



**HAL**  
open science

# Evaluation de la réponse cellulaire et moléculaire d'une diatomée benthique d'eau douce à l'exposition à des nanoparticules carbonées

Marion Garacci

► **To cite this version:**

Marion Garacci. Evaluation de la réponse cellulaire et moléculaire d'une diatomée benthique d'eau douce à l'exposition à des nanoparticules carbonées. Biologie végétale. Université Paul Sabatier - Toulouse III, 2018. Français. NNT : 2018TOU30250 . tel-02328953

**HAL Id: tel-02328953**

**<https://theses.hal.science/tel-02328953>**

Submitted on 23 Oct 2019

**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.



# THÈSE

## En vue de l'obtention du DOCTORAT DE L'UNIVERSITÉ DE TOULOUSE

Délivré par l'Université Toulouse 3 - Paul Sabatier

---

Présentée et soutenue par

**Marion GARACCI**

Le 16 novembre 2018

### Évaluation de la réponse cellulaire et moléculaire d'une diatomée benthique d'eau douce à l'exposition à des nanoparticules carbonées

---

Ecole doctorale : **SDU2E - Sciences de l'Univers, de l'Environnement et de  
l'Espace**

Spécialité : **Ecologie fonctionnelle**

Unité de recherche :  
**ECOLAB - Laboratoire d'Ecologie Fonctionnelle et Environnement**

Thèse dirigée par  
**Eric PINELLI et Maïalen BARRET**

Jury

Mme Marisol Goñi Urriza, Rapporteur  
M. Benoit Schoefs, Rapporteur  
Mme Catherine Santaella, Rapporteur  
M. Emmanuel Flahaut, Examineur  
M. Patrice Gonzalez, Examineur  
Mme Elisabeth Girbal-Neuhauser, Examineur  
M. Eric PINELLI, Directeur de thèse  
Mme Maïalen Barret, Co-directeur de thèse



*A mes parents,  
Mes modèles et sources d'inspiration*

*En hommage à mes grands-pères*



## *Remerciements*

C'est avec émotion, et un mal de crâne sans nom, que j'écris les dernières lignes de ce manuscrit de thèse. Je tiens à remercier les nombreuses personnes qui se sont impliquées de près ou de loin dans cette aventure.

Tout d'abord je tiens à adresser un grand merci à mes directeurs de thèse Eric Pinelli et Maialen Barret. Eric, c'est d'abord en stage que vous m'avez permis de faire mes premiers pas en laboratoire mais surtout de faire la connaissance des diatomées, ces curieuses petites bêtes qui ont piqué ma curiosité et habité mes pensées, et parfois mêmes mes nuits. Votre enthousiasme et la passion que vous portez pour ce travail de recherche m'ont encouragé à continuer dans cette voie. C'est grâce à vos encouragements mais aussi aux petits coups de pression que vous lanciez, sans vraiment le vouloir, que j'ai pu surmonter les situations compliquées (que tout thésard qui se respecte rencontre tôt ou tard, j'imagine) qui me paraissaient pourtant être des impasses. S'il y a bien une chose que je vais retenir, grâce à vos conseils, que je n'ai pas suivis, est qu'il n'est jamais bon de se lancer dans des manip un peu trop ambitieuses. Maia, l'accompagnement à la fois humain et scientifique que tu m'as apporté m'ont permis de gagner en autonomie mais également de prendre un plus confiance en moi. C'est ta sérénité et ta rigueur, qui m'ont aidé à apprivoiser les terrains tortueux de la biologie moléculaire. Je me suis beaucoup appuyé sur tes conseils et tes idées pour pouvoir me dépêtrer de plus d'une situation.

Merci à vous pour nos nombreuses discussions de couloir qui ont toutes été enrichissantes et motivantes. La complémentarité de vos compétences et de vos qualités m'ont permis d'avancer et d'apprendre un peu plus chaque jour, même les jours un peu plus difficiles. J'ai réellement eu de la chance de pouvoir faire mes premiers dans le monde de la recherche à vos côtés et je tenais à vous remercier d'avoir été disponibles toutes les fois où j'en ai eu besoin.

Je souhaite également remercier les membres du jury : Marisol Goñi Urriza et Benoît Schoefs, pour avoir accepté d'être rapporteur de mes travaux de thèse ; Elizabeth Girbal-Neuhauser, présidente de ce jury, et Catherine Santaella pour avoir évalué ces travaux de thèse. Je remercie également Patrice Gonzalez et Emmanuel Flahaut pour avoir examiné cette thèse et apporté des remarques constructives dans leur domaine de compétence respectifs. Je tiens également à remercier Laury Gauthier pour sa participation au jury de thèse.

Les séjours que j'ai pu faire chez nos collaborateurs auscitains et arcachonnais m'ont apporté énormément pour mener à bien ces travaux. Je tien ainsi à remercier les membres de l'équipe du LBAE, et tout particulièrement Elizabeth Girbal-Neuhauser, qui a su m'aiguiller pour mieux comprendre les particularités des biofilms, et Claire-Emmanuel Marcato-Romain qui m'a gentiment guidé et prêté mains fortes pour les manips de « bonne heure et de bonne humeur » accompagnées du lever de soleil sur Auch (magnifique d'ailleurs !). Mes remerciements vont également aux personnels du laboratoire EPOC, mais surtout à Patrice Gonzalez pour sa bienveillance et pour ses conseils inestimables qui, plus d'une fois, m'ont sorti de biens des galères. Merci à Anthony Bertucci qui a eu la gentillesse de me consacrer une partie de son temps et sans qui je serais certainement encore en train de traiter mes données transcriptomiques. Je remercie également nos voisins toulousains du GBF, Mohamed Zouine et Clément Folgoas pour leur patience et leurs compétences en bio-informatiques sur lesquels j'ai pu m'appuyer pour traiter les données RNA-seq. Merci aux membre de l'équipe NNC du CIRIMAT, Cyril Sarrieu, Pierre Lonchambon et George Chimowa pour avoir fourni toutes les nanoparticules de carbone utilisées dans ces travaux de thèse, et Emmanuel Flahaut pour sa réactivité impressionnante et sa motivation à toute épreuve.

Je voudrais remercier chaleureusement les autres membres de l'équipe ECI qui ont pris du temps pour discuter des « soucis techniques » que j'ai pu rencontrer et proposer des solutions. Merci à Annie Perrault, Jérôme Silvestre et Jean-Yves Charcosset qui ont dû supporter les nombreuses fois où j'ai débarqué dans leur bureau pour avoir leur avis sur les méthodologies que j'utilisais. Merci à Laury Gauthier et Florence Mouchet pour leur soutien lors des congrès et leur aide pour la soumission de mon premier article.

D'autres personnes extérieures au laboratoire m'ont également aidé à plusieurs reprises au cours de ces travaux de thèse. Merci à Philippe Anson pour m'avoir dépanné à de nombreuses reprises et à Nathalie Marty-Guasset pour m'avoir gentiment prêté son matériel mais aussi pour ces conseils pour extraire et analyser les protéines de la matrice extracellulaire.

De plus, j'ai eu l'occasion d'encadrer deux stagiaires qui ont fait avancer ses travaux de thèse. Sandra Garcia, en BTS à l'époque, pour son intérêt et ses efforts pour mener à bien les missions qui lui ont été confiées. Sans oublier, Kilian Ducos qui a montré une curiosité toute particulière et un dévouement remarquable pour son stage de master lui donnant ainsi le courage de venir travailler au laboratoire à peu près tous les jours fériés du mois mai, et avec le sourire ! Merci à vous deux, et bon courage pour la suite !





# Table des matières

<b>Liste des abréviations</b> .....	10
<b>Introduction générale</b> .....	12
<b>Chapitre 1 Etude bibliographique</b> .....	16
1. Un petit monde en plein essor : les nanotechnologies .....	17
1.1 Nanoparticules : terminologie et origine .....	17
1.2 Un enjeu économique grandissant.....	19
2 Présentation des nanoparticules de carbone .....	22
2.1 Le graphène et ses sous-produits.....	22
2.1.1 Mode de production .....	24
2.1.2 Propriétés physico-chimiques et applications .....	27
2.2 Les nanotubes de carbone.....	29
2.2.1 Mode de production .....	31
2.2.2 Propriétés physico-chimiques et applications .....	35
2.3 Risques potentiels.....	38
2.3.1 Cadre législatif .....	39
2.3.2 Lacunes scientifiques .....	41
3 Les nanoparticules de carbone et l'environnement .....	43
3.1 Ecosystèmes aquatiques : voies de contamination .....	43
3.2 Physico-chimie des NPCs dans l'environnement.....	45
3.3 Dégradation et biodégradation .....	46
3.4 Détection dans le milieu : techniques et contraintes .....	47
4 Ecotoxicité des nanoparticules de carbone.....	49
4.1 Les biofilms d'eau douce .....	50
4.1.1 Présentation des biofilms et composition cellulaire .....	50
4.1.2 Rôles de la matrice extracellulaire .....	52
4.1.3 Intérêts des études écotoxicologiques sur les biofilms.....	53
4.2 Impact sur les composants cellulaires du biofilm .....	56
4.2.1 Effets sur les biofilms mixtes .....	56
4.2.2 Organismes hétérotrophes .....	57
4.2.3 Organismes phototrophes .....	59
Références bibliographiques .....	64

<b>Chapitre 2</b>	<b>Présentation du modèle biologique d'étude et des matériaux</b>	78
1	Introduction	79
2	La diatomée comme modèle d'étude	79
2.1	Origine et classification	79
2.2	Biologie et cycle de vie	81
2.3	Conditions environnementales et rôle clé des diatomées	85
2.4	Intérêts en écotoxicologie	87
2.5	<i>Nitzschia palea</i> , l'espèce idéale	88
3	Les nanoparticules de carbone étudiées	89
3.1	Graphène à quelques feuillets de carbone (FLG)	89
3.2	Nanotubes de carbone à double paroi (DWCNTs)	91
	Références bibliographiques	93
<b>Chapitre 3</b>	<b>Effet d'une exposition aux nanoparticules de graphène à quelques feuillets sur la diatomée <i>Nitzschia palea</i></b>	96
	Résumé	97
	Abstract	98
1	Introduction	98
2	Materials and methods	99
2.1	Diatom strain cultivation and graphene preparation	99
2.1.1	Diatom strain cultivation and graphene preparation	99
2.1.2	FLG suspension	99
2.2	Exposure conditions	100
2.3	Effect of FLG on <i>N. palea</i> growth and viability	100
2.4	Effect of FLG on photosynthetic activity	100
2.5	Assessment of FLG-Diatoms interaction and microscopy observation of <i>N. palea</i> biofilm	100
2.6	Statistical analysis	101
3	Results	101
3.1	Characterization of FLG suspension	101
3.2	FLG effects on <i>N. palea</i> growth and viability	102
3.3	Effect of FLG suspension on photosynthetic yield and PAR	102
3.4	Quantification of FLG interaction with algal biofilm	104
4	Discussion	106
4.1	Effect of total exposure on diatoms growth and viability	106
4.2	Shading effect of FLG	106

4.3	Investigation of the interaction between diatoms and FLG suspension.....	107
5	Conclusion.....	107
	Acknowledgments.....	107
	References.....	107
<b>Chapitre 4</b>	<b>Etude des fonctions biologiques impliquées dans la réponse de <i>N. palea</i> face à différentes formes allotropiques du carbone</b> .....	<b>110</b>
1	Contexte .....	111
2	Développement d'une méthode d'extraction d'ARN d'une diatomée en présence de NPCs.....	111
2.1	Les critères à respecter .....	111
2.2	Optimisation de protocoles d'extraction d'ARN connus en présence de NPCs	113
2.2.1	Lyse des diatomées en absence de NPCs .....	113
2.2.2	Limiter l'interaction avec les NPCs .....	117
2.2.3	Amélioration de la qualité .....	122
3	Démarche des analyses bio-informatiques sur les données RNAseq.....	123
4	Evaluation de la réponse transcriptomique de <i>N. palea</i> en exposition au graphène à quelques feuillets (FLG).....	127
	Résumé.....	127
	Transcriptomic response of the benthic freshwater diatom <i>Nitzschia palea</i> exposed to Few Layer Graphene .....	128
	Abstract .....	128
4.1	Introduction .....	129
4.2	Materials and methods .....	132
4.2.1	Preparation of graphene suspension.....	132
4.2.2	FLG characterization.....	133
4.2.3	Diatoms culture and exposure .....	133
4.2.4	RNA extraction and <i>de novo</i> sequencing .....	134
4.2.5	RNA-seq <i>de novo</i> assembly and quantification analysis .....	135
4.3	Results and Discussion.....	136
4.3.1	Characterization of FLG.....	136
4.3.2	Assembly and annotation statistics .....	136
4.3.3	Differential expression .....	138
4.3.4	Functional annotation .....	141
4.4	Conclusion.....	155

Acknowledgments .....	156
References .....	157
Supplementary information for the article <i>Transcriptomic response of the benthic freshwater diatom Nitzschia palea exposed to Few Layer Graphene</i> .....	164
5 Effets des nanotubes de carbone double paroi (DWCNTs) sur la réponse transcriptomique de <i>N. palea</i> .....	168
Résumé .....	168
Transcriptomic response of the freshwater diatom biofilm exposed to potential environmental and accidental concentrations of Carbon Nanotubes .....	169
Abstract .....	169
5.1 Introduction .....	170
5.2 Materials and methods .....	172
5.2.1 Preparation before cellular exposition.....	172
5.2.2 Cellular CNT exposure conditions.....	174
5.2.3 RNA isolation and sequencing.....	174
5.2.4 RNA assembly and differential expression analysis .....	176
5.3 Results and Discussion.....	176
5.3.1 Differential expression and annotation statistics.....	176
5.3.2 Functional annotation .....	180
5.4 Conclusion.....	194
References .....	195
Supporting information for the article <i>Transcriptomic response of the freshwater diatom biofilm exposed to potential environmental and accidental concentrations of Carbon Nanotubes</i> .....	201
Références bibliographiques .....	203
<b>Chapitre 5 Effets d’une exposition à différentes formes allotropiques du carbone sur la composition de la matrice extracellulaire de <i>Nitzschia palea</i></b> .....	205
1 Contexte .....	206
2 Développement d’une technique d’extraction des EPS .....	206
2.1 Choix d’un indicateur de l’intégrité cellulaire .....	207
2.2 Technique de lyse.....	209
2.3 Extraction séquentielle .....	209
2.4 Quantification.....	214
3 Etude de la réponse extracellulaire de <i>N. palea</i> en exposition à différentes formes allotropiques du carbone .....	217
Résumé.....	217

Role of exoproteome in diatoms' biofilm response .....	219
Abstract .....	219
3.1 Introduction .....	220
3.2 Materials and methods .....	222
3.2.1 Preparation and experimental exposition .....	222
3.2.2 EPS extraction and growth monitoring .....	224
3.2.3 Quantitative analysis .....	225
3.2.4 Shotgun sequencing and functional analyses of the exoproteomes .....	227
3.2.5 Statistical analysis .....	228
3.3 Results .....	228
3.3.1 Impact of carbon nanoparticles on EPS content.....	228
3.3.2 Analysis of the baseline exoproteome of <i>N. palea</i> biofilm .....	229
3.3.3 Identification of exoproteins involved in diatoms' response .....	231
3.4 Discussion .....	238
3.4.1 Exoproteome: dream or reality? .....	239
3.4.2 Effect of carbon nanoparticles on the exoproteome.....	240
3.5 Conclusion.....	245
References .....	246
Supporting information for the article <i>Role of exoproteome in diatoms' biofilm response to carbon nanoparticles</i> .....	251
Références bibliographiques .....	254
<b>Discussion générale, conclusions et perspectives</b> .....	255
1 Comparaison des réponses induites par les deux types de NPCs.....	256
1.1 Réponses générées aux faibles doses .....	257
1.2 Réponses générées aux fortes doses en NPCs.....	259
1.3 Ombrage et contact direct FLG .....	263
2 Limites et perspectives vers une généralisation des effets des NPCs à l'échelle de l'écosystème .....	267
2.1 Utilisation des outils « omiques » sur les diatomées : prudence et efforts à conduire .....	267
2.2 Représentativité des conditions environnementales.....	269
Références bibliographiques .....	273
<b>Liste des figures</b> .....	277
<b>Liste des tableaux</b> .....	279

<b>Annexes .....</b>	<b>280</b>
<b>Liste et statut des publications présentées dans ce manuscrit .....</b>	<b>289</b>
<b>Communications scientifiques.....</b>	<b>290</b>

## Liste des abréviations

**A**DN : Acide DésoxyriboNucléique

AFNOR : Association française de normalisation

ANSES : Agence nationale de sécurité sanitaire de l'alimentation, de l'environnement et du travail

ARN : Acide RiboNucléique

ATP : Adénosine TriPhosphate

**B**P : Processus biologique (*Biological Process* en anglais)

BSA : Albumine de sérum bovin (*Bovine Serum Albumin* en anglais)

**C**C : Contenant cellulaire (*Cellular Component* en anglais)

CER : Résine échangeuse de cations (*Cation Exchange Resin* en anglais)

CHU10 : milieu de culture normalisé CHU n°10.

CIRIMAT : Centre Interuniversitaire de Recherche et d'Ingénierie des MATériaux

CNRS : Centre National de Recherche Scientifique.

CNT : Nanotube de carbone (*Carbon NanoTubes* en anglais). S/D/MWCNT: Nanotube de carbone à Simple/Double/Multiparoi.

**D**EG : Gènes présentant une expression significativement différente dans deux conditions (*Differential Expressed Gene*, en anglais)

DEP : Protéines présentant une expression significativement différente dans deux conditions (*Differential Expressed Protein*, en anglais)

DO : Densité Optique

DVCC : Dépôt de Vapeurs Chimiques Catalysées

**E**DTA : Acide éthylènediaminetétraacétique

EPOC : laboratoire Environnements et Paléoenvironnements Océaniques et Continentaux.

EPS : Substances Exo-polymériques (*ExoPolymeric Substances* en anglais)

ETM : Eléments Traces Métalliques

**F**LG : Graphène à quelques feuillets (*Few Layer Graphene* en anglais)

**G**BF : laboratoire Génomique et Biotechnologie des Fruits.

GO : méthode d'annotation de séquence par ontologie de gène (*Gene Ontology* en anglais)

Go : Graphène oxydé (*Graphene oxide* en anglais)

**H**AP : Hydrocarbures Aromatiques Polycycliques

**I**BD : Indice Biologique Diatomées.

ICP-OES : Spectrométrie de masse à plasma induit couplée à l'émission optique (*Inductively Coupled Plasma Optical Emission Spectrometry*, en anglais)

INPT : Institut National Polytechnique de Toulouse.

INRS : Institut National de Recherche et de Sécurité

IPS : Indice de PolluoSensibilité

ISO : Organisation internationale de normalisation (*International Organization for Standardization* en anglais)

**L**BAE : Laboratoire de Biotechnologies Agroalimentaire et Environnementale.

LC-MS/MS : Chromatographie en phase liquide couplée à la spectrométrie de masse (*Liquid chromatography coupled to tandem mass spectrometry* en anglais)

**M**EB : Microscope Electronique à Balayage

MET : Microscope Electronique à Transmission

MF : Fonction moléculaire (*Molecular Function* en anglais)

**N**MP : N-méthylpyrrolidone

NPC : Nanoparticule de carbone

NP : Nanoparticule

**O**CDE / OECD : Organisation de Coopération et de Développement Economiques (*Organisation for Economic Cooperation and Development* en anglais)

**P**AR : Rayonnement photosynthétiquement actif (*PhotoActive Radiation* en anglais)

PBS : Solution tampon phosphate (*Phosphate Buffer Solution* en anglais)

**R**&D : Recherche et Développement

REACH : Enregistrement, Evaluation, Autorisation et Restriction des substances Chimiques (*Registration, Evaluation, Autorisation and restriction of Chemicals* en anglais)

rGo : Graphène oxydé réduit (*reduced Graphene oxide* en anglais)

RIN : Indicateur d'intégrité des ARNs (*RNA Integrity Number* en anglais)

ROS : Espèces réactives de l'oxygène (*Reactive Oxygen Species* en anglais)

RT-qPCR : réaction en chaîne par polymérase quantitative par reverse transcription (*Reverse Transcription quantitative Polymerase Chain Reaction* en anglais)

**S**AR : Groupe désignant l'ensemble des straménopiles, alvéolés et rhizaires.

SEMN : Systèmes ElectroMécaniques Nanométriques

SPE : milieu de culture CHU n°10 modifié

**T**CA : Acide trichloracétique

(*Trichloroacetic acid* en anglais)

**U**PS : Université Paul Sabatier

UV : Ultraviolet



## Introduction générale

C'est dans les années 60 qu'une prise de conscience sur la fragilité de l'environnement apparaît. Rachel Carson révèle au grand public les conséquences que peuvent avoir les produits d'origine anthropique, émis dans l'environnement, sur la santé humaine mais surtout sur la biosphère et les écosystèmes, craignant un « *Silent Spring* » (Carson, 1962). L'écotoxicologie, terme établi en 1969, apparaît alors comme une nouvelle discipline scientifique alliant plusieurs sciences « dures » (écologie, toxicologie, physique et chimie) mais également des sciences « molles » (histoire, économie et sociologie). Cette science que l'on pourrait qualifier aujourd'hui de transdisciplinaire a pour but d'étudier le devenir des contaminants dans les milieux et leurs effets sur les écosystèmes (Moriarty, 1988).

De nouveaux produits ne cessent d'être régulièrement découverts et/ou synthétisés dans le but d'être commercialisés. Depuis plus d'une dizaine d'années, les nanomatériaux manufacturés représentent une nouvelle classe de produits qui ne cesse de susciter l'intérêt des industriels et des scientifiques. De leurs propriétés physico-chimiques découlent un fort potentiel pour de multiples applications dans divers secteurs, conduisant à une accélération fulgurante de leur production et de leurs usages. Cependant, la compréhension de leurs effets sur l'environnement reste encore incomplète et nécessite d'être approfondie. C'est dans cette optique que ces travaux de thèse, présentés dans le présent manuscrit, ont été menés. A l'interface entre l'écotoxicologie et la microbiologie environnementale, ces travaux se focalisent sur les effets des nanoparticules carbonées, et tout particulièrement du graphène à quelques feuillets (FLG) et des nanotubes de carbone (CNTs), sur une diatomée benthique d'eau douce.

Cette thèse s'inscrit au sein du projet européen *Graphene Flagship*, initié en 2013. Ce programme de recherche rassemble une communauté scientifique d'une ampleur remarquable, alliant 150 équipes de recherche (public et privé) issues de 23 pays autour d'un même sujet : le graphène (<http://graphene-flagship.eu/>). L'ensemble des travaux de recherche réalisés dans le cadre du *Graphene Flagship* recouvrent tous les aspects ayant trait au graphène, de sa production jusqu'à l'évaluation des risques pour l'Homme et l'environnement, incluant l'optimisation de ses propriétés physico-chimiques au sein d'un nanocomposite. Les travaux établis dans ce projet de thèse font l'objet de collaborations entre plusieurs laboratoires scientifiques alliant leurs compétences et leurs expertises afin d'apporter une meilleure évaluation des risques liés à l'utilisation des nanoparticules de carbone (NPCs). Une solide

collaboration entre deux laboratoires, établie en 2005, a motivé la réalisation de ces études écotoxicologiques. L'équipe ECotoxicologie Intégrative (ECI) du laboratoire EcoLab (UMR 5245), portant un intérêt tout particulier pour les NPCs déjà depuis plus d'une petite dizaine d'années, apporte son expérience concernant l'évaluation de la toxicité de contaminants sur de multiples modèles biologiques. L'équipe Nanocomposites et Nanotubes de Carbone (NNC) du Centre Interuniversitaire de Recherche et d'Ingénierie des MATériaux (CIRIMAT, UMR 5085, Institut Carnot) amène à ce projet de thèse leurs connaissances concernant la production et la caractérisation des nanoparticules (NPs). Les différentes NPCs utilisées dans ces travaux ont d'ailleurs été fournies par l'équipe NNC qui a ainsi produit les suspensions de FLG mais également les nanotubes de carbone double paroi (DWCNTs). Grâce à leurs nombreuses années d'expertise sur les biofilms et leurs composants moléculaires, une collaboration a également été mise en place avec des membres du Laboratoire de Biotechnologies Agroalimentaire et Environnementale (LBAE, EA 4565). Le laboratoire Génomique et Biotechnologie des Fruits (GBF, UMR 990), avec qui une collaboration a nouvellement été initiée, ainsi que le laboratoire Environnements et Paléoenvironnements Océaniques et Continentaux (EPOC, UMR 5805) ont apporté leurs compétences dans la réalisation des analyses bio-informatiques des données de séquençage.

L'évaluation de l'effet des NPCs sur les organismes microbiens d'eau douce s'est tout particulièrement concentrée sur une micro-algue largement utilisée au sein du laboratoire EcoLab comme modèle d'étude : la diatomée. Les diatomées, producteurs primaires à la base de la chaîne trophique, jouent un rôle essentiel dans le fonctionnement des écosystèmes aquatiques continentaux. Intégrant à la fois l'échelle des populations du biofilm, mais aussi l'échelle moléculaire en passant par l'évaluation de la réponse cellulaire, ces travaux permettent de comprendre les mécanismes induits lors de la réponse d'un biofilm benthique à l'exposition à des NPCs grâce à différentes approches. Ces travaux de thèse ont pour but de comprendre les mécanismes de réponse des diatomées benthiques générés face à différentes formes allotropiques du carbone. La problématique générale de notre projet s'articule autour de quatre objectifs :

- L'étude de la réponse cellulaire d'une diatomée benthique d'eau douce, *Nitzschia palea*, exposée à différentes formes allotropiques du carbone. Pour évaluer la toxicité cellulaire des NPCs, plusieurs paramètres ont été suivis (croissance, mortalité...), ainsi que le comportement des NPCs dans le système expérimental grâce à différentes mesures (densité optique (DO) et densitométrie). La question posée ici est de

déterminer si les diatomées présentent une réponse globale similaire lorsqu'elles sont exposées au FLG ou aux CNTs. Cette comparaison repose alors en partie sur les travaux réalisés par Laurent Verneuil (2015) sur les CNTs.

- L'étude globale du transcriptome de *N. palea* exposée au FLG ou aux DWCNTs en s'appuyant sur l'outil puissant qu'est le séquençage haut-débit. Les gènes différentiellement transcrits (DEGs) lors de ces expositions ont alors fait l'objet d'une étude à part entière cherchant à déterminer les voies métaboliques mises en jeu lors d'une exposition à ces deux différentes formes allotropiques du carbone.
- L'étude des caractéristiques de la matrice extracellulaire du biofilm. Une attention particulière a été portée aux interactions entre le biofilm algal et les NPCs afin de déterminer l'influence d'une exposition aux NPCs sur la matrice extracellulaire des diatomées. La réponse extracellulaire des diatomées a été étudiée grâce à différentes approches allant de l'observation microscopique jusqu'à l'analyse des substances exopolymériques (EPS) excrétées par les cellules. Cette étude permet d'apprécier pour la première fois, à notre connaissance, la composition protéique de la matrice extracellulaire d'un biofilm de diatomée d'eau douce. Les modifications induites sur la quantité et/ou la composition de cette matrice lors de l'exposition à différentes formes allotropiques du carbone ont également été évaluées.
- L'étude d'un effet indirect des NPCs. Défini comme un effet d'ombrage des NPCs, il a été démontré à plusieurs reprises dans la littérature. Les dispositifs expérimentaux utilisés dans ces travaux ont donc été adaptés afin d'étudier l'impact de l'ombrage des NPCs sur un biofilm de diatomée. La question est de savoir si l'ombrage des NPCs, seul, induit une réponse globale différente de celle d'un contact direct.

Pour répondre à chacune de ces problématiques, ce manuscrit s'articulera autour de six chapitres :

- Le premier chapitre est une étude bibliographique visant à introduire les nanotechnologies, et tout particulièrement l'essor des nanoparticules carbonées. Les nanoparticules utilisées dans cette étude sont dès lors décrites de leur production jusqu'à leurs applications. Des points essentiels pour l'évaluation des risques sont également abordés, notamment la législation actuelle et l'estimation des quantités des NPCs présentes ou à prévoir dans l'environnement. Enfin, un état de l'art des études écotoxicologiques évaluant les effets des NPCs a été établi en mettant l'accent sur les biofilms et leurs différents composants cellulaires.

- Le deuxième chapitre présente le modèle biologique étudié, ses origines, sa structure cellulaire et l'intérêt qu'il présente. Les caractéristiques et mode de production des deux formes de nanoparticules carbonées utilisées dans ces travaux de thèse sont également abordés.
- Le troisième chapitre présente les résultats obtenus lors de l'étude de la réponse cellulaire des diatomées face aux nanoparticules de graphène FLG présentés sous forme d'article.
- Le quatrième chapitre se focalise sur la réponse transcriptomique des diatomées exposées à différentes formes allotropiques du carbone en distinguant l'ombrage du contact direct et vise à déterminer les voies métaboliques induites lors de ces expositions. Cette étude est scindée en deux axes distincts présentés sous la forme d'articles. Une partie méthodologie, détaillant les techniques développées et utilisées lors de ces travaux, a été incluse dans ce chapitre.
- Le cinquième chapitre présente les résultats de l'étude de la matrice extracellulaire d'un biofilm de diatomée exposée au FLG et aux DWCNTs en prenant soin de discerner l'effet d'ombrage du contact direct pour le FLG. Cette étude a également été rédigée suivant le format article après une partie méthodologie.
- Le dernier chapitre aborde une discussion générale reprenant l'ensemble de ces travaux, pour ensuite en dégager quelques perspectives de recherche.

# Chapitre 1

## Etude bibliographique

## 1. Un petit monde en plein essor : les nanotechnologies

Depuis les années 1950, le monde de l'industrie est tourné vers un nouvel objectif : la miniaturisation. C'est dans cette dynamique que Robert Feynman, physicien renommé, propose pour la première fois l'idée de produire des composants à l'échelle nanométrique permettant de mettre au point des technologies à l'échelle moléculaire. Débute alors l'émergence des nanotechnologies. Comme son nom l'indique, les nanotechnologies s'intéressent aux objets de taille nanométrique, voire atomique, appelés nanomatériaux. Après la découverte des nanocomposites, peu d'études s'y sont intéressées, mais une fois leurs propriétés physico-chimiques mises en évidence, l'intérêt des communautés scientifiques, de toutes disciplines, pour ces nanomatériaux n'a cessé de prendre de l'ampleur (Bottero et al., 2015; Sanchez et al., 2012). La diversification du secteur des nanotechnologies incite de plus en plus d'industries à mettre à profit les propriétés physico-chimiques de ces matériaux. Certains auteurs considèrent les nanotechnologies comme une nouvelle révolution industrielle (Staggers et al., 2008). Les nanoparticules sont majoritairement utilisées pour développer des nanocomposites novateurs dans des secteurs comme la biomédecine, l'électronique, ou l'aéronautique (Paul and Robeson, 2008).

### 1.1 Nanoparticules : terminologie et origine

Le manque de clarté concernant la nomenclature de ces matériaux ajoute une complexité supplémentaire à la mise en place et à l'application des réglementations régissant l'utilisation des nanotechnologies. Il convient ainsi dans un premier temps de définir les termes de nanoparticules et de nanomatériaux qui portent à controverse dans ce nanomonde (Klaine et al., 2008).

Le terme « nano » signifie que la taille d'un nanocomposite, ou d'une nanoparticule, est à l'échelle nanométrique, soit  $10^{-9}$  mètre (Figure 1). Pour donner une idée de cette dimension nanométrique, on peut imaginer que si une nanoparticule avait la taille d'un ballon de foot, une cellule sanguine aurait la dimension d'un terrain de football.

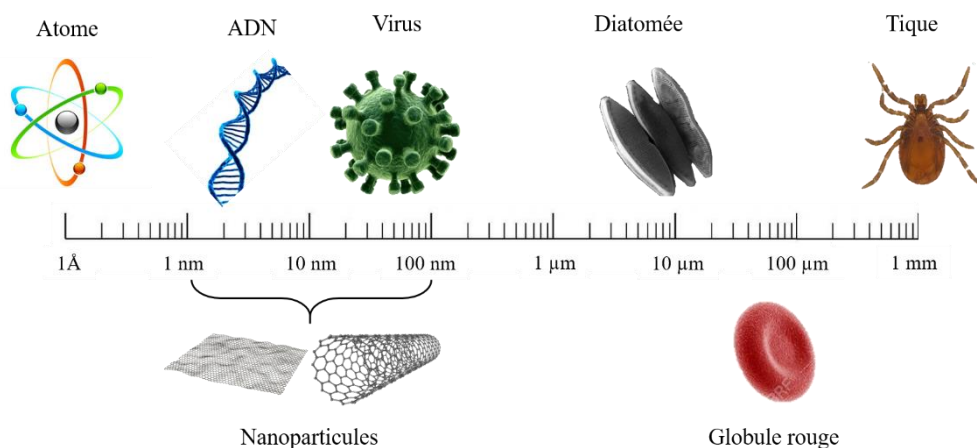


Figure 1. Représentation schématique de l'échelle nanométrique. Comparaison des tailles de différents éléments moléculaire ou cellulaire, de l'angström au millimètre, en passant par l'état nanoparticulaire.

D'après la Commission européenne, le terme de nanomatériau désigne « un matériau [...] dont au moins 50 % des particules, dans la répartition numérique par taille, présentent une ou plusieurs dimensions externes se situant entre 1 nm et 100 nm » (INRS, 2018). Un nanomatériau est donc composé de nano-objets dont au moins une des trois dimensions spatiales est inférieure à 100 nm. Les nanoparticules sont classées dans la catégorie des nano-objets et sont donc des composants des nanomatériaux. Cependant la définition des nanoparticules est un peu plus complexe. En effet, selon la *British Standard Institution*, le terme de nanoparticule rassemble tous les nano-objets dont les trois dimensions spatiales sont comprises entre 1 et 100 nm. Si un nano-objet présente une longueur ou une largeur de plus de trois fois la taille nanométrique (100 nm), il faut alors employer des termes différents : « nanofibre » (*nanorod*, en anglais) si deux dimensions présentent la même taille et la troisième significativement plus grande que 100 nm, et « nanoplaque » (*nanoplate*, en anglais) si une dimension (l'épaisseur) est inférieure à 100 nm et les deux autres dépassent la taille nanométrique (British Standards Institution, 2007). Dans la littérature, cette terminologie est rarement respectée. Le terme de nanoparticules est alors utilisé pour désigner les nano-objets dont au moins une dimension est comprise entre 1 et 100 nm. Dans ce manuscrit, nous garderons alors cette dernière terminologie pour désigner les nanoparticules utilisées lors de ces travaux.

Les nanoparticules peuvent être d'origine naturelle, comme les nanoparticules d'argile, auxquelles la biosphère est abondamment confrontée. Elles peuvent également être d'origine anthropique. Dans ce cas, il est important de distinguer celles qui sont produites non

intentionnellement, comme les NPCs générées lors de la combustion de charbon, de celles qui sont manufacturées. Ces travaux de thèse se sont intéressés uniquement aux NPs manufacturées, qui font l'objet du reste de ce manuscrit. On distingue deux grandes familles de nanoparticules : les nanoparticules organiques, essentiellement représentées par les NPCs, et les nanoparticules inorganiques, composées de NPs métalliques, de NPs d'oxydes métalliques et les *quantum dots*<sup>1</sup> (Peralta-Videa et al., 2011). Au sein de ces familles, il est possible de classer les NPCs également en fonction de leur dimensionnalité (0 dimension pour les fullerènes<sup>2</sup> et nanodiamants, 1 dimension pour les nanotubes de carbone, 2 dimensions pour les fines structures en feuillets, et 3 dimensions pour le diamant), de leur morphologie (nanohélice, nanocubes, nanotubes, ...), de leur composition (libres ou en composites) ou encore selon leur état d'agglomération (dispersées ou non) (Bystrzejewska-Piotrowska, Golimowski, et Urban 2009).

## 1.2 Un enjeu économique grandissant

Les nanoparticules connaissent un succès encore inépuisé grâce aux avantages qu'apportent leur taille nanométrique, mais surtout grâce à leurs propriétés physico-chimiques remarquables. Les dimensions nanométriques font apparaître de nouvelles propriétés variées et inégalables, en comparaison avec le même élément à l'échelle macroscopique. Cette spécificité est due à l'augmentation de la surface spécifique du matériau lors du passage de l'échelle macroscopique à l'échelle nanométrique (Figure 2). Les nanoparticules présentent alors des propriétés recherchées dans le monde de l'industrie, telles que des propriétés antibactériennes, leur conductivité ou supraconductivité, une légèreté incomparable ou encore une résistance mécanique supérieure à tout autre matériau utilisé jusqu'à présent. Ces propriétés offrent ainsi un champ d'applications très large des nanoparticules et ouvrent de multiples perspectives dans le monde des nanotechnologies. Les nanoparticules peuvent être utilisées dans divers secteurs d'activité. Elles permettent ainsi la production de matériaux renforcés et plus légers utilisés dans le secteur de l'automobile et l'aéronautique. Les technologies sans fils et le développement de processeurs miniaturisés ne sont que des

---

<sup>1</sup> Quantum dots : Nanostructure cristalline composée à partir d'assemblage de métal, d'oxyde de métal et de matériau semi-conducteur n'excédant pas quelques dizaines de nanomètres. Elles sont utilisées comme semi-conducteur grâce leur potentiel de confinement des électrons entraînant une modification de l'état énergétique de ces derniers conférant aux quantum dots des propriétés proches de celles d'un atome, notamment une capacité de fluorescence exploitée dans la fabrication de téléviseurs (Lamelot, 2015)

<sup>2</sup> Fullerènes : Nanoparticule possédant au minimum 60 atomes de carbone présentant une structure sphérique d'épaisseur monoatomique dont la structure rappelle celle d'un ballon de football.



exemples d'applications des NPs dans le secteur de l'électronique. De nouvelles perspectives sont ouvertes pour le monde de la construction avec l'apparition de matériaux autonettoyants. Le monde de l'énergie et de la défense voient également l'efficacité de leurs produits augmentée grâce à l'utilisation de nanomatériaux. Leur emploi peut également servir une tout autre cause comme celle de l'environnement grâce à la dépollution des sols, des eaux de surface et souterraines. Une autre application, pour le moins surprenante, concerne le domaine de l'alimentation, où les nanoparticules de silice sont utilisées comme agent antiagglomérant afin de préserver les propriétés de dissolution d'une poudre et épaissir les pâtes (Dekkers et al., 2011). Mais le secteur qui connaît une avancée fulgurante dans le nanomonde est le domaine biomédical. Les NPs sont utilisées pour optimiser l'administration ciblée de médicaments ou encore améliorer l'imagerie médicale, pour ne citer que quelques applications (Srivastava et al., 2010). A l'heure actuelle, les nanotechnologies sont présentes dans de nombreux secteurs industriels, et font l'objet de recherches afin d'exploiter de nouvelles propriétés et ainsi étendre les domaines d'utilisation.

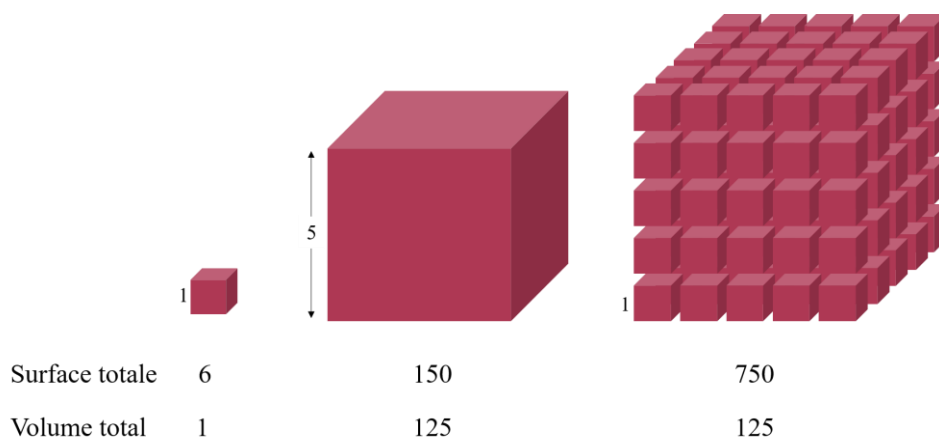


Figure 2. Relation entre la surface d'une particule et son volume. La diminution de la taille d'une particule entraîne une augmentation de sa surface tandis que le volume reste constant.

Du fait de leurs multiples applications, les produits à base de nanomatériaux, commercialisés à l'heure actuelle ou dans un futur proche, génèrent des flux économiques internationaux conséquents. Les enjeux économiques touchent dès lors toutes les étapes du cycle de vie partant de la recherche et développement (R&D) jusqu'à la gestion des déchets et le recyclage des nanocomposites. Les investissements proviennent à la fois des industriels mais également des gouvernements favorisant ainsi l'essor des nanotechnologies.

L'accès aux données concernant les dernières actualités du marché des nanomatériaux est difficile. Les valeurs accessibles concernent principalement l'année 2004. Plus de 8,6 milliards de dollars ont été investis par les gouvernements et les industriels du monde entier

dans la R&D des nanotechnologies, dont 1,3 milliards par les pays d'Europe. L'Europe représente ainsi 28% du marché mondial des nanotechnologies en 2004, contre 35% pour l'Amérique du Nord. Aux Etats-Unis, le marché des nanotechnologies a pris une telle ampleur que le budget accordé dans la R&D dépasse celui investi dans le projet du génome humain (*Human Genome Project*, en anglais), avec plus de 3,16 milliards de dollars en 2000 (The Nanotechnology Report, 2004). L'entreprise japonaise Mitsubishi a ainsi multiplié son taux de production de fullerènes par 10 à partir de 2005 passant de 4 à 40 tonnes/an (Aitken et al., 2006).

Les NPCs représentent une part non négligeable du marché des NPs avec au moins 89 produits carbonés actuellement sur le marché, notamment des produits contenant du noir de carbone<sup>3</sup> (*carbon black*, en anglais) et des CNTs (Vance et al., 2015). Les CNTs comptent parmi les nanoparticules les plus prometteuses en terme d'applications, mais connaissent un succès commercial moins important que certaines NPs, comme les nanoparticules de silice ou dioxyde de titane, du fait de leur faible rendement de production ; au maximum 40 kg/jour, soit environ 8,7 tonnes/an pour les CNTs, contre 500 tonnes/an pour les nanoparticules de dioxyde de silice (Aitken et al., 2006; INRS, 2015). Cette difficulté de rendement est de moins en moins rencontrée grâce aux nombreux travaux cherchant à optimiser leur synthèse. Les nanomatériaux manufacturés, incluant les NPCs, connaissent ainsi un intérêt grandissant dans le monde des nanotechnologies et leur production mondiale ne cesse de s'intensifier avec un volume de nanomatériaux produits multiplié par dix entre 2002 et 2011 (230 000 tonnes) et pouvant même atteindre 350 000 tonnes en 2016 d'après le rapport de Market Publishers (2012). Ces données peuvent varier selon les sources d'information. Les NPCs sont ainsi considérées comme des contaminants émergents<sup>4</sup>, susceptibles d'être rejetés à une ou plusieurs étapes de leur cycle de vie. Ces travaux s'inscrivent dans un contexte d'utilisation et de rejet croissants des nanoparticules carbonées dans l'environnement.

---

<sup>3</sup> Noir de carbone : forme amorphe du carbone contrairement au graphène (forme cristalline) obtenue par combustion ou décomposition thermique de composés organique.

<sup>4</sup> Contaminant émergent : selon la définition du gouvernement français (le glossaire sur l'eau) ce terme désigne une « substance que l'on trouve dans l'environnement au fur et à mesure de l'amélioration de la surveillance et des techniques analytiques ». Cependant, on parle souvent de contaminant émergent pour désigner des substances nouvellement produites représentant une problématique émergente à cause du manque d'informations disponibles sur leur toxicité et leur persistance dans l'environnement. Le sens de ce terme employé ici correspond à la dernière notion citée.

## 2 Présentation des nanoparticules de carbone

La formation de liaison entre atomes est une capacité commune à tous les atomes, mais seul le carbone présente la capacité de former de longues structures en chaîne par le biais de liaisons covalentes. L'agencement des atomes de carbone entre eux peut varier et permettre d'obtenir différentes formes allotropiques du carbone (Figure 3). Sous certaines conditions de température et de pression (foudre, éruption volcanique...), la plupart de ces allotropes du carbone sont formés dans le milieu naturel, comme le graphite retrouvé dans les roches métamorphiques et les météorites. Les activités anthropiques, comme la combustion des énergies fossiles (Lam et al., 2006), causent la formation non intentionnelle d'autres allotropes du carbone émis dans l'environnement, comme les nanotubes de carbone présents depuis des millénaires dans l'atmosphère (Murr et al., 2004). Mais les NPCs, présentant des propriétés physico-chimiques exceptionnelles, se trouvent être des NPs manufacturées obtenues à partir de matériaux naturels, comme le graphite, ou provenant de l'extraction et assemblage des atomes de carbone d'une source carbonée. Ce sont ces NPs manufacturées qui font l'objet des études réalisées dans ce projet de thèse, portant ainsi sur les CNTs et une autre NPC qui fait de plus en plus parler d'elle, le graphène.

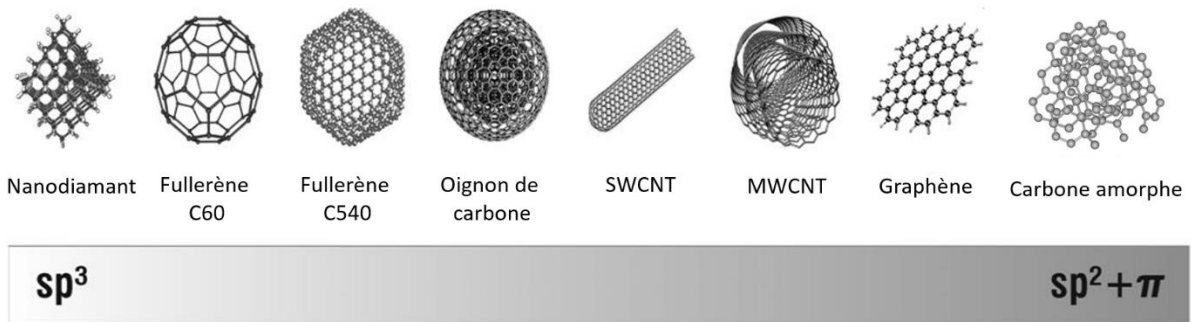


Figure 3. Représentation schématique de huit allotropes du carbone classés selon la capacité d'hybridation des atomes de carbone. (d'après (Carr, 2017), consulté le 23 mai 2018).

### 2.1 Le graphène et ses sous-produits

Le graphène fait rêver les physiciens depuis déjà plus de 70 ans. Dès 1947 P. R. Wallace avait imaginé une structure graphitique constituée d'une seule couche d'atomes de carbone formant une structure planaire obtenue à partir du graphite. Mais ce n'est que bien plus tard que ce cristal bidimensionnel a pu être synthétisé. La première production de graphène à partir de

graphite est réalisée en 2004 par Konstantin Novoselov et André Geim. Découverte pour laquelle ils obtiendront le prix Nobel de physique en 2010. Le graphite est composé d'une série de nombreuses couches de plan d'atomes de carbone, principalement  $sp^2$  et possiblement  $sp^3$  sur les bords extérieurs, formant un réseau hexagonal (ou nid d'abeille). La formation de ces réseaux bidimensionnels repose sur la capacité du carbone à former trois liaisons covalentes avec d'autres atomes de carbone en utilisant les orbitales  $sp^2$ . Ces feuillets de carbone superposés sont faiblement liés les uns aux autres sous l'effet des forces de Van der Waals. Un procédé d'exfoliation a donc permis de décomposer le graphite en plusieurs monocouches constituant les monofeuillets de graphène. Théoriquement, le graphène est donc défini comme étant un cristal bidimensionnel de carbone, d'épaisseur monoatomique, constituant la plus mince membrane obtenue à ce jour (Novoselov et al., 2004). Il peut présenter une surface spécifique différente selon sa longueur et sa largeur qui varient selon l'utilisation à laquelle il est destiné. Cependant, le taux de rendement de production du graphène simple est très faible, il reste donc difficile à produire.

Par abus de langage, le terme de « graphène » peut être retrouvé dans de nombreuses publications scientifiques sans pour autant désigner le graphène au sens strict (monofeuillet), mais peut faire référence aux autres formes de la famille du graphène (Figure 4). Des formes dérivées du graphène existent, présentant soit un nombre de feuillets de carbone différent, tout en restant à l'échelle nanométrique, soit des groupes fonctionnels supplémentaires greffés à sa surface. Ainsi, le graphène à quelques feuillets, ou FLG, est composé de 3 à 9 monofeuillets superposés, et représente un sous-produit obtenu lors de la fabrication du graphène simple. Au-delà de 10 couches, on parle de graphite dont l'épaisseur reste inférieure à 100 nm. Aux vues de ces multiples propriétés, il est aujourd'hui produit intentionnellement pour de nombreux intérêts commerciaux. L'obtention de FLG présente un rendement qui reste encore relativement faible, pouvant varier selon les modes de production, mais permet tout de même de produire des quantités raisonnables. Représentant une des NPs les plus fines et les plus prometteuses qui puisse être obtenue sans trop de difficultés, le choix de l'objet d'étude pour ces travaux de thèse s'est donc tourné vers le FLG.

Le graphène oxydé (Go) est la forme fonctionnalisée du graphène simple. Cette particule présente des groupes hydroxyles et des époxydes fonctionnels polaires sur la surface et des groupes carboxylates en périphérie. Ces groupes fonctionnels peuvent être réduits pour obtenir un graphène réduit (rGo). La réduction du Go en rGo permet alors de rétablir les propriétés électriques, mais peut aussi avoir plusieurs conséquences sur les autres propriétés

initialement offertes par le Go, notamment son aptitude à la dispersion en solution, mais aussi ses possibilités de greffage, permettant de l'intégrer très facilement dans tout type de composite, à l'origine de son succès commercial.

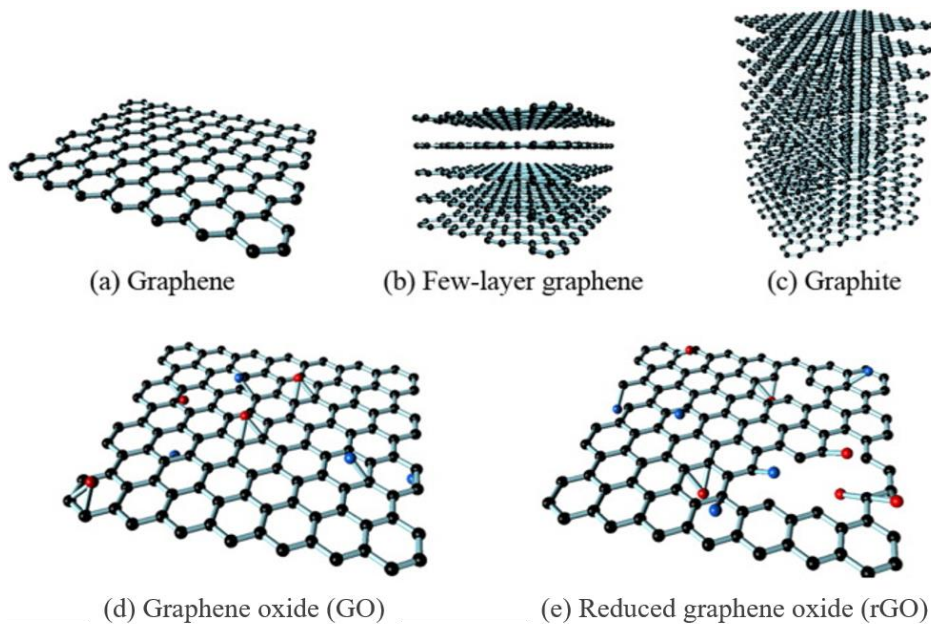


Figure 4. Structure des différentes formes de la famille du graphène. (d'après (Kiew et al., 2016)).

### 2.1.1 Mode de production

Le graphène peut être obtenu à partir de la transformation de nanomatériaux carbonés, comme le graphite ou le graphène oxydé, mais aussi à partir d'atomes de carbone provenant de précurseurs carbonés, comme le méthane ; on parlera respectivement d'approche descendante ou ascendante. Le graphite étant composé de feuillets de carbone faiblement liés entre eux, il s'effeuille sans trop de difficultés. Parmi les approches descendantes, l'exfoliation du graphite peut être réalisée via des procédés chimiques ou mécaniques. Le graphène a été produit, pour la première fois, grâce à une exfoliation mécanique, durant laquelle le graphite subit un pelage répété à l'aide de bandes adhésives. Une fois cette étape terminée, les paillettes de carbone les plus fines sont récupérées dans un solvant grâce à l'ajout d'une plaque de  $\text{SiO}_2$  sur laquelle les particules viennent se fixer. Du graphène de moins de 10 nm d'épaisseur et de bonne qualité électrique a pu être obtenu grâce à cette méthode de pelage successif (Novoselov et al., 2004; K. S. Novoselov et al., 2005). Une autre méthode d'exfoliation mécanique permet d'isoler du

graphène multifeuillets (10-100 nm d'épaisseur) grâce à un procédé électrique. Ce graphène de haute qualité est surtout utilisé pour la recherche fondamentale de ses propriétés physiques (Zhu et al., 2010). Ces techniques relativement longues à mettre en œuvre, avec un rendement et une qualité variable selon les procédés employés, laissent place aujourd'hui à des méthodes plus rapides.

Les nouveaux procédés de fabrication cherchent à optimiser les rendements de production. L'expansion du graphite peut s'effectuer grâce à un traitement électrochimique durant lequel une électrode négative de graphite est exfoliée à l'aide d'ultrasons de forte intensité au sein d'un solvant organique, comme le N-méthyl-2-pyrrolidone (NMP) ou le propylène carbonate électrolyte (Wang et al., 2011). Ces solvants organiques jouent un rôle dans la dispersion du graphène en solution aqueuse. Cette méthode permet d'obtenir simultanément du FLG, composé de moins de 5 feuillets de carbone, et des monocouches de carbone, tous deux de bonne qualité mais de faible surface (Khan et al., 2010).

Des méthodes descendantes permettent de produire du graphène à grande échelle à partir de la transformation du graphène oxydé. L'expansion du Go peut être réalisée aussi bien de manière mécanique que chimique. L'exfoliation par arc électrique, bien connue pour la production de CNTs, permet d'obtenir du graphène monocouche en appliquant un courant électrique important (100 à 150A) sous hydrogène. La première étape de cette méthode de production est l'oxydation du graphite, très souvent réalisée par l'action d'agents oxydants puissants, selon la méthode de Hummers (Hummers & Offeman 1958). Une fois produit, le Go est placé au sein d'une solution de NMP afin de le réduire. Le graphène exfolié est ensuite obtenu par l'application d'un courant électrique généré entre la cathode, composée d'une tige de graphite, et l'anode, composée d'un cylindre de graphite à l'intérieur duquel se trouve le Go (Wu et al., 2009). Jin et al. (2013) ont conservé uniquement l'approche chimique de ce mode de fabrication en utilisant du Go préalablement exfolié, ensuite réduit dans une solution d'hydroxyde de potassium chauffée à 80°C pour obtenir du graphène monocouche.

Les approches ascendantes de production du graphène consistent à extraire et réarranger les atomes de carbone d'un précurseur carboné pour former des feuillets de carbone. Ces méthodes reposent sur la synthèse par Dépôt de Vapeurs Chimiques Catalysées (DVCC) (Zhu et al., 2010). La condensation des atomes de carbone à partir des précurseurs carbonés, comme le méthane, s'effectue à haute température (500- 1500°C). Lors de ce procédé, un substrat métallique sert à catalyser le dépôt des atomes de carbone de manière ordonnée pour former des feuillets de carbone. Le choix du couple précurseur/catalyseur métallique peut avoir une influence sur les dimensions du graphène produit. Le cuivre reste le meilleur

catalyseur pour produire du graphène monocouche, le nickel quant à lui permet d'obtenir du graphène composé de 1 à 10 feuillets de carbone. Berger & Ibrahimi (2011) ont choisi, eux, d'utiliser uniquement un substrat carboné : le carbonate de silice, sans catalyseur. La sublimation du silicium à 1500°C laisse place aux atomes de carbone formant des nids d'abeilles afin d'obtenir du graphène épitaxié<sup>5</sup>. Les auteurs ont ainsi pu obtenir du graphène multicouches avec des propriétés similaires au graphène monocouche. Néanmoins cette technique présente un faible rendement et des coûts importants liés au matériau utilisé (Bares, 2016). Un autre mode de fabrication utilisé par une équipe de recherche américaine (Dato et al., 2008) et belge (Malesevic et al., 2008) fait appel à un réacteur plasma à micro-ondes. La synthèse du graphène s'effectue alors en phase gazeuse sans substrat. Sous l'effet des micro-ondes, le méthane et le dihydrogène, soumis à une température proche de 700°C, donnent forme au graphène dans un réacteur. Ces équipes ont ainsi réussi à produire du graphène composé de 1 à 6 feuillets de carbone.

Suivant la méthode de fabrication, la suspension finale de graphène peut contenir d'autres entités liées au mode de production et au matériau initial, pouvant gêner son utilisation (Tableau 1). Dans le cas des études écotoxicologiques, la présence de surfactants peut par exemple conduire à des erreurs d'interprétations importantes. Certains auteurs recommandent ainsi une étape de purification du graphène afin de séparer le graphène de ces entités, pouvant être à l'origine d'une toxicité connue chez certains organismes (Chabot et al., 2013). Après une exfoliation du graphite à la gomme arabique, le graphène est purifié grâce à une étape de centrifugation/filtration combinée à une hydrolyse acide afin d'éliminer les résidus de gomme arabique.

Pour la synthèse de Go, la méthode de fabrication la plus connue a été développée par Hummers, déjà évoquée plus haut, souvent reprise et améliorée par d'autres équipes, comme Tölle, Gamp, & Mülhaupt (2014) ou J. Chen et al. (2015), pour citer les plus récents. Les modifications apportées par les études récentes préconisent une étape de purification du Go. De cette manière, tous les résidus non oxydés mais également les impuretés pouvant provenir du graphite et/ou des agents oxydants sont éliminés. Cette étape de purification est réalisée à l'aide de séries de centrifugation et filtration successives. Les propriétés électriques du Go peuvent être améliorées en éliminant les fonctions oxygénées greffées aux feuillets de carbone

---

<sup>5</sup> Graphène épitaxié : graphène obtenu à partir d'une technique de croissance orientée en présence de cristaux (de même nature ou de nature différente) possédant un certain nombre d'éléments de symétrie communs dans leurs réseaux cristallins

(Stankovich et al., 2007). Cette réduction peut se réaliser par différents procédés impactant les propriétés du matériau généré, appelé oxyde de graphène réduit, et donc son champ d'application (Pei and Cheng, 2012). Ces procédés de réduction font souvent appel à des agents réducteurs assez nocifs pour l'environnement, mais de nouvelles études cherchent à remplacer ces produits par des agents verts limitant ainsi l'impact sur l'environnement (De Silva et al., 2017).

### 2.1.2 Propriétés physico-chimiques et applications

Le graphène monofeuillet est le premier matériau à deux dimensions et donc le plus fin jamais synthétisé. L'épaisseur monoatomique du graphène le rend non seulement transparent, mais flexible. Il peut ainsi être intégré dans tous les autres types de matériaux sans en altérer la couleur, mais également prendre toutes les formes souhaitées. Le graphène peut alors être à l'origine de la création de nouveaux matériaux inédits, créés sur demande en fonction de l'application voulue. La morphologie et la structure du graphène ouvrent de nouvelles perspectives dans une multitude de secteurs d'activités (Banks et al., 2004; Zhu et al., 2010; Zurutuza and Marinelli, 2014). Du fait de sa découverte tardive, le graphène n'est encore qu'au début de ses potentielles utilisations. Ainsi, les prévisions du marché des produits à base de graphène annoncent une valeur de 675 millions de dollars d'ici 2020 (Ahmed and Rodrigues, 2013).

Chaque atome de carbone composant les feuillets du graphène présente une orbitale  $\pi$  contribuant à la formation d'un réseau d'électrons libres. Novoselov et ses collaborateurs (2005) ont ainsi mis en évidence que les atomes de carbone des feuillets de graphène présentent des particules de types fermion de Dirac (toutes les particules chargées comme les électrons ou les positrons). Ces éléments ne présentent quasiment aucune masse facilitant ainsi leur mobilité à la surface des feuillets de carbone. Une faible énergie thermique, appelée bruit thermique de Johnson, est libérée lors du déplacement des électrons, capacité s'ajoutant ainsi à la liste des propriétés exceptionnelles du graphène (Zhang et al., 2005). Ces transports d'électrons améliorés sont alors à l'origine des effets quantiques, comme l'effet quantique de Hall<sup>6</sup>, traduisant une bonne qualité électronique (Ribeiro-Palau et al., 2015). Ces propriétés

---

<sup>6</sup> L'Effet de Hall quantique est un phénomène connu dans le domaine de l'électromagnétisme selon lequel « un courant électrique traversant un matériau baignant dans un champ magnétique, engendre une tension perpendiculaire à ce dernier ».



électriques peuvent varier en fonction de la température et de la pression subies par les nanoparticules de graphène (Novoselov et al., 2007). Le graphène présente également une conductivité thermique proche de celle du diamant, qui est la plus élevée de tous les matériaux connus à ce jour. L'ensemble de ces propriétés confèrent ainsi au graphène une capacité de transport électronique sans précédent exploitée dans de nombreuses applications à grande échelle, notamment dans la production de super-condensateurs (Brownson et al., 2011). Il est maintenant possible d'envisager son utilisation dans divers domaines, mais surtout dans le domaine des composants électroniques flexibles qui recourt à des nanotechnologies de plus en plus poussées. Les feuillets de graphène sont alors utilisés dans la production de transistors optimisés, en diminuant la taille des composants tout en augmentant leur conductivité électrique (Zhu et al., 2010). Des recherches théoriques et expérimentales ont pu mettre en évidence les avantages de l'utilisation des monofeuillets de graphène dans la production de capteurs. En effet, grâce à sa conductance, sa grande surface spécifique ainsi que le faible bruit de Johnson généré, le graphène monofeuillet est considéré comme un élément prometteur dans la détection de molécules variées, comme les gaz ou les biomolécules (protéines et ADN) (Mohanty and Berry, 2008; Ohno et al., 2009). Un transfert de charge entre les molécules adsorbées et le graphène, en tant que donneur ou accepteur d'électrons, serait alors à l'origine de la réponse chimique à l'origine de ce phénomène modifiant les caractéristiques électriques du graphène. Le graphène pourrait également rentrer dans la composition d'électrodes utilisées dans les dispositifs de stockage d'énergie (Winter et al., 1998). Il a donc un potentiel non négligeable dans la production de batteries rechargeables, grâce à sa capacité de liaison aux ions lithium, comme les batteries de portable ou les voitures hybrides (Brownson et al., 2011; Wu et al., 2010). Tous les produits électroniques pourront ainsi bénéficier d'améliorations inédites grâce à l'intégration du graphène dans des composants de nombreux produits du quotidien, comme les moyens de communication mais également les moyens de transport.

Les propriétés optiques du graphène résultent de sa structure, mais également de ses propriétés électroniques. La transmission de la lumière du domaine du visible laisse apparaître le graphène transparent. Cette transparence décroît cependant avec l'épaisseur du graphène. Cette propriété ouvre d'autres possibilités d'application du graphène, notamment de sa forme oxydée. Il peut ainsi être utilisé dans la production de films conducteurs transparents. Une méthode de fabrication du graphène et du graphène oxydé réduit a ainsi été développée à partir de ces films conducteurs (Park and Ruoff, 2009). Ces matériaux pourront également

entrer dans la composition de produits commercialisés à grande échelle, comme la production d'électrodes de panneaux solaires (Wang et al., 2008), ou encore les dispositifs à cristaux liquides, composants cruciaux des technologies actuelles (Blake et al., 2008). Les propriétés dérivées comme l'absorption des ultra-violets (UV) ou encore la fluorescence font du graphène un matériau prometteur pour la production de biocapteurs utilisés dans les thérapies cancéreuses (Chung et al., 2013; Feng and Liu, 2011). Le secteur biomédical représente donc une perspective offrant de multiples applications pour les nanoparticules de la famille du graphène (Shen et al., 2012).

Malgré le fait que ce soit un des matériaux les plus légers, en terme de densité, produits jusqu'à ce jour, le graphène présente une résistance mécanique impressionnante, près de 10 fois supérieure à celle de l'acier (Geim, 2009; Wu and Drzal, 2012). Face à un matériau comme le diamant, le graphène monofeuillet présente une capacité de résistance intrinsèque plus importante, tout en gardant une certaine flexibilité (Lee et al., 2008). Cette propriété est utilisée dans la production de matériau spécifique comme des raquettes de tennis ou encore des textiles ultra résistants aux chocs.

## 2.2 Les nanotubes de carbone

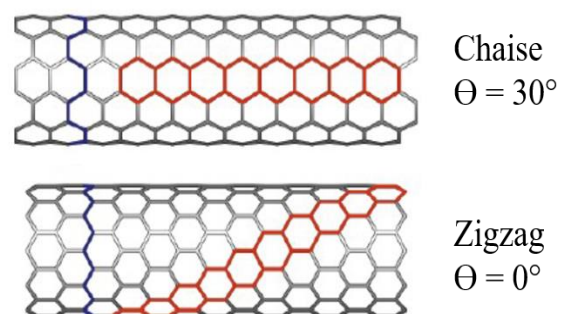
Quelques années après la découverte du fullerène, l'engouement continue pour les nanoparticules carbonées, notamment pour Iijima (1991) qui cherche à synthétiser une autre forme allotropique du carbone. Ainsi, en s'inspirant du mode de fabrication des fullerènes, il observe la formation de microtubules hélicoïdaux composés de structure graphitique, communément appelé aujourd'hui les nanotubes de carbone. Le procédé de fabrication utilisé lui permet alors d'obtenir des CNTs composés d'un nombre de parois variant entre 2, pour les CNTs double ou bi parois (DWCNTs), et 50, regroupés sous le terme de CNTs multiparois (MWCNTs). Deux ans plus tard, Iijima & Ichihashi (1993) parviennent à synthétiser des nanotubes composés d'une seule paroi (SWCNTs).

Les CNTs représentent ainsi une famille de nanoparticules carbonées composée d'un ou plusieurs feuillets de carbone  $sp^2$ , comme le graphène, mais enroulés sur eux-mêmes pour former une structure cylindrique. Les extrémités des tubes peuvent être cloisonnées par une structure sphérique comparable à un demi-fullerène. Le diamètre du cylindre respecte la taille nanométrique entre 0,75 et 6,7 nm, mais les CNTs peuvent mesurer plusieurs micromètres de

long. Le diamètre de la paroi interne des MWCNTs peut être adapté afin de conserver cette échelle nanométrique, même pour les MWCNTs présentant jusqu'à 50 parois. La surface spécifique des CNTs varie en fonction du nombre de parois. Ainsi, un CNT voit sa surface spécifique (en  $\text{m}^2/\text{g}$ ) diminuer avec le nombre de parois qui le composent (Peigney et al., 2001). La taille des CNTs n'est pas le seul facteur déterminant leur surface spécifique, leur état dans le milieu conditionne également ce paramètre. Les CNTs présentent une forte capacité d'adsorption avec les impuretés, générées lors de leur synthèse, mais également entre eux, par des forces de Van Der Waals, conduisant à la formation d'agglomérats plus ou moins ordonnés en milieu aqueux (Agnihotri et al., 2006). L'agrégation des CNTs en solution réduit alors leur surface spécifique. La circonférence, la longueur ainsi que la surface spécifique des CNTs peut varier de même que la disposition des atomes de carbone. Cette caractéristique, appelée chiralité, décrit l'angle entre les réseaux hexagonaux et l'axe du nanotube. Pour faciliter cette représentation on peut également décrire cette chiralité en imaginant un feuillet de carbone enroulé sur lui-même suivant différents axes. Suivant la taille de cet angle, différents types d'enroulements, ou hélicité, existent : zigzag lorsque cet angle est nul, chaise lorsqu'il est à  $30^\circ$ , et lorsqu'il est compris entre  $0$  et  $30^\circ$  on parle de nanotubes chiraux (Scarselli et al., 2012) (Figure 5).

L'ensemble de ces paramètres confèrent aux CNTs des propriétés différentes qui seront déterminantes dans leurs applications, mais également en terme de comportement dans l'environnement.

Figure 5. Représentation schématique des différentes hélicités possibles des CNTs. (a) CNT non chiral de type chaise (b) CNT non chiral de type zigzag.  $\theta$  représente l'angle entre les réseaux de carbone hexagonaux et l'axe du nanotube (d'après Bernard 2007).



### 2.2.1 Mode de production

Dans une optique de production à grande échelle, de nombreuses études ont été publiées sur la synthèse contrôlée des nanotubes de carbone dans le but d'améliorer la qualité du produit final. Depuis leur découverte, trois principales techniques de production des CNTs à haute température sont utilisées : la décharge d'arc électrique, l'ablation laser et le DVCC, déjà mentionnée pour la synthèse de graphène.

La technique de production par décharge d'arc électrique a été utilisée dans un premier temps afin de produire des fullerènes en grande quantité, et elle a été reprise par Iijima (1991) pour la première synthèse de CNTs. Cette technique de production des CNTs, comme la plupart des nanoparticules de carbone, utilise comme matière première le graphite. Elle repose sur l'application d'un courant électrique de forte intensité (50 à 100 A) entre deux électrodes de graphite sous atmosphère inerte (hélium ou argon). La production d'un arc électrique entre ces électrodes entraîne la formation d'un plasma à haute température ( $> 3000^{\circ}\text{C}$ ). L'anode étant progressivement sublimée sous l'effet de cette température, les atomes de carbone provenant du graphite se vaporisent à l'état plasmatique autour de la cathode. A partir de la vapeur de carbone, les atomes de carbone se condensent sur la cathode pour former les CNTs, avec deux ou plusieurs parois. Pour la synthèse de SWCNTs, l'utilisation d'un ou plusieurs catalyseurs métalliques, comme le nickel, le fer, le cobalt, est nécessaire. Dans le cas où plusieurs catalyseurs sont utilisés, le choix du couple d'éléments métalliques peut fortement influencer le rendement de cette technique de production. En 1997, Journet et ses collaborateurs ont optimisé cette technique de production en choisissant comme catalyseurs métalliques le couple nickel/yttrium révélant un rendement de production inédit. Ces résultats ont permis à plusieurs entreprises de production de CNTs d'employer le même protocole afin de réaliser une production de masse.

La deuxième technique de production de CNTs à haute température est l'ablation laser. Cette méthode de production consiste à vaporiser un disque de graphite par irradiation laser. Toujours sous atmosphère inerte, la cible est placée dans un four à  $1200^{\circ}\text{C}$ , et deux impulsions laser de fréquences différentes entraînent un réarrangement des atomes de carbone au niveau de la zone d'impact. Les atomes de carbone forment ainsi des formes cylindriques lors des irradiations laser pour arriver à la synthèse de MWCNTs. Cette technique peut également être couplée à l'utilisation de catalyseurs métalliques afin de produire des SWCNTs (Scott et al., 2001). Un autre type de laser peut être utilisé pour simplifier cette

technique de production, comme l'a démontré Maser et al. (1998) en employant un laser  $\text{CO}_2$ . L'ablation laser est une méthode longue et nécessite une mise en œuvre complexe, entraînant des coûts importants liés à l'utilisation d'un laser puissant et de matière brute d'une grande pureté, afin d'engendrer le moins d'impuretés possible dans le produit final. Ainsi le rapport entre les coûts et le rendement de cette méthode n'est pas très intéressant. Cependant, cette technique présente un avantage non négligeable, en permettant une production spécifique des CNTs de bonne qualité structurale, c'est-à-dire avec un bon agencement des atomes de carbone similaire à celui du graphène, et de taille contrôlable, en fonction de la température et des catalyseurs métalliques employés. Malgré ces avantages, cette technique ne permet pas pour le moment une production à l'échelle industrielle.

La synthèse des CNTs peut également être effectuée par dépôt de vapeur chimique catalysée (DVCC). Cette méthode est la plus développée et la plus utilisée à l'heure actuelle. Ce procédé consiste à condenser les atomes de carbone d'une source de carbone choisie sur un catalyseur métallique grâce à un traitement thermique ( $500\text{-}1200^\circ\text{C}$ ). Dans cette technique les atomes de carbone constituant les CNTs ne proviennent pas du graphite mais d'hydrocarbures, comme le méthane ( $\text{CH}_4$ ) ou le benzène ( $\text{C}_6\text{H}_6$ ), et d'hydrogène. Les catalyseurs métalliques les plus utilisés sont le fer, le nickel, le cobalt et le molybdène (Lam et al., 2006). Cette méthode de production permet d'obtenir aussi bien des MWCNTs que des SWCNTs, dont le rendement peut varier en fonction des métaux catalytiques et des sources carbonées choisis (Guo et al., 1995; Laurent et al., 1998). Le nombre de parois des CNTs peut être contrôlé en fonction du catalyseur métallique employé (Flahaut et al., 2003). Un avantage majeur de cette technique est la production en continu des nanotubes, révélant un rendement important de cette technique. Ce n'est pas le cas pour les SWCNTs dont la production reste un peu plus compliquée avec un rendement plus faible que pour la synthèse des MWCNTs. Cependant une amélioration de cette technique de production en présence d'eau, supprimant le carbone amorphe, permet de synthétiser des forêts de SWCNTs en croissance non limitée pouvant atteindre jusqu'à 2 cm (Bernard, 2007) ! Un contrôle parfait du diamètre et de la chiralité des CNTs produits constitue un avantage très apprécié par les industriels pouvant ainsi produire des CNTs de tailles variables. La taille des CNTs sera alors conditionnée en fonction de l'application recherchée. De plus, la croissance des CNTs peut se faire à des endroits prédéterminés pouvant ainsi former des « pelouses » de CNTs alignés perpendiculairement à la surface (Zhang et al., 2011). Même si la relation entre les conditions expérimentales (température, pression, ...) et les propriétés obtenues par les CNTs est encore

mal connue (See and Harris, 2007), de nombreux paramètres peuvent être contrôlés de manière précise grâce à cette méthode, comme l'orientation, l'alignement des atomes de carbone ou encore la longueur, le diamètre, et la pureté des CNTs produits (Liné et al., 2017). La synthèse par DVCC permet tout de même de produire des MWCNTs en masse, elle est donc préférentiellement employée pour une synthèse à grande échelle. D'autres techniques moins connues sont associées à la technique de DVCC, dérivant du même principe. Ces techniques, comme la DVCC au sein d'un réacteur à chambre fluide (Corrias et al. 2003) ou la pyrolyse liquide, permettent de synthétiser des MWCNTs de très bonne qualité mais le rendement est tel que cette technique n'est pas envisagée pour une production à l'échelle industrielle (Monthieux, 2012; Terrones, 2004).

Une technique appelée décomposition sous haute pression de monoxyde de carbone, permet d'obtenir des SWCNTs en grande quantité. Développé par Nikolaev et ses collaborateurs (1999), ce procédé fait appel à une décomposition catalytique à 1200°C. La source de carbone ici est constituée par un flux de monoxyde de carbone, avec lequel est associé un flux de pentacarbonyl de fer, qui en se décomposant sous l'effet de la chaleur, constitue le catalyseur de la formation des SWCNTs. De cette manière, aucune impureté d'origine organique ou métallique n'est retrouvée avec les SWCNTs. Cette méthode permet de générer des SWCNTs, avec une large distribution de taille, sans interruption et peut ainsi être employée comme méthode de production industrielle.

La plupart des procédés de fabrication des CNTs induisent la présence d'impuretés en plus ou moins grande quantité selon la technique, comme la présence de carbone amorphe ou de résidus de métaux catalytiques (Tableau 1). Ainsi une étape de purification est nécessaire pour obtenir un produit final le plus pur possible afin de pouvoir être utilisé dans une variété de produits aux applications différentes. Des résidus métalliques sont présents sous la forme de nanoparticules, piégées au sein de la couche externe du nanotube. Plusieurs processus de purification ont été développés afin de retirer ces impuretés métalliques : l'oxydation par voie acide ou par voie gazeuse, la filtration et la chromatographie, mais aussi la purification par intercalant (Nanowerk, 2017). L'oxydation par voie gazeuse est essentiellement utilisée pour la purification des MWCNTs (Chiang et al., 2001a). L'utilisation d'acide nitrique permet à la fois d'oxyder les métaux mais également d'éliminer toutes les impuretés (Dillon et al., 1999). Cependant ces techniques altèrent fortement les CNTs présentant des défauts de structure. Une grande quantité peut ainsi être purifiée mais beaucoup de produits de départ sont éliminés abaissant les rendements de production. Chiang et son équipe (2001) ont alors testé la

purification de SWCNTs par oxydation des métaux à basse température conduisant à la réduction des impuretés carbonées présentes sur la paroi des SWCNTs, suivie par un lavage à l'acide chlorhydrique des résidus ferreux. La purification par voie acide consiste à réaliser une étape de filtration suivie d'une dissolution par des solvants organiques et/ou des acides concentrés permettant d'éliminer les résidus graphitiques et de réduire les impuretés métalliques et carbonées respectivement (Rinzler et al., 1998). Pour éliminer les résidus d'acides et de solvant, des centrifugations successives sont appliquées, et dans certains cas, elles sont suivies par une étape de chromatographie. Enfin, une dernière méthode de purification consiste à ajouter un intercalant de chlorure métallique, comme le chlorure de cuivre, entre les structures graphitiques permettant l'oxydation des particules libres tout en limitant l'altération des CNTs. Cependant, cette méthode relativement longue (plus d'une semaine), peut entraîner la présence d'autres résidus (intercalants) et la dégradation des tubes. De surcroît cette méthode n'est efficace que sur les particules métalliques libres mais pas sur celles qui sont piégées entre les parois des CNTs.

Tableau 1. Produits et impuretés éventuelles générées à partir de différents précédés de production du graphène et des CNTs

Techniques de production	Précurseur	Catalyseur	Impuretés possibles	Produit obtenu
Exfoliation mécanique	Graphite		Carbone amorphe	Graphène mono feuillet
Exfoliation électrochimique	Graphite		NMP et propylène	FLG < 5 feuillets Graphène
Exfoliation par arc électrique	GO Graphite oxydé		NMP et propylène Hydroxyde de potassium	
DVCC	Méthane et dihydrogène		Carbone amorphe Hydrocarbure Suie	Graphène 1 - 6 feuillets
	Méthane/ Benzène/ Hydrogène	Cuivre Nickel		Graphène mono feuillet Graphène 1 – 10 feuillets
		Nickel/Fer/Cobalt/Molybdène	Résidus métalliques Carbone amorphe Hydrocarbure Suie	SWCNT/MWCNT
	Carbonate de silice			Graphène épitaxié
Arc électrique	Graphite	Fer/Cobalt		MWCNT/SWCNT
Ablation laser	Graphite		Carbone amorphe	MWCNT

Une fois les CNTs produits, plusieurs types de fonctions peuvent être greffées à leur surface afin d'en modifier les propriétés physico-chimiques, et donc leur état de dispersion dans les milieux. Un type de fonctionnalisation largement utilisé est l'ajout de groupements carboxyles afin de produire des CNTs oxydés. Cette fonctionnalisation s'effectue par oxydation des CNTs grâce à un acide, comme l'acide nitrique utilisé lors de la purification, ou en rompant les liaisons covalentes entre les atomes de carbone par de lourds traitements aux ultrasons.

Cette fonctionnalisation modifie la structure des CNTs de manière définitive. Un autre type de fonctionnalisation, non covalente, consiste à adsorber des molécules organiques à la surface des CNTs grâce aux interactions entre les orbitales  $\pi$  des carbones  $sp^2$ . Ces types d'interactions s'ajoutent aux interactions électrostatiques et hydrophobes expliquant l'affinité des CNTs pour certains composants organiques comme les phospholipides qui composent les membranes cellulaires ou encore l'ADN (Mu et al., 2014; Zheng et al., 2003). Aucun CNT fonctionnalisé n'a été utilisé dans ces travaux de thèse.

### 2.2.2 Propriétés physico-chimiques et applications

Dès leurs découvertes, il y a déjà plus de 25 ans, les CNTs ont suscité un fort engouement auprès des scientifiques. De nombreuses recherches ont été effectuées tout au long de ces années pour mettre à jour les différentes propriétés physico-chimiques des CNTs, et leurs possibles applications dans tous les secteurs d'activités envisageables. Ce sont les NPCs les plus étudiées, et non sans raison. Les CNTs présentent des propriétés très appréciées par les industriels pour améliorer les produits actuels et tendre vers la miniaturisation des technologies. En 2015, le marché des CNTs représentait 3,43 milliards de dollars et devrait atteindre 8,7 milliards en 2022 (Markets and Markets, 2017).

La première exploitation des CNTs mettait à profit une propriété physique intrinsèque à sa structure. En effet, l'assemblage des atomes de carbone confèrent une résistance mécanique sans précédent aux CNTs. Depuis leur découverte, de nombreuses études ont théorisé les limites des propriétés mécaniques des CNTs, définissant un module d'élasticité, appelé le module d'Young, afin de déterminer cette résistance mécanique. Le module d'Young exprime le rapport entre la contrainte exercée, pour modifier la longueur d'un corps, et le changement effectif produit par cette force. Le module d'Young calculé pour les CNTs est très élevé, tout en étant indépendant de leur diamètre et de leur chiralité. Pour donner une comparaison, les toiles d'araignée, connues pour posséder une forte résistance à la traction, présentent un module d'Young 250 fois plus faible que celui des CNTs (Lu, 1997). Ils peuvent ainsi être soumis à de fortes contraintes mécaniques sans être déformés ou fragilisés. De surcroît, les déformations infligées aux CNTs sont réversibles mais pas de manière spontanée. Ce retour à l'état initial doit se réaliser à l'aide de nanomanipulations (Bernard, 2007). Ces propriétés mécaniques sont directement exploitées dans la production de Systèmes ElectroMécaniques Nanométriques (SEMN) regroupant toutes les structures mécaniques miniatures avec des fonctions de capteurs ou actionneurs, comme les nanomoteurs. Leur diamètre nanométrique



ainsi que leur rigidité et leur grande flexibilité conduisent les CNTs à être utilisés dans de nombreux domaines notamment dans le renforcement de matrices polymériques. Ces matrices polymériques renforcées peuvent avoir plusieurs applications allant de la biomédecine en développement (fabrication de muscles artificiels), aux produits commercialisés à grande échelle comme les articles sportifs (raquette de tennis, cadre de vélo, ou encore crosse de hockey) où la capacité de résistance alliée à la légèreté est très recherchée. Dans le secteur des pneumatiques, les CNTs pourraient remplacer le noir de carbone, rendant les pneus isolants, afin d'améliorer la conductivité permettant ainsi de faciliter le procédé de fabrication.

En plus de leurs propriétés mécaniques, les CNTs ont montré des capacités thermiques peu exploitées à ce jour. La conductivité thermique des CNTs, comparable celle du graphène (de l'ordre 6000 W/mK), est de grande ampleur (Berber et al., 2000). Cette propriété semble être conditionnée par le diamètre du CNT, où les SWCNTs présentent une conductivité thermique plus importante. Les MWCNTs conduisent moins bien la chaleur que les SWCNTs, mais ont une conductivité thermique plus importante que le graphite lorsqu'ils sont isolés (Hone, 2001) (Tableau 2). Cette caractéristique est due au fait que l'énergie quantique vibrationnelle, générée sous l'effet du déplacement des électrons, circule très bien le long des CNTs (Ferreira, 2006).

Tableau 2. Récapitulatif et comparaison des propriétés caractérisant un graphène monofeuillet et un nanotube de carbone simple paroi. Données tirées de plusieurs articles scientifiques (Hone et al., 2001; Hong et al., 2007; Lu et al., 1997; Popov et al., 2004; Zhu et al., 2010)

Propriétés	Graphène	Nanotube de carbone
Nombre de dimension	2	1
Dimension nanométrique	Epaisseur	Diamètre
Taille	0,335 nm	0,4 – 3 nm
Surface spécifique	1 520 - 2 630 m <sup>2</sup> .g <sup>-1</sup>	1315 m <sup>2</sup> .g <sup>-1</sup>
Mobilité des électrons	15 000 - 200 000 cm <sup>2</sup> .V <sup>-1</sup> .s <sup>-1</sup>	10 000 cm <sup>2</sup> .V <sup>-1</sup> .s <sup>-1</sup>
Conductivité thermique	600 - 6 000 W/mK	1 700 - 6 000 W/mK
Elasticité	1 000 GPa	120 GPa
Force de fracture	130 GPa	0,12 GPa
Transparence	98%	92%

A l'heure actuelle, l'attention des chercheurs se tourne vers une combinaison entre les propriétés mécaniques des CNTs et leurs propriétés électroniques, afin de développer de nouvelles nanotechnologies (Scarselli et al., 2012). La structure cylindrique des nanotubes de

carbone leur confère des propriétés comparables aux composants métalliques et semi-conductrices (Popov, 2004). La géométrie structurale (diamètre, chiralité, défauts ...) et le degré de cristallinité (parfait agencement des atomes de carbone) conditionnent en grande partie la capacité de transport électronique des CNTs (Dai et al., 1996). Ainsi, seuls les CNTs avec une hélicité de type chaise ont des propriétés métalliques, les autres types de CNTs sont semi-conducteurs (Hong and Myung, 2007). Les CNTs présentent une capacité de transport électronique 1000 fois plus grande qu'un composant métallique usuel, comme le cuivre ou l'aluminium (Dai et al., 2006). Les semi-conducteurs, eux, permettent de moduler le courant et sont ainsi utilisés dans la fabrication de transistors. Il a été démontré à plusieurs reprises que ces propriétés électroniques étaient dépendantes des conditions expérimentales, notamment de la température (Baughman et al., 2002). Les SWCNTs, seuls ou assemblés en faisceaux, avec un faible diamètre semblent présenter un pouvoir conducteur plus important que les MWCNTs, et sont alors considérés comme des « super-conducteurs » (Kasumov et al., 1999).

Les capacités de transport électroniques des CNTs permettent ainsi d'envisager leur utilisation dans la fabrication de sources d'émission (diodes, lampes à rayon X, ... ) entrant dans la composition de produits comme les écrans de télévision ou de téléphone (des CNTs sont déjà intégrés dans la composition des téléphones Samsung depuis 2005) (Terrones, 2004; Yue et al., 2002). Dans le domaine des technologies portables, les CNTs ont également montré des capacités réversibles de stockage de lithium, utilisés dans la fabrication des batteries portables, bien supérieures aux matériaux carbonés utilisés lors de leur développement (Yang and Wu, 2001). Alliant à la fois des propriétés mécaniques et électriques les CNTs sont de bons candidats pour la fabrication d'appareils électrochimiques comme les super-condensateurs et actionneurs. Ce type d'appareils permet de fournir à la fois une puissance électrique importante et une grande capacité de stockage, utiles dans des produits comme les voitures hybrides (Baughman et al., 2002). Toujours dans le domaine des automobiles, C. Liu et son équipe (1999) ont pu mettre en évidence le stockage d'hydrogène ( $H_2$ ) et d'argon au sein des CNTs. Ainsi, cette capacité de stockage des gaz au sein des CNTs représentent un avantage dans la fabrication de piles à combustible pour les véhicules électriques. Tout comme le graphène, les CNTs sont capables d'adsorber certains groupements chimiques à leur surface. Cette caractéristique a permis à Kong et ses collaborateurs (2000) d'utiliser les CNTs afin de détecter des gaz toxiques, comme le dioxyde d'azote et l'ammoniac.

### 2.3 Risques potentiels

A l'heure actuelle, la plupart des NPCs sont encore utilisées à l'état de prototype, mais seront dans un futur proche présentes dans de nombreux produits du quotidien. Les applications majeures des NPCs touchent principalement le secteur des nouvelles technologies, qui prennent de plus en plus de place dans notre société et notre mode de vie. Une production en masse de ces produits prometteurs a récemment été enclenchée. Cette industrialisation des NPCs soulève alors des interrogations quant à leur présence dans l'environnement. En effet, à chacune des étapes de leur cycle de vie, de la production des matériaux brutes jusqu'à leur élimination en passant par leur utilisation, les NPCs sont susceptibles d'être rejetées dans l'environnement. Elles peuvent ainsi atteindre tous les compartiments environnementaux passant par différentes voies de contamination. Du fait de la présence des NPCs manufacturées dans l'environnement, difficilement décelable (estimation des concentrations en CNTs dans les eaux de surface de l'ordre de  $0,0035 \text{ ng.L}^{-1}$  (Gottschalk et al., 2009)), elles sont désignées comme des contaminants émergents. Partant de ce constat, quelques questionnements ont rapidement été soulevés concernant leurs effets non seulement sur l'Homme mais aussi sur l'environnement. Les études de risques pour la santé humaine et environnementale sont donc devenues nécessaires afin de déterminer la toxicité de ces NPCs.

Dans le cadre de l'évaluation des risques liés à l'exposition aux NPCs, les études de toxicité et d'écotoxicité doivent prendre en compte la durée mais également le niveau d'exposition. La communication des entreprises sur le niveau de production des NPCs est limitée, rendant l'estimation de la quantité émise dans l'environnement difficile. Mais ce manque de communication n'est pas le seul facteur limitant la détermination du niveau d'exposition. En effet, ce critère est conditionné à la fois par les propriétés intrinsèques des NPCs décrivant leur comportement dans le milieu, mais aussi par les conditions environnementales (Crane et al., 2008). Ainsi, la prédiction du devenir des NPCs dans l'environnement reste complexe et encore mal connue à ce jour. Des techniques de mesure existent mais sont peu développées, à cause de leur coût et de leur complexité. Le niveau d'exposition des organismes à travers l'environnement reste alors difficile à quantifier.

Malgré cette difficulté de nombreuses études tentent d'évaluer le risque des NPCs sur l'Homme et l'environnement (Peralta-Videoa et al., 2011). Des réglementations, comme la norme ISO/TR 13014 :2012, ont également été mises en place afin d'uniformiser les méthodes d'évaluation des risques des NPCs. D'après ces normes, la dangerosité des NPCs

est fortement liée à l'ensemble de leurs caractéristiques structurales et chimiques. Cependant, Nel et son équipe (2006) ont soulevé un point très important dans la réalisation des études de risque concernant l'interaction entre les NPs et les éléments du milieu. En effet, une fois dans l'environnement, les NPs peuvent voir leurs propriétés physico-chimiques modifiées par le biais de plusieurs phénomènes, comme la photo-oxydation ou encore l'adsorption ionique de certains éléments présents dans le milieu. Ainsi, il est fondamental de prendre en compte non seulement les propriétés intrinsèques des NPs mais également les nouvelles propriétés résultant de l'interaction des NPs avec leur environnement (Li et al., 2013; Mu et al., 2014; Petersen et al., 2014).

Il est clair que des études de risque doivent être réalisées afin d'assurer à la fois la santé des populations et le maintien du bon fonctionnement des écosystèmes. Pour mener à bien ces études, la mise en place de directives spécifiques claires concernant la gestion des NPs par les industriels est indispensable. Des normes concernant les paramètres pris en compte dans l'évaluation de la toxicité de ces dernières sur différents types d'organismes modèles sont également nécessaires (Handy and Shaw, 2007).

### 2.3.1 Cadre législatif

De nombreuses réglementations, dont la plus connue est intitulée Enregistrement, Evaluation, Autorisation et Restriction des substances Chimiques (*REACH Registration, Evaluation, Autorisation and restriction of Chemicals* en anglais), régissent la production et l'utilisation des substances chimiques, des médicaments ou encore des produits cosmétiques, mais ce n'est pas le cas pour les NPs. A ce jour, la manipulation des nanomatériaux en France ne fait l'objet d'aucune réglementation spécifique. Une des raisons qui pourrait expliquer cette situation est la complexité de la classification des nanomatériaux. Aujourd'hui encore, aucun consensus international ne permet de définir clairement les NPs et les nanomatériaux. Ce défaut de terminologie rend alors la mise en place d'une clause spécifique pour les NPs difficile, même au niveau national.

La régulation de la production et de l'utilisation des nanomatériaux est primordiale pour assurer un futur durable. Ce n'est que récemment que les premières directives sont établies. Selon les pays, la gestion des nanomatériaux est différente ajoutant une complexité supplémentaire à l'application d'une réglementation internationale adoptée par tous. En 2013 et 2014, la Norvège et le Danemark imposent l'enregistrement des nanomatériaux ou des produits contenant ou entraînant le rejet des nanomatériaux. Aux Etats-Unis, plusieurs

associations assurent la régulation des nanomatériaux, incluant les nanomatériaux manufacturés, comme les CNTs. En revanche, les nanomatériaux ne font pas l'objet de contrôle dans les pays asiatiques. Au niveau national, le code de l'environnement intègre à la loi Grenelle 2, trois nouveaux articles concernant les « substances à l'état nanoparticulaire ». Ces articles visent à mettre en place une déclaration annuelle des nanomatériaux mis sur le marché en France à partir du 1<sup>er</sup> Janvier 2013. En plus de l'identité du déclarant, la déclaration doit faire apparaître les quantités, les propriétés physico-chimiques et les usages de ces substances. Les informations disponibles sur leur dangerosité d'utilisation doivent être également mentionnées. Toutes informations utiles à l'évaluation des risques sur la santé et l'environnement doivent également être transmises. Il est à noter, que les informations demandées concernent en partie le mode de production des NPs, qui, nous avons pu le voir plus haut, peut induire la présence d'impuretés dont la toxicité est déjà avérée. Cependant aucune réglementation n'impose l'apparition de ces informations sur les caractéristiques du produit communiquées par le fournisseur. Un des décrets de cette déclaration précise la définition de « substances à l'état particulaire » mais détermine aussi le caractère obligatoire de cette déclaration lorsque la production atteint un seuil de 100 g par an et par substance. Les fournisseurs doivent ensuite envoyer cette déclaration à l'ANSES (Agence Nationale de Sécurité Sanitaire alimentation, environnement, travail) (ANSES, 2016). La mise en place de cette déclaration permet alors une meilleure visibilité sur l'état du marché des NPs mais aussi une meilleure traçabilité. Ce dispositif renforce également la centralisation des données toxicologiques et écotoxicologiques des nanomatériaux utilisés.

Avant la mise sur le marché d'un nouveau produit, des études doivent établir l'absence d'effets toxiques sur l'Homme et l'environnement liés à son utilisation. Pour assurer cela dans le cas de NPs, la commission européenne décide en 2005 d'établir un plan d'action « Nanoscience et nanotechnologies » sur 4 ans garantissant la réalisation des études d'évaluation des risques toxiques sur l'ensemble de la biosphère. En 2007, une nouvelle réglementation REACH est adoptée par le parlement européen. Elle vise à régir l'utilisation et la mise sur le marché de toutes les substances chimiques produites à plus de 100 tonnes par an assurant la préservation de la santé de l'Homme et de l'Environnement. Une nouvelle version de ce dispositif sera mise en vigueur durant l'année 2018 pour les substances produites entre 1 et 100 tonnes par an, sans préambule concernant leur toxicité. Cette nouvelle catégorie devrait théoriquement prendre en compte les nanomatériaux. Cependant, les nanomatériaux sont rarement produits ou importés dans ces volumes et ne sont alors que partiellement pris en

compte dans le cadre cette réglementation. Par ailleurs, cette réglementation estime que les NPs ont une identité moléculaire proche de produits déjà présents sur le marché et ne considère donc pas les NPs comme de nouvelles substances. Apparentée à des produits préexistants, la commercialisation des nanomatériaux est plus accessible. Pour la plupart des nanomatériaux, les informations demandées par REACH sont simplifiées excluant alors la communication des données écotoxicologiques. En 2012, un projet européen, REACHnano, a été initié afin de faciliter la gestion des nanomatériaux par les industriels tout en leur permettant de participer à l'évaluation des risques grâce à des outils simples en ligne. Ce projet représente ainsi une première démarche pour l'implication des nanomatériaux dans la réglementation REACH.

Au niveau international, la prise en compte des nanomatériaux dans l'évaluation des risques a été reconnue par l'Organisation de Coopération et de Développement Economique (OCDE). Pour aider les études de risque, cette organisation a alors mis en place des guides à la fois pour les industriels comme pour les scientifiques afin de faciliter et de normaliser les tests déterminant les effets toxiques des nanomatériaux sur la santé de l'Homme et de l'environnement (OCDE, 2010). Cependant, les NPs métalliques et organiques présentent toutes des propriétés physico-chimiques spécifiques. Partant de ce constat, l'OCDE a soulevé l'importance d'établir une réglementation au cas par cas pour chacune de ces NPs. Néanmoins, aucune règle claire n'a encore été fondée concernant l'évaluation des risques liés à l'exposition des nanomatériaux.

### 2.3.2 Lacunes scientifiques

L'attrait des scientifiques pour les NPs n'est plus à mettre en doute. Parmi les nombreuses études menées sur ces nouveaux objets, la plupart cherchent à découvrir de nouvelles caractéristiques physico-chimiques que les industriels pourront exploiter par la suite. D'autres travaux se tournent sur les effets de ces NPs sur le vivant, notamment sur leur rejet dans l'environnement. Des estimations de la quantité de NPs relarguées à partir des produits manufacturés ont été réalisées par des études de modélisation (Gottschalk et al., 2010, 2009). Néanmoins, les techniques de quantification sont rares et peu adaptées aux matrices environnementales (eau, sédiment, sol, organismes), d'autant plus que le carbone est l'élément le plus répandue dans la nature. Cette lacune technique est liée au fait qu'une multitude de NPs différentes existent, chacune ayant des caractéristiques physiques et

chimiques propres. Ainsi, chaque type de NP présente un comportement différent dans l'environnement. Par conséquent, un certain manque de connaissance à la fois sur les quantités présentes dans l'environnement mais également sur les risques potentiels des NPs sur la biosphère est à souligner.

Malgré les consensus gouvernementaux établissant la nécessité d'une évaluation des risques des nanoparticules avant leur commercialisation, relativement peu d'études sont réalisées sur leur toxicité (Nel et al., 2006). Dans les années 1990, une étude pionnière s'appliquant à déterminer les effets des particules ultrafines sur le système respiratoire lance la recherche en nano-toxicologie (Oberdörster et al., 2005). Si de nombreuses études toxicologiques font état d'effets des nanoparticules sur l'Homme (Hoyt and Mason, 2008; Savolainen et al., 2010), la préoccupation des effets des NPs sur l'environnement n'apparaît que bien plus tard. Le premier papier décrivant une étude nano-écotoxicologique est publié en 2004 (Oberdörster, 2004), même si le terme d'écotoxicité n'est pas mentionné au sein de ce travail. La nano-écotoxicologie apparaît alors comme une discipline émergente et reste à l'heure actuelle très limitée. Parmi les travaux réalisés sur les nanomatériaux entre 1980 et 2011, seulement une étude sur 1000 traite des effets sur l'environnement (Bour, 2015).

Malgré le peu d'études réalisées sur l'impact des NPs sur l'environnement, leur nombre ne cesse de croître d'année en année. Globalement le nombre d'études visant à évaluer les effets des nanotubes de carbone et du graphène sur les écosystèmes sont rares, où une faible proportion porte sur les formes non fonctionnalisées de ces allotropes du carbone. Parmi les NPCs, le graphène fait partie des particules les moins étudiées, contrairement aux CNTs. L'impact des NPCs sur les systèmes aquatiques a principalement été évalué sur bactéries et crustacés, tandis que les algues ne constituent pas un modèle de prédilection. Les algues au centre des quelques études publiées sont très majoritairement des algues vertes. A l'heure actuelle seulement 5 études se sont penchées sur l'évaluation de l'impact des NPCs sur les diatomées. Les biofilms comptent parmi les organismes les moins étudiés avec les mollusques (Freixa et al., 2018).

Afin d'évaluer les risques potentiels liés à l'utilisation des nanomatériaux de manière fiable, la priorité doit être mise sur l'acquisition de connaissances quant au rejet des NPs et leur comportement dans l'environnement.

### 3 Les nanoparticules de carbone et l'environnement

L'évaluation des risques liés à la production en masse des NPCs requiert de nombreuses informations concernant leur mobilité dans le milieu mais également leur réactivité et leur persistance (Nowack and Bucheli, 2007). Dès lors, des études doivent être mises en place pour déterminer les voies d'exposition. Cependant, tous les écosystèmes actuels, même ceux dit naturels, présentent la marque de l'anthropisation des milieux, notamment des rejets de xénobiotiques dans l'environnement induisant des pollutions plus ou moins sévères, notamment dans les milieux dulçaquicoles. Les eaux douces constituent seulement 2,5% du volume totale d'eau sur la planète dont une faible proportion de 0,3% représente les eaux de surface (Gleick and Palaniappan, 2010). Ces ressources en eaux potables se font de plus en plus rares, et les efforts actuels de conservation s'axent majoritairement sur la dépollution des eaux faiblement polluées. Les écosystèmes d'eau douce constituent alors un modèle d'étude pertinent en écotoxicologie.

#### 3.1 Ecosystèmes aquatiques : voies de contamination

Le rejet des NPCs provenant des nanomatériaux manufacturés est susceptible de se produire à chacune des étapes de leurs cycles de vie. Le traitement de la matière première, la transformation des NPs, leur utilisation et leur élimination sont toutes des étapes entraînant potentiellement le rejet de ces dernières dans l'environnement. L'étape de manipulation de la matière première par les travailleurs entraîne une pollution principalement par voie aérienne. De par leurs tailles et leurs formes, les CNTs, à l'état sec, sont très volatiles et se retrouvent alors facilement transportés *via* les courants d'air les plus faibles, même ceux se produisant au sein d'une chaîne de production. Par contre, le graphène, lui, est moins volatile, mais peut tout de même se retrouver dans l'atmosphère en se liant à des particules fines comme les poussières.

L'usure des produits à base d'allotropes du carbone entraîne également une libération non contrôlée de faibles quantités dans l'environnement. Ce phénomène est alors à l'origine de la différence de répartition des NPCs dans les différents compartiments environnementaux en plus de leurs caractéristiques propres. La répartition des NPCs dans les différents milieux naturels dépend alors à la fois de leur application mais également de leur devenir dans le milieu.



La principale source de pollution provient des usines de fabrication des NPs, *via* les eaux usées provenant du refroidissement des machines de production ou des lavages des matériaux, malgré les traitements d'épuration des eaux par les plantes qui s'avèrent ne pas être totalement efficaces (Brar et al., 2010). Les déversements accidentels peuvent également représenter une source de pollution directe non volontaire dans le milieu naturel. Les sources de pollution des milieux aquatiques peuvent être diffuses, avec de petites quantités rejetées en différents endroits (stations d'épurations par exemple) ou ponctuelle, où de grosses quantités peuvent être rejetées dans le milieu (accident lié au transport, rejet accidentel d'une usine, etc...). Une étude récente a pu établir une estimation des émissions de NPs dans l'environnement sur la base des modélisations et des données de production de l'année 2010 fournies par les industriels. En intégrant à la fois tous les rejets possibles à différentes étapes de leur cycle de vie ainsi que leur traitement d'épuration par des végétaux suivi de leur combustion, cette étude estime que 8 à 28 % des nanoparticules manufacturées seront rejetées dans les sols, 0,4 à 7% dans l'eau, et 0,1 à 1,5 % dans l'atmosphère (Keller et al., 2013).

Cependant les quantités émises dans les différents compartiments environnementaux ne reflètent pas les quantités retrouvées à terme dans ces derniers en raison des transferts de matière inter-compartiments. Les écosystèmes aquatiques reçoivent les polluants par voie directe *via* différentes sources de pollutions, mais aussi ceux parvenant de différents compartiments environnementaux par le biais de plusieurs processus hydrogéologiques. La contamination du milieu aquatique est fortement conditionnée par la capacité des NPCs à être transportées par les courants et les dépôts atmosphériques, mais également par les précipitations, le ruissèlement ou encore par la lixiviation. Les eaux de ruissèlement et d'infiltration chargées en NPs finissent par rejoindre les eaux souterraines et de surface par écoulement (Figure 6). L'ensemble de ces facteurs font des milieux aquatiques de véritables réceptacles finaux.

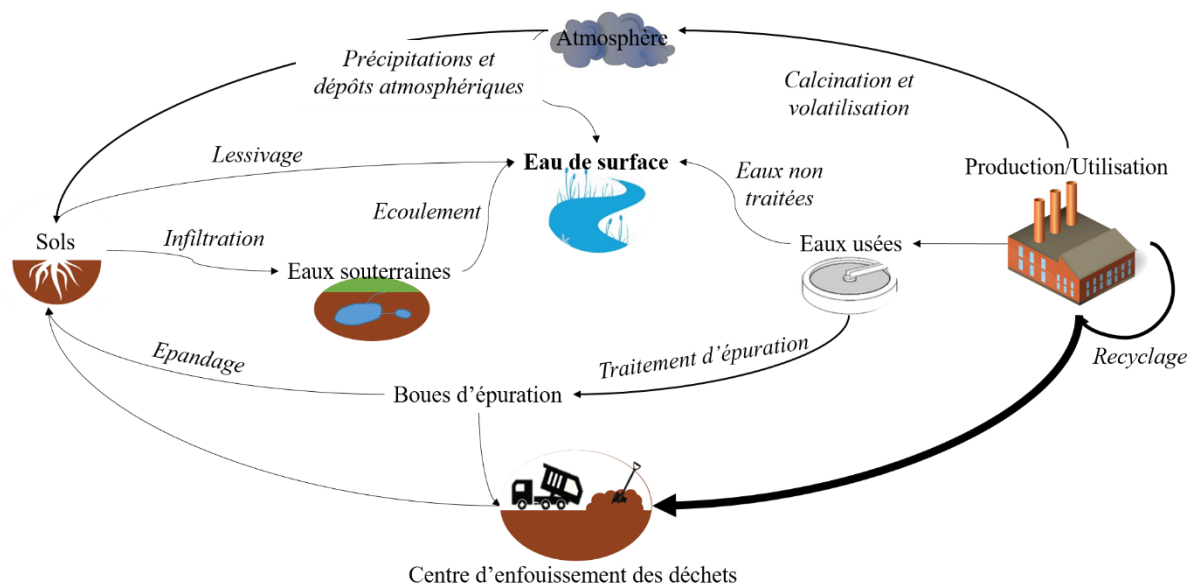


Figure 6. Processus de transport des polluants jusqu'au cours d'eau. Quelle que soit la source d'émission des xénobiotiques, l'ensemble des processus hydrogéologiques les conduisent dans tous les cas dans les milieux aquatiques constituant le réceptacle final de toute la pollution. L'épaisseur des flèches est représentative de la quantité de nanoparticules de carbone transférée. Ici, cet exemple est donné pour les nanotubes de carbone d'après les modélisations réalisées par Gottschalk et son équipe (2009).

### 3.2 Physico-chimie des NPCs dans l'environnement

Le comportement des NPCs dans le milieu aquatique est fortement conditionné par leur chimie de surface influençant leurs interactions avec les molécules organiques présentes dans les eaux de surface mais également dans les sédiments (Christian et al., 2008). Les nanotubes de carbone sont connus pour rapidement s'agglomérer en solution aqueuse contenant des cations (Sano et al., 2001) et l'hydrophobicité des feuillets de graphène entraîne la formation d'agrégats. Cependant, lorsque ces deux NPCs sont en contact avec des surfactants ou de molécules organiques dans le milieu, telles que des protéines (Karajanagi et al., 2006), des phospholipides (Wu et al., 2006), ou plus généralement de la matière organique (Hyung & Fortner 2007; Verneuil et al. 2014), leur état de dispersion se trouve modifié. Les CNTs et le graphène se désagrègent pour former une suspension stable grâce à la création de force de Van Der Waals entre les substances organiques solubles et ces dernières (Lin et al., 2011). Un des effets indirects des NPCs sur les organismes aquatiques est lié à l'adsorption des différents nutriments dans le milieu pouvant alors engendrer des interprétations erronés sur les effets propres aux NPCs (Petersen et al., 2014). La présence de matière organique dans les milieux aquatiques engendre donc une augmentation de leur surface spécifique. De même, leur densité induira une modification de la localisation dans la colonne d'eau. Ces

modifications, sous l'effet des conditions environnementales, jouent alors un rôle non négligeable dans leurs interactions avec les systèmes biologiques.

### 3.3 Dégradation et biodégradation

Un des paramètres fondamentaux pour évaluer le risque d'exposition d'une substance est sa persistance dans le milieu. Ces informations sont déterminantes dans la modélisation de la rémanence des particules dans le milieu conditionnant leur toxicité sur les organismes. Ces paramètres sont fortement liés à la notion de dégradation<sup>7</sup> des NPs. Les formes brutes des NPCs présentent une stabilité physico-chimique au sein des milieux aquatiques et sont peu sensibles aux rayons UVs (Nguyen et al., 2011). De ce fait, leur potentiel de dégradation au sein des milieux aquatiques est faible, mais elles peuvent subir des transformations physiques induisant des modifications de leur comportement dans le milieu notamment pour former des structures plus compactes. Par conséquent, les NPCs seront accumulées au fur et à mesure des apports dans les cours d'eau sans être éliminées, exceptées lors d'une interaction biologique. Les NPCs seront alors ingérées par des macro-organismes ou utilisées comme source de carbone par des bactéries ; on parle de biodégradation<sup>8</sup>.

