



**HAL**  
open science

# Spectroscopies infrarouge et Raman de microalgues : étude des interactions avec des micro et nanoparticules

Maureen Déniel

► **To cite this version:**

Maureen Déniel. Spectroscopies infrarouge et Raman de microalgues : étude des interactions avec des micro et nanoparticules. Biologie moléculaire. Le Mans Université, 2020. Français. NNT : 2020LEMA1012 . tel-02928966

**HAL Id: tel-02928966**

**<https://theses.hal.science/tel-02928966v1>**

Submitted on 3 Sep 2020

**HAL** is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

# THESE DE DOCTORAT DE PHYSIQUE

LE MANS UNIVERSITE

ECOLE DOCTORALE N° 596

*Matière, Molécules, Matériaux*

Spécialité : « *Physique : Environnement et biologie* »

Par

**Maureen DÉNIEL, BABIN**

**Spectroscopies infrarouge et Raman de microalgues : étude des interactions avec des micro et nanoparticules**

Thèse présentée et soutenue à Le Mans, le 5 juin 2020

Unité de recherche : Institut des molécules et matériaux du Mans, UMR 6283

Thèse N° : 2020LEMA1012

## **Rapporteurs avant soutenance :**

Ganesh SOCKALINGUM, Professeur, Université de Reims

Sophie LECOMTE, Professeur, Université de Bordeaux

## **Composition du Jury :**

Examineurs : Jérôme DUVAL  
Joël FLEURENCE

Directeur de recherche, CNRS, Université de Lorraine  
Professeur, Université de Nantes

Directeur de thèse : Fabienne LAGARDE  
Co-encadrant de thèse : Nicolas ERRIEN  
Co-encadrante de thèse : Aurore CARUSO

Maître de conférences, Le Mans Université  
Maître de conférences, Le Mans Université  
Maître de conférences, HDR, Le Mans Université



# Remerciements

---

A la recherche française, qui malgré ses défis financiers, m'a quand même permis de réaliser cette thèse. Merci aux collectivités locales sarthoises qui ont financés ces recherches. Espérons que les chercheurs et apprentis chercheurs auront dans les années à venir encore les moyens de chercher sur du long terme et de manière publique.

A la Bretagne, une belle plante a toujours besoin de ses racines pour pousser que dire sinon trugarez « O Breizh, ma Bro, me gar ma Bro ».

A mes encadrants, merci pour la confiance que vous m'avez accordée tous les trois et pour m'avoir offert la possibilité de participer à plusieurs congrès où j'ai pu présenter mes travaux et échanger avec des scientifiques dans de nombreux domaines. Je vous remercie également d'avoir survécu à l'annonce du mariage puis de l'arrivée de Dan.

Nicolas, merci pour ta disponibilité, pour ton accueil chaleureux, pour l'aide pour les TP de physique, pour avoir cru en mes résultats qu'en parfois je baissais les bras. Merci également de m'avoir laissée beaucoup d'autonomie et d'avoir bien voulu endosser le rôle de directeur de thèse.

Fabienne, merci pour m'avoir appris à toujours chercher à perfectionner mon travail par tes questions, pour tes discussions intéressantes sur le plan professionnel et personnel, pour ta vision des choses qui m'a aidé à recentrer mon sujet de recherche dans un contexte plus global. Merci aussi d'avoir pris les rênes de cette thèse sur la fin et pour toutes tes corrections de dernière minute.

Aurore, merci pour ton soutien et ton écoute, pour ton regard de biologiste, pour m'avoir formée sur la bio mol (merci de ne pas avoir perdu patience) et un grand merci d'avoir mis la main à la patte quand je ne pouvais pas manipuler. Merci pour le nom sur la porte du bureau, ça m'a donné l'impression de faire partie intégrante du labo de bio et cela me fait chaud au cœur.

A mon comité de suivi de thèse, Ika Paul-Pont et Philippe Soudant, qui ont su avec diplomatie m'aider à réaliser un travail rigoureux et à me questionner toujours plus. Merci pour les krampouz dégustées face à la mer lors de mon passage à Brest.

A mes relecteurs et examinateurs, merci pour votre oui à prendre part à l'évaluation de mes travaux, je remercie sincèrement Monsieur Ganesh Sockalingum et Madame Sophie Lecomte d'avoir bien voulu être rapporteurs de ce manuscrit de thèse. Également tous mes remerciements à Monsieur Joël Fleurence et Monsieur Jérôme Duval de faire partie du jury de ma soutenance en tant qu'examineur.

A mes amies d'expérimentation, au cœur de ce manuscrit, qui en ont vu des vertes et des pas mûres, à tel point qu'on me surnommait en physique, « la tortureuse d'algues ». Chères *Chlamydo*, merci pour ne m'avoir pas lâchée pendant ses quatre années. Merci aux daphnies d'avoir bien voulu survivre à une débutante de l'élevage dulcicole.

Aux stagiaires que j'ai eu l'honneur d'encadrer, Amélie Bâcle, Mathilde Constans et Kateryna Melchuck. C'était un plaisir de travailler avec vous et merci pour vos questions qui me poussaient à toujours approfondir mes explications et mes plans de manip.

A l'équipe PIMS et ses pauses mémorables, merci pour la bonne ambiance et pour avoir toujours apprécié mes gâteaux pourtant des fois un peu exotiques ! Un merci spécial à Frédéric Amiard pour avoir toujours été là pour me dépanner sur le Raman et l'infrarouge. Merci Agnès Ranger pour ton accueil et pour prendre régulièrement 5 min pour discuter.

A la team biologie, toujours souriante et accueillante, un grand merci. Un remerciement spécial à Marie Zanella sans qui une partie des expérimentations n'auraient pas pu avoir lieu. Merci à Hélène Gateau, pour tes encouragements pour la thèse et ta sympathie à chaque fois qu'on se croisait, je te souhaite plein d'énergie positive pour que tes projets fleurissent. Merci Nathalie Casse pour m'avoir confiée les TP de bio cellulaire et merci à Brigitte Moreau pour la préparation matérielle de ceux-ci. Merci Marie Yvon, pour ces matins où tu prenais toujours une minute pour comment j'allais. Gérard Tremblin, nous n'avons pas eu l'occasion de discuter beaucoup, mais heureuse d'avoir trouvé un inconditionnel des algues, toujours prêt à en parler.

Au pôle doctoral, à l'école doctorale et ses gestionnaires en or. Aux personnels en soutien à la recherche de l'IMMM, notamment Saïda Ménard, merci pour avoir géré tout l'administratif des déplacements et des commandes ainsi que pour avoir pris le relai pour le bac de tri.

A Philippe Daniel, merci pour votre contribution à l'élaboration de cette thèse. A Alain Bulou pour votre belle histoire sur le Raman, vous êtes pour moi un exemple de chercheur accompli. A Nair Gireeshkumar Balakrishnan, contente d'avoir voyagé avec toi pour le congrès SETAC à Rome et merci pour les discussions in english ! A Sébastien Nogarotto, merci pour ta bienveillance et ta sympathie, il est toujours plaisant de discuter avec toi. A Rémi Busselez pour les discussions le matin dans le tram sur les courtes nuits de jeunes parents.

Et enfin, un très grand merci à Fanon Julienne, merci pour ton accueil le premier jour, pour ton humeur (parfois changeante mais toujours pleine de vérité), pour ton souci des autres et pour avoir été là tous les jours dans la joie ou dans la peine dans notre bocal toutes ces années. Je te souhaite plein de joie dans tes projets actuels et futurs et bonne recherche de ta voie professionnelle.

A mes amis,

Bon courage chers amis doctorants Marie Guilcher, Thomas Choi et Yann Gourtay, c'est maintenant à votre tour d'écrire l'histoire ! et bon vent docteur Myriam Garrouj (félicitations !). Merci pour votre soutien toutes ces années.

Merci aussi à mes amies Marie De Scoraille, Marie Foyer, Nathalie Cador, Nolwenn Huet et Christelle Tombozafy dont je peux toujours compter sur leurs prières et leur amitié spirituelle.

Merci à Lénéig Le Bihan, à qui j'ai beaucoup pensé en écrivant les conclusions.

A Nina Cudennec, pour ton aide pour l'anglais et ton goût des algues, merci beaucoup d'avoir relu entièrement mon deuxième article depuis la Guadeloupe.

A mes amies qui ont partagé avec moi la joie de la maternité et qui comprennent la vie belle mais dure de maman au travail, Pauline Foyer, Anne-Claire Villedieu et Maryse Peltier.

A JC, merci pour ton soutien fidèle et ta présence à chaque instant.

A ma famille, toujours là pour me soutenir, un grand merci !

A mon père qui m'a toujours encouragé à faire un travail par passion et son goût pour la musique irlandaise qui m'a porté dans les moments où la page était blanche et pendant les longues heures de traitement des données.

A ma maman qui a toujours trouver les mots pour me remonter le moral dès qu'il fallait et qui m'a soutenu dans tous mes projets.

A mon frère Brendan pour me remettre toujours dans le concret et pour me rappeler qu'il faut que je prenne soin de moi.

A ma sœur Alison, pour ton soutien face aux enseignements parfois pas faciles et ta compréhension quand le moral n'était pas là.

A ma sœur Fiona, et ton goût pour la biologie, on se ressemble beaucoup au fond. Je te souhaite de trouver ta voie auprès de tes chers amis les animaux.

A ma belle-famille (Jean-Pierre, Claire, Blandine, Paul, Marie-Emeline, Gérard et Monique), merci de vous être toujours intéressés à mon travail et merci pour votre grand soutien. Vous êtes des personnes formidables.

Au confinement qui m'a permis de passer la fin de thèse en famille et de voir mon bout de chou faire ces premiers pas tout en travaillant (#mamanenthèse).

A Dan, merci mon trésor de me rappeler tous les jours ce que c'est la Vie.

A François, merci pour l'orchidée qui a fleuri tous les ans, pour ces quatre ans que tu as vécu durement mais pendant lesquels tu m'as toujours soutenu. Merci de me remettre les pieds sur terre, de m'apprendre la beauté de la simplicité et du moment présent. Merci pour toutes les fois où tu as fait la soupape de la cocote minute que j'étais, m'évitant de m'énerver publiquement. Merci pour ton amour inconditionnel.

Maureen, An 2020

# Liste des productions scientifiques

---

## Publications

T. E. Cox, M. Nash, F. Gazeau, M. Déniel, E. Legrand, S. Alliouane, P. Mahacek, A. Le Fur, J.-P. Gattuso, S. Martin, Effects of in situ CO<sub>2</sub> enrichment on *Posidonia oceanica* epiphytic community and mineralogy, *Marine Biology*, 2017, 164(5) pp.103.

M. Puspita, M. Déniel, I. Widowati, O. Karna Radjasa, P. Douzenel, C. Marty, L. Vandanjon, G. Bedoux, N. Bourgoignon, Total phenolic content and biological activities of *Sargassum muticum* enzymatic hydrolysates (2016) *Journal of Applied Phycology*, Springer Verlag, 2017, 29 (5), pp.2521-2537.

M. Déniel, M. Puspita, P. Douzenel, V. Stiger-Pouvreau, G. Bedoux, L. Vandanjon, Seasonal Variation of *Sargassum muticum* Biochemical Composition Determined by Fourier Transform Infra-Red Spectroscopy: --. *Journal of Analytical & Bioanalytical Techniques*, 2017 (2), pp.1-10.

G. Balakrishnan, M. Déniel, T. Nicolai, C. Chassenieux, F. Lagarde, Towards more realistic reference microplastics and nanoplastics: preparation of polyethylene micro/nanoparticles with a biosurfactant, *Environmental Science Nano*, 2019, 6, 315-324.

M. Déniel, N. Errien, P. Daniel, A. Caruso, F. Lagarde, Current methods to monitor microalgae-nanoparticle interaction and associated effects, *Aquatic Toxicology*, 2019, 217.

M. Déniel, F. Lagarde, A. Caruso, N. Errien, Infrared spectroscopy as a tool to monitor interaction between nanoplastics and microalgae? *Analytical and bioanalytical chemistry*, 2020.

M. Déniel, N. Errien, F. Lagarde, M. Zanella, A. Caruso, Interactions between polystyrene nanoparticles and *Chlamydomonas reinhardtii* monitored by combined analysis infrared and molecular biology, *Environmental pollution, accepted with major revisions*

## Communications orales

M. Déniel, M. Puspita, P. Douzenel, O. Goncalves, V. Stiger-Pouvreau, N. Bourgoignon, G. Bedoux, L. Vandanjon, Determination of the biochemical composition of proliferative macroalgae by IR spectrometry, *OCEANEXT*, Nantes, France, Juin 2016.

P Puspita, M. Déniel, I. Widowati, O. K. Radjasa, G. Bedoux and N. Bourgoignon, Antioxidant and antibacterial activity of solid-liquid and enzyme-assisted extraction of phenolic compound from three species of tropical Sargassum. *The 2nd International Conference on Tropical and Coastal Region Eco-Development (ICTCRED)*, Bali, Indonésie, 25-27 Octobre 2016. *Publication associée: IOP Conference Series: Earth and Environmental Science, IOP Publishing, 2017, 55, pp.012057)*

M. Déniel, Spectroscopie vibrationnelle pour le suivi des effets des nanoparticules sur les microalgues, *Séminaire IMMM*, Le Mans, France, 12 juillet 2017.

M. Déniel, F. Lagarde, A. Caruso, N. Errien, Détection des particules et étude des microalgues par spectroscopie, *Réunion ANR Microplastics*, Brest, France, 14-15 juin 2017.

M. Déniel, N. Errien, A. Caruso, F. Lagarde, Do nanoparticles cause stress effects on microalgae ? An infrared spectroscopy study, *SETAC Europe*, Rome, Italie, 13-17 mai 2018.

M. Déniel, F. Lagarde, A. Caruso, N. Errien, Spectroscopic tools characterisation of an environmental problematic : Nanoplastic-microalgae interaction, *Journée de l'école doctorale 3M « Energie, environnement »*, Le Mans, France, 6 juin 2017.

M. Déniel, M. Constans, A. Caruso, N. Errien, F. Lagarde, Monitoring micro and nano-plastic interaction with microalgae using spectroscopic tools, *Congrès Youmares 9<sup>th</sup>*, Oldenburg, Allemagne, 11-14 septembre 2018.

M. Déniel<sup>1</sup>, G. Balakrishnan Nair, M. Constans, N. Errien, A. Caruso, F. Lagarde, Microplastics-Daphnia interactions : importance of surfactant, *Congrès MICRO 2018*, Arrecife, Lanzarote, 19-23 novembre 2018.

## **Posters**

M. Déniel, M. Puspita, M-P. Gémin, I. Widowati, G. Bedoux, O.K. Radjasa, N. Bourgougnon, L. Vandanjon, Extraction of alginates and fucoidans from *Sargassum muticum* and purity evaluation of the extracts by Fourier Transform Infra-Red spectroscopy, *Congrès International Society of Apply Phycology*, 19-23 juin 2017, Nantes, France

M. Déniel, F. Lagarde, A. Caruso, N. Errien, Interactions microalgues-nanoparticules : application de la spectroscopie infrarouge, *Congrès Groupement Français de Spectroscopie Vibrationnelle*, Le Mans, France, 27-30 juin 2017.

M. Déniel, F. Lagarde, A. Caruso, N. Errien, Microalgae and nanoparticles : a new world to study, *Journée de l'école doctorale 3MPL*, Angers, France, 30 juin 2017.

M. Déniel, N. Errien, A. Caruso, F. Lagarde, Les nanopolystyrènes ont-ils un effet similaire à d'autres stress sur les microalgues ?, *Workshop Polymères & Océans*, Montpellier, France, 15-17 janvier 2018.

M. Déniel, Microalgues : alerte aux nanoparticules ? *Forum Jeunes chercheurs*, Concours Expose ta thèse, Le Mans, France, 30 novembre 2018.



## **Actions de diffusions scientifiques**

Visite de laboratoire pour des lycéens : présentation des travaux de thèse et de la spectroscopie infrarouge, Le Mans Université, 23 février 2018

Accueil de stagiaires 3<sup>ème</sup> au sein de l'IMMM, Le Mans Université, (2jours/an, 2017-2020)

Café-thèse : Présentation « Nanoparticules et microalgues : un monde d'interaction », Le Mans Université, 20 mars 2018

Organisation d'une journée scientifique de l'école doctorale, Le Mans Université, 6 juin 2018

Présentation des travaux de thèse à la Nuit des chercheurs « 1001 histoires », Le Mans, 28 septembre 2018

Participation à un ciné-débat « Océans, le mystère plastique » auprès d'un public de collégiens, Le Mans, 17 janvier 2019

Accueil de collégiens dans le cadre de Science Tour, animation autour de la thématique de l'environnement et des plastiques, Le Mans, 29 novembre 2019

## **Implications**

Bénévole organisation Nuit des chercheurs, Le Mans, 29 septembre 2017

Bénévole organisation congrès GFSV, Le Mans, 27-30 juin 2017

Représentante des doctorants à l'école doctorale 3M au sein de la cellule de site et du conseil bi-régional de l'école doctorale (2017-2019)

Représentante au conseil du pôle doctoral du Mans (2017-2020)

## **Communication dans les journaux**

\_ Le Mans Métropole Notre Ville, N°374, Janvier-février 2017, p.15, Talent du Mans, « Un prix pour Maureen Déniel », <http://www.lemans.digitomag.com/lmnvm374.php#1> .

\_ Etudessup, n°13, Edition 2017, p.30, « A l'écoute des microalgues ».

\_ Conférence Scientifique : Le mystère Plastique, article web du 23 janvier 2019, <https://bellevue.paysdelaloire.e-lyco.fr/bienvenueactualites/conference-scientifique-le-mystere-plastique/>

# Table des matières

---

Liste des principales abréviations	15
Introduction générale	17
Chapitre 1 : Etat de l'art	20
1 Nanoparticules, des particules aux propriétés particulières	20
<b>1.1 Types et applications des nanoparticules</b>	<b>20</b>
1.1.1 Métaux et oxydes métalliques	21
1.1.2 Silice (SiO <sub>2</sub> )	22
1.1.3 Plastiques	22
<b>1.2 Propriétés des nanoparticules</b>	<b>23</b>
1.2.1 Evolution de la nature, forme, taille et concentration des nanoparticules	24
1.2.2 Importance de la chimie et de la charge de la surface des nanoparticules	26
1.2.3 Nanoparticules métalliques, un relargage possible d'ions	27
2 Le "plancton", un modèle d'étude de la réponse au stress	28
<b>2.1 Microalgue, un modèle d'étude à l'échelle cellulaire</b>	<b>28</b>
<b>2.2 Daphnie, consommateur primaire d'eau douce</b>	<b>29</b>
2.2.1 Ingestion des microplastiques et impact sur la physiologie des daphnies	31
2.2.2 Comportement natatoire des daphnies	31
2.2.3 Effet à l'échelle moléculaire	32
<b>2.3 Stratégie de défense des microalgues</b>	<b>33</b>
2.3.1 Réponses des microalgues face aux stress environnementaux	34
2.3.2 Stress lumineux et l'art de la photoprotection	35
2.3.3 Stress thermique : attention ça chauffe !	37
2.3.4 Stress salin : les microalgues reines de l'adaptation	37
2.3.5 Stress nutritif et son impact sur le métabolisme	38
<b>2.4 Réponse des microalgues à certains stress induits par les activités humaines</b>	<b>39</b>
2.4.1 Augmentation du dioxyde de carbone (CO <sub>2</sub> )	39
2.4.2 Stress dus à des métaux ou particules métalliques	39
2.4.3 Les plastiques peuvent-ils être un stress ?	40
3 Interactions microalgues-nanoparticules : mécanismes et effets associés	42
<b>3.1 Impacts sur la croissance des microalgues</b>	<b>42</b>

3.2	<b>Ombrage : effet sur l'activité photosynthétique</b>	<b>43</b>
3.3	<b>Relargage d'ions : source de stress</b>	<b>44</b>
3.4	<b>Paroi et membrane plasmique : au contact des nanoparticules</b>	<b>45</b>
3.5	<b>Adsorption : conséquences de la présence des NP en surface</b>	<b>46</b>
3.6	<b>Absorption : et si les nanoparticules entraînent dans les microalgues ?</b>	<b>47</b>
3.7	<b>Impact au niveau des gènes</b>	<b>48</b>
3.8	<b>Au bilan : quels impacts mesurés pour quelles nanoparticules ?</b>	<b>49</b>
4	<b>Outils pour la caractérisation des interactions</b>	<b>54</b>
4.1	<b>Microscopie à différentes échelles : visualisation des interactions</b>	<b>55</b>
4.2	<b>Spectroscopies vibrationnelles appliquées à l'étude des interactions entre les matériaux et les organismes</b>	<b>56</b>
4.2.1	Principe des spectroscopies Raman et infrarouge	56
4.2.2	Spectroscopies vibrationnelles sur les microalgues : études des composés cellulaires	61
4.2.3	Spectroscopies vibrationnelles appliquées à l'étude des cellules au contact des nanomatériaux	64
4.3	<b>Biologie moléculaire ou comment expliquer les mécanismes de réponse mis en place</b>	<b>66</b>
<b>Chapitre 2 : Matériels et méthodes</b>		<b>72</b>
1	<b>Modèles d'étude</b>	<b>72</b>
1.1	<i>Chlamydomonas reinhardtii</i>	72
1.2	<i>Daphnia magna</i>	74
1.3	<b>Caractérisation des micro et nanoparticules</b>	<b>75</b>
2	<b>Suivi des interactions microalgues-nanoparticules</b>	<b>77</b>
2.1	<b>Visualisation</b>	<b>77</b>
2.1.1	Microscope électronique à balayage	77
2.1.2	Microscopie champ sombre	77
2.1.3	Microscopie confocale	78
2.2	<b>Suivi de l'état physiologique et moléculaire des microalgues</b>	<b>79</b>
2.2.1	Croissance	79
2.2.2	Fluorescence : suivi de l'activité photosynthétique	80
2.2.3	Screening des pigments	82
2.2.4	Intégrité membranaire : dosage de la lactate déshydrogénase	82
2.2.5	Approche moléculaire : RT-PCR quantitative	83

2.3	<b>Analyse de l'état de la microalgue par spectroscopie Raman et infrarouge</b>	<b>88</b>
2.3.1	Spectroscopie Raman	88
2.3.2	Spectroscopie infrarouge	91
3	<b>Suivi des interactions microparticules-daphnies</b>	<b>96</b>
3.1	<b>Toxicité aigüe</b>	<b>96</b>
3.2	<b>Toxicité chronique</b>	<b>96</b>
3.3	<b>Temps de présence des microparticules dans l'appareil digestif</b>	<b>96</b>
3.4	<b>Visualisation des microplastiques par analyse Raman</b>	<b>97</b>
3.5	<b>Analyse du comportement natatoire</b>	<b>97</b>
3.6	<b>Analyse génétique</b>	<b>97</b>
3.6.1	PCR sur ADN : amplification et contrôle des gènes d'intérêt	98
3.6.2	Extraction d'ARN et RT	98
<b>Chapitre 3 : Intérêt des spectroscopies vibrationnelles dans l'étude des réponses aux stress environnementaux chez <i>Chlamydomonas reinhardtii</i></b>		<b>100</b>
1	<b>Etude des stress par spectroscopie Raman : les caroténoïdes, indicateurs pertinents ?</b>	<b>100</b>
1.1.	<b>Chromatographie sur couche mince : visualisation des pigments</b>	<b>100</b>
1.2.	<b>Spectre Raman de <i>C. reinhardtii</i></b>	<b>101</b>
1.3.	<b>Microalgues sous stress lumineux : réponse des caroténoïdes ?</b>	<b>103</b>
2	<b>Spectroscopie infrarouge : un outil pour suivre l'effet des stress environnementaux chez <i>Chlamydomonas reinhardtii</i></b>	<b>113</b>
2.1	<b>Traitement du signal adapté à l'étude des variations de composition biochimique de microalgues</b>	<b>114</b>
2.2	<b>Etude des stress environnementaux sur la composition moléculaire de <i>C. reinhardtii</i> : intérêt de la spectroscopie infrarouge</b>	<b>119</b>
2.3	<b>Spectroscopie infrarouge, outil pour le suivi de la composition moléculaire de <i>C. reinhardtii</i> suite à un stress ionique Cd<sup>2+</sup></b>	<b>125</b>
2.3.1	Etat physiologique des microalgues	125
2.3.2	Composition macromoléculaire des microalgues	127
2.3.3	Expression génétique des microalgues	130

Chapitre 4 : Etude de la réponse des microalgues en présence de nanoparticules	134
1 Caractérisation des nanoparticules étudiées	135
2 Quels effets des nanoplastiques au contact des microalgues ?	137
2.1 Croissance : indicateur de l'état physiologique des microalgues	137
2.2 Composition biochimique des microalgues au contact des nanopolystyrènes	138
2.3 Intégrité membranaire suite aux interactions microalgues/NP PS	141
2.4 Biologie moléculaire : indicateur de l'expression génétique des microalgues	142
3 Effet de la nature (chimique) des nanoparticules	145
3.1 Variation de la composition des microalgues suite aux interactions	145
3.2 Focus sur les polysaccharides pour suivre les interactions avec les NP PS	148
3.3 Pigments et polysaccharides : une expression différentielle	151
3.3.1 Réponse des gènes liés aux polysaccharides	151
3.3.2 Réponse des gènes liés à la biosynthèse des caroténoïdes	152
3.4 Visualisation des particules après interaction avec les microalgues	153
3.4.1 Microscopies champ sombre et électronique à balayage : outils pour visualiser les nanoparticules d'or	154
3.4.2 Visualisation des nanopolystyrènes par microscopie confocale	156
4 Effet du type de paroi des microalgues sur les interactions avec des nanoparticules	158
4.1 D'une souche à l'autre, une cohérence spectrale	158
4.2 Focus sur les polysaccharides	162
4.3 Réponse des gènes : deux tendances	164
5 Evolution de la réponse dans le temps de <i>C. reinhardtii</i> en présence de nanoparticules	167
5.1 CC400 et 2935, allures de croissance différenciées	167
5.2 Analyse combinée de la réponse des microalgues en trois points	169

Chapitre 5 : Importance de la chimie de surface dans les interactions entre organismes aquatiques et microplastiques	178
1 Quelle réponse macromoléculaire des microalgues en présence de microplastiques ?	179
2 Interactions daphnies et MP PE +/- microalgues	185
<b>2.1 Effet à court terme de la présence des MP PE</b>	<b>186</b>
2.1.1 Ingestion des microplastiques et mortalité	186
2.1.2 Analyse Raman des particules retrouvées dans le tube digestif des daphnies	189
2.1.3 Excrétion des MP PE ?	189
2.1.4 Evolution du comportement natatoire	190
2.1.5 Impact sur les descendants des daphnies exposées	193
<b>2.2 Effet chronique de la présence des MP PE</b>	<b>194</b>
2.2.1 Taux de survie et reproduction	194
2.2.2 Impact sur la mobilité des daphnies	196
2.2.3 Etude préliminaire de l'expression des gènes chez <i>Daphnia magna</i>	196
<b>2.3 Discussion sur l'impact des MP PE sur les daphnies</b>	<b>198</b>
2.3.1 Présence des MP PE dans le tube digestif : facteurs influents	198
2.3.2 Facteurs de mortalité des daphnies	200
2.3.3 Modification du comportement natatoire	200
2.3.4 Reproduction retardée	201
Conclusions et perspectives	204
Annexes	213
1 Etat de l'art	213
2 Matériels et méthodes	229
3 Intérêt des spectroscopies vibrationnelles dans l'étude des réponses aux stress environnementaux chez <i>Chlamydomonas reinhardtii</i>	230
<b>3.1 Raman : résultats complémentaires : spectres bruts</b>	<b>230</b>
<b>3.2 Raman : résultats complémentaires : comparaison 2 à 2 des conditions stress lumineux</b>	<b>231</b>
<b>3.3 La question de la variabilité des témoins</b>	<b>236</b>
<b>3.4 Prétraitements des spectres infrarouge de microalgues</b>	<b>238</b>

<b>3.5</b>	<b>Différences de réponses infrarouges des microalgues par rapport au milieu de culture</b>	<b>251</b>
3.5.1	Croissance	251
3.5.2	Spectres infrarouge	253
<b>4</b>	<b>Etude de la réponse des microalgues en présence de nanoparticules</b>	<b>255</b>
<b>4.1</b>	<b>Correspondance des sigles en biologie moléculaire et efficacité des gènes</b>	<b>255</b>
<b>4.2</b>	<b>Spectroscopie IR : Evolution temporelle toutes les conditions confondues</b>	<b>256</b>
<b>4.3</b>	<b>Spectroscopie IR : Evolution temporelle à 4, 8 et 11 jours</b>	<b>257</b>
	<b>Bibliographie</b>	<b>265</b>

# Liste des principales abréviations

---

ACP : Analyse en composante principale

ADNc : Acide désoxyribonucléique  
complémentaire

Anova : Analyse de la variance

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

ARN : Acide ribonucléique

ATP : Adénosine triphosphate

BKT :  $\beta$ -carotène kétolase

BS : Biosurfactant

Chl : Chlorophylle

CHY :  $\beta$ -carotène hydrolase

CP : Composante principale

D1 SG : Dérivée primaire Savitzky-Golay

DLS : Dynamic light scattering ou  
diffusion dynamique de la lumière

EC50 : Concentration efficace médiane (à  
50%)

EDX : Rayons X à énergie dispersive

EPS : Exopolysaccharides

GD : UDP-glucuronate décarboxylase

GE : UDP glucose 4 épimérase

GLD : UDP glucose 4-6 déhydratase

HPLC : Chromatographie en phase liquide  
à haute performance

INRS : Institut national de recherche et de  
sécurité

LB : Ligne de base

LDH : Lactate déhydrogénase

ME : GDP mannose 3-5 épimérase

MEB : Microscope électronique à balayage

MET : Microscope électronique à  
transmission

MP : Microplastiques

MSC : Correction de diffusion  
multiplicative

Norm : Normalisation

NP : Nanoparticules

NS : Sans surfactant

OECD : Organisation de coopération et de  
développement économiques

PCR : Réaction en chaîne par polymérase

PE : Polyéthylène

PG : Phosphoglucomutase

PS : Polystyrène

ROS : Reactive Oxygen Species ou  
Formes Réactives de l'Oxygène

SNV : Standard normal variate

TAG : Triacylglycérides

TAP : Tris acétate phosphate

TME : Eléments traces métalliques

Tw : Tween

UV : Ultraviolet



Il était une fois l'histoire d'une microalgue prénommée  
*Chlamydomonas reinhardtii* qui rencontra des  
 nanoplastiques....



Illustration de Clémence Jost suite à une discussion sur cette thèse (Source : Songes du Mans, ANPU, 2019).

« Recherche : partir de ce qu'on croit savoir,  
 et tirer sur le fil en souhaitant qu'il se brise. »  
 Jean Rostand ; *Le carnet d'un biologiste* (1959)

# Introduction générale

---

La pollution de toutes les eaux du globe par les particules de plastiques représente depuis quelques décennies un problème environnemental majeur. Les plastiques qui se retrouvent dans les eaux vont au cours du temps se dégrader formant des fragments plus petits appelés microplastiques et dans certains cas, ces plastiques peuvent se retrouver sous forme nanométrique, alors appelés nanoplastiques venant s'ajouter à des nanoparticules d'autres natures chimiques (métaux et oxydes notamment). Les nanoparticules sont une classe particulière de matériau puisque leurs propriétés physico-chimiques sont différentes des matériaux bruts. Le devenir des nanoparticules dans l'environnement et leur potentiel impact sur la vie aquatique sont encore peu connus. De plus, malgré le fait qu'une partie des déchets plastiques entre dans l'environnement par les milieux d'eau douce, les interactions entre nanoparticules et organismes des rivières restent très peu étudiées.

Cette étude a donc pour but de participer à la compréhension des effets des particules de plastiques sur les organismes des rivières et plus particulièrement sur les microalgues. En effet, les microalgues, peu complexes d'un point de vue de leur structure, permettent une compréhension plus aisée des mécanismes impliqués. Etant à la base de la chaîne trophique aquatique, elles sont de plus très utilisées comme modèles dans les études écotoxicologiques. L'étude des impacts potentiels sur les microalgues de la pollution par les micro et nanoplastiques dans les eaux douces, reste un sujet peu exploré du fait de la difficulté à observer ces particules, laissant en suspens de nombreuses questions sur leur toxicité.

Pour effectuer cette étude, une méthodologie permettant de caractériser les microalgues suite à un stress ou à un changement de leur environnement est nécessaire. Cette méthodologie se doit d'être applicable pour caractériser à la fois les interactions entre microalgues et nanoplastiques et les potentielles modifications induites chez les microalgues en condition de stress ou lors de leur réponse. Pour ce faire, l'exploration des techniques de spectroscopies vibrationnelles qui permettent l'obtention rapide d'informations biochimiques sur une population de microalgues sera effectuée. En effet, le stress et les réponses au stress induisent des modifications biochimiques chez les microalgues (production de lipides ou de polysaccharides par exemple) qui doivent être détectées par spectroscopie couplée à de l'analyse statistique. Nous tenterons de caractériser la réponse des microalgues suite à l'interaction avec les nanoparticules à partir du suivi de la réponse à des stress

environnementaux courants. Cette réponse sera notamment observée par l'analyse des spectres infrarouge moyens et de l'expression gènes d'une population de microalgues. Des questions sous-jacentes à ces interactions seront également abordées : quel type de contact ont ces deux entités ? Quels sont les paramètres influents ces interactions ? A quels niveaux se situent les effets sur les microalgues et quels mécanismes de réponses mettent-elles en place ?

Pour mieux identifier et comprendre les facteurs influençant la possible toxicité des nanoparticules, nous tenterons à la fois d'évaluer différentes propriétés des nanoparticules pouvant modifier la toxicité et de comprendre le rôle de la paroi des microalgues comme barrière physique à ces interactions. Enfin, la question de l'impact à un niveau trophique supérieur sera également soulevée, afin de remettre notre étude dans son contexte biologique pour ouvrir des perspectives sur compréhension de phénomènes tels que la biodisponibilité ou la bioaccumulation au sein de la chaîne trophique aquatique.

### **Objectifs de thèse**

Dans cette étude nous nous sommes particulièrement intéressés aux premiers niveaux trophiques avec les interactions entre microalgues et nanoparticules et entre des microplastiques et des daphnies. Un premier objectif méthodologique de la thèse sera de tester l'efficacité des méthodes spectroscopiques pour détecter rapidement un stress environnemental chez une microalgue modèle. Ces techniques seront ensuite utilisées afin de discriminer différents types de stress et de mesurer les impacts de la présence de polluants particuliers (nanoparticules métalliques, micro et nanoplastiques en particulier). Par la suite, le couplage des données spectroscopiques avec la réponse au niveau moléculaire permettra de faire avancer les connaissances dans la compréhension des mécanismes mis en place lors des interactions, ce qui était un des objectifs principaux de cette thèse. Pour cela, nous étudierons l'influence de plusieurs paramètres tels que la nature chimique, la taille et la chimie de surface des particules sur les modifications induites sur les microalgues.

Le manuscrit est ainsi composé de 5 chapitres.

- Le chapitre 1 présente l'état de l'art sur les interactions nanoparticules-microalgues et les techniques utilisées pour les suivre.
- Le chapitre 2 développe les modèles biologiques étudiés ainsi que les techniques et méthodes utilisées dans ce travail.
- Le chapitre 3 présente l'intérêt des techniques de spectroscopies vibrationnelles dans l'étude des réponses aux stress environnementaux chez *Chlamydomonas reinhardtii*.
- Ensuite, dans le chapitre 4, un focus sera fait sur la réponse des microalgues en présence des nanoparticules selon le protocole de spectroscopie infrarouge développé et en couplage avec des études de biologie moléculaire.
- Enfin le chapitre 5 portera plus précisément sur l'importance de la chimie de surface dans les interactions entre organismes aquatiques et microplastiques et présentera des travaux préliminaires menés sur un autre organisme, la daphnie.

# Chapitre 1 : Etat de l'art

---

## **Introduction**

Par leur utilisation massive dans notre quotidien les micro et nanoparticules anthropogéniques (plastiques, métaux, oxydes...) contaminent les eaux naturelles. D'après un rapport de l'ANSES, les effets des nanomatériaux sont encore méconnus [1]. L'étude de leurs interactions avec le biote aquatique, notamment avec les premiers maillons de la chaîne trophique, est devenue primordiale. Dans ce chapitre, un état de l'art des types, applications et propriétés des nanoparticules sera établi. Les réponses des microalgues aux stress environnementaux et les techniques de suivi des interactions seront présentées dans le but d'aider à la compréhension des mécanismes d'interactions des nanoparticules avec les organismes aquatiques dont notamment les microalgues.

## **1 Nanoparticules, des particules aux propriétés particulières**

Le terme générique des nanoparticules (NP) regroupe une grande variété de particules de différentes natures, origines (naturelles vs industrielles) aux applications très diverses. Des NP minérales, organiques jusqu'aux NP synthétiques, elles ont une large gamme d'applications dans les domaines des technologies, de la production d'énergie, du biomédical, de la cosmétique, du conditionnement et de la réhabilitation [2, 3]. Comme l'utilisation des nanomatériaux conçus a augmenté de manière globale ces dernières années [4], ils peuvent, par leur petite taille, être relargués des produits manufacturés, passer à travers les systèmes de traitement des eaux et ainsi rentrer non intentionnellement dans l'environnement créant une pollution « invisible » [3].

### **1.1 Types et applications des nanoparticules**

Cette partie présente plusieurs grandes classes de particules en fonction de leur nature chimique : métaux et oxydes métalliques, silice, plastique, quantum dot et carbone (non présentés ici). Cette grande diversité de types de nanoparticules correspond à de nombreuses et diverses applications qui sont présentées succinctement ci-après.

### 1.1.1 Métaux et oxydes métalliques

Parmi les premières NP synthétisées, les NP de métaux nobles, argent et or, sont aujourd'hui largement commercialisées. Utilisées dans les études écotoxicologiques, les principales caractéristiques de ce type de particules sont présentées en annexe (Annexe Tableau 1-A). Les nanoparticules d'or sont utilisées dans le domaine médical et en biologie moléculaire [4] mais également dans les peintures et composants électroniques [5]. Les nanoparticules d'argent sont employées principalement comme agents antimicrobiens dans le domaine médical, les textiles et les produits cosmétiques [6]. Les nanoparticules de platine sont aussi utilisées dans les applications biomédicales, les capteurs électrochimiques et les transformateurs de gaz d'échappement automobiles [7]. Enfin, par leurs propriétés catalytiques, magnétiques et électriques, les nanoparticules de cobalt sont employées pour les fluides magnétiques et le domaine biomédical [8].

Les nanoparticules d'oxydes métalliques forment une deuxième catégorie de nanomatériaux métalliques (Annexe Tableau 1-B). Le pouvoir antibactérien de ces oxydes, cuivre (CuO), cérium (CeO) et zinc (ZnO) fait qu'ils sont utilisés principalement dans les peintures antifouling [9, 10], les dentifrices [11], les textiles [12] et les produits pharmaceutiques [13, 14]. Les nanoparticules d'oxyde de nickel (NiO) et de CeO sont employées fréquemment dans l'industrie comme catalyseur ou comme des pigments pour la céramique et le verre pour les NiO [15, 16]. Photoréactives, les nanoparticules d'oxyde de zinc (ZnO) et de titane (TiO<sub>2</sub>) sont des photocatalyseurs et des agents blanchissants. Cela fait des TiO<sub>2</sub>, un des nanomatériaux le plus produit au monde [17, 18]. Les nanoparticules de TiO<sub>2</sub> peuvent servir également pour l'administration de médicaments et la conception des produits d'emballage [19]. Le ZnO est une molécule ayant une grande capacité d'absorption des rayons UV, une propriété qui est utilisée dans les crèmes solaires, les cosmétiques et les peintures [20, 21]. D'autres nanoparticules d'oxydes métalliques comme le lanthane, l'aluminium et le fer sont moins souvent étudiées. La construction des piles à combustible, le stockage des données magnétiques, la biomédecine et le traitement des eaux usées sont des applications relatives aux nanoparticules d'oxyde de lanthane (La<sub>2</sub>O<sub>3</sub>) [22]. Les nanoparticules de fer de valence zéro (ZVI) sont quant à elles employées dans la restauration environnementale, l'agroalimentaire et le diagnostic médical [23, 24].

### 1.1.2 Silice (SiO<sub>2</sub>)

La silice est le composant majoritaire de la croûte continentale et peut être naturellement présent à l'état de nanoparticules dans les océans [25]. Il peut se retrouver sous deux formes : amorphe ou cristalline. La silice cristalline, retrouvée dans les secteurs manufacturiers et les mines est connue pour être très toxique par inhalation (silicose, données INRS). L'OECD (Organisation de coopération et de développement économiques) recommande les nanoparticules de silice amorphe comme nanoparticules de référence pour l'évaluation des risques et de la toxicité liée aux nanomatériaux [26]. De plus, les nanoparticules de silice (< 100 nm) sont employées dans de nombreux domaines comme la cosmétique ou dans les produits alimentaires en tant qu'agents anti-agglomérants (E551) [27].

### 1.1.3 Plastiques

Chaque année, environ 1,7 kg/jour/habitant [28] de matière plastique se retrouve dans l'environnement aquatique. Leur présence dans l'environnement a commencé à soulever des interrogations dans les années 1970, mais ce n'est que plus récemment [29] que leur présence universelle en a fait une problématique émergente. La production mondiale de plastique en 2016 a été estimée à 335 millions de tonnes, d'après Plastics Europe [30]. Les sources de microplastiques (MP) sont de deux types. Les MP primaires fabriqués avec une taille inférieure à 5 mm et se présentant sous forme de pastilles de préproduction des matériaux plastiques ou de microbilles [29]. Les MP secondaires sont issus de la fragmentation au fil du temps de plastiques, obtenue par des phénomènes thermiques, mécaniques, de photodégradation [31, 32] ou encore de colonisation, dégradation par des micro-organismes [33–35]. Par exemple, les fibres polymériques provenant du lavage des vêtements ne sont pas retenues par les usines de traitement des eaux usées et ont été détectées dans l'environnement aquatique [36]. De plus, la faible densité des plastiques favorise le transfert rapide par le vent et le courant des rivières des MP dans le milieu aquatique [37]. Les principaux types de polymères identifiés dans l'environnement aquatique sont notamment le polyéthylène (PE), le polypropylène (PP), le polyvinyle chlorure (PVC), le polyéthylène téréphtalate (PET) et le polystyrène (PS). Ceux-ci représentent 90 % de la production mondiale et deux d'entre eux sont très utilisés dans les études d'interactions et d'impact : PS et PE [38]. Cela est dû à leur disponibilité commerciale à différentes tailles (de nano à micro) avec différentes charges de surface : neutre, anionique et cationique [39, 40]. Quelques études sont focalisées sur d'autres polymères (PVC, PET et PP)

mais seulement à l'échelle micrométrique [41–43]. Le polystyrène (PS) est retrouvé dans les emballages, sous forme expansée pour l'isolation ou bien encore dans les verres de lunettes. Le polyéthylène (PE) à basse densité représente 28 % de la production totale de plastique en Europe [30] et est le plus retrouvé dans l'environnement [38]. Ce polymère thermoplastique ayant une forte résistance aux agents chimiques [44] d'où l'utilisation des MP PE à basse densité notamment dans les emballages, les sacs et les bouteilles plastiques.

Plus spécifiquement, les plus petits fragments appelés nanoplastiques dont la présence a été récemment décrite par Ter Halle et al., (2017) [45] et Gigault et al. (2016) [46] proviennent des nanobilles polymériques (utilisées dans l'industrie) qui peuvent aussi entrer dans l'habitat aquatique. L'accumulation potentielle de ces nouveaux nanomatériaux est préoccupante. De plus, les quantités de nanoplastiques dans l'environnement sont inconnues par le fait de leur très faible taille qui ne permet pas de mesurer leur concentration de manière fiable. Ces nanobilles, également nommées colloïdes polymères, sont grandement utilisées comme renforcement des matériaux, dans les applications médicales (propriétés antimicrobiennes, administration de médicaments...) et dans les produits cosmétiques [47–51]. Ainsi les nanoparticules ont des applications nombreuses et diverses, qui sont dues à leur propriétés spécifiques détaillées ci-dessous.

## **1.2 Propriétés des nanoparticules**

Les nanoparticules représentent une classe spécifique du fait de leurs propriétés physico-chimiques qui diffèrent des matériaux bruts. Une propriété commune à toutes les nanoparticules est la taille nanométrique ( $<100$  nm) dans au moins une des trois dimensions. Cette petite taille leur confère un grand ratio aire de surface/volume qui diffère des matériaux bruts. Cependant elles comportent aussi des autres propriétés qui varient d'un type de nanoparticules à l'autre, pouvant modifier le devenir des nanoparticules au contact de l'environnement aquatique [3]. Ces propriétés physico-chimiques (Figure 1) des nanoparticules vont impacter leurs interactions avec les organismes aquatiques, il est donc important de les caractériser [52] pour comprendre en quoi elles les influencent.



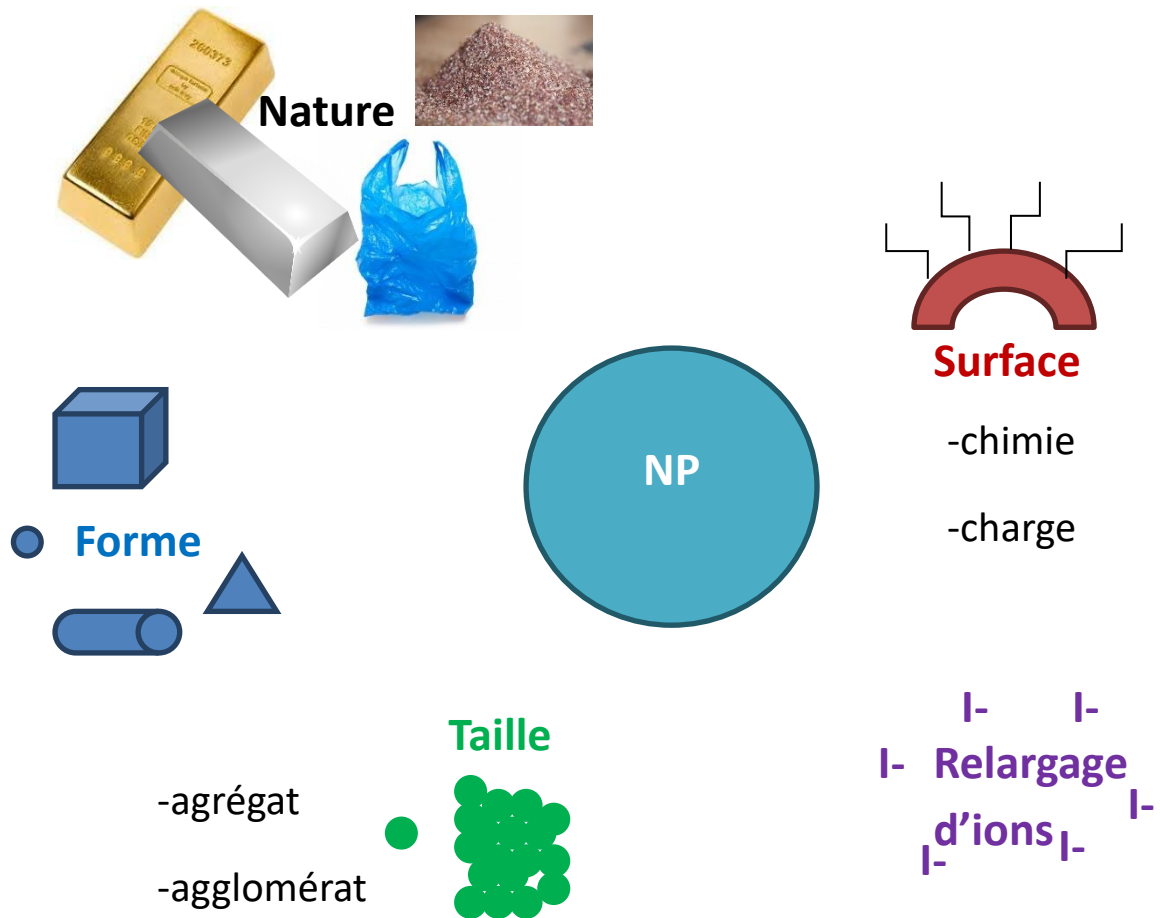


Figure 1 : Propriétés physico-chimiques des nanoparticules

### 1.2.1 Evolution de la nature, forme, taille et concentration des nanoparticules

La nature chimique est un facteur important du devenir des nanoparticules. Elle peut être déterminée, dans la plupart des cas (sauf pour les matières plastiques), par spectroscopie rayons X à énergie dispersive (EDX), par microscopie électronique à balayage (MEB) ou par spectrométrie de masse à plasma à couplage inductif. L'identification de la nature des éléments composant les agglomérats de nanoparticules par analyse EDX a permis de confirmer la présence de nanoparticules d'oxydes métalliques transportées dans les cellules pour les oxydes de nickel [16] et pour les oxydes de cuivre [53]. Au-delà de la nature élémentaire, la connaissance du type de cristallisation et des phases cristallines, par des techniques de rayons X, peut être important pour déterminer le comportement des nanoparticules. Sadiq et al. (2011) [54] ont utilisé la diffraction par rayons X (XRD) sur les nanoparticules de  $\text{TiO}_2$  pour identifier la taille de la phase anatase (17 nm).

Concernant l'évolution de la forme des particules, morphologique et cristallographique, elle peut être suivie par la microscopie électronique à transmission (MET) [54]. L'analyse d'images en microscopie sert aussi à suivre la distribution en taille des nanoparticules. Cela a été réalisé par exemple par Leclerc et Wilkinson pour des nanoparticules d'argent, Pulido-Reyes et al. pour des nanoparticules d'oxyde de cérium et Aruoja et al. pour une étude comparative de nanométaux [26, 55, 56]. De plus, une comparaison des mesures de tailles par MET et DLS (Diffusion dynamique de la lumière) a été réalisée pour des nanoparticules de silice en interaction avec *Pseudokirchneriella subcapitata* [57]. Les auteurs considèrent que la DLS est plus fiable du fait du grand volume analysé et du fait que les nanoparticules peuvent être analysées en solution.

Si la taille primaire des particules est toujours mentionnée, de plus en plus, les études suivant le devenir des nanoparticules, vérifient au cours de l'expérience l'évolution de celle-ci afin de renseigner sur un possible phénomène d'agglomération (liaisons physiques entre les particules faibles) ou d'agrégation (liaisons chimiques fortes). En effet, dans le milieu les nanoparticules peuvent s'agréger ou s'agglomérer entre elles ou avec d'autres substances présentes dans le milieu formant ainsi des blocs qui n'auront plus une taille nanométrique. Pour cela, différentes méthodes existent pour obtenir la distribution en taille des particules comme la spectrométrie de masse par plasma à couplage inductif (ICP-MS) [58] mais la plus commune est la mesure par DLS [17, 51, 66, 57, 59–65]. Cette technique non-invasive permet de caractériser les particules en solution (dans le milieu utilisé lors de l'interaction) par mesure de la distribution de leur rayon hydrodynamique. Après interaction d'un faisceau lumineux avec les particules, le mouvement Brownien des particules génère une diffusion de la lumière à différentes intensités. Ces intensités lumineuses sont mesurées et les diamètres des nanoparticules sont obtenus par la relation de Stokes-Einstein. La DLS est une technique appropriée si la taille des NP est comprise entre 0,5 nm et quelques  $\mu\text{m}$ . Dans leur étude, Wang et al. (2008) [17] ont suivi l'impact de l'interaction sur la taille des NP  $\text{TiO}_2$  (21 nm). Leurs observations ont mis en évidence une agglomération des particules, formant des objets d'environ 900 nm dans le milieu de culture de *Chlamydomonas reinhardtii*, modifiant par-là les propriétés des nanoparticules (par exemple la réduction de leur surface spécifique).

Les nanoparticules pouvant s'agglomérer, leur concentration à l'état nanoparticulaire peut évoluer au cours du temps. Ainsi l'étude de la stabilité des teneurs en particules dans le milieu peut être suivie par des mesures d'absorption en UV-visible d'après certains auteurs. En effet, les mesures des pics d'absorption peuvent être caractéristiques d'espèces chimiques et

donner accès à des informations comme la concentration ou la taille des nanoparticules [67]. Par exemple, Renault et al. (2008) [5] ont observé une diminution de la concentration en nanoparticules d'or dans les eaux d'Arcachon comparée à de l'eau ultrapure par suivi de la concentration des nanoparticules de 10 nm à 520 nm. De plus, Bhattacharya et al. (2010) [68] suggèrent une plus forte absorbance de la bande à 260 nm des polystyrènes adsorbés sur la paroi des microalgues ce qui facilite la quantification de la concentration en nanopolystyrènes dans le milieu.

### 1.2.2 Importance de la chimie et de la charge de la surface des nanoparticules

Etant donné que la propriété spécifique des nanoparticules est leur fort ratio surface/volume, les propriétés de surfaces de ces structures sont donc particulièrement importantes. La plupart des études évaluant la charge des nanoparticules fournissent des éléments sur la nature des interactions et des forces ioniques [11, 51, 71–74, 59–62, 64, 68–70]. La charge de densité est généralement obtenue par mesure de la mobilité électrophorétique renseignant sur le potentiel zêta des particules. L'état de valence des nanoparticules peut être caractérisé par la spectroscopie photoélectronique à rayons X (XPS), comme présenté par Gong et al. (2011) [15] pour les nanoparticules de Ni. Enfin, la caractérisation de la chimie de surface (rayons X) des oxydes de cérium a permis de déterminer le ratio  $Ce^{3+}/Ce^{4+}$  [56]. Ces travaux ont fortement contribué à la compréhension de la stabilité des particules comme Handy et al. (2012) [52] le recommandent. De cette manière, Bhattacharya et al. (2010) [68] ont montré la différence de comportement d'agrégation des nanoparticules, dans un milieu complexe, de même nature chimique mais avec deux surfactants différents.

Ce point est crucial puisque beaucoup de nanoparticules sont synthétisées avec des molécules sur leur surface permettant de stabiliser la dispersion des colloïdes en suspension ou de leur donner des propriétés spécifiques (Annexe Tableau 1-A, B et C). Citrate, amine, polyacrylate ou sodium dodécyl sulfate (SDS) sont fréquemment utilisés comme surfactants des nanoparticules d'or [5, 63] et d'argent [55, 75]. Les nanoparticules de polystyrène ont des groupes amine, carboxyle ou polyéthylèneimine greffés à leur surface pour leur procurer une charge de surface [51, 60, 64, 68, 76]. Ces différents groupements peuvent avoir leur propre toxicité et modifier ainsi les effets d'un même type de particules sur les organismes exposés. Ainsi des récents travaux montrent que les polystyrènes chargées positivement ne sont que légèrement impactés par les facteurs environnementaux et conservent une taille nanométrique

au contraire des particules chargées négativement ou non chargées qui s'agrègent entre elles formant des blocs de l'ordre du micromètre [77].

### 1.2.3 Nanoparticules métalliques, un relargage possible d'ions

Finalement, certains types de nanoparticules en solution peuvent subir un vieillissement avec le temps et ainsi relarguer des ions ou molécules. Cette fraction ionique notamment en ce qui concerne les nanométaux, peut modifier les effets cytotoxiques liés à la présence de nanoparticules. Il est donc devenu nécessaire de quantifier la fraction dissoute dans le milieu [78]. Dans le cas des particules métalliques, la spectrométrie à torche de plasma couplée à un spectromètre de masse (ICP-MS) a été largement utilisée dans l'objectif de quantifier la fraction ionique pour les nanocuvres [73], les nanoparticules de platine et d'argent [7, 55, 65, 79]. La solubilité des nanoparticules d'oxyde de nickel et le taux de bioabsorption dans les cellules ont ainsi été quantifiés [15]. Des techniques dérivées, l'ICP-OES (spectrométrie d'émission optique, mesure à 308 nm) et l'ICP-AES (spectrométrie d'émission atomique) ont permis le suivi d'ions libérés par les NP d' $\text{Al}_2\text{O}_3$  [61] et par les NP de ZnO [80]. Ces dernières se dissolvent en  $\text{Zn}^{2+}$  dont la concentration peut être mesurée par spectroscopie d'absorption atomique par four graphite (GFAAS).

Ainsi, les nanoparticules sont caractérisées par différents paramètres de nature, forme, chimie de surface, charge... Ces nanoparticules qui arrivent dans l'environnement par rejet accidentel ou par les eaux usées peuvent entrer en contact avec le biote aquatique. Pour comprendre quels vont être les mécanismes mis en place par les microalgues par rapport à l'arrivée des nanoparticules dans le milieu environnant, les stratégies de défense des microalgues face aux stress courants vont être premièrement décrites.

## 2 Le "plancton", un modèle d'étude de la réponse au stress

Malgré le fait qu'une partie des déchets plastiques entre dans l'environnement par les rivières, les milieux d'eau douce et les organismes qui y habitent sont peu étudiés dans le contexte de la pollution plastique. C'est pourquoi, nous nous sommes particulièrement intéressés aux organismes d'eaux douces suivants : les microalgues et les daphnies.

