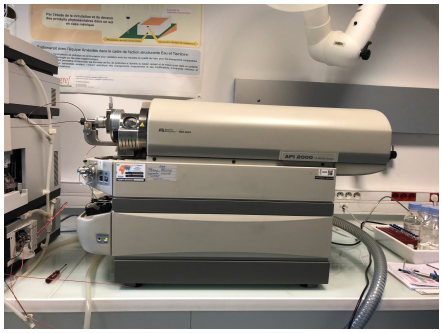
TABLEAU I. — Composition du milieu de culture.

	Composés chimiques	Concentrations mg/litre
Milieu de base	MgSO4, 7H20	25
	FeSO4, 7H20	1
	CaCl2, 2H20	25
	Na2 EDTA	1
	NaHCO3	50
	Na2CO3	5
Oligo-éléments	ZnSO4, 7H20	0,020
	CuCl2, 2H20	0,020
	MnCl2, 4H20	0,400
	CoCl2, 6H20	0,010
	Bo3H3	0,001
	Na2MoO4	0,035
Nutriments	KNO3	200
	K2HPO4	25
	SiO2 Na205, H20	212

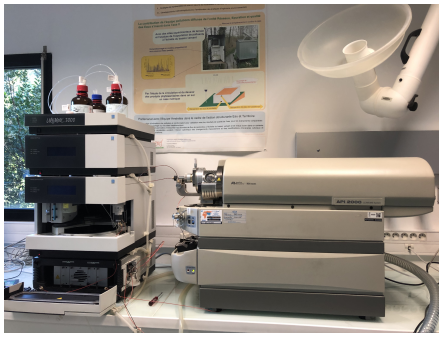
(Figure 14) Composition du milieuDAuta Normal

(Figure 15) photographie de l'instrument analytique HPLC

(Figure 16) colonne HPLC



(Figure 17) photographie de l'instrument de spectrographie de masse au laboratoire



(Figure 18) photographie des instruments LC MS/MS couplés

C) English abstract

ABSTRACT

Pollutants found in fish we eat can compromise the body's defense.

According to a study by two researchers from the University of San Diego, sixteen organic pollutants, currently used, are capable of affecting the proper functioning of P-GP protein.
The P-GP is a protein in the cell membrane that recognizes harmful and foreign elements, and activates a defense mechanism to remove them.
Ten of the pollutants of this study were found in human organisms, which means that these components are present in the food chain.
Indeed, nine of these pollutants are found in tuna, the most widely eaten fish in the world.
Examples include DDT, a pesticide banned in 2001, and flame retardants.
Their presence in the ocean is due to runoff with rainwater or wastewater discharges into rivers.
The most vulnerable people are newborn babies, because they have few P-GP in their young cells and they can drink contaminated breast milk.
Moreover, we don't know all the effects on humans, for example in case of contact with other medications which could cause an unexpected chemical reaction.
To conclude, chemical products created to make life easier, can have an unfamiliar behaviour and in the end deteriorate health.

Article : https://advances.sciencemag.org/content/2/4/e1600001 (found with https://www.newscientist.com/article/2084882)