Malgré l'importance des données de rémanence des NPCs dans les écosystèmes aquatiques, peu d'études se sont penchées sur le phénomène de biodégradation du graphène et des CNTs par les organismes aquatiques. Les CNTs brutes comme leurs formes fonctionnalisées semblent être plus facilement biodégradables que les feuillets de graphène simples. Les formes fonctionnalisées du graphène sont plus sensibles aux phénomènes de dégradation liés à leurs défauts de structure (cf. 2.1.1 Mode de production). Des études ont pu démontrer, qu'une fois dans le milieu cellulaire, les feuillets de graphène oxydés mais également les CNTs sont susceptibles d'être biodégradés sous l'action de plusieurs enzymes catalysant leur dégradation (Kotchey et al., 2013). Des tests *in vitro* ont ainsi pu révéler l'action d'enzymes oxydatives d'origine végétale, comme la peroxydase du raifort, et animale, comme la myeloperoxydase, sur la dégradation des CNTs en présence de faible concentration d'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (Allen et al., 2008; Zhao et al., 2011). Kotchey et son équipe (2011) ont démontré l'action de

---

<sup>7</sup> La dégradation est un processus à la fois chimique et physique selon lequel une molécule va subir un changement significatif de sa structure chimique et physique sous certaines conditions environnementales (chaleur, pH, UVs etc...) alliées à des stress mécaniques.

<sup>8</sup> Le phénomène de biodégradation fait appel à la dégradation d'une molécule mais cette fois-ci initiée sous l'action de micro-organismes qui vont utiliser la molécule en question comme source de carbone pour se développer.

ces peroxydases sur la dégradation du Go. Les mécanismes d'action restent encore peu connus.

Il est important de souligner que beaucoup de travaux sont réalisés dans des conditions contrôlées en laboratoire, ne rendant pas compte des conditions présentes dans les milieux naturels, des études *in situ* ou en milieux plus complexes sont recommandées pour améliorer la prédiction des interactions entre les NPCs et les organismes (Bour et al., 2015). Après une longue exposition aux CNTs, certaines bactéries ou consortia sont capables de dégrader les CNTs pour former d'autres intermédiaires en présence d'une source de carbone (You et al., 2017; Zhang et al., 2013). Ces transformations peuvent engendrer des composés ayant des effets différents des NPCs initiales sur les organismes exposés. Néanmoins, il a été démontré que les bactéries utilisées dans les traitements d'épuration des eaux usées ne parviennent pas à dégrader les CNTs (Kümmerer et al., 2011).

De manière générale, des efforts doivent être faits pour réaliser des études en conditions naturelles afin de déterminer le mieux possible le devenir des NPCs dans le milieu aquatique.

### 3.4 Détection dans le milieu : techniques et contraintes

L'incertitude sur les concentrations environnementales des NPCs pousse les scientifiques à étudier toutes les possibilités en testant une large gamme de concentration pouvant correspondre à tous les scénarios possibles. Cette incertitude est principalement liée à l'absence de technologie adaptée pour détecter ces NPCs. Même si ce domaine de recherche commence à se développer, les techniques de quantification des NPCs présentent de nombreuses contraintes. La difficulté de quantification des NPCs est principalement liée à leur intégration au sein de matrices plus ou moins dures (polymères, résines, ...) à des fins industrielles. Du fait des sources d'émission globale (non centralisées sur un point donné) les quantités de NPCs émises dans l'environnement sont relativement faibles et donc également difficilement quantifiables. Les méthodes de détection doivent alors être adaptées à de faibles concentrations dans les milieux. De surcroît, l'état des NPCs est modifié en fonction des conditions abiotiques complexifiant d'autant plus leur détection. Afin de normaliser l'évaluation des risques, l'une des premières étapes est de standardiser également les techniques de détection qui ne le sont pas encore.

Bien que peu accessibles, quelques techniques de détection existent à l'heure actuelle. Cinq types de méthodes se distinguent :

- La plus simple d'entre elles est basée sur l'observation microscopique électronique à transmission (MET) des NPCs dans un échantillon du milieu environnemental ou au sein d'une matrice biologique. Cette méthode présente cependant certains biais pouvant conduire à une mauvaise interprétation. L'observation de NPCs au milieu d'une coupe peut simplement être dû au déplacement de ces dernières de l'extérieur de l'échantillon vers l'intérieur lors de la préparation de l'échantillon (Bourdiol et al., 2013). Cette technique est donc à utiliser avec précaution.
- La spectrométrie Raman permet à la fois de quantifier et de caractériser les NPCs. Cette méthode analytique permet d'obtenir un spectre avec plusieurs pics caractéristiques : la bande D, correspondant aux hybridations  $sp^3$ , et la bande G, pour les hybridations  $sp^2$ . L'intensité de chacun de ces pics et le ratio entre ces deux valeurs permet d'informer sur la concentration, et l'orientation des atomes de carbone dans les cas des CNTs, mais également sur la proportion d'atomes de carbone mal agencés (Barbillat et al., 1999).
- Chaque NPC présente une signature thermique propre et fait ainsi l'objet d'un autre type de méthode de détection des NPCs : l'analyse thermogravimétrique. En mesurant la variation de masse d'un échantillon pour une température donnée, cette méthode permet d'estimer la quantité de NPC dans un milieu complexe. Des équipements techniques spécifiques, tels qu'une canne d'analyse thermique différentielle, sont nécessaires pour réaliser ce type de mesure. Cette méthode est donc assez peu répandue.
- Les impuretés présentes au sein des suspensions de NPCs résultant de leur synthèse peuvent également être dosées afin d'évaluer la quantité en NPCs présents dans un échantillon. Cependant en fonction du mode de production et du lot de NPCs, les catalyseurs métalliques utilisés pour leur synthèse peuvent être différents induisant une incertitude quant au choix de l'élément métallique à doser. Par ailleurs, même si la méthode de détection cherche à cibler des NPCs produits avec un catalyseur bien spécifique, celui-ci peut avoir été libéré dans le milieu sous l'effet des conditions environnementales. Cette méthode présente donc beaucoup d'incertitudes.
- La seule méthode aujourd'hui disponible capable de détecter les NPCs au sein d'une matrice biologique de manière fiable est le suivi après fabrication de NPCs enrichies

au  $^{14}\text{C}$  ou au  $^{13}\text{C}$ . Ces mesures engendrent des coups importants pour les chercheurs en charge de la quantification des NPCs, mais également des problèmes de sécurité et de santé des manipulateurs (Petersen et al., 2011). Par ailleurs, ces techniques ne peuvent pas être utilisées dans le milieu naturel.

En appui à ces méthodes de détection, la modélisation des émissions des NPCs permet d'estimer les quantités potentiellement retrouvées dans les différents compartiments environnementaux. De cette manière, T. Y. Sun et ses collaborateurs (2014) rapportent une concentration en CNTs estimée à 1,2  $\mu\text{g}/\text{Kg}$  dans les sédiments, bien supérieure à celle estimée dans les eaux de surface atteignant 0,35  $\text{ng}/\text{L}$ . L'accumulation des CNTs au sein des sédiments s'explique par l'agglomération entraînant la sédimentation des CNTs dans les milieux aquatiques. Les organismes benthiques se retrouvent ainsi exposés à de plus fortes concentrations en NPCs que les organismes pélagiques. Toutefois ces estimations ne tiennent pas compte du devenir des NPCs dans les milieux aquatiques écartant à la fois le rôle de la matière organique et le scénario de sédimentation des NPCs dans le milieu.

#### 4 Ecotoxicité des nanoparticules de carbone

L'accumulation des lacunes scientifiques sur l'impact des nanoparticules de carbone, et l'importance des services écosystémiques rendus par les milieux aquatiques, montrent un réel besoin d'études nano-écotoxicologiques des organismes dulçaquicoles.

Les modifications des propriétés physico-chimiques des NPCs entraînent également une variation de leurs impacts sur les organismes. Plusieurs études ont démontré une différence de toxicité des nanoparticules en fonction de leur taille, de leur structure, de leur charge superficielle, de leur surface spécifique (Chen et al., 2007; Long et al., 2012; Mottier et al., 2016; Navarro et al., 2008; Simon-Deckers et al., 2009) mais également de leur mode de dispersion (Kwok et al., 2010). Par ailleurs, le mode de production et la fonctionnalisation des nanoparticules entraînent la présence d'impuretés, plus ou moins toxiques pour les organismes. Différents types d'impuretés adsorbées à la surface des nanoparticules de carbone sont alors susceptibles d'être vectorisés dans les organismes, comme les hydrocarbures aromatiques polycycliques (HAPs) ou encore les éléments traces métalliques (ETMs) (Hull et al., 2009; Pumera, 2007). La probabilité de désorption varie en fonction des conditions physico-chimiques rencontrées (Oleszczuk et al., 2009) et dépend aussi des métabolites

pouvant être sécrétés par les organismes étudiés (Wei et al., 2010). Ces contaminants ainsi vectorisés peuvent être impliqués, à différents degrés, dans les effets observés sur les organismes lors de l'expérimentation. Il est donc fortement recommandé de caractériser les nanoparticules de carbone utilisées de tenir compte de l'interaction entre les NPCs et le milieu (voir paragraphe 3.2. Physico-chimie des NPCs dans l'environnement) afin de pouvoir prendre en compte tous ces artéfacts lors de l'interprétation des résultats (Petersen et al., 2014).

#### 4.1 Les biofilms d'eau douce

##### 4.1.1 Présentation des biofilms et composition cellulaire

Les biofilms sont définis comme étant une communauté microbienne, vivant au sein d'une matrice, adhérente à une surface où les cellules peuvent également adhérer entre elles (Costerton et al., 1995) (Figure 7). Les biofilms se développent sur tout type de surfaces : biotiques (macrophytes, exosquelettes...) ou abiotiques (rochers, sédiments...), naturelles ou synthétiques. Selon le substrat, les biofilms phototrophes, appelés aussi périphyton, peuvent avoir une dénomination plus spécifique. On parlera alors de biofilm épilithique lorsqu'ils se développent sur une surface minérale, et de biofilm épiphytique pour ceux adhérant à un macrophyte (Aloi, 1990; Townsend and Gell, 2005).

Les biofilms constituent des micro-écosystèmes, plus ou moins complexes, composés de différents types de cellules vivant en communauté: hétérotrophes ou autotrophes, eucaryotes ou procaryotes (O'Toole et al., 2000). Ainsi selon les conditions environnementales, les biofilms mixtes sont composés de bactéries, gram positif ou négatif, de micro-algues vertes ou brunes (comme les diatomées), de champignons ou encore de protistes. La proportion de chacun de ces organismes au sein du biofilm varie tout au long de l'année en fonction des conditions environnementales (Gao et al., 2005; Lyautey et al., 2005; Stevenson, 1997). Les organismes phototrophes peuvent alors représenter jusqu'à 30% de la masse de carbone totale des biofilms (Lyautey et al., 2005).

Les cellules constituant les biofilms vivent en symbiose au sein d'une matrice extracellulaire représentant jusqu'à 90% de la masse sèche des biofilms (Pyl'nik et al., 2007). Cette matrice est majoritairement constituée de protéines, de polysaccharides et de lipides (Flemming and Wingender, 2010). L'ensemble de ces constituants est regroupé sous le terme de substances polymériques extracellulaires (EPS). Plusieurs études ont également démontré la présence d'ADN extracellulaire au sein de cette matrice (Flemming et al., 2007; Whitchurch et al., 2002). La composition de la matrice extracellulaire varie en fonction des organismes présents et évolue en fonction de l'âge du biofilm (Barranguet et al., 2005; Flemming et al., 2007; Romani et al., 2008).

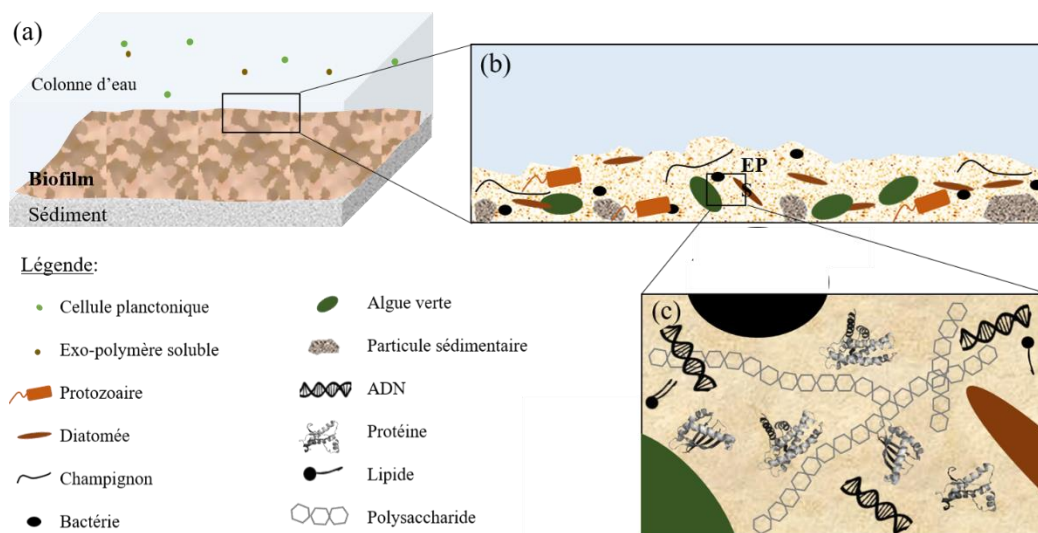


Figure 7. La matrice du biofilm : composition cellulaire et moléculaire. (a) Représentation d'un milieu aquatique où le biofilm adhère sur les sédiments. Les cellules planctoniques dans la colonne peuvent constituer des espèces similaires aux espèces présentes dans le biofilm qui peuvent soit être en cours d'adhésion, soit présenter une préférence pour ce mode de vie selon l'environnement, ou encore constituer des cellules non viables se détachant du biofilm. Le biofilm étant une interface entre la colonne d'eau et le milieu sédimentaire, des EPS solubles sont souvent excrétées par les cellules se localisant ainsi proche du biofilm. (b) Schématisation d'une coupe de biofilm mixte complexe. De nombreuses espèces peuvent se retrouver au sein d'un même biofilm. La dynamique des populations microbiennes évolue en fonction des conditions abiotiques laissant place à un cycle tout au long de l'année. L'épaisseur du biofilm peut varier en fonction du stade de développement de ce dernier. (c) Composition moléculaire des EPS constituant le biofilm. La concentration de chacun des constituants de la matrice extracellulaire varie en fonction des conditions environnementales mais dépend également de l'état de stress des cellules. Cette représentation n'inclue pas les formes plus complexes, comme les glycoprotéines ou encore les lipoprotéines, qui peuvent être incluses dans la composition du biofilm.

Les tailles et les formes schématiques représentées dans cette figure ne sont pas représentatives de la réalité.



#### 4.1.2 Rôles de la matrice extracellulaire

Le biofilm représente un mode de vie communautaire très avantageux pour les micro-organismes, car il est le siège de nombreux processus et fonctions qui ne s'opèrent pas en mode de vie planctonique. L'ensemble de ces fonctions sont assurées par les EPS (Vu et al., 2009). La fonction première du biofilm est l'ancrage (ou l'adhésion) à un substrat (Liu et al., 2010). Les cellules peuvent coloniser un milieu lentique tout comme un milieu lotique sans difficultés, en excréant des EPS. La matrice extracellulaire procure ainsi la stabilité mécanique du biofilm dans le temps, pouvant résister à une certaine agitation ou force de courant. Cette fonction permet alors de former une matrice cohésive à l'épreuve des perturbations. Le biofilm forme un réseau, constituant un lieu d'échanges et d'interactions entre les cellules au sein du biofilm, mais aussi avec l'extérieur. La matrice constitue ainsi une voie de signalisation moléculaire par laquelle les cellules communiquent entre elles notamment pour moduler la croissance du biofilm (Davies et al., 2014). D'autres types d'interactions plus communes, comme la compétition, la prédation ou encore le mutualisme, interviennent au sein du biofilm entre les algues et les bactéries. Les assemblages bactéries-organismes phototrophes sont à l'origine d'interactions antagonistes dans certains cas (Paerl and Pinckney, 1996). Les bactéries étant des organismes hétérotrophes, elles consomment ainsi une partie des EPS excrétés par l'ensemble des micro-organismes présents dans le biofilm. En retour, les bactéries sécrètent des toxines afin de limiter la prolifération des autres organismes microbiens. Cependant, des interactions positives s'y produisent également comme le recyclage des nutriments, ou encore la dégradation de certains polluants par les bactéries profitant ainsi aux organismes phototrophes.

Lorsque les ressources nutritives se font rares, les EPS composant la matrice extracellulaire représentent une source alternative de carbone pour les organismes mixotrophes et hétérotrophes présents dans le biofilm. De plus, il est possible de retrouver de la matière organique, provenant du milieu extérieur, piégée dans le réseau d'EPS, procurant aux cellules une ressource supplémentaire en carbone. Le biofilm permet ainsi un stockage de carbone, qui est ensuite minéralisé lors des périodes de restriction nutritive (Wolfaardt et al., 1995). Une réserve d'enzymes extracellulaires est maintenue proche des cellules du biofilm afin de métaboliser les polymères de la colonne d'eau accumulés dans la matrice (Flemming and Wingender, 2010).

Le biofilm offre également un espace tridimensionnel dans lequel les cellules munies de flagelles peuvent se déplacer de manière autonome, et les micro-organismes participant à la production de la matrice extracellulaire montrent une certaine « mobilité », alors propulsés sous l'effet de l'excrétion des EPS. La matrice entourant les cellules leur confère ainsi une protection à la fois contre les contraintes environnementales, comme la dessiccation, mais également contre les xénobiotiques. Plusieurs études ont ainsi démontré l'importance des EPS dans la réponse des cellules face à un polluant soluble, comme les antibiotiques (Davies, 2003), ou particulaire, comme les nanoparticules (Luongo and Zhang, 2010; Quigg et al., 2013). Rodrigues et Elimelech (2010) ont mis en évidence l'inhibition du développement du biofilm d'*Escherichia coli* face aux SWCNTs, lorsque ces dernières sont encore à l'état planctonique, et démontrent ainsi la vulnérabilité des cellules face à un xénobiotique lors du premier stade de croissance des biofilms, où les cellules ne sont pas incluses dans une matrice extracellulaire. Ces résultats sont en accord avec ceux obtenus par Y. Liu et al. (2007) démontrant une réponse cellulaire moindre d'*E. coli* lorsque celle-ci est cultivée au sein d'un biofilm composé d'EPS, contrairement à des cultures sans EPS.

Chacun des composants moléculaires du biofilm est impliqué dans une ou plusieurs fonctions de la matrice extracellulaire. Les polysaccharides et les protéines participent alors à l'adhésion et à la cohésion du biofilm notamment grâce aux fibres amyloïdes (Randrianjatovo-Gbalou et al., 2017). Cette matrice extracellulaire permet également de former une barrière protectrice contre les agressions extérieures, comme le broutage ou l'interaction avec les polluants (Flemming and Wingender, 2010). L'ADN extracellulaire contribue également à la formation du biofilm surtout dans les premiers stades de développement. Cependant cette contribution varie en fonction des espèces microbiennes (Randrianjatovo-Gbalou et al., 2017; Tang et al., 2013).

#### 4.1.3 Intérêts des études écotoxicologiques sur les biofilms

Les études de toxicologie environnementale cherchent à déterminer l'effet d'un xénobiotique sur les organismes en essayant d'appréhender les effets globaux sur l'écosystème étudié. La nano-écotoxicologie relève alors des travaux s'appliquant à évaluer à la fois les effets observés à l'échelle de l'organisme (cytotoxicité, approche moléculaire, tissulaire...) jusqu'à la propagation de ces effets au sein d'une population, d'une communauté ou d'un écosystème. Lors d'une étude monospécifique, le choix du modèle d'étude doit être pertinent afin de pouvoir prédire les répercussions sur le fonctionnement de l'écosystème. Une fois dans le

système aquatique, les nanoparticules carbonées pourront interagir avec les organismes présents dans le milieu : des micro-organismes aux plus grands prédateurs. Les micro-organismes photosynthétiques constituent les producteurs primaires, à la base de la chaîne trophique. Les organismes microbiens constituent donc un choix de modèle d'étude pertinent au vu d'évaluer les impacts environnementaux des nanoparticules carbonées. L'étude de ces organismes présente plusieurs avantages, notamment la facilité d'entretien en laboratoire et la vitesse de croissance des cultures. L'intérêt porté pour les organismes microbiens provient non seulement du fait qu'ils représentent la première forme de vie apparue sur la Terre, mais qu'ils constituent la majeure partie des organismes vivants sur Terre, avec une remarquable diversité spécifique. Ainsi le nombre d'études écotoxicologiques sur les micro-organismes sont très largement représentées.

Plusieurs études s'accordent à dire que les organismes les plus exposés aux CNTs et au graphène sont les organismes benthiques du fait du comportement des nanoparticules au sein des milieux aquatiques (Lanphere et al., 2014; Schierz et al., 2014). La plupart des micro-organismes benthiques vivent en communauté mixte formant des biofilms. Ces biofilms constituent le siège des échanges entre le milieu sédimentaire et la colonne d'eau (Pyl'nik et al., 2007).

Les biofilms phototrophes représentent la principale ressource nutritive pour de nombreux brouteurs benthiques (Jenkins et al., 2001). Ils constituent ainsi un maillon clé dans le fonctionnement de l'écosystème. Les biofilms phototrophes ont une participation majeure dans la production primaire globale des systèmes d'eau douce (Cushing and Wolf, 1984; Wetzel, 1983). Les biofilms occupent ainsi une place non négligeable dans la régulation du cycle du carbone (Romaní et al., 2006), de l'azote (Teissier and Torre, 2002) et du phosphore (Dodds, 2003; Paerl and Pinckney, 1996). Ils procurent également un service écosystémique largement utilisé dans le domaine sanitaire. En effet, les biofilms sont connus pour épurer la colonne d'eau par adsorption des minéraux et des matières organiques particulières, mais également des polluants (Miao et al., 2009; Simpson, 2008). Ils offrent ainsi une fonction de bioremédiation naturelle, largement exploitée depuis plusieurs décennies dans les systèmes d'épuration des eaux (Gebara, 1999; Lazarova and Manem, 1995). Cependant ce phénomène de bioremédiation ne conduit pas dans tous les cas à une élimination des polluants, surtout pour ceux qui sont peu dégradables, comme les NPCs. Certains polluants peuvent ainsi être concentrés dans les biofilms.

Dans le milieu naturel, ce phénomène de bioremédiation par les biofilms peut impacter les maillons supérieurs de la chaîne trophique : en écotoxicologie ce phénomène est appelé bioamplification (Figure 8). Il résulte de la concentration des polluants chez un organisme en particulier : la bioaccumulation. Chez les biofilms, ce terme convient uniquement si une endocytose, ou une internalisation, des xénobiotiques survient, sinon le terme de biosorption semble plus adapté dans le cas où les xénobiotiques restent dans la matrice extracellulaire. En effet, les biofilms sont capables de stocker toutes sortes de xénobiotiques solubles ou particulaires, comme les métaux lourds (Morin et al., 2008; Wolfaardt et al., 1995), qui seront ensuite consommés par les brouteurs (Wolfaardt et al., 1994). La consommation du biofilm par les brouteurs permet alors le transfert des polluants vers le reste de la chaîne trophique jusqu'au superprédateur, bien souvent considéré comme l'Homme. Les biofilms présentent ainsi une importance majeure dans le fonctionnement des écosystèmes aquatiques face aux xénobiotiques.

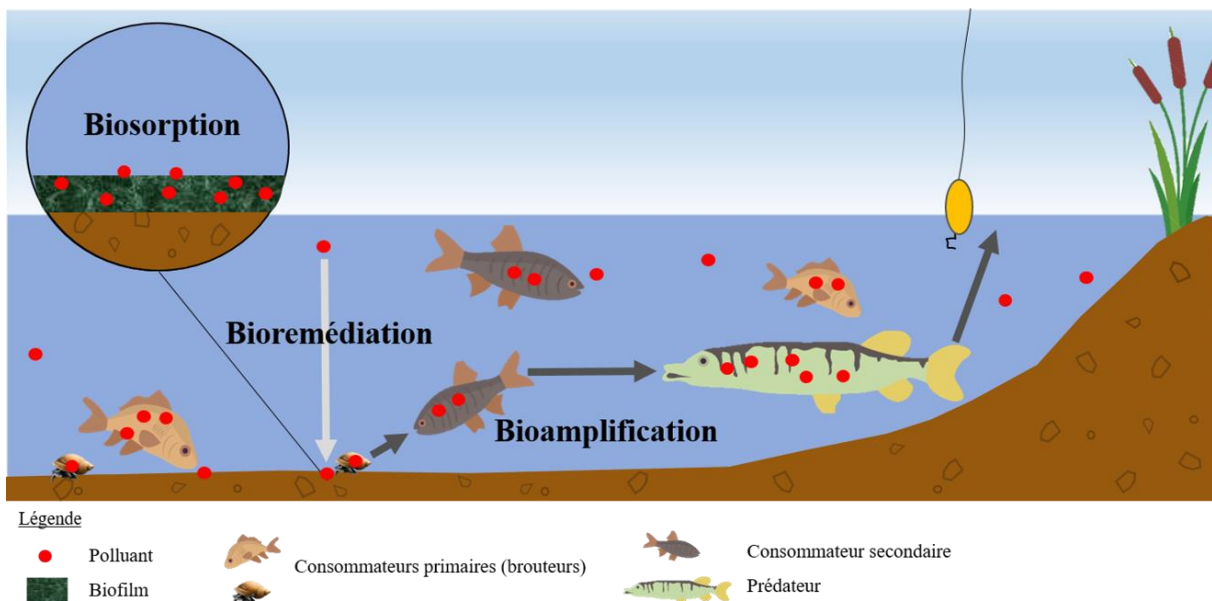


Figure 8. Importance des biofilms benthiques dans le devenir des xénobiotiques au sein d'un système lotique et leurs interactions avec les organismes le long de la chaîne trophique. Une fois dans le milieu aquatique, une part des xénobiotiques interagit directement avec les organismes pélagiques, mais la majeure partie se retrouve piégée au sein des biofilms benthiques. De plus en plus de polluants sont ainsi stockés au cours du temps. Les organismes brouteurs des biofilms ingèrent alors des concentrations en polluant plus élevées que celles retrouvées dans la colonne d'eau. Le transfert des xénobiotiques continue ainsi le long de la chaîne trophique. A chaque niveau trophique les polluants se retrouvent plus concentrés que dans les organismes du maillon inférieur. Ce phénomène de concentration des polluants le long de la chaîne trophique est appelé bioamplification.

Du fait de leur importance dans le fonctionnement de l'écosystème, il est alors essentiel d'évaluer les impacts des nanoparticules de carbone sur les biofilms. L'essentiel de l'état de l'art sur les effets démontrés des nanoparticules carbonées est présenté ci-après. On

s'intéresse ici non seulement à leurs impacts sur chacun des composants cellulaires du biofilm pris séparément et pas nécessairement organisés en biofilm, mais aussi sur les biofilms mixtes afin de comprendre la réponse cellulaire et moléculaire des cellules au sein du biofilm.

## 4.2 Impact sur les composants cellulaires du biofilm

L'exposition des micro-organismes aux nanoparticules peut induire différents types d'effets plus ou moins nocifs pour la cellule. L'évaluation de la toxicité des nanoparticules se base sur le suivi de différents paramètres. Les principaux paramètres étudiés en écotoxicologie microbienne sont la croissance, la mortalité, la production d'espèces réactives de l'oxygène (ROS) et un indice de l'activité cellulaire, différent en fonction du micro-organisme exposé. L'étude bibliographique présentée ci-après met en évidence les effets des nanoparticules de carbone sur chacun de ces paramètres. La cause de ces effets peut être très diversifiée en fonction du type de nanoparticules testé, mais aussi de l'organisme étudié. Afin d'avoir une vision complète des effets des nanoparticules de carbone sur les biofilms, une synthèse bibliographique a été réalisée sur les études écotoxicologiques réalisées sur les différents types de biofilms : des communautés complexes aux biofilms hétérotrophes et phototrophes simplifiés. L'ensemble des études écotoxicologiques décrites ci-dessous ont été recensées dans le Tableau 3.

### 4.2.1 Effets sur les biofilms mixtes

Les biofilms mixtes représentent le mode de vie microbien dominant dans les écosystèmes aquatiques. Les études écotoxicologiques traitant de l'effet des nanoparticules de carbone sur les biofilms aquatiques naturels sont quasi inexistantes. De par leur utilisation au sein des systèmes d'épuration des eaux, les études réalisées sur les biofilms portent de manière générale sur les boues activées. Ce terme fait référence à un assemblage de cellules, au sein d'EPS formant des floccs, développé sous des conditions contrôlées. Afin de rendre compte de l'impact de ces nanoparticules sur les biofilms mixtes, il sera tout de même présenté ici quelques études réalisées sur les boues activées.

D'après la bibliographie étudiée, les nanotubes de carbone n'induisent pas d'effets cellulaires létaux pour les cellules composants les biofilms. Une amélioration de la fixation du biofilm au sein de bioréacteurs a pu être observée par Yin et al. (2009). Ces résultats mettent en avant un effet faussement positif des nanoparticules de carbone sur les biofilms que les auteurs n'expliquent pas. En effet, sachant que l'un des rôles des EPS est aussi de former une barrière

protectrice (Flemming and Wingender, 2010), il est alors possible de se demander si la réponse observée n'est pas une expression de l'état de stress des micro-organismes. Les cellules mettraient en place une allocation énergétique en faveur d'une sur-excrétion d'EPS pour limiter le contact avec les nanoparticules, défavorisant ainsi d'autres fonctions biologiques. En plus d'une augmentation des EPS dans le biofilm, Luongo and Zhang (2010) ont pu mettre en évidence une inhibition de la respiration de la communauté microbienne suite à l'interaction physique de MWCNTs avec des cellules.

Des modifications en terme de structure de communauté ont été démontrées lors d'une exposition aux SWCNTs induisant une modification de l'abondance relative des espèces présentes dans une boue activée (Goyal et al., 2010). Certaines espèces se trouvent être plus sensibles que d'autres et sont alors sélectionnées par l'exposition aux SWCNTs. En plus d'un effet sur la structure de la communauté bactérienne, El-temsah *et al.* (2017) ont observé un changement de mode de vie de certaines bactéries favorisant le mode de vie planctonique, lors d'une exposition aux CNTs en présence de matière organique. D'après ces résultats, il est nécessaire de se questionner sur l'impact des CNTs sur la fonction de dépollution des eaux par les biofilms. En effet un changement de la composition du biofilm peut affecter le service écosystémique de bioremédiation. De plus, un fort impact du Go sur les cellules composant les boues activées a été démontré par Ahmed & Rodrigues (2013). L'exposition au Go entraîne alors une diminution de l'efficacité du traitement d'épuration des eaux.

#### 4.2.2 Organismes hétérotrophes

La plus grande partie des études évaluant l'impact environnemental des nanoparticules de carbone sont réalisées sur des bactéries. Certaines études mettent en évidence la cytotoxicité des nanoparticules de graphène oxydé pour des souches bactériennes modèles, telle que *E. coli* ou *Staphylococcus aureus*. Le contact direct avec ces dernières entraîne des dommages au niveau de la membrane cellulaire (Akhavan & Ghaderi, 2010). Ces souches bactériennes présentent également une altération de la membrane cellulaire lorsqu'elles sont exposées aux SWCNTs. Cette détérioration est accompagnée par une inhibition de la croissance (Simon-Deckers et al., 2009) ainsi qu'une diminution de la viabilité cellulaire (Kang et al., 2007; Liu et al., 2009). Les auteurs expliquent que le contact direct avec les nanoparticules est à l'origine des altérations cellulaires et affirment que les SWCNTs ont un effet tranchant sur les bactéries. L'ensemble de ces études mettent alors en évidence l'impact physique des nanoparticules de carbone à l'origine de leur cytotoxicité.

L'altération membranaire induit des effets nocifs supplémentaires sur les bactéries. Seoktae Kang *et al.* (2008) ont montré que la détérioration des membranes due au contact direct avec les nanoparticules entraînait un stress oxydatif, par la production de ROS. Les auteurs mettent aussi en évidence l'importance des propriétés intrinsèques des CNTs, en observant un stress oxydatif de plus grande ampleur chez les bactéries exposées aux SWCNTs, par rapport à l'exposition aux MWCNTs. Les auteurs ont émis l'hypothèse que les SWCNTs ayant un diamètre inférieur pourraient être internalisés par les cellules et ainsi induire des dommages cellulaires plus importants. La taille des CNTs, mais également leur structure électronique joueraient un rôle non négligeable sur leur cytotoxicité. Vecitis *et al.* (2010) montrent que plus les SWCNTs présentent une structure électronique métallique, à l'inverse des semi-conducteurs, plus la viabilité de *E. coli* est altérée en lien avec un stress oxydatif.

Néanmoins, les différentes espèces modèles de bactéries ne semblent pas toutes présenter la même sensibilité face aux CNTs. Chez *Cupriavidus metallidurans*, une étude a pu montrer que l'adsorption de MWCNTs à la surface des cellules n'entraînait aucune réponse (Simon-Deckers *et al.*, 2009).

En plus d'une inhibition de la croissance, plusieurs études ont démontré une diminution de l'activité métabolique de *E. coli* lors d'une exposition au graphène oxydé (Akhavan *et al.*, 2011; Hu *et al.*, 2010). Akhavan, Ghaderi & Esfandiar (2011) ont mis en évidence un effet surprenant lors de la réduction de feuillets de graphène oxydé en présence de mélatonine. Les auteurs observent alors une immobilisation des bactéries *E. coli* qui se retrouvent enveloppées dans les nanofeuillets, contraintes à l'inactivité. Chez la bactérie modèle marine *Vibrio fischeri*, une inhibition de l'activité de bioluminescence, sans diminution de croissance, a été observée lorsque les cellules sont exposées au graphène sous forme de poudre mais également au graphène monofeuillet (Pretti *et al.*, 2014). Cependant, toutes les études réalisées sur le graphène oxydé n'arrivent pas à la même conclusion au sujet de sa cytotoxicité. En effet, Ruiz *et al.* (2011) ont démontré un effet positif des nanoparticules de graphène oxydées sur les bactéries *E. coli* induisant ainsi une augmentation de leur croissance. Les auteurs expliquent alors la possibilité d'utilisation des particules de graphène comme d'un support de croissance lié à une stimulation de la production d'exo-polymères. De même que les CNTs, le graphène oxydé et le graphite induisent également un stress oxydatif, chez *E. coli* mesuré par une augmentation de glutathion-S-transférase, biomarqueurs enzymatiques impliqués dans la détoxification cellulaire (Liu *et al.*, 2011).

### 4.2.3 Organismes phototrophes

L'évaluation de la réponse cellulaire lors des essais sur les effets des nanoparticules de carbone chez les micro-algues prend en compte un paramètre supplémentaire, par rapport aux études bactériennes : l'activité photosynthétique.

Plusieurs études réalisées sur l'évaluation de la réponse cellulaire des micro-algues planctoniques *Dunaliella tertiolecta*, *Raphidocelis subcapitata* et *Chlorella pyrenoidesa* ont mis en évidence une inhibition de la croissance lors d'une exposition à plusieurs formes de nanoparticules carbonées de la famille du graphène (Nogueira et al., 2015; Pretti et al., 2014; Zhao et al., 2017). En plus d'une inhibition de croissance due à l'exposition au graphène oxydé, une altération de la membrane cellulaire et une production de ROS ont été observées chez *R. subcapitata* et *C. pyrenoidesa*. Cependant, le graphène monofeuillet ne semble pas avoir d'impact sur la croissance cellulaire de *C. pyrenoidesa* mais induit un stress oxydatif qui serait lié à l'altération de la membrane cellulaire. Zhao *et al.* (2017) expliquent l'inhibition de croissance chez *C. pyrenoidesa* par un effet indirect des nanoparticules de graphène oxydé. Ils considèrent alors que l'effet d'ombrage généré par le Go est responsable à 16% de la diminution de la prolifération cellulaire. De plus, les auteurs soulèvent ici un autre effet jamais évoqué dans les études antérieures. En effet, un appauvrissement du milieu de culture en macroéléments ( $\text{Ca}^{2+}$  et  $\text{Mg}^{2+}$ ) est observé tandis que la concentration en microéléments (Fe, Cu et Zn) n'est pas impactée. Les macroéléments ayant un potentiel électrochimique plus élevé que les microéléments, sont ainsi préférentiellement adsorbés à la surface des nanoparticules de Go. De ce fait, 53% de la toxicité du graphène oxydé est alors expliqué par une réduction de la disponibilité des éléments nutritifs. Cependant aucunes de ces études démontrent un impact de l'ombrage du graphène sur l'activité photosynthétique des micro-organismes exposés.

Plusieurs études évaluant l'impact des CNTs s'appliquent à démontrer leurs effets néfastes sur la croissance des algues vertes unicellulaires, comme *Chlorella vulgaris* et *Pseudokirchneriella subcapitata* (Lukhele et al., 2015; Schwab et al., 2011; Sohn et al., 2015). D'autres phénomènes liés à une pathologie, comme l'atrophie ou la rupture cellulaire, ont été observés par Sohn *et al.* (2015) se traduisant par une altération de la morphologie des cellules. Les auteurs ne discutent pas explicitement les conséquences de ces altérations, mais au vue de la littérature nous pouvons imaginer qu'une interaction forte avec les CNTs est à l'origine de ces dégradations. Schwab *et al.* (2011) expliquent que l'inhibition de croissance



observée chez *C. vulgaris* est principalement due à un effet indirect de la suspension de CNTs agglomérés dans la colonne d'eau. Le comportement des CNTs entraîne ainsi une diminution de la lumière disponible pour ces organismes phototrophes induisant également une diminution du métabolisme du carbone. Une des spécificités des nanoparticules de carbone est l'induction d'un effet indirect défini comme étant un ombrage des nanoparticules sur les cellules. En effet, les nanoparticules de carbone, étant de couleur sombre, à l'image du charbon, elles absorbent la lumière, contrairement aux nanoparticules métalliques, qui elles, n'opacifient pas la colonne d'eau et n'induisent pas d'ombrage (Aruoja et al., 2009; Hundrinke and Simon, 2006). Une étude postérieure, réalisée sur *Chlorella sp.* confirme cet effet, et accorde 25% de l'inhibition de croissance à l'interaction physique des CNTs agglomérés autour des cellules et 25% à l'effet d'ombrage généré par ce complexe (Long et al. 2012). Les auteurs définissent cet effet comme étant un effet d'ombrage dû à la formation d'agglomérats de CNTs autour des cellules. L'observation d'un effet d'ombrage amène alors à se questionner sur les effets des nanoparticules de carbone sur l'activité photosynthétique des organismes phototrophes. Des altérations du rendement quantique du photosystème II ont été observées chez la micro-algue verte *Chlamidomonas reinhardtii* en présence de nanotubes de carbone (Matorin et al., 2010).

La génération d'un stress oxydatif suite à l'exposition aux CNTs a également été observée dans plusieurs études. Long et al. (2012) ont mis en évidence une production de ROS ainsi qu'une augmentation de la peroxydation lipidique traduisant un stress oxydatif chez les cellules exposées aux MWCNTs. La génération de ROS a également été constatée chez *D. tertiolecta* (Wei et al., 2010). Le stress oxydatif induit est mis en relation avec une interaction physique étroite entre les CNTs oxydés et les cellules, entraînant ainsi une altération de la membrane. Les auteurs ont pu également mettre en évidence que la cytotoxicité générée par les CNTs oxydés est temporaire. L'excrétion d'EPS par les cellules serait alors à l'origine de l'agrégation des nanotubes de carbone dans le milieu permettant ainsi aux algues de limiter leurs impacts.

Une revue détaillant les études des effets des nanoparticules carbonées sur les organismes aquatiques met en évidence la faible sensibilité des bactéries face aux nanoparticules de carbone. Contrairement aux algues qui représentent les organismes étudiés les plus sensibles à ces xénobiotiques (Freixa et al., 2018).

A l'heure actuelle peu d'études se sont penchées sur les effets des nanoparticules carbonées sur les diatomées. La première étude sur l'évaluation des effets des CNTs sur diatomées n'a

été réalisée qu'une dizaine d'années auparavant. Cette étude a pu démontrer une inhibition de croissance des diatomées marines *Thalassiosira pseudonana* lors d'une exposition aux DWCNTs (Kwok et al., 2010). Par ailleurs, une étude plus récente a également démontré une inhibition de croissance temporaire sur la diatomée d'eau douce *Nitzschia palea* liée à un ombrage significatif uniquement aux fortes concentrations en MWCNTs dispersés sous l'effet de la matière organique (Verneuil et al., 2014). Après une inhibition de croissance marquée, les cellules exposées aux DWCNTs ne montrent plus aucun signe de toxicité cellulaire au bout de quelques jours. Les auteurs expliquent cette inhibition temporaire par une allocation énergétique des cellules vers la production d'EPS limitant ainsi la toxicité des nanoparticules qui se retrouvent adsorbées au sein du réseau d'exo-polymères. Ce processus permet ainsi aux cellules de se dégager et de retrouver un niveau de croissance normale sans aucun signe de toxicité au bout de quelques jours. Plus récemment encore, il a été démontré que la réponse engendrée par *N. palea* exposée aux nanotubes de carbone faisait intervenir une surproduction d'EPS et plus particulièrement de protéines hydrophobes excrétées par les cellules (Verneuil et al., 2015).

L'exposition aux CNTs peut aussi engendrer un tout autre type d'effet selon les organismes. En effet, dans son travail de thèse Laurent (Verneuil, 2015) a mis en évidence les effets tératogènes et génotoxiques des DWCNTs sur une diatomées d'eau douce *Nitzschia linearis*. Les cellules montraient de fortes modifications de la morphologie des frustules, ainsi qu'une augmentation des anomalies nucléaires (micronoyaux, noyaux acentriques, ...). Ces effets ont pu être corrélés à une entrée des DWCNTs dans les cellules.

Tableau 3. Etat de l'art de l'écotoxicité de différentes formes allotropiques du carbone. L'étude bibliographique s'est principalement focalisée sur l'impact des nanoparticules de la famille du graphène et des nanotubes de carbone sur les biofilms mixtes, les bactéries et les algues unicellulaires

Catégorie	Espèce	NP Carbone	Doses testées	Effets observés	Références
Biofilm mixte		MWCNT	624-3240 mg/L	Inhibition de la respiration	Luongo and Zhang, 2010
		SWCNT	219 mg/L	Modification de la structure de la communauté	Goyal et al., 2010
		SWCNT	219 mg/L	Amélioration de la fixation du biofilm	Yin et al., 2009
		Graphène oxydé	10-300 mg/L	Diminution de l'activité métabolique Diminution de la viabilité cellulaire Production de ROS	Ahmed and Rodrigues, 2013
Bactérie	<i>E. coli</i> <i>S. aureus</i>	Graphène oxydé	1000 mg/L	Altération de la membrane cellulaire	Akhavan and Ghaderi 2010
	<i>E. coli</i>	Graphène oxydé	85 mg/L	Diminution de l'activité métabolique Inhibition de la croissance Diminution de la viabilité cellulaire	Hu et al., 2010
	<i>V. fischeri</i>	Poudre de graphène	5 mg/L	Inhibition de bioluminescence	Pretti et al., 2014
	<i>V. fischeri</i>	Graphène monofeuillet	5 mg/L	Inhibition de bioluminescence	Pretti et al., 2014
	<i>E. coli</i>	Graphène oxydé	20-80 mg/L	Inhibition de la croissance Diminution de la viabilité cellulaire Production de glutathionne GSH	Liu et al., 2011
	<i>E. coli</i>	Graphite	20-80 mg/L	Inhibition de la croissance Diminution de la viabilité cellulaire Production de glutathionne GSH	Liu et al., 2011
	<i>E. coli</i>	Graphène oxydé	25 mg/L	Augmentation de la croissance	Ruiz et al., 2011
	<i>E. coli</i>	SWCNT	5 mg/L	Diminution de la viabilité cellulaire Altération de la membrane cellulaire	Kang et al., 2007
	<i>E. coli</i>	SWCNT	5 mg/L	Diminution de l'activité métabolique Inhibition de la croissance Diminution de la viabilité cellulaire Stress oxydatif	Kang et al., 2008
	<i>E. coli</i>	MWCNT	5 mg/L	Diminution de l'activité métabolique Diminution de la viabilité cellulaire Stress oxydatif	Kang et al., 2008
	<i>E. coli</i> <i>S. aureus</i> <i>P. aeruginosa</i> <i>B. subtilis</i>	SWCNT	5-80 mg/L	Altération de la membrane cellulaire Augmentation de la mortalité Inhibition de la croissance	Liu et al., 2009
	<i>E. coli</i>	Graphène oxydé	0,5-5 mg/L	Inhibition de la croissance Diminution de l'activité métabolique	Akhavan et al., 2011
	<i>C. metallidurans</i>	MWCNT	10, 100 et 500 mg/L	Pas d'effets sur la viabilité	Simon-Deckers et al., 2009
	<i>E. coli</i>	MWCNT	10, 100 et 500 mg/L	Inhibition de la croissance	Simon-Deckers et al., 2009
	<i>E. coli</i>	SWCNT	100 mg/L	Stress oxydatif	Vecitis et al., 2010

Tableau 3. Suite

Catégorie	Espèce	NP Carbone	Doses testées	Effets observés	Références
Algue verte unicellulaire	<i>D. tertiolecta</i>	Poudre de graphène	1,25-10 mg/L	Inhibition de la croissance	<i>Pretti et al., 2014</i>
	<i>D. tertiolecta</i>	Graphène monofeuillet	0,675-10 mg/L	Inhibition de la croissance	<i>Pretti et al., 2014</i>
	<i>R. subcapitata</i>	Graphène oxydé	20-100 mg/L	Inhibition de la croissance	<i>Nogueira et al., 2015</i>
	<i>R. subcapitata</i>	Graphène oxydé	10-100 mg/L	Altération de la membrane cellulaire Stress oxydatif	<i>Nogueira et al., 2015</i>
	<i>C. vulgaris</i>	CNT	24 mg/L	Inhibition de la croissance	<i>Schwab et al., 2011</i>
	<i>P.subcapitata</i>	CNT	36 mg/L	Inhibition de la croissance	<i>Schwab et al., 2011</i>
	<i>C. vulgaris</i>	CNT oxydé	40 mg/L	Inhibition de la croissance	<i>Schwab et al., 2011</i>
	<i>D. tertiolecta</i>	MWCNT oxydé	10 mg/L	Inhibition de la croissance Stress oxydatif Diminution de l'activité photosynthétique	<i>Wei et al., 2010</i>
	<i>Chlorella sp.</i>	MWCNT	5-100 mg/L	Inhibition de la croissance Stress oxydatif	<i>Long et al., 2012</i>
	<i>C. reinhardtii</i>	MWCNT	1-2 mg/L	Diminution de l'activité photosynthétique	<i>Matorin et al., 2010</i>
	<i>P.subcapitata</i>	DWCNT	50 mg/L	Inhibition de la croissance	<i>Lukhele et al., 2015</i>
	<i>C. pyrenoidesa</i>	Graphène oxydé	50 mg/L	Inhibition de la croissance Stress oxydatif Altération de la membrane cellulaire	<i>Zhao et al., 2017</i>
	<i>C. pyrenoidesa</i>	Graphène multifeuillets	50 mg/L	Pas d'inhibition de croissance Stress oxydatif Altération de la membrane cellulaire	<i>Zhao et al., 2017</i>
	<i>C. vulgaris</i> <i>R. subcapitata</i>	SWCNT	12-46 mg/L	Inhibition de la croissance Modification de la morphologie des cellules	<i>Sohn et al., 2015</i>
	Diatomée	<i>T. pseudonana</i>	DWCNT	1,86-100 mg/L	Inhibition de la croissance
<i>N. palea</i>		MWCNT	0,1-50 mg/L	Inhibition de la croissance	<i>Verneuil et al. 2014</i>
<i>N. linearis</i>		MWCNT	0,1-10 mg/L	Modification de la morphologie des cellules Diminution de la viabilité cellulaire Anomalies nucléaires Inhibition de la croissance	<i>Verneuil et al. 2015 (non publié)</i>

## Références bibliographiques

- Agnihotri, S., Mota, J.P.B., Rostam-Abadi, M., Rood, M.J., 2006. Adsorption site analysis of impurity embedded single-walled carbon nanotube bundles. *Carbon N. Y.* 44, 2376–2383. <https://doi.org/10.1016/j.carbon.2006.05.038>
- Ahmed, F., Rodrigues, D.F., 2013. Investigation of acute effects of graphene oxide on wastewater microbial community : A case study. *J. Hazard. Mater.* 256–257, 33–39. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2013.03.064>
- Aitken, R.J., Chaudhry, M.Q., Boxall, A.B.A., Hull, M., 2006. Manufacture and use of nanomaterials: Current status in the UK and global trends. *Occup. Med. (Chic. Ill)*. 56, 300–306. <https://doi.org/10.1093/occmed/kql051>
- Akhavan, O., Ghaderi, E., 2010. Toxicity of Graphene and Graphene Oxide Nanowalls Against Bacteria. *ACS Nano* 4, 5731–5736. <https://doi.org/10.1021/nn101390x>
- Akhavan, O., Ghaderi, E., Esfandiari, A., 2011. Wrapping bacteria by graphene nanosheets for isolation from environment, reactivation by sonication, and inactivation by near-infrared irradiation. *J. Phys. Chem. B* 115, 6279–6288. <https://doi.org/10.1021/jp200686k>
- Allen, B.L., Kichambare, P.D., Gou, P., Vlasova II, Kapralov, A. a., Konduru, N., Kagan, V.E., Star, A., Vlasova, I.I., Kapralov, A. a., Konduru, N., Kagan, V.E., Star, A., Vlasova, Kapralov, A. a., Konduru, N., Kagan, V.E., Star, A., 2008. Biodegradation of single-walled carbon nanotubes through enzymatic catalysis. *Nano Lett.* 8, 3899–3903. <https://doi.org/10.1021/nl802315h>
- Aloi, J.-E., 1990. Review of Recent Freshwater Periphyton Field Methods. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.* 47, 656–670. <https://doi.org/10.1139/f90-073>
- ANSES, 2016. R-Nano.fr [WWW Document]. URL <https://www.r-nano.fr/>
- Aruoja, V., Dubourguier, H., Kasemets, K., Kahru, A., 2009. Toxicity of nanoparticles of CuO , ZnO and TiO 2 to microalgae *Pseudokirchneriella subcapitata*. *Sci. Total Environ.* 407, 1461–1468. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2008.10.053>
- Banks, C.E., Moore, R.R., Davies, T.J., Compton, R.G., 2004. Investigation of modified basal plane pyrolytic graphite electrodes: definitive evidence for the electrocatalytic properties of the ends of carbon nanotubes. Electronic supplementary information (ESI) available: the use of CNT-modified electrodes in electro. *Chem. Commun.* 1804. <https://doi.org/10.1039/b406174h>
- Barbillat, J., Bougeard, D., Buntinx, G., Delhaye, M., Dhamelin court, P., Fillaux, F., 1999. Spectrométrie raman, in: *Techniques de l'ingénieur. Analyse et Caractérisation*. pp. 1–31. <https://doi.org/10.2307/302397>
- Bares, H., 2016. Fonctionnalisation chimique du graphène , : vers des matériaux bidimensionnels photo actifs pour la reconnaissance et l' électronique moléculaire. Université de Bordeaux.
- Barranguet, C., Veuger, B., Beusekom, S.A.M. Van, Marvan, P., Sinke, J.J., Admiraal, W., 2005. Divergent composition of algal-bacterial biofilms developing under various external factors. *Eur. J. Phycol.* 40, 1–8. <https://doi.org/10.1080/09670260400009882>
- Baughman, R.H., Zakhidov, A.A., De Heer, W.A., 2002. Carbon Nanotubes--the Route Toward Applications. *Science (80- )*. 297, 787–792. <https://doi.org/10.1126/science.1060928>
- Berber, S., Kwon, Y.-K., Tomanek, D., 2000. Unusually high thermal conductivity of carbon nanotubes. *Phys. Rev. Lett.* 84, 4613–4616. <https://doi.org/10.1103/PhysRevLett.84.4613>
- Berger, C., Ibrahimi, A.T., 2011. Le graphène épitaxié : un cas d'école de graphène isolé. *Société Chim. Fr.* 116, 356–357. <https://doi.org/hal-00911810>

- Bernard, C., 2007. Propriétés mécaniques des nanotubes de carbone en tant que nanosondes et leur fonctionnalisation par bio-nanoparticules. Université Sciences et Technologies - Bordeaux I.
- Blake, P., Brimicombe, P.D., Nair, R.R., Booth, T.J., Jiang, D., Schedin, F., Ponomarenko, L.A., Morozov, S. V., Gleeson, H.F., Hill, E.W., Geim, A.K., Novoselov, K.S., 2008. Graphene-based liquid crystal device. *Nano Lett.* 8, 1704–1708. <https://doi.org/10.1021/nl080649i>
- Bottero, J.Y., Auffan, M., Borschnek, D., Chaurand, P., Labille, J., Levard, C., Masion, A., Tella, M., Rose, J., Wiesner, M.R., 2015. Nanotechnology, global development in the frame of environmental risk forecasting. A necessity of interdisciplinary researches. *Comptes Rendus - Geosci.* 347, 35–42. <https://doi.org/10.1016/j.crte.2014.10.004>
- Bour, A., 2015. Effets ecotoxicologiques de nanoparticules de dioxyde de cerium en milieu aquatique: d'une évaluation en conditions monospécifiques à l'étude de chaînes trophiques expérimentales en microcosmes. Université de Toulouse.
- Bour, A., Mouchet, F., Silvestre, J., Gauthier, L., Pinelli, E., 2015. Environmentally relevant approaches to assess nanoparticles ecotoxicity: A review. *J. Hazard. Mater.* 283, 764–777. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2014.10.021>
- Bourdiol, F., Mouchet, F., Perrault, A., Fourquaux, I., Datas, L., Gancet, C., Boutonnet, J.C., Pinelli, E., Gauthier, L., Flahaut, E., 2013. Biocompatible polymer-assisted dispersion of multi walled carbon nanotubes in water, application to the investigation of their ecotoxicity using *Xenopus laevis* amphibian larvae. *Carbon N. Y.* 54, 175–191. <https://doi.org/10.1016/j.carbon.2012.11.024>
- Brar, S.K., Verma, M., Tyagi, R.D., Surampalli, R.Y., 2010. Engineered nanoparticles in wastewater and wastewater sludge - Evidence and impacts. *Waste Manag.* 30, 504–520. <https://doi.org/10.1016/j.wasman.2009.10.012>
- British Standards Institution, 2007. Terminology for nanomaterials. Publicly Available Specif. 16. <https://doi.org/9780580613210>
- Brownson, D.A.C., Kampouris, D.K., Banks, C.E., 2011. An overview of graphene in energy production and storage applications. *J. Power Sources* 196, 4873–4885. <https://doi.org/10.1002/9783527665105.ch5>
- Bystrzejewska-Piotrowska, G., Golimowski, J., Urban, P.L., 2009. Nanoparticles: Their potential toxicity, waste and environmental management. *Waste Manag.* 29, 2587–2595. <https://doi.org/10.1016/j.wasman.2009.04.001>
- Carson, R., 1962. *Silent spring*, Crest Book. <https://doi.org/10.1093/forestry/36.2.195>
- Chabot, V., Kim, B., Sloper, B., Tzoganakis, C., Yu, A., 2013. High yield production and purification of few layer graphene by Gum Arabic assisted physical sonication. *Sci. Rep.* 3, 1–7. <https://doi.org/10.1038/srep01378>
- Chen, J., Li, Y., Huang, L., Li, C., Shi, G., 2015. High-yield preparation of graphene oxide from small graphite flakes via an improved Hummers method with a simple purification process. *Carbon N. Y.* 81, 826–834. <https://doi.org/10.1016/j.carbon.2014.10.033>
- Chen, Z., Meng, H., Xing, G., Chen, C., Zhao, Y., 2007. Toxicological and biological effects of nanomaterials. *J. Nanotechnol.* 4, 179–196. <https://doi.org/10.1504/IJNT.2007.012323>
- Chiang, I.W., Brinson, B.E., Huang, A.Y., Willis, P.A., Bronikowski, M.J., Margrave, J.L., Smalley, R.E., Hauge, R.H., 2001a. Purification and characterization of single-wall carbon nanotubes (SWNTs) obtained from the gas-phase decomposition of CO (HiPco process). *J. Phys. Chem. B* 105, 8297–8301. <https://doi.org/10.1021/jp0114891>
- Chiang, I.W., Brinson, B.E., Smalley, R.E., Margrave, J.L., Hauge, R.H., 2001b. Purification and

- Characterization of Single-Wall Carbon Nanotubes. *J. Phys. Chem. B* 105, 1157–1161.  
<https://doi.org/10.1021/jp003453z>
- Christian, P., Von Der Kammer, F., Baalousha, M., Hofmann, T., 2008. Nanoparticles: Structure, properties, preparation and behaviour in environmental media. *Ecotoxicology* 17, 326–343.  
<https://doi.org/10.1007/s10646-008-0213-1>
- Chung, C., Kim, Y.K., Shin, D., Ryoo, S.R., Hong, B.H., Min, D.H., 2013. Biomedical applications of graphene and graphene oxide. *Acc. Chem. Res.* 46, 2211–2224.  
<https://doi.org/10.1021/ar300159f>
- Corrias, M., Caussat, B., Ayrat, A., Durand, J., Kihn, Y., Kalck, P., Serp, P., 2003. Carbon nanotubes produced by fluidized bed catalytic CVD: First approach of the process. *Chem. Eng. Sci.* 58, 4475–4482. [https://doi.org/10.1016/S0009-2509\(03\)00265-3](https://doi.org/10.1016/S0009-2509(03)00265-3)
- Costerton, J., Lewandowski, Z., Caldwell, D., Korber, D., Lappin-Scott, H., 1995. Microbial biofilms. *Annu Rev Microbiol* 49, 711–745. [https://doi.org/0066-4227/9511 00 1-0711 \\$05.0](https://doi.org/0066-4227/9511 00 1-0711 $05.0)
- Crane, M., Handy, R.D., Garrod, J., Owen, R., 2008. Ecotoxicity test methods and environmental hazard assessment for engineered nanoparticles. *Ecotoxicology* 17, 421–437.  
<https://doi.org/10.1007/s10646-008-0215-z>
- Cushing, C.E., Wolf, E.G., 1984. Primary production in rattlesnake springs, a cold desert spring-stream. *Hydrobiologia* 114, 229–236. <https://doi.org/10.1007/BF00031874>
- Dai, H., Javey, a L.I., Pop, E., Mann, D., Kim, W., Lu, Y., 2006. Electrical Transport Properties and Field Effect Transistors of Carbon Nanotubes. *NANO Br. Reports Rev.* 1, 1–4.  
<https://doi.org/10.1142/S1793292006000070>
- Dai, H., Wong, E.W., Lieber, C.M., 1996. Probing Electrical Transport in Nanomaterials: Conductivity of Individual Carbon Nanotubes. *Science (80- )*. 272, 523–526.  
<https://doi.org/10.1126/science.272.5261.523>
- Dato, A., Radmilovic, V., Lee, Z., Phillips, J., Frenklach, M., 2008. Substrate-Free Gas-Phase Synthesis of Graphene Sheets. *Nano Lett.* 8, 2012–2016. <https://doi.org/10.1021/nl8011566>
- Davies, D., 2003. Understanding biofilm resistance to antibacterial agents. *Nat. Rev. Drug Discov.* 2, 114–122. <https://doi.org/10.1038/nrd1008>
- Davies, D.G., Davies, D.G., Parsek, M.R., Pearson, J.P., Iglewski, B.H., Costerton, J.W., Greenberg, E.P., 2014. The Involvement of Cell-to-Cell Signals in the Development of a Bacterial Biofilm The Involvement of Cell-to-Cell Signals in the Development of a Bacterial Biofilm. *Science (80- )*. 280, 295–299. <https://doi.org/10.1126/science.280.5361.295>
- De Silva, K.K.H., Huang, H.H., Joshi, R.K., Yoshimura, M., 2017. Chemical reduction of graphene oxide using green reductants. *Carbon N. Y.* 119, 190–199.  
<https://doi.org/10.1016/j.carbon.2017.04.025>
- Dekkers, S., Krystek, P., Peters, R.J.B., Lankveld, D.P.K., Bokkers, B.G.H., Van Hoeven-Arentzen, P.H., Bouwmeester, H., Oomen, A.G., 2011. Presence and risks of nanosilica in food products. *Nanotoxicology* 5, 393–405. <https://doi.org/10.3109/17435390.2010.519836>
- Dillon, A.C., Gennett, T., Jones, K.M., Alleman, J.L., Parilla, P.A., Heben, M.J., 1999. Simple and complete purification of single-walled carbon nanotube materials. *Adv. Mater.* 11, 1354–1358.  
[https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1521-4095\(199911\)11:16<1354::AID-ADMA1354>3.0.CO;2-N](https://doi.org/10.1002/(SICI)1521-4095(199911)11:16<1354::AID-ADMA1354>3.0.CO;2-N)
- Dodds, W.K., 2003. The role of periphyton in phosphorus retention in shallow freshwater aquatic systems. *J. Phycol.* 39, 840–849. <https://doi.org/10.1046/j.1529-8817.2003.02081.x>
- El-temsah, Y., Pinelli, E., Verneuil, L., Silvestre, J., Mouchet, F., Gauthier, L., Barret, M., 2017. Carbon nanotubes shape the bacterial communities associated with the freshwater diatom

- Nitzschia linearis*, in: 1st International Conference on Microbial Ecotoxicology.
- Feng, L., Liu, Z., 2011. Graphene in biomedicine: opportunities and challenges. *Nanomedicine (Lond)*. 6, 317–324. <https://doi.org/10.2217/nmm.10.158>
- Ferreira, R., 2006. Electrons et phonons dans les nanostructures de semiconducteurs. Université Pierre et Marie Curie.
- Flahaut, E., Bacsá, R., Peigney, A., Laurent, C., Flahaut, E., Bacsá, R., Peigney, A., Laurent, C., Ccvd, G., 2003. Gram-scale CCVD synthesis of double-walled carbon nanotubes. *Chem. Commun.* 12, 1442–1443. <https://doi.org/10.1039/b301514a>
- Flemming, H., Wingender, J., 2010. The biofilm matrix. *Nature* 8, 623–633. <https://doi.org/10.1002/9783527620944.ch4>
- Flemming, H.C., Neu, T.R., Wozniak, D.J., 2007. The EPS matrix: The “House of Biofilm Cells.” *J. Bacteriol.* 189, 7945–7947. <https://doi.org/10.1128/JB.00858-07>
- Freixa, A., Acuña, V., Sanchís, J., Farré, M., Barceló, D., Sabater, S., 2018. Ecotoxicological effects of carbon based nanomaterials in aquatic organisms. *Sci. Total Environ.* 619–620, 328–337. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2017.11.095>
- Gao, X., Olape, O.A., Leff, L.G., 2005. Comparison of benthic bacterail community composition in nine streams. *Aquat. Microb. Ecol.* 40, 51–60.
- Gebara, F., 1999. Activated sludge biofilm wastewater treatment system. *Water Res.* 33, 230–238. [https://doi.org/10.1016/S0043-1354\(98\)00210-3](https://doi.org/10.1016/S0043-1354(98)00210-3)
- Geim, A.K., 2009. Graphene : Status and Prospects. *Science (80-. )*. 324, 1530–1534. <https://doi.org/10.1126/science.1158877>
- Gleick, P.H., Palaniappan, M., 2010. Peak water limits to freshwater withdrawal and use. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 107, 11155–11162. <https://doi.org/10.1073/pnas.1004812107>
- Gottschalk, F., Scholz, R.W., Nowack, B., 2010. Probabilistic material flow modeling for assessing the environmental exposure to compounds: Methodology and an application to engineered nano-TiO<sub>2</sub> particles. *Environ. Model. Softw.* 25, 320–332. <https://doi.org/10.1016/j.envsoft.2009.08.011>
- Gottschalk, F., Sonderer, T., Scholz, R.W., Nowack, B., 2009. Modeled environmental concentrations of engineered nanomaterials (TiO<sub>2</sub>, ZnO, Ag, CNT, fullerenes) for different regions. *Environ. Sci. Technol.* 43, 9216–9222. <https://doi.org/10.1021/es9015553>
- Goyal, D., Zhang, X.J., Rooney-Varga, J.N., 2010. Impacts of single-walled carbon nanotubes on microbial community structure in activated sludge. *Lett. Appl. Microbiol.* 51, 428–435. <https://doi.org/10.1111/j.1472-765X.2010.02913.x>
- Guo, T., Nikolaev, P., Thess, A., Colbert, D.T., Smalley, R.E., 1995. Catalytic growth of single-walled manotubes by laser vaporization. *Chem. Phys. Lett.* 243, 49–54. [https://doi.org/10.1016/0009-2614\(95\)00825-O](https://doi.org/10.1016/0009-2614(95)00825-O)
- Handy, R.D., Shaw, B.J., 2007. Toxic effects of nanoparticles and nanomaterials: Implications for public health, risk assessment and the public perception of nanotechnology. *Heal. Risk Soc.* 9, 125–144. <https://doi.org/10.1080/13698570701306807>
- Hone, J., 2001. Phonons and thermal properties of carbon nanotubes. *Top. Appl. Phys.* 80, 273–286. [https://doi.org/10.1007/3-540-39947-X\\_11](https://doi.org/10.1007/3-540-39947-X_11)
- Hong, S., Myung, S., 2007. Nanotube electronics : A flexible approach to mobility. *Nature* 2, 207–208.



- Hoyt, V.W., Mason, E., 2008. Nanotechnology. Emerging health issues. *J. Chem. Heal. Saf.* 15, 10–15. <https://doi.org/10.1016/j.jchas.2007.07.015>
- Hu, W., Peng, C., Luo, W., Lv, M., Li, X., Li, D., Huang, Q., Fan, C., 2010. Graphene-based antibacterial paper. *ACS Nano* 4, 4317–4323. <https://doi.org/10.1021/nn101097v>
- Hull, M.S., Kennedy, A.J., Steevens, J.A., Bednar, A.J., Weiss, C.A., Vikesland, P.J., 2009. Release of metal impurities from carbon nanomaterials influences aquatic toxicity. *Environ. Sci. Technol.* 43, 4169–4174. <https://doi.org/10.1021/es802483p>
- Hummers, W.S., Offeman, R.E., 1958. Preparation of Graphitic Oxide. *J. Am. Chem. Soc.* 80, 1339. <https://doi.org/10.1021/ja01539a017>
- Hund-rinke, K., Simon, M., 2006. Ecotoxic Effect of Photocatalytic Active Nanoparticles (TiO<sub>2</sub>) on Algae and Daphnids. *Env. Sci Pollut Res* 1–8. <https://doi.org/10.1065/espr2006.06.311> Abstract
- Hyung, H., Fortner, J.D., 2007. Natural Organic Matter Stabilizes Carbon Nanotubes in the Aqueous Phase 179–184.
- Iijima, S., 1991. Helical microtubules of graphitic carbon. *Nature* 354. <https://doi.org/10.1038/354056a0>
- Iijima, S., Ichihashi, T., 1993. Single-shell carbon nanotubes of 1-nm diameter. *Nature* 363, 603–605. <https://doi.org/10.1038/363603a0>
- INRS, 2018. Nanomatériaux, nanoparticules, Médecine et Maladies Infectieuses. [https://doi.org/10.1016/S0399-077X\(07\)80055-2](https://doi.org/10.1016/S0399-077X(07)80055-2)
- INRS, 2015. Les Nanomatériaux Manufacturés À L’Horizon 2030.
- Jenkins, S.R., Arenas, F., Arrontes, J., Bussell, J., Castro, J., Coleman, R.A., Hawkins, S.J., Kay, S., Martínez, B., Oliveros, J., Roberts, M.F., Sousa, S., Thompson, R.C., Hartnoll, R.G., 2001. European-scale analysis of seasonal variability in limpet grazing activity and microalgal abundance. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 211, 193–203. <https://doi.org/10.3354/meps211193>
- Jin, Y., Jia, M., Zhang, M., Wen, Q., 2013. Preparation of stable aqueous dispersion of graphene nanosheets and their electrochemical capacitive properties. *Appl. Surf. Sci.* 264, 787–793. <https://doi.org/10.1016/j.apsusc.2012.10.130>
- Journet, C., Maser, W.K., Bernier, P., Loiseau, A., Lamy de la Chapelle, M., Lefrant, S., Deniard, P., Lee, R., Fischer, J.E., 1997. Large-scale production of single-walled carbon nanotubes by the electric-arc technique. *Nature* 388, 756–758. <https://doi.org/10.1038/41972>
- Kang, S., Herzberg, M., Rodrigues, D.F., Elimelech, M., 2008. Antibacterial effects of carbon nanotubes: size does matter! *Langmuir* 24, 6409–6413. <https://doi.org/10.1021/la800951v>
- Kang, S., Pinault, M., Pfefferle, L., Elimelech, M., 2007. Single-Walled Carbon Nanotubes Exhibit Strong Antimicrobial Activity. *Langmuir* 23, 8670–8673.
- Karajanagi, S.S., Yang, H.C., Asuri, P., Sellitto, E., Dordick, J.S., Kane, R.S., 2006. Protein-assisted solubilization of single-walled carbon nanotubes. *Langmuir* 22, 1392–1395. <https://doi.org/10.1021/La0528201>
- Kasumov, A.Y., Deblock, R., Kociak, M., Reulet, B., Bouchiat, H., Khodos, I.I., Gorbatov, Y.B., Volkov, V.T., Journet, C., Burghard, M., 1999. Supercurrents Through Single-Walled Carbon Nanotubes. *Science* (80-. ). 284, 1508–1511. <https://doi.org/10.1126/science.284.5419.1508>
- Keller, A. a., McFerran, S., Lazareva, A., Suh, S., 2013. Global life cycle releases of engineered nanomaterials. *J. Nanoparticle Res.* 15, 1692. <https://doi.org/10.1007/s11051-013-1692-4>
- Khan, U., O’Neill, A., Lotya, M., De, S., Coleman, J.N., 2010. High-concentration solvent exfoliation

- of graphene. *Small* 6, 864–871. <https://doi.org/10.1002/sml.200902066>
- Klaine, S.J., Alvarez, P.J.J., Batley, G.E., Fernandes, T.F., Handy, R.D., Lyon, D.Y., Mahendra, S., McLaughlin, M.J., Lead, J.R., 2008. Nanomaterials in the environment: Behavior, fate, bioavailability, and effects. *Environ. Toxicol. Chem.* 27, 1825–1851. <https://doi.org/10.1897/08-090.1>
- Kong, J., Franklin, N.R., Zhou, C., Chapline, M.G., Peng, S., Cho, K., Dai, H., 2000. Nanotube molecular wires as sensors. *Science* (80-. ). 287, 622–625. <https://doi.org/10.1126/science.287.5453.622>
- Kotchey, G.P., Allen, B.L., Vedala, H., Yanamala, N., Kapralov, A.A., Tyurina, Y.Y., Klein-Seetharaman, J., Kagan, V.E., Star, A., 2011. The enzymatic oxidation of graphene oxide. *ACS Nano* 5, 2098–2108. <https://doi.org/10.1021/nn103265h>
- Kotchey, G.P., Zhao, Y., Kagan, V.E., Star, A., 2013. Peroxidase-mediated biodegradation of carbon nanotubes in vitro and in vivo. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 65, 1921–1932. <https://doi.org/10.1016/j.addr.2013.07.007>
- Kümmerer, K., Menz, J., Schubert, T., Thielemans, W., 2011. Biodegradability of organic nanoparticles in the aqueous environment. *Chemosphere* 82, 1387–1392. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2010.11.069>
- Kwok, K.W., Leung, K.M., Flahaut, E., Cheng, J., Cheng, S.H., 2010. Chronic toxicity of double-walled carbon nanotubes to three marine organisms: influence of different dispersion methods. *Nanomedicine* 5, 951–961. <https://doi.org/10.2217/nmm.10.59>
- Lam, C., James, J.T., McCluskey, R., Arepalli, S., Hunter, R.L., 2006. A Review of Carbon Nanotube Toxicity and Assessment of Potential Occupational and Environmental Health Risks. *Crit. Rev. Toxicol.* 36, 189–217. <https://doi.org/10.1080/10408440600570233>
- Lamelot, M., 2015. 5 choses à savoir sur les téléviseurs à Quantum Dots [WWW Document]. URL <https://www.tomshardware.fr/articles/tv-quantum-dots,2-2365.html>
- Lanphere, J.D., Rogers, B., Luth, C., Bolster, C.H., Walker, S.L., 2014. Stability and transport of graphene oxide nanoparticles in groundwater and surface water. *Environ. Eng. Sci.* VO - 31, no. 5.
- Laurent, C., Flahaut, E., Peigney, A., Rousset, A., 1998. Metal nanoparticles for the catalytic synthesis of carbon nanotubes. *New J. Chem.* 22, 1229–1237.
- Lazarova, V., Manem, J., 1995. Biofilm characterization and activity analysis in water and wastewater treatment. *Water Res.* 29, 2227–2245. [https://doi.org/10.1016/0043-1354\(95\)00054-0](https://doi.org/10.1016/0043-1354(95)00054-0)
- Lee, C., Wei, X., Kysar, J.W., Hone, J., 2008. Measurement of the elastic properties and intrinsic strength of monolayer graphene. *Science* (80-. ). 321, 385–388. <https://doi.org/10.1126/science.1157996>
- Li, R., Wang, X., Ji, Z., Sun, B., Zhang, H., Chang, C.H., Lin, S., Meng, H., Liao, Y.P., Wang, M., Li, Z., Hwang, A.A., Song, T. Bin, Xu, R., Yang, Y., Zink, J.I., Nel, A.E., Xia, T., 2013. Surface charge and cellular processing of covalently functionalized multiwall carbon nanotubes determine pulmonary toxicity. *ACS Nano* 7, 2352–2368. <https://doi.org/10.1021/nn305567s>
- Lin, S., Shih, C.J., Strano, M.S., Blankschtein, D., 2011. Molecular insights into the surface morphology, layering structure, and aggregation kinetics of surfactant-stabilized graphene dispersions. *J. Am. Chem. Soc.* 133, 12810–12823. <https://doi.org/10.1021/ja2048013>
- Liné, C., Larue, C., Flahaut, E., 2017. Carbon nanotubes: Impacts and behaviour in the terrestrial ecosystem - A review. *Carbon N. Y.* 123, 767–785. <https://doi.org/10.1016/j.carbon.2017.07.089>
- Liu, C., Fan, Y., Liu, M., Cong, H.T., Cheng, H.M., 1999. Hydrogen Storage in Single-Walled Carbon

- Nanotubes at Room Temperature. *Science* (80-. ). 286, 1127–1129.  
<https://doi.org/10.1126/science.286.5442.1127>
- Liu, S., Wei, L., Hao, L., Fang, N., Chang, M.W., Xu, R., Yang, Y., Chen, Y., 2009. Sharper and faster “Nano darts” kill more bacteria: A study of antibacterial activity of individually dispersed pristine single-walled carbon nanotube. *ACS Nano* 3, 3891–3902.  
<https://doi.org/10.1021/nn901252r>
- Liu, S., Zeng, T.H., Hofmann, M., Burcombe, E., Wei, J., Jiang, R., Kong, J., Chen, Y., 2011. Antibacterial activity of graphite, graphite oxide, graphene oxide, and reduced graphene oxide: Membrane and oxidative stress. *ACS Nano* 5, 6971–6980. <https://doi.org/10.1021/nn202451x>
- Liu, X.-M., Sheng, G.-P., Luo, H.-W., Zhang, F., Yuan, S.-J., Xu, J., Zeng, R.J., Wu, J.-G., Yu, H.-Q., 2010. Contribution of Extracellular Polymeric Substances (EPS) to the Sludge Aggregation. *Environ. Sci. Technol.* 44, 4355–4360. <https://doi.org/10.1021/es9016766>
- Liu, Y., Li, J., Qiu, X., Burda, C., 2007. Bactericidal activity of nitrogen-doped metal oxide nanocatalysts and the influence of bacterial extracellular polymeric substances (EPS). *J. Photochem. Photobiol. A Chem.* 190, 94–100. <https://doi.org/10.1016/j.jphotochem.2007.03.017>
- Long, Z., Ji, J., Yang, K., Lin, D., Wu, F., 2012. Systematic and quantitative investigation of the mechanism of carbon nanotubes’ toxicity toward algae. *Environ. Sci. Technol.* 46, 8458–8466.  
<https://doi.org/10.1021/es301802g>
- Lu, J.P., 1997. Elastic Properties of Carbon Nanotubes and Nanoropes. *Phys. Rev. Lett.* 79, 1297–1300. <https://doi.org/10.1103/PhysRevLett.79.1297>
- Lukhele, L.P., Mamba, B.B., Musee, N., Wepener, V., 2015. Acute Toxicity of Double-Walled Carbon Nanotubes to Three Aquatic Organisms. *J. Nanomater.* 2015, 1–19.  
<https://doi.org/10.1155/2015/219074>
- Luongo, L.A., Zhang, X., 2010. Toxicity of carbon nanotubes to the activated sludge process. *J. Hazard. Mater.* 178, 356–362. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2010.01.087>
- Lyautey, E., Jackson, C.R., Cayrou, J., Rols, J.L., Garabétian, F., 2005. Bacterial community succession in natural river biofilm assemblages. *Microb. Ecol.* 50, 589–601.  
<https://doi.org/10.1007/s00248-005-5032-9>
- Malesevic, A., Vitchev, R., Schouteden, K., Volodin, A., Zhang, L., Tendeloo, G. Van, Vanhulsel, A., Haesendonck, C. Van, 2008. Synthesis of few-layer graphene via microwave plasma-enhanced chemical vapour deposition. *Nanotechnology* 19, 305604. <https://doi.org/10.1088/0957-4484/19/30/305604>
- Markets and Markets, 2017. Carbon Nanotubes (CNT) Market by Type (Single, Multi Walled), Method (Chemical Vapor Deposition, Catalytic Chemical Vapor Deposition, High Pressure Carbon Monoxide), Application (Electronics, Chemical, Batteries, Energy, Medical) - Global Forecast to 2022.
- Maser, W.K., Muñoz, E., Benito, A.M., Martínez, M.T., De La Fuente, G.F., Maniette, Y., Anglaret, E., Sauvajol, J.L., 1998. Production of high-density single-walled nanotube material by a simple laser-ablation method. *Chem. Phys. Lett.* 292, 587–593. [https://doi.org/10.1016/S0009-2614\(98\)00776-3](https://doi.org/10.1016/S0009-2614(98)00776-3)
- Matorin, D.N., Karateyeva, A. V., Osipov, V.A., Lukashev, E.P., Seifullina, N.K., Rubin, A.B., 2010. Influence of carbon nanotubes on chlorophyll fluorescence parameters of green algae *Chlamydomonas reinhardtii*. *Nanotechnologies Russ.* 5, 320–327.  
<https://doi.org/10.1134/S199507801005006X>
- Miao, A., Schwehr, K.A., Xu, C., Zhang, S., Luo, Z., Quigg, A., Santschi, P.H., 2009. The algal toxicity of silver engineered nanoparticles and detoxification by exopolymeric substances.

- Environ. Pollut. 157, 3034–3041. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2009.05.047>
- Mohanty, N., Berry, V., 2008. Graphene-based single-bacterium resolution biodevice and DNA transistor: Interfacing graphene derivatives with nanoscale and microscale biocomponents. *Nano Lett.* 8, 4469–4476. <https://doi.org/10.1021/nl802412n>
- Monthioux, M., 2012. An Introduction to Carbon Nanotubes, in: *Carbon Meta-Nanotubes*. John Wiley & Sons, pp. 7–39.
- Moriarty, F., 1988. *Ecotoxicology*. *Hum. Exp. Toxicol.* 7, 437–441. <https://doi.org/10.1177/096032718800700510>
- Morin, S., Duong, T.T., Herlory, O., Feurtet-Mazel, A., Coste, M., 2008. Cadmium toxicity and bioaccumulation in freshwater biofilms. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 54, 173–186. <https://doi.org/10.1007/s00244-007-9022-4>
- Mottier, A., Mouchet, F., Laplanche, C., Cadarsi, S., Lagier, L., Arnault, J., Girard, H.A., Leon, V., Vazquez, E., Sarrieu, C., Pinelli, E., Gauthier, L., Flahaut, E., 2016. Surface Area of Carbon Nanoparticles: A Dose Metric for a More Realistic Ecotoxicological Assessment. *Nano. Lett.* 16, 3514–3518. <https://doi.org/10.1021/acs.nanolett.6b00348>
- Mu, Q., Jiang, G., Chen, L., Zhou, H., Fourches, D., Tropsha, A., Yan, B., 2014. Chemical basis of interactions between engineered nanoparticles and biological systems. *Chem. Rev.* 114, 7740–7781. <https://doi.org/10.1021/cr400295a>
- Murr, L.E., Soto, K.F., Esquivel, E. V., Bang, J.J., Guerrero, P.A., Lopez, D.A., Ramirez, D.A., 2004. Carbon nanotubes and other fullerene-related nanocrystals in the environment: A TEM study. *Jom* 56, 28–31. <https://doi.org/10.1007/s11837-004-0106-6>
- Nanowerk, 2017. Carbon nanotubes 101 – Purification methods.
- Navarro, E., Baun, A., Behra, R., Hartmann, N.B., Filser, J., Miao, A.-J., Quigg, A., Santschi, P.H., Sigg, L., 2008. Environmental behavior and ecotoxicity of engineered nanoparticles to algae, plants, and fungi. *Ecotoxicology* 17, 372–386. <https://doi.org/10.1007/s10646-008-0214-0>
- Nel, A., Xia, T., Mädler, L., Li, N., 2006. Toxic Potential of Materials at the Nanolevel. *Science* (80-. ). 311, 622–627. <https://doi.org/10.1126/science.1114397>
- Nguyen, T., Pellegrin, B., Bernard, C., Gu, X., Gorham, J.M., Stutzman, P., Stanley, D., Shapiro, A., Byrd, E., Hettner, R., Chin, J., 2011. Fate of nanoparticles during life cycle of polymer nanocomposites, in: *Journal of Physics: Conference Series*. <https://doi.org/10.1088/1742-6596/304/1/012060>
- Nikolaev, P., Bronikowski, M.J., Bradley, R.K., Rohmund, F., Colbert, D.T., Smith, K. a, Smalley, R.E., 1999. Gas-phase catalytic growth of single-walled carbon nanotubes from carbon monoxide. *Chem. Phys. Lett.* 313, 91–97. [https://doi.org/10.1016/S0009-2614\(99\)01029-5](https://doi.org/10.1016/S0009-2614(99)01029-5)
- Nogueira, P.F.M., Nakabayashi, D., Zucolotto, V., 2015. The effects of graphene oxide on green algae *Raphidocelis subcapitata*. *Aquat. Toxicol.* 166, 29–35. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2015.07.001>
- Novoselov, K.S., Geim, A.K., Morozov, S.V., Jiang, D., Zhang, Y., Dubonos, S.V., Grigorieva, I.V., Firsov, A.A., 2004. Electric field effect in atomically thin carbon films. *Science* (80-. ). 306, 666–669. <https://doi.org/10.1126/science.1102896>
- Novoselov, K.S., Geim, A.K., Morozov, S. V, Jiang, D., Katsnelson, M.I., Grigorieva, I. V, Dubonos, S. V, 2005. Two-dimensional gas of massless Dirac fermions in graphene 438, 197–200. <https://doi.org/10.1038/nature04233>
- Novoselov, K.S., Jiang, D., Schedin, F., Booth, T.J., Khotkevich, V. V., Morozov, S. V., Geim, A.K., 2005. Two-dimensional atomic crystals. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 102, 10451–10453.

<https://doi.org/10.1073/pnas.0502848102>

- Novoselov, K.S., Jiang, Z., Zhang, Y., Morozov, S. V, Stormer, H.L., Zeitler, U., Maan, J.C., Boebinger, G.S., Kim, P., Geim, A.K., 2007. Room-Temperature Quantum Hall Effect in Graphene. *Science* (80- ). 315, 1379–1379. <https://doi.org/10.1126/science.1137201>
- Nowack, B., Bucheli, T.D., 2007. Occurrence, behavior and effects of nanoparticles in the environment. *Environ. Pollut.* 150, 5–22. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2007.06.006>
- O’Toole, G., Kaplan, H.B., Kolter, R., 2000. Biofilm Formations as Microbial Development. *Annu Rev Microbiol* 54, 49–79. [https://doi.org/0066-4227/00/1001-0049\\$14.00](https://doi.org/0066-4227/00/1001-0049$14.00)
- Oberdörster, E., 2004. Manufactured nanomaterials (fullerenes, C60) induce oxidative stress in the brain of juvenile largemouth bass. *Environ. Health Perspect.* 112, 1058–1062. <https://doi.org/10.1289/ehp.7021>
- Oberdörster, G., Oberdörster, E., Oberdörster, J., 2005. Nanotoxicology: An emerging discipline evolving from studies of ultrafine particles. *Environ. Health Perspect.* 113, 823–839. <https://doi.org/10.1289/ehp.7339>
- OCDE, 2010. Guidance manual for the testing of manufactured nanomaterials : OCDE’s sponsorship programme; firts revision. OCDE Environ. Heal. Saf. Publ. Ser. Saf. Manuf. Nanomater. 25, 1–92.
- Ohno, Y., Maehashi, K., Yamashiro, Y., Matsumoto, K., 2009. Electrolyte-Gated Graphene Field-Effect Transistors for Detecting pH and Protein Adsorption. *Nano Lett.* 9, 3318–3322. <https://doi.org/10.1021/nl901596m>
- Oleszczuk, P., Pan, B., Xing, B., 2009. Adsorption and desorption of oxytetracycline and carbamazepine by multiwalled carbon nanotubes. *Environ. Sci. Technol.* 43, 9167–9173. <https://doi.org/10.1021/es901928q>
- Paerl, H., Pinckney, J., 1996. A Mini-review of Microbial Consortia : Their roles in aquatic production and biogeochemical cycling. *Microb. Ecol.* 31, 225–247. <https://doi.org/10.1007/s00248-007-9209-2>
- Park, S., Ruoff, R.S., 2009. Chemical methods for the production of graphenes. *Nat. Nanotechnol.* 4, 217–224. <https://doi.org/10.1038/nnano.2009.58>
- Paul, D.R., Robeson, L.M., 2008. Polymer nanotechnology: Nanocomposites. *Polymer (Guildf).* 49, 3187–3204. <https://doi.org/10.1016/j.polymer.2008.04.017>
- Pei, S., Cheng, H.M., 2012. The reduction of graphene oxide. *Carbon N. Y.* 50, 3210–3228. <https://doi.org/10.1016/j.carbon.2011.11.010>
- Peigney, A., Laurent, C., Flahaut, E., Bacsá, R.R., Rousset, A., 2001. Specific surface area of carbon nanotubes and bundles of carbon nanotubes. *Carbon N. Y.* 39, 507–514. [https://doi.org/10.1016/S0008-6223\(00\)00155-X](https://doi.org/10.1016/S0008-6223(00)00155-X)
- Peralta-Videa, J.R., Zhao, L., Lopez-Moreno, M.L., de la Rosa, G., Hong, J., Gardea-Torresdey, J.L., 2011. Nanomaterials and the environment: A review for the biennium 2008-2010. *J. Hazard. Mater.* 186, 1–15. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2010.11.020>
- Petersen, E.J., Henry, T.B., Zhao, J., MacCuspie, R.I., Kirschling, T.L., Dobrovolskaia, M.A., Hackley, V., Xing, B., White, J.C., 2014. Identification and avoidance of potential artifacts and misinterpretations in nanomaterial ecotoxicity measurements. *Environ. Sci. Technol.* 48, 4226–4246. <https://doi.org/10.1021/es4052999>
- Petersen, E.J., Zhang, L., Mattison, N.T., Carroll, D.M.O., Whelton, A.J., Uddin, N., Nguyen, T., Huang, Q., Henry, T.B., Holbrook, O.R.D., Chen, K.L., 2011. Potential Release Pathways , Environmental Fate , And Ecological Risks of Carbon Nanotubes. *Environ. Sci. Technol.* 45,

9837–9856. <https://doi.org/10.1021/es201579y>

- Popov, V.N., 2004. Carbon nanotubes: Properties and application. *Mater. Sci. Eng.* 43, 61–102. <https://doi.org/10.1016/j.mser.2003.10.001>
- Pretti, C., Oliva, M., Pietro, R. Di, Monni, G., Cevasco, G., Chiellini, F., Pomelli, C., Chiappe, C., 2014. Ecotoxicity of pristine graphene to marine organisms. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 101, 138–145. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2013.11.008>
- Pumera, M., 2007. Carbon nanotubes contain residual metal catalyst nanoparticles even after washing with nitric acid at elevated temperature because these metal nanoparticles are sheathed by several graphene sheets. *Langmuir* 23, 6453–6458. <https://doi.org/10.1021/la070088v>
- Pyl'nik, S. V., Dueck, J.H., Min'kov, L.L., 2007. Equilibrium thickness of a biofilm. *Theor. Found. Chem. Eng.* 41, 430–435. <https://doi.org/10.1134/S004057950704015X>
- Quigg, A., Chin, W., Chen, C., Zhang, S.-J., Jiang, Y., Miao, A., Schwehr, K. a, Xu, C., Santschi, P.H., 2013. Direct and Indirect Toxic Effects of Engineered Nanoparticles on Algae: Role of Natural Organic Matter. *Sustain. Chem. Eng.* 1, 686–702. <https://doi.org/10.1021/sc400103x>
- Randrianjatovo-Gbalou, I., Rouquette, P., Lefebvre, D., Girbal-Neuhauser, E., Maracto-Romain, C.-E., 2017. In situ analysis of *Bacillus licheniformis* biofilms: Amyloid-like polymers and eDNA are involved in the adherence and aggregation of the extracellular matrix. *J. Appl. Microbiol.* 122, 1262–1274. <https://doi.org/10.1111/jam.13423>
- Research and Markets, 2016. The Global Nanomaterials Market to 2025.
- Ribeiro-Palau, R., Lafont, F., Brun-Picard, J., Kazazis, D., Michon, A., Cheynis, F., Couturaud, O., Consejo, C., Jouault, B., Poirier, W., Schopfer, F., 2015. Quantum Hall resistance standard in graphene devices under relaxed experimental conditions. *Nat. Nanotechnol.* 10, 965–971. <https://doi.org/10.1038/nnano.2015.192>
- Rinzler, A.G., Liu, J., Dai, H., Nikolaev, P., Huffman, C.B., Rodríguez-Macías, F.J., Boul, P.J., Lu, A.H., Heymann, D., Colbert, D.T., Lee, R.S., Fischer, J.E., Rao, A.M., Eklund, P.C., Smalley, R.E., 1998. Large-scale purification of single-wall carbon nanotubes: process, product, and characterization. *Appl. Phys. A Mater. Sci. Process.* 67, 29–37. <https://doi.org/10.1007/s003390050734>
- Rodrigues, D.F., Elimelech, M., 2010. Toxic Effects of Single-Walled Carbon Nanotubes in the Development of *E. coli* Biofilm. *Environ. Sci. Technol.* 44, 4583–4589. <https://doi.org/10.1021/es1005785>
- Romaní, A.M., Fund, K., Artigas, J., Schwartz, T., Sabater, S., Obst, U., 2008. Relevance of polymeric matrix enzymes during biofilm formation. *Microb. Ecol.* 56, 427–436. <https://doi.org/10.1007/s00248-007-9361-8>
- Romaní, A.M., Vázquez, E., Butturini, A., 2006. Microbial availability and size fractionation of dissolved organic carbon after drought in an intermittent stream: Biogeochemical link across the stream-riparian interface. *Microb. Ecol.* 52, 501–512. <https://doi.org/10.1007/s00248-006-9112-2>
- Ruiz, O.N., Fernando, K.A.S., Wang, B., Brown, N.A., Luo, P.G., McNamara, N.D., Vangsness, M., Sun, Y.P., Bunker, C.E., 2011. Graphene oxide: a nonspecific enhancer of cellular growth. *ACS Nano* 5, 8100–8107. <https://doi.org/10.1021/nn202699t>
- Sanchez, V.C., Jachak, A., Hurt, R.H., Kane, A.B., 2012. Biological Interactions of Graphene-Family Nanomaterials : An Interdisciplinary Review 15–34. <https://doi.org/10.1021/tx200339h>
- Sano, M., Okamura, J., Shinkai, S., 2001. Nanotubes in Electrolyte Solution : The. *Langmuir* 17, 7172–7173.
- Savolainen, K., Alenius, H., Norppa, H., Pylkkänen, L., Tuomi, T., Kasper, G., 2010. Risk assessment

- of engineered nanomaterials and nanotechnologies—A review. *Toxicology* 269, 92–104. <https://doi.org/10.1016/j.tox.2010.01.013>
- Scarselli, M., Castrucci, P., De Crescenzi, M., 2012. Electronic and optoelectronic nano-devices based on carbon nanotubes. *J. Phys. Condens. Matter* 24. <https://doi.org/10.1088/0953-8984/24/31/313202>
- Schierz, A., Espinasse, B., Wiesner, M.R., Bisesi, J.H., Sabo-Attwood, T., Ferguson, P.L., 2014. Fate of single walled carbon nanotubes in wetland ecosystems. *Environ. Sci. Nano* 1, 574–583. <https://doi.org/10.1039/c4en00063c>
- Schwab, F., Bucheli, T.D., Lukhele, L.P., Magrez, A., Nowack, B., Sigg, L., Knauer, K., 2011. Are Carbon Nanotube Effects on Green Algae Caused by Shading and Agglomeration? 6136–6144. <https://doi.org/10.1021/es200506b>
- Scott, C.D., Arepalli, S., Nikolaev, P., Smalley, R.E., 2001. Growth mechanisms for single-wall carbon nanotubes in a laser-ablation process. *Appl. Phys. A Mater. Sci. Process.* 72, 573–580. <https://doi.org/10.1007/s003390100761>
- See, C.H., Harris, A.T., 2007. A Review of Carbon Nanotube Synthesis via Fluidized-Bed Chemical Vapor Deposition. *Ind. Eng. Chem. Res.* 46, 997–1012. <https://doi.org/10.1021/ie060955b>
- Shen, H., Zhang, L., Liu, M., Zhang, Z., 2012. Biomedical applications of graphene. *Theranostics* 2, 283–294. <https://doi.org/10.7150/thno.3642>
- Simon-Deckers, A., Loo, S., Mayne-L'hermite, M., Herlin-Boime, N., Menguy, N., Reynaud, C., Gouget, B., Carriere, M., 2009. Size-, composition-and shape-dependent toxicological impact of metal oxide nanoparticles and carbon nanotubes toward bacteria. *Env. Sci. Technol.* 43, 8423–8429. <https://doi.org/10.1021/es9016975>
- Simpson, D.R., 2008. Biofilm processes in biologically active carbon water purification. *Water Res.* 42, 2839–2848. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2008.02.025>
- Sohn, E.K., Chung, Y.S., Johari, S.A., Kim, T.G., Kim, J.K., Lee, J.H., Lee, Y.H., Kang, S.W., Yu, I.J., 2015. Acute toxicity comparison of single-walled carbon nanotubes in various freshwater organisms. *Biomed Res. Int.* 2015. <https://doi.org/10.1155/2015/323090>
- Srivastava, P., Malviya, R., Dhamija, K., Gupta, S., Kumar Sharma, P., 2010. Nanotechnology : Application and Market. *Drug Invent. Today* 2, 254–257.
- Staggers, N., McCasky, T., Brazelton, N., Kennedy, R., 2008. Nanotechnology: The coming revolution and its implications for consumers, clinicians, and informatics. *Nurs. Outlook* 56, 268–274. <https://doi.org/10.1016/j.outlook.2008.06.004>
- Stankovich, S., Dikin, D.A., Piner, R.D., Kohlhaas, K.A., Kleinhammes, A., Jia, Y., Wu, Y., Nguyen, S.B.T., Ruoff, R.S., 2007. Synthesis of graphene-based nanosheets via chemical reduction of exfoliated graphite oxide. *Carbon N. Y.* 45, 1558–1565. <https://doi.org/10.1016/j.carbon.2007.02.034>
- Stevenson, R.J., 1997. Scale-Dependent Determinants and Consequences of Benthic Algal Heterogeneity. *J. North Am. Benthol. Soc.* 16, 248–262. <https://doi.org/10.2307/1468255>
- Sun, T.Y., Gottschalk, F., Hungerbühler, K., Nowack, B., 2014. Comprehensive probabilistic modelling of environmental emissions of engineered nanomaterials. *Environ. Pollut.* 185, 69–76. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2013.10.004>
- Tang, L., Schramm, A., Neu, T.R., Revsbech, N.P., Meyer, R.L., 2013. Extracellular DNA in adhesion and biofilm formation of four environmental isolates: a quantitative study. *FEMS Microbiol. Ecol.* 86, 394–403. <https://doi.org/10.1111/1574-6941.12168>
- Teissier, S., Torre, M., 2002. Simultaneous assessment of nitrification and denitrification on

- freshwater epilithic biofilms by acetylene block method. *Water Res.* 36, 3803–3811.  
[https://doi.org/10.1016/S0043-1354\(02\)00098-2](https://doi.org/10.1016/S0043-1354(02)00098-2)
- Terrones, M., 2004. Carbon nanotubes: synthesis and properties, electronic devices and other emerging applications. *Int. Mater. Rev.* 49, 325–377. <https://doi.org/10.1179/174328004X5655>
- The Nanotechnology Report, 2004. The Nanotechnology Report 2004 Features New Investment Strategies , Patent Licensing Opportunities and Trends [WWW Document]. URL <https://phys.org/news/2004-08-nanotechnology-features-investment-strategies-patent.html%0AThis>
- Tölle, F.J., Gamp, K., Mülhaupt, R., 2014. Scale-up and purification of graphite oxide as intermediate for functionalized graphene. *Carbon N. Y.* 75, 432–442.  
<https://doi.org/10.1016/j.carbon.2014.04.022>
- Townsend, S.A., Gell, P.A., 2005. The role of substrate type on benthic diatom assemblages in the Daly and Roper Rivers of the Australian wet/dry tropics. *Hydrobiologia* 548, 101–115.  
<https://doi.org/10.1007/s10750-005-0828-7>
- Vance, M.E., Kuiken, T., Vejerano, E.P., McGinnis, S.P., Hochella, M.F., Rejeski, D., Hull, M.S., 2015. Nanotechnology in the real world: Redeveloping the nanomaterial consumer products inventory. *Beilstein J. Nanotechnol.* 6, 1769–1780. <https://doi.org/10.3762/bjnano.6.181>
- Vecitis, C.D., Zodrow, K.R., Kang, S., Elimelech, M., 2010. Electronic-structure-dependent bacterial cytotoxicity of single-walled carbon nanotubes. *ACS Nano* 4, 5471–5479.  
<https://doi.org/10.1021/nn101558x>
- Verneuil, L., 2015. Toxicité environnementale et écotoxicité de nanotubes de carbone chez des diatomées benthiques: de la cellule au biofilm. Institut National Polytechnique de Toulouse (INP Toulouse).
- Verneuil, L., Silvestre, J., Mouchet, F., Flahaut, E., Boutonnet, J., Bourdiol, F., Bortolamiol, T., Baqué, D., Gauthier, L., Pinelli, E., 2014. Multi-walled carbon nanotubes , natural organic matter , and the benthic diatom *Nitzschia palea* : “ A sticky story .” *Nanotoxicology* 9, 119–229.  
<https://doi.org/10.3109/17435390.2014.918202>
- Verneuil, L., Silvestre, J., Randrianjatovo, I., Maracato-romain, C.-E., Girbal-Neuhauser, E., Mouchet, F., Flahaut, E., Gauthier, L., Pinelli, E., 2015. Double walled carbon nanotubes promote the overproduction of extracellular protein-like polymers in *Nitzschia palea* : An adhesive response for an adaptive issue. *Carbon N. Y.* 88, 113–125. <https://doi.org/10.1016/j.carbon.2015.02.053>
- Vu, B., Chen, M., Crawford, R.J., Ivanova, E.P., 2009. Bacterial extracellular polysaccharides involved in biofilm formation. *Molecules* 14, 2535–2554.  
<https://doi.org/10.3390/molecules14072535>
- Wallace, P.R., 1947. The band theory of graphite. *Phys. Rev.* 71, 622–634.  
<https://doi.org/10.1103/PhysRev.71.622>
- Wang, J., Manga, K.K., Bao, Q., Loh, K.P., 2011. High-yield synthesis of few-layer graphene flakes through electrochemical expansion of graphite in propylene carbonate electrolyte. *J. Am. Chem. Soc.* 133, 8888–8891. <https://doi.org/10.1021/ja203725d>
- Wang, X., Zhi, L., Müllen, K., 2008. Transparent, conductive graphene electrodes for dye-sensitized solar cells. *Nano Lett.* 8, 323–327. <https://doi.org/10.1021/nl072838r>
- Wei, L., Thakkar, M., Chen, Y., Addo, S., Mitra, S., Zhang, X., 2010. Cytotoxicity effects of water dispersible oxidized multiwalled carbon nanotubes on marine alga , *Dunaliella tertiolecta*. *Aquat. Toxicol.* 100, 194–201. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2010.07.001>
- Wetzel, R.G., 1983. Periphyton of freshwater ecosystems, in: First International Workshop on



Periphyton of Freshwater Ecosystems. Junk.

- Whitchurch, C.B., Tolker-Nielsen, T., Ragas, P.C., Mattick, J.S., 2002. Extracellular DNA required for bacterial biofilm formation. *Science* (80-. ). 295, 1487. <https://doi.org/10.1126/science.295.5559.1487>
- Winter, M., Besenhard, J.O., Spahr, M.E., Novák, P., 1998. Insertion electrode materials for rechargeable lithium batteries. *Adv. Mater.* 10, 725–763. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1521-4095\(199807\)10:10<725::AID-ADMA725>3.0.CO;2-Z](https://doi.org/10.1002/(SICI)1521-4095(199807)10:10<725::AID-ADMA725>3.0.CO;2-Z)
- Wolfaardt, G.M., Lawrence, J.R., Headley, J. V., Robarts, R.D., Caldwell, D.E., 1994. Microbial exopolymers provide a mechanism for bioaccumulation of contaminants. *Microb. Ecol.* 27, 279–291. <https://doi.org/10.1007/BF00182411>
- Wolfaardt, G.M., Lawrence, J.R., Robarts, R.D., Caldwell, D.E., 1995. Bioaccumulation of the herbicide diclofop in extracellular polymers and its utilization by a biofilm community during starvation. *Appl. Environ. Microbiol.* 61, 152–158.
- Wu, H., Drzal, L.T., 2012. Graphene nanoplatelet paper as a light-weight composite with excellent electrical and thermal conductivity and good gas barrier properties. *Carbon N. Y.* 50, 1135–1145. <https://doi.org/10.1016/j.carbon.2011.10.026>
- Wu, Y., Hudson, J.S., Lu, Q., Moore, J.M., Mount, A.S., Rao, A.M., Alexov, E., Ke, P.C., 2006. Coating single-walled carbon nanotubes with phospholipids. *J. Phys. Chem. B* 110, 2475–2478. <https://doi.org/10.1021/jp057252c>
- Wu, Z., Ren, W., Wen, L., Gao, L., Zhao, J., Chen, Z., Zhou, G., Li, F., 2010. Graphene Anchored with Co<sub>3</sub>O<sub>4</sub> Batteries with Enhanced Reversible 4, 3187–3194. <https://doi.org/10.1021/nn100740x>
- Wu, Z.S., Ren, W.C., Gao, L.B., Zhao, J.P., Chen, Z.P., Liu, B.L., Tang, D.M., Yu, B., Jiang, C.B., Cheng, H.M., 2009. Synthesis of Graphene Sheets with High Electrical Conductivity and Good Thermal Stability by Hydrogen Arc Discharge Exfoliation. *ACS Nano* 3, 411–417. <https://doi.org/10.1021/nn900020u>
- Yang, Z. hong, Wu, H. qing, 2001. Electrochemical intercalation of lithium into carbon nanotubes. *Solid State Ionics* 143, 173–180. [https://doi.org/10.1016/S0167-2738\(01\)00852-9](https://doi.org/10.1016/S0167-2738(01)00852-9)
- Yin, Y., Zhang, X.J., Graham, J., Luongo, L., 2009. Examination of purified single-walled carbon nanotubes on activated sludge process using batch reactors. *J. Environ. Sci. Heal. Part A* 661–665. <https://doi.org/10.1080/10934520902847695>
- You, Y., Das, K.K., Guo, H., Chang, C.W., Navas-Moreno, M., Chan, J.W., Verburg, P., Poulson, S.R., Wang, X., Xing, B., Yang, Y., 2017. Microbial Transformation of Multiwalled Carbon Nanotubes by *Mycobacterium vanbaalenii* PYR-1. *Environ. Sci. Technol.* 51, 2068–2076. <https://doi.org/10.1021/acs.est.6b04523>
- Yue, G.Z., Qiu, Q., Gao, B., Cheng, Y., Zhang, J., Shimoda, H., Chang, S., Lu, J.P., Zhou, O., 2002. Generation of continuous and pulsed diagnostic imaging x-ray radiation using a carbon-nanotube-based field-emission cathode. *Appl. Phys. Lett.* 81, 355–357. <https://doi.org/10.1063/1.1492305>
- Zhang, L., Petersen, E.J., Habteselassie, M.Y., Mao, L., Huang, Q., 2013. Degradation of multiwall carbon nanotubes by bacteria. *Environ. Pollut.* 181, 335–339. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2013.05.058>
- Zhang, Q., Huang, J.Q., Zhao, M.Q., Qian, W.Z., Wei, F., 2011. Carbon nanotube mass production: Principles and processes. *ChemSusChem* 4, 864–889. <https://doi.org/10.1002/cssc.201100177>
- Zhang, Y., Tan, Y.Y.-W.W., Stormer, H.L.H.H.L., Kim, P., 2005. Experimental observation of the

- quantum Hall effect and Berry's phase in graphene. *Nature* 438, 201–4.  
<https://doi.org/10.1038/nature04235>
- Zhao, J., Cao, X., Wang, Z., Dai, Y., Xing, B., 2017. Mechanistic understanding toward the toxicity of graphene-family materials to freshwater algae. *Water Res.*  
<https://doi.org/10.1016/j.watres.2016.12.037>
- Zhao, Y., Allen, B.L., Star, A., 2011. Enzymatic degradation of multiwalled carbon nanotubes. *J. Phys. Chem. A* 115, 9536–9544. <https://doi.org/10.1021/jp112324d>
- Zheng, M., Jagota, A., Semke, E.D., Diner, B.A., McLean, R.S., Lustig, S.R., Richardson, R.E., Tassi, N.G., 2003. DNA-assisted dispersion and separation of carbon nanotubes. *Nat. Mater.* 2, 338–342. <https://doi.org/10.1038/nmat877>
- Zhu, Y., Murali, S., Cai, W., Li, X., Suk, J.W., Potts, J.R., Ruoff, R.S., 2010. Graphene and graphene oxide: Synthesis, properties, and applications. *Adv. Mater.* 22, 3906–3924.  
<https://doi.org/10.1002/adma.201001068>
- Zurutuza, A., Marinelli, C., 2014. Challenges and opportunities in graphene commercialization. *Nat. Nanotechnol.* 9, 730–734. <https://doi.org/10.1038/nnano.2014.225>

## Chapitre 2

### Présentation du modèle biologique d'étude et des matériaux

# 1 Introduction

Comme mentionné dans le chapitre précédent, l'évaluation de la toxicité des nanoparticules de carbone a été réalisée sur un microorganisme tout particulier, la diatomée. Avant de décrire les paramètres biologiques suivis et les résultats obtenus, qui seront plus amplement abordés dans les chapitres suivants, ce chapitre présente le modèle biologique choisi, ainsi que l'intérêt de son utilisation au sein des études écotoxicologiques. Les conditions de culture cellulaire spécifiques à chaque étude sont détaillées dans les chapitres correspondants. Une présentation des deux formes allotropiques du carbone est également réalisée à la fin de ce chapitre en mentionnant sommairement leurs caractéristiques physiques et chimiques et leur méthode de production, qui sont détaillées dans les chapitres suivants.

## 2 La diatomée comme modèle d'étude

### 2.1 Origine et classification

Découvertes et observées pour la première fois en 1702, les diatomées sont tout d'abord classées dans le règne animal du fait de leur capacité à se mouvoir, mais c'est avec le progrès de la microscopie que leur vraie nature est mise à jour (Saint Martin, n.d.). Au XIX<sup>e</sup> siècle, après plus de 150 espèces recensées, les diatomées sont reconnues comme étant des organismes photosynthétiques. L'originalité de ces organismes, reposant sur leur étonnante carapace en silice appelée frustule, a fasciné les chercheurs du monde entier depuis plusieurs siècles. Ce frustule étant imputrescible, l'étude des fossiles a permis de déterminer l'origine des diatomées, marines en premier lieu, remontant au Jurassique (~185 millions d'années). Cependant, des outils de recherche se basant sur la génétique, entre autres, supposent une origine encore plus ancienne datant du Permien (Kooistra and Medlin, 1996).