### 2.1 Microalgue, un modèle d'étude à l'échelle cellulaire

Beaucoup d'études écotoxicologiques utilisent les algues - incluant les vertes et les brunes - comme modèles pour les expérimentations. Ces organismes unicellulaires peuvent être fortement impactés par différents stress ou pollutions. Les microalgues sont des organismes microscopiques autotrophes, vivant sous forme unicellulaire ou formant des colonies, à la base des chaînes trophiques aquatiques. La part de la

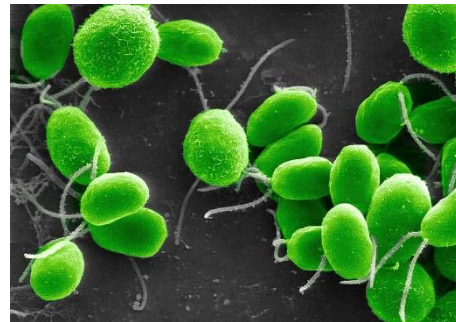


Figure 2 : *Chlamydomonas reinhardtii*  
(source : Université de Vienne)

production primaire due au phytoplancton océanique a été estimée à 40-50 % de la production primaire nette [81, 82]. Ces microorganismes, ont un rôle important dans le confinement du dioxyde de carbone au fond des océans par leur sédimentation en fin de vie [83]. Les microalgues, qui sont présentes dans les écosystèmes d'eau douce et d'eau de mer, peuvent être divisées en deux groupes : les microalgues benthiques qui sont positionnées sur les fonds aquatiques, tandis que les microalgues pélagiques se retrouvent dans la colonne d'eau et forment le phytoplancton avec les cyanophytes. Ce large groupe polyphylétique présente une très grande diversité : les chlorophycées par exemple comptent environ 8 000 espèces décrites et selon Guiry et al. (2012) [84], un tiers serait encore à décrire. L'hypothèse d'endosymbioses successives [85] est communément retenue pour expliquer l'émergence de trois lignées de microalgues. La première des trois lignées constitue les glaucophytes de couleur bleu verte à tendance grise. La seconde lignée est la lignée rouge des rhodophytes à partir de laquelle se serait distinguée la lignée brune renfermant les diatomées - microalgues à frustule ornementé siliceux. Et enfin, une troisième lignée, les chlorophytes ou algues vertes, initialement constituée de microalgues puis de macroalgues puis, de ce groupe, les plantes terrestres auraient divergé [86]. *Chlamydomonas reinhardtii* (Figure 2) appartient à cette dernière lignée et est composée en moyenne de 48 % de protéines, 21 % de lipides et 17 % de polysaccharides (en pourcentage de matière sèche) [87]. Les polysaccharides recensés chez *C. reinhardtii* sont le

glucose (sucre majoritaire), le galactose (aldohexose), le fucose, l'arabinose, le rhamnose, et le mannose [88]. Le xylose (pentose), le fructose (hétérohexose) et le ribose ont également été détectés dans des exopolysaccharides (EPS) excrétés de *C. reinhardtii* [42, 89, 90]. De plus, les polysaccharides font parties des composés, avec les protéines, structurant la paroi glycoprotéique de *C. reinhardtii* qui est riche en hydroxyproline, ce qui est une particularité de cette espèce par rapport aux autres chlorophycées [91]. Chez *C. reinhardtii* la paroi, qui se trouve en contact direct avec le milieu environnant et les contaminants qui y sont présents, est semi-perméable et pas entièrement fermée du fait de l'émergence des flagelles au niveau apical [92, 93].

A plus grande échelle, la position de ces producteurs primaires implique le transfert de leur biomasse le long de la chaîne trophique affectant les organismes les consommant. Les consommateurs primaires peuvent être directement affectés par un manque de nourriture – diminution du stock de microalgues – ou indirectement, par accumulation de plus en plus de polluants via transfert dans leur nourriture [50, 94]. Il est donc intéressant d'étudier également ce niveau trophique que sont les consommateurs primaires.

## 2.2 Daphnie, consommateur primaire d'eau douce

Les daphnies (Figure 3) sont des petits crustacés planctoniques appartenant aux Phyllopoètes (branchiopodes) qui se caractérisent par des pattes aplaties en forme de feuille, permettant de générer un courant d'eau pour leur appareil de filtration. Le genre *Daphnia* appartient aux cladocères, caractérisé par une carapace (coquille sans calcium) [95]. Ces organismes mesurent entre 2 et 6 mm au stade adulte contre 1 mm au stade larvaire. La reproduction chez les daphnies se



Figure 3 : Photo de *Daphnia magna* en nage

fait de manière asexuée (cycle parthénogénétique) en conditions normales. Mais en cas de stress elles deviennent sexuées avec l'engendrement de daphnie mâle (Figure 4). Dans le genre *Daphnia*, les femelles et les mâles sont différenciables. Les mâles sont plus petits, possèdent des antennes plus grandes, leur post-abdomen est modifié et la présence d'un crochet sur les premières pattes peut être observée [95]. Les mâles ont également une couleur orangée et leur vitesse de nage est plus rapide que les femelles. Dans le milieu naturel, les daphnies vivent dans les lacs et les étangs [95] et constituent la partie zooplancton des eaux douces. Ces

consommateurs primaires se nourrissent essentiellement en filtrant de grandes quantités d'eau pour collecter des microalgues vertes. Cependant elles sont aussi capables d'ingérer des particules micro et nanométriques [96, 97]. Ainsi les daphnies peuvent servir de bioindicateurs puisque leur métabolisme va être sensible à la présence des très petites particules et qu'elles représentent le deuxième maillon de la chaîne trophique aquatique après les microalgues. Les daphnies sont d'ailleurs pour cela utilisées comme indicateur sensible et précoce de la qualité de l'eau [98].

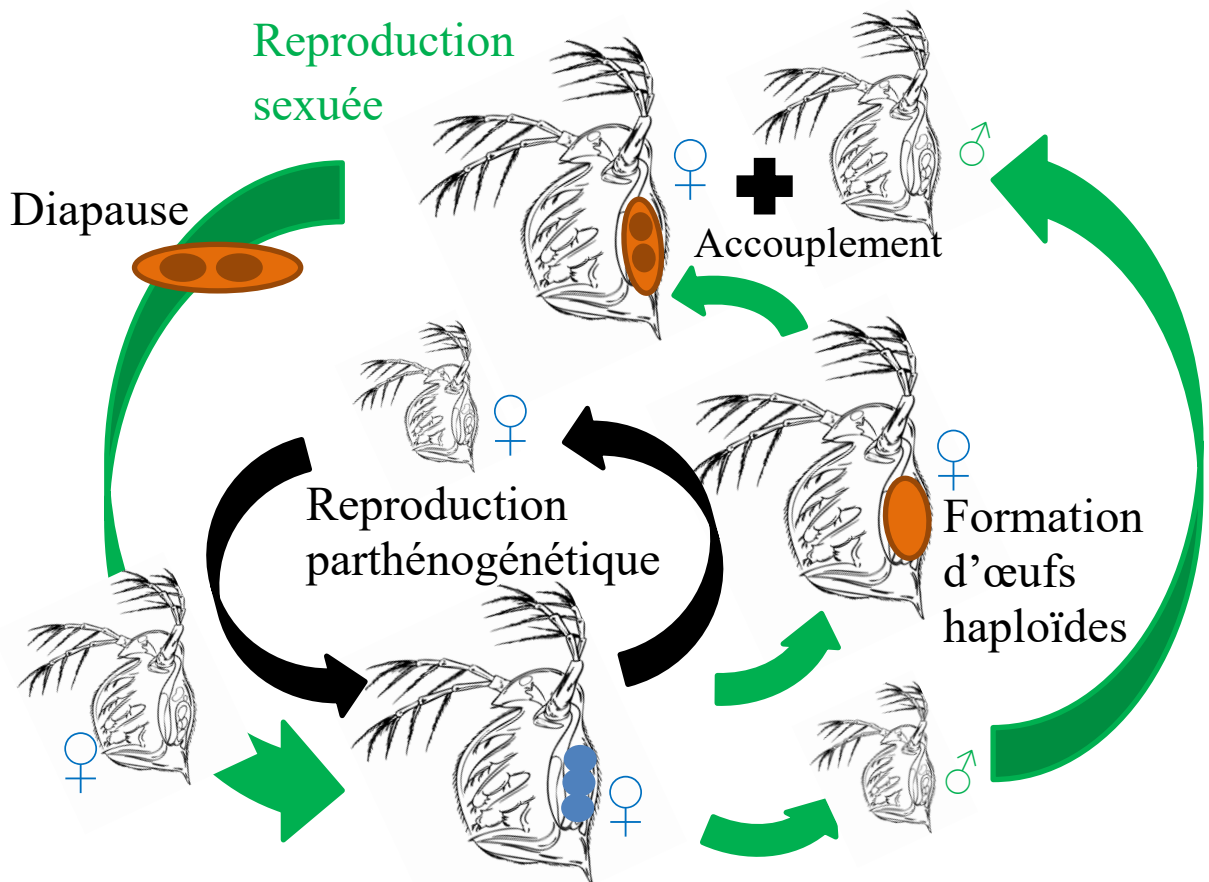


Figure 4 : Cycle de reproduction sexuée et asexuée chez les daphnies (schéma inspiré d'Ebert, 2005 [95]).

La présence de microplastiques (MP) peut entraîner des effets sur les daphnies à différents niveaux : physiologie, alimentation, comportement natatoire et expression génétique.

### 2.2.1 Ingestion des microplastiques et impact sur la physiologie des daphnies

Les daphnies sont capables d'ingérer des MP par la filtration passive. D'après la littérature, les tailles de particules de plastiques ingérées par les daphnies, sont comprises entre 20 nm et 75 µm [99–102]. L'étude de Rehse et al. (2016) [100] a montré que les particules de PE de 100 µm ne pouvaient pas être ingérées. Il est donc important de bien définir la taille des plastiques utilisés pour les expérimentations pour qu'il y ait une possibilité d'ingestion par les daphnies. L'étude d'Ogonowski et al. (2016) [103] comparant l'effet de la nature de microparticules naturelles (kaoline) et plastiques a montré que bien que la taille soit le facteur prépondérant pour l'ingestion, la nature plastiques des particules est un facteur impactant. L'ingestion des MP chez un autre crustacé, le copépode *Parvocalanus crassirostris* a montré des effets indésirables tels qu'une faible reproduction et un changement de comportement natatoire [104]. De plus chez *D. magna*, les études présentent des résultats variables, ainsi d'après Rehse et al. (2016) [100], l'ingestion de PE d'1 µm conduit à l'augmentation de l'immobilisation avec une  $EC_{50} = 57,43$  mg/L après 96 h. Alors que l'ingestion des MP PE plus grosses (63-75 µm, 25-100 mg/L), n'entraîne pas d'effet sur la survie et la reproduction des daphnies [102]. Ces différences peuvent être dues aux temps de présence des MP dans le tube digestif des daphnies variables selon la taille des MP [99].

### 2.2.2 Comportement natatoire des daphnies

Le comportement natatoire des daphnies est un biomarqueur de toxicité multiparamétrique qui permet de définir l'état des daphnies lors de changements environnementaux [105]. Il reflète les changements induits sur des systèmes sensibles (nerveux et endocrinien). Les paramètres mesurables par analyse du comportement natatoire peuvent être la vitesse de nage, la fréquence de saut, la distribution horizontale et verticale, la distance parcourue, la trajectoire de nage, le nombre de tournants, le temps de repos. Les altérations de la migration verticale peuvent être une réponse comportementale à la lumière, la prédation ou la température. Par exemple, la diminution de la vitesse de nage s'explique par une viscosité élevée pour certaines solutions aquatiques [106].



### 2.2.3 Effet à l'échelle moléculaire

La présence de microplastiques au contact des daphnies peut entraîner une réponse moléculaire spécifique. Les protéines de choc thermique HSP60 et HSP70 font partie du système d'alarme et de réparation intracellulaire. Ce système protège l'intégrité des protéines contre les effets négatifs induits par des facteurs de stress environnementaux tels que la chaleur ou des substances toxiques [107]. Certains gènes sont impliqués dans la réponse à la présence de prédateurs dont le gène SERCA (calcium P-ATPase) qui joue un rôle dans la signalisation du calcium cellulaire (enrichissement de la carapace) [108]. Les MP peuvent également interagir dans la réponse au stress oxydatif [109]. Des gènes de la famille GST (glutathion S-transférase), enzyme qui élimine les espèces réactives de l'oxygène à partir de cellules ont été déterminés chez *Daphnia magna* [110]. De plus, dix analogues des hormones juvéniles, servant à réguler différents aspects physiologiques (vitellogénèse, régulation de la production de mâles), ont été détectés chez les daphnies [111].

La comparaison des effets des particules plastiques à différents niveaux trophiques est importante pour comprendre leur impact écologique concret à l'échelle de la communauté. Ici les microalgues représentent le niveau cellulaire mais aussi populationnel, tandis que les daphnies se placent au niveau de l'individu. Cependant plus l'intérêt écologique est grand, plus le système regardé est complexe à étudier et donc plus difficile à comprendre en ce qui concerne les mécanismes et les effets (Figure 5). Du fait de cette complexité, peu d'études incluent des espèces de deux niveaux trophiques. L'étude de Yue et al. (2017) [65] est un des quelques exemples existant avec la comparaison au niveau cellulaire des effets des NP d'argent sur deux niveaux trophiques différents, *Euglena gracilis* (microalgue) et d'*Oncorhynchus mykiss* (poisson). Ainsi Biswas et Sarkar (2019) [3] encouragent notamment à combler le peu d'informations sur la compréhension des effets des nanoparticules sur différentes espèces de différents niveaux trophiques.

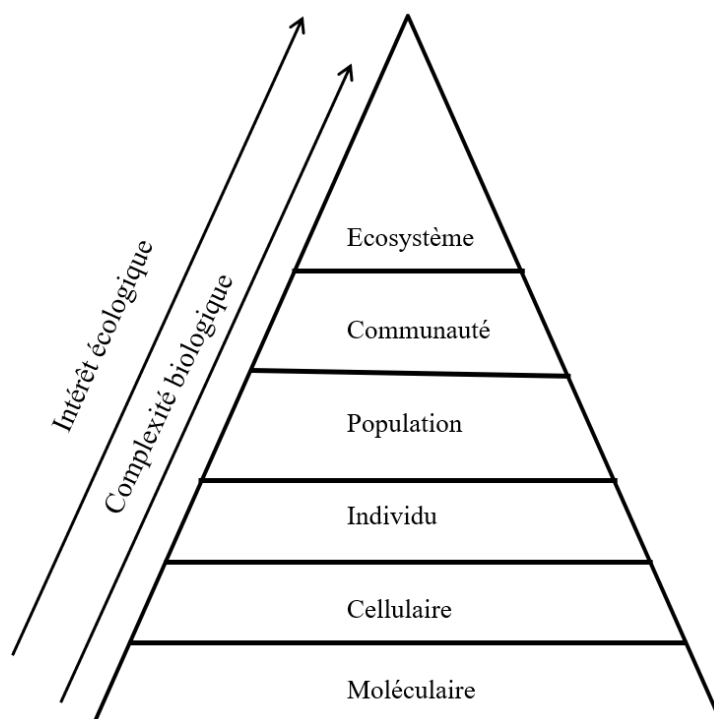


Figure 5 : Schéma des différents niveaux d'études possibles des études écotoxicologiques. L'intérêt écologique s'accroît avec la complexité biologique du système étudié.

### 2.3 Stratégie de défense des microalgues

Dans le but de mieux comprendre les mécanismes impliqués dans les interactions avec microalgues-nanoparticules, les stratégies de réponse des microalgues face à des stress ou polluants sont présentés. Celles-ci permettent aux microalgues de se défendre ou de s'adapter dans des conditions stressantes.

Les réponses à un stress peuvent avoir lieu à trois niveaux :

- \* réponses morphologiques, avec modifications de la taille et forme des cellules comme résultat du contact avec un herbicide [112].
- \* réponses biochimiques, par exemple, la stress azoté induit une accumulation de triacylglycérides (TAG, [113]).
- \* réponses moléculaires, telle que l'induction de la sur-exposition des gènes codant pour la thioredoxine (chélation du cadmium) et la glutathione peroxydase (transformation du  $H_2O_2$  en  $H_2O$ ) chez *C. reinhardtii* en présence du cadmium ( $115 \mu M$ ) pour limiter les dommages dû au stress oxydatif [114].

Dans cette partie, il sera présenté dans un premier temps les réponses aux facteurs environnementaux, puis dans un second temps les réponses aux stress d'origine anthropiques (métaux et plastiques).

### 2.3.1 Réponses des microalgues face aux stress environnementaux

Plusieurs types de stress environnementaux existent naturellement comme les variations de lumière, de température, de salinité ou les carences en éléments nutritifs par exemple (Figure 6). Tous ces stress entraînent des réponses variées des microalgues dont notamment des modifications de productions de certains composés macromoléculaires (composés de stockage, de fonctionnement cellulaire).

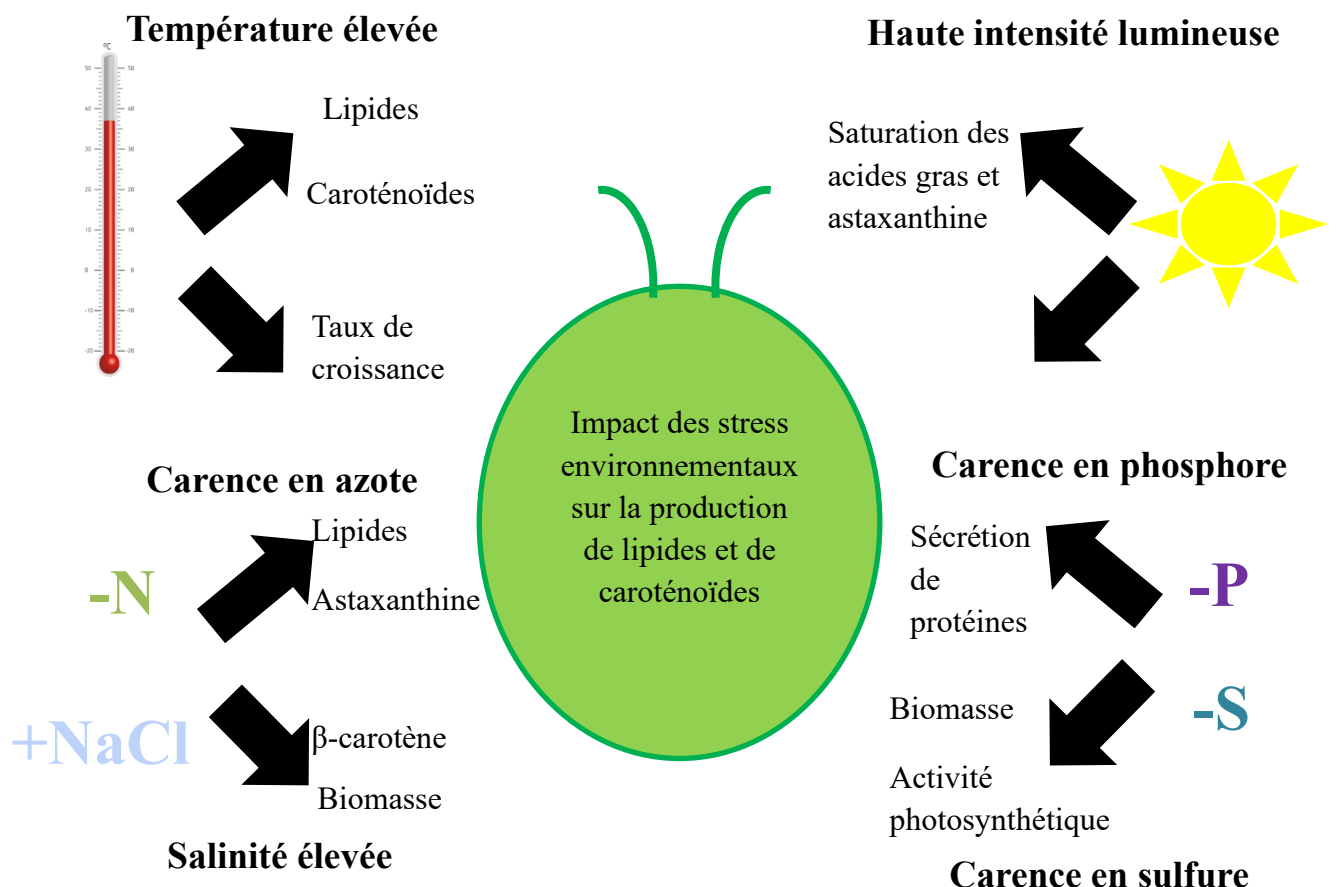


Figure 6 : Synthèse de l'effet des stress environnementaux sur la production de lipides et de caroténoïdes chez les microalgues d'après Minhas et al. (2016), Irihimovitch et al., (2008) et Dean et al. (2008) [115–117].

### 2.3.2 Stress lumineux et l'art de la photoprotection

La lumière est le plus important facteur limitant la croissance des microalgues [115]. L'étude de Nama et al. (2015) [118] présente l'effet sur le système photosynthétique de *Chlamydomonas reinhardtii* d'une forte exposition en lumière (1000, 1500 et 2000  $\mu\text{mol photons m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ ) pendant 1 h. Les changements induits sont mesurés par fluorescence et l'identification des polypeptides des thylakoïdes est réalisée par immunotransfert et par BN-PAGE (électrophorèse en gel polyacrylamide avec marqueur bleu originel). Cette étude décrit les principaux mécanismes de photoprotection chez les algues vertes :

- en premier lieu la phototaxie, phénomène par lequel les cellules se dirigent en fonction de la lumière présente dans leur environnement
- une dissipation de l'énergie lumineuse captée en énergie thermique
- un transport cyclique d'électrons autour du photosystème I
- un système d'élimination des ROS (Reactive Oxygen Species; Formes Réactives de l'Oxygène)
- une voie de photorespiration

Cette variation environnementale entraîne l'endommagement du système de capture de lumière, s'en suit la non transmission efficace de l'énergie d'excitation au centre de réaction photosynthétique et la réduction des complexes des photosystèmes I et II. Les thylakoïdes des cellules exposées montrent des changements considérables au niveau des interactions pigments/pigments et pigments/protéines. Il y a induction d'une perturbation du profil protéique qui amène une baisse du rendement photosynthétique [118] et donc de la croissance.

Pour maintenir un taux de photosynthèse suffisant et protéger l'appareil photosynthétique de potentielles conditions destructives, les microalgues, et les plantes en général, ont développé des mécanismes de régulation pour s'adapter aux fluctuations d'intensité lumineuse [119]. Les pigments comme la chlorophylle, les phycobilines et notamment les caroténoïdes participent à cette régulation [120]. Ces derniers sont des pigments terpénoïdes (tétraterpènes:  $\text{C}_{40}$ ) présentant près de 600 types différents [121]. Chez les microalgues, les caroténoïdes sont généralement localisés dans le chloroplaste, accumulés dans des vésicules, ou bien encore attachés à la membrane ou à d'autres macromolécules [122]. Ces pigments -dits primaires - prennent directement part à la photosynthèse en tant que composants de structure ou de fonction de l'appareil photosynthétique (ex:  $\alpha$  et  $\beta$ -carotènes, lutéine, fucoxanthine, violaxanthine, zéaxanthine et néoxanthine), -ou dits secondaires - synthétisés (ex: astaxanthine,

canthaxanthine, échinénone) de façon extra-plastidique après exposition à un stimulus environnemental spécifique [120]. Chez *C. reinhardtii*, lors de la caroténogénèse de nombreux gènes sont impliqués dans la synthèse des pigments [123, 124, 125]. Parmi ces gènes, deux d'entre eux sont particulièrement intéressants puisqu'ils codent les enzymes impliquées dans la synthèse de l'astaxanthine (3,3'-dihydroxy-4,4'-diketo- $\beta$ -carotène) : la  $\beta$ -carotène hydrolase (CHYb) et la  $\beta$ -carotène kétolase (BKT ou CrtO) ([124], Figure 7). Présent dans les corps lipidiques à l'extérieur du chloroplaste [125], ce kétocaroténoïde (pigment rouge) protège l'algue de plusieurs formes de stress [126]. Ainsi l'augmentation de l'intensité lumineuse résulte en une augmentation de l'astaxanthine et du  $\beta$ -carotène dont il est issu [115].

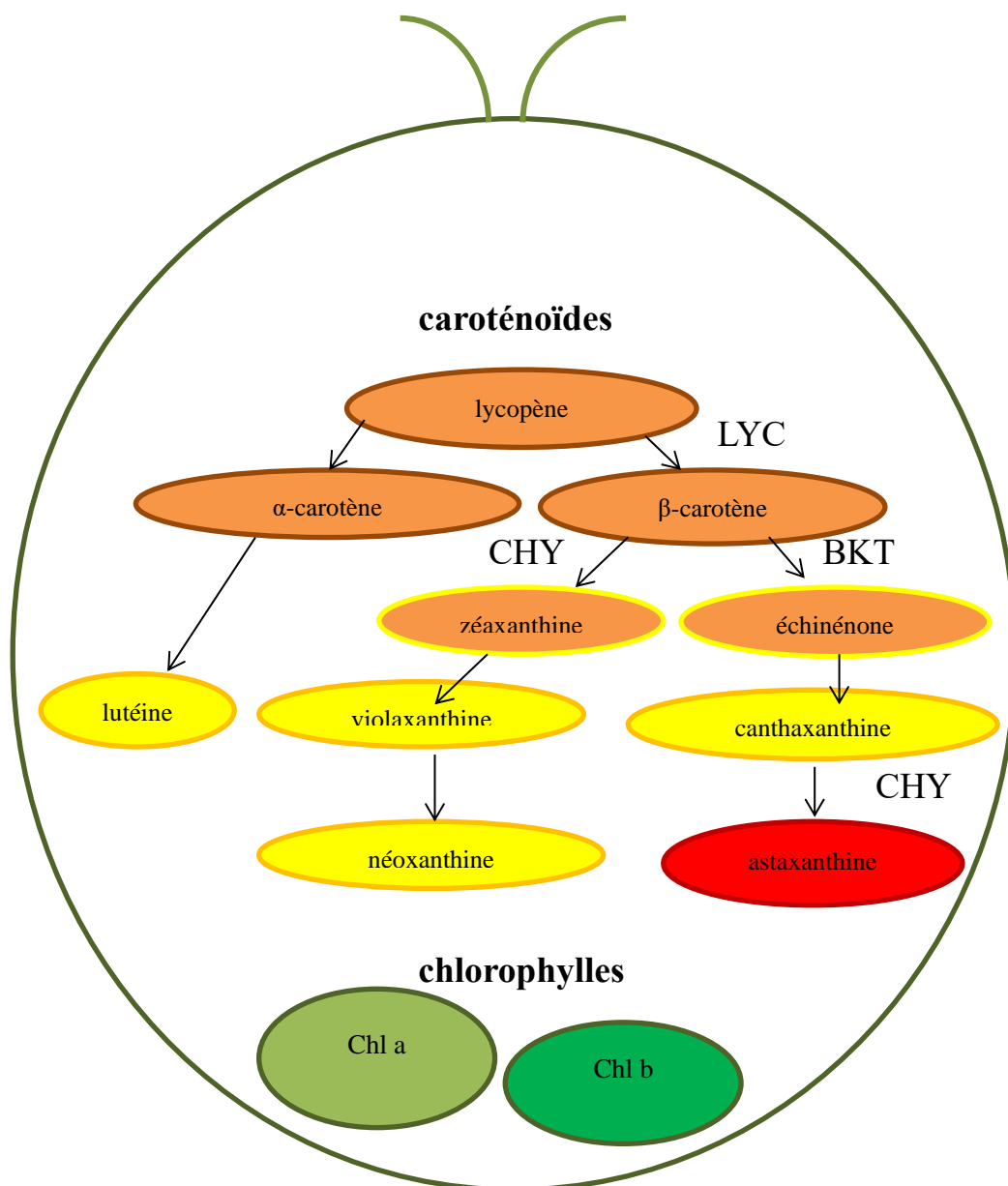


Figure 7 : Voies de biosynthèse des principaux caroténoïdes chez les microalgues vertes (d'après Lee et al. 2018 et Mulders et al. 2014 [127, 128]).

### 2.3.3 Stress thermique : attention ça chauffe !

La température est le deuxième facteur limitant le bon état physiologique des microalgues. La plupart d'entre elles sont capables de tolérer des températures inférieures à 15 °C de leur température optimale mais ne peuvent excéder 2-4 °C au-dessus de cette température [129]. Une élévation de la température augmente le stress photo-oxydatif résultant en l'accumulation croissante des caroténoïdes [130]. Le stress oxydatif est considéré comme "un stress secondaire" qui accompagne notamment les stress thermique et métallique. La production excessive de ROS provoque des dommages au niveau de l'ADN, la peroxydation des lipides membranaires ou encore l'oxydation des protéines [131]. Afin de se protéger des peroxydations, les cellules ont développé des systèmes de défense, appelés antioxydants. Choi et Lee (2012) [132] ont montré par électrophorèse à deux dimensions chez une microalgue antarctique, qu'il y a une augmentation de l'activité protéique d'enzymes de détoxification : la catalase (cat), l'ascorbate peroxydase (apx) et l'aldéhyde déhydrogénase (aldh) après une forte augmentation de température.

### 2.3.4 Stress salin : les microalgues reines de l'adaptation

La salinité est un facteur de stress pour les organismes aquatiques rendant parfois impossible leur survie. Cependant les microalgues, par leur structure, s'adaptent plus facilement à une large gamme de salinité que les organismes plus évolués. Le stress salin peut accroître la production de lipides des microalgues, par exemple l'étude de Ho et al. (2014) [133] a montré une haute production (223 mg lipides/L/jour) chez la souche JSCC4 de *Chlamydomonas*. La salinité a également un impact sur l'augmentation de la production d'astaxanthine et de  $\beta$ -carotène [115, 134]. Un autre caroténoïde, la lutéine, voit sa teneur augmenter chez *Botryococcus braunii* en présence de sel [135]. La lutéine est considérée comme le caroténoïde majeur du maintien de l'intégrité membranaire [115, 126]. De même, chez *Dunaliella salina* la production d'EPS augmente (994 mg/L d'EPS produit) parallèlement à l'élévation de la salinité du milieu environnant (5M de NaCl, [89]). La capacité des cellules de *Dunaliella salina* à survivre à une grande plage de concentration en sel peut être attribuée à l'excrétion d'EPS qui lui servent de protection. Ces EPS sont composés de quatre monosaccharides détectés par analyse HPLC (chromatographie en phase liquide à haute performance) : fructose (sucre majoritaire), glucose, galactose et xylose.

### 2.3.5 Stress nutritif et son impact sur le métabolisme

Les nutriments sont essentiels au fonctionnement normal des microalgues. Le stress azoté entraîne une carence et une augmentation de la production de caroténoïdes secondaires ainsi qu'une compétition d'allocation du carbone qui est requis également pour la synthèse de protéines [136]. Illman et al. (2000) [137] ont montré que la réduction de nitrate dans le milieu augmente le contenu lipidique de cinq souches de microalgues vertes *Chlorella*. L'accumulation de lipides, dans des organites appelés gouttelettes lipidiques est recensée aussi chez *C. reinhardtii*, sous forme de TAG en cas de carence en azote [138]. Dans l'étude de Miller et al. (2010) [113], il a été montré par analyse comparative des transcrits, l'activation d'un sous ensemble de gènes de contrôle impliqués dans la gamétogénèse qui régulent à la baisse la biosynthèse des protéines, lors d'une carence en azote. S'en suit une redirection du métabolisme : la source de carbone primaire, l'acétate, n'est plus convertie en bloc de cellules par le cycle glyoxylate et la gluconéogenèse mais rentre directement dans la biosynthèse d'acides gras. Ainsi comme beaucoup de microalgues, *Chlamydomonas reinhardtii* forme des gouttelettes lipidiques riches en TAG lors d'une carence en nutriment [113]. Le stress nutritif est utilisé notamment pour augmenter la production des composés à haute valeur ajoutée des microalgues comme les lipides, polysaccharides, protéines et pigments [139], les caroténoïdes (lutéine, zéaxanthine et astaxanthine), les acides gras polyinsaturés et vitamines [120, 128, 140].

Quant à l'absence de phosphore ou de soufre dans le milieu, cela résulte en la répression de la photosynthèse et dans l'arrêt de la division cellulaire [116, 141–143]. Le phosphore est stocké principalement sous forme de polyphosphates chez *Chlamydomonas* [144, 145]. En cas de carence, il y a une sécrétion de protéines appelées phosphatases extracellulaires pour cliver l'élément phosphore des composés organiques, se traduisant par une augmentation du niveau de transcrite codant la phosphatase alcaline PHOX [146]. De même pour la carence en soufre, une sécrétion de protéines extracellulaires a lieu : les sulfatases comme l'arylsulfatase, qui sont capable de cliver les anions sulfate des sulfates organiques estérifiés [147] par exemple. Une augmentation des niveaux d'activités des enzymes d'assimilation de soufre, ATP sulfurylase, APS (5'-adénylyl sulfate) réductase, Ser acétyltransférase et O-acétyl-Ser(thiol)lyase, est également observée par Zhang et al. (2004) [148]. Le soufre n'a pas de compartiment de stockage chez *Chlamydomonas*. En cas de carence en cet élément une diminution rapide de l'activité photosynthétique, accompagnée par un déclin du transport d'électrons du photosystème II [142] et une production d'H<sub>2</sub> [149, 150] est induite. Ainsi les stress

environnementaux entraînent une variété de réponse moléculaire et biochimique stress dépendants et sans doute microalgues dépendantes.

## 2.4 Réponse des microalgues à certains stress induits par les activités humaines

Les activités anthropiques entraînent notamment l'augmentation du CO<sub>2</sub>, la présence de particules métalliques, plastiques et des nanomatériaux dans l'environnement aquatique. Qu'en est-il des mécanismes de réponse des microalgues à ces stress ?

### 2.4.1 Augmentation du dioxyde de carbone (CO<sub>2</sub>)

La teneur en CO<sub>2</sub> peut influencer le métabolisme des microalgues. Dans le cas du réchauffement climatique ce facteur pourrait avoir des conséquences sévères sur l'écophysiologie des microalgues [151]. Chiu et al. (2009) [152] montrent une augmentation de la biomasse et une accumulation de lipides avec l'augmentation de CO<sub>2</sub> (aération) dans les cultures de *Nannochloropsis oculata*.

### 2.4.2 Stress dus à des métaux ou particules métalliques

Le cadmium a été beaucoup étudié pour tester le stress métallique sur les microalgues. Premièrement, Jamers et al. (2009) [153] ont montré que *C. reinhardtii* modifiait sa taille et sa granularité cellulaire en présence de cadmium (Cd). De plus, dans cette étude, *C. reinhardtii* présente un contenu significativement plus faible en chlorophylle que le contrôle, après 72 h d'exposition à 100 µM Cd. Deuxièmement, la production de composés peut avoir lieu en présence de particules métalliques, tel que le présente l'étude de Liu et al. (2008) [154] indiquant qu'à une concentration élevée en fer, une accumulation considérable de lipides chez *C. vulgaris* est observée. Troisièmement, l'exposition aux métaux lourds peut entraîner un mécanisme de peroxydation lipidique et la formation de ROS, notamment par la présence d'ions métalliques, comme le Cd<sup>2+</sup> [153]. Szivák et al. (2009) [155] ont testé la capacité de plusieurs métaux avec activité d'oxydoréduction (Fe<sub>3</sub>, Cu<sub>2</sub>, Ag<sub>1</sub>, Cr<sub>3</sub>, Cr<sub>6</sub>) et sans activité d'oxydoréduction (Pb<sub>2</sub>, Cd<sub>2</sub>, Zn<sub>2</sub>) et des métalloïdes (As<sub>3</sub>, As<sub>5</sub>) à créer des dommages oxydatifs chez *C. reinhardtii*. La détection de l'accumulation intracellulaire des ROS a été réalisée par la



cytométrie en flux à l'aide du fluorophore H<sub>2</sub>DFFDA (difluorodihydrofluorescéine). Des faibles concentrations (10<sup>-6</sup> à 10<sup>-9</sup> M) de ces métaux ont entraîné une production élevée de ROS intracellulaires, sauf pour As<sub>3</sub> et Cr<sub>3</sub>, selon des intensités diverses en fonction de la nature des métaux. [155]. De plus, l'exposition des microalgues au cadmium résulte aussi en une augmentation de l'activité estérase, détectée par fluorescence, pouvant indiquer la présence d'une possible activité de détoxification [153]. D'autre part, les phytochélatines, polypeptides capables de confiner les métaux, sont synthétisées par voie enzymatique post-traductionnelle par *C. reinhardtii* pour évacuer les éléments traces métalliques (TME) de la cellule [156]. Après une exposition à 150 µM de cadmium, l'effet le plus drastique observé est la diminution en abondance des oxygénase et carboxylase des sous-unités du ribulose 1,5-biphosphate. Pour limiter les dommages dus au stress oxydatif, *C. reinhardtii* va induire la sur-expression des gènes codant la thioredoxine (chélation du cadmium) et la glutathione peroxydase (transformation du H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> en H<sub>2</sub>O) en présence du cadmium (115 µM) [114]. Concernant l'expression des gènes de la biosynthèse des acides gras, des acides aminés et des protéines, ils sont sous-exprimés dans cette étude. Tandis que les protéines impliquées dans le métabolisme de l'ATP et dans la réponse au stress oxydatif sont sur-exprimées en présence du cadmium [114, 157].

#### 2.4.3 Les plastiques peuvent-ils être un stress ?

Du fait de leur présence dans une grande partie de la colonne d'eau, les microalgues peuvent interagir avec un grand nombre de matériaux particuliers de différentes densités. Les plastiques peuvent se retrouver à différentes échelles de taille dans la colonne d'eau par des mécanismes de fragmentation physique, par le vieillissement [31] et de dégradation par des organismes (bio-détérioration, bio-fragmentation, assimilation et minéralisation) [158]. Les études d'expositions de microalgues aux micro et nanoplastiques sont assez récentes. A l'échelle micro, les particules de polyéthylène (1-5 µm, concentrations testées : 0,05 à 1,48 mg/L) en contact avec *Tetraselmis chui* (microalgue marine) pendant 3 jours n'ont pas montré d'effet sur sa croissance [41]. De même sur de plus longues expositions, la présence de microplastiques (>400 µm) de PP et de polyéthylène à haute densité (HDPE) n'impacte pas la croissance des microalgues *C. reinhardtii* avant 63 jours. C'est seulement après 78 jours qu'une décroissance significative pour PP et non significative pour HDPE est observée [42]. D'autres études au contraire suggèrent qu'en fonction de la taille des plastiques la croissance algale

pourrait être impactée. Par exemple, des MP PS de 6  $\mu\text{m}$  présentent de faibles effets sur la croissance de *D. tertiolecta* (réduction <10 %) et concernant le PVC, chez *Skeletonema costatum*, un phénomène d'inhibition de croissance en présence des particules les plus petites (1  $\mu\text{m}$ , [43]) a également été relevé. Ainsi l'effet des particules de plastique semble directement lié à la taille de la particule [76] et évidemment à la concentration en particules [43]. Au-delà d'effets sur la croissance, une agrégation des particules de polymère avec les microalgues a été observée chez différentes espèces de phytoplancton (*C. reinhardtii*, *Chaetoceros neogracile*, *Rhodomonas salina*, *S. costatum*) avec des impacts possibles sur leur position dans la colonne d'eau [39, 42, 43].

Par contre, la taille des particules de plastiques n'apparaît pas comme un facteur influençant la photosynthèse des microalgues [76] au contraire de la concentration et de la nature des microplastiques [43, 68]. Enfin, les microalgues peuvent adsorber à leur surface certains microplastiques de faible taille et ces derniers peuvent recouvrir leurs pores, entraînant une limitation des transferts d'énergie, d' $\text{O}_2/\text{CO}_2$  et des substances nutritives [43].

Ainsi l'interaction de matériaux anthropiques (métaux, plastiques) entraîne des dommages et effets néfastes au développement normal des microalgues. Qu'en est-il des nanomatériaux ? Peut-on considérer qu'ils sont toxiques pour les microalgues ? Celles-ci, ont-elles développé des mécanismes de protection spécifique pour se protéger des nanoparticules ? Et au-delà de leur impact, quel est le devenir des nanomatériaux en interaction avec des cellules ? Peuvent-ils passer les barrières physiques des microalgues ? Est-ce que leur présence peut modifier la biochimie cellulaire ? L'étude de la littérature sur les interactions nanoparticules-microalgues présentée ci-dessous va tenter de fournir des éléments de réponse à ces questions.

### 3 Interactions microalgues-nanoparticules : mécanismes et effets associés

Plusieurs types d'interaction entre les microalgues et les nanoparticules sont possibles et sont résumés dans la Figure 8 : ombrage, relargage d'ions, adsorption, absorption et désorganisation de la paroi. Les interactions nanoparticules-microalgues peuvent induire des changements dans l'état des microalgues (physiologique, biochimique et moléculaire). La présence des nanoparticules au contact des microalgues peut engendrer plusieurs effets : impact sur sa multiplication, sur ses barrières physiques, sur son fonctionnement cellulaire et sur ses gènes.

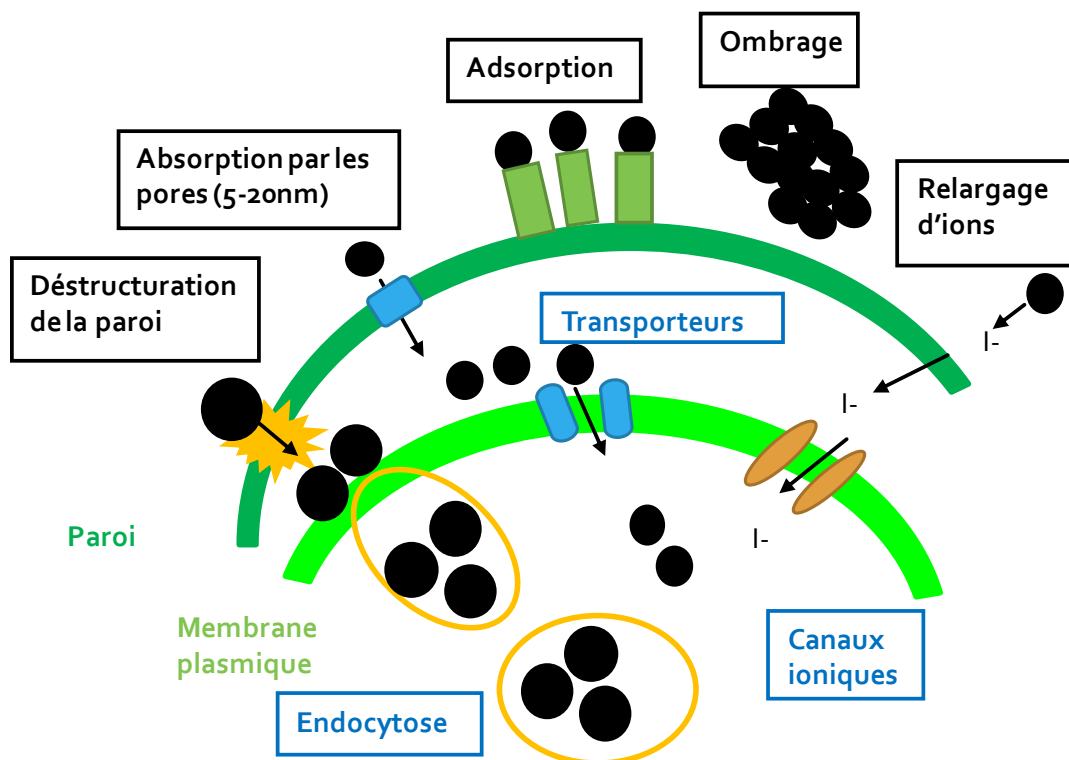


Figure 8 : Potentielles interactions des nanoparticules avec les barrières de la microalgue (paroi et membrane plasmique) : libération d'ions (absorption par les canaux ioniques), effet d'ombrage, adsorption (bloque les échanges d'ions) et absorption par les pores, destruction de la paroi et endocytose.

#### 3.1 Impacts sur la croissance des microalgues

Tous les types d'interactions peuvent impacter la croissance des microalgues, qui est le paramètre le plus communément suivi. Plusieurs études ont d'ailleurs montré une inhibition de la croissance de *P. subcapitata* au contact avec des nanoparticules de Zn et de TiO<sub>2</sub> [11] mais

aussi des nanoparticules d'argent et de platine [7], ainsi que de la croissance de *Scenedesmus obliquus* en présence de NP PS (70 nm) [50]. L'exposition de *D. tertiolecta* à des NP PS de 50 nm (concentration 250 mg/L, neutre) entraîne une réduction de croissance de 45 % par rapport au contrôle alors que pour des particules plus grosses (500 nm), la réduction du taux de croissance est de 13 % [76].

D'autres études évaluent la santé des microalgues en mesurant la densité cellulaire et la fluorescence de la chlorophylle par cytométrie en flux [71, 73, 74, 159, 160]. Après interaction avec des nanoparticules de cuivre par exemple [160], une réduction des dimensions cellulaires a été observée après exposition à des nanoparticules d'AgNO<sub>3</sub> (chez *Chlorella autotrophica*) et des nanoparticules d'or (*S. subspicatus*) à des concentrations respectives de 5 mg/L et 1,6x10<sup>-6</sup> mg/L [5, 74]. De plus, une augmentation de la complexité cellulaire (granularité) est observée chez *C. autotrophica* après 24 h de contact avec des nanoparticules d'argent et de cérium [74]. Selon Saison et al. (2010) [69], les nanoparticules de CeO augmentent aussi la granularité et induisent un phénomène d'agrégation. L'agrégation peut être accompagnée d'une perte de coloration de la cellule, comme chez *Chlorella kessleri* en présence de nanoparticules de silice (5 nm) [25].

### **3.2 Ombrage : effet sur l'activité photosynthétique**

La réduction de la lumière captée à cause de la présence de particules dans leur milieu, appelée phénomène d'ombrage, a été décrite par Schwab et al. (2011) et Cheloni et al. (2016) [73, 161]. Les auteurs ont montré une corrélation entre l'inhibition de la photosynthèse et l'ombrage en présence de nanoparticules de carbone et de CuO. Chen et al. (2018) [66] ont mis en évidence une corrélation entre l'inhibition de croissance et l'ombrage chez trois espèces de microalgues (*Platymonas subcordiformis*, *Chaetoceros curvisetus* et *Skeletonema costatum*) en présence de nanoparticules de carbone, d'oxyde de cuivre et de cobalt. De même, l'augmentation de la turbidité du milieu due à la présence d'agglomérats de NP PS serait responsable de l'inhibition de croissance de *P. subcapitata* [51]. Néanmoins, l'expérience d'ombrage avec des NP TiO<sub>2</sub> sur *Isochrysis galbana*, n'a pas montré d'impact significatif sur la photosynthèse de la microalgue marine [162] et globalement peu d'études prennent en compte cet effet d'ombrage.

Cependant, comme discuté au paragraphe 2.3.2, la diminution de la quantité de lumière impacte directement la photosynthèse. Ce mécanisme clé du fonctionnement des cellules algales, est quant à lui fréquemment exploré dans les interactions [43, 68, 163], par l'analyse de la photoinhibition du photosystème II par exemple [69]. Pendant la photosynthèse, le CO<sub>2</sub> et l'eau sont captés et transformés en glucides et O<sub>2</sub> sous l'effet de la lumière. Par le suivi de la réduction du CO<sub>2</sub>, l'altération du fonctionnement de la photosynthèse algale peut également être mise en évidence et informe sur un possible phénomène de respiration cellulaire [68]. De manière concise, la photosynthèse peut être impactée de deux façons : soit indirectement par réduction de la lumière capturée [73] ou soit directement par photoinhibition du photosystème II et photocatalyse [163]. Concernant la présence de nanoparticules, chez *C. reinhardtii* un mécanisme de photoinhibition du photosystème II (PS II) a été révélé en présence de nanoparticules d'oxyde de cérium recouvertes par du polystyrène (80 nm; 0,01 g/L), ce qui a conduit à une détérioration de la chlorophylle [69]. De plus, des chercheurs ont pu montrer la sensibilité du système photosynthétique en présence de nanoparticules, se traduisant par une baisse de l'activité photosynthétique [160].

### 3.3 Relargage d'ions : source de stress

Les nanoparticules en solution peuvent relarguer des ions et cela est particulièrement fréquent dans le cas de nanoparticules d'oxydes métalliques. Il devient alors difficile de distinguer si un effet observé est dû aux particules ou à ces ions. Concernant les études sur les nanoparticules d'argent (Tableau 1), la plupart ont rapporté une internalisation chez plusieurs types de microalgues (*C. reinhardtii*, *C. vulgaris*, *S. obliquus* et *E. gracilis*) due à la libération d'ions Ag<sup>+</sup> et à l'agglomération des ions dans la cellule par la suite [7, 54, 65, 164–167]. Cependant, la présence de cystéine peut permettre de bloquer les ions Ag<sup>+</sup> par complexation [55].

Si celui-ci n'est pas bloqué, le relargage d'ions peut induire un stress oxydatif et des effets sur la photosynthèse des microalgues, comme cela a été rapporté pour les nanoparticules de CuO [69, 70, 160]. Quelques nanoparticules comme Zn et TiO<sub>2</sub> par le relargage d'ions induisent un phénomène de photocatalyse chez *P. subcapitata* [168], conduisant à la formation de ROS. Le stress oxydatif se produit fréquemment après chaque modification environnementale [169]. De plus, c'est un mécanisme communément rapporté après un contact avec des nanoparticules réactives comme les oxydes et les particules qui peuvent en partie être dissoutes en ions. Les

dommages oxydatifs peuvent être dus au transfert d'électrons d'une chaîne respiratoire désorganisée à l'oxygène formant des radicaux et peuvent être mesurés par résonance électronique de spin (ESR). La formation de ROS chez plusieurs types de microalgues exposées à des nanoparticules a été mise en évidence par détection de la fluorescence de DCFH-DA (2,7-dichlorodihydrofluorescein diacétate) [69, 160].

L'augmentation de l'activité enzymatique de la glutathione S transférase (GST) a été observée chez *C. vulgaris* après interaction avec des nanoparticules de TiO<sub>2</sub>. Ceci indique la mise en place de la réparation des macromolécules oxydées, signe de la défense cellulaire des microalgues [170]. En parallèle, il a été montré par Leclerc et Wilkinson (2014) [55] que les ions Ag<sup>+</sup> relargués par les nanoparticules d'argent induisent la production de ROS responsables de la toxicité des nanoparticules d'argent sur *C. reinhardtii*. De plus chez cette espèce, le test de la malondialdéhyde (MDA) a montré une peroxydation lipidique en présence de NP TiO<sub>2</sub> (10 mg/L) [17].

### **3.4 Paroi et membrane plasmique : au contact des nanoparticules**

Chez *C. reinhardtii*, l'augmentation de la concentration en ROS est couplée avec une peroxydation des membranes lipidiques en présence de CuO à 1000 mg/L [159]. Ainsi d'importants dommages cellulaires peuvent découler de la formation de ROS comme une perte de la fluidité membranaire et l'oxydation de lipides insaturés... [4, 26, 172, 56, 59, 61, 68–70, 159, 171].

Par ailleurs, les nanoparticules peuvent heurter physiquement les microalgues et impacter par choc leurs barrières physiques (paroi et membrane plasmique). Des nanoparticules d'Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> à 1 µg/mL ont engendré des dommages membranaires chez *C. ellipsoïds* [61]. Les changements peuvent apparaître au niveau de l'intégrité de la membrane cellulaire. Une augmentation de l'enzyme cytolitique lactate déhydrogénase (LDH) dans le milieu environnant a révélé des dommages membranaires chez *C. ellipsoïds* en présence de NP d'Al<sup>3+</sup> (86 nm) [61]. Le marquage à l'iodure de propidium (fluorophore) s'intercale dans les brins d'acides nucléiques des cellules aux membranes endommagées. Ce test permet de mesurer la perte d'intégrité de la membrane chez la diatomée *Nitzschia closterium* en présence de NP TiO<sub>2</sub> [173]. Des études sur *C. vulgaris* ont présenté une déstructuration de la membrane en présence de nanoparticules de NiO [15] et de ZnO [21]. Ces impacts sur la membrane peuvent entraîner des conséquences sur

le métabolisme cellulaire. Melegari et al. (2013) [159] ont démontré, par exemple, en présence de CuO, une diminution de l'activité de l'estérase, essentielle pour le métabolisme de la membrane phospholipidique chez *C. reinhardtii* [174].

L'altération structurale des microalgues a montré une distorsion de la paroi résultant d'une interaction de *P. subcapitata* avec des nanoparticules de Zn [11]. L'énergie nécessaire à la désorganisation de la paroi chez *Tetraselmis suecica* a été mesurée par AFM [168]. De plus, la présence des nanoparticules de TiO<sub>2</sub> génère la peroxydation de groupes fonctionnels au niveau de la paroi et de la membrane. Les dommages au niveau des chaînes phospholipidiques de *C. reinhardtii* sont révélés par analyse infrarouge et MEB [175]. La paroi et la membrane plasmique sont donc des compartiments cellulaires qui peuvent être respectivement affectés par les impacts physiques ou biochimiques des nanoparticules.

### **3.5 Adsorption : conséquences de la présence des NP en surface**

Une question clé soulevée par beaucoup de chercheurs est de savoir si oui ou non ces nanoparticules peuvent être adsorbées ou si un phénomène d'absorption peut apparaître donnant lieu à une internalisation des particules. La localisation des nanoparticules à la surface (adsorption) ou dans les cellules (absorption) est seulement partiellement possible car les résolutions nanométriques sont encore difficiles à atteindre lorsqu'il s'agit de regarder des interactions.

Les travaux de Balusamy et al. (2015) [22] ont démontré l'attachement des nanoparticules de La<sub>2</sub>O<sub>3</sub> sur les microalgues sans produire de changements morphologiques chez *Chlorella* sp.. Au contraire, l'interaction de nanoparticules de TiO<sub>2</sub> avec *C. reinhardtii* a conduit à des modifications morphologiques de la surface [175]. D'autres auteurs ont montré que les nanoparticules de TiO<sub>2</sub> semblent recouvrir *P. subcapitata* en plusieurs couches non uniformes [176].

De plus, il a été montré que les nanoparticules d'oxyde de cérium sont détectées à la surface mais pas à l'intérieur de *P. subcapitata* [56]. Nolte et al. (2016) [51] ont observé par topographie de surface une paroi avec une structure fibrillaire offrant de nombreux points d'attache pour des nanobilles de polystyrène, avec une adsorption préférentielle des PS-NH<sub>2</sub>. L'iodure de propidium utilisé après des interactions entre nanoparticules de ZnO avec *P. subcapitata* met

en évidence les interactions des NP avec des sites de surface de la paroi conduisant à sa déformation morphologique et à la perte d'intégrité membranaire [21].

Van Hoecke et al. (2008) [57] ont examiné l'adhésion des nanoparticules de silice à la surface de *P. subcapitata*. Ce phénomène d'adsorption a aussi été rapporté dans le cas de particules de CeO chez *P. subcapitata* et *C. reinhardtii* [56, 177]. L'attachement à la paroi peut entraîner une désorganisation physiologique de la paroi des microalgues, comme un obstacle à la photosynthèse chez *Chlorella* en présence de nanopolystyrène [68] ou une désorganisation des thylakoïdes, effet suggéré pour des nanoparticules de cobalt par Chen et al. (2018) [66] suite aux observations de Hui et al. (2010) [178]. Il a été démontré qu'après adhésion, les nanoparticules de TiO<sub>2</sub> peuvent aussi perturber la paroi cellulaire, donnant lieu à une plasmolyse [173]. De plus, la plasmolyse, phénomène de perte d'eau par la cellule, est aussi induite après l'adhésion de nanoparticules de NiO chez *C. vulgaris* [15].

Dans le cas des plastiques, les mécanismes d'adsorption ont été très étudiés avec les microplastiques [42]. A cette taille, il a été montré que les microalgues forment des hétéro-agrégats cohésifs avec les plastiques par excrétion des substances exopolymériques (EPS) conduisant à leur sédimentation [39]. A l'échelle nanométrique, l'adsorption des nanoplastiques a été observée sur *Scenedesmus* et *Chlorella* [68]. Cette adsorption serait favorisée dans le cas de PS chargées positivement qui adsorbent plus sur les membranes cellulaires comparés à celles chargées négativement [40, 51].

### **3.6 Absorption : et si les nanoparticules entraînent dans les microalgues ?**

L'absorption de nanoparticules semble adopter deux voies, une naturelle via les pores de la paroi car celle-ci est semi-perméable et peut permettre le passage de très petites particules (< 20 nm) [163]. Ensuite le passage de la membrane peut s'effectuer par un transporteur membranaire, l'expression des ARN messagers de la protéine CTR<sub>2</sub> (transporteur de cuivre) en présence de NP Ag et d'Ag<sup>+</sup> chez *C. reinhardtii* confirme cette hypothèse [55].

Une autre voie d'entrée possible des nanoparticules est via un mécanisme de déstructuration de la paroi [71, 177]. L'internalisation de nanoparticules d'argent, de cérium et de silice a été observée par la microscopie électronique à transmission (MET) [25, 166, 179]. Une fois que les nanoparticules sont absorbées, dans quels compartiments cellulaires vont-elles être retrouver ? Des agglomérats de nanoparticules de NiO ont été observés dans le cytoplasme de *C. vulgaris*



[15, 16]. Ceci laisse supposer que l'absorption des nanoparticules s'est réalisée par désorganisation des barrières de la microalgue. De la même manière, des agrégats de CuO d'une centaine de nanomètre sont retrouvés chez *C. reinhardtii* dans le cytoplasme et les vacuoles [70]. De plus chez cette même espèce, les nanoparticules de CeO sont localisées autour des cellules et dans des vésicules intracellulaires [179].

### 3.7 Impact au niveau des gènes

La présence des nanoparticules au contact des microalgues peut les impacter, morphologiquement et biochimiquement, qu'en est-il au niveau de leur fonctionnement moléculaire ? Une approche transcriptomique a été proposée par Taylor et al. (2016) [179], consistant en une étude des protéines impliquées dans la photosynthèse suite à des interactions entre NP CeO et *C. reinhardtii*. Simon et al. (2013) [165] rapportent pour *C. reinhardtii* une baisse du niveau de transcrit liée à la réduction de la photosynthèse et une hausse des transcrits liée au protéasome (augmentation du système de détoxification, protéine incorrectement pliée) en présence de nanoparticules de TiO<sub>2</sub> et de ZnO. Cette étude met également en évidence un accroissement des niveaux de transcrits codants les composants de la paroi en présence de nanoparticules d'argent [180]. Schiavo et al. (2016) [181] ont suivi la génotoxicité des nanoparticules de Zn avec un test comètes. Ils ont relevé une altération de la structure moléculaire de l'ADN à partir de 5 mg Zn/L. La génotoxicité des nanoparticules est principalement reliée, à faible concentration, à la forme plus qu'à la composition chimique des nanoparticules d'après Yang et al. (2009) [182].

De plus, s'il y a internalisation des nanoparticules, celles-ci vont possiblement rencontrer des espèces moléculaires qui vont s'adsorber sur les nanoparticules et influencer les propriétés physico-chimiques de celles-ci (modification des charges de surfaces, de la solubilité et du pouvoir d'agrégation) et donc de leur impact au sein des cellules [183]. Ceci a été montré dans le cas des nanoparticules d'argent à l'intérieur de *C. reinhardtii* où des protéines associées avec les NP ont été mises en évidence par électrophorèse SDS-PAGE et identifiées par spectrométrie de masse MALDI MS-MS [54].

Après un stress ou une perturbation environnementale, l'expression génétique offre un moyen de suivre la sur ou sous-expression des gènes. Une étude en RT-PCR (transcription inverse - réaction en chaîne par polymérase) a été réalisée par Wang et al. (2008) [17] sur des

gènes de réponses au stress oxydatif (superoxyde dismutase, glutathione peroxydase, catalase). Dans cette étude, les transcrits des gènes liés à la photosynthèse (*psbA*, gène nucléaire codant la protéine de liaison D1, faisant partie du corps réactif du photosystème II; *rbcL*, petite sous-unité du gène de la ribulose 1-5 bis phosphate carboxylase) et d'autres gènes liés aux voies de biosynthèses des caroténoïdes, (*pds*, gène codant pour la phytoène désaturase) sont aussi suivis [17]. De plus, l'expression des gènes de l'UDP glucose 4-6 déshydratase (GLD), de l'UDP-glucuronate décarboxylase (GD), de l'UDP glucose 4-épimérase (GE) et du phosphoglucomutase (PG), impliqués dans les voies de biosynthèse des polysaccharides a été suivie après interaction des microalgues *Chlamydomonas reinhardtii* avec des microplastiques [42]. Cette étude sur du long-terme (70 jours) avec des microplastiques de polypropylène et de polyéthylène haute densité a montré une sur-expression des gènes associés avec les voies de biosynthèses du xylose (GD) chez *C. reinhardtii* [42]. A notre connaissance, les mêmes mécanismes peuvent être suggérés en présence de nanoplastiques mais pour l'instant il n'y a pas eu d'études sur l'expression des voies de biosynthèse des polysaccharides chez les microalgues en présence de nanomatériaux. Ainsi la présence de particules à l'intérieur de la cellule peut modifier la réponse moléculaire des microalgues.

### **3.8 Au bilan : quels impacts mesurés pour quelles nanoparticules ?**

Au vu des propriétés très diverses des nanoparticules étudiées, présentées précédemment, les impacts mesurés sur les microalgues peuvent grandement diverger. Plus de 60 études ont examinés l'exposition de différentes microalgues aux nanoparticules (Annexe Tableau 1-A, B et C). Les effets reportés (Annexe Tableau 1-D, E et F) sont synthétisés dans le Tableau 1 pour évaluer quelles nanoparticules conduisent à quels impacts ?

L'argent (Ag) est l'une des nanoparticules la plus étudiée (17/60 études) car elle est suspectée d'être toxique contrairement aux nanoparticules d'oxyde de lanthane ( $\text{La}_2\text{O}_3$ ), d'oxyde d'aluminium ( $\text{Al}_2\text{O}_3$ ), d'oxyde de nickel (NiO) et d'oxyde de magnésium (MgO) qui sont peu étudiées (Tableau 1). La plupart des recherches ont rapporté l'internalisation d'Ag dans différents types de microalgues (*C. reinhardtii*, *C. vulgaris*, *S. obliquus* et *E. gracilis*) suite au relargage d'ions  $\text{Ag}^+$  et une agglomération de ceux-ci à l'intérieur de la cellule [7, 54, 65, 163, 165, 167, 184]. Dans la majeure partie de ces études, la toxicité des nanoparticules d'Ag apparaît à des concentrations très faibles (0,01 mg/L, [55], Annexe Tableau 1-D). De plus, la photosynthèse des microalgues est impactée par les nanoparticules d'Ag entre 0,03 et 5 mg/L [65, 74, 79, 165, 167, 185]. Néanmoins, les concentrations de toxicité varient de 0,26 à 4,91 mg/L (Annexe Tableau 1-D), pour les mêmes nanoparticules d'argent selon le surfactant utilisé

[79]. Cependant, dans deux de ces études, aucun effet indésirable n'a été rapporté pour une concentration de  $4,63 \times 10^{-4}$  M en NP Ag chez *Thalassiosira weissflogi* et *C. vulgaris* [186, 187].

**Tableau 1 : Synthèse des effets des interactions entre nanoparticules et microalgues. Rouge : effet rapporté dans la majorité des études (plus de la moitié), orange : effet rapporté dans quelques études (moins de la moitié), jaune : effet pas clairement démontrés (différence de conclusion entre études), vert : pas d'effet, blanc : pas étudié.**

Type de NP	Nombre d'études	Effets enregistrés	Croissance	Stress oxydatif	Photosynthèse	Internalisation	Ions	Autre
Ag	17	15/17	Orange	Jaune	Orange	Rouge	Rouge	Sur-expression des gènes
CeO <sub>2</sub>	15	12/15	Jaune	Jaune	Jaune	Jaune	Orange	Adsorption
								Domage à la membrane
Zn	14	13/14	Rouge	Orange	Orange	Orange	Rouge	
PS	13	9/13	Jaune	Jaune	Jaune	Vert		
TiO <sub>2</sub>	11	9/11	Rouge	Orange	Jaune	Jaune	Vert	Modification de l'expression des gènes
								Effet d'ombrage
CuO	5	5/5	Jaune	Rouge	Orange	Jaune	Orange	
Au	4	3/4	Rouge	Blanc	Jaune	Jaune	Blanc	Adsorption
Co	3	3/3	Rouge	Blanc	Rouge	Vert	Rouge	Adsorption
NiO	2	2	Rouge	Jaune	Jaune	Jaune	Jaune	
Si	2	2	Rouge	Blanc	Jaune	Jaune		
Pt	1	1	Rouge	Blanc			Vert	
La <sub>2</sub> O <sub>3</sub>	1	0	Vert					
Fe <sub>2</sub> O <sub>3</sub>	1	1	Rouge	Rouge	Rouge			
MgO	1	1	Rouge	Rouge	Rouge		Rouge	
Al <sub>2</sub> O <sub>3</sub>	1	1	Rouge	Vert	Blanc		Rouge	
QD	1	1	Rouge	Rouge	Vert			

Quoique moins étudiées, des études existent sur les autres nanoparticules de métal pur comme celles d'or, de cobalt et de platine. L'internalisation de nanoparticules d'or a été observée chez *S. subspicatus* et *C. reinhardtii* (10 nm ; [5]) tandis qu'elle n'a pas lieu avec des nanoparticules de cobalt [66]. Toutes les nanoparticules métalliques présentent un effet sur la croissance et l'activité photosynthétique quand elle est explorée. Comme pour l'argent, la toxicité des nanoparticules de cobalt est supposée induite par le relargage des ions  $\text{Co}^{2+}$ , montrant que la quantification de la libération des ions est d'une importance majeure pour l'étude des interactions entre micro-organismes et nanoparticules métalliques. Par ailleurs, l'agrégation des nanoparticules de cobalt peut conduire à un effet d'ombrage, c'est ce que Chen et al. (2018) [66] mentionnent pour les trois espèces de microalgues suivantes : *Platymonas subcordiformis*, *Chaetoceros curvisetus* et *Skeletonema costatum*. De manière générale, la croissance et l'activité photosynthétique des microalgues sont les critères les plus étudiés. De plus, ces deux paramètres semblent être impactés dans la majorité des études impliquant des nanoparticules métalliques ou d'oxydes métalliques. Ces constatations supportent l'idée que le métal contenu dans les nanoparticules est toxique pour les microalgues. Cependant, dans tous les cas, sauf pour les nanoparticules de  $\text{TiO}_2$ , l'inhibition de croissance est enregistrée en parallèle d'une libération d'ions métalliques, soulevant la question de la toxicité réelle des particules comparées aux ions [11, 12, 21, 181]. Entre-temps, quelques études ont rapporté une absence d'effet des nanoparticules sur les microalgues, comme par exemple l'étude de Miller et al. (2010) [80], qui n'ont pas remarqué d'effet des nanoparticules de  $\text{TiO}_2$  (20 nm, 1000  $\mu\text{g/L}$ ). De même, il n'y a pas d'effet des nanoparticules d'oxyde de lanthane ( $\text{La}_2\text{O}_3$ ) à haute concentration (1000 mg/L) sur la croissance de *Chorella* sp. alors que pour la même concentration des effets létaux ont été observés sur *Daphnia magna*, montrant que la réponse à la présence de nanoparticules est spécifique au type d'organisme étudié [22]. Concernant les nanoplastiques, seuls les impacts de nanoparticules de polystyrène sur les microalgues ont été étudiés jusqu'à présent (Annexe Tableau 1-C). Ils ont été considérés comme très toxiques pour *Scenedesmus obliquus* (30 mg NP PS/L, [50]). Les concentrations testées dans cette étude sont toutefois plus élevées que les concentrations environnementales potentielles. A l'inverse, les nanoparticules de silice amorphe, considérées comme sans danger biologique, mais affectent pourtant la croissance de microalgues d'eau douce [25, 57].

Un autre enjeu est de comprendre si les propriétés de surface, et lesquelles, peuvent modifier les effets sur les microalgues. Or ce paramètre est très peu caractérisé dans les tests d'exposition. L'effet revêtement des particules de Zn a été étudié par Yung et al. (2017) [12]

qui ont montré que les nanoparticules hydrophiles inhibent la croissance des microalgues plus que les nanoparticules hydrophobes. La présence de surfactants, molécules chimiques amphiphiles capables de réduire la tension superficielle et de prévenir l'agrégation des particules [188], peut grandement impacter les effets des nanoparticules. Navarro et al. (2015) [79], ont examinés particulièrement la divergence de réponse de *C. reinhardtii* au contact de différents types de surfactant (chitosan, lactate, PVP, polyéthylène glycol, gélatine, sodium dodécyl benzènesulfonate, citrate, dexpanthenol et carbonate) des nanoparticules d'Ag. Tandis qu'Adeleye et Keller (2016) [24] ont étudiés, sur des EPS algaux, l'effet des nanoparticules de TiO<sub>2</sub> avec deux enduits, l'aluminium-glycérol et l'aluminium-polymère diméthicone. Taylor et al. (2016) [179] ont réalisés des tests avec les NP CeO recouvertes de PVP qui leur confèrent des propriétés fonctionnelles différentes. La présence d'autres polluants en surface des nanoparticules peut s'ajouter à la toxicité de celles-ci par adsorption ou inversement moduler les effets par complexation avec les nanoparticules, c'est le cas du Cd<sup>2+</sup> avec les NP TiO<sub>2</sub> [59]. De même, les propriétés de surface ont été mises en lumière, comme facteurs influents dans les mesures d'impacts, avec la récente recrudescence des recherches sur les plastiques. Plusieurs études rapportant l'effet des nanoparticules de polystyrène ont été effectués dans de nombreux environnements : eau douce, saumâtre et eau de mer [50, 64, 76]. L'inhibition de croissance de *P. subcapitata* et *S. obliquus* a été décrite en présence des nanoparticules de polystyrène-amide [50, 51, 64] tandis que le phénomène n'a pas été observé avec des nanoparticules de polystyrène recouvertes de groupes carboxyliques, suggérant l'importance du surfactant sur les nanoparticules (Annexe Tableau 1-F, [51, 64, 68]). Les nanoparticules de polystyrène avec des groupes NH<sub>2</sub> à leur surface induisent une hausse du stress oxydatif comparé à celles recouvertes de COOH et cela dès les faibles concentrations (13 mg/L contre plus de 100 mg/L pour COOH, [64, 68]. Ces résultats montrent que le suivi des propriétés de surface des nanoparticules est d'une importance majeure pour comprendre les mécanismes d'interactions.

Différentes tailles de NP PS, allant de 20 à 500 nm, ont aussi été testées, mais aucune internalisation des nanoparticules polymériques n'est mentionnée (Tableau 1 et Annexe Tableau 1-F). La concentration minimale de toxicité observée pour des nanoparticules de polystyrène recensée est de 6,5 mg/L [68]. Cependant, les effets des nanoplastiques sur les microalgues ont été seulement partiellement décrits, comparés aux nanoparticules métalliques, à cause de leur difficulté de détection et au faible nombre de type de nanoplastiques actuellement disponibles commercialement. Dernièrement, même si l'effet de tous les types de particules étudiées est souvent décrit comme taille-dépendant, jusqu'à présent, la corrélation

directe entre taille des nanoparticules et les effets décrits n'a pas été prouvée. Par exemple, Fujiwara et al. (2008) [25] suggèrent que la toxicité des NP Si est taille-dépendante tandis que Van Hoecke et al. (2008) [57] observent des effets similaires pour deux NP Si de taille et d'aire de surface différentes.

Globalement, caractériser les propriétés des nanoparticules dans les expériences d'expositions est incontestablement important et apparaît comme un moyen de comprendre les mécanismes d'interactions et les impacts potentiels de ces particules sur les microalgues. Parmi les nombreux paramètres actuellement utilisés pour suivre les impacts (photosynthèse, intégrité membranaire, suivi de la composition biochimique, expression des gènes...), la croissance est le paramètre le plus simple à enregistrer et demeure le plus largement mentionné comme un indicateur de la toxicité des nanoparticules sur les microalgues (Tableau 1). Cependant, les autres paramètres peuvent être plus informatifs et plus précisément suivis au regard des mécanismes impliqués pendant l'interaction. Les techniques les plus fréquemment utilisées dans le suivi des interactions microalgues-NP sont la microscopie, les tests biochimiques (ROS, quantification de l'iodure de propidium), les outils génétiques et la spectroscopie. Toutes ces techniques fournissent des données qui sont complémentaires et le plus souvent, plusieurs sont nécessaires pour comprendre les impacts des interactions sur les microalgues et fournissent des informations sensibles sur les propriétés et les modifications des NP.

Pour conclure, parmi toutes les études citées ici, la taille, la concentration en nanoparticules et le temps d'interaction varient grandement, rendant dans les faits leur comparaison difficile. Par ailleurs, les méthodes de caractérisation diffèrent d'une étude à l'autre, avec chacune d'elles fournissant seulement quelques éléments de preuve. De plus, le terme "Nanoparticules" est un nom générique regroupant une large gamme de matériaux qui peuvent varier de manière notable par leur nature chimique, leur forme, leur taille et leurs propriétés de surface. Conséquemment, il est très difficile d'identifier des voies de réponses communes dans leurs interactions avec les microalgues. Enfin, les producteurs primaires présentent aussi des formes et types de barrières diverses (frustule, paroi, membrane plasmique) qui peuvent être un obstacle pour l'interprétation des facteurs clés résultant de leurs impacts. Ainsi le suivi des interactions entre les NP et les microalgues et des facteurs influençant les effets sont essentiels à une meilleure compréhension des interactions. Pour cela, il nous faut visualiser les interactions et estimer leur effet à l'échelle des organismes et aussi de leur métabolisme moléculaire. Dans la partie suivante, nous nous attacherons à présenter des techniques pouvant aider à la compréhension des interactions avec notre modèle d'étude principal, les microalgues.

## 4 Outils pour la caractérisation des interactions

Les différentes techniques de caractérisation des nanoparticules et de suivi de leurs effets sur les microalgues recensées dans la littérature sont présentées dans la Figure 9. Dans cette partie, les techniques de microscopie, de spectroscopies vibrationnelles et de biologie moléculaire seront détaillées.

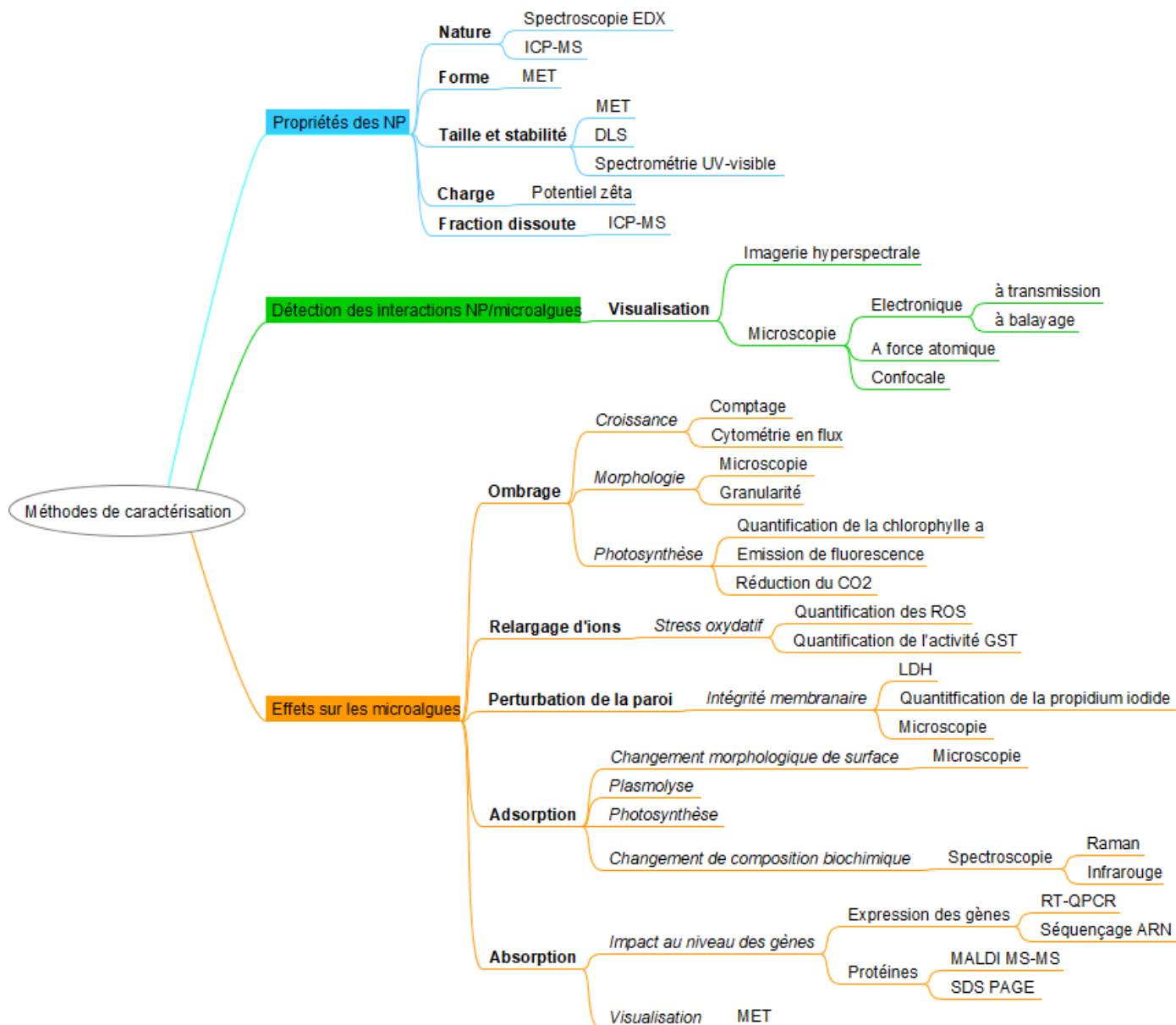


Figure 9 : Méthodes de caractérisation des interactions microalgues-nanoparticules : propriétés des nanoparticules, détection des interactions nanoparticules et microalgues et des effets sur les microalgues.

#### 4.1 Microscopie à différentes échelles : visualisation des interactions

Avant de suivre les effets de telles interactions, il est d'abord important de visualiser si l'interaction entre les deux entités a bien eu lieu. Pour cela, plusieurs techniques de microscopie permettent la visualisation des interactions entre nanoparticules et microalgues (Figure 9) à différentes échelles jusqu'à l'échelle nanométrique. Premièrement, la microscopie électronique à balayage (MEB) détecte des éléments jusqu'à une centaine de nanomètres en collectant la réflexion des électrons secondaires de l'échantillon après excitation par un faisceau laser. Le MEB couplé à un détecteur de rayons X permet de fournir une information sur la nature de l'élément détecté, comme par exemple pour démontrer la présence d'atomes d'argent dans *C. reinhardtii* [54]. Deuxièmement, la microscopie électronique à transmission (MET) rend possible la visualisation de très petites particules (jusqu'à la taille nanométrique) par détection des électrons transmis. Malgré son coût, cette technique est régulièrement utilisée pour l'analyse de nanoparticules métalliques comme par exemple l'analyse des nanoparticules d'or [189]. Renault et al. (2008) [5] ont notamment suivi l'impact de la distribution des nanomatériaux chez *S. subspicatus*. Tandis que Peng et al. (2011) [190] montrent, par MET, un impact plus grand des NP TiO<sub>2</sub> en bâtonnets que celles sphériques chez *P. tricornutum*.

Suite à l'interaction de microalgues avec du TiO<sub>2</sub>, la microscopie confocale a été utilisée pour visualiser les agrégats de nanoparticules (taille primaire : 35 nm, taille secondaire : 3580 nm) à la surface de *P. subcapitata* [176]. L'inconvénient de cette technique comparée aux autres microscopies électroniques est que la visualisation des nanomatériaux n'est possible qu'à l'état d'agglomérats due à la limite de détection de quelques centaines de nanomètres [171]. De plus, contrairement aux MEB et MET, la microscopie confocale nécessite des fluorophores avec un risque de relargage du fluorophore [191]. D'autres techniques sont utilisées marginalement, comme la microscopie champ sombre, qui diffusent des structures, couplée avec l'imagerie hyperspectrale. Cette technique a été utilisée par Leclerc et Wilkinson (2014) [55] pour visualiser l'internalisation des particules d'argent chez *C. reinhardtii*. La microscopie à force atomique (AFM) est également utilisée pour étudier la topographie de surface des microalgues [51]. Récemment, la spectroscopie Raman à 532 nm a été proposée comme un outil pour étudier la localisation des nanoparticules de polystyrène dans les cellules humaines [192]. Cette technique a été décrite comme optimale pour ce qui est de l'intensité de signal et comme permettant l'analyse des cellules vivantes. Ivask et al. (2017) [193] ont suggéré que le Raman pouvait être utilisé pour les études d'interaction microalgues-nanoparticules. La diffusion Raman exaltée de surface (DRES), a été utilisée sur *P. subcapitata* pour détecter la biosynthèse



des nanoparticules d'or [194]. La résonance des nanoparticules d'or par la technique SERS amplifie le signal Raman des cellules vivantes, avec une haute résolution et une diminution du temps de collection du signal, permettant des mesures non-destructives [195].

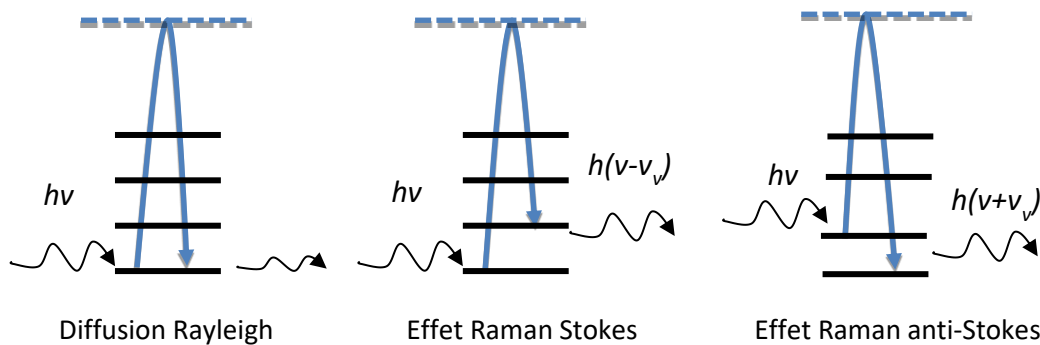
## **4.2 Spectroscopies vibrationnelles appliquées à l'étude des interactions entre les matériaux et les organismes**

Par rapport aux techniques de microscopie qui permettent seulement de visualiser les nanoparticules, les spectroscopies vibrationnelles (Raman et Infrarouge) ont l'avantage de permettre l'étude, suite aux interactions avec les nanoparticules, de la réponse des organismes par suivi de leur composition biochimique. Ce sont des techniques optiques permettant l'analyse non intrusive et non destructive de la composition chimique ou structurale d'un échantillon. A partir de l'interaction matière-rayonnement, les spectroscopies optiques ont pour but de renseigner sur les caractéristiques de la matière étudiée (Techniques de l'ingénieur, [196]). Par l'usage des hautes fréquences, il est possible de suivre les vibrations des atomes légers (C, H, O, N) qui sont caractéristiques des liaisons chimiques, mais qui sont aussi sensibles à leur environnement. Les deux techniques (diffusion Raman et absorption infrarouge) sont de plus en plus utilisées en biologie car elles ne nécessitent pas de préparation particulière [197] et permettent généralement de ne pas dénaturer l'échantillon, contrairement à la chromatographie en phase liquide à haute performance (HPLC, [119]). Elles sont complémentaires car la spectroscopie infrarouge est sensible aux variations des moments dipolaires tandis que la spectroscopie Raman est sensible aux variations des polarisabilités des liaisons moléculaires (Techniques de l'ingénieur, [198]).

### **4.2.1 Principe des spectroscopies Raman et infrarouge**

La spectroscopie Raman permet d'analyser la composition chimique de la structure d'un échantillon par l'étude de la diffusion inélastique de la lumière monochromatique (radiation électromagnétique dont la fréquence est connue) (Techniques de l'ingénieur, [199]). Pour observer l'effet Raman, une source laser va exciter l'échantillon. Il y a interaction des photons avec celui-ci : une fraction des photons est diffusée sans variation d'énergie (diffusion Rayleigh), et une autre est diffusée avec un décalage d'énergie. Ce décalage de fréquence est

appelé effet Raman et il est constitué d'une partie dite Stokes (décalage vers une fréquence plus faible) et une dite anti-Stokes (décalage vers une fréquence plus élevée) (Figure 10).



**Figure 10 : Schématisation quantique de l'interactions photons-matière : cas possibles de diffusion des photons (schéma réalisé à partir de Barbillat et al. 1999 [199]). ( $h\nu$  : énergie des photons incidents pour un rayonnement de fréquence  $\nu$  ;  $h\nu_v$  : énergie de la vibration de fréquence  $\nu_v$ ); traits horizontaux pleins : niveaux d'énergie vibrationnels ; traits horizontaux en tirets : niveaux électroniques virtuels).**

La différence entre l'énergie vibrationnelle de l'échantillon et du rayon incident peut être détectée par spectroscopie Raman [200]. Le spectre obtenu est composé de différentes bandes associées aux différentes vibrations du composé. Chaque bande Raman est caractérisée par la position de la raie (fréquence d'un mode de vibration) spécifique à une liaison chimique, par l'intensité de la raie (spécifique de chaque vibration et en proportion de la liaison chimique par rapport aux autres raies), par la largeur à mi-hauteur (représentant la complexité de l'environnement chimique, [201]), par un éventuel décalage de la position normale (modification de l'environnement chimique ou physique) ([199], Techniques de l'ingénieur, Figure 11). L'intensité des bandes Raman dépend aussi de la longueur d'onde choisie, du coefficient de diffusion de l'échantillon et de la polarisabilité des liaisons chimiques étudiées. La grandeur utilisée pour indiquer la position de la bande est le nombre relatif d'ondes qui correspond à l'écart entre le nombre d'onde de la raie Raman et celui de la raie excitatrice (Rayleigh), exprimée en  $\text{cm}^{-1}$ .

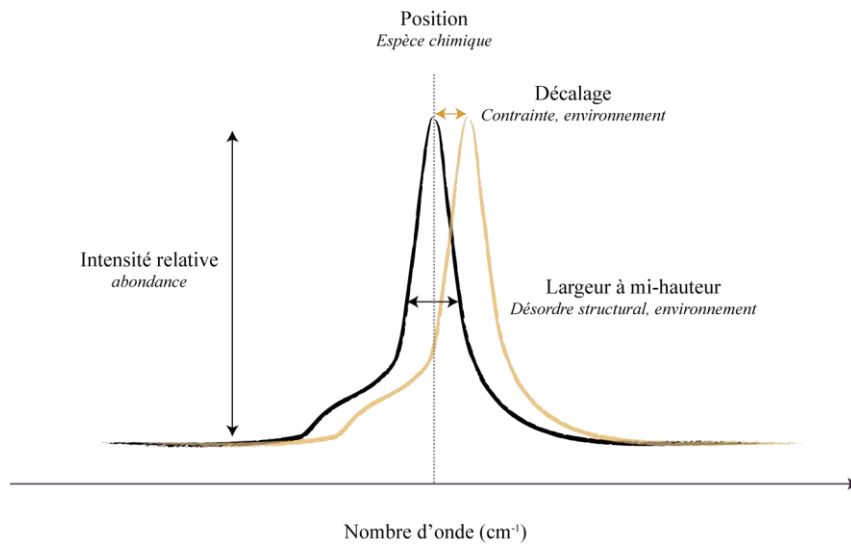


Figure 11 : Principales informations pouvant être extraites d'une raie Raman (source: Thèse Chauvet R., 2016, [202])

Un ensemble de spectrométrie Raman est composé de 5 parties (Techniques de l'ingénieur, [199, 200]) :

- une source laser qui sert d'excitatrice
- un optique qui focalise le laser sur la cellule et collecte les photons diffusés Raman
- un filtre ou des réseaux qui rejettent les photons élastiques Rayleigh et les photons inélastiques anti-Stokes
- un spectrophotomètre équipé d'un détecteur de rayonnement
- un logiciel d'acquisition et de traitement des données

Pour récupérer les signaux Raman, le spectromètre Raman est conçu de manière à éliminer les photons Rayleigh qui sont des signaux plus intenses et couvrent les raies Raman ( $I_{\text{Rayleigh}}/I_{\text{Raman}} \approx 10^6$ ). Deuxièmement, les raies Raman ( $\nu_R$ ) sont proches de la raie Rayleigh ( $\nu_0$ ) correspondante ( $\frac{\nu_R - \nu_0}{\nu_0} \ll 1$ ), une haute résolution est nécessaire pour les distinguer. Enfin les raies Raman sont très faibles, ce qui nécessite un détecteur de très haute sensibilité, peu de bruit électronique et un laser excitateur intense. Pour éliminer la Rayleigh, il existe deux techniques. L'utilisation d'un triple monochromateur, qui a l'avantage d'engendrer peu de bruit, permet de diffracter la lumière sur trois réseaux (augmente la résolution) et d'empêcher ainsi le passage de la Rayleigh et de transmettre vers le détecteur seulement les raies Raman Stokes et anti-Stokes (Figure 12).

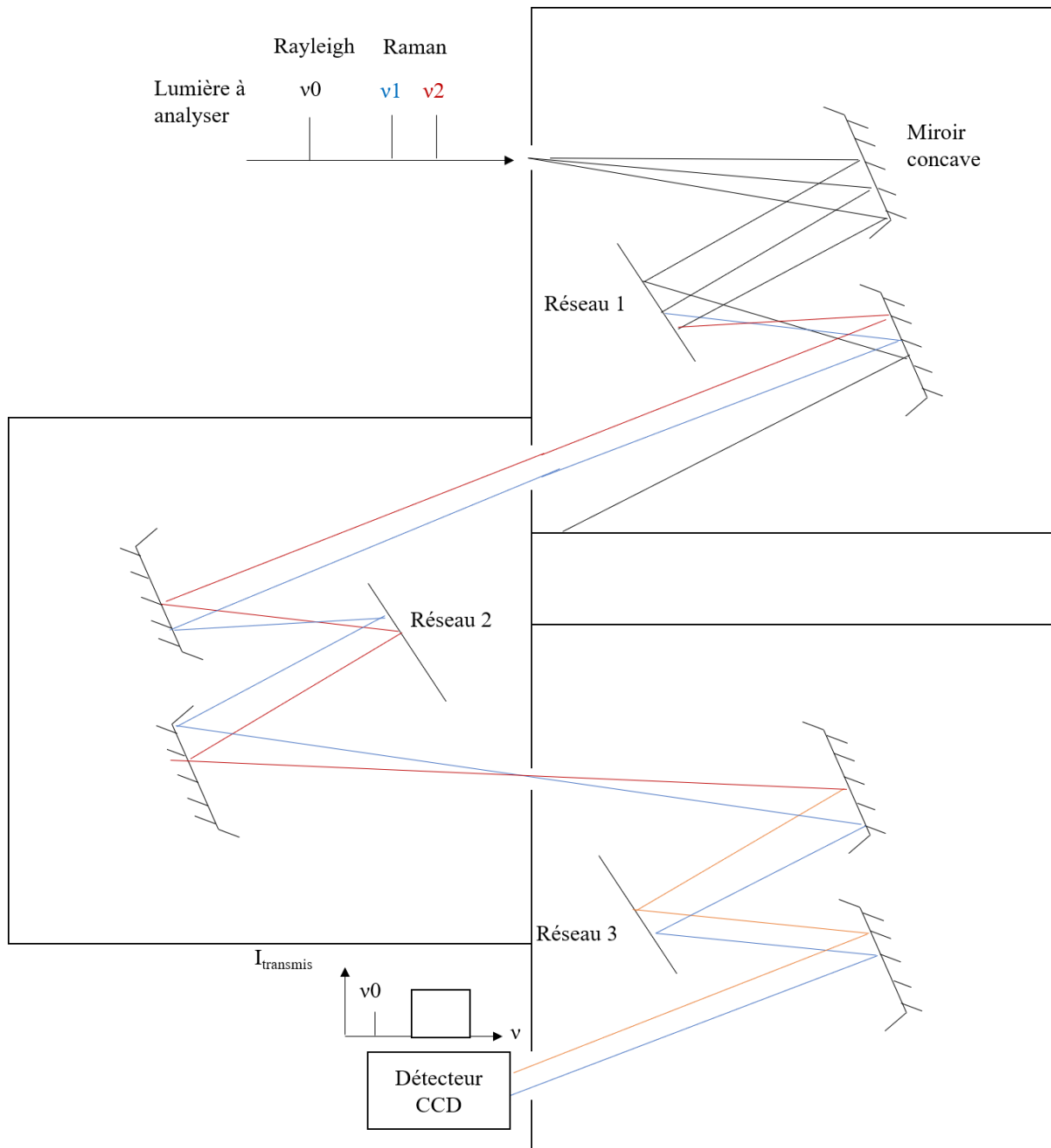


Figure 12 : Principe d'un triple monochromateur

La deuxième technique consiste à filtrer la lumière diffractée par un filtre interférentiel de réjection (type Notch, de nature organique, haute qualité mais peu résistant dans le temps) ou passe bande (type Edge, de nature minérale avec une bonne résistance dans le temps) (Figure 13). Pour avoir une haute résolution il faut surtout une grande longueur focale des miroirs sphériques concaves des systèmes monochromateurs dispersifs (à réseaux), comme par exemple sur le spectromètre T64000 (spectromètre à trois réseaux). Il faut aussi un réseau dispersif, c'est-à-dire dont le nombre de trait par mm  $N$  est grand (300 trait/mm : peu dispersif ; 2400 trait/mm : très dispersif).

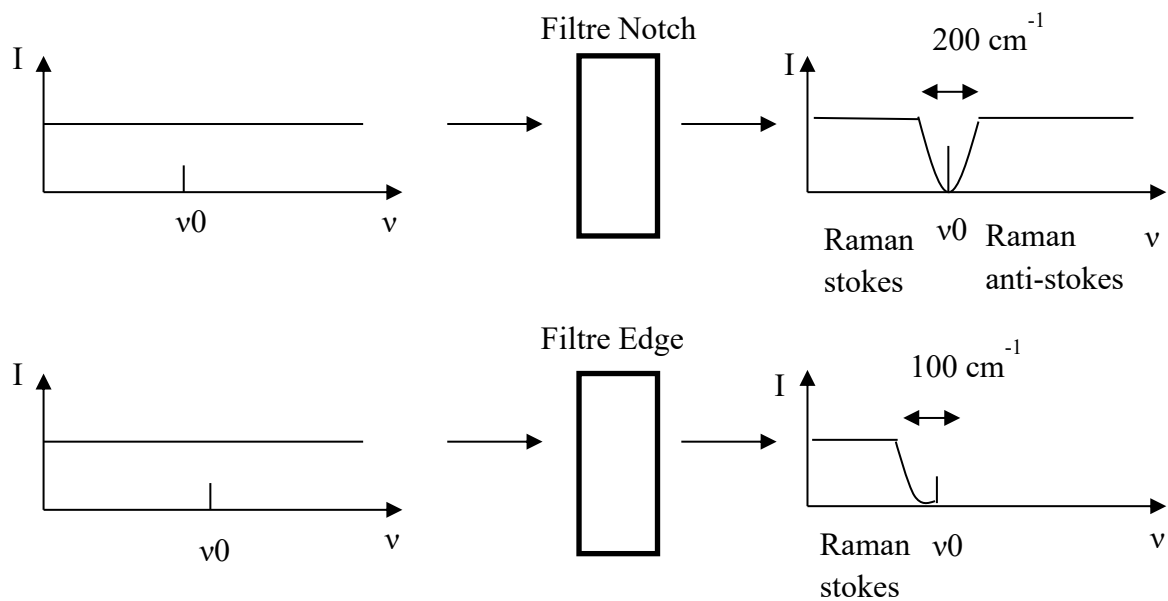


Figure 13 : Représentation du principe des filtres Notch et Edge de spectromètre Raman

Un des avantages de cette technique est que la résolution des raies est meilleure qu'en spectroscopie infrarouge. De plus, les molécules d'eau émettent très peu de diffusion Raman (Techniques de l'ingénieur, [199]), ce qui fait de la spectroscopie Raman est une technique intéressante pour l'étude des micro-organismes aquatiques tels que les microalgues. Pour la détection de microalgues, les longueurs d'ondes excitatrices les plus utilisées sont 532 nm et 780 nm [200]. La longueur d'onde 532 nm est d'ailleurs décrite comme optimale en terme d'intensité du signal et d'autofluorescence [193]. Les inconvénients de la spectroscopie Raman sont la possible dégradation de l'échantillon (suite à une acquisition longue pour collecter un nombre suffisant de photons) et la fluorescence, pouvant être très intense et susceptible de masquer les signaux Raman des échantillons biologiques (Techniques de l'ingénieur [198, 202]). Pour y pallier, plusieurs solutions peuvent être envisagées. Pour éviter la dégradation de l'échantillon, il est possible premièrement de diminuer la puissance excitatrice (avec un filtre), deuxièmement de diminuer le temps d'acquisition et enfin de contrôler la température de l'échantillon par une cellule spécifique pour éviter la surchauffe. Enfin, en ce qui concerne le problème de fluorescence, il peut être partiellement résolu par l'utilisation d'une autre longueur d'onde où les molécules n'entraînent pas de phénomène de résonance Raman. Cependant pour certains types d'organismes comme les microalgues qui absorbent sur une large gamme spectrale, cette solution peut ne pas être envisageable.

Concernant la spectroscopie infrarouge, celle-ci est basée sur un rayonnement incident dans le domaine de l'infrarouge modifiant l'énergie vibrationnelle et l'énergie rotationnelle de la molécule, induisant une variation du moment dipolaire électrique de la molécule. Alors que la diffusion Raman permet une forte absorption des liaisons carbonées, l'absorption infrarouge met en lumière les liaisons polaires ayant un fort moment dipolaire, c'est le cas des groupements fonctionnels O-H, N-H, C-H...[203]. Les spectres infrarouge représentent les bandes fondamentales de ces liaisons chimiques ainsi que leurs différents modes de vibrations ( $\nu$ , élongation ;  $\delta$ , déformation). La spectroscopie infrarouge à l'avantage d'être une technique à un coût abordable pour la plupart des laboratoires. La résolution spatiale de la microscopie infrarouge permet aussi des mesures d'espèces spécifiques à l'intérieur des communautés microscopiques hétérogènes [197]. De plus, le développement des techniques de spectroscopie infrarouge permet maintenant par la microspectroscopie infrarouge, l'analyse de cellule unique pouvant aller jusqu'à l'analyse subcellulaire en couplant la microspectroscopie infrarouge et le synchrotron [204]. Les limites de la spectroscopie infrarouge sont dues à la forte absorption de l'eau qui masque une partie du spectre et la faible résolution des raies d'absorption (possibilité de recouvrement entre elles) [205]. Malgré cela, certains auteurs, Heraud et al. (2005) [206] ont quand même pu suivre les changements de composition dans une cellule en milieu aqueux de *Micrasteria hardyi* à l'aide d'un système modèle sur un temps d'une journée. De plus les travaux de Chan et Kazarian (2016) [207] montrent qu'il est possible d'imager par spectroscopie infrarouge des cellules vivantes.

#### 4.2.2 Spectroscopies vibrationnelles sur les microalgues : études des composés cellulaires

La spectroscopie Raman est beaucoup utilisée pour mettre en évidence les pigments chez les microalgues car ceux-ci ont un signal Raman assez fort. La caractérisation des lipides, de la chlorophylle et des caroténoïdes des microalgues par spectroscopie Raman, offre la possibilité d'applications futures en biotechnologies [208, 209]. De plus, comme la plupart des pigments (Chlorophylle a,  $\beta$ -carotène et astaxanthine) absorbant dans le visible, la longueur d'onde la plus utilisée en Raman est la 532 nm [200, 210]. Koch et al., (2017) [119] indiquent que les bandes Raman entre 1600 et 1800  $\text{cm}^{-1}$  correspondent à la chlorophylle et les bandes à 1528, 1158 et 982  $\text{cm}^{-1}$  sont caractéristiques des caroténoïdes chez *Dunaliella salina*. Wei et al. (2014) [200] ont compilé les principales bandes Raman connues des spectres de microalgues liées aux pigments. Ils indiquent que les bandes caractéristiques du  $\beta$ -carotène pour *C. reinhardtii* sont situées à 1520 et 1525  $\text{cm}^{-1}$  (C=C) et de l'astaxanthine à 1156-1158  $\text{cm}^{-1}$  (C-C) chez *Haematococcus pluvialis* [209, 211].

Les caroténoïdes peuvent être observés par spectroscopie Raman grâce à l'effet résonance Raman. Le principe de cet effet est qu'une exaltation de l'intensité du signal (de  $10^3$  à  $10^6$ ) a lieu lorsque la fréquence d'excitation coïncide avec une des transitions électronique des molécules, c'est notamment le cas des molécules colorées [212]. La détection de ces pigments est bien établie et a permis l'étude sur les aspects fonctionnels et la configuration des caroténoïdes avec le photosystème [213]. Ainsi Koch et al. (2017) [119] ont présenté une première approche *in vivo* de mesure de la cinétique d'adaptation à la lumière de *D. salina* par la spectroscopie Raman en combinant avec des analyses multivariées. Chez cette microalgue, l'étude de deux xanthophylles suite à un stress lumineux ( $3000 \mu\text{mol. s}^{-1}.\text{m}^{-2}$  photons) a été réalisée [119]. La violaxanthine ( $1531 \text{ cm}^{-1}$ ) assiste la captation de la lumière et le transfert de l'énergie absorbée à la chlorophylle, tandis que la zéaxanthine ( $1524 \text{ cm}^{-1}$ ) participe à diminuer l'excès d'énergie par dissipation de la chaleur. A la fin de l'illumination, il est observé une adaptation à l'obscurité traduite par la diminution de la teneur en zéaxanthine et l'augmentation de la violaxanthine. Une baisse ultérieure de la violaxanthine et de la zéaxanthine est observée quand la capacité de régulation du cycle est réduite par des périodes prolongées d'obscurité.

Par la spectroscopie Raman, le calcul du ratio des liaisons carbone-carbone insaturés sur saturés rend possible la détermination de la proportion de ces deux types de lipides dans les cellules algales. Par cette méthode, Samek et al. (2010) [209] ont calculé sur des spectres Raman (785 nm) le rapport des intensités des pics  $1656 \text{ cm}^{-1}$  (élongation cis C=C) et  $1445 \text{ cm}^{-1}$  (vibration  $\text{CH}_2$ , liaison C-C,) pour définir le ratio de liaison carbone-carbone insaturés sur saturés de trois espèces algales : *Botryococcus sudeticus*, *Chlamydomonas sp.* et *Trachydiscus minutus*.

Quant à la spectroscopie infrarouge, elle apporte un gain de temps pour le suivi de la composition des microalgues, qui est plus traditionnellement réalisée par des dosages biochimiques qui demandent plus de temps d'analyse [197]. La spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier (FTIR) a été décrite comme un outil fiable, sensible et permettant une mesure rapide de la composition macromoléculaire des microalgues [117]. Cette technique est plutôt utilisée pour l'étude des macromolécules (lipides, polysaccharides, acides nucléiques et protéines) composant les microalgues [197, 214]. Par ailleurs, Murdock et Wetzel (2009) [197] recensent dans leur étude, les principales bandes infrarouges correspondant aux groupes fonctionnels des algues.

Par cette technique, l'analyse du changement de composition de la biomasse après limitation en nutriment (azote, N et phosphore, P) a été beaucoup étudiée ces dernières années [117, 215–218]. Ainsi Stehfest et al. (2005) [217] ont suivi l'état physiologique de cyanobactéries et de bacillariophycées par mesure de l'efficacité photosynthétique (effet à court terme) et de la composition biochimique par FTIR. Après deux semaines de privation en nutriments (N ou P), une variation des ratios d'aires des différents groupes biochimiques (protéines, lipides, polysaccharides et silicate) est observée. Cette étude indique également une réponse métabolique hautement espèce spécifique. L'utilisation de l'infrarouge a été aussi recensée pour étudier l'allocation du carbone cellulaire en fonction du quota de phosphore chez *C. reinhardtii* [117], *S. subspicatus* [215], *Scenedesmus quadricauda* [218] et *Phormidium luridum*, *Nitzschia sp.*, *Sphaerocystis schoeteri* [219]. Les bandes des polysaccharides et des lipides augmentent sous conditions de carence en P, alors que suite à l'ajout de P, une augmentation des bandes de phosphodiester (1244 et 1080  $\text{cm}^{-1}$ ) a été observée en même temps qu'une diminution des polysaccharides et des lipides [215, 219]. Puis toujours concernant l'allocation du carbone en cas de stress, cette fois azoté, la composition d'une microalgue marine, *Isochrysis zhangjiangensis*, a été suivie par calcul des rapport de bandes d'absorption [216]. De manière générale, les limitations en N et P causent une augmentation des lipides et polysaccharides comparée aux groupes protéiques et phosphores [197].

Des premiers essais de FTIR quantitative initiés par Jakob et al., (2007) [220] et les travaux de Wagner et al. (2010) [221] laissent à penser que l'application de la spectroscopie infrarouge pourrait permettre la quantification de macromolécules cellulaires (protéines, polysaccharides et lipides totaux) à partir de spectres de substances de référence (BSA, glucose, glycérol tripalmitate), d'algorithme PLS (Partial Least Squares) et de comparaison avec des méthodes biochimiques. La microspectroscopie infrarouge peut également servir au suivi de la variation de distribution spatiale des métabolites dans une microalgue, *M. hardyi* suite à une exposition à des ingrédients pharmaceutiques actifs [222].

Enfin, l'identification de l'empreinte spectrale infrarouge de trois espèces sélectionnées pour leur potentiel en tant que biofioul, *Chromochloris zofingiensis*, *Acutodesmus obliquus* et *Chlorella sorokiniana*, a été réalisée par Bartošová et al. (2015) [223] permettant la caractérisation des polysaccharides. Kansiz et al. (1999) [224] différencient cinq espèces de cyanobactéries et une microalgue verte (*Chlorella emeronii*) en utilisant les premières dérivées des spectres entre 950 et 1800  $\text{cm}^{-1}$ . La différenciation et l'identification d'espèces phytoplanctoniques par FTIR ont été également étudiées par Giordano et al. (2009) [225].



Cependant Driver et al. (2015) [226] ont présenté les limites de la spectroscopie infrarouge pour l'identification d'espèces de microalgues, montrant, que la méthode de différenciation des espèces est robuste en conditions contrôlées, mais que dans le cas de privation de nutriments (division par dix des quantités d'azote et de phosphore), l'identification des neuf espèces devient limitée par les variations de l'empreinte des métabolites (plasticité phénotypique).

Ainsi la spectroscopie infrarouge est principalement utilisée pour deux approches, l'approche physiologique, avec l'étude de la composition chimique des microalgues et l'approche écologique se focalisant sur les interactions entre microalgues et son environnement [197]. Bien que certaines études commencent à utiliser comme outil de quantification absolue la spectroscopie infrarouge, cette technique permet principalement d'obtenir une quantification relative de la composition par mesure des augmentations ou diminutions relatives.

#### 4.2.3 Spectroscopies vibrationnelles appliquées à l'étude des cellules au contact des nanomatériaux

Les spectroscopies vibrationnelles (Infrarouge et Raman) sont également des outils capables de détecter les modifications chimiques des microalgues [216] suite aux interactions avec les nanoparticules.

La spectroscopie Raman permet l'observation des nanomatériaux, jusqu'à une centaine de nanomètres dans les cellules végétales et animales sans marquage par sonde fluorescente [183, 193]. Comparée aux approches de biologie moléculaire qui sont reliées à un composant spécifique du système cellulaire, l'approche Raman fournit une combinaison de toute l'information phénotypique (étude des conséquences phénotypiques de l'expression génétique) des molécules contenues dans l'échantillon. Dorney et al. (2012) [192] présentent la microscopie Raman couplée à une analyse chimiométrique comme une technique offrant la possibilité d'étudier la présence de nanoparticules dans l'environnement subcellulaire des cellules. Ainsi, par leur signature spectrale reliée à leur structure chimique, des nanoparticules de polystyrène (50 et 100 nm) ont été localisées dans le cytoplasme [192].

Dans le cas des NP d'or ou d'argent, un champ local fort a lieu au voisinage de ces particules engendrant un effet SERS (Spectroscopie Raman exalté de surface) qui se traduit par un signal Raman fort. Ce signal permet de détecter et de suivre la distribution des nanoparticules dans la cellule à des concentrations faibles et d'en réaliser une cartographie [183, 200]. Une étude d'interaction de nanoparticules d'or avec des cellules épithéliales montre que l'intensité du signal SERS dépend surtout de la morphologie des nanoparticules (taille, forme ou agrégation) et est amplifié par la présence de petits agrégats d'or (dimère ou trimère) [227]. Le SERS est également utilisé pour avoir des informations sur les molécules positionnées aux alentours des nanostructures. Dans l'étude de Lahr et Vikesland (2014) [194], la technique SERS en trois dimensions est utilisée pour détecter la biosynthèse intra et extra cellulaire des nanoparticules d'or à partir d'acide tétrachloraurique ( $\text{HAuCl}_4$ ) par *P. subcapitata* à 785 nm. Les spectres SERS des microalgues montrent les pics du  $\beta$ -carotène, de la glutathione, chlorophylle a, hydroxylproline, nicotinamide adénine dinucléotide (NAD) et des protéines, composés suspectés de participer à la biosynthèse des nanoparticules [194].

Une autre technique permettant la meilleure visualisation interne des particules se nomme résonance plasmonique de surface (SPR). Celle-ci est créée par l'oscillation des électrons de nanoparticules métalliques (Or, Ag et Cu) et améliore l'absorption et la diffusion Rayleigh de la lumière de nanoparticules. Le spectre Raman révèle ainsi une différence entre les cellules saines et cancéreuses au niveau des bandes peptidiques [228].

L'usage de la spectroscopie infrarouge dans les études d'interactions microalgues-nanoparticules est assez récent et encore peu d'études sont publiées sur le sujet. Sadiq et al. (2011) [53] ont utilisé cette technique pour suivre l'attachement des nanoparticules de titane sur les microalgues *Scenedesmus* sp. et *Chlorella* sp. Les spectres FTIR révèlent des changements de composition chimique des microalgues suite aux interactions avec les nanoparticules. Les bandes  $3430\text{ cm}^{-1}$  (Ti-OH),  $1630\text{ cm}^{-1}$  (O-H),  $673\text{ cm}^{-1}$  (*Chlorella* sp.) et  $669\text{ cm}^{-1}$  (*Scenedesmus* sp.) correspondant aux liaisons Ti-OH [229] sont présentes dans le spectre des microalgues après interaction. Ces résultats confirment l'adsorption des NP  $\text{TiO}_2$  sur la surface des microalgues [53]. Un des intérêts majeurs de ces techniques, dans le cas d'une adsorption des nanoparticules sur les microalgues, est de mettre en évidence les groupes chimiques impactés. Pour des NP  $\text{TiO}_2$ , Chen et al. (2017) [175] ont, par FTIR en réflexion totale atténuée (ATR), montré une baisse des intensités des pics de groupes fonctionnels comme

C-N, C=O, C-O-C et P=O chez *C. reinhardtii*, qui sont caractéristiques des composants membranaires et des parois [175]. La spectroscopie infrarouge a été aussi appliquée à l'étude des effets des nanoparticules de CeO et d'Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> sur les microalgues [56, 61].

La présence de nanoparticules biosynthétisées à l'intérieur des cellules peut être confirmée par analyse infrarouge. Rao et Pennathur (2017) [230] démontrent ainsi l'implication des biomolécules algales dans la réduction et la stabilisation de nanoparticules de sulfure de cadmium (CdS). Le spectre infrarouge de *C. reinhardtii* présente une augmentation de la bande N-H (1403 cm<sup>-1</sup>, amide II) et une variation de la bande 1155 cm<sup>-1</sup> (C-O-C), laissant penser à une liaison des protéines avec la surface des nanoparticules de CdS [230]. Chez la microalgue marine, *Tetraselmis suecica*, les mesures infrarouges ont mis en évidence les groupes fonctionnels (amide et carbonyle) impliqués dans la biosynthèse des nanoparticules d'or [231]. Enfin, la spectroscopie est également utilisée pour vérifier l'attachement de surfactant sur des nanoparticules. Ainsi Bharathiraja et al. (2016) [232] montrent, dans une étude d'interaction de nanoparticules d'or avec des cellules cancéreuses, l'attachement aux nanoparticules de molécules d'astaxanthine. La présence d'astaxanthine a été mise en évidence par la présence de bandes caractéristiques (1071 et 1014 cm<sup>-1</sup>) ainsi que des bandes correspondant aux liaisons -CH=CH<sub>2</sub>- liées au cycle aromatique de l'astaxanthine dans le spectre des nanoparticules d'or [232]. De même, Perreault, Bogdan, et al. (2012) [233] ont étudié l'effet de nanoparticules d'or recouvert d'amine-G0polyamidoamine (PAMAM) sur la physiologie de *C. reinhardtii*. Par analyse FTIR, ils confirment la présence du PAMAM en surface des nanoparticules.

Pour conclure, les spectroscopies vibrationnelles Raman et infrarouge ont montré leur intérêt dans le domaine des interactions entre matériaux et organismes pour le suivi de la composition biochimique. Ces techniques seront donc utiles pour suivre l'effet des interactions entre nanomatériaux et microalgues au niveau macromoléculaire. Qu'en est-il du niveau moléculaire ? Comment peut-on suivre la réponse des microalgues à ce niveau ?

#### **4.3 Biologie moléculaire ou comment expliquer les mécanismes de réponse mis en place**

Le suivi de l'expression génétique peut être un moyen pour suivre les effets au niveau moléculaire de telles interactions. L'intérêt principal de regarder les effets à cette échelle est de comprendre d'où viennent les éventuelles évolutions de composés macromoléculaires en présence de nanoparticules et comment les mécanismes de réponses sont mis en place.

La Q-PCR (quantitative -réaction en chaîne par polymérase) est utilisée dans notre étude pour suivre les gènes possiblement marqueurs des réponses des microalgues aux interactions avec les nanoparticules. Cette technique, qui date des années 1980, permet de multiplier le nombre de copies d'une séquence nucléique (ADN, ou ARN - technique de QRT-PCR) définie grâce à une polymérase. Initialement développée avec du bromure d'éthidium [234], le suivi au fur et mesure de l'accumulation de l'amplification des produits PCR se fait par détection de fluorescence. La fluorescence est émise par un agent fluorescent qui s'intercale au niveau des brins néoformés soit de façon non spécifique (SyberGreen), soit de façon spécifique à une séquence cible quand le marqueur fluorescent est couplé à une sonde (Taqman). Le principe est que l'augmentation de la fluorescence va être proportionnelle à la quantité d'ADN matrice. Le logiciel de quantification produit des courbes d'amplification au fur et à mesure de la synthèse des amplicons [234]. Les cycles Q-PCR sont constitués de deux étapes. La première étape est celle de dénaturation qui consiste à la séparation des deux brins d'ADN. La deuxième étape est double et correspond à l'hybridation des amorces à ces brins et l'élongation qui correspond à la synthèse du brin complémentaire d'ADN par les polymérases à partir des dNTP (désoxyribonucléosides triphosphates). A la fin de l'amplification PCR, les amplicons sont soumis à une variation de température avec suivi de la fluorescence. Une droite de régression linéaire inverse est alors construite, représentant l'émission de fluorescence en fonction du logarithme de la concentration en ADN matrice. Cette droite permet d'estimer l'efficacité d'accroche et d'amplification des couples d'amorces (d'une vingtaine de paires de base) spécifiques au gène étudié. Cette étape permet aussi de déterminer les courbes et température de dissociation de chaque couple d'amorces, révélant l'existence d'un ou plusieurs amplicons par couples d'amorces.

Dans notre étude, les gènes suivants ont été testés :

- les gènes de ménage : (*rps*) gènes référents dont l'expression ne varie pas en conditions de stress
- les gènes impliqués dans la réponse au stress :
  - photosynthèse : la RuBisCo est une enzyme clé de la photosynthèse dont le gène chloroplastique *rbcL* code sa grande sous-unité (L).
  - oxydatif : les antioxydants enzymatiques permettent de diminuer le taux de ROS cellulaire avec notamment la superoxyde dismutase (*SOD*) et la catalase (*Cat*). La *SOD* catalyse la dismutation de l'anion superoxyde en peroxyde d'hydrogène et en oxygène

moléculaire [235]. La catalase et la peroxydase catalysent les H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> produit avec le stress oxydatif en eau et en dioxygène [236].

- thermique/osmotique/rayonnement UV: les Heat Shock Protein (HSP) sont des protéines chaperonnes participant à la réparation protéique par l'assemblage et le repliement correct des protéines cellulaires.
- apoptose : les caspases, protéase à cystéine, sont impliquées dans le mécanisme de destruction programmée de la cellule.
- des gènes liés à la voie de biosynthèse de l'astaxanthine, caroténoïde produit par certaines microalgues en cas de stress (lumineux notamment).
- des gènes liés aux voies de biosynthèse des polysaccharides (glucose, xylose, mannose, rhamnose, galactose, Figure 14).