Le nom de Bacillariée s'imposa en 1788 pour décrire la famille réunissant les différentes espèces de diatomées. Baptisés pour la première fois « diatomées » (*Diatoma*, en latin) en 1805, ces organismes sont aussi appelées Bacillariophycées, ou encore Diatomophycées, sous-catégorie des Bacillariophycées. Au plus haut de la taxinomie, les diatomées, étant des organismes eucaryotes, appartiennent au sous-domaine des Bicontés, rassemblant tout organisme dont la cellule présente deux flagelles (Stechmann and Cavalier-Smith, 2003). Parmi les règnes regroupés sous le domaine des Bicontés, les diatomées font partis des Chromoalvéolés au sein duquel deux groupes se distinguent : les Hacrobia et les Harosa, ou SAR (Burki et al., 2007). L'abréviation SAR provient de la première lettre de chacune des

trois divisions dont il est constitué : les Straménopiles, les Alvéolés et les Rhizariens. Les Straménopiles, connus sous d'autres noms comme Hétérokontés, Chromophytes, ou encore Chromistes, abritent la classe des diatomées (Patterson, 1999). La diversité des noms donnés à ce phylum est représentative des modifications de la systématique établie au cours des recherches successives. Ce dernier nom désigne les organismes possédant, au cours de leur cycle de vie, une cellule avec deux flagelles différents : un lisse et un plumeux. Au sein des Hétérokontés, trois embranchements se distinguent : les Ochrophytes désignant les organismes photosynthétiques, les Oomycètes, organismes filamenteux non photosynthétiques regroupant les champignons et les saprophytes, et enfin les Bigyras encore mal connus à ce jour (Cavalier-Smith, 1997, 1986). Les algues appartenant à l'embranchement des Ochrophytes, comme les diatomées, ont la particularité de présenter une coloration brune à dorée. Au sein de cet embranchement on retrouve alors 16 classes, selon *World Register of Marine Species* (Flanders Marine Institute, 2016) parmi lesquelles se trouvent les Bacillariophycées. Cette dernière désigne les micro-algues unicellulaires aquatiques pélagiques ou benthiques, entourées d'un squelette externe en silice, le frustule. La forme et l'ornementation du frustule permet alors de diviser les Bacillariophycées en trois classes :

- Les diatomées présentant un frustule à symétrie bilatérale avec un raphé (zone médiane non ornementée) (Figure 9b) sont des diatomées pennées regroupées sous la classe des Bacillariophycées.
- Les diatomées pennées sans raphé représentent la classe des Fragilariophycées (Figure 9c).
- Les diatomées centriques dont le frustule présente une symétrie radiaire appartiennent aux Coscinodiscophycées (Figure 9a).

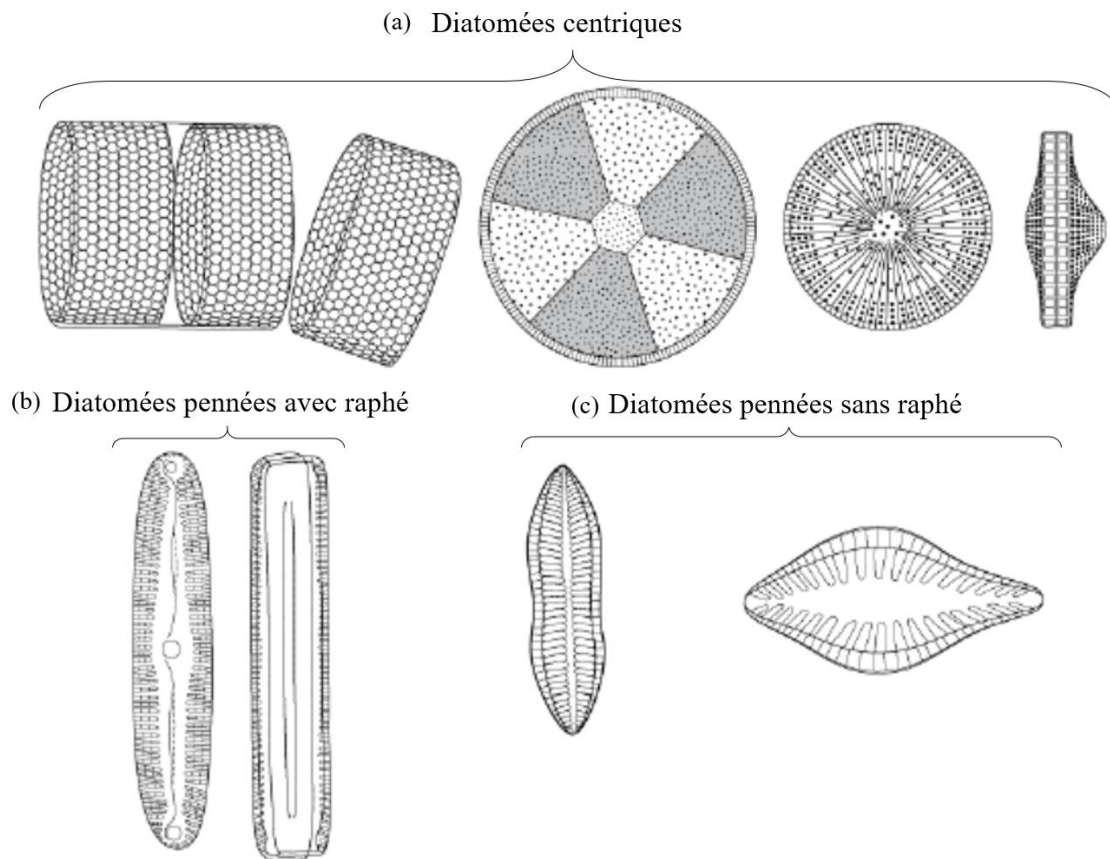


Figure 9. Présentation des différentes variétés de symétrie du frustule des Bacillariophycées. D'après Mathieu et ses collaborateurs (2011).

Depuis leur découverte, la classification des diatomées s'est basée sur la détermination de la morphologie grâce aux observations microscopiques. Cette méthode aujourd'hui contestée est un peu moins utilisée pour la reconnaissance spécifique des diatomées laissant place aux outils génétiques en perpétuel développement. Ces nouvelles méthodes apportent une bien meilleure qualité quant à la précision de l'appartenance phylogénétique des diatomées, qui restent malheureusement encore peu étudiées.

## 2.2 Biologie et cycle de vie

Les diatomées sont des micro-algues unicellulaires eucaryotes photosynthétiques et possèdent tous les organites propres à ces organismes. Le noyau des diatomées, localisé au centre de la cellule, lorsque celle-ci n'est pas en phase de division cellulaire, présente une membrane poreuse qui peut à certains endroits être liée au réticulum endoplasmique. Autotrophes en phase lumineuse et hétérotrophes à l'obscurité, les diatomées possèdent des gouttelettes lipidiques, réserve en glycérides, et des chloroplastes pouvant prendre des formes différentes en fonction de la classe de diatomées concernée. Les diatomées pennées, plutôt longitudinale,

présentent deux chloroplastes plaqués le long de la membrane (Figure 10a) tandis que les diatomées centriques, souvent de forme arrondie, possèdent plusieurs chloroplastes de petite taille dans le cytoplasme. En plus de la chlorophylle a et c, les diatomées possèdent des pigments chlorophylliens spécifiques appartenant à la famille des xanthophylles (diatoxanthine, diadinoxanthine, fucoxanthine), mais également des caroténoïdes leur conférant cette couleur brune.

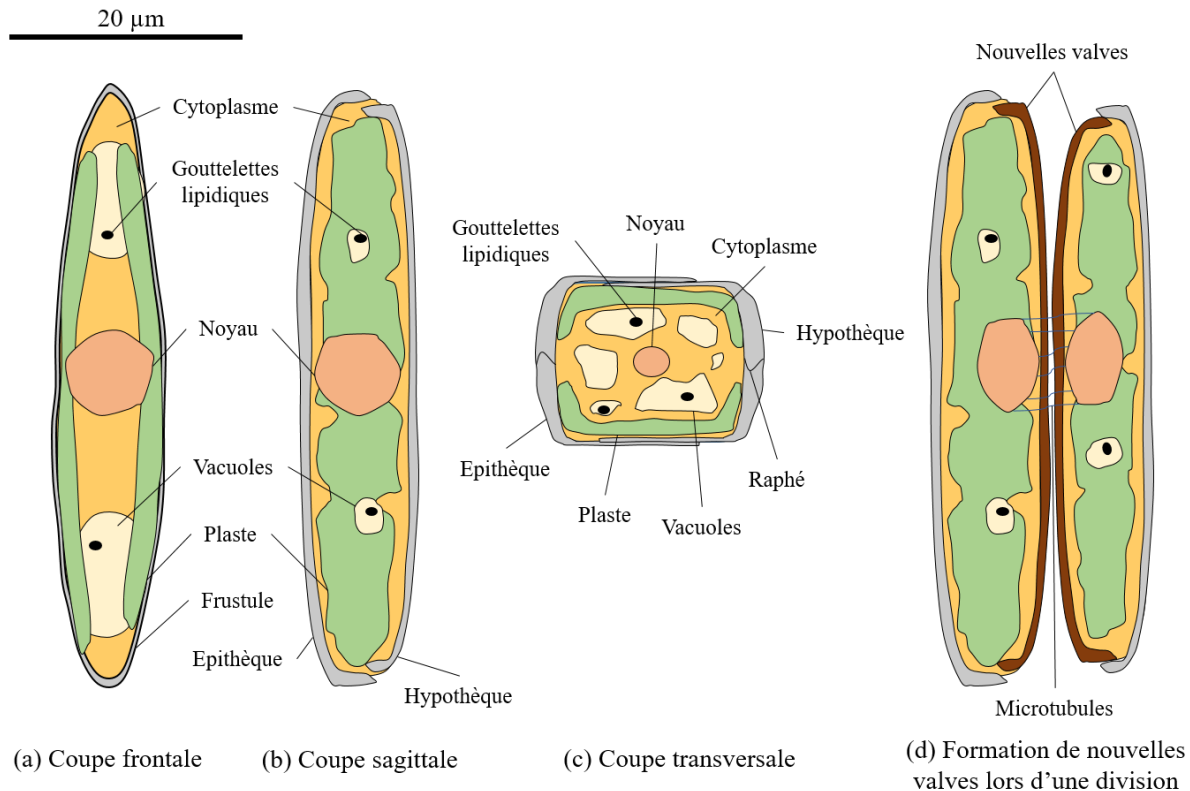


Figure 10. Structure et composition cellulaire d'une diatomée pennée avec raphé (a) en coupe frontale (b) en coupe sagittale (c) en coupe transversale. (d) Mise en évidence de la diminution de taille du frustule lors de la division cellulaire (reproduction asexuée).

Le nom de diatomée vient du grec *diatomos* signifiant « coupé en deux », faisant ainsi allusion aux deux thèques, imbriquées l'une dans l'autre, constituant le frustule (Figure 10b-c). La carapace de silice, sous forme non cristalline, est ainsi composée d'une grande thèque appelée l'épithèque (que l'on peut imaginer comme le couvercle d'une boîte), dans laquelle est emboîtée une plus petite thèque, l'hypothèque (représentant ainsi le fond de la boîte). Chacune des thèques est constituée de deux éléments : une valve et un cingulum. L'épivalve et l'épicingulum compose l'épithèque tandis que l'hypovalve et l'hypocingulum eux sont associés à l'hypothèque. Le cingulum constitue une paroi verticale entourant la périphérie de la cellule, à la manière d'une ceinture, permettant la solidarisation de deux thèques. Les valves du frustule portent les fines ornements (pores, sillons, excroissance, épines...)

ayant fascinés les microbiologistes depuis plusieurs décennies. Le frustule étant inextensible, les diatomées ont un mode de division cellulaire particulier durant lequel les deux thèques du frustule se séparent une fois les nouvelles valves formées, donnant tout son sens à l'étymologie du nom de cet organisme.

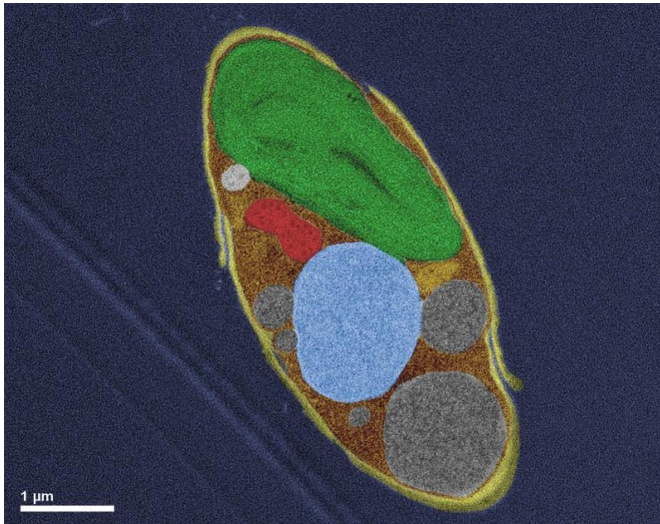


Figure 11. Coupe de la diatomée marine *Phaeodactylum tricorutum* photographiée au microscope électronique et colorisée. Le noyau est visible en bleu, un chloroplaste en vert, la mitochondrie en rouge, divers granules en gris, et le squelette siliceux en jaune. Photographie prise par Bowler C., Takana A., ENS Paris.

La formation de nouvelles thèques s'effectue grâce à l'import de silicium provenant du milieu extérieur vers l'intérieur de la cellule *via* des pompes membranaires consommant de l'ATP. Ce processus étant énergétiquement coûteux pour les cellules, les nouvelles valves formées sont ainsi que des hypothèques (Figure 10d-Figure 11). Selon les espèces, la taille des diatomées varie de 5  $\mu\text{m}$  à 500  $\mu\text{m}$ , voire jusqu'au millimètre pour certaine. Au long des divisions cellulaires, la taille des cellules diminue de plus en plus jusqu'à atteindre une taille critique ( $< 30\%$  de la taille initiale), induisant le mécanisme compensateur, l'auxosporulation. Ce mode de reproduction sexuée particulier, spécifique aux Bacillariophycées, ne se produit qu'une fois la taille limite atteinte, ou après une longue période de pénurie en silicium, et permet de générer une cellule dont la taille est équivalente à la taille initiale, voire trois à dix fois plus grande. Les diatomées sont principalement rencontrées sous leur forme diploïde, bien que la forme haploïde représente une courte période de leur cycle de vie. Les diatomées présentent ainsi un cycle de vie monogénétique diplophasique, où les cellules diploïdes d'une seule génération assurent le retour à un individu identique à celui d'origine par la production de gamètes haploïdes (Figure 12).



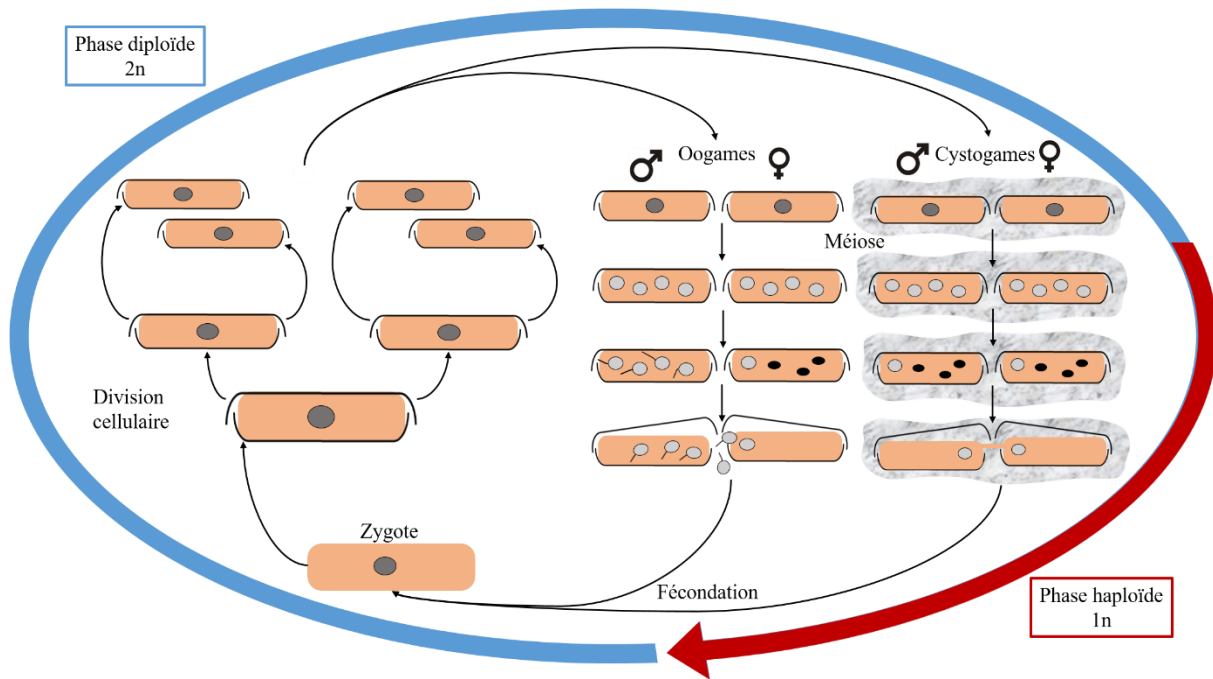


Figure 12. Cycle de vie des diatomées. La phase diploïde étant dominante ce cycle de vie est décrit comme diplophasique monogénétique. Les divisions cellulaires successives entraînent la diminution de la taille du frustule, déclenchement de la reproduction sexuée (auxosporulation). Ce mode de reproduction sexuée diffère entre les diatomées centriques (oogames) et pennées (cystogames).

Une méiose se déroule dans chacune des cellules mères, produisant ainsi quatre noyaux haploïdes, dont seulement deux fonctionnent comme des gamètes. Chez les diatomées centriques (Coscinodiscophycées), un gamète femelle et un gamète mâle sont produits ; elles sont oogames. Etant de grande taille, les gamètes femelles ne sont pas mobiles et restent dans l'oogone, tandis que les gamètes mâles de petite taille possèdent un flagelle leur permettant de pénétrer dans l'oogone de la cellule mère voisine, afin de féconder le gamète femelle pour donner un zygote diploïde, appelé auxospore (Chepurnov et al., 2006). Le processus de fécondation est légèrement différent chez les diatomées pennées (Fragilariophycées et Bacillariophycées), où la production d'un mucilage, permettant de maintenir les cellules mères proches l'une de l'autre, précède la méiose. Trois des quatre gamètes produits dégénèrent, laissant place à un gamète sans flagelle identique dans les deux cellules mères ; elles sont cystogames. La fécondation des deux gamètes immobiles se fait par la formation d'un canal de copulation (Mann et al., 2003), ou par migration du gamète mâle (non flagellé) vers le gamète femelle (Chepurnov and Mann, 2004) pour former l'auxospore. Ce mode de fécondation est encore peu connu et présente des différences suivant les espèces de diatomées, mettant parfois en doute l'évolution et la taxonomie établie de certaines espèces (Davidovich and Bates, 1998; Mann, 1993). Dans tous les cas, une fois formé, l'auxospore produit un mucilage épais et augmente considérablement sa taille pour ensuite produire un frustule.

Qu'elles soient pennées ou centriques, les diatomées peuvent être autonomes et ainsi présenter un mode de vie solitaire ou coloniale. Les cellules filles des espèces vivant en colonie ont la capacité de rester associées par l'intermédiaire d'une matrice externe ou par extension du frustule formant progressivement une colonie, pouvant être différente selon le type de liaison (étoile, éventail, zigzag, filamenteux, ruban). Les cellules d'une colonie étant indépendante les unes des autres, chacune d'entre elles a la possibilité de survivre seule en cas de décrochage. Au sein d'une colonie sans forme particulière (déformable), les diatomées peuvent se déplacer par le biais de la production de cette matrice exopolymériques propulsant les cellules dans la direction opposée. Le raphé des diatomées pennées peut même parfois servir de rail lorsque les cellules, sous l'effet de la production d'EPS, se glissent les unes sur les autres. Certaines diatomées coloniales vivent sous la forme planctonique, en suspension dans la colonne d'eau, ou à l'état benthique, adhérentes sur une surface de nature biotique ou abiotique.

### 2.3 Conditions environnementales et rôle clé des diatomées

Apparues il y a environ 200 millions d'années, les diatomées marines ont survécu à la crise biologique à l'origine de l'extinction des dinosaures pour ensuite évoluer et occuper diverses niches écologiques<sup>9</sup>. En développant des stratégies d'acclimatation environnementales dans des conditions parfois extrêmes, les diatomées ont pu coloniser différents milieux et sont aujourd'hui ubiquistes (Bussard, 2015). Il est possible de les trouver dans tous les milieux aquatiques (eaux marines, douces ou saumâtres) même dans les eaux polaires arctiques (comme *Thalassiosira antarctica*), mais également dans les milieux terrestres (comme *Pinnularia borealis* ou encore *Hantzschia amphioxys*). Encore plus surprenant, des diatomées ont également été trouvées dans un environnement aérien, en dehors des milieux aquatiques (mousses humides sur les arbres), et sont ainsi considérées comme des diatomées aériennes ou subaériennes (Johansen, 2010). Ces milieux constituent des milieux extrêmes où relativement peu d'espèces sont capables de survivre. Les milieux aquatiques rassemblent les conditions les plus favorables au développement des diatomées et constituent ainsi leur habitat majeur.

---

<sup>9</sup> Concept écologique décrivant l'ensemble des conditions biotiques et abiotiques nécessaire à la survie d'une espèce. Cette notion désigne également la distribution d'une espèce, sa fonction écologique et ses ressources nutritives (Soberon, 2007).

L'accès à la lumière est un paramètre essentiel pour leur croissance et représente donc un facteur limitant modulant ainsi le mode de vie des diatomées au sein des milieux aquatiques. Les diatomées marines sont donc souvent présentes sous la forme planctonique près de la surface de l'eau, bien que la formation croissante d'amas d'objets émergés dans les milieux marins puisse constituer des substrats pour le développement des biofilms. Les diatomées d'eau douce sont majoritairement benthiques. Une exposition lumineuse excessive ne correspond pas à leur optimum de croissance. La présence de diatomées dans les biofilms d'eau douce est ainsi modulée en fonction des saisons. Les diatomées représentent alors le composant cellulaire majeur des biofilm d'eau douce en automne et au printemps (Chessman, 1985). Les diatomées présentent une activité cellulaire (photosynthèse et production d'EPS) plus importante en faible luminosité, contrairement aux algues vertes unicellulaires ou aux bactéries (Barranguet et al., 2005). Lors d'importantes périodes d'ensoleillement, les diatomées laissent alors place aux algues vertes apparaissant sous forme de « bloom », ou efflorescence algale, en été. D'autres paramètres environnementaux (pH, salinité, teneur en oxygène) sont déterminants dans la répartition géographique des diatomées notamment la température des eaux. Un plus grand nombre d'espèce de diatomées a été retrouvé dans les eaux froides, riches en nutriments, tandis que les eaux tropicales pauvres en phosphate et en azote ne représentent pas le milieu préférentiel des diatomées.

Leur capacité à effectuer la photosynthèse désigne les diatomées comme des producteurs primaires. Les producteurs tiennent une place essentielle dans le fonctionnement des écosystèmes, notamment en terme de captation du CO<sub>2</sub> et de production d'oxygène. Ainsi, l'émergence des diatomées sur Terre, accompagnées de deux autres groupes d'eucaryotes unicellulaires photosynthétiques (les Dinoflagellés et les Coccolithophorales), a entraîné une modification majeure du cycle du carbone amorçant le déclin du CO<sub>2</sub> atmosphérique et l'augmentation de l'O<sub>2</sub> atmosphérique (Katz et al., 2005). Aujourd'hui, les diatomées représentant la famille dominante des océans, plusieurs estimations démontrent qu'elles sont responsables de 30 à 45% de la production primaire océaniques, sachant que le globe est recouvert à 70% par les océans (Armbrust, 2009). Ainsi, près d'un quart de la production primaire globale est assurée par les diatomées, ce qui surpasse la part produite par les forêts tropicales (Falkowski et al., 1998; Scala and Bowler, 2001). Le rôle des diatomées au sein du cycle du carbone est donc une évidence permettant ainsi la production de carbone organique dans le milieu aquatique, ensuite utilisé par les organismes supérieurs de la chaîne trophique. L'azote, élément essentiel à la vie servant à la production de protéines et d'acides nucléiques,

peut également être capté par les diatomées. Un des secrets de la remarquable capacité d'adaptation des diatomées aux conditions extrêmes réside dans leur disposition à effectuer le cycle de l'urée (Armbrust et al., 2004). Ceci permet alors aux diatomées de survivre en absence d'oxygène et de lumière, pendant plusieurs mois, en utilisant le carbone organique provenant des composés azotés sans effectuer la photosynthèse (Kamp et al., 2011). Les diatomées permettent ainsi la fixation de l'azote organique et son transfert dans la chaîne trophique. La biominéralisation de la silice par les diatomées, permettant la synthèse de leur frustule, font de ces organismes les acteurs principaux dans le cycle du silicium. Ainsi les diatomées jouent un rôle non négligeable dans la régulation de plusieurs cycles biogéochimiques.

La fonction de producteur primaire place les diatomées à la base de la chaîne trophique aquatique. Elles occupent ainsi une position clé dans le fonctionnement des milieux aquatiques, assurant une ressource nutritive pour les niveaux trophiques supérieurs. Ce qui signifie que la disparition de ces organismes entraînerait un dysfonctionnement conséquent pour l'ensemble des organismes aquatiques autant pour les autres micro-organismes que pour les brouteurs, leurs consommateurs respectifs, ainsi que tout le reste des organismes de la chaîne trophique.

#### 2.4 Intérêts en écotoxicologie

Depuis plusieurs années maintenant, le lien entre la composition spécifique des communautés de diatomées, principalement des diatomées benthiques, et l'état écologique des cours d'eau a été établi (Watanabe et al., 1986). L'évolution des diatomées a aboutie à un nombre spectaculaire d'espèces différentes (près de 200 000 espèces estimées) présentant toutes des caractéristiques différentes, notamment l'aptitude à proliférer au sein d'un milieu pollué. De cette manière, le niveau de pollution organique affecte les espèces de diatomées différemment, déterminant ainsi l'existence d'espèce plus ou moins polluosensible. Ainsi les diatomées ont été utilisées pour améliorer le suivi de la qualité de l'eau mais ont également été considérées comme des organismes bioindicateurs de l'eutrophisation des cours d'eau. Plusieurs indices ont alors été développés : l'IPS (Indice de Polluosensibilité Spécifique) créé en 1994 (Kelly and Whitton, 1995) et l'IBD (Indice Biologique Diatomique) mis au point en 1996, exprimant une note allant de 0 à 20 (normalisé par l'AFNOR en 2000 et révisé en 2016).

L'utilisation de ces indices a également permis de détecter la présence de polluants synthétiques dans les milieux aquatiques. Peu après l'avènement des herbicides, des études écotoxicologiques de plusieurs pesticides, tel que le diuron, ont établi la résistance de certaines espèces de diatomées à ces produits phytosanitaires (Molander and Blanck, 1992). Ainsi les diatomées benthiques constituent un modèle biologique incontestable en écotoxicologie (Araújo et al., 2010). La mortalité des individus n'est pas le seul paramètre pouvant être pris en compte par les études écotoxicologiques, la déformation de la frustule sous l'effet d'un contaminant peut également être un indicateur du mécanisme de toxicité (Cattaneo et al., 2004; Debenest et al., 2013).

En plus de la pertinence du choix de cet organisme comme modèle biologique en écotoxicologie, l'étude des diatomées en laboratoire présente de nombreux avantages. Le fait que ce soit un microorganisme facilite son échantillonnage, mais également le maintien des cultures en laboratoire. Le mode de reproduction et le temps de génération des diatomées permet une amplification rapide des cultures et ne limitent donc pas la réalisation d'essais écotoxicologiques.

## 2.5 *Nitzschia palea*, l'espèce idéale

Le genre *Nitzschia* comprend environ 800 espèces signalées sur la base de données *AlgaeBase* (Guiry 2018) présentant des morphologies assez proches et rendant l'identification et la classification de ces espèces complexe. Elles sont largement répandues dans les eaux douces du monde entier, autant dans les milieux lotiques (rivière) que dans les milieux lenticules (lacs). Les espèces de ce genre sont principalement benthiques et se retrouvent au sein d'une grande partie des biofilms. Appartenant à la classe des Bacillariophycées, leurs frustule avec raphé présente une forme linéaire avec des valves lancéolées mesurant entre 12 et 40  $\mu\text{m}$  de long pour 3-4  $\mu\text{m}$  de large. Elles présentent des extrémités arrondies, avec une densité de stries de l'ordre de 36-38 dans 10  $\mu\text{m}$  (Kociolek, 2011). Certaines espèces sont connues pour être tolérantes aux pollutions organiques (Khan, 1990) et métalliques, (Lai et al., 2003; Sabater, 2000), notamment l'espèce *N. palea*.

Découverte pour la première fois en 1844 par F. T. Kützing, l'espèce *Nitzschia palea* portait le nom originel de *Synedra palea*. Elle a ensuite été décrite par W. Smith en 1856 qui lui donna son nom actuel (Smith, 1856). Au sein de l'espèce *Nitzschia palea*, ces travaux de thèse se sont tout particulièrement intéressés à la variété *N. palea* var *palea*. La capacité à

coloniser les milieux pollués est encore plus marquée chez cette variété, pouvant ainsi être retrouvée dans des milieux chargés en nutriments, comme les eaux usées non traitées. En laboratoire, cette variété peut être cultivée en condition axénique, contrairement à d'autres espèces du genre *Nitzschia* qui ne subsistent pas sans leur cortège bactérien. Leur mode de vie benthique est rendu possible grâce à l'excrétion d'EPS leur permettant de former un biofilm sous l'effet d'une légère agitation mécanique. La possibilité de cultiver cette variété en condition axénique et la rapidité d'établissement d'un biofilm sur un support de culture amène à penser que *N. palea var palea* est une espèce pionnière pouvant coloniser une large gamme d'habitat. La souche axénique utilisée (CPCC160) a été fournie par le Centre Canadien de Culture Phycologique (*Canadian Phycological Culture Center*). A l'origine cultivée dans du milieu de culture CHU10 (Annexe 1), elle a été maintenue en laboratoire dans une version modifiée de ce milieu de culture dont la composition est légèrement différente, renommé SPE-1,5 (Annexe 1).

### 3 Les nanoparticules de carbone étudiées

La réponse des diatomées face aux nanoparticules de carbone a été évaluée sur deux allotropes du carbone : une forme planaire à deux dimensions, le FLG, et la forme cylindrique à une dimension, les DWCNTs. L'effet des DWCNTs sur le compartiment primaire (diatomées) a déjà été étudié dans le cadre de la thèse de Laurent Verneuil (2015). Cependant, aucune étude à l'heure actuelle considère l'impact du FLG sur les diatomées. Ces travaux de thèse permettent ainsi de mettre en parallèle les impacts de ces deux nanoparticules de carbone sur les diatomées jusqu'à l'échelle moléculaire. L'ensemble des nanoparticules de carbone nécessaire à la réalisation des expérimentations sur les diatomées a été synthétisée au CIRIMAT (Institut Carnot, UMR 5085 CNRS UPS INPT) à Toulouse (31, France).

#### 3.1 Graphène à quelques feuillets de carbone (FLG)

Le FLG utilisé dans ces travaux de thèse a été obtenu grâce à une approche descendante à partir de poudre de graphite. Le graphite expansible utilisé comme matériau initial est commercialisé par la société Asbury Carbons, en tant qu'additif pour les retardateurs de feu. Cette poudre de graphite (pH entre 5 et 10) contient plus de 98% de carbone et 3,1% de soufre résultant d'un traitement à l'acide facilitant la séparation des feuillets de carbone (Ref. 3772) (Asbury Carbons, 2018). Une exfoliation thermique de ce graphite a été réalisée à

900°C entraînant une accumulation de la pression inter-feuillets. Le graphite exfolié a ensuite été transféré dans un solvant (propan-2-ol) pour subir deux dispersions mécaniques : une agitation de 15 min à 8000 rpm permettant d'homogénéiser la solution, suivie d'une sonication (50% d'amplitude) d'1h30 afin de diminuer la taille des agrégats pouvant se former lors du traitement chimique. Une étape de centrifugation (1h à 2000 rpm) permet ensuite d'éliminer les particules les plus grosses (trop larges et/ou trop épaisses, ne respectant pas la dimension nanométrique < 100 nm), qui restent dans le culot, pour récupérer les plus fines, dans le surnageant. La suspension est alors filtrée sur une membrane en cellulose (45 mm de diamètre, taille des pores de 0,45 µm) pour enfin subir une congélation suivie d'une lyophilisation (2-3 jours). Une fois les échantillons correctement séchés, ils ont été transférés dans le milieu de culture SPE-1,5. Cette méthode de production présente un rendement massique de 0,8%.

Cependant, le protocole de préparation du FLG étant à ses débuts lors du démarrage de cette thèse, il a pu être amélioré au cours de ces travaux. Ainsi, la préparation des échantillons, utilisés pour évaluer la réponse moléculaire des diatomées (Chapitre 4 et 5), n'a pas suivi exactement le même protocole. L'étape de congélation ainsi que la lyophilisation ont été supprimées. De cette manière, les échantillons ont directement été transférés dans le milieu de culture SPE-1,5 après filtration. Cette nouvelle méthode de production présentait alors un rendement massique plus important de 4,1%.

Les différentes méthodes de caractérisation des nanoparticules obtenues, appliquées au CIRIMAT, ont permis d'estimer le nombre de feuillets de carbone entre 5 et 10. La spectroscopie Raman a révélé une bande D de faible intensité et un pic G de forte intensité permettant d'affirmer la bonne qualité structurale du produit obtenu. La composition élémentaire en carbone de ce FLG atteint 94,5%, le reste étant composé de 4% d'oxygène et 1,5% de silice.

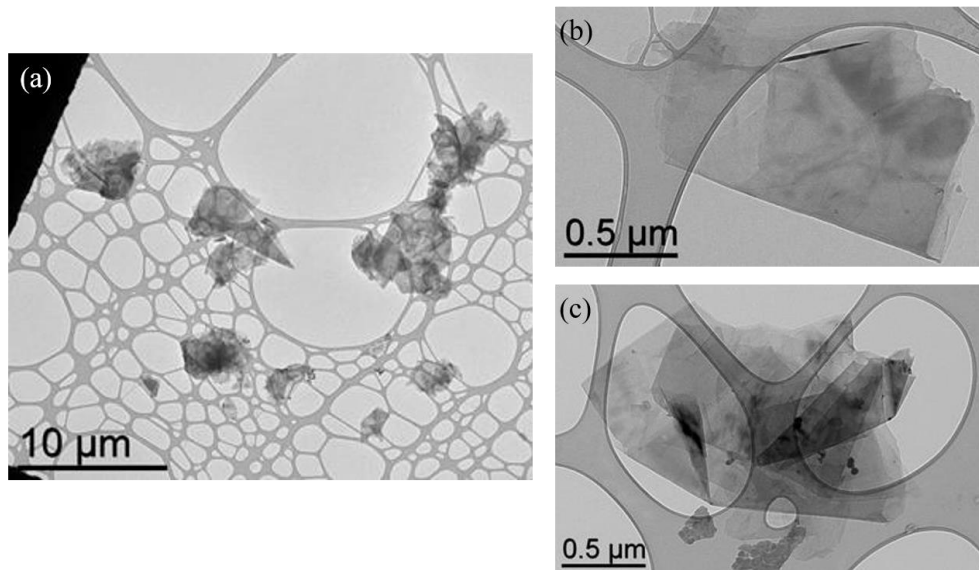


Figure 13. Photographies prises au MET de FLG utilisé pendant ces travaux de thèse

### 3.2 Nanotubes de carbone à double paroi (DWCNTs)

Une synthèse par DVCC a permis d'obtenir les DWCNTs. Le catalyseur utilisé dans cette méthode de production est composé de magnésium et d'oxyde de cobalt ( $Mg_{1-x}Co_xO$ ) en présence d'oxyde de molybdène ( $MoO_3$ ) (Flahaut et al., 2003). Ce dernier est connu pour augmenter l'efficacité de production. Lors de l'application de cette méthode de synthèse, la formation des CNTs est rendue possible grâce à la présence d'un précurseur carboné composé, dans notre cas, d'un mélange de dihydrogène et de méthane chauffé jusqu'à 1000°C sous atmosphère d'azote. L'extraction des nanotubes de carbone, ou élimination des catalyseurs, est ensuite réalisée grâce à un traitement à l'acide chlorhydrique concentré (HCl 37%). Ce traitement permet également de dissoudre tous les résidus de cobalt non protégés ainsi que la magnésie. Seuls les éléments non solubles dans l'HCl peuvent subsister, notamment le molybdène sous forme de carbures de molybdène. Ces éléments sont éliminés par des rinçages successifs permettant également de ramener les échantillons à la neutralité. Une fois correctement nettoyés les échantillons ont ensuite été filtrés sur une membrane de cellulose et transférés dans le milieu de culture SPE-1,5 en s'assurant de la bonne dispersion des CNTs grâce à des passages intermédiaires au bain à ultrasons. La solution finale a été placée une dernière fois au bain à ultrasons pendant 30 min.

Les DWCNTs représentent 77% du produit obtenu, le reste étant composé de 18% de SWCNT et 5% de MWCNT formant des faisceaux de 1 à plus de 100 µm de long et de 10 à



20 nm de diamètre. Les DWCNTs d'intérêt, caractérisés par la suite, présentent un diamètre interne de 1,2 nm et un diamètre externe de 3,2 nm (Figure 14). La surface spécifique déterminée par la théorie de Brunauer-Emmett-Teller est estimée à  $980 \text{ m}^2.\text{g}^{-1}$ . Le matériau obtenu est composé de plus de 89% de carbone. Des résidus de cobalt et molybdène ont été détecté dans les échantillons à hauteur de 4,5% et 1,1% respectivement. L'intensité des bandes D et G en spectroscopie Raman permet de confirmer la qualité des DWCNTs produits.

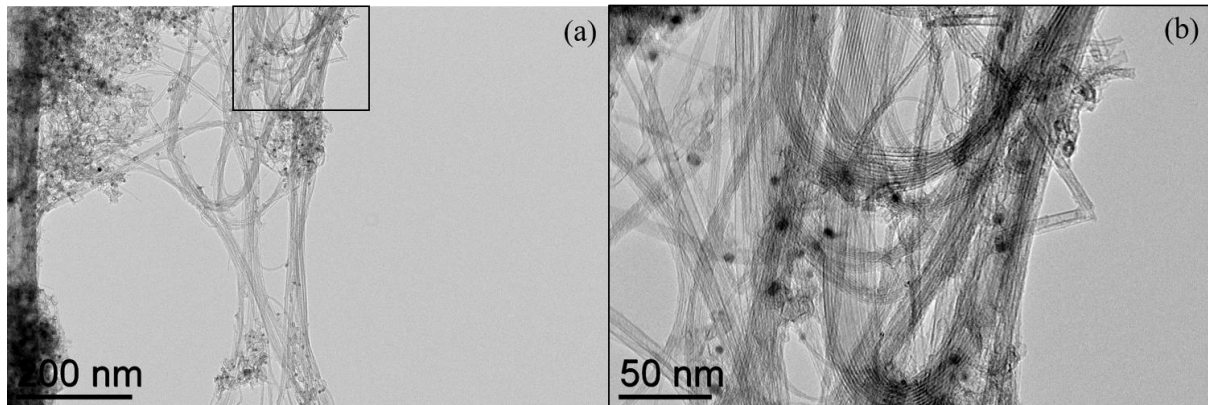


Figure 14. Observation au MET de DWCNTs utilisés dans ces travaux de thèse après purification au CIRIMAT

## Références bibliographiques

- Araújo, C.V.M., Blasco, J., Moreno-garrido, I., 2010. Microphytobenthos in ecotoxicology : A review of the use of marine benthic diatoms in bioassays. *Environ. Int.* 36, 637–646.  
<https://doi.org/10.1016/j.envint.2010.04.017>
- Armbrust, E.V., 2009. The life of diatoms in the world's oceans. *Nature* 459, 185–192.  
<https://doi.org/10.1038/nature08057>
- Armbrust, E.V., Berges, J.A., Bowler, C., Green, B.R., Martinez, D., Putnam, N.H., Zhou, S., Allen, A.E., Apt, K.E., Bechner, M., Brzezinski, M.A., Chaal, B.K., Chiovitti, A., Davis, A.K., Demarest, M.S., Detter, J.C., Glavina, T., Goodstein, D., Hadi, M.Z., Hellsten, U., Hildebrand, M., Jenkins, B.D., Jurka, J., Kapitonov, V. V., Kröger, N., Lau, W.W.Y., Lane, T.W., Larimer, F.W., Lippmeier, J.C., Lucas, S., Medina, M., Montsant, A., Obornik, M., Parker, M.S., Palenik, B., Pazour, G.J., Richardson, P.M., Ryneerson, T.A., Saito, M.A., Schwartz, D.C., Thamatrakoln, K., Valentin, K., Vardi, A., Wilkerson, F.P., Rokhsar, D.S., 2004. The Genome of the Diatom *Thalassiosira Pseudonana*: Ecology, Evolution, and Metabolism. *Science* (80- ). 306, 79–86.
- Asbury Carbons, 2018. Expandable Graphite.
- Barranguet, C., Veuger, B., Van Beusekom, S.A.M., Marvan, P., Sinke, J.J., Admiraal, W., 2005. Divergent composition of algal-bacterial biofilms developing under various external factors. *Eur. J. Phycol.* 40, 1–8. <https://doi.org/10.1080/09670260400009882>
- Burki, F., Shalchian-Tabrizi, K., Minge, M., Skjæveland, Å., Nikolaev, S.I., Jakobsen, K.S., Pawlowski, J., 2007. Phylogenomics reshuffles the eukaryotic supergroups. *PLoS One* 2, 1–6.  
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0000790>
- Bussard, A., 2015. Capacités d'acclimatation des diatomées aux contraintes environnementales.
- Cattaneo, A., Couillard, Y., Wunsam, S., Courcelles, M., 2004. Diatom taxonomic and morphological changes as indicators of metal pollution and recovery in Lac Dufault (Quebec, Canada ). *J. Paleolimnol.* 32, 163–175. <https://doi.org/10.1023/B:JOPL.0000029430.78278.a5>
- Cavalier-Smith, T., 1997. Sagenista and Bigyra, two phyla of heterotrophic heterokont chromists. *Arch. fur Protistenkd.* 148, 253–267. [https://doi.org/10.1016/S0003-9365\(97\)80006-1](https://doi.org/10.1016/S0003-9365(97)80006-1)
- Cavalier-Smith, T., 1986. The kingdom Chromista: origin and systematics. *Prog. Phycol. Res.* 4, 309–347.
- Chepurnov, V.A., Mann, D.G., 2004. Auxosporulation of *Licmophora communis* (Bacillariophyta) and a review of mating systems and sexual reproduction in araphid pennate diatoms. *Phycol. Res.* 52, 1–12. <https://doi.org/10.1111/j.1440-1835.2004.tb00309.x>
- Chepurnov, V.A., Mann, D.G., Von Dassow, P., Armbrust, E.V., Sabbe, K., Dasseville, R., Vyverman, W., 2006. Oogamous reproduction, with two-step auxosporulation, in the centric diatom *Thalassiosira punctigera* (Bacillariophyta). *J. Phycol.* 42, 845–858.  
<https://doi.org/10.1111/j.1529-8817.2006.00244.x>
- Chessman, B., 1985. Phytoplankton of the La Trobe River, Victoria. *Mar. Freshw. Res.* 36, 115–122.  
<https://doi.org/10.1071/MF9850115>
- Davidovich, N.A., Bates, S.S., 1998. Sexual reproduction in the pennate diatoms *Pseudonitzschia multiseries* and *P. pseudodelicatissima*. *J. Phycol.* 34, 126–137.  
<https://doi.org/DOI: 10.1046/j.1529-8817.1998.340126.x>
- Debenest, T., Silvestre, J., Pinelli, E., 2013. Diatoms in Ecotoxicology, in: *Encyclopedia of Aquatic Ecotoxicology*. pp. 1–8. [https://doi.org/10.1007/SpringerReference\\_379944](https://doi.org/10.1007/SpringerReference_379944)

- Falkowski, P.G., Barber, R.T., Smetacek, V., 1998. Biogeochemical Controls and Feedbacks on Ocean Primary Production. *Science* (80- ). 281, 200–207. <https://doi.org/10.1126/science.281.5374.200>
- Flahaut, E., Bacsá, R., Peigney, A., Laurent, C., 2003. Gram-scale CCVD synthesis of double-walled carbon nanotubes. *Chem. Commun.* 1442–1443. <https://doi.org/DOI: 10.1039/b301514a>
- Flanders Marine Institute, 2016. World Register of Marine Species (WoRMS) [WWW Document]. URL <http://www.marinespecies.org>
- Guiry, M.D, G.M. 2018. AlgaeBase. World-wide electronic publication, National University of Ireland, Galway. <http://www.algaebase.org>; searched on 24 September 2018
- Johansen, J.R., 2010. Diatoms of aerial habitats, in: *The Diatoms: Applications for the Environmental and Earth Sciences*. <https://doi.org/10.2307/302397>
- Kamp, A., de Beer, D., Nitsch, J.L., Lavik, G., Stief, P., 2011. Diatoms respire nitrate to survive dark and anoxic conditions. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 108, 5649–5654. <https://doi.org/10.1073/pnas.1015744108>
- Katz, M.E., Wright, J.D., Miller, K.G., Cramer, B.S., Fennel, K., Falkowski, P.G., 2005. Biological overprint of the geological carbon cycle. *Mar. Geol.* 217, 323–338. <https://doi.org/10.1016/j.margeo.2004.08.005>
- Kelly, M.G., Whitton, B.A., 1995. The Trophic Diatom Index : a new index for monitoring eutrophication in rivers. *J. Appl. Phycol.* 7, 433–444.
- Khan, I.S. a. N., 1990. Assessment of Water Pollution using Diatom Community Structure and Species Distribution — A Case Study in a Tropical River Basin. *Int. Rev. der gesamten Hydrobiol. und Hydrogr.* 75, 317–338. <https://doi.org/10.1002/iroh.19900750305>
- Kociolek, P., 2011. *Nitzschia palea* [WWW Document]. Diatoms North Am. URL [https://diatoms.org/species/nitzschia\\_palea](https://diatoms.org/species/nitzschia_palea) (accessed 8.17.18).
- Kooistra, W.H.C.F., Medlin, L.K., 1996. Evolution of the Diatoms (Bacillariophyta). *Mol. Phylogenet. Evol.* 6, 391–407. <https://doi.org/10.1006/mpev.1996.0088>
- Lai, S.D., Chen, P.C., Hsu, H.K., 2003. Benthic algae as monitors of heavy metals in various polluted rivers by Energy Dispersive X-ray Spectrometer. *J. Environ. Sci. Heal. - Part A Toxic/Hazardous Subst. Environ. Eng.* 38, 855–866. <https://doi.org/10.1081/ESE-120018596>
- Mann, D.G., 1993. Patterns of sexual reproduction in diatoms. *Twelfth Int. Diatom Symp.* 269/270, 11–20.
- Mann, D.G., Chepurinov, V.A., Idei, M., 2003. Mating system, sexual reproduction, and auxosporulation in the anomalous raphid diatom *Eunotia* (Bacillariophyta). *J. Phycol.* 39, 1067–1084. <https://doi.org/10.1111/j.0022-3646.2003.03-011.x>
- Mathieu, R., Bellier, J., Granier, B., 2011. *Handbook of Micropaleontology*.
- Molander, S., Blanck, H., 1992. Detection of pollution-induced community tolerance in marine periphyton communities established under diuron exposure. *Aquat. Toxicol.* 22, 129–144. [https://doi.org/10.1016/0166-445X\(92\)90028-L](https://doi.org/10.1016/0166-445X(92)90028-L)
- Patterson, D.J., 1999. The Diversity of Eukaryotes. *Am. Nat.* 65, S96–S124. <https://doi.org/10.1086/303287>
- Sabater, S., 2000. Diatom communities as indicators of environmental stress in the Guadiamar River, S-W. Spain, following a major mine tailings spill. *J. Appl. Phycol.* 12, 113–124. <https://doi.org/10.1023/A:1008197411815>
- Saint Martin, S., n.d. Les diatomées, joyaux du monde microscopique [WWW Document]. URL

[http://www.saga-geol.asso.fr/Geologie\\_page\\_conf\\_diatomees.html](http://www.saga-geol.asso.fr/Geologie_page_conf_diatomees.html)

Scala, S., Bowler, C., 2001. Molecular insights into the novel aspects of diatom biology. *CMLS* 58, 1666–1673.

Smith, W., 1956. A synopsis of the British Diatomaceae : with remarks on their structure, functions and distribution, and instructions for collecting and preserving specimens. 2. van Voorst.

Soberon, J., 2007. Grinnellian and Eltonian niches and geographic distribution of species. *Ecol. Lett.* 10, 1115–1123. <https://doi.org/10.1111/j.1461-0248.2007.01107.x>

Stechmann, A., Cavalier-Smith, T., 2003. The root of the eukaryote tree pinpointed. *Curr. Biol.* 13, 665–666. [https://doi.org/10.1016/S0960-9822\(03\)00602-X](https://doi.org/10.1016/S0960-9822(03)00602-X)

Verneuil, L., 2015. Toxicité environnementale et écotoxicité des nanotubes de carbone sur des diatomées benthiques : de la cellule au biofilm. Université de Toulouse.

Watanabe, T., Asai, K., Houki, A., 1986. Numerical estimation to organic pollution of flowing water by using the Epilithic Diatom Assemblage -Diatom Assemblage Index (DAIpo)-. *Sci. Total Environ.* 55, 209–218.

## Chapitre 3

Effet d'une exposition aux  
nanoparticules de graphène à  
quelques feuilletts sur la diatomée  
*Nitzschia palea*

## Résumé

L'essor que connaissent les nanotechnologies depuis quelques années est principalement lié à la manufacture de nanoparticules carbonées, comme les graphènes, présentant des propriétés physico-chimiques inédites conduisant à diverses applications. La future production massive de ces dernières soulève alors la question du rejet dans l'environnement et de leur accumulation *in fine* dans les milieux aquatiques. Le but de cette étude a été d'évaluer l'impact du *Few Layer Graphene* (FLG) sur une diatomée benthique d'eau douce vivant en biofilm, *Nitzschia palea*, en distinguant les effets liés à l'ombrage de l'effet total, avec un contact direct. La réponse cellulaire a alors été évaluée, grâce au suivi de la croissance, de la viabilité/intégrité cellulaire et de l'activité photosynthétique. Afin de déterminer l'existence d'une interaction entre le biofilm et le FLG, le comportement du FLG a fait l'objet d'un suivi quantitatif à la fois dans la colonne d'eau, et dans le biofilm algal. Les résultats marquants de cette étude ont mis en avant une inhibition du taux de croissance associée à une altération significative de la viabilité cellulaire des diatomées exposées à la plus forte dose (50 mg.L<sup>-1</sup>) après 48 h d'exposition. Cependant l'impact du FLG en contact direct sur la croissance cellulaire n'est que temporaire puisqu'une récupération de la croissance des cultures est observée à 144 h. Cela suggère alors l'existence d'une interaction entre les cellules et les nanoparticules, contrairement à l'exposition sans contact (effet d'ombrage), où l'inhibition de croissance est maintenue jusqu'à la fin de l'expérience. Le suivi du devenir du FLG dans le milieu expérimental a montré une diminution de la concentration du FLG dans la colonne d'eau et une augmentation au sein du biofilm. Une interaction forte entre les nanoparticules et le réseau d'EPS a été observée, expliquant ainsi la récupération de croissance en exposition totale. Cette étude a mis en avant la contribution des EPS dans la clarification de la colonne d'eau et leur rôle dans la limitation des interactions entre les cellules et les nanoparticules mais également dans la réduction de l'effet d'ombrage induit par ces dernières. Dans l'ensemble, ces résultats suggèrent que l'impact du FLG résulte d'une combinaison entre l'interaction physique et l'effet d'ombrage.

Ces travaux ont fait l'objet d'une première publication scientifique dans la revue *Carbon*, intitulée :

Few Layer Graphene sticking by biofilm of freshwater diatom *Nitzschia palea*  
as a mitigation to its ecotoxicity

*Marion Garacci, Maialen Barret, Florence Mouchet, Cyril Sarrieu, Pierre Lonchambon,  
Emmanuel Flahaut, Laury Gauthier, Jérôme Silvestre & Eric Pinelli*



ELSEVIER

Contents lists available at ScienceDirect

## Carbon

journal homepage: [www.elsevier.com/locate/carbon](http://www.elsevier.com/locate/carbon)

## Few Layer Graphene sticking by biofilm of freshwater diatom *Nitzschia palea* as a mitigation to its ecotoxicity



M. Garacci<sup>a</sup>, M. Barret<sup>a</sup>, F. Mouchet<sup>a</sup>, C. Sarrieu<sup>b</sup>, P. Lonchambon<sup>b</sup>, E. Flahaut<sup>b</sup>,  
L. Gauthier<sup>a</sup>, J. Silvestre<sup>a</sup>, E. Pinelli<sup>a,\*</sup>

<sup>a</sup> EcoLab (Laboratoire d'Ecologie Fonctionnelle), Université de Toulouse, CNRS, INPT, UPS, Toulouse, France

<sup>b</sup> CIRIMAT, Université de Toulouse, CNRS, INPT, UPS, UMR, CNRS-UPS-INP No 5085, Université Toulouse 3 Paul Sabatier, Bât., CIRIMAT, 118, route de Narbonne, 31062 Toulouse Cedex 9, France

## ARTICLE INFO

## Article history:

Received 28 July 2016

Received in revised form

14 November 2016

Accepted 15 November 2016

Available online 16 November 2016

## ABSTRACT

Carbon-based nanoparticles such as graphene have many applications leading to their industrial production. Few-Layer Graphene (FLG) is thus likely to be found in the environment, and especially in rivers. In this study, the effect of FLG on the photosynthetic benthic diatom *Nitzschia palea* was assessed making distinction between the impact of a direct contact with FLG and a shading effect of FLG on diatoms. Growth inhibition of diatoms exposed to FLG at 50 mg L<sup>-1</sup> was observed at 48 h of exposure associated with an increase in diatoms mortality. At 144 h, the growth rate was recovered. However, in shading condition, at 48 h of FLG exposure, a persistent growth inhibition was observed at 50 mg L<sup>-1</sup>. Microscopic observations and a monitoring of FLG concentration in the medium allowed to conclude that exopolymeric substances (EPS), naturally secreted by *N. palea*, strongly interact with FLG, sticking nanoparticles at the bottom of wells. Our results highlight the potential mechanisms of clarification of the water column by diatoms biofilms, by sticking FLG even at high concentration. Overall, these results suggest that one potential toxicity process of graphene could be a combination of direct and shading effect leading to a strong interaction between biofilm and nanoparticles.

© 2016 Elsevier Ltd. All rights reserved.

## 1. Introduction

Nanotechnology is no more an emerging science and arouses more interest for few years. The interest for new nanomaterials is continuously growing [1], sustained by very intensive research work in this field [2,3]. Among the studied manufactured nanoparticles, graphene nanomaterial family (graphene and related materials), including Few Layer Graphene (FLG), is increasingly studied for its promising applications. FLG is a planar carbon-based particle which differs from bulk graphite by its nanometric thickness. This is the assembly of several monoatomic layers of carbon (graphene). Carbon atoms in each graphene sheet are bounded by sp<sup>2</sup> covalent bonds in a honeycomb lattice. The nanometric thickness of this material confers numerous interesting properties such as mechanical, electrical, thermal and optical properties [4–6], which open new prospects and emerging applications in several sectors ranging from energy [7,8] to the biomedicine [9,10].

Nevertheless, interaction of such particles with biological systems is in return difficult to predict and thus the emergence of FLG presents numerous environmental risks [11]. There is in fact a strong lack of information about effective quantities of carbon-based nanoparticles in circulation [1] and especially for graphene. FLG could be found in the environment at several steps of its life cycle and especially in aquatic ecosystems where most pollutants can be concentrated. The size of nanoparticles implies a great specific surface area, which plays an important role in the impact on organisms [12,13]. Although many studies on the toxicology of nanoparticles have been carried out *in vivo* to date on model organisms such as rat but also *in vitro* on human cells [14,15], studies aimed to investigate the effect of graphene in the Environment are scarce.

Most of ecotoxicological studies were carried out on the effect of functionalized graphene such as graphene oxide. Several toxicological studies reported the impact of graphene oxide on plants [16] and bacteria discussing its antibacterial properties. A cytotoxic effect of these nanoparticles on *Escherichia coli* or *Staphylococcus aureus* was evidenced [17]. Hu et al. [18] reported a strong

\* Corresponding author.

E-mail address: [pinelli@ensat.fr](mailto:pinelli@ensat.fr) (E. Pinelli).

inhibition of *E. coli* (DH5 $\alpha$ ) growth in presence of 85 mg L<sup>-1</sup> of graphene oxide. However, few years later, Ruiz et al. [19] observed an opposite effect with an increase in *E. coli* (JM109) proliferation exposed to the same range of concentration of graphene oxide. According to the authors, this growth activation might have been due to the use of graphene oxide as a growth scaffold, helped by an overproduction of EPS which could depend on the bacteria species. Nevertheless, only few studies have investigated the impact of FLG on organisms. Pretti et al. [20] investigated the impact of graphene mono layer flakes on several marine organisms and reported an inhibition of bioluminescence on the bioluminescent bacterium *Vibrio fischeri* with an EC<sub>50</sub> value of 2 mg L<sup>-1</sup>, but no effect on the crustacean *Artemia salina*. Several studies on *Daphnia magna*, a freshwater planktonic crustacean, demonstrated an accumulation of <sup>14</sup>C-labeled graphene in gut's organisms [21,22]. Another study revealed no toxic effect of multi-functional graphene on zebra fish embryos even at 100 mg L<sup>-1</sup> [23].

Despite the low number of studies on algae, their crucial position in the aquatic food chain as primary producer and their important function in the carbon cycle [24] make them of particular interest for the assessment of contaminants effects [25]. Nevertheless, only a small fraction of the studies on graphene ecotoxicity was carried out on algae. A study on the green algae *Raphidocelis subcapitata* reported a shading effect caused by graphene oxide which contribute to reduce algal density [26]. Pretti et al. [20] showed that graphene mono layer flakes induced a growth inhibition on the unicellular algae *Dunaliella tertiolecta* from 1.25 mg L<sup>-1</sup> of graphene. All studies carried out on graphene have shown a dose-dependent effect of this nanomaterial on biological systems without clear conclusion on the effects associated with shading or any direct toxicity [27].

The toxicity of nanomaterials on biological systems in the aquatic environment could be impacted by the presence of natural organic matter in the media. Thus, several recent studies aimed to understand fate and effects of graphene-based materials in the aquatic environment [28,29]. Wang et al. (2016) [29] demonstrated that the presence of organic acids improved the stability of graphene nanoplatelets suspension but had also an impact on the toxicity of nanoparticles on a unicellular green algae *Scenedesmus obliquus*. These authors observed a hormesis effect of low organic acids [29], implying the mitigating of graphene toxicity only at low concentration of organic acids resulting in a decrease of growth inhibition and oxidative stress on *Scenedesmus obliquus*.

Among algae, diatoms play a major role in the global primary productivity responsible at least of a quarter of the inorganic carbon fixed each year in the ocean [30]. Diatoms represent the main component of many photosynthetic biofilms during autumn and spring in freshwater [31]. These microalgae have the particularity to produce a cell wall, called frustule, composed of silica structure with different ornamentations. A particular feature of diatoms is their capacity to produce extracellular polymeric substances (EPS) mainly composed of polysaccharides and proteins [32]. The biofilm built with these EPS helps diatoms to adhere and grow on a substrate [33,34]. EPS can also have a role in the protection against pollutants such as metals thanks to an accumulation of metals in the polysaccharide matrix of the biofilm [35].

A recent study demonstrated original effects of carbon nanotubes (CNTs) on *Nitzschia palea* algae [36]. This study reported that CNTs caused a temporary growth inhibition linked to a shading effect without neither toxicity nor photosynthetic disruption. Furthermore, the authors highlighted the major role of EPS produced during the interaction between diatoms and nanoparticles.

In this study, the toxicity of FLG on the diatom *N. palea* (Kützing) W. Smith (*N. palea*) was assessed. The aim of this work was to determine the toxicity level of FLG on diatoms cells by studying

three different endpoints such as growth inhibition, photosynthetic yield and cell viability. An original device previously developed by Verneuil et al. [36] was used. This device allows distinguishing the shading effect and the total effect (including direct contact and shading) of FLG on these benthic organisms. In addition, the interaction between the algal biofilm and FLG suspension has been investigated using complementary microscopic approaches.

## 2. Materials and methods

### 2.1. Diatom strain cultivation and graphene preparation

#### 2.1.1. Diatom strain cultivation prior to exposure experiments

The axenic strain of *N. palea* CPCC-160 was provided by the Canadian Phycological Culture Center (University of Waterloo, Waterloo, ON, Canada). Algal cultures were grown under axenic conditions in a modified CHU no. 10 basic medium, called SPE medium (SPE; 6.4 < pH < 6.6) (Supplementary Table S1 for the detailed composition). Bioassays were carried out in a growth room at 22 ± 1 °C on a rotary shaker at 90 rpm with a light/dark period of 14 h/10 h supplied by high pressure sodium lamps (VIALOX® NAV® (SON) SUPER 4Y®, 400 W, OSRAM GmbH) at 120  $\mu$ E. SPE medium was replaced by fresh medium 72 h before each experiment. The axenic conditions were maintained by carrying out experiments under a class II laminar flow hood to avoid biotic contamination.

#### 2.1.2. FLG suspension

**2.1.2.1. Synthesis.** The FLG was prepared (CIRIMAT) by an exfoliation process from expandable graphite flakes. This starting material, provided by Asbury Carbons (Ref. 3772), is a graphite of natural origin which has been industrially treated with acids and using strong oxidizing agents as catalysts, before being washed and dried. In this way, acidic compounds are intercalated between graphene sheets. This enables a later expansion of the material using a sudden thermal treatment.

Here, this thermal expansion was carried out from 2.6 g of expandable graphite flakes. Batches of 200 mg (in 55 mL crucibles) were thus placed 4 min in an open furnace maintained at 900 °C under air, before being removed for cooling at room temperature. The 810 mg resulting expanded graphite were dispersed in 4 L of propan-2-ol to reach a 0.2 g L<sup>-1</sup> nominal concentration. The mechanical exfoliation was carried out from this suspension. First, it was homogenized with a shear mixer (Silverson L5M) for 15 min at 8000 RPM by batches of 1 L. Besides, it underwent a probe sonication for 90 min at 50% amplitude (Vibra cell 75042, 13 mm-diameter probe, 500 W, 20 kHz) by batches of 200 mL.

A size selection of the particles was then realized by centrifugation at 800 G. Immediately prior to the centrifugation, the 200 mL batches were submitted again to a 4 min sonication at 50% amplitude in order to redisperse agglomerates which may have formed during the storage of the suspensions. The batches were then submitted to centrifugation for 45 min in 0.6 L flasks (Thermofisher scientific Heraeus Megafuge 40, rotation acceleration = 9, rotation deceleration = 3).

The collected supernatant was filtered on cellulose nitrate membranes (45 mm diameter, 0.45  $\mu$ m pore size) and washed with deionised water (1 volume of deionised water per volume of suspension). The membrane with the FLG deposit was placed in deionised water in a 10 mL flask and bath sonicated for 10 min (Elmasonic S30H, 280 W) in order to fully recover the FLG from the membrane. This FLG suspension was finally frozen and freeze-dried (Christ Alpha 2–4 LSC) leading to a final weight of 19.8 mg which corresponds to a 0.8 wt % global yield.

FLG was dispersed in SPE medium, bath sonicated for 10 min (Elmasonic S30H, 280 W) and autoclaved. Dilutions were then



carried out from this suspension for the algal test and microscope observation. Before pipetting, the initial suspension was again homogenized by sonication for 2 min using a BRANDSON digital sonifier S-250D with a 1/8 inch Tapered Microtip (200 W; amplitude: 35% 5s/2s) to prepare four homogenous intermediary FLG suspension at 0.167, 1.67, 16.7 and 83.5 mg L<sup>-1</sup> used. These intermediary dilutions permitted to prepare the experimental device with the real concentrations 0.1, 1, 10 and 50 mg L<sup>-1</sup> for the exposure. A last sonication was carried out just before adding FLG suspension in the exposure medium.

**2.1.2.2. Characterization.** The morphology of the dried particles and their size were characterized by Transmission Electronic Microscopy (TEM, JEOL JEM 1400). A very small fraction of the powder was dispersed for 10 min by ultrasonic bath in ethanol, and few drops were deposited on a TEM grid (Lacey carbon). The structure was controlled by RAMAN spectroscopy on a Labram-HR800 (Horiba) using a laser at 633 nm in confocal mode ( $\times 100$  magnification, 100  $\mu\text{m}$  hole, diaphragm D1, 20 s exposition, 10 accumulations). The chemical composition was analyzed by XPS (K $\alpha$  ThermoScientific, monochromatic Al-K $\alpha$  source).

To avoid misinterpretations in the potential FLG toxicity investigation [37], the analysis of macro-, micro-nutrient and trace elements were conducted by incubation of 50 mg L<sup>-1</sup> of FLG in the culture medium under stirring during 144 h. The mixture was filtered at 0.1  $\mu\text{m}$  on a Minisart<sup>®</sup> high flow polyethersulfone membrane (SARTORIUS-STEDIUM). Elements were quantified by inductively coupled plasma-optic spectrometry (ICP-OES, Agilent-7500ce, Agilent Technologies, Palo Alto, CA) to check for a potential release by FLG.

## 2.2. Exposure conditions

The experimental device used in this study was the same as the one previously described by Pouvreau et al. [38] and Verneuil et al. [36] to distinguish the shading effect from the total effect (combined effect of direct exposure and shading) on algae exposed to nanoparticles. Experiments were carried out using experimental device where two 12-wells plates (COSTAR<sup>®</sup>-3513, Corning Incorporated, Corning, NY) were superimposed on each other with a black film stuck around the wells on the upper one. The plates were surrounded by Parafilm<sup>®</sup> to avoid medium evaporation, and then placed in an open-topped opaque box to allow light perception by diatoms only from the top aperture of wells.

Before the beginning of the exposure to FLG, lower plates of each device were inoculated with 1 mL of algal culture ( $2.5 \times 10^5$  cells mL<sup>-1</sup>) to establish the algal biofilm. These plates were then shaken in a culture room for 24 h of light at 120  $\mu\text{E}$ . Then, to test the Total effect, 1.5 mL of a dispersed suspension of nanoparticles, at the appropriate concentration, were added into each well of the lower plates in order to obtain a final volume of 2.5 mL per well (corresponding to time 0). The final FLG concentrations were respectively 0.1, 1, 10, and 50 mg L<sup>-1</sup> (FLG<sub>50mg</sub>). For the Shading effect test, 1.5 mL of FLG suspensions were placed in each well of the upper plates only. The wells which did not contain a final volume of 2.5 mL, were filled with SPE medium (2.5 mL in wells of the upper plate for the Total effect test and 1 mL in wells on the upper plate for the Shading effect test). Wells were monitored by sampling at 24, 48, 72 and 144 h. Each experimental condition was conducted in triplicate.

## 2.3. Effect of FLG on *N.palea* growth and viability

At the end of the incubation time, the contents of triplicate wells were scraped and homogenized. Algal concentrations were assessed performing two counts per well using a Malassez cell

counter. Like in Verneuil et al. study [36], the growth rates ( $r$ ) was calculated from the following equation (with  $n_0 = 1 \times 10^5$  representing the number of cells per mL at the beginning of the exposure and  $n_x =$  the number of cells per mL after  $x$  hours of exposure to FLG).

$$r = \frac{n_x - n_0}{n_0}$$

Algal viability was determined at 48 h of exposure to FLG suspensions using SYTOX Green<sup>®</sup> marking (Molecular Probes, Inc., Eugene, OR) [39] generally used on bacteria [40] but also on diatoms [41]. After scrapping, cells were incubated 10 min in SYTOX Green<sup>®</sup> (100 nM) and then observed using a fluorescence microscope (BX-41, Olympus, Center Valley, PA) equipped with an Hg lamp (U-LH100HG, Olympus, Center Valley, PA) using a 470–490 nm/520 nm excitation/emission filter and a 500-nm dichromatic filter (U-MNB2, Olympus, Center Valley, PA). All injured or dead cells present an apparent green fluorescence of the nucleus whereas intact cells do not present any fluorescence (Invitrogen, Molecular Probes, SYTOX<sup>®</sup> Green Nucleic Acid Stain). The rate of dead cells was determined by the following equation ( $T$  represents the rate of dead cells,  $n_{48}$  = the total number of cells counted 48 h after the beginning of the exposure and  $n_d$  = the number of counted dead cells)

$$T(\%) = \frac{n_d}{n_{48}} * 100$$

## 2.4. Effect of FLG on photosynthetic activity

In agreement with Verneuil et al. [36], the photosynthetic active radiations (PAR) received by *N. palea* were measured at 48 h of exposure, using a light-meter (Li-250 A light meter equipped with Li-COR Quantum sensor; Li-COR Biosciences, San Diego, CA). Before the measurement, the agitation of culture flasks was stopped and the sensor was placed between the two plates for each condition for the Shading test, and under the lower plate in Total exposure conditions. Measurements for the control condition were carried out under and between the two plates to compare PAR values in FLG exposure to the respective control value.

Pulse Amplitude Modulated fluorimetry (PAM) was carried out to assess photosynthetic activity of diatoms exposed to FLG using a Phyto-PAM (Heinz Walz GmbH, Effeltrich, Germany). After a strong light pulse, the photosystem II quantum yield (PSII) was obtained from fluorescence yield measured just before the saturation pulse and the maximal fluorescence yield. Then, the photosystem II quantum yield is the ratio of emitted photons and photons absorbed by chlorophyll after the illumination pulse. When the quantum yield is close to 0, photosystem II is strongly altered and photosynthetic activity is totally inhibited. This value rises when the photosystem II activity is increased (Phytoplankton Analyzer PHYTO-PAM and Phyto-Win Software V 1.45, System Components and Principles of Operation). Measurements were done 48 h after the beginning of the exposure to FLG for each triplicated condition, and after dark conditioning of well plates for approximately 10 min. A measurement was carried out on wells containing only FLG<sub>50mg</sub> to control the impact of FLG on the Phyto-PAM measurement.

## 2.5. Assessment of FLG-Diatoms interaction and microscopy observation of *N. palea* biofilms

The interaction between FLG and diatoms was investigated at 6, 24, 48 and 144 h of exposure to FLG<sub>50mg</sub> by combining (i)

macroscopic observation of the wells, (ii) optical density measurements after sampling the water column, (iii) observation of the biofilm by stereomicroscopy, and (iv) observation of the biofilm by scanning electron microscopy (SEM).

A first macroscopic observation was carried out using a stereo microscope (SZX2-ILLT, Olympus Corporation,  $\times 8$  and  $\times 56$ ) to photograph the full wells in the presence and in the absence of diatoms. After this, 1 mL of the supernatant (fraction called S, Fig. 1) was sampled to assess the FLG concentration in the shallow-depth part of the water column and the rest of the contents (fraction of 1.5 mL called S') was sampled to evaluate the sedimentation of FLG above the diatoms biofilm. The wells were rinsed once with 1 mL of SPE medium and a second macroscopic observation of the bottom of wells was performed. The percentage of FLG in the three compartments was calculated as follows (where %S and %S' represent the percentage of FLG quantity in the respective fractions S and S',  $OD_S$ ,  $OD_{S'}$  and  $OD_i$  are the  $OD_{800}$  value for the respective fractions S and S' and for the total fraction of the well,  $V_S$  and  $V_{S'}$  represent the volume of the respective fraction sampled S and S',  $V_{tot}$  is the total volume of the wells = 2.5 mL, and % FLG stuck represents the percentage of FLG stuck in the biofilm):

$$\%S = \frac{OD_S * V_S}{OD_i * V_{tot}} \quad \%S' = \frac{OD_{S'} * V_{S'}}{OD_i * V_{tot}}$$

$$\%FLG\ stuck = 100 - \%S - \%S'$$

The fraction S and S' removed from wells prior to stereomicroscopy were preserved for measuring the optical density measurement as previously described to assess the fate of carbon nanoparticles in the presence of algae [42]. To avoid chlorophyll absorbance, the optical density was measured at 800 nm ( $OD_{800}$ ) in the fraction S and S' at 6, 24, 48 and 144 h of exposure to  $FLG_{50mg}$  using a spectrophotometer (Secomam Anthelie UV/Visible Light Advanced Spectrophotometer) for each condition. This  $OD_{800}$  measurement was also carried out with only  $FLG_{50mg}$  in wells to confirm the absence of adherence of nanoparticles at the bottom of the wells. These measurements allowed to characterize the nanoparticles behavior in wells.

After collecting fractions S and S', the wells were rinsed once with 1 mL of SPE medium and a second macroscopic observation of the bottom of wells was performed by stereomicroscopy. The collected images were analyzed with the "ImageJ" software ("ImageJ" 1.45s, Wayne Rasband, National Institute of Health, USA) using the "Analyze Particles" module to quantify the area covered by FLG adhered on diatoms biofilm. Wells containing only diatoms ( $0\text{ mg L}^{-1}$  of FLG) were considered to fix the threshold value for FLG detection with ImageJ software.

At the cellular level, interaction between FLG nanoparticles and diatoms biofilm was observed for each condition by both light

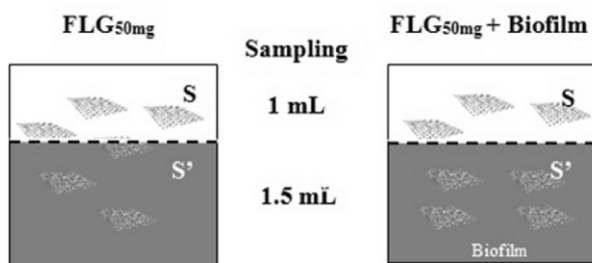


Fig. 1. Schematic representation of FLG distribution between the three compartments in wells: fractions S and S' in the water column and fraction of FLG stuck on the biofilm.

microscopy and SEM. For SEM analysis, glass coverslip were placed at the bottom of wells before inoculating cultures and exposing diatoms to  $FLG_{50mg}$  for 48 h. Then, samples were fixed and colored with Alcian blue (Sigma-Aldrich, Paris, France) directly in the wells following the Erlandsen's et al. [43] protocol with some modifications also used in earlier work by Verneuil et al. [36]. First, an incubation of 24 h in a solution of 0.1% Alcian blue in acetic acid (0.5 M), paraformaldehyde (2%), and glutaraldehyde (2%) buffered using sodium cacodylate (0.15 M) permitted samples fixation directly in wells. Then, wells were rinsed with a cacodylate buffer (0.15 M). A second fixation step consisted in a 2 h incubation in a solution of cacodylate buffer containing potassium ferro-cyanide (1.5%) and  $OsO_4$  (1%) was conducted. Then, samples were rinsed again and dehydrated in an ascending ethanol gradient [50, 70, 80, and 95%] each for 10 min and twice for 15 min in ethanol 100% before drying with  $N_2$ . Glass coverslips were then placed on SEM mounts and platinum coated before observation (JEOL JSM-6700F, 3 kV, detection mode: Secondary Electron Imaging).

## 2.6. Statistical analysis

All statistical analysis were applied at a maximum level of 5% by a one-way analysis of variance (ANOVA) implemented using the statistical open source software "R" (SSR; R Development Core Team 2012, Bio-RAD, Charlottesville, VA) to detect a significant difference between the different conditions for the growth test, viability test and PSII quantum yield measures. This analysis was followed by Tukey HSD *post hoc* test to determine which conditions were different from the others. If data did not follow a normal distribution, equivalent non-parametric tests were run (Kruskal-Wallis analysis of variance followed by Kruskal mc test *post hoc*). Thus, to estimate a correlation between FLG concentration and PSII quantum yield, a Kendall test was run. Furthermore, a correlation between PAR and the cellular density was tested to exclude the influence of the presence of diatoms at the bottom of wells on the PAR measurement running a Kendall test.

## 3. Results

### 3.1. Characterization of FLG suspension

Fig. 2 shows an example of FLG nanoparticles. From both Transmission Electronic Microscopy) TEM and XRD measurements (confirming an interlayer distance of 0.335 nm) the number of layers was estimated to be between 5 and 10.

A small D band was observed at  $1330.1\text{ cm}^{-1}$  in Fig. 3. Its relative intensity ( $I_{D/G} = 0.1$ ) was especially low in comparison to what is typically described in the literature using other routes (for example stronger oxidizing treatments of graphite followed by reduction). The low FWHM ( $17\text{ cm}^{-1}$ ) of the G peak at  $1580.4\text{ cm}^{-1}$  also confirmed the good structural quality of this material.

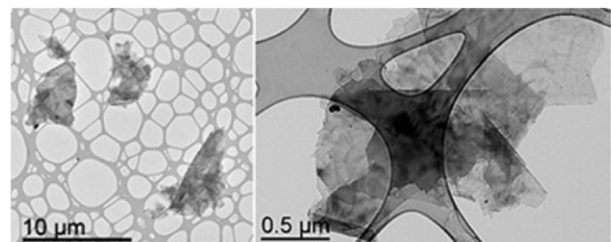


Fig. 2. Transmission Electronic Microscopic micrograph of FLG after drying and dispersing in ethanol.

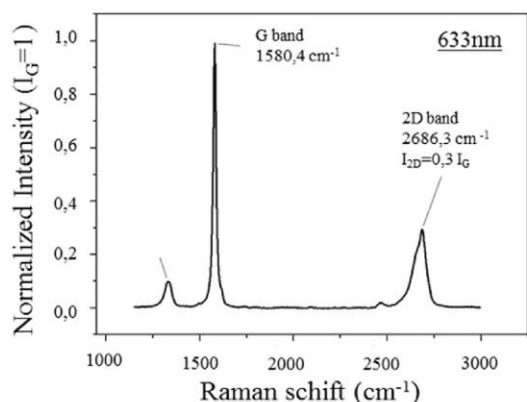


Fig. 3. Raman spectrum of dried FLG.

The atomic composition of the surface was mainly: C = 94.5 at. % (284.1 eV), O = 4.0 at. % (532.0 eV) (Fig. S2). Si accounted for 1.5 at. %, although nothing in sample preparation could explain the presence of this element. However, it may originate either from the adhesive carbon tape used to prepare the sample for XPS analysis, or from SiO<sub>2</sub> coming from the glassware used for sample processing. Oxygen may also come from residual humidity, XPS is also very sensitive to this.

The ICP-OES analysis did not reveal any difference between the

Table 1

Quantity of the different elements measured by ICP-OES analysis in the medium culture in the absence and in the presence of FLG<sub>50mg</sub>. ND = not detected.

Elements quantified	Medium culture (ppm)	Medium culture + FLG <sub>50</sub> (ppm)
<b>Medium culture elements</b>		
Si	10.41 ± 0.26	12.55 ± 0.04
Na	25.92 ± 0.33	27.03 ± 0.06
Ca	9.36 ± 0.14	9.74 ± 0.07
Mg	2.27 ± 0.03	2.33 ± 0.02
S	2.98 ± 0.07	3.20 ± 0.02
K	4.42 ± 0.02	4.44 ± 0.05
P	1.55 ± 0.06	1.512 ± 0.002
B	0.43 ± 0.01	0.539 ± 0.019
Mn	0.044 ± 0.001	0.047 ± 0.002
Fe	0.27 ± 0.01	0.1435 ± 0.0008
Mo	ND	ND
Zn	0.008 ± 0.003	0.018 ± 0.002
Co	0.0018 ± 0.0001	0.0018 ± 0.0001
Se	ND	ND
V	ND	ND
Elements quantified	Medium culture (ppm)	Medium culture + FLG <sub>50</sub> (ppm)
<b>Trace elements</b>		
Cd	0.0001 ± 0.0001	ND
Ag	ND	ND
Al	ND	ND
As	ND	ND
Ba	ND	ND
Be	ND	ND
Cr	ND	ND
Li	ND	ND
Ni	ND	ND
Pb	ND	ND
Rb	ND	ND
Sb	ND	ND
Sc	ND	ND
Se	ND	ND
Sr	ND	ND
Ti	ND	ND
Tl	ND	ND
U	ND	ND

medium culture without nanoparticles and the medium culture incubated with FLG<sub>50mg</sub> (Table 1), demonstrating the absence of release of metallic ions by FLG. Furthermore, no absorption of nutrients by FLG were demonstrated in this study which is a current observation in the bioassays testing nanoparticles of the graphene family nanomaterial [3].

### 3.2. FLG effects on *N. palea* growth and viability

Fig. 4 shows the growth kinetics curve of *N. palea* determined by cellular counting from 24 h to 144 h of exposure. For each experiment, growth rate was determined at 48 h, corresponding to the end of the exponential growth phase, and at 144 h of exposure, corresponding to the stationary period.

Diatoms growth rate calculated for the Total exposure and Shading conditions at 48 h and 144 h are represented in Fig. 5a and b, respectively. After 48 h of direct exposure (Total effect), FLG caused a decline of diatoms growth for both exposure conditions. The decrease in growth rate was significant only for diatoms exposed to FLG<sub>50mg</sub> suspensions (Fig. 5a) (p-value < 0.05) reaching a minimum value of  $0.3 \pm 0.2$ . After 144 h of FLG exposure (Fig. 5b), the inhibition totally disappeared whatever the tested concentrations (0.1–50 mg L<sup>-1</sup>). Then, at the end of the experiment, the average diatoms growth rate was about  $9.2 \pm 0.3$ . In the case of the Shading test, the growth rate was significantly lower than control only for the culture exposed to FLG<sub>50mg</sub> (48 h:  $5.1 \pm 1.4$ , 144 h:  $10.8 \pm 0.2$ ) at respectively 48 h ( $2.1 \pm 0.4$ ) and 144 h ( $6.5 \pm 1.4$ ) of FLG exposure. Shading effect at lower concentrations had no significant impact on diatoms growth.

Fig. 6 shows the proportion of non-viable cells determined using SYTOX Green<sup>®</sup> staining of dead cells. This graph outlines a similar impact, although not significant, of the toxicity between 0.1 and 10 mg L<sup>-1</sup>. In the control conditions,  $2.9 \pm 1.6\%$  of the cells were non-viable, which was consistent with mortality values cited by Verneuil et al. [36] in similar incubations. At FLG<sub>50mg</sub> exposure, the viability test revealed a significant (p-value < 0.05) increase in toxicity with a diatoms mortality around  $22.2 \pm 2.2\%$ .

### 3.3. Effect of FLG suspension on photosynthetic yield and PAR

PAR was measured at 48 h of FLG exposure (Fig. 7). In the control condition, PAR was clearly higher than other study where diatoms are exposed to 45 μE [44] or 24 μE [36]. For both Total and Shading

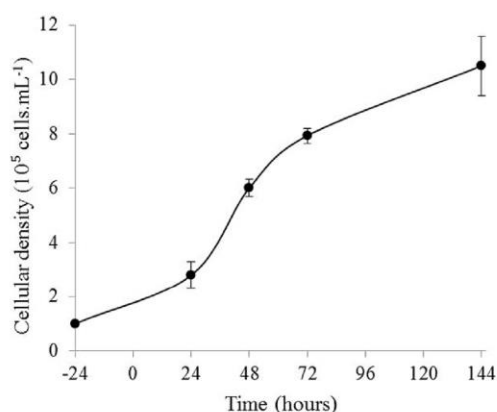


Fig. 4. Growth kinetic curve of *N. palea* control culture in SPE medium. Diatoms counting were carried out in Malassez cell at 24, 48, 72 and 144 h of growth. Error bars represent standard errors of the mean of 3 separate experiments.

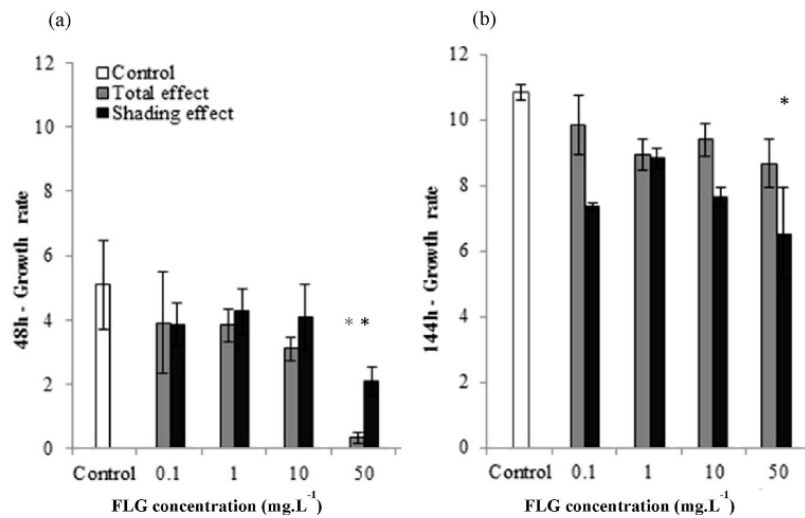


Fig. 5. Growth rate ( $r$ ) of *N. palea* after 48 h (a) and 144 h (b) of FLG exposure for total effect test (grey bars) and shading effect test (black bars). (\*) indicates significant difference ( $p < 0.05$ ) between the different concentrations tested. Error bars represent standard errors of the mean of 3 separate experiments.

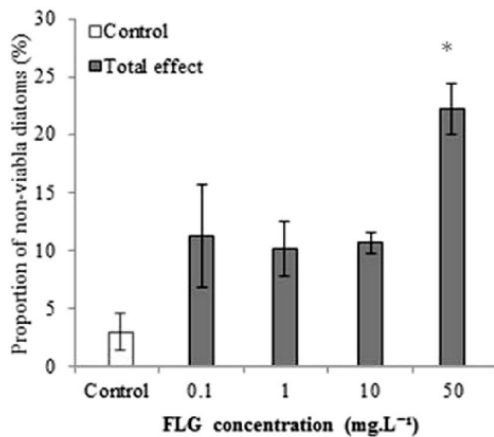


Fig. 6. Proportion of non-viable diatoms for total exposure test at 48 h of FLG exposure. (\*) indicates significant difference ( $p < 0.05$ ). Error bars represent standard errors of the mean of 3 separate experiments.

effect experiments, PAR decreased with the FLG concentration tested. Light intensity measured in shading condition was always higher than in total exposure due to the position of the sensor during the measurement which was placed between the two wells plates for the Shading test to assess exactly the shading provided by FLG. For total exposure, PAR decreased significantly from exposure to 50 mg L<sup>-1</sup> of FLG with a PAR value of  $25.7 \pm 3.3 \mu\text{E}$  compared to the control 1 which exhibited a PAR value of  $55.3 \pm 3.4 \mu\text{E}$ . This decrease was also observed in shading condition where PAR remained stable from 0.1 to 10 mg L<sup>-1</sup> and showed a significant decline only at 50 mg L<sup>-1</sup> of FLG ( $46.0 \pm 2.5 \mu\text{E}$  for FLG<sub>50mg</sub> and  $72.3 \pm 3.9 \mu\text{E}$  for the control 2).

Fig. 8 depicts the PSII quantum yield measured at 48 h of FLG exposure. Control cultures presented a PSII quantum yield of  $0.6 \pm 0.1$  comparable to values found in the literature (around 0.50) [45]. The absence of impact of the presence of FLG on the PSII measurement was verified (data not shown). PSII quantum yield measured in total exposure conditions showed a slight decrease in

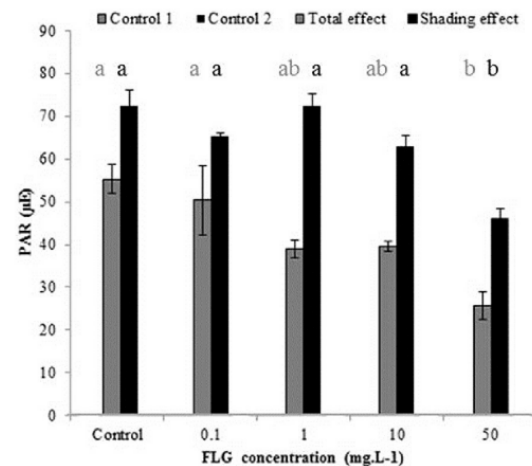
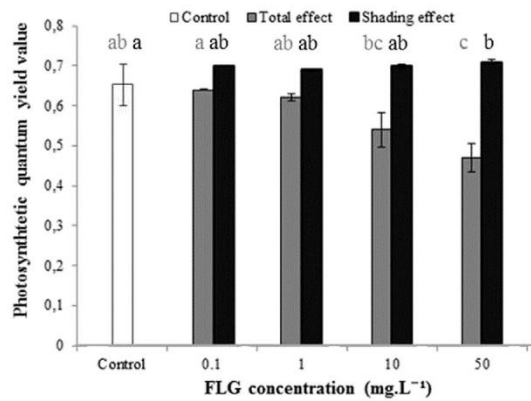


Fig. 7. Photosynthetic Active Radiation measured for the total exposure test (grey bars) and the shading test (black bars) at 48 h of FLG exposure. Groups with the same letter are not significantly different ( $p\text{-value} > 0.05$ ). Error bars represent standard errors of the mean of 3 separate experiments.

chloroplast integrity from 0.1 to 10 mg L<sup>-1</sup> of FLG where diatoms exposed to this range of concentration exhibited an average PSII quantum yield of  $0.6 \pm 0.1$ . A significant decrease in PSII quantum yield was observed only for diatoms exposed to FLG<sub>50mg</sub>. Thus, a significant negative correlation between PSII quantum yield and FLG concentration ( $r = -0.57$ ;  $Z = -2.78$ ;  $p\text{-value} < 0.05$ ) was observed in the total exposure test. In shading condition, no significant difference in PSII quantum yield was observed between control and treated diatoms regardless of FLG concentration. PSII quantum yield values remained stable during the experiment for diatoms exposed from 0.1 to 10 mg L<sup>-1</sup> of FLG, except for diatoms exposed to FLG<sub>50mg</sub>, with an average of  $0.7 \pm 0.0$ .

The interaction of FLG with the algal biofilm was investigated at 6, 24, 48 and 144 h of FLG<sub>50mg</sub> exposure, using a stereo microscopy and SEM. This interaction was first quantified by monitoring FLG adhesion onto biofilm using stereo microscope, OD<sub>800</sub> and PAR



**Fig. 8.** Photosystem II quantum yield of *N. palea* exposed to the total effect (grey bars) and to shading effect (black bars) at 48 h of FLG exposure. Groups with the same letter are not significantly different ( $p$ -value > 0.05). Error bars represent standard errors of the mean of 3 separate experiments.

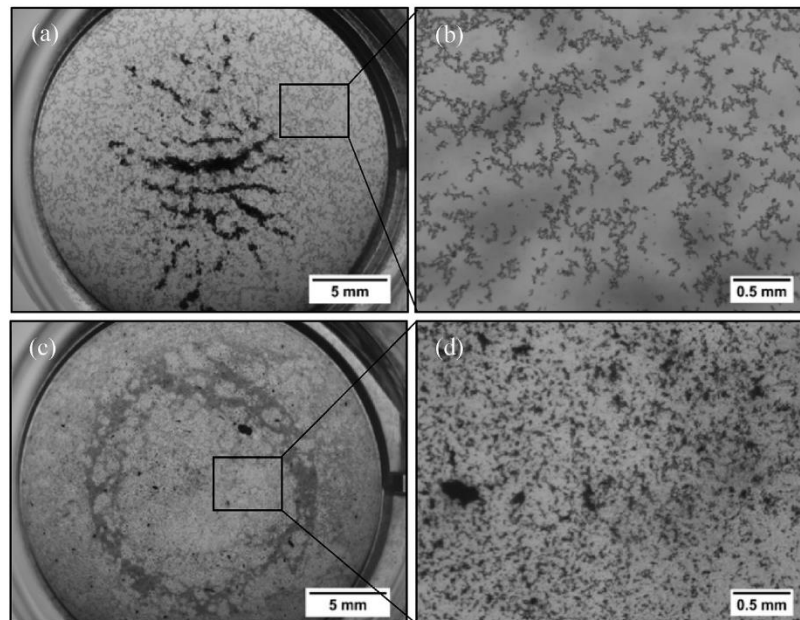
(data not shown). Fig. 9 shows examples of collected stereo-microscopy images of FLG<sub>50mg</sub>. These images allowed to observing the size and the structure of the agglomerates of nanoparticles in the absence (Fig. 9a and b) or presence of diatoms (Fig. 9c and d). In the absence of diatoms, the nanoparticles were agglomerated in the water column in the center of the wells without any sign of adhesion at the bottom of the wells. In the presence of diatoms, nanoparticles formed numerous scattered agglomerates at the bottom of wells onto the biofilm.

Fig. 10 shows examples of collected SEM images of *N. palea* in control culture (Fig. 10a) and in cultures exposed to FLG<sub>50mg</sub> (Fig. 10b–d). SEM allowed better observation at higher magnification of algal biofilm and the interaction with FLG at 48 h of exposure. SEM images evidenced the high affinity of FLG nanoparticles

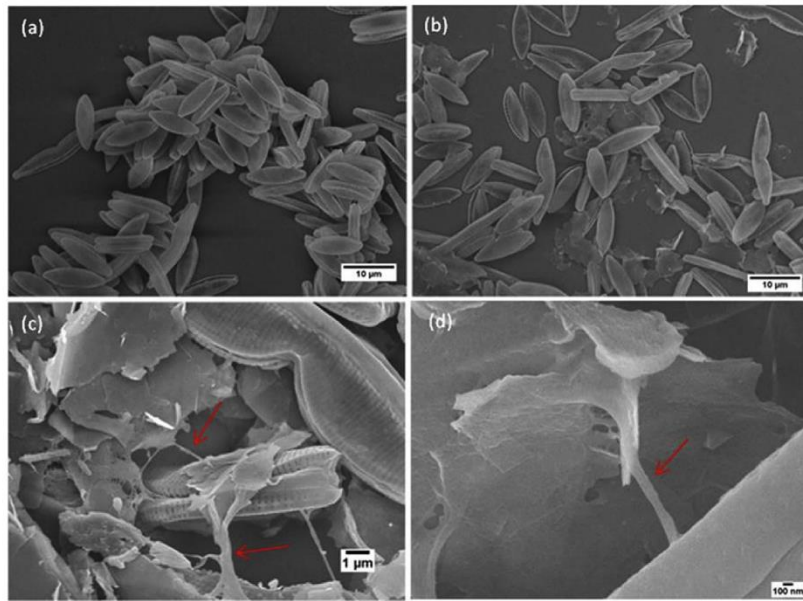
for the EPS. These images show that FLG nanoparticles were included in the EPS network (red arrows). Few FLG were also found directly on the surface of cells. The high magnification of SEM images allowed observing that FLG size was too large to enter into the cells by the pores of the frustules.

Fig. 11a and b shows examples of pictures analyzed using “ImageJ” software at 6 h and 144 h of FLG<sub>50mg</sub> exposure where a significant difference could be observed in the quantity of spot of nanoparticles stuck at the bottom of wells. The quantification of FLG adhesion onto the algal biofilm by densitometry analysis is shown in Fig. 11c (represented by white points). An increase in FLG adhesion at the bottom of wells was observed from  $5.8 \pm 0.6\%$  at 6 h to  $18.0 \pm 0.8\%$  covering at 144 h in the presence of diatoms. Preliminary microscopic observations allowed verifying the absence of algae in the water column (data not shown).

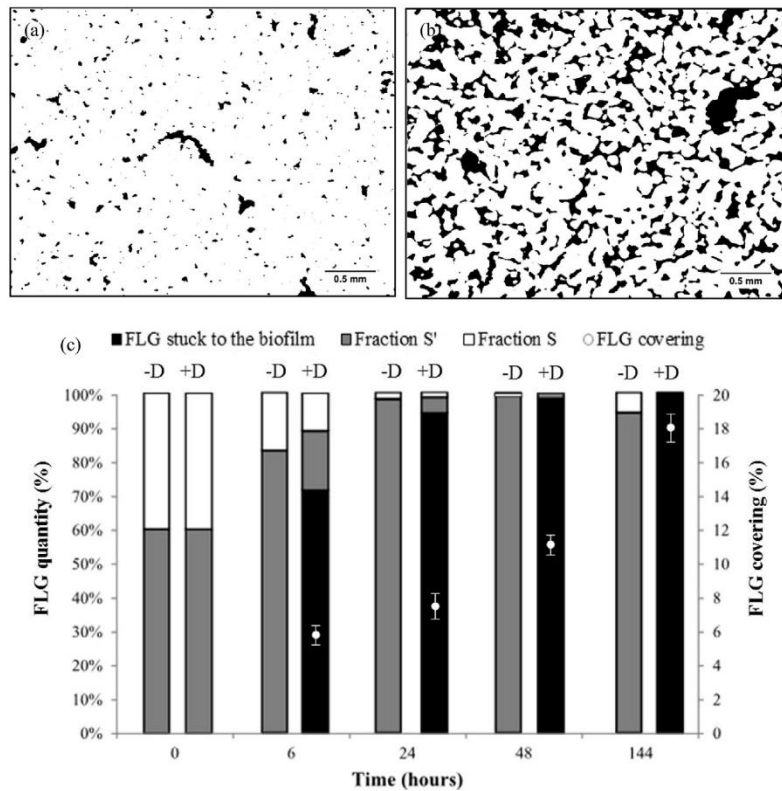
The FLG concentrations in the two different fractions of the water column (*S* and *S'*) measured by optical density and the deduced concentration of FLG stuck on the biofilm were expressed in relative percentage of FLG quantity. The dynamic of the FLG quantity in these three different compartments is presented in Fig. 11c. In the absence of diatoms, FLG quantity values indicated that FLG declined at shallow depth (fraction *S*) while it accumulated in the bottom of wells (fraction *S'*), but did not adhere to the plate. After 6 h, FLG in the bottom fraction of the well already accounted for  $95.3 \pm 0.4\%$  of the total FLG quantity against 60% as the theoretical initial value. These data indicate that FLG underwent a sedimentation process within the water column, without any strong interaction with the plastic at the bottom of the well. In the presence of diatoms, FLG also sedimented, but in that case, FLG accumulated in the biofilm rather than in the bottom fraction of the water column (*S'*). Indeed, the amount of FLG stuck to the biofilm reached  $71.4 \pm 0.4\%$  after 6 h and more than 98% at 144 h. At this time, the FLG in the water column was not detectable by OD<sub>800</sub> measurement. These results confirmed data derived from ImageJ analysis.



**Fig. 9.** Examples of collected images at stereo microscopy of full wells containing FLG<sub>50mg</sub> without *N. palea* culture in large view (a) and in magnified view (b), and with *N. palea* culture in large view (c) and in magnified view (d) after 144 h of exposure.



**Fig. 10.** Scanning electron microscopy images of *N. palea* at 48 h of growth in control culture (a) and in culture exposed to FLG<sub>50mg</sub> (b–d). Red arrows indicate the EPS network secreted by diatoms. (A colour version of this figure can be viewed online.)



**Fig. 11.** Examples of pictures analyzed with “ImageJ” showing FLG at the bottom of wells after 6 h (a) and 144 h (b) of FLG<sub>50mg</sub> exposure. FLG distribution derived from the OD<sub>600</sub> measures between the different fractions: fraction S (measured, white bars), fraction S' (measured, grey bars) and FLG stuck on the algal biofilm (estimated, black bars) in the absence (-D) and in the presence (+D) of diatoms at the beginning (0 h) (theoretical value), 6, 24, 48 and 144 h of FLG<sub>50mg</sub> exposure (c). FLG<sub>50mg</sub> percentage covering at the bottom of wells derived from image analysis is represented by white dots (c). Error bars represent standard errors of the mean of 3 separate experiments.

#### 4. Discussion

The aim of this study was to assess the global response of *N. palea* exposed to FLG measuring several standard endpoints (such as the growth rate, the algal mortality and membrane integrity) combined with a more original approach to characterize the and the interaction between the algal biofilm and nanoparticles. In this study a particular interest was assigned to the different effects of FLG distinguishing the shading effect which is a potential part of the total effect of FLG on *N. palea*.

##### 4.1. Effect of total exposure on diatoms growth and viability

Diatoms growth and mortality were assessed for the Total and Shading effect test simultaneously. When cells were directly in contact with nanoparticles (Total effect), the exposure to FLG induced a dose-dependent inhibition which was significant only for diatoms exposed to 50 mg L<sup>-1</sup> of FLG. Furthermore, the analysis of cell viability revealed a high percentage of mortality only for diatoms in contact with FLG<sub>50mg</sub> at 48 h. These results suggest a real toxicity of FLG suspensions from 50 mg L<sup>-1</sup>. Alterations of the photosynthetic quantum yield (PSII yield) confirmed this toxicity leading to a significant decrease of 28% of photosynthetic activity for diatoms exposed to the highest concentration (50 mg L<sup>-1</sup>). Nevertheless, this decline is not due to a shading effect because in this condition quantum yield was not affected (Fig. 8). This inhibitory response of diatoms PSII yield could be caused by the contact with FLG nanoparticles as shown by the negative correlation between PSII yield and FLG concentration observed only in direct exposure, meaning a negative effect of FLG on photosynthetic activity. These results could suggest that direct physical interaction between FLG and diatoms lead to frustule damages and a loss of plasma membrane integrity. These physical disruptions were already observed in presence of graphene oxide and CNTs on *E. coli* [46,47], observed with SEM and TEM, leading to cell damages and morphological alterations.

Thus, OD<sub>800</sub> values in the absence of diatoms allowed to confirm that FLG nanoparticles sediment at the bottom of the wells leading to a contact with the biofilm. This contact may be at the origin of toxic effects on cells at high concentration. In view of the dimensions of FLG, a shearing effect could be hypothesized. Then, chloroplast alterations and inhibition of PSII yield could be a consequence of diatom cell damages.

The FLG toxicity, like other nanoparticles may result from numerous factors: damage by direct contact as previously observed [48] and mentioned in a previous paragraph, but also reactive oxygen species (ROS) production [49,50]. ROS generation can be caused either by direct contact and/or indirect effects, associated with the physico-chemical properties of the materials, the functionalization of the surface and/or the release of toxic elements, involved in the nanomaterial synthesis processes. In many cell types, ROS generation is generally associated to plasma membrane disruption and mitochondria alteration [50]. Today, little is known about toxicity pathways for graphene in general and FLG in particular. However, it has been suggested that because of their similarity to carbon nanotubes, oxidative stress may be an important pathway in the graphene family effects [3].

Several works focusing on the study of carbon nanoparticles revealed that their toxicity was associated with the presence of exogenous compounds as metal ions, used as nanoparticles catalyzer for example [51–53]. FLG was not grown catalytically and do not contain residual metal catalysts. However, a related contamination due to its mode of dispersion by ultrasonic probe may be at the origin of the presence of metals. So, the analysis of numerous trace elements were conducted by incubation of 50 mg L<sup>-1</sup> FLG in

the culture medium under stirring during 144 h. The absence of toxic metallic ions (Table 1) demonstrated that growth inhibition and toxicity were not caused by metal contamination. One of the characteristics of FLG materials is their high surface area. FLG is described as a potent sorbent for a wide variety of small molecule solutes in a physiological fluid. Adsorption on carbon surfaces is possible for molecules with high lipophilic degree, molecules with conjugated  $\pi$  bonds or molecules with positive charge. In this last case, the biological consequences could be a micronutrient depletion [54]. The analysis of nutrient composition of diatom culture medium in presence and absence of 50 mg L<sup>-1</sup> FLG has shown no significant differences. So, in this work, growth inhibition and cell mortality at 48 h were not associated to release and/or sorption processes but support a direct effect of FLG on diatom cells.

The growth recovery observed at 144 h of total exposure might signify a decline or an absence of toxic effect of FLG on diatoms at this time. These results support the hypothesis that the pressure of the toxic agent is mitigated. Growth recovery was also observed by Verneuil et al. [36] when diatoms were exposed to CNTs. These results suggest the implementation of a protection process limiting interaction with FLG allowing the growth over the biofilm containing the nanoparticles. These results underline the capacity of diatoms to recover their growth even after a strong initial perturbation. This capacity can be related with the biofilm development. Brouwer et al. [55] reported that EPS production had a major role in the biostabilization, reducing potential for erosion, and the matrix can be considered as a microbial recycling storage. But it is not the only benefits of EPS matrix, which can confer a protection against trace elements and biocides even at high concentrations [56].

##### 4.2. Shading effect of FLG

In shading condition, growth inhibition was observed at 48 h of FLG<sub>50mg</sub> exposure without a growth recovery at 144 h. These results revealed that the presence of FLG<sub>50mg</sub> in the upper plate strongly inhibited diatoms growth until 144 h of exposure. In this condition, an effect which is not a contact one is stated. An exposure to FLG<sub>50mg</sub> promotes a shading effect which is too high and does not permit a growth recovery because (i) of a significant PAR deficit (Fig. 7), and (ii) cells and EPS are not in contact with nanoparticles and then cannot interact with them. As shown by Pouvreau et al. [38] when the light intensity is not enough, the algal growth is altered. Therefore, growth inhibition observed in direct contact condition at 48 h of exposure is due to a combination of toxic and shading effect. Combined effects (contact and shading) on cell growth in presence of CNTs was also demonstrated by Long et al. [57] and Schwab et al. [58] on *Chlorella sp.* However, shading effect did not result in a significant diatom mortality even at the highest FLG concentration tested in the present study. Shading effect was also observed with the exposure of other brown algae such as *Fucus serratus* to carbon black nanoparticles [59].

Contrary to carbon nanoparticles, metal oxide nanoparticles can cause an opacification of the culture medium without shading effect on organisms reported [60,61]. The most studied nanoparticles were cerium dioxide (CeO<sub>2</sub>) and titanium dioxide (TiO<sub>2</sub>). These kinds of nanoparticles lead to milky suspensions and present an absorption spectra only in the UV-range [62]. Some cytotoxic effect of metal dioxide nanoparticles were demonstrated on green algae, daphnia and bacteria [63–65] but no toxic effect were observed on photosynthetic activity and no shading effect was recorded for CeO<sub>2</sub> nanoparticles on diatoms [66]. Overall, the shading effect seems to be specific to carbon nanoparticles, as a result of their black color. Thus, carbon-based nanoparticles appear to automatically promote shading effect on benthic and pelagic organisms. In this study, the results show that the shading did not significantly

alter the photosynthetic activity at low FLG concentrations. The photosystem II activity was slightly but significantly promoted at high FLG concentration only. The presence of TiO<sub>2</sub> or ZnO<sub>2</sub> nanoparticles was previously shown to increase the chlorophyll synthesis in several photosynthetic organisms [67,68] which can be considered as a response to a photo-induced stress. This shading can alter physiological activity of photosynthetic organisms such as the reproduction or the fertilization process. The increase of the photosynthetic activity in shading exposition suggest that *N. palea* invested more energy in chlorophyll synthesis which represent the main source of energy in these cells. In these conditions, the energy allocated to cell division was reduced.

#### 4.3. Investigation of the interaction between diatoms biofilm and FLG suspension

The interaction between algal biofilm and FLG nanoparticles was investigated by microscopic observation but also by a monitoring of OD<sub>800</sub> of the supernatant. Wells observations at FLG<sub>50mg</sub> exposure has shown that, in the absence of diatoms, FLG nanoparticles were agglomerated in the center of the wells and did not adhere at the bottom of the plate even if a sedimentation phenomenon could be observed (Fig. 9a and b). Nevertheless, in the presence of diatoms, carbon nanoparticles formed numerous heterogeneous agglomerates stuck at the bottom of the wells (Fig. 11a, b, c). These observations support a real interaction between algal biofilm and nanoparticles, leading to the formation of large agglomerates of nanoparticles at the bottom of wells. Furthermore, FLG adhesion rate onto diatoms and the monitoring of OD<sub>800</sub> in the water column suggested a transfer of FLG from the water column to the bottom of wells. As a result, most nanoparticles for the exposure concentration of 50 mg L<sup>-1</sup> were found stuck at the bottom of the wells because of a strong interaction with algal biofilm. This sticking was not due to the adherence of nanoparticles alone at the bottom of wells. Furthermore, SEM observations (Fig. 10) provide an evidence of a strong agglomeration and adherence of FLG on the EPS network secreted by diatoms.

The data derived from the monitoring of FLG concentration in the water column and from microscopic observation were in agreement. The sedimentation process undergone by FLG in the water column, which was associated with the sticking promoted by EPS secreted by diatoms, as previously described [34].

It is well known that *Nitzschia palea* diatom species can be found in contaminated or eutrophic medium [69]. This species presents a strong resistance capacity which can be related with the biofilm production. It was reported that the secretion of EPS by the marine diatoms *Thalassiosira weissflogii* [70] increased in the presence of Ag nanoparticles and reduced its toxicity [71] suggesting that EPS can be involved in a detoxification process by this diatom. Furthermore, the secretion of polysaccharides in the medium seems to be a defense mechanism of algae against heavy metals [35,72]. More recently, Verneuil et al. [73] also demonstrated the role of EPS production in diatoms cultures exposed to CNTs. The authors reported the high proportion of hydrophobic proteins in EPS, which represent the primary part of extracted EPS. Otherwise, extracellular DNA was identified as another component of EPS during the biofilm development which can be a structuring element of algal biofilm [56,74]. Tong et al. [75] reported that the presence of extracellular DNA appears to play a role in the initial adhesion and the biofilm formation of *Reinheimera* sp. F8, *Pseudomonas* sp. FW1, *Microbacterium* sp. FW3 and *Serratia* sp. FW2 and especially during the exponential growth phase. A strong affinity between nucleic acids and graphene has been previously reported [3] and supports the possible involvement of extracellular DNA in EPS and FLG interaction.