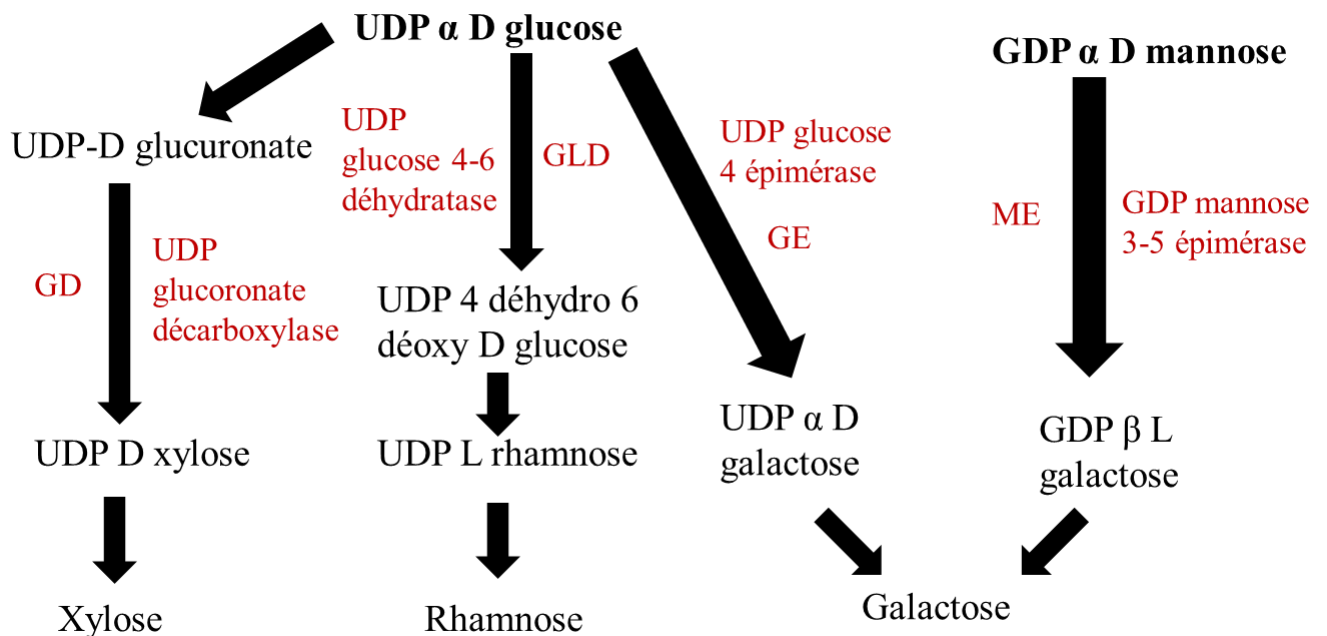


Figure 14: Voies de biosynthèse des polysaccharides et enzyme étudiées (en rouge).

Pourquoi s'intéresser aux gènes liés aux voies de biosynthèse des polysaccharides ? Ces composés macromoléculaires peuvent être excrétés en cas de stress comme mécanismes de défense (cf. §2.3.4, stress salin et §3.5, en présence de plastiques). De plus des études montrent que les gènes liés aux polysaccharides répondent suite à des stress environnementaux. Par exemple, des variations de l'expression des gènes liés aux polysaccharides ont été décrites sous un stress de froid chez *C. reinhardtii*, montrant une sur-expression des gènes liés à la sucrose-phosphate-synthase et à la tréhalose-6-phosphate synthase 1 impliqués respectivement dans la biosynthèse du sucrose et tréhalose [237]. De plus, toujours chez *C. reinhardtii* et sous faible

illumination, une sous-expression des gènes de l'hexose kinase (glycolyse) et  $\alpha$ -tréhalase (clivage de dimère de glucose) a été reportée [238]. Ces gènes semblent donc être des marqueurs intéressants lors d'une évaluation de la réponse moléculaire d'organismes à des changements dans leur environnement.

## **Conclusions du chapitre 1 : Etat de l'art**

La contamination des eaux douces par les micro et nanoplastiques entraînent des questionnements sur l'impact de ces particules sur les organismes aquatiques. Parmi ceux-ci, les microalgues et les daphnies sont des indicateurs sensibles de la qualité de l'eau des rivières ce qui en fait des modèles d'études intéressants.

Bien que la littérature soit riche sur les impacts des polluants et stress sur les premiers maillons de la chaîne trophique, les effets des nanomatériaux sont encore méconnus d'après l'ANSES et notamment en ce qui concerne les nanoplastiques dont les études les prenant en compte sont peu nombreuses. De plus, à l'heure actuelle, les mécanismes qui gouvernent les interactions des nanoparticules et leurs effets sur les microalgues ne sont pas clairement définis. Ces interactions peuvent dépendre des propriétés physico-chimiques des nanoparticules qui sont différentes des matériaux bruts. En raison de leur fort ratio surface/volume, la chimie de surface est une caractéristique importante et peut modifier la toxicité induite. Leur taille nanométrique est également un paramètre important car cette propriété leur confère la possibilité de traverser les membranes plasmiques cellulaires ayant pour conséquence une potentielle bioaccumulation au sein de la chaîne trophique aquatique dès son premier niveau.

De plus, les nanoplastiques, du fait de leur taille et leur nature sont difficilement détectables seuls. L'idée de cette étude est de suivre la réponse des organismes pour comprendre les effets et les mécanismes mis en place en leur présence. Pour cela, au vu des méthodes recensées dans la littérature pour le suivi des nanoparticules et de l'écotoxicité sur des organismes, il nous est apparu que les spectroscopies vibrationnelles sont adaptées à notre objectif. La spectroscopie vibrationnelle apporte les avantages de pouvoir étudier l'organisme dans son milieu originel, une cellule unique mais aussi de cartographier l'ensemble de la réponse biochimique de manière précise et de demander peu de préparation d'échantillons. Enfin, il peut être intéressant d'étudier les interactions microalgues-nanoparticules de plastiques par spectroscopie infrarouge puisque celui-ci à un signal fort en infrarouge.

## Points clés du chapitre

---

- Les nanomatériaux, par leur taille et leur fort ratio surface/volume ont des propriétés physico-chimiques différentes des matériaux bruts.
  - Les propriétés qui vont influencer les interactions avec les organismes sont la taille, la chimie de surface et la capacité à relarguer des ions.
  - Les microalgues et les daphnies, organismes planctoniques, sont des modèles d'études écotoxicologiques.
  - Les interactions et les mécanismes de réponse des organismes en présence des particules de plastiques sont peu étudiés, notamment à l'échelle nanométrique.
  - Les techniques spectroscopiques semblent être un outil intéressant pour le suivi de la réponse à ces interactions et n'ont pas encore été étudié dans le cas des interactions entre microalgues et nanoplastiques.
  - Les approches de biologie moléculaire pourraient apporter une plus-value dans la compréhension des mécanismes mis en place lors de ces interactions.
-



# Chapitre 2 : Matériels et méthodes

## 1 Modèles d'étude

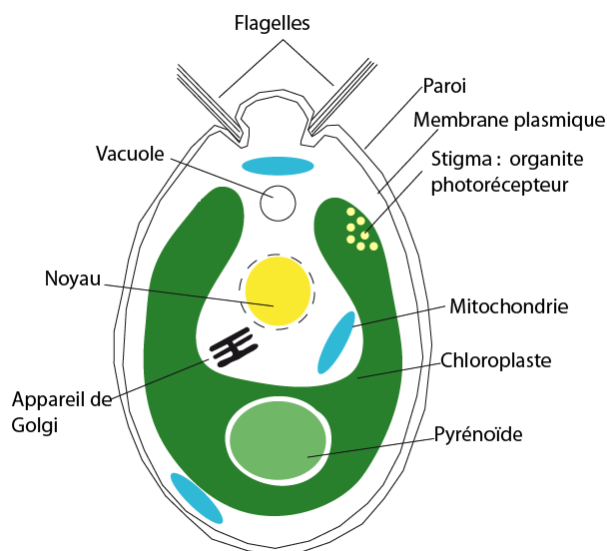
### 1.1 *Chlamydomonas reinhardtii*

*Chlamydomonas reinhardtii*, est une microalgue verte appartenant à la classe des Chlorophycées (Figure 15). La croissance rapide de cette espèce (grandes populations disponibles rapidement) et le fait qu'elle est présente de façon



Figure 15 : *Chlamydomonas reinhardtii* au microscope grossissement x 10

ubiquiste dans l'environnement aquatique en fait un modèle écotoxicologique de choix [239]. C'est aussi un modèle biologique simple, approprié à l'étude des mécanismes pour suivre les processus se déroulant à l'interface organisme/milieu [240]. Cet organisme unicellulaire biflagellé (permettant la motilité de la cellule) a deux barrières physiques : une paroi constituée de glycoprotéines (glucose, arabinose, mannose et galactose) et une membrane plasmique (Figure 16). La paroi cellulaire mesure entre 54 à 226 nm d'épaisseur et est constituée d'un ensemble de sept couches d'épaisseur variable [93] (Figure 17). Cet ensemble est dissocié en deux domaines, l'un contenant des protéines liées entre elles par des interactions non covalentes et l'autre avec des polysaccharides et quelques protéines formant la structure de la paroi [241]. La présence de pores, d'une taille estimée entre 5 et 20 nm, dans la paroi, permet à des petits éléments de passer à travers cette barrière physiologique [92, 164, 242, 243].



<b>Règne</b>	Plantae
<b>Phylum</b>	Chlorophyta
<b>Classe</b>	Chlorophyceae
<b>Ordre</b>	Chlamydomonadales
<b>Famille</b>	Chlamydomonadaceae
<b>Genre</b>	<i>Chlamydomonas</i>

Figure 16 : Schéma et classification phylogénétique de la microalgue *Chlamydomonas reinhardtii*

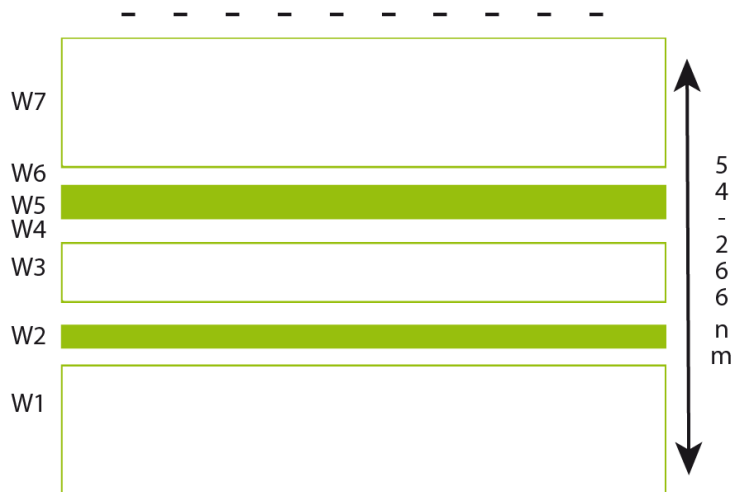


Figure 17 : Schéma de la paroi cellulaire de *Chlamydomonas reinhardtii* d'après Roberts et al., 1972 [244]. Taille des différentes couches (W) : W1 : 30-200 nm, W2 et W6 (cristalline) : 4 nm, W3 et W5 : 10 nm et W4 (non cristalline) : 10-12 nm, W7 : (couche amorphe).

Deux souches de *Chlamydomonas reinhardtii* sont utilisées dans cette étude :

- le type sauvage 2935 mt- [Québec, *Chlamydomonas* Resource Center] [245, 246]
- le type mutant CC400 cw15 mt+ [From K.-S. Chiang, University of Chicago] qui est considéré sans paroi ou avec une paroi très fine comparée au type sauvage. C'est le plus utilisé des mutants sans paroi dans la littérature d'après Davies et Plaskitt (1971) [247].

*C. reinhardtii* est mise en culture dans des Erlenmeyers de 250 mL contenant 100 mL de milieu Tris Acétate Phosphate (TAP) (Gorman et Levine 1965, Annexe Tableau 2-A) à 20 °C. Les Erlenmeyers sont placés sous une lumière de 122  $\mu\text{mol photons.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$  grâce à des tubes fluorescents blanc-froid (Philips TLD 36 W) avec une photopériode 14/10 h. Les Erlenmeyers sont randomisés chaque jour lors des expériences. Les cultures sont constamment maintenues en suspension par agitation (Table d'agitation VWR, Model 5000) à 100 rpm (rotation par minute).

Afin de comprendre les réponses des microalgues suite à différentes conditions potentiellement stressantes, les conditions de culture ont été adaptées aux expériences réalisées. Le Tableau 2 présente les paramètres modifiés pour chaque cas :

Tableau 2 : Conditions de culture et paramètres modifiés en fonction des expériences

Conditions de culture	Paramètres modifiés
Obscurité	Erlenmeyers recouverts d'aluminium
Faible intensité lumineuse	90 $\mu\text{mol photons.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$
Forte intensité lumineuse	350 $\mu\text{mol photons.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$
Très forte intensité lumineuse	700 $\mu\text{mol photons.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$
Cadmium	Concentrations testées : 50 $\mu\text{M}$ et 100 $\mu\text{M}$
Stress azoté	6 mM (réduction de 25 % par rapport au contrôle)
Nanoparticules d'or	2 mg/mL équivaut à $7 \cdot 10^5$ NP/ $\mu\text{a}$
Nanoparticules de polystyrène	2 mg/mL équivaut à $13 \cdot 10^6$ NP/ $\mu\text{a}$

## 1.2 *Daphnia magna*

L'espèce *Daphnia magna* (Figure 18) a été ici choisie comme modèle d'étude des consommateurs primaires car elle très souvent utilisée en laboratoire [249] pour les recherches d'écotoxicologie [250]. Les daphnies utilisées dans ce projet viennent de la société Aqualiment (Niederbronn-les-Bains, France). Il s'agit de petits crustacés mesurant un à quatre millimètres retrouvés dans des eaux douces parfois saumâtres et pouvant être stagnantes. Comme le montre la Figure 18, les daphnies sont protégées par une carapace transparente laissant entrevoir les organes internes, elles possèdent des antennes plumeuses servant à la nage et cinq paires de pattes.

Les daphnies ont été nourries avec des microalgues *C. reinhardtii* [251] à intervalle de deux jours (avec une concentration de 0,1 mg de carbone/daphnie/jour, sachant que 100  $\mu\text{g}$  de carbone/daphnie/jour équivaut à  $8,10^4$  cellules microalgues/mL) et sont cultivées en milieu ISO (Annexe Tableau 2-B) renouvelé toutes les semaines [252]. Les cultures sont oxygénées en continu avec une pompe à air. La température est maintenue constante à 20 °C ( $\pm 2$  °C) et l'éclairage suit une photopériode de 12:12 h. Le montage expérimental est présenté dans la Figure 19.



Figure 18 : Photo de *Daphnia magna* à la loupe binoculaire grossissement x 25.



Figure 19 : Montage expérimental

### 1.3 Caractérisation des micro et nanoparticules

Les microparticules de polyéthylène (PE) étudiées sont préparées au laboratoire IMMM par micro-émulsification [253] avec différents surfactants permettant de stabiliser la taille des MP obtenus (0,2-0,8  $\mu\text{m}$ ) et d'éviter une agrégation au cours du temps. Afin de suivre l'impact de la chimie de surface dans les effets des MP PE sur les daphnies, trois types de particules ont été fabriquées : sans surfactant (NS), avec biosurfactant (BS) et avec du Tween 60 (Tw). Les particules sans surfactant servent de témoin de l'effet des MP PE vierges. Le Tween 60 est un détergent non ionique, qui est toxique à faible concentration [254]. Le biosurfactant est un surfactant composé d'exopolysaccharides des microalgues *C. reinhardtii* qui est considéré comme non toxique.

La concentration des MP PE a été quantifiée à l'aide des cellules Malassez en utilisant du Rouge de Nil pour détecter les microparticules à la lumière visible. Le Rouge de Nil donne la fluorescence des microparticules grâce à l'adsorption sur leurs surfaces. Ce produit est sensible à la lumière. Une solution mère des MP PE a été préparée à une concentration de 60 mg/L (équivalent à  $4,56 \times 10^7$  MP/L, [102]).

Les nanoparticules (NP) utilisées dans ses travaux sont des particules commerciales (Interchim) d'une taille de 100 nm. Les nanoparticules d'or sont en solution aqueuse à une concentration de 0,01 % avec un surfactant citrate. Les nanobilles de polystyrène sont quant à elles stabilisées avec un surfactant anionique en solution aqueuse à 1 % en concentration.

Le potentiel zêta et la taille des nanoparticules sont mesurées à l'aide de l'appareil Zetasizer Nano ZS (Malvern). Cet appareil permet par le principe de la diffusion dynamique de la lumière (diffusion des particules proportionnelle à la taille) de mesurer la taille des petites particules. Cette technique mesure la diffusion des particules soumises aux mouvements browniens et calcule une distribution de taille des particules au moyen de la relation de Stokes-Einstein. La technologie de rétrodiffusion non invasive (NIBS) sert quant à elle à augmenter au maximum la sensibilité, la plage de concentration et de taille dynamique. La vitesse du mouvement brownien étant liée à la température, un contrôle précis de celle-ci est essentiel pour obtenir des mesures précises de la taille. La charge ou potentiel zêta des particules est déterminée par mesure de leur mobilité électrophorétique. Quand un champ électrique est appliqué sur une solution, la vitesse à laquelle les particules vont migrer vers une électrode est proportionnelle à l'intensité du champ et à leur potentiel zêta. Si l'intensité du champ est connue, la vitesse de déplacement est simplement mesurée en réalisant une électrophorèse par laser Doppler et à partir de cela la mobilité électrophorétique est calculée. Les tailles mesurables par cet appareil sont comprises entre 0,3 nm et 10  $\mu\text{m}$  et les mesures de potentiel zêta sont réalisables pour des particules de 3,8 nm à 100  $\mu\text{m}$  de diamètre. Les échantillons doivent avoir une concentration allant de 0,1 ppm à 40 % p/v pour être mesurables d'après le constructeur (Malvern). Les dispersants utilisés dans cette étude sont l'eau ultra-pure et le TAP (viscosité : 0,8859 cP ; indice de réfraction : 1,330, constante diélectrique : 78,5). Les mesures sont réalisées à 25 °C avec un délai de 20 secondes entre chaque mesure. La mesure de taille est réalisée en six réplicats dans des cellules de type DTS0012 par back scattering (173°). La mesure de potentiel zêta est réalisée dans des cellules DTS1070 en triplicat à un voltage de 2 volts avec le modèle Smoluchowski.

## **2 Suivi des interactions microalgues-nanoparticules**

### **2.1 Visualisation**

#### **2.1.1 Microscope électronique à balayage**

Le fonctionnement du microscope électronique à balayage (MEB) est basé sur la détection des électrons secondaires. Un canon à électrons (filament de tungstène) va émettre un faisceau étroit d'électrons primaires qui va se focaliser en une zone précise de l'échantillon. L'échantillon conducteur va générer à la suite des électrons secondaires (d'énergie faible) qui vont être récupérés par un détecteur et le signal est amplifié par la suite. Toute la surface de l'échantillon va être balayée de cette façon. Cette technique permet d'obtenir des images de surface et de topographie, point par point à fort grossissement (X 5-300 000), avec une résolution pouvant aller jusqu'à quelques nanomètres.

Les échantillons sont préparés de deux manières soit par dépôt d'une goutte de microalgues (en présence ou absence de NP or) sur une surface de silicium, soit par filtration de la culture de microalgues en fin d'expérience sur filtre microfibrilles de verre Whatman préalablement lavés avec du milieu TAP. Les échantillons sont séchés à l'air libre et une métallisation carbone (Métalliseur JEOL, JEC-530) est réalisée pour qu'ils soient conducteurs et pour éviter la métallisation or (l'or étant déjà présent dans certains échantillons à l'état de nanoparticules). Une fine couche de carbone est donc pulvérisée sur les échantillons pour le charger. Les échantillons sont ensuite observés par le MEB (modèle JSM-6510, marque JEOL) de la plateforme microscopie électronique de l'IMMM : tension 10 kV, spot size 35. Enfin, l'analyse dispersive en énergie EDS (ou EDX) est utilisée pour obtenir la composition en éléments des échantillons observés. Les images obtenues sont analysées à l'aide du logiciel AZtec.

#### **2.1.2 Microscopie champ sombre**

Le principe de la microscopie champ sombre s'appuie sur le phénomène de diffusion des rayons lumineux par l'objet observé et non pas ceux réfléchis directement. Cette méthode est une technique qui peut permettre de distinguer des éléments non visibles en champ clair et qui diffusent fortement la lumière. La microscopie champ sombre est appliquée notamment pour l'étude de nanoparticules métallique à l'échelle d'une particule, comme les nanoparticules d'or [255].

### 2.1.3 Microscopie confocale

La microscopie confocale à balayage laser permet d'identifier des structures en focalisant la lumière fluorescente émise sur un seul plan focal d'un échantillon. La lumière hors de ce plan est filtrée ce qui fait que l'intensité lumineuse des objets est faible et que l'on a, la plupart du temps, recours à des fluorophores pour visualiser les objets. Un faisceau laser focalisé vient balayer l'échantillon en x, y et z à l'aide d'une platine motorisée, de lentilles et d'un diaphragme. Chaque point de l'échantillon correspond à un pixel de l'image créée. Suite à une absorption de photons (énergie lumineuse), les échantillons émettent une lumière fluorescente soit grâce à leur nature (photoluminescence), soit grâce à des fluorochromes adsorbés à leur surface (Figure 20). La fluorescence, caractérisée par l'émission de photons a lieu lors du passage de la molécule de l'état excité à l'état fondamental. Les molécules marquées avec une sonde fluorescente ne peuvent pas être excitées à l'infini. A chaque passage d'un état à l'autre, la sonde se dégrade conduisant à la photo-destruction de celle-ci.

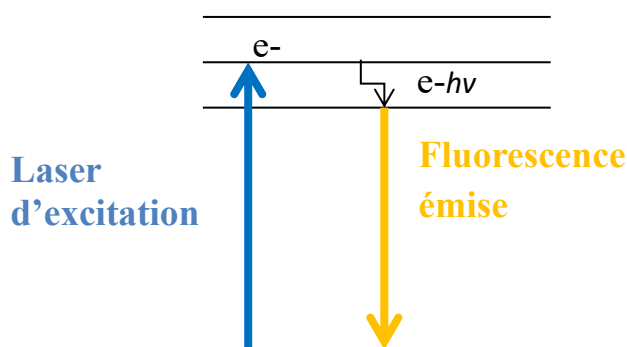


Figure 20 : Photoluminescence d'une sonde fluorescente (schéma réalisé d'après Ako (2010) [256]).

Après une étape de calibration de l'appareil Zeiss LSM800 microscope (Carl Zeiss Microscopy GmbH, Jena, Germany), l'échantillon (1 mL de suspension algale) est inséré entre lame de verre et lamelle bordé d'un scotch spécial pour éviter l'évaporation. En position "load", la lame est placée lamelle vers le bas sur le support du microscope puis la distance objectif-échantillon est ajustée jusqu'à ce que la goutte d'eau touche la lamelle. Enfin un dernier réglage du focus est réalisé à l'aide de l'ordinateur. L'acquisition se fait à grossissement X 25 ou X 63, en réflexion, avec un objectif à immersion. Les paramètres d'acquisition sont réglés dans le mode Imaging setup du Logiciel Zen System. La microscopie confocale permet d'observer des objets fluorescents sur un plan donné. La microalgue est naturellement fluorescente et les nanoparticules de polystyrène sont ici marquées au rouge de Nil. Le rouge de Nil ( $C_{20}H_{18}N_2O_2$ ) utilisé ici, dont le spectre d'émission est présenté Figure 21, est photostable sur quelques jours ( $\lambda$  excitation : 552 nm,  $\lambda$  émission : 636 nm) puis photoblanchit. A l'objectif X 25, après 2 h

d'interaction entre les nanoparticules de polystyrène et les microalgues, l'échantillon est excité par deux lasers à 5 % aux longueurs d'ondes 488 et 561 nm. La lumière émise par l'échantillon est captée par deux canaux de détection CNF : (583-700 nm, master gain : 530 V) et Nile Red (550-583 nm, master gain : 594 V).

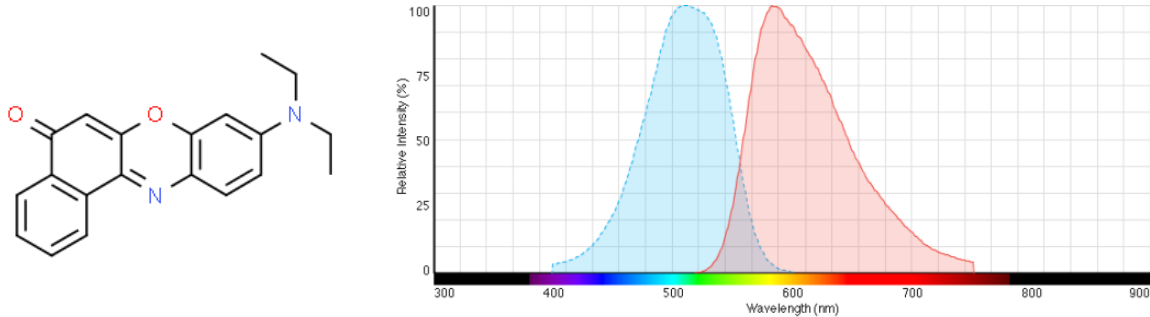


Figure 21 : Structure chimique et spectre de fluorescence du Rouge de Nil (source : thermofisher.com).

La distribution d'intensité lumineuse est représentée ce qui permet une meilleure visualisation de la saturation. Afin d'obtenir une meilleure qualité d'image, la puissance du laser et le master gain ont été modifiés pendant l'analyse. En effet, plus la puissance est importante, plus le rapport signal/bruit est grand et plus la valeur du master gain est haute et plus le détecteur sera sensible, à tous les petits signaux de fluorescence mais également au bruit de fond. Le balayage de l'échantillon est réalisé en mode unidirectionnel et en ligne, ce qui permet un temps plus faible entre deux passages (ici au nombre de quatre) au même point de la zone étudiée. La méthode de mesure choisie est de moyenniser les intensités sur chaque pixel. De plus, la taille de l'image (Frame Size) est de 1276\*1276 pixels (avec huit bits par pixel). Des séries temporelles ont été réalisées avec cet appareil.

## 2.2 Suivi de l'état physiologique et moléculaire des microalgues

### 2.2.1 Croissance

La croissance des microalgues est suivie par comptage cellulaire des cultures sur cellule de Malassez (Figure 22) à une dilution au 1/10<sup>ème</sup> dans du milieu TAP. Dans 10 carrés de la cellule de Malassez, les cellules sont dénombrées de telle façon qu'elles ne soient prises en compte qu'une seule fois, puis rapportées au volume initial introduit. La densité cellulaire est calculée comme suit : Nb de cellules par mL =  $\sum$  (10 comptages) \* facteur de dilution \* volume du rectangle de comptage (1/0.01X10<sup>-3</sup> mL =1000).



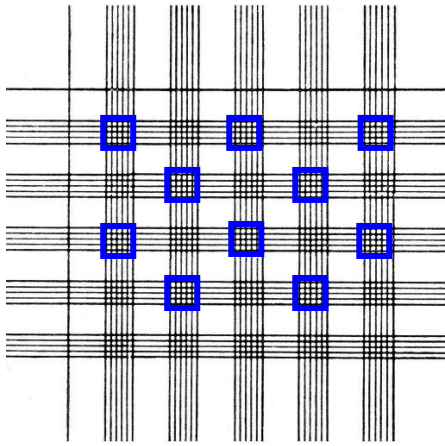


Figure 22 : Schéma d'une cellule de Malassez avec les carrés dénombrés (en bleu).

### 2.2.2 Fluorescence : suivi de l'activité photosynthétique

La fluorimétrie modulée (ou mesure de la fluorescence chlorophyllienne) est une technique non intrusive qui fournit des informations rapides, fiables et reproductibles sur le photosystème II et la perturbation de l'activité photosynthétique [257, 258]. Le principe de la fluorimétrie modulée est basé sur l'émission d'un signal lumineux modulé de faible puissance (lumière analytique, Nichia NSPB-500S) pour induire la fluorescence couplée à un système récepteur permettant de mesurer et d'enregistrer les variations du signal de fluorescence de même fréquence émise par les microalgues. Deux sources lumineuses composent le système, la lumière analytique (précédemment décrite) et la lumière actinique (lumière blanche, lampe Osram 8 V, 20 W), dont l'intensité est variable et est utilisée pour activer la photosynthèse.

Pour mesurer la fluorescence des microalgues, il faut d'abord standardiser la densité optique des échantillons. Pour cela, un spectrophotomètre et son logiciel (Perkin Elmer UV WinLab), sont utilisés pour obtenir un scan de la culture de microalgues (triplicat d'1 mL analysé) des longueurs d'onde de 600 à 800 nm, à une vitesse de scan de 480 nm. Le milieu de culture TAP est utilisé comme blanc pour les mesures.

Les échantillons sont dilués dans du milieu TAP à une DO de 0,1 pour mesure de la fluorescence selon la formule suivante :  $V_i = (DO_f \times V_f) / DO_i = (0,1 \times V_f) / (DO_{680 \text{ nm}} - DO_{800 \text{ nm}})$ . La solution diluée est placée dans une cuve en verre bi-miroitée avec barreau aimanté pour maintenir l'homogénéité de la culture. L'échantillon est gardé à température constante (23,5 °C) grâce à un cryothermostat. La mesure de fluorescence est réalisée à l'aide d'un fluorimètre FMS-1 (Hansatech) modifié par Rech et al. (2003) [260]. La cuve est placée dans l'obscurité pour éviter toute interférence de la lumière avec la mesure. Après dix min d'acclimatation des

microalgues, période nécessaire pour une ré-oxydation complète des accepteurs d'électrons des photosystèmes II, la mesure est réalisée à l'aide du logiciel Modfl2.

Le programme est constitué de deux étapes :

\*une 1<sup>ère</sup> étape qui permet d'éliminer tous les électrons de la chaîne photosynthétique pour avoir le niveau de fluorescence minimale ( $F_0$ ).

\*une 2<sup>ème</sup> étape ou pulse réactionnel d'intensité 85 qui correspond à 1700  $\mu\text{mol/photons}$ , pendant 0,8 s donnant le niveau de fluorescence maximale ( $F_m$ ). Ce passage d'un état fondamental stable à un état excité, induit une inhibition temporaire de la photochimie au niveau des centres réactionnels par la réduction momentanée des accepteurs d'électrons du photosystème II (PSII). La chlorophylle excitée se désactive spontanément par fluorescence, par dissipation thermique ou par photochimie. Le spectre obtenu à l'allure présentée en Figure 23.

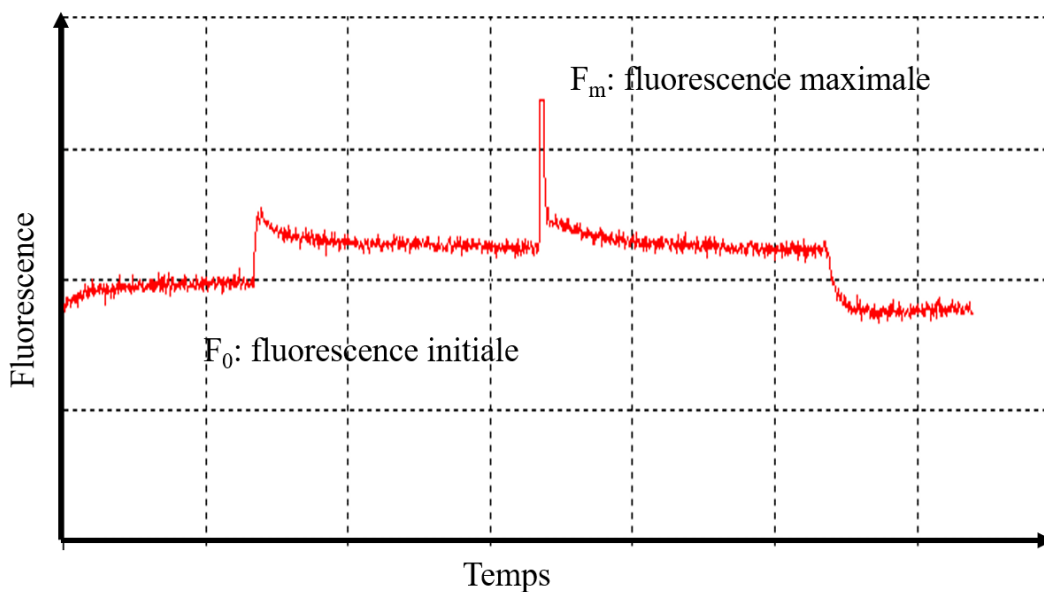


Figure 23: Spectre de fluorescence de *Chlamydomonas reinhardtii*

La fluorescence à l'état initial ( $F_0$ ) est mesurée lorsque tous les centres réactionnels du PSII sont ouverts (à l'obscurité). Tandis que la fluorescence maximale ( $F_m$ ) est mesurée lorsque tous les centres réactionnels du PSII sont fermés. Ces deux paramètres nous permettent de connaître la fluorescence variable ( $F_v$ ) correspondant à la fraction des centres réellement actifs et de calculer le rapport  $F_v/F_m$  par la formule suivante :

$F_v/F_m = (F_m - F_0)/F_m$  : rendement quantique de la photosynthèse nette, traduit l'efficacité du photosystème II à utiliser la lumière pour la conversion photochimique.

### 2.2.3 Screening des pigments

La chromatographie sur couche mince (CCM) a été utilisée ici pour observer les pigments présents chez *Chlamydomonas reinhardtii*. La CCM a pour principe la migration par capillarité des pigments disposés sur une phase stationnaire fixe par une phase mobile liquide, appelé éluant. Après centrifugation de microalgues broyées et reprises dans de l'acétone, le dépôt des centrifugats se fait par spot de 10 µL sur le haut de la plaque d'oxyde d'aluminium, qui constitue la couche mince. Après 20 min de séchage, la plaque est trempée dans un bécher contenant un mélange de solvant éther de pétrole/acétone (70:30). Sous hotte, la solution est recouverte d'aluminium (pour éviter la photodégradation) et la migration se déroule ensuite pendant 15 min.

### 2.2.4 Intégrité membranaire : dosage de la lactate déshydrogénase

Dans la cellule, l'enzyme lactate déshydrogénase (LDH) catalyse la réaction d'oxydation du lactate au pyruvate, qui est liée à une co-réaction de réduction du  $\text{NAD}^+$  en NADH. Si la membrane plasmique de la microalgue est intacte, l'enzyme LDH reste dans la cellule. Par contre, si la membrane est impactée, la quantité d'enzyme LDH retrouvée dans le milieu environnant la microalgue va être proportionnelle à la quantité de dommages à la membrane (Figure 24). Pour quantifier les dégâts membranaires, le test de la LDH, qui consiste à mesurer la quantité de  $\text{NAD}^+$  réduite par mesure d'absorbance au spectrophotomètre UV-visible (proportionnelle à l'activité de la LDH, [182]) est utilisé. Le protocole décrit par Pakrashi et al. (2013) [61] est le suivant : 1 mL de culture de microalgues est centrifugé dix min à 6000 g. 100 µL de surnageant sont prélevés et additionnés de 100 µL de pyruvate de sodium 30 mM et 2,8 mL de Tris-HCl à 0,2 M. Ensuite, 100 µL de NADH à 6,6 mM sont ajoutés et les échantillons sont agités par retournement juste avant mesure au spectrophotomètre. La mesure de DO est réalisée sur 1 mL à 340 nm en triplicats.

Cellules endommagées

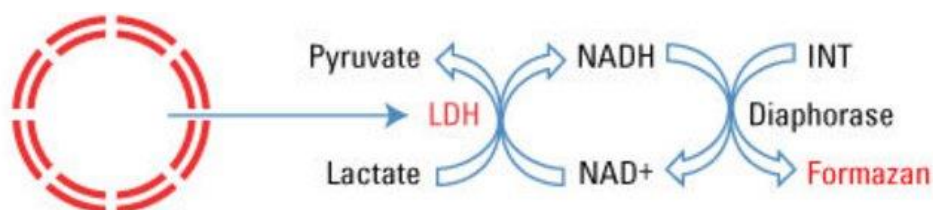


Figure 24 : Schéma montrant la réaction d'un test LDH (source : <http://www.thermofisher.com/order/catalog/product/88953>)

### 2.2.5 Approche moléculaire : RT-PCR quantitative

10 mL de culture de microalgues sont prélevés après interaction avec les différentes conditions de stress et filtrés à l'aide d'une unité de filtration et de filtres microfibrilles de verre Whatman de diamètre 47 mm et de pores de 1,2 µm. Les filtres sont ensuite conservés dans de l'azote liquide avant d'être mis à -80 °C pour une utilisation future.

L'ARN est extrait des microalgues à l'aide du kit Spectrum Plant Total RNA (Sigma-Aldrich). Une première étape de broyage dans des mortiers passés au four pasteur (5 h minimum à 150°C) est réalisée en présence d'1 mL tampon de lyse avec 10 µL de bêta-mercaptoéthanol, jusqu'à obtenir une pâte liquide. Cette pâte est introduite dans des tubes Eppendorf pour la deuxième étape de séparation et d'accroche sur la colonne. Les tubes sont "vortexés" pendant 30 s puis mis à incuber à 56 °C durant 5 min. Une centrifugation est réalisée à 15700 g pendant 3 min pour séparer les débris cellulaires du reste de l'échantillon. Le surnageant est ensuite placé sur la colonne de filtration puis une nouvelle centrifugation est réalisée (15700 g, 1 min) ce qui retient les petits débris. Le liquide est récupéré et 750 µL de solution d'accroche sont ajoutés. 700 µL de ce mélange sont déposés sur la colonne "binding" et centrifugés à 15700 g, durant 1 min pour permettre l'accroche des acides nucléiques sur la membrane. Le liquide est jeté et le reste du volume contenant les acides nucléiques est redéposé sur la colonne. Dans une troisième étape, la colonne est lavée par ajout de solution de lavage 1 (300 µL) puis centrifugation pendant 1 min à 15700 g. Un traitement DNase (10 µL de DNase et 70 µL tampon de DNase digestion) est déposé sur la membrane. S'en suit une incubation à température ambiante de 15 min pour permettre à la DNase d'agir. Puis la colonne est lavée dans les mêmes conditions que précédemment avec 500 µL de solution de lavage 1 puis avec une solution de lavage 2 (30 secondes de centrifugation à chaque fois). La colonne est centrifugée à vide 1 min à 15700 g pour éliminer l'éthanol restant. La quatrième étape consiste à récupérer les ARN en transférant la colonne sur un nouveau tube, en ajoutant 50 µL de solution d'élution sur la membrane et en laissant incuber 1 min à température ambiante avant une dernière centrifugation à 15 700 g, durant 1 min. L'ARN extrait est conservé à -80°C.

#### 2.2.5.1 *Quantification de la concentration en ARN*

Pour doser la concentration en ARN de la fraction obtenue et vérifier la pureté de l'échantillon, le Nanodrop 2000 (Thermo Scientific) est utilisé. Le blanc est réalisé sur 1 µL de tampon d'élution. De la même manière, 1 µL d'échantillon est déposé pour obtenir une courbe d'absorbance entre 230 et 300 nm avec une mesure notée à 260 (acides nucléiques) et 280

(protéines) nm. Pour avoir une bonne pureté d'échantillon, le rapport 260/280 doit être autour de 2.

### 2.2.5.2 Transcription inverse (ou RT ou reverse transcriptase)

Cette étape consiste à transcrire les ARN messagers (ARNm, 1 % des ARN totaux), qui correspondent aux gènes sollicités à un moment précis, en ADN complémentaire (ADNc) (Figure 25). Pour cela, tous les échantillons sont dilués à une même quantité d'ARN. Aux 100 ng d'ARN, sont ajoutés un master mix comprenant 2 µM d'oligo dT modifiés [261], 10 µM random primers (8-10 paires de base ; Proméga) et de l'eau sans nucléase (qsp 15 µL). Les échantillons sont ensuite placés dans un thermocycleur (Applied Biosystems Veriti 96-Well Programmable Thermocycler) pour une étape d'accroche des amorces et de dénaturation d'éventuels doubles brins d'ARN (70 °C, 5 min). Puis un deuxième master mix contenant 200 U de l'enzyme MMLV RT (Proméga), 1X tampon MMLV, 0,5 mM dNTP et 25 U RNase inhibitor a été ajouté. De l'eau sans nucléase (qsp 10 µL) est ajoutée dans chaque microtube pour obtenir un volume final de 25 µL. Les ARN en mélange sont replacés dans le thermocycleur pour une deuxième étape de 65 min à 42 °C. Les échantillons sont ensuite conservés à -20 °C.

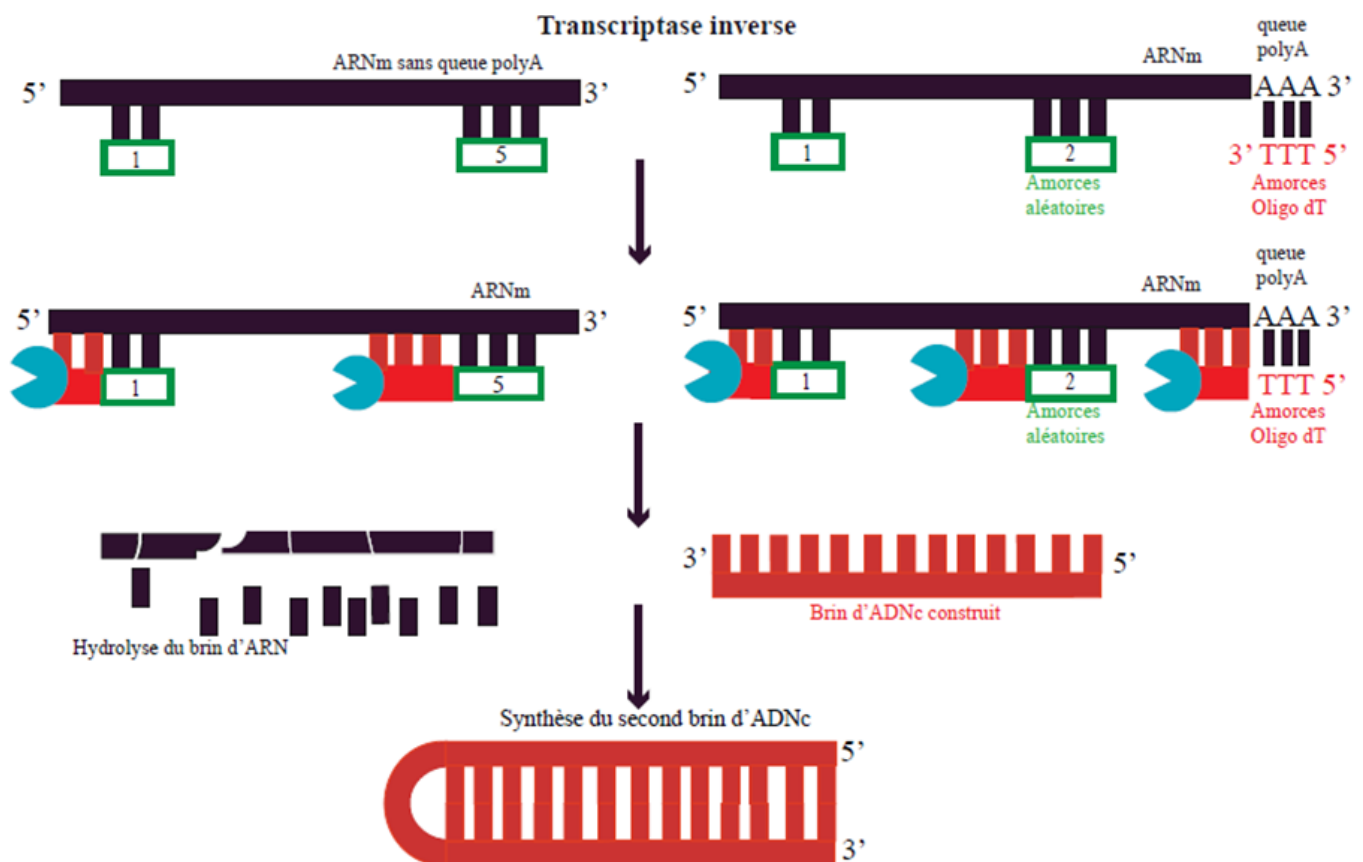


Figure 25 : Principe de la transcription inverse

### 2.2.5.3 Réaction en chaîne par polymérase en temps réel (qPCR, quantitative Principal Chain Reaction)

La RT-PCR quantitative est réalisée en deux temps grâce au kit *GoTaq* qPCR Master Mix (Proméga). Dans une première étape, la qualité d'accroche des amorces et un choix de dilution de l'ADNc sont réalisés. Dans un second temps, l'expression de chaque gène est obtenue pour chaque condition étudiée. Quelle que soit l'étape, le mélange par puits est composé de : 4,9 µL d'ADNc et 8,3 µL d'un mélange composé de 7,55 µL de 2X *GoTaq* qPCR Master Mix, 0,3 µL de chaque amorce sens et anti-sens à 10 µM et 0,15 µL de CXR (stabilisateur de la fluorescence).

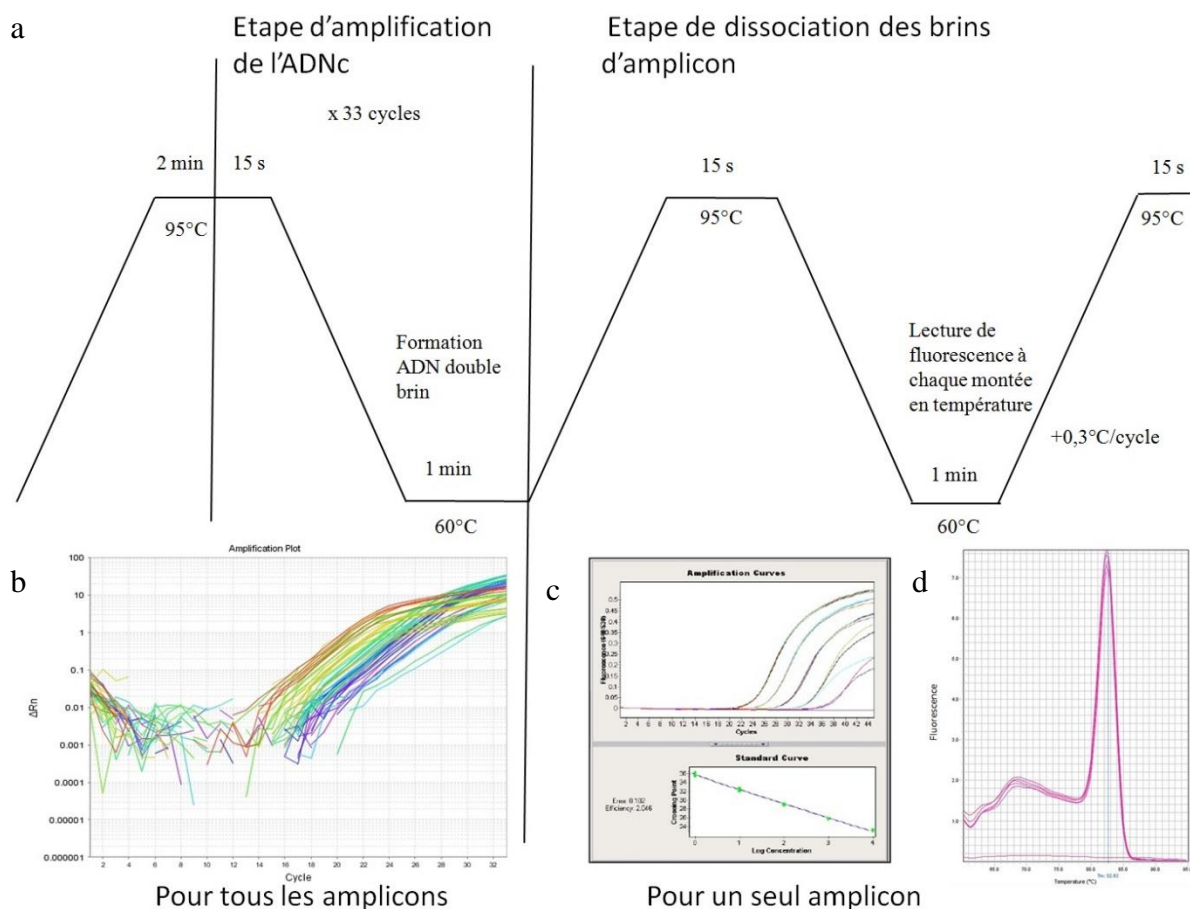
#### Première étape : choix des amorces et de la dilution de matrice

Il est réalisé une première RT-qPCR pour vérifier l'efficacité de l'amplification par PCR et qu'aucune population d'ADNc ne va prendre le dessus par rapport à une autre population. Pour cela un mélange des différents ADNc par condition - à un même volume - est réalisé et dilué en cascade. La dilution peut être choisie tout d'abord de façon arbitraire puis affinée ou de façon plus précise par rapport à des tests précédents ou suivant la littérature. La dilution au 1/2 a été testée en partant d'une concentration d'ADNc mélangés de 100 ng.

Le programme utilisé est résumé en Figure 26a. La première étape permet l'amplification des gènes à partir du mélange d'ADNc, alors que la deuxième partie du programme, permet quant à elle la vérification de l'efficacité d'accroche des amorces, de l'absence d'inhibiteur de PCR et la sélection de la dilution.

L'analyse des résultats se fait à l'aide du logiciel Step One 2.1. Les cycles threshold (Ct, nb de cycle PCR à partir duquel l'ADNc devient quantifiable), les courbes standard, le pourcentage d'efficacité et les courbes de dissociation sont ainsi obtenus (Figure 26). Sur le logiciel Step one 2.1, le profil de la courbe d'amplification est premièrement observé (Figure 26b). Les courbes doivent avoir une allure de croissance exponentielle finissant par un plateau et entre les dilutions, elles doivent être décalées d'un Ct pour des dilutions au demi. Une valeur de Ct très élevée peut indiquer une inhibition. Dans un deuxième temps, la courbe standard (droite d'efficacité) est analysée pour chaque couple d'amorces testées (Figure 26c). L'efficacité est obtenue par la formule suivante  $E(\text{Efficacité}) = 10^{-1/\text{coeff.pente}}$ , à partir de la pente de la courbe  $Ct = f(\text{concentration})$ . Plus le pourcentage est proche de 100 %, plus l'efficacité est bonne et montre un doublement de la matrice à chaque cycle PCR. Pour les calculs, l'efficacité est notée de la façon suivante : 100 %=2, d'où 98 %=1,98 et 110 %=2,10. Pour tous les couples

d'amorces testés (Tableau 3), seuls ceux ayant une efficacité comprise entre 85 et 115 % ont été conservés. Pour tous les couples d'amorces retenus, une dilution au centre de la droite de régression linéaire a été retenue pour être commune à tous les échantillons et employée ensuite lors de la deuxième étape de la PCR en temps réel. La dilution 1/8<sup>ème</sup> a été choisie. En parallèle, la présence d'un seul pic sur la courbe de dissociation est vérifiée pour valider que l'amplification s'est réalisée correctement et qu'un seul amplicon par couple d'amorces soit obtenu (Figure 26d).



**Figure 26 : RT-qPCR (a) Programme, Résultats : (b) Courbe d'amplification permet d'obtenir les cycles threshold (Ct), (c) Droite d'efficacité pour déterminer la qualité d'accroche des amorces, (d) Courbe de fusion pour validation de la qualité de l'ADN quantifié.**

### Deuxième étape : expression de gènes

Chaque RT est diluée à la dilution optimale (1/8<sup>ème</sup>) et il est appliqué le même protocole de remplissage de plaque que précédemment et le même programme de PCR en temps réel (Figure 26a) Les Ct obtenus pour chaque échantillon amplifié avec les gènes de ménages sont entrés

dans le logiciel Best Keeper [262] pour vérifier leur stabilité au cours du temps et dans chaque condition. Deux gènes de ménage ont été sélectionnés et ont permis de calculer l'expression des gènes selon la formule des  $\Delta\Delta Ct$ .

**Tableau 3 : Couples d'amorces testés et leur séquence : gène de ménage (rps 2, 8, 14, 19), gènes liés au stress (RbcL, cat, sod, perchl, hsp 20, hsp70, cas), gènes liés aux polysaccharides (GD Q1, GE Q1, GLD Q1, ME Q2, PG Q1), gènes liés à la voie de biosynthèse de l'astaxanthine (Q1 BKT, Q2 CHY).**

Gènes	Sigle	Sens (F)/ Antisens (R)	Séquence des amorces (5'=> 3')
<b>de ménage</b>			
Protéine ribosomale petite unité 2	rps 2	F	CGAACGGTAAAGAAAATGCT
		R	ACAAATTGCAGCCCAAAAAC
Protéine ribosomale petite unité 8	rps 8	F	TCGCCTTAAATATCGTTCAAAA
		R	CCTTCAGGCGTTGTAAACAAT
Protéine ribosomale petite unité 14	rps 14	F	ACGGTTGTGTAACGACTG
		R	GCGTGAATTAACGCCAAA
Protéine ribosomale petite unité 19	rps 19	F	CACGTTTCATCAATGATTGTTCC
		R	TTAGCATGGCCACGATATGTA
<b>lié au stress</b>			
Grande sous unité L de la RuBisCo	rbcL	F	AGC TTC AGC AAC GAA AAG GA
		R	ATT CGT AGG TCC TCC ACA CG
Catalase	cat	F	CAGCTTTCCTGCAGACCTTT
		R	GTGGAGGAGGAGTTTGTGGA
Super Oxyde Dismutase : stress oxydatif	sod	F	ATGAACATCCACCACACCAA
		R	CCTTCCAGAAGAAGCTGTGG
Peroxydase : stress oxydatif	perchl	F	CAGCTTTCCTGCAGACCTTT
		R	TCCACAAACTCCTCCTCCAC
Heat Shock Protein 20: réparation protéique	hsp 20	F	GGC ATG AGT GAC GAG GACAT
		R	CTGAAGCGGTAAGACACACG
Heat Shock Protein 70 : réparation protéique	hsp 70	F	GTCGGTCTACACCTCCAAGC
		R	GTCGGTCAAGGAGTGTGACGC
Caspase : apoptose	cas	F	GCAAGAAGGCTGTCCTCATC
		R	GCTCTTGTCGGTGTCAATCA
<b>Biosynthèse des polysaccharides</b>			
UDP-glucuronate décarboxylase, xylose	GD Q1	F	GTGACTACCTGGTGGCTCGT
		R	GATTTGGTCCACCTCCAAGA
	GD Q2	F	GTGGTGACGAACTTCGTGTC
		R	GTGTTCTCGGGGTACTIONGAT
UDP glucose 4 épimérase, galactose	GE Q1	F	CAAGCCGCTCGAGTACTACC
		R	ACATGTCCTCCTGGAACAGC
	GE Q2	F	AGATGATCAAGGCGTTTCGAG
		R	ACATGTCCTCCTGGAACAGC



UDP glucose 4-6dehydratase, rhamnose	GLD Q1	F	CATCAAGGGCGATATCCAGT
		R	GGTCTCGCCATACACCTCAT
	GLD Q2	F	CGCAGCTACCTGTACGTTGA
		R	ACGTTGACCACCTTGCTCTC
GDP mannose 3-5 épimérase, galactose	MEQ1	F	GCAGCTGTGCAAGCACTACA
		R	GCAGTCGTCAATGAAGGTGA
	ME Q2	F	GTCCTTCGACGACAAGAAGC
		R	TGCTGTGGCTGTACTTGTT
Phosphoglucomutase glucose	PG Q1	F	CGACCGTGTTATTTGCCTTCG
		R	GGTCTCGCCATACACCTCAT
	PG Q2	F	GACCGTGTTATTTGCCTTCG
		R	GTAACCCGAGGGGTAGTCAA
<b>Biosynthèse de l'astaxanthine</b>			
$\beta$ -carotène hydrolase voie de biosynthèse de l'astaxanthine	Q2 CHY	F	GAGCTCAACGACATCTACGC
		R	TTGGTGTGGTGGATCTGATG
	Q1 CHY	F	GGCATCGCCTACATGTTCTT
		R	AGCTTGTCCAGCTCCTCCTT
$\beta$ -carotène kétolase voie de biosynthèse de l'astaxanthine	Q1 BKT	F	TTCCGCCTGTTCTACTACGG
		R	GTGCTCCCAGTGCAGGTC
	Q2 BKT	F	TACCACTTCGACCTGCACTG
		R	GAGGCGGAGGAAGCTGAC

### 2.3 Analyse de l'état de la microalgue par spectroscopie Raman et infrarouge

Les spectroscopies vibrationnelles (Raman et infrarouge) souvent présentées comme complémentaire ont toutes les deux été étudiés ici.

#### 2.3.1 Spectroscopie Raman

Les appareils Raman utilisés dans ces travaux sont le T64000 (Horiba Jobin-Yvon associé à un microscope Olympus BX41) et l'Xplora (Horiba – Jobin Yvon). Le T64000 est un spectromètre triple réseaux (trois monochromateurs) tandis que l'Xplora est constitué que d'un seul réseau. Le triple réseau du T64000 permet d'avoir une haute résolution spectrale, qui à 514 nm est de l'ordre de  $0,1 \text{ cm}^{-1}$ . Le T64000 à un laser à Ar/Kr (Argon/Krypton) permettant une forte intensité de faisceau (400 mW), d'avoir plusieurs longueurs d'ondes possibles (entre  $\lambda_1 = 457 \text{ nm}$  et  $\lambda_{10} \approx 647 \text{ nm}$ ) et des  $\lambda_i$  avec une faible largeur spectrale (pas d'élargissement des raies Raman par l'excitatrice) ainsi qu'une longueur d'onde très stable. L'Xplora fonctionne avec des diodes lasers (638 et 785 nm) et un Nd : YAG (532 nm). Les diodes lasers ont des puissances plus faibles que le laser Ar/Kr et présentent l'inconvénient que la longueur d'onde est sensible à leur température d'où une moindre précision sur la longueur d'onde ( $\Delta\lambda/\lambda$  grand). L'excitatrice à 532 nm est doublée en fréquence et sa nature solide lui confère une longueur d'onde très stable. La température du détecteur est abaissée pour réduire le bruit

électronique. Sur le T64000, le refroidissement se fait à l'azote liquide ( $T=-133^{\circ}\text{C}$ ) alors que sur l'Xplora le froid est obtenu par un Peltier ( $T=-69^{\circ}\text{C}$ ). Les détecteurs ont une faible réponse si la longueur d'onde est grande. Ceci a pour conséquence que les photons de faibles énergies (c'est-à-dire les vibrations moléculaires de hautes fréquences) ne peuvent pas être détectés aussi facilement à 785 nm qu'à 532 nm.

L'Xplora est en lien avec le logiciel Labspec Version 5. La réponse des microalgues après un et quatre jours de stress lumineux a été suivie par dépôt de 10  $\mu\text{L}$  de suspension algale sur une surface de silicium. Pour cet appareil, l'acquisition du spectre a été réalisée sur la gamme 400-1700  $\text{cm}^{-1}$  à une longueur d'onde de 532 nm, à l'objectif X50 avec un réseau de 1800 traits/mm et un filtre de densité de 10 %. Le temps d'acquisition est de 3 secondes. En ce qui concerne les analyses avec le T64000, les paramètres utilisés sont les suivants : grossissement X10, réseau de 1800 traits/mm et temps d'acquisition et d'accumulation d'une seconde. Un filtre de densité optique de 0,3 a été utilisé pour protéger les microalgues de la forte intensité du laser d'excitation. Le laser d'excitation utilisé à une longueur d'onde de 514 nm pour le T64000 et la gamme spectrale étudiée est comprise entre 1050 et 1560  $\text{cm}^{-1}$ . Cette gamme spectrale est plus faible que la gamme précédemment étudiée avec l'Xplora car il a été observé que les pics ressortaient tous dans cette gamme plus restreinte et cela permet de diminuer le temps d'exposition de l'échantillon au laser et ainsi d'éviter leur dégradation.

Un spectre Raman type est présenté sur la Figure 27. Il est à noter des pics caractéristiques du substrat de silicium, des pigments bêta-carotènes et du pigment astaxanthine.

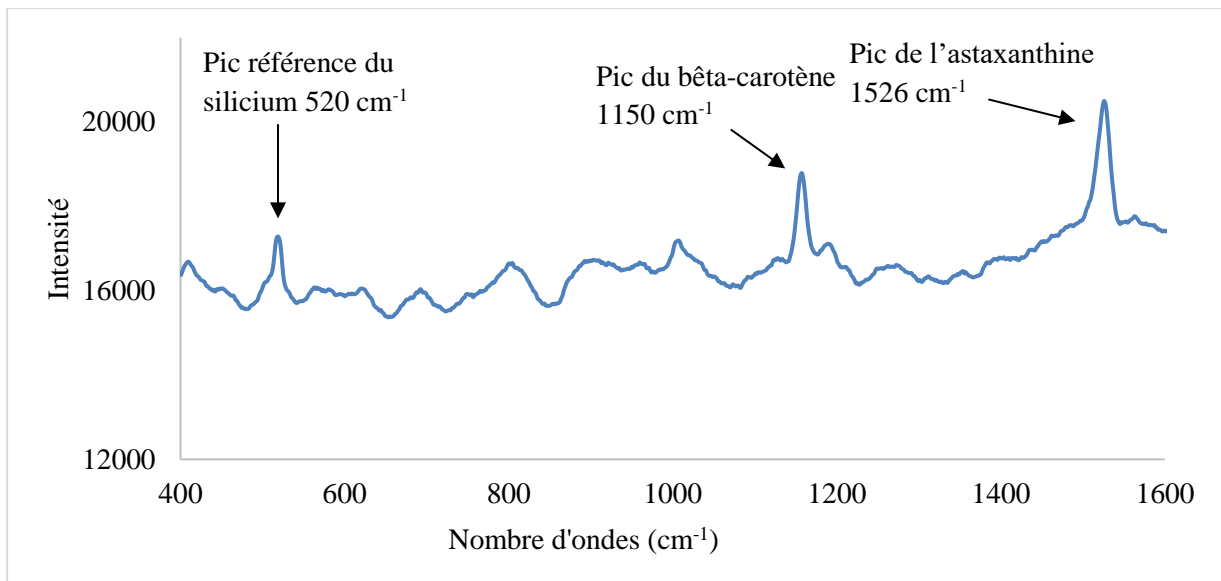


Figure 27 : Spectre représentatif Raman résonance de *Chlamydomonas reinhardtii* souche 2935 excité à 532 nm. Paramètres : Scan de 400 à 1700 cm<sup>-1</sup> à une longueur d'onde de 532 nm, réseau 1800 traits/mm, résolution 1 cm<sup>-1</sup>, à l'objectif X50 et avec un filtre de densité de 10 %. Lissage Savitzky-Golay 5 points.

Concernant l'analyse des spectres Raman, plusieurs types de prétraitements ont été testés. Les prétraitements à l'aide des dérivées (première et seconde) ne permettent pas de réduire le bruit présent sur les spectres (Figure 28 et Figure 29). Après traitement de la ligne de base, les spectres ont été normalisés par la moyenne, cela a permis de résoudre le problème de décalage de ligne de base.

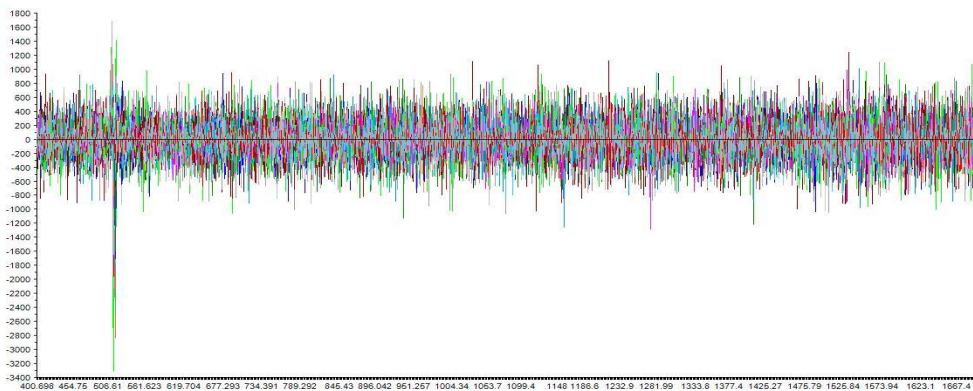


Figure 28 : Spectres Raman de *Chlamydomonas reinhardtii* souche 2935 après prétraitement dérivée seconde

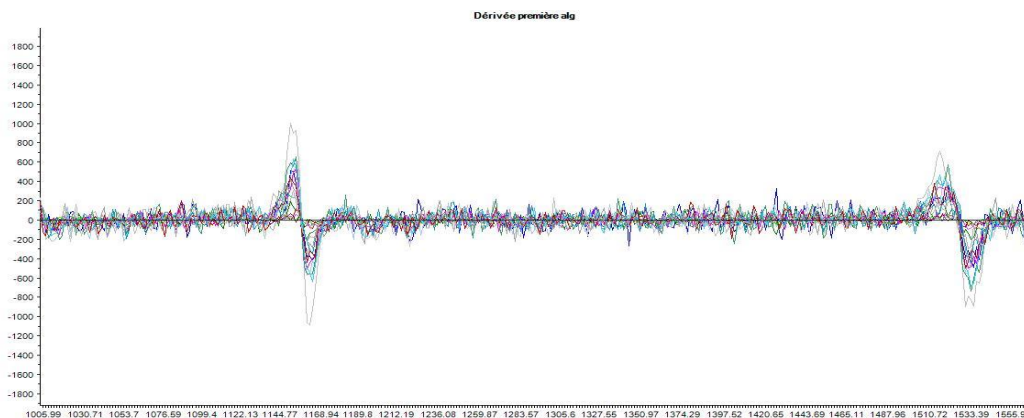


Figure 29 : Spectres Raman de *Chlamydomonas reinhardtii* souche 2935 après prétraitement dérivée première

### 2.3.2 Spectroscopie infrarouge

Les deux appareils utilisés ici sont le microspectroscope infrarouge Spotlight 200i (Perkin-Elmer) et l'infrarouge 70v (Vertex).

#### 2.3.2.1 Microspectroscope infrarouge Spotlight 200i

L'acquisition des spectres de 500 à 4000  $\text{cm}^{-1}$  est réalisée en 5 réplicats sur des gouttes de 10  $\mu\text{L}$  de microalgues des différentes conditions testées après une heure de séchage des échantillons sur une surface de  $\text{CaF}_2$  (Fluorure de Calcium). Le fluorure de calcium possède une large gamme d'applications aux lumières UV, visible et IR. De plus, il a une faible absorption et possède un indice de réfraction très faible. Le mode transmission du microscope infrarouge (FTIR-microscope Spotlight 200i, Perkin-Elmer) est utilisé avec une accumulation de 32 scans et une résolution de 4  $\text{cm}^{-1}$ .

#### 2.3.2.2 Spectroscopie infrarouge Vertex 70v

L'acquisition des spectres infrarouge est réalisée sur des gouttes de 10  $\mu\text{L}$  de microalgues des différentes conditions testées après une heure de séchage à l'air libre des échantillons sur du silicium poli double face. La zone échantillonnée est choisie pour que la répartition des cellules de microalgues soit relativement homogène. Le mode transmission du spectroscope infrarouge (Vertex IR 70v, Bruker, logiciel Opus) est utilisé avec une accumulation de 50 scans allant de 500 à 4000  $\text{cm}^{-1}$  et une résolution de 4  $\text{cm}^{-1}$ .

#### 2.3.2.3 Analyse des données spectrales

Sur l'ensemble des spectres bruts, un prétraitement de type ligne de base (LB) type concave Rubber Band est appliqué (Figure 30). Les principales bandes caractéristiques des composés d'intérêt des microalgues telles que les lipides (1742  $\text{cm}^{-1}$ , C=O), protéines (1650

$\text{cm}^{-1}$ , Amide I,  $\text{C}=\text{O}$ ,  $1550 \text{ cm}^{-1}$ , Amide II,  $\text{N-H}$ ), acide nucléique ( $1255 \text{ cm}^{-1}$ ,  $\text{P}=\text{O}$ ), polysaccharides ( $1050 \text{ cm}^{-1}$  et  $1080 \text{ cm}^{-1}$ ,  $\text{C-O}$ ,  $1150 \text{ cm}^{-1}$ ,  $\text{C-OH}$ ) [117, 216] sont mesurés en intensités et les ratios sont calculés. Le spectre infrarouge moyen avec l'écart-type de chaque condition est réalisé sur la zone d'étude ( $950\text{-}1900 \text{ cm}^{-1}$ ) à l'aide du logiciel Excel 2007.

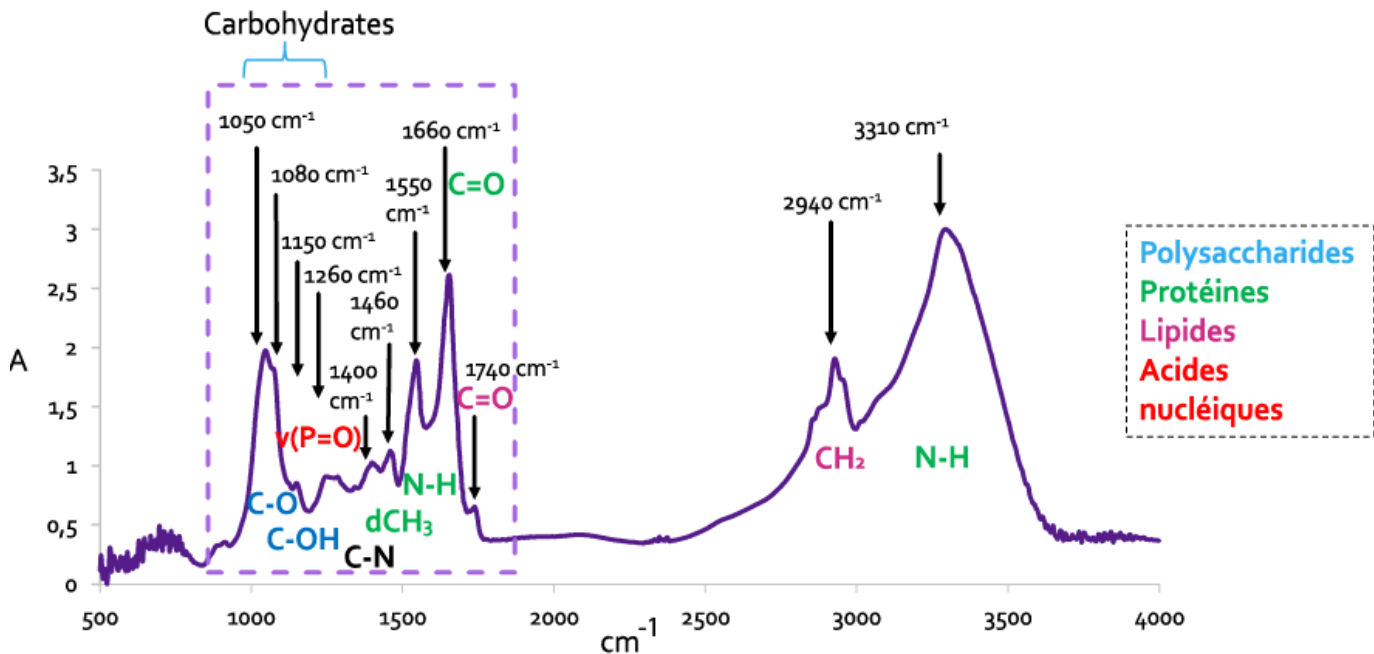


Figure 30 : Spectre infrarouge typique de *Chlamydomonas reinhardtii* souche 2935 après 1 h de séchage. Les principales liaisons chimiques caractéristiques sont indiquées sur la figure. En violet, la zone d'étude.

Afin de comparer les différentes conditions testées, plusieurs approches de prétraitement des spectres ont été testées à l'aide du logiciel Unscrambler sur l'ensemble du jeu de données spectrales pour définir quel est le meilleur prétraitement à réaliser avant une analyse chimiométrique des données selon la démarche présentée en Figure 31.

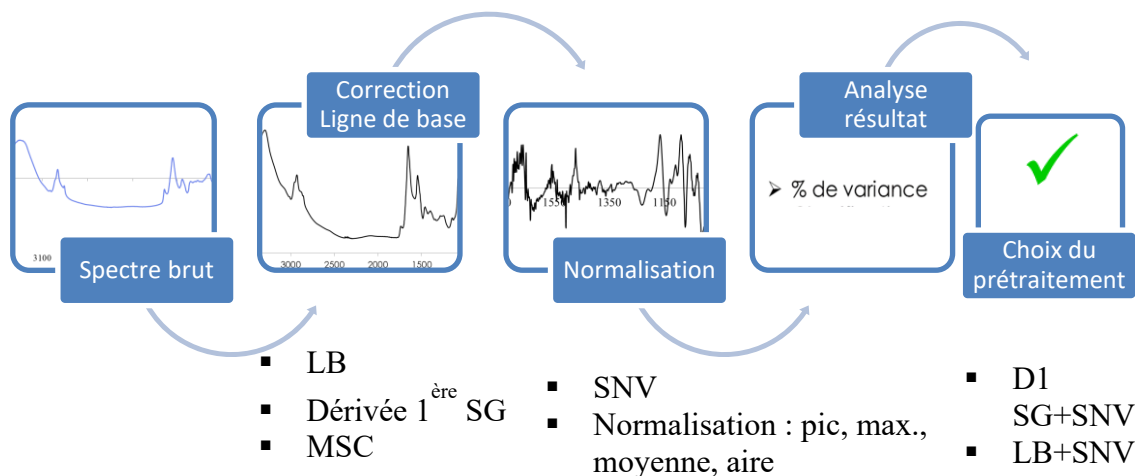


Figure 31 : Workflow des différents prétraitements testés pour le traitement des spectres bruts infrarouges. Une première étape de correction de la ligne de base et ensuite une étape de normalisation des spectres. Les prétraitements adaptés sont ensuite choisis par analyse des % de variance et de la répartition des groupes.

Premièrement, le prétraitement SNV (Standard normalisation variante ou centrage par réduction en ligne) qui combine la réduction de la ligne de base et permet de mettre à l'échelle individuellement les spectres en centrant le spectre avec sa moyenne et en réajustant l'ensemble

de l'intensité grâce à l'écart-type (SNV :  $\tilde{s}_{id} = \frac{s_{id} - \bar{s}_i}{\sigma_i}$   $\sigma_i = \sqrt{\frac{1}{D-1} \sum_{d=1}^D (s_{id} - \bar{s}_i)^2}$ ). Cette

méthode est applicable aux données spectroscopiques d'après Rammal (2017) [263] et Barnes et al. (1989) [264]. Elle peut être notamment utilisée pour réduire le bruit, notamment dû à des effets multiplicatifs d'interférence de la diffusion [263]. Cette normalisation a été utilisée sur les spectres sans et avec prétraitement de la ligne de base. Deuxièmement, la MSC (Multiplicative Scatter Correction ou correction de dispersion multiplicative) est une méthode de normalisation qui, à la différence de la SNV, standardise le spectre à partir de la moyenne des spectres du jeu et non à partir des données de son propre spectre. Cette technique corrige uniquement les effets d'offset et multiplicatifs. Une extension de cette technique est l'EMSC

( $\tilde{s}_{id} = \frac{s_{id} - \min(s_{i(R)})}{\max(s_{i(R)}) - \min(s_{i(R)})}$  Min-Max) qui n'a pas été testée ici. Celle-ci est de plus en plus

utilisée comparée à la MSC car elle prend en compte les effets de diffusion physique de la

lumière qui affectent le spectre mesuré. Troisièmement, la dérivation est un prétraitement couramment appliqué en spectroscopie infrarouge permettant de séparer des pics se chevauchant. Ce prétraitement basé sur la régression linéaire des moindres carrés permet de corriger la ligne de base et est appliqué pour lisser les données. Cependant, l'inconvénient, de la dérivée d'ordre 1 de Savitzky-Golay (D1SG) est d'amplifier le bruit haute fréquence et d'augmenter ainsi la complexité des spectres, ce qui fait qu'elle est souvent associée à un autre prétraitement pour corriger le bruit haute fréquence. Ainsi la D1SG a ici été combinée avec le prétraitement SNV. La méthode D1SG+SNV est l'une des plus adaptée aux données spectroscopiques d'après la thèse de Rammal (2017) [263]. La correction de la ligne de base en amont de ce prétraitement a aussi été étudiée pour estimer si celle-ci apportait une plus-value au prétraitement D1SG+SNV. D'autre part, certains auteurs se servent également de la fonction Savitsky-Golay pour lisser leurs spectres [206, 265]. Enfin, d'autres techniques de normalisation basées sur un élément du spectre existent. La normalisation par la valeur maximale consiste à diviser toutes les valeurs du spectre par son maximum, elle est par exemple utilisée dans l'étude de Kansiz et al. (1999) [224] sur des spectres infrarouge de *Microcystis aeruginosa*. L'inconvénient de cette méthode est de ne prendre qu'une valeur pour estimer l'effet multiplicatif, ce qui peut engendrer du bruit. Une deuxième normalisation est étudiée, la normalisation moyenne. Elle a pour avantage d'évaluer l'effet sur la moyenne des spectres ce qui n'engendre pas d'augmentation du bruit. La normalisation peut également être réalisée par rapport à l'aire sous la courbe, permettant de prendre en compte pas seulement les valeurs d'intensité de pic mais aussi leur surface. Une dernière possibilité qui a été testé, est la détermination d'un pic de référence est de réaliser la normalisation à partir de ce pic. Dans cette étude, deux pics ont été choisis pour tester l'effet de cette normalisation sur les spectres, le pic à  $1150\text{ cm}^{-1}$  (polysaccharides, liaison  $\nu\text{C-OH}$ ) et celui à  $1654\text{ cm}^{-1}$  (protéines, liaison  $\text{C=O}$ ). Ces pics sont choisis car ils ont déjà été testés dans d'autres publications pour la normalisation des spectres [215, 266, 267].

La zone d'étude choisie pour la suite de l'analyse chimiométrique est la zone  $800\text{-}1780\text{ cm}^{-1}$ . Une analyse multivariée des données de type ACP (analyse en composante principale) est réalisée à la suite de ce prétraitement avec étude des loadings (vecteurs propres) à l'aide du logiciel Unscrambler. Pour étudier plus finement le massif des polysaccharides, une déconvolution des pics de la zone  $930\text{-}1190\text{ cm}^{-1}$  a été réalisée avec le logiciel PeakFit v4.02 (Figure 32). Lors de cette déconvolution de type Aire Gaussienne-Lorentzienne, la largeur à mi-hauteur des pics est considérée comme étant égale pour chacun des six pics. La position des

pics est fixée à 980, 1018, 1049, 1078, 1108 et 1152  $\text{cm}^{-1}$  à l'aide des observations faites après prétraitement du spectre par dérive seconde Savitzky-Golay indiquant des pics à ces nombres d'ondes (Figure 97). Le  $R^2$  minimum accepté pour le fit est de 0,99. Suite à la déconvolution des pics, le pourcentage de contribution en aire de chacun des pics à l'ensemble du massif est relevé.

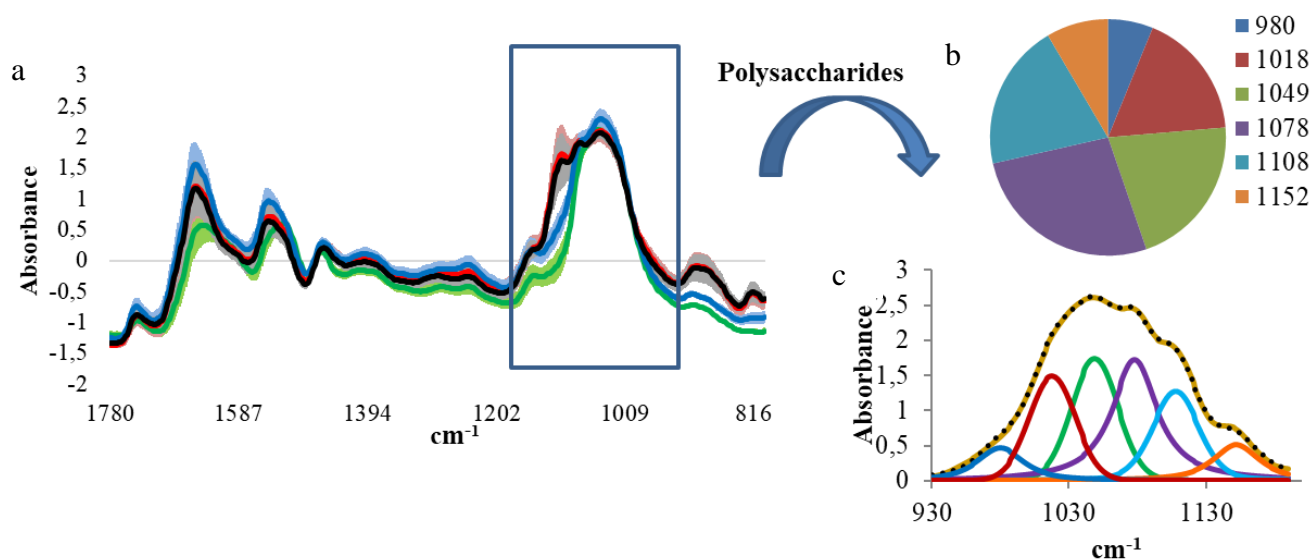


Figure 32 : Exemple de déconvolution spectrale avec Peakfit (a) Spectres infrarouge de microalgues obtenus après interaction. Déconvolution spectrale de la région des polysaccharides (b) répartition des pourcentages d'aires par bande spectrale et (c) représentation des pics déconvolués.



### **3 Suivi des interactions microparticules-daphnies**

Dans les expériences présentées dans cette partie, chaque condition testée est réalisée en triplicats dans un volume de 300 mL de milieu ISO (Annexe Tableau 2-B).

#### **3.1 Toxicité aigüe**

Le test de toxicité aigüe est effectué sur une période de 72 h. Une première étude a été effectuée avec dix daphnies par condition où les paramètres de mortalité et d'ingestion ont été suivis quotidiennement. Les daphnies sont mises en présence de MP PE sans surfactant (NS), avec Tween, avec biosurfactant (BS) à concentration de 60 mg/L ou encore sans microplastiques (témoin). Une deuxième étude avec 20 individus âgés de sept jours par condition mis en présence de MP PE BS et NS à 60 mg/L s'est intéressée au comportement natatoire, à l'ingestion des particules et à la réponse génétique des daphnies sans ajout de nourriture. L'ingestion des particules est suivie par analyse en microscopie champ sombre de la lumière polarisée par les microparticules. Des points de mesures ont été réalisés à 2, 24 et 48 h. Dans le cas de ce test sans nourriture, les daphnies n'ont pas été nourries pendant les deux derniers jours précédant l'essai. Une étude complémentaire en présence de nourriture a été réalisée dans les mêmes conditions.

#### **3.2 Toxicité chronique**

La toxicité chronique des MP PE NS et BS sur les *D. magna* a été testé à différentes concentrations (1 et 60 mg/L) sur une période de 21 jours [252]. Le nombre d'individu par Erlenmeyer est de dix. Les daphnies ont été nourries tous les deux jours par des microalgues à une concentration de  $1,6 \times 10^6$  cellules/mL. Les juvéniles nés au cours de l'analyse sont récupérés et mis à part. Le suivi de la mortalité, de la reproduction et également du comportement natatoire a été réalisé tous les sept jours.

#### **3.3 Temps de présence des microparticules dans l'appareil digestif**

Ce test a pour but de déterminer le temps de stockage des MP PE dans le tube digestif des daphnies. Pour cela, après 24 h d'interaction entre les daphnies et les MP PE BS (60 mg/L), les daphnies sont placées dans du milieu ISO sans particules. Elles sont observées à 2, 24 et 48 h en lumière polarisée pour détermination le temps d'excrétion des MP PE par les daphnies. Les daphnies n'ont pas reçu de nourriture pendant cette expérience.

### **3.4 Visualisation des microplastiques par analyse Raman**

Pour déterminer la présence des MP PE dans le tube digestif, l'analyse par microspectrométrie Raman des daphnies a été réalisée à l'aide de l'appareil Witec Alpha300. Cet outil permet de focaliser la lumière à l'intérieur des daphnies et obtenir les spectres des particules ingérées ( $160-3900\text{ cm}^{-1}$ ; 10 secondes d'acquisition, réseau 600 traits/mm, résolution spectrale  $2,61\text{ cm}^{-1}$ ). Un rincage préalable des daphnies au milieu ISO a été réalisé pour éviter la détection des MP éventuellement adsorbés sur les daphnies. Les spectres obtenus ont été comparés à des spectres de MP PE.

### **3.5 Analyse du comportement natatoire**

Le comportement natatoire des daphnies est un biomarqueur sensible de toxicité. Cette analyse a été effectuée à l'aide d'une loupe binoculaire (Leica). Les crustacés ont été placés individuellement dans une boîte de Pétri (60 mm de diamètre) remplie avec 3 mL de milieu ISO. Avant le début des enregistrements les individus ont eu un temps d'adaptation à l'éclairage de 3 min. L'enregistrement de vidéos a été réalisé pendant 60 s pour chaque daphnie analysée (triplicat) avec le logiciel Kinovea. Les mouvements des daphnies au cours de la période des 60 s ont été retracés et la distance totale parcourue a été mesurée. L'un des paramètres les plus fiables et largement utilisé de l'activité comportementale des daphnies est la vitesse de nage. Ainsi pour chaque vidéo, la vitesse de nage moyenne a été déterminée. La distance parcourue, la fréquence de sauts et le nombre de tournants effectué par les daphnies par minute ont également été dénombrés par une analyse « image par image » des vidéos.

### **3.6 Analyse génétique**

Pour l'étude de l'expression génétique des daphnies, quatre individus par Erlens et par temps d'analyse (2, 24 et 48 h) ont été conservés dans l'azote liquide en ajoutant 500  $\mu\text{L}$  de Trizol (Invitrogen, USA), puis congelés à  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$  pour l'extraction d'ARN et la détermination des gènes impliqués dans la réponse aux stress.

### 3.6.1 PCR sur ADN : amplification et contrôle des gènes d'intérêt

Une PCR a été réalisée pour amplifier les gènes d'intérêt afin d'obtenir une quantité suffisante pour le détecter et l'étudier. Les amorces utilisées avec leurs caractéristiques sont présentes dans le Tableau 4. La matrice utilisée est constituée de daphnies chauffées dans 50  $\mu\text{L}$  d'eau pendant 3 min à 94°C. Le mélange réactionnel (25  $\mu\text{L}$ ) pour la PCR contient : 5  $\mu\text{L}$  de solution Tampon (5 X) ; 2,5  $\mu\text{L}$  de  $\text{MgCl}_2$  (2,5 mM) ; 0,5  $\mu\text{L}$  de dNTPs (10 mM) ; 0,5  $\mu\text{L}$  d'amorces spécifiques (10  $\mu\text{L}$ ) ; 0,12  $\mu\text{L}$  de *Taq* polymérase (5 U/ $\mu\text{L}$ ).

Une électrophorèse sur gel d'agarose 2 % a été réalisée pour analyser et séparer les fragments d'ADN suivant leur taille. Le bromure d'éthidium (BET) incorporé dans le gel permet de révéler les fragments d'ADN. Le marqueur de taille Low Molecular Weight DNA Ladder avec une gamme de taille de 25 à 766 pb a été utilisé. Le TAE 1X a été utilisé en tant que tampon pendant la migration. Les dépôts dans les puits ont été réalisés en quantité suivante : 6  $\mu\text{L}$  de marqueur de taille et 11  $\mu\text{L}$  de mélange réactionnel. Les molécules d'ADN chargées négativement migrent vers l'anode dans le champ électrophorétique. La migration est effectuée à une tension de 80 V durant 75 min.

### 3.6.2 Extraction d'ARN et RT

L'extraction d'ARN a été réalisée sur les daphnies broyées à l'aide de RNase Mini Kit (Allemagne), selon le protocole avec les modifications suivantes : une étape DNase a été ajoutée (pour éviter l'influence d'ADN génomique pendant la PCR) et une 2<sup>ème</sup> étape de séchage. La concentration totale de l'ARN et la qualité de l'ARN isolé ont été évaluées à l'aide d'un spectrophotomètre NanoDrop 2000 comme cité précédemment. Le contrôle de la qualité d'ARN a été fait par la migration sur gel d'agarose 1% à une tension de 120 V durant 14 minutes. Pour cela, 5  $\mu\text{L}$  de tampon de charge ont été ajoutés dans chaque échantillon.

Tableau 4 : Couples d'amorces testés et leurs séquences

Nom d'amorce	Sigle	Température, °C	Séquence 5'=>3' Amorce sens	Séquence 5'=>3' Amorce anti-sens	Taille, pb	Source
Actine	Act	58	CCACACTGTCCCCATTTA TGAA	CGCGACCAGCCAAATCC	71	[268]
A-tubuline	αTub	60	TGGAGGTGGTGACGACT	CCAAGTCGACAAAGACAGC A	89	[268]
Flotiline	Flot	60	GCGACCAATTCGCTTCTC TA	TGGTGAAGGAAAGGATTTTC G	81	[269]
Glycéraldéhyde-3-phosphate déshydrogénase	GAPDH	58	GGCAAGCTAGTTGTCAAT GG	TATTCAGCTCCAGCAGTTCC	89	[268]
Glutathion-S-transférase S1	GST	58	TCAGGCTGGTGTGAGTT TG	GAGCAAGCATTGTCCATCA	119	[37]
Heat shock protein 60	HSP60	60	AGCTGGTGATGGAACAA CTG	TGAGATAGTGGCAACCTGA G	-	[270]
Heat shock protein 70	HSP70	56	TGTCCAGACTTACCATAA GCA	CAACGTCAAGCAACAAAGG A	103	
Hormone juvénile estérase	JHE	60	ATGGAGTTCTCAACGGAA CG	ATCTCAGGTGTGGGCATTTTC	100	[268]
Succinate déshydrogénase	SDH	60	TGCCATTTAGTCGCACTC AG	GTGAGCTTGTCCCTCCTTTGC	89	[268]
Sarcoplasmique Calcium ATPase	SERCA	60	TCGCAAAGAAGTCTTCGA CTC	AAACACCAATACGACGGCA G	125	[249]
Syntaxine 16	STX16	60	TCTATCCTATCCAGGACA GTGC	AAACTCGTCTTTCGTTGAAC AG	131	[249]
TATA-box binding protein	TBP	60	TGTGAGTCAGAACGAGA CCT	AAGAAGATTCAAGATTAGC AGCCC	120	[249]
Ubuquitine Conjugating Enzyme	UBC	60	TCACCTGCACTCACCATT TC	AATCTCCGGAACCAAAGGA T	90	[268]
Gustatory Receptor for Sugar taste	TSA	60	1. TCGTTCGCTTACGTCA TTTG 2. TCGTTCGCTTACGTCA TTCT	TAGCTTTGAGGCCGATGACT	-	Cette étude

# Chapitre 3 : Intérêt des spectroscopies vibrationnelles dans l'étude des réponses aux stress environnementaux chez *Chlamydomonas reinhardtii*

---

## Introduction

Dans cette partie, deux techniques de spectroscopie vibrationnelle, Raman et infrarouge, ont été utilisées pour étudier la réponse des microalgues suite à des changements/stress environnementaux (lumineux, nutritif, métallique). Plusieurs traitements chimiométriques des données ont été réalisés sur les spectres afin de déterminer le traitement le plus adapté. En parallèle, ces réponses sont également suivies par des mesures biologiques pour mieux comprendre les résultats obtenus par spectroscopie et tenter d'identifier les mécanismes impliqués.

## 1 Etude des stress par spectroscopie Raman : les caroténoïdes, indicateurs pertinents ?

### 1.1. Chromatographie sur couche mince : visualisation des pigments

Dans le but de suivre la réponse des microalgues à des stress environnementaux bien maîtrisés par spectroscopie, il est nécessaire d'avoir des indicateurs biologiques de la réponse au stress. Les pigments peuvent être des indicateurs de la contrainte subie par les microalgues. Afin d'obtenir une première approche des pigments existant chez *Chlamydomonas reinhardtii*, une chromatographie sur couche mince a été réalisée. Les résultats sont illustrés sur la figure 1. Chaque tache obtenue correspond à un type de pigments présent chez cette espèce. Cinq taches de différentes couleurs sont observées : une verte, deux jaunes, une verte olive et pour finir une jaune/verte. D'après la littérature, les chlorophycées contiennent des chlorophylles (Chl) a et b, du  $\beta$ -carotène ainsi que des xanthophylles (lutéine, violaxanthine, néoxanthine) [271]. En partant de la gauche de la Figure 33, la première tache pourrait correspondre à la chlorophylle b suivie de la chlorophylle a, puisque ces deux pigments sont des composés qui migrent peu. Ensuite, les taches jaune et vert olive pourraient correspondre aux xanthophylles (lutéine, néoxanthine ou violaxanthine). Enfin la dernière tache semble être le  $\beta$ -carotène.

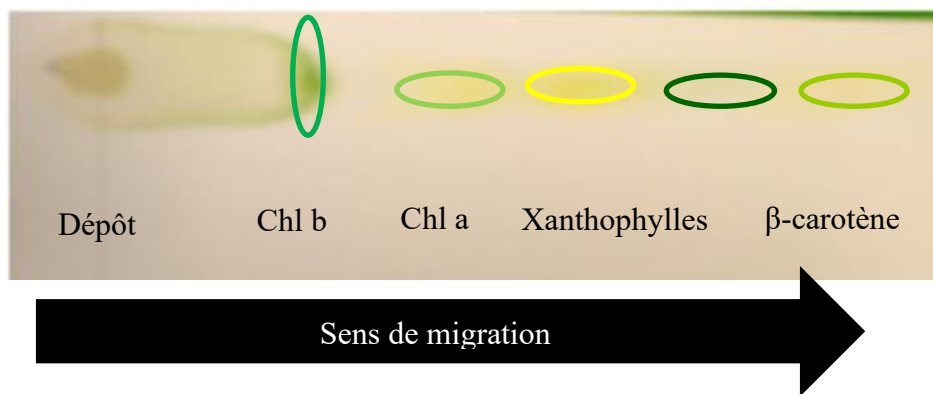


Figure 33 : Chromatographie sur couche mince sur plaque d'oxyde d'aluminium de *C. reinhardtii* 2935.

Le  $\beta$ -carotène et les xanthophylles font partie des caroténoïdes et participent à la capture de l'énergie lumineuse en tant que pigments complémentaires aux chlorophylles [271]. Ces composés sont également impliqués dans la réponse au stress, en faisant ainsi des macromolécules intéressantes à suivre pour l'étude des interactions nanoparticules-microalgues. Dans cette optique, la spectroscopie Raman a été utilisée pour visualiser les éventuelles variations des bandes correspondant aux caroténoïdes et ainsi tenter de comprendre la réponse des microalgues à des stress environnementaux bien définis pour ensuite étudier les interactions nanoparticules-microalgues. L'étude de la composition de *C. reinhardtii* en phase exponentielle de croissance puis de la réponse des microalgues suite à un stress lumineux ont été étudiées par spectroscopie Raman.

## 1.2. Spectre Raman de *C. reinhardtii*

Le spectre de microalgues *Chlamydomonas reinhardtii* de souche 2935 (avec paroi) dans des conditions de culture normale est obtenu par analyse d'une goutte de culture déposée sur du silicium et excitée à 532 nm à l'aide du Raman Xplora. Ce spectre (Figure 34) comporte plusieurs pics de fortes intensités : celui du silicium à  $520\text{ cm}^{-1}$ , qui sert ici de référence pour la calibration de l'appareil et trois pics caractéristiques des caroténoïdes à  $1002\text{ cm}^{-1}$  (bande correspondant à la liaison C-CH<sub>3</sub> du  $\beta$ -carotène [200, 272]), à  $1150\text{ cm}^{-1}$  (bande correspondant à la liaison C-C de l'astaxanthine chez *Haematococcus pluvialis* [200, 211] et à  $1526\text{ cm}^{-1}$  (bande correspondant à la liaison C=C du  $\beta$ -carotène [200, 211]). La liaison C=C peut varier de  $1505\text{-}1530\text{ cm}^{-1}$  parce qu'elle dépend de la longueur de la chaîne conjuguée. Plus la chaîne polyène est longue (nombre de liaisons conjuguées augmente), plus la position du pic aura une valeur faible.

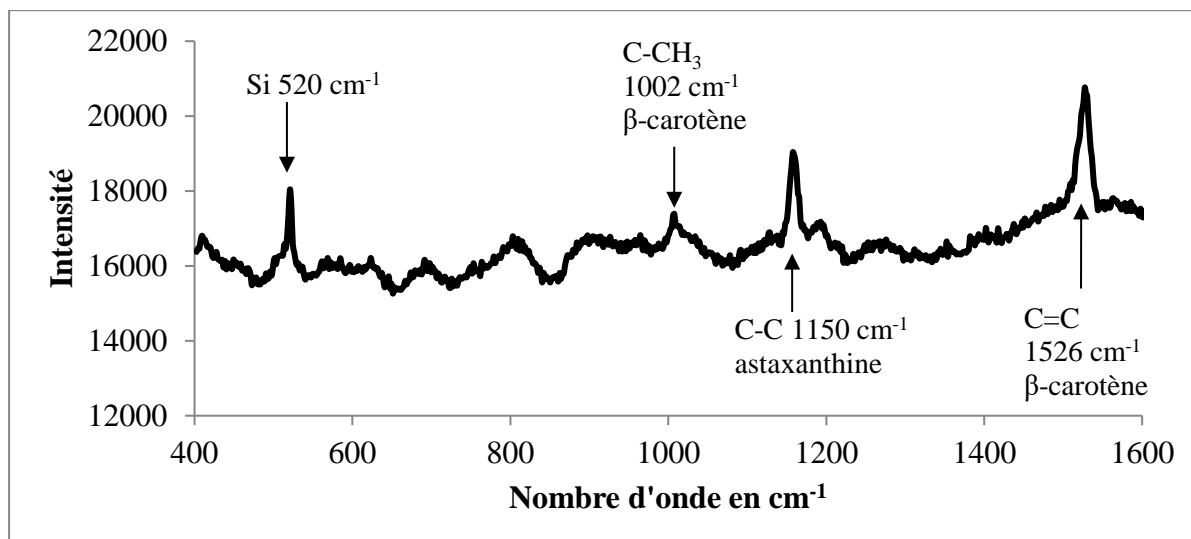


Figure 34 : Spectre Raman résonance de *C. reinhardtii* 2935 à 532 nm (Xplora) en conditions normales

Les microalgues *C. reinhardtii* 2935 ont également été soumises à des excitations à 638 et 785 nm. Dans le premier cas, le signal obtenu est dominé par la fluorescence et aucune bande ne peut être discriminée. Dans le second cas, la fluorescence est également présente mais permet de visualiser les bandes décrites précédemment. Cependant, par la forte fluorescence des microalgues à cette longueur d'onde d'excitation et à cause des oscillations dues au détecteur en cas de faible signal, les bandes sont peu résolues. Il est donc difficile d'interpréter les spectres obtenus à 785 nm (Figure 35) car leur rapport signal sur bruit est faible. Un lissage des spectres plus poussé aurait peut-être permis une amélioration de la qualité spectrale.

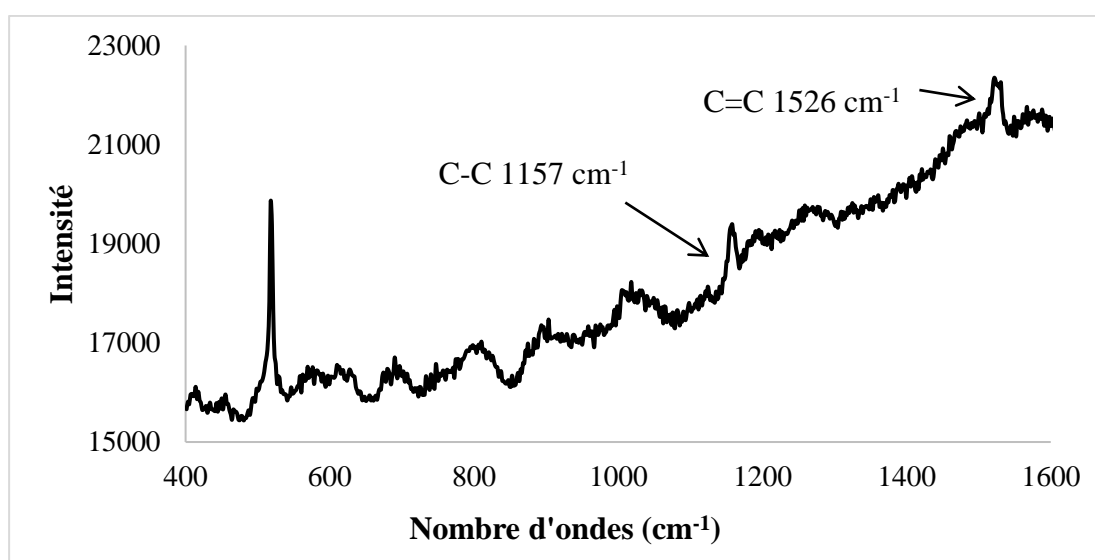


Figure 35 : Spectre Raman brut de *C. reinhardtii* 2935 à 785 nm (Xplora) en conditions normales après lissage Savitzky-Golay 5 points.

Pour la deuxième souche mutante CC400, avec peu de paroi, le spectre Raman à 532 nm est présenté sur la Figure 36. On y retrouve les principales bandes présentées plus haut. Le spectre ne semble pas être grandement différent de celui de la souche 2935, cependant la présence de caroténoïdes, molécules résonantes peut masquer les autres variations de pics éventuelles.

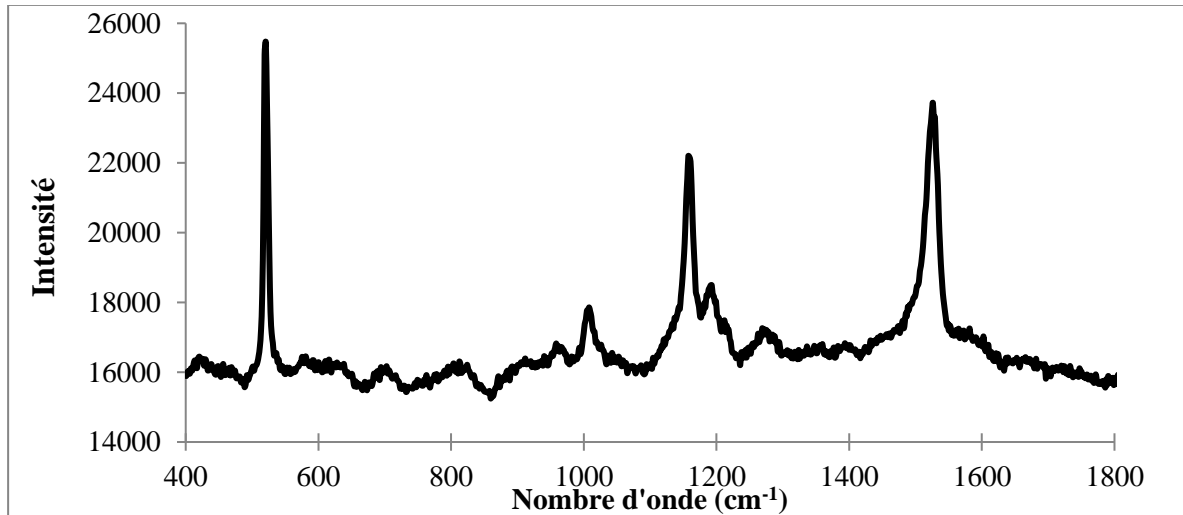


Figure 36 : Spectre Raman résonance de *C. reinhardtii* CC400 à 532 nm (Xplora) en conditions normales

De cette première approche d'observation des microalgues par spectroscopie Raman, il est noté que la longueur d'onde d'excitation à 532 nm apparaît comme celle permettant d'obtenir le plus d'informations sur la composition des caroténoïdes des microalgues. Ainsi pour la suite de l'étude, des excitations à 532 nm (Xplora) ou 514 nm (T64000) seront sélectionnées. Les caroténoïdes qui sont des composés résonants ressortent bien par analyse Raman. Ceux-ci étant impliqués dans la réponse au stress lumineux, les éventuelles variations des bandes correspondantes ont été suivies afin de comprendre l'implication des caroténoïdes en fonction de l'intensité lumineuse.

### 1.3. Microalgues sous stress lumineux : réponse des caroténoïdes ?

La lumière étant le premier facteur limitant la croissance des microalgues d'après Minhas et al. (2016) [115], *C. reinhardtii* 2935 a été placée sous plusieurs conditions lumineuses : stress - (faible intensité lumineuse,  $90 \mu\text{mol photons}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ ), stress + (forte intensité lumineuse,  $350 \mu\text{mol photons}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ ) et stress ++ (très forte intensité lumineuse  $700 \mu\text{mol photons}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ ), celui-ci pouvant entraîner des variations de réponse notamment au niveau des caroténoïdes. Après quatre jours de stress lumineux, les spectres bruts de *C. reinhardtii* sont obtenus par



spectroscopie Raman Xplora, à 532 nm (Annexe Figure 98). Pour tenter de faire ressortir des variations entre ces spectres (15 spectres par condition ont été sélectionnés aléatoirement) une analyse chimiométrique est réalisée sur les spectres après traitement de la ligne de base et normalisation par la moyenne (Figure 37 et Figure 38). Les pics peuvent varier en termes d'intensité ou de position. Il est premièrement observé sur ces spectres que les pics correspondant aux caroténoïdes ne varient pas en termes de position (nombre d'ondes), indiquant que la conformation des caroténoïdes n'est pas impactée par la variation d'intensité lumineuse. Alors que l'étude d'Andreeva et Velitchkova (2009) [213] a présenté des shift de la bande à  $1525\text{ cm}^{-1}$  en fonction du temps d'irradiation (étude sur 120 min).

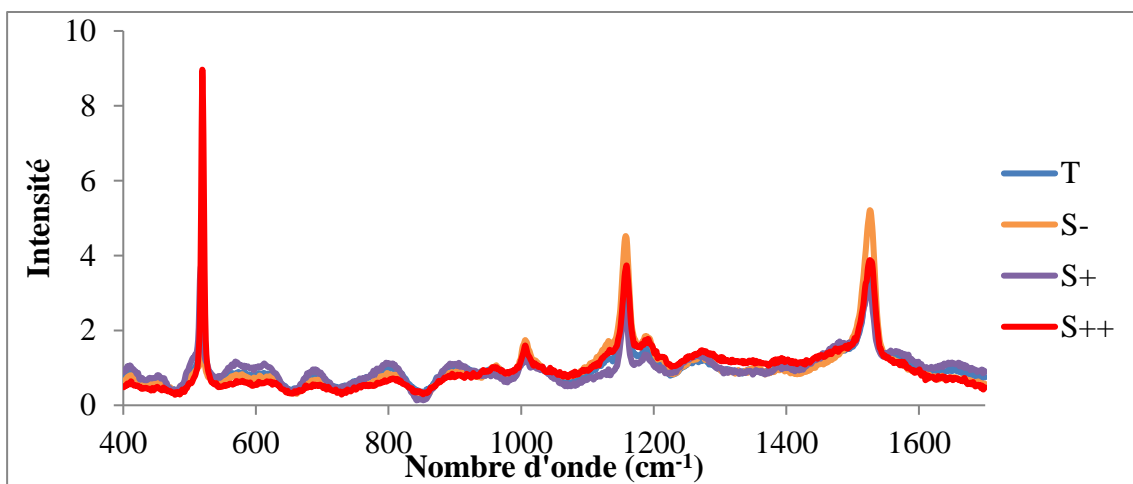


Figure 37 : Spectres Raman résonance moyens de *C. reinhardtii* 2935 sous différentes conditions lumineuses après correction de la ligne de base et normalisation moyenne des spectres (LB+Norm M). Témoin (bleu), faible intensité lumineuse (Stress-, orange), forte intensité lumineuse (Stress+, violet), très forte intensité lumineuse (Stress ++, rouge).

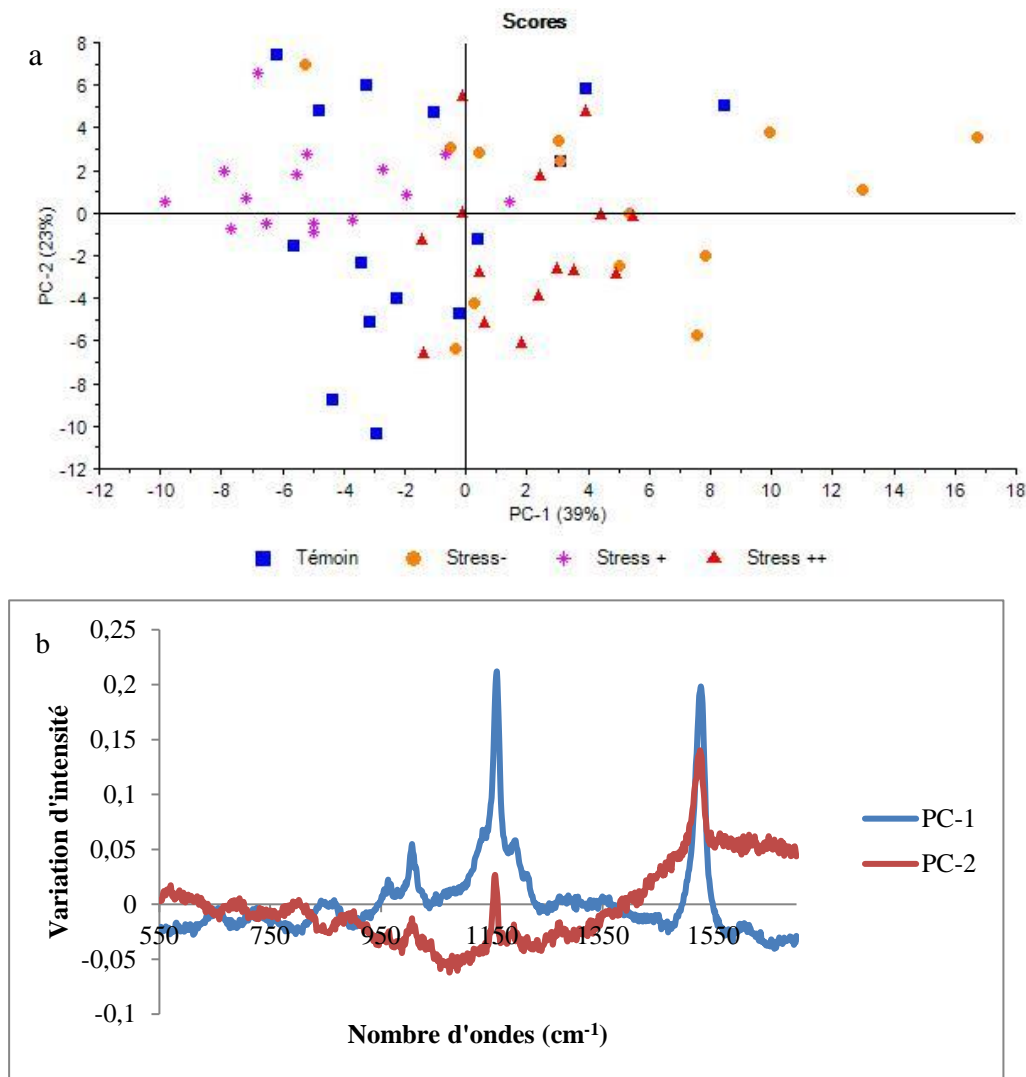


Figure 38 : (a) ACP Score plot des spectres après traitement LB+normM de *C. reinhardtii* souche 2935 suite à différents stress lumineux sur la zone d'étude 550-1700 cm<sup>-1</sup> ; (b) X Loadings PC-1 (bleu) et PC-2 (rouge). Témoin (carré bleu), faible intensité lumineuse (Stress-, rond orange), forte intensité lumineuse (Stress+, étoile violet), très forte intensité lumineuse (Stress ++, triangle rouge).

La comparaison des spectres Raman de *C. reinhardtii* par ACP (Figure 38a) semble montrer que la variabilité de réponses observée par condition (notamment pour le témoin) ne permet pas de conclure sur une réponse différenciée des microalgues à chaque type d'intensité d'illumination (Annexe Figure 100). De plus les composantes (CP) 1 et 2 ne représentent ici que 62 % de la variance des spectres, ce qui est plutôt faible (Figure 38a). Les loadings de la CP 1 ne sont pas très informatifs puisqu'ils indiquent que la variance est ici dépendante de l'ensemble des bandes observées (1005, 1155 et 1526 cm<sup>-1</sup>) (Figure 38b). Tandis que les loadings de la CP 2 présentent une variance principalement impactée par les variations du pic à 1525 cm<sup>-1</sup> des caroténoïdes (Figure 38b), ce qui est cohérent avec l'étude d'Andreeva et Velitchkova (2009) [213] qui retrouvait cette même bande suite à un stress lumineux. Du fait

de la forte résonance des caroténoïdes, il n'est pas ici pas observé à ce niveau de différence de réponse suite au stress lumineux chez *C. reinhardtii*.

De plus, la microalgue étant un organisme vivant, la réponse à un stress peut évoluer dans le temps. A ce propos l'étude de He et al. (2015) [273] montre l'évolution de la fluorescence de la chlorophylle a chez *C. reinhardtii* en fonction du temps d'exposition à un stress lumineux. Dans cette partie, le suivi à deux instants différents (un et quatre jours) de la réponse des microalgues face au stress lumineux a été réalisé. Pour cela, un appareil Raman, le T6400, présentant une résolution spectrale au moins trois fois plus élevée que l'Xplora a été utilisé afin de comprendre si une amélioration de celle-ci permettait de mieux différencier les différents spectres.

Les spectres Raman moyens de *C. reinhardtii* exposée un jour sous différents stress lumineux sont obtenus (Figure 39a). D'après l'ACP présentée en Figure 39b, il semble difficile de discriminer les différentes conditions d'intensité lumineuse testées, d'autant plus que le témoin présente une grande variabilité de réponse. La CP 1 et 2 représente 96 % de la variabilité des spectres, indiquant que l'ACP est explicative. Le loading de la CP 1 contient les deux pics 1155 et 1520  $\text{cm}^{-1}$  correspondants aux caroténoïdes (Figure 39c). Il y a donc des variations à ce niveau entre les différents échantillons, mais ces variations sont plus inter-individuelles qu'entre les différentes conditions. Le loading de la CP 2 est peu informatif et ne représente que 7 % de la variance du spectre. Après un jour d'interaction, il n'est donc pas observé de différenciation des spectres de microalgues en fonction des conditions lumineuses de culture. Ceci est en contradiction avec la diminution dans le temps de l'intensité de la bande Raman correspondant à l'augmentation du temps d'illumination de la lutéine qui a été montrée par Andreeva et Velitchkova (2009) [213].