## 5. Conclusion

Exposure of *N. palea* to FLG clearly promotes a negative cellular response at high concentration with a dose-dependent growth inhibition and an effective short-term toxicity. The frustule appears to be an efficient barrier preventing the FLG cellular uptake but it is not sufficiently resistant to the physical interaction, which can be a potential cutting effect, of FLG nanoparticles. In this paper, we demonstrated that the cytotoxicity is caused by a negative impact of both the direct contact of cells with nanoparticles but also a shading effect. This indirect effect was only observed with dispersed CNTs. Shading seems to be specific to carbon-based nanoparticles. EPS secretion appeared to be a key process in the response of diatoms resulting in the clarification of the water column. This process allows reducing contact opportunities between FLG and diatoms which can recover a normal growth after 144 h of exposure. Then, the clarification of the water column by *N. palea* results in physical interactions with FLG. To go further, an assessment of the composition of the EPS secreted while diatoms are exposed to different carbon-based nanoparticles could be the next step to determine the specificity of the response induced by *N. palea*. Beyond the proper response of *N. palea* to FLG exposure, our results have ecological implications. FLG sticking in the biofilm is likely to mitigate its ecotoxicity not only towards *N. palea* but also towards other organisms in aquatic ecosystems, including pelagic organisms. Despite the absence of toxic effects at low concentrations on *N. palea*, toxicity effects might occur for upper organisms in the food chain. Indeed, the sticking of FLG in the biofilm results in the concentration of nanoparticles in the biofilm which can be ingested by grazers. These organisms would be exposed to higher concentration which could lead to toxic effects.

## Acknowledgments

We thank the financial support for this study provided by the French Ministry of Higher Education and Research (PhD grant No 2015–73). The research leading to these results has received funding from the European Union Seventh Framework Program under grant agreement No 604391 Graphene Flagship. We acknowledge the Common Service for Scanning Electron Microscopy of the University Paul Sabatier and Stephane Le Blond Du Ploy for his technical help.

## Appendix A. Supplementary data

Supplementary data related to this article can be found at <http://dx.doi.org/10.1016/j.carbon.2016.11.033>.

## References

- [1] C.O. Hendren, X. Mesnard, J. Dröge, M.R. Wiesner, Estimating production data for five engineered nanomaterials as a basis for exposure assessment, *Environ. Sci. Technol.* 45 (2011) 2562–2569, <http://dx.doi.org/10.1021/es103300g>.
- [2] J.Y. Bottero, M. Auffan, D. Borschnek, P. Chaurand, J. Labille, C. Levard, et al., Nanotechnology, global development in the frame of environmental risk forecasting. A necessity of interdisciplinary researches, *Comptes Rendus - Geosci.* 347 (2015) 35–42, <http://dx.doi.org/10.1016/j.crte.2014.10.004>.
- [3] V.C. Sanchez, A. Jachak, R.H. Hurt, A.B. Kane, Biological Interactions of Graphene-family Nanomaterials: an Interdisciplinary Review, 2012, pp. 15–34, <http://dx.doi.org/10.1021/tx200339h>.
- [4] N.K. Mahanta, A.R. Abramson, Thermal conductivity of graphene and graphene oxide nanoplatelets, 13th Intersoc. Conf. Therm. Thermomechanical Phenom. Electron. Syst. (2012) 1–6, <http://dx.doi.org/10.1109/ITHERM.2012.6231405>.
- [5] K.S. Novoselov, A.K. Geim, S.V. Morozov, D. Jiang, M.I. Katsnelson, I.V. Grigorieva, et al., Two-dimensional gas massless Dirac fermions graphene 438 (2005) 197–200, <http://dx.doi.org/10.1038/nature04233>.
- [6] J.H. Seol, I. Jo, A.L. Moore, L. Lindsay, Z.H. Aitken, M.T. Pettes, et al., Two-dimensional phonon transport in supported graphene, *Sci.* (80) 328 (2010)



- 213–216, <http://dx.doi.org/10.1126/science.1184014>.
- [7] D.A.C. Brownson, D.K. Kampouris, C.F. Banks, An overview of graphene in energy production and storage applications, *J. Power Sources* 196 (2011) 4873–4885, <http://dx.doi.org/10.1002/j9783527665105.ch5>.
- [8] Z. Wu, W. Ren, L. Wen, L. Gao, J. Zhao, Z. Chen, et al., in: *Graphene Anchored with Co 3 O 4 Batteries with Enhanced Reversible*, vol. 4, 2010, pp. 3187–3194, <http://dx.doi.org/10.1021/nn100740x>.
- [9] C. Chung, Y.K. Kim, D. Shin, S.R. Ryoo, B.H. Hong, D.H. Min, Biomedical applications of graphene and graphene oxide, *Acc. Chem. Res.* 46 (2013) 2211–2224, <http://dx.doi.org/10.1021/ar300159f>.
- [10] L. Feng, Z. Liu, Graphene in biomedicine: opportunities and challenges, *Nanomedicine (Lond)* 6 (2011) 317–324, <http://dx.doi.org/10.2217/nnm.10.158>.
- [11] X. Hu, Q. Zhou, Health and ecosystem risks of graphene, *Chem. Rev.* 113 (2013) 3815–3835, <http://dx.doi.org/10.1021/cr300045n>.
- [12] A. Nel, T. Xia, L. Mädler, N. Li, Toxic potential of materials at the nanolevel, *Sci.* (80) 311 (2006) 622–627, <http://dx.doi.org/10.1126/science.1114397>.
- [13] A. Mottier, F. Mouchet, C. Laplanche, S. Cadarsi, L. Lagier, J. Arnault, et al., Surface area of carbon nanoparticles: a dose metric for a more realistic ecotoxicological assessment, *Nano Lett.* 16 (2016) 3514–3518, <http://dx.doi.org/10.1021/acs.nanolett.6b00348>.
- [14] K. Savolainen, H. Alenius, H. Norppa, L. Pylkanen, T. Tuomi, G. Kasper, Risk assessment of engineered nanomaterials and nanotechnologies—a review, *Toxicology* 269 (2010) 92–104, <http://dx.doi.org/10.1016/j.tox.2010.01.013>.
- [15] R.H. Hurt, M. Monthieux, A. Kane, in: *Toxicology of Carbon Nanomaterials: Status, Trends, and Perspectives on the Special Issue*, vol. 44, 2006, pp. 1028–1033, <http://dx.doi.org/10.1016/j.carbon.2005.12.023>.
- [16] P. Begum, R. Ikhtiar, B. Fugetsu, Graphene phytotoxicity in the seedling stage of cabbage, tomato, red spinach, and lettuce, *Carbon N. Y.* 49 (2011) 3907–3919, <http://dx.doi.org/10.1016/j.carbon.2011.05.029>.
- [17] O. Akhavan, E. Ghaderi, Toxic. Graphene Graphene Oxide Nanowalls Against Bact. 4 (2010) 5731–5736, <http://dx.doi.org/10.1021/nn101390x>.
- [18] W. Hu, C. Peng, W. Luo, M. Lv, X. Li, D. Li, et al., Graphene-based antibacterial paper, *ACS Nano* 4 (2010) 4317–4323, <http://dx.doi.org/10.1021/nn101097v>.
- [19] O.N. Ruiz, K.A.S. Fernando, B. Wang, N.A. Brown, P.G. Luo, N.D. McNamara, et al., Graphene oxide: a nonspecific enhancer of cellular growth, *ACS Nano* 5 (2011) 8100–8107, <http://dx.doi.org/10.1021/nn202699t>.
- [20] C. Pretti, M. Oliva, Pietro R. Di, G. Monni, G. Cevasco, F. Chiellini, et al., Ecotoxicity of pristine graphene to marine organisms, *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 101 (2014) 138–145, <http://dx.doi.org/10.1016/j.ecoenv.2013.11.008>.
- [21] X. Guo, S. Dong, E.J. Petersen, S. Gao, Q. Huang, L. Mao, Biological uptake and depuration of radio-labeled graphene by *Daphnia magna*, *Environ. Sci. Technol.* 47 (2013) 12524–12531, <http://dx.doi.org/10.1021/es403230u>.
- [22] Y. Feng, K. Lu, L. Mao, X. Guo, S. Gao, E.J. Petersen, Degradation of 14C-labeled few layer graphene via Fenton reaction: reaction rates, characterization of reaction products, and potential ecological effects, *Water Res.* 84 (2015) 49–57, <http://dx.doi.org/10.1016/j.watres.2015.07.016>.
- [23] G. Gollavelli, Y.-C. Ling, Multi-functional graphene as an in vitro and in vivo imaging probe, *Biomaterials* 33 (2012) 2532–2545, <http://dx.doi.org/10.1016/j.biomaterials.2011.12.010>.
- [24] S. Scala, C. Bowler, Molecular insights into the novel aspects of diatom biology, *CMLS* 58 (2001) 1666–1673.
- [25] T. Debenest, J. Silvestre, M. Coste, E. Pinelli, Effects of pesticides on freshwater diatoms, *Rev. Environ. Contam. Toxicol.* 203 (2010) 87–104, <http://dx.doi.org/10.1007/978-1-4419-1352-4>.
- [26] P.F.M. Nogueira, D. Nakabayashi, V. Zucolotto, The effects of graphene oxide on green algae *Raphidocelis subcapitata*, *Aquat. Toxicol.* 166 (2015) 29–35, <http://dx.doi.org/10.1016/j.aquatox.2015.07.001>.
- [27] A.B. Seabra, A.J. Paula, R. De Lima, O.L. Alves, N. Durán, Nanotoxicity of graphene and graphene oxide, *Chem. Res. Toxicol.* (2014) 27, <http://dx.doi.org/10.1021/tx400385x>.
- [28] J. Zhao, Z. Wang, J.C. White, B. Xing, Graphene in the aquatic environment: adsorption, dispersion, toxicity and transformation, *Environ. Sci. Technol.* 48 (2014) 9995–10009, <http://dx.doi.org/10.1021/es5022679>.
- [29] Z. Wang, Y. Gao, S. Wang, H. Fang, D. Xu, F. Zhang, Impacts of low-molecular-weight organic acids on aquatic behavior of graphene nanoplatelets and their induced algal toxicity and antioxidant capacity, *Environ. Sci. Pollut. Res.* 23 (2016) 10938–10945, <http://dx.doi.org/10.1007/s11356-016-6290-4>.
- [30] P.G. Falkowski, J.A. Raven, *Aquatic Photosynthesis*, vol. Second edi, second ed., Princeton University Press, Princeton, 1997.
- [31] W. Smith, A Synopsis of the British Diatomaceae: with Remarks on Their Structure, Functions and Distribution, and Instructions for Collecting and Preserving Specimens. 2. Van Voorst, 1956.
- [32] C. Lancelot, S. Mathot, Biochemical fractionation of primary production by phytoplankton in Belgian coastal waters during short- and long-term incubations with 14C-bicarbonate, *Mar. Biol.* 86 (1985) 219–226, <http://dx.doi.org/10.1126/science.333.6043.686>.
- [33] L.J. Stal, Microphytobenthos, their extracellular polymeric substances, and the morphogenesis of intertidal sediments, *Geomicrobiol. J.* 20 (2003) 463–478, <http://dx.doi.org/10.1080/713851126>.
- [34] L.J. Stal, Brouwer J.F.C. De, Biofilm Form. by benthic diatoms their Influ. Stab. intertidal mudflats 12 (2003) 109–111.
- [35] L.R. Andrade, R.N. Leal, M. Nosedá, M.E.R. Duarte, M.S. Pereira, P.A.S. Mourão, et al., Brown algae overproduce cell wall polysaccharides as a protection mechanism against the heavy metal toxicity, *Mar. Pollut. Bull.* 60 (2010) 1482–1488, <http://dx.doi.org/10.1016/j.marpolbul.2010.05.004>.
- [36] L. Verneuil, J. Silvestre, F. Mouchet, E. Flahaut, J. Boutonnet, F. Bourdiol, et al., Multi-walled carbon nanotubes, natural organic matter, and the benthic diatom *Nitzschia palea*, A sticky story 5390 (2014) 1–11, <http://dx.doi.org/10.3109/17435390.2014.918202>.
- [37] E.J. Petersen, T.B. Henry, J. Zhao, R.I. MacCuspie, T.L. Kirschling, M.A. Dobrovolskaia, et al., Identification and avoidance of potential artifacts and misinterpretations in nanomaterial ecotoxicity measurements, *Environ. Sci. Technol.* 48 (2014) 4226–4246, <http://dx.doi.org/10.1021/es4052999>.
- [38] J.-B. Pouvreau, E. Housson, Tallec L. Le, M. Moranais, Y. Rince, J. Fleurence, et al., Growth inhibition of several marine diatom species induced by the shading effect and allelopathic activity of marennine, a blue-green polyphenolic pigment of the diatom *Haslea ostrearia* (Gaillon/Bory) Simonsen, *J. Exp. Mar. Bio. Ecol.* 352 (2007) 212–225, <http://dx.doi.org/10.1016/j.jembe.2007.07.011>.
- [39] S. Thakur, D.I. Cattoni, M. Nollmann, The fluorescence properties and binding mechanism of SYTOX green, a bright, low photo-damage DNA intercalating agent, *Eur. Biophys. J.* 44 (2015) 337–348, <http://dx.doi.org/10.1007/s00249-015-1027-8>.
- [40] B.L. Roth, M. Poot, S.T. Yue, P.J. Millard, Bacterial viability and antibiotic susceptibility testing with SYTOX green nucleic acid stain, *Bact. Viability Antibiotic Susceptibility Test. SYTOX Green Nucleic Acid Stain* 63 (1997) 2421–2431.
- [41] L.H. Armbrrecht, V. Smetacek, P. Assmy, C. Klaas, Cell death and aggregate formation in the giant diatom *Coscinodiscus wailesii* (Gran & Angst, 1931), *J. Exp. Mar. Bio. Ecol.* 452 (2014) 31–39, <http://dx.doi.org/10.1016/j.jembe.2013.12.004>.
- [42] L. Zhang, C. Lei, J. Chen, K. Yang, L. Zhu, D. Lin, Effect of natural and synthetic surface coatings on the toxicity of multiwalled carbon nanotubes toward green algae, *Carbon N. Y.* 83 (2015) 198–207, <http://dx.doi.org/10.1016/j.carbon.2014.11.050>.
- [43] S.L. Erlandsen, C.J. Kristich, G.M. Dunny, C.L. Wells, High-resolution visualization of the microbial glycocalyx with low-voltage scanning electron microscopy: dependence on cationic dyes, *J. Histochem. Cytochem.* 52 (2004) 1427–1435, <http://dx.doi.org/10.1369/jhc.4A6428.2004>.
- [44] M. Mathieu, J. Lefflaive, L. Ten-Hage, R. De Wit, E. Buffan-Dubau, Free-living nematodes affect oxygen turnover of artificial diatom biofilms, *Aquat. Microb. Ecol.* 49 (2007) 281–291, <http://dx.doi.org/10.3354/ame01150>.
- [45] R.S. Macedo, A.T. Lombardi, C.Y. Omachi, L.R. Rorig, Effects of the herbicide bentazon on growth and photosystem II maximum quantum yield of the marine diatom *Skeletonema costatum*, *Toxicol. Vitr.* 22 (2008) 716–722, <http://dx.doi.org/10.1016/j.tiv.2007.11.012>.
- [46] K. Yang, Y. Li, X. Tan, R. Peng, Z. Liu, Behavior and Toxicity of Graphene and its Functionalized Derivatives in Biological Systems, 2013, pp. 1492–1503, <http://dx.doi.org/10.1002/sml.201201417>.
- [47] S. Kang, M. Herzberg, D.F. Rodrigues, M. Elimelech, Antibacterial effects of carbon nanotubes: size does matter!, *Langmuir* 24 (2008) 6409–6413, <http://dx.doi.org/10.1021/la800951v>.
- [48] A. Simon-Deckers, S. Loo, M. Mayne-L’hermite, N. Herlin-Boime, N. Menguy, C. Reynaud, et al., Size-, composition- and shape-dependent toxicological impact of metal oxide nanoparticles and carbon nanotubes toward bacteria, *Env. Sci. Technol.* 43 (2009) 8423–8429, <http://dx.doi.org/10.1021/es9016975>.
- [49] H.L. Karlsson, P. Cronholm, J. Gustafsson, L. Möller, Copper oxide nanoparticles are highly toxic: a comparison between metal oxide nanoparticles and carbon nanotubes, *Chem. Res. Toxicol.* 21 (2008) 1726–1732, <http://dx.doi.org/10.1021/tx800064j>.
- [50] N. von Moos, V.I. Slaveykova, Oxidative stress induced by inorganic nanoparticles in bacteria and aquatic microalgae-state of the art and knowledge gaps, *Nanotoxicology* 8 (2013) 1–26, <http://dx.doi.org/10.3109/17435390.2013.809810>.
- [51] A.A. Shvedova, A. Pietriusti, F. Bengt, V.E. Kagan, Mech. carbon nanotube-induced Toxic. Focus oxidative stress 261 (2012) 121–133, <http://dx.doi.org/10.1038/nbt.3121.ChIP-nexus>.
- [52] N. Li, T. Xia, A. Nel, The role of oxidative stress in ambient particulate matter-induced lung diseases and its implications in the toxicity of engineered nanoparticles, *Free Radic. Biol. Med.* 44 (2008) 1689–1699, <http://dx.doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2008.01.028.The>.
- [53] J.-P. Tessonnier, D.S. Su, Recent progress on the growth mechanism of carbon nanotubes: a review, *ChemSusChem* 4 (2011) 824–847, <http://dx.doi.org/10.1002/cssc.201100175>.
- [54] L. Guo, A. Von Dem Bussche, M. Buechner, A. Yan, A.B. Kane, R. Hurt, Adsorption of essential micronutrients by carbon nanotubes and the implications for nanotoxicity testing, *NIH* 4 (2012) 721–727, <http://dx.doi.org/10.1016/j.pestbp.2011.02.012.Investigations>.
- [55] J.F.C. de Brouwer, K. Wolfstein, G.K. Ruddy, T.E.R. Jones, L.J. Stal, Biogenic stabilization of intertidal sediments: the importance of extracellular polymeric substances produced by benthic diatoms, *Microb. Ecol.* 49 (2005) 501–512, <http://dx.doi.org/10.1007/s00248-004-0020-z>.
- [56] H.C. Flemming, J. Wingender, Relevance of microbial extracellular polymeric substances (EPS)—Part I: structural and ecological aspects, *Water sci. technol. J. Int. asso.c water pollut. res.* 43 (2001) 1–8.
- [57] Z. Long, J. Ji, K. Yang, D. Lin, F. Wu, Systematic and quantitative investigation of the mechanism of carbon nanotubes’ toxicity toward algae, *Environ. Sci. Technol.* 46 (2012) 8458–8466, <http://dx.doi.org/10.1021/es301802g>.

- [58] F. Schwab, T.D. Bucheli, L.P. Lukhele, A. Magrez, B. Nowack, L. Sigg, et al., Are Carbon Nanotube Effects on Green Algae Caused by Shading and Agglomeration?, 2011, pp. 6136–6144, <http://dx.doi.org/10.1021/es200506b>.
- [59] H.D. Nielsen, L.S. Berry, V. Stone, T.R. Burrige, T.F. Fernandes, Interactions between carbon black nanoparticles and the brown algae *Fucus serratus*: inhibition of fertilization and zygotic development, *Nanotoxicology* 2 (2008) 88–97.
- [60] K. van Hoeckel, J.T.K. Quik, J. Mankiewicz-Boczek, K. a C. De Schampelaere, A. Elsaesser, P. van Der Meeren, et al., Fate and effects of CeO<sub>2</sub> nanoparticles in aquatic ecotoxicity tests, *Environ. Sci. Technol.* 43 (2009) 4537–4546, <http://dx.doi.org/10.1021/es900244a>.
- [61] V. Aruoja, H.C. Dubourguier, K. Kasemets, A. Kahru, Toxicity of nanoparticles of CuO, ZnO and TiO<sub>2</sub> to microalgae *Pseudokirchneriella subcapitata*, *Sci. Total Environ.* 407 (2009) 1461–1468, <http://dx.doi.org/10.1016/j.scitotenv.2008.10.053>.
- [62] S. Tsunekawa, T. Fukuda, A. Kasuya, Blue shift in ultraviolet absorption spectra of monodisperse CeO<sub>2</sub> nanoparticles, *J. Appl. Phys.* 87 (2000) 1318–1321, <http://dx.doi.org/10.1063/1.372016>.
- [63] K. Hund-rinke, M. Simon, Ecotoxic effect of photocatalytic active nanoparticles (TiO<sub>2</sub>) on algae and daphnids, *Env. Sci. Pollut. Res.* 2006 (2006) 1–8.
- [64] J. Ji, Z. Long, D. Lin, Toxicity of oxide nanoparticles to the green algae *Chlorella* sp., *Chem. Eng. J.* 170 (2011) 525–530, <http://dx.doi.org/10.1016/j.cej.2010.11.026>.
- [65] Y.-H. Tsuang, J.-S. Sun, Y.-C. Huang, C.-H. Lu, W.H.-S. Chang, C.-C. Wang, Studies of photokilling of bacteria using titanium dioxide nanoparticles, *Artif. Organs* 32 (2008) 167–174, <http://dx.doi.org/10.1111/j.1525-1594.2007.00530.x>.
- [66] A. Bour, F. Mouchet, J. Silvestre, L. Gauthier, E. Pinelli, Environmentally relevant approaches to assess nanoparticles ecotoxicity: a review, *J. Hazard Mater* 283 (2015) 764–777, <http://dx.doi.org/10.1016/j.jhazmat.2014.10.021>.
- [67] E. Navarro, A. Baun, R. Behra, N.B. Hartmann, J. Filser, A.-J. Miao, et al., Environmental behavior and ecotoxicity of engineered nanoparticles to algae, plants, and fungi, *Ecotoxicology* 17 (2008) 372–386, <http://dx.doi.org/10.1007/s10646-008-0214-0>.
- [68] R. Raliya, J.C. Tarafdar, ZnO nanoparticle biosynthesis and its effect on phosphorous-mobilizing enzyme secretion and gum contents in clusterbean (*Cyamopsis tetragonoloba* L.), *Agric. Res.* 2 (2013) 48–57, <http://dx.doi.org/10.1007/s40003-012-0049-z>.
- [69] G. Hofmann, in: Gabriele Hofmann, Horst Lange-Bertalot, Marcus Werum (Eds.), *Diatomeen im Süßwasser-Benthos von Mitteleuropa: Bestimmungsflora Kieselalgen für die ökologische Praxis: über 700 der häufigsten Arten und ihre Ökologie*/Horst Lange-Bertalot, Königstein: Koeltz Scientific Books, 2013.
- [70] A. Miao, K.A. Schwehr, C. Xu, S. Zhang, Z. Luo, A. Quigg, et al., The algal toxicity of silver engineered nanoparticles and detoxification by exopolymeric substances, *Environ. Pollut.* 157 (2009) 3034–3041, <http://dx.doi.org/10.1016/j.envpol.2009.05.047>.
- [71] N. Joshi, B.T. Ngwenya, C.E. French, Enhanced resistance to nanoparticle toxicity is conferred by overproduction of extracellular polymeric substances, *J. Hazard Mater* 241–242 (2012) 363–370, <http://dx.doi.org/10.1016/j.jhazmat.2012.09.057>.
- [72] T.A. Davis, B. Volesky, A. Mucci, A review of the biochemistry of heavy metal biosorption by brown algae, *Water Res.* 37 (2003) 4311–4330, [http://dx.doi.org/10.1016/S0043-1354\(03\)00293-8](http://dx.doi.org/10.1016/S0043-1354(03)00293-8).
- [73] L. Verneuil, J. Silvestre, I. Randrianjatovo, C.-E. Maracato-romain, E. Girbal-Neuhauser, F. Mouchet, et al., Double walled carbon nanotubes promote the overproduction of extracellular protein-like polymers in *Nitzschia palea*: an adhesive response for an adaptive issue, *Carbon N. Y.* (2015) 88, <http://dx.doi.org/10.1016/j.carbon.2015.02.053>.
- [74] J. Wang, K.W. Bayles, Programmed cell death in plants: lessons from bacteria? *Trends Plant Sci.* 18 (2013) 133–139, <http://dx.doi.org/10.1016/j.tplants.2012.09.004>.
- [75] L. Tang, A. Schramm, T.R. Neu, N.P. Revsbech, R.L. Meyer, Extracellular DNA in adhesion and biofilm formation of four environmental isolates: a quantitative study, *FEMS Microbiol. Ecol.* 86 (2013) 394–403, <http://dx.doi.org/10.1111/1574-6941.12168>.

## Chapitre 4

Etude des fonctions biologiques  
impliquées dans la réponse de  
*N. palea* face à différentes formes  
allotropiques du carbone

## 1 Contexte

Le chapitre précédent mettait en évidence l'impact d'une exposition à de forte concentration en FLG se répercutant sur la croissance ainsi que sur l'activité photosynthétique de *N. palea*. Une différence de réponse entre une exposition directe et indirecte (correspondant à l'ombrage généré par le FLG) a pu être constatée. Une étude antérieure a également montré les mêmes effets sur la croissance, mais sans impact sur la viabilité cellulaire de *N. palea* exposée à l'effet total des MWCNTs (Verneuil et al., 2014). De plus, aucun effet d'ombrage sur la croissance, ni d'impact sur l'activité photosynthétique n'avaient été décelés. Par ailleurs, les DWCNTs semblent avoir un impact supérieur sur les diatomées que les MWCNTs (Verneuil, 2015). Ainsi, afin de mieux comprendre les mécanismes mis en jeu, une approche transcriptomique évaluant la réponse de *N. palea* exposée à la fois au FLG, en contact direct et en ombrage, mais également aux DWCNTs a été utilisée. Les études présentées dans ce chapitre permettent ainsi de mettre en évidence les différents mécanismes de toxicité du FLG entre une exposition directe et indirecte, et de comparer les processus biologiques impliqués dans la réponse au FLG et aux DWCNTs à faible concentration, sans effets sur la croissance et fortes concentrations, inhibant la croissance des diatomées.

Cependant, la procédure d'extraction d'ARN a demandé une importante mise au point préalable. En effet, la présence d'un frustule, protégeant le contenu cellulaire des diatomées, représente un véritable obstacle lors de l'extraction du matériel génétique. Les NPCs, particulièrement les nanotubes de carbone, pouvant interagir physiquement avec les acides nucléiques, le protocole d'extraction d'ARN a dû être adapté afin de pouvoir séparer les acides nucléiques des NPCs. La première partie de ce chapitre présente alors l'ensemble des tests effectués et les difficultés rencontrées, avant d'avoir élaboré le protocole final. La suite du chapitre est divisée en deux parties : la première concernant l'étude de la réponse transcriptomique suite à une exposition au FLG, suivie d'une présentation des résultats obtenus en présence de DWCNTs.

## 2 Développement d'une méthode d'extraction d'ARN d'une diatomée en présence de NPCs

### 2.1 Les critères à respecter

L'étude des processus biologiques induits lors de la réponse de *N. palea* aux NPCs passe par un séquençage ARN *de novo* de haute résolution (Illumina Next Generation) réalisé par la

plateforme GATC Biotech (Constance, Allemagne). Afin d'assurer la qualité nécessaire pour le séquençage, les échantillons doivent remplir certains critères de quantité et une qualité suffisante. Une fois sur la plateforme, les échantillons subissent un deuxième contrôle qualité avant la préparation de la librairie d'ADNc. Au moment de la mise en œuvre de ces expérimentations, les échantillons devaient contenir un minimum de 1µg d'ARN total (ce taux a évolué en raison d'avancées techniques concomitantes à cette thèse, fixé aujourd'hui à 150 ng d'ARN total). L'estimation de la quantité d'ARN extrait était réalisée par des mesures d'absorbance au Nanodrop, pour ensuite être affinée grâce à la réalisation de microgel d'électrophorèse sur des puces Agilent (BioRad Experion) estimant la concentration en acides nucléiques dans les échantillons en ng/µL.

La qualité des échantillons, en terme de présence de contaminants, peut également être déterminée au Nanodrop grâce au ratio entre les absorbances mesurées à 230, 260 et 280 nm. Les acides nucléiques purs se caractérisant par un ratio d'absorbance 260/280 de 2, et les protéines absorbant fortement à 280 nm, le ratio 260/280 permet de déterminer la contamination des échantillons d'ARN par les protéines. La plupart des solvants utilisés pour l'extraction des acides nucléiques absorbant à 230 nm, le ratio 260/230 indique la contamination des échantillons par des résidus de solvants provenant des tampons d'extraction. Lorsque le ratio 260/280 est compris entre 1,8 et 2 et le ratio 260/230 entre 2 et 2,2, la pureté des échantillons en acides nucléiques est acceptable. Cependant, ces mesures manquent parfois de précision.

Pour évaluer la qualité des échantillons en terme d'intégrité des ARN, deux autres indicateurs résultant de l'analyse par microgel d'électrophorèse sur des puces Agilent (BioRad Experion) ont été pris en compte. Cette analyse a permis d'obtenir l'intensité des bandes d'acides nucléiques détectées, notamment les bandes correspondant aux ARN ribosomaux des sous-unités 28S et 18S présentes chez tous les eucaryotes. Le ratio entre l'intensité de fluorescence de ces deux fragments est un indicateur du statut de dégradation de l'ARN analysé. Si ce ratio est au-dessus de 0,8, l'intégrité de l'ARN testé est acceptable. Un nouvel indicateur se basant sur l'intensité des fragments 28S et 18S doit également être pris en compte : le RIN pour RNA Integrity Number<sup>10</sup>. Compris entre 4 et 6, il indique une qualité moyennement

---

<sup>10</sup> Le calcul de cette valeur est obtenu par un algorithme comparant l'électropherogramme des échantillons testés avec des séries de données standardisées.

acceptable, mais entre 7 et 10 le RIN indique une qualité parfaitement acceptable. Cette analyse par électrophorèse permet de plus une deuxième mesure de la concentration en ARN.

## 2.2 Optimisation de protocoles d'extraction d'ARN connus en présence de NPCs

Le premier obstacle à l'extraction d'ARN chez *N. palea* était d'assurer une lyse efficace des cellules, et donc du frustule, pour avoir accès au matériel génétique tout en évitant les dégradations de ce dernier. En parallèle à cette problématique, le choix de la méthodologie a également été abordé en testant celle proposée par un kit commercial ou la méthode très connue au phénol chloroforme. Plusieurs protocoles de lyse basés sur ces deux options ont été testés sur des échantillons de diatomées, dans un premier temps en absence de NPCs. Par la suite, des modifications ont dû être apportées afin d'améliorer la qualité des extraits en présence de NPCs.

### 2.2.1 Lyse des diatomées en absence de NPCs

Plusieurs conditions de lyse cellulaire ont été testées, suivies d'une purification soit par le kit RNeasy Plant Mini Kit (QIAGEN), soit par la méthode au phénol chloroforme. Les conditions testées font appel à une lyse mécanique, chimique ou une combinaison des deux. Cinq conditions ont été expérimentées sur des échantillons en absence de NPCs :

- Une lyse mécanique à l'aide d'un broyage à l'azote liquide, au pilon et mortier
- Deux méthodes de lyse chimique à l'aide de Trizol, différant par leur température (ambiante ou à 65°C pendant 5 min). En effet, le tampon de lyse proposé dans le kit commercial est adapté pour les plantes, dont les parois cellulaires sont bien plus faciles à lyser qu'un frustule de diatomée. Le choix du tampon d'extraction s'est donc porté sur le Trizol, réactif à base de phénol, précédemment utilisé à température ambiante sur diatomées (Moisset et al., 2015). Meng & Feldman (2010) ont démontré une augmentation de la quantité, sans altération de qualité, en chauffant le Trizol à 95°C. Afin d'éviter toute dégradation d'ARN, une température de chauffage un peu plus faible a donc été fixée à 65°C.
- Deux protocoles de lyse alliant à la fois une méthode chimique et mécanique. En plus d'un traitement au Trizol, de 5 min à température ambiante, un broyage aux billes de

silice (diamètre 0,1 mm) a été ajouté en utilisant soit un vortex (5 min à vitesse maximum) soit un homogénéiseur à haute vitesse (FastPrep, 6x20sec à  $6,5\text{m}\cdot\text{s}^{-1}$ ).

Dans nos essais, le protocole d'extraction du kit QIAGEN a été adapté afin de pouvoir tester la lyse cellulaire au Trizol. Ainsi, cette étape de lyse cellulaire est toujours suivie d'une phase d'extraction au chloroforme avant de poursuivre avec l'étape correspondante du protocole proposé par le kit commercial.

En combinant les cinq conditions de lyse et les deux protocoles d'extraction, dix conditions au total ont été testées. Les résultats, concernant la quantité et la qualité des extraits d'ARN, obtenus au Nanodrop et sur puce Agilent (BioRad) sont présentés dans la Figure 26. Les résultats quantitatifs sont exprimés en rendement, soit la quantité d'ARN normalisée par le poids frais du culot cellulaire. Les microgels sont présentés dans la Figure 27. Les quantités extraites avec le protocole du kit QIAGEN sont similaires à celles obtenues avec la méthode phénol chloroforme affichant les mêmes tendances pour chacune des conditions de lyse cellulaires testée (Figure 26a et Figure 26b). Ces premiers résultats permettent de constater que le broyage à l'azote seul ne donne pas de résultats satisfaisants ( $176\pm 100$  ng d'ARN/mg de poids frais) en comparaison aux autres méthodes de lyse (entre  $240\pm 50,7$  et  $674,4\pm 153,8$  ng d'ARN/mg de poids frais). C'est pour cette raison que la qualité sur puce Agilent des échantillons correspondants à cette condition n'a pas été évaluée. De même, les séries d'extraction par la méthode phénol chloroforme étant réalisées en dernier lieu, cette condition a été supprimée.

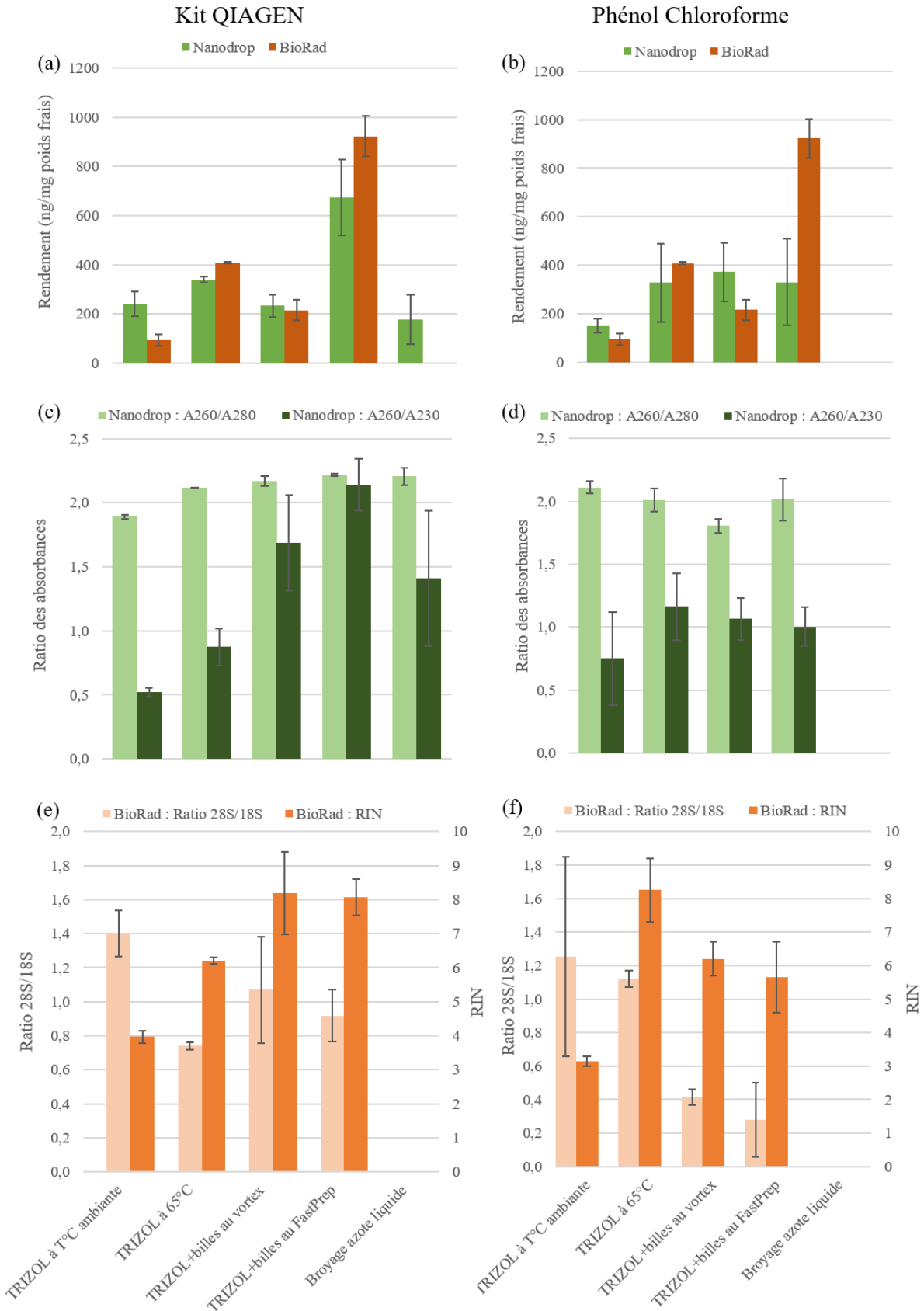


Figure 26. Résultats des extractions d'ARN pour chacune des méthodes de lyse testées. Les quantités d'ARN (a) et la qualité déterminée à la fois au Nanodrop (c) et au BioRad (e) sont décrites pour les extraits obtenus à partir du protocole du kit QIAGEN. Les mêmes caractéristiques sont présentées pour la méthode d'extraction au phénol chloroforme (b), (d) et (f).



Pour chacune des conditions de lyse testées, les extraits d'ARN obtenus semblent être de moins bonne qualité lors de l'application de la méthode au phénol chloroforme (Figure 26d et Figure 26f). En effet, le ratio 260/230 reste toujours inférieur à 1,5 indépendamment des conditions de lyse, et les ratios 28S/18S (entre  $0,3 \pm 0,2$  et  $1,3 \pm 0,6$ ) ainsi que les RIN (entre  $3,1 \pm 0,1$  et  $6,2 \pm 0,5$ ) ne respectent pas les critères qualités demandés, excepté les échantillons obtenus à partir d'un traitement au Trizol chauffé à  $65^{\circ}\text{C}$  ( $28\text{S}/18\text{S}=1,1 \pm 0$  et  $\text{RIN}=8,2 \pm 0,9$ ). De plus, les numérisations des microgels réalisés sur puce Agilent indiquent de larges bandes similaires à des *smears* générant des fragments de moins de 200 nucléotides pour toutes les conditions de lyse testées, excepté pour un des deux réplicas de la condition au Trizol chauffé à  $65^{\circ}\text{C}$  et avec un broyage au Fastprep (Figure 27b). De manière générale, la méthode au phénol chloroforme ne permet pas d'obtenir des extraits d'assez bonne qualité pour pouvoir réaliser un séquençage *de novo* par la suite.

La qualité des échantillons évaluées au Nanodrop et sur puce Agilent indiquent de manière générale un meilleur niveau de pureté et une intégrité plus acceptable des ARNs extraits avec le kit QIAGEN (Figure 26c et Figure 26e). Les quantités extraites sont variables en fonction des méthodes de lyse appliquées (entre  $240 \pm 50,7$  et  $674,4 \pm 153,8$  ng d'ARN/mg de poids frais). Les ARNs extraits grâce à un traitement au Trizol à température ambiante présentent une mauvaise qualité avec un ratio 260/230 inférieur à 0,6 et un RIN de  $4 \pm 0,2$ . Une large bande similaire à un *smear* est observée assez tôt dans la migration de ces échantillons générant un grand nombre de fragment de moins de 200 nucléotides (Figure 27b). Malgré une quantité plus importante, les extraits obtenus avec une lyse au Trizol chauffé à  $65^{\circ}\text{C}$  semblent être de très moyenne qualité avec un ratio 260/230 de  $0,9 \pm 0,1$ , un RIN inférieur à 6,5 et un ratio 28S/18S de  $0,7 \pm 0$ . Des *smears* sont également observés sur les migrations de ces échantillons de même que pour les extraits obtenus grâce à un broyage au vortex. Cependant, les ratios d'absorbance estimés au Nanodrop ( $2,2 \pm 0$  et  $1,7 \pm 0,4$  pour les ratios 260/280 et 260/230, respectivement) et les analyses sur puce Agilent ( $\text{RIN}=8,2 \pm 0,5$  et ratio  $28\text{S}/18\text{S}=1,1 \pm 0,3$ ) indiquent une qualité proche d'être acceptable.

La méthode de lyse cellulaire permettant d'extraire la plus grande quantité d'ARN est clairement identifiable : un traitement au Trizol combiné à un broyage à billes au Fastprep semble très efficace ( $674,4 \pm 153,8$  ng d'ARN/mg de poids frais). D'après les ratios indiqués par le Nanodrop ( $2,2$  et  $2,1 \pm 0,2$  pour les ratios 260/280 et 260/230, respectivement) et le RIN ( $8 \pm 0,5$ ) calculé à partir de la migration sur gel des extraits, la qualité des extraits obtenus à partir de cette méthode de lyse suivie du protocole du kit QIAGEN respecte les critères

demandés. Seul le ratio 28S/18S reste moyennement acceptable et pourrait être amélioré davantage. La migration de ces extraits sur microgel révèle des bandes nettes avec une coloration intense indiquant une bonne qualité et intégrité des ARNs obtenus. La technique de lyse conservée est donc celle au Trizol combinée avec un broyage à billes au FastPrep, et le protocole d'extraction retenu est celui proposé par le kit QIAGEN.

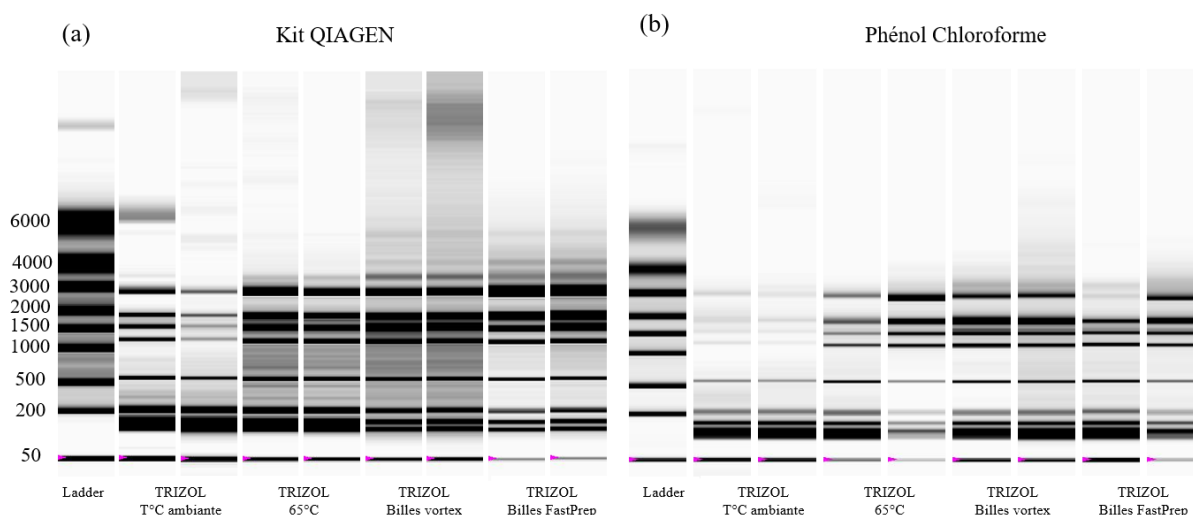


Figure 27. Microgel réalisés sur puce Agilent des ARN extraits dans chacune des conditions de lyse cellulaire suivie (a) du protocole du kit QIAGEN ou (b) de la méthode au phénol chloroforme.

### 2.2.2 Limiter l'interaction avec les NPCs

Les NPCs sont connues pour avoir de fortes interactions avec les molécules organiques et notamment avec les acides nucléiques (Mu et al., 2014; Sargent et al., 2012). Cette propriété est exploitée en nanomédecine où les nanotubes de carbones sont utilisés pour délivrer des molécules thérapeutiques, notamment des protéines et des acides nucléiques (Bianco et al., 2005).

Avant de réaliser une modification sur le protocole choisi, une première série d'extraction d'ARN de *N. palea* en présence de NPCs a été réalisée. Seules les plus fortes concentrations ( $50 \text{ mg.L}^{-1}$ ), induisant une inhibition significative de la croissance (Garacci et al., 2017; Verneuil et al., 2014), ont été testées sur des biofilms de 24 et 144h. Les NPCs ont été ajoutés au dernier moment avant l'extraction d'ARN. Cette approche permet alors de s'affranchir des effets biologiques potentiels des NPCs et de se concentrer sur les interférences dues aux NPCs spécifiquement durant l'extraction d'ARN. La Figure 28 montre la quantité et la qualité

estimées au Nanodrop. Les quantités d'ARN extraites en absence et en présence de FLG sont à peu près équivalentes, allant de 5,2 (144h) à 18,7  $\mu\text{g}$  d'ARN (24h) pour la condition témoin et de 3,6 à 23,5  $\mu\text{g}$  d'ARN (24h) pour les diatomées exposées au FLG. Cependant la présence des DWCNTs semblent fortement impacter l'extraction d'ARN avec une quantité obtenue inférieure à 7  $\mu\text{g}$  d'ARN. Ces premiers résultats démontrent une plus forte interaction entre les ARNs et les DWCNTs qu'avec le FLG, entraînant un piégeage des ARNs à la surface des DWCNTs responsable de la faible quantité récupérée. L'analyse qualitative des extraits obtenus en présence de FLG révèle un ratio 260/280 compris entre 1,6 (144h) et 2,3 (24h) (2,1 et 2,3 à 144h pour la condition témoin) indiquant l'absence de contamination protéique, tandis que le ratio 260/230 des échantillons à 144h est trop faible ( $1,2 \pm 0,5$ ) suggérant une contamination par des solvants utilisés lors de l'extraction. Ce constat est également fait pour la condition témoin à 144h où le ratio 260/230 est de  $1,8 \pm 0,5$ . Concernant les extraits en présence de DWCNTs, la pureté estimée est très moyenne avec un ratio 260/280 inférieure à 2 pour les biofilms de 144h. Quel que soit la NPC testée, les ARNs extraits ne présentent pas une pureté suffisante pour assurer la qualité du séquençage par la suite. Ainsi des améliorations doivent être apportées à la fois pour diminuer l'interaction ARN-DWCNTs et permettre la récupération des ARNs, mais également pour correctement éliminer les solvants d'extraction dans l'éluât final.

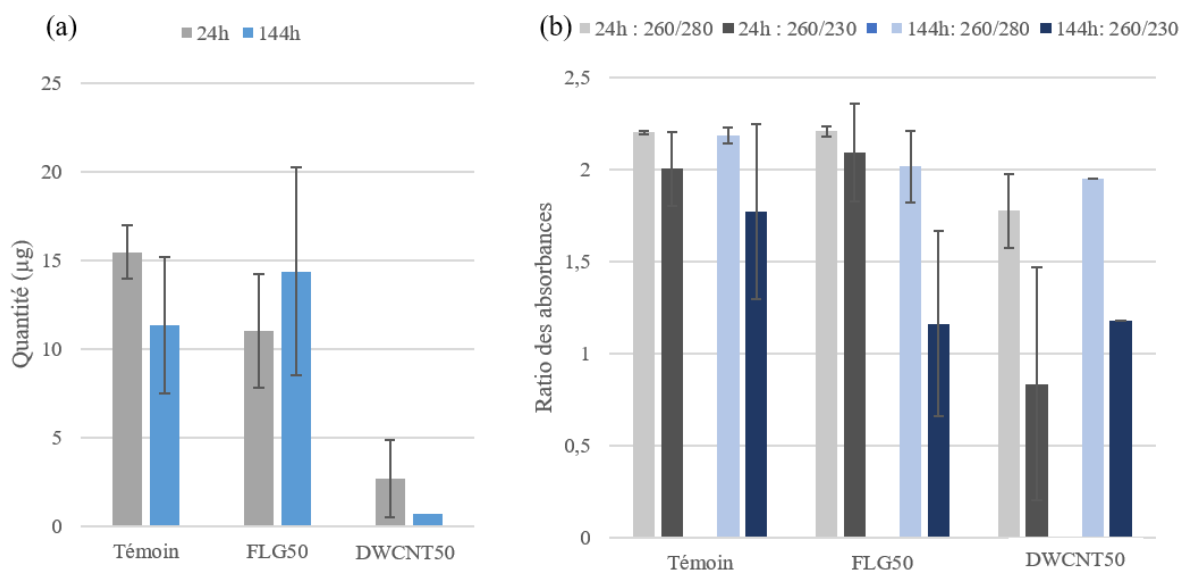


Figure 28. Résultats des extractions d'ARN réalisées en absence et en présence de NPCs à  $50 \text{ mg.L}^{-1}$ . Les quantités (a) et la pureté (b) des échantillons est représentée pour les condition témoins et les diatomées exposées aux FLGs et aux CNTs.

Les traitements thermiques sont connus pour entraîner une modification de la structure de l'ADN en induisant la rupture des liaisons hydrogènes entre les bases azotées séparant ainsi les deux brins d'ADN. La liaison entre les acides nucléiques et les NPCs peut être de nature électrostatique *via* des liaisons de Van Der Waals mais des liaisons hydrogènes, peuvent également se former entre les bases azotées des monobrins d'ARN et les atomes de carbone des NPCs. Nous pouvons alors supposer que l'application d'un traitement thermique lors de l'extraction d'ARN permettra de dénaturer les interactions existantes avec les NPCs. Ceci permettrait alors de libérer les brins d'ARN qui ne seront plus éliminés avec les NPCs, augmentant ainsi le rendement de l'extraction. Sur la base de la littérature, trois températures d'extraction ont été testées : 56°C (Chomczynski and Sacchi, 2006), 95°C (Pinto et al., 2009) et 70°C pour avoir une température intermédiaire. Les premières séries d'extraction ont été réalisées sur des biofilms de 24h en présence de FLG à 50 mg.L<sup>-1</sup>. Les conditions avec traitement thermique sont alors comparées avec une condition sans traitement thermique toujours en présence de FLG (Non chauffé). Suite à cela certaines conditions ont pu être éliminées lors des essais en présence de CNTs, qui sont comparées aux extractions réalisées en présence de FLG. Ainsi la condition sans traitement thermique en présence de CNTs n'a pas été appliquée. Par ailleurs, les faibles quantités extraites en présence de CNTs à 50 mg.L<sup>-1</sup>, nous ont poussé à choisir une concentration moins élevée afin d'optimiser le rendement de l'extraction. Ainsi la nouvelle forte concentration des CNTs choisie pour le reste des expérimentations de ces travaux de thèse est de 10 mg.L<sup>-1</sup>. Les résultats des analyses quantitatives et qualitatives réalisées au Nanodrop et sur puce Agilent sont présentés dans la Figure 29.

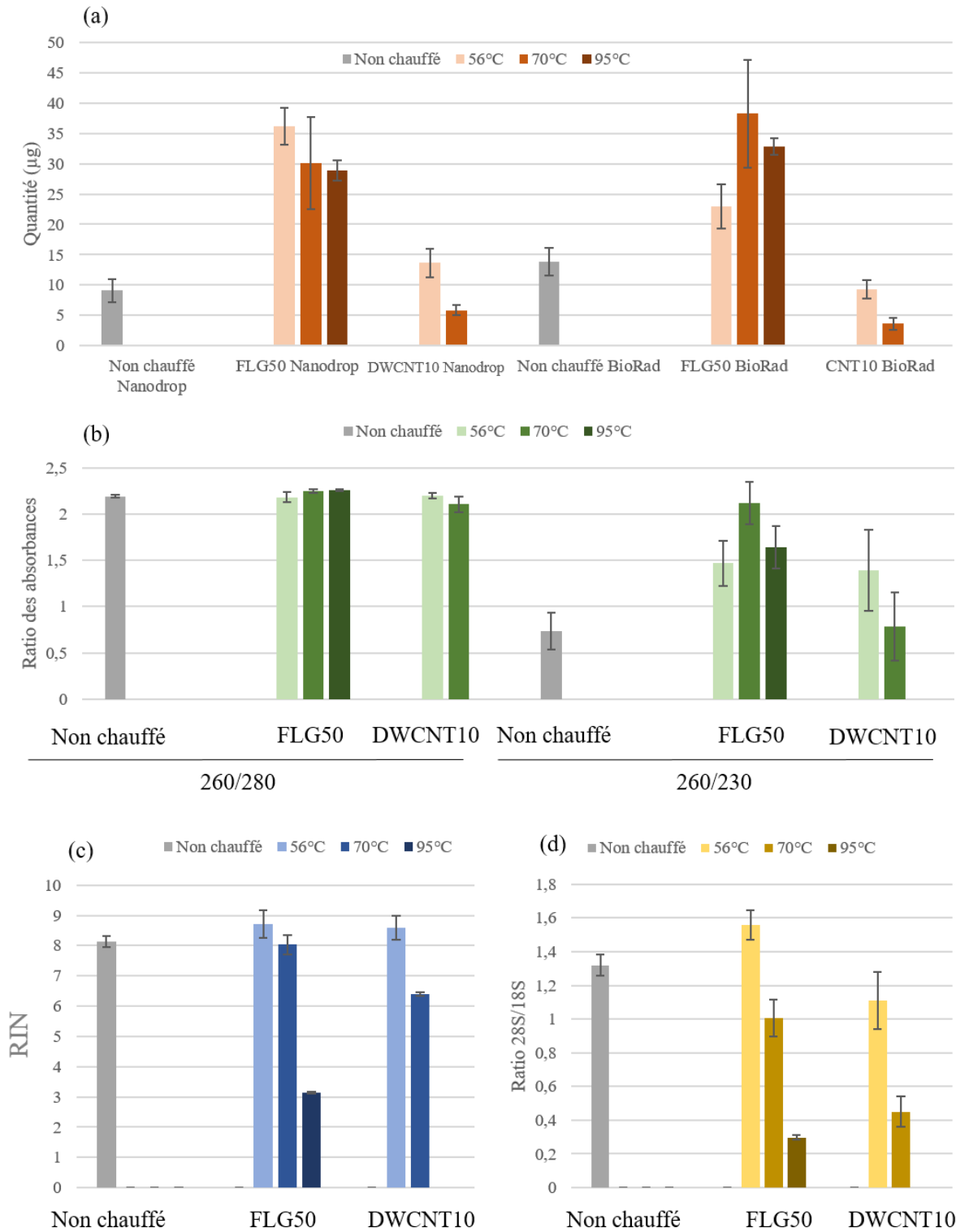


Figure 29. Influence d'un traitement thermique lors de l'extraction d'ARN en présence de NPCs sur la quantité d'ARN extrait (a), la pureté estimée au Nanodrop (b) et l'intégrité des ARNs (c et d).

L'ajout d'un traitement thermique au protocole d'extraction d'ARN en présence de FLG permet d'obtenir une quantité d'ARN plus importante (entre  $9 \pm 1,9 \mu\text{g}$  et  $13,8 \pm 2,2 \mu\text{g}$  pour la condition Non chauffé et entre  $23 \pm 3,6$  et  $38,3 \pm 8,9$  avec un traitement thermique). Cependant, l'élévation de la température entraîne une diminution de la quantité d'ARN estimée au Nanodrop avec  $36,2 \pm 3 \mu\text{g}$  d'ARN à  $56^\circ\text{C}$ ,  $30,1 \pm 7,6$  à  $70^\circ\text{C}$  et  $28,9 \pm 1,6$  à  $95^\circ\text{C}$  (Figure 29a). Cette tendance est également observée par les estimations de la quantité déterminées sur puce Agilent, sauf pour le traitement à  $56^\circ\text{C}$  où la quantité d'ARN extraite est plus faible ( $23 \pm 3,6 \mu\text{g}$  d'ARN) (Figure 29b). Les analyses qualitatives évaluant l'intégrité des ARNs extraits à  $95^\circ\text{C}$  en présence de FLG montrent clairement une dégradation des ARNs obtenus avec un RIN inférieur à 3,5 (Figure 29c). Les microgels de migration réalisés sur puce Agilent montrent un *smear* visible tout au long de la migration pour les échantillons traités à  $95^\circ\text{C}$  (Figure 30). C'est pour cette raison que cette condition n'a pas été testée pour la deuxième série de tests en présence de DWCNTs à  $10 \text{ mg.L}^{-1}$ .

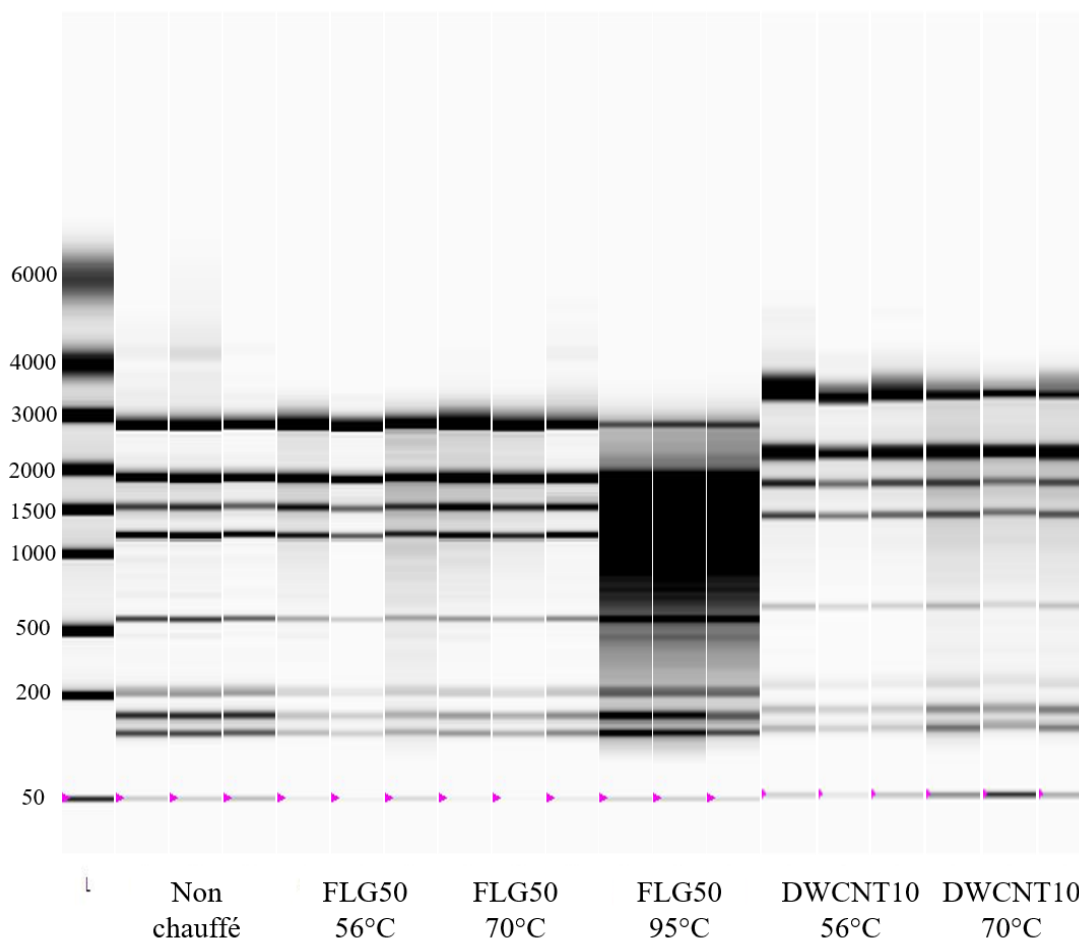


Figure 30. Intégrité des ARNs extraits en absence (Non chauffé) ou en présence de FLG à  $50 \text{ mg.L}^{-1}$  (FLG50) et de DWCNT à  $10 \text{ mg.L}^{-1}$  (DWCNT10) après avoir appliqué un traitement thermique à  $56^\circ\text{C}$ ,  $70^\circ\text{C}$  ou  $95^\circ\text{C}$ .

En présence de DWCNTs, la quantité d'ARN extraite reste toujours beaucoup plus faible que celle obtenue en présence de FLG quel que soit le traitement thermique (entre 1,7 et 11,3  $\mu\text{g}$  d'ARN). La plus faible température testée semble tout de même donner des résultats respectant les critères pour le séquençage avec une quantité supérieure à 5  $\mu\text{g}$  d'ARN. Malgré les faibles quantités extraites en présence de DWCNTs, la pureté des échantillons est acceptable, avec des ratios d'absorbance estimés au Nanodrop toujours supérieurs à 2 (Figure 29b). Le problème de contamination aux solvants utilisés lors de l'extraction persiste au vu des valeurs des ratios 260/230, oscillant entre  $1,4 \pm 0,4$  et  $1,5 \pm 0,2$  pour les extraits obtenus en présence de DWCNTs et de FLG à 56°C, même pour les extraits obtenus sans traitement thermique ( $260/230 < 1$ ). D'après les RIN et les ratio 28S/18S calculés, l'application d'un traitement à 70°C semble entraîner une légère diminution de l'intégrité des ARN extraits à la fois en présence de FLG et de DWCNTs (Figure 29c et d). Ces résultats sont confirmés par la migration de chacun de ces échantillons (Figure 30). Des smears, représentant un continuum de fragments d'ARN, apparaissent entre les bandes observées à 56°C et 70°C, indiquant une légère dégradation des ARN extraits à 70°C. L'ensemble de ces résultats permettent ainsi de démontrer que l'application d'un traitement thermique est efficace pour augmenter le rendement d'extraction d'ARN à partir d'échantillons en présence de DWCNTs. Cependant au-delà de 56°C, une dénaturation des ARNs commence à apparaître. L'application d'un traitement de 56°C lors de l'extraction d'ARN en présence de NPCs est alors conservée.

### 2.2.3 Amélioration de la qualité

Les essais précédents ont pu mettre en évidence la présence d'une contamination aux solvants, issus des tampons d'extraction utilisés. Pour améliorer la pureté des échantillons, une deuxième phase d'extraction au chloroforme successive est ajoutée au protocole précédemment choisi. Une étape supplémentaire consistant à appliquer un traitement DNase est également appliquée afin de s'assurer de l'absence d'ADN. Ces derniers essais, réalisés sur des biofilms de 48h, se sont focalisés uniquement sur les extractions en présence de DWCNTs à  $10 \text{ mg.L}^{-1}$ , par soucis d'économie du stock de FLGs préalablement préparés au CIRIMAT. L'intégrité des ARNs précédemment extraits étant vérifié, seuls les absorbances estimées au Nanodrop ont été mesurées afin d'évaluer les quantités d'ARN extraites et leur pureté (Figure 31). L'application des dernières modifications a alors permis d'améliorer la pureté des échantillons, extraits en présence de DWCNTs, à la fois en réduisant la présence d'ADN (ratio 260/280 > 2) mais également en diminuant la contamination aux solvants (ratio

260/230 > 2). Ainsi, l'ensemble des critères demandés pour le séquençage *de novo* en terme de quantité, de pureté et d'intégrité est respecté. Ces modifications sont alors conservées et permettent d'établir le protocole final d'extraction d'ARN qui permettra par la suite de séquencer le transcriptome des cultures de *N. palea* exposées aux NPCs.

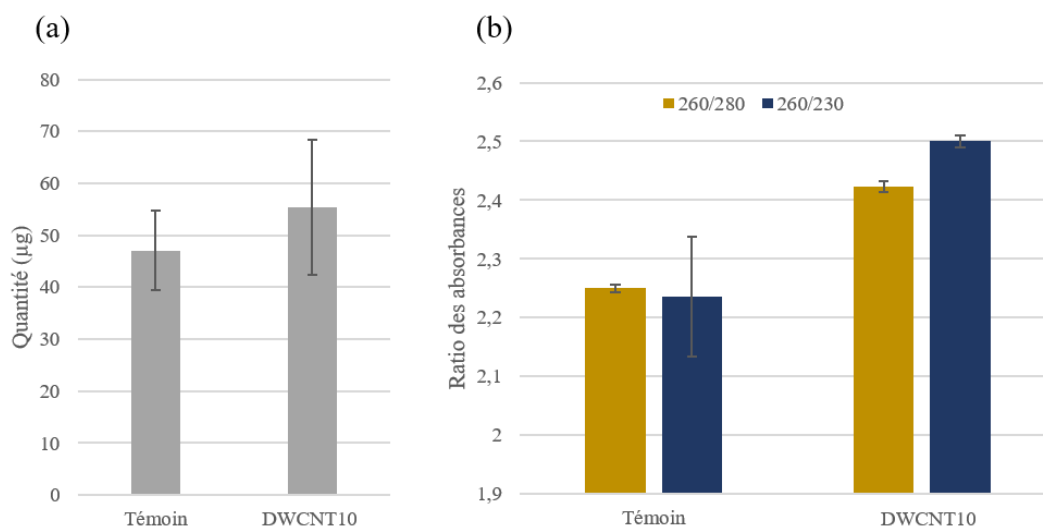


Figure 31. Résultats des extractions d'ARN en absence (Témoin) et en présence de CNT à 10mg.L (CNT10) concernant (a) la quantité en ARN et (b) la pureté des extraits.

### 3 Démarche des analyses bio-informatiques sur les données RNAseq

Une fois les expositions terminées et les extractions d'ARN réalisées, les échantillons sont envoyés à la plateforme GATC Biotech (Constance, Allemagne) pour un séquençage en « paired end »<sup>11</sup> générant des fragments de 150 pb en utilisant la technologie Illumina. Environ 30 millions de fragments d'ARN ont ainsi pu être séquencés et ont fait l'objet d'analyses bio-informatiques. L'ensemble des analyses bio-informatiques réalisées sont résumées dans la Figure 32. Pour chacune des conditions testées, les séquences brutes ont été nettoyées, afin d'éliminer les répétitions et les séquences de faible qualité comme les queues poly A, et assemblés pour former des transcriptomes grâce au pipeline De novo RNA-seq Assembly Pipeline (DRAP) (Cabau et al., 2017). Ce processus a été répété avec chacun des transcriptomes précédemment obtenus afin de générer un transcriptome le plus complet

<sup>11</sup> Un séquençage d'ARN ou d'ADN, peut se réaliser en construisant une banque d'ADN complémentaires (ADNc) dans le sens de lecture du brin codant de 3' vers 5' (single end) ou dans les deux sens de lecture du brin codant (paired end).



possible pour la diatomée *N. palea*. La génération préalable de transcriptomes pour chacune des conditions testées permet de considérer toutes ces conditions, où différentes réponses transcriptomiques sont attendues, avec le même poids dans cette analyse.

Après avoir généré un transcriptome complet, les fragments séquencés dans chacune des conditions ont été « mappés »<sup>12</sup> sur ce transcriptome en utilisant le logiciel Trinity Transcripts Quantification v2.4.0 (Haas et al., 2013). Cette étape permet alors de quantifier le nombre de fragment séquencés dans les différents transcrits identifiés afin de déterminer l'intensité de la réponse mais aussi la régulation d'un gène par comparaison avec une autre condition. En parallèle, une annotation fonctionnelle du transcriptome par homologie de séquence est réalisée grâce à l'utilisation du logiciel Blast2GO (Götz et al., 2008). Les séquences obtenues, automatiquement traduites en séquence protéiques grâce à l'outil Blastx, ont alors été confrontées à la base de données « nr » permettant d'identifier les séquences référencées homologues. Pour cette analyse le seuil d'homologie par défaut a été conservé éliminant ainsi toutes les séquences dont la e-value (valeur statistique représentative des similarités et du pourcentage de recouvrement de la séquence étudiée par une séquence référencée) est supérieure à  $1.10^{-3}$ . Cette analyse permet ainsi d'obtenir des informations sur la fonction des gènes exprimés. Ces informations se traduisent par une description de la protéine correspondante, c'est-à-dire le nom donné à la séquence de référence présentant le plus d'homologie avec la séquence étudiée. Parfois la séquence référencée la plus homologue ne présente pas de description car sa fonction reste encore inconnue générant alors des transcrits annotés « hypothetical protein » ou « predicted protein ». Cette analyse par homologie de séquence permet également d'obtenir des annotations définissant la fonction des gènes exprimés sur la base du Gene Ontology Consortium (GO). Ces annotations se divisent en trois catégories décrivant les fonctions des protéines putatives : le (ou les) compartiment(s) cellulaire(s) (CC), la (ou les) fonction(s) moléculaire(s) attribuée(s) (MF) ainsi que le (ou les) processus biologique(s) (BP) auxquelles elles participent. De cette manière, même sans description il est possible d'avoir des informations sur l'éventuelle fonction des gènes impliqués dans la réponse de *N. palea* face à différentes formes allotropiques du carbone.

L'annotation du transcriptome est suivie d'une analyse d'expression différentielle entre les différentes conditions testées et notamment par comparaison avec la condition témoin. Cette

---

<sup>12</sup> Le « mapping » des fragments d'ARN ou d'ADN consiste à positionner ces derniers sur une séquence de référence, génome ou transcriptome.

analyse statistique est réalisée sur le logiciel R (R Core Team, 2013) en utilisant le package “DESeq2” (Love et al., 2014). Sur la base du nombre de fragments séquencés dans les transcrits étudiés, les gènes avec une expression significativement différente entre deux conditions sont alors identifiés (DEGs). Les analyse bio-informatiques se poursuivent avec un enrichissement des annotations GO, réalisé grâce au package “topGO” (Alexa and Rahnenführer, 2018), permettant de déterminer les annotations GO significativement différentes entre les conditions.

Une fois l’enrichissement GO terminée, les annotations significatives identifiées pour chacune des catégories GO sont utilisées comme données d’entrée dans un outil informatique libre QuickGO. Cet outil permet de relier ces annotations entre elles et de les hiérarchiser sous forme d’arbre. Les arbres générés ont ensuite été utilisés pour regrouper ces annotations sous les mêmes niveaux hiérarchiques, correspondant à de grandes fonctions biologiques. Cette étape a permis ainsi de faciliter la comparaison des fonctions biologiques induites dans les différentes conditions. Par la suite, l’étude des processus biologiques impliqués dans la réponse de *N. palea* lors de l’exposition aux NPCs s’est alors focalisée sur la fonction des transcrits correspondant aux annotations mises en évidence par l’enrichissement GO.



#### 4 Evaluation de la réponse transcriptomique de *N. palea* en exposition au graphène à quelques feuillets (FLG)

##### Résumé

L'utilisation d'une approche transcriptomique lors de l'exposition de *N. palea* à différentes concentrations en FLG a permis de mettre en évidence des disparités et des similitudes dans les réponses étudiées. La plus faible concentration testée (0,1 mg.L<sup>-1</sup>), proche de celle que l'on pourrait retrouver dans les milieux aquatiques, ne semble pas induire une forte réponse après 48h d'exposition. Une surexpression de gènes probablement impliqués dans la protection des cellules contre un stress oxydatif est suggérée, ainsi qu'une génération de protéines susceptibles d'être impliquées dans la réparation du frustule, certainement lié à des blessures provoquées par le FLG. Cependant, une forte concentration en FLG (50 mg.L<sup>-1</sup>), mimant un déversement accidentel, induit une forte réponse transcriptomique avec plus de 1900 gènes différentiellement exprimés après 48h de contact direct. Plusieurs altérations physiologiques sont alors constatées, notamment une modification de la régulation de la transcription, accompagnée d'une variation du mécanisme de modification post-traductionnelles des protéines. L'ensemble de la voie de biosynthèse des pigments chlorophylliens semble être inhibée. L'observation de protéines impliquées dans la réparation des parois cellulaires suggère, une fois de plus, la génération de blessures par le FLG. Ces fortes concentrations en FLG induisent une importante modification du métabolisme énergétique, où les voies de la glycolyse et de l'oxydation des acides gras semblent être sur-régulées. Mais les gènes les plus surexprimés sont impliqués dans la production de protéines extracellulaires contribuant au processus d'adhésion cellulaire. La réponse générée par les diatomées exposées à l'ombrage seul du FLG ne présente pas de similarités avec celle générée en exposition directe. En effet, après 48h d'ombrage les cellules présentent une forte inhibition du métabolisme énergétique, notamment du métabolisme des carbohydrates et des acides gras.

Cette étude a abouti à la rédaction d'un article scientifique, récemment soumis dans la revue Journal of Environmental Science : Nano, intitulé :

##### Transcriptomic response of the benthic freshwater diatom *Nitzschia palea* exposed to Few Layer Graphene

*Marion Garacci, Maialen Barret, Clément Folgoas, Emmanuel Flahaut, George Chimowa, Anthony Bertucci, Patrice Gonzalez, Jérôme Silvestre, Laury Gauthier, Mohamed Zouine and Eric Pinelli*

# Transcriptomic response of the benthic freshwater diatom

## *Nitzschia palea* exposed to Few Layer Graphene

Marion Garacci<sup>1</sup>, Maialen Barret<sup>1,\*</sup>, Clément Folgoas<sup>2</sup>, Emmanuel Flahaut<sup>3</sup>, George Chimowa<sup>3</sup>, Anthony Bertucci<sup>4</sup>, Patrice Gonzalez<sup>4</sup>, Jérôme Silvestre<sup>1</sup>, Laury Gauthier<sup>1</sup>, Mohamed Zouine<sup>2</sup> and Eric Pinelli<sup>1</sup>

<sup>1</sup> EcoLab, Université de Toulouse, CNRS, Toulouse, France,

<sup>2</sup> GBF (Laboratoire Génomique et Biotechnologie du Fruit), ENSAT, INRA/INP, UMR 990, Castanet Tolosan, France

<sup>3</sup> Institut Carnot CIRIMAT (Centre Inter-universitaire de Recherche et d'Ingénierie des MATériaux), Université de Toulouse, INP, UPS, UMR CNRS 5085, Toulouse, France

<sup>4</sup> Univ.Bordeaux, UMR EPOC CNRS 5805, Pessac, France

### Abstract

Nanotechnology currently undergoes a rising development partly due to the increasing use of carbon-based nanoparticles, such as Few Layer Graphene (FLG). Owing to their numerous applications, their industrial production is likely to lead to environmental release, especially in rivers. In this study, a transcriptomic approach was used to assess the effect of FLG at low (0.1 mg.L<sup>-1</sup>) and high (50 mg.L<sup>-1</sup>) concentration on the benthic freshwater diatom *Nitzschia palea* after 48h of exposure. Direct contact with FLG and induced shading were distinguished to compare the transcriptomic responses. Differentially expressed genes between each exposure and control conditions were identified and their functional description was discussed. Slight transcriptomic response related to cell wall repair was observed in diatoms exposed to low FLG concentration. Exposure to high FLG concentration induced a strong response involving 1907 transcripts. Notably, 16 transcripts involved in chlorophyll biosynthesis process were under-expressed (Log2FoldChange between -3 and -1.2), suggesting a down-regulation of photosynthetic metabolism. Diatoms exposed to high FLG concentration over-expressed about 13 transcripts encoding for extracellular proteins playing a role in cellular adhesion, and two highly up-regulated transcripts involved in cell wall repair. Light deprivation caused by shading induced a down-regulation of genes involved in the energetic metabolism of *N. palea*. Overall, these results revealed that metabolic pathways impacted by FLG exposure were concentration contact-dependent. Moreover, this study suggests that low FLG concentration, close to environmental conditions, will have minor impact on diatom biofilms whereas high FLG concentration, mimicking accidental release, might be critical for ecosystems.

## 4.1 Introduction

The use of nanoparticles in everyday-life items available on the market place is now established (Brumfiel, 2006). Nowadays, industrials seek to optimize performance and quality of products already commercialized, thanks to the use of nanomaterials. Notably, the development of nanocomposite-based products allows for miniaturizing technologies. Nanotechnology has been a fast-growing science in the last few years. The number of nanomaterials-based products was multiplied by thirty in less than a decade (Pitkethly, 2004; Vance et al., 2015). The scientists' interest for carbon nanoparticles such as graphene and its derivatives is particularly rising because of their specific properties (Huang et al., 2011). The graphene nanomaterials' family encompasses graphene, strictly speaking (composed of a monoatomic carbon layer), and related materials including Few Layer Graphene (FLG). The particular properties of FLG are provided by the nanometric thickness of its planar carbon-based sheets. Several monoatomic layers composed of  $sp^2$ -bonded carbon atoms in a honeycomb lattice (graphene) are overlapped to form FLG. The thickness in the nanometric range confers industrially interesting properties such as lightness, bendability, and exceptional electrical and thermal conductivity (Lee et al., 2008; Nair et al., 2008; Yan et al., 2015; Zhu et al., 2010). All these properties move FLG from research laboratory to the market driven by demand from industries ranging from energy to biomedicine (Brownson et al., 2011; Feng and Liu, 2011; Wang et al., 2008). The use of these nanomaterials offers attractive economical perspectives in several industrial fields (Ahmed and Rodrigues, 2013).

Yet, no strict regulation is yet established for nanomaterials production (Boverhof et al., 2015). Information about real quantities of carbon-based nanoparticles in circulation are not available, especially in the case of graphene. Thus, unknown nanoparticles' amounts may be discharged in waste water from industry and individual households, and then finally released in the environment. Aquatic ecosystems are the final receptacle of pollution through different hydro-geochemical processes, such as atmospheric deposition, lixiviation and leaching of soils. In aquatic ecosystems, nanoparticles might interact with biological systems and cause disturbances. Their theoretically exceptionally high specific area and the difficulty to predict the release and fate in the aquatic ecosystems make FLG a worrying emerging contaminant (Hu and Zhou, 2013; Mottier et al., 2016; Nel et al., 2006). In spite of this, the evaluation of the environmental risk of FLG is still in its infancy and a strong lack of information persists regarding its potential impact on aquatic ecosystems (Freixa et al., 2018).

Most of the environmental nanotoxicity studies assessing the impact of graphene family material focused on the graphene oxide, which carries (among others) epoxide functions on the surface of the carbon layer. Inhibition of root development followed by an adaptation of terrestrials plants exposed to 0.01 to 1 mg.L<sup>-1</sup> was demonstrated (Wang et al., 2014; Zhou and Hu, 2017). Studies on the ecotoxicological effects of FLG are scarce. An interesting work carried out on zebrafish larvae exposed to 25 to 100 mg.L<sup>-1</sup> graphene quantum dots (GQD; crystalline nanostructure smaller than a nanoparticle with high photoluminescence properties) revealed an acute inflammatory response linked to an activation of the detoxifying system (Deng et al., 2018). Graphene nanoplatelets (GNP) toxicity on *Pseudomonas aeruginosa* was evaluated by Mortimer and his co-workers (2018). The authors suggested that GNP (10 mg.L<sup>-1</sup>) had no antibacterial activity, but could affect bacterial physiology and metabolism.

Potential accumulation in the sediment and subsequent transfer of nanoparticles along the food chain through biomagnification justifies the relevance of ecotoxicological studies towards microbial organisms which are essential to the biogeochemical cycles of aquatic ecosystems. Despite the crucial role of photosynthetic organisms in the ecosystem functioning, only few studies evaluated the effect of graphene family nanoparticles on algae. Hu and co-workers (2014) reported an internalisation of graphene oxide nanoparticles in *Chlorella vulgaris* cells, leading to organelles damages including the alteration of chloroplast structure. After 8 days of exposure, cell division of *C. vulgaris* was inhibited with an increase in Reactive Oxygen Species (ROS) production. Transcriptomic analysis revealed an inhibition of the carbohydrates and amino acids metabolisms in addition to a modification of the urea and fatty acids metabolisms. Few years later, the same authors demonstrated the contribution of the fatty acid metabolism to ROS levels, adding that cell plasmolysis was associated with a carbohydrate consumption (Hu et al., 2016). Nevertheless, in this study, these effects were shown to be reversed with a return to the normal level by placing cells in a fresh medium, suggesting reversible effects.

Diatoms constitute a particular branch of unicellular microalgae with the ability to produce a cell wall, called frustule, composed of silica with different ornamentations depending on species. Diatoms are known to play a major role in the global primary productivity of the aquatic ecosystem (Falkowski et al., 2004; Parker et al., 2008). They represent the main cellular component of freshwater biofilm when environmental conditions are not optimal for green algae. Some diatom species are able to resist to organic pollution and the diatom community composition can be used as a bioindicator of the ecological state of freshwater

(Watanabe et al., 1986). Within biofilm, diatoms and other organisms are able to produce extracellular polymeric substances (EPS) mainly composed of polysaccharides and proteins (Flemming and Wingender, 2010). Several roles are proposed to the excretion of EPS, but the primary and major role of this external matrix is to help diatoms to adhere and grow on a substrate. Secondly, the EPS matrix was found to procure a protection against pollutants such as metals (Andrade et al., 2010) or carbon nanoparticles such as carbon nanotubes (Verneuil et al., 2015) or FLG (Garacci et al., 2017). Pollutants are then accumulated in the extracellular matrix and removed from the water column. However, the biochemical structure of substances responsible for the trapping of nanoparticles is still to be elucidated.

To evaluate the nanotoxicity on aquatic organisms, transcriptomics, proteomics and metabolomics are up-date powerful tools. Indeed, they provide an accurate, high-throughput and hypothesis-independent description of the mechanisms involved in stress response. Omic approaches enables to establish the relationship between molecular endpoints and global metabolic response at lower contaminants concentration and on all kind of organisms (Poynton and Vulpe, 2009; Villeneuve and Garcia-Reyero, 2011). Transcriptomic and proteomic studies conducted on diatoms are limited (Muhseen et al., 2015), and have never been applied to nanotoxicology.

Cellular responses of *N. palea* (Kützing) W. Smith (*N. palea*) exposed to FLG (0.1, 1, 10 and 50 mg.L<sup>-1</sup>) were assessed in a previous work studying the impact on cellular growth and photosynthesis activity (Garacci et al., 2017). Based on these endpoints, diatom response to FLG was detected only at 50 mg.L<sup>-1</sup>. Moreover, the sticking of FLG nanoparticles in diatoms biofilm was appreciated thanks to a monitoring of FLG fate in the water column and in the biofilm. The current study aims at assessing the molecular response of this diatom exposed to FLG using a transcriptomic analysis. Here, we analysed the difference of the transcriptomic response of diatoms exposed to growth inhibitory and non-inhibitory FLG concentrations. We tested two doses of FLG: one dose, close to a potential environmental concentration (0.1 mg.L<sup>-1</sup>) and a high one (50 mg.L<sup>-1</sup>), which could correspond to an accidental release of nanoparticles. We also distinguished the shading part of the total impact of FLG exposure at high concentration.



## 4.2 Materials and methods

### 4.2.1 Preparation of graphene suspension

The synthesis of FLG was carried out by an exfoliation process from expandable graphite flakes provided by Asbury Carbons (Ref. 3772). Expandable graphite was prepared by industrial intercalation of acids in order to facilitate the exfoliation process. A thermal expansion was performed from 12.95 g of expandable graphite flakes divided in batches. Crucibles containing the expandable graphite were placed for 4 min pre-heated and in a furnace maintained at 900°C under air flow after what, they were retrieved and allowed to cool down to room temperature. A dispersion of the 52 wt.% of resulting expanded graphite was performed by two successive mechanical exfoliations in 2.2 L of propan-2-ol to reach a 3 g.L<sup>-1</sup> nominal concentration. The first one consisted in a homogenization with a shear mixer (Silverson L5M) for 15 min at 8000 rpm for each batch. During the second one, a probe sonication at 50% amplitude for 90 min (Vibra cell 75042, 13mm-diameter probe, 500 W, 20 kHz) was carried out by batches of 200 mL. The collected material was diluted to reach a nominal concentration of 0.2 g.L<sup>-1</sup>.

Selection of FLG by removal of too thick (> 100 nm) particles and agglomerates was performed by centrifugation at 2000 rpm for 1h (Thermofisher scientific Heraeus Megafuge 40, rotation acceleration = 9, rotation deceleration = 3). Because, after storage, particles may agglomerate at the bottom of the containers, a brief sonication of 10 min in the same conditions as described above was carried out immediately prior to centrifugation. The residue was discarded. Once the supernatant collected, a filtration on a cellulose nitrate membrane (45 mm diameter, 0.45 µm pore size) was performed followed by washing the particles with deionised water (1 volume of deionised water per volume of suspension). The final equivalent weight of dry FLG was 530 mg which corresponded to a yield of 4.1 wt. % from the starting expandable graphite.

The wet FLG was diluted in SPE medium sterilized 20min at 121°C and bath sonicated for 10 min (Elmasonic S30H, 280W). Immediately after a second short bath sonication of 2 min of the FLG suspension, dilutions were carried out under axenic conditions before the experiments in order to avoid contamination. Homogenous intermediary FLG suspension were then prepared at 0.167 and 83.5 mg.L<sup>-1</sup> to reach a final concentration in the experimental device of 0.1 (FLG<sub>0.1mg</sub>) and 50 mg.L<sup>-1</sup> (FLG<sub>50mg</sub>) respectively. Just before the addition of

FLG to the diatoms culture, a last sonication was performed to ensure a good dispersion of nanoparticles in the exposure medium.

#### 4.2.2 FLG characterization

A small quantity of FLG suspension was frozen and freeze-dried (Christ Alpha 2-4 LSC) in order to perform a Transmission Electronic Microscopy (TEM, JEOL JEM 1400) observation to determine their size and morphology. Sample was dispersed by bath sonication in ethanol for 10 min and then deposited on a TEM grid (Lacey carbon). Raman spectroscopy analysis on a Labram-HR800 (Horiba) was performed using a laser at 633 nm in confocal mode (x100 magnification, 100 µm hole, diaphragm D1, 20 s exposition, 10 accumulations). Chemical analysis of the samples was obtained by XPS (K $\alpha$  ThermoScientific, monochromatic Al-K $\alpha$  source).

#### 4.2.3 Diatoms culture and exposure

##### *Diatoms pre-cultivation*

Axenic *N. palea* CPCC-160 strain was purchased from the Canadian Phycological Culture Centre (University of Waterloo, Waterloo, ON, Canada). To maintain axenic conditions of this strain, diatoms were handled under a class II laminar flow hood to avoid biotic contamination. The culture medium used was a sterilized modified CHU N° 10 basic medium, called SPE medium (SPE; 6.4 < pH < 6.6). The amplification of the algal culture and the experiments were carried out in a growth room at 22 ± 1 °C on a rotary shaker at 50 rpm with a light/dark period of 14 h/10 h supplied by led Floodlight 150W Dimmable (Vegeled, Colasse SA, Belgium) at 60±10 µE. To carry out ecotoxicological tests on diatoms in active phase, the SPE medium was replaced by fresh medium 72 h before each experiment.

##### *Exposure conditions*

The principle of the experimental device used was the same than the one developed earlier by Verneuil *et al.* (2014) and described in a previous study (Garacci *et al.*, 2017) where the shading effect of carbon nanoparticles could be distinguished from the overall exposure effect (combined direct exposure and shading). Experiments were performed in 750 mL culture flasks (FALCON® Cell Culture Flask, 175cm<sup>2</sup> straight neck vented cap) superposed on each

other. These culture flasks were then placed in customised open-top opaque boxes by batches of 18 where the light perception was only provided by the top face of the flasks.

Before the beginning of the exposure to FLG, 15 lower flasks of each system were inoculated with 100 mL of algal culture ( $2.5 \times 10^5$  cells.mL<sup>-1</sup>) to establish the algal biofilm. After 48h, 150 mL of dispersed FLG suspension diluted to the appropriate concentration was added to the algal culture to obtain a final volume of 250 mL for each flask corresponding to the condition of total exposure to nanoparticles. In this way, the final FLG concentration were 0.1 and 50 mg.L<sup>-1</sup>. For the shading exposition, only the highest FLG concentration was tested, which was the only one inducing shading effect on diatoms culture (Garacci et al., 2017). To test the shading impact on the molecular response of diatoms, 150 mL of FLG at a concentration of 83.5 mg.L<sup>-1</sup> were placed only in the top flask of the experimental system. All of the flasks which did not contain a final volume of 250 mL were filled with SPE medium (250 mL in the superior flask of the total exposure condition, 150 mL in the lower flask and 100 mL in the upper one of the shading exposure condition). Flasks were placed in a growth room for 48h. Each experimental condition was conducted in triplicate.

#### 4.2.4 RNA extraction and *de novo* sequencing

After 48h of incubation, the flasks were collected and all the supernatant was gently removed without resuspending the algal biofilm. Then the biofilm was scrapped into 50 mL of fresh medium, transferred in a 50 mL Falcon tube and centrifuge at 10 000 rpm for 10s. The supernatant was not completely removed and the pellet containing diatoms was transferred in a new 2 mL Eppendorf tube for a final centrifugation to pellet the cells. Once the supernatant removed, the pellets were immediately frozen in liquid nitrogen and store at -80°C until RNA extraction.

Extraction of total RNA was carried out using a modified QIAGEN<sup>®</sup> kit protocol (RNeasy Plant Mini Kit, 74904, QIAGEN). A first step of cellular lysis was performed using 450µL of TRIzol<sup>®</sup> Reagent (Invitrogen) combined to grinding with silica beads (Sartorius<sup>™</sup> BBI-8541400) (200µL) using a FastPrep<sup>®</sup> (FastPrep<sup>®</sup>-24 Classic Instrument, MP Biomedicals, 6.5 m.s<sup>-1</sup>, 6x20s). Samples were then heated at 56°C for 10min to separate RNA from carbon-based nanoparticles, since these nanoparticles are known to strongly interact with nucleic acids through adsorption onto nanoparticles surfaces (Zheng et al., 2003). A first extraction step with 200µL of chloroform RECTAPUR (VWR) was followed by the RNA isolation and purification on QIAGEN<sup>®</sup> RNeasy Mini Spin column to bind total RNA. Potential small

quantity of DNA in the sample was suppressed thanks to a 15min DNase I treatment at room temperature. The final elution was carried out in 40µL of RNase free water. The yield and quality of RNA samples were assessed using a Nanodrop spectrophotometer. RNA concentration ranged from 99 to 3,091.5 ng.µL<sup>-1</sup>. The ratio of absorbance at 260 and 280 nm was higher than 2. RNA integrity was checked by a microgel electrophoresis on an Experion™ Electrophoresis Automated System using a Experion™ RNA StdSens Analysis kit. RIN ranged from 5 to 7.5. Samples were stored at -80°C prior to sequencing. RNA samples were sent to GATC Biotech SARL platform for RNA sequencing. A next generation Illumina paired end sequencing was performed with a strand specific cDNA library generated and insert size of 150pb resulting in about 30 million reads (± 3%). Assembled sequences were submitted to Transcriptome Shotgun Assembly (TSA) database in the GenBank NCBI (Submission ID: SUB4486479) under the BioProject named “Nitzschia palea Transcriptome” (Accession number: PRJNA489196).

#### 4.2.5 RNA-seq *de novo* assembly and quantification analysis

Reads assembly was performed using the De novo RNA-seq Assembly Pipeline (DRAP) (Cabau et al., 2017) including the trimming of low quality bases. A transcriptome was generated for each conditions and a metatranscriptome was obtained. Reads were mapped on this assembled metatranscriptome using the Trinity Transcripts Quantification v2.4.0 (Haas et al., 2013) applying the RNA-Seq by Expectation-Maximization method (Li and Dewey, 2011). Annotation and Gene Ontology (GO) mapping of the *N. palea* metatranscriptome were carried out with the Blast2GO software using default parameters (Götz et al., 2008). Transcripts were compared to the non-redundant ‘nr’ database using the BLASTx tool with an E-value threshold of  $1.10^{-3}$ . Differential expression analysis was inferred based on the normalized counts with the statistical open source software R (R Core Team, 2013) using the “DESeq2” package (Love et al., 2014). For all the differential expressed genes (DEGs) with  $FDR < 0.05$ , a GO Enrichment analysis was performed using the “topGO” R package (Alexa and Rahnenführer, 2018). The “topGO” outcomes were implemented in the open web-based tool QuickGO (Binns et al., 2009) to generate GO trees for each condition and each GO category (Biological Process, Molecular Function and Cellular Component). All the enriched GO terms for these DEGs were aggregated at the same GO level in order to simplify the comparison of BP involved between conditions. R packages “gplots” (Warnes et al., 2009) and “RColorBrewer” (Neuwirth, 2005) were used to generate heat maps of gene expression,

and “VennDiagram” package (Chen, 2014) to represent the numbers of DEGs shared between conditions.

### 4.3 Results and Discussion

#### 4.3.1 Characterization of FLG

The initial expandable graphite and the method used to produce FLG suspension were exactly the same as the ones used in a previous study (Garacci et al., 2017). The full description of FLG nanoparticles is thus provided in this previous study. Briefly, FLG nanoparticles present a number of layers estimated between 5 and 10 with an interlayer distance of 0.34 nm. Figure 33 shows TEM observations of FLG nanoparticles.

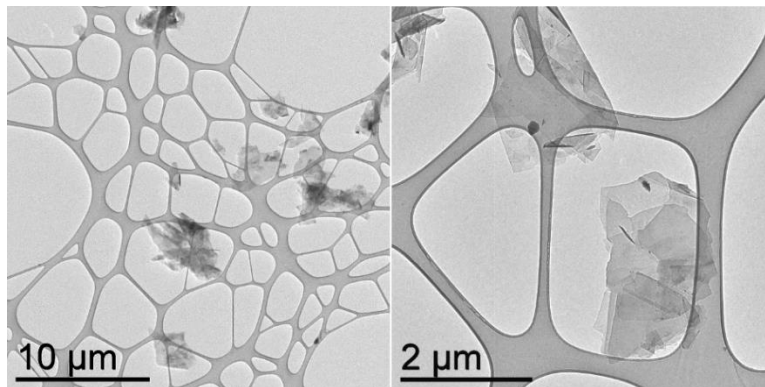


Figure 33. Transmission Electronic Microscopy of dried FLG.

To avoid misinterpretations due to the presence of other pollutants in the FLG suspensions (Petersen et al., 2014) which could be linked to the mode of production, ICP-OES analyses were also performed on previous FLG sample revealing the absence of release of metallic ions or absorption of nutrients by FLG in the culture medium.

#### 4.3.2 Assembly and annotation statistics

Next Generation Sequencing and RNA-seq assembly generated an unprecedented *N. palea* transcriptome. A total of 15,906 transcripts ranging from 230 to 24,434 bp (N50 = 2,139 bp) were obtained after running the DRAP pipeline. The generated *N. palea* transcriptome presented an estimated recovery of 69-97% of its sequenced genome (not published yet). The obtained *N. palea* transcriptome thus ensures a consistent analysis based on reads quantification. Functional annotation of *N. palea* transcriptome revealed that 17.5% of the transcripts did not match with known sequences in the database we used.

This non-negligible percentage revealed the lack of information for this species. Nevertheless, the percentage of annotation was relatively similar for Hook and co-workers (2014) found on the marine diatom *Ceratoneis closterium* transcriptome with 36.3% of non-annotated transcripts. In other transcriptomic studies on diatoms, this percentage was not reached, with 33% of annotation for *Thalassiosira pseudonana* (Carvalho et al., 2011) or 27.6% for the diatom *Leptocylindrus aporus* (Nanjappa et al., 2017). Only few transcriptomic or genomic studies have been performed on diatoms, mainly on marine species, leading to a persistent paucity of sequence information available (Hook et al., 2014). Indeed, the genome sequence of only four marine diatoms are currently available: *T. pseudonana* (Armbrust et al., 2004b) and *Phaeodactylum tricornutum* (Bowler et al., 2008), *T. oceanica* (Lommer et al., 2012), *Fragilariopsis cylindricus* (Mock et al., 2017).

In addition, 37.2% of the transcripts showed no GO annotation. As shown in Table 4, in our dataset the ten most over- and under-expressed transcripts (Log2FoldChange: Log2FC) in all conditions inclusive were mostly generated in direct FLG<sub>50mg</sub> exposure. 85% of these transcripts were annotated.

Table 4. Characteristics of the 'top ten' up and down-regulated transcripts. This classification was performed on the transcripts expression level in all conditions taken together.

Transcript ID	Description	Log2FC			# GO Terms
		FLG0.1	FLG50	Shading FLG50	
NP3908	---NA---	0.89	6.97	-0.89	0
NP12499	extracellular matrix	0.87	5.82	-0.51	8
NP11038	Bv80 Bb-	0.40	5.80	0.72	2
NP11871	vegetative cell wall gp1-like	0.76	5.72	-0.37	2
NP2395	---NA---	0.80	5.59	-0.05	0
NP5869	cytochrome c oxidase subunit III (mitochondrion)	-3.43	5.48	1.32	5
NP4477	galectin-7	-0.63	-0.31	5.29	7
NP3305	zinc finger	0.00	5.26	-0.31	0
NP29	filamentous hemagglutinin family N-terminal domain	0.87	5.06	0.19	5
NP4460	cytochrome c oxidase subunit I (mitochondrion)	-4.87	6.35	1.41	9
NP701	predicted protein	2.07	-4.44	2.68	3
NP12220	Calcium calmodulin dependent kinase association-domain	3.45	-4.67	0.86	3
NP1950	---NA---	-0.03	-4.69	2.71	0
NP3480	peptide methionine sulfoxide reductase	3.14	-4.75	1.21	2
NP6602	40S ribosomal S18	-5.02	0.65	0.81	15
NP717	keratin 1	-5.46	-0.31	2.10	17
NP5871	elongation factor 1-alpha 1	-5.46	3.89	2.75	25
NP4039	S100-A8	-5.96	-0.31	-5.12	37
NP4496	S100-A9	-5.42	-0.31	-6.01	40

### 4.3.3 Differential expression

The differential expression analysis was performed to identify DEGs after 48h under each exposure condition. Among the 15,906 transcripts, 1,953 DEGs (12.3 %) were differentially expressed. DEGs obtained were not filtered on the Log2FC value. This percentage of DEGs is higher than that found in previous studies carried out on the marine diatoms *T. pseudonana*, and *C. closterium*, in which DEGs with a  $\text{Log}_2\text{FC} \geq 1$  or  $\geq 3.3$ , accounted respectively for 6 and 2.5% (Carvalho et al., 2011; Hook et al., 2014). In these studies, *T. pseudonana* was exposed to an ammonia concentration ( $4 \text{ mg.L}^{-1}$ ) corresponding to 10% growth inhibition ( $\text{IC}_{10}$ ), and *C. closterium* to  $\text{IC}_{40}$  of the polycyclic aromatic hydrocarbon benzo-a-pyrene ( $36.45 \text{ } \mu\text{g.L}^{-1}$ ). These concentrations were sufficiently high to impact the cellular growth rate

but induced a slighter transcriptomic response than obtained in our study. This comparison highlight that conditions tested in our experiments, especially for FLG<sub>50mg</sub> exposure, represent considerable conditions inducing strong transcriptomic response. In our DEGs dataset the expression level varied between -4.7 and -0.6 for the down regulated and between 0.5 and 7 for the up-regulated DEGs. This transcript differential expression levels were comparable to that observed by Carvalho, Bopp, and Lettieri (2011) in which the Log<sub>2</sub>FC reached 7.2. It is noteworthy that, generally, the Log<sub>2</sub>FC resulting from the comparison with the control condition is about 3. However, a reverse transcriptomic study on *N. palea* exposed to 1 µg.L<sup>-1</sup> diuron exhibited a maximum expression level, with Log<sub>2</sub>FC = 4.9, for the gene *coxI* without growth inhibition (Moisset et al., 2015). For example, during sexual reproduction of *Leptocylindrus danicus* diatom, the flagellar gene exhibited the highest over-expression with a Log<sub>2</sub>FC of 2.8 (Nanjappa et al., 2017). In our study, the gene expression levels suggested a strong response of diatoms, especially for diatoms directly exposed to FLG<sub>50mg</sub> (Figure 34).

Exposure to the highest FLG concentration was associated with a high number of DEGs (1907 DEGs), compared to the low FLG concentration (50 DEGs) and shading condition (23 DEGs) (Figure 34a). Most of these DEGs were up-regulated in diatoms exposed to 0.1 and 50 mg.L<sup>-1</sup> of FLG, while down-regulated transcripts represented most of the DEGs in the shading condition. Overall, 68.2% of the DEGs could not be associated with GO terms. More specifically 17.7% of DEGs were not annotated for the shading condition, 58% for FLG<sub>0.1mg</sub> and 31.1% for FLG<sub>50mg</sub> exposure (Figure 34b). The comparison of expression profiles obtained in FLG<sub>50mg</sub> with the two others conditions showed that diatoms responses were mainly different, with only 13 DEGs shared with FLG<sub>0.1mg</sub> and 14 with shading condition (Figure 34c). None of the DEGs was shared between the shading and FLG<sub>0.1mg</sub> exposure. This is consistent with a previous study in which we did not detect any shading effect on cellular response (Garacci et al., 2017). Diatoms exposed to high FLG concentration exhibited a stronger and specific transcriptomic response compared to FLG<sub>0.1mg</sub> and shading conditions.

Within the amount of shared sequences, the number of transcripts regulated in the same way were also identified. Among the 13 transcripts differentially expressed in diatoms directly exposed to low and high FLG concentration, 9 were similarly regulated (up- or down-). These results showed that responses shared between low and high FLG concentrations were weak. Nevertheless, the few identical DEGs were mostly expressed in the same way and they exhibited high Log<sub>2</sub>FC values (from -4.7 to -1.7 and 1.2 to 4.4, for down- and up-regulated DEGs, respectively). Among the 14 DEGs shared between direct and shading exposition to



FLG<sub>50mg</sub>, only one was regulated in the same way. Shading exposure shared few DEGs with direct exposure for the same FLG concentration where the common DEGs were in majority inversely expressed. Regarding these first results, we could suppose that the response induced by direct exposure to FLG<sub>50mg</sub> might not be comparable to the response obtained in the shading condition. These results were in accordance with the shading effect observed in a previous study (Garacci et al., 2017) revealing growth inhibition until the end of the experiment while diatoms directly exposed to FLG<sub>50mg</sub> showed a temporary growth inhibition after 48h of exposure with a growth recovery at the end of the experiment thanks to the sticking of nanoparticles in the biofilm matrix.

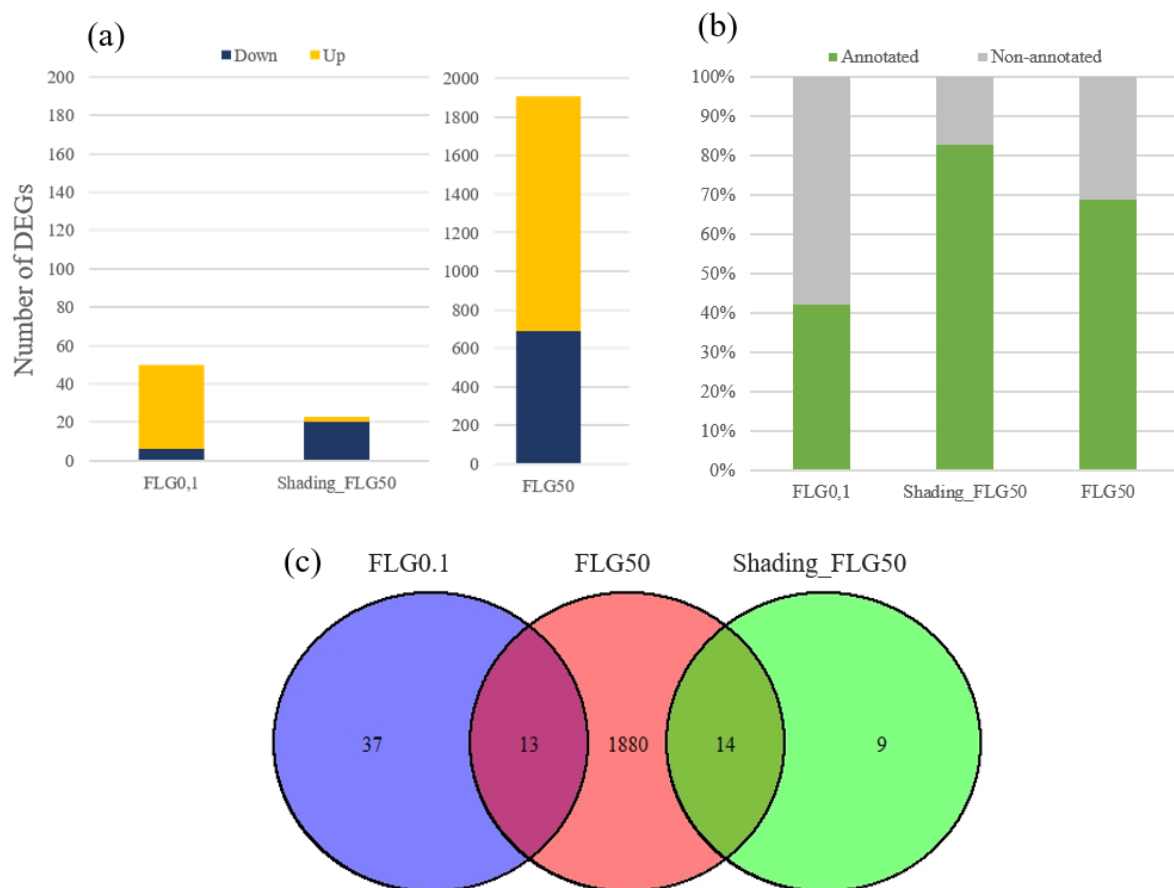


Figure 34. Description of the differential expressed genes in the different conditions. (a) Total number of DEGs with the proportion of up and down-regulated transcripts. (b) Percentage of DEGs assigned to a Gene Ontology term. (c) Venn diagram showing the number of shared DEGs between in each exposure condition.

#### 4.3.4 Functional annotation

GO enrichment analysis was performed to identify biological processes (BP), molecular function (MF) and cellular component (CC) to which DEGs are related. The results shown in this paper primarily concern the BP category, with an overview of CC category, especially in FLG<sub>50mg</sub> condition. Only 3 GO terms were overrepresented for 2 DEGs expressed in FLG<sub>0.1mg</sub> condition, 162 GO terms for 599 DEGs in FLG<sub>50mg</sub> and 37 GO terms for 8 DEGs in the shading condition. It should be noted that each DEG can be associated with several biological processes and hence carrying multiple GO terms.

Study of the BP involved in diatom's responses to FLG was performed on DEGs with enriched GO terms in each condition. Once enriched GO terms aggregated at the same GO tree level, one BP term can be encompassed under multiple higher GO terms. Thus, the number of enriched GO terms do not correspond to the number of BP involved in each condition. These BP and the associated DEG expression levels are displayed in Figure 35. The response of diatoms exposed to FLG<sub>50mg</sub> involved the highest number of BP (14) when compared to FLG shading condition (12) and low FLG concentration (6). The rest of the functional analysis, based on DEGs description, focused only on DEGs associated to enriched GO terms.

##### *Diatoms exposed to low FLG concentration*

Results of GO enrichment revealed that only two up-regulated DEGs were associated with enriched GO terms for diatoms exposed to low FLG concentration. These two DEGs (4% of total number of DEGs expressed in FLG<sub>0.1mg</sub>) had a Log<sub>2</sub>FC values of 1.1 and 1.2 and were commonly involved in primary, organic substance metabolic processes. The first DEG (NP15612) encoded for a platelet activating factor acetylhydrolase-like protein (PAF-AH; e-value = 7.7E-33) involved in catabolic process. The molecular activity of PAF-AH is a deacetylation of the PAF protein leading to a loss of activity. PAF-AH can participate in several physiological processes, probably involved in nuclear movement and microtubule organization and it can also protect cells from oxidative stress by suppressing oxidized phospholipids (Arai et al., 2002). The other DEG (NP11952) was also involved in cellular metabolic, nitrogen compound metabolic and biosynthetic processes and could correspond to a proline rich protein (PRP) (e-value = 4.5E-5). It was demonstrated that frustulin, in association with the silica-based substructure of the diatom cell wall (frustule), presented

considerable proline rich region (Kröger et al., 1997, 1996). The significant activation of PRP could suggest a rallying of protein involved in frustule synthesis to undergo a minor physical stress which could be induced by the interaction between cells and FLG nanoparticles. Low FLG concentration elicited a slight transcriptomic response in diatoms and didn't result in cellular damages, in accordance with a previous study (Garacci et al., 2017).

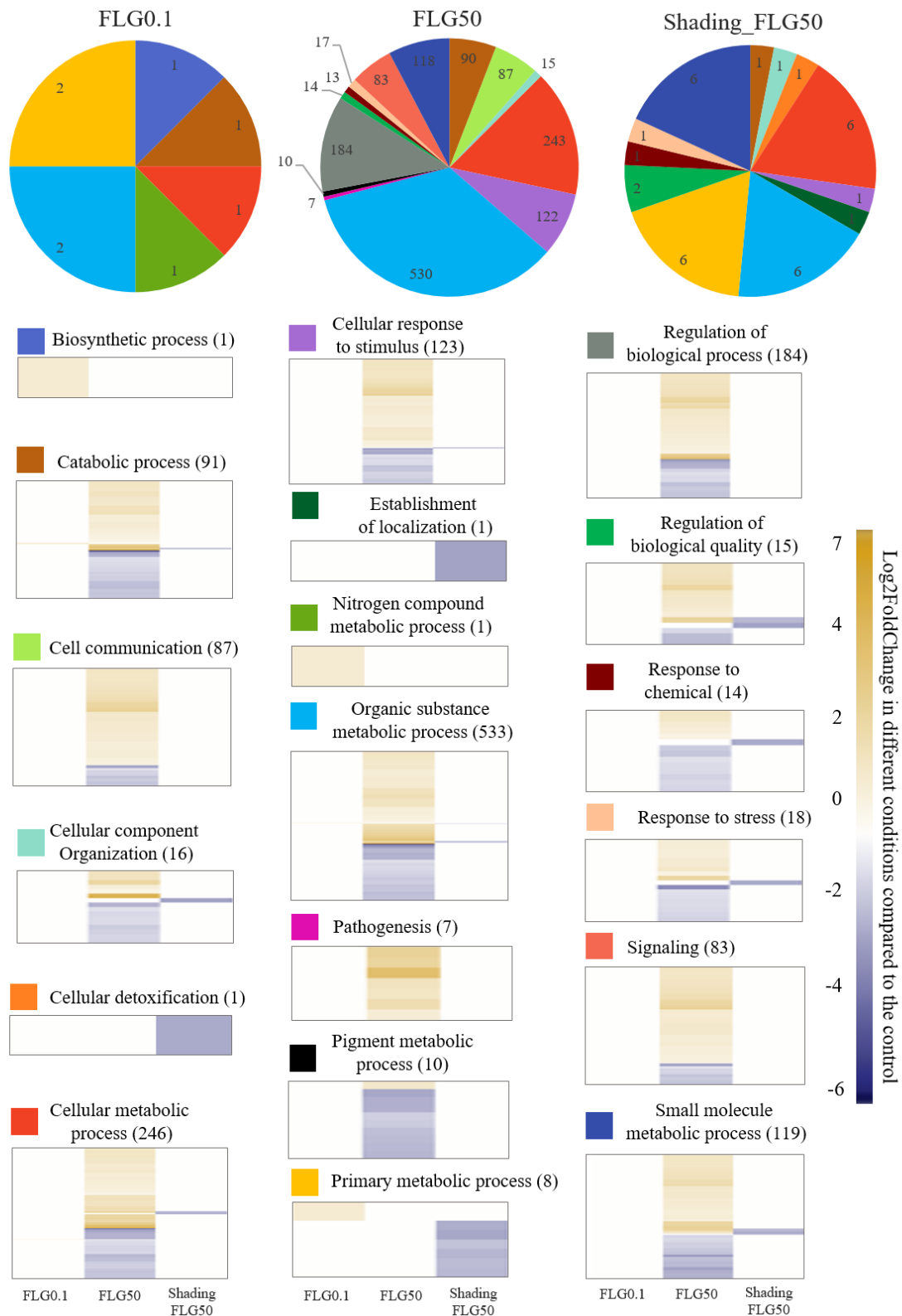


Figure 35. Biological processes involved and regulation of gene expression in the three different conditions. Pie charts present the distribution of GO terms associated with the DEGs relative to the control condition. Heat maps show profiles of gene expression for each biological process represented in pie charts. Numbers in pie charts and heat maps indicated the number of DEGs contributing to biological process.

### *Diatoms exposed to high FLG concentration*

In the direct FLG<sub>50mg</sub> exposure, 31.4% of the total DEGs presented a GO term and a BLAST homology. Within these DEGs, 7%, mostly up-regulated (Log<sub>2</sub>FC between 0.7 and 3), were involved in cellular response to stimulus, response to stress and regulation of biological quality. The expression of down-regulated transcripts participating to these biological processes did not exceed -3 in Log<sub>2</sub>FC. One of the 10 most down-regulated DEGs (NP3273) participating to these biological processes encoded a DNA helicase homologue (Table S1). The deactivation of this enzyme involved in several crucial cellular processes such as DNA replication and transcription (Matson et al., 1993) suggested a genomic regulation in response to a stimulus. DNA helicases are also known to be the first agent encountering DNA damages, and then can be highly involved in the DNA repair after mutations due to chemical expositions or radiations (Tuteja et al., 2009). As down-regulated in our study, exposure to high FLG concentration did not seem to generate genetic damages in the diatom *N. palea*.

A majority of the transcripts was involved in the organic substance metabolic process (530 DEGs) and cellular metabolic process (243 DEGs). Several DEGs among the 10 most up-regulated ones participated to these biological processes, especially GO term related with DNA modification, such as DNA-templated transcription, termination and DNA binding. One of these DEGs (NP9382) was described as a Rho termination factor with specific mRNA binding site. Rho termination factor acts as an helicase to disengage mRNA from DNA and RNA polymerase (Kaplan and O'Donnell, 2003). This transcription factor was primarily discovered in *Escherichia coli* and known to be present in bacteria (Das et al., 1976). A Rho termination factor-like protein was also identified in higher plants plastids (Chi et al., 2014). Interestingly, regulatory mechanisms associated with Rho termination factors have not been described yet in diatoms (Montsant et al., 2007).

Moreover, two major up-regulated DEGs, a SPT2 homolog (NP10895), which is a chromatin component, and a winged helix DNA-binding domain-containing protein (NP11926) participated to the regulation of biological process (9.6% of the 1907 DEGs expressed in this condition) and cellular component organization (1.31%). These putative proteins play a role in the transcription and post-transcriptional regulations (Thebault et al., 2011). In the 10 more down-regulated DEGs, the presence of three DEGs participating to the organic substance metabolic process, suggested a decrease in post-translational protein modification process with a down-regulation of peptidyl-prolyl cis-trans isomerase (NP3760), calcium calmodulin dependent kinase association-domain protein (NP12220) and peptidase S8 (NP11562). These

results might suggest that cells established regulation processes in response to the stress generated by the presence of high FLG concentration. This response is likely to be linked with the growth recovery previously observed (Garacci et al., 2017) after a temporary growth inhibition at 48h of FLG<sub>50mg</sub> exposure. Diatoms were then able to implement an efficient response to reduce toxic effects induced by FLG<sub>50mg</sub> exposure which is in accordance with the modification of regulation processes observed in this work.

The catabolic process encompassed up to 4.7% of the annotated DEGs with 53 out of 90 up-regulated DEGs with a Log<sub>2</sub>FC up to 5.8. Seven DEGs were involved in pathogenesis, all of them being up-regulated (Log<sub>2</sub>FC between 1.6 and 3). Two up-regulated DEGs, participating to these biological processes, presented the same protein identification referring to a vegetative cell wall gp1-like (NP13398 and NP11576) that is a glycoprotein described as a major component of the outer cell wall layer of the green microalgae *Chlamydomonas reinhardtii* (Ferris et al., 2001). In a previous study evaluating the cell viability by fluorescent marking, toxicity effect induced by FLG<sub>50mg</sub> exposure was assumed to partly result from cellular wounds generated by the physical contact between cells and FLG nanoparticles (Garacci et al., 2017). Indeed, in some diatoms from the population exposed to FLG<sub>50mg</sub>, wounds and cell wall distortions were evidenced by scanning electron microscopy (Figure 36b-d). The physical interaction could partly explain the alteration of the global metabolism, as observed by Pohnert (2000) who found that the diatoms *Thalassiosira rotula* and *Asterionella formosa* overproduced C<sub>20</sub> fatty acids in response to mechanical cell damages, reproducing herbivorous impact, as a chemical defence by high local concentration of defensive metabolites. The upregulation of the transcript encoding this protein suggests a potential cell wall repair as a consequence of wounds induced by physical contact with FLG<sub>50mg</sub>.

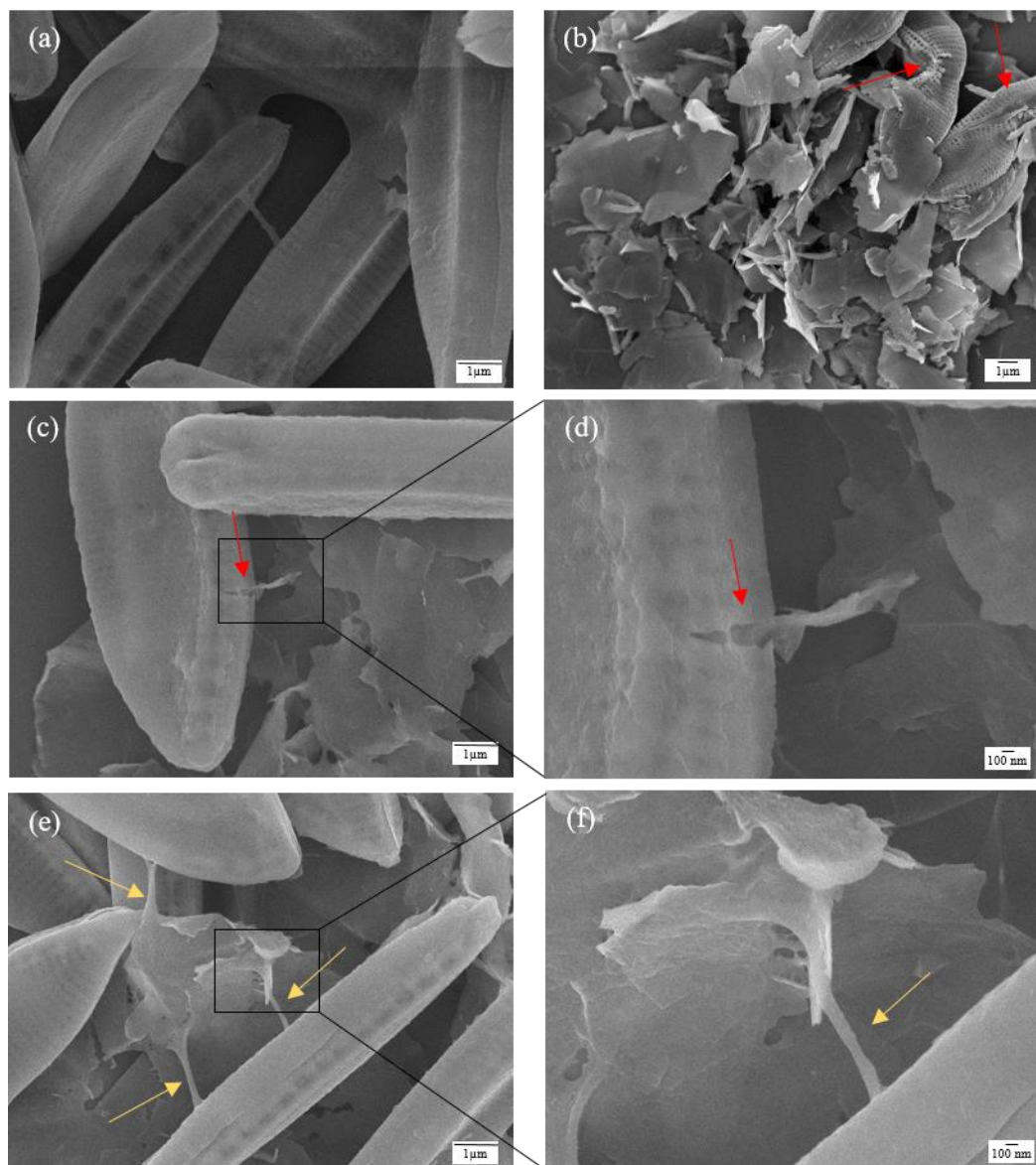


Figure 36. Scanning electron microscopy images of *N. palea* at 48 h of growth in control culture (a) and in culture exposed to  $FLG_{50mg}$  (b-f). Red arrows indicate a wound or distortion of the cell wall and yellow ones indicate EPS matrix.

In addition, DEGs participating in pigment metabolic process (10 DEGs), small molecule metabolic process (118 DEGs), organic substances and cellular metabolic processes, counted among the lowest regulated DEGs ( $\text{Log}_2\text{FC}$  between -3 and -1.2). Only one DEG contributing to these BP was upregulated encoded for a phosphoribosylamine-glycine ligase ( $\text{Log}_2\text{FC} = 1.4$ ). Among the most downregulated DEGs, 16 participated in the pigment biosynthetic pathway, encoding for 10 enzymes or proteins complexes (Table S2). The position of enzymes encoded by these transcripts in the pigment biosynthetic pathway are represented in the Figure 37. Among these DEGs, an Aminolevulinatase (ALA) dehydratase started this metabolic pathway in the cytoplasm forming porphobilinogen, the first pyrrole. Moreover, an uroporphyrinogen III synthase and three uroporphyrinogen decarboxylase were found as

potential products of DEGs being part of the most down-regulated transcripts. These tetrapyrroles enzymes are involved in the porphyrin biosynthesis which enter in the chlorophyll biosynthesis and then play a role in the photosynthesis process (Stenbaek and Jensen, 2010). Enzymes catalysing reactions of the rest of the metabolic pathway, such as protoporphyrinogen IX oxidase, ferrochelatase, protoporphyrin IX methyltransferase, geranyl reductase and chlorophyll synthetase were all found in down-regulated DEGs. Two DEGs described as light harvesting complex and two others encoding for fucoxanthin chlorophyll a c binding protein were also included in this down-regulated DEGs group. Taken as a whole, the under-expression of these 17 transcripts suggest a reduction of photosynthesis as a result of exposure to FLG<sub>50mg</sub>. A reduction of photosynthetic activity thanks to photosystem II quantum yield measurement was previously demonstrated for diatoms directly exposed to FLG<sub>50mg</sub> (Garacci et al., 2017), which is in full agreement with the transcriptomic response identified here.

Besides, DEGs encoding for a glutathione S-transferase and a glutaredoxin (NP3215 and NP11801, Log<sub>2</sub>FC = -2.7; -2.6, respectively) were part of the most down-regulated transcripts. These proteins are known to act against oxidative stress by maintaining redox homeostasis (Shelton et al., 2005), as demonstrated by Poirier and co-workers (2018) studying *P. tricornutum* exposed to cadmium selenide nanocrystals. The down-regulation of these transcripts in our case suggests that FLG<sub>50mg</sub> exposure might be associated with a lower oxidative condition than in control. The down-regulation of oxidative stress management could be linked to the reduction of photosynthesis activity. Indeed, during photosynthesis, superoxide radicals production resulting in electron transfer from PS-I to oxygen is one of the major source of ROS generation in plants leading to oxidative damages (Ahmad et al., 2008). As a result of the marine diatom *P. tricornutum* acclimation to high light, Nymark and co-workers (2009) revealed the up-regulation of gene encoding for enzymes involved in photosynthetic pigment biosynthesis and genes encoding specific proteins involved in ROS scavenging. This supports the relationship between light intensity exposure and ROS production. In the case of FLG<sub>50mg</sub> exposure, we can hypothesize the reverse regulation process, where lower photosynthetic activity leads to a decrease in ROS production, then genes associated with oxidative stress were downregulated in order to reduced ROS scavenging.

A part of the plastid genome encodes for proteins involved in photosynthesis (Mullet, 1988). Among all plants, chlorophyll biosynthesis pathway starts in the cytoplasm with the



chloroplast glutamate tRNA, which after several enzymatic reactions forms the 5-aminolevulinic acid synthesis (Schön et al., 1986). This plastid encoded factor was found down-regulated in diatoms exposed to high FLG concentration (NP8573; Log2FC = -1.22). In our dataset, almost all protein complexes and enzymes involved in the chlorophyll biosynthetic pathway were down-regulated in diatoms exposed to high FLG concentration. Genes encoding for these proteins might be grouped and submitted to the same regulation process such as Rho termination factor previously discussed, found up-regulated in this condition. Genomic analysis undertaken by Yu and co-workers (2014) suggested that environmental stress, such as light, can induce the formation of functional modules by nuclear-encoded transcription factors which can mediate the regulation of plastid gene expression. This could be the case here, where Rho termination factor might be nuclear-encoded and act on chloroplast gene expression. Thus, we can hypothesize that the up-regulation of the transcript homologous with a Rho termination factor could be linked with the down-regulation of all DEGs encoding for enzymes involved in chlorophyll biosynthetic pathway.

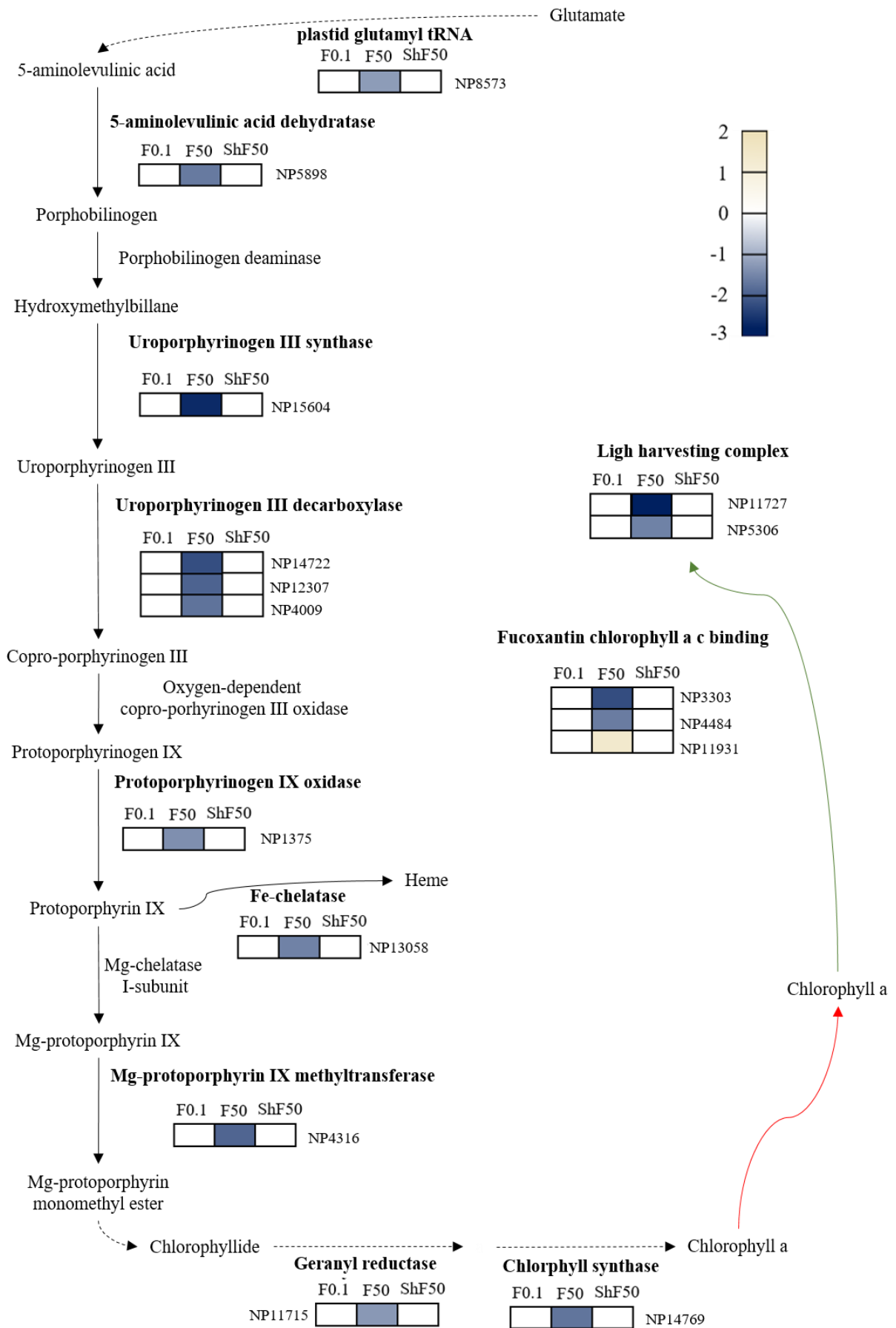


Figure 37. Chlorophyll *a* biosynthetic pathway in *N. palea* derived from Stenbaek and Jensen (2010)<sup>68</sup>. Coloured squares indicated the regulation of gene encoding for enzymes functioning (in bold) after 48h of exposure to FLG<sub>0.1mg</sub> (F0.1), FLG<sub>50mg</sub> (F50) and shading FLG<sub>50mg</sub> (ShF50). The scale on the right represents genes Log<sub>2</sub>FC value. Solid arrows indicate the conversion of each intermediate into the next and the involved enzymes are shown next one to each arrow. Dotted arrows indicate a reduction of chemical reaction to facilitate the reading of the figure. The red arrow indicates a transfer of chlorophyll *a* from cytoplasm to thylakoid membrane and the green arrow indicates a protein complex formation.

The analysis of transcript characterized by the CC GO category revealed a majority of transcripts (126 DEGs) encoding for proteins located in cell among which 57.1% were up-regulated transcripts ( $0.7 < \text{Log}_2\text{FC} < 4$ ). Assembly of two or more macromolecules (protein-containing complex) was also represented (99 DEGs) but with a majority of down-regulated transcripts (60.6%). An interesting result was found for transcripts involved in extracellular region and membrane (50 DEGs) with a majority of up-regulated transcripts (76%). In addition, the DEG with the highest overexpression encoded for a protein located in the extracellular matrix (NP12499, see Table 4). Among the extracellular proteins, adhesin protein (NP98), non-classical arabinogalactan 31 (AGP31) (NP11899), a lpxtg-motif cell wall anchor domain protein (NP486) and a filamentous hemagglutinin family N-terminal domain protein (NP29) were highly up-regulated ( $\text{Log}_2\text{FC} = 5$ ). AGP31 was found to be a proteoglycan that may contribute to the strengthening of cell walls in *Arabidopsis thaliana* (Hijazi et al., 2014). Willis et al. (2014) also hypothesized that a protein sharing weak similarities with AGP31 (PDC4) was involved in the adhesion of *P. tricornutum* directly on substrate. A protein homologous to a filamentous hemagglutinin domain was described as a bacterial adhesin, especially for the bacteria *Bordetella pertussis*, allowing for cellular adhesion (Weiss and Hewlett, 1986). Our results suggest that the excretion of proteins involved in adhesion process was highly activated in the FLG<sub>50mg</sub> direct exposure (Figure 36e-f).

Biofilm formation, by keeping cells close to each other, promote strong cells interactions including cell-cell communication and the formation of synergistic microconsortia (Flemming and Wingender, 2010). After the detection of environmental stress, marine diatoms cells are able to modulate infochemicals synthesis, such as nitric oxide, to induce cell-cell communication but also biofilm formation (Vardi, 2008). Thus, cell communication and adhesion process thanks to the EPS external production can both be consequences of environmental stress. Several molecular components of the extracellular matrix can be involved in the *N. palea* response to FLG<sub>50mg</sub> exposure, such as polysaccharides (in our dataset 9 chitin-binding protein were overexpressed in this condition), which are known to represent a non-negligible part of the EPS matrix (Bellinger et al., 2005), and specific protein

(adhesin and AGP31 for instance) (Willis et al., 2014). The induction of adhesive protein excretion as a response to the presence of high FLG concentration is consistent with previous nanotoxicological studies. Verneuil et al., (2015) demonstrated an EPS overproduction and excretion, especially the protein part of them, by *N. palea* exposed to carbon nanotubes. This is also supported by the observation of FLG sticking in the external matrix, which was already pointed as a mitigation to FLG toxicity (Garacci et al., 2017). Although EPS overproduction is a well-known mechanism occurring in a wide range of microorganisms exposed to many types of contaminants (Davies, 2003; Luongo and Zhang, 2010; Quigg et al., 2013), little is known about the structure, mechanisms and specificity of these over-produced EPS. Our study provided valuable insights into the biochemical characteristics of the EPS over-excreted by *N. palea* exposed to FLG. This defence mechanism may lead to a modification of biofilm composition with more extracellular matrix and less cells.

These results suggest a global alteration of biological processes regulation to engage a response to contaminant, which can reveal an adaptive response to high FLG concentration. The impact on catabolic process could reveal a modification of the energy produced by cells. As evocated in previous works (Garacci et al., 2017; Verneuil et al., 2014), diatoms could be able to induce energetic allocation from growth energy to EPS excretion pathway and response to stress in order to maintain a viable physiological level. Furthermore, the transcriptomic response suggesting an increase of extracellular proteins and polysaccharides production was only observed at high FLG concentration but not at low FLG concentration. The response between low and high FLG concentration was partly different and did not engage the same metabolic pathways. Slight transcriptomic response with low impact on the diatoms physiology was induced in low FLG concentration, whereas a clear stress was detected in high FLG concentration with light harvesting decrease and a significant toxicity linked to a growth inhibition. Signs of cellular damages probably linked to physical interactions with nanoparticles could occur at low and high concentration but EPS overproduction was only induced when diatoms were exposed to FLG<sub>50mg</sub> where wounds were actually observed.

#### *Diatoms exposed to FLG shading*

GO enrichment of DEGs in response to FLG<sub>50mg</sub> resulted in 12 BP with 8 down-regulated DEGs associated. One single DEG (NP10387, Log<sub>2</sub>FC = -2.2) described as an ubiquitin super

oxide dismutase participated in response to stress, response to chemical, cellular response to chemical, cellular detoxification and cellular metabolic processes. This protein is known to remove cellular superoxide radicals. The reduction of this mRNA expression suggested that cells response to oxidative stress was inhibited.

Major biological processes were primary, small molecule, organic substance and cellular metabolic process representing, taken together, 537 DEGs with expression level ranging from -2.3 to -1.5 of Log<sub>2</sub>FC. Functional description of the DEGs involved in these biological processes revealed the down-regulation of one DEG encoding for a glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) (NP4189), involved in glycolysis and gluconeogenesis processes. Enzymes involved in energetic metabolic pathways are represented in Figure 38 (Table S3 details the DEGs expression level and functional description). It was demonstrated that in *Neurospora* this enzyme activity was not influenced by environmental stresses such as nitrogen deprivation, high temperature or osmotic stress, but it was controlled by circadian clock, closely linked to light availability (Shinohara et al., 1998). Studies undertaken on *P. tricornutum* demonstrated that GAPDH was activated during dark period (Allen et al., 2008; Siaux et al., 2007), which correspond to a period of time not exceeding 24h. Nevertheless, in the case of *N. palea* exposed to 48h of shading FLG<sub>50mg</sub>, which is longer than a dark period, this enzyme was down-regulated. This observation suggests that the duration of light limited access induced a modification of carbon metabolic pathway. This metabolic adaptation could help to maintain a physiological homeostasis during light deprivation. This might be at the origin of cell growth rate decrease (Garacci et al., 2017).

In addition, functional analysis revealed the inhibition of the catabolic process and regulation of biological quality, modulating physical traits of an organism. In these biological processes, three DEGs were respectively associated with a long-chain fatty acid protein with a CoA ligase activity (NP206), an acyl-CoA dehydrogenase (NP6038), and a fatty acid oxidation alpha mitochondrial protein with a 3-hydroxyacyl-CoA dehydrogenase activity (NP3058). These three down-regulated DEGs were involved in the fatty acid beta-oxidation process which contribute to the production of energy from fatty acids, captured in the form of ATP. Another down-regulated DEG (NP14730) in this condition encoding for a 3-ketoacyl participated to several biological processes linked to the cellular organization and localization (establishment of localization and cellular component organization). The description and the MF of this putative protein, suggesting an acetyl-CoA C-acyltransferase activity, were in accordance with the activity of a 3-ketoacyl-CoA thiolase, also involved in the fatty acid beta

oxidation process. Thus we can hypothesize that the 3-ketoacyl protein described in our dataset is a 3-ketoacyl-CoA thiolase. This catabolic pathway provides the major source of energy for ATP production (Schulz, 1991), but to start the oxidation process, fatty acids must be activated by acyl CoA synthase to form acyl-CoA, which consumes ATP (Coleman et al., 2002; Suzuki et al., 1990). In the literature, the effect of environmental conditions, such as light intensity, nutrient availability and temperature, are known, for a long time, to influence the content and the composition of fatty acids in diatoms (Mortensen et al., 1988; Roessler, 1990). Exposition to high light intensity induced an accumulation of fatty acids in cells (Mortensen et al., 1988; Roessler, 1990), but in the case of shading FLG<sub>50mg</sub> exposure, with limited access to light, the reverse phenomenon occurred and could result in a decrease of fatty acid oxidation.

Moreover, a DEG corresponding to a homologous of isocitrate lyase (NP2633) was down-regulated in this condition. This protein is known to be a part of the glyoxylate cycle, resulting in the formation of succinate, generally involved in carbon source deprivation (Cronan, Jr. and Laporte, 2006), with ATP consumption (Kornberg and Madsen, 1958). This metabolic pathway is located in the peroxisome, where a part of oxidation reactions occur, as suggested by Kroth and co-workers (2008). The down-regulation of this enzyme could be linked to the inhibition of fatty acids beta oxidation that produces acetylCoA which is a substrate of the glyoxylate cycle. Another product of the glyoxylate cycle is the oxaloacetate (OAA) which is involved in numerous metabolic pathways such as fatty acids biosynthesis or gluconeogenesis process. A DEGs described as a gene encoding a phosphoenolpyruvate carboxykinase (PEPCK) (NP14613) was also down-regulated in shading FLG<sub>50mg</sub> condition. This enzyme, located in mitochondrion, catalyses the chemical reaction of OAA in phosphoenolpyruvate (PEP), which is a primary step to enter in the gluconeogenesis process and lipids production. No evidence of effect of light intensity on this enzyme activity was found in the literature but a study demonstrated the increase of transcripts associated with PEPCK during the induction of pH stress on a marine diatom (Mus et al., 2013). This suggest that once exposed to certain environmental stresses, such as pH or salinity, the induction of PEPCK allowed cells to manage stress. However, in the case of shading FLG<sub>50mg</sub> exposure, the under-expression of PEPCK could mean that diatoms were not able to undertake efficient response to the stress generated. Glyoxylate cycle is generally involved in the glucose production from lipids such as fatty acids, thanks to the OAA obtained. And yet, decarboxylation of OAA by the PEPCK generating PEP was also inhibited in this condition.

Our results highlighted that all these processes, needing energetic supply, were down-regulated suggesting a strong alteration of energetic metabolism of *N. palea* after 48h of shading FLG<sub>50mg</sub> exposure.

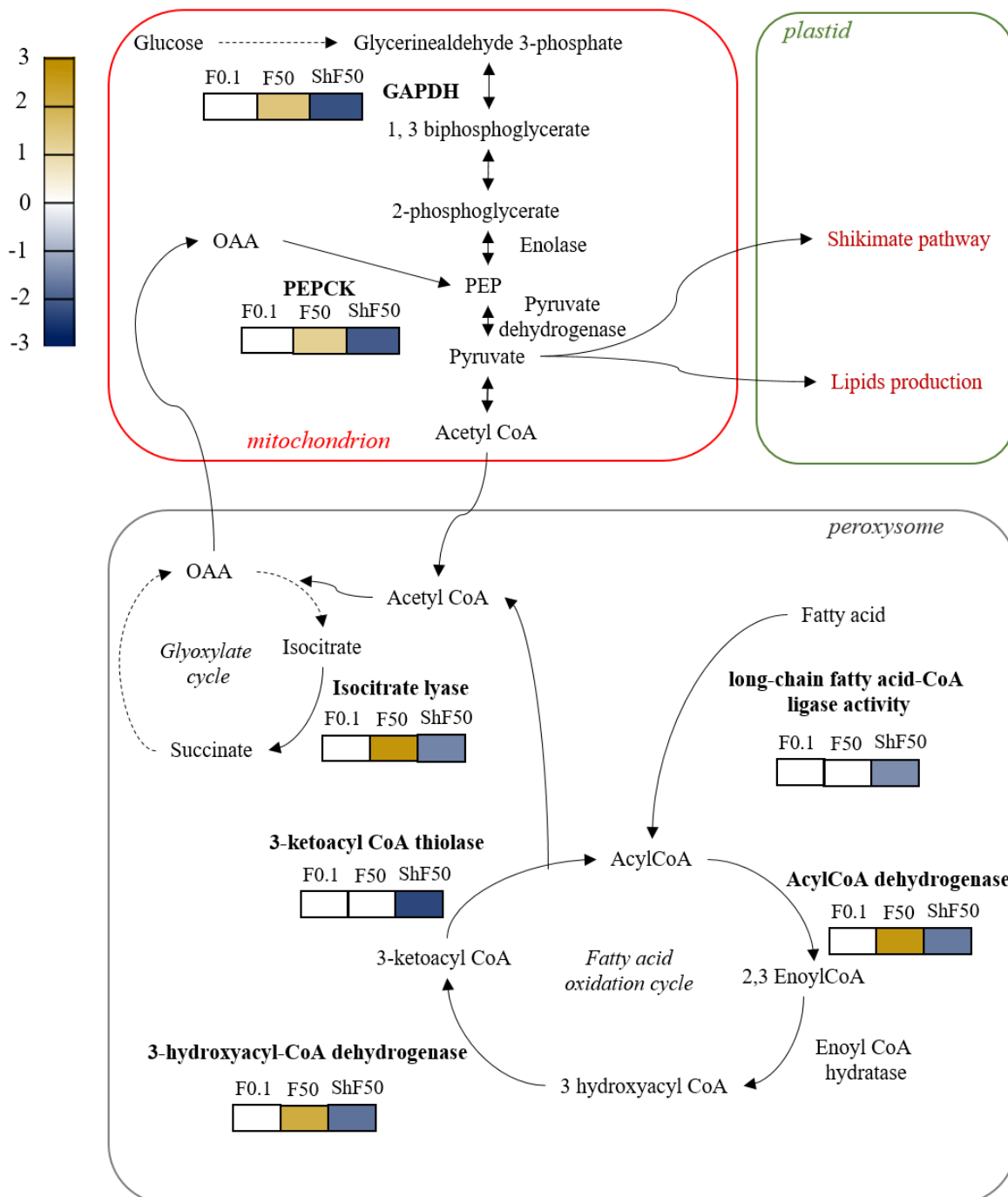


Figure 38. Hypothesized energetic metabolic pathways in *N. palea*. Colored squares indicated the regulation of gene encoding for enzymes functioning (in bold) after 48h of exposure to FLG0.1 (FLG<sub>0.1mg</sub>), FLG50 (FLG<sub>50mg</sub>) and ShF50 (shading FLG<sub>50mg</sub>). The scale on the left represents genes Log<sub>2</sub>FC value. Solid arrows indicate the conversion of each intermediate into the next one and the involved enzymes are shown next to each arrow. Dotted arrows indicate a reduction of chemical reaction to facilitate the reading of the figure. For simplicity, the number of organelle membranes has been reduced in this figure. This schematic view was adapted from Kroth and co-workers (2008) and Heydarizadeh et al., (2014).

FLG<sub>50mg</sub> shading seemed to more generally inhibit the energetic metabolism of diatoms despite the slight number of DEGs involved. The reduction of basic metabolism might evidence an energetic preservation waiting for optimal environmental conditions for proliferation. Interestingly, this downregulation mechanism was effective after 48h of FLG<sub>50mg</sub> shading exposure whereas it was undetected or even opposite after 48h of FLG<sub>50mg</sub> direct exposure (Figure 38). This phenomenon could be explained by the fact that under shading condition, cells response could not have an effective feedback on the shading stress. Indeed, in that case, cells were not in contact with nanoparticles and that sticking of FLG<sub>50mg</sub> in the extracellular matrix was not possible. An hypothesis could be that the down regulation mechanisms reported with FLG<sub>50mg</sub> shading might have occurred at the very beginning of the FLG<sub>50mg</sub> direct exposure, followed by a recovery of basal expression after FLG sticking associated with a clarification of the culture medium (i.e. mitigation of shading effect) before 48h (Garacci et al., 2017).

The stress induced in the shading and the direct FLG<sub>50mg</sub> exposure was absolutely not the same despite the presence of shared DEGs. A majority of these was up-regulated in direct exposure while they were all down-regulated in the shading exposure. The low percentage of similar DEGs regulated in the same way was mostly lost after the GO enrichment analysis. Contrary to the shading exposure, the direct contact of FLG<sub>50mg</sub> mostly up-regulated the transcription of DEGs involved in the fatty acids oxidation. Diatoms exposed to shading and direct FLG exposure exhibited a specific response to the stress caused by direct contact or shading, which could help to adapt their physiological functions. Production of extracellular proteins involved in the direct exposure was not found in the shading effect suggesting that the contact and/or the toxicity induced by direct exposure was at the origin of this response. Hence, the two exposure modalities used in this study made it possible to disentangle the FLG effects due to contact or shading.

#### 4.4 Conclusion

A transcriptomic approach was used to assess the effects of low and high FLG concentration in direct contact or in shading condition to identify the genes involved and the metabolic pathway affected in the different conditions. At low FLG concentration, close to anticipated environmental conditions, a slight transcriptomic response was induced in order to maintain the diatoms physiological state in accordance with the absence of growth inhibition. On the contrary, diatoms directly exposed to high FLG concentration exhibited a stronger



transcriptomic response with differentially expressed genes involved in cell division and response to stress. No oxidative stress was identified but a decrease in photosynthetic metabolism gene expression was noticed suggesting a decrease in primary production. At the ecosystem level, this could eventually lead to a reduction in resources for grazers. An increase of transcripts encoding extracellular proteins with a role in the cellular adhesion confirmed previous results showing a sticking of FLG nanoparticles in the EPS matrix. The accumulation of FLG nanoparticles in the biofilm may then represent a risk of bioaccumulation for upper organisms. Few DEGs were shared between diatoms exposed to low and high FLG concentration, but the biological processes and the metabolic pathways mainly differed except for cellular division induction. In the shading condition, light deprivation induced a global slowing down of the metabolic activity of *N. palea*. This study highlighted that the number of DEGs expressed in a condition did not reflect the cellular response. In fact, a low number of DEGs were detected in diatoms exposed to low FLG concentration and shading, and yet a growth inhibition was only observed in the shading condition. In transcriptomic analysis, the function of DEGs must be prioritized over the number of DEGs.

Overall, this study gave insights into the specific biological processes and pathways involved in diatoms response to different FLG concentrations and exposition conditions. Nevertheless, transcriptomic study on the species *N. palea* present limits because the paucity of genomic and transcriptomic data available on diatoms impact the annotation quality.

### ***Conflict of interest***

The authors report no conflict of interest.

### **Acknowledgments**

This project has received funding from the European Union's Horizon 2020 research and innovation programme under grant agreement No 696656. Financial support for this study provided by the French Ministry of Higher Education and Research (PhD grant N°2015-73).

## References

- Ahmad, P., Sarwat, M., Sharma, S., 2008. Reactive oxygen species, antioxidants and signaling in plants. *J. Plant Biol.* 51, 167–173. <https://doi.org/10.1007/BF03030694>
- Ahmed, F., Rodrigues, D.F., 2013. Investigation of acute effects of graphene oxide on wastewater microbial community : A case study. *J. Hazard. Mater.* 256–257, 33–39. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2013.03.064>
- Alexa, A., Rahnenführer, J., 2018. Gene set enrichment analysis with topGO.
- Allen, A.E., LaRoche, J., Maheswari, U., Lommer, M., Schauer, N., Lopez, P.J., Finazzi, G., Fernie, A.R., Bowler, C., 2008. Whole-cell response of the pennate diatom *Phaeodactylum tricornutum* to iron starvation. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 105, 10438–10443. <https://doi.org/10.1073/pnas.0711370105>
- Andrade, L.R., Leal, R.N., Nosedá, M., Duarte, M.E.R., Pereira, M.S., Mourão, P.A.S., Farina, M., Amado Filho, G.M., 2010. Brown algae overproduce cell wall polysaccharides as a protection mechanism against the heavy metal toxicity. *Mar. Pollut. Bull.* 60, 1482–1488. <https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2010.05.004>
- Arai, H., Koizumi, H., Aoki, J., Inoue, K., 2002. Platelet-Activating Acetylhydrolase (PAF-AH). *J. Biochem.* 131, 635–640. [https://doi.org/10.1016/S0090-6980\(02\)00023-0](https://doi.org/10.1016/S0090-6980(02)00023-0)
- Armbrust, E.V., Berges, J.A., Bowler, C., Green, B.R., Martinez, D., Putnam, N.H., Zhou, S., Allen, A.E., Apt, K.E., Bechner, M., Brzezinski, M.A., Chaal, B.K., Chiovitti, A., Davis, A.K., Demarest, M.S., Detter, J.C., Glavina, T., Goodstein, D., Hadi, M.Z., Hellsten, U., Hildebrand, M., Jenkins, B.D., Lau, W.W.Y., Lane, T.W., Larimer, F.W., Lippmeier, J.C., Lucas, S., Montsant, A., Obornik, M., Parker, M.S., Palenik, B., Pazour, G.J., Richardson, P.M., Rynearson, T.A., Saito, M.A., Schwartz, D.C., Thamatrakoln, K., Valentin, K., Vardi, A., Wilkerson, F.P., Rokhsar, D.S., 2004. The Genome of the Diatom. *Sciences (New York)*. 306, 79–87.
- Bellinger, B.J., Abdullahi, A.S., Gretz, M.R., Underwood, G.J.C., 2005. Biofilm polymers: Relationship between carbohydrate biopolymers from estuarine mudflats and unialgal cultures of benthic diatoms. *Aquat. Microb. Ecol.* 38, 169–180. <https://doi.org/10.3354/ame038169>
- Binns, D., Dimmer, E.C., Huntley, R.P., Barrell, D.G., Binns, D., Apweiler, R., 2009. QuickGO: a web-based tool for Gene Ontology searching. *Bioinformatics* 25, 3045–3046. <https://doi.org/10.1002/pmic.200800002>
- Boverhof, D.R., Bramante, C.M., Butala, J.H., Clancy, S.F., Lafranconi, W.M., West, J., Gordon, S.C., 2015. Comparative assessment of nanomaterial definitions and safety evaluation considerations. *Regul. Toxicol. Pharmacol.* 73, 137–150. <https://doi.org/10.1016/j.yrtph.2015.06.001>
- Bowler, C., Allen, A.E., Badger, J.H., Grimwood, J., Jabbari, K., Kuo, A., Maheswari, U., Martens, C., Maumus, F., Otiillar, R.P., Rayko, E., Salamov, A., Vandepoele, K., Beszteri, B., Gruber, A., Heijde, M., Katinka, M., Mock, T., Berges, J.A., Brownlee, C., Cadoret, J., Chiovitti, A., Valentin, K., Choi, C.J., Coesel, S., Martino, A. De, Detter, J.C., Durkin, C., Falciatore, A., Lopez, P.J., Lucas, S., Lindquist, E., Lommer, M., Napoli, C., Obornik, M., Parker, M.S., Petit, J., Porcel, B.M., 2008. The *Phaeodactylum* genome reveals the evolutionary history of diatom genomes. *Nature* 456, 239–244. <https://doi.org/10.1038/nature07410>
- Brownson, D.A.C., Kampouris, D.K., Banks, C.E., 2011. An overview of graphene in energy production and storage applications. *J. Power Sources* 196, 4873–4885. <https://doi.org/10.1002/9783527665105.ch5>
- Brumfiel, G., 2006. Consumer products leap aboard the nano bandwagon. *Nature* 440, 262.

<https://doi.org/10.1038/440262b>

- Cabau, C., Escudié, F., Djari, A., Guiguen, Y., Bobe, J., Klopp, C., 2017. Compacting and correcting Trinity and Oases RNA-Seq de novo assemblies. *PeerJ*. <https://doi.org/10.7717/peerj.2988>
- Carvalho, R.N., Bopp, S.K., Lettieri, T., 2011. Transcriptomics responses in marine diatom *Thalassiosira pseudonana* exposed to the polycyclic aromatic hydrocarbon benzo[a]pyrene. *PLoS One* 6, e26985. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0026985>
- Chen, H., 2014. Generate High-Resolution Venn and Euler Plots. [https://doi.org/10.1163/\\_q3\\_SIM\\_00374](https://doi.org/10.1163/_q3_SIM_00374)
- Chi, W., He, B., Manavski, N., Mao, J., Ji, D., Lu, C., Rochaix, J.D., Meurer, J., Zhang, L., 2014. RHON1 Mediates a Rho-Like Activity for Transcription Termination in Plastids of *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell*. <https://doi.org/10.1105/tpc.114.132118>
- Coleman, R. a, Lewin, T.M., Van Horn, C.G., Gonzalez-Baró, M.R., 2002. Do long-chain acyl-CoA synthetases regulate fatty acid entry into synthetic versus degradative pathways? *J. Nutr.* 132, 2123–2126. <https://doi.org/10.1093/jn/132.8.2123>
- Cronan, Jr., J.E., Laporte, D., 2006. Tricarboxylic Acid Cycle and Glyoxylate Bypass. *EcoSal Plus* 1. <https://doi.org/10.1128/ecosalplus.3.5.2>
- Das, A., Court, D.O.N., Adhya, S., 1976. Isolation and characterization of conditional lethal mutants of *Escherichia coli* defective in transcription termination factor rho. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 73, 1959–1963.
- Davies, D., 2003. Understanding biofilm resistance to antibacterial agents. *Nat. Rev. Drug Discov.* 2, 114–122. <https://doi.org/10.1038/nrd1008>
- Deng, S., Jia, P.-P., Zhang, J.-H., Junaid, M., Niu, A., Ma, Y.-B., Fu, A., Pei, D.-S., 2018. Transcriptomic response and perturbation of toxicity pathways in zebrafish larvae after exposure to graphene quantum dots (GQDs). *J. Hazard. Mater.* 357, 146–158. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2018.05.063>
- Falkowski, P.G., Katz, M.E., Knoll, A.H., Quigg, A., Raven, J. a, Schofield, O., Taylor, F.J.R., 2004. The Evolution of Modern Eukaryotic. *Science* (80-. ). 305, 354–360. <https://doi.org/10.1126/science.1095964>
- Feng, L., Liu, Z., 2011. Graphene in biomedicine: opportunities and challenges. *Nanomedicine (Lond)*. 6, 317–324. <https://doi.org/10.2217/nnm.10.158>
- Ferris, P.J., Woessner, J.P., Waffenschmidt, S., Kilz, S., Drees, J., Goodenough, U.W., 2001. Glycosylated Polyrproline II Rods with Kinks as a Structural Motif in Plant Hydroxyproline-Rice Glycoproteins. *Biochemistry* 40, 2978–2987. <https://doi.org/10.1021/bi0023605>
- Flemming, H., Wingender, J., 2010. The biofilm matrix. *Nature* 8, 623–633. <https://doi.org/10.1002/9783527620944.ch4>
- Freixa, A., Acuña, V., Sanchís, J., Farré, M., Barceló, D., Sabater, S., 2018. Ecotoxicological effects of carbon based nanomaterials in aquatic organisms. *Sci. Total Environ.* 619–620, 328–337. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2017.11.095>
- Garacci, M., Barret, M., Mouchet, F., Sarrieu, C., Lonchambon, P., Flahaut, E., Gauthier, L., Silvestre, J., Pinelli, E., 2017. Few Layer Graphene sticking by bio film of freshwater diatom *Nitzschia palea* as a mitigation to its ecotoxicity. *Carbon N. Y.* 113, 139–150. <https://doi.org/10.1016/j.carbon.2016.11.033>
- Götz, S., García-Gómez, J.M., Terol, J., Williams, T.D., Nagaraj, S.H., Nueda, M.J., Robles, M., Talón, M., Dopazo, J., Conesa, A., 2008. High-throughput functional annotation and data mining with the Blast2GO suite. *Nucleic Acids Res.* 36, 3420–3435. <https://doi.org/10.1093/nar/gkn176>

- Haas, B.J., Papanicolaou, A., Yassour, M., Grabherr, M., Philip, D., Bowden, J., Couger, M.B., Eccles, D., Li, B., Macmanes, M.D., Ott, M., Orvis, J., Pochet, N., Strozzi, F., Weeks, N., Westerman, R., William, T., Dewey, C.N., Henschel, R., LeDuc, R.D., Friedman, N., Regev, A., 2013. De novo transcript sequence reconstruction from RNA-seq: reference generation and analysis with Trinity. *Nat Protoc.* 8, 1–43. <https://doi.org/10.1038/nprot.2013.084>.De
- Heydarizadeh, P., Marchand, J., Chenais, B., Sabzalian, M.R., Zahedi, M., Moreau, B., Schoefs, B., 2014. Functional investigations in diatoms need more than a transcriptomic approach. *Diatom Res.* 29, 75–89. <https://doi.org/10.1080/0269249X.2014.883727>
- Hijazi, M., Roujol, D., Nguyen-Kim, H., Del Rocio Cisneros Castillo, L., Saland, E., Jamet, E., Albenne, C., 2014. Arabinogalactan protein 31 (AGP31), a putative network-forming protein in *Arabidopsis thaliana* cell walls? *Ann. Bot.* 114, 1087–1097. <https://doi.org/10.1093/aob/mcu038>
- Hook, S.E., Osborn, H.L., Gissi, F., Moncuquet, P., Twine, N.A., Wilkins, M.R., Adams, M.S., 2014. RNA-Seq analysis of the toxicant-induced transcriptome of the marine diatom, *Ceratoneis closterium*. *Mar. Genomics* 16, 45–53. <https://doi.org/10.1016/j.margen.2013.12.004>
- Hu, X., Gao, Y., Fang, Z., 2016. Integrating metabolic analysis with biological endpoints provides insight into nanotoxicological mechanisms of graphene oxide: From effect onset to cessation. *Carbon N. Y.* 109, 65–73. <https://doi.org/10.1016/j.carbon.2016.07.068>
- Hu, X., Lu, K., Mu, L., Kang, J., Zhou, Q., 2014. Interactions between graphene oxide and plant cells: Regulation of cell morphology, uptake, organelle damage, oxidative effects and metabolic disorders. *Carbon N. Y.* 80, 665–676. <https://doi.org/10.1016/j.carbon.2014.09.010>
- Hu, X., Zhou, Q., 2013. Health and ecosystem risks of graphene. *Chem. Rev.* 113, 3815–3835. <https://doi.org/10.1021/cr300045n>
- Huang, X., Yin, Z., Wu, S., Qi, X., He, Q., Zhang, Q., Yan, Q., Boey, F., Zhang, H., 2011. Graphene-based materials: Synthesis, characterization, properties, and applications. *Small* 7, 1876–1902. <https://doi.org/10.1002/sml.201002009>
- Kaplan, D.L., O'Donnell, M., 2003. Rho factor: Transcription termination in four steps. *Curr. Biol.* 13, 714–716. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2003.08.047>
- Kornberg, H.L., Madsen, N.B., 1958. The metabolism of C<sub>2</sub> compounds in micro-organisms. 3. Synthesis of malate from acetate via the glyoxylate cycle. *Biochem. J.* 68, 549–557. <https://doi.org/10.1042/bj0680549>
- Kröger, N., Bergsdorf, C., Sumper, M., 1996. Frustulins : domain conservation in a protein family associated with diatom cell walls. *Eur. J. Biochem.* 239, 259–264. <https://doi.org/10.1145/2745234.2746980>
- Kröger, N., Lehmann, G., Rachel, R., Sumper, M., 1997. Characterization of a 200-kDa diatom protein that is specifically associated with a silica-based substructure of the cell wall. *Eur. J. Biochem.* 250, 99–105. <https://doi.org/10.1111/j.1432-1033.1997.00099.x>
- Kroth, P.G., Chiovitti, A., Gruber, A., Martin-Jezequel, V., Mock, T., Parker, M.S., Stanley, M.S., Kaplan, A., Caron, L., Weber, T., Maheswari, U., Armbrust, E.V., Bowler, C., 2008. A Model for Carbohydrate Metabolism in the Diatom *Phaeodactylum tricornutum* Deduced from Comparative Whole Genome Analysis. *PLoS One* 3, e1426. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0001426>
- Lee, C., Wei, X., Kysar, J.W., Hone, J., 2008. Measurement of the elastic properties and intrinsic strength of monolayer graphene. *Science* (80-. ). 321, 385–388. <https://doi.org/10.1126/science.1157996>
- Li, B., Dewey, C.N., 2011. RSEM: Accurate transcript quantification from RNA-Seq data with or without a reference genome. *BMC Bioinformatics* 12, 1–16. <https://doi.org/10.1186/1471-2105->

- Lommer, M., Specht, M., Roy, A.S., Kraemer, L., Andreson, R., Gutowska, M.A., Wolf, J., Bergner, S. V., Schilhabel, M.B., Klostermeier, U.C., Beiko, R.G., Rosenstiel, P., Hippler, M., LaRoche, J., 2012. Genome and low-iron response of an oceanic diatom adapted to chronic iron limitation. *Genome Biol.* 13. <https://doi.org/10.1186/gb-2012-13-7-r66>
- Love, M.I., Huber, W., Anders, S., 2014. Moderated estimation of fold change and dispersion for RNA-seq data with DESeq2. *Genome Biol.* 15, 1–21. <https://doi.org/10.1186/s13059-014-0550-8>
- Luongo, L.A., Zhang, X., 2010. Toxicity of carbon nanotubes to the activated sludge process. *J. Hazard. Mater.* 178, 356–362. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2010.01.087>
- Matson, S.W., Bean, D.W., George, J.W., 1993. DNA Helicases: Enzymes with Essential Roles in All Aspects of DNA Metabolism. *BioEssays* 16, 13–22. <https://doi.org/10.1002/bies.950160103>
- Mock, T., Otilar, R.P., Strauss, J., McMullan, M., Paajanen, P., Schmutz, J., Salamov, A., Sanges, R., Toseland, A., Ward, B.J., Allen, A.E., Dupont, C.L., Frickenhaus, S., Maumus, F., Veluchamy, A., Wu, T., Barry, K.W., Falciatore, A., Ferrante, M.I., Fortunato, A.E., Glöckner, G., Gruber, A., Hipkin, R., Janech, M.G., Kroth, P.G., Leese, F., Lindquist, E.A., Lyon, B.R., Martin, J., Mayer, C., Parker, M., Quesneville, H., Raymond, J.A., Uhlig, C., Valas, R.E., Valentin, K.U., Worden, A.Z., Armbrust, E.V., Clark, M.D., Bowler, C., Green, B.R., Moulton, V., Van Oosterhout, C., Grigoriev, I. V., 2017. Evolutionary genomics of the cold-Adapted diatom *Fragilariopsis cylindrus*. *Nature* 541, 536–540. <https://doi.org/10.1038/nature20803>
- Moisset, S., Tiam, S.K., Feurtet-Mazel, A., Morin, S., Delmas, F., Mazzella, N., Gonzalez, P., 2015. Genetic and physiological responses of three freshwater diatoms to realistic diuron exposures. *Environ. Sci. Pollut. Res.* 22, 4046–4055. <https://doi.org/10.1007/s11356-014-3523-2>
- Montsant, A., Allen, A.E., Coesel, S., Martino, A. De, Falciatore, A., Mangogna, M., Siaut, M., Heijde, M., Jabbari, K., Maheswari, U., Rayko, E., Vardi, A., Apt, K.E., Berges, J.A., Chiovitti, A., Davis, A.K., Thamtrakoln, K., Hadi, M.Z., Lane, T.W., Lippmeier, J.C., Martinez, D., Parker, M.S., Pazour, G.J., Saito, M.A., Rokhsar, D.S., 2007. IDENTIFICATION AND COMPARATIVE GENOMIC ANALYSIS OF SIGNALING AND REGULATORY COMPONENTS IN THE DIATOM THALASSIOSIRA PSEUDONANA 1 604, 585–604. <https://doi.org/10.1111/j.1529-8817.2007.00342.x>
- Mortensen, S.H., Børshheim, K.Y., Rainuzzo, J., Knutsen, G., 1988. Fatty acid and elemental composition of the marine diatom *Chaetoceros gracilis* Schütt. Effects of silicate deprivation, temperature and light intensity. *J. Exp. Mar. Bio. Ecol.* 122, 173–185. [https://doi.org/10.1016/0022-0981\(88\)90183-9](https://doi.org/10.1016/0022-0981(88)90183-9)
- Mortimer, M., Devarajan, N., Li, D., Holden, P.A., 2018. Multiwall Carbon Nanotubes Induce More Pronounced Transcriptomic Responses in *Pseudomonas aeruginosa* PG201 than Graphene, Exfoliated Boron Nitride, or Carbon Black. *ACS Nano* 12, 2728–2740. <https://doi.org/10.1021/acsnano.7b08977>
- Mottier, A., Mouchet, F., Laplanche, C., Cadarsi, S., Lagier, L., Arnault, J., Girard, H.A., Leon, V., Vazquez, E., Sarrieu, C., Pinelli, E., Gauthier, L., Flahaut, E., 2016. Surface Area of Carbon Nanoparticles: A Dose Metric for a More Realistic Ecotoxicological Assessment. *Nano. Lett.* 16, 3514–3518. <https://doi.org/10.1021/acs.nanolett.6b00348>
- Muhseen, Z.T., Xiong, Q., Chen, Z., Ge, F., 2015. Proteomics studies on stress responses in diatoms. *Proteomics* 15, 3943–3953. <https://doi.org/10.1002/pmic.201500165>
- Mullet, J.E., 1988. Chloroplast Development and Gene Expression. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 39, 475–502. [https://doi.org/10.1016/0014-5793\(79\)80667-5](https://doi.org/10.1016/0014-5793(79)80667-5)
- Mus, F., Toussaint, J.-P., Cooksey, K.E., Fields, M.W., Gerlach, R., Peyton, B.M., Carlson, R.P., 2013. Physiological and molecular analysis of carbon source supplementation and pH stress-

- induced lipid accumulation in the marine diatom *Phaeodactylum tricornutum*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 97, 3625–3642. <https://doi.org/10.1007/s00253-013-4747-7>
- Nair, R.R., Blake, P., Grigorenko, A.N., Novoselov, K.S., Booth, T.J., Stauber, T., Peres, N.M.R., Geim, A.K., 2008. Fine Structure Constant Defines visual Transparency of Graphene. *Science* (80-. ). 320, 1308.
- Nanjappa, D., Sanges, R., Ferrante, M.I., Zingone, A., 2017. Diatom flagellar genes and their expression during sexual reproduction in *Leptocylindrus danicus*. *BMC Genomics* 18, 813. <https://doi.org/10.1186/s12864-017-4210-8>
- Nel, A., Xia, T., Mädler, L., Li, N., 2006. Toxic Potential of Materials at the Nanolevel. *Science* (80-. ). 311, 622–627. <https://doi.org/10.1126/science.1114397>
- Neuwirth, E., 2005. The RColorBrewer Package.
- Nymark, M., Valle, K.C., Brembu, T., Hancke, K., Winge, P., Andresen, K., Johnsen, G., Bones, A.M., 2009. An integrated analysis of molecular acclimation to high light in the marine diatom *Phaeodactylum tricornutum*. *PLoS One* 4. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0007743>
- Parker, M.S., Mock, T., Armbrust, E.V., 2008. Genomic Insights into Marine Microalgae. *Annu. Rev. Genet.* 42, 619–645. <https://doi.org/10.1146/annurev.genet.42.110807.091417>
- Petersen, E.J., Henry, T.B., Zhao, J., MacCusprie, R.I., Kirschling, T.L., Dobrovolskaia, M.A., Hackley, V., Xing, B., White, J.C., 2014. Identification and avoidance of potential artifacts and misinterpretations in nanomaterial ecotoxicity measurements. *Environ. Sci. Technol.* 48, 4226–4246. <https://doi.org/10.1021/es4052999>
- Pitkethly, M.J., 2004. Nanomaterials - The driving force. *NanoToday* 7, 20–29. [https://doi.org/10.1016/S1369-7021\(04\)00627-3](https://doi.org/10.1016/S1369-7021(04)00627-3)
- Pohnert, G., 2000. Wound-activated chemical defense in unicellular planktonic algae. *Angew. Chemie - Int. Ed.* 39, 4352–4354. [https://doi.org/10.1002/1521-3773\(20001201\)39:23<4352::AID-ANIE4352>3.0.CO;2-U](https://doi.org/10.1002/1521-3773(20001201)39:23<4352::AID-ANIE4352>3.0.CO;2-U)
- Poirier, I., Pallud, M., Kuhn, L., Hammann, P., Demortière, A., Jamali, A., Chicher, J., Caplat, C., Gallon, R.K., Bertrand, M., 2018. Toxicological effects of CdSe nanocrystals on the marine diatom *Phaeodactylum tricornutum*: The first mass spectrometry-based proteomic approach. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 152, 78–90. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2018.01.043>
- Poynton, H.C., Vulpe, C.D., 2009. Ecotoxicogenomics: emerging technologies for emerging contaminants 1. *J. Am. Water Resour. Assoc.* 45, 83–96. <https://doi.org/10.1111/j.1752-1688.2008.00291.x>
- Quigg, A., Chin, W., Chen, C., Zhang, S.-J., Jiang, Y., Miao, A., Schwehr, K. a, Xu, C., Santschi, P.H., 2013. Direct and Indirect Toxic Effects of Engineered Nanoparticles on Algae: Role of Natural Organic Matter. *Sustain. Chem. Eng.* 1, 686–702. <https://doi.org/10.1021/sc400103x>
- R Core Team, 2013. R: a language and environment for statistical computing. R Found. Stat. Comput. Vienna, Austria.
- Roessler, P.G., 1990. Environmental Control of Glycerolipid Metabolism in Microalgae: Commercial Implications and Future Research Directions. *J. Phycol.* 26, 393–399. <https://doi.org/10.1111/j.0022-3646.1990.00393.x>
- Schön, A., Krupp, G., Gough, S., Berry-Lowe, S., Kannangara, C.G., Söll, D., 1986. The RNA required in the first step of chlorophyll biosynthesis is a chloroplast glutamate tRNA. *Nature* 322, 281–284. <https://doi.org/10.1038/322281a0>
- Schulz, H., 1991. Beta oxidation of fatty acids. *Biochim. Biophys. Acta* 1081, 109–120. [https://doi.org/10.1016/0005-2760\(91\)90015-A](https://doi.org/10.1016/0005-2760(91)90015-A)

- Shelton, M.D., Boon Chock, P., Mieyal, J.J., 2005. Glutaredoxin: Role in Reversible Protein S-Glutathionylation and Regulation of Redox Signal Transduction and Protein Translocation. *Antioxyd. Redox Signal.* 7, 348–367. <https://doi.org/10.1089/ars.2005.7.348>
- Shinohara, M.L., Loros, J.J., Dunlap, J.C., 1998. Glyceraldehyde-3-phosphate Dehydrogenase Is Regulated on a Daily Basis by the Circadian Clock. *J. Biol. Chem.* 273, 446–452. <https://doi.org/10.1073/pnas.0711370105>
- Siaut, M., Heijde, M., Mangogna, M., Montsant, A., Coesel, S., Allen, A., Manfredonia, A., Falciatore, A., Bowler, C., 2007. Molecular toolbox for studying diatom biology in *Phaeodactylum tricornutum*. *Gene* 406, 23–35. <https://doi.org/10.1016/j.gene.2007.05.022>
- Stenbaek, A., Jensen, P.E., 2010. Redox regulation of chlorophyll biosynthesis. *Phytochemistry* 71, 853–859. <https://doi.org/10.1016/j.phytochem.2010.03.022>
- Suzuki, H., Kawarabayasi, Y., Kondo, J., Abe, T., Nishikawa, K., Kimura, S., Hashimoto, T., Yamamoto, T., 1990. Structure and regulation of rat long-chain acyl-CoA synthetase. *J. Biol. Chem.* 265, 8681–8685.
- Thebault, P., Boutin, G., Bhat, W., Rufiange, A., Martens, J., Nourani, A., 2011. Transcription Regulation by the Noncoding RNA SRG1 Requires Spt2-Dependent Chromatin Deposition in the Wake of RNA Polymerase II. *Mol. Cell. Biol.* 31, 1288–1300. <https://doi.org/10.1128/MCB.01083-10>
- Tuteja, N., Ahmad, P., Panda, B.B., Tuteja, R., 2009. Genotoxic stress in plants: Shedding light on DNA damage, repair and DNA repair helicases. *Mutat. Res. - Rev. Mutat. Res.* 681, 134–149. <https://doi.org/10.1016/j.mrrev.2008.06.004>
- Vance, M.E., Kuiken, T., Vejerano, E.P., McGinnis, S.P., Hochella, M.F., Rejeski, D., Hull, M.S., 2015. Nanotechnology in the real world: Redeveloping the nanomaterial consumer products inventory. *Beilstein J. Nanotechnol.* 6, 1769–1780. <https://doi.org/10.3762/bjnano.6.181>
- Vardi, A., 2008. Cell signaling in marine diatoms. *Commun. Integr. Biol.* 1, 134–136. <https://doi.org/10.4161/cib.1.2.6867>
- Verneuil, L., Silvestre, J., Mouchet, F., Flahaut, E., Boutonnet, J., Bourdiol, F., Bortolamiol, T., Baqué, D., Gauthier, L., Pinelli, E., 2014. Multi-walled carbon nanotubes, natural organic matter, and the benthic diatom *Nitzschia palea*: “A sticky story.” *Nanotoxicology* 9, 119–229. <https://doi.org/10.3109/17435390.2014.918202>
- Verneuil, L., Silvestre, J., Randrianjatovo, I., Maracato-romain, C.-E., Girbal-Neuhauser, E., Mouchet, F., Flahaut, E., Gauthier, L., Pinelli, E., 2015. Double walled carbon nanotubes promote the overproduction of extracellular protein-like polymers in *Nitzschia palea*: An adhesive response for an adaptive issue. *Carbon N. Y.* 88, 113–125. <https://doi.org/10.1016/j.carbon.2015.02.053>
- Villeneuve, D.L., Garcia-Reyero, N., 2011. Vision & strategy: Predictive ecotoxicology in the 21st century. *Environ. Toxicol. Chem.* 30, 1–8. <https://doi.org/10.1002/etc.396>
- Wang, Q., Zhao, S., Zhao, Y., Wang, D., 2014. Toxicity and translocation of graphene oxide in *Arabidopsis* plants under stress conditions. *RSC Adv.* 4, 60891–60901. <https://doi.org/10.1039/C4RA10621K>
- Wang, X., Zhi, L., Müllen, K., 2008. Transparent, conductive graphene electrodes for dye-sensitized solar cells. *Nano Lett.* 8, 323–327. <https://doi.org/10.1021/nl072838r>
- Warnes, G.R., Bolker, B., Bonebakker, L., Gentleman, R., Huber, W., Liaw, A., 2009. Various R programming tools for plotting data. *R Packag. version 2*, 1.
- Watanabe, T., Asai, K., Houki, A., 1986. Numerical estimation to organic pollution of flowing water by using the Epilithic Diatom Assemblage -Diatom Assemblage Index (DAIpo)-. *Sci. Total*

Environ. 55, 209–218.

- Weiss, A.A., Hewlett, E.L., 1986. Virulence factors of bordetella pertussis. *Ann. Rev. Microbiol.* 40, 661–686. <https://doi.org/0066-4227/86/1001-0661> \$02. 00 661
- Willis, A., Eason-Hubbard, M., Hodson, O., Maheswari, U., Bowler, C., Wetherbee, R., 2014. Adhesion molecules from the diatom *Phaeodactylum tricornutum* (Bacillariophyceae): Genomic identification by amino-acid profiling and in vivo analysis. *J. Phycol.* 50, 837–849. <https://doi.org/10.1111/jpy.12214>
- Yan, Z., Nika, D.L., Balandin, A.A., 2015. Thermal properties of graphene and few-layer graphene: applications in electronics. *IET Circuits, Devices Syst.* 9, 4–12. <https://doi.org/10.1049/iet-cds.2014.0093>
- Yu, Q.-B., Huang, C., Yang, Z.-N., 2014. Nuclear-encoded factors associated with the chloroplast transcription machinery of higher plants. *Front. Plant Sci.* 5, 1–10. <https://doi.org/10.3389/fpls.2014.00316>
- Zheng, M., Jagota, A., Semke, E.D., Diner, B.A., McLean, R.S., Lustig, S.R., Richardson, R.E., Tassi, N.G., 2003. DNA-assisted dispersion and separation of carbon nanotubes. *Nat. Mater.* 2, 338–342. <https://doi.org/10.1038/nmat877>
- Zhou, Q., Hu, X., 2017. Systemic Stress and Recovery Patterns of Rice Roots in Response to Graphene Oxide Nanosheets. *Environ. Sci. Technol.* 51, 2022–2030. <https://doi.org/10.1021/acs.est.6b05591>
- Zhu, Y., Murali, S., Cai, W., Li, X., Suk, J.W., Potts, J.R., Ruoff, R.S., 2010. Graphene and graphene oxide: Synthesis, properties, and applications. *Adv. Mater.* 22, 3906–3924. <https://doi.org/10.1002/adma.201001068>



Supplementary information for the article *Transcriptomic response of the benthic freshwater diatom Nitzschia palea exposed to Few Layer Graphene*

Table S1. Identification and description of the top 30 up and down-regulated DEGs in *N. palea* exposed to FLG<sub>50mg</sub>.

DEG identification	Description	Log2FC	E-value
NP12499	extracellular matrix	5,82	2.32395E-10
NP29	filamentous hemagglutinin family N-terminal domain	5,06	1.40079E-49
NP7579	ubiquitin thioesteraseVirion core	5,06	2.94065E-13
NP10895	SPT2 homolog	4,96	5.95629E-92
NP9382	Rho termination factor	4,45	7.3469E-16
NP13398	vegetative cell wall gp1-like	4,31	2.4908E-20
NP11576	vegetative cell wall gp1-like	4,14	1.44095E-37
NP11926	winged helix DNA-binding domain-containing	3,86	6.40682E-17
NP486	lpxtg-motif cell wall anchor domain	3,81	2.60566E-19
NP98	adhesin [	3,79	1.50536E-53
NP2579	pyridine nucleotide-disulfide oxidoreductase	3,72	3.77326E-160
NP11899	non-classical arabinogalactan 31 (peptidoglycane)	3,70	1.34501E-37
NP10091	filamentous hemagglutinin family N-terminal domain	3,68	7.20383E-56
NP12002	axoneme-associated mst101(2)-like isoform X2	3,63	1.56664E-29
NP140	beta strand repeat-containing	3,62	1.96448E-168
NP4006	possible RNA polymerase sigma factor	3,51	5.48801E-12
NP12165	5 -3 exoribonuclease 1	3,51	0.0
NP12360	family 18 chitinase	3,40	4.59927E-22
NP13781	DNA-binding heat shock factor	3,30	6.41012E-18
NP13331	autotransporter-associated beta strand repeat	3,26	4.11169E-26
NP5512	hypothetical protein THAOC_30976, partial	3,24	1.44114E-107
NP4857	glycosyl transferase family 8	3,23	2.35408E-37
NP12374	choice-of-anchor A domain-containing	3,19	5.49928E-114
NP11654	basic proline-rich -	3,15	7.52329E-103
NP4074	patatin-like phospholipase domain-containing 2 isoform X1	3,14	1.44665E-52
NP1265	hypothetical protein FisN_12Lh033	3,14	9.76254E-43
NP3505	cell surface receptor	3,06	1.51773E-76
NP15068	hypothetical protein FRACYDRAFT_251158	3,05	1.12553E-29
NP12543	filamentous hemagglutinin family N-terminal domain	3,02	2.12447E-116
NP97	DUF3494 domain-containing	2,97	1.93628E-61

Table S1. Continued

<b>DEG identification</b>	<b>Description</b>	<b>Log2FC</b>	<b>E-value</b>
NP12042	NAD-dependent glycerol-3-phosphate dehydrogenase	-2,01	8.3601E-145
NP6800	ribose 5-phosphate isomerase A	-2,02	1.47214E-148
NP10861	RNA polymerase sigma factor	-2,02	7.83548E-146
NP5447	branched-chain-amino-acid aminotransferase chloroplastic-like isoform X2	-2,03	0.0
NP2631	peptidyl-prolyl cis-trans isomerase-like	-2,04	9.37844E-65
NP1516	glutaredoxin 3	-2,04	2.72799E-30
NP15514	nicotinate-nucleotide pyrophosphorylase [carboxylating]	-2,04	2.90052E-68
NP2445	trimethylguanosine synthase	-2,06	2.68973E-92
NP1389	tetratricopeptide repeat family	-2,12	3.35772E-149
NP13280	predicted protein	-2,20	3.63203E-87
NP3140	G1 S-specific cyclin-E3 isoform X2	-2,22	4.06593E-10
NP4739	DUF952 domain-containing	-2,22	1.17713E-29
NP3751	cell surface receptor	-2,23	7.52967E-11
NP14722	uroporphyrinogen decarboxylase	-2,24	0.0
NP3303	fucoxanthin chlorophyll a c binding	-2,28	7.67505E-39
NP11842	triosephosphate isomerase	-2,30	3.50352E-146
NP9464	hypothetical protein FRACYDRAFT_243716	-2,32	1.72987E-21
NP3871	SET domain-containing	-2,55	1.05216E-120
NP7005	Cof-type HAD-IIB family hydrolase	-2,56	9.84635E-87
NP11801	glutaredoxin	-2,62	3.33467E-31
NP3215	glutathione S-transferase	-2,71	5.81408E-84
NP11562	peptidase S8	-2,78	3.38969E-38
NP15604	uroporphyrinogen-iii synthase	-2,86	3.97566E-98
NP5593	NA	-2,87	1.18368E-85
NP3273	DNA helicase	-2,96	8.70572E-13
NP11727	Light harvesting complex	-3,01	2.02388E-101
NP3760	peptidyl-prolyl cis-trans isomerase	-3,13	7.16764E-78
NP9080	FKBP-type peptidyl-prolyl cis-trans isomerase	-3,60	6.21015E-70
NP701	predicted protein	-4,44	5.14558E-25
NP12220	Calcium calmodulin dependent kinase association-domain	-4,67	6.84004E-58

Table S2. DEGs participating in the biosynthetic chlorophyll pathway expressed in *N. palea* exposed to FLG<sub>50mg</sub>.

<b>DEGs Identification</b>	<b>Description</b>	<b>Log2FC</b>	<b>E-value</b>
NP1688	zeta-carotene desaturase	-1.20	0.0
NP8573	plastid glutamyl tRNA	-1.22	0.0
NP11715	geranylgeranyl reductase	-1.27	0.0
NP1375	plastid protoporphyrinogen	-1.43	0.0
NP13058	ferrochelatase	-1.63	0.0
NP4484	fucoxanthin chlorophyll a c	-1.67	1.61E-93
NP5306	chloroplast light harvesting isoform	-1.71	3.14E-69
NP14769	chlorophyll synthetase	-1.71	0.0
NP5898	ALA dehydratase	-1.79	0.0
NP4009	Uroporphyrinogen decarboxylase	-1.81	0.0
NP12307	uroporphyrinogen decarboxylase	-1.96	0.0
NP4316	protoporphyrin IX methyltransferase	-2.00	5.84E-146
NP14722	uroporphyrinogen decarboxylase	-2.24	0.0
NP3303	fucoxanthin chlorophyll a c binding	-2.28	7.67E-39
NP15604	uroporphyrinogen-iii synthase	-2.86	3.97E-98
NP11727	Light harvesting complex	-3.01	2.02E-101

Table S3. DEGs participating to energetic pathways expressed in *N. palea* exposed to shading FLG<sub>50mg</sub>

<b>DEGs identification</b>	<b>Description</b>	<b>Log2FC</b>	<b>E-value</b>
NP206	Long-chain-fatty-acid--	-1.50	4.40E-158
NP2633	isocitrate lyase	-1.69	0.0
NP6038	acyl- dehydrogenase	-1.76	0.0
NP3058	fatty acid oxidation alpha mitochondrial	-1.88	0.0
NP14613	phosphoenolpyruvate carboxykinase (ATP)	-2.07	0.0
NP4189	glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	-2.23	0.0
NP14730	3-ketoacyl- mitochondrial	-2.33	0.0

## 5 Effets des nanotubes de carbone double paroi (DWCNTs) sur la réponse transcriptomique de *N. palea*

### Résumé

Des réponses transcriptomiques différentes sont générées par *N. palea* en exposition à de faibles ( $0,1 \text{ mg.L}^{-1}$ ) et de fortes ( $10 \text{ mg.L}^{-1}$ ) doses en DWCNTs. En effet, très peu de gènes exprimés sont partagés entre ces deux conditions. Cependant, les analyses fonctionnelles de ces gènes démontrent de nombreuses similitudes. Une modification de régulation de l'appareil de transcription ainsi qu'une altération du mécanisme de modification post-traductionnelles des protéines sont observées à la fois à faible et forte concentration en DWCNTs. L'induction d'une réponse contribuant à l'adhésion cellulaire est également suggérée dans les conditions testées, mais semble être plus prononcée à forte dose. Certaines protéines impliquées dans l'adhésion cellulaire présentent une fonction moléculaire en relation avec la synthèse de chitine ou avec le transport et/ou la fixation du calcium. Cette observation suggère le rôle de ces deux composés dans le processus d'adhésion cellulaire en réponse à l'exposition aux DWCNTs. Une inhibition de la biosynthèse de pigments chlorophylliens en association avec une diminution de la lutte contre le stress oxydatif, moins marqué à faible concentration en DWCNTs, semble également être induite après 48h d'exposition. L'énergie investie dans le transport des contaminants paraît être économisée *via* la répression de gènes codant pour les transporteurs correspondants. Cependant, le métabolisme énergétique semble être altéré uniquement à l'exposition à forte dose en DWCNTs, favorisant ainsi la voie métabolique des pentoses accompagné d'une modulation de la voie du shikimate étroitement associée à la voie de biosynthèse des acides aminés aromatiques, notamment celui du tryptophane.

L'ensemble de ces résultats sont détaillés dans la partie suivante rédigée sous la forme d'article scientifique s'intitulant :

### Transcriptomic response of the freshwater diatom biofilm exposed to potential environmental and accidental concentration of Carbon Nanotubes

*Marion Garacci, Eric Pinelli, Clément Folgoas, Emmanuel Flahaut, Pierre Lonchambon, Anthony Bertucci, Patrice Gonzalez, Jérôme Silvestre, Mohamed Zouine, Laury Gauthier, and Maialen Barret*

# Transcriptomic response of the freshwater diatom biofilm exposed to potential environmental and accidental concentrations of Carbon Nanotubes

Marion Garacci<sup>1</sup>, Eric Pinelli<sup>1,\*</sup>, Clément Folgoas<sup>2</sup>, Emmanuel Flahaut<sup>3</sup>, Pierre Lonchambon<sup>3</sup>, Anthony Bertucci<sup>4</sup>, Patrice Gonzalez<sup>4</sup>, Jérôme Silvestre<sup>1</sup>, Mohamed Zouine<sup>2</sup>, Laury Gauthier<sup>1</sup>, and Maialen Barret<sup>1</sup>

<sup>1</sup> EcoLab, Université de Toulouse, CNRS, Toulouse, France,

<sup>2</sup> GBF (Laboratoire Génomique et Biotechnologie du Fruit), ENSAT, INRA/INP, UMR 990, Castanet Tolosan, France

<sup>3</sup> Institut Carnot CIRIMAT (Centre Inter-universitaire de Recherche et d'Ingénierie des MATériaux), Université de Toulouse, INP, UPS, UMR CNRS 5085, Toulouse, France

<sup>4</sup> EPOC, University of Bordeaux, UMR 5805, Arcachon, France

## Abstract

DWCNT-based nanomaterials are likely to be released in aquatic environment at different step of product life cycle. This study focused on the transcriptomic response of the benthic freshwater diatom *Nitzschia palea* after 48h of exposure at low (0.1 mg.L<sup>-1</sup>) and high (10 mg.L<sup>-1</sup>) DWCNT concentration. After *de novo* RNA-seq, differentially expressed genes in each exposure condition were functionally analysed and altered metabolic pathways were identified. Among the 1,972 differentially expressed transcripts, only 68 were involved at low DWCNT concentration. Enrichment analysis evidenced modification in transcription regulation and post-translational modification induced by DWCNTs exposure (Log2FoldChange between -4 and 1.7, and -2.5 and 6.6 for low and high DWCNT concentration, respectively). The pigment biosynthetic process was down-regulated, with only one gene encoding for chlorophyll pigment down-regulated at low DWCNT concentration, while 8 were repressed at high DWCNT concentration. The suggested reduction in photosynthesis activity was associated with a decrease in reactive oxygen species managing. An adhesion response seemed to be involved, regardless of DWCNT concentration, associated with cell wall repair at high DWCNT concentration. Energetic saving was suggested by reducing ATP-consumption by drug transporters. Moreover, exposure to high DWCNT concentration led to a modulation of glucose metabolism, shikimate pathway and tryptophan biosynthesis. As the tested concentrations are known not to induce growth inhibition, this study highlighted an adaptive response whose intensity and diversity of expressed genes depend on the dose of exposure.

## 5.1 Introduction

Nanoparticles represent the solution to the main industrial issue in nanotechnologies: miniaturize technology with an improvement of its efficiency. The number of research studies performed on the exploitation of their properties are incessantly rising, just like the scientists' interest (Vance et al., 2015). Carbon-based nanoparticles are especially attractive for industrials thanks to their tremendous physical chemistry properties (Research and Markets, 2016). Carbon Nanotubes (CNT) are the second carbon nanoparticles synthesized after the fullerenes (spherical carbon structure, similar to a football) (Iijima, 1991). CNT are cylindrical, similar to a monoatomic carbon layer, where atoms bounded by  $sp^2$  covalent bonds are organized in a honeycomb lattice (graphene), enrolled on itself. Their extremities can be closed by a demi-fullerene. The number of layer can vary from one (for single-wall CNT: SWCNT), two (for double-wall CNT: DWCNT) to 50 (multiple-wall: MWCNT). The diameter of CNT, generally ranging between 0.8 nm for SWCNT and 20 nm for MWCNT, respects the size criterion of nanoparticles, with at least one spatial dimension not exceeding 100 nm (Iijima and Ichihashi, 1993). But their length can range from 100 nm to several centimetres. Owing to their remarkable mechanical properties (combining high flexibility and strong rigidity) (Bernard, 2007; Lu, 1997), electrical behaviour (acting like semiconductor or metal) (Hong and Myung, 2007), and their high thermal conductivity (Hone, 2001), they are currently used, associated in composite materials, in sporting equipment, paintings, supercapacitors and more (Ajayan and Zhou, 2001). Chemical vapour deposition (CVD), presenting the best production yield, is the most common synthesis process used for industrial production and has led to an incredible increase of their worldwide production, multiplied by 10, between 2006 and 2013 (De Volder et al., 2013).

Because of their future massive production, which is not yet subjected to clear regulations, CNT will likely be released in the environment at different steps of the nanoparticles based-products life cycle (Gottschalk et al., 2013). In addition, CNT production estimated from CNT-related journal publications is generally overestimated compared to confirmed by number estimated by industries, leading to strong uncertainties on CNT-based products on the market (De Volder et al., 2013). This lack of information contributes to uncertainties of prediction of the CNT quantity discharged in the environment. As waste-water treatment plant cannot ensure complete elimination of engineered nanoparticles (Brar et al., 2010), all nanoparticles released from industrials waste-water or individual habitats, will be found in

aquatic environment, which is a final receptacle. Different hydrogeochemical phenomena conducting to this transfer, such as atmospheric deposition or lixiviation (Nowack and Bucheli, 2007), lead to the concentration of pollutants in aquatic ecosystems, especially rivers (Gottschalk et al., 2013; Sun et al., 2014). Once discharged in the aquatic medium, CNTs will be able to interact with organisms of different food web level. Since a decade, environmental evaluation of CNTs toxicity are slowly rising but a strong lack of information is still missing concerning their fate in aquatic systems and their impact on ecosystem functioning (Freixa et al., 2018). In particular, ecotoxicological studies on photosynthetic organisms, which are primary producers at the basis of the trophic chain, are essential to predict the impact of CNTs at ecosystem level.

Nevertheless, most of evaluations of CNT toxicity on aquatic photosynthetic organisms focused on cellular impact without dealing with advanced physiological response. A majority of ecotoxicological studies, assessing the CNT toxicity mechanism, was undertaken on plants thanks to their potential application in agriculture for molecular disease treatment and enhancing the nutrient absorption by plants (Joseph and Morrison, 2006). In *Arabidopsis thaliana* exposed to high SWCNT concentration (25-100 mg.L<sup>-1</sup>), genes encoding for enzymes involved in peroxide scavenging were upregulated in protoplasts isolated from leaves, leading to programmed cell death (Shen et al., 2010). Khodakovskaya and co-workers (2011) observed an up-regulation of genes involved in stress response in tomato seedling exposed to 200 mg.L<sup>-1</sup> of SWCNTs. A study on an aquatic planktonic rotifer, *Brachionus koreanus*, exposed to 100 mg.L<sup>-1</sup> of MWCNTs revealed an induction of reactive oxygen species (ROS) production associated with an upregulation of glutathione S-transferase (GST) (Lee et al., 2016). Taken as a whole, these studies revealed that CNTs, especially SWCNTs, were included in the major contaminant category inducing oxidative stress (Shvedova et al., 2012).

Photosynthetic microbial communities constitute a crucial compartment for aquatic ecosystem functioning, playing an essential role in the carbon, nitrogen and phosphorus cycle (Paerl and Pinckney, 1996). Among these organisms, diatoms are ubiquitous microalgae responsible for 20% of global primary productivity (Falkowski et al., 1998). They are easily recognizable thanks to their particular cell wall, called frustule, composed of silica and specifically ornamented for each species. Diatoms are widely used as bio indicators for the evaluation of ecological state of aquatic environment, since the diatoms community composition differs depending on the amount of pollutants (Watanabe et al., 1986). Diatoms can have a



planktonic or benthic lifestyle thanks to the excretion of exopolymeric substances (EPS) mainly composed of polysaccharides, proteins and extracellular DNA (Flemming and Wingender, 2010). The first role of EPS secretion is the cellular adhesion to a substrate in order to create a biofilm, but another function of this excretion is to protect cells from external pollution (Andrade et al., 2010; Davies, 2003), and notably from CNTs as observed by Verneuil and co-workers (2015). Their study demonstrated that proteins excreted during exposure to DWCNT (0.1, 1, 10 and 50 mg.L<sup>-1</sup>) were overproduced by the freshwater diatom *Nitzschia palea* suggesting that extracellular proteins play a crucial role in response to DWCNT exposition. A temporary growth inhibition presumably related to energetic allocation for EPS excretion was observed for *N. palea* exposed to 50 mg.L<sup>-1</sup>, without cellular damages. The cellular impact of DWCNT was thus evaluated on diatoms, but the physiological mechanisms are still not well understood. The use of a transcriptomic approach usually results in more specific insight of toxicity mechanisms even for non-impacting pollutants concentration. Transcriptomic studies on diatoms are scarce, and until now inexistent for diatoms exposed to nanoparticles.

In this study, a differential transcriptomic analysis of the diatom *N. palea* response in exposition to low (0.1 mg.L<sup>-1</sup>) and high DWCNT concentration (10 mg.L<sup>-1</sup>) was achieved. These two tested doses represent respectively a condition close to environmental future concentration and an accidental discharge. In this way, we could also determinate biological processes and metabolic pathways involved in diatoms exposed to DWCNT concentrations that do not inhibit growth.

## 5.2 Materials and methods

### 5.2.1 Preparation before cellular exposition

#### *CNT synthesis and preparation of the suspension*

Suspension of DWCNT was prepared by a CVD synthesis using Mg<sub>1-x</sub>Co<sub>x</sub>O solid solutions as catalysts, associated with MoO<sub>y</sub> (Flahaut et al., 2003). DWCNTs were obtained by carbon vaporisation from a mixture of H<sub>2</sub> and CH<sub>4</sub> heated at 1000°C under N<sub>2</sub> atmosphere. The extraction, or catalysts elimination, was carried out from composite material (ref: R-4-170717) with an acidic treatment. Composite material (159 mg containing 12.6% of DWCNTs) was suspended in 4 mL of HCl 37% and 0.7 mL of distilled water for 19h. The obtained suspension, composed of a theoretical amount of 20 mg of DWCNTs, was then filtered on a 0.45 µm pore size nitrate cellulose membrane and washed with distilled water.

Once properly collected, product was soaked in 30 mL of medium culture. The mixture was briefly (1 min) bath sonicated (Elmasonic S30H, 280W) to break nanoparticles aggregates. The rest of the medium culture was added to reach a final volume of 222 mL with an intermediary step after 10 mL of medium added followed by 1 min of bath sonication. After this, the mixture concentrated at  $90 \text{ mg.L}^{-1}$  was bath sonicated a last time during 30 min and keep in a fridge before sterilisation at  $121^\circ\text{C}$  for 20 min.

Brunauer, Emmett and Teller theory were used to determinate the specific surface area which was estimated at  $980 \text{ m}^2.\text{g}^{-1}$ . High Resolution Transmission Electron Microscopy observation was performed to estimate the diameter size: inner and outer diameter were about 1.2 and 3.2 nm, respectively (Figure 39a-b). The Raman spectroscopy indicated the absence of DWCNTs disruption caused by ultra-sonication (Figure 39c). To avoid misinterpretations on toxicity induced by DWCNTs exposition (Petersen et al., 2014), an analysis of the dried samples composition (Crealins) was carried out to quantify catalysts residues. Dried DWCNTs samples were composed of 4.5% of cobalt and 1.1% of molybdenum, which correspond to non-induced toxicity level on microorganisms (Trenfield et al., 2015).

For cellular experiment, DWCNT suspensions at the adapted concentration ( $0.2$  and  $16.7 \text{ mg.L}^{-1}$  to reach a final concentration of  $0.1$  and  $10 \text{ mg.L}^{-1}$  in the experimental design) were prepared by dilution with medium culture immediately after 10 min of bath sonication. DWCNT suspensions were bath sonicated a last time just before the cellular exposition to ensure homogenous dispersion in the experimental device.

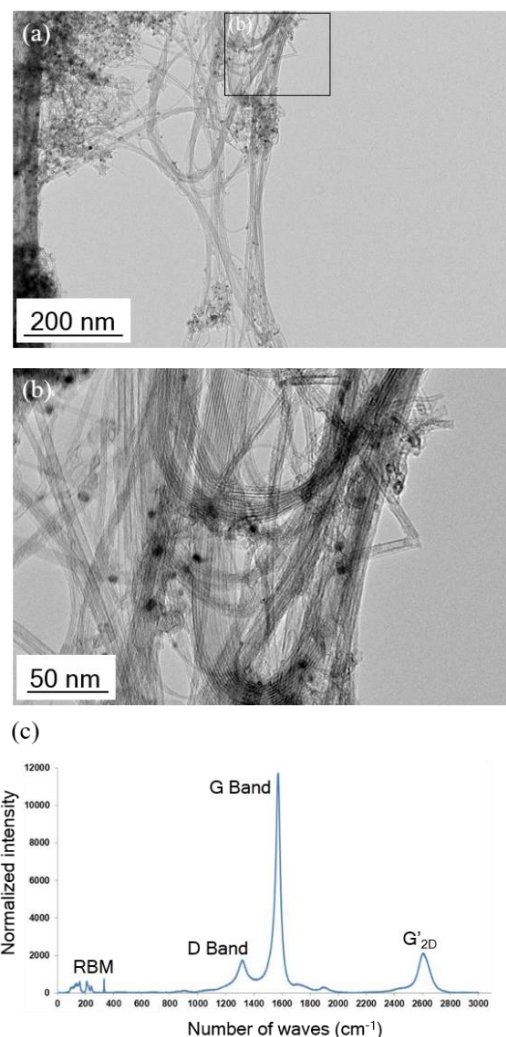


Figure 39. (a) Transmission Electronic Microscopy photography of dried DWCNTs, (b) Magnified view of (a), (c) Raman spectra of DWCNTs.

### *Cellular cultivation*

Axenic strain of *Nitzschia palea* (CPCC160) was provided by the Canadian Phycological Culture Centre (University of Waterloo, Waterloo, ON, Canada). Diatoms culture were grown in a sterilized SPE medium with controlled pH (6.4 – 6.6). To maintain the strain purity, cultures were manipulated under a class II laminar flow hood. The maintenance and experimental exposition were carried out under agitation (50 rpm), to reproduce water movements in rivers, in a growth room at  $22 \pm 1$  °C. The light/dark period was supplied by led Floodlight 150W Dimmable (Vegeled, Colasse SA, Belgium) at  $60 \pm 10$   $\mu$ E. Expositions were carried out on diatoms in growth active phase by replacing SPE medium by fresh medium culture 72h before experiments.

#### 5.2.2 Cellular CNT exposure conditions

The experimental setup was inspired by exposure mode used in a previous study (Verneuil et al., 2014). In this study, only direct DWCNT exposure were performed in agreement with a previous study which demonstrated the absence of shading impact of MWCNTs suspension on the cellular growth of *N. palea* (Verneuil et al., 2014). Cellular expositions were performed in 750 mL culture flasks (FALCON® Cell Culture Flask, 175cm<sup>2</sup> straight neck vented cap). To reproduce water column, supplementary culture flasks only containing SPE medium were superposed on the one containing cells and DWCNTs suspension.

Diatoms culture were first inoculated for 48h before the DWCNTs exposure to promote a biofilm production. Thus, 9 culture flasks containing 100 mL of algal culture ( $2.5 \times 10^5$  cells.mL<sup>-1</sup>) were placed in the growth room without agitation. After this, DWCNTs suspension to the appropriate concentration were added to reach a final volume of 250 mL with concentrations of 0.1 (DWCNT<sub>0.1mg</sub>) and 10 mg.L<sup>-1</sup> (DWCNT<sub>10mg</sub>). For the control condition, SPE medium culture replaces DWCNTs suspension. Representatives water column culture flasks were filled with 250 mL of SPE medium. All the culture flasks were correctly placed in black boxes, opened on the top, for 48h in growth room. Each experimental condition was conducted in triplicate.

#### 5.2.3 RNA isolation and sequencing

The method for RNA isolation from the diatom *N. palea* was the same as the one used in Garacci et al. (submitted). The extraction was performed after 48h of DWCNT exposure. All

the supernatant was first removed while the algal biofilm remained intact. To collect the cells, the biofilm was scrapped in 50 mL of fresh medium culture. The algal suspension was then transfer in a 50 mL tube for being centrifuged at 10 000 rpm for 10 sec in order to collect cells in a pellet. Supernatant was removed and 2 ml of fresh medium was added and transferred in a new tube to be briefly centrifuged at high speed a last time. After discarding the supernatant, the pellet was a frozen in liquid nitrogen and the samples were stored at -80°C in order to preserve RNA from degradation.

Modifications were made to the manufacturer's extraction protocol (RNeasy Plant Mini Kit, 74904, QIAGEN®). Cellular lysis was carried out in 450 µL of Trizol Reagent (Invitrogen). Once vortexed, 200 µL of silica beads (Sartorius™ BBI-8541400) were added for mechanical grinding with a FastPrep® (FastPrep®-24 Classic Instrument, MP Biomedicals, 6.5 m.s<sup>-1</sup>, 6x20s). A heat treatment (56°C for 10 min) was performed in order to separate RNA from residuals DWCNTs, initially trapped in the biofilm matrix. Indeed, CNTs are known to have great interactions with organic molecules, and especially for nucleic acids, leading to their adsorption on the CNTs surface (Bianco et al., 2005b; Mu et al., 2014). This is the reason why samples obtained from culture exposed to 50 mg.L<sup>-1</sup> did not present sufficient amount of undamaged mRNA to be sequenced. After addition of 200 µL of chloroform RECTAPUR (VWR), total RNA was isolated and purified on a QIAGEN® RNeasy Mini Spin column. Residual DNA was removed by incubating with DNase I for 15 min at room temperature followed by washings (RW1 and RPE buffers from QIAGEN® RNeasy Plant Mini kit). Finally, the RNA was eluted in 40 µL of RNase-free water. Quality control of RNA samples was first performed using a Nanodrop spectrophotometer. RNA concentrations were estimated between 48.8 and 3,091.5 ng.µL<sup>-1</sup> and ratios of optical densities at 260 and 280 nm were higher than 2. Microgel electrophoresis on an Experion™ Electrophoresis Automated System using an Experion™ RNA StdSens Analysis kit was carried out in order to evaluate RNA integrity. RNA RNA Integrity number (RIN) was estimated between 5.9 and 7.4. RNA samples were conserved at -80°C before sequencing. A next generation Illumina paired end sequencing with 150 bp inserts was performed by GATC Biotech SARL platform (Constance, Germany). About 30 million reads pairs (± 3%) were generated. Raw reads were submitted to a Sequence Read Archive (SRA) database (Submission ID: SUB4486857) included in the project "Nitzschia palea Transcriptome" deposited at GenBank NCBI under the accession PRJNA489196.

#### 5.2.4 RNA assembly and differential expression analysis

RNA-seq reads were mapped to the referenced *N. palea* transcriptome (Garacci et al. (submitted)) where 15,906 transcripts were identified, and transcripts abundance were quantified by Trinity Transcripts Quantification v2.4.0 (Haas et al., 2013) applying the RNA-Seq by Expectation-Maximization method (Li and Dewey, 2011). Genes differentially expressed (DEGs) between control and exposure conditions (False Discovery Rate < 0.05) were identified using the number of mapped reads as inputs in the statistical software R (R Core Team, 2013) the using the “DESeq2” R package (Love et al., 2014). A Gene Ontology (GO) enrichment analysis was performed using the “topGO” R package (Alexa and Rahnenführer, 2018) for each GO category (Biological Process, Molecular Function and Cellular Component). Enriched GO terms were submitted to the open web-based tool QuickGO (Binns et al., 2009) in order to visualize GO trees and encompass GO terms at the same level to facilitate comparison between exposure condition. Heat maps were generated thanks to the R packages “gplots” (Warnes et al., 2009) and “RColorBrewer” (Neuwirth, 2005).

### 5.3 Results and Discussion

#### 5.3.1 Differential expression and annotation statistics

Among transcripts sequenced from diatoms exposed to DWCNT, more than 60% presented a GO annotation. However, among the ten most up-or down-regulated transcripts (expression level indicated in Log2FoldChange: Log2FC), mostly generated in DWCNT<sub>10mg</sub> condition, 45% did not have a GO annotation (Table 2). It's noteworthy here that the most up-regulated transcript in this dataset did not present GO annotation. The non-negligible amount of non-annotated transcript evidenced the lack of genetic information among diatoms (Heydarizadeh et al., 2014). The occurrence of horizontal gene transfer from bacteria, which are widely studied, explains the presence of a non-negligible amount of diatoms transcripts description from bacteria sequences (Bowler et al., 2008).

Table 2. Functional description and Gene Ontology annotation for the ten most up- and down-regulated genes. The selection of these transcripts was obtained by a classification of all transcripts detected in both DWCNT exposure conditions. The Log2FC of differentially expressed transcripts were noted in bold.

Transcript ID	Description	GO Terms	Log2FC	# GO Terms	
NP3908	---NA---		DWCNT0.1.DWCNT10 0.48	<b>6.90</b>	0
NP4477	galectin-7	C:nucleus. C:extracellular space. C:extracellular exosome. C:cytoplasm. P:apoptotic process. P:heterophilic cell-cell adhesion via plasma membrane cell adhesion molecules. F:carbohydrate binding	6.84	0.55	7
NP12499	extracellular matrix	P:positive regulation of catalytic activity. F:calcium ion binding. C:membrane. P:lipid catabolic process. C:integral component of membrane. P:digestion. F:enzyme activator activity. C:extracellular region	0.09	<b>6.76</b>	8
NP10895	SPT2 homolog	F:DNA binding. F:histone binding. P:regulation of chromatin assembly. P:histone exchange. P:regulation of transcription. DNA-templated. P:nucleosome assembly	0.67	<b>6.60</b>	6
NP15068	hypothetical protein FRACYDRAFT_251158	P:carbohydrate metabolic process	-0.33	<b>6.50</b>	1
NP6604	60S ribosomal L37a	C:cytosolic large ribosomal subunit. P:rRNA processing. F:large ribosomal subunit rRNA binding. P:translational initiation. P:viral transcription. C:nucleus. C:extracellular exosome. F:protein binding. P:SRP-dependent cotranslational protein targeting to membrane. C:focal adhesion. F:structural constituent of ribosome. P:nuclear-transcribed mRNA catabolic process. nonsense-mediated decay. F:metal ion binding	5.95	0.55	13
NP11038	Bv80 Bb-	F:DNA binding. C:membrane	0.31	<b>5.90</b>	2
NP15458	collagen 2		1.35	<b>5.57</b>	0
NP3305	zinc finger		1.28	<b>5.51</b>	0
NP15564	fatty acid desaturase	C:membrane	-0.43	<b>5.36</b>	1
NP12978	hypothetical protein THAOC_11144		-7.14	1.08	0
NP5389	---NA---		-0.11	<b>-6.77</b>	0
NP14335	family	C:membrane. C:integral component of membrane	-0.26	<b>-6.11</b>	2
NP12398	Uncharacterised		<b>-5.38</b>	1.24	0
NP15493	serine threonine- kinase Nek10-like isoform XI	C:membrane	<b>-5.25</b>	0.14	1
NP12853	---NA---		-0.25	<b>-4.93</b>	0
NP10517	hypothetical protein PTSG_06631	F:protein tyrosine phosphatase activity. P:protein dephosphorylation. P:peptidyl-tyrosine dephosphorylation. C:intracellular	-0.76	<b>-4.73</b>	4
NP3653	---NA---		<b>-4.66</b>	2.97	0
NP12491	predicted protein		0.23	<b>-4.47</b>	0
NP12447	Nipped-B B	F:DNA binding	0.23	<b>-4.39</b>	1

After 48h of DWCNTs exposure, differential expression analysis revealed that 1,972 transcripts presented an expression level significantly different from the control condition representing 12.4% of the transcriptome. Expression level for these DEGs ranged between 0.5 and 6.9 for up-regulated DEGs and -4.4 to -0.5 for the down regulated ones. These statistics were similar to a previous study where *N. palea* was exposed to Few Layer Graphene (FLG) with a Log2FC ranging from -4.7 to 7 (data on submission). This would mean that the conditions tested in this study induced stress level comparable to earlier tested FLG conditions.

Among the 1,972 DEGs detected in this study, the majority was differentially expressed in diatoms exposed to DWCNT<sub>10mg</sub> (1912 DEGs representing 12% of the transcriptome) while almost 30 fold less DEGs (68 DEGs) were found in DWCNT<sub>0.1mg</sub> condition (Figure 40a). Up-regulated transcripts were mostly expressed in DWCNT<sub>10mg</sub> whereas low DWCNT exposure generally induced a gene downregulation. Among all DEGs detected in this study, 85% presented a description and 64% had a GO annotation. Nevertheless, 462 DEGs, that being 23.4% of DEGs, were described as an “hypothetical protein” or “predicted protein” which represent a non-negligible amount of transcript partially annotated with unknown function. Functional annotation provided higher yield in DWCNT<sub>10mg</sub> condition than in DWCNT<sub>0.1mg</sub> (Figure 40c). This annotation results highlighted that a part of the diatoms’ response was not taken into account functional analysis.

Only 8 DEGs were shared between low and high DWCNT concentration exposure among which 5 were regulated in the same way (up-or down-regulated). The gene expression profiles (Figure 40b) showed that transcriptomic response was highly pronounced in DWCNT<sub>10mg</sub> exposure compared to DWCNT<sub>0.1mg</sub>, suggesting that diatoms’ response was concentration-dependent. However, absence of cellular impact was previously observed for both DWCNT concentrations. This highlighted that even if DWCNT<sub>10mg</sub> did not induce growth inhibition, a high transcriptomic response was generated after 48h of exposure.

An interesting comparison of the number of DEGs detected in low DWCNT exposure and low FLG concentration from a previous study, where 50 DEGs were detected (Garacci et al. (submitted)) suggested the same stress level of the diatoms exposed to low FLG and DWCNT concentrations. However, in FLG<sub>0.1mg</sub> condition most of the DEGs were upregulated while in diatoms exposed to DWCNT<sub>0.1mg</sub> they were in majority downregulated (Log2FC between -7.1 and 3 for DWCNT<sub>0.1mg</sub> and between -1.7 and 4 for FLG<sub>0.1mg</sub>). In the case of exposure to high FLG and DWCNT concentrations, a stronger similarity was observed with almost the same

number of DEGs involved (1907 DEGs in high FLG condition) and their comparable range of expression level (Log<sub>2</sub>FC between -4.7 and 7, and ranging from -6.8 to 6.9 for FLG and DWCNT, respectively). These results might suggest comparative physiological response induced in FLG and DWCNT exposure.

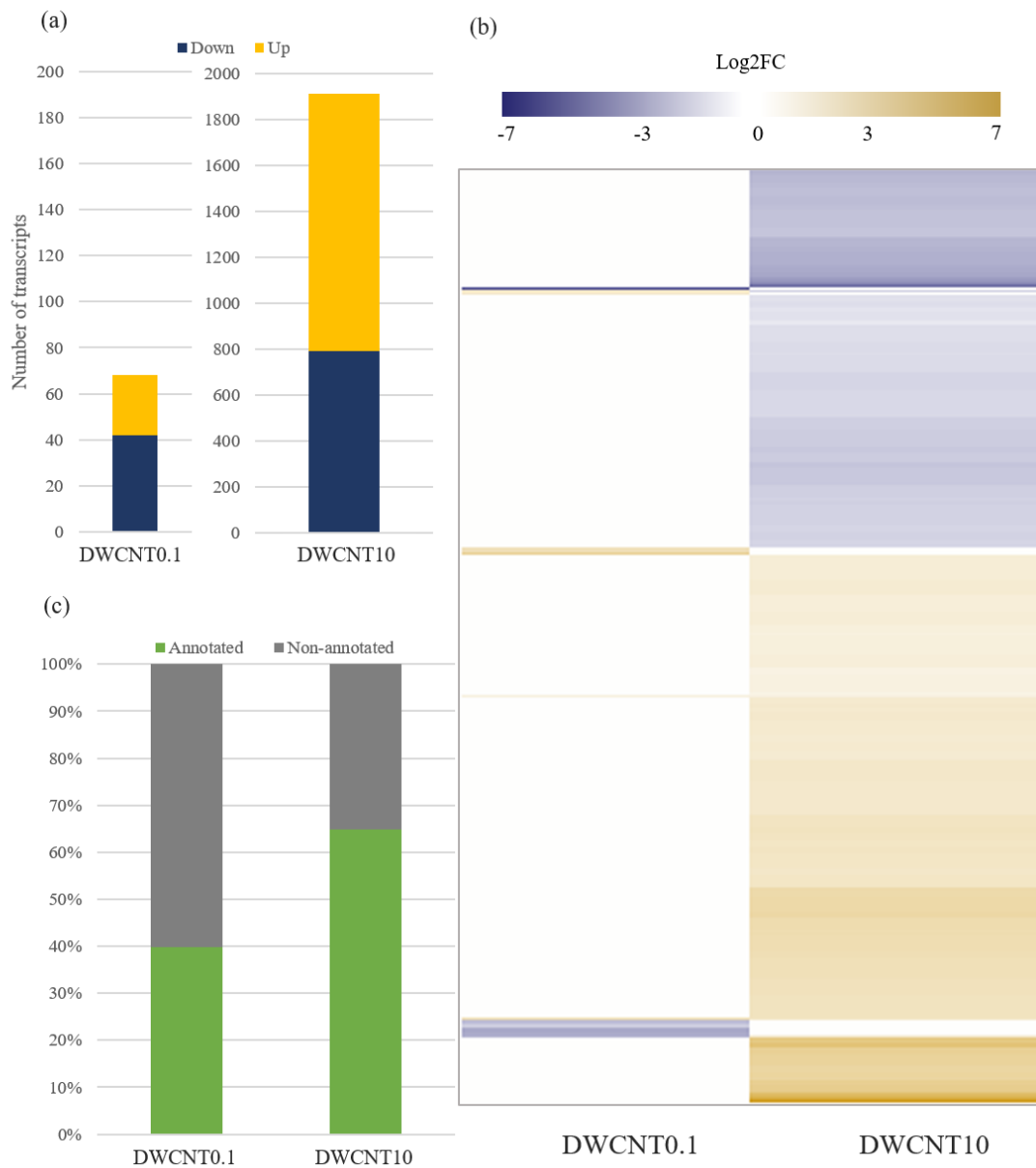


Figure 40. Differential expressed genes at low and high DWCNTs concentration. (a) Number of up- and down-regulated DEGs. (b) Heat map showing the Log<sub>2</sub>FC values of DEGs. (c) Percentage of Gene Ontology annotation among the DEGs.



### 5.3.2 Functional annotation

Analysis of enriched GO terms was carried out in each condition, but only GO terms related to BP category are discussed in this study. GO enrichment revealed 90 GO terms associated with 15 DEGs in DWCNT<sub>0.1mg</sub> condition, while 127 GO terms for 495 DEGs were found in DWCNT<sub>10mg</sub> condition. A majority of these DEGs were upregulated (66% with a Log<sub>2</sub>FC between 0.5 and 6.7) in DWCNT<sub>10mg</sub> exposure whereas 75% were down-regulated in DWCNT<sub>0.1mg</sub> exposure.
















Altered BP were studied on the basis of DEGs corresponding to enriched GO terms. Aggregation of enriched GO terms led to the association of BP terms to one or several higher GO terms. BP affected by DWCNT exposure and expression level of DEGs contributing to these BP are displayed in Table 3 for DWCNT<sub>0.1mg</sub> and Figure 41 for DWCNT<sub>10mg</sub>. Once agglomerated at the same GO level, 15 BP were involved in DWCNT<sub>0.1mg</sub> exposure and 22 in DWCNT<sub>10mg</sub> exposure. The number of BP induced in response to DWCNTs was higher than in FLG exposure (19) (Garacci et al. (submitted)), suggesting that even at lower concentration (10 mg.L<sup>-1</sup> for DWCNTs against 50 mg.L<sup>-1</sup> for FLG), DWCNTs might induced more physiological alterations than FLG. To determine specific metabolic pathways involved in the response of *N. palea*, functional analysis, based on DEGs description which present different name from BP, was performed only on DEGs with enriched GO terms.
















#### *Alteration of DNA, transcription machinery and post-translational modifications*

At low concentration exposure, 7 DEGs participating to the BP response to stress and cellular response to stimulus were involved with Log<sub>2</sub>FC between -2.3 and 0.8. Within these DEGs, the most up-regulated (NP2462, Log<sub>2</sub>FC=0.85) encoded for an hypothetical protein (FRACYDRAFT\_241601), similar to that sequenced in the diatom *Fragilariopsis cylindrus*. According to Uniprot database description (Entry: A0A1E7F538), this putative protein, involved in mismatch repair process, seemed to be part of the protein domain High mobility group (HMG) box (InterPro: IPR009071) and is known to bind to DNA. The same encoding DEG was also found up-regulated with the same magnitude in diatoms exposed to high FLG concentration (Log<sub>2</sub>FC = 1) (Garacci et al. (submitted)). Among plants, this HMG-box protein domain, described as a chromatin-associated protein, was found to be involved in the regulation of several nuclear processes such as chromosomal architecture or DNA

recombination/repair (Antosch et al., 2012). Moreover, environmental stresses, such as drought, cold or high-salinity induced an overexpression of genes encoding for HMG proteins in order to modulate plant gene expression (Kim et al., 2010). A DEG participating in several BP such as aging, growth, cellular component organization and cell death was down regulated in this condition. This DEG (NP12458, Log<sub>2</sub>FC = -3.9) encoded for an endonuclease which is known to be involved in DNA recombination. This suggests that CNT<sub>0.1mg</sub> exposition induced a stress leading to a modification of gene regulation.