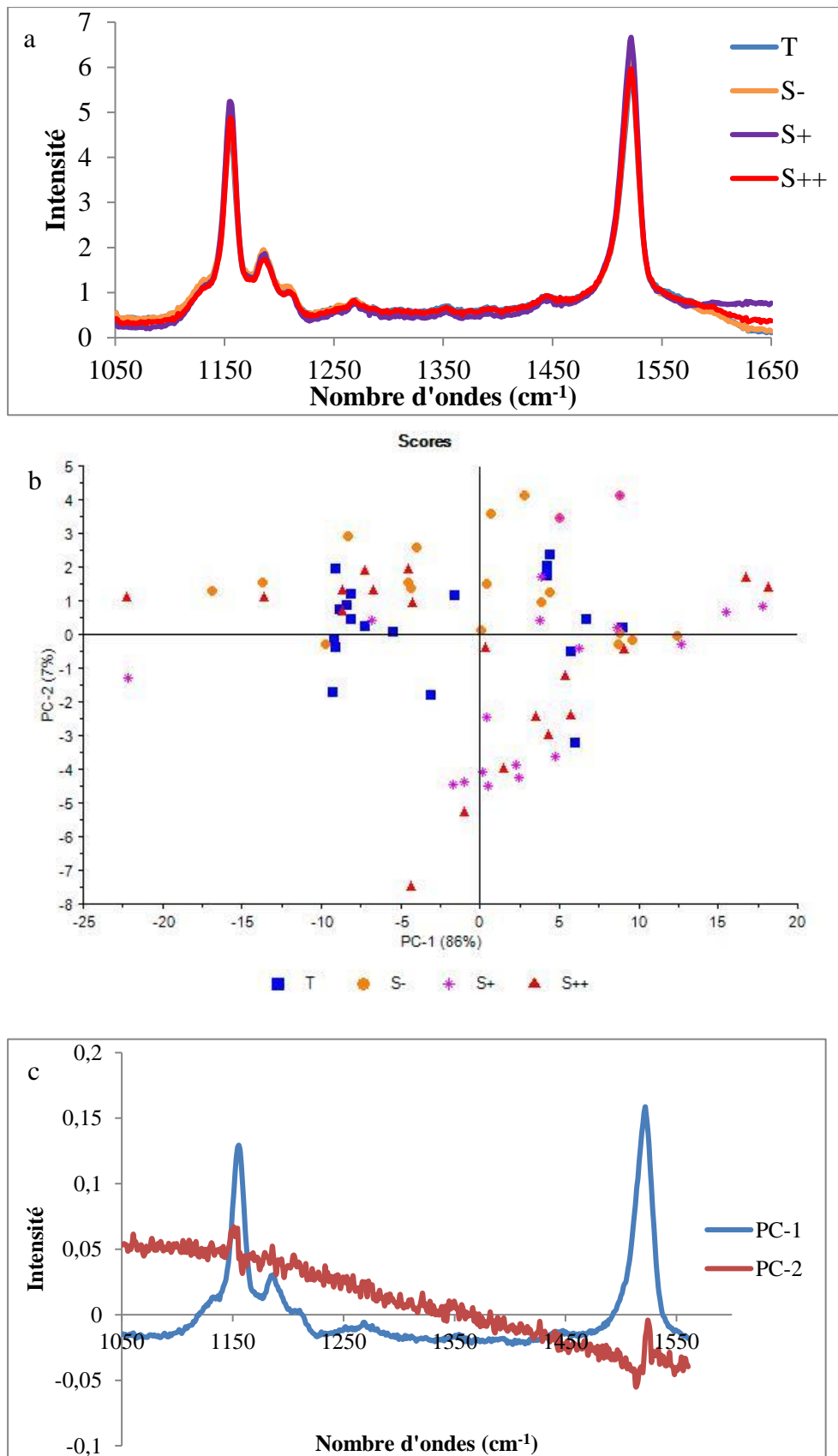


Figure 39 : (a) Spectres LB+Norm moyens Raman de *C. reinhardtii* 2935 après un jour de stress lumineux, 1050-1650  $\text{cm}^{-1}$  ; (b) ACP (c) X Loadings PC1 (bleu) et PC2 (rouge). Témoin (carré bleu), faible intensité lumineuse (Stress -, rond orange), forte intensité lumineuse (Stress +, étoile violet), très forte intensité lumineuse (Stress ++, triangle rouge).

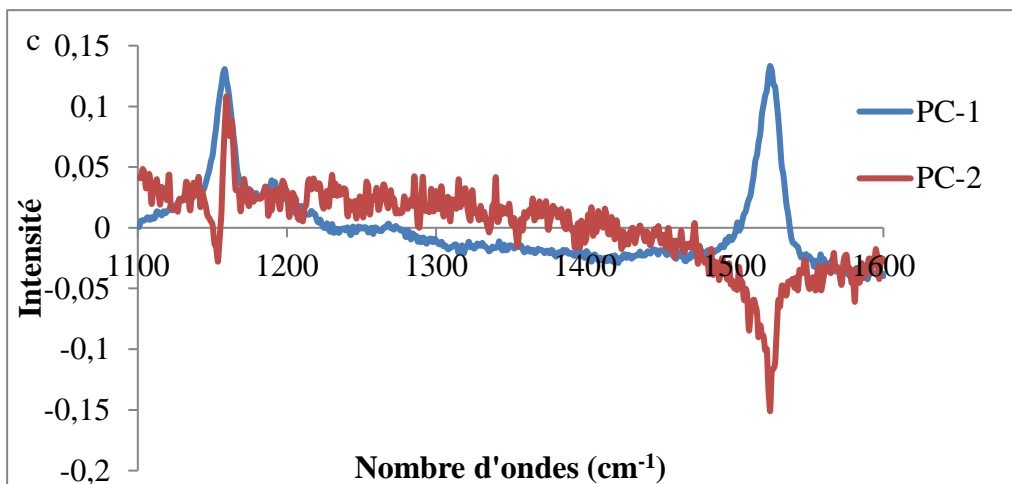
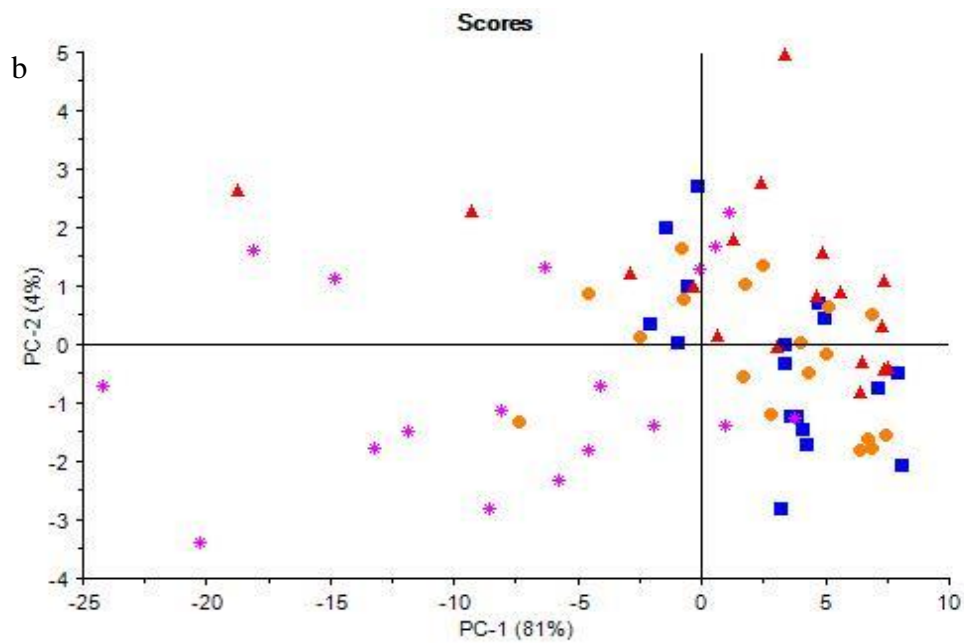
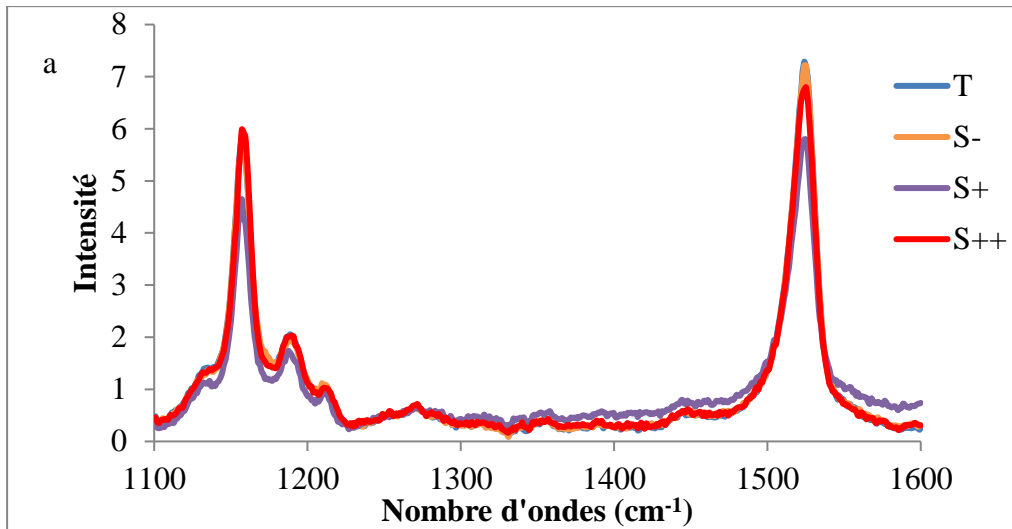


Figure 40 : (a) Spectres LB+Norm moyens Raman de *C. reinhardtii*. 2935 après quatre jours de stress lumineux, 1100-1600  $\text{cm}^{-1}$ ; (b) ACP (c) X Loadings PC1 (bleu) et PC2 (rouge). Témoin (carré bleu), faible intensité lumineuse (Stress -, rond orange), forte intensité lumineuse (Stress +, étoile violet), très forte intensité lumineuse (Stress ++, triangle rouge).

Après quatre jours de stress, les spectres moyens après prétraitements obtenus par le T64000 ressemblent à première vue aux spectres précédemment obtenus avec le Raman Xplora (Figure 40a). Au niveau de l'ACP, les différentes conditions ne présentent pas de différence marquée (Figure 40b). Les témoins semblent cependant un peu plus regroupés que lors des dernières analyses et le stress lumineux + semble se dissocier des autres groupes. La CP1 explique 81 % de la variance et la CP2 seulement 4 %. La Figure 40c présentant les loadings, informe sur la présence de variation toujours au niveau des deux pics d'intérêts. Les spectres du groupe stress + sont majoritairement situés à gauche de l'axe CP1 suggérant ici que la plupart des microalgues soumises à la condition de forte intensité lumineuse présentent une augmentation de teneur des deux caroténoïdes. Pour les autres conditions, les tendances restent floues et il semble qu'il n'y ait pas de variations clairement définies. Cette expérience a été reproduite et les mêmes résultats ont été obtenus.

Afin d'étudier plus finement la variation au niveau des caroténoïdes, une ACP est réalisée sur les deux pics d'intérêt séparément. Pour le premier pic correspondant à la liaison C-C de l'astaxanthine, la zone d'étude  $1140-1226\text{ cm}^{-1}$  a été sélectionnée. Une meilleure tendance à la séparation des groupes est observée avec globalement trois sous-groupes (stress +, témoins et stress-, stress ++, Figure 41), laissant penser que la teneur en astaxanthine des microalgues varie avec la variation d'intensité lumineuse. Cette analyse plus détaillée nous permet de visualiser la différence entre les deux groupes de forte intensité lumineuse. Il est suggéré ici qu'une augmentation très forte de l'intensité lumineuse a tendance à induire une augmentation en astaxanthine dans les microalgues, ce qui est soutenu par Mulders et al. (2014) [128] qui indiquent une accumulation de caroténoïdes secondaires dans ce cas, alors qu'une intensité lumineuse plus modérée aura tendance à diminuer la teneur en ce même composé. De plus, la diminution d'intensité lumineuse ne semble pas avoir beaucoup d'effet par rapport au contrôle sur l'intensité de la bande astaxanthine, ce qui peut ici être expliqué par une photoacclimatation des microalgues à cette sous saturation lumineuse [128]. Pour le deuxième pic correspondant à la liaison C=C du  $\beta$ -carotène, la zone d'étude  $1490-1552\text{ cm}^{-1}$  a été choisie. Il n'est pas observé de séparation réelle entre les différentes conditions (Figure 42). Les échantillons stress + sont plus éparpillés que les autres échantillons des groupes. Les loadings de la CP2 présentent un double pic à  $1520\text{ cm}^{-1}$ , qui laisse penser à une possible liaison conjuguée du  $\beta$ -carotène avec une autre molécule [213].

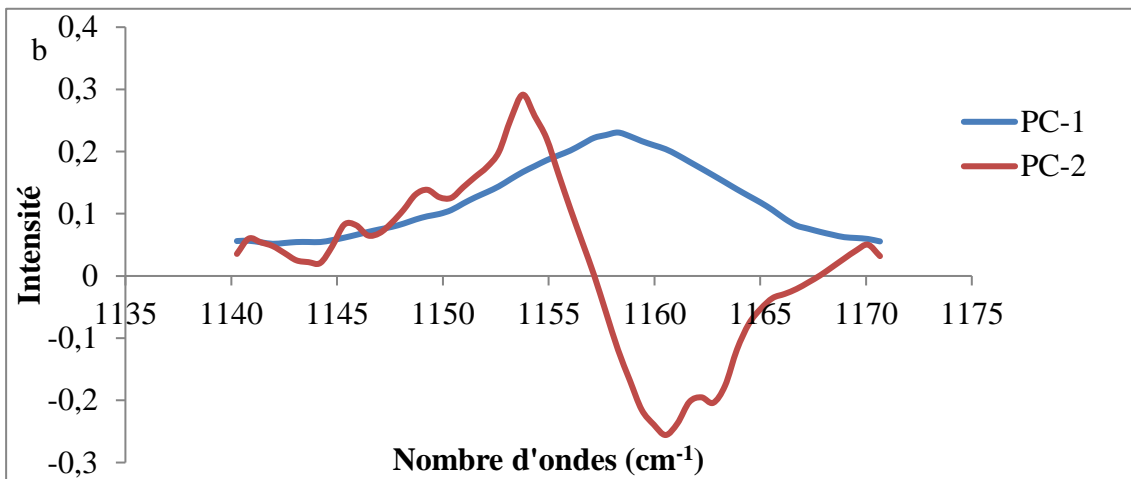
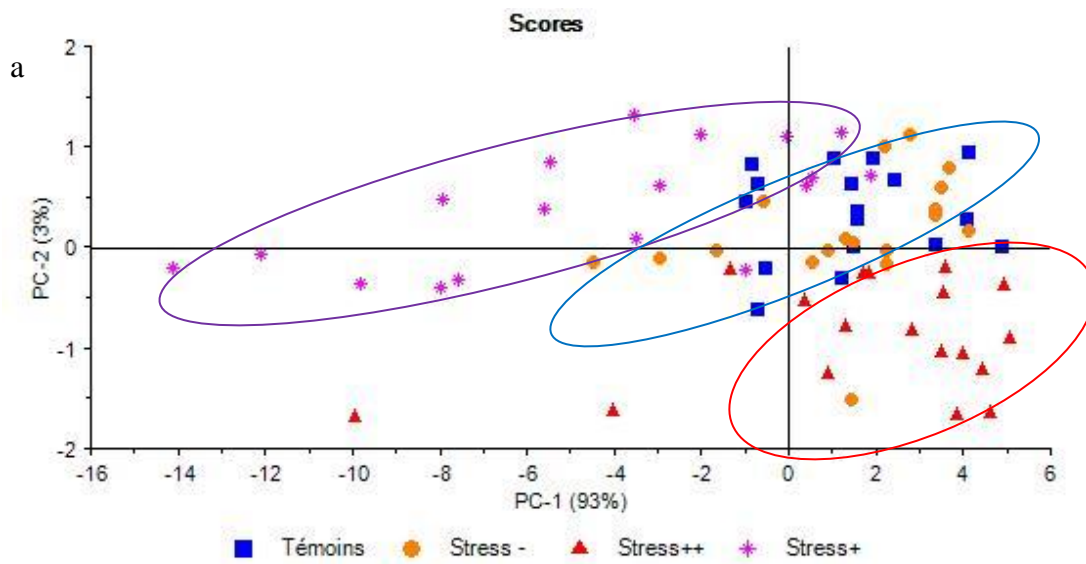


Figure 41 : (a) ACP pic 1 (1140-1226 cm<sup>-1</sup>) spectres LB+Norm moyens Raman de *C. reinhardtii*. 2935 après quatre jours de stress lumineux (b) X Loadings PC1 (bleu) et PC2 (rouge). Témoin (carré bleu), faible intensité lumineuse (Stress -, rond orange), forte intensité lumineuse (Stress +, étoile violet), très forte intensité lumineuse (Stress ++, triangle rouge).

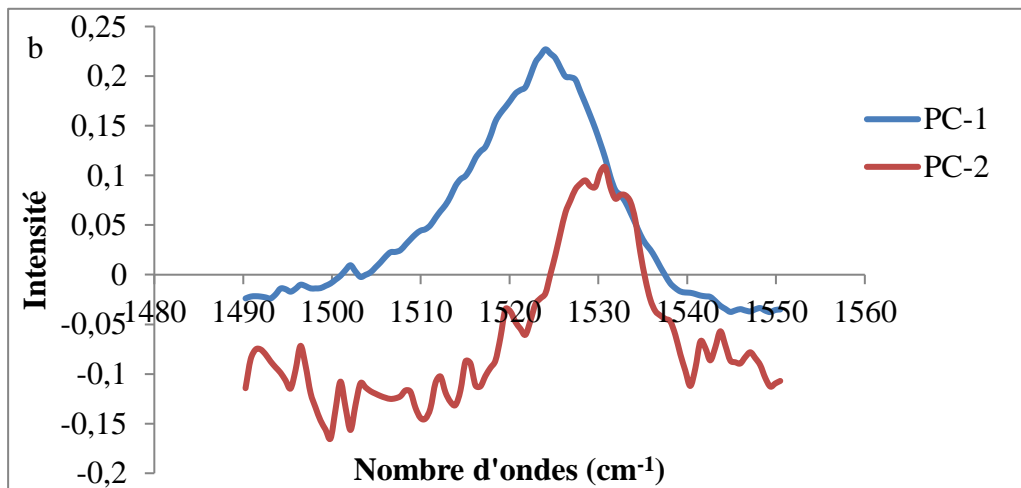
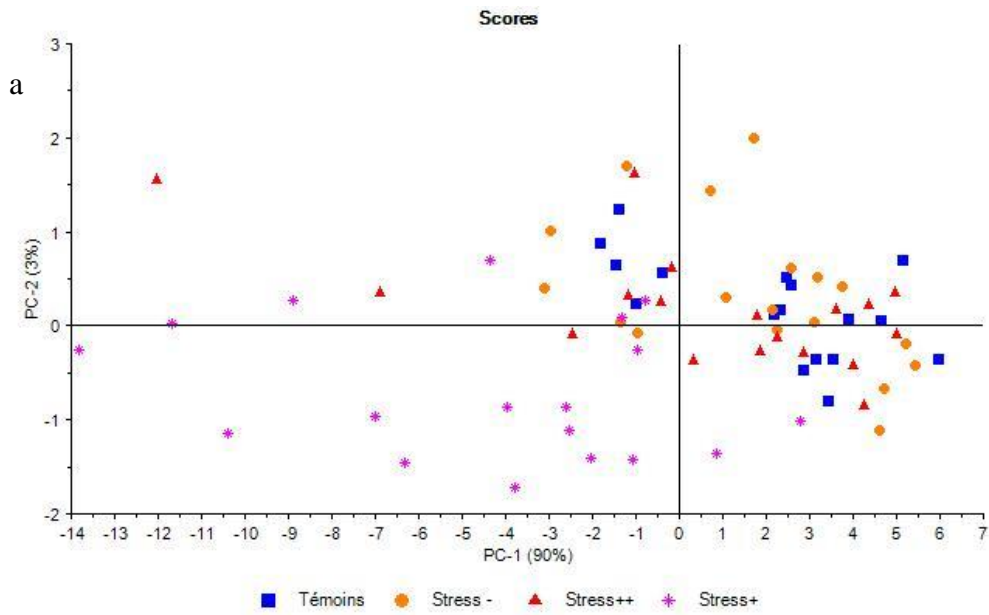


Figure 42 : (a) ACP pic 2 ( $1490-1552\text{ cm}^{-1}$ ) spectres LB+Norm moyens Raman de *C. reinhardtii*. 2935 après quatre jours de stress lumineux (b) X Loadings PC1 (bleu) et PC2 (rouge). Témoin (carré bleu), faible intensité lumineuse (Stress -, rond orange), forte intensité lumineuse (Stress +, étoile violet), très forte intensité lumineuse (Stress ++, triangle rouge).

Ainsi par l'utilisation de la variation sur le pic correspondant à la liaison C-C de l'astaxanthine, il est possible de discriminer le groupe stress lumineux + des autres conditions. Il est également remarqué que la diminution de l'intensité lumineuse semble ici avoir peu d'effets sur la teneur en caroténoïdes de la microalgue *C. reinhardtii*. Des résultats similaires ont été observés en comparant deux à deux les stress après un et quatre jours d'interaction (Annexe 3.2).



## Conclusion

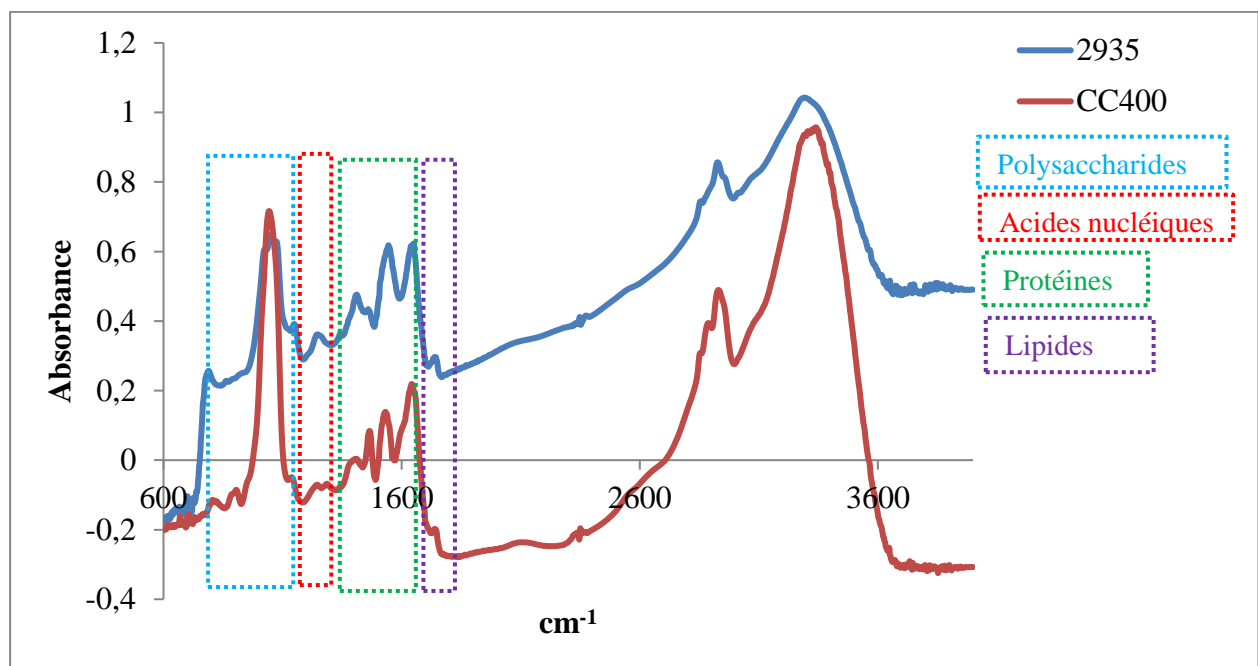
Les premières études spectroscopiques menées en Raman montrent que la longueur d'onde d'excitation 532 nm apparaît comme celle permettant d'obtenir la meilleure résolution de bandes sans problème de fluorescence pour caractériser les microalgues étudiées.

L'analyse en spectroscopie Raman de *C. reinhardtii* a permis d'observer trois pics caractéristiques des caroténoïdes à  $1002\text{ cm}^{-1}$  (liaison C-CH<sub>3</sub>, β-carotène),  $1150\text{ cm}^{-1}$  (liaison C-C, astaxanthine) et  $1526\text{ cm}^{-1}$  (liaison C=C, β-carotène). Ces pigments, composés résonants, sont connus pour être impliqués dans la réponse biologique aux stress lumineux au niveau de la protection cellulaire. Il a premièrement été observé qu'en réponse à des stress lumineux (déficit ou excès de lumière), les pics correspondant aux caroténoïdes ne varient pas au niveau de la position. La conformation des molécules visualisées n'est donc pas impactée par la variation d'intensité lumineuse. En ce qui concerne les variations d'intensité de ces pics, les analyses en composante principale n'ont pas permis d'établir un lien évident entre variations d'intensité de ces pics et conditions d'éclairement testés. Il est suggéré ici qu'une augmentation très forte de l'intensité lumineuse a tendance à augmenter le contenu des microalgues en astaxanthine, ce qui est soutenu par Mulders et al. (2014) [128] qui indiquent une accumulation de caroténoïdes secondaires dans ce cas. Alors que des variations plus modérées d'intensité lumineuse auront tendance à avoir peu d'effets par rapport au contrôle sur l'intensité de la bande astaxanthine, ce qui peut ici être expliqué par une photoacclimatation des microalgues [128].

D'autre part, le temps d'éclairement ne semble pas influencer la réponse des microalgues, puisqu'à un et quatre jours d'interaction, les mêmes résultats sont obtenus et ne permettent pas de bien discriminer les stress lumineux. Deux éléments peuvent expliquer ces résultats contraires à nos attentes. La croissance des microalgues, suivie par comptage cellulaire, qui n'a pas montré d'impact négatif à court terme (quatre jours) des stress lumineux. L'intensité des signaux des carotènes, très intense, nécessitant un stress important pour qu'une modification puisse être détectée et mise en évidence par cette technique. Ainsi, la réponse des microalgues *C. reinhardtii* suite à un stress lumineux, ici n'est donc pas facilement détectable par spectroscopie Raman, même avec un spectroscope à haute résolution. L'utilisation de la spectroscopie infrarouge, technique complémentaire au Raman va être présentée puisqu'elle permet de suivre d'autres composés moléculaires des microalgues qui sont masqués en spectroscopie Raman et pourrait être des indicateurs du stress chez *C. reinhardtii*.

## 2 Spectroscopie infrarouge : un outil pour suivre l'effet des stress environnementaux chez *Chlamydomonas reinhardtii*

La spectroscopie Raman ne semblant pas permettre de différencier facilement les stress lumineux induits sur *Chlamydomonas reinhardtii*, la spectroscopie infrarouge a par la suite été utilisée pour suivre la réponse des microalgues suite à des stress environnementaux. Les spectres infrarouge bruts des deux souches de *C. reinhardtii* sont présentés sur la Figure 43. Les deux souches de microalgues diffèrent concernant la composition biochimique au niveau des protéines et de polysaccharides. Premièrement, les bandes à 1650 et à 1550  $\text{cm}^{-1}$  ne présentent pas les mêmes proportions dans le cas de la souche mutante contrairement à la souche 2935. En second temps, les bandes relatives aux polysaccharides sont beaucoup plus resserrées dans le cas de la CC400 que dans le cas de la souche sauvage.



Tout comme pour l'analyse des spectres Raman, les complexes et nombreux spectres infrarouge enregistrés nécessitent une analyse statistique des résultats sur les spectres après prétraitements. Comme ceux-ci peuvent grandement influencer l'interprétation des spectres, il a donc été étudié, dans un premier temps, les différents paramètres et prétraitements adaptés à notre jeu de données, tâche complexe et importante d'après Wagner et al. (2013) [274].

## 2.1 Traitement du signal adapté à l'étude des variations de composition biochimique de microalgues

Premièrement, le choix des bandes spectrales pertinentes pour suivre les changements de physiologie des microalgues a été précédemment discuté dans la littérature. Certains auteurs argumentent sur l'étude du spectre entier [225] et d'autres montrent l'intérêt de n'étudier que la partie informative du spectre [226]. La zone du spectre la plus communément choisie est celle entre 950 et 1900  $\text{cm}^{-1}$  car elle comprend la plupart des bandes d'intérêts [221, 226]. Ici la zone d'étude choisie pour les analyses a été réduite à la région 950-1800  $\text{cm}^{-1}$ , permettant d'éliminer les liaisons chimiques correspondant aux O-H (3200-3500  $\text{cm}^{-1}$ ), qui sont liées à la quantité d'eau dans les échantillons. Dans cette partie, des spectres infrarouge sont obtenus pour des microalgues soumises aux stress suivants pendant 48 h : obscurité (culture recouverte de papier aluminium), réduction de l'intensité lumineuse (stress lumineux -, 90  $\mu\text{mol photons.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ ), augmentation de l'intensité lumineuse (stress lumineux +, 350  $\mu\text{mol photons.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ ) et baisse de l'apport en azote (réduction de 25 %). Le groupe contrôle est illuminé à 122  $\mu\text{mol photons.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ . Plusieurs prétraitements ont été testés sur ce jeu de données.

Par exemple, il est observé que la ligne de base n'est pas la même d'un spectre à l'autre. Cela peut être le résultat de différents phénomènes, dont le principal est l'effet de diffusion. Un spectre infrarouge diffus est un spectre qui présente une ligne de base diminuée en amplitude vers les courtes longueurs d'onde (grands nombres d'ondes). Pour que le niveau de ligne de base ne soit pas un biais dans la comparaison des échantillons, celui-ci est réétalonné pour tous les échantillons à l'aide du logiciel Spectrum. Les nombres d'ondes suivants, 3800; 2105 et 730  $\text{cm}^{-1}$  ont permis de définir cette ligne de base manuellement. A posteriori, une définition de la ligne de base par polynôme de degré 2 ou 3 aurait été plus approprié. Les spectres obtenus sont présentés sur la Figure 44.

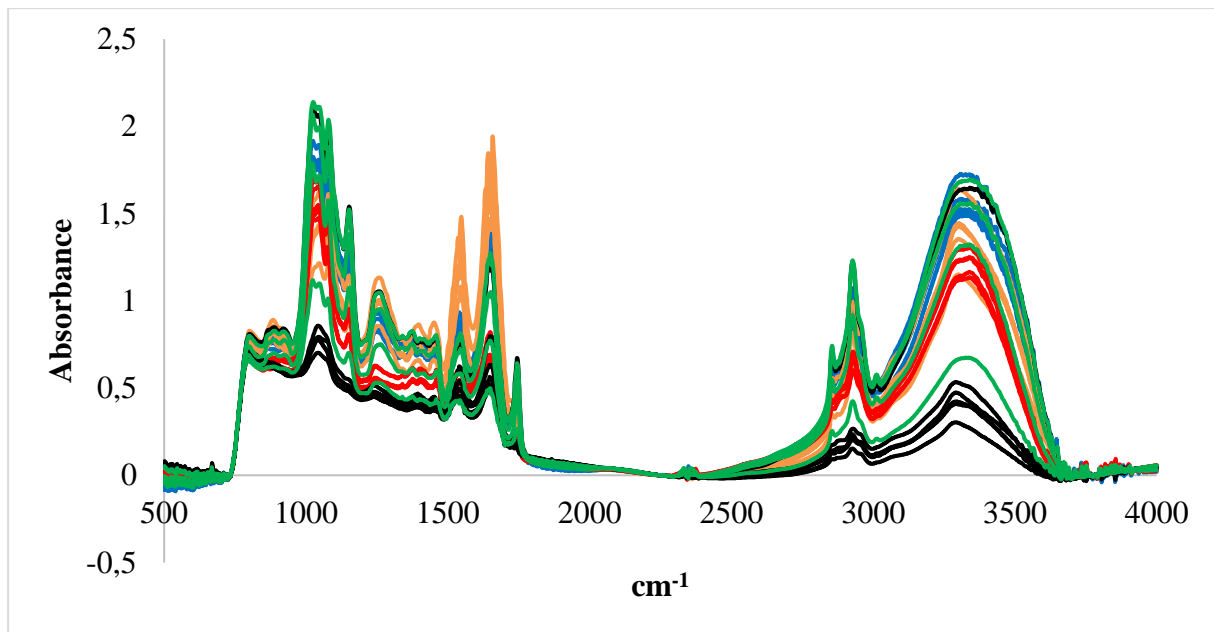


Figure 44 : Spectres infrarouge de *C. reinhardtii* souche 2935 soumis à différents stress après traitement de la ligne de base (LB) de 500-4000  $\text{cm}^{-1}$ . Témoin (bleu), faible intensité lumineuse (orange), forte intensité lumineuse (rouge), obscurité (noir) et carence en azote (vert).

Par la suite, l'ensemble des prétraitements et les analyses en composantes principales ont été réalisés sur le logiciel Unscrambler. Lors d'une première phase d'observation des spectres, il semble possible de distinguer des variations de composition moléculaire des microalgues liées aux conditions de stress étudiés (Figure 44). L'ACP après traitement de la ligne de base présente un regroupement des spectres par conditions sauf pour le groupe carence en azote qui apparaît plus dispersé (Figure 45a). Concernant les loadings, la CP 1 qui représente 81 % de la variation du spectre différencie les groupes obscurité et stress lumineux +, des témoins et du groupe stress lumineux - (Figure 45b). Les variations de bandes à 1650 et 1545  $\text{cm}^{-1}$  (protéines) sur la CP2 sont positives pour les conditions obscurité et stress lumineux -. Tandis que les conditions stress lumineux + et carence en azote sont influencées négativement par cette composante au niveau des bandes des polysaccharides 1151 et 1025  $\text{cm}^{-1}$ .

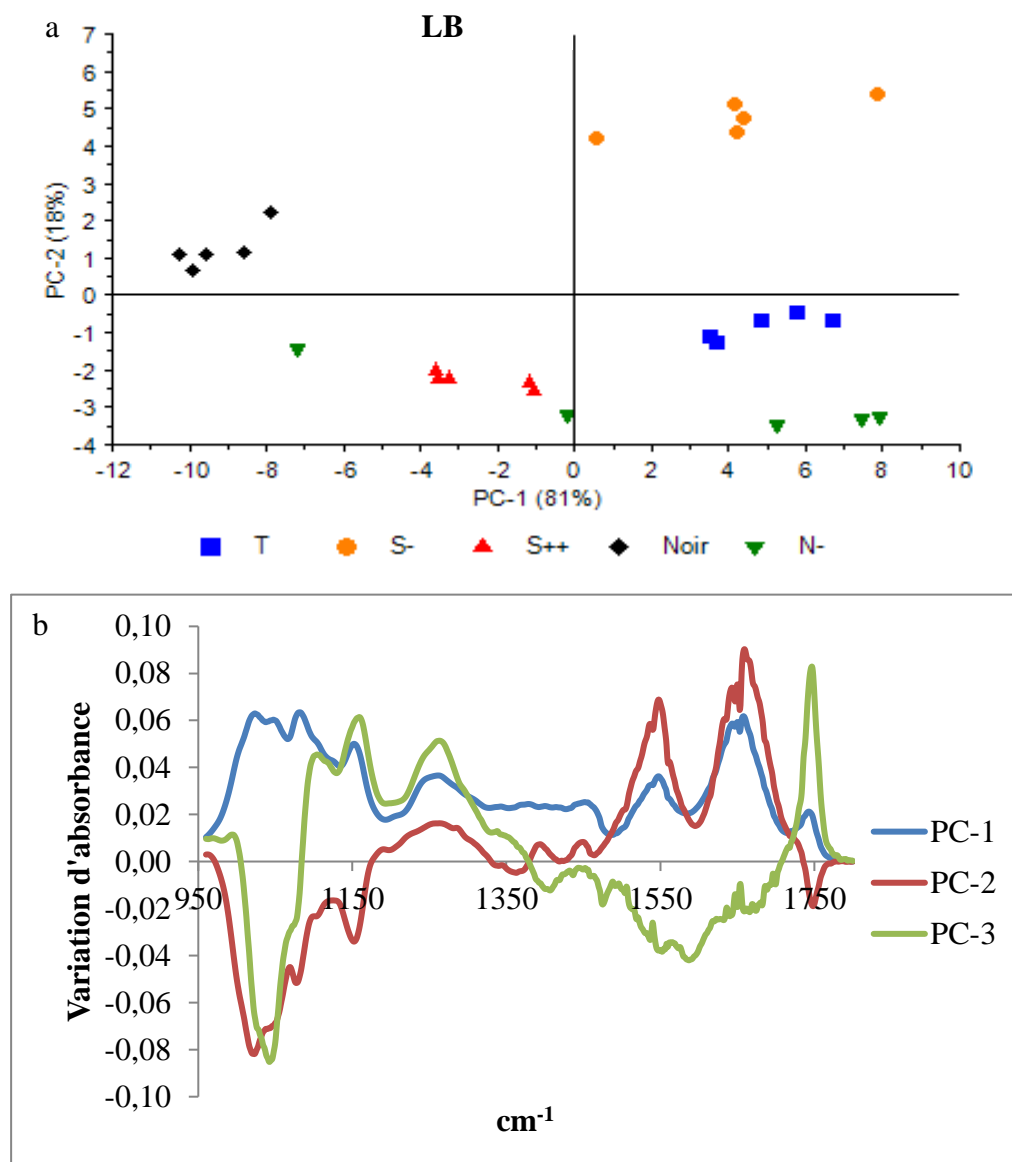


Figure 45 : Prétraitement LB des spectres infrarouge de *C. reinhardtii* 2935 sur la zone d'étude 950-1800  $\text{cm}^{-1}$  : (a) ACP Témoin (carré bleu), faible intensité lumineuse (S -, rond orange), forte intensité lumineuse (S++, triangle rouge), obscurité (Noir, losange noir), carence en azote (N -, triangle inversé vert) ; (b) X Loadings PC1 (bleu), PC2 (rouge) et PC3 (vert).

La correction de la ligne de base permet de ne pas avoir de problème de diffusion mais ne permet pas de comparer directement les spectres puisqu'ils ne sont pas normalisés. Il existe beaucoup de types de normalisation dont les principaux ont été testés dans cette étude. Les résultats obtenus (spectres moyens, ACP et loadings) pour chaque type de normalisation sont résumés dans le tableau 1 et les spectres et ACP obtenus sont présentés en Annexe 3.4.

**Tableau 5 : Tableau synthèse résultats des ACP suite aux prétraitements (sauf mention contraire, variations positives décrites). Prot. (Protéines), Pol. (Polysaccharides) A. n. (acides nucléiques) et Lip. (Lipides) ; CP (composante principale ; nombre d'ondes indiqués en cm<sup>-1</sup>).**

Prétraitement	Avantage	Inconvénient	CP1	CP2	Interprétation générale
LB	Remet tous les spectres au même seuil	Pas de normalisation	81% Condition azote dispersée	18% Prot : S- et obscurité Pol. : S++ et N-	Témoin bien groupé et en CP2 proche du 0.
LB +SNV	Enlève les interférences de dispersion, centrage à 0	Normalisation +/- à l'écart-type du spectre	63% Prot : Noir Lip. et pol.: N- et S++	33% classé par la présence/ absence de 1253 (A. n.) : S- et N-	Regroupement par conditions CP3 informative (3%) : 1740 en + et 1025 en -
SNV			55% Prot. : Noir et S- Lip. et pol. : N- et S++	41% classé par la présence/ absence de 1253 (A. n.) : S- et N-	PC3 (2%) : 1740 en + et 1050 en - Peu de différence avec la LB+ SNV
D1 SG	Séparation des pics Pas besoin de faire la ligne de base	Amplifie le bruit haute fréquence	50% Très bruité 1650 et 1151	36% Protéines	CP3 (7%) Noir et T bien groupé mais N-, S++ et S- plutôt dispersé
D1 SG+SNV	Méthode recensée par Rammal thèse 2017 comme la plus efficace		54% Prot. (1650), pol. (1150 et 1050) : S++ et Noir Pol. (1025); prot. (1545) : S-	25% 1080 : S++ et N- 1150 : S-	CP3 (11%) en - : 1150 et 1025 4 groupes distincts
LB + D1 SG+SNV		Pas de plus value par rapport à D1SG+SNV	42% Pol. : S- et Noir	34% Pol. : S-	CP3 (13%) 1080+ 1150 et 1045 en- 4 groupes distincts
MSC	corrige niveau dispersion de tous les spectres des échantillons à partir d'un spectre moyen. Enlève les interférences multiplicatives		68% Prot.: Noir et S- Lip., pol. : N- et S++	28% 1455 : dCH <sub>3</sub> "Prot. : Noir	CP3 (2%) : lip. + et pol. en -

LB + Norm max.	Fonctionne si c'est toujours le même pic qui est majoritaire	Ici le pic majoritaire n'est pas toujours le même	65% Faibles variations, influence condition Noir	28% Prot. : S- Pol. : S++ et N-	Condition obscurité bien distincte
LB + Norm moyenne	Normalise -/- à 0		63% Faibles variations	33% Pol. : S++, Noir, N- Prot. et A.n. : S-	Condition obscurité très disparate
LB+Norm aire		Dépend de la ligne de base	63% Prot et Pol. : Noir	33% Pol. : S++, Noir, N- Prot. et A.n. : S-	Conditions très regroupées autour de 0.
LB + Norm 1150 cm <sup>-1</sup>		Pic bouge en intensité	67% Ttes les bandes : Noir Lip. : N- et S++	29% Pol. : S++ et N- Prot., Lip., A.n.: S-	Condition obscurité bien distincte
LB + Norm 1654 cm <sup>-1</sup>	Pic référencé dans la littérature comme étant stable	Pic pas stable dans notre étude	79% Pol. : N- et S++	19% Pol. et lip. : S++, N-	CP3 (4%) 1255, 1150 et 1740 : en + Condition obscurité bien distincte

Pour sélectionner le ou les prétraitements les plus adaptés à notre jeu de données, un critère principal a été choisi, qui est le pourcentage de variance expliquée par l'ACP. Les prétraitements LB+SNV et MSC, puisqu'ils présentent un pourcentage de variance expliquée important (96 % sur les deux premières composantes) et se rapprochent le plus possible du spectre brut apparaissent alors les plus adaptés à ce jeu de données. La normalisation à 1150 cm<sup>-1</sup> présente également un pourcentage assez fort (96 %), pour autant celle-ci ne permet pas de visualiser les variations au niveau de ce pic des polysaccharides ce qui peut gêner notre interprétation. De même, la normalisation à 1654 cm<sup>-1</sup> (amide I), bien que très utilisée dans la littérature [215, 216, 225, 275–277] comme pic de référence, car supposée être stable, n'est pas ici un choix judicieux dans notre étude, puisque des variations de teneur en protéines sont attendues et observées. Ces deux prétraitements n'ont donc pas été gardés pour la suite de l'analyse ainsi que les prétraitements de normalisation moyenne et par rapport à l'aire malgré leur pourcentage de variance expliquée assez élevé (96 %). Le prétraitement DISG+SNV, bien qu'ayant un plus faible pourcentage de variance expliquée sur les deux premières composantes (79 %) est également intéressant car en plus de bien discriminer les différents types de conditions, il permet de ne pas déterminer une ligne de base *a priori* (Figure 110). De plus, cette combinaison des deux prétraitements est l'une des plus adaptée selon Rammal (2017) pour l'étude des spectres infrarouge, ces prétraitements seront donc utilisés pour la suite des analyses.

## 2.2 Etude des stress environnementaux sur la composition moléculaire de *C. reinhardtii* : intérêt de la spectroscopie infrarouge

Les résultats suivants ont fait l'objet d'un article accepté avec corrections mineures dans le journal *Analytical and Bioanalytical Chemistry* (Infrared spectroscopy as a tool to monitor interaction between nanoplastics and microalgae ? M. Déniel, F. Lagarde, A. Caruso, N. Errien, 2020). Ils ont consisté à démontrer l'utilité de cette technique pour suivre les changements de composition des microalgues *C. reinhardtii* suite à des stress environnementaux. Le même jeu de données, que celui vu précédemment pour le choix des prétraitements, est utilisé ici.

Les spectres infrarouge moyens des microalgues sous changements environnementaux contrôlés sont présentés sur la Figure 46a. Premièrement, pour mieux comprendre les variations de composition des microalgues lors des stress, des rapports d'intensité entre les principales bandes d'intérêts (polysaccharides, protéines, acides nucléiques et lipides) sont tracés sur la Figure 46b. Le ratio protéines/polysaccharides ( $I_{1650}/I_{1045}$ ) augmente par exemple pour les conditions de faible illumination et d'absence de lumière. En accord avec Jebsen et al. (2012) [265], il est observé que la production des protéines est favorisée par rapport à celle des polysaccharides dans le cas d'une réduction de lumière (partielle ou totale). Au contraire, le ratio  $I_{1650}/I_{1045}$  diminue pour le stress de carence en azote et dans les conditions de forte intensité lumineuse par rapport au contrôle. Hu (2004) [278] a observé une hausse des polysaccharides reliée à une hausse de l'intensité lumineuse. Dans le cas de la carence en azote, cette observation est cohérente avec l'étude de Stehfest et al. [18], qui montrent que sous une carence modérée en azote, une augmentation des polysaccharides se produit initialement. Concernant les lipides, il a été montré dans la littérature que sous un stress important causée par une carence en nutriment, les microalgues produisent des lipides [117]. Ce point est confirmé ici par les ratios  $I_{1742}/I_{1650}$  et  $I_{1742}/I_{1045}$  qui augmentent seulement dans le cas du stress azoté. De plus, une baisse du ratio lipides/protéines est observée pour les conditions d'obscurité et de faible intensité lumineuse. Patel et al. (2008) [222] ont aussi rapporté cette diminution, des impacts sur la bicouche lipidique de *Micrasterias hardyi* ont également été observés après interaction avec des actifs d'ingrédients pharmaceutiques. Pour la condition de forte illumination, il y a peu de variation du contenu lipidique comparé aux protéines. L'augmentation de l'intensité lumineuse conduit également à une diminution des lipides comparés aux polysaccharides ( $I_{1742}/I_{1045}$ ), ce résultat étant en accord avec l'étude de Benavente-valdés et al. (2016) [279].



Par ailleurs, les résultats concernant le stress azoté sont en accord avec les conclusions de certaines études qui montrent l'accumulation de lipides et de polysaccharides [139]. Par exemple, Meng et al. (2014) [216] utilisent la FTIR pour mesurer le détournement d'allocation du carbone des protéines au bénéfice des polysaccharides et des lipides neutres chez *Isochrysis zhangjiangensis*. Enfin, la condition de faible intensité lumineuse présente une augmentation du ratio acides nucléiques/polysaccharides ( $I_{1255}/I_{1045}$ ), inversement, au déclin de ce ratio dans le cas d'une intensité lumineuse forte. Ces résultats mettent en évidence le métabolisme de redirection et de changement d'allocation d'énergie de la microalgue. Lorsqu'elle est soumise à un stress, les composés de stockage (protéines, polysaccharides et lipides) sont préférés [117, 139, 265]. Les principales variations sont observées pour les bandes des protéines et des polysaccharides.

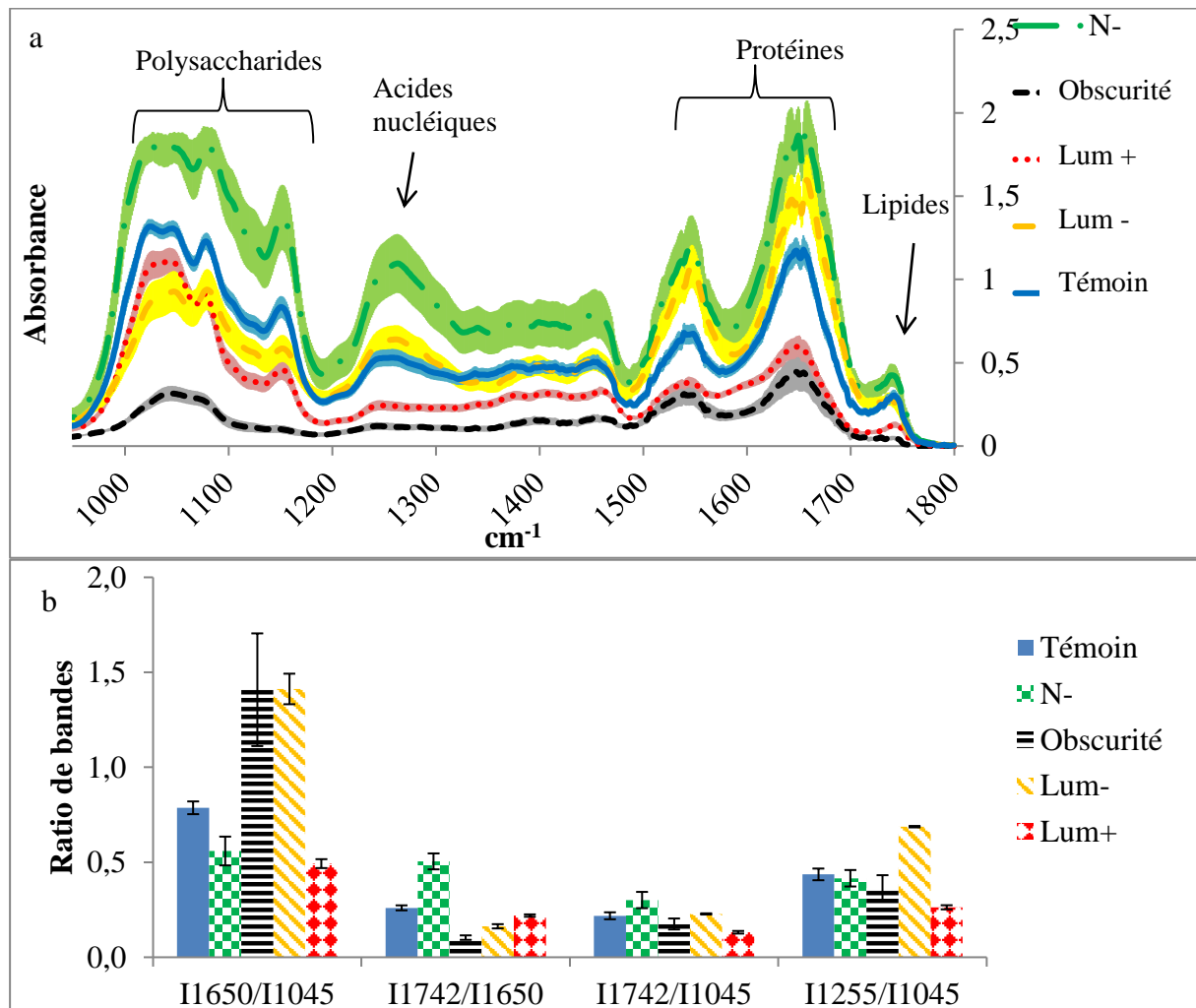


Figure 46: Spectres infrarouge de *C. reinhardtii* souche 2935 (48 h, 950-1800  $cm^{-1}$ ) sous changements environnementaux avec écart-type (Témoïn (bleu plein): 122  $\mu mol photons.m^{-2}.s^{-1}$ , N- (carreau vert): carence en azote, Obscurité (lignes horizontales noire): sans lumière, Haute intensité lumineuse (losange rouge): 350  $\mu mol photons.m^{-2}.s^{-1}$ , Faible intensité lumineuse (lignes inclinées orange): 90  $\mu mol photons.m^{-2}.s^{-1}$ ) (a) après ligne de base (LB); (b) Ratio des principales bandes caractéristiques des spectres LB sous des changements environnementaux connus avec écart-type: Lipides (1742  $cm^{-1}$ , C=O), Protéines (1650  $cm^{-1}$ , Amide I), Acides nucléiques (1255  $cm^{-1}$ , P=O), Polysaccharides (1045  $cm^{-1}$ , C-O).

L'analyse des spectres par étude des rapports d'intensité entre certaines bandes, comme précédemment décrite, est informative mais pas facilement applicable à un nombre considérable de spectres. Sur ce jeu de données infrarouges, une ACP est réalisée après application des prétraitements DISG+SNV (Figure 47b). L'ACP est utilisée pour regrouper les spectres par similitude et aide à distinguer les différentes conditions. Dans notre cas, les spectres des conditions « obscurité » et « faible lumière » d'une part et « forte lumière » et « carence en azote » d'autre part sont divisés en deux groupes distincts sur l'axe CP1, avec le groupe contrôle au centre. Pour expliquer ces regroupements, les loadings plots sont également représentés (Figure 47c). La CP1, qui représente 54 % de la variation spectrale, présente des fluctuations au niveau des pics des lipides (C=O, 1740  $\text{cm}^{-1}$ ), protéines (C=O, 1650  $\text{cm}^{-1}$ ; N-H, 1545  $\text{cm}^{-1}$ ) et polysaccharides ( $\nu$ C-O-X, 1150  $\text{cm}^{-1}$ ; 1050  $\text{cm}^{-1}$ ; 1025  $\text{cm}^{-1}$ ) en accord avec les résultats décrit par Dean et al. (2008). Les variations positives sur la CP1 des pics 1650 (protéines), 1150 et 1050  $\text{cm}^{-1}$  (polysaccharides) rendent compte de la variance des groupes « forte intensité lumineuse » et « carence en azote ». Au contraire, des variations négatives sont également observées sur les pics à 1025  $\text{cm}^{-1}$  (polysaccharides) et 1545  $\text{cm}^{-1}$  (protéines), qui sont liés aux variations des spectres de microalgues sous faible intensité lumineuse (Figure 47c). Concernant la CP2 (25 % de la variance expliquée), les conditions « obscurité » et « faible intensité lumineuse » sont distinctement divisés en deux clusters de spectres. Les bandes qui diffèrent de cette composante sont reliés aux polysaccharides (1150; 1080; 1025  $\text{cm}^{-1}$ ) avec des variations positives sur le pic à 1080  $\text{cm}^{-1}$  pour les conditions « forte intensité lumineuse » et « carence en azote » et une variation négative sur le pic à 1150  $\text{cm}^{-1}$  pour le groupe « faible intensité lumineuse ». La CP3, qui représente 11 % de la variation spectrale, présente aussi des changements sur les bandes des polysaccharides (1150; 1080; 1025  $\text{cm}^{-1}$ ). Pour améliorer l'interprétation des spectres, un lissage Savitsky-Golay a été réalisé avec 13 points, les figures obtenues sont présentées en annexe (Figure 117).

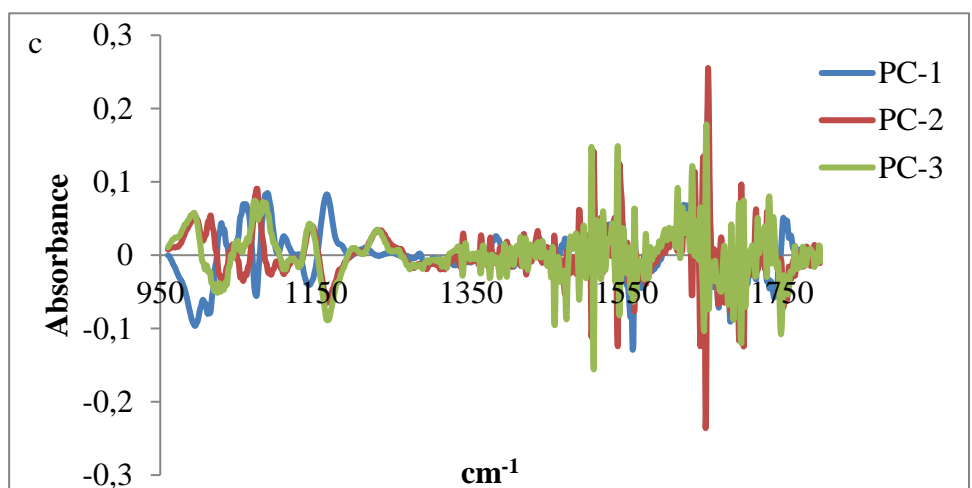
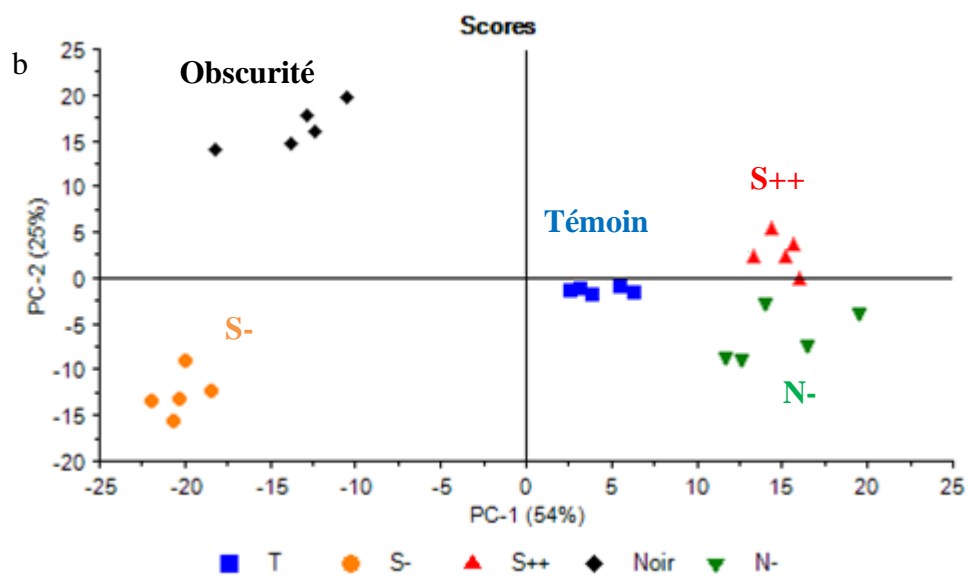
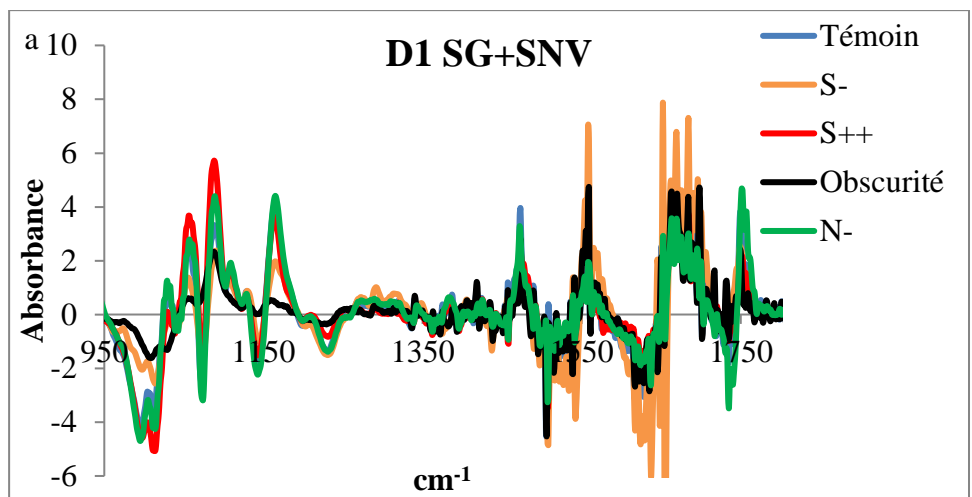


Figure 47: (a) Spectres infrarouge de *C. reinhardtii* souche 2935 après pré-traitements D1SG (dérivé première de Savitzky-Golay) +SNV (48 h, 950-1800  $\text{cm}^{-1}$ ) sous changement environnementaux contrôlés avec écart-type (Témoïn (bleu): 122  $\mu\text{mol photons.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ , N- (vert): carence en azote, Obscurité (noir): sans lumière, Haute intensité lumineuse (rouge): 350  $\mu\text{mol photons.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ , Faible intensité lumineuse (orange): 90  $\mu\text{mol photons.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ ) (b) ACP des spectres D1SG+SNV de microalgues (48 h, 950-1800  $\text{cm}^{-1}$ ). Loadings (c) de la composante principale 1 (PC1), (d) PC2 et (e) PC3.

## Conclusions

En conclusion, ces expériences valident l'hypothèse que les stress induits par des modifications environnementales conduisent à des modifications de spectres infrarouge des microalgues. Les changements sont notamment observés sur les bandes caractéristiques des protéines et des polysaccharides. Le ratio protéines/polysaccharides des microalgues apparaît influencé par l'intensité lumineuse ou la carence en nutriment et ceci est en cohérence avec la littérature pour ce qui est des stress nutritifs [217, 220]. Ces résultats donnent des informations complémentaires à la littérature existante sur l'influence de la lumière sur la composition biochimique de la microalgue [115].