Table 3. Participation to biological processes of the DEGs involved in low DWCNT concentration exposure and their expression level in each exposure condition. The number of DEGs associated with a BP is indicated next to the corresponding biological process.

DEGs ID	Description	Log <sub>2</sub> FC CNT0.1	Log <sub>2</sub> FC CNT10	Biological process
NP133	Gram-positive anchor	2.22	0	
NP1265	hypothetical protein FisN_12Lh033	1.67	3.36	
NP14142	winged helix DNA-binding domain-containing	1.30	0	
NP11926	winged helix DNA-binding domain-containing	1.29	2.28	
NP2462	hypothetical protein FRACYDRAFT_241601	0.85	0.82	
NP4691	26S proteasome non-ATPase regulatory subunit 2	-0.79	0	
NP3424	fucoxanthin chlorophyll a c	-1.34	0	
NP3175	thioredoxin-like	-1.55	0	
NP14860	Pol Poly	-1.97	0	
NP15432	heat shock transcription factor	-2.06	0	
NP13123	multidrug resistance MATE family	-2.27	0	
NP14294	Pol Poly	-2.37	1.21	
NP3639	hypothetical protein THAOC_18690. partial	-2.44	0	
NP9964	camp receptor	-2.56	0	
NP12458	endonuclease	-3.91	0	

-  Aging (1)
-  Cellular response to stimulus (7)
-  Organic substance metabolic process (10)
-  Biosynthetic process (6)
-  Cellular metabolic process (11)
-  Regulation of biological process (10)
-  Cell death (1)
-  Establishment of localization (1)
-  Response to stress (7)
-  Cellular component organization (1)
-  Growth (1)
-  Small molecule metabolic process (1)
-  Cellular nitrogen compound (8)
-  Macromolecule localization (1)
-  Transposition (1)

For diatoms exposed to DWCNT<sub>10mg</sub>, functional analysis primarily focused on the thirty most up-and down-regulated DEGs (Table S4). Among these DEGs, two presented a functional description related to DNA modification and participated to cellular metabolic, biosynthetic metabolic and nitrogen compound metabolic processes. The up-regulated DEG (NP5512; Log<sub>2</sub>FC = 3.2) described as an hypothetical protein (THAOC\_30976), sequenced in *Thalassiosira oceanica*, probably plays a role in specific-site DNA recombination according to GO annotation. The Uniprot database description (Entry: K0RA91) suggested the similarity of this protein with a DNA integrase (InterPro: IPR011010). The presence of this putative DNA integrase was also identified in two marine diatoms *Thalassiosira pseudonana*

(Armbrust et al., 2004a) and *Skeletonema costatum* (Chung and Hwang, 2009) by genome sequencing. The previous study on *N. palea* exposed to high FLG concentration revealed overexpression (Log2FC = 3.2) of the same DEG, but most of DEGs involved in DNA damages were down-regulated in this condition (Garacci et al. (submitted)). In addition, a down-regulated DEG (NP13280, Log2FC = -2.5) was involved in DNA integration, according to GO annotation. Unfortunately, no accurate information about the function or the origin of this predictive protein was found. These results would mean that putative proteins expressed in DWCNT<sub>10mg</sub> condition have an enzymatic activity mediating site-specific DNA modification.

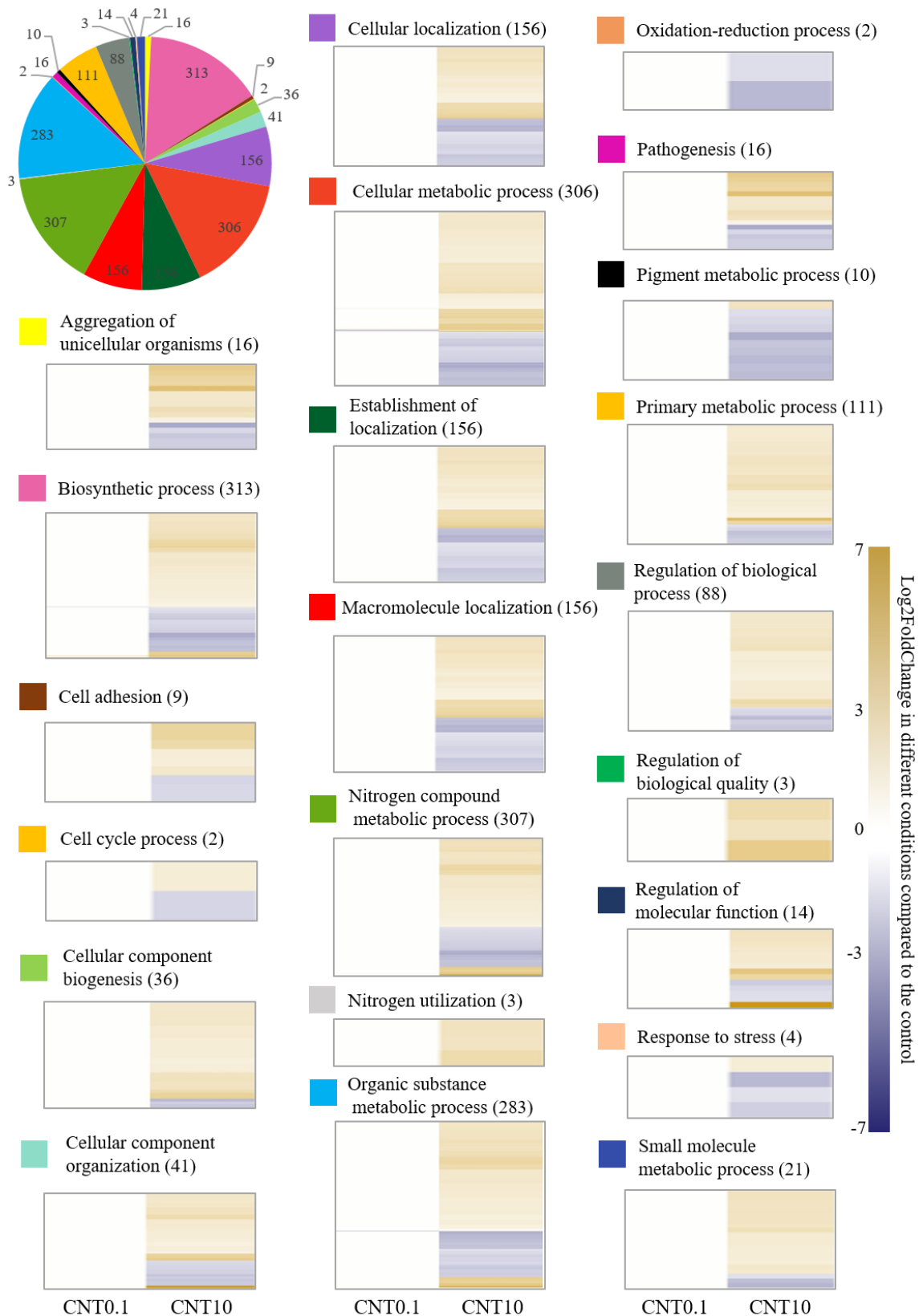


Figure 41. Biological processes involved in high CNT concentration exposure and expression pattern of DEGs contributing to these BP. Enriched BP terms proportion is represented in the pie chart with the number of DEGs associated. Heat maps show regulation of gene expression in the different BP involved.

In DWCNT<sub>0.1mg</sub> condition, three DEGs participated in biosynthetic, organic substance metabolic, cellular metabolic processes, cellular nitrogen compound and regulation of biological process (Log2FC between -3.9 and 1.7). Two up-regulated DEGs (NP14142 and NP11926), involved in these BP, were homologous to sequences encoding a winged helix DNA-binding domain-containing protein. 9 DEGs encoding for this domain-containing protein were also found in DWCNT<sub>10mg</sub> exposure condition. Among these 9 DEGs, 3 belonged to the set of thirty most down-regulated genes (Log2FC between - 2.3 and - 1.3) and 6 to list of up-regulated ones (Log2FC between 2.3 and 2.8). This protein motif is known to make sequence-specific DNA contact and regulate transcription process, but also plays a role in post-transcriptional regulations (Thebault et al., 2011). In diatoms exposed to high FLG concentration, three similar DEGs corresponding to this protein were regulated in the same way than in DWCNTs exposure (Garacci et al. (submitted)). The third DEG (NP1265) contributing to these BP was commonly overexpressed at low and high DWCNT concentration (Log2FC = 1.7 and 3.4 in DWCNT<sub>0.1mg</sub> and DWCNT<sub>10mg</sub>, respectively). This DEG encoding an hypothetical protein (FisN\_12Lh033), described in the oleaginous diatom *Fistulifera solaris* (Uniprot database entry: A0A1Z5KGP7), presented a sequence-specific DNA binding molecular function (MF). The function of this protein is currently unknown but, as mentioned in the database, it could be a part of winged helix DNA-binding domain-containing protein (InterPro: IPR036388) or Heat Shock Factor (HSF) superfamily (InterPro: IPR000232). Exposition of *N. palea* to high FLG concentration also induced the overexpression of this DEG (Log2FC = 3.1). Another DEG (NP15432) corresponding to an HSF transcription was down-regulated (Log2FC = -2) in DWCNT<sub>0.1mg</sub> condition. This transcription factor is involved in the regulation of heat shock gene expression, especially in its activation (Pirkkala et al., 2001). In the marine diatoms *T. pseudonana* and *Phaeodactylum tricorutum*, most of the transcription factors are HSF, within many of them might play a role in specific response to environmental stimuli (Rayko et al., 2010). Among down-regulated DEGs in DWCNT<sub>0.1mg</sub> condition, two (NP14860 and NP14294) were described as Pol Poly protein with a nucleic acid and zinc binding molecular function. One of them (NP3639) corresponded to an hypothetical protein (THAOC\_18690), described in *T. oceanica* (Uniprot entry: K0S7H9), without any functional description but probably involved in regulation of transcription, according to GO annotation. These results suggested that the exposition to low DWCNT induced a modification of transcription process which could be a response to environmental modifications. Interestingly, no significant modification in regulation of transcription was observed in diatoms exposed to low FLG concentration (Garacci et al.

(submitted)). In addition, the cellular response to stimulus and response to stress BPs were involved with 7 DEGs expressed in exposition to DWCNT<sub>0.1mg</sub>. Most of DEGs participating to these BP were down-regulated (Log2FC between - 2.3 and 0.8). One of them (NP9964) encoded for a camp receptor protein (CRP) described in the bacteria *Escherichia coli* as playing a role in transcription. Indeed, after a conformational change caused by the binding to cyclic adenosine monophosphate (cAMP), CRP fixes to the promoters of controlled genes allowing for RNA polymerase binding (Lawson et al., 2004). This highlighted that exposition to low DWCNT concentration induced a modification of transcription regulation.

In DWCNT<sub>10mg</sub> condition, three up-regulated DEGs (NP9422, NP2884 and NP13077, Log2FC = 3; 1.8; 1.4, respectively) were associated with the same hypothetical protein (FRACYDRAFT\_264505). According to Uniprot database (Entry: A0A1E7ERH9), this protein could correspond to a lamin tail domain protein (InterPro: IPR001322). Six DEGs corresponding to this hypothetical protein were also up-regulated (Log2FC between 1.2 and 2.4) in *N. palea* at high FLG exposure among which 3 DEGs were shared with DWCNT<sub>10mg</sub> condition. This protein, which is an intermediate filament in metazoans cell, presenting a DNA binding molecular function, acts as a stress absorber and manages cytoskeleton machinery. This suggests that this putative protein can participate in the regulation of transcription. DEGs expressed in this condition were also found to contribute to the cellular component organization BP. In the most up-regulated DEGs in DWCNT<sub>10mg</sub>, 5 relating to this BP were involved in the transcription machinery (Log2FC between 3.1 and 6.6): one SPT2 homolog protein, one possible RNA polymerase sigma factor, one ubiquitin thioesteraseVirion core and a 5'-3' exoribonuclease 1. The SPT2 homolog and RNA polymerases sigma factors, which can be found in plastid transcriptional apparatus (Liere and Börner, 2007), are known to be involved in regulation and initiation of transcription, respectively. The exposition of *N. palea* to high FLG concentration also highly induced the overexpression (Log2FC = 5) of the SPT2 homolog protein. The ubiquitin thioesteraseVirion core was described as a Rho termination factor on the Uniprot database (Entry: W8W248). This transcription factor, generally found in bacteria (Das et al., 1976) but also described in plants plastids (Chi et al., 2014), ends the transcription process by binding specific mRNA sequence and disengages RNA polymerase. The up-regulation of this putative protein suggests an inhibition of specific genes and probably plastid-encoded genes, as suggested in a previous study where *N. palea* was exposed to high FLG concentration (Garacci et al. (submitted)). The hypothesis of the regulation of chloroplastic gene expression was reinforced

by the identification of a RAP (RNA-binding domain abundant in Apicomplexans) domain-containing chloroplastic-like encoded by NP14446 DEG, counting among the most down-regulated. Indeed, this motif found in *A. thaliana* proteins, is involved in chloroplast rRNA maturation (Kleinknecht et al., 2014). One more DEG among the 30 most down-regulated, NP11131, encoding for a predicted protein with a nucleic acid binding molecular function, was also involved in regulation of transcription. According to these results an exposition to high DWCNT concentration induced a strong modification of transcription regulation to probably implement an efficient response to the stress detected. These results were similar with those found in *N. palea* exposed to high FLG concentration causing growth inhibition (Garacci et al. (submitted)).

Moreover, the two DEGs associated with Pol poly proteins down-regulated in DWCNT<sub>0.1mg</sub> exposure also seemed to play a role in proteolysis according to GO annotation. In addition, a 26S proteasome non-ATPase regulatory subunit 2 encoded by a down-regulated DEG (NP4691, Log<sub>2</sub>FC = -0.8) was also identified in this condition. This subunit may correspond to a multiprotein complex, not including ATPase, involved in the degradation of unfolded protein, allowing for the maintenance of protein homeostasis (Kanayama et al., 1992). In diatoms exposed to DWCNT<sub>10mg</sub> concentration, a tetratricopeptide repeat domain was encoded by a DEG (NP1389, Log<sub>2</sub>FC = -2.5) in the most 30 down-regulated. It was also down-regulated, with the same magnitude, at high FLG concentration (Log<sub>2</sub>FC = -2.1). The functional description of this protein motif, frequently found in eukaryotes, is still not well defined. Tewari and co-workers (2010) suggested that proteins containing this motif could be molecular chaperones. Taking together, these results suggested that DWCNTs exposure, regardless the concentration, induce a decrease in post-translational modification, and then modulate protein activity.

#### *Adhesive response and cell wall alterations*

The most up-regulated DEG (NP133, Log<sub>2</sub>FC = 2.2) in DWCNT<sub>0.1mg</sub> condition participated in macromolecule localization and establishment of localization. The corresponding protein was a Gram-positive anchor protein, described in Gram-positive bacteria, containing hydrophobic domain responsible for the anchorage in cell membrane in order to be linked to the outer cell surface (Jenkinson, 1995).

The most up-regulated DEG (NP12499, Log2FC = 6.7) in DWCNT<sub>10mg</sub> condition, encoded for an extracellular matrix protein. A DEG encoding an ADP-ribosylation factor GTPase-activating 1 (NP3396), which contributed to regulation of molecular function process, was up-regulated (Log2FC = 3.6). Only identified in human, this factor is involved in membrane trafficking and /or vesicle transport and then is involved in the Golgi organization. Mazaki and co-workers (2001) demonstrated that cellular localization mechanisms, requiring this factor, were regulated during integrin-mediated cell adhesion. Thus, we could hypothesize that diatoms implemented cell adhesion process in response to DWCNT<sub>10mg</sub> exposure. In addition, several DEGs encoding for extracellular proteins were up-regulated in this condition (Log2FC between 1.4 and 4.5). A DUF3494 domain-containing protein (NP97), which is a protein family, involved in primary metabolic process was over-expressed. This protein, with a chitin binding molecular function, was found in bacteria but also in the Antarctic marine diatom *Nitzschia stellate* (Uniprot entry: H2EZP5\_9STRA) and in the polar sea-ice diatom *F. cylindrus* (Uniprot entry: D0FHA3). This last one is known to grow on ice thanks to the excretion of ice-binding protein belonging to the DUF3494 protein family (Bayer-Giraldi et al., 2018), suggesting that this protein, which is able to bind chitin, could play a role in cell adhesion in response to DWCNT<sub>10mg</sub> exposure. In addition, others DEGs encoding for proteins, with function in bacterial adhesion (Weiss and Hewlett, 1986), such as filamentous hemagglutinin family N-terminal domain proteins (3 DEGs : NP29, NP141 and NP12543) and adhesin (NP98) were up-regulated. All overexpressed DEGs involved in cell adhesion in DWCNT<sub>10mg</sub> were also induced in *N. palea* exposed to high FLG concentration where cells induced excretion of adhesive proteins in order to mitigate FLG contact and shading (Garacci et al. (submitted)). An adhesive response related an overproduction of hydrophobic-like proteins constituting the EPS network was also evidenced for *N. palea* exposed to DWCNT (Verneuil et al., 2015).

Furthermore, a benzoate transporter was encoded by an highly down-regulated DEG (NP2881, Log2FC = -2.4). The function of this transporter was highlighted by Nishikawa and co-workers (2008) in the Gram-negative bacteria *Pseudomonas putida* in the extrusion of benzoate from cells. Benzoate is an aromatic compound degraded into catechol by two specific enzymes in *P. putida* (Cowles et al., 2000). The moiety of catechol was found to be the link between protein and chitin in several animal and plant organisms reinforcing the strength of cuticle (Briggs, 1999). This could suggest that inhibition of benzoate transporter observed in *N. palea* exposed to DWCNT<sub>10mg</sub> induced the benzoate accumulation in cells in



order to increase benzoate degradation into catechol. Several proteins involved in cell adhesion presented a chitin binding molecular function. Thus, we can hypothesize that down-regulation of benzoate transporter could allow for the binding of adhesive proteins to chitin. As Durkin and co-workers (2009) evidenced the association of chitin with the cell wall of *T. pseudonana*, we could suggest that the under regulation of benzoate transporter could result in frustule reinforcement. These results were in accordance with the over-excretion of extracellular protein involved in EPS matrix demonstrated by Verneuil *et al.* (2015) in *N. palea* exposed to high DWCNT concentration. In addition, benzoate intermediates are known to convert chorismate, via a series of enzymatic reactions, in salicylic acid which is involved in the activation of disease resistance in plants following pathogens invasion (Vlot *et al.*, 2009). This suggests that not-extruded benzoate, thanks to the inhibition of benzoate transporter, may participate to signaling pathway in response to the stress induced by DWCNT<sub>10mg</sub> exposure.

The list of up-regulated adhesive proteins was longer, not forgetting the expression of an encoded (NP12716, Log<sub>2</sub>FC = 2.7) hemolysin-type calcium-binding protein, involved in cell adhesion. Lin and co-workers (2008) demonstrated the induction of hemolysin-type protein, with a calcium-binding function as observed in our study, in adhesion process. This suggests that calcium also plays a role in this process. Interestingly, 13 DEGs related to calcium were overexpressed in this condition, in which the two most up-regulated encoded for conserved repeat domain proteins (NP4436, Log<sub>2</sub>FC=3) and a cation transporting (NP13944, Log<sub>2</sub>FC=2.8), with calcium binding and calcium-transporting ATPase activity molecular function, respectively. This result suggested that calcium plays an important role in diatoms' response to environmental perturbations (Verret *et al.*, 2010), DWCNT<sub>10mg</sub> exposure here, but also in the cell adhesion as evocated in *Leptospria spp.* (Lin *et al.*, 2008).

Moreover, in DWCNT<sub>10mg</sub> exposure, two DEGs encoding a vegetative cell wall gp1-like protein (NP11576, Log<sub>2</sub>FC = 4), major component of cell wall in *Chlamydomonas reinhardtii* microalgae (Ferris *et al.*, 2001), and a lpxtg-motif cell wall anchor domain protein (NP15636, Log<sub>2</sub>FC = 2.7), allowing cells to resist to physical aggression (Fischetti *et al.*, 1990; Otto, 2014) were up-regulated in this condition. Overexpression of the encoded vegetative cell wall gp1-like protein was also noticed at high FLG concentration (Log<sub>2</sub>FC = 4.1). Three encoded silicon transporters (Log<sub>2</sub>FC between 1.8 and 2.4) and urea-proton symporters DUR3 (NP974, Log<sub>2</sub>FC = 3.1), known to transport urea but also polyamines required for silica precipitation, were also up-regulated suggesting the induction of frustule component

production (Allen et al., 2011). This suggested that diatoms exposed to DWCNT<sub>10mg</sub> implemented cell wall repair maybe due to wounds generated by physical interactions with DWCNTs. However, no alterations of the cell wall of *N. palea* exposed to DWCNT were observed in a previous study (Verneuil et al., 2015).

#### *Photosynthesis and oxidation reduction process*

Functional analysis revealed that exposition to low DWCNT concentration involved the under expression of one single DEG corresponding to a fucoxanthin chlorophyll a c (NP3424; Log<sub>2</sub>FC = -1.3). This photosynthetic pigment plays a crucial role in the light harvesting complex for photosynthesis. This would suggest a decrease in photosynthesis activity for *N. palea* exposed to low DWCNT concentration. This alteration was not observed for diatoms exposed to low FLG concentration, and Verneuil and co-workers (2014) did not detect significant decrease in photosynthesis activity nor chloroplasts abnormalities for diatoms exposed to MWCNT.

Nevertheless, in DWCNT<sub>10mg</sub> exposure, pigment biosynthetic process seemed to be repressed with the down-regulation (Log<sub>2</sub>FC between - 2.4 and -1.1) of uroporphyrinogen decarboxylase (2 DEGs involved in pigment metabolic process), plastid protoporphyrinogen, with oxygen-dependent protoporphyrinogen oxidase activity MF, protoporphyrinogen IX methyltransferase, coproporphyrinogen III oxidase, ferrochelatase and glutamyl-tRNA reductase. The down regulation of this chlorophyll biosynthetic pathway was also observed at high FLG concentration. In addition, in the down-regulated DEGs, three DEGs were described as mevalonate kinase (NP7195, Log<sub>2</sub>FC = -1), 2-C-methyl-D-erythritol 4-phosphate cytidyltransferase (NP1066; Log<sub>2</sub>FC = -2), and 4-hydroxy-3-methylbut-2-enyl diphosphate reductase (NP13478, Log<sub>2</sub>FC = -2.1), all involved in isoprenoid biosynthetic process. The biosynthesis of heme, which is one of the numerous biomolecules included in isoprenoids class, provides the precursor for the photosynthetic pigment in diatoms (Oborník and Green, 2005). Thus, we can hypothesize that the down regulation of these proteins may also have an impact on the photosynthetic pigment biosynthesis. This can be related with the under-expression of 3 DEGs (Log<sub>2</sub>FC between -3 and -1.8): one (NP1256) encoding an hypothetical protein (FisN\_24Hh015), sequenced in *F. solaris* (Uniprot entry: A0A1Z5KJ33), and two (NP8524 and NP3244) coding for an hemopexin domain-containing protein which were described as globin proteins (InterPro: IPR000971). These putative proteins appeared to play a role in the binding and transport of oxygen which occurs in photosynthesis process.

The downregulation of these proteins would suggest a decrease of photosynthesis activity caused by high DWCNT concentration exposure, as observed at high FLG concentration (Garacci et al. (submitted)). However, no significant correlation was previously observed between DWCNT concentration and photosystem II quantum yield (Verneuil et al., 2014). This could suggest that *N. palea* enhanced its photosynthesis efficiency to compensate the underproduction of photosynthetic pigment.

In DWCNT<sub>0.1mg</sub> condition, a DEG (NP3175) involved in small molecule metabolic process encoding for a thioredoxin-like protein was down-regulated (Log<sub>2</sub>FC = -1.5). Indeed, most of the thioredoxins present in the marine diatom *P. tricornutum* were found located mainly in the plastid, and in a lesser extent in mitochondrion and cytosol (Weber et al., 2009). It was suggested that thioredoxins in diatoms are involved in the redox regulation of the photosynthetic reactions (Kikutani et al., 2012). In comparison, the up-regulated PAF-AH at low FLG concentration is also involved in the cell protection from oxidative stress. Furthermore, a DEG (NP15862, Log<sub>2</sub>FC = -2.1) down-regulated in DWCNT<sub>10mg</sub> condition encoded for a violaxanthin de-epoxidase enzyme, which plays a role in most of xanthophyll cycles (Latowski 2011). Indeed, xanthophyll cycles can be involved in protection against oxidative stress generated by over-exposition to light, or environmental stress inducing ROS production in plants but also in *N. palea* (Willemoës and Monas, 1991). Nevertheless, the upregulation of a DEG (NP7708, Log<sub>2</sub>FC = 2.8) in the first 30 ones, revealed the induction of a nucleoredoxin 2 involved in cellular component biogenesis and cellular component organization. This protein seems to be a protective enzyme for antioxidant agents, such as catalase, in plant cells with ROS-induced oxidation (Kneeshaw et al., 2017). Thus, a decrease in photosynthesis can be related to a modulation in oxidation-reduction process in diatoms exposed to DWCNT which is similar with the results obtained in presence of high FLG concentration (Garacci et al. (submitted)).

### *Cellular transport*

Involved in cellular response to stimulus and localization, a down-regulated DEG (NP13123, Log<sub>2</sub>FC = -2.3) was overexpressed at low DWCNT concentration. It encoded for a multidrug resistance MATE (Multidrug And Toxic compound Extrusion) protein family. Proteins belonging to the MATE family, which is a part of multidrug efflux transporters families, were discovered in several microorganisms but more specifically in bacteria *Escherichia coli* and

*Staphylococcus aureus* involved in resistance to antimicrobial agents (Kuroda and Tsuchiya, 2009). MATE family was not found in plants but it was the case for one of the five multidrug pumps family: ABC transporters (Theodoulou, 2000). These active transporters, or pumps, typically extrude unrelated substances from cellular content thanks to an electrochemical gradient cation-dependent. But this mechanism requires energy from ATP hydrolysis (Higgins and Linton, 2004). The down-regulation of this putative protein might suggest that diatoms inhibited drug extrusion pathways, which are energetic consuming, in order to allocate energy for response to stress such as adhesive extracellular protein production, as suggested by Verneuil *et al.* (2014).

In DWCNT<sub>10mg</sub> condition, seven DEGs described as ABC transporters as well as multidrug and toxin extrusion protein and Drug Metabolite Transporter (DMT) protein superfamily were present in the 30 most down-regulated DEGs (Log<sub>2</sub>FC between - 2.3 and -1). Hypothetical functions, other than drug extrusion have been addressed to the ABC transporters family such as light-dependent cell elongation (Sidler *et al.*, 1998) and chlorophyll catabolite transport in *Arabidopsis thaliana* (Tommasini *et al.*, 1998). No transcript encoding for this transporter family was differentially expressed in FLG condition. As these transporters may function as ion channels transporters (Higgins, 2001), multiple DEGs encoding ion transport were also down-regulated (Log<sub>2</sub>FC between -2.1 and -1) such as copper, zinc potassium or molybdate transporters. On the other hand, transport of other substrates seemed to be activated in DWCNT<sub>10mg</sub> conditions. Indeed, DEGs involved in macromolecule localization were up-regulated, one of them (NP14837, Log<sub>2</sub>FC = 3.2) encoding a solute:sodium symporter family protein. This protein is known to be involved in transport of sugars, amino acids and water. Most of symporters are required for catabolic pathways and then allow cell to import organic resource as nitrogen or carbon (Jung, 2002). The ATP consumption at the origin of ABC transporters mechanism might explain the down regulation of this transporter family in *N. palea* exposed to DWCNT<sub>10mg</sub>. In such a stress condition, diatoms implemented energetic supply saving as a response to stress and resulting in EPS production. Furthermore, this response seems to be specific to DWCNT exposition, as it was not shared with FLG exposure (Garacci *et al.* (submitted)).

### *Alteration of energetic and aromatic amino acids biosynthesis pathways*

Only in DWCNT<sub>10mg</sub> condition, several DEGs involved in energetic metabolism and amino acids biosynthesis pathway were involved (Figure 42 details positions of enzymes encoded in these pathways). In fact, several DEGs encoding for proteins contributing to glycolysis pathway were identified. One encoding glucose-6-phosphate isomerase (G6PI) was down-regulated while two DEGs encoding for a triosephosphate isomerase, which is known to catalyse a reversible reaction to form glyceraldehyde-3-phosphate (Anderson and Cooper, 1969), were up-regulated. Others DEGs encoding for enzymes well known to contributing to this pathway were up-regulated such as enolase and pyruvate kinase. Anabolic metabolism also seemed to be modulated with the overexpression of an encoded dihydroxyacetone kinase, contributing to polysaccharides production during glycerol deprivation in the green algae *Dunaliella parva* (Lerner and Avron, 1977). In addition, a DEG encoding an UDP glucose-6-phosphate-dehydrogenase (G6PDH) involved in pentose phosphate pathway was up-regulated. Most of these DEGs were also regulated in the same way in diatoms exposed to high FLG exposure (Garacci et al. (submitted)). These results suggested that diatoms exposed to DWCNT<sub>10mg</sub> condition modified their energetic metabolism to implement an energy mobilization probably to undertake all others ATP-consuming pathways.

Shikimate pathway, occurring in chloroplasts according to Kroth and co-workers (2008), also appeared to be altered in DWCNT<sub>10mg</sub> condition. One DEG encoding a 3-deoxy-7-phosphoheptulonate synthase (DAHP synthase) was up-regulated, as observed at high FLG concentration, whereas an encoded 3-dehydroxyquininate synthase was down-regulated. Shikimate pathway connects carbon metabolism and aromatic amino acids (AAA) biosynthesis, tryptophan, phenylalanine and tyrosine (Maeda and Dudareva, 2012). DEGs encoding for proteins involved in AAA biosynthetic process were also observed in our dataset. An encoded chorismate synthase was up-regulated. The formation of chorismate leads to several AAA production, and the tryptophan pathway seemed to be particularly modified in this study. Indeed, a DEG encoding for a protein with a phosphoribosylanthranilate isomerase (PAI) activity was down-regulated. AAA are precursor of several organic molecules in plants including pigments or cell wall components, essential for defense and environmental response.

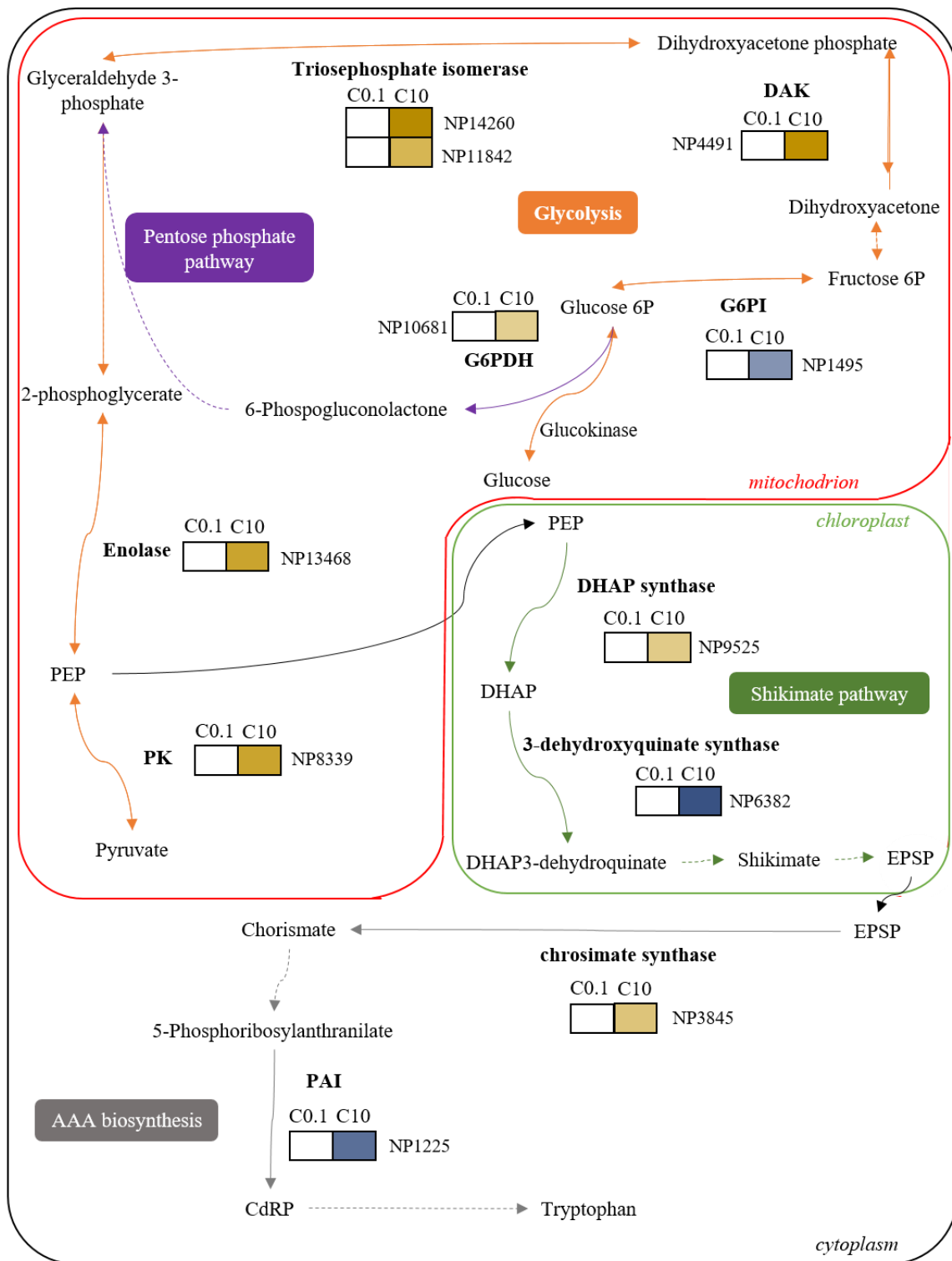


Figure 42. Representation of energetic metabolic pathways involved in *N. palea* exposed to CNTs. Colored squares indicated the regulation of gene encoding for enzymes functioning (in bold) after 48h of exposure to C0.1 (CNT<sub>0.1mg</sub>), C10 (CNT<sub>10mg</sub>). The scale in the bottom represents genes Log<sub>2</sub>FC value. Solid arrows indicate the conversion of each intermediate into the next one and the involved enzymes are shown next to each arrow. Dotted arrows indicate a reduction of chemical reaction to facilitate the reading of the figure. Black arrows indicate a transport of organic molecule between cellular compartment. For simplicity, the number and the shape of organelles are not representative of the reality in this figure. This schematic view was adapted from Maeda et al., (2012). Abbreviations: G6PI: glucose-6-phosphate isomerase; DAK: Dihydroxyacetone kinase; PK: pyruvate kinase; G6PD: glucose-6-phosphate dehydrogenase; DHAP: 3-deoxy-D-arabino-heptulosonate 7-phosphate; EPSP: 5-enolpyruvylshikimate 3-phosphate; CdRP: 1-(o-carboxyphenylamino)-1-deoxy-ribulose 5-phosphate PAI: phosphoribosylanthranilate isomerase.

## 5.4 Conclusion

The response of *N. palea* exposed to DWCNT was evaluated thanks to a transcriptomic analysis at low concentration, corresponding to potential future environmental condition, and high concentration, mimicking an accidental release. The amount of DEGs and expression pattern were less pronounced at low DWCNT concentration, where modulation of transcription machinery and regulation in post-translational modifications were noticed. A slight inhibition of the response to oxidative stress together with a decrease in photosynthesis (diminution of light harvesting and pigment biosynthetic process in DWCNT<sub>0.1mg</sub> and DWCNT<sub>10mg</sub> respectively) occurred in both conditions. High overexpression of adhesive proteins, with chitin association, was observed in both conditions. However, proteins involved in cell wall composition were only upregulated in high DWCNT exposure. In this condition, diatoms seemed to implemented energetic allocation by managing glucose metabolism, shikimate pathway and tryptophan biosynthesis, but also reducing drug extrusion process which is ATP consuming. This energetic allocation was probably linked to excretion of proteins and other compounds involved in cell adhesion. Overall these results evidenced mechanisms of diatoms' response exposed to growth non-inhibitory DWCNT concentrations.

## References

- Ajayan, P.M., Zhou, O.Z., 2001. Applications of Carbon Nanotubes. *Top. Appl. Phys.* 80, 391–425. [https://doi.org/10.1007/978-1-61779-052-2\\_15](https://doi.org/10.1007/978-1-61779-052-2_15)
- Alexa, A., Rahnenführer, J., 2018. Gene set enrichment analysis with topGO.
- Allen, A.E., Dupont, C.L., Oborník, M., Horák, A., Nunes-Nesi, A., McCrow, J.P., Zheng, H., Johnson, D.A., Hu, H., Fernie, A.R., Bowler, C., 2011. Evolution and metabolic significance of the urea cycle in photosynthetic diatoms. *Nature* 473, 203–207. <https://doi.org/10.1038/nature10074>
- Anderson, A., Cooper, R.A., 1969. Gluconeogenesis in *Escherichia coli*. The role of Triose Phosphate Isomerase. *FEBS Lett.* 4, 19–20.
- Andrade, L.R., Leal, R.N., Nosedá, M., Duarte, M.E.R., Pereira, M.S., Mourão, P.A.S., Farina, M., Amado Filho, G.M., 2010. Brown algae overproduce cell wall polysaccharides as a protection mechanism against the heavy metal toxicity. *Mar. Pollut. Bull.* 60, 1482–1488. <https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2010.05.004>
- Antosch, M., Mortensen, S.A., Grasser, K.D., 2012. Plant Proteins Containing High Mobility Group Box DNA-Binding Domains Modulate Different Nuclear Processes. *Plant Physiol.* 159, 875–883. <https://doi.org/10.1104/pp.112.198283>
- Armbrust, E.V., Berges, J.A., Bowler, C., Green, B.R., Martinez, D., Putnam, N.H., Zhou, S., Allen, A.E., Apt, K.E., Bechner, M., Brzezinski, M.A., Chaal, B.K., Chiovitti, A., Davis, A.K., Demarest, M.S., Detter, J.C., Glavina, T., Goodstein, D., Hadi, M.Z., Hellsten, U., Hildebrand, M., Jenkins, B.D., Jurka, J., Kapitonov, V. V., Kröger, N., Lau, W.W.Y., Lane, T.W., Larimer, F.W., Lippmeier, J.C., Lucas, S., Medina, M., Montsant, A., Obornik, M., Parker, M.S., Palenik, B., Pazour, G.J., Richardson, P.M., Rynearson, T.A., Saito, M.A., Schwartz, D.C., Thamatrakoln, K., Valentin, K., Vardi, A., Wilkerson, F.P., Rokhsar, D.S., 2004. The Genome of the Diatom *Thalassiosira Pseudonana*: Ecology, Evolution, and Metabolism. *Science* (80- ). 306, 79–86.
- Bayer-Giraldi, M., Sasaki, G., Azuma, N., Takata, M., Kipfstuhl, S., Hidemasa, K., Furukawa, Y., 2018. Ice-binding proteins from a sea-ice diatom: Their effect on ice growth and ice physical properties, in: 14th International Conference on the Physics and Chemistry of Ice (PCI).
- Bernard, C., 2007. Propriétés mécaniques des nanotubes de carbone en tant que nanosondes et leur fonctionnalisation par bio-nanoparticules. Université Sciences et Technologies - Bordeaux I.
- Bianco, A., Kostarelos, K., Prato, M., 2005. Applications of carbon nanotubes in drug delivery. *Curr. Opin. Biotechnol.* 9, 674–679. <https://doi.org/10.1016/j.cbpa.2005.10.005>
- Binns, D., Dimmer, E.C., Huntley, R.P., Barrell, D.G., Binns, D., Apweiler, R., 2009. QuickGO: a web-based tool for Gene Ontology searching. *Bioinformatics* 25, 3045–3046. <https://doi.org/10.1002/pmic.200800002>
- Bowler, C., Allen, A.E., Badger, J.H., Grimwood, J., Jabbari, K., Kuo, A., Maheswari, U., Martens, C., Maumus, F., Otiillar, R.P., Rayko, E., Salamov, A., Vandepoele, K., Beszteri, B., Gruber, A., Heijde, M., Katinka, M., Mock, T., Berges, J.A., Brownlee, C., Cadoret, J., Chiovitti, A., Valentin, K., Choi, C.J., Coesel, S., Martino, A. De, Detter, J.C., Durkin, C., Falciatore, A., Lopez, P.J., Lucas, S., Lindquist, E., Lommer, M., Napoli, C., Obornik, M., Parker, M.S., Petit, J., Porcel, B.M., 2008. The *Phaeodactylum* genome reveals the evolutionary history of diatom genomes. *Nature* 456, 239–244. <https://doi.org/10.1038/nature07410>
- Brar, S.K., Verma, M., Tyagi, R.D., Surampalli, R.Y., 2010. Engineered nanoparticles in wastewater and wastewater sludge - Evidence and impacts. *Waste Manag.* 30, 504–520. <https://doi.org/10.1016/j.wasman.2009.10.012>



- Briggs, D.E.G., 1999. Molecular taphonomy of animal and plant cuticles : selective preservation and diagenesis. *Philos. Trans. R. Soc. London* 354, 7–17. <https://doi.org/10.1098/rstb.1999.0356>
- Chi, W., He, B., Manavski, N., Mao, J., Ji, D., Lu, C., Rochaix, J.D., Meurer, J., Zhang, L., 2014. RHON1 Mediates a Rho-Like Activity for Transcription Termination in Plastids of *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell*. <https://doi.org/10.1105/tpc.114.132118>
- Chung, C., Hwang, S.L., 2009. The Identification of Three Novel Genes Involved in the Rapid-Growth Regulation in a Marine Diatom, *Skeletonema costatum*. *Mar. Biotechnol.* 11, 356–367. <https://doi.org/10.1007/s10126-008-9150-5>
- Cowles, C.E., Nichols, N.N., Harwood, C.S., 2000. BenR, a XylS Homologue, Regulates Three Different Pathways of Aromatic Acid Degradation in *Pseudomonas putida*. *J. Bacteriol.* 182, 6339–6346. <https://doi.org/10.1128/JB.182.22.6339-6346.2000>. Updated
- Das, A., Court, D.O.N., Adhya, S., 1976. Isolation and characterization of conditional lethal mutants of *Escherichia coli* defective in transcription termination factor rho. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 73, 1959–1963.
- Davies, D., 2003. Understanding biofilm resistance to antibacterial agents. *Nat. Rev. Drug Discov.* 2, 114–122. <https://doi.org/10.1038/nrd1008>
- De Volder, M.F.L., Tawfick, S.H., Baughman, R.H., Hart, A.J., 2013. Carbon Nanotubes : Present and Future Commercial Applications. *Science* (80- ). 339, 535–539. <https://doi.org/10.1126/science.1222453>
- Durkin, C.A., Mock, T., Armbrust, E.V., 2009. Chitin in diatoms and its association with the cell wall. *Eukaryot. Cell* 8, 1038–1050. <https://doi.org/10.1128/EC.00079-09>
- Falkowski, P.G., Barber, R.T., Smetacek, V., 1998. Biogeochemical Controls and Feedbacks on Ocean Primary Production. *Science* (80- ). 281, 200–207. <https://doi.org/10.1126/science.281.5374.200>
- Ferris, P.J., Woessner, J.P., Waffenschmidt, S., Kilz, S., Drees, J., Goodenough, U.W., 2001. Glycosylated Polyrproline II Rods with Kinks as a Structural Motif in Plant Hydroxyproline-Rice Glycoproteins. *Biochemistry* 40, 2978–2987. <https://doi.org/10.1021/bi0023605>
- Fischetti, V.A., Pancholi, V., Schneewind, O., 1990. Conservation of a hexapeptide sequence in the anchor region of surface proteins from Gram-positive cocci. *Mol. Microbiol.* 4, 1603–1605. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.1990.tb02072.x>
- Flahaut, E., Bacsá, R., Peigney, A., Laurent, C., Flahaut, E., Bacsá, R., Peigney, A., Laurent, C., Ccvd, G., 2003. Gram-scale CCVD synthesis of double-walled carbon nanotubes. *Chem. Commun.* 12, 1442–1443. <https://doi.org/10.1039/b301514a>
- Flemming, H., Wingender, J., 2010. The biofilm matrix. *Nature* 8, 623–633. <https://doi.org/10.1002/9783527620944.ch4>
- Freixa, A., Acuña, V., Sanchís, J., Farré, M., Barceló, D., Sabater, S., 2018. Ecotoxicological effects of carbon based nanomaterials in aquatic organisms. *Sci. Total Environ.* 619–620, 328–337. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2017.11.095>
- Gottschalk, F., Sun, T., Nowack, B., 2013. Environmental concentrations of engineered nanomaterials: Review of modeling and analytical studies. *Environ. Pollut.* 181, 287–300. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2013.06.003>
- Haas, B.J., Papanicolaou, A., Yassour, M., Grabherr, M., Philip, D., Bowden, J., Couger, M.B., Eccles, D., Li, B., Macmanes, M.D., Ott, M., Orvis, J., Pochet, N., Strozzi, F., Weeks, N.,

- Westerman, R., William, T., Dewey, C.N., Henschel, R., LeDuc, R.D., Friedman, N., Regev, A., 2013. De novo transcript sequence reconstruction from RNA-seq: reference generation and analysis with Trinity. *Nat Protoc.* 8, 1–43. <https://doi.org/10.1038/nprot.2013.084>.De
- Heydarizadeh, P., Marchand, J., Chenais, B., Sabzalian, M.R., Zahedi, M., Moreau, B., Schoefs, B., 2014. Functional investigations in diatoms need more than a transcriptomic approach. *Diatom Res.* 29, 75–89. <https://doi.org/10.1080/0269249X.2014.883727>
- Higgins, C.F., 2001. ABC transporters: physiology, structure and mechanism--an overview. *Res. Microbiol.* 152, 205–210. [https://doi.org/10.1016/S0923-2508\(01\)01193-7](https://doi.org/10.1016/S0923-2508(01)01193-7)
- Higgins, C.F., Linton, K.J., 2004. The ATP switch model for ABC transporters. *Nat. Struct. Mol. Biol.* 11, 918–926. <https://doi.org/10.1038/nsmb836>
- Hone, J., 2001. Phonons and thermal properties of carbon nanotubes. *Top. Appl. Phys.* 80, 273–286. [https://doi.org/10.1007/3-540-39947-X\\_11](https://doi.org/10.1007/3-540-39947-X_11)
- Hong, S., Myung, S., 2007. Nanotube electronics : A flexible approach to mobility. *Nature* 2, 207–208.
- Iijima, S., 1991. Helical microtubules of graphitic carbon. *Nature* 354. <https://doi.org/10.1038/354056a0>
- Iijima, S., Ichihashi, T., 1993. Single-shell carbon nanotubes of 1-nm diameter. *Nature* 363, 603–605. <https://doi.org/10.1038/363603a0>
- Jenkinson, H.F., 1995. Anchorage and release of Gram-positive bacterial cell-surface polypeptides. *Trends Microbiol.* 3, 333–335. [https://doi.org/10.1016/S0966-842X\(00\)88969-6](https://doi.org/10.1016/S0966-842X(00)88969-6)
- Joseph, T., Morrison, M., 2006. Nanotechnology in Agriculture and Food, Nanoforum Report. <https://doi.org/10.1002/9783527697724.ch8>
- Jung, H., 2002. The sodium / substrate symporter family : structural and functional features. *FEBS Lett.* 529, 73–77. [https://doi.org/10.1016/S0014-5793\(02\)03184-8](https://doi.org/10.1016/S0014-5793(02)03184-8)
- Kanayama, H., Tamura, T., Ugai, S., Kagawa, S., Tanahashi, N., Yoshimura, T., Tanaka, K., Ichihara, A., 1992. Demonstration that a human 26S proteolytic complex consists of a proteasome and multiple associated protein components and hydrolyzes ATP and ubiquitin-ligated proteins by closely linked mechanisms. *Eur. J. Biochem.* 206, 567–578. <https://doi.org/10.1111/j.1432-1033.1992.tb16961.x>
- Khodakovskaya, M. V, Silva, K. De, Nedosekin, D.A., Dervishi, E., Biris, A.S., Shashkov, E. V., Galanzha, E.I., Zharov, V.P., 2011. Complex genetic, photothermal, and photoacoustic analysis of nanoparticle-plant interactions. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 108, 1028–1033. <https://doi.org/10.1073/pnas.1008856108> /DCSupplemental.www.pnas.org/cgi/doi/10.1073/pnas.1008856108
- Kikutani, S., Tanaka, R., Yamazaki, Y., Hara, S., Hisabori, T., Kroth, P.G., Matsuda, Y., 2012. Redox regulation of carbonic anhydrases via thioredoxin in chloroplast of the marine diatom *Phaeodactylum tricorutum*. *J. Biol. Chem.* 287, 20689–20700. <https://doi.org/10.1074/jbc.M111.322743>
- Kim, J.M., To, T.K., Nishioka, T., Seki, M., 2010. Chromatin regulation functions in plant abiotic stress responses. *Plant, Cell Environ.* 33, 604–611. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3040.2009.02076.x>
- Kleinknecht, L., Wang, F., Stube, R., Philippar, K., Nickelsen, J., Bohne, A.-V., 2014. RAP, the Sole Octotricopeptide Repeat Protein in Arabidopsis, Is Required for Chloroplast 16S rRNA Maturation. *Plant Cell* 26, 777–787. <https://doi.org/10.1105/tpc.114.122853>
- Kneeshaw, S., Keyani, R., Delorme-Hinoux, V., Imrie, L., Loake, G.J., Le Bihan, T., Reichheld, J.-P.,

- Spoel, S.H., 2017. Nucleoredoxin guards against oxidative stress by protecting antioxidant enzymes. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 114, 8414–8419. <https://doi.org/10.1073/pnas.1703344114>
- Kroth, P.G., Chiovitti, A., Gruber, A., Martin-Jezequel, V., Mock, T., Parker, M.S., Stanley, M.S., Kaplan, A., Caron, L., Weber, T., Maheswari, U., Armbrust, E.V., Bowler, C., 2008. A Model for Carbohydrate Metabolism in the Diatom *Phaeodactylum tricornutum* Deduced from Comparative Whole Genome Analysis. *PLoS One* 3, e1426. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0001426>
- Kuroda, T., Tsuchiya, T., 2009. Multidrug efflux transporters in the MATE family. *Biochim. Biophys. Acta - Proteins Proteomics* 1794, 763–768. <https://doi.org/10.1016/j.bbapap.2008.11.012>
- Lawson, C.L., Swigon, D., Murakami, K.S., Darst, S.A., Berman, H.M., Ebright, R.H., 2004. Catabolite activator protein: DNA binding and transcription activation. *Curr. Opin. Struct. Biol.* 14, 10–20. <https://doi.org/10.1016/j.sbi.2004.01.012>
- Lee, J.W., Kang, H.M., Won, E.J., Hwang, D.S., Kim, D.H., Lee, S.J., Lee, J.S., 2016. Multi-walled carbon nanotubes (MWCNTs) lead to growth retardation, antioxidant depletion, and activation of the ERK signaling pathway but decrease copper bioavailability in the monogonont rotifer (*Brachionus koreanus*). *Aquat. Toxicol.* 172, 67–79. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2015.12.022>
- Lerner, H.R., Avron, M., 1977. Dihydroxyacetone Kinase Activity in *Dunaliella parva*. *Plant Physiol.* 59, 15–17. <https://doi.org/10.1104/pp.59.1.15>
- Li, B., Dewey, C.N., 2011. RSEM: Accurate transcript quantification from RNA-Seq data with or without a reference genome. *BMC Bioinformatics* 12, 1–16. <https://doi.org/10.1186/1471-2105-12-323>
- Liere, K., Börner, T., 2007. Transcriptional regulation and transcriptional regulation in plastids, in: *Cell and Molecular Biology of Plastids*. pp. 121–174. <https://doi.org/10.1007/4735>
- Lin, Y.P., Raman, R., Sharma, Y., Chang, Y.F., 2008. Calcium binds to leptospiral immunoglobulin-like protein, LigB, and modulates fibronectin binding. *J. Biol. Chem.* 283, 25140–25149. <https://doi.org/10.1074/jbc.M801350200>
- Love, M.I., Huber, W., Anders, S., 2014. Moderated estimation of fold change and dispersion for RNA-seq data with DESeq2. *Genome Biol.* 15, 1–21. <https://doi.org/10.1186/s13059-014-0550-8>
- Lu, J.P., 1997. Elastic Properties of Carbon Nanotubes and Nanoropes. *Phys. Rev. Lett.* 79, 1297–1300. <https://doi.org/10.1103/PhysRevLett.79.1297>
- Maeda, H., Dudareva, N., 2012. The Shikimate Pathway and Aromatic Amino Acid Biosynthesis in Plants. *Annu. Rev. Plant Biol.* 63, 73–105. <https://doi.org/10.1146/annurev-arplant-042811-105439>
- Mazaki, Y., Hashimoto, S., Okawa, K., Tsubouchi, A., Nakamura, K., Yagi, R., Yano, H., Kondo, A., Iwamatsu, A., Mizoguchi, A., Sabe, H., 2001. An ADP-ribosylation factor GTPase-activating protein Git2-short/KIAA0148 is involved in subcellular localization of paxillin and actin cytoskeletal organization. *Mol. Biol. Cell* 12, 645–662. <https://doi.org/10.1091/mbc.12.3.645>
- Mu, Q., Jiang, G., Chen, L., Zhou, H., Fourches, D., Tropsha, A., Yan, B., 2014. Chemical basis of interactions between engineered nanoparticles and biological systems. *Chem. Rev.* 114, 7740–7781. <https://doi.org/10.1021/cr400295a>
- Neuwirth, E., 2005. The RColorBrewer Package.
- Nishikawa, Y., Yasumi, Y., Noguchi, S., Sakamoto, H., Nikawa, J., 2008. Functional Analyses of *Pseudomonas putida* Benzoate Transporters Expressed in the Yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 72, 2034–2038. <https://doi.org/10.1271/bbb.80156>

- Nowack, B., Bucheli, T.D., 2007. Occurrence, behavior and effects of nanoparticles in the environment. *Environ. Pollut.* 150, 5–22. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2007.06.006>
- Oborník, M., Green, B.R., 2005. Mosaic origin of the heme biosynthesis pathway in photosynthetic eukaryotes. *Mol. Biol. Evol.* 22, 2343–2353. <https://doi.org/10.1093/molbev/msi230>
- Otto, M., 2014. Physical stress and bacterial colonization. *FEMS Microbiol. Rev.* 38, 1–21. <https://doi.org/10.1111/1574-6976.12088>
- Paerl, H., Pinckney, J., 1996. A Mini-review of Microbial Consortia : Their roles in aquatic production and biogeochemical cycling. *Microb. Ecol.* 31, 225–247. <https://doi.org/10.1007/s00248-007-9209-2>
- Petersen, E.J., Henry, T.B., Zhao, J., MacCusprie, R.I., Kirschling, T.L., Dobrovolskaia, M.A., Hackley, V., Xing, B., White, J.C., 2014. Identification and avoidance of potential artifacts and misinterpretations in nanomaterial ecotoxicity measurements. *Environ. Sci. Technol.* 48, 4226–4246. <https://doi.org/10.1021/es4052999>
- Pirkkala, L., Nykänen, P., Sistonen, L., 2001. Roles of the heat shock transcription factors in regulation of the heat shock response and beyond. *FASEB J.* 15, 1118–1131. <https://doi.org/10.1096/fj00-0294rev>
- R Core Team, 2013. R: a language and environment for statistical computing. R Found. Stat. Comput. Vienna, Austria.
- Rayko, E., Maumus, F., Maheswari, U., Jabbari, K., Bowler, C., 2010. Transcription factor families inferred from genome sequences of photosynthetic stramenopiles. *New Phytol.* 188, 52–66. <https://doi.org/10.1111/j.1469-8137.2010.03371.x>
- Research and Markets, 2016. The Global Nanomaterials Market to 2025.
- Shen, C.X., Zhang, Q.F., Li, J., Bi, F.C., Yao, N., 2010. Induction of programmed cell death in *Arabidopsis* and rice by single-wall carbon nanotubes. *Am. J. Bot.* 97, 1602–1609. <https://doi.org/10.3732/ajb.1000073>
- Shvedova, A.A., Pietriusti, A., Bengt, F., Kagan, V.E., 2012. Mechanisms of carbon nanotube-induced toxicity: Focus on oxidative stress. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 261, 121–133. <https://doi.org/doi:10.1016/j.taap.2012.03.023>
- Sidler, M., Hassa, P., Hasan, S., Ringli, C., Dudler, R., 1998. Involvement of an ABC transporter in a developmental pathway regulating hypocotyl cell elongation in the light. *Plant Cell* 10, 1623–36. <https://doi.org/10.1105/tpc.10.10.1623>
- Sun, T.Y., Gottschalk, F., Hungerbühler, K., Nowack, B., 2014. Comprehensive probabilistic modelling of environmental emissions of engineered nanomaterials. *Environ. Pollut.* 185, 69–76. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2013.10.004>
- Tewari, R., Bailes, E., Bunting, K.A., Coates, J.C., 2010. Armadillo-repeat protein functions: Questions for little creatures. *Trends Cell Biol.* 20, 470–481. <https://doi.org/10.1016/j.tcb.2010.05.003>
- Thebault, P., Boutin, G., Bhat, W., Rufiange, A., Martens, J., Nourani, A., 2011. Transcription Regulation by the Noncoding RNA SRG1 Requires Spt2-Dependent Chromatin Deposition in the Wake of RNA Polymerase II. *Mol. Cell Biol.* 31, 1288–1300. <https://doi.org/10.1128/MCB.01083-10>
- Theodoulou, F.L., 2000. Plant ABC transporters. *Biochim. Biophys. Acta - Biomembr.* 1465, 79–103. [https://doi.org/10.1016/S0005-2736\(00\)00132-2](https://doi.org/10.1016/S0005-2736(00)00132-2)
- Tommasini, R., Vogt, E., Fromenteau, M., Hörtensteiner, S., Matile, P., Amrhein, N., Martinoia, E.,

1998. An ABC-transporter of *Arabidopsis thaliana* has both glutathione-conjugate and chlorophyll catabolite transport activity. *Plant J.* 13, 773–780. <https://doi.org/10.1046/j.1365-313X.1998.00076.x>
- Trenfield, M.A., van Dam, J.W., Harford, A.J., Parry, D., Streten, C., Gibb, K., van Dam, R.A., 2015. Aluminium, gallium, and molybdenum toxicity to the tropical marine microalga *Isochrysis galbana*. *Environ. Toxicol. Chem.* 34, 1833–1840. <https://doi.org/10.1002/etc.2996>
- Vance, M.E., Kuiken, T., Vejerano, E.P., McGinnis, S.P., Hochella, M.F., Rejeski, D., Hull, M.S., 2015. Nanotechnology in the real world: Redeveloping the nanomaterial consumer products inventory. *Beilstein J. Nanotechnol.* 6, 1769–1780. <https://doi.org/10.3762/bjnano.6.181>
- Verneuil, L., Silvestre, J., Mouchet, F., Flahaut, E., Boutonnet, J., Bourdiol, F., Bortolamiol, T., Baqué, D., Gauthier, L., Pinelli, E., 2014. Multi-walled carbon nanotubes, natural organic matter, and the benthic diatom *Nitzschia palea*: “A sticky story.” *Nanotoxicology* 9, 119–229. <https://doi.org/10.3109/17435390.2014.918202>
- Verneuil, L., Silvestre, J., Randrianjatovo, I., Maracato-romain, C.-E., Girbal-Neuhauser, E., Mouchet, F., Flahaut, E., Gauthier, L., Pinelli, E., 2015. Double walled carbon nanotubes promote the overproduction of extracellular protein-like polymers in *Nitzschia palea*: An adhesive response for an adaptive issue. *Carbon N. Y.* 88, 113–125. <https://doi.org/10.1016/j.carbon.2015.02.053>
- Verret, F., Wheeler, G., Taylor, a R., Farnham, G., Brownlee, C., 2010. Calcium channels in photosynthetic eukaryotes: implications for evolution of calcium based signalling. *New Phytol.* 187, 23–43. <https://doi.org/10.1111/j.1469-8137.2010.03271.x>
- Vlot, A.C., Dempsey, D.A., Klessig, D.F., 2009. Salicylic Acid, a Multifaceted Hormone to Combat Disease. *Annu. Rev. Phytopathol.* 47, 177–206. <https://doi.org/10.1146/annurev.phyto.050908.135202>
- Warnes, G.R., Bolker, B., Bonebakker, L., Gentleman, R., Huber, W., Liaw, A., 2009. Various R programming tools for plotting data. *R Packag. version 2, 1.*
- Watanabe, T., Asai, K., Houki, A., 1986. Numerical estimation to organic pollution of flowing water by using the Epilithic Diatom Assemblage -Diatom Assemblage Index (DAIpo)-. *Sci. Total Environ.* 55, 209–218.
- Weber, T., Gruber, A., Kroth, P.G., 2009. The presence and localization of thioredoxins in diatoms, unicellular algae of secondary endosymbiotic origin. *Mol. Plant* 2, 468–477. <https://doi.org/10.1093/mp/ssp010>
- Weiss, A.A., Hewlett, E.L., 1986. Virulence factors of *bordetella pertussis*. *Ann. Rev. Microbiol.* 40, 661–686. <https://doi.org/0066-4227/86/1001-0661> \$02. 00 661
- Willemoës, M., Monas, E., 1991. Relationship between growth irradiance and the xanthophyll cycle pool in the diatom *Nitzschia palea*. *Physiol. Plant.* 83, 449–456. <https://doi.org/10.1111/j.1399-3054.1991.tb00119.x>

Supporting information for the article *Transcriptomic response of the freshwater diatom biofilm exposed to potential environmental and accidental concentrations of Carbon Nanotubes*

Table S4. Identification and description of the top 30 up and down-regulated DEGs in *N. palea* exposed to  $DWCNT_{10mg}$

DEG identification	Description	Log2FC	E-value
NP12499	extracellular matrix	6,76	2,32E-10
NP10895	SPT2 homolog	6,60	5,96E-92
NP97	DUF3494 domain-containing	4,52	1,94E-61
NP29	filamentous hemagglutinin family N-terminal domain	4,46	1,40E-49
NP11576	vegetative cell wall gp1-like	4,01	1,44E-37
NP3396	ADP-ribosylation factor GTPase-activating 1	3,61	1,02E-148
NP15833	possible RNA polymerase sigma factor	3,59	6,38E-22
NP98	adhesin [	3,58	1,51E-53
NP1265	hypothetical protein FisN_12Lh033	3,36	9,76E-43
NP4491	Dihydroxyacetone kinase (Fragment)	3,27	9,43E-46
NP5512	hypothetical protein THAOC_30976, partial	3,23	1,44E-107
NP14837	Solute:Sodium symporter family	3,18	0,00E+00
NP7579	ubiquitin thioesteraseVirion core	3,15	2,94E-13
NP12165	5 -3 exoribonuclease 1	3,13	0,00E+00
NP8268	predicted protein	3,10	1,96E-15
NP14260	triosephosphate isomerase	3,07	0,00E+00
NP974	Urea-proton symporter DUR3	3,07	0,00E+00
NP9422	hypothetical protein FRACYDRAFT_264505	3,01	1,65E-35
NP6948	RNA recognition motif-containing	2,98	2,93E-89
NP4436	conserved repeat domain	2,98	8,82E-129
NP141	filamentous hemagglutinin family N-terminal domain	2,94	2,63E-86
NP7708	nucleoredoxin 2	2,84	3,23E-53
NP3569	winged helix DNA-binding domain-containing	2,79	4,63E-34
NP6799	PAB1 binding	2,77	5,15E-109
NP14280	hypothetical protein FisN_3Hh170	2,76	9,46E-71
NP13944	cation transporting	2,75	0,00E+00
NP15636	lpxtg-motif cell wall anchor domain	2,75	9,14E-27
NP12716	hemolysin-type calcium-binding region	2,68	0,00E+00
NP13293	peptidase	2,66	0,00E+00
NP7607	chaperonin	2,65	0,00E+00

Table S4. continued

<b>DEG identification</b>	<b>Description</b>	<b>Log2FC</b>	<b>E-value</b>
NP15521	ABC transporter	-1,90	0,00E+00
NP12991	tryptophanyl-tRNA synthetase	-1,93	0,00E+00
NP4009	Uroporphyrinogen decarboxylase	-1,95	0,00E+00
NP15520	major facilitator superfamily domain-containing 5	-1,97	5,34E-117
NP10054	F-box only 31-like	-2,02	1,46E-129
NP12225	tRNA-intron endonuclease	-2,03	1,64E-114
NP1066	2-C-methyl-D-erythritol 4-phosphate cytidylyltransferase	-2,03	2,88E-141
NP412	ABC transporter	-2,05	0,00E+00
NP4070	Drug Metabolite Transporter (DMT) Superfamily	-2,06	1,74E-75
NP1375	plastid protoporphyrinogen	-2,06	0,00E+00
NP9085	heme oxygenase	-2,08	5,95E-96
NP15862	Violaxanthin de-epoxidase	-2,08	2,14E-135
NP14446	RAP domain-containing chloroplastic-like	-2,09	0,00E+00
NP8330	ABC transporter	-2,10	0,00E+00
NP9130	copper-transporting ATPase	-2,12	1,82E-37
NP63	multidrug and toxin extrusion 1-like	-2,12	2,68E-169
NP13478	4-hydroxy-3-methylbut-2-enyl diphosphate reductase	-2,14	0,00E+00
NP12688	ATP-binding subfamily G (WHITE) member 2	-2,16	0,00E+00
NP6382	3-dehydroquinase synthase	-2,19	0,00E+00
NP1256	hypothetical protein FisN_24Hh015	-2,19	1,02E-23
NP15192	RNA polymerase sigma factor	-2,26	0,00E+00
NP12837	winged helix DNA-binding domain-containing	-2,27	3,28E-10
NP11131	predicted protein	-2,31	2,84E-77
NP2913	ABC transporter A family member 7-like	-2,33	0,00E+00
NP14722	uroporphyrinogen decarboxylase	-2,42	0,00E+00
NP2881	benzoate transporter	-2,44	3,73E-118
NP1389	tetratricopeptide repeat family	-2,48	3,36E-149
NP14301	NAD(P)-binding Rossmann-fold superfamily	-2,49	4,34E-99
NP13280	predicted protein	-2,50	3,63E-87
NP8524	hemopexin domain-containing	-2,98	1,41E-122

## Références bibliographiques

- Alexa, A., Rahnenführer, J., 2018. Gene set enrichment analysis with topGO.
- Bianco, A., Kostarelos, K., Prato, M., 2005. Applications of carbon nanotubes in drug delivery. *Curr. Opin. Chem. Biol.* 9, 674–679. <https://doi.org/10.1016/j.cbpa.2005.10.005>
- Cabau, C., Escudié, F., Djari, A., Guiguen, Y., Bobe, J., Klopp, C., 2017. Compacting and correcting Trinity and Oases RNA-Seq de novo assemblies. *PeerJ*. <https://doi.org/10.7717/peerj.2988>
- Chomczynski, P., Sacchi, N., 2006. The single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction: Twenty-something years on. *Nat. Protoc.* 1, 581–585. <https://doi.org/10.1038/nprot.2006.83>
- Garacci, M., Barret, M., Mouchet, F., Sarrieu, C., Lonchambon, P., Flahaut, E., Gauthier, L., Silvestre, J., Pinelli, E., 2017. Few Layer Graphene sticking by bio film of freshwater diatom *Nitzschia palea* as a mitigation to its ecotoxicity. *Carbon N. Y.* 113, 139–150. <https://doi.org/10.1016/j.carbon.2016.11.033>
- Götz, S., García-Gómez, J.M., Terol, J., Williams, T.D., Nagaraj, S.H., Nueda, M.J., Robles, M., Talón, M., Dopazo, J., Conesa, A., 2008. High-throughput functional annotation and data mining with the Blast2GO suite. *Nucleic Acids Res.* 36, 3420–3435. <https://doi.org/10.1093/nar/gkn176>
- Haas, B.J., Papanicolaou, A., Yassour, M., Grabherr, M., Philip, D., Bowden, J., Couger, M.B., Eccles, D., Li, B., Macmanes, M.D., Ott, M., Orvis, J., Pochet, N., Strozzi, F., Weeks, N., Westerman, R., William, T., Dewey, C.N., Henschel, R., LeDuc, R.D., Friedman, N., Regev, A., 2013. De novo transcript sequence reconstruction from RNA-seq: reference generation and analysis with Trinity. *Nat Protoc.* 8, 1–43. <https://doi.org/10.1038/nprot.2013.084>
- Love, M.I., Huber, W., Anders, S., 2014. Moderated estimation of fold change and dispersion for RNA-seq data with DESeq2. *Genome Biol.* 15, 1–21. <https://doi.org/10.1186/s13059-014-0550-8>
- Meng, L., Feldman, L., 2010. A rapid TRIzol-based two-step method for DNA-free RNA extraction from *Arabidopsis* siliques and dry seeds. *Biotechnol. J.* 5, 183–186. <https://doi.org/10.1002/biot.200900211>
- Moisset, S., Tiam, S.K., Feurtet-Mazel, A., Morin, S., Delmas, F., Mazzella, N., Gonzalez, P., 2015. Genetic and physiological responses of three freshwater diatoms to realistic diuron exposures. *Environ. Sci. Pollut. Res.* 22, 4046–4055. <https://doi.org/10.1007/s11356-014-3523-2>
- Mu, Q., Jiang, G., Chen, L., Zhou, H., Fourches, D., Tropsha, A., Yan, B., 2014. Chemical basis of interactions between engineered nanoparticles and biological systems. *Chem. Rev.* 114, 7740–7781. <https://doi.org/10.1021/cr400295a>
- Pinto, F.L., Thapper, A., Sontheim, W., Lindblad, P., 2009. Analysis of current and alternative phenol based RNA extraction methodologies for cyanobacteria. *BMC Mol. Biol.* 10, 79. <https://doi.org/10.1186/1471-2199-10-79>
- R Core Team, 2013. R: a language and environment for statistical computing. R Found. Stat. Comput. Vienna, Austria.
- Sargent, L.M., Hubbs, A.F., Kashon, M.L., Dinu, C.Z., Salisbury, J.L., Lowry, D.T., Murray, A.R., Kisin, E.R., Siegrist, K.J., Battelli, L., Sturgeon, J.L., Bunker, K.L., Shvedova, A.A., Reynolds, S.H., 2012. Single-walled carbon nanotube-induced mitotic disruption. *Mutat. Res. - Rev. Mutat. Res.* 745, 28–37. <https://doi.org/10.1016/j.mrgentox.2011.11.017>
- Verneuil, L., 2015. Toxicité environnementale et écotoxicité de nanotubes de carbone chez des diatomées benthiques: de la cellule au biofilm. Institut National Polytechnique de Toulouse (INP Toulouse).



Verneuil, L., Silvestre, J., Mouchet, F., Flahaut, E., Boutonnet, J., Bourdiol, F., Bortolamiol, T., Baqué, D., Gauthier, L., Pinelli, E., 2014. Multi-walled carbon nanotubes , natural organic matter , and the benthic diatom *Nitzschia palea* : “ A sticky story .” *Nanotoxicology* 9, 119–229. <https://doi.org/10.3109/17435390.2014.918202>

## Chapitre 5

Effets d'une exposition à  
différentes formes allotropiques du  
carbone sur la composition de la  
matrice extracellulaire de  
*Nitzschia palea*

## 1 Contexte

Les études réalisées concernant la réponse cellulaire de *N. palea* après exposition au FLG, correspondant aux résultats présentés dans le Chapitre 3, et aux DWCNTs, travaux de thèse de Laurent Verneuil (Verneuil, 2015) ont permis de mettre en évidence le rôle majeur de la matrice exopolymérique ou EPS constituant du biofilm dans la réponse des algues avec pour effet principal un collage des NPCs et une épuration de la colonne d'eau. Le chapitre précédent confirmait ces observations macroscopiques en montrant une induction des gènes liés à la production de protéines contribuant à l'adhésion des cellules à la fois en présence de FLG, et des DWCNTs. Les observations du piégeage des nanoparticules au sein du réseau d'EPS laissent donc penser qu'une augmentation de la production d'EPS pourrait être engendrée par l'exposition au FLG, sans savoir si celle-ci provient de la perception du contact direct ou de l'ombrage généré par les nanoparticules de carbone. De même, il a été suggéré que la fraction protéique tenait une place importante dans l'atténuation des effets des DWCNTs en comparaison des carbohydrates (Verneuil et al., 2015). L'étude présentée dans ce chapitre s'est alors intéressée à l'effet du FLG et des DWCNTs sur la matrice extracellulaire grâce à une approche à la fois quantitative et qualitative. Cette étude a pour objectif de (i) comparer la composition de la matrice extracellulaire de biofilms exposées à deux formes allotropiques du carbone, (ii) évaluer la différence d'impact sur la production d'EPS entre une exposition directe au FLG et l'effet d'ombrage, enfin (iii) identifier les protéines extracellulaires impliquées dans la composition des EPS.

La grande difficulté de ce travail a résidé dans le fait que l'étude de la matrice extracellulaire implique une extraction des EPS sans pour autant endommager les cellules afin de ne pas contaminer les extraits protéiques avec le contenu intracellulaire. Ce chapitre présente dans un premier temps le développement de la méthode utilisée pour réaliser cette extraction en mettant en avant les difficultés rencontrées, avant d'aborder les résultats de cette étude dans une seconde partie rédigée sous la forme d'une publication.

## 2 Développement d'une technique d'extraction des EPS

Les matrices extracellulaires des biofilms benthiques étant majoritairement composées en protéines et carbohydrates (Flemming et al., 2007; Wingender et al., 1999), l'évaluation des effets des NPCs sur les EPS excrétées par *N. palea* s'est basée sur l'étude de ces composés.

Une première analyse quantitative est envisagée afin d'estimer la quantité d'EPS grâce aux dosages des protéines et des sucres. Le contenu protéique des échantillons a ensuite fait l'objet d'une analyse qualitative par spectrométrie de masse afin d'identifier les protéines induites dans la réponse extracellulaire des diatomées face à deux formes allotropiques du carbone. Cette approche qualitative implique une bonne qualité des échantillons, contenant des protéines extracellulaires non dégradées, mais également en quantité suffisante (10 µg de protéines au minimum). Plusieurs paramètres doivent alors être développés afin de s'assurer de l'absence de contenu intracellulaire, mais aussi de l'efficacité de l'extraction.

## 2.1 Choix d'un indicateur de l'intégrité cellulaire

Le principal objectif de la mise au point d'une méthode d'extraction des EPS est de limiter la libération du contenu intracellulaire, tout en récupérant une biomasse suffisante pour les analyses. Avant d'établir un protocole d'extraction, l'attention est portée sur le développement d'un indice de viabilité afin de pouvoir estimer la lyse cellulaire provoquée par les différentes étapes de l'extraction des EPS. Dans plusieurs études, la lyse cellulaire a été vérifiée par des observations microscopiques (Sesay et al., 2006; Staats et al., 1999; Takahashi et al., 2009). Cette méthode peu précise a été remplacée par le dosage de composants intracellulaires dans les extraits, comme l'ATP (Azeredo et al., 2003), l'ADN (D'Abzac et al., 2010) ou encore la glucose-6-phosphate déshydrogénase (Ras et al., 2008). Les diatomées étant des organismes photosynthétiques, le dosage de chlorophylle est également un bon indicateur de la libération de contenu intracellulaire.

Pour ces premiers essais, deux éléments ont été dosés après plusieurs temps de lyse cellulaire d'une culture de *N. palea* : l'ATP et la chlorophylle. Pour une même culture initiale, les diatomées ont subi une lyse aux ultrasons pendant 1, 2 et 3 min. Une fois les échantillons centrifugés et le surnageant récupéré, l'ATP a été dosé par mesure de luminescence en utilisant un kit commercial (ATP Determination Kit, Molecular probes) et des mesures de DO à 663 nm ont permis d'évaluer la concentration en chlorophylle. Pour la mesure d'ATP, un standard fourni dans le kit commercial a été utilisé pour réaliser la gamme étalon tandis qu'une gamme étalon de chlorophylle a été effectuée en lysant des cultures de densité cellulaire croissante aux ultrasons. Les corrélations entre le temps d'ultrasons subies par les diatomées et la quantité en ATP, et en chlorophylle détectée ont été testées en appliquant la méthode de Pearson (Figure 43).

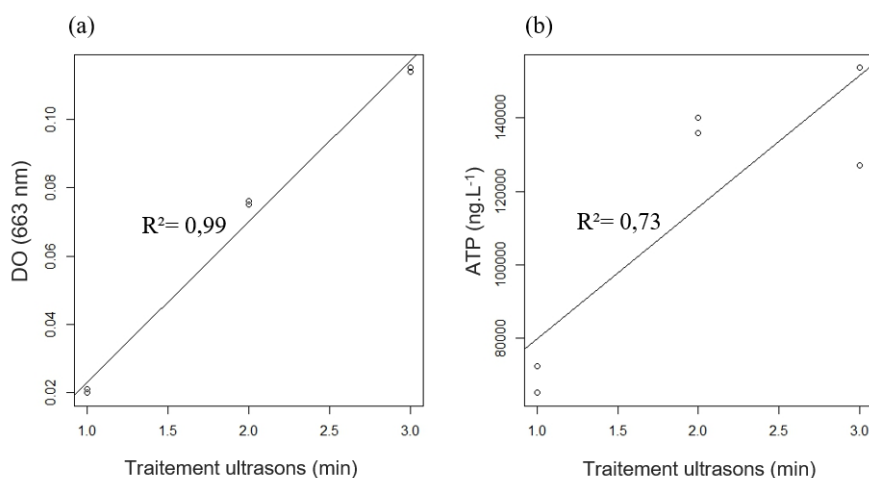


Figure 43. Comparaison de deux méthodes de mesure de lyse cellulaire. Corrélation entre (a) la mesure de la DO à 663 nm et le temps de lyse d'une culture aux ultrasons (b) la concentration en ATP et le temps de lyse d'une culture aux ultrasons.

Bien que les mesures d'ATP présentent une bonne corrélation avec le temps du traitement aux ultrasons (Figure 43b), la mesure de DO à 663 nm (Figure 43a), relatif à la concentration en chlorophylle dans les extraits, donne une meilleure indication de la présence de contenu intracellulaire. Lors des extractions d'EPS, le suivi de la lyse cellulaire tout au long des étapes du protocole sera effectué par une estimation de la chlorophylle grâce à la mesure de DO à 663 nm. Le calcul de la lyse cellulaire, exprimée en pourcentage par la suite, se base sur la concentration totale en chlorophylle de la culture étudiée. Ainsi, une fois l'extraction des EPS terminée, les cellules font l'objet d'une lyse totale et un dosage permet de déterminer la teneur totale en chlorophylle. Le pourcentage de lyse est alors calculé comme suit (où  $[chlorophylle]_{\text{extrait}}$  correspond à la concentration en chlorophylle estimée dans l'extrait en question et  $[chlorophylle]_{\text{culture}}$  indique la concentration en chlorophylle totale dans la totalité de la culture après extraction des EPS) :

$$Lyse (\%) = \frac{[chlorophylle]_{\text{extrait}} * volume_{\text{extrait}}}{\sum [chlorophylle]_{\text{extraits}} * volume_{\text{extraits}} + [chlorophylle]_{\text{culture}} * volume_{\text{culture}}} * 100$$

## 2.2 Technique de lyse

Lors du suivi de la lyse cellulaire déterminée par les mesures de chlorophylle, les pourcentages de lyse obtenus (Figure 46b) semblent très variables affichant de grandes valeurs d'erreur standard à la moyenne. Des essais ont été mis en place afin de diminuer cette variabilité en utilisant des techniques de lyse à la fois mécaniques et chimiques. Ainsi en plus de la lyse aux ultrasons, des méthodes de lyse à l'acétone et au broyage à billes de silice (similaire à celui appliqué lors des extractions d'ARN cf. Chapitre 4) ont été testées sur des cultures présentant des densités cellulaires croissantes.

La lyse à l'acétone des cultures de diatomées génère une gamme étalon satisfaisante présentant une bonne corrélation entre la concentration croissante en cellules et la DO à 663 nm. Cependant, en présence des solvants d'extraction, la gamme étalon se trouve modifiée pour une même concentration en acétone, modifiant ainsi les estimations en cellules lysées. Cette technique de lyse a lors été écartée. La gamme étalon obtenue après un broyage à billes au Fastprep des cultures de diatomées présente également une bonne corrélation avec la concentration en cellules lysées. Sa rapidité d'exécution et la reproductibilité du traitement pour tous les échantillons ont orienté le choix de la technique de lyse des échantillons en faveur du broyage à billes au Fastprep.

## 2.3 Extraction séquentielle

De nombreuses études se sont penchées sur l'étude des EPS, et plusieurs méthodes d'extraction d'EPS ont ainsi été mises au point. Le tableau présenté en Annexe 3 synthétise l'ensemble des méthodes d'extraction d'EPS décrites dans la littérature. Certaines font appel à des moyens mécaniques ou physiques (traitement aux ultrasons), afin de favoriser le détachement des EPS attachés aux cellules, et d'autres utilisent plutôt des agents chimiques dans le but de dénaturer les liaisons existant entre les EPS et les cellules. Parmi les composés chimiques les plus souvent utilisés, le Tween 20 ou le Triton permettent de dénaturer les EPS et de réduire les liaisons entre les EPS et les cellules favorisant ainsi la solubilisation des protéines hydrophobes. Les chélateurs de cations, comme l'EDTA ou les résines échangeuses de cations (CER), sont utilisés afin d'entraîner le détachement des cations divalents fortement impliqués dans les liaisons des EPS et permettre l'extraction des protéines à caractère ionique. Cependant, en fonction des analyses réalisées à la suite des extractions, la présence d'EDTA

dans les extraits implique une dialyse en fin de procédé (Monico et al., 2017; Sheng et al., 2010). De plus, la présence d'EDTA semble altérer la quantification des EPS extraits (Liu and Fang, 2002).

Dans le cadre de la thèse de Lurent Verneuil, des extractions de la matrice exo-polymérique ont également été réalisées. Lors de ces travaux, une extraction séquentielle des EPS en fonction de leurs caractéristiques a été mise en place. Ainsi, une première extraction à l'aide d'un tampon salin (PBS) permettait d'obtenir la fraction soluble des EPS, une deuxième fraction était extraite grâce à une incubation au Tween 20 (0,25%), correspondant aux protéines de nature hydrophobe, et enfin une dernière incubation à l'EDTA (1%) libérait les protéines de nature ionique. Après un premier essai du protocole précédemment utilisé, les extraits obtenus ont fait l'objet de mesure de chlorophylle afin de vérifier l'intégrité cellulaire. Un peu moins de 30% de lyse cellulaire a été observée pour les extraits obtenus après incubation au Tween 20 et environ 10% pour les échantillons résultant de l'incubation à l'EDTA. Ces premiers résultats ont alors encouragé l'optimisation du protocole d'extraction séquentielle des EPS, sur la base de la méthode précédemment établie, afin de diminuer cette lyse cellulaire.

Une des premières modifications apportées est de supprimer l'étape d'incubation au PBS après laquelle une quantité négligeable d'EPS y sont extraites. La qualité des extraits peut également être améliorée en réalisant toutes les manipulations, de la récupération des cultures jusqu'à l'obtention du culot final, en chambre froide à 4°C. Ceci limite ainsi la lyse cellulaire, mais également la dégradation des EPS extraits. De plus, des prétraitements chimiques peuvent parfois être entrepris en ajoutant des fixateurs cellulaires, comme le formamide ou le glutaraldéhyde afin de limiter la lyse et donc de contaminer les extraits protéiques (Delattre et al., 2016). Un prétraitement a alors été testé en fixant les cellules au formamide (37%) avant les incubations au Tween 20 et à l'EDTA. Par ailleurs, la soude (NaOH) semble être également efficace pour extraire les EPS en dissociant les groupements acides des EPS grâce à la diminution du pH (Adav et al., 2008). D'après Liu & Fang (2002), l'enchaînement d'un prétraitement au formamide avec une incubation au NaOH seraient la technique d'extraction la plus efficace. Cette méthode fait alors l'objet d'un des protocoles testés dans cette mise au point. Une proposition supplémentaire a été faite concernant l'ordre des incubations au Tween 20 et à l'EDTA. Une hypothèse selon laquelle les protéines à caractère hydrophobe se trouveraient majoritairement au cœur de la matrice exo-polymérique a motivé l'essai d'un autre protocole où ces deux incubations ont été inversées. Enfin, les interférences possibles de

l'EDTA avec certaines méthodes d'analyse et de quantification suggère l'utilisation d'un autre composé chimique permettant de récupérer les protéines à caractère ionique, comme la CER (50 mg CER pour 10 mg de masse sèche). Ainsi, 6 protocoles ont été testés sur des biofilms de 168h (excepté pour le protocole avec une incubation en présence de CER réalisé sur des biofilms de 144h). La Figure 44 détaille l'ensemble des expérimentations réalisées.

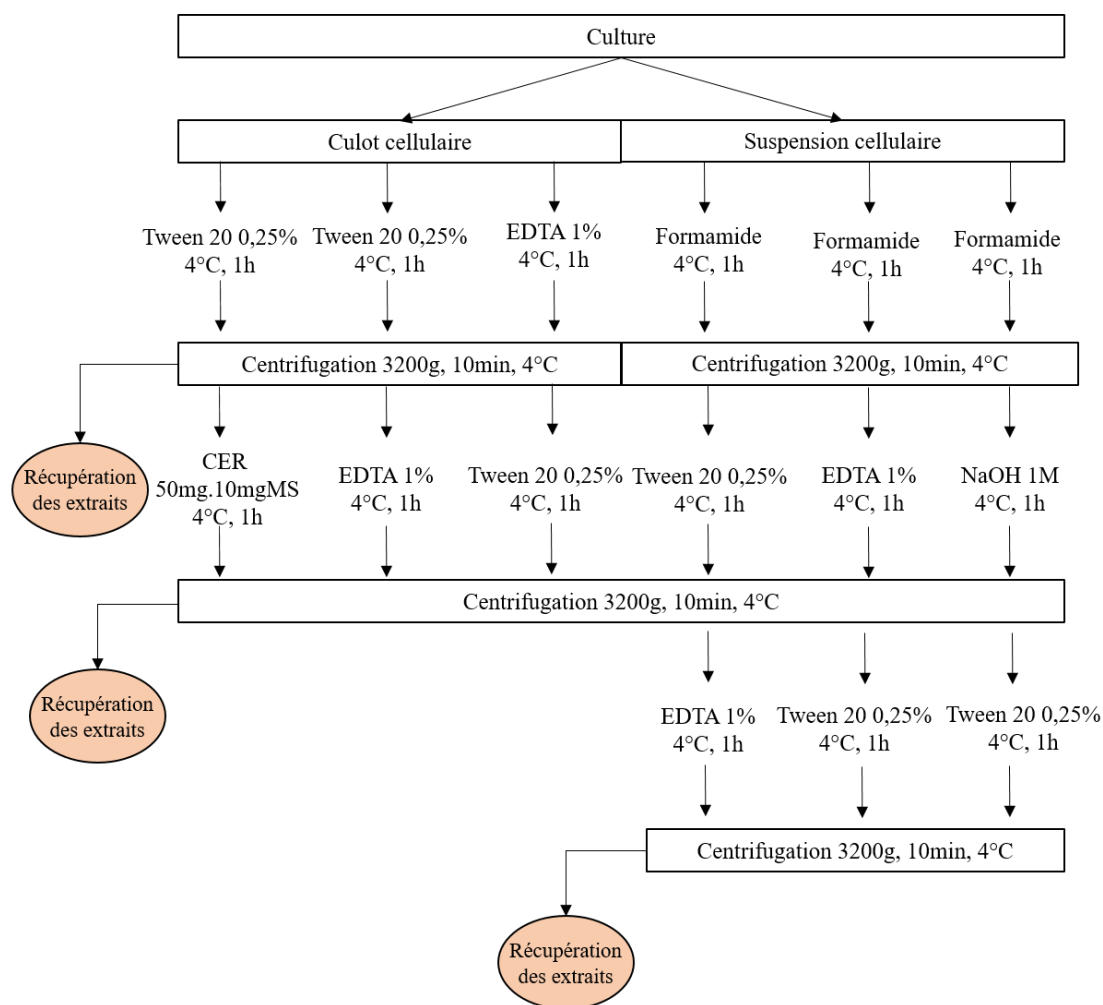


Figure 44. Comparaison de six protocoles d'extraction des EPS d'un biofilm de diatomée.



Les essais comprenant un traitement à la soude ont été stoppés directement après cette incubation à cause de la coloration verte des cultures. Une importante lyse cellulaire a ainsi pu être constatée suite à l'incubation à la NaOH, les mesures de chlorophylle n'ont pas été effectuées et ce protocole a directement été écarté. Les mesures de chlorophylle des cultures incubées en présence de CER présentaient un niveau de lyse au-delà de 3% qui par comparaison au premier protocole établie par Laurent Verneuil était plus important (Figure 45). L'EDTA a donc été conservé pour la suite des expérimentations.

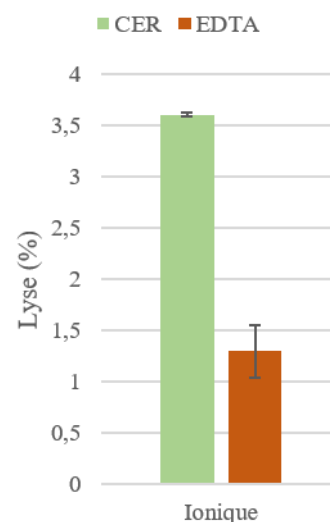


Figure 45. Estimation de la lyse cellulaire après 1h d'incubation en présence de CER (50mgCER.10mgMS) ou d'EDTA

Suite aux extractions, les teneurs en protéines ont été déterminées en utilisant un kit commercial de dosage à l'acide bicinchoninique (BCA) (Pierce™ BCA Protein Assay Kit) en utilisant comme standard l'albumine de sérum bovin (BSA). La mesure est ensuite effectuée en mesurant l'absorbance à 562 nm. Le reste des résultats concernant la quantité de protéines extraites et la lyse cellulaire estimée sont présentés dans la Figure 46.

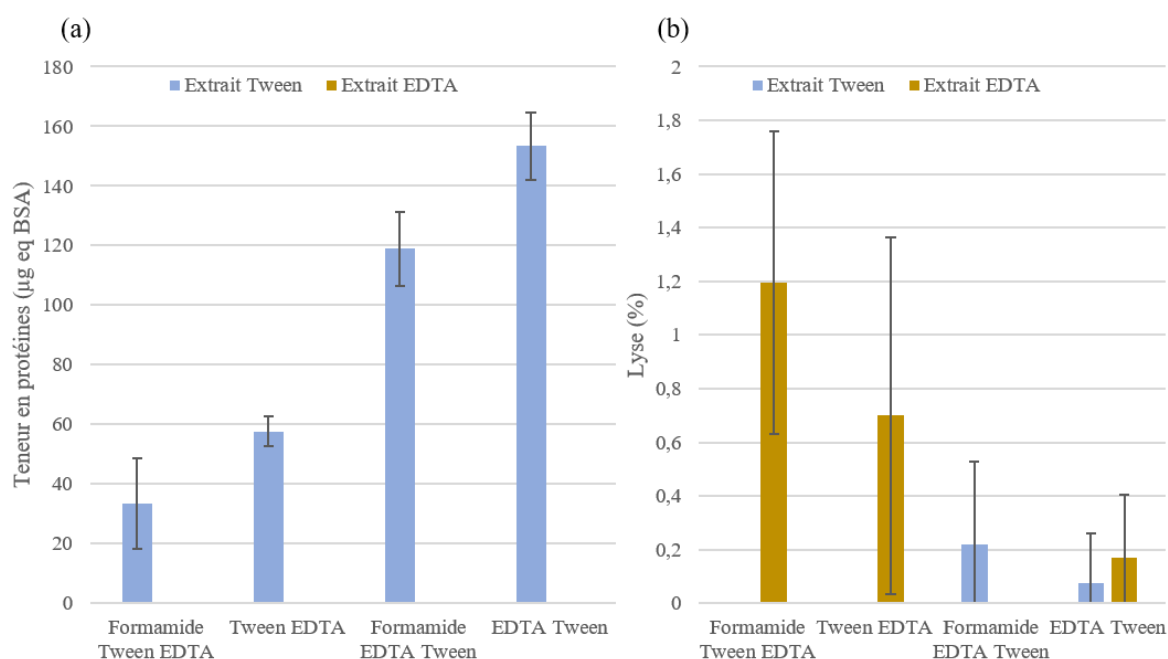


Figure 46. Résultats de quatre protocoles d'extraction d'EPS. (a) Quantité de protéines extraites et (b) estimation de la lyse cellulaire pour chacun des étapes d'extraction.

D'après les dosages protéiques, seule la fraction correspondant aux protéines à caractère hydrophobe est détectée (Figure 46a). Ces protéines semblent représenter la majorité des protéines présentes dans la matrice extracellulaire. L'estimation de la lyse cellulaire montre pourtant une lyse des extraits à l'EDTA de l'ordre de 0 à  $1,2 \pm 0,6\%$ , tous protocoles confondus (Figure 46b). Pour les échantillons extraits à l'EDTA, l'absence de détection de protéine en présence de lyse cellulaire peut s'expliquer par une interférence de l'EDTA avec la méthode de quantification utilisée. En effet, plusieurs gammes étalons ont été effectuées et sur chacune d'entre elles, la concentration protéique et la DO mesurée ne présentaient pas une bonne corrélation, avec des  $R^2$  allant de 0,31 à 0,85. Après les dosages, les valeurs obtenues font l'objet d'un calcul de limite de détection sur la base de la gamme étalon afin de déterminer la valeur minimum pour laquelle un composé est réellement présent. L'équation permettant de calculer la limite de détection est la suivante (avec  $\sigma$  représentant l'écart-type) :

$$\text{Limite de détection} = 3,28 \sigma$$

La limite de détection calculée à partir de la gamme étalon réalisée en présence d'EDTA était relativement haute du fait de la grande variabilité des mesures (surtout pour les faibles concentrations), considérant une détection de protéines à partir de  $350 \text{ mg.L}^{-1}$  environ. Ceci engendre donc l'élimination de la totalité des valeurs de dosage obtenues, expliquant l'absence de protéines détectée mais la présence de lyse cellulaire.

D'après les pourcentages de lyse cellulaire, l'ajout d'un prétraitement au formamide ne limite pas la lyse dans tous les cas ( $1,2 \pm 0,6\%$  de lyse lors de l'application du protocole formamide Tween EDTA). Les méthodes présentant les plus faibles valeurs de lyse  $< 0,6\%$  sont obtenues lors de l'application d'une incubation à l'EDTA avant celle du Tween avec ou sans prétraitement au formamide. Ce sont également celles qui permettent d'extraire la plus de protéines. Cependant, l'absence de prétraitement au formamide semble augmenter le rendement de l'extraction sans engendrer de lyse cellulaire. Ainsi le protocole choisi pour l'étude d'impact des NPCs sur la composition de la matrice cellulaire comprend une incubation à l'EDTA (1%, 1h), suivi d'une incubation au Tween (0,25%, 1h) sans prétraitement des cultures, le tout réalisé à  $4^\circ\text{C}$ .

## 2.4 Quantification

Les essais d'extraction d'EPS ont mis en avant un dernier paramètre à améliorer : le dosage des protéines en présence d'EDTA. Lors des extractions d'EPS, l'utilisation de l'EDTA entraîne souvent une étape de purification afin d'éliminer ce composé incompatible avec certaines méthodes de quantification. Il existe quatre principales méthodes de dosage des protéines (Tableau 5) et dans deux d'entre elles l'EDTA est incompatible. La méthode de Lowry est totalement incompatible avec la présence d'EDTA, mais la méthode de quantification au BCA, utilisée dans nos expérimentations, tolère la présence d'EDTA jusqu'à 10 mM.

Tableau 5. Présentation des différentes méthodes de quantification des protéines

Méthode	Longueur d'onde d'absorbance	Mécanisme	Limite de détection	Avantages	Inconvénients	Incompatibilité
Absorption UV	280 nm	Absorption tyrosine et tryptophane	0.1-100 µg/ml	Petit volume, rapide, pas chère	Interférence des composés présentant le même spectre d'absorbance	
Acide Bicinchoninique (BCA)	562 nm	Réaction de Biuret : réduction du cuivre ( $\text{Cu}^{2+}$ en $\text{Cu}^+$ ) grâce à la présence de résidus cystéine, cystéine, tryptophane et tyrosine	20-2000 µg/ml	Compatible avec les détergents et agents dénaturants, faible variabilité	Faible voir non compatible avec les agents réducteurs	EDTA >10mM Tween >5% Triton X-100 > 5% Tris > 250mM Ethanol > 10%
Lowry	750 nm	Réaction de Biuret et production de la coloration bleu par la réaction entre le réactif de Folin-Ciocalteu et le complexe cuivre-protéines	10-1000 µg/ml	Très sensible et précis	Incompatible avec les détergents et agents réducteur, procédure longue	Carbohydrates EDTA Tris
Bradford ou bleu de Coomassie	470 nm	Liaison du bleu de Coomassie avec les protéines	20-2000 µg/ml	Compatible avec les agents réducteurs, rapide	Incompatible avec les détergents	Tween Triton X-100

Le but étant de trouver une méthode de quantification permettant de doser tous les extraits de la même manière, le réactif de Bradford ne peut donc être utilisé du fait de son incompatibilité avec les détergents non ioniques comme le Tween. L'utilisation de la méthode de mesure d'absorption à 280 nm ne serait pas fiable dans notre cas. En effet, cette méthode présente un inconvénient majeur lié à la présence de composés présentant une absorption à cette longueur, comme les acides nucléiques. Or il a été démontré que la matrice extracellulaire des biofilms contenait également de l'ADN extracellulaire (Tang et al., 2013). De plus, la présence de NPCs, notamment de FLG à forte concentration entraîne une mortalité des diatomées risquant ainsi d'entraîner la libération d'ADN. Les échantillons obtenus à partir des cultures exposées au FLG seraient alors contaminées par la présence d'ADN qui interfèrera lors de la mesure

d'absorption à 280 nm. La solution envisagée pour pouvoir doser tous les extraits avec une même méthode de quantification est de précipiter tous les extraits protéiques à l'acide trichloracétique (TCA) pour ensuite les redissoudre dans une solution tamponnée (contenant du sulfate de cuivre, du sodium citrate, du carbonate de sodium et de la soude). Cette manipulation a ensuite permis de réaliser la méthode de quantification au BCA, plus rapide et suffisamment précise.

L'ensemble des étapes réalisées lors de l'extraction et du dosage des EPS sont résumées dans la Figure 47. Lors des expérimentations en présence de NPCs, la fraction soluble a tout de même été conservée avant le grattage du biofilm, pour récupérer les cellules, et après le grattage afin d'estimer à la fois la concentration en EPS solubles mais également pour s'assurer de l'absence d'altération des cellules par ce procédé.

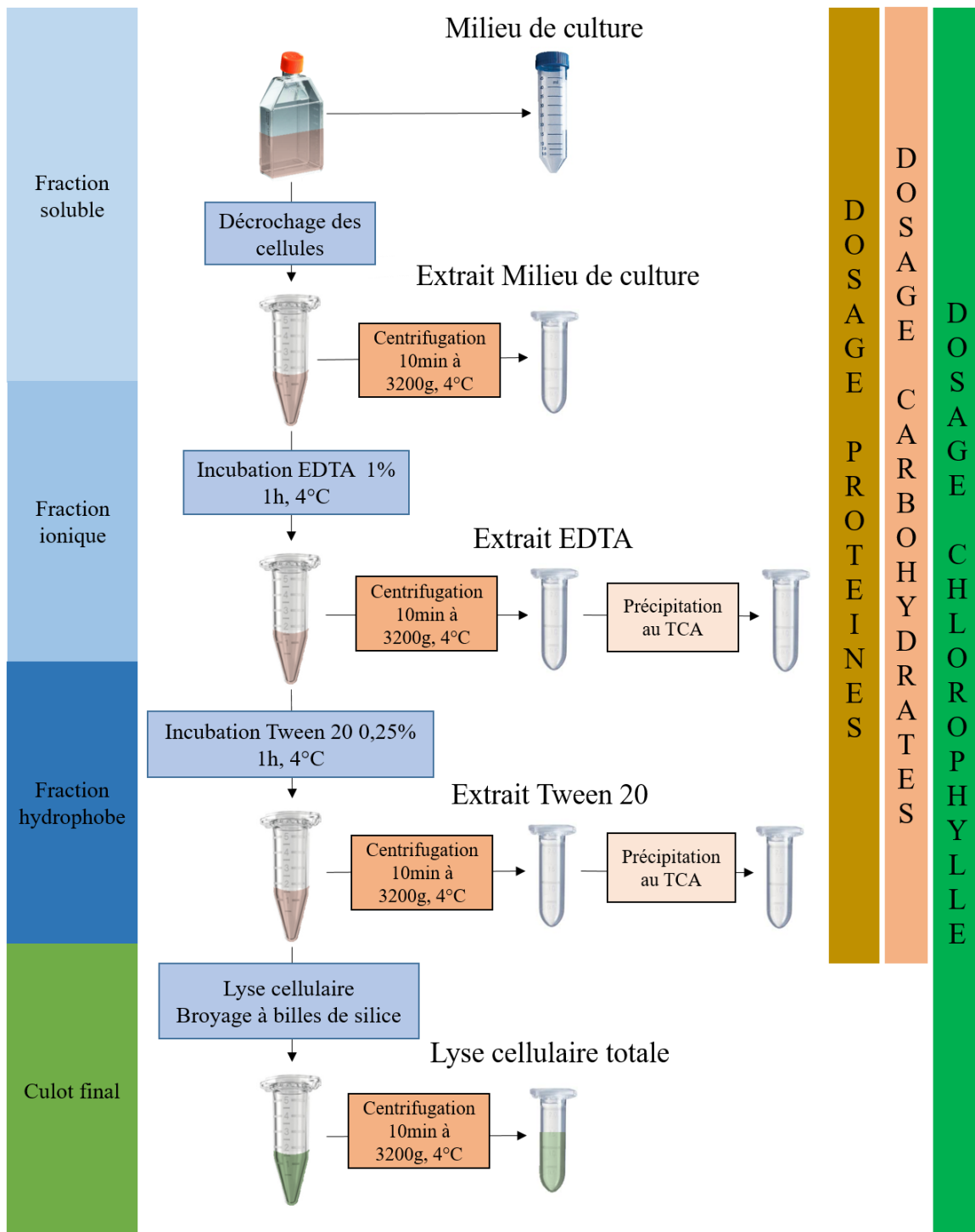


Figure 47. Protocole d'extraction d'EPS d'un biofilm de diatomée benthique

### 3 Etude de la réponse extracellulaire de *N. palea* en exposition à différentes formes allotropiques du carbone

#### Résumé

Cette étude a permis d'établir un premier aperçu de l'exoprotéome de *N. palea*. Les composants des matrices extracellulaires mentionnés dans la littérature ont ainsi été retrouvés grâce à l'analyse fonctionnelle des 100 premières protéines les plus abondantes suggérant ainsi la présence de protéines, impliquées dans l'adhésion cellulaire, de carbohydrates, de glycoprotéines. Des protéines impliquées dans le processus de traduction, pouvant potentiellement avoir une fonction dans l'adhésion cellulaire, ont également été retrouvées. La réponse induite aux faibles concentrations en nanoparticules de carbone entraîne principalement la surproduction de protéines relatives au processus de traduction, ces effets sont plus marqués en présence de DWCNTs. L'exposition des diatomées à du FLG en condition d'ombrage seul entraîne une réponse extracellulaire différente de celle observée en contact direct, induisant principalement une sous-production des protéines extracellulaires. Les protéines surexcrétées dans la condition d'ombrage correspondent en majorité à des fonctions cataboliques révélant la mise en place d'une économie d'énergie. Par ailleurs, une surexcrétion significative des exoprotéines, plus prononcée pour les cultures exposées aux DWCNTs, a été observée pour les cultures exposées à de fortes concentrations en nanoparticules de carbone. Les diatomées semblent alors mettre en place un complexe d'adhésion, incluant des protéines associées à de la chitine, probablement pour renforcer le réseau d'EPS. Les protéines les plus abondantes de cette étude, retrouvées chez les cultures exposées aux fortes concentrations en DWCNTs, présentent une fonction associée à celle des microtubules, suggérant un rôle majeur de ces protéines dans la réponse des diatomées. De plus, l'excrétion d'enzymes protéolytiques impliquées dans le catabolisme a été mise en relation avec la réduction de la production de protéines impliquées dans plusieurs voies métaboliques. L'ensemble de ces résultats suggèrent, pour les fortes doses testées, la mise en place d'une modulation de l'allocation énergétique orientée vers l'excrétion d'EPS, qu'elle que soit la nature des nanoparticules. Les réponses extracellulaires générées par *N. palea* montrent une forte similarité pour les deux formes de nanoparticules pour la même gamme de concentration testée. La réponse étant plus liée à la concentration qu'à la forme allotropique.

L'ensemble de ces résultats sont détaillés dans la partie suivante rédigée sous la forme d'un article scientifique en préparation :

### Role of exoproteome in diatoms' biofilm response to carbon nanoparticles

Marion Garacci, Maialen Barret, Claire-Emmanuelle Marcato-Romain, Emmanuel Flahaut, George Chimowa, Annie Perrault, Jérôme Silvestre, Laury Gauthier and Eric Pinelli

## Role of exoproteome in diatoms' biofilm response to carbon nanoparticles

Marion Garacci<sup>1</sup>, Maialen Barret<sup>1,\*</sup>, Claire-Emmanuelle Marcato-Romain<sup>2</sup>, Emmanuel Flahaut<sup>3</sup>, George Chimowa<sup>3</sup>, Annie Perrault<sup>1</sup>, Jérôme Silvestre<sup>1</sup>, Laury Gauthier<sup>1</sup> and Eric Pinelli<sup>1</sup>

<sup>1</sup> EcoLab, Université de Toulouse, CNRS, Toulouse, France,

<sup>2</sup> LBAE (Laboratoire de Biotechnologies Agro-alimentaire et Environnementale), Université de Toulouse, UPS EA 4565, Institut Universitaire de Technologie, 24 Rue d'Embaque's, 32000 Auch, France

<sup>3</sup> Institut Carnot CIRIMAT (Centre Inter-universitaire de Recherche et d'Ingénierie des MATériaux), Université de Toulouse, INP, UPS, UMR CNRS 5085, Toulouse, France

### Abstract

Remarkable physical chemical properties of Few Layer Graphene (FLG) and Carbon Nanotubes (CNT), pushed industries to develop nanotechnology, and its use in an increasing number of current life items. Their future massive production will probably increase environmental discharge, and accumulation in aquatic ecosystems. A proteomic approach was used in this study to assess the extracellular response of the axenic *Nitzschia palea* biofilm exposed to different allotropic forms of carbon nanoparticles at low (0.1 mg.L<sup>-1</sup>) and high concentration (10 and 50 mg.L<sup>-1</sup> for FLG and CNT, respectively). As FLG is known to induce significant shading, a distinction between direct exposure and shading exposition was conducted at high FLG concentration. A quantitative and qualitative analysis of extracellular proteins were performed. The exoproteome of *N. palea* was characterized and the presence of translation elongation factor, which appeared to have a significant role in diatoms' response to low carbon nanoparticles concentration, was discussed. Functions of proteins differentially overproduced in each exposure condition related to control condition were discussed. A significant overproduction of hydrophobic-like proteins and carbohydrates was observed in exposition to high FLG and CNT concentration, while shading condition induced four times more under than overproduced proteins. A major extracellular enzymatic response was induced in shading condition with low number of similar exoproteins with the direct contact condition. An "adhesive complex" involved in high carbon nanoparticles concentrations exposures was proposed including specific adhesive protein, carbohydrates, chitin and extracellular DNA. The role of microtubules in response of high DWCNTs concentration was discussed. This study highlighted an important extracellular response of *N. palea* specificity for carbon nanoparticles concentration.



### 3.1 Introduction

Since the discovery of carbon nanoparticles, scientific interest and investigations on their physical chemical properties have risen continually (Pitkethly, 2004; Zhang et al., 2011). Newly synthesized for the first time, graphene is a bi-dimensional crystal composed of a monolayer of carbon with atoms organized in honeycombs. It is the finest carbon nanoparticle ever obtained (Novoselov et al., 2004). Graphene can be functionalized or composed of different numbers of carbon layers leading to several derivatives including Few Layer Graphene (FLG). The number of carbon layers of FLG is not higher than 10. The graphene nanometric thickness, not exceeding 100 nm, does not harm its mechanical properties. On the contrary, it combines exceptional bendability and strength (Lee et al., 2008; Zhu et al., 2010). Carbon nanotubes (CNTs), constituted of one (SWCNTs), two (DWCNTs), or several (MWCNTs) carbon layers (graphene) enrolled to form a cylindrical structure (Iijima, 1991), is one of the most famous carbon nanoparticles thanks to its remarkable properties and its synthesis facilities (Zhang et al., 2011). CNT and FLG have both outstanding electrical (Kasumov et al., 1999; Yan et al., 2015), thermal (Hone, 2001; Mahanta and Abramson, 2012) and optical properties (Nair et al., 2008; Popov, 2004) which bring them to be the new component of nanocomposites used in numerous nanotechnologies (Paul and Robeson, 2008; Potts et al., 2011). Thus, carbon nanoparticles represent a consequent economical stake in different industrial fields, such as energy (Baughman et al., 2002; Brownson et al., 2011) or biomedicine (Bianco et al., 2005; Feng and Liu, 2011).

Their potential applications in multiple industrial markets will lead to their future massive production, which has already started for CNTs and some form of graphene (Piccinno et al., 2012). Thus, at different steps of the life cycle of carbon nanoparticles-based products, CNTs and FLG are likely to be involuntarily released in the environment (Keller et al., 2013). As carbon nanoparticles are emerging contaminants with difficulty to quantify, discharged quantities are not clearly determined but some research teams have tried to evaluate this number thanks to modelling (Sun et al., 2014). These statistical evaluations focused on CNT, as carbon nanoparticles, but information on FLG production or discharge estimation are currently not available in research journal publications (Boverhof et al., 2015). In addition, no clear regulation drives the carbon nanoparticle market. As a result, communication on production yields by the industries is not well established. This lack of information leads to serious uncertainties implemented in modelling. The industrial or domestic discharge of

carbon nanoparticles in the environment will lead to their concentration in aquatic environment, final receptacle of all pollutants. Despite interaction with aquatic biological system is inevitable, environmental risks evaluation of the release of carbon nanoparticles are still missing especially for FLG (Freixa et al., 2018). Nevertheless, the number of ecotoxicological studies on FLG and CNT are continuously rising but their impact on the aquatic ecosystem functioning remains unclear. This is the reason why evaluation of impact of the CNT and FLG on photosynthetic organisms, primary producers at the basis of the food chain, are fundamental.

Studies assessing the impacts of carbon nanoparticles on algae and biofilms represent a minor part of the ones performed on aquatic organisms. Microorganisms living in biofilms are included in an external matrix composed of exopolymeric substances (EPS). Proteins, polysaccharides, nucleic acids, and lipids are the major organic components of the EPS matrix (Flemming and Wingender, 2010). The first role of EPS is the cellular adherence in order to colonize a substrate and constitute a biofilm (Cooksey and Wigglesworth-Cooksey, 1995). Nevertheless, EPS provide other advantages to the biofilm lifestyle, such as cellular cohesion or protective barrier towards mechanical aggressions (Flemming, 1993; Liu et al., 2010). The essential role of EPS in the maintenance of productive biofilm pushed the evaluation of carbon nanoparticles effects on EPS composition. As CNTs is the most studied carbon nanoparticles, the majority of ecotoxicological evaluation on microbial communities focused on the CNTs effects. At low CNTs concentration ( $0.5 \text{ mg.L}^{-1}$ ), a fluorescent lectin binding analysis was conducted by Lawrence and co-workers (2016) on riverine microbial communities. The authors observed quantitative as well as qualitative effects on the amount of sugar residues decreased of approximately 75% and sugar composition was modified. A previous study undertaken on activated sludge evidenced the protective role of the EPS matrix against high concentration of MWCNT ( $640$  to  $3240 \text{ mg.L}^{-1}$ ) by EPS content quantification (Luongo and Zhang, 2010). An overproduction of proteins fraction was detected with an amount of  $68 \text{ mg.L}^{-1}$  in sheared cultures and  $0.3 \text{ mg.L}^{-1}$  in unshaired ones. Ecotoxicological studies on FLG on microbial biofilm are not existent, but the impact of graphene oxide on *Escherichia coli* cultures was evaluated. Ruiz and co-workers (2011) demonstrated the role of EPS secretion in *E. coli* response to  $25 \text{ mg.L}^{-1}$  of graphene oxide exposure. In addition, Rodrigues and Elimelech (2010) highlighted the role of soluble EPS in *E. coli* mature biofilm exposed to 1 to  $500 \text{ mg.L}^{-1}$  of SWCNT in the mitigation of its cytotoxicity.

Among the aquatic microbial community, diatoms are mixotrophic microalgae responsible for about 20% of global primary productivity (Falkowski et al., 2004), and then take a crucial place in the ecosystem functioning. Easily identifiable with their silica cell wall, diatoms are a part of biofilm thanks to their EPS excretion capacities. The impact of FLG and DWCNTs on the benthic species *Nitzschia palea* was assessed in previous works revealing the crucial role of EPS in the sticking of carbon nanoparticles in the biofilm matrix to mitigate their toxicity and shading (Garacci et al., 2017; Verneuil et al., 2014). A previous study performed on this species demonstrated an overproduction only of the protein part of EPS promoted by the exposition to 1 and 10 mg.L<sup>-1</sup> of DWCNTs (Verneuil et al., 2015). Nevertheless, the properties and functions of proteins involved in the response to carbon nanoparticles still remain unknown.

In this study, the extracellular proteins excreted by diatoms culture exposed to low and high FLG and DWCNTs concentrations were quantitatively and qualitatively characterized. The effect of shading of these carbon nanoparticles was also assessed. The EPS production in total carbohydrates and proteins was quantified and the protein composition was determined by shot gun sequencing. This work allowed to establish a novel insight of carbon nanoparticles influence on the extracellular matrix protein composition of a diatom biofilm.

## 3.2 Materials and methods

### 3.2.1 Preparation and experimental exposition

#### *Diatoms cultivation*

To avoid biotic contamination, the axenic *N. palea* CPCC-160 strain purchased from the Canadian Phycological Culture Centre (University of Waterloo, Waterloo, ON, Canada) was maintained in a sterilized modified CHU no. 10 basic medium, called SPE medium (SPE; 6.4 < pH < 6.6) and manipulated under a class II laminar flow hood. Culture amplification and experimental exposition to nanoparticles were carried out in a growth room at 22 ± 1 °C on a rotary shaker at 50 rpm with a light/dark period of 14 h/10 h supplied by led Floodlight 150W Dimmable (Vegeled, Colasse SA, Belgium) at 60±10 µE. The culture medium was replaced by fresh medium 72h before experiment in order to ensure ecotoxicological tests on diatoms cultures in active growth phase.

#### *Synthesis and preparation of carbon nanoparticles suspension*

Carbon nanoparticles suspensions were prepared in the same way as previously described (Garacci et al., 2017; Verneuil et al., 2015). The FLG suspension was obtained thanks to

thermal exfoliation process (4 min at 900°C) of expandable graphite flakes provided by Asbury Carbons (Ref. 3772). This process was followed by a mechanical exfoliation in propan-2-ol by homogenization (15 min at 8000 rpm, Silverson L5M) and probe sonication (90 min at 50% amplitude, Vibra cell 75042, 13mm-diameter probe, 500 W, 20 kHz). A centrifugation (1h at 2000 rpm, Thermofisher scientific Heraeus Megafuge 40, rotation acceleration = 9, rotation deceleration = 3) allowed to apply a size selection avoiding the collection of too thick (> 100 nm), and large particles. After this, nanoparticles in the supernatant were filtered on a cellulose membrane (45 mm diameter, 0.45 µm pore size) and diluted in small volume of distilled water. This synthesis methods presented a production yield of 4.1 wt. % from the starting expandable graphite. A chemical vapour deposition synthesis was performed to produce DWCNT suspension using a using Mg<sub>0.9</sub>Co<sub>0.1</sub>O solid solutions as catalysts (Flahaut et al., 2003). An overnight acidic treatment (HCl 37%) allowed to remove catalysts from composite material (ref: R-4-170717) containing about 12.6% of DWCNTs. As for FLG production, the product obtained was filtered and washed in distilled water. Once obtained, FLG and DWCNTs powder were diluted in SPE medium culture with serial brief bath sonications (Elmasonic S30H, 280W) to obtain a final carbon nanoparticles suspension at 90 mg.L<sup>-1</sup>. Both suspensions were sterilized at 121°C for 20 min.

To avoid bacterial contamination, sterilized DWCNTs and FLG suspension were diluted under a class II laminar flow hood. Carbon nanoparticles suspension were bath sonicated immediately before dilutions in medium culture to ensure homogenous dilutions. These intermediary dilutions were prepared at 0.2, 16.7 and 83.5 mg.L<sup>-1</sup> to obtain a final concentration of 0.1 mg.L<sup>-1</sup> (FLG<sub>0.1mg</sub> and DWCNT<sub>0.1mg</sub>), 10 mg.L<sup>-1</sup> (DWCNT<sub>10mg</sub>) and 50 mg.L<sup>-1</sup> (FLG<sub>50mg</sub> and FLG<sub>50mg</sub> shading) in the experimental design. Finally, carbon nanoparticles suspensions were sonicated a last time just before diatoms exposure ensuring a good initial dispersion.

#### *Exposition of diatoms cultures to carbon nanoparticles*

Experimental device used was inspired by the one developed by Verneuil and co-workers (2014) and was the same as used in a previous study (Garacci et al. (submitted)). The experimental design allowed to distinguish the shading effect of carbon nanoparticles from the total effect (combining direct contact and potential shading effect). In the literature, it was demonstrated that only FLG<sub>50mg</sub> induced a significant shading impact on the growth rate of *N. palea* (Garacci et al., 2017; Verneuil et al., 2014). This is the raison why the shading

exposition was tested only for the FLG<sub>50mg</sub> exposure. The principle of the experimental device was based on the superposition of two 250 mL culture flasks (FALCON® Cell Culture Flask, 75cm<sup>2</sup> straight neck vented cap) for each replicates. This allowed the absence of contact between cells and carbon nanoparticles for the shading condition. Once correctly filled, batches of 2 x 9 culture flasks were placed in a specific device where diatoms had access to light only by the top face of the superior flasks.

To promote a biofilm formation before carbon nanoparticles exposure, 36 culture flasks were filled with 25 mL of algal culture ( $4 \times 10^5$  cells.mL<sup>-1</sup>) and placed in a growth room without rotary shaking for 48h. After this, culture flasks, which constituted the lower level of the experimental device, were filled with carbon nanoparticles suspension: 40 mL of nanoparticles suspensions were added in 24 culture flasks containing diatoms to reach a final concentration of DWCNT<sub>0.1mg</sub>, DWCNT<sub>10mg</sub>, FLG<sub>0.1mg</sub> and FLG<sub>50mg</sub>. Culture flasks containing diatoms exposed to control condition and FLG<sub>50mg</sub> shading were filled with 40 mL of medium culture. To reproduce the water column in river and to ensure the same experimental conditions for each replicates, cultures flasks without cells, which constituted the upper level of the device, were correctly filled with: 65 mL of medium culture for control condition (6 flasks) and total exposition (18 flasks), and 65 mL of the suspension of FLG<sub>50mg</sub> in culture medium, for the shading condition (6 flasks). Once properly placed in the experimental device, flasks were placed in a growth room for 48h and 168h. Three replicates were performed for each experimental condition.

For each exposure condition, the photoactive radiation (PAR) was monitored using a light-meter (Li-250 A light meter equipped with Li-COR Quantum sensor; Li-COR Biosciences, San Diego, CA) at the beginning of the exposure and at 48h and 168h of exposure. Measures were taken by placing the sensor under the two superposed flasks, to evaluate the quantity of light under the biofilm, between flasks, to determine the light quantity absorbed by carbon nanoparticles or water column, and above the flasks, to verify the homogeneity of light received by each replicates.

### 3.2.2 EPS extraction and growth monitoring *Sequential EPS extraction*

After 48h and 168h of carbon nanoparticles exposure, 3 flasks per condition were gently removed from the experimental device. A sequential extraction using a modified method previously described by Ras and co-workers (2011) was performed (Figure 48). Four steps

extractions were run in order to remove soluble EPS in the water column, ionic-like and hydrophobic-like EPS in the biofilm. All the following manipulations were carried out at 4°C to avoid cells disruption and proteins denaturation.

In the first place, 50 mL of culture medium was removed and constituted the first fraction (B) of soluble EPS. After this, flasks contents were completely removed and discarded, and 25 mL of fresh medium were added to gently scrap the biofilm. Once the biofilm detached from the flasks, cells were collected and centrifuged at 3,200 g for 10 min and the supernatant was collected (S0). Cells in pellet were then incubated in 1.5 mL of EDTA 1% (in Tris-HCl 0.3 mol.L<sup>-1</sup>, pH 8.2) and placed in rotary shaking (60 rpm) for 1h. After a new centrifugation (3,200g for 10min), 1mL of the supernatant was first collected (SE) and the remaining 0.5 mL were separately collected. The last fraction, closer from the pellet, was centrifuged one more time in order to remove residual cells in the sample. The supernatant was added to the 1mL fraction SE, and the obtained pellet was diluted in medium culture for a later quantitative analysis of cellular density to determine the cell losses. The last extraction step was performed by incubating the cells pellet in 1.5 mL of Tween<sup>®</sup> 20 (0.25% in phosphate buffered saline pH 7.4) for 1h of incubation. The last fraction (ST) was collected, in the same way as the fraction SE, by removing the supernatant after centrifugation (3,200g for 10 min).

### 3.2.3 Quantitative analysis

#### *Evaluation of the presence of intracellular contents*

To determine the amount of chlorophyll in EPS samples, due to potential cell lysis, the final pellets obtained after EPS extraction was completely lysed by grinding. For this, pellets were incubated in 1.5 mL of fresh medium culture and 500 µL of silica beads (Sartorius™ BBI-8541400) and cellular lysis was performed using a FastPrep<sup>®</sup> (FastPrep<sup>®</sup>-24 Classic Instrument, MP Biomedicals, 6.5 m.s<sup>-1</sup>, 6x20s). Then, after a brief centrifugation (10,000 g for 10sec) supernatant was collected and conserved for quantitative analysis. A standard range was prepared for each extraction buffer: EDTA, Tween<sup>®</sup> 20, but also for medium culture (corresponding to the fraction B and S0). In addition, seven cell cultures dilutions were prepared at 0.1, 1, 2, 5, 10, 50 and 100 cells.mL<sup>-1</sup> and cellular lysis was performed, as previously described to serve as a standard curve. A quantitative analysis on EPS samples (B, S0, SE and ST) and on final lysed pellet was carried out by Optical Density measurement (OD) at 663 nm using a microplate reader (CLARIOstar<sup>®</sup> BMG Labtech). Three subsamples of 150 µL for each samples were deposited in 96-well microplates (Falcon<sup>®</sup> 353072) for this OD<sub>663</sub> measurement.

### *Carbohydrates contents*

Carbohydrates were quantified using the method previously described in (De Coen and Janssen, 1997). Glucose was used as a standard for quantitative analysis of carbohydrates with a concentration of 0, 0.37, 0.75, 1.5 and 3 mg.L<sup>-1</sup>. 50µL of each EPS fraction and standard were added in triplicates in 96-well microplate (Falcon® 353072). After this, 50 µL of phenol 5% and 200 µL of sulphuric acid (H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) were added and microplates were then placed in obscurity for 30 min. Carbohydrates concentration was measured by OD at 492 nm using a microplate reader (CLARIOstar® BMG Labtech).

### *Protein quantitative analysis*

Before protein quantitative analysis, SE and ST fractions were precipitated with trichloroacetic acid (TCA) with a final concentration of 15% in samples. After 30 min at 4°C, samples were centrifuged at high speed (13,000g for 15 min at room temperature) and the supernatant was gently removed. The pellet was carefully washed twice with acetone 99%, maintained at -20°C, and a last centrifugation was performed. The final pellets were diluted in a saline buffer (containing CuSO<sub>4</sub>, Na<sub>3</sub>C<sub>6</sub>H<sub>5</sub>O<sub>7</sub>, Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> and NaOH). Standards in each extraction buffer (medium culture, EDTA and Tween® 20) were prepared with bovine serum albumin (BSA) at 25, 40, 80, 100, 200, 400 and 600 mgeqBSA.L<sup>-1</sup>. Each standard was also precipitated with TCA, as previously described.

Quantitative analysis of protein contents in EPS samples was performed using the Pierce bicinchoninic acid (BCA) Protein Assay kit (ThermoFisher Scientific, 23225). 25 µL of EPS fractions or standards in saline buffer were added in triplicates to 200 µL of BCA reagent in 96-well microplate (Falcon® 353072) and were protected from light. After 30 min at 37°C, OD was measured at 562 nm using a microplate reader (CLARIOstar® BMG Labtech).

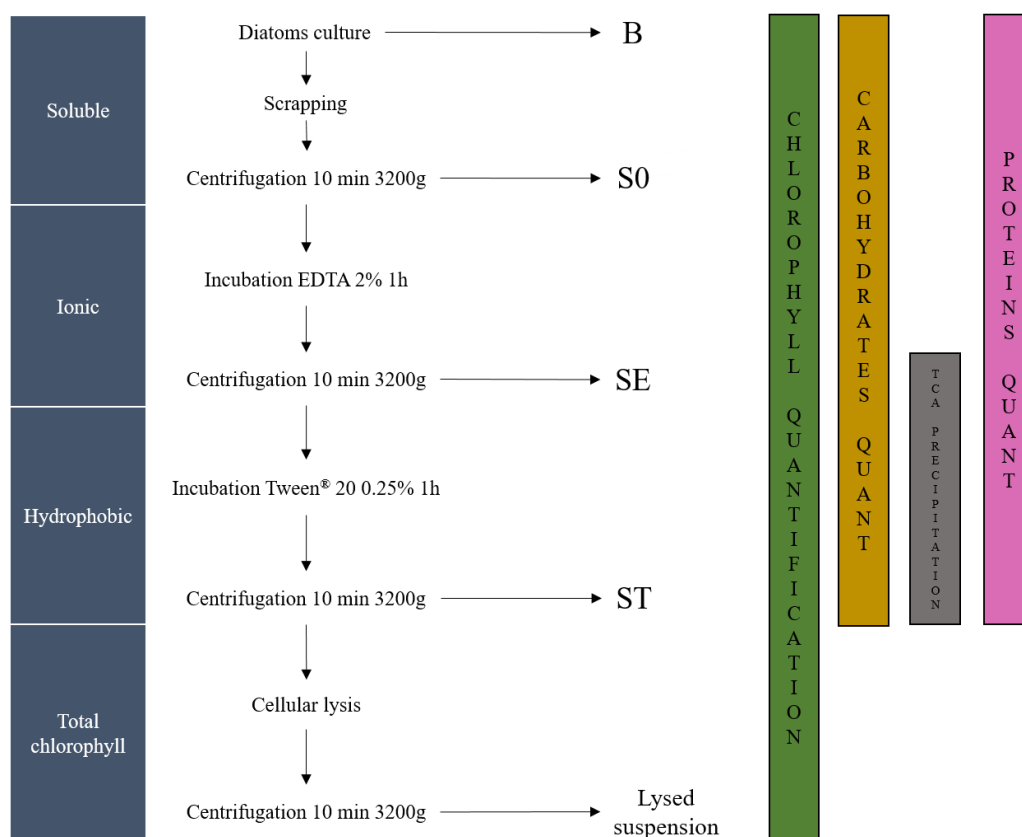


Figure 48. Schematic representation of the sequential extraction methods of extracellular proteins. This method allowed to differentiate three fractions: soluble, ionic-like and hydrophobic-like EPS. The final pellet was lysed to assess the total chlorophyll content. After extraction, quantitative analysis of chlorophyll and carbohydrates contents were performed. Only EPS samples extracted in EDTA and Tween<sup>®</sup> 20 were precipitated in TCA. After this, the proteins content was measured in all EPS samples.

### 3.2.4 Shotgun sequencing and functional analyses of the exoproteomes

The proteomic analysis was performed by the Proteome Platform in the Centre of Functional Genomics of Bordeaux. A control quality was first performed with 10  $\mu$ L of each sample deposited in a gel-SDS-PAGE (10%). As samples had correctly migrated (Figure S1), protein bands were collected and decoloured. Disulfids bonds were alkylated and a trypsin treatment was undertaken overnight. Peptides were extracted from the bands and acidified before LC-MS/MS analysis using a Fusion Lumos (Gradient 70 min).

Identification of peptides was performed on the basis of sequence homology, with comparison to database. A validation tool (Percolator) was used in order to obtain a false-positive yield < 1%. All proteins identified with a number of peptides < 2 were removed. After this, a relative label-free quantification analysis was performed to compare each exposure condition with the control condition. Differential excreted proteins (DEPs) were identified (p-value < 0.05) and



only proteins presenting a fold change  $> 2$  (overexpressed DEP) or  $< 0.5$  (underexpressed DEP) were retained (Choi et al., 2008). Proteins descriptions resulted from the sequence homology analysis were discussed based on the biological process to which they participated.

### 3.2.5 Statistical analysis

To identify a significant effect of carbon nanoparticles treatment on chlorophyll, proteins and carbohydrates content, statistical analysis were performed at a maximum level of 5% (p-value  $< 0.05$ ) on the statistical open source software 'R' (R Core Team, 2013). One-way analysis of variance (ANOVA) were performed and the normal distribution of residuals was tested. After this a Tukey HSD post hoc was implemented in order to determine significant differences between conditions. When the data did not follow a normal distribution, squared root transformation was applied. To generate representation of DEP shared between conditions, the "VennDiagram" (Chen, 2014) package was used, and for expression level visualization heat maps were generated (package "gplot" (Warnes et al., 2009) and "RColorBrewer" (Neuwirth, 2005)). To simplify, expression level visualization of the fold change was transformed in logarithmic base 2 value (Log<sub>2</sub>FC).

## 3.3 Results

### 3.3.1 Impact of carbon nanoparticles on EPS content

Despite all cautions taken to handle samples, potential cellular lysis can persist. Then quantitative analysis of chlorophyll in B, S0, SE and ST extracts were carried out to check the presence of intracellular content in EPS samples. No significant cellular lysis could be detected by chlorophyll quantitative analysis in EPS samples in any experimental condition (Table S5). Detection limit, corresponding to the lowest chlorophyll concentration quantifiable in EPS samples, represented about 2% and 1.5% at of the total cellular density at 48h and 168h, respectively.

After sequential EPS extraction, proteins and carbohydrates contents were quantified separately in order to evaluate a modification in EPS composition. No significant amount of soluble EPS was detected in the fractions B and S0. In addition, in the ionic-like fractions (SE), quantification indicated very low concentrations of proteins and only few amounts of carbohydrates, not exceeding 13 mg.eqGlucose, at both time of exposure (Figure S2). Figure 49 shows the results in the hydrophobic-like fraction (ST) at 48h (Figure 49a) and 168h (Figure 49b) of carbon nanoparticles exposure.

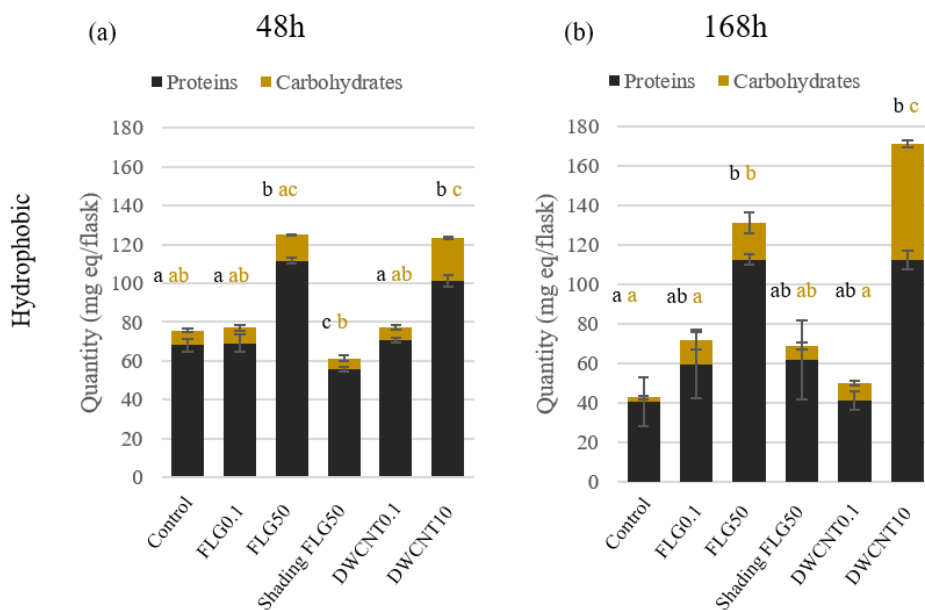


Figure 49. Results of quantitative analysis of proteins and carbohydrates contents in hydrophobic-like EPS samples at 48h (a) and 168h (b) of carbon nanoparticles exposure in each exposure condition. Groups with the same letter are not significantly different ( $p$ -value>0.05). Error bars represent standard errors of the mean of 3 separate experiments.

After 48h and 168h of high DWCNTs and FLG concentration exposure, a significant increase in hydrophobic-like proteins contents ( $111.7 \pm 1.5$  mg eqBSA and  $101.2 \pm 2.9$  mg eqBSA in FLG<sub>50mg</sub> and DWCNT<sub>10mg</sub> conditions respectively at 48h and  $112.6 \pm 2.8$  mg eqBSA and  $112.3 \pm 4.7$  mg eqBSA at 168h) by comparison to the control condition ( $68 \pm 3$  mg eqBSA and  $40.7 \pm 12.3$  mg eqBSA at 48h and 168h, respectively) was observed. However, the amounts of exoproteins was not modified at low concentrations. In addition, FLG<sub>50mg</sub> exposure seemed to induce carbohydrates excretion and this overexcretion was more pronounced when diatoms were exposed to DWCNT<sub>10mg</sub> with an amount of  $22 \pm 0.6$  mg.eqGlucose at 48h and  $58.9 \pm 1.6$  mg eqGlucose at 168h. However, when diatoms were exposed to FLG<sub>50mg</sub> shading, a significant reduction in hydrophobic-like proteins contents was observed after 48h whereas at the end of the experiment (168h) this amount was not significantly different from control condition.

### 3.3.2 Analysis of the baseline exoproteome of *N. palea* biofilm

A total number of 1,956 proteins were identified by LC-MS/MS method in all experimental conditions taken together. To evaluate the protein composition of the *N. palea* extracellular matrix, the first 100 most abundant proteins in control samples, representing 68% of the total abundance in this condition, were considered. The Figure 50 depicts the relative abundance

proteins for each biological process deduced from the description obtained by sequence homology analysis.

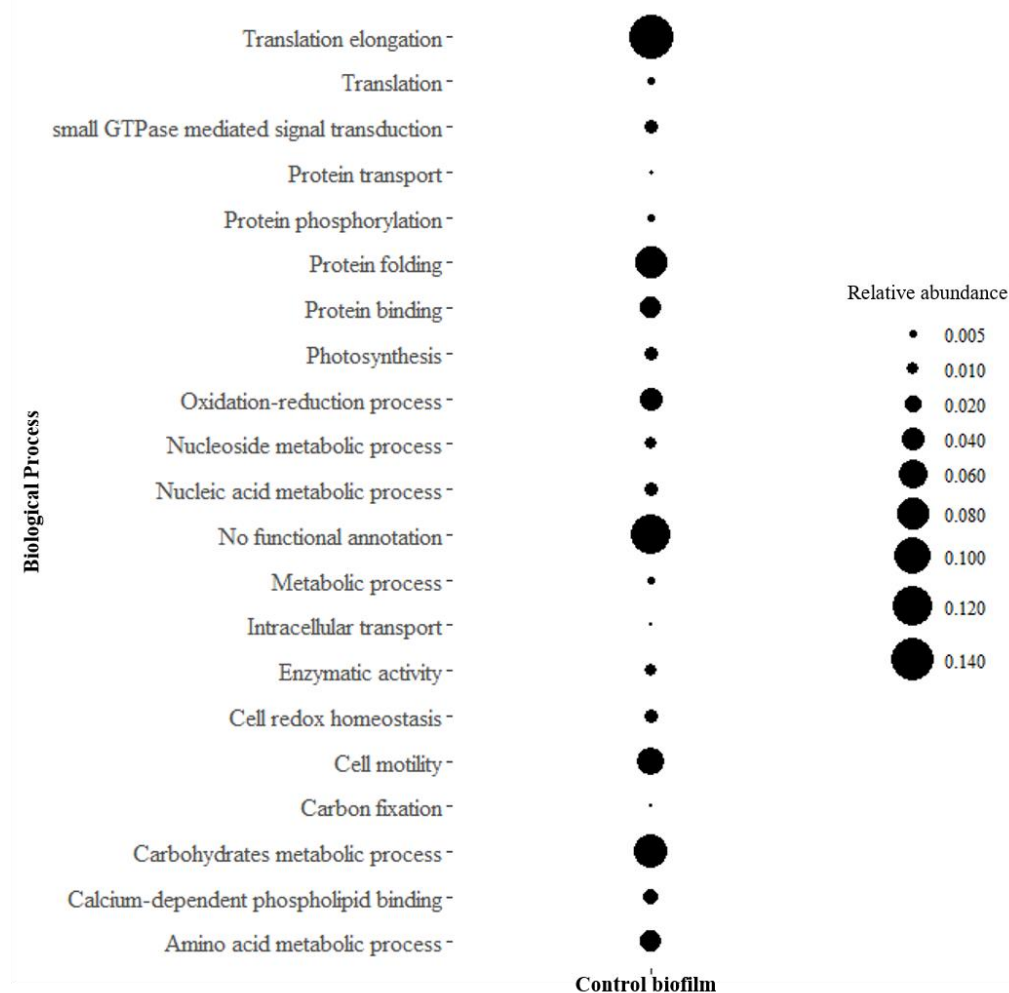


Figure 50. Relative abundance of top 100 proteins detected in the *N. palea* biofilm assigned to the biological processes. Indicated values ranging from 0 to 1.

A consequent proportion of proteins could not be functionally annotated, representing 17% of the abundance of the top 100 proteins. The most important biological process in which extracellular proteins were involved, was the translation elongation, representing 22% of the first top 100 proteins. The second biological process most represented in EPS samples was related to carbohydrates metabolic process (12% of the top 100), followed by protein folding activity and cell motility, with proteins associated to actin polymers. The same proportion was observed for proteins contributing to oxidation-reduction process, protein binding activity and amino acid metabolic process.

### 3.3.3 Identification of exoproteins involved in diatoms' response *Overview of DEP regulation*

After BLAST identification in each condition at 48h of exposure, a number of 310 DEPs was identified in all conditions taken together. Figure 51 details the relative proportion of under and overexcreted DEPs detected in each condition. Diatoms exposed to high carbon nanoparticles concentrations showed the most important relative abundance of overexcreted DEPs, with the same relative abundance of 0.97. In  $DWCNT_{0.1mg}$  condition the relative proportion of overexcreted DEPs was about 0.92 against 0.48 in  $FLG_{0.1mg}$ . Underexcreted DEPs were comparable in  $DWCNTs$  and  $FLG_{50mg}$  conditions, but the abundance of underexcreted proteins observed in  $FLG_{0.1mg}$  was proportionally higher (0.52).  $FLG_{50mg}$  shading exposure induced the lowest proportion of extracellular proteins overrepresented where the relative abundance of underexcreted DEPs was almost 4-fold higher than overexcreted DEPs.

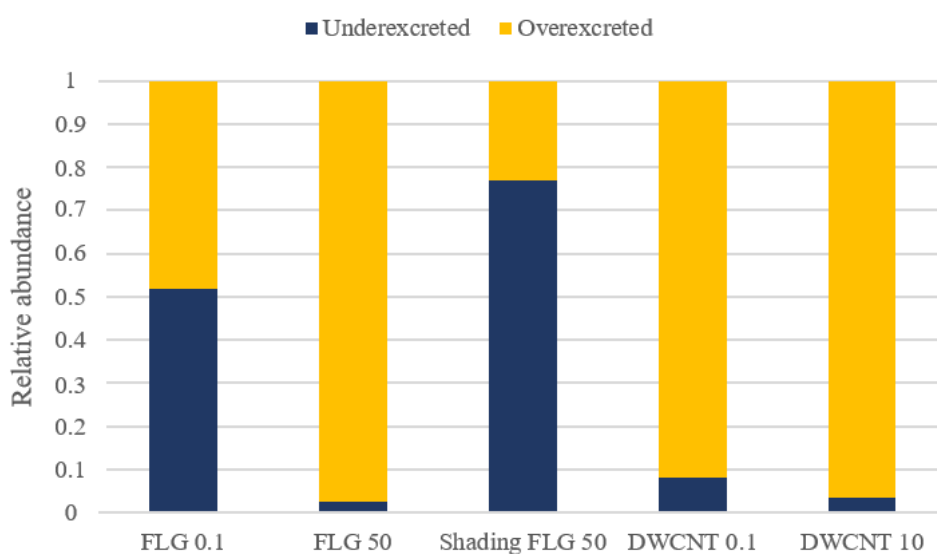


Figure 51. Proportion of the differentially overexcreted and underexcreted proteins in the total amount of DEPs for each exposure condition.

The similarity between conditions was assessed considering the number of shared DEPs represented in the Venn diagrams in Figure 52. The highest similarity was found between high carbon nanoparticles conditions with 81 identical DEPs which were all regulated in the same way. The second most similar condition were the two low carbon nanoparticles concentrations with 41 shared DEPs, among which 95% were similarly over or underexcreted. Only 20 DEPs were shared in  $FLG_{50mg}$  direct and shading exposure and 75% of them were regulated in the same way.

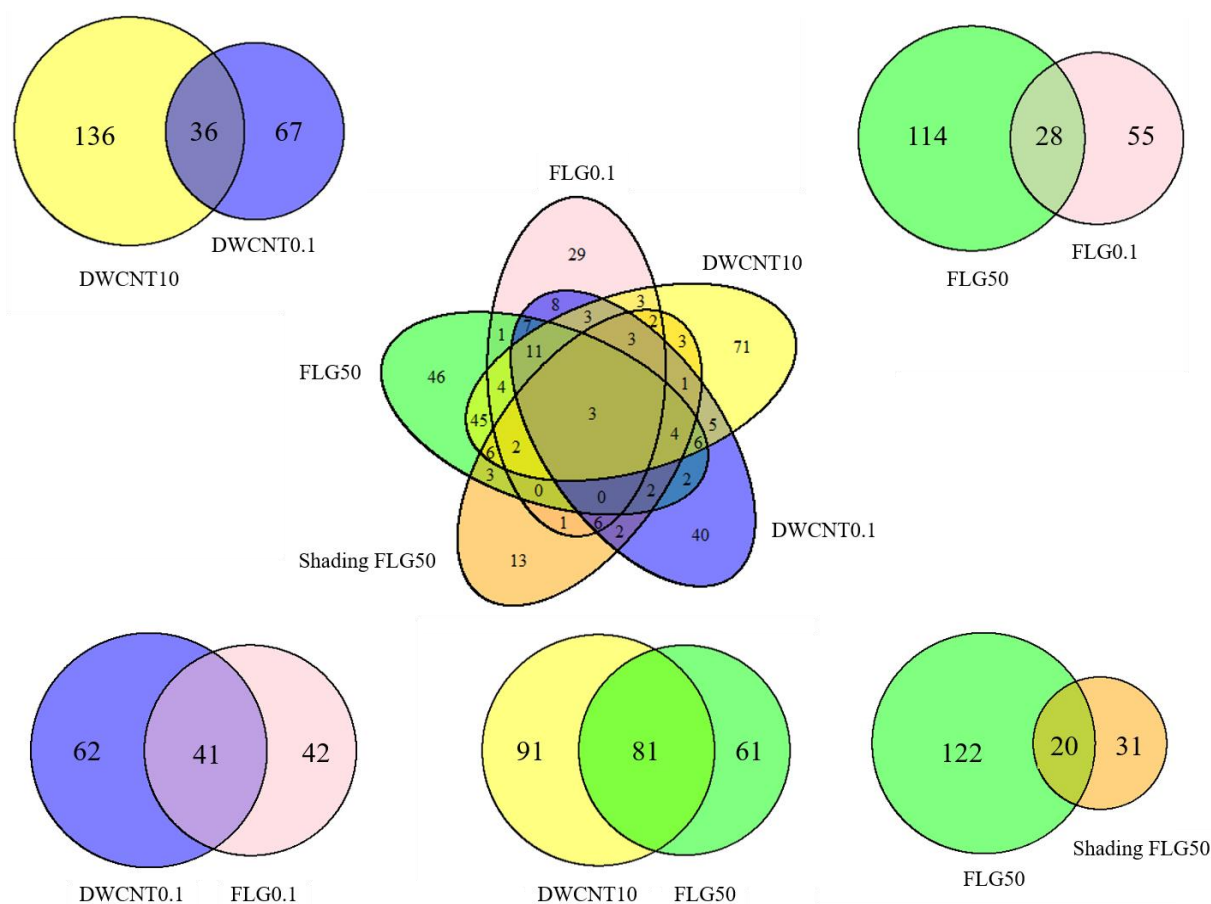


Figure 52. Venn diagrams of the proteins differentially expressed between in each exposure condition.

### Functional analysis

Annotation analysis led to the description of DEPs in each exposure condition. Several DEPs did not present any description or information because of the absence of homologous sequences in the interrogated database. Others were only described with a name species and no functional information was available for these DEPs. And finally, other DEPs presented a description with a gene identification and/or Gene Ontology terms category and eventually a species name. Only, the latter were considered for the functional analysis. The lowest percentage of annotation was observed in FLG<sub>50mg</sub> shading exposure where only 17% of the DEPs were annotated, followed by DWCNT<sub>10mg</sub> and FLG<sub>50mg</sub> with 28% and 38% of annotation, respectively. Low carbon nanoparticles concentration presented the highest percentage of annotation, with 57% and 92% of annotation for FLG<sub>0.1mg</sub> and DWCNT<sub>0.1mg</sub>,

respectively. Biological processes were proportionally represented as a function of DEPs relative abundance calculated from the total DEPs abundance in each exposure condition. (Figure 53).



Figure 53. Biological processes and relative abundance of DEPs on the total DEPs abundance in each exposure condition.

*Differentially excreted proteins related to cell adhesion.* The biological process presenting the most abundant DEPs was related to translation mechanisms (Figure 53), especially in diatoms exposed to DWCNT<sub>0.1mg</sub> concentration where 18 DEPs were overexcreted (Log<sub>2</sub>FC ranging between 1.3 and 4.1) (Figure 54). DEPs contributing to translation machinery were mostly repressed in high carbon nanoparticles concentration with 3 underexcreted and 4 overexcreted DEPs in FLG<sub>50mg</sub> (Log<sub>2</sub>FC ranging from -3.8 to 2.2) and 5 underexcreted DEPs in DWCNT<sub>10mg</sub> (Log<sub>2</sub>FC reaching -4.6). In addition, proteins involved in signal pathway and cell adhesion processes were overrepresented in the exoproteome of diatoms exposed to high carbon nanoparticles concentration with 9 and 2 overexcreted DEPs, respectively, in both conditions (Figure 54). DEPs related to nucleic acid metabolic process were also overexcreted at high carbon nanoparticles concentration with an expression level ranging from 1.4 to 3.4 of Log<sub>2</sub>FC. In FLG<sub>50mg</sub> condition, relative abundance of these DEPs represented 16% of the total DEPs abundance in this condition. This biological process was not particularly involved at low carbon nanoparticles concentration but one DEP (g9887.t1), involved in 'de novo' pyrimidine nucleobase biosynthetic process was overexcreted in FLG<sub>0.1mg</sub>. (Log<sub>2</sub>FC=2.5). A biological process related to spindle check point was induced only in DWCNT<sub>10mg</sub> condition, representing about 14% of the total abundance of DEPs excreted in this condition.

Several overexcreted DEPs involved in metabolism of organic molecules such as carbohydrates (Log<sub>2</sub>FC ranging from 2.5 for g13276.t1 and 6.6 for g14417.t1 in FLG<sub>50mg</sub>), lipids (g4164.t1 with Log<sub>2</sub>FC=2 in DWCNT<sub>10mg</sub>), glycoprotein (g7455.t1 with Log<sub>2</sub>FC=1.8 in DWCNT<sub>10mg</sub>), or glycolipids (g13276.t1 with Log<sub>2</sub>FC=2.6 in DWCNT<sub>10mg</sub>) were observed at high carbon nanoparticles concentration whereas they were partially underrepresented in DWCNT<sub>0.1mg</sub>. Among these biological processes, the highest DEP abundance was found for proteins involved in carbohydrates metabolic process for diatoms directly exposed to FLG<sub>50mg</sub> (Figure 53) whereas the shading condition induced only one overexcreted DEP (g17422.t1, Log<sub>2</sub>FC=1.8) (Figure 54). In diatoms exposed to DWCNT<sub>0.1mg</sub>, one slightly overexcreted DEP (g4594.t1, Log<sub>2</sub>FC=1.4) was involved in proteasome assembly with low proteins abundance, and two DEPs (g11352.t1; g15214.t1) related to cell motility were underexcreted (Log<sub>2</sub>FC=-1.3 and -1.4). Diatoms exposed to high carbon nanoparticles concentration overexcreted two different DEPs involved in chitin metabolic process (Log<sub>2</sub>FC reaching 6.6 for g16173.t1 in FLG<sub>50mg</sub> and 2.7 for g13937.t1 in DWCNT<sub>10mg</sub>), but only FLG<sub>50mg</sub> exposure induced an overexcretion of a DEP (g3388.t1) involved in calcium ion binding in beta roll structure with an expression level reaching 1.4.

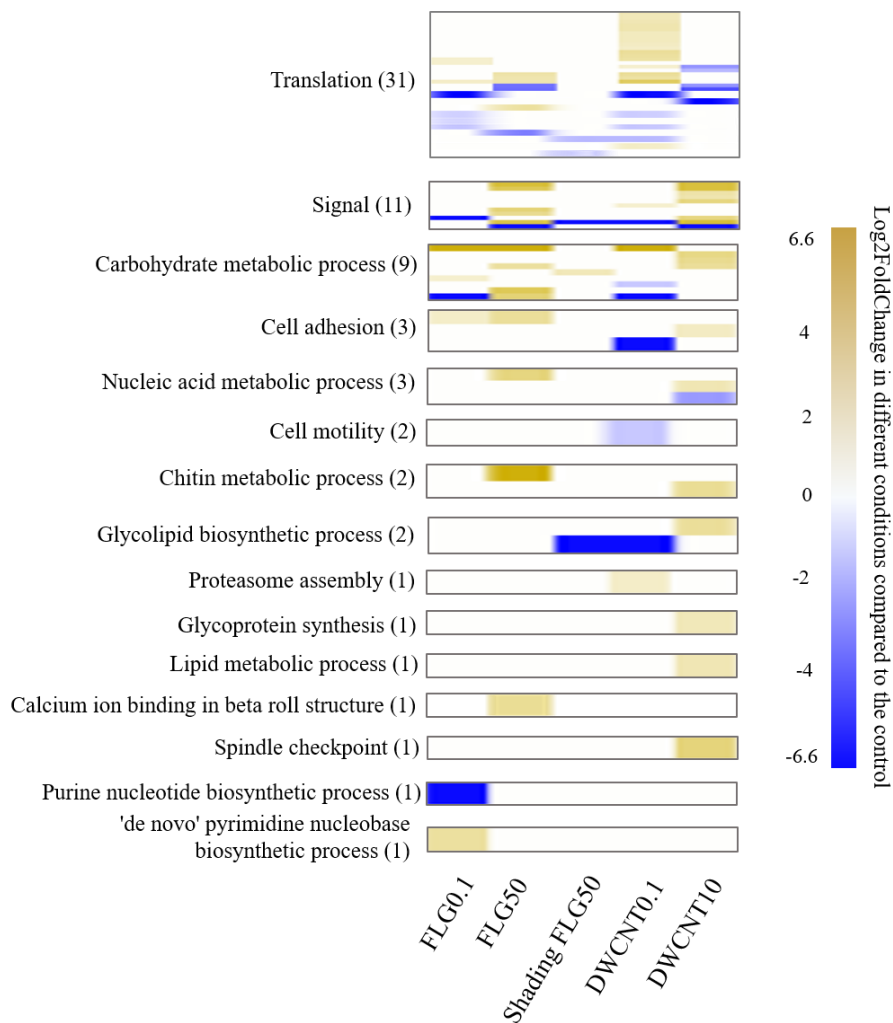


Figure 54. Heat maps of extracellular DEPs involved in several biological process related to adhesive response in each carbon nanoparticles conditions.

*Effects of carbon nanoparticles on extracellular protein modifications.* Amino acid metabolism also seemed to be affected by low carbon nanoparticles mostly in the way of down-regulation as DEPs contributing to this biological process showed a Log<sub>2</sub>FC ranging -6.6 from to 2.5. (Figure 55). Furthermore, some post-translational modifications processes seemed to be repressed with two underexcreted DEPs participating to protein modification that were not detected in direct exposure to carbon nanoparticles (i.e. Log<sub>2</sub>FC=-6.6). In addition, high carbon nanoparticles inhibited the excretion of DEPs associated with protein homooligomerization (g21179.t1) in DWCNT<sub>10mg</sub> and peptidyl-amino acid modification (g11965.t1) in FLG<sub>50mg</sub> (Log<sub>2</sub>FC=-6.6, i.e. undetected). Other DEPs were commonly



overexcreted in all experimental conditions, participating to protein phosphorylation (g20248.t1) with an expression level ranging from 1.5 in DWCNT<sub>0.1mg</sub> to 6.6 in the others conditions.

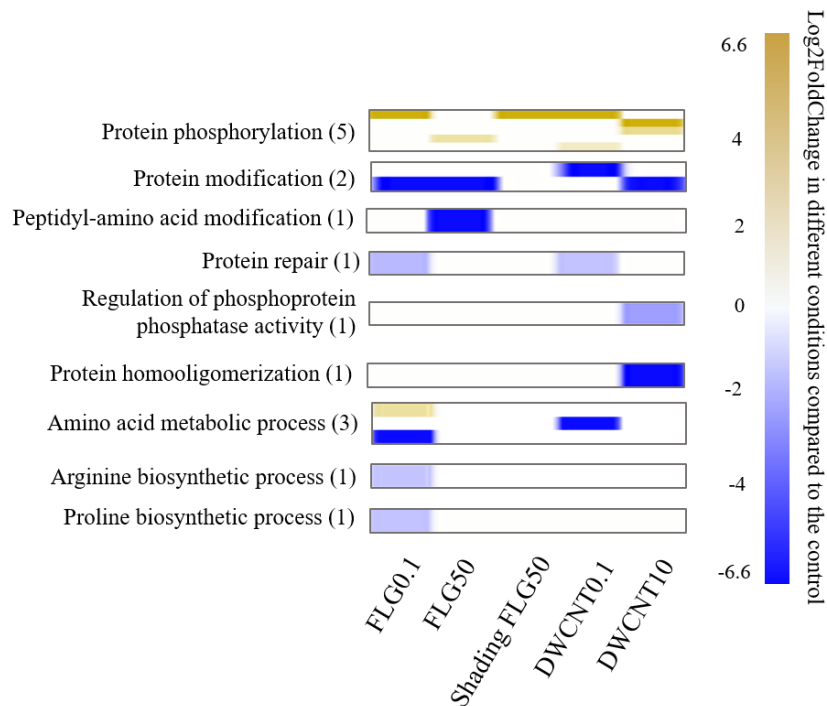


Figure 55. Heat map of DEPs involved in several protein metabolic process in each carbon nanoparticles conditions.

*Exoproteins involved in catabolic processes and physical interactions.* Carbon nanoparticles exposure seemed to induce a modification of extracellular catabolism (Figure 56) In all experimental conditions, one DEP (g19939.t1) contributing to proteolysis was identified whereas it was not detected in control conditions The number and relative abundance of overexcreted DEPs involved in this biological process was higher at high carbon nanoparticles concentrations but also in shading condition. In addition, one common DEP (g21034.t1) involved in fatty acid oxidation was overexcreted (Log<sub>2</sub>FC=6.6) in diatoms facing all carbon nanoparticles exposure conditions except for FLG<sub>50mg</sub> condition. Moreover, one overexcreted DEP (g5138.t1) involved in cell redox homeostasis was observed in all exposure conditions (Log<sub>2</sub>FC=6.6) and was more represented in diatoms exposed to FLG<sub>0.1mg</sub> (Figure 53). Others DEPs participating to these biological process also seemed to be repressed

in direct contact exposure conditions (Log2FC ranging from -4.7 in FLG<sub>50mg</sub> and -1 in FLG<sub>0.1mg</sub>). In addition, DEPs associated with oxidation-reduction process were mostly underexcreted in these conditions (Log2FC ranging from -6.6 when no detected in FLG<sub>0.1mg</sub> and FLG<sub>50mg</sub> and -1 in FLG<sub>0.1mg</sub>). In addition, DEPs participating to response to oxidative stress and glutathione metabolic process were underrepresented at low carbon nanoparticles concentrations.

Furthermore, three DEPs participating to response to wounding were overexcreted only in diatoms exposed to high carbon nanoparticles concentrations, with a Log2FC of 2.9 (g310.t1) and 3.5 (g3491.t1) in DWCNT<sub>10mg</sub>, and 4.2 in FLG<sub>50mg</sub> (g3491.t1) (Figure 56).

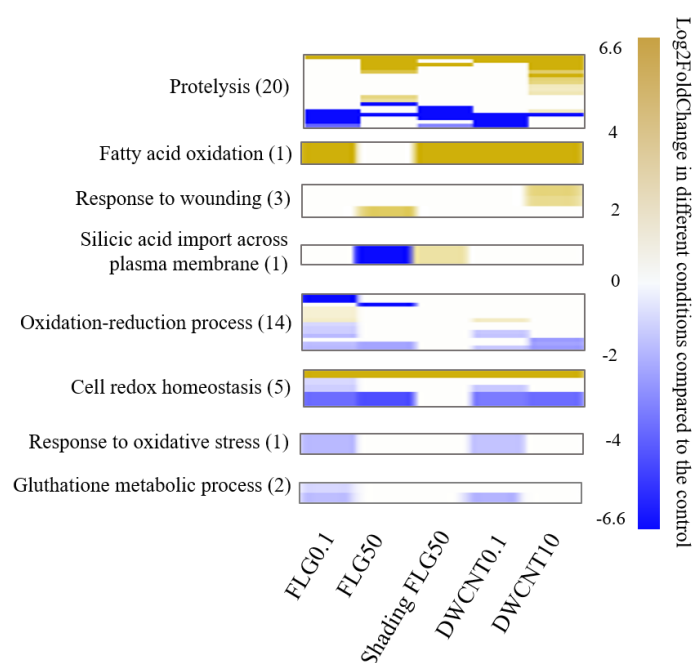


Figure 56. Heat maps showing the Log2FC values of DEPs with catabolic activity and DEPs involved in oxidative response in each condition.

*Probable energy saving.* Several DEPs participating in diverse metabolic pathways were underexcreted, or even undetected, mostly in direct contact exposures (Figure 57). Thus, underexcreted DEPs associated with response to stress, to toxic substance, to stimulus and disease resistance were underexcreted in these conditions (Log2FC ranging from -6.6 to -1.1). DEPs involved in metabolic process were generally underexcreted in direct contact exposure

conditions (Log2FC ranging from -6.6 to -1.2), except in FLG<sub>0.1mg</sub>. Nitrogen metabolism seemed to be partly inhibited (g8358.t1 and g20946.t1 were underexcreted) in direct contact conditions, except in DWCNT<sub>10mg</sub>. Despite the inhibition of one DEP (g13365.t1) related to transport in diatoms exposed to DWCNT<sub>10mg</sub>, two others were overexcreted in DWCNTs conditions (Log2FC reaching 2.4 in DWCNT<sub>10mg</sub>). In shading exposure to FLG<sub>50mg</sub>, only one DEP (g11754.t1) contributing to tricarboxylic acid cycle was underexcreted (Log2FC=-1.9). Proteins involved in these biological processes were not detected among the top 100 described in the *N. palea* exoproteome (Figure 50).

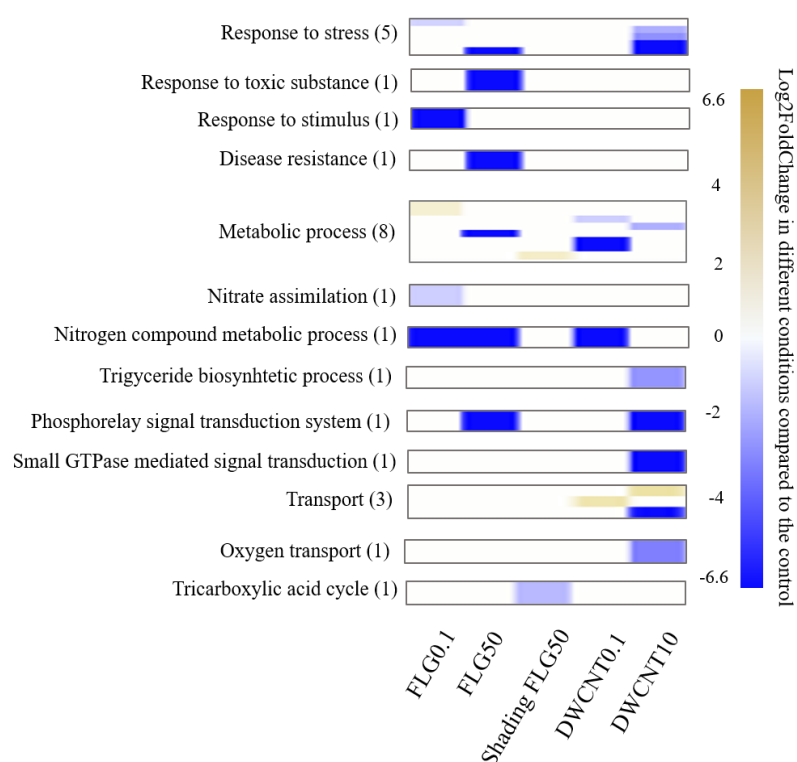


Figure 57. Heat maps of DEPs involved in several inhibited pathways in the different carbon nanoparticles exposures.

### 3.4 Discussion

The aim of this study was to identify proteins of the *N. palea* extracellular matrix and assess quantitative and qualitative modifications of this exoproteome in response to carbon nanoparticles exposure. In this work, two allotropic forms of carbon were compared at

different concentrations and a shading exposure was distinguished only for the highest FLG concentration condition.

#### 3.4.1 Exoproteome: dream or reality?

Studies on the exoproteome of biofilms have one principal issue linked to the contamination by intracellular components, and especially for diatoms because of their silicic exoskeleton making difficult the microscopic appreciation of cellular lysis induced by extraction buffer. However, several results obtained indicated that proteins identified by LC-MS/MS analysis probably did not originate from the intracellular content.

First, all cautions were taken during extracellular proteins extraction. Cellular lysis was monitored at each step revealing that chlorophyll was not detectable in all the EPS samples. The detection limit, corresponded to less than 2% of total cellular density, meaning that this control quality measure was robust. This would suggest that the EPS extracts likely contained minor intracellular contamination. Despite the absence of chlorophyll detection in samples, the functional description of the identified exoproteins was carefully examined, especially in control conditions. (Figure 50) The functional analysis revealed the presence of protein related to photosynthesis but in the lower abundant protein of this top 100 focus (0.01). Nevertheless, a previous proteomic study of a diatom limited in iron evidenced the overexcretion of proteins contributing to photosynthesis in the first induced biological process (Nunn et al., 2013), suggesting that the presence of these photosynthesis-related proteins does not necessarily reveal cell lysis.

Furthermore, functional analysis of the proteins extracted from the control culture revealed several biological processes, notably proteins involved in translation. It was demonstrated that a cell surface protein involved in cell adhesion (PVN1) in higher plant had high sequence identity with a translational elongation factor (EF-1 $\alpha$ ) (Zhu et al., 1994). In addition, proteomics studies on marine diatoms in phosphorus (Dyhrman et al., 2012) or nitrogen (Yang et al., 2014) deprivation induced an intracellular underproduction of proteins involved in translation. This supports our hypothesis that proteins involved in translation in control condition were excreted by diatoms and were not released by cell lysis.

The presence of proteins related to carbohydrates metabolism in this study was in accordance with numerous studies which evidenced the role of carbohydrates in the extracellular matrix (Flemming and Wingender, 2010; Smith and Underwood, 2000). The observation of proteins

involved in oxidation-reduction process and cell redox homeostasis was also consistent with the literature. Indeed, the presence of oxidoreductases, such as phenol oxidase, peroxidase or extracellular redox activity enzymes, was previously noticed in rivers biofilm and activated sludge (Flemming and Wingender, 2010). Proteins with enzymatic activity in the *N. palea* exoproteome suggested a degradation of organic molecules in the extracellular matrix such as carbohydrates, which can then be used as carbon resources by diatoms.

Exoproteins involved in protein folding, protein binding, amino acid metabolic process, protein phosphorylation and protein transport suggested that proteins composing the extracellular matrix might undergo post-translation modifications in the extracellular medium. Cell motility also counted among the most represented biological processes in the exoproteome. Such proteins were already observed in diatoms thanks to the association of actin polymers with myosin (Lesley and Zavortink, 1983), but also in the vesicle transport allowing the adhesion complex assembly (Chiovitti et al., 2006). These cell-wall associated polymers, located just behind the raphe, play a role in the adhesion of diatoms (Evans, 2003). As pennate diatoms are attached to the substrate at their raphe, we could hypothesize that this actin filament could be excreted and act as a rail for cell motility. However, the presence of actin filament in the extracellular matrix was not yet evidenced.

The role of proteins associated with calcium in cell adhesion was previously demonstrated (Geesey et al., 2000). In addition, nucleic metabolic processes can suggest the presence of extracellular DNA, known to be a component of the extracellular matrix of bacteria biofilm (Flemming and Wingender, 2010; Tang et al., 2013), likely to allow the structuration of the EPS network.

All these results suggest that proteins identified in this study were in great majority excreted in the extracellular medium despite their function which are primarily known as intracellular. Added to the fact that no cellular lysis was detected, we considered that our EPS extraction method did not provoke significant release of intracellular contents

#### 3.4.2 Effect of carbon nanoparticles on the exoproteome

The annotation analysis of DEPs excreted in diatoms' biofilm exposed to carbon nanoparticles revealed a significant lack of functional information on extracellular proteins, as the percentage of annotated DEPs ranged between 17% and 92%. This highlighted that identification of extracellular proteins in the biofilm matrix is still in its infancy and needs to

be explored (Heydarizadeh et al., 2014). Even if some proteins have already been sequenced in other diatoms species, their functions are not determined yet. Then, these results evidenced a clear need in omics approach, such as transcriptomic, proteomic or metabolomics in biofilm matrix in order to identify molecular components acting in stress response to external pollution as carbon nanoparticles exposition.

#### *In the shadow of FLG*

Quantitative analysis revealed a clear difference in the extracellular response induced in shading and direct contact exposure to FLG<sub>50mg</sub>. A significant underexcretion of proteins was observed in shading condition whereas an overexcretion of proteins was noticed in direct exposure to FLG<sub>50mg</sub>. Moreover, similarity in proteins differentially excreted in these two conditions was relatively low. As the light reduction in the beginning of the exposure was comparable in these two conditions, with a significant PAR decrease (Garacci et al., 2017), we can suggest that physical contact with diatoms is responsible for this overexcretion. The protein underexcretion observed in shading condition was consistent with the transcriptomic response assessed in a previous study where a global reduction of its energetic metabolism was evidenced (Garacci et al. submitted). Lowering protein production and excretion is another way for saving energy. Moreover, the inhibition of signal pathway (Figure 54) which is crucial in biofilm development (Kjelleberg and Molin, 2002) was consistent with the protein underexcretion observed for diatoms exposed to shading. In addition, the induction of exoproteins involved in proteolysis and fatty acid oxidation suggested that diatoms exposed to FLG<sub>50mg</sub> shading tended to degrade extracellular components, as protein or fatty acids, which can be a part of EPS component previously excreted (Conrad et al., 2003). Proteolytic enzymes are known to be excreted by light-stressed biofilms (Berges and Falkowski, 1998; Romani, 2009). These extracellular enzymes allow the acquisition of nitrogen and carbon resources from the external matrix in bacteria biofilm which undergone an environmental stress or starvation (Zhang and Bishop, 2003). As *N. palea* is mixotrophic, they consume extracellular components from natural organic matter or EPS, as carbon resources in obscurity period

#### *Impact of direct contact with carbon nanoparticles on *N. palea* exoproteome*

Proteins quantification revealed a significant protein overexcretion at high concentration of both FLG and DWCNTs, which is in accordance with a previous study for diatoms exposed to DWCNTs (Verneuil et al., 2015). Interestingly, exoproteins measured at low concentrations

conditions did not reveal significant differences with the control condition. However, LC-MS/MS analysis revealed the presence of overexcreted proteins at low carbon nanoparticles concentrations, more pronounced for diatoms exposed to DWCNT<sub>0.1mg</sub>. These results suggest that the excretion of proteins involved in the biofilm matrix was dependent of the concentration of these carbon nanoparticles.

*Low concentrations exposure.* Functional analysis of the exoproteome produced by diatoms exposed to low carbon nanoparticles did not reveal any overexcretion of proteins involved in cell adhesion. However, a consequent number of overexcreted proteins related to translation was noticed in these conditions, especially for diatoms exposed to DWCNT<sub>0.1mg</sub>. The proteins involved in this biological process could be associated with transcription elongation factor, which was suggested to have a role in plant cell adhesion (Zhu et al., 1994). As DEPs involved in signaling pathway were inhibited in diatoms exposed to low carbon nanoparticles concentrations, this concentration did not seem to be detected through this pathway as an environmental stress by *N. palea*.

The overexcretion of proteins involved in carbohydrates metabolic process suggested that low carbon nanoparticles concentration induced a modification in EPS composition by modulating the proportion of polysaccharides in the extracellular matrix. In addition, a major underexcretion of proteins involved in proteolysis, in accordance with a reduction in nitrogen assimilation and nitrogen compound metabolic process, suggested the reduction, of extracellular carbon and nitrogen utilization as resources.

Nevertheless, post-translational protein modification seemed to be induced in these conditions. Protein phosphorylation, occurring as well in plants and prokaryotes, is a part of post-translational modifications generally taking place in response to environmental stress, altering protein function (Duncan and Hershey, 1989). This mechanism, leading to activation or deactivation of a targeted protein, plays an important role in the signalling pathway by translating extracellular signal into cellular response. In *Streptococcus mutans* the expression of *pKnB* gene, coding for an homologous serine/threonine protein kinase family involved in protein phosphorylation, with an extracellular C-terminal domain, seemed to be essential in biofilm formation (Hussain et al., 2006). Thus, we can suggest that overproduction of exoproteins contributing to protein phosphorylation in *N. palea* exposed to carbon nanoparticles was related to biofilm formation in response to carbon nanoparticles exposition

regardless the type of nanoparticles. It is noteworthy that this regulation mechanism was also detected at high concentrations, which revealed its genericity.

*High carbon nanoparticles concentration.* Signal pathway appeared to be induced in diatoms exposed to high FLG and DWCNTs concentrations suggesting a response to environmental modification. Detection of environmental stress pathway in bacterial biofilm generally involves the quorum sensing system in order to modulate physiological processes such as biofilm formation (Cvitkovitch et al., 2003; Parsek and Greenberg, 2005). Small peptides are then produced and excreted, as signals, to be detected by neighbour cells. Such signal peptides, involved in cell-cell communication, seemed to play a role in *N. palea* response to high carbon nanoparticles concentration.

Exoproteomic analysis also revealed an induction of cell adhesion process when diatoms were exposed to high carbon nanoparticles concentrations, suggesting an extracellular adhesive response. The overexcretion of proteins involved in carbohydrates metabolic process suggested that a part of exoproteins involved in diatoms' response, especially to DWCNT<sub>10mg</sub>, were probably in association with polysaccharides. This was supported by the overexcretion of exoproteins contributing to glycoproteins and glycolipids, but also lipids metabolic processes at high DWCNT concentration. It was previously demonstrated that these organic molecules composed the extracellular matrix of microbial biofilm (Conrad et al., 2003; Flemming and Wingender, 2010; Lind et al., 1997).

The adhesive complex produced by diatoms at high carbon nanoparticles concentration also seemed to include chitin-associated exoproteins. Several studies have already demonstrated the role of chitin as a structural component of the cell wall in the marine diatom *Thalassiosira pseudonana* (Durkin et al., 2009; Hoagland et al., 1993). Chitin then crossed and embedded the cell wall forming chitin-based network which can play a central role in cell division during silica starvation (Brunner et al., 2009). In this way, chitin is known as a component of the cell wall but can also take part in biological processes to undergo environmental stress. Moreover, Wetherbee and co-workers (1998) reported that the extracellular adhesion system produced by diatom is in part associated with the plasma membrane and cytoplasm. Then we can hypothesize that under exposure to high carbon nanoparticles concentrations, the overproduction of chitin-associated exoproteins can play a role in the diatoms response by strengthening the EPS network. In addition, analysis of extracellular proteins also allowed to



evidence one of the toxicity mechanism of carbon nanoparticles by induction of exoproteins involved in response to wounding. Then, overproduction of these proteins confirmed that physical contact with FLG and DWCNTs induced wounds, as previously observed for *N. palea* in direct contact with FLG<sub>50mg</sub> (Garacci et al. submitted) but also for bacteria exposed to SWCNTs (Kang et al., 2007; Liu et al., 2009). This physical interaction might explain the strengthen of EPS matrix only in high carbon nanoparticles concentration by chitin.

In this way, glycoproteins, which are generally transmembrane proteins, and glycolipids involved in the response to DWCNT<sub>10mg</sub> condition could also be associated with chitin. In addition, exoproteins with calcium ion binding function appeared to play a role in the extracellular response of *N. palea* exposed to FLG<sub>50mg</sub>. The induction of hemolysin-type protein, with a calcium-binding function in *Leptospria spp.* pushed Lin and co-workers (2008) to suggest the role of calcium in cell adhesion. These results suggest that calcium and calcium binding protein play a role in the biofilm network composition in response to high concentrations of carbon nanoparticles.

Furthermore, the presence of overproduced exoproteins involved in nucleic acid metabolism in the extracellular matrix of diatoms exposed to high concentration of carbon nanoparticles suggested the presence of extracellular DNA. Randrianjatovo-Gbalou and co-workers (2017) demonstrated that association of extracellular DNA with amyloid-like polymers plays a role in the adherence but also in the aggregation of a bacteria extracellular matrix. In DWCNT<sub>10mg</sub> condition, diatoms generated exoproteins, contributing to spindle checkpoint. This process generally involved in cell duplication makes act the kinetochores, which are multi-proteins complexes, and microtubules for genetic material separation and migration (De Martino et al., 2009). Animal cell extracellular matrix components such as adhesive proteins were supposed to influence the intracellular microtubules organization (Bökel et al., 2005) and assembly caused by external mechanical forces (Putnam et al., 2001). Despite the absence of evidence in the literature of the excretion of microtubules, we could hypothesize that these exoproteins might allow the cell anchoring to substrate or to DWCNTs, as they were excreted only in this condition.

Moreover, exoproteins involved in response to oxidative stress were mostly underproduced in all experimental conditions but one exoprotein involved in cell redox homeostasis was overproduced. However, previous studies demonstrated the absence of intracellular oxidative stress induced by high FLG (Garacci et al. (submitted)) and high DWCNTs concentrations (Garacci et al. (in preparation)), with a decrease in transcripts encoding for protein involved in

ROS scavenging. In addition, Wuertz *et al.*, (1998) suggested that the induction of extracellular redox activity in activated sludge could be involved to facilitate enzymatic attack of recalcitrant organic molecule as lignin. This phenomenon can be linked to the induction of proteolysis, which can be undertaken, as evocated above, in order to biodegrade extracellular proteins and use products as nitrogen and carbon resources, when diatoms had a limited access to light.

Then, several pathways such as global response to stress pathway, related to drug export, or transduction process, allowing cell communication, but also energetic pathways were repressed. These results suggested an energy saving strategy reinforcing the hypothesis of energetic allocation of diatoms exposed to carbon nanoparticles, regardless the allotropic form or the concentration (Garacci *et al.*, 2017; Verneuil *et al.*, 2014).

### 3.5 Conclusion

This study provided a proteomic approach of the extracellular matrix generated by *N. palea* exposed to different forms and concentrations of carbon nanoparticles. Functional analysis revealed a strong lack of information about proteins excreted by diatoms. Nevertheless, our proteomic data was consistent with previous studies which demonstrated the presence of different extracellular components, such as adhesive proteins, carbohydrates, extracellular DNA or oxidative enzymes. Translation elongation factor and actin polymers were supposed to have a role in cell adhesion. After 48h of exposure to high FLG and DWCNTs concentration, diatoms exhibited an overexcretion of hydrophobic-like proteins and carbohydrates contents. The experimental distinction between shading and direct contact exposure to FLG highlighted an extracellular response completely different suggesting the induction of a major extracellular catabolic metabolism in shading condition. Only low carbon nanoparticle highly induced translation elongation factor suggesting that the production of these exoproteins might be specific for low concentrations. High carbon nanoparticles concentrations seemed to induce an adhesive response including adhesive protein, glycoproteins and glycolipids, but also chitin. This suggested that a whole adhesion system was undertaken by diatoms in response to direct exposition to carbon nanoparticles. In addition, a modification of extracellular catabolism was deduced by the induction of proteolytic enzymes and redox activity which allow cells to provide extracellular nitrogen and carbon resources. Overall, this study evidenced the exoproteomic response of *N. palea* presented high similarities between the same concentration of carbon nanoparticles.

## References

- Baughman, R.H., Zakhidov, A.A., De Heer, W.A., 2002. Carbon Nanotubes--the Route Toward Applications. *Science* (80-. ). 297, 787–792. <https://doi.org/10.1126/science.1060928>
- Berges, J.A., Falkowski, P.G., 1998. Physiological stress and cell death in marine phytoplankton: Induction of proteases in reponse to nitrogen or light limitation. *Limnol. Oceanogr.* 43, 129–135. <https://doi.org/10.4319/lo.1998.43.1.0129>
- Bianco, A., Kostarelos, K., Prato, M., 2005. Applications of carbon nanotubes in drug delivery. *Curr. Opin. Chem. Biol.* 9, 674–679. <https://doi.org/10.1016/j.cbpa.2005.10.005>
- Bökel, C., Prokop, A., Brown, N.H., 2005. Papillote and Piopio: Drosophila ZP-domain proteins required for cell adhesion to the apical extracellular matrix and microtubule organization. *J. Cell Sci.* 118, 633–642. <https://doi.org/10.1242/jcs.01619>
- Boverhof, D.R., Bramante, C.M., Butala, J.H., Clancy, S.F., Lafranconi, W.M., West, J., Gordon, S.C., 2015. Comparative assessment of nanomaterial definitions and safety evaluation considerations. *Regul. Toxicol. Pharmacol.* 73, 137–150. <https://doi.org/10.1016/j.yrtph.2015.06.001>
- Brownson, D.A.C., Kampouris, D.K., Banks, C.E., 2011. An overview of graphene in energy production and storage applications. *J. Power Sources* 196, 4873–4885. <https://doi.org/10.1002/9783527665105.ch5>
- Brunner, E., Richthammer, P., Ehrlich, H., Paasch, S., Simon, P., Ueberlein, S., Van Pée, K.H., 2009. Chitin-based organic networks: An integral part of cell wall biosilica in the diatom thalassiosira pseudonana. *Angew. Chemie - Int. Ed.* 48, 9724–9727. <https://doi.org/10.1002/anie.200905028>
- Chen, H., 2014. Generate High-Resolution Venn and Euler Plots. [https://doi.org/10.1163/\\_q3\\_SIM\\_00374](https://doi.org/10.1163/_q3_SIM_00374)
- Chiovitti, A., Dugdale, T.M., Wetherbee, R., 2006. Diatom adhesives: molecular and mechanical properties, in: *Biological Adhesives*. pp. 79–103. [https://doi.org/10.1163/\\_q3\\_SIM\\_00374](https://doi.org/10.1163/_q3_SIM_00374)
- Choi, H., Fermin, D., Nesvizhskii, A.I., 2008. Significance Analysis of Spectral Count Data in Label-free Shotgun Proteomics. *Mol. Cell. Proteomics* 7, 2373–2385. <https://doi.org/10.1074/mcp.M800203-MCP200>
- Conrad, A., Kontro, M., Keinaenen, M.M., Cadoret, A., Faure, P., Mansuy-huault, L., Block, J., 2003. Fatty acids of lipid fractions in extracellular polymeric substances of activated sludge flocs. *Lipids* 38, 1093–1105. <https://doi.org/10.1007/s11745-006-1165-y>
- Cooksey, K.E., Wigglesworth-Cooksey, B., 1995. Adhesion of bacteria and diatoms to surfaces in the sea: A review. *Aquat. Microb. Ecol.* 9, 87–96. <https://doi.org/10.3354/ame009087>
- Cvitkovitch, D.G., Li, Y.H., Ellen, R.P., 2003. Quorum sensing and biofilm formation in streptococcal infections. *J. Clin. Invest.* 112, 1626–1632. <https://doi.org/10.1172/JCI200320430>. Streptococcal
- De Coen, W., Janssen, C.R., 1997. The use of biomarkers in *Daphnia magna* toxicity testing. IV. Cellular Energy Allocation: a new methodology to assess the energy budget of toxicant-stressed *Daphnia* populations. *J. Aquat. Ecosyst. Stress Recover.* 6, 43–55. <https://doi.org/10.1023/A:1008228517955>
- De Martino, A., Amato, A., Bowler, C., 2009. Mitosis in diatoms: Rediscovering an old model for cell division. *BioEssays* 31, 874–884. <https://doi.org/10.1002/bies.200900007>
- Duncan, R.F., Hershey, J.W.B., 1989. Protein synthesis and protein phosphorylation during heat stress, recovery, and adaptation. *J. Cell Biol.* 109, 1467–1481. <https://doi.org/10.1083/jcb.109.4.1467>

- Durkin, C.A., Mock, T., Armbrust, E.V., 2009. Chitin in diatoms and its association with the cell wall. *Eukaryot. Cell* 8, 1038–1050. <https://doi.org/10.1128/EC.00079-09>
- Dyhrman, S.T., Jenkins, B.D., Rynearson, T.A., Saito, M.A., Mercier, M.L., Alexander, H., Whitney, L.A.P., Drzewianowski, A., Bulygin, V. V., Bertrand, E.M., Wu, Z., Benitez-Nelson, C., Heithoff, A., 2012. The transcriptome and proteome of the diatom *Thalassiosira pseudonana* reveal a diverse phosphorus stress response. *PLoS One* 7. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0033768>
- Evans, L., 2003. Biofilms: recent advances in their study and control. [https://doi.org/10.1163/\\_q3\\_SIM\\_00374](https://doi.org/10.1163/_q3_SIM_00374)
- Falkowski, P.G., Katz, M.E., Knoll, A.H., Quigg, A., Raven, J. a, Schofield, O., Taylor, F.J.R., 2004. The Evolution of Modern Eukaryotic. *Science* (80- ). 305, 354–360. <https://doi.org/10.1126/science.1095964>
- Feng, L., Liu, Z., 2011. Graphene in biomedicine: opportunities and challenges. *Nanomedicine (Lond)*. 6, 317–324. <https://doi.org/10.2217/nmm.10.158>
- Flahaut, E., Bacsa, R., Peigney, A., Laurent, C., Flahaut, E., Bacsa, R., Peigney, A., Laurent, C., Ccvd, G., 2003. Gram-scale CCVD synthesis of double-walled carbon nanotubes. *Chem. Commun.* 12, 1442–1443. <https://doi.org/10.1039/b301514a>
- Flemming, H., Wingender, J., 2010. The biofilm matrix. *Nature* 8, 623–633. <https://doi.org/10.1002/9783527620944.ch4>
- Flemming, H.C., 1993. Biofilms and environmental protection. *Water Sci. Technol.* 27, 1–10. <https://doi.org/10.1021/es00038a700>
- Freixa, A., Acuña, V., Sanchís, J., Farré, M., Barceló, D., Sabater, S., 2018. Ecotoxicological effects of carbon based nanomaterials in aquatic organisms. *Sci. Total Environ.* 619–620, 328–337. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2017.11.095>
- Garacci, M., Barret, M., Mouchet, F., Sarrieu, C., Lonchambon, P., Flahaut, E., Gauthier, L., Silvestre, J., Pinelli, E., 2017. Few Layer Graphene sticking by bio fi lm of freshwater diatom *Nitzschia palea* as a mitigation to its ecotoxicity. *Carbon N. Y.* 113, 139–150. <https://doi.org/10.1016/j.carbon.2016.11.033>
- Geesey, G.G., Wigglesworth-Cooksey, B., Cooksey, K.E., 2000. Influence of calcium and other cations on surface adhesion of bacteria and diatoms: A review. *Biofouling* 15, 195–205. <https://doi.org/10.1080/08927010009386310>
- Heydarizadeh, P., Marchand, J., Chenais, B., Sabzalian, M.R., Zahedi, M., Moreau, B., Schoefs, B., 2014. Functional investigations in diatoms need more than a transcriptomic approach. *Diatom Res.* 29, 75–89. <https://doi.org/10.1080/0269249X.2014.883727>
- Hoagland, K.D., Rosowski, J.R., Gretz, M.R., Roemer, S.C., 1993. Diatom extracellular polymeric substances: function, fine structure, chemistry, and physiology. *J. Phycol.* 29, 537–566.
- Hone, J., 2001. Phonons and thermal properties of carbon nanotubes. *Top. Appl. Phys.* 80, 273–286. [https://doi.org/10.1007/3-540-39947-X\\_11](https://doi.org/10.1007/3-540-39947-X_11)
- Hussain, H., Branny, P., Allan, E., 2006. A Eukaryotic-Type Serine / Threonine Protein Kinase Is Required for Biofilm Formation , Genetic Competence , and Acid Resistance in *Streptococcus mutans*. *J. Bacteriol.* 188, 1628–1632. <https://doi.org/10.1128/JB.188.4.1628>
- Iijima, S., 1991. Helical microtubules of graphitic carbon. *Nature* 354. <https://doi.org/10.1038/354056a0>
- Kang, S., Pinault, M., Pfefferle, L., Elimelech, M., 2007. Single-Walled Carbon Nanotubes Exhibit Strong Antimicrobial Activity. *Langmuir* 23, 8670–8673.

- Kasumov, A.Y., Deblock, R., Kociak, M., Reulet, B., Bouchiat, H., Khodos, I.I., Gorbatov, Y.B., Volkov, V.T., Journet, C., Burghard, M., 1999. Supercurrents Through Single-Walled Carbon Nanotubes. *Science* (80-. ). 284, 1508–1511. <https://doi.org/10.1126/science.284.5419.1508>
- Keller, A. a., McFerran, S., Lazareva, A., Suh, S., 2013. Global life cycle releases of engineered nanomaterials. *J. Nanoparticle Res.* 15, 1692. <https://doi.org/10.1007/s11051-013-1692-4>
- Kjelleberg, S., Molin, S., 2002. Is there a role for quorum sensing signals in bacterial biofilms? *Curr. Opin. Microbiol.* 5, 254–258. [https://doi.org/10.1016/S1369-5274\(02\)00325-9](https://doi.org/10.1016/S1369-5274(02)00325-9)
- Lawrence, J.R., Waiser, M.J., Swerhone, G.D.W., Roy, J., Tumber, V., Paule, A., Hitchcock, A.P., Dynes, J.J., Korber, D.R., 2016. Effects of fullerene (C60), multi-wall carbon nanotubes (MWCNT), single wall carbon nanotubes (SWCNT) and hydroxyl and carboxyl modified single wall carbon nanotubes on riverine microbial communities. *Environ. Sci. Pollut. Res.* 23, 10090–10102. <https://doi.org/10.1007/s11356-016-6244-x>
- Lee, C., Wei, X., Kysar, J.W., Hone, J., 2008. Measurement of the elastic properties and intrinsic strength of monolayer graphene. *Science* (80-. ). 321, 385–388. <https://doi.org/10.1126/science.1157996>
- Leroy, C., Delbarre, C., Ghillebaert, F., Compere, C., Combes, D., 2008. Influence of subtilisin on the adhesion of a marine bacterium which produces mainly proteins as extracellular polymers. *J. Appl. Microbiol.* 105, 791–799. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2008.03837.x>
- Lesley, A.E., Zavortink, M., 1983. The Mechanism of Diatom Locomotion. II: Identification of Actin. *Proc. R. Soc.* 218, 345–348.
- Lin, Y.P., Raman, R., Sharma, Y., Chang, Y.F., 2008. Calcium binds to leptospiral immunoglobulin-like protein, LigB, and modulates fibronectin binding. *J. Biol. Chem.* 283, 25140–25149. <https://doi.org/10.1074/jbc.M801350200>
- Lind, J.L., Heimann, K., Miller, E.A., Van Vliet, C., Hoogenraad, N.J., Wetherbee, R., 1997. Substratum adhesion and gliding in a diatom are mediated by extracellular proteoglycans. *Planta* 203, 213–221. <https://doi.org/10.1007/s004250050184>
- Liu, S., Wei, L., Hao, L., Fang, N., Chang, M.W., Xu, R., Yang, Y., Chen, Y., 2009. Sharper and faster “Nano darts” kill more bacteria: A study of antibacterial activity of individually dispersed pristine single-walled carbon nanotube. *ACS Nano* 3, 3891–3902. <https://doi.org/10.1021/nn901252r>
- Liu, X.-M., Sheng, G.-P., Luo, H.-W., Zhang, F., Yuan, S.-J., Xu, J., Zeng, R.J., Wu, J.-G., Yu, H.-Q., 2010. Contribution of Extracellular Polymeric Substances ( EPS ) to the Sludge Aggregation. *Environ. Sci. Technol.* 44, 4355–4360. <https://doi.org/10.1021/es9016766>
- Luongo, L.A., Zhang, X., 2010. Toxicity of carbon nanotubes to the activated sludge process. *J. Hazard. Mater.* 178, 356–362. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2010.01.087>
- Mahanta, N.K., Abramson, A.R., 2012. Thermal conductivity of graphene and graphene oxide nanoplatelets. 13th IEEE Intersoc. Conf. on Thermal Thermomechanical Phenom. *Electron. Syst.* 1–6. <https://doi.org/10.1109/ITHERM.2012.6231405>
- Nair, R.R., Blake, P., Grigorenko, A.N., Novoselov, K.S., Booth, T.J., Stauber, T., Peres, N.M.R., Geim, A.K., 2008. Fine Structure Constant Defines visual Transparency of Graphene. *Science* (80-. ). 320, 1308.
- Neuwirth, E., 2005. The RColorBrewer Package.
- Novoselov, K.S., Geim, A.K., Morozov, S. V., Jiang, D., Zhang, Y., Dubonos, S. V., Grigorieva, I. V., Firsov, A.A., 2004. Electric Field Effect in Atomically Thin Carbon Films. *Science* (80-. ). 306, 666–669.

- Nunn, B.L., Faux, J.F., Hippmann, A.A., Maldonado, M.T., Harvey, H.R., Goodlett, D.R., Boyd, P.W., Strzepek, R.F., 2013. Diatom Proteomics Reveals Unique Acclimation Strategies to Mitigate Fe Limitation. *PLoS One* 8. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0075653>
- Parsek, M.R., Greenberg, E.P., 2005. Sociomicrobiology: The connections between quorum sensing and biofilms. *Trends Microbiol.* 13, 27–33. <https://doi.org/10.1016/j.tim.2004.11.007>
- Paul, D.R., Robeson, L.M., 2008. Polymer nanotechnology: Nanocomposites. *Polymer (Guildf)*. 49, 3187–3204. <https://doi.org/10.1016/j.polymer.2008.04.017>
- Piccinno, F., Gottschalk, F., Seeger, S., Nowack, B., 2012. Industrial production quantities and uses of ten engineered nanomaterials in Europe and the world. *J. Nanoparticle Res.* 14, 1–11. <https://doi.org/10.1007/s11051-012-1109-9>
- Pitkethly, M.J., 2004. Nanomaterials - The driving force. *NanoToday* 7, 20–29. [https://doi.org/10.1016/S1369-7021\(04\)00627-3](https://doi.org/10.1016/S1369-7021(04)00627-3)
- Popov, V.N., 2004. Carbon nanotubes: Properties and application. *Mater. Sci. Eng.* 43, 61–102. <https://doi.org/10.1016/j.mser.2003.10.001>
- Potts, J.R., Dreyer, D.R., Bielawski, C.W., Ruoff, R.S., 2011. Graphene-based polymer nanocomposites. *Polymer (Guildf)*. 52, 5–25. <https://doi.org/10.1016/j.polymer.2010.11.042>
- Putnam, A.J., Schultz, K., Mooney, D.J., 2001. Control of microtubule assembly by extracellular matrix and externally applied strain. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* 280, C556–C564. <https://doi.org/10.1152/ajpcell.2001.280.3.C556>
- R Core Team, 2013. R: a language and environment for statistical computing. R Found. Stat. Comput. Vienna, Austria.
- Randrianjatovo-Gbalou, I., Rouquette, P., Lefebvre, D., Girbal-Neuhauser, E., Maracto-Romain, C.-E., 2017. In situ analysis of *Bacillus licheniformis* biofilms: Amyloid-like polymers and eDNA are involved in the adherence and aggregation of the extracellular matrix. *J. Appl. Microbiol.* 122, 1262–1274. <https://doi.org/10.1111/jam.13423>
- Ras, M., Lefebvre, D., Derlon, N., Paul, E., Girbal-Neuhauser, E., 2011. Extracellular polymeric substances diversity of biofilms grown under contrasted environmental conditions. *Water Res.* 45, 1529–1538. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2010.11.021>
- Rodrigues, D.F., Elimelech, M., 2010. Toxic Effects of Single-Walled Carbon Nanotubes in the Development of *E. coli* Biofilm. *Environ. Sci. Technol.* 44, 4583–4589. <https://doi.org/10.1021/es1005785>
- Romani, A., 2009. Freshwater biofilms, in: *Biofouling*.
- Ruiz, O.N., Fernando, K.A.S., Wang, B., Brown, N.A., Luo, P.G., McNamara, N.D., Vangsness, M., Sun, Y.P., Bunker, C.E., 2011. Graphene oxide: a nonspecific enhancer of cellular growth. *ACS Nano* 5, 8100–8107. <https://doi.org/10.1021/nn202699t>
- Smith, D.J., Underwood, G.J.C., 2000. The production of extracellular carbohydrates by estuarine benthic diatoms: The effects of growth phase and light and dark treatment. *J. Phycol.* 36, 321–333. <https://doi.org/10.1046/j.1529-8817.2000.99148.x>
- Sun, T.Y., Gottschalk, F., Hungerbühler, K., Nowack, B., 2014. Comprehensive probabilistic modelling of environmental emissions of engineered nanomaterials. *Environ. Pollut.* 185, 69–76. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2013.10.004>
- Tang, L., Schramm, A., Neu, T.R., Revsbech, N.P., Meyer, R.L., 2013. Extracellular DNA in adhesion and biofilm formation of four environmental isolates: a quantitative study. *FEMS Microbiol. Ecol.* 86, 394–403. <https://doi.org/10.1111/1574-6941.12168>

- Verneuil, L., Silvestre, J., Mouchet, F., Flahaut, E., Boutonnet, J., Bourdiol, F., Bortolamiol, T., Baqué, D., Gauthier, L., Pinelli, E., 2014. Multi-walled carbon nanotubes , natural organic matter , and the benthic diatom *Nitzschia palea* : ““ A sticky story .”” *Nanotoxicology* 9, 119–229. <https://doi.org/10.3109/17435390.2014.918202>
- Verneuil, L., Silvestre, J., Randrianjatovo, I., Maracato-romain, C.-E., Girbal-Neuhauser, E., Mouchet, F., Flahaut, E., Gauthier, L., Pinelli, E., 2015. Double walled carbon nanotubes promote the overproduction of extracellular protein-like polymers in *Nitzschia palea* : An adhesive response for an adaptive issue. *Carbon N. Y.* 88, 113–125. <https://doi.org/10.1016/j.carbon.2015.02.053>
- Warnes, G.R., Bolker, B., Bonebakker, L., Gentleman, R., Huber, W., Liaw, A., 2009. Various R programming tools for plotting data. *R Packag.* version 2, 1.
- Wetherbee, R., Lind, J.L., Burke, J., Quatrano, R.S., 1998. The first kiss: Establishment and control of initial adhesion by raphid diatoms. *J. Phycol.* 34, 9–15. <https://doi.org/10.1046/j.1529-8817.1998.340009.x>
- Wuertz, S., Pfeleiderer, P., Kriebitzsch, K., Späth, R., Griebe, T., Coello-Oviedo, D., Wilderer, P.A., Flemming, H.C., 1998. Extracellular redox activity in activated sludge. *Water Sci. Technol.* 37, 379–384. [https://doi.org/10.1016/S0273-1223\(98\)00134-6](https://doi.org/10.1016/S0273-1223(98)00134-6)
- Yan, Z., Nika, D.L., Balandin, A.A., 2015. Thermal properties of graphene and few-layer graphene: applications in electronics. *IET Circuits, Devices Syst.* 9, 4–12. <https://doi.org/10.1049/iet-cds.2014.0093>
- Yang, Z.K., Ma, Y.H., Zheng, J.W., Yang, W.D., Liu, J.S., Li, H.Y., 2014. Proteomics to reveal metabolic network shifts towards lipid accumulation following nitrogen deprivation in the diatom *Phaeodactylum tricornutum*. *J. Appl. Phycol.* 26, 73–82. <https://doi.org/10.1007/s10811-013-0050-3>
- Zhang, Q., Huang, J.Q., Zhao, M.Q., Qian, W.Z., Wei, F., 2011. Carbon nanotube mass production: Principles and processes. *ChemSusChem* 4, 864–889. <https://doi.org/10.1002/cssc.201100177>
- Zhang, X., Bishop, P.L., 2003. Biodegradability of biofilm extracellular polymeric substances. *Chemosphere* 50, 63–69. [https://doi.org/10.1016/S0045-6535\(02\)00319-3](https://doi.org/10.1016/S0045-6535(02)00319-3)
- Zhu, J.K., Damsz, B., Kononowicz, A.K., Bressan, R.A., Hasegawa, P.M., 1994. A higher plant extracellular vitronectin-like adhesion protein is related to the translational elongation factor-1 alpha. *Plant Cell* 6, 393–404. <https://doi.org/10.1105/tpc.6.3.393>
- Zhu, Y., Murali, S., Cai, W., Li, X., Suk, J.W., Potts, J.R., Ruoff, R.S., 2010. Graphene and graphene oxide: Synthesis, properties, and applications. *Adv. Mater.* 22, 3906–3924. <https://doi.org/10.1002/adma.201001068>

Supporting information for the article *Role of exoproteome in diatoms' biofilm response to carbon nanoparticles*

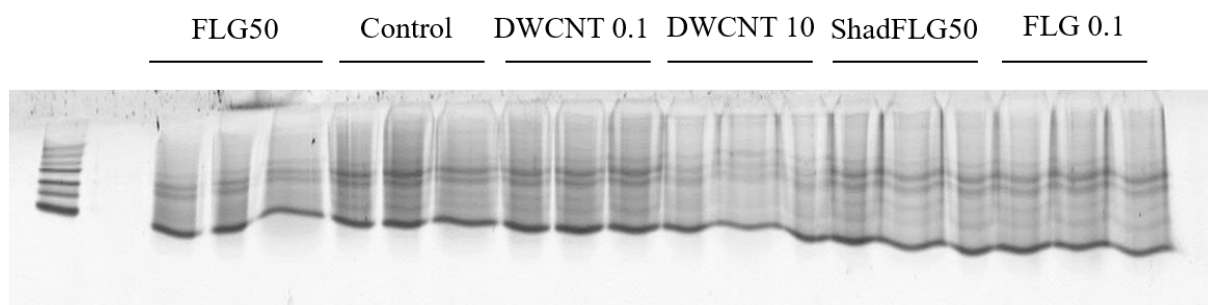


Figure S1. Control quality of EPS samples estimated on gel SDS-PAGE.

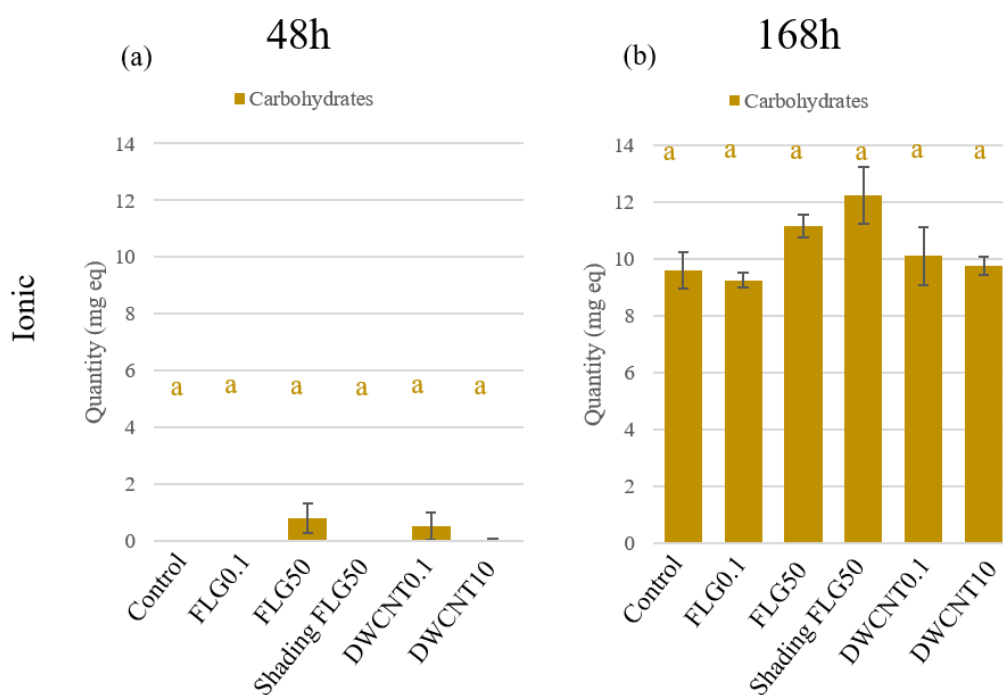


Figure S2. Quantification of carbohydrates in ionic-like proteins fraction at (a) 48h and (b) 168h in different carbon nanoparticles exposures conditions. Groups with the same letter are not significantly different ( $p$ -value > 0.05). Error bars represent standard errors of the mean of 3 separate experiments.



Table S5. Optical density values at 663 nm for chlorophyll measurement and detection limit calculated at 48h and 168h of exposure.

<b>Samples</b>	<b>DO 663 nm 48h</b>			<b>Detection limit 48h</b>	<b>DO 663 nm 168h</b>			<b>Detection limit 168h</b>
B-TR1	0,013	0,014	0,012	0,024	0,013	0,014	0,014	0,025
B-TR2	0,013	0,012	0,012	0,024	0,016	0,018	0,016	0,025
B-TR3	0,013	0,014	0,01	0,024	0,015	0,014	0,015	0,025
B-FLG0,1R1	0,012	0,012	0,013	0,024	0,01	0,011	0,011	0,025
B-FLG0,1R2	0,012	0,012	0,011	0,024	0,013	0,013	0,012	0,025
B-FLG0,1R3	0,012	0,012	0,047	0,024	0,013	0,012	0,015	0,025
B-FLG50R1	0,013	0,014	0,013	0,024	0,013	0,012	0,012	0,025
B-FLG50R2	0,013	0,021	0,012	0,024	0,011	0,014	0,012	0,025
B-FLG50R3	0,012	0,015	0,011	0,024	0,013	0,013	0,013	0,025
B-Shading-FLG50R1	0,011	0,012	0,01	0,024	0,014	0,014	0,013	0,025
B-Shading-FLG50R2	0,011	0,01	0,011	0,024	0,013	0,013	0,012	0,025
B-Shading-FLG50R3	0,01	0,011	0,01	0,024	0,013	0,013	0,013	0,025
B-CNT0,1R1	0,013	0,012	0,012	0,024	0,012	0,015	0,012	0,025
B-CNT0,1R2	0,011	0,012	0,012	0,024	0,016	0,017	0,015	0,025
B-CNT0,1R3	0,012	0,012	0,012	0,024	0,012	0,013	0,012	0,025
B-CNT10R1	0,01	0,013	0,01	0,024	0,011	0,014	0,012	0,025
B-CNT10R2	0,011	0,011	0,01	0,024	0,016	0,015	0,011	0,025
B-CNT10R3	0,01	0,01	0,009	0,024	0,014	0,013	0,01	0,025
S0-TR1	0,012	0,013	0,011	0,028	0,011	0,012	0,012	0,017
S0-TR2	0,012	0,011	0,011	0,028	0,012	0,011	0,011	0,017
S0-TR3	0,013	0,012	0,011	0,028	0,012	0,011	0,011	0,017
S0-FLG0,1R1	0,011	0,011	0,012	0,028	0,01	0,01	0,011	0,017
S0-FLG0,1R2	0,012	0,012	0,011	0,028	0,01	0,01	0,01	0,017
S0-FLG0,1R3	0,012	0,011	0,012	0,028	0,011	0,011	0,011	0,017
S0-FLG50R1	0,012	0,012	0,012	0,028	0,01	0,011	0,011	0,017
S0-FLG50R2	0,011	0,021	0,011	0,028	0,011	0,011	0,01	0,017
S0-FLG50R3	0,011	0,012	0,011	0,028	0,011	0,011	0,011	0,017
S0-Shading-FLG50R1	0,011	0,011	0,011	0,028	0,012	0,011	0,012	0,017
S0-Shading-FLG50R2	0,011	0,011	0,01	0,028	0,013	0,011	0,012	0,017
S0-Shading-FLG50R3	0,01	0,01	0,011	0,028	0,014	0,013	0,012	0,017
S0-CNT0,1R1	0,011	0,011	0,012	0,028	0,011	0,011	0,01	0,017
S0-CNT0,1R2	0,011	0,011	0,012	0,028	0,011	0,012	0,012	0,017
S0-CNT0,1R3	0,012	0,011	0,011	0,028	0,01	0,01	0,011	0,017
S0-CNT10R1	0,01	0,013	0,012	0,028	0,01	0,014	0,011	0,017
S0-CNT10R2	0,011	0,011	0,011	0,028	0,014	0,011	0,011	0,017
S0-CNT10R3	0,011	0,011	0,01	0,028	0,012	0,01	0,009	0,017

Table S5. Continued.

<b>Samples</b>	<b>DO 663 nm 48h</b>			<b>Detection limit 48h</b>	<b>DO 663 nm 168h</b>			<b>Detection limit 168h</b>
SE-TR1	0,011	0,012	0,01	0,014	0,013	0,012	0,011	0,016
SE-TR2	0,011	0,011	0,012	0,014	0,012	0,011	0,011	0,016
SE-TR3	0,012	0,011	0,012	0,014	0,013	0,011	0,011	0,016
SE-FLG0,1R1	0,011	0,011	0,012	0,014	0,011	0,012	0,011	0,016
SE-FLG0,1R2	0,011	0,011	0,012	0,014	0,013	0,012	0,017	0,016
SE-FLG0,1R3	0,013	0,012	0,013	0,014	0,014	0,011	0,016	0,016
SE-FLG50R1	0,013	0,014	0,016	0,014	0,014	0,013	0,013	0,016
SE-FLG50R2	0,013	0,023	0,013	0,014	0,013	0,015	0,013	0,016
SE-FLG50R3	0,011	0,012	0,014	0,014	0,011	0,013	0,012	0,016
SE-Shading-FLG50R1	0,01	0,011	0,011	0,014	0,011	0,011	0,011	0,016
SE-Shading-FLG50R2	0,011	0,011	0,011	0,014	0,011	0,01	0,011	0,016
SE-Shading-FLG50R3	0,01	0,011	0,011	0,014	0,011	0,011	0,011	0,016
SE-CNT0,1R1	0,011	0,011	0,012	0,014	0,011	0,013	0,012	0,016
SE-CNT0,1R2	0,011	0,012	0,012	0,014	0,011	0,012	0,013	0,016
SE-CNT0,1R3	0,012	0,012	0,013	0,014	0,012	0,013	0,012	0,016
SE-CNT10R1	0,012	0,015	0,013	0,014	0,01	0,014	0,011	0,016
SE-CNT10R2	0,011	0,011	0,013	0,014	0,011	0,01	0,01	0,016
SE-CNT10R3	0,012	0,011	0,012	0,014	0,01	0,01	0,01	0,016
ST-TR1	0,023	0,022	0,02	0,024	0,014	0,014	0,013	0,024
ST-TR2	0,021	0,021	0,021	0,024	0,013	0,012	0,012	0,024
ST-TR3	0,02	0,019	0,018	0,024	0,014	0,013	0,012	0,024
ST-FLG0,1R1	0,017	0,019	0,019	0,024	0,012	0,012	0,012	0,024
ST-FLG0,1R2	0,019	0,018	0,018	0,024	0,013	0,013	0,013	0,024
ST-FLG0,1R3	0,021	0,02	0,021	0,024	0,015	0,014	-0,02	0,024
ST-FLG50R1	0,02	0,02	0,02	0,024	0,015	0,014	0,014	0,024
ST-FLG50R2	0,018	0,023	0,018	0,024	0,015	0,026	0,015	0,024
ST-FLG50R3	0,014	0,018	0,017	0,024	0,015	0,019	0,016	0,024
ST-Shading-FLG50R1	0,017	0,02	0,017	0,024	0,013	0,018	0,014	0,024
ST-Shading-FLG50R2	0,017	0,017	0,018	0,024	0,013	0,012	0,011	0,024
ST-Shading-FLG50R3	0,015	0,015	0,015	0,024	0,012	0,012	0,012	0,024
ST-CNT0,1R1	0,019	0,02	0,019	0,024	0,013	0,013	0,019	0,024
ST-CNT0,1R2	0,016	0,015	0,015	0,024	0,014	0,014	0,013	0,024
ST-CNT0,1R3	0,017	0,018	0,016	0,024	0,011	0,013	0,012	0,024
ST-CNT10R1	0,016	0,016	0,016	0,024	0,012	0,012	0,011	0,024
ST-CNT10R2	0,016	0,018	0,018	0,024	0,012	0,013	0,015	0,024
ST-CNT10R3	0,016	0,017	0,016	0,024	0,014	0,014	0,015	0,024

## Références bibliographiques

- Adav, S.S., Lee, D., Tay, J., 2008. Extracellular polymeric substances and structural stability of aerobic granule. *Water Res.* 42, 1644–1650. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2007.10.013>
- Azeredo, J., Henriques, M., Sillankorva, S., Oliveira, R., 2003. Extraction of exopolymers from biofilms: the protective effect of glutaraldehyde. *Water Sci. Technol.* 47, 175–179.
- D'Abzac, P., Bordas, F., Van Hullebusch, E., Lens, P.N.L., Guibaud, G., 2010. Extraction of extracellular polymeric substances (EPS) from anaerobic granular sludges: comparison of chemical and physical extraction protocols. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 85, 1589–1599. <https://doi.org/10.1007/s00253-009-2288-x>
- Delattre, C., Pierre, G., Laroche, C., Michaud, P., 2016. Production, extraction and characterization of microalgal and cyanobacterial exopolysaccharides. *Biotechnol. Adv.* 34, 1159–1179. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2016.08.001>
- Flemming, H.C., Neu, T.R., Wozniak, D.J., 2007. The EPS matrix: The “House of Biofilm Cells.” *J. Bacteriol.* 189, 7945–7947. <https://doi.org/10.1128/JB.00858-07>
- Liu, H., Fang, H.H.P., 2002. Extraction of extracellular polymeric substances (EPS) of sludges. *J. Biotechnol.* 95, 249–256. [https://doi.org/10.1016/S0168-1656\(02\)00025-1](https://doi.org/10.1016/S0168-1656(02)00025-1)
- Monico, A., Martinez-Sendra, E., Canada, F.J., Zorrilla, S., Perez-Sala, D., 2017. Drawbacks of Dialysis Procedures for Removal of EDTA. *PLoS One* 1–9. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0169843>
- Ras, M., Girbal Neuhäuser, E., Paul, E., Lefebvre, D., 2008. A high yield multi-method extraction protocol for protein quantification in activated sludge. *Bioresour. Technol.* 99, 7464–7471. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2008.02.025>
- Sesay, M.L., Ozcengiz, G., Sanin, F.D., 2006. Enzymatic extraction of activated sludge extracellular polymers and implications on bioflocculation. *Water Res.* 40, 1359–1366. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2006.01.045>
- Sheng, G., Yu, H., Li, X., 2010. Extracellular polymeric substances (EPS) of microbial aggregates in biological wastewater treatment systems: A review. *Biotechnol. Adv.* 28, 882–894. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2010.08.001>
- Staats, N., De Winder, B., Stal, L., Mur, L., 1999. Isolation and characterization of extracellular polysaccharides from the epipelagic diatoms *Cylindrotheca closterium* and *Navicula salinarum*. *Eur. J. Phycol.* 34, 161–169. <https://doi.org/10.1080/09670269910001736212>
- Takahashi, E., Ledauphin, J., Goux, D., Orvain, F., 2009. Optimising extraction of extracellular polymeric substances (EPS) from benthic diatoms: Comparison of the efficiency of six EPS extraction methods. *Mar. Freshw. Res.* 60, 1201–1210. <https://doi.org/10.1071/MF08258>
- Tang, L., Schramm, A., Neu, T.R., Revsbech, N.P., Meyer, R.L., 2013. Extracellular DNA in adhesion and biofilm formation of four environmental isolates: a quantitative study. *FEMS Microbiol. Ecol.* 86, 394–403. <https://doi.org/10.1111/1574-6941.12168>
- Verneuil, L., 2015. Toxicité environnementale et écotoxicité des nanotubes de carbone sur des diatomées benthiques : de la cellule au biofilm. Université de Toulouse.
- Wingender, J., Neu, T.R., Flemming, H.-C., 1999. What are Bacterial Extracellular Polymeric Substances?, in: Wingender, J., Neu, T.R., Flemming, H.-C. (Eds.), *Microbial Extracellular Polymeric Substances: Characterization, Structure and Function*. Springer Berlin Heidelberg, Berlin, Heidelberg, pp. 1–19. [https://doi.org/10.1007/978-3-642-60147-7\\_1](https://doi.org/10.1007/978-3-642-60147-7_1)

# Discussion générale, conclusions et perspectives

Les risques environnementaux liés à l'utilisation croissante des NPCs ont suscités le développement d'études en nano-écotoxicologie dans le but d'anticiper les effets de ces nouveaux contaminants sur les organismes. C'est dans cette démarche prospective que s'inscrivent ces travaux de thèse évaluant les mécanismes de toxicité de deux allotropes du carbone sur le compartiment primaire des milieux aquatiques.

Les biofilms, connus pour épurer la colonne d'eau, peuvent accumuler des quantités conséquentes de différents polluants, incluant les NPCs, exposant ainsi les organismes qui broutent le biofilm à de fortes concentrations locales. Dans l'optique de prédire les effets du rejet potentiel de ces NPCs sur le fonctionnement des écosystèmes aquatiques, le choix du modèle biologique pour ces travaux s'est porté sur la diatomée benthique *Nitzschia palea*, composante cellulaire d'une majorité de biofilms phototrophes. Les effets de deux formes allotropiques du carbone, du FLG et des DWCNTs, ont été étudiés à la fois à l'échelle de la population cellulaire mais également à l'échelle moléculaire grâce à différentes approches. Dans un premier temps, la toxicité du FLG sur les cultures de *N. palea* a fait l'objet d'une première étude, mis en parallèle avec les résultats obtenus dans un travail antérieur sur les MWCNTs (Verneuil et al., 2014). Cette étude a permis d'établir de premières hypothèses quant aux mécanismes de toxicité de ces NPCs.

L'utilisation des outils « omiques » a permis de comparer les réponses générées entre de faibles concentrations, n'induisant aucun impact sur la croissance, et de fortes concentrations où des effets significatifs d'inhibition de croissance ont été mesurés au niveau de l'appareil photosynthétique ou encore de la transcription, pour une même nanoparticule. Une première étude a permis de déterminer la réponse transcriptomique générée lors d'un contact direct en comparaison avec l'effet d'ombrage du FLG. Lors des expérimentations suivantes, la présence de DWCNTs, interagissant fortement avec les acides nucléiques, et donc empêchant l'extraction/purification des ARN, n'a malheureusement pas permis de déterminer la réponse transcriptomique générée face à une concentration induisant une inhibition de croissance. Cette forte concentration a alors été remplacée par une concentration un peu plus faible sans effets démontrés sur la croissance de *N. palea*. Ces approches transcriptomiques ont permis de

mettre une évidence les processus biologiques impliqués dans les effets sur la croissance mais aussi de mieux cerner leur cause.

De manière générale ces études ont clairement suggéré l'importance du rôle des EPS dans la réponse de *N. palea* à l'exposition aux deux formes allotropiques du carbone. C'est pourquoi, une étude de la matrice extracellulaire a été mise en œuvre. L'effet des NPCs sur le biofilm algal a alors été évalué grâce à une analyse quantitative déterminant les taux d'excrétion à la fois des protéines extracellulaires, mais également des carbohydrates composant cette matrice. Une approche à la fois semi-quantitative et qualitative, par spectrométrie de masse, a été investie dans le but d'identifier les protéines impliquées dans la réponse extracellulaire de *N. palea* induite par les différentes NPCs choisies.