Ainsi, l'effet de stress environnementaux importants comme l'appauvrissement en nutriment ou en lumière sur la composition biochimique de la microalgue *Chlamydomonas reinhardtii* peut être facilement mis en évidence par spectroscopie infrarouge, d'autant plus si celle-ci est couplée à des analyses multivariées comme l'ACP. L'analyse par ACP est complémentaire du calcul des ratios de bandes pour tenter de comprendre les modifications biomoléculaires majeures impliquées dans la réponse aux stress et présente deux avantages comparés aux ratios : une analyse rapide et un processus statistique de traitement des données. D'une part, cette technique a l'avantage d'exiger des quantités faibles de microalgues et d'autre part, contrairement aux essais biochimiques classiques, de fournir une réponse rapide.

Enfin, la comparaison des méthodes de spectroscopies infrarouge et Raman pour suivre les changements de composition biochimique des microalgues suite à un stress lumineux met en évidence la complémentarité des techniques d'un point de vue de leur composition en macromolécules (caroténoïdes visibles seulement en spectroscopie Raman). Cependant, la spectroscopie infrarouge permet de visualiser plus de composés des microalgues et couplée à l'ACP, elle discrimine donc plus aisément les différents types de stress environnementaux que la spectroscopie Raman (Figure 48). De manière générale, cette étude montre que l'infrarouge couplée avec des analyses chimiométriques appropriées peut être applicable dans la compréhension des mécanismes de réponse au stress chez des microalgues.

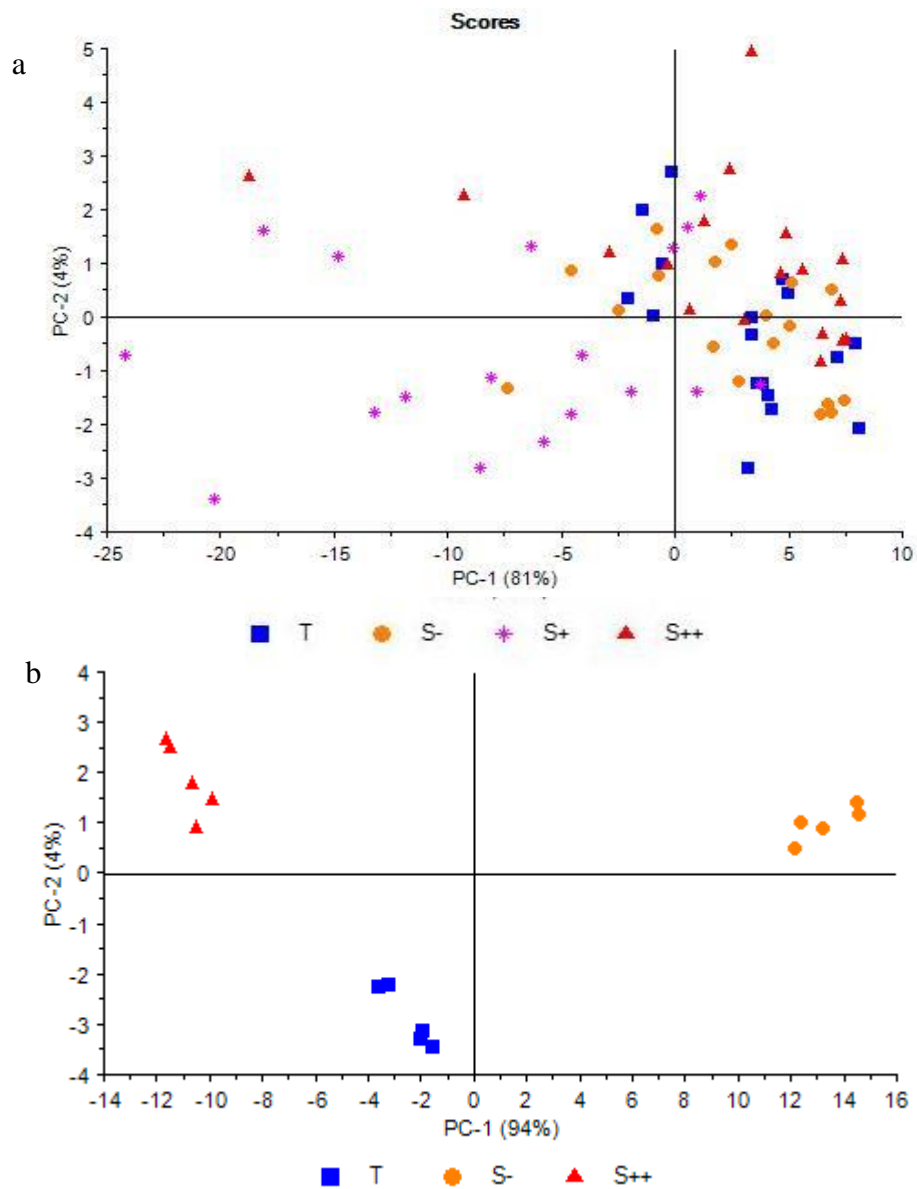


Figure 48 : Comparaison de deux expériences de stress lumineux sur *C. reinhardtii* 2935. ACP sur les spectres Raman (a) et infrarouges (b) obtenus après quatre jours d'interaction après LB+normalisation par la moyenne.

## 2.3 Spectroscopie infrarouge, outil pour le suivi de la composition moléculaire de *C. reinhardtii* suite à un stress ionique Cd<sup>2+</sup>

En plus des changements environnementaux vus précédemment, des polluants solubles peuvent se retrouver dans l'environnement et donc au contact des microalgues. Dans le but d'obtenir des informations sur la réponse de microalgues suite à une interaction de type « présence d'un polluant non particulaire », une interaction avec des ions cadmium (Cd<sup>2+</sup>) chez *C. reinhardtii* a été réalisée. Le cadmium, élément trace métallique, connu pour ces effets toxiques (capacité à changer la perméabilité membranaire, [153]) est couramment utilisé comme stress métallique et ionique dans les études écotoxicologiques [280, 281]. Le suivi de la réponse à ce type de stress a été réalisé par deux voies, l'une biologique (étude de la croissance, de l'activité photosynthétique, de l'expression de gènes) et l'autre spectroscopique (étude infrarouge pour le suivi de la composition macromoléculaire). L'expérience a été menée sur quatre jours et deux concentrations en Cd<sup>2+</sup> ont été testées, 50 et 100 µM.

### 2.3.1 Etat physiologique des microalgues

La courbe de croissance réalisée après comptage journalier des microalgues montre une augmentation du nombre de microalgues par unité de volume dans toutes les conditions au cours de l'expérience (Figure 49). Il est constaté qu'il n'y a pas de variations significatives entre les trois groupes (témoin, 50 µM et 100 µM Cd) sauf à quatre jours où le témoin semble présenter une croissance plus rapide que les deux autres conditions. Ces résultats sont cohérents avec l'étude de Prasad et al. (1998) [282] qui présente aussi une réduction de croissance de deux types de *C. reinhardtii* en présence d'ions cadmium à concentration de 50 et 100 µM à partir de quatre jours.

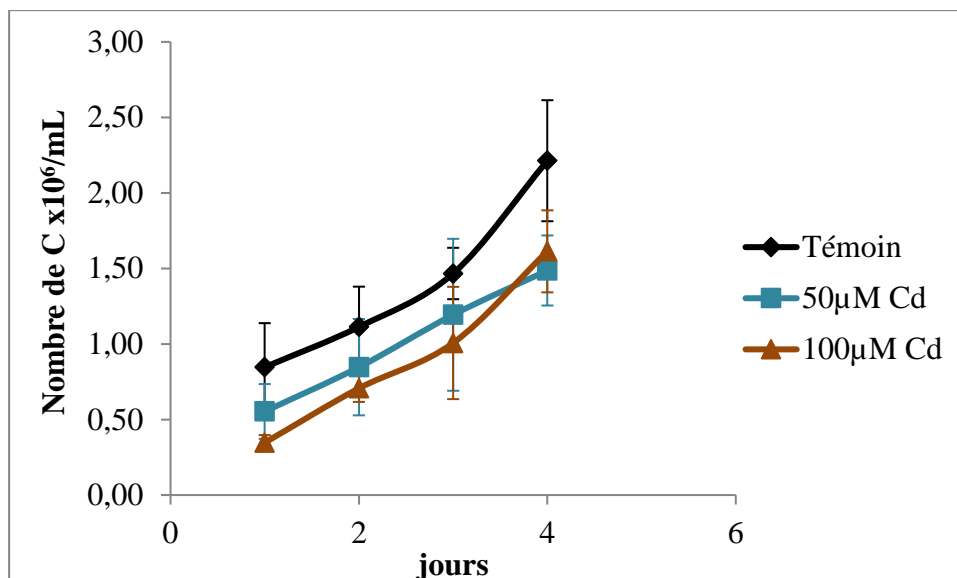


Figure 49 : Courbe de croissance moyenne avec écart-type de *C. reinhardtii* 2935. Témoin (noir), 50 μM (bleu vert) et 100 μM Cd (marron).

De plus, la fluorescence de la chlorophylle a été enregistrée pour contrôler l'activité photosynthétique des microalgues après quatre jours d'interactions avec les ions cadmium. Le rendement quantique calculé présente une différence entre chaque condition (Tableau 6), la condition 100 μM Cd présentant le plus faible rendement. Le témoin présente ici la meilleure valeur d'efficacité du photosystème II à la conversion photochimique de la lumière, tandis que la présence d'ions cadmium semble altérer les capacités photocatalytiques de *C. reinhardtii*. Ceci peut être mis en relation avec l'étude de Jamers et al. (2009) [153], où les microalgues exposées à 100 μM Cd pendant 72 h présentent un contenu significativement plus faible en chlorophylle que le contrôle.

Tableau 6: Fluorescence de *C. reinhardtii* 2935 suite à quatre jours d'interaction avec des ions cadmium.

	Rendement quantique moyen (Fv/Fm)	Ecart-type
Témoin	0,47	0,02
50 μM Cd	0,36	0,03
100 μM Cd	0,29	0,14

Ainsi bien que la croissance des microalgues ne soit pas impactée par la présence des ions cadmium, une altération de la capacité photocatalytique du photosystème II des microalgues est relevée et semble s'accroître avec l'augmentation de la concentration. En parallèle, la composition biochimique de *C. reinhardtii* a été suivie par infrarouge pour continuer notre analyse et étudier les éventuels impacts des ions à ce niveau.

### 2.3.2 Composition macromoléculaire des microalgues

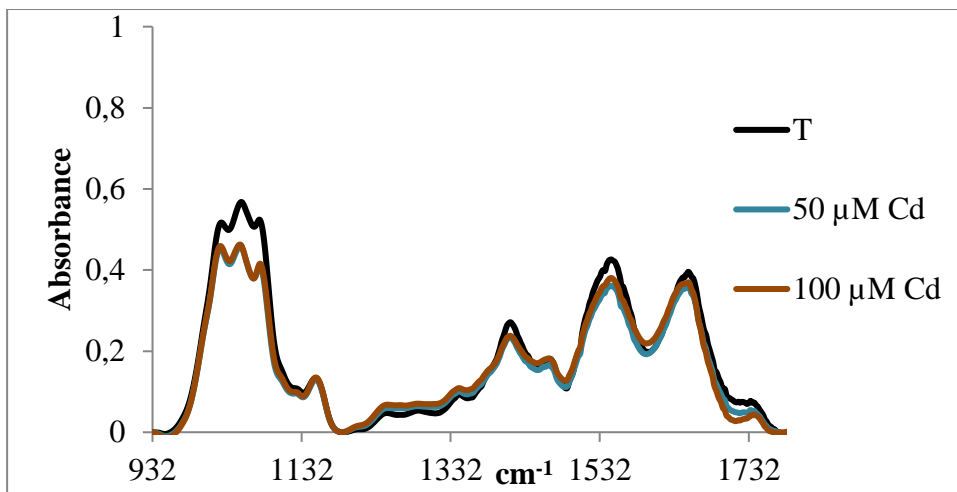


Figure 50: Spectres infrarouge moyens après LB de *C. reinhardtii* 2935 suite à un stress  $\text{Cd}^{2+}$ . Témoin (noir), 50  $\mu\text{M}$  Cd (bleu vert) et 100  $\mu\text{M}$  Cd (marron).

En regardant les spectres infrarouge moyens de *C. reinhardtii* après quatre jours de contact avec  $\text{Cd}^{2+}$ , les conditions testées semblent se dissocier du témoin sur certains pics en termes d'intensité mais pas de position (Figure 50). Les rapports de bandes, des principales macromolécules, réalisés sur les spectres, ne montrent pas de variations significatives entre les conditions, à l'exception du ratio lipides/protéines ( $I_{1742}/I_{1650}$ ) qui diminue dans les conditions 50 et 100  $\mu\text{M}$   $\text{Cd}^{2+}$  par rapport au témoin (Figure 51). Le contenu en lipides et protéines de *C. reinhardtii* semble donc impacté en présence d'ions cadmium tandis que les polysaccharides ne semblent pas affectés.



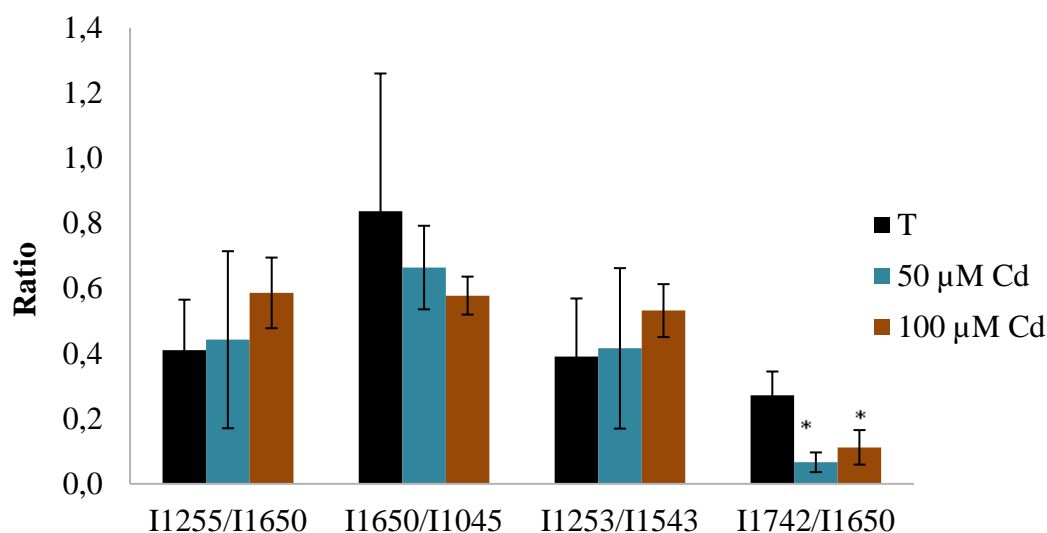


Figure 51 : Rapport de bandes infrarouges des spectres de *C. reinhardtii* 2935 après quatre jours de contact avec des ions cadmium. Témoin (noir), 50 µM Cd (bleu vert) et 100 µM Cd (marron). \* Test non paramétrique Wilcoxon, p-value <0,05.

Pour vérifier ce résultat, les spectres sont analysés par ACP après prétraitement D1SG-SNV (Figure 52a et b). Premièrement, le groupe 100 µM Cd se distingue assez nettement du groupe témoin, alors que les échantillons du groupe 50 µM Cd sont plus dispersés. La CP1 qui représente 65 % de la variance des spectres, influence principalement le groupe 100 µM Cd. Des variations sur les bandes des protéines (1671 et 1550 cm<sup>-1</sup>) et des lipides (1742 cm<sup>-1</sup>) sont observées et confirment les variations de rapport de bandes. Avec l'ACP, il est de plus observé des fluctuations d'absorbance sur les bandes des polysaccharides (Figure 52c). La composante 2, représentant 17 % de la variance, est très bruitée dans la partie 1500-1800 cm<sup>-1</sup>, rendant l'interprétation difficile. Cependant, sur le reste du spectre, il est observé des variations sur les bandes des polysaccharides.

Les variations de composition macromoléculaire de *C. reinhardtii* en présence d'ions cadmium se font donc au niveau des protéines, des lipides et des polysaccharides. Ceci va dans le même sens que les variations au niveau des protéines et polysaccharides observés chez des macroalgues *Padina tetrastromatica* en présence d'ions cadmium (445 µM). Ainsi le cadmium induit un stress pour les microalgues. La composition biochimique des microalgues étant sous contrôle de l'expression de gènes, il est donc intéressant d'effectuer une étude biomoléculaire en parallèle de cette étude.

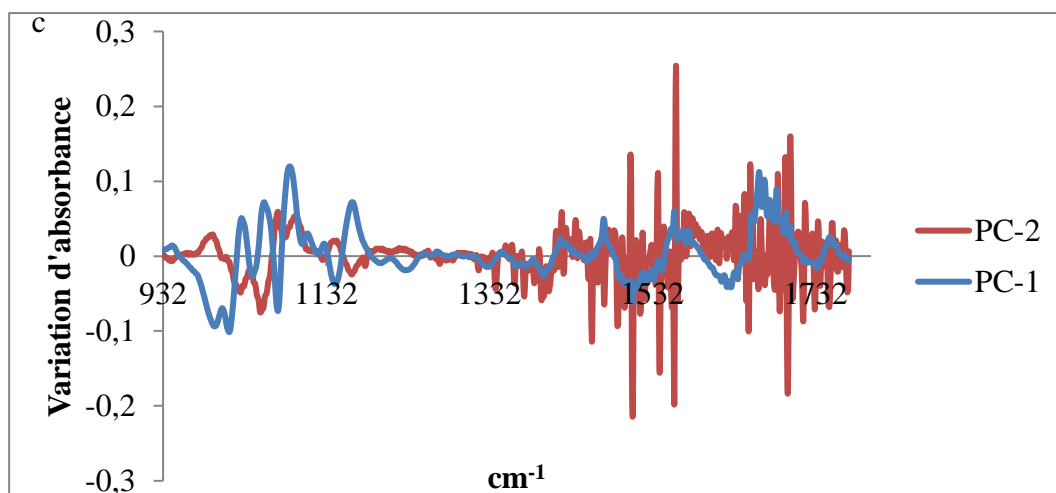
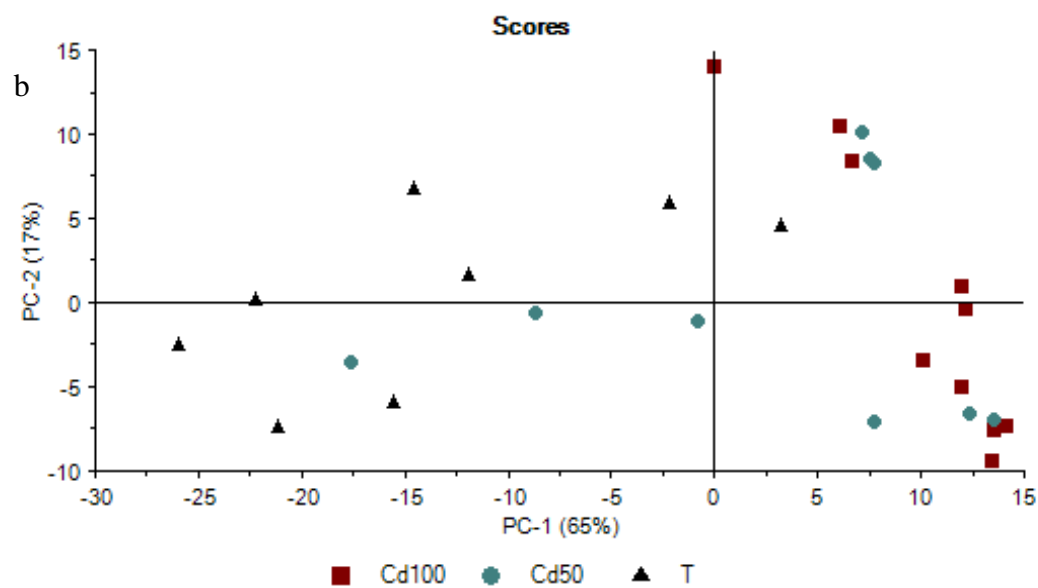
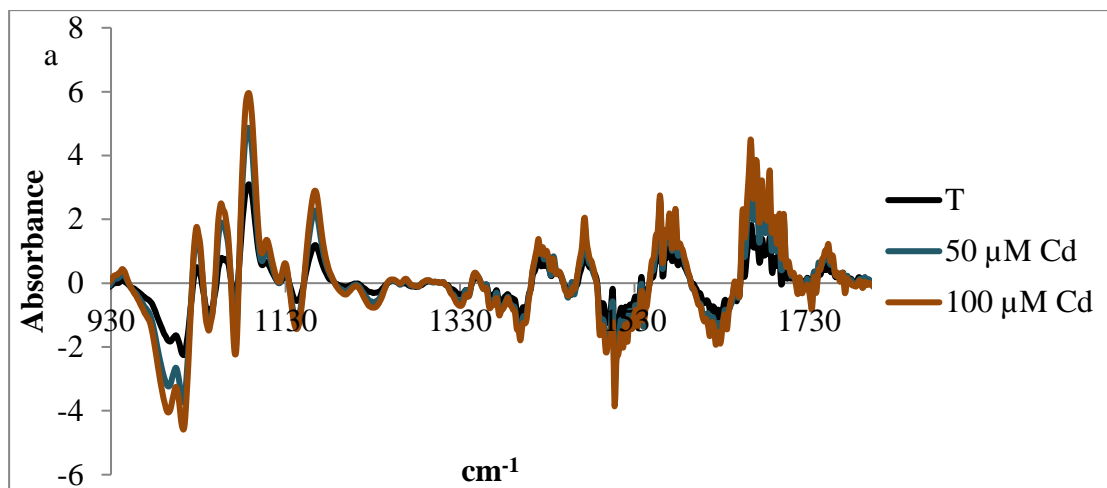


Figure 52 : (a) Spectres infrarouge moyens SG1-SNV de *C. reinhardtii* 2935 suite à un stress Cd<sup>2+</sup> : (b) ACP (c) X Loading CP1 et 3. Zone d'étude : 932-1773 cm<sup>-1</sup>, Témoin (noir), 50 μM Cd (bleu vert) et 100 μM Cd (marron).

### 2.3.3 Expression génétique des microalgues

Premièrement, l'expression des gènes liés à la réponse au stress de *C. reinhardtii* a été étudiée après quatre jours. Les niveaux d'expressions sont constants pour ce qui est des gènes liés à la mort cellulaire (caspase) et à la photosynthèse (rbcL) (Figure 53). Ces résultats sont cohérents avec ce qui a été observé au niveau de la croissance cellulaire et de son maintien. Pour la condition 100  $\mu\text{M}$  Cd, il est observé une augmentation significative du niveau d'expression des heat shock protein (hsp20, impliquées dans la réparation des protéines). Ce résultat suggère des dommages aux niveaux des protéines qui impliquent un mécanisme de réparation, ceci est en cohérence avec l'analyse infrarouge. Dans la littérature, il a été montré que les ions cadmium pouvaient induire la présence d'espèces réactives à l'oxygène (ROS) chez *C. reinhardtii* [155]. Ceci pourrait entraîner la diminution des protéines (Figure 50) et l'induction d'un mécanisme de réparation (Figure 53) suggéré également par Jamers et al. (2009) [153] qui ont montré une variation de l'activité de l'estérase dans le cas d'ions cadmium à 100  $\mu\text{M}$ . De plus, Jamers et al. (2013) [114] ont montré une surexpression de la glutathione peroxydase impliquée dans la défense antioxydante, qu'il serait intéressant de tester. D'autre part, deux gènes liés aux voies de biosynthèse des caroténoïdes (BKT et CHY) sont étudiés comme potentiels indicateurs de stress. L'exposition au cadmium n'engendre pas de variations significatives de l'expression de ces deux gènes, il est seulement noté une légère augmentation non significative de l'expression du gène CHY pour la condition 100  $\mu\text{M}$  Cd. Cette analyse s'est focalisée sur quelques gènes clés et montre le peu d'impact des  $\text{Cd}^{2+}$ . Pour compléter cette étude, les voies de stockage du cadmium et le pouvoir biorémédiateur de cette microalgue pourrait être suivie. Par ailleurs, une augmentation du niveau de transcrits de la thioredoxine a été révélée, ceci pourrait expliquer le peu d'impact observé au niveau de la réponse moléculaire de *C. reinhardtii* par un pouvoir de stockage de ce composé.

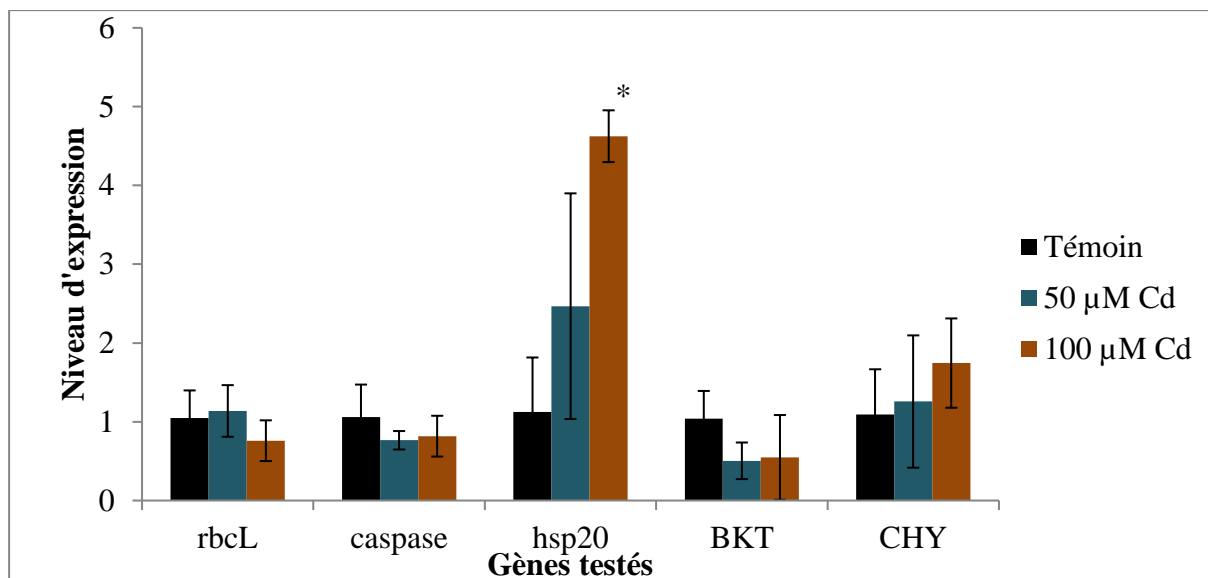


Figure 53 : Niveaux d'expression des gènes de stress *C. reinhardtii* 2935 suite à un stress  $Cd^{2+}$ . Témoin (noir), 50  $\mu M$  Cd (bleu vert) et 100  $\mu M$  Cd (marron). Dilution 1/8. Gènes liés à la mort cellulaire (caspase), photosynthèse (rbcL), réparation protéique (hsp20). \*Test non paramétrique Kruskal-Wallis p-value <0,05.

Deuxièmement, comme les bandes des polysaccharides ne sont pas bien définies par l'analyse infrarouge, une étude de certains gènes présents chez *C. reinhardtii*, et impliqués dans les voies de biosynthèse des polysaccharides, a été réalisée pour mieux comprendre les variations observées à ce niveau. Les résultats obtenus montrent que les gènes liés au galactose et au rhamnose ont un niveau d'expression similaire au groupe témoin (Figure 54). Par contre, le gène codant la voie de biosynthèse du xylose présente une sur-expression pour 50 et 100  $\mu M$   $Cd^{2+}$ . Ainsi, le xylose serait impacté par la présence des ions cadmium.

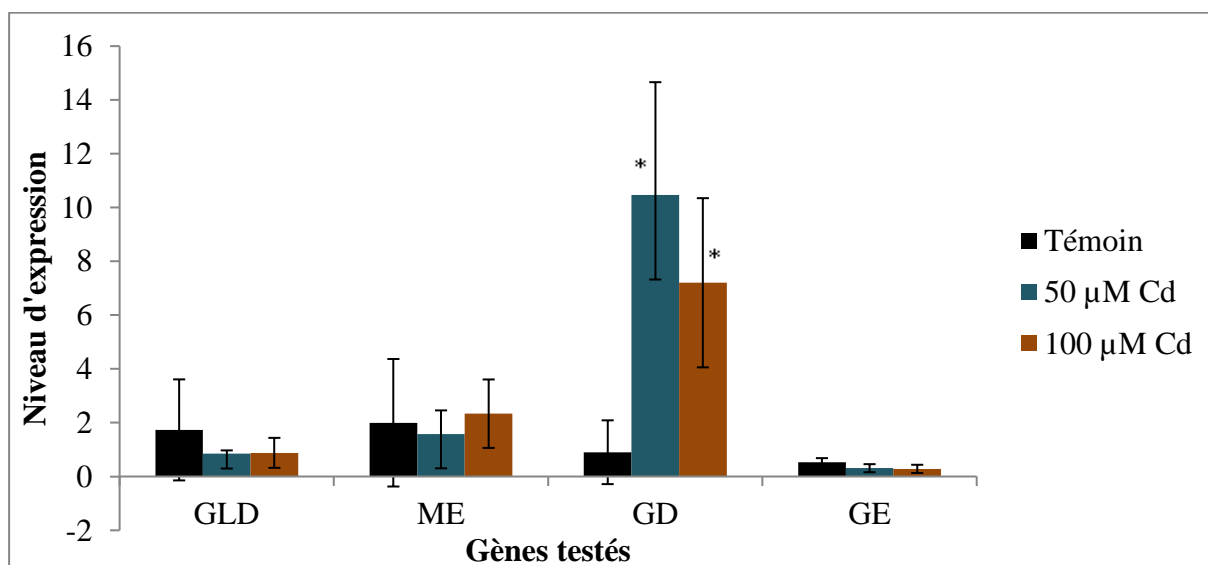


Figure 54 : Niveaux d'expression des gènes des polysaccharides (GD (xylose), GE (galactose), GLD (rhamnose), ME (galactose) de *C. reinhardtii* suite à un stress cadmium. Témoin (noir), 50  $\mu M$  Cd (bleu vert) et 100  $\mu M$  Cd (marron).

### **Conclusion du chapitre 3 : Intérêt des spectroscopies vibrationnelles dans l'étude des réponses aux stress environnementaux chez *Chlamydomonas reinhardtii***

Dans cette partie, il a pu être mis en parallèle les méthodes de spectroscopie infrarouge et Raman pour suivre les changements de composition biochimique des microalgues suite à un stress lumineux. La comparaison des méthodes de spectroscopie infrarouge et Raman suite à ce stress met en évidence la complémentarité des techniques pour le suivi de la composition en macromolécules des microalgues (caroténoïdes visibles seulement en spectroscopie Raman). Cependant, la spectroscopie infrarouge couplée à l'ACP discrimine plus aisément les différents types de stress environnementaux que la spectroscopie Raman. L'intensité des signaux des carotènes, très intenses, nécessite un stress important pour qu'une variation puisse être détectée et mise en évidence par cette technique. Le choix des prétraitements adaptés est primordial pour une interprétation ajustée des données. Concernant les spectres Raman, bien que la comparaison n'ait pas été aussi exhaustive qu'en infrarouge, la normalisation moyenne après correction de la ligne de base a semblé être le traitement le plus adapté des trois prétraitements testés. Pour ce qui est de l'analyse des spectres infrarouge, la comparaison de différents prétraitements et de la littérature a permis d'en distinguer trois qui permettent de dissocier les différents types de stress : MSC, LB+SNV et DISG-SNV. Les deux derniers prétraitements seront utilisés par la suite pour l'ensemble des expériences réalisées.

Des variations de composition biochimique de *C. reinhardtii* ont pu être mises en évidence par spectroscopie vibrationnelle suite à des stress environnementaux différents. Tout d'abord, une haute intensité lumineuse engendre une augmentation du contenu des microalgues en astaxanthine (Raman), ainsi que des polysaccharides (Infrarouge). L'absence de lumière ou sa faible intensité se traduit par une augmentation des protéines et une diminution des lipides chez *C. reinhardtii*. Ensuite, le stress dû à une carence en azote conduit à une augmentation des bandes liées aux lipides et aux polysaccharides et à une diminution des bandes relatives aux protéines. Enfin, le stress lié à la présence d'ions cadmium induit une diminution légère des lipides, des protéines et des polysaccharides. L'analyse de l'expression des gènes souligne le fait que les ions cadmium induisent un stress pour les microalgues (sur-expression hsp 20) et que des variations ont bien lieu au niveau des polysaccharides (sur-expression GD). Il y a donc un lien entre les modifications observées en infrarouge et les analyses d'expression des gènes. Ainsi dans le chapitre suivant, notre intérêt se portera particulièrement sur le couplage des outils de biologie moléculaire et de spectroscopie infrarouge pour développer notre compréhension des mécanismes existants lors d'interaction nanoparticules avec les microalgues *C. reinhardtii*.

## Points clés du chapitre

---

- La spectroscopie infrarouge, méthode plus adaptée que le Raman pour suivre les changements de composition biochimique des microalgues suite à des stress environnementaux.
  - Les prétraitements adaptés pour l'analyse des spectres infrarouge sont MSC, LB+SNV et DISG-SNV.
  - Une forte luminosité accroît le contenu en astaxanthine et en polysaccharides de *C. reinhardtii*, tandis qu'une faible luminosité engendre une augmentation des protéines et une diminution des lipides.
  - Le stress azoté conduit à une augmentation du contenu lipidique et en polysaccharides et à une diminution du contenu protéique.
  - Les ions cadmium provoquent un stress pour les microalgues (expression des heat shock protéines).
  - L'expression des gènes peut informer sur les mécanismes impliqués dans la réponse au stress (exemple du stress cadmium).
-

# Chapitre 4 : Etude de la réponse des microalgues en présence de nanoparticules

---

## Introduction

Les microalgues, en tant qu'organismes vivants, sont sensibles à l'environnement qui les entoure. Dans le milieu aquatique, divers types de polluants sont retrouvés : pesticides, métaux lourds et plus récemment nanomatériaux, dont l'utilisation massive dans le quotidien en fait une nouvelle source potentielle de pollution aquatique. Si les nanoparticules métalliques ont été majoritairement étudiées dans la littérature (44 études sur 60 cf. Tableau 1, chap. 1), ce n'est pas le cas des nanoplastiques. Bien qu'étant des nanomatériaux émergents, ils sont encore peu étudiés du fait de verrous analytiques pour les quantifier notamment. Ainsi, dans cette étude l'impact des nanoparticules de polystyrène sur les microalgues sera étudié. Au-delà de l'aspect toxicité, l'intérêt dans ce chapitre sera porté sur l'apport d'éléments de réponse et de discussion aux questions suivantes : comment les microalgues perçoivent-elles la présence des nanoparticules ? Quels types d'interactions ont lieu entre ces deux entités et quels sont les paramètres qui les influencent ? Quels mécanismes de réponse sont mis en place par les microalgues ?

Pour suivre ces réponses, la spectroscopie infrarouge a été précédemment décrite comme étant une méthode adaptée pour le suivi de la variation de composition biochimique des microalgues. De plus, l'analyse de l'expression génétique a montré qu'elle pouvait apporter des informations sur les mécanismes impliqués dans la réponse aux stress (cf. chap. 3). Ainsi, pour suivre l'effet des nanoparticules sur les microalgues aux niveaux biochimique et moléculaire, la combinaison des techniques de spectroscopie infrarouge et de l'expression des gènes a été utilisée.

Les réponses des microalgues *Chlamydomonas reinhardtii* suite à des interactions avec des nanoparticules de polystyrène (NP PS) ont été étudiées et comparées aux réponses obtenues avec des nanoparticules d'or (NP Or) de tailles et formes très proches. Les résultats du suivi de la composition biochimique des microalgues et de l'expression de certains de leurs gènes sont également présentés dans cette partie.

Premièrement, il est tout d'abord nécessaire de caractériser les nanoparticules. Dans une seconde partie, afin de comprendre les paramètres influençant la réponse des microalgues, l'effet de la nature des nanoparticules sera étudié. Pour comprendre au mieux les interactions, la présence des particules au contact des microalgues est visualisée. Ensuite, afin de mettre en évidence l'influence du type de paroi des microalgues, deux souches de *C. reinhardtii* sont étudiées. Enfin, la réponse des microalgues en fonction du temps d'interaction avec les nanoparticules est étudiée afin de tenter de comprendre si à moyen terme, les effets observés sur les microalgues présentent une évolution temporelle.

## 1 Caractérisation des nanoparticules étudiées

Les NP PS (utilisées comme modèles de nanoplastiques dans ce travail) et les NP Or ont une taille de 100 nm d'après le fournisseur et sont respectivement entourées d'un surfactant anionique et de citrate. La caractérisation physique (taille et charge) des nanoparticules a été réalisée par DLS et mesure du potentiel zêta à l'aide de l'appareil Zetasizer Nano ZS (Malvern) à une concentration de 0,005 % en masse. Les mesures de taille et de charge sont présentées en Figure 55 et Figure 56. Les caractéristiques des nanoparticules ont été suivies dans deux environnements pour étudier l'influence de l'environnement physique et biologique dans lequel sont les nanomatériaux sur les propriétés des nanoparticules. Le comportement des nanoparticules est supposé ne pas être le même dans les deux milieux, notamment dû à la différence de force ionique [74].

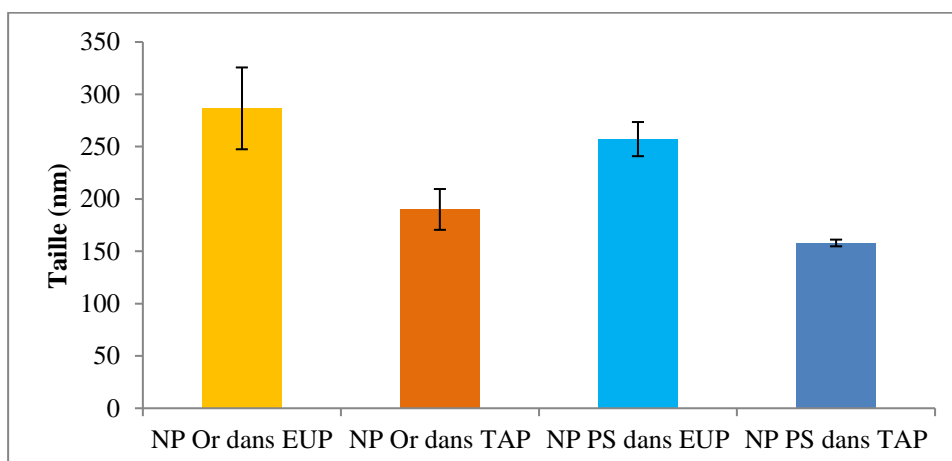


Figure 55 : Mesure de taille en nanomètres des nanoparticules d'or (jaune et orange) et de polystyrène (PS, bleu) dans deux milieux aqueux (EUP : Eau ultrapure, TAP : Tris acétate phosphate) obtenue par DLS (diffusion dynamique de la lumière).



Le diamètre hydrodynamique des deux types de nanoparticules, Or et PS, mesuré dans l'eau (respectivement 286 nm et 257 nm) est plus élevé que dans le milieu de culture TAP des microalgues (respectivement 190 nm et 158 nm) (Figure 55). La taille des particules correspond bien avec ce qui est annoncé par le fournisseur et une précédente étude a montré que la taille des NP Or dans l'eau ultrapure ne variait pas sur une journée [5]. La taille mesurée étant plus faible dans le milieu TAP que dans l'eau ultrapure, il ne semble donc pas y avoir d'agrégation des nanoparticules dans le milieu de culture, d'autant que la taille hydrodynamique, ici mesurée, tient compte de la couche d'hydratation qui se fixe sur les nanoparticules en milieu liquide et donc augmente la taille réelle de celles-ci [283].

Concernant le potentiel zêta, dans l'eau ultrapure, il est de -14 mV pour les NP Or et de -28 mV dans le cas des particules de polystyrène (Figure 56). Dans le milieu TAP, les nanoparticules ont des charges négatives plus importantes de -28 mV pour les NP Or et de -50 mV pour les NP PS. Cette dernière valeur est proche de celle obtenue par Bergami et al. (2017) [64] pour des NP PS-COOH de 40 nm (-66 mV). Ainsi le milieu de culture influence les charges de surfaces des deux types de nanoparticules et celles-ci sont chargées négativement, comme la plupart des nanoparticules testées dans la littérature sur les microalgues [284].

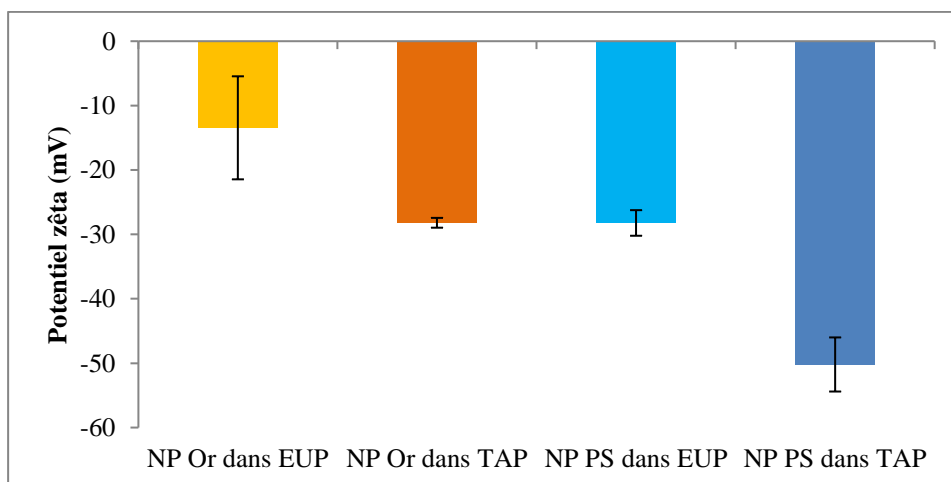


Figure 56 : Mesure de potentiel zêta en millivolts des nanoparticules d'or (jaune et orange) et de polystyrène (PS, bleu) dans deux milieux aqueux (EUP : Eau ultrapure, TAP : Tris acétate phosphate).

## 2 Quels effets des nanoplastiques au contact des microalgues ?

La présence de micro et nanoplastiques dans l'environnement aquatique étant une problématique actuelle, nous nous sommes intéressés particulièrement dans cette étude à celles de tailles nanométriques, afin de voir leurs potentiels effets sur des microalgues *C. reinhardtii* - à la base de la chaîne trophique aquatique. Les résultats de ces interactions seront comparés avec les stress environnementaux précédemment étudiés (cf. Chapitre 3 Partie 2) afin de déterminer si les interactions avec des nanoplastiques peuvent être considérées comme un stress pour les microalgues. La réponse des micro-organismes est suivie à quatre niveaux : physiologique, composition biochimique, intégrité membranaire et expression génétique.

### 2.1 Croissance : indicateur de l'état physiologique des microalgues

En écotoxicologie, la croissance est le premier indicateur de l'état physiologique des microalgues. Ce paramètre a été mesuré chaque jour durant toute la durée de l'exposition et les courbes obtenues sont présentées sur la Figure 57. Le jour 1 est le premier jour d'interaction de *C. reinhardtii* avec les NP PS. Le nombre de cellules par millilitre (mL) n'est pas significativement différent dans les conditions témoin et NP PS.

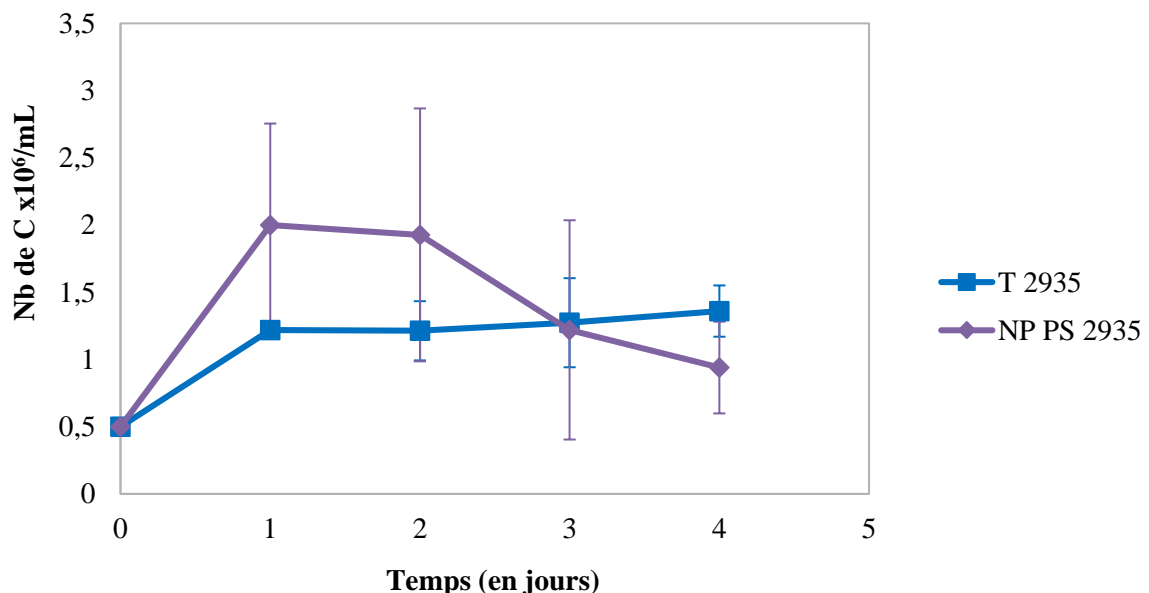


Figure 57 : Courbe de croissance moyenne *C. reinhardtii* expérience en présence de nanopolystyrènes. Test statistique de Kruskal-Wallis  $p > 0,1$ .

## 2.2 Composition biochimique des microalgues au contact des nanopolystyrènes

Pour suivre la composition biochimique des microalgues après 72 h d'interaction avec les NP PS, la spectroscopie infrarouge est utilisée. Les spectres infrarouge des microalgues obtenus après interaction avec des NP PS à 2 mg/mL pendant 72 h sont présentés sur la Figure 58a et b. Les rapports des bandes spectrales lipides/protéines ( $I_{1742}/I_{1650}$ ) et lipides/polysaccharides ( $I_{1742}/I_{1045}$ ) (Figure 58c) ne présentent pas de grandes variations comparées au groupe témoin. Les proportions de contenu lipidique semblent stables et les microalgues ne semblent pas stocker l'énergie sous cette forme en présence de NP PS. Ces résultats indiquent un effet marginal des NP PS sur la teneur en lipides des microalgues. Les changements dus à la présence des NP PS à cette concentration ne sont pas comparables avec l'effet de la limitation en nutriments [215, 217] ou la présence de cations métalliques [285] qui conduisent à une accumulation des lipides ou bien qui donne lieu à une diminution des composés lipidiques dans le cas de la présence d'ions cadmium (chapitre 3 §2.3.2). Par contre, comme dans le cas des ions cadmium, le ratio lipides/protéines ( $I_{1742}/I_{1650}$ ) est faible par rapport au témoin. De plus, une augmentation du ratio protéines/polysaccharides ( $I_{1650}/I_{1045}$ ) et une diminution très franche du ratio acides nucléiques/polysaccharides ( $I_{1255}/I_{1045}$ ) en présence des NP PS ont été observées. Comme pour le cas des lipides, les polysaccharides ne semblent pas contribuer au stockage de l'énergie puisque les bandes polysaccharides en présence de NP PS apparaissent moins intenses que celles du groupe témoin. Ce résultat va dans le même sens que ce que nous avons obtenu précédemment pour le stress cadmium (chapitre 3 §2.3.2). Concernant les protéines, une augmentation est ici mise en évidence avec les NP PS alors qu'en présence des ions cadmium, une diminution du contenu des microalgues pour ces composés a été observée (chapitre 3 §2.3.2). L'augmentation du contenu protéique observée ici est similaire à celle précédemment enregistrée sous des conditions de faibles illuminations (chapitre 3 §2.2) et mentionnée aussi par Jebsen et al. [265] sous des conditions de limitations en lumière ( $50 \mu\text{mol photons}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ ). De manière similaire, la synthèse de protéines a aussi été décrite chez *Scenedesmus* dans des conditions de limitations en fer [139, 286]. Selon la Figure 58a, la teneur en protéines des microalgues augmente en présence de NP PS, suggérant que les microalgues réagissent à leur présence. L'augmentation des protéines peut servir à accroître la croissance des microalgues ou à la maintenir dans ce cas puisqu'il n'y a pas d'augmentation significative de la croissance durant l'exposition [274]. Enfin, comme dans la condition de forte intensité lumineuse, le contenu en acides nucléiques des microalgues en présence des NP PS est très faible comparé

au groupe contrôle. En présence d'ions  $\text{Cd}^{2+}$ , les microalgues n'avaient pas présentées de variations au niveau du pic des acides nucléiques (chapitre 3 §2.3.2).

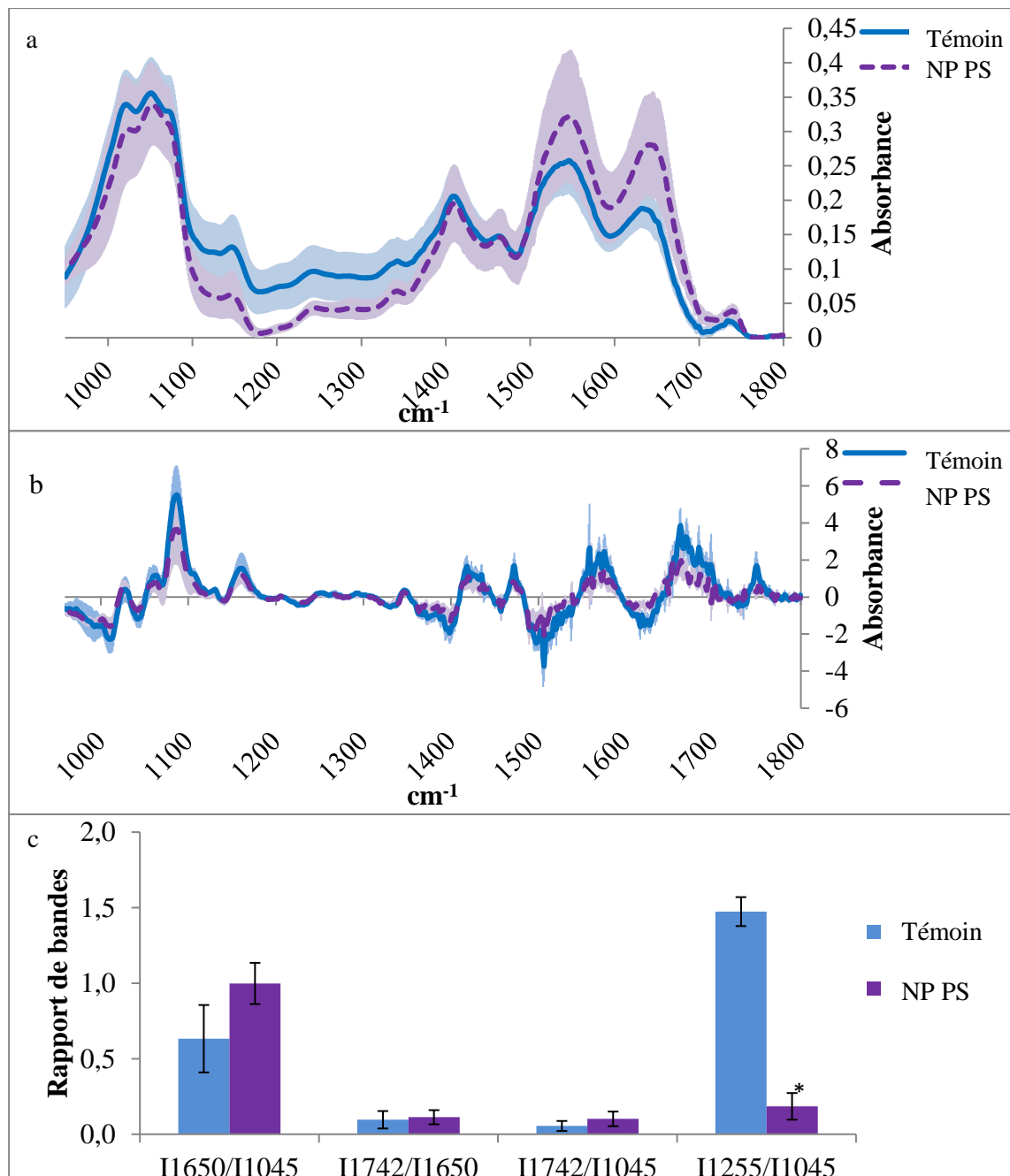


Figure 58: Spectres infrarouge de *C. reinhardtii* souche 2935 (72 h, 2 mg/mL, 950-1800  $\text{cm}^{-1}$ ) au contact des nanoparticules de polystyrènes (NP PS, ligne pointillée violette) et témoin (ligne pleine bleue) : (a) après LB (b) après DISG+SNV. (c) Rapport des principales bandes caractéristiques des spectres infrarouge en contact avec les nanoparticules de PS (violet) et en condition témoin (bleu) : Lipides (1742  $\text{cm}^{-1}$ , C=O), Protéines (1650  $\text{cm}^{-1}$ , Amide I), Acide nucléique (1255  $\text{cm}^{-1}$ , P=O), Polysaccharides (1045  $\text{cm}^{-1}$ , C-O). \* Test Kruskal-Wallis  $p < 0,05$ .

Comme le montre la Figure 59, l'ACP présente une différenciation claire des conditions témoin et NP PS selon la CP1, qui explique 61 % de la variance. La première composante est principalement influencée par les variations des bandes à 1650, 1545 (protéines) et 1050 (polysaccharides)  $\text{cm}^{-1}$ . La CP2 expose les fluctuations sur les pics 1150, 1050 et 1025  $\text{cm}^{-1}$  qui sont reliés aux polysaccharides (Figure 59b). De plus, la CP3 représente le bruit de fond du spectre (8 %, Figure 59c). Ces fluctuations sont similaires aux changements d'environnement décrits dans la littérature et cela reste pertinent avec des conditions de stress modérés [197, 226]. Par exemple, Driver et al. [226] présentent des variations sur les mêmes bandes des protéines et des polysaccharides sous conditions de faible nutriments.

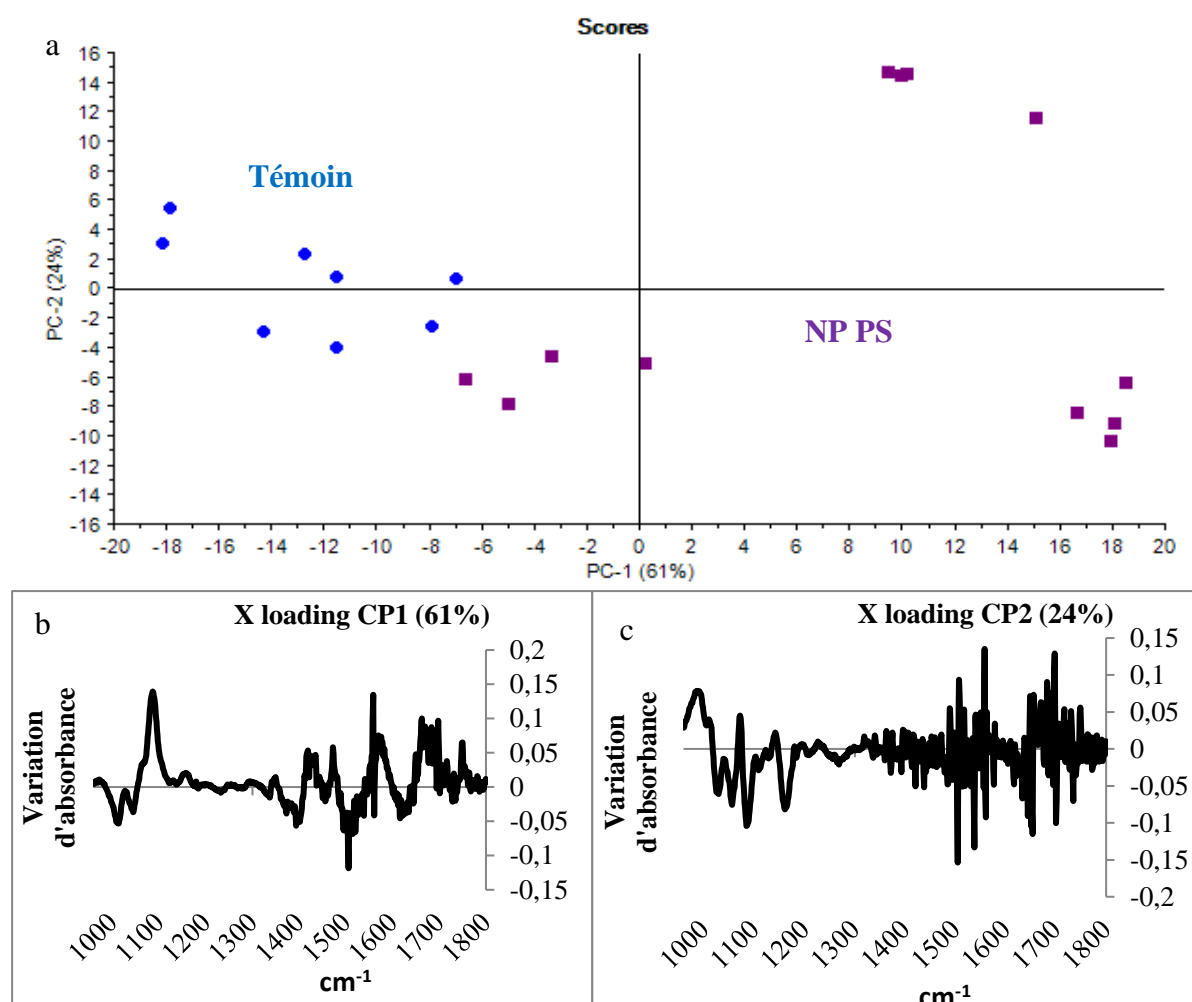


Figure 59: (a) ACP sur les spectres DISG+SNV de *C. reinhardtii* 2935 (72 h, 2 mg/mL, 950-1800  $\text{cm}^{-1}$ ) au contact de nanoparticules de polystyrène (NP PS). Témoin (rond bleu) ; NP PS (carré violet). (b) Loading de la composante principale 1 (CP1) et (c) Loading CP2.