## 1 Comparaison des réponses induites par les deux types de NPCs

Ces travaux de thèse se sont orientés sur la comparaison de deux formes différentes de NPCs afin de déterminer la spécificité de la structure tridimensionnelle, et des caractéristiques intrinsèques associées, sur leur écotoxicité. La forme cylindrique des CNTs, largement étudiés dans les évaluations environnementales (Freixa et al., 2018), a été comparée à la forme plane du FLG, largement moins étudié dans la littérature (Zhao et al., 2014). Les premiers essais évaluant la réponse des cultures de *N. palea* ont été réalisés sur du FLG en utilisant la même méthodologie développée lors de travaux antérieurs sur les MWCNTs (Verneuil et al., 2014) afin de faciliter la comparaison des résultats obtenus. De cette manière, les impacts sur la croissance, l'intégrité cellulaire et le rendement quantique des photosystèmes II ont été déterminés après 144h d'exposition. La réponse moléculaire de *N. palea* a été évaluée sur les deux formes allotropiques du carbone dans les mêmes conditions expérimentales, nécessitant parfois des adaptations techniques (cf. Chapitre 4 et 5 partie 2). Les effets subis lors du contact direct ainsi que l'ombrage du FLG seul ont été évalués grâce à un dispositif expérimental adapté. La détermination de la spécificité de la réponse des diatomées à la forme allotropique du carbone est discutée dans cette partie en analysant l'ensemble des résultats obtenus dans un premier temps pour les faibles doses, puis pour les fortes doses testées. L'effet d'ombrage du FLG, lui, a toujours été étudié en parallèle avec le contact direct des nanoparticules avec les cellules pour une même concentration de 50 mg.L<sup>-1</sup>. L'ensemble des résultats sont synthétisés dans le Tableau 6 résumant schématiquement les réponses obtenues par les trois grandes approches utilisées lors des différentes expositions aux NPCs.

## 1.1 Réponses générées aux faibles doses

La plus faible dose expérimentée ( $0,1 \text{ mg.L}^{-1}$ ) dans l'ensemble de ces travaux de thèse n'induit pas d'impact décelable à l'échelle de la culture cellulaire, à la fois pour les essais en présence de FLG (Chapitre 3 (Garacci et al., 2017)) ou de MWCNTs (Verneuil et al., 2014). Ainsi, aucun effet sur le taux de croissance, le taux de mortalité ou encore le rendement quantique des photosystèmes II n'a été noté pour ces cultures. D'après la littérature, l'ensemble des études écotoxicologiques effectuées sur des organismes aquatiques (Freixa et al., 2018), notamment sur les cultures algales (Pretti et al., 2014; Schwab et al., 2011), mettent en évidence une gamme de concentration effective des CNTs et du graphène du même ordre de grandeur, sans effets néfastes en dessous de  $1 \text{ mg.L}^{-1}$ . Cependant, si les faibles doses en NPCs n'impactent pas la croissance des cultures, l'évaluation de la réponse transcriptomique semble indiquer une modification significative de l'expression des gènes (Chapitre 4).

Bien que seulement 50 et 68 gènes soient différentiellement exprimés par les diatomées exposées au FLG et aux DWCNTs, respectivement, l'intensité des réponses transcriptomiques générées à faible concentration n'en est pas moins négligeable. Les DWCNTs semblent altérer la réponse transcriptomique des diatomées de manière plus importante que le FLG avec une gamme d'expression différentielle plus large. Cependant, le nombre de DEGs similaires dans les deux conditions représentent près de 30% de la réponse transcriptomique générée, révélant ainsi un profil de réponse commun à ces deux allotropes du carbone à faible concentration. De plus, sur ces 30% de DEGs partagés, tous sont régulés de la même manière, qu'ils soient surexprimés ou réprimés, renforçant ainsi l'hypothèse d'une réponse similaire pour un ensemble de gènes.

Cependant, l'analyse fonctionnelle des DEGs, présentant une annotation fonctionnelle significative, ne révèle plus cette similitude de réponse. En effet, après l'enrichissement des annotations par Gene Ontology (GO), les annotations significativement différentes de celles exprimées dans la condition témoin ne permettent pas de sélectionner des gènes communs aux deux conditions. Ainsi, les processus biologiques impliqués dans la réponse de chacune des NPCs testées semblent différents. L'exposition au FLG semble induire un léger stress oxydatif accompagné d'une induction des transcrits impliqués dans la synthèse/réparation du frustule, suggérant un effet abrasif lors de l'interaction entre les diatomées et le FLG même à de faibles concentrations. Les graphènes sont connus pour engendrer des dommages membranaires à des doses plus importantes (plus de  $1 \text{ mg.L}^{-1}$ ) (Akhavan and Ghaderi, 2010),

mais ces constatations sont souvent faites à partir de méthodes de dosage extracellulaire ou d'observations en microscopie électronique. L'utilisation d'une approche transcriptomique permet ainsi de déceler des symptômes cellulaires à de faibles concentrations en contaminants (Poynton and Vulpe, 2009), tandis que les méthodes de suivi classiques sont moins sensibles et ne permettent pas de déterminer les mécanismes de toxicité. Les DWCNTs, eux, semblent avoir un impact physiologique plus large touchant ainsi la régulation de la transcription mais également le mécanisme de modification post-traductionnelle des protéines, pouvant ainsi modifier leur fonction. De plus, une légère diminution de l'expression des gènes impliqués dans la synthèse de pigments chlorophylliens (chlorophylle a) peut être observée chez les diatomées exposées aux DWCNTs, suggérant un début d'impact sur le processus de photosynthèse, également évoqué chez l'algue unicellulaire *Chlamydomonas reinhardtii* en présence de 1-2 mg.L<sup>-1</sup> de MWCNTs (Matorin et al., 2010). Une première hypothèse en lien avec la surface spécifique pourrait être envisagée ici pour expliquer la différence d'intensité de réponse entre les diatomées exposées à du FLG et aux DWCNTs. En effet, Mottier *et al.*(2016) ont pu mettre en évidence l'importance de cette caractéristique sur l'impact des NPCs chez les xénopes. Avec une surface spécifique de 980m<sup>2</sup>.g<sup>-1</sup>, les DWCNTs présentent une surface d'interaction avec les organismes bien plus importantes que le FLG dont la surface spécifique peut être jusqu'à trois fois plus petite (elle a été estimée entre 263 et 526m<sup>2</sup>.g<sup>-1</sup> pour le FLG utilisé dans ces travaux).

Par ailleurs, l'induction d'une réponse adhésive retrouvée uniquement chez les diatomées exposées aux DWCNTs, *via* la synthèse de protéines impliquées dans le processus d'adhésion cellulaire, laissent penser que la lutte contre le stress induit par les DWCNTs passe par une stratégie liée au style de vie « biofilm ». En effet, les protéines extracellulaires composant le matrice des biofilms peuvent avoir en plus du rôle d'ancrage des cellules à un substrat, une fonction cruciale dans la protection des cellules face aux agressions extérieures (Flemming and Wingender, 2010). Ces derniers résultats sont cohérents avec les analyses de la matrice extracellulaire (Chapitre 5) révélant une augmentation de la quantité de protéines après 48h d'exposition légèrement plus importante aux faibles concentrations aux DWCNTs (50 protéines surexcrétées) qu'en présence de FLG (32 protéines surexcrétées). La réponse fonctionnelle extracellulaire des diatomées semble malgré tout être similaire entre les deux conditions dont une grande partie fait appel à des protéines impliquées dans le processus de traduction, qui pourrait avoir un rôle dans l'adhésion cellulaire. Cependant, l'intensité de production différentielle et l'abondance de ces exoprotéines suggère une réponse

extracellulaire plus marquée chez les diatomées exposées aux DWCNT, tout comme la réponse transcriptomique. En plus de la relation établie entre la surface spécifique et la toxicité des DWCNTs, un autre phénomène pourrait expliquer l'ampleur de la réponse des diatomées lors d'une exposition aux DWCNTs. Bien que des travaux antérieurs (Verneuil, 2015) aient pu observer des ornements au sein des pores qui pourraient agir comme une barrière physique et empêcherait l'internalisation des CNTs, la réponse transcriptomique générée par les diatomées en exposition aux DWCNT suggèrent l'internalisation des ces derniers. Un phénomène d'internalisation a déjà été observé sur des cellules de mammifères (Kam et al., 2004), chez l'algue verte *Desmodesmus subspicatus* (Rhiem et al., 2015) ou encore chez la diatomée *Nitzschia linearis* (dont le frustule présentent des pores de plus grande taille). La présence du frustule chez les diatomées forme une véritable barrière rendant la pénétration des CNTs plus difficile. Cependant, l'existence d'un stade dans leur cycle cellulaire, où les diatomées se retrouvent sans frustule (stade zygote ou auxospore), laisse penser que l'internalisation des CNTs reste tout de même envisageable.

Dans l'ensemble, ces études suggèrent que les expositions au FLG et aux DWCNTs à de faibles concentrations induisent des interactions physiques différentes avec les cellules, mais provoquent toutes deux une réponse extracellulaire proche. Les interactions avec les cellules semblent jouer un grand rôle dans l'effet des NPCs.

## 1.2 Réponses générées aux fortes doses en NPCs

Les cultures de diatomées présentent une inhibition de croissance significative après 48h d'exposition au FLG, tout comme aux MWCNTs, à forte concentration ( $50 \text{ mg.L}^{-1}$ ) (Verneuil et al., 2014). Cependant, la présence de FLG entraîne une cytotoxicité contrairement à l'exposition aux MWCNTs où le taux de mortalité est similaire aux cultures témoins. Bien qu'aucun impact significatif n'ait été détecté sur la croissance des diatomées exposées à  $10 \text{ mg.L}^{-1}$  de DWCNTs (Verneuil et al., 2015), l'étude de la réponse transcriptomique après 48h d'exposition révèle des modifications importantes de l'expression de certains gènes, tout comme dans le cas des diatomées exposées au FLG. Il est important de mentionner ici que l'étude sur la réponse cellulaire des diatomées exposées aux DWCNTs a été réalisée en présence de matière organique naturelle avec qui les DWCNTs ont une grande affinité (Hyung and Fortner, 2007). L'interaction entre la matière organique et les CNTs permettrait ainsi de réduire leurs effets sur les organismes, comme observé chez l'algue verte *Chlorella pyrenoidosa* (Zhang et al., 2015).



Bien que les concentrations étudiées soient différentes, un nombre comparable de DEGs sont communs à ces deux formes de NPCs et représente près de 30% des DEGs exprimés dans chacune des deux conditions. Ces chiffres mettent en évidence l'existence d'une réponse générique, d'autant plus que près de 96% de ces DEGs partagés sont régulés dans le même sens. D'après ces données, les DWCNTs induisent une réponse transcriptomique d'ampleur similaire au FLG, mais le fait que les DWCNTs soient 5 fois moins concentrés que le FLG suggèrent un stress physiologique induit par ces derniers plus important. Cette remarque fait également appel à la différence de surface spécifique entre ces deux nanoparticules, plus grande chez les DWCNTs augmentant leur surface de contact avec les cellules et donc leur toxicité. En plus de cette disparité de surface spécifique, une nouvelle hypothèse peut être envisagée pour expliquer l'ampleur de la réponse transcriptomique générée à 10 mg.L<sup>-1</sup> de DWCNT. Sachant que la taille des agrégats formés par les DWCNTs en milieux aqueux étant trop important pour permettre leur internalisation au sein des auxospores des diatomées, il est possible d'imaginer la production de résidus carbonés via la biodégradation des DWCNTs. En effet, les CNTs ont la possibilité d'être biodégradés par des enzymes comme les peroxydases (Allen et al., 2008), dont certaines peuvent se retrouver dans la matrice extracellulaire des diatomées (Flemming and Wingender, 2010; Moore et al., 1996). Ce phénomène pourrait alors conduire à la génération de résidus carbonés de plus petites tailles pouvant être par la suite internalisés et agir.

Dans les deux conditions, l'exposition aux NPCs affecte la régulation de la transcription ainsi que les processus de modifications post-traductionnelles des protéines (Tableau 6). Par ailleurs, la quasi-totalité des voies de biosynthèse de pigments chlorophylliens est réprimée dans les deux conditions, ce qui s'accompagne d'une diminution de la régulation du stress oxydatif. Cette observation est cohérente avec la diminution des rendements quantiques des photosystèmes II observée en présence de FLG. La littérature concernant les effets des CNTs sur l'activité photosynthétique des microalgues est plutôt partagée. Verneuil *et al.* (2015) n'avaient pas décelé d'effets sur ce paramètre lors d'une exposition aux DWCNTs, même à 50 mg.L<sup>-1</sup>, tandis que Wei *et al.* (2010) rapportent une diminution du rendement quantique des photosystèmes II lors de l'exposition de *Dunaliella tertiolecta* à 10 mg.L<sup>-1</sup> de MWCNTs.

Souvent évoqué dans les études précédentes, une modulation de l'allocation énergétique pourrait contribuer à expliquer l'inhibition de croissance observée à fortes concentrations en NPCs (Garacci et al., 2017; Verneuil et al., 2015, 2014). Cette hypothèse est renforcée par les résultats des analyses transcriptomiques évoquant des modifications du métabolisme

énergétique à la fois chez les diatomées exposées au FLG, et celles exposées aux DWCNTs (Tableau 6). Cependant, des différences entre les deux conditions semblent apparaître sur ces processus biologiques. Une induction des gènes impliqués dans la glycolyse et l'oxydation des acides gras ainsi que dans le cycle du glyoxylate est observée en présence de FLG, tandis que les DWCNTs auraient un impact plus modéré sur ces voies métaboliques avec une amplification de la voie des pentoses contre une diminution de l'expression des gènes impliqués dans la glycolyse. La glycolyse étant un processus réversible, la régulation positive d'enzymes impliquées dans ce processus peut également signifier une induction de la néoglucogenèse. La différence des effets de ces deux NPCs sur le métabolisme énergétique pourrait être liée à la proportion de carbohydrates excrétés dans la matrice extracellulaire qui semble plus importante, chez les diatomées exposées aux DWCNTs (Chapitre 5).

En plus d'une modification du métabolisme énergétique, une répression de nombreux transporteurs notamment ceux impliqués dans l'excrétion de contaminants s'ajoute à l'économie d'énergie cellulaire mise en place par les diatomées exposées aux DWCNTs. Une dernière différence de la réponse transcriptomique dans les deux conditions de NPCs testées apparaît au niveau de la modulation de la voie du shikimate et de la biosynthèse des acides aminés aromatiques en présence de DWCNTs. L'affinité des CNTs avec les composés organiques aromatiques apolaires (Chen et al., 2007), comme certains acides aminés, pourrait expliquer la modulation de ces voies métaboliques via l'internalisation des résidus intermédiaires générés par la biodégradation de ces derniers (Chapitre 4, partie 4.2). L'hypothèse de modulation de l'allocation énergétique est renforcée par la possibilité d'un recyclage des composants de la matrice extracellulaire, comme les protéines ou les lipides, grâce à l'excrétion de protéines cataboliques. De plus, une augmentation d'exoprotéines enzymatiques, pouvant être impliquées dans la dégradation des polysaccharides (Wingender et al., 1999) mais également des molécules organiques plus coriaces, comme lignine pouvant être dégradée par des cultures d'*Escherichia coli* (Wuertz et al., 1998), ou la chitine, renforce l'hypothèse d'une utilisation des composants de la matrice extracellulaire comme source de carbone. Cette observation laisse alors penser que les diatomées mettent en place une économie du métabolisme énergétique, ciblée sur la réutilisation de composants extracellulaires précédemment excrétés, afin d'investir dans une réponse extracellulaire.

Une récupération de la croissance plus tardive est observée pour les cultures exposées aux deux allotropes du carbone qui se retrouvent alors collés dans la matrice extracellulaire. Parmi les gènes les plus surexprimés dans les deux conditions d'exposition aux NPCs, les gènes

codant pour différentes protéines adhésives, comme une hémagglutinine filamenteuse ou encore une adhésine sont observés. Ces observations sont cohérentes avec l'augmentation significative de protéines extracellulaires estimée lors des expositions aux fortes concentrations en NPCs. La présence de DWCNTs semble engendrer légèrement plus de surproduction protéique que le FLG, accompagnée également d'une augmentation significative de la part des carbohydrates dans la matrice extracellulaire. Cette réponse extracellulaire a également été observée suite à l'exposition à d'autres formes de nanoparticules, notamment des nanoparticules métalliques (Andrade et al., 2010) suggérant une réponse générique à l'exposition aux contaminants nanoparticulaires.

La communication extracellulaire semble également jouer un rôle important dans la réponse des diatomées, certainement lié à la mise en œuvre d'une réponse adhésive collective (Davies et al., 2014; O'Toole and Kolter, 1998). Comme nous avons pu l'observer, un ensemble d'exoprotéines d'adhésion mais également de glycoprotéines, suggérées par l'induction d'exoprotéines impliquées dans le métabolisme de ces dernières mais également dans le métabolisme des polysaccharides, sont susceptibles d'être surproduites en réponse aux NPCs. Un grand nombre de ces protéines peuvent interagir avec la chitine, connue pour renforcer l'exosquelette des insectes et des crustacés (Moussian et al., 2005; Raabe et al., 2006). Ces résultats suggèrent un rôle important de ce polysaccharide dans la formation du système d'adhésion cellulaire. La potentielle induction de chitine pourrait alors supposer un renforcement de la matrice extracellulaire entourant les cellules, agissant alors comme une barrière protectrice permettant de limiter les dommages au niveau du frustule. D'autant plus que des auteurs ont montré l'importance de la chitine dans la formation du frustule (Durkin et al., 2009). Des altérations physiques peuvent ainsi expliquer ce renforcement de la matrice extracellulaire. En effet, des observations au microscope électronique ont pu mettre en évidence des altérations du frustule qui semble alors « cisailé » par le FLG à forte concentration (Chapitre 3). Ces observations sont cohérentes avec l'induction de gènes impliqués dans la réparation de la paroi cellulaire lors d'une exposition au FLG mais également aux DWCNTs, même si pour ces dernières aucunes détériorations des frustules n'ont été observées. Néanmoins, bon nombre d'études ont pu mettre en évidence l'impact des CNTs sur les membranes plasmiques des cellules immunitaires (Palomäki et al., 2011), mais également des bactéries (Liu et al., 2009) perçant ainsi les cellules à l'image d'une « aiguille ». Ces observations suggèrent de fortes interactions entre les diatomées et les DWCNTs dans notre cas.

Plus globalement, ces résultats démontrent des réponses extracellulaires similaires des diatomées en présence de deux formes allotropiques du carbone (Tableau 6). Les analyses de la composition de la matrice extracellulaire semblent indiquer la mise en place d'un système d'adhésion comprenant des protéines, à caractère hydrophobe, filamenteuses, mais surtout des peptidoglycanes, probablement en association avec de la chitine grâce à l'intervention du calcium. Nous pouvons proposer comme hypothèse que les différences fonctionnelles observées proviennent bien de la forme des nanoparticules et non de la différence de concentration (50 mg.L<sup>-1</sup> pour FLG et 10 mg.L<sup>-1</sup> pour DWCNTs) car même à des concentrations différentes les profils de réponse intracellulaire et extracellulaire sont sensiblement similaires entre les deux NPCs. Cette matrice extracellulaire permet ainsi aux cellules de piéger les NPCs pour limiter leurs effets. Le piégeage des NPCs au sein de la matrice extracellulaire des diatomées conduit à l'accumulation de ces contaminants dans les biofilms phototrophes. Les organismes des niveaux trophiques supérieurs, mais également les autres espèces composant les biofilms se retrouveront alors confrontés à des concentrations en NPCs bien plus importantes que dans la colonne d'eau. D'un point de vue écotoxicologique, l'exposition des diatomées aux NPCs pourraient conduire à un transfert des NPCs le long de la chaîne trophique qui se retrouveront alors de plus en plus concentrées à chaque niveau trophique supérieur par bioamplification. Ce phénomène pourrait avoir *in fine* des conséquences pour la santé humaine lors de la consommation d'organismes aquatiques d'eau douce. Ces travaux de thèse s'étant focalisés sur une espèce de diatomées résistante aux pollutions organiques, il est possible d'envisager une sélection des organismes les plus résistants lors d'une exposition aux NPCs, ce qui pourrait à terme manifesterment modifier le fonctionnement de l'écosystème.

Les grands impacts concernant le fonctionnement des écosystèmes et les services écosystémiques associés découlent de 3 phénomènes : (i) la modulation d'allocation énergétique modifiant la production primaire, (ii) l'accumulation dans le biofilm qui peut affecter la santé de tous les organismes de la chaîne trophique, et enfin (iii) la modification des communautés par la sélection des organismes les plus résistants.

### 1.3 Ombrage et contact direct FLG

Les MWCNTs, même à fortes concentrations, n'induisent pas d'effet significatif sur la croissance des diatomées lorsque celles-ci ne sont pas en contact avec les cellules (Verneuil et al., 2014), contrairement au FLG (Chapitre 3). Cette inhibition de croissance persiste jusqu'à

la fin de l'expérience tandis qu'en contact direct la surproduction d'exoprotéines permet de limiter la toxicité du FLG et de retrouver un taux de croissance similaire aux cultures témoins (Garacci et al., 2017).

L'évaluation de la réponse moléculaire a permis de mieux cerner les effets de l'ombrage, lié au FLG, sur les diatomées. L'impact de l'ombrage du FLG sur la croissance des cultures est expliqué par l'analyse de la réponse transcriptomique suggérant une répression globale du métabolisme énergétique. Les gènes codant pour des protéines impliquées dans le cycle du glyoxylate, la glycolyse et l'oxydation des acides gras se trouvent alors réprimés. Les réponses transcriptomiques générées lors d'une exposition au contact direct ou à l'ombrage du FLG révèlent un faible nombre de DEGs communs (14 DEGs représentant moins de 1% des DEGs exprimés dans la condition de contact direct et environ 60% pour la condition d'ombrage) correspondant en grande partie à la modification du métabolisme énergétique induit dans les deux conditions. Parmi ces DEGs communs, un seul est régulé de la même manière correspond à la répression d'une protéine impliquée dans la diminution du stress oxydatif. En effet, l'accès à la lumière étant limitée, la diminution de la photosynthèse est alors accompagné d'une diminution de la gestion des espèces réactives de l'oxygène (Ahmad et al., 2008).

Une diminution des protéines de la matrice extracellulaire est observée dans la condition d'ombrage par rapport au contrôle, contrairement au contact direct, suggérant qu'avant 48h d'ombrage les cellules investissent moins d'énergie dans la formation d'une matrice extracellulaire. Cependant, 20 exoprotéines sont retrouvées différemment produites dans les deux conditions, dont 15 sont régulées de la même manière. La faible réponse extracellulaire commune entre ces deux types d'exposition concerne l'excrétion de protéines cataboliques, suggérant l'utilisation des composés extracellulaires notamment des carbohydrates comme source de carbone. Ce phénomène, observé sur des biofilms bactériens en carence nutritive (Zhang and Bishop, 2003), entraîne une déstructuration de la matrice extracellulaire à l'origine du détachement du biofilm. Bien que ce phénomène n'ait pas fait l'objet d'un suivi particulier dans ces travaux de thèse, il est possible d'imaginer que le biofilm de *N. palea* en condition d'ombrage est sur le point de se détacher du support, afin de coloniser un nouveau milieu plus propice au développement cellulaire. Dans cette condition expérimentale, l'accès à la lumière, connu pour influencer le déplacement des diatomées (McLachlan et al., 2009), constitue probablement le signal de cette réponse. Bien que ce facteur limitant soit également présent lorsque les diatomées sont en contact direct avec le

FLG, les diatomées génèrent des réponses différentes (Tableau 6). La surproduction de protéines extracellulaires est efficace contre la réduction de l'accès à la lumière uniquement lorsque les nanoparticules entrent en interaction avec les cellules. L'ombrage subi par les diatomées lors du contact direct est de courte durée car le collage des NPCs dans la matrice extracellulaire est rapidement mis en place, y compris grâce à la matrice extracellulaire déjà en place au moment de la contamination. Cette absence de contact dans la condition d'ombrage empêche les diatomées d'épurer la colonne d'eau et donc de retrouver des conditions favorables au développement cellulaire.

Tableau 6. Synthèse des impacts observés et suggérés sur la diatomée *N. palea* lors de l'exposition aux différentes formes de nanoparticules de carbone pour chaque dose et type d'exposition testés. Les effets observés sur les diatomées exposées aux DWCNTs et au FLG sont indiqués à l'aide d'un cercle ou d'un rectangle, respectivement. Lorsqu'un impact est observé ou activé, la forme géométrique correspondante est jaune, bleue dans le cas contraire ou grise pour indiquer une modulation. L'absence de forme géométrique indique qu'aucun effet significatif n'a été observé.

Approche	Impacts	Faible dose	Forte dose	Ombrage FLG
Culture	Inhibition de croissance			
Culture	Altération de l'activité photosynthétique			
Transcriptomique	Biosynthèse de pigments chlorophylliens			
Transcriptomique	Stress oxydatif			
Transcriptomique	Altération de la membrane			
Exoprotéomique				
Culture				
Culture	Altération de la viabilité			
Transcriptomique	Modification du mécanisme de transcription			
Transcriptomique	Modification post-traductionnelles			
Exoprotéomique				
Transcriptomique	Métabolisme des sucres			
Transcriptomique	Métabolisme des acides gras			
Transcriptomique	Métabolisme du glyoxylate			
Exoprotéomique	Catabolisme des molécules organiques			
Transcriptomique	Activité des transporteurs de xénobiotiques			
Transcriptomique	Voie du shikimate			
Exoprotéomique	Biosynthèse des acides aminés aromatiques			
Transcriptomique	Réponse adhésive			
Exoprotéomique				
Culture				
Culture	Récupération de croissance			

- 2 Limites et perspectives vers une généralisation des effets des NPCs à l'échelle de l'écosystème
- 2.1 Utilisation des outils « omiques » sur les diatomées : prudence et efforts à conduire

De manière générale, les diatomées, qu'elles soient d'eau douce ou marines, ne font pas parties des organismes les plus étudiés à l'heure actuelle, en particulier en écotoxicologie. Bien que ces organismes soient connus depuis plusieurs siècles, un certain manque de connaissance concernant leur physiologie persiste encore. Depuis quelques années une équipe de recherche se concentre sur l'évolution des diatomées marines grâce à l'utilisation d'outils génétiques (séquençage du génome de *Thalassiosira pseudonana* et *Phaeodactylum tricornutum*) (Armbrust et al., 2004; Bowler et al., 2008). Ces travaux ont permis d'établir une première série de données servant ainsi de référence pour les études suivantes, notamment lors de l'évaluation de la réponse transcriptomique d'autres espèces de diatomées. Cependant de nombreuses informations, comme la localisation de certaines protéines et leur mode d'activation, restent encore à clarifier (Heydarizadeh et al., 2014). Dans les jeux de données présentés dans le présent manuscrit, le manque de développement des études génétiques sur les diatomées a alors conduit à des proportions importantes de gènes et de protéines non annotés car leur séquence ne correspondait à aucune de celles qui sont référencées dans la base de données. De ce fait, des DEGs fortement réprimés ou au contraire induits, ne présentant pas d'annotations, ne sont pas pris en compte dans l'analyse fonctionnelle permettant de déterminer les processus biologiques impliqués dans la réponse de *N. palea* face aux NPCs, et idem pour les exoprotéines. Ce défaut d'annotation induit alors un doute sur les interprétations émises à partir de ces données, qui sont incomplètes. L'acquisition de nouvelles données génétiques et transcriptomiques sur différentes espèces de diatomées à la fois d'eau douce et marines résoudra progressivement le problème des gènes et transcrit non identifiés. Cependant, pour déterminer la fonction des protéines codées par ces gènes ou transcrits des études de biochimies structurales classique sont à mettre en œuvre et cela protéine par protéine.

Néanmoins, une analyse par RT-qPCR permettrait de confirmer et de généraliser l'ensemble des résultats obtenus par l'approche transcriptomique. Les gènes fortement impliqués dans la réponse à l'exposition aux NPCs pourraient ainsi être utilisés comme biomarqueurs grâce à ces analyses rapides et peu coûteuses, comparées au RNAseq. La mise au point de tels



marqueurs permettrait alors de détecter la présence de NPCs dans un milieu naturel. Un suivi de la contamination environnementale par différents types de nanoparticules, comme les nanoparticules d'oxyde métallique (dioxyde de titane ou oxyde de cérium) ou encore des nanoparticules naturelles (l'argile ou la silice), pourrait également être évaluée grâce à l'utilisation de ces biomarqueurs si et seulement si la réponse de *N. palea* à ces différentes nanoparticules s'avère être spécifique.

Par ailleurs, la réponse moléculaire de *N. palea* obtenue lors d'une exposition au contact direct et à l'ombrage du FLG suggère des stress très différents. Sachant que les diatomées ont la capacité d'induire un collage des NPCs seulement quelques heures après le début de l'exposition, il est alors possible d'imaginer que, durant cette courte période, les diatomées exposées à ces deux conditions subissent un stress similaire. Ce postulat pourrait être éclairci grâce à une évaluation de la réponse transcriptomique de diatomées exposées à ces deux conditions dans les premières heures d'exposition.

Lors de l'étude de la réponse transcriptomique de *N. palea* exposées aux NPCs, l'annotation des DEGs a fait référence en grande partie aux bactéries. Ces observations peuvent faire penser en premier lieu à une contamination bactérienne des cultures de diatomées maintenues en laboratoire par nos soins, mais en y regardant de plus près cette constatation avait déjà été faite à plusieurs reprises dans la littérature. En plus d'un manque d'informations sur les diatomées dans les banques de données, Bowler et son équipe (2008) rapportent l'existence d'un transfert génétique horizontal entre les bactéries et les diatomées expliquant ainsi l'existence d'homologie entre ces microorganismes, appartenant à des règnes différents.

L'évaluation de la réponse protéique extracellulaire est encore plus délicate. En effet, en plus d'un nombre important de séquences non annotés et non identifiés, comme c'est le cas pour les séquences nucléotidiques, les annotations des protéines extraites font souvent appel à des mécanismes renseignés comme intracellulaires. Cette observation peut être expliquée par deux hypothèses :

- La première hypothèse est qu'une partie des cellules ont été lysées entraînant la libération du contenu intracellulaire dans le milieu expérimental, alors analysé en plus du contenu réellement excrété. Ce qui voudrait dire que toutes les protéines à fonction intracellulaire devraient être retirées de l'analyse laissant alors très peu d'exoprotéines à analyser.

- La deuxième hypothèse serait que les protéines séquencées lors de cette analyse auraient à la fois une fonction intracellulaire et extracellulaire. De ce fait, l'analyse fonctionnelle des protéines de la matrice extracellulaire font ainsi référence à des fonctions intracellulaires. Cette constatation est également liée au manque de données sur les protéines de la matrice extracellulaire disponibles dans les bases de données. Bien qu'elles fassent l'objet de plus en plus d'études, ces protéines extracellulaires restent peu connues.

Ces deux hypothèses peuvent expliquer les résultats obtenus par l'analyse protéomique de la matrice extracellulaire des diatomées exposées aux NPCs. Bien que les vérifications de lyse cellulaire, basées sur la détection de chlorophylle dans le milieu expérimental, n'indiquent pas de libération significative du contenu intracellulaire, les interprétations doivent tout de même être considérées avec prudence. De plus, même si une méthode d'extraction parfaite, c'est-à-dire où aucune lyse cellulaire n'est détectée par plusieurs techniques de mesure plus fines que celle utilisée dans ces travaux, est développée, le doute persisterait quant à l'absence de protéines intracellulaires dans les extraits obtenus après une exposition aux NPCs. En effet, les NPCs et tout particulièrement le FLG, induisent une mortalité significative des cultures après 48h d'exposition. Une autre solution serait de réaliser une analyse non-destructive. Une autre technique de caractérisation du biofilm comme la spectrométrie d'absorption infrarouge, permettant d'accéder aux différents composés organiques ou inorganiques présents dans les biofilms, pourrait être envisagée (Hui et al., 2010).

De manière générale, des efforts restent à produire sur le développement des études omiques sur les diatomées. Au-delà de la comparaison de deux formes allotropiques du carbone, ces travaux de thèse constituent une première exploration de la réponse moléculaire de diatomées d'eau douce face à des nanoparticules carbonées.

## 2.2 Représentativité des conditions environnementales

Les essais écotoxicologiques monospécifiques réalisées sur des microorganismes présentent des avantages incontestables quant à la mise en place des expérimentations, le contrôle des conditions d'exposition et donc l'interprétation des effets des contaminants observés sur l'espèce étudiée. Les expérimentations réalisées dans ces travaux de thèse se sont focalisées sur une seule espèce de diatomées en condition axénique. Cependant, les diatomées, constituant les biofilms phototrophes, en milieux naturels sont accompagnées de différentes espèces de

bactéries, algues vertes, et champignons. Plusieurs types d'interactions interspécifiques peuvent alors avoir lieu au sein de ces biofilms (Little et al., 2008) influençant potentiellement le comportement de chacune des espèces lors d'une exposition à un contaminant. La présence d'autres espèces dans les essais écotoxicologiques peut donc modifier la réponse des diatomées face aux NPCs. Bien que le choix du modèle biologique se soit porté une espèce clé dans le fonctionnement de l'écosystème, la généralisation des effets des NPCs sur les biofilms phototrophes et les organismes supérieurs reste cependant difficile.

Dans le but de généraliser les effets des NPCs aux écosystèmes aquatiques, plusieurs mises au point peuvent être effectuées sur les expérimentations en laboratoire. Des essais sur des biofilms mixtes, plus proche des conditions environnementales, pourraient être envisagés afin de pouvoir anticiper les impacts des NPCs sur les biofilms naturels. Mettre en parallèle ces essais avec des essais monospécifiques sur chacun des composants cellulaires de ce biofilm permettrait de déterminer l'influence des interactions interspécifiques sur la toxicité des NPCs. Si on ajoute à cela un fractionnement de la composition de ce biofilm entre des espèces sensibles et d'autres résistantes, il sera alors possible de confirmer l'impact des NPCs sur la sélection des espèces résistantes.

Le rejet des NPCs dans l'environnement aquatique pourrait intervenir à toutes les étapes du cycle de vie des nanocomposites et donc à n'importe quel moment de l'année. L'évaluation des impacts des NPCs sur les biofilms pourrait donc être envisagée à différents stades de maturation du biofilm : du premier stade de colonisation du milieu lors de l'établissement d'un biofilm, afin de déterminer la capacité des organismes à coloniser un milieu déjà contaminé, jusqu'au biofilm mature. Par ailleurs, en mettant en œuvre cette étude sur de longues périodes (plusieurs semaines), il serait alors possible d'observer la capacité des microorganismes à changer de mode vie. En effet, certaines bactéries vivant en biofilm ont la capacité, sous l'effet d'une exposition aux CNTs de favoriser le mode de vie pélagique, évitant ainsi le contact avec les CNTs (El-temsah et al., 2017).

Les conditions expérimentales mises en œuvre dans les évaluations présentées dans ce manuscrit ont cherché à simuler le mouvement de la colonne d'eau, que l'on peut retrouver en milieux lotiques naturels, en plaçant les dispositifs expérimentaux sur un plateau rotatif. Cependant, le renouvellement constant en ressources nutritives par écoulement de la colonne d'eau, se produisant dans les conditions environnementales, n'a pas été reproduit en laboratoire. Néanmoins, il est possible que cette dissemblance n'affecte ni la croissance, ni la réponse des diatomées face aux NPCs. En effet, les diatomées présentent une très bonne

aptitude à proliférer en conditions de laboratoire. Par ailleurs, la composition du milieu de culture utilisé dans ces études ne reflète pas celle du milieu naturel. En effet la présence de matière organique n'a pas été reconstituée ici, contrairement aux essais antérieurs réalisés sur les effets des DWCNTs sur *N. palea* (Verneuil et al., 2015). Bien que cette dernière favorise la croissance des cultures de diatomées et modifie l'état de dispersion des CNTs, nous avons préféré ne pas l'ajouter dans nos expérimentations. Ce choix s'est basé sur le fait que cette matière organique présente de nombreux composants moléculaires, et potentiellement des protéines, interférant avec les analyses mises en œuvre pour déterminer la réponse moléculaire des diatomées, notamment lors de l'étude de la matrice extracellulaire. Ces interférences peuvent engendrer des erreurs dans l'interprétation des effets des NPCs sur le biofilm de diatomées.

Par ailleurs, les milieux aquatiques contiennent de nombreux types de polluants en faible concentration formant ainsi des cocktails de polluants différents, en fonction des conditions environnementales et des localisations géographiques. La présence de ces cocktails de polluants peut influencer à la fois l'état physiologique des diatomées avant l'exposition aux NPCs, mais également les caractéristiques physico-chimiques des NPCs, et leur potentiel de sorption d'autres contaminants comme les HAPs, et donc leur toxicité. En effet, la présence de micropolluants peut entraîner des effets synergiques ou au contraire antagonistes, modulant ainsi la toxicité des nanoparticules (Deng et al., 2017). Dans nos expérimentations, cet aspect a donc été écarté pour isoler les effets propres aux NPCs, et s'affranchir des interactions avec d'autres contaminants. Cependant, la représentativité du milieu naturel serait d'autant plus optimale en utilisant un milieu d'incubation représentatif d'un cours d'eau contenant à la fois des micropolluants, mais aussi de la matière organique. Cette modification permettrait de déterminer les conséquences à la fois sur les propriétés physiques et chimiques des NPCs mais également sur leur niveau de toxicité sur les biofilms.

Le dernier point important abordé quant à la représentativité des conditions environnementales concerne les concentrations en NPCs testées. Des concentrations plus faibles en NPCs pourraient également être testées afin de se rapprocher des concentrations environnementales estimées à l'heure actuelle (Sun et al., 2014). La plus faible concentration évaluée dans ces travaux est de  $0,1 \text{ mg.L}^{-1}$ , ce qui représente une concentration élevée par rapport aux estimations des concentrations que l'on pourrait retrouver dans les milieux aquatiques, de l'ordre du  $\text{ng.L}^{-1}$ . Les fortes concentrations ( $50 \text{ mg.L}^{-1}$  pour FLG et  $10 \text{ mg.L}^{-1}$  pour DWCNT) testées se justifient par la possibilité d'occurrence de déversements accidentels

entraînant le rejet de quantités massives des nanoparticules de carbone, comme ça été souvent le cas pour les nanoparticules de dioxyde de titane (Haut Conseil de la Santé Publique, 2018). Par ailleurs, l'un des objectifs de ces études était de déterminer les mécanismes de toxicité des NPCs, les concentrations étudiées ont dû être suffisamment élevées pour pouvoir mesurer et analyser ces mécanismes.

Les résultats des études sur la réponse transcriptomique de *N. palea* exposées au FLG et aux DWCNTs soulèvent plusieurs questions. La première concerne l'interaction physique entre les DWCNTs et les diatomées. Afin de confirmer l'hypothèse d'internalisation des DWCNTs faiblement concentrés, une étude centrée sur l'interaction physique de ces NPCs avec des auxospores ou des cellules en division pourrait être mise en œuvre grâce à une synchronisation du cycle cellulaire des diatomées (Armbrust and Chisholm, 1990; Godhe et al., 2014; Kinrade et al., 2002) avant une exposition aux NPCs. Une deuxième hypothèse énoncée plus haut suggère la biodégradation des CNTs par l'excrétion d'enzymes, notamment des peroxydases, qui pourrait alors être vérifiée par des méthodes de quantification extracellulaire d'activité enzymatique au cours de l'exposition à de fortes concentrations en DWCNTs. La production de CNTs marqués au  $^{13}\text{C}$  ou au  $^{14}\text{C}$  pourrait également être utilisée afin de mettre en évidence la génération d'intermédiaires réactionnelles par l'action des enzymes excrétées par les diatomées.

La généralisation des effets des NPCs à l'écosystème nécessite également de se placer à une échelle similaire lors des expérimentations en laboratoire, notamment en utilisant des mésocosmes (Bour et al., 2015; Lagier, 2017). Ainsi, des essais de longue durée sur un milieu environnemental complexe sont encouragés. De cette manière, chacun des compartiments des milieux aquatiques dulçaquicoles pourrait y être représenté, des brouteurs jusqu'au prédateurs, en mimant des conditions environnementales (écoulement de l'eau, température, luminosité...). Le suivi des paramètres propres à chacun des modèles biologiques étudiés (croissance, reproduction, activité photosynthétique, prédation...) permettrait ainsi de déterminer l'effet des NPCs sur chacun des organismes dans un système complexe mais également d'évaluer l'impact global des NPCs sur le fonctionnement de l'écosystème et les services écosystémiques rendus. La clé d'une généralisation des effets des NPCs à un système naturel passe donc par une approche multistress, représentative des facteurs de stress environnementaux à la fois biotiques et abiotiques.

## Références bibliographiques

- Ahmad, P., Sarwat, M., Sharma, S., 2008. Reactive oxygen species, antioxidants and signaling in plants. *J. Plant Biol.* 51, 167–173. <https://doi.org/10.1007/BF03030694>
- Akhavan, O., Ghaderi, E., 2010. Toxicity of Graphene and Graphene Oxide Nanowalls Against Bacteria. *ACS Nano* 4, 5731–5736. <https://doi.org/10.1021/nn101390x>
- Allen, B.L., Kichambare, P.D., Gou, P., Vlasova II, Kapralov, A. a., Konduru, N., Kagan, V.E., Star, A., Vlasova, I.I., Kapralov, A. a., Konduru, N., Kagan, V.E., Star, A., Vlasova, Kapralov, A. a., Konduru, N., Kagan, V.E., Star, A., 2008. Biodegradation of single-walled carbon nanotubes through enzymatic catalysis. *Nano Lett.* 8, 3899–3903. <https://doi.org/10.1021/nl802315h>
- Andrade, L.R., Leal, R.N., Nosedá, M., Duarte, M.E.R., Pereira, M.S., Mourão, P.A.S., Farina, M., Amado Filho, G.M., 2010. Brown algae overproduce cell wall polysaccharides as a protection mechanism against the heavy metal toxicity. *Mar. Pollut. Bull.* 60, 1482–1488. <https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2010.05.004>
- Armbrust, E.V., Berges, J.A., Bowler, C., Green, B.R., Martinez, D., Putnam, N.H., Zhou, S., Allen, A.E., Apt, K.E., Bechner, M., Brzezinski, M.A., Chaal, B.K., Chiovitti, A., Davis, A.K., Demarest, M.S., Detter, J.C., Glavina, T., Goodstein, D., Hadi, M.Z., Hellsten, U., Hildebrand, M., Jenkins, B.D., Jurka, J., Kapitonov, V. V., Kröger, N., Lau, W.W.Y., Lane, T.W., Larimer, F.W., Lippmeier, J.C., Lucas, S., Medina, M., Montsant, A., Obornik, M., Parker, M.S., Palenik, B., Pazour, G.J., Richardson, P.M., Rynearson, T.A., Saito, M.A., Schwartz, D.C., Thamatrakoln, K., Valentin, K., Vardi, A., Wilkerson, F.P., Rokhsar, D.S., 2004. The Genome of the Diatom *Thalassiosira Pseudonana*: Ecology, Evolution, and Metabolism. *Science* (80- ). 306, 79–86.
- Armbrust, E.V., Chisholm, S.W., 1990. Role of light and the cell cycle on the induction of spermatogenesis in a centric diatom. *J. Phycol.* 26, 470–478. <https://doi.org/10.1111/j.0022-3646.1990.00470.x>
- Bour, A., Mouchet, F., Silvestre, J., Gauthier, L., Pinelli, E., 2015. Environmentally relevant approaches to assess nanoparticles ecotoxicity: A review. *J. Hazard. Mater.* 283, 764–777. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2014.10.021>
- Bowler, C., Allen, A.E., Badger, J.H., Grimwood, J., Jabbari, K., Kuo, A., Maheswari, U., Martens, C., Maumus, F., Otillar, R.P., Rayko, E., Salamov, A., Vandepoele, K., Beszteri, B., Gruber, A., Heijde, M., Katinka, M., Mock, T., Berges, J.A., Brownlee, C., Cadoret, J., Chiovitti, A., Valentin, K., Choi, C.J., Coesel, S., Martino, A. De, Detter, J.C., Durkin, C., Falciatore, A., Lopez, P.J., Lucas, S., Lindquist, E., Lommer, M., Napoli, C., Obornik, M., Parker, M.S., Petit, J., Porcel, B.M., 2008. The *Phaeodactylum* genome reveals the evolutionary history of diatom genomes. *Nature* 456, 239–244. <https://doi.org/10.1038/nature07410>
- Chen, W., Duan, L., Zhu, D., Chen, W.E.I., Duan, L.I.N., 2007. Adsorption of Polar and Nonpolar Organic Chemicals to Carbon Nanotubes Adsorption of Polar and Nonpolar Organic Chemicals to Carbon Nanotubes. *Environ. Sci. Technol.* 41, 8295–8300. <https://doi.org/10.1021/es071230h>
- Davies, D.G., Davies, D.G., Parsek, M.R., Pearson, J.P., Iglewski, B.H., Costerton, J.W., Greenberg, E.P., 2014. The Involvement of Cell-to-Cell Signals in the Development of a Bacterial Biofilm The Involvement of Cell-to-Cell Signals in the Development of a Bacterial Biofilm. *Science* (80- ). 280, 295–299. <https://doi.org/10.1126/science.280.5361.295>
- Deng, R., Lin, D., Zhu, L., Majumdar, S., White, J.C., Gardea-Torresdey, J.L., Xing, B., 2017. Nanoparticle interactions with co-existing contaminants: joint toxicity, bioaccumulation and risk. *Nanotoxicology* 11, 591–612. <https://doi.org/10.1080/17435390.2017.1343404>
- Durkin, C.A., Mock, T., Armbrust, E.V., 2009. Chitin in diatoms and its association with the cell wall. *Eukaryot. Cell* 8, 1038–1050. <https://doi.org/10.1128/EC.00079-09>

- El-temsah, Y., Pinelli, E., Verneuil, L., Silvestre, J., Mouchet, F., Gauthier, L., Barret, M., 2017. Carbon nanotubes shape the bacterial communities associated with the freshwater diatom *Nitzschia linearis*, in: 1st International Conference on Microbial Ecotoxicology.
- Flemming, H., Wingender, J., 2010. The biofilm matrix. *Nature* 8, 623–633. <https://doi.org/10.1002/9783527620944.ch4>
- Freixa, A., Acuña, V., Sanchís, J., Farré, M., Barceló, D., Sabater, S., 2018. Ecotoxicological effects of carbon based nanomaterials in aquatic organisms. *Sci. Total Environ.* 619–620, 328–337. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2017.11.095>
- Garacci, M., Barret, M., Mouchet, F., Sarrieu, C., Lonchambon, P., Flahaut, E., Gauthier, L., Silvestre, J., Pinelli, E., 2017. Few Layer Graphene sticking by bio film of freshwater diatom *Nitzschia palea* as a mitigation to its ecotoxicity. *Carbon N. Y.* 113, 139–150. <https://doi.org/10.1016/j.carbon.2016.11.033>
- Godhe, A., Kremp, A., Montresor, M., 2014. Genetic and microscopic evidence for sexual reproduction in the centric diatom *Skeletonema marinoi*. *Protist* 165, 401–416. <https://doi.org/10.1016/j.protis.2014.04.006>
- Haut Conseil de la Santé Publique, 2018. Bilan des connaissances relatives aux effets des nanoparticules de dioxyde de titane (tio2) sur la sante Humaine ; caracterisation de l'exposition des populations et mesures de gestion.
- Heydarizadeh, P., Marchand, J., Chenais, B., Sabzalian, M.R., Zahedi, M., Moreau, B., Schoefs, B., 2014. Functional investigations in diatoms need more than a transcriptomic approach. *Diatom Res.* 29, 75–89. <https://doi.org/10.1080/0269249X.2014.883727>
- Hui, F., Husson, G.P., Hochet, B., Rebouté, G., Lédion, J., 2010. Caractérisation de biofilms par spectrométrie d'absorption infrarouge. *Tech. Sci. Méthodes* 7/8, 46–55. <https://doi.org/10.1051/tsm/2010070464>
- Hyung, H., Fortner, J.D., 2007. Natural Organic Matter Stabilizes Carbon Nanotubes in the Aqueous Phase 179–184.
- Kam, N.W.S., Jessop, T.C., Wender, P.A., Dai, H., 2004. Nanotube molecular transporters: Internalization of carbon nanotube-protein conjugates into mammalian cells. *J. Am. Chem. Soc.* 126, 6850–6851. <https://doi.org/10.1021/ja0486059>
- Kinrade, S.D., Gillson, A.-M.E., Knight, C.T.G., 2002. Silicon-29 NMR evidence of a transient hexavalent silicon complex in the diatom *Navicula pelliculosa*. *J. Chem. Soc. Dalton Trans.* 50, 307–309. <https://doi.org/10.1039/b105379p>
- Lagier, L., 2017. Ecotoxicité comparative de l'oxyde de graphène et d'autres nanoparticules de carbone chez des organismes aquatiques modèles : d'une évaluation en conditions monospécifiques vers l'étude d'une chaîne trophique expérimentale. Université Toulouse 3 Paul Sabatier (UT3 Paul Sabatier). <https://doi.org/10.1017/CBO9781107415324.004>
- Little, A.E.F., Robinson, C.J., Peterson, S.B., Raffa, K.F., Handelsman, J., 2008. Rules of Engagement: Interspecies Interactions that Regulate Microbial Communities. *Annu. Rev. Microbiol.* 62, 375–401. <https://doi.org/10.1146/annurev.micro.030608.101423>
- Liu, S., Wei, L., Hao, L., Fang, N., Chang, M.W., Xu, R., Yang, Y., Chen, Y., 2009. Sharper and faster “Nano darts” kill more bacteria: A study of antibacterial activity of individually dispersed pristine single-walled carbon nanotube. *ACS Nano* 3, 3891–3902. <https://doi.org/10.1021/nn901252r>
- Matorin, D.N., Karateyeva, A. V., Osipov, V.A., Lukashev, E.P., Seifullina, N.K., Rubin, A.B., 2010. Influence of carbon nanotubes on chlorophyll fluorescence parameters of green algae *Chlamydomonas reinhardtii*. *Nanotechnologies Russ.* 5, 320–327.

<https://doi.org/10.1134/S199507801005006X>

- McLachlan, D.H., Brownlee, C., Taylor, A.R., Geider, R.J., Underwood, G.J.C., 2009. Light-induced motile responses of the estuarine benthic diatoms *Navicula perminuta* and *Cylindrotheca closterium* (bacillariophyceae). *J. Phycol.* 45, 592–599. <https://doi.org/10.1111/j.1529-8817.2009.00681.x>
- Moore, R.M., Webb, M., Tokarczyk, R., 1996. Bromoperoxidase and iodoperoxidase enzymes and production of halogenated methanes in marine diatom cultures. *J. Geophys. Res.* 101, 20899–20908. <https://doi.org/10.1029/96JC01248>
- Mottier, A., Mouchet, F., Laplanche, C., Cadarsi, S., Lagier, L., Arnault, J., Girard, H.A., Leon, V., Vazquez, E., Sarrieu, C., Pinelli, E., Gauthier, L., Flahaut, E., 2016. Surface Area of Carbon Nanoparticles: A Dose Metric for a More Realistic Ecotoxicological Assessment. *Nano. Lett.* 16, 3514–3518. <https://doi.org/10.1021/acs.nanolett.6b00348>
- Moussian, B., Schwarz, H., Bartoszewski, S., Nüsslein-Volhard, C., 2005. Involvement of chitin in exoskeleton morphogenesis in *Drosophila melanogaster*. *J. Morphol.* 264, 117–130. <https://doi.org/10.1002/jmor.10324>
- O'Toole, G.A., Kolter, R., 1998. Initiation of biofilm formation in *Pseudomonas fluorescens* WCS365 proceeds via multiple, convergent signalling pathways: A genetic analysis. *Mol. Microbiol.* 28, 449–461. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2958.1998.00797.x>
- Palomäki, J., Välimäki, E., Sund, J., Vippola, M., Clausen, P.A., Jensen, K.A., Savolainen, K., Matikainen, S., Alenius, H., 2011. Long, needle-like carbon nanotubes and asbestos activate the NLRP3 inflammasome through a similar mechanism. *ACS Nano* 5, 6861–6870. <https://doi.org/10.1021/nn200595c>
- Poynton, H.C., Vulpe, C.D., 2009. Ecotoxicogenomics: emerging technologies for emerging contaminants 1. *J. Am. Water Resour. Assoc.* 45, 83–96. <https://doi.org/10.1111/j.1752-1688.2008.00291.x>
- Pretti, C., Oliva, M., Pietro, R. Di, Monni, G., Cevasco, G., Chiellini, F., Pomelli, C., Chiappe, C., 2014. Ecotoxicity of pristine graphene to marine organisms. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 101, 138–145. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2013.11.008>
- Raabe, D., Romano, P., Sachs, C., Fabritius, H., Al-Sawalmih, A., Yi, S.B., Servos, G., Hartwig, H.G., 2006. Microstructure and crystallographic texture of the chitin-protein network in the biological composite material of the exoskeleton of the lobster *Homarus americanus*. *Mater. Sci. Eng. A* 421, 143–153. <https://doi.org/10.1016/j.msea.2005.09.115>
- Rhiem, S., Riding, M.J., Baumgartner, W., Martin, F.L., Semple, K.T., Jones, K.C., Schäffer, A., Maes, H.M., 2015. Interactions of multiwalled carbon nanotubes with algal cells: Quantification of association, visualization of uptake, and measurement of alterations in the composition of cells. *Environ. Pollut.* 196, 431–439. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2014.11.011>
- Schwab, F., Bucheli, T.D., Lukhele, L.P., Magrez, A., Nowack, B., Sigg, L., Knauer, K., 2011. Are Carbon Nanotube Effects on Green Algae Caused by Shading and Agglomeration? 6136–6144. <https://doi.org/10.1021/es200506b>
- Sun, T.Y., Gottschalk, F., Hungerbühler, K., Nowack, B., 2014. Comprehensive probabilistic modelling of environmental emissions of engineered nanomaterials. *Environ. Pollut.* 185, 69–76. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2013.10.004>
- Verneuil, L., 2015. Toxicité environnementale et écotoxicité des nanotubes de carbone sur des diatomées benthiques : de la cellule au biofilm. Université de Toulouse.
- Verneuil, L., Silvestre, J., Mouchet, F., Flahaut, E., Boutonnet, J., Bourdiol, F., Bortolamiol, T., Baqué, D., Gauthier, L., Pinelli, E., 2014. Multi-walled carbon nanotubes , natural organic matter



, and the benthic diatom *Nitzschia palea* : ““ A sticky story .”” *Nanotoxicology* 9, 119–229.  
<https://doi.org/10.3109/17435390.2014.918202>

- Verneuil, L., Silvestre, J., Randrianjatovo, I., Maracato-romain, C.-E., Girbal-Neuhauser, E., Mouchet, F., Flahaut, E., Gauthier, L., Pinelli, E., 2015. Double walled carbon nanotubes promote the overproduction of extracellular protein-like polymers in *Nitzschia palea* : An adhesive response for an adaptive issue. *Carbon N. Y.* 88, 113–125. <https://doi.org/10.1016/j.carbon.2015.02.053>
- Wei, L., Thakkar, M., Chen, Y., Addo, S., Mitra, S., Zhang, X., 2010. Cytotoxicity effects of water dispersible oxidized multiwalled carbon nanotubes on marine alga , *Dunaliella tertiolecta*. *Aquat. Toxicol.* 100, 194–201. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2010.07.001>
- Wuertz, S., Pfeleiderer, P., Kriebitzsch, K., Späth, R., Griebe, T., Coello-Oviedo, D., Wilderer, P.A., Flemming, H.C., 1998. Extracellular redox activity in activated sludge. *Water Sci. Technol.* 37, 379–384. [https://doi.org/10.1016/S0273-1223\(98\)00134-6](https://doi.org/10.1016/S0273-1223(98)00134-6)
- Zhang, L., Lei, C., Chen, J., Yang, K., Zhu, L., Lin, D., 2015. Effect of natural and synthetic surface coatings on the toxicity of multiwalled carbon nanotubes toward green algae. *Carbon N. Y.* 83, 198–207. <https://doi.org/10.1016/j.carbon.2014.11.050>
- Zhang, X., Bishop, P.L., 2003. Biodegradability of biofilm extracellular polymeric substances. *Chemosphere* 50, 63–69. [https://doi.org/10.1016/S0045-6535\(02\)00319-3](https://doi.org/10.1016/S0045-6535(02)00319-3)
- Zhao, J., Wang, Z., White, J.C., Xing, B., 2014. Graphene in the aquatic environment: Adsorption, dispersion, toxicity and transformation. *Environ. Sci. Technol.* 48, 9995–10009.  
<https://doi.org/10.1021/es5022679>

## Liste des figures

Figure 1. Représentation schématique de l'échelle nanométrique.....	18
Figure 2. Relation entre la surface d'une particule et son volume.....	20
Figure 3. Représentation schématique de huit allotropes du carbone classés selon la capacité d'hybridation des atomes de carbone.....	22
Figure 4. Structure des différentes formes de la famille du graphène.....	24
Figure 5. Représentation schématique des différentes hélicités possibles des CNTs.....	30
Figure 6. Processus de transport des polluants jusqu'au cours d'eau.....	45
Figure 7. La matrice du biofilm : composition cellulaire et moléculaire.....	51
Figure 8. Importance des biofilms benthiques dans le devenir des xénobiotiques au sein d'un système lotique et leurs interactions avec les organismes le long de la chaîne trophique.....	55
Figure 9. Présentation des différentes variétés de symétrie du frustule des Bacillariophycées.....	81
Figure 10. Structure et composition cellulaire d'une diatomée pennée avec raphé (a) en coupe frontale (b) en coupe sagittale (c) en coupe transversale. (d) Mise en évidence de la diminution de taille du frustule lors de la division cellulaire (reproduction asexuée).....	82
Figure 11. Coupe de la diatomée marine <i>Phaeodactylum tricornutum</i> photographiée au microscope électronique et colorisée.....	83
Figure 12. Cycle de vie des diatomées.....	84
Figure 13. Photographies prises en MET de FLG utilisé pendant ces travaux de thèse.....	91
Figure 14. Observation au MET de DWCNTs utilisés dans ces travaux de thèse après purification au CIRIMAT.....	92
Figure 15. Schematic representation of FLG distribution between the three compartments in wells: fraction S and S' in the water column and fraction of FLG stuck on the biofilm.....	101
Figure 16. Transmission Electronic Microscopic micrography of FLG after drying and dispersing in ethanol.....	101
Figure 17. Raman spectrum of dried FLG.....	102
Figure 18. Growth kinetic curve of <i>N. palea</i> control culture in SPE medium.....	102
Figure 19. Growth rate (r) of <i>N. palea</i> after 48h (a) and 144h (b) of FLG exposure for total effect test (grey bars) and shading effect test (black bars).....	103
Figure 20. Proportion of non-viable diatoms for total exposure test at 48h of FLG exposure.....	103
Figure 21. Photosynthetic Active Radiation measured for the total exposure test (grey bars) and the shading test (black bars) at 48h of FLG exposure.....	103
Figure 22. Photosystem II quantum yield of <i>N. palea</i> exposed to the total effect (grey bars) and to shading effect (black bars) at 48h of FLG exposure.....	104
Figure 23. Examples of collected images of stereo microscopy of full wells containing FLG <sub>50mg</sub> without <i>N. palea</i> culture in large view (a) and in magnified view (b), and with <i>N. palea</i> culture in large view (c) and in magnified view (d) after 144h of exposure.....	104
Figure 24. Scanning electron microscopy images of <i>N. palea</i> at 48h of growth in control culture (a) and in culture exposed to FLG <sub>50mg</sub> (b-d).....	105
Figure 25. Examples of pictures analyzed with "Image J" showing FLG at the bottom of wells after 6h (a) and 144h (b) of FLG <sub>50mg</sub> exposure. FLG distribution derived from the OD <sub>800</sub> measures between the different fractions: fraction S (measured, white bars), fraction S'(measured, grey bars) and FLG stuck on the algal biofilm (estimated, black bars) in the absence (-D) of diatoms at the beginning (0h)(theoretical value), 6, 24, 48 and 144h of FLG <sub>50mg</sub>	

exposure (c). FLG <sub>50mg</sub> percentage covering at the bottom of wells derived from image analysis is represented by white dots (c).....	105
Figure 26. Résultats des extractions d'ARN pour chacune des méthodes de lyse testées.....	115
Figure 27. Microgel réalisés sur puce Agilent des ARN extraits dans chacun des conditions de lyse cellulaire suivie (a) du protocole du kit QIAGEN ou (b) de la méthode au phénol chloroforme. ....	117
Figure 28. Résultats des extraction d'ARN réalisées en absence et en présence de NPCs à 50 mg.L <sup>-1</sup> .....	118
Figure 29. Influence d'un traitement thermique lors de l'extraction d'ARN en présence de NPCs sur la quantité d'ARN extrait (a), la pureté estimée au Nanodrop (b) et l'intégrité des ARNs (c et d).....	120
Figure 30. Intégrité des ARNs extraits en absence (Non chauffé) ou en présence de FLG à 50 mg.L <sup>-1</sup> (FLG50) et de DWCNT à 10 mg.L <sup>-1</sup> (DWCNT10) après avoir appliqué un traitement thermique à 56°C, 70°C ou 95°C. ....	121
Figure 31. Résultats des extractions d'ARN en absence (Témoin) et en présence de CNT à 10mg.L (CNT10) concernant (a) la quantité en ARN et (b) la pureté des extraits. ....	123
Figure 32. Représentation schématique des étapes suivies pour le traitement bio-informatiques des données générées par le séquençage ARN.....	126
Figure 33. Transmission Electronic Microscopy of dried FLG. ....	136
Figure 34. Description of the differential expressed genes in the different conditions.....	140
Figure 35. Biological processes involved and regulation of gene expression in the three different conditions.. ....	143
Figure 36. Scanning electron microscopy images of <i>N. palea</i> at 48 h of growth in control culture (a) and in culture exposed to FLG <sub>50mg</sub> (b-f).. ....	146
Figure 37. Chlorophyll a biosynthetic pathway in <i>N. palea</i> derived from Stenbaek and Jensen (2010).. ....	150
Figure 38. Hypothesized energetic metabolic pathways in <i>N. palea</i> .. ....	154
Figure 39. (a) Transmission Electronic Microscopy photography of dried DWCNTs, (b) Magnified view of (a), (c) Raman spectra of DWCNTs. ....	173
Figure 40. Differential expressed genes at low and high DWCNTs concentration. (a) Number of up-and down-regulated DEGs. (b) Heat map showing the Log2FC values of DEGs. (c) Percentage of Gene Ontology annotation among the DEGs. ....	179
Figure 41. Biological processes involved in high CNT concentration exposure and expression pattern of DEGs contributing to these BP.....	183
Figure 42. Representation of energetic metabolic pathways involved in <i>N. palea</i> exposed to CNTs.. ....	194
Figure 43. Comparaison de deux méthodes de mesure de lyse cellulaire.....	208
Figure 44. Comparaison de six protocoles d'extraction des EPS d'un biofilm de diatomée. .	211
Figure 45. Estimation de la lyse cellulaire après 1h d'incubation en présence de CER (50mgCER.10mgMS) ou d'EDTA (2%). ....	212
Figure 46. Résultats de quatre protocoles d'extraction d'EPS. (a) Quantité de protéines extraites et (b) estimation de la lyse cellulaire pour chacun des étapes d'extraction. ....	212
Figure 47. Protocole d'extraction d'EPS d'un biofilm de diatomée benthique .....	216
Figure 48. Schematic representation of the sequential extraction methods of extracellular proteins.....	227

Figure 49. Results of quantitative analysis of proteins and carbohydrates contents in hydrophobic-like EPS samples at 48h (a) and 168h (b) of carbon nanoparticles exposure in each exposure condition. ....	229
Figure 50. Relative abundance of the top 100 proteins detected in the <i>N. palea</i> biofilm assigned to the biological processes.....	230
Figure 51. Proportion of the differentially overexcreted and underexcreted proteins in the total amount of DEPs for each exposure condition.....	231
Figure 52. Venn diagrams of the proteins differentially expressed between in each exposure condition.....	232
Figure 53. Biological processes and relative abundance of DEPs on the total amount in each exposure condition. ....	233
Figure 54. Heat maps of extracellular DEPs involved in several biological process related to adhesive response in each carbon nanoparticles conditions.....	235
Figure 55. Heat map of DEPs involved in several protein metabolic process in each carbon nanoparticles conditions.....	236
Figure 56. Heat maps showing the Log2FC values of DEPs with catabolic activity and DEPs involved in oxidative response in each condition. ....	237
Figure 57. Heat maps of DEPs involved in several inhibited pathways in the different carbon nanoparticles exposures.....	238

### Liste des tableaux

Tableau 1. Produits et impuretés éventuelles générées à partir de différents précédés de production du graphène et des CNTs .....	34
Tableau 2. Récapitulatif et comparaison des propriétés caractérisant un graphène monofeuillet et un nanotube de carbone simple paroi.....	36
Tableau 3. Etat de l’art de l’écotoxicité de différentes formes allotropiques du carbone.....	62
Table 4. Characteristics of the ‘top ten’ up and down-regulated transcripts. This classification was performed on the transcripts expression level in all conditions taken together.....	138
Tableau 5. Présentation des différentes méthodes de quantification des protéines.....	214
Tableau 6. Synthèse des impacts observés et suggérés sur la diatomée <i>N. palea</i> lors de l’exposition aux différentes formes de nanoparticules de carbone pour chaque dose et type d’exposition testés.....	266

Table 1. Quantity of the different elements measured by ICP-OES analysis in the medium culture in the absence and in the presence of FLG <sub>50mg</sub> ND=not detected.....	102
Table 2. Functional description and Gene Ontology annotation for the ten most up-and down-regulated genes.....	177
Table 3. Participation to biological processes of the DEGs involved in low DWCNT concentration exposure and their expression level in each exposure condition.....	181

# Annexes

# Annexe 1

## Composition des milieux de culture CHU n°10 et SPE-1,5

	Composition	CAS N°	Concentration (mg.L <sup>-1</sup> )	
			CHU10	SPE1,5
<i>Eléments majeurs</i>	NaSiO <sub>3</sub> 5H <sub>2</sub> O (212,14)	10213-79-3	60	90
	Ca(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> 4H <sub>2</sub> O (236,15)	13477-34-4	60	
	MgSO <sub>4</sub> 7H <sub>2</sub> O (246,48)	10034-99-8	25	
	Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub> (105,99)	497-19-8	20	
	K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> (174,18)	7758-11-045	10	
	H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub> (61,83)	10043-35-3	2,86	
	Fe-EDTA	préparé au laboratoire	5	-
<i>Oligo éléments</i>	MnSO H <sub>2</sub> O (169,01)	1004-96-5	1,5	-
	MnCl <sub>2</sub> 4H <sub>2</sub> O (197,844)	13446-34-9	-	0,18
	Na <sub>2</sub> EDTA 2H <sub>2</sub> O (372,2)	6381-92-6	-	4,36
	FeCl <sub>3</sub> 6H <sub>2</sub> O		-	1,5
	CuSO <sub>4</sub> 5H <sub>2</sub> O (249,612)	7758-99-8	0,8	0,0001
	ZnSO <sub>4</sub> 7H <sub>2</sub> O (287,54)	7446-20-0	0,25	0,02
	Co(NO) 6H <sub>2</sub> O (291,03)	10026-22-9	0,05	-
	CoCl <sub>2</sub> 6H <sub>2</sub> O (237,839)	7791-13-1	-	0,01
	H <sub>2</sub> SeO <sub>3</sub>	7783-00-8	-	0,0016
	NaVO <sub>3</sub> (121,93)	13718-26-8	-	0,0012
	Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> 2H <sub>2</sub> O (241,92)	10102-40-6	0,025	0,02
<i>Vitamines</i>	Thiamine HCl : C <sub>12</sub> H <sub>17</sub> ClN <sub>4</sub> OS,HCl	67-03-8	0,01	
	Vitamine B12 : C <sub>63</sub> H <sub>88</sub> CoN <sub>14</sub> O <sub>14</sub> P	68-19-9	0,005	
	Biotine (B7) : C <sub>10</sub> H <sub>16</sub> N <sub>2</sub> SO <sub>3</sub>	58-85-5	0,00055	

## Annexe 2

### Synthèse bibliographique des méthodes d'extraction des EPS

Méthode	Protocole	Organismes	Taux d'extraction	Evaluation de la lyse	Auteurs	
Physique	GTA, Ultrasons	Biofilm	19,7-69,4mg.g biofilm	Dosage ATP : 0-30µg.g biofilm	(Azeredo et al., 2003)	
	Ultrasons	A.denitrificans et P.fluorescens	35-128mg.g biofilm	Dosage ATP : 150µg.g biofilm	(Azeredo et al., 2003)	
		Biofilm algue-bactérie	20,39-22,3mg.g biofilm	Pas de vérification	(Pan et al., 2010)	
		Biofilm nitrifiant	94mg.g biofilm (control : 7mg.g boue)	Dosage G6P-DH: 11,2µmol.min.mL (control : 0,6µmol.min.mL)	(Liang et al., 2010)	
		Boues bactéries	150mg.g boue	Pas de vérification	(Zhang et al., 2007)	
			US court 10mg.L US long : 115mg.L	Dosage G6P-DH : cellules intactes (pas de données)	(Ras et al., 2008a)	
			97-162g.g boue	Dosage G6P-DH : 0 nmol NADH/min/g VSS	(Ras et al., 2008b)	
			79mg.g boue (control : 6mg.g boue)	Dosage G6P-DH: 8,4µmol.min.mL (control : 0,6µmol.min.mL)	(Liang et al., 2010)	
			190-250mg.g boue (control : 10-20mg.g)	Dosage G6P-DH: 10-30% (control : 0%)	(Pellicer-Nacher et al., 2013)	
			180-250mg.g boue	Pas de vérification	(Yu et al., 2008)	
			12,7g.g boue	Pas de vérification	(Dignac et al., 1998)	
	"Blender"	Boues bactéries	73-157g.g boue	Dosage G6P-DH : 0 nmol NADH/min/g VSS	(Ras et al., 2008b)	
	Physique et chimique	Ultrasons et CER	Boues bactéries	60-190mg.g boue (control: 15-80mg.g boue)	Dosage acides nucléiques : 0,018-0,194mg.g boue (control : 0,003-0,261mg.g boue)	(D'Abzac et al., 2010)
14-22,6mg.g boue				Pas de vérification	(Liu et al., 2010)	
255-266mg.g boue (control: 249-317mg.g boue)				Pas de vérification	(Comte et al., 2006)	
25mg.L				Dosage G6P-DH : cellules intactes (pas de données)	(Ras et al., 2008a)	
24,2g.g boue				Pas de vérification	(Dignac et al., 1998)	
Ultrasons et Triton X-100		Boues bactéries	120mg.L	Dosage G6P-DH : cellules intactes (pas de données)	(Ras et al., 2008a)	
Ultrasons, Tween, EDTA			US : 20-150mg.g biofilm Tween : 10-120mg.g biofilm EDTA : 40-150mg.g biofilm	Dosage G6P-DH : 0-2547 U.g biofilm soit 0-9,7% contamination	(Ras et al., 2011)	
			Ultraturax et/ou Triton X-100/CER	64-182mg.L	Dosage G6P-DH : cellules intactes (pas de données)	(Ras et al., 2008a)
(Ultrasons), Formaldéhyde/Formamide, NaoH, (Ultrasons)			Boues bactéries	36-53mg.g boue (control : 5,8mg.g boue)	Dosage de KDO (2-keto-3-deoxyoctonate) : 0,10-0,19mg.g boue (control : 0,01mg.g boue)	(Adav et al., 2008)
				15-190mg.g boue (control: 15-80mg.g boue)	Dosage acides nucléiques : 0,004-0,107 mg.g boue (control : 0,003-0,261mg.g boue)	(D'Abzac et al., 2010)
		25,8-54,6mg.g boue (control : 4,4-7,9mg.g boue)		Dosage acides nucléiques : 0,15-0,35mg.g boue (control : 0,02-0,06mg.g boue)	(Liu and Fang, 2002)	
		Biofilm algue-bactérie		13,64-17,07mg.g boue	Pas de vérification	(Pan et al., 2010)
		Boues bactéries		10,8-20,4mg.g boue (control : 4,4-7,9mg.g boue)	Dosage acides nucléiques : 0,04-0,13mg.g boue (control : 0,02-0,06mg.g boue)	(Liu and Fang, 2002)
73-107mg.g boue (control : 249-317mg.g boue)	Pas de vérification		(Comte et al., 2006)			

## Annexe 2 (suite 1/3)

Méthode	Protocole	Organismes	Taux d'extraction	Evaluation de la lyse	Auteurs	
Chimique	Incubation à 30°C en eau	Diatomée marine : Navicula jeffreyi	50pg.cellule (control : 10pg.cellule)	Observation au microscope: 98% cellules lysées (control : 25%) Dosage ATP : 25000.Million cellules (control : 2000)	(Takahashi et al., 2009)	
		Diatomée marine : Cylindrotheca closterium	1,5µg.mL (Bound EPS)	Marquage au DIBAC et comptage au microscope: 43,6% (control: 11,7%)	(Brouwer et al., 2002a)	
		Diatomées marines : Cylindrotheca closterium et Nitzschia sp.	Sucres	Pas de vérification	(Brouwer et al., 2002b)	
		Diatomées marines à l'interface eau/sédiments	5,4-16,8% (?)	Observation des cellules après coloration à l'Alcian bleu : pas d'impact visible	(Staats et al., 1999)	
	NaCl 60°C	Boues bactériennes	15-55mg.g boue	Pas de vérification	(Li and Yang, 2007)	
	Lavage en PBS, agitation, incubation à 60°C		66mg.g boue	Pas de vérification	(Wang et al., 2006)	
	Incubation à 80°C en eau MiliQ		62mg.g boue (control : 5,8mg.g boue)	Dosage de KDO (2-keto-3-deoxyoctonate) : 0,10mg.g boue (control : 0,01mg.g boue)	(Adav et al., 2008)	
			40-210mg.g boue (control: 15-80mg.g boue)	Dosage acides nucléiques : 0,006-0,339mg.g boue (control : 0,003-0,261mg.g boue)	(D'Abzac et al., 2010)	
			121mg.g boue	Pas de vérification	(Frolund et al., 1996)	
			296-378mg.g boue (control : 249-317mg.g boue)	Pas de vérification	(Comte et al., 2006)	
	Formaldéhyde et incubation à 80°C		40-310mg.g boue (control: 15-80mg.g boue)	Dosage acides nucléiques : 0,148-0,722mg.g boue (control : 0,003-0,261mg.g boue)	(D'Abzac et al., 2010)	
	Formaldéhyde/Formamide		9,2mg.g boue (control : 6mg.g boue)	Dosage G6P-DH: 1,9µmol.min.mL (control : 0,6µmol.min.mL)	(Liang et al., 2010)	
			Biofilm nitrifiant	7,2mg.g boue (control : 7mg.g boue)	Dosage G6P-DH: 0,5µmol.min.mL (control : 0,6µmol.min.mL)	(Liang et al., 2010)
			Biofilm algue-bactérie	2,57-8mg.g biofilm	Pas de vérification	(Pan et al., 2010)
			Boues bactériennes	5,9-12,3mg.g boue (control : 4,4-7,9mg.g boue)	Dosage acides nucléiques : 0,02-0,07mg.g boue (control : 0,02-0,06mg.g boue)	(Liu and Fang, 2002)
	GTA, CER et eau à 30°C		9pg.cellule (control : 10pg.cellule)	Observation au microscope: 21% cellules lysées (control : 25%)	(Takahashi et al., 2009)	
	GTA et eau à 30°C		Diatomée marine : Navicula jeffreyi	12pg.cellule (control : 10pg.cellule)	Observation au microscope: 43% cellules lysées (control : 25%)	(Takahashi et al., 2009)
	GTA et CER		8pg.cellule (control : 10pg.cellule)	Observation au microscope: 19% cellules lysées (control : 25%)	(Takahashi et al., 2009)	
			Biofilm A.denitrificans et P.fluorescens	6,3-16,4mg.g biofilm	Dosage ATP: 50µg.g	(Azeredo et al., 2003)



## Annexe 2 (suite 2/3)

Méthode	Protocole	Organismes	Taux d'extraction	Evaluation de la lyse	Auteurs
Chimique	CER	Boues bactériennes	243mg.g boue	Coloration DAPI, CTC et acridine orange (visualisation d'une diminution du nombre de cellules)	(Frolund et al., 1996)
			60-140mg.g boue (control: 15-80mg.g boue)	Dosage acides nucléiques : 0,014-0,16 mg.g boue (control : 0,003-0,261mg.g boue)	(D'Abzac et al., 2010)
			86mg.L	Dosage G6P-DH : cellules intactes (pas de données)	(Ras et al., 2008a)
			40-60mg.g boue (control : 10-20mg.g)	Dosage G6P-DH : 0-20% (control : 0%)	(Pellicer-Nacher et al., 2013)
			37-50g.g boue	Dosage enzyme G6P-DH : 0 nmol NADH/min/g VSS	(Ras et al., 2008b)
			301-322mg.g boue (control: 249-317mg.g boue)	Pas de vérification	(Comte et al., 2006)
			57,9-74mg.g boue	Pas de vérification	(Park et al., 2008)
			68mg.g boue (control : 12mg.g boue)	Pas de vérification	(Wuertz et al., 2001)
			6,2-17,6mg.g boue (control : 4,4-7,9mg.g boue)	Dosage acides nucléiques : 0,05-0,14mg.g boue (control : 0,02-0,06mg.g boue)	(Liu and Fang, 2002)
			49mg.g boue (control : 6mg.g boue)	Dosage G6P-DH: 3,1µmol.min.mL (control : 0,6µmol.min.mL)	(Liang et al., 2010)
			300-600mg.L	Pas de vérification	(Ni et al., 2009)
			191-353mg.g boue	Dosage acides nucléiques : 5,5-28mg.g boue	(Wilén et al., 2003)
			39-73mg.g boue	Dosage G6P-DH : cellules intactes (pas de données)	(McSwain et al., 2005)
		53mg.g boue	Pas de vérification	(Sesay et al., 2006)	
		Biofilm A.denitrificans et P.fluorescens	7-16,5mg.g boue	Dosage ATP : 25-350µg.g	(Azeredo et al., 2003)
		Diatomée marine : Navicula jeffreyi	15pg.cellule (control : 10pg.cellule)	Observation au microscope: 28% cellules lysées (control : 25%) Dosage ATP : 5000.Million cellules (control : 2000)	(Takahashi et al., 2009)
		Biofilm nitrifiant	43 mg.g boue (control : 7mg.g boue)	Dosage G6P-DH: 3,5µmol.min.mL (control : 0,6µmol.min.mL)	(Liang et al., 2010)

## Annexe 2 (suite 3/3)

Méthode	Protocole	Organismes	Taux d'extraction	Evaluation de la lyse	Auteurs	
Chimique	NaOH	Biofilm nitrifiant	51mg.g boue (control : 7mg.g boue)	Dosage G6P-DH: 5,7µmol.min.mL (control : 0,6µmol.min.mL)	(Liang et al., 2010)	
		Boues bactéries	64mg.g boue (control : 6mg.g boue)	Dosage G6P-DH: 4,1µmol.min.mL (control : 0,6µmol.min.mL)	(Liang et al., 2010)	
			185-210mg.g boue 96 mg.g boue	Pas de vérification Pas de vérification	(McSwain et al., 2005) (Frolund et al., 1996)	
	NaCl	Diatomée marine : Cylindrotheca closterium	1,2µg.mL (Bound EPS)	Marquage au DIBAC et comptage au microscope: 33,5% (control: 11,7%)	(Brouwer et al., 2002a)	
	Ethanol		19-50g.g boue	Dosage G6P-DH : 0 nmol NADH/min/g VSS	(Ras et al., 2008b)	
			45-200mg.g boue (control: 15-80mg.g boue)	Dosage acides nucléiques : 0,005-0,169mg.g boue (control : 0,003-0,261mg.g boue)	(D'Abzac et al., 2010)	
	EDTA		Boues bactéries	3-592g.g boue	Dosage enzyme G6P-DH : 0-10,5 nmol NADH/min/g VSS	(Ras et al., 2008b)
				6,5-22,9mg.g boue (control : 4,4-7,9mg.g boue)	Dosage acides nucléiques : 0,22-0,47mg.g boue (control : 0,02-0,06mg.g boue)	(Liu and Fang, 2002)
				21mg.g boue (control : 12mg.g boue)	Dosage G6P-DH : cellules intactes (pas de données)	(Wuertz et al., 2001)
				50mg.g boue	Dosage acides nucléiques: 15mg.g boue	(Sheng and Yu, 2006)
			73mg.g boue (control : 6mg.g boue)	Dosage G6P-DH: 2,9µmol.min.mL (control : 0,6µmol.min.mL)	(Liang et al., 2010)	
			10-25mg.g boue (control: 15-80mg.g boue)	Dosage acides nucléiques : 0,007-0,151mg.g boue (control : 0,003-0,096mg.g boue)	(D'Abzac et al., 2010)	
			Biofilm nitrifiant	88mg.g boue (control : 7mg.g boue)	Dosage G6P-DH: 4,4µmol.min.mL (control : 0,6µmol.min.mL)	(Liang et al., 2010)
			Biofilm algue- bactérie	0,71-1,7mg.g biofilm	Pas de vérification	(Pan et al., 2010)
			Diatomée marine : Cylindrotheca closterium	3µg.mL (Bound EPS)	Marquage au DIBAC et comptage au microscope: 100% (control: 11,7%)	(Brouwer et al., 2002)
			PBS, Tween, EDTA	Diatomées Nitschia palea	50mg.L (exposées à 10mg.L CNT) (control : 30mg.L)	Coloration au Sytox Green: Pas de DIFFERENCES de mortalité entre les conditions testées
	Tween	Boues bactéries	120g.g boue	Dosage G6P-DH : 0,05-0,74 nmol NADH/min/g VSS	(Ras et al., 2008b)	
	Triton X-100		120-310mg.g boue	Dosage G6P-DH: 75-100% (control : 0%)	(Pellicer-Nacher et al., 2013)	
	Sulfide : NaCl, Na <sub>2</sub> S <sub>2</sub> O <sub>3</sub>		11,1-33mg.g boue	Pas de vérification	(Park et al., 2008)	
	Acide : H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> (pH=3)		20-50mg.g boue (control : 10-20mg.g)	Dosage G6P-DH: 20-50% (control : 0%)	(Pellicer-Nacher et al., 2013)	
	Base : NaCl et NaOH (pH=10,5)		31-68,7mg.g boue	Pas de vérification	(Park et al., 2008)	
			220-250mg.g boue (control : 10-20mg.g)	Dosage G6P-DH: 70-90% (control : 0%)	(Pellicer-Nacher et al., 2013)	
	Enzymes (a-amylase et/ou cellulase et/ou proteinase)		3,2-63,2mg.g boue	Observation microscope : pas de lyse cellulaire observée (données non disponibles)	(Sesay et al., 2006)	
	Crown ether		15-44mg.g boue (control : 12mg.g boue)	Pas de vérification (?)	(Wuertz et al., 2001)	

## Références Annexe 2

- Adav, S.S., Lee, D., Tay, J., 2008. Extracellular polymeric substances and structural stability of aerobic granule. *Water Res.* 42, 1644–1650. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2007.10.013>
- Azeredo, J., Henriques, M., Sillankorva, S., Oliveira, R., 2003. Extraction of exopolymers from biofilms: the protective effect of glutaraldehyde. *Water Sci. Technol.* 47, 175–179.
- Comte, S., Guibaud, G., Baudu, M., 2006. Relations between extraction protocols for activated sludge extracellular polymeric substances (EPS) and EPS complexation properties: Part I. Comparison of the efficiency of eight EPS extraction methods. *Enzyme Microb. Technol.* 38, 237–245. <https://doi.org/10.1016/j.enzmictec.2005.06.016>
- D'Abzac, P., Bordas, F., Van Hullebusch, E., Lens, P.N.L., Guibaud, G., 2010. Extraction of extracellular polymeric substances (EPS) from anaerobic granular sludges: comparison of chemical and physical extraction protocols. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 85, 1589–1599. <https://doi.org/10.1007/s00253-009-2288-x>
- De Brouwer, J.F.C., Ruddy, G.K., Jones, T.E.R., Stal, L.J., 2002. Sorption of EPS to sediment particles and the effect on the rheology of sediment slurries. *Biogeochemistry* 61, 57–71. <https://doi.org/10.1023/A:1020291728513>
- De Brouwer, J.F.C., Stal, L.J., 2002. Daily Fluctuations of Exopolymers in Cultures of the Benthic Diatoms *Cylindrotheca Closterium* and *Nitzschia* Sp. (Bacillariophyceae). *J. Phycol.* 38, 464–472. <https://doi.org/10.1046/j.1529-8817.2002.t01-1-01164.x>
- Dignac, M., Urbain, V., Rybacki, D., Bruchet, A., Snidaro, D., Scribe, P., 1998. Chemical description of extracellular polymers: implication on activated sludge floc structure. *Water Sci. Technol.* 38, 45–53. [https://doi.org/10.1016/S0273-1223\(98\)00676-3](https://doi.org/10.1016/S0273-1223(98)00676-3)
- Frolund, B., Palmgren, R., Keiding, K., Nielsen, P.H., 1996. Extraction of extracellular polymers from activated sludge using a cation exchange resin. *Water Res.* 30, 1749–1758. <https://doi.org/0043-1354/96>
- Li, X.Y.Ã., Yang, S.F., 2007. Influence of loosely bound extracellular polymeric substances (EPS) on the flocculation, sedimentation and dewaterability of activated sludge. *Water Res.* 41, 1022–1030. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2006.06.037>
- Liang, Z., Li, W., Yang, S., Du, P., 2010. Extraction and structural characteristics of extracellular polymeric substances (EPS), pellets in autotrophic nitrifying biofilm and activated sludge. *Chemosphere* 81, 626–632. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2010.03.043>
- Liu, H., Fang, H.H.P., 2002. Extraction of extracellular polymeric substances (EPS) of sludges. *J. Biotechnol.* 95, 249–256. [https://doi.org/10.1016/S0168-1656\(02\)00025-1](https://doi.org/10.1016/S0168-1656(02)00025-1)
- Liu, X.-M., Sheng, G.-P., Luo, H.-W., Zhang, F., Yuan, S.-J., Xu, J., Zeng, R.J., Wu, J.-G., Yu, H.-Q., 2010. Contribution of Extracellular Polymeric Substances (EPS) to the Sludge Aggregation. *Environ. Sci. Technol.* 44, 4355–4360. <https://doi.org/10.1021/es9016766>
- McSwain, B.S., Irvine, R.L., Hausner, M., Wilderer, P.A., 2005. Composition and Distribution of Extracellular Polymeric Substances in Aerobic Flocs and Granular Sludge. *Appl. Environ. Microbiol.* 71, 1051–1057. <https://doi.org/10.1128/AEM.71.2.1051-1057.2005>
- Ni, B.J., Fang, F., Xie, W.M., Sun, M., Sheng, G.P., Li, W.H., Yu, H.Q., 2009. Characterization of extracellular polymeric substances produced by mixed microorganisms in activated sludge with gel-permeating chromatography, excitation-emission matrix fluorescence spectroscopy measurement and kinetic modeling. *Water Res.* 43, 1350–1358. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2008.12.004>
- Pan, X., Liu, J., Zhang, D., Chen, X.I., Li, L., Song, W., Yang, J., 2010. A comparison of five

- extraction methods for extracellular polymeric substances (EPS) from biofilm by using three-dimensional excitation-emission matrix (3DEEM) fluorescence spectroscopy. *Water SA* 36, 111–116. <https://doi.org/10.4314/wsa.v36i1.50914>
- Park, C., Novak, J.T., Helm, R.F., Ahn, Y., Esen, A., 2008. Evaluation of the extracellular proteins in full-scale activated sludges. *Water Res.* 42, 3879–3889. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2008.05.014>
- Pellicer-Nacher, C., Domingo-Felez, C., Mutlu, G.A., Smets, B.F., 2013. Critical assessment of extracellular polymeric substances extraction methods from mixed culture biomass. *Water Res.* 47, 5564–5574. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2013.06.026>
- Ras, M., Girbal-Neuhauser, E., Paul, E., Spérandio, M., Lefebvre, D., 2008. Protein extraction from activated sludge: An analytical approach. *Water Res.* 42, 1867–1878. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2007.11.011>
- Ras, M., Girbal Neuhauser, E., Paul, E., Lefebvre, D., 2008. A high yield multi-method extraction protocol for protein quantification in activated sludge. *Bioresour. Technol.* 99, 7464–7471. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2008.02.025>
- Ras, M., Lefebvre, D., Derlon, N., Paul, E., Girbal-Neuhauser, E., 2011. Extracellular polymeric substances diversity of biofilms grown under contrasted environmental conditions. *Water Res.* 45, 1529–1538. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2010.11.021>
- Sesay, M.L., Ozcengiz, G., Sanin, F.D., 2006. Enzymatic extraction of activated sludge extracellular polymers and implications on bioflocculation. *Water Res.* 40, 1359–1366. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2006.01.045>
- Sheng, G.-P., Yu, H.-Q., 2006. Relationship between the extracellular polymeric substances and surface characteristics of *Rhodospseudomonas* ... Relationship between the extracellular polymeric substances and surface characteristics of *Rhodospseudomonas acidophila*. *Appl. Microb. Cell Physiol.* 72, 126–131. <https://doi.org/10.1007/s00253-005-0225-1>
- Staats, N., De Winder, B., Stal, L., Mur, L., 1999. Isolation and characterization of extracellular polysaccharides from the epipellic diatoms *Cylindrotheca closterium* and *Navicula salinarum*. *Eur. J. Phycol.* 34, 161–169. <https://doi.org/10.1080/09670269910001736212>
- Takahashi, E., Ledauphin, J., Goux, D., Orvain, F., 2009. Optimising extraction of extracellular polymeric substances (EPS) from benthic diatoms: Comparison of the efficiency of six EPS extraction methods. *Mar. Freshw. Res.* 60, 1201–1210. <https://doi.org/10.1071/MF08258>
- Verneuil, L., Silvestre, J., Randrianjatovo, I., Maracato-romain, C.-E., Girbal-Neuhauser, E., Mouchet, F., Flahaut, E., Gauthier, L., Pinelli, E., 2015. Double walled carbon nanotubes promote the overproduction of extracellular protein-like polymers in *Nitzschia palea*: An adhesive response for an adaptive issue. *Carbon N. Y.* 88, 113–125. <https://doi.org/10.1016/j.carbon.2015.02.053>
- Wang, Z., Liu, L., Yao, J., Cai, W., 2006. Effects of extracellular polymeric substances on aerobic granulation in sequencing batch reactors. *Chemosphere* 63, 1728–1735. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2005.09.018>
- Wilén, B.M., Jin, B., Lant, P., 2003. The influence of key chemical constituents in activated sludge on surface and flocculating properties. *Water Res.* 37, 2127–2139. [https://doi.org/10.1016/S0043-1354\(02\)00629-2](https://doi.org/10.1016/S0043-1354(02)00629-2)
- Wuertz, S., Spaeth, R., Hinderberger, A., Griebe, T., Flemming, H.-C., Wilderer, P.A., 2001. A New Method for Extraction of Extracellular Polymeric Substances from Biofilms and Activated Sludge Suitable for Direct ... *Water Sci. Technol.* 43, 25–31.
- Yu, G., He, P., Shao, L., Zhu, Y., 2008. Extracellular proteins, polysaccharides and enzymes impact on sludge aerobic digestion after ultrasonic pretreatment. *Water Res.* 42, 1925–1934.

<https://doi.org/10.1016/j.watres.2007.11.022>

Zhang, L., Feng, X., Zhu, N., Chen, J., 2007. Role of extracellular protein in the formation and stability of aerobic granules. *Enzyme Microb. Technol.* 41, 551–557.

<https://doi.org/10.1016/j.enzmictec.2007.05.001>

## Liste et statut des publications présentées dans ce manuscrit

### Publication acceptée et publiée :

M. Garacci, M.Barret, F. Mouchet, C. Sarrieu, P.Lonchambon, E. Flahaut, L. Gauthier, J. Silvestre and E. Pinelli. **2017**. Few Layer Graphene sticking by biofilm of freshwater diatom *Nitzschia palea* as a mitigation to its ecotoxicity, *Carbon*, 113: 139-150.

### Publications soumises :

M. Garacci, M. Barret, C. Folgoas, E. Flahaut, G. Chimowa, A. Bertucci, P. Gonzalez, J. Silvestre, L. Gauthier, M. Zouine and E. Pinelli. **2018**. Transcriptomic response of the benthic freshwater diatom *Nitzschia palea* exposed to Few Layer Graphene. *En révision dans Environmental Sciences: Nano*.

### Publications en cours de préparation :

M. Garacci, E. Pinelli, C. Folgoas, E. Flahaut, P. Lonchambon, A. Bertucci, P. Gonzalez, J. Silvestre, M. Zouine, L. Gauthier, and M. Barret. **2018**. Transcriptomic response of the freshwater diatom biofilm exposed to potential environmental and accidental concentrations of Carbon Nanotubes.

M. Garacci, M. Barret, C-E. Marcato-Romain, E. Flahaut, G. Chimowa, A. Perrault, J. Silvestre, L. Gauthier and E. Pinelli. **2018**. Role of exoproteome in diatoms' biofilm response to carbon nanoparticles.

# Communications scientifiques

### Liste des communications orales et posters en tant que premier auteur

M. Garacci, M.Barret, F. Mouche, C. Sarrieu, E. Flahaut, L. Gauthier, J. Silvestre and E. Pinelli “**Assessment of Graphene toxicity on a benthic freshwater diatom *Nitzschia palea*. Interaction of carbon nanoparticles with algal biofilm**” Communication orale pour la 32<sup>ème</sup> conférence de la Society for Environmental Geochemistry and Health du 4 au 8 juillet 2016 (Bruxelles, Belgique)

M. Garacci, J. Silvestre, F. Mouchet, P. Lonchambon, E. Flahaut, L. Gauthier, M. Barret and E. Pinelli “**Evaluation of the cellular and molecular response of a monospecific diatom biofilm exposed to carbon nanoparticles**” Communication orale pour la conférence Functional Ecology and Environment du 11 au 12 juillet 2017 (Toulouse, France)

M. Garacci, M.Barret, F. Mouchet, C. Sarrieu, E. Flahaut, L. Gauthier, J. Silvestre and E. Pinelli “**Ecotoxicological effect of graphene on the benthic freshwater diatom *Nitzschia palea***” Poster pour la conférence Society of Environmental Toxicology and Chemistry du 11 au 12 juillet 2017 (Nantes, France)

M. Garacci, J. Silvestre, F. Mouchet, P. Lonchambon, E. Flahaut, L. Gauthier, M. Barret and E. Pinelli “**Analysis of the extracellular matrix of a monospecific benthic biofilm exposed to different forms of carbon nanoparticles**” Poster pour la conférence Ecotoxicomic du 21 au 24 novembre 2017 (Lyon, France)

### Liste des communications orales et posters en tant que co-auteur

L. Gauthier, F. Mouchet, S. Cadarsi, L. Lagier, M. Garacci, A. Mottier, L. Evariste, E. Flahaut, C. Sarrieu, P. Lonchambon, G. Chimowa and E. Pinelli, « **Ecotoxicity assessment of carbonbased nanoparticles using single-species test-systems vs microcosm exposures** », Communication orale durant le 8<sup>ème</sup> CNMBT17 (Symposium on Carbon Nanomaterials Biology, Medicine & Toxicology) le 30 juin 2017 (Belo Horizonte, Brésil)



Communication orale pour la 32<sup>ème</sup> conférence de la Society for Environmental Geochemistry and Health du 4 au 8 juillet 2016 (Bruxelles, Belgique)

## Assessment of Graphene toxicity on a benthic freshwater diatom *Nitzschia palea*

### Interaction of carbon nanoparticles with algal biofilm

M. Garacci<sup>1</sup>, M. Barret<sup>1</sup>, F. Mouchet<sup>1</sup>, C. Sarrieu<sup>2</sup>, E. Flahaut<sup>2</sup>, L. Gauthier<sup>1</sup>, J. Silvestre<sup>1</sup> and E. Pinelli<sup>1,\*</sup>

<sup>1</sup>EcoLab (Laboratoire d'Ecologie Fonctionnelle), ENSAT, INP, UPS, Université de Toulouse ; UMR CNRS 5245, Castanet Tolosan, France,

<sup>2</sup>Institut Carnot CIRIMAT (Centre Inter-universitaire de Recherche et d'Ingénierie des MATériaux), Université de Toulouse, INP, UPS, UMR CNRS 5085, Toulouse, France

The use of carbon-based nanoparticles such as Few Layer Graphene (FLG) is processing in several fields such as materials engineering, owing to their nanoscale and physicochemical properties. Carbon-based nanoparticles are thus likely to be found in the environment and especially in rivers. In this study, the toxicity of FLG on the freshwater benthic diatom *Nitzschia palea* was assessed. The experimental design used allowed to distinguish the shading effect from the total effect of FLG exposure on *N. palea*, where diatoms are directly exposed to nanoparticles. To assess the effect of FLG on diatoms, a range of concentrations was tested (0.1, 1, 10 and 50 mg.L<sup>-1</sup>) and several toxicity end-points were evaluated, such as the growth rate, mortality and photosynthetic activity. A growth rate inhibition of diatoms culture exposed to 50 mg.L<sup>-1</sup> of FLG was observed 48 h after the beginning of the exposure, revealing a significant effect in both conditions tested (Total and Shading test). In total exposure conditions, the growth inhibition was associated with an increase in diatoms mortality (cell viability) and photosynthesis alteration. For total exposure condition, after 144 h, the toxicity disappeared and the growth rate was recovered, suggesting a decline in diatoms mortality. Microscopy analysis showed a strong interaction between FLG and exo-polymeric substances (EPS) produced by *N. palea*. In addition, optical density measurements of the culture medium in presence or absence of diatoms allowed to demonstrate that EPS secretion contributed to clarify the water column and reduced the physical interaction between FLG and diatoms. Overall, these results suggest that graphene toxicity could be a combination of direct and shading effect, in relation with a strong interaction between biofilm and nanoparticles. These results also highlight the potential mechanisms of clarification of the water column by trapping and sticking FLG at the bottom of wells even at high concentrations.

Communication orale pour la conférence Functional Ecology and Environment du 11  
au 12 juillet 2017 (Toulouse, France)

## Evaluation of the cellular and molecular response of a monospecific diatom biofilm exposed to carbon nanoparticles

Garacci Marion<sup>a</sup>, Silvestre Jérôme<sup>a</sup>, Mouchet Florence<sup>a</sup>, Lonchambon Pierre<sup>b</sup>, Flahaut Emmanuel<sup>b</sup>, Gauthier Laury<sup>a</sup>, Barret Maïalen<sup>a</sup> and Pinelli Eric<sup>a\*</sup>

<sup>a</sup> EcoLab (Laboratoire d'Ecologie Fonctionnelle), ENSAT, INP, UPS, Université de Toulouse ; UMR CNRS 5245, Castanet Tolosan, France,

<sup>b</sup> Institut Carnot CIRIMAT (Centre Inter-universitaire de Recherche et d'Ingénierie des MATériaux), Université de Toulouse, INP, UPS, UMR CNRS 5085, Toulouse, France

Carbon-based nanoparticles such as Few Layer Graphene (FLG) and Carbon NanoTubes (CNT) present a rising interest in several fields as aerospace, electronics or automotive. Then, at the end of their life cycle, carbon nanoparticles are likely to be found in aquatic ecosystems. In the majority of ecosystems, phototrophic microorganisms such as diatoms represent the first level in the food chain and their exposition to pollutants can affect the whole ecosystem.

In this study, the effect of different forms of carbon nanoparticles on the benthic diatom *Nitzschia palea* was assessed distinguishing the shading effect induced by carbon nanoparticles already demonstrated on *N. palea* and total effect of carbon nanoparticles.

The cellular response of benthic freshwater diatoms exposed to carbon nanoparticles was assessed by monitoring the cellular growth. After 48 hours of exposure, an impact of high FLG and CNT concentration (50 mg.L<sup>-1</sup>) on the growth rate of diatoms was observed, associated with a significant mortality only for diatoms exposed to FLG. Nevertheless, a recovery of growth for diatoms was observed after 144 hours of exposure, linked to a sticking of nanoparticles in the biofilm formed by the extracellular substances secreted by diatoms.

To bring the role of extracellular proteins to light, the molecular response of *N. palea* exposed to CNT and FLG has been assessed carrying out the extraction of the extracellular matrix at different times of exposure. At 48h of exposure, the effect of CNT was more pronounced than FLG inducing an overproduction of 50% of hydrophobic proteins at high concentration and 50% of ionic proteins. At 144h of exposure, the effect of FLG and CNT was similar and lead to a ten-fold overproduction of ionic proteins.

Our results demonstrate that carbon nanoparticles can modify the characteristics of benthic biofilms, which is likely to disturb the functioning of natural ecosystems.

Poster pour la conférence Society of Environmental Toxicology and Chemistry du 11 au 12 juillet 2017 (Nantes, France)

### Ecotoxicological effect of graphene on the benthic freshwater diatom *Nitzschia palea*

M. Garacci<sup>1</sup>, M.Barret<sup>1</sup>, F. Mouchet<sup>1</sup>, C. Sarrieu<sup>2</sup>, E. Flahaut<sup>2</sup>, L. Gauthier<sup>1</sup>, J. Silvestre<sup>1</sup> and E. Pinelli<sup>1,\*</sup>

<sup>1</sup>EcoLab (Laboratoire d'Ecologie Fonctionnelle), ENSAT, INP, UPS, Université de Toulouse ; UMR CNRS 5245, Castanet Tolosan, France,

<sup>2</sup>Institut Carnot CIRIMAT (Centre Inter-universitaire de Recherche et d'Ingénierie des MATériaux), Université de Toulouse, INP, UPS, UMR CNRS 5085, Toulouse, France

Carbon-based nanoparticles such as graphene have many applications in different fields due to their outstanding electrical, optical and mechanical properties leading to their industrial production. Thus, few-layer graphene nanoparticles (FLG), composed of 1 to 4 planar carbon layers, are likely to be found in the environment and especially in rivers. In this study, the ecotoxicological effect of FLG on the freshwater benthic diatom *Nitzschia palea* was assessed. The experimental design used allowed to distinguish the shading effect from the total effect of exposure to FLG on *N. palea*, where diatoms are directly exposed to nanoparticles. A large range of concentrations was tested (0.1, 1, 10 and 50 mg.L<sup>-1</sup> of FLG). To assess the effect of FLG on diatoms, several toxicity markers were evaluated such as growth rate, mortality and the photosynthetic activity. An inhibition of the growth rate of diatoms exposed to 50 mg.L<sup>-1</sup> of FLG was observed 48 h after the beginning of the exposure, revealing a significant toxicity. In these conditions, the growth inhibition was associated with an increase in diatoms mortality. After 48 h of FLG exposure, a shading effect was observed on the cellular growth for culture exposed to the highest concentration of FLG. However, after 144 h of exposure, the growth rate was recovered, revealing a decrease in diatoms mortality, which can be explained by FLG stuck on the biofilm. *N.palea* naturally produces biofilm by excreting exo-polymeric substances (EPS) which can help diatoms to grow on the substrate. Indeed, EPS analysis by Alcian blue coloration and Scanning Electron Microscopy observation allowed us to conclude that EPS produced by diatoms strongly interact with FLG, sticking nanoparticles at the bottom of the well. These observations could explain the growth rate recovery at the end of the experiment in the total exposure conditions. In our experiments EPS secretion contributed to clarify the water column and reduced the physical interaction between FLG and diatoms to avoid the contamination. Overall, these results suggest that one potential toxicity process of graphene could be a combination of direct and shading effect leading to a strong interaction between biofilm and nanoparticles. Our results highlight the potential mechanisms of clarification of the water column by diatoms biofilms in natural



## Evaluation of the transcriptomic response of a freshwater diatom exposed to carbon nanoparticles

Garacci Marion<sup>a</sup>, Silvestre Jérôme<sup>a</sup>, Lonchambon Pierre<sup>b</sup>, Flahaut Emmanuel<sup>b</sup>, Folgoas Clément<sup>c</sup>, Zouine Mohamed<sup>c</sup>, Gonzalez Patrice<sup>d</sup>, Barret Maïalen<sup>a</sup> and Pinelli Eric<sup>a\*</sup>

<sup>a</sup> EcoLab (Laboratoire d'Ecologie Fonctionnelle), ENSAT, INP, UPS, Université de Toulouse ; UMR CNRS 5245, Castanet Tolosan, France,

<sup>b</sup> Institut Carnot CIRIMAT (Centre Inter-universitaire de Recherche et d'Ingénierie des MATériaux), Université de Toulouse, INP, UPS, UMR CNRS 5085, Toulouse, France

<sup>c</sup> GBF (Laboratoire Génomique et Biotechnologie du Fruit), ENSAT, INRA/INP, UMR 990, Castanet Tolosan, France

<sup>d</sup> EPOC, University of Bordeaux, UMR 5805, Arcachon, France

Carbon-based nanoparticles such as Few Layer Graphene (FLG) and Carbon NanoTubes (CNT) present a rising interest in several fields as aerospace. Then, at the end of their life cycle, carbon nanoparticles are likely to be found in aquatic ecosystems, where phototrophic microorganisms such as diatoms represent the first level in the food chain. In this study, the effect of different forms of carbon nanoparticles, close to environmental concentration (0.1 mg.L<sup>-1</sup>), on the benthic freshwater diatom *Nitzschia palea* was assessed distinguishing shading and total effect induced by carbon nanoparticles only for high concentration (50 mg.L<sup>-1</sup>). After 48h of exposure, RNA of *N. palea* was extracted and an Illumina Next Generation sequencing was performed. Sequences were assembled by running the DRAP pipeline allowing to generate the *N. palea* transcriptome for the first time. Transcripts were then annotated with BLAST tools based on the sequence homology by interrogating the database “nr” and a differential expression analysis was applied to determine the impact of low carbon nanoparticles concentration on the transcriptomic response of *N. palea*. The size of the assembled transcriptome obtained was estimated at 31Mb. The first results showed that low carbon nanoparticles concentration seemed to induce a slight modification of gene expression for both carbon allotropic forms. Diatoms exposed to low FLG concentration generated a majority of overexpressed genes, whereas CNT mostly induced a downregulation, suggesting that the impact on biological processes were different. Furthermore, in shading condition FLG seemed to induce a slight transcriptomic response with a great majority of underexpressed genes. This result suggests that in shading condition, diatoms downregulated a majority of metabolic pathways.





**TITLE:** Assessment of the cellular and molecular response of a benthic freshwater diatom exposed to carbon-based nanoparticles

**ABSTRACT :**

Different approaches were used to assess the effect of two forms of carbon-based nanoparticles (CNP) nanotubes and graphene, in order to determine the mechanism of the response generated by the benthic freshwater diatom *Nitzschia palea*. The effect at the cellular community scale demonstrated a temporary impact on biofilm growth and an accumulation of NPC in the extracellular matrix. The use of transcriptomic study evidenced the role of the physic interaction, causing alteration of the frustule, in the extracellular response leading to an overexcretion of exopolymeric substances (EPS). This approach also revealed the impact of NPC on the photosynthetic activity of diatoms and a modification of the energetic metabolism suggesting an energetic allocation for the EPS production. The study of the extracellular proteome allowed to have a first insight of the extracellular matrix composition, in majority composed of hydrophobic-like proteins. In NPC exposure, diatoms seemed to produce an adhesive system allowing to strengthen the extracellular matrix and increase the biofilm stability while trapping NPC. The exposition of diatoms to the two NPC forms induce a response greatly similar for the highest tested concentration.

Key words: carbon allotrops, carbon nanotubes, graphene, diatom, biofilm, transcriptomic, proteomic, shading effect, extracellular matrix, energetic allocation.



**AUTEUR :** Marion GARACCI

**TITRE :** Évaluation de la réponse cellulaire et moléculaire d'une diatomée benthique d'eau douce à l'exposition à des nanoparticules carbonées

**DIRECTEUR ET CO-DIRECTEUR DE THESE :** Eric PINELLI et Maialen BARRET

**LIEU ET DATE DE SOUTENANCE :** ENSAT, le 16 Novembre 2018

**RESUME :**

Différentes approches ont été utilisées pour évaluer les effets de deux formes de nanoparticules de carbone (NPC), nanotubes et graphène, afin de comprendre les mécanismes de la réponse générée par la diatomée benthique d'eau douce *Nitzschia palea*. Les effets à l'échelle de la communauté ont démontré un impact temporaire sur la croissance du biofilm et une accumulation des NPC dans la matrice extracellulaire. L'application d'une étude transcriptomique a mis en évidence l'importance de l'interaction physique, à l'origine d'altération du frustule, dans la mise en place de cette réponse extracellulaire se traduisant par une surproduction des substances exo-polymériques (EPS). Cette approche a également révélé l'impact des NPC sur l'activité photosynthétique des diatomées et une modification du métabolisme énergétique, suggérant une allocation énergétique en faveur de la production d'EPS. L'étude du protéome extracellulaire a permis d'avoir un premier aperçu de la composition de la matrice extracellulaire, principalement constituée de protéines à caractère hydrophobe. Lors de l'exposition aux NPC, les diatomées semblent produire un système adhésif complexe permettant de renforcer la matrice extracellulaire et d'augmenter la stabilité du biofilm tout en piégeant les NPC. L'exposition des diatomées face aux deux formes de NPC induit une réponse présentant une forte similitude notamment pour les plus fortes concentrations testées.

**MOTS-CLES :** allotropes du carbone, nanotube de carbone, graphène, diatomée, biofilm, transcriptomiques, protéomiques, effet d'ombrage, matrice extracellulaire, allocation énergétique.