Etonnamment, la variabilité des spectres des microalgues en interaction avec des NP PS apparaît ici plus importante que les différences avec le contrôle. En fait, une culture est vraiment proche du contrôle en termes de signal tandis que les deux autres cultures sont bien discriminées sur l'axe CP1. Cette variabilité dépendante des Erlenmeyers a été déjà observée et décrite dans d'autres études [218] telle que Driver et al. [226], où les spectres infrarouge de *C. reinhardtii* et *C. concordia* en conditions contrôlées présentent le même type de variabilité. De plus, la variabilité peut être expliquée par une distribution différentielle des nanoparticules dans le milieu, conduisant les microalgues à être impactée différemment par les NP PS. Une autre hypothèse peut être que les modifications créées par les interactions sont réversibles. Dans tous les cas, il peut être suggéré à partir de ces résultats que les nanoplastiques présents dans l'environnement des microalgues, ont, au moins à court terme, des impacts modérés sur la composition biochimique des microalgues. Mais de quel type d'impact s'agit-il ? La partie suivante s'intéressera aux potentiels impacts physiques des nanoparticules sur la membrane plasmique des microalgues.

### **2.3 Intégrité membranaire suite aux interactions microalgues/NP PS**

Les interactions nanoparticules-microalgues peuvent mener à une modification des barrières physiques des microalgues. La cytotoxicité des NP PS est suivie par le test LDH qui est un dosage enzymatique et qui permet de détecter si la membrane plasmique des microalgues est affectée ou non. Quand la membrane est impactée, la quantité d'enzyme LDH dans le milieu est proportionnelle à la quantité de dommages à la membrane. Une augmentation significative du pourcentage d'enzyme LDH (de 11,2 % après une heure et 7,5 % après 72 h) par rapport au contrôle a été mesurée dans tous les échantillons en interaction avec les NP PS. Ces résultats suggèrent que l'intégrité de la membrane plasmique de *C. reinhardtii* apparaît être impactée en présence de NP PS. Ce phénomène a aussi été montré par Pakrashi et al. [61] chez *Chlorella ellipsoïds* après interaction avec des NP d'oxyde d'aluminium de 100 nm dans des concentrations comparables (0,05 mg/L) avec une augmentation de 13 % après 72 h. De même, à des concentrations dix fois plus grandes, la présence de ZnO de 50 nm conduit également à la perte d'intégrité membranaire chez *Chlorella vulgaris* [21]. Il a déjà été décrit que les nanoparticules en contact avec les microalgues peuvent causer des dommages morphologiques conduisant à la non-intégrité des barrières des microalgues [21, 284]. Cependant, la réparation peut être inégale dans les zones abondamment couvertes. Dans ce cas, des problèmes d'échange

de nutriments entre les microalgues et le milieu externe peuvent avoir lieu. Ce phénomène d'interaction et de toxicité a été montré chez la diatomée *Skeletonema costatum* [43]. Avec les microalgues vertes, toutefois l'interaction avec le plastique peut être positive à moyen terme. En 2018, Mao et al. [287], ont montré que l'interaction des microalgues vertes *Chlorella pyrenoidosa* avec des microplastiques de polystyrène résulte en un épaissement de la paroi impliquée dans sa réhabilitation et dans la reprise de sa croissance. Ici, le pourcentage de dommages membranaires décroît dans le temps, suggérant que la cellule adopte des mécanismes de réparation, conduisant à une production de protéines [166]. Ces résultats peuvent probablement être mis en relation avec les variations d'intensité des spectres infrarouge sur les bandes protéiques.

## **2.4 Biologie moléculaire : indicateur de l'expression génétique des microalgues**

L'effet des interactions avec les NP PS est également suivi au niveau génétique avec l'étude des gènes liés au stress chez *C. reinhardtii* (liste en Annexe Tableau 4-A). Les gènes liés au stress oxydatif, superoxyde dismutase (*sod*), peroxydase (*perox*) et catalase (*cat*), ont été testés en RT-PCR quantitative, mais ont présenté des efficacités trop faibles pour les échantillons étudiés. Ils n'ont donc pas été gardés dans la suite de l'analyse. Les gènes de stress globaux étudiés (*rbcL*, *caspase*, *hsp 20*) sont bien exprimés dans les échantillons en contact avec les NP PS mais ne présentent pas de sur-expression par rapport au témoin (Figure 60a). De plus, les gènes liés aux voies de biosynthèse de l'astaxanthine (BKT et CHY) ne présentent pas non plus de variation significative en présence de NP PS par rapport au témoin. Ainsi, dans cette étude, la réponse des microalgues au contact avec les NP PS ne présentent pas de variation d'expression génétique sur les gènes de stress globaux, oxydatif ou encore liés aux voies de biosynthèse de l'astaxanthine. En ce qui concerne les gènes liés aux sucres, sur les cinq gènes étudiés, seul le gène lié à la biosynthèse du rhamnose (GLD) présente une légère sur-expression en conditions NP PS (Figure 60b). De plus, le gène lié au glucose (PG) ne présente pas d'expression dans ces conditions.

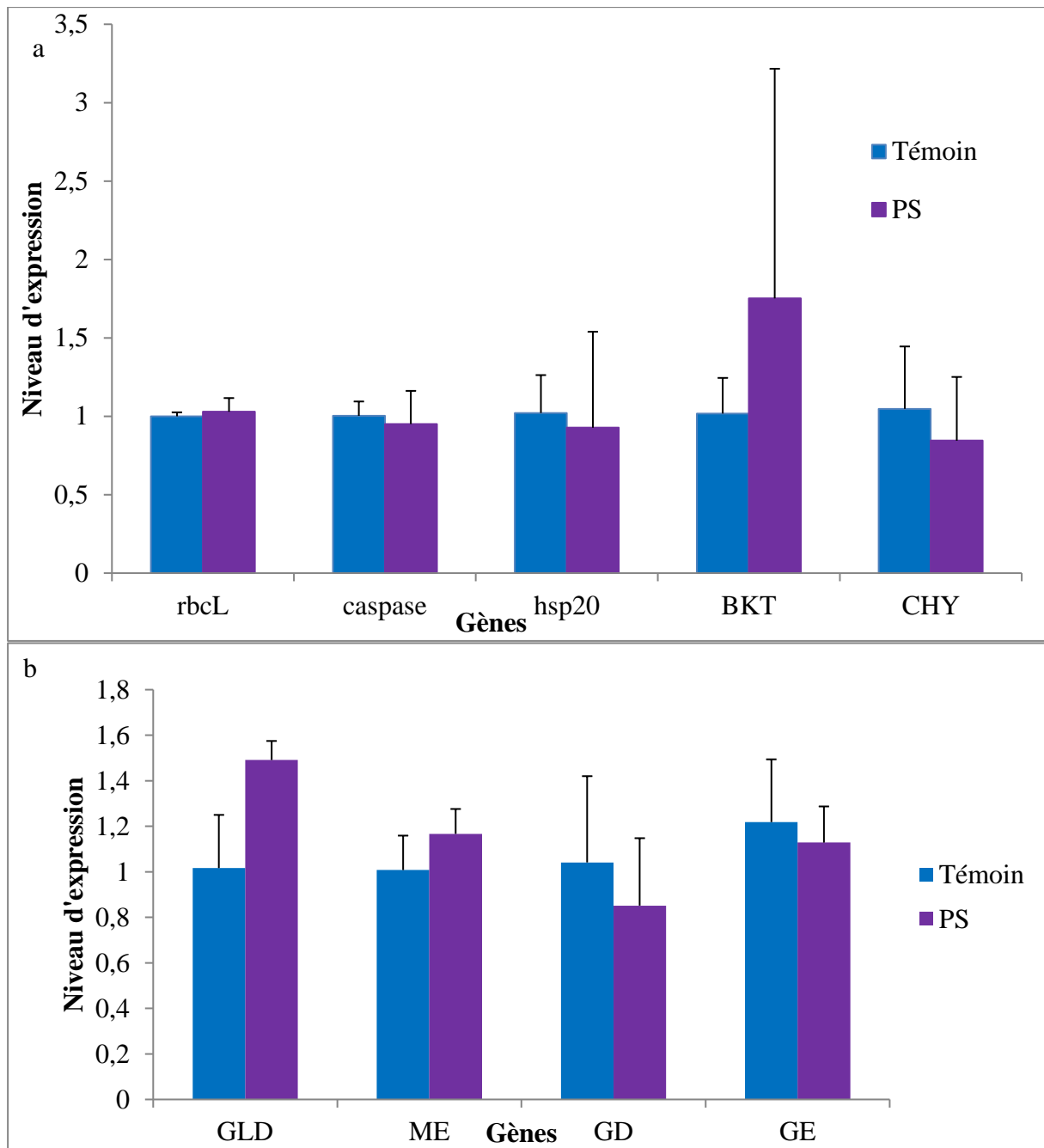


Figure 60 : Expression des gènes liés au stress et aux polysaccharides chez *C. reinhardtii* 2935 en condition témoin (bleu) et suite à l'interaction avec des nanoparticules de PS (violet). RbcL (Rubisco grande unité L), caspase (apoptose), hsp 20 (protéine de choc thermique 20), BKT ( $\beta$ -carotène kétolase), CHY ( $\beta$ -carotène hydrolase) ainsi que les gènes liés à la biosynthèse du rhamnose (GLD), du galactose (ME et GE) et du xylose (GD).



## Conclusion

Cette première étude menée après trois jours d'interaction avec des particules de PS à des concentrations importantes montre que les effets sur les microalgues sont moindres au niveau de leur croissance et de leur expression génétique concernant la réponse au stress. De plus, le test LDH indique une perte d'intégrité membranaire de *C. reinhardtii* après 72 h d'interaction avec les NP PS, confirmant le contact physique des particules avec les microalgues. Au niveau membranaire, les modifications chimiques résultantes sont probablement reliées aux variations biochimiques mises en évidence par analyse des spectres infrarouge. Nos résultats montrent pour *C. reinhardtii* que l'interaction avec les nanoplastiques conduit à une réponse modérée comparée à une carence en nutriments, des variations d'intensité lumineuse ou encore la présence d'ions cadmium. En effet, la teneur en lipides reste stable, seul le contenu en polysaccharides diminue faiblement conjointement avec une augmentation du contenu en protéines. Toutefois, la présence de NP PS peut être assimilée à un changement environnemental puisqu'elle induit des modifications *in situ* chez les microalgues.

Enfin, il est difficile d'interpréter et de comparer directement ces expériences puisqu'elles ont été réalisées à des moments différents. Pour éviter ce biais et pour essayer de mieux comprendre les paramètres influençant la réponse des microalgues aux interactions avec les nanoparticules, il est réalisé une expérience comparative avec différents types de stress et la présence de NP Or notamment.

### 3 Effet de la nature (chimique) des nanoparticules

Dans cette partie, les interactions de *C. reinhardtii* avec des nanoplastiques sont mises en parallèle avec deux conditions différentes, l'une particulière (NP Or) et l'autre, une condition de stress bien connue et caractérisée - le stress azoté (6 mM N-) [140]. Afin de déterminer les mécanismes de réponse des microalgues à la présence de nanoplastiques, l'étude par analyse infrarouge couplée à une approche moléculaire a été réalisée sur huit jours. Les résultats suivants ont fait l'objet de la soumission d'un article dans *Environmental pollution* intitulé « Interactions between polystyrene nanoparticles and *Chlamydomonas reinhardtii* monitored by infrared spectroscopy combined with molecular biology » (M. Déniel, N. Errien, F. Lagarde, M. Zanella, A. Caruso, en révision). Cette étude a pour but de suivre l'effet de la nature chimique des nanoparticules sur les interactions avec des microalgues d'eau douce *C. reinhardtii*. Ces interactions sont décrites ici par une approche combinée de la spectroscopie et de la biologie moléculaire. Les deux types de nanoparticules testées sont les NP Or [5] (2 mg/mL équivaut à  $7,1 \times 10^5$  NP/microalgues) et les NP PS (2 mg/mL, équivaut à  $13,1 \times 10^6$  NP/microalgues).

#### 3.1 Variation de la composition des microalgues suite aux interactions

Les spectres infrarouge moyens de *C. reinhardtii*, après huit jours d'interaction dans les conditions témoin, stress azoté, NP PS et NP Or sont présentés après prétraitement de ligne de base et normalisation de variation standard (LB+SNV) sur la Figure 61.

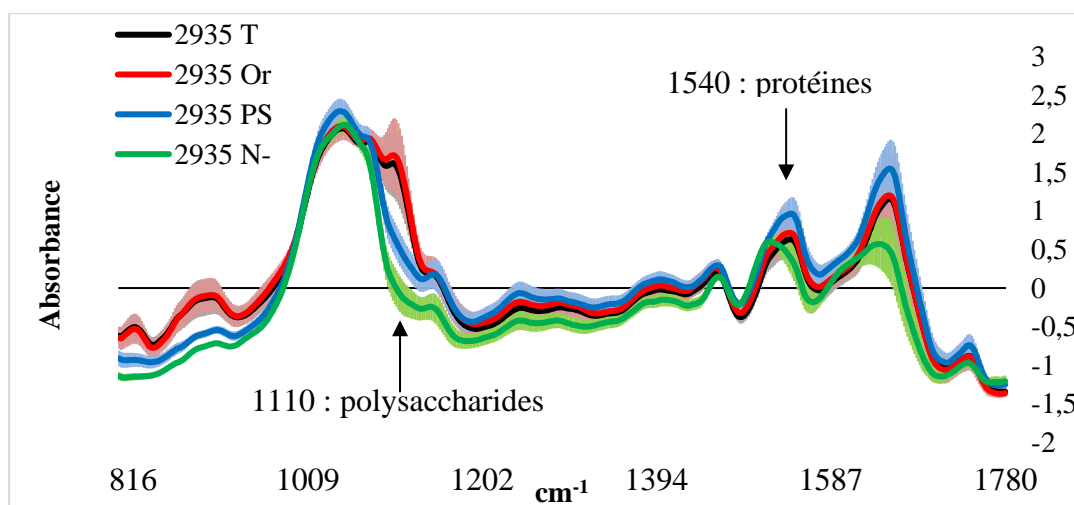


Figure 61: Spectres infrarouge LB+SNV de *C. reinhardtii* 2935 entre 1780 et 800  $\text{cm}^{-1}$  après huit jours d'expérimentation. Conditions : Stress azoté (vert), NP Or (rouge), NP PS (bleu) et Témoin (noir).

La Figure 61 montre un décalage de pics correspondant aux protéines (N-H) à  $1540\text{ cm}^{-1}$  pour la condition stress azoté (en vert), cela pour s'expliquer par un changement d'environnement des microalgues suite à la diminution en azote. Pour le pic à  $1110\text{ cm}^{-1}$  (vibration d'élongation,  $\nu\text{C-O}$ ) des polysaccharides, une variation d'absorbance a été observée entre les conditions avec une différenciation des groupes témoin et NP Or d'une part et d'autre part, les NP PS et le stress azoté. Il est suggéré que le contenu en polysaccharides est plus élevé dans les groupes témoins et NP Or que dans les deux autres. Les microalgues peuvent relarguer suite à un stress, des polysaccharides, appelés exopolysaccharides (EPS), comme mécanisme de défense [24]. Dans nos conditions d'étude, les NP PS et le groupe carence en azote peuvent être considérés comme des stress. Cependant, l'ACP (Figure 62a) réalisée à partir des spectres des quatre conditions montre que le groupe stress azoté se distingue des trois autres. Une autre ACP a été réalisée sur les trois autres conditions (Figure 62b) qui ont des spectres plus similaires pour tenter de mieux comprendre ce qui les différencie.

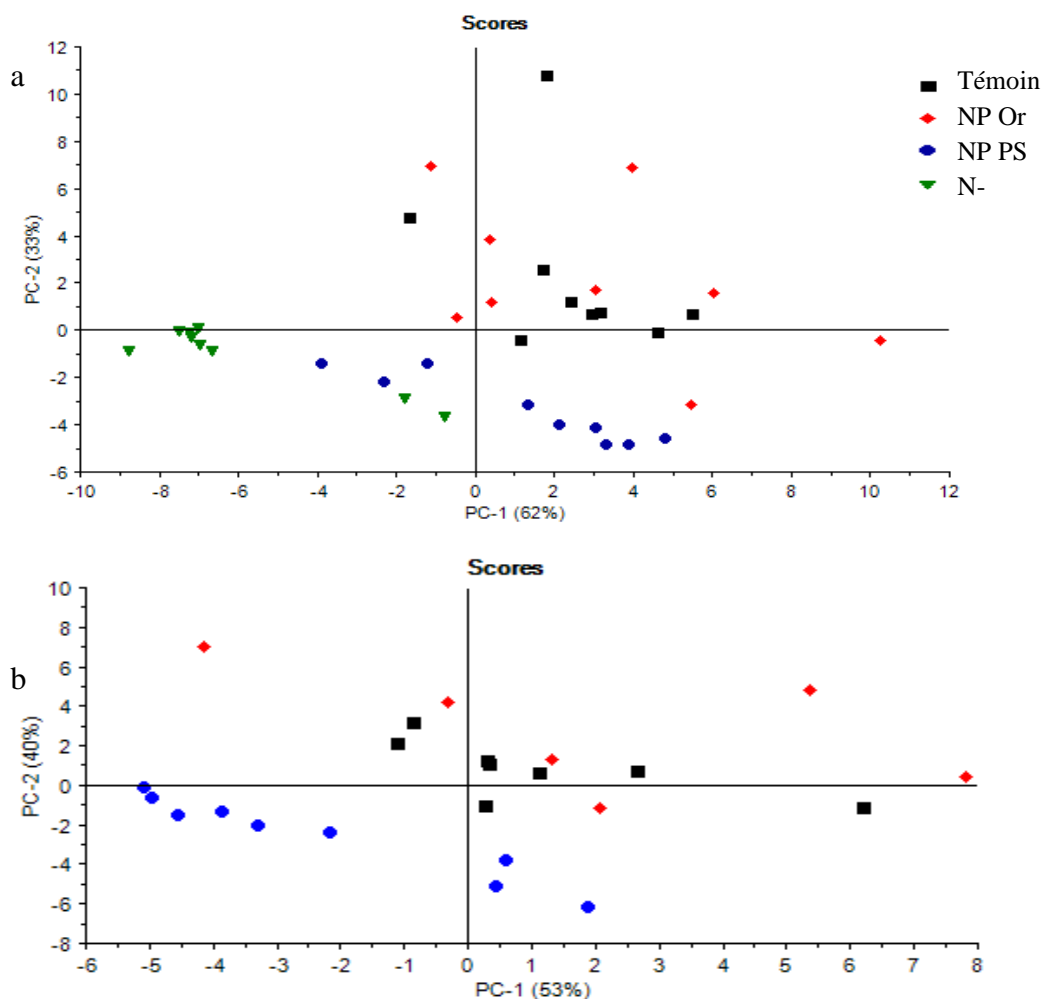


Figure 62 : (a) ACP LB+SNV 2935 après huit jours entre  $1780$  et  $800\text{ cm}^{-1}$  ; (b) ACP LB+SNV 2935 sans groupe stress azoté. Témoins (carré noir), NP Or (losange rouge) et NP PS (rond bleu), N- (triangle inversé vert).

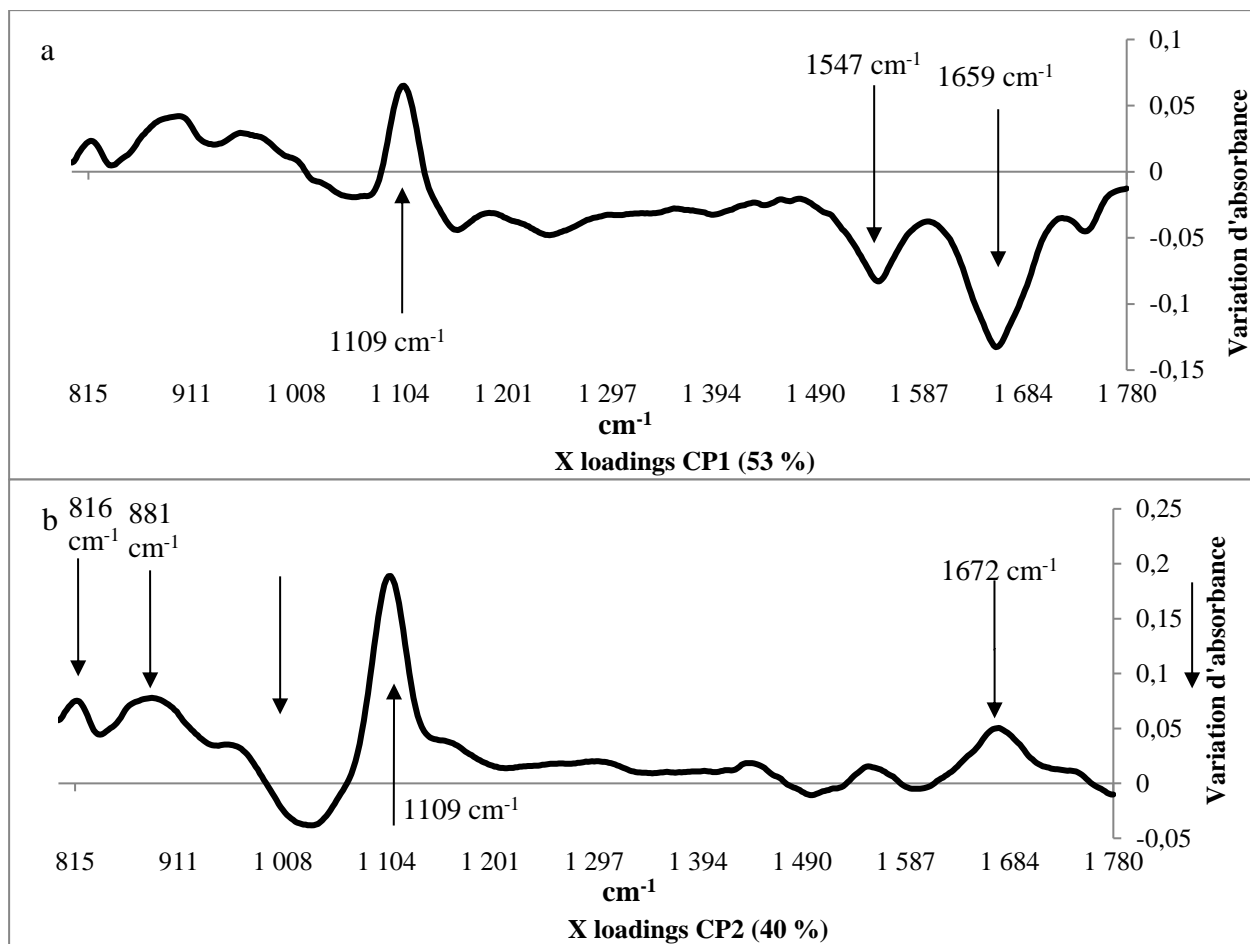


Figure 63 : Loadings ACP (a) CP1, (b) CP 2 sur les spectres LB+SNV 2935 Témoins, NP Or et NP PS après huit jours entre 1780 et 800  $\text{cm}^{-1}$ .

L'ACP sans la condition de stress azoté (Figure 62b) discrimine de manière claire les échantillons correspondant aux microalgues en contact avec les NP PS et les deux autres groupes. Les microalgues en contact avec les NP Or ont le même comportement que les échantillons témoins. La composante principale 1 (CP 1) explique 53 % de la variation spectrale et présente une variation positive à 1109  $\text{cm}^{-1}$  qui est attribuée à la liaison chimique C-O des polysaccharides [197, 288]; (Figure 63a). Une variation négative est également observée sur la CP1 pour les bandes des protéines (C=O: 1659  $\text{cm}^{-1}$  et N-H: 1547  $\text{cm}^{-1}$ ). La deuxième composante CP2 (40 %), qui discrimine surtout les NP PS des deux autres groupes, fait apparaître –Figure 63b – les bandes à 1672  $\text{cm}^{-1}$  (liaison chimique des protéines C=O), 1109  $\text{cm}^{-1}$  et 1034  $\text{cm}^{-1}$  (liaison chimique des polysaccharides  $\nu$ C-O), 881  $\text{cm}^{-1}$  (liaison chimique des polysaccharides C-H [289, 290]) et 816  $\text{cm}^{-1}$  (liaison chimique C-O-S liée au sulfate en C6 du galactose [291, 292]) comme discriminantes. La CP3 est peu informative car elle reflète seulement 3 % des variations.

Le fait que les conditions NP Or et témoin ne diffèrent pas, contrairement aux NP PS, semble confirmer la possibilité d'utiliser des NP Or comme un standard non toxique de nanoparticules [293]. La nature, la taille et la chimie de surface des particules sont trois facteurs potentiels affectant les modes d'interaction [294]. La taille des nanoparticules n'apparaît pas ici comme un facteur de toxicité puisque les NP Or ne conduisent pas à une variation significative de la composition biochimique des microalgues comparées aux témoins. Les principales variations observées dans le cas des NP PS par rapport aux NP Or prennent place au niveau des protéines et des polysaccharides et peuvent être influencées par la nature ou la chimie de surface des nanobilles. Il convient de noter que les bandes reliées aux polysaccharides ( $900-1200\text{ cm}^{-1}$ ) représentent une partie complexe du spectre des microalgues (beaucoup de pics superposés) et il est nécessaire d'en réaliser une étude détaillée afin d'en ressortir des informations sur les types de liaisons polysaccharidiques impactées.

### **3.2 Focus sur les polysaccharides pour suivre les interactions avec les NP PS**

Les polysaccharides, sont des chaînes d'unités monosaccharidiques. Les monosaccharides retrouvés chez *C. reinhardtii* peuvent être des hexoses (six carbones) tels que le glucose, le galactose et le rhamnose ou des pentoses (cinq carbones) tel que le xylose. Ces oses diffèrent principalement par leur différence de conformation. Ils vont donc avoir des signaux vibrationnels proches les uns des autres et les pics peuvent se recouper. Selon Buslov et al. (2000) [295] et Palmucci et al. (2011) [266], la méthode de déconvolution spectrale fournit une meilleure résolution des bandes d'absorption dans l'étude des polysaccharides. Ainsi par une déconvolution du massif des polysaccharides ( $1190-930\text{ cm}^{-1}$ ) des spectres infrarouge moyens de *C. reinhardtii*, la séparation des pics pourra permettre d'identifier plus précisément les liaisons polysaccharidiques impliqués dans la réponse aux interactions avec les nanoparticules. Basés sur la forme des spectres et les largeurs à mi-hauteur des pics considérées comme égales, six composants de ce massif ont été identifiés. La Figure 64 présente les spectres déconvolués et les pourcentages d'aire sous la courbe des six pics qui décrivent les liaisons des polysaccharides. Premièrement, comme avec l'ACP (Figure 62b), très peu de différences sont observées entre la distribution des bandes du témoin et de la condition NP Or (Figure 64a et b). Cela souligne une nouvelle fois l'utilisation des nanoparticules d'or comme référence inerte de nanoparticules en interaction avec les microalgues. En ce qui concerne les conditions NP PS et stress azoté, des variations relativement similaires sont observées (Figure 64c et d) avec en

particulier une diminution très importante de la bande à  $1108\text{ cm}^{-1}$ , correspondant à la vibration  $\nu(\text{C-O})$  des polysaccharides [296] pour les deux conditions. Une baisse plus légère de la contribution du pic à  $1152\text{ cm}^{-1}$  ( $\text{C-O-C}$  conformation du glucose, [297]) dans le cas de la condition du stress azoté est également observé. En conséquence de la diminution de proportion de la bande à  $1108\text{ cm}^{-1}$ , les proportions relatives des bandes à  $1018\text{ cm}^{-1}$  (correspondant à la liaison chimique  $\nu(\text{C-O})$ , [276]), à  $1049\text{ cm}^{-1}$  ( $\text{C-OH}$ , [298]) et à  $1078\text{ cm}^{-1}$ , qui selon Chen et al. (2017) [175], est lié à la  $\nu_{\text{symétrique}}(\text{PO}_2)$  chez *C. reinhardtii* et par Wiercigroch et al. [296] est référencée comme étant une vibration C-O. Ce phénomène est accentué pour la carence en azote, montrant que ce stress semble plus important (Figure 64 c et d). La proportion du pic à  $980\text{ cm}^{-1}$  ( $\beta(\text{CCH})$ ,  $\beta(\text{CCO})$ , lié au fructose [296]) reste relativement stable comparé aux groupes témoins, signifiant que le contenu en fructose ne varie pas dans le cas d'un stress nutritif ou d'une interaction avec des nanoparticules.

Des variations des bandes correspondant principalement aux polysaccharides sont observées ici, mais peu sont clairement assignées à un polysaccharide spécifique présent chez *C. reinhardtii*. D'autre part, Lagarde et al. (2016) [42], ont montré une sur-expression de deux gènes liés à la voie de biosynthèse du galactose et du xylose en présence de particules de microplastiques (polypropylène et polyéthylène haute densité). Ainsi dans le but d'identifier les polysaccharides présentant des variations de teneur, un suivi de l'expression des gènes des voies de biosynthèse des polysaccharides a été réalisé.

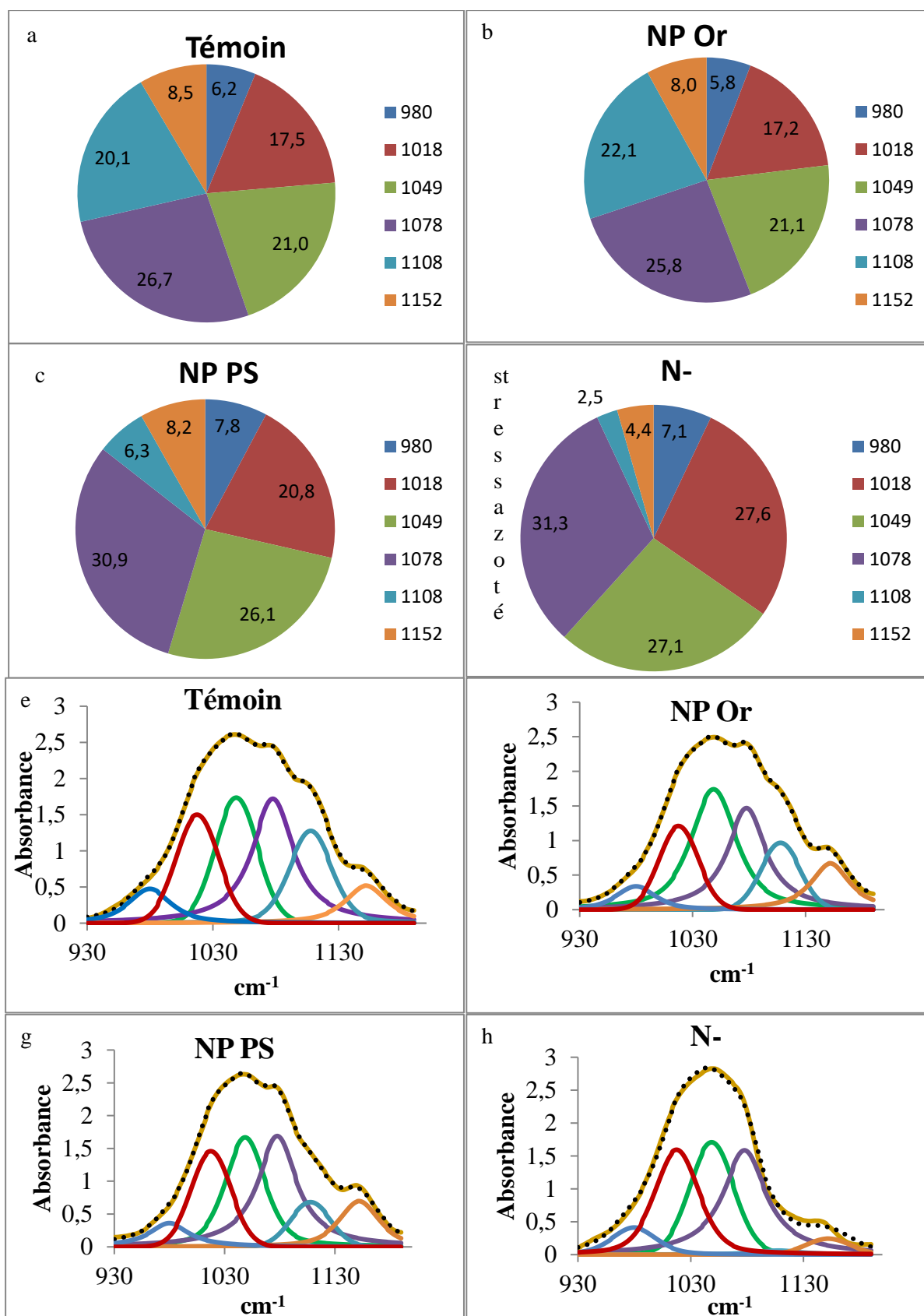


Figure 64: (a-d) Pourcentage d'aire des bandes des polysaccharides de chaque condition après huit jours d'interaction (moyenne des spectres infrarouge LB+SNV de *C. reinhardtii* 2935) ; (e-h) Spectres déconvolués correspondant. Spectres observés (marron) et calculés (pointillés noir) ; Pics : 980 (bleu foncé), 1018 (rouge), 1049 (vert), 1078 (violet), 1108 (bleu turquoise), 1152 (orange) cm<sup>-1</sup>.

### 3.3 Pigments et polysaccharides : une expression différentielle

Dans cette partie, l'étude des gènes liés à la production des polysaccharides et aux caroténoïdes comme potentiels marqueurs de stress, est réalisée après huit jours d'interactions avec les microalgues afin de relier de potentielles différences d'expression avec les modifications observées en infrarouge.

#### 3.3.1 Réponse des gènes liés aux polysaccharides

Le niveau d'expression des gènes des voies de biosynthèse de quatre sucres (glucose, xylose, rhamnose et galactose) a été évalué par RT-PCR en temps réel. La Figure 65 présente l'expression relative des gènes pour les différentes conditions étudiées. En premier lieu, la condition stress azoté est à nouveau différenciée des autres conditions par une sous-expression de la majorité des gènes étudiés (PG, GE, GLD et BKT), montrant ici qu'un changement environnemental peut induire une variation au niveau des polysaccharides. Ceci est supporté par l'étude de Mishra et Jha (2009) [89] sur une microalgue verte, *Dunaliella salina*, proche de notre modèle qui a montré que des exopolysaccharides (EPS), composés de monosaccharides: glucose, galactose, fructose ainsi que xylose, étaient produits dans le cas d'un stress salin [89], indiquant que ceux-ci pouvait être un marqueur de la réponse au stress des microalgues. De plus, le gène lié à la synthèse du glucose (PG) est discriminant pour distinguer la différence de réponse selon la nature des nanoparticules (Or et PS). Pour le groupe soumis aux NP Or, une sur-expression de ce gène est observée alors qu'avec le groupe en présence de NP PS il est sous-exprimé (expression du gène 10 fois inférieure au témoin). Concernant le gène GD lié à la synthèse du xylose, la condition stress azoté décrit une sous-expression de 2,5 fois. Les conditions NP PS et stress azoté montrent une sous-expression comparée à la condition témoin pour les gènes des voies de biosynthèse du rhamnose et du glucose. De même, une sous-expression des deux gènes impliqués dans la voie de biosynthèse du galactose pour les conditions NP PS et stress azoté est observée ainsi que pour le gène GE lié également à la voie de biosynthèse du galactose pour la condition NP Or. En revanche, concernant le glucose, le gène lié à son expression est sur-exprimé pour le groupe NP Or. Il est aussi possible de différencier les deux types de nanoparticules par leur expression différentielle pour le gène du mannose épimérase (ME) : les microalgues en contact avec les nanoparticules d'or ne montrent pas de modification de leur expression tandis que les microalgues en contact avec les NP PS présentent une sous-expression du gène, inférieure de huit fois l'expression du témoin.



### 3.3.2 Réponse des gènes liés à la biosynthèse des caroténoïdes

L'expression de deux gènes codant les enzymes des voies de biosynthèse de l'astaxanthine sont suivies : le gène de la  $\beta$ -carotène kétolase (BKT), connu pour catalyser le nombre limitant d'étape de la synthèse d'astaxanthine et le gène de la  $\beta$ -carotène hydrolase (CHY), codant l'enzyme impliquée dans la conversion du  $\beta$ -carotène en astaxanthine. Ces deux gènes sont utilisés pour suivre la réponse aux stress [124]. Une sous-expression des gènes BKT et CHY est observée chez *C. reinhardtii* après interaction avec les NP PS ainsi que suite à un stress azoté (Figure 65). Une étude sur *Haematococcus pluvialis* a aussi montré une sous-expression de ces deux gènes suite à un stress lumineux [127]. Ce résultat suggère que la présence de NP PS peut être un facteur de stress pour *C. reinhardtii*. Cependant, dans notre précédente étude après trois jours d'interaction (§2.4), les NP PS n'induisaient pas de modification de l'expression de ces gènes.

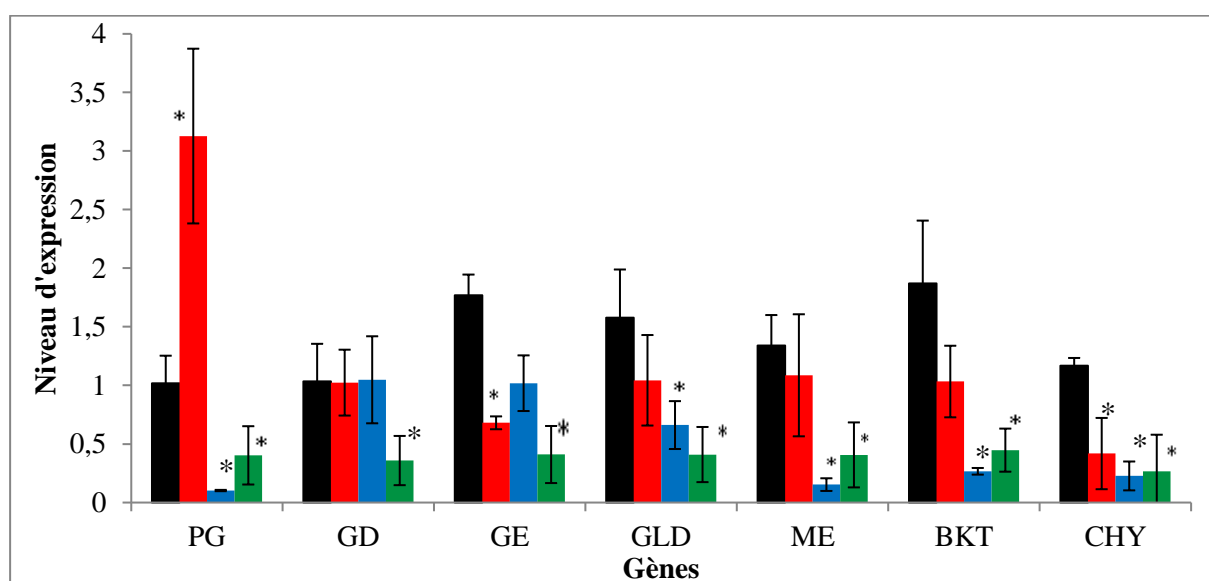


Figure 65 : Niveaux d'expression des gènes de *C. reinhardtii* (2935) après huit jours (témoin : noir) d'interaction avec des nanoparticules d'or (rouge), nanoparticules de polystyrène (bleu) ou sous un stress azoté (vert). Gènes des enzymes PG, phosphoglucomutase (glucose), GD, UDP-glucuronate décarboxylase (xylose), GE, UDP glucose 4 épimérase (galactose), GLD, UDP glucose 4-6 déhydratase (rhamnose) et ME, GDP mannose 3-5 épimérase (galactose), voie de biosynthèse de l'astaxanthine (caroténoïdes) BKT ( $\beta$ -carotène kétolase) et CHY ( $\beta$ -carotène hydrolase). \* test anova  $p < 0,05$ .

A partir de la combinaison des données infrarouges (Figure 64) avec les résultats de l'expression des gènes (Figure 65), quelques conclusions peuvent être avancées. Premièrement, concernant l'expression des gènes (Figure 65), il est possible de souligner qu'il n'y a pas de variation d'expression du gène lié au xylose, qui est un pentose [296], observée en présence de nanoparticules. Au contraire, le glucose et galactose qui sont des hexoses, présentent des variations d'expression des gènes en présence de nanoparticules (GE et PG). Ceci concorde avec l'étude de Wiercigroch et al. (2017) [296] montrant une différence des spectres infrarouge entre hexose et pentose. Deuxièmement, pour les conditions NP PS et stress azoté, il peut être noté que certains gènes sont sous-exprimés (GLD, ME, PG) en parallèle avec le déclin de l'aire de pic à  $1110\text{ cm}^{-1}$  et pour la condition stress azoté un déclin du pic à  $1152\text{ cm}^{-1}$  est lié au glucose. En outre, en se référant aux spectres infrarouge moyens (Figure 61), la diminution de l'intensité de la bande à  $1110\text{ cm}^{-1}$  est liée avec la baisse d'intensité à  $881$  et  $816\text{ cm}^{-1}$ . Le nombre d'ondes à  $816\text{ cm}^{-1}$  est référencé comme correspondant à la liaison chimique C-O-S du sulfate sur le C6 galactose [291, 292]. En parallèle, une sous-expression du gène du mannose épimérase (ME) est relevée. Ces résultats soulignent la corrélation entre la composition moléculaire obtenue par infrarouge et l'expression génétique des polysaccharides chez *C. reinhardtii* (Tableau 7).

**Tableau 7 : Synthèse des résultats des spectres infrarouge et d'expression des gènes de *C. reinhardtii* 2935 après huit jours d'interactions avec des NP Or et PS (polystyrène) et sous condition de carence en azote (N-). GD (xylose), GLD (rhamnose), PG (glucose), ME et GE (galactose).**

Expression génétique	ACP des spectres infrarouge	Polysaccharides : variations des % d'aire
GD : ↓ N- Galactose : ↓ PS, N- (GE, ME), Or (GE) GLD : ↓ N- et PS PG : ↑ Or, ↓ PS et N- Caroténoïdes : ↓ PS, N-	Différenciation T/PS et Or/PS selon la CP2 : pics à $1672$ (protéines), $1109$ , $1034$ , $881$ et $816\text{ cm}^{-1}$ (polysaccharides)	$1108\text{ cm}^{-1}$ : Divisé par 2 PS et N- comparé à T et Or $1018\text{ cm}^{-1}$ : ↑ N- surtout et un peu PS $1049$ , $1078\text{ cm}^{-1}$ : ↑ PS et N- $1152\text{ cm}^{-1}$ : divisé par deux pour N-

### 3.4 Visualisation des particules après interaction avec les microalgues

Pour comprendre le processus d'interaction des nanoparticules avec les microalgues, la visualisation de celles-ci s'est réalisée de deux manières différentes au vu de leur nature. Le microscope à balayage électronique (MEB) et la microscopie champ sombre ont été utilisés pour le suivi des NP Or et le microscope confocal pour celui des NP PS.

### 3.4.1 Microscopies champ sombre et électronique à balayage : outils pour visualiser les nanoparticules d'or

La microscopie champ sombre a été utilisée après évaporation de l'eau, pour visualiser les NP Or puisqu'elles ont une activité catalytique qui permet de les détecter [299]. La Figure 66c montre bien la présence d'agglomérats de NP Or au contact des microalgues, par la présence de points lumineux. L'expérience réalisée ne permet pas de savoir si les nanoparticules sont adsorbées sur les microalgues, hypothèse suggérée par Renault et al. (2008) [5] qui mettent en évidence l'adsorption de NP Or de 10 nm sur la paroi de *Scenedesmus subspicatus* visualisée par MET.

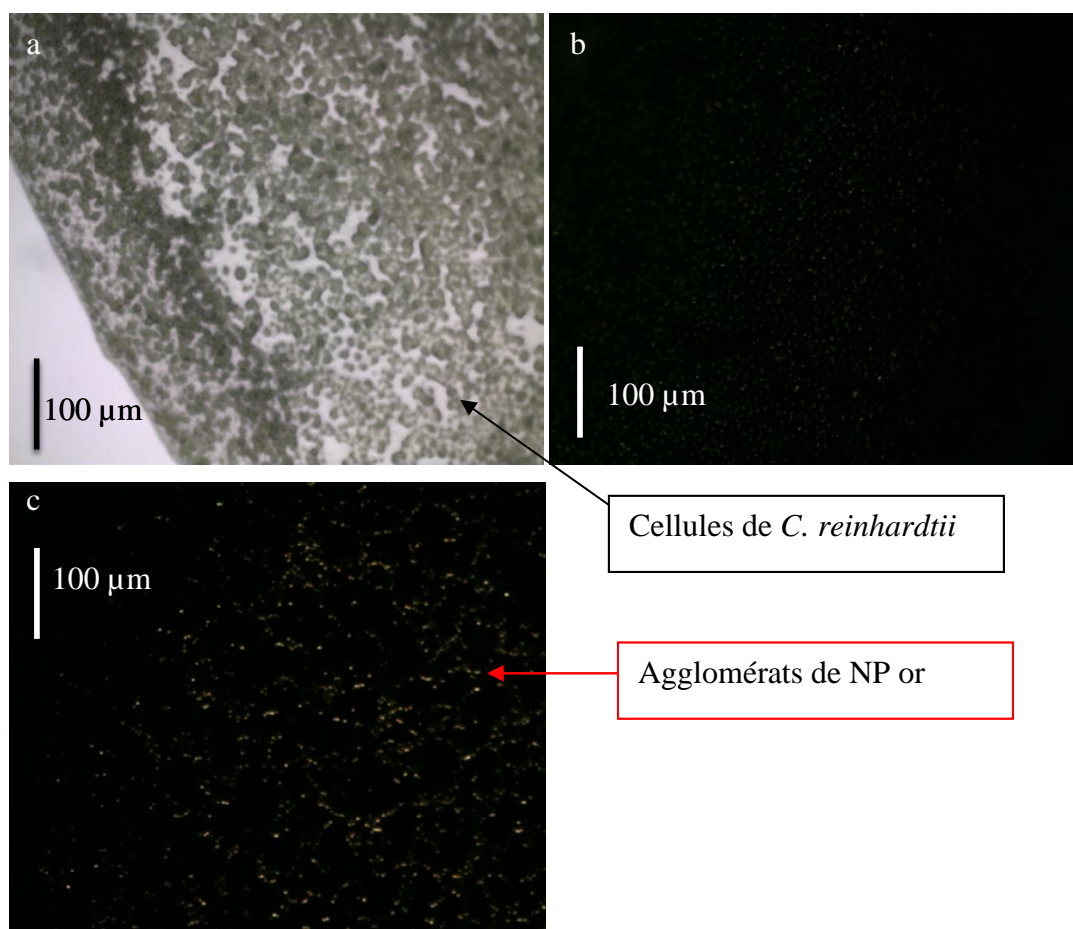


Figure 66 : (a) Microalgues en champ clair, (b) microalgues seules en champ sombre (c) microalgues après interaction avec des nanoparticules d'or en champ sombre.

Afin de mieux visualiser les interactions NP Or-microalgues, une étude en MEB a été réalisée après 72 h d'interaction. La Figure 67 présente les microalgues témoins (a), les microalgues en présence de nanoparticules d'or dans le milieu de culture TAP (b et c). Les microalgues en présence de nanoparticules présentent sur la Figure 67b des structures englobant les microalgues ce qui fait penser à la présence d'EPS dans l'échantillon. Cependant ce résultat n'est pas retrouvé dans tous les échantillons analysés (Figure 67c). L'analyse EDX de l'échantillon permet de détecter la nature chimique des éléments présents. Ici il est recherché la présence des NP Or, qui semblent être réparties aléatoirement dans l'échantillon (Figure 67d). Cependant, l'or émet des photons X qui ont des raies d'énergie très proches du phosphate, qui est naturellement présent chez les microalgues, ainsi, il n'est pas possible de distinguer les NP Or avec assurance dans les échantillons.

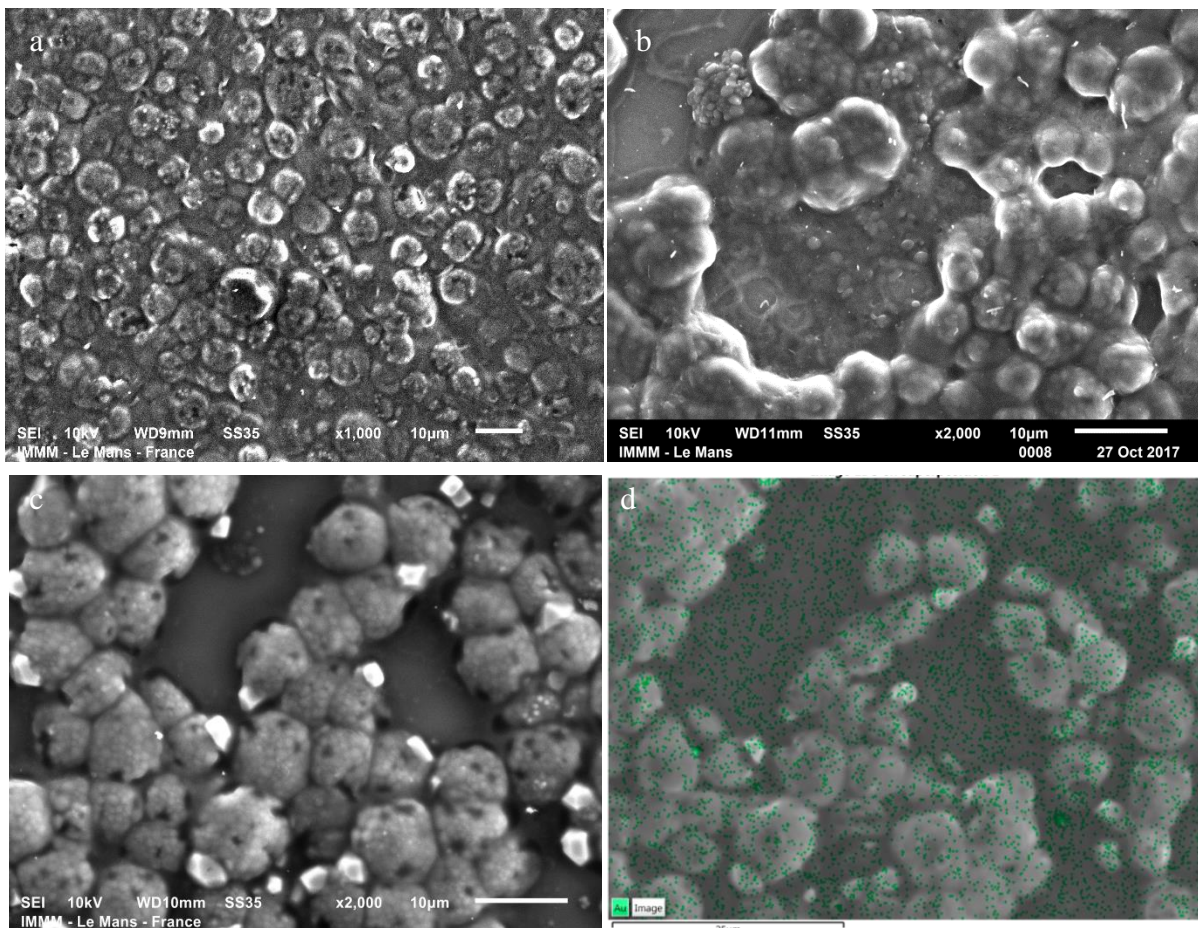


Figure 67 : Image de microscopie électronique à balayage de *C. reinhardtii* 2935 (a) témoin (b) et (c) en présence de nanoparticules d'or (d) Analyse EDX.

### 3.4.2 Visualisation des nanopolystyrènes par microscopie confocale

Les NP PS sont marquées au rouge de Nil pour qu'elles puissent être détectées par microscopie confocale. Quant aux microalgues, elles sont autofluorescentes grâce à leurs pigments chlorophylliens [300]. La souche 2935 de *C. reinhardtii* est mise en contact avec les NP PS pendant 2 h dans du milieu de culture TAP. Après excitation par deux lasers (émission : 488 et 561 nm), la lumière émise du milieu liquide est collectée, permettant d'obtenir l'image ci-dessous (Figure 68) et de distinguer les nanoparticules (en doré) des microalgues (en bleu). La microscopie confocale permet ici de confirmer l'interaction entre NP PS et microalgues. Les NP PS semblent s'adsorber sur la surface de *C. reinhardtii* et ne pas être internalisées ce qui est cohérent en raison de leur taille supérieure au diamètre des pores de la paroi de *C. reinhardtii*. Ce résultat est concordant avec l'étude de Li et al. (2015) [300] qui a montré des NP PS (50 nm) associés à des EPS en surface d'*Euglena gracilis*. Les NP PS semblent également former des agglomérats.

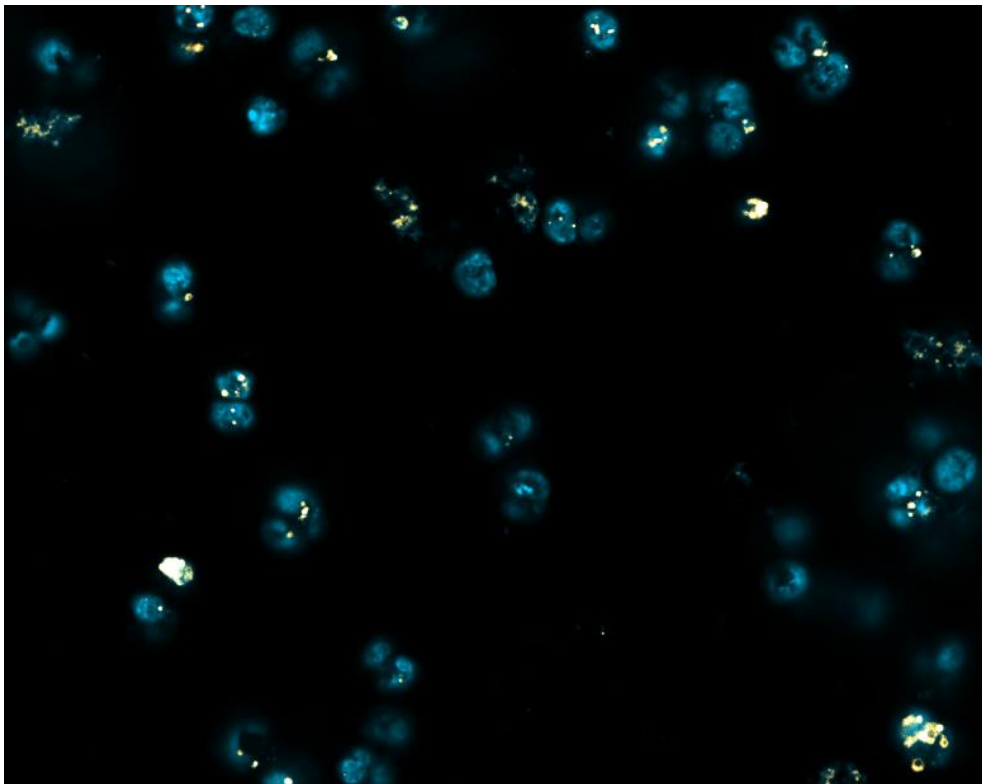


Figure 68 : Visualisation des microalgues de *C. reinhardtii* (2935)- nanoparticules de polystyrène avec un microscope confocal après 2 h d'exposition (bleu : structure des microalgues et jaune : NP PS).

Ainsi, bien que les mesures de taille ne relèvent pas d'agglomération des nanoparticules dans le milieu de culture, il semble que la présence des microalgues influence leur devenir et conduit à la création d'agglomérats (force de van der Waals) ou d'agrégation (forces covalentes) de nanoparticules. Ce phénomène a pu être montré pour des NP Or citrate plus petite (37 nm) en présence de *S. obliquus* [63]. L'adsorption semble ici être le mécanisme d'interaction des NP PS avec les microalgues. La charge négative des nanoparticules peut également jouer un rôle dans les effets sur les microalgues [51, 64, 68].

## Conclusion

L'interaction des nanoparticules avec les microalgues *C. reinhardtii* est bien vérifiée par microscopie pour les deux types de NP avec une possible adsorption des particules à la surface des microalgues. Cette interaction entraîne un impact au niveau de l'intégrité de la membrane plasmique en présence de NP PS alors que lors de l'interaction de *C. reinhardtii* avec des NP Or les pourcentages d'augmentation de la LDH sont très faibles 0,5 % à 1 h et 2,3 % à 72 h.

Les tendances sont similaires entre les résultats obtenus en infrarouge et en expression génétique. De plus, dans les deux cas, une similarité de réponse entre le témoin et les NP Or et entre le stress azoté et les NP PS est mise en évidence. Ce constat suggère que ce qui est visualisé en infrarouge correspond bien à des mécanismes de défenses mis en place par la microalgue en réponse à des stress. L'ensemble des résultats obtenus (infrarouge et expression génétique) laisse donc penser qu'il y a une réponse graduelle et que la présence de NP PS pourrait représenter un stress supérieur à celles de nature Or puisque les NP PS ont une réponse plus proche de la condition de carence en azote qui est un stress bien connu.

Néanmoins, il est difficile de savoir ce qui cause cette différence de réponse. Est-ce la différence de nature chimique, le surfactant ou bien la densité des nanoparticules qui influence cette réponse ? De plus, ces différences de réponses sont-elles liées à la nature/structure de la microalgue étudiée ? Dans la partie suivante, l'effet du type de microalgues sur les mécanismes d'interactions microalgues/ nanoparticules sera étudié ?

## 4 Effet du type de paroi des microalgues sur les interactions avec des nanoparticules

La structure des microalgues peut intervenir dans les effets des interactions. Par exemple, une variation de la complexité cellulaire a été indiquée comme étant dépendante du type de paroi suite à l'interaction de nanoparticules de  $\text{CeO}_2$  avec *C. reinhardtii* (paroi glycoprotéique), *P. tricornutum* (paroi constituée de protéines et polysaccharides et protégée par un frustule fin) et *Nannochloris atomus* (paroi cellulosique) [74]. De plus, la paroi est considérée comme le premier site d'interactions des NP avec les microalgues faisant aussi office de barrière physique à leur entrée [301]. Des études d'interactions entre microalgues et nanoparticules métalliques ont montré un taux d'absorption plus grand des ions relargués ( $\text{Ce}^{3+}$  et  $\text{Ag}^+$ ) dans les souches mutantes sans paroi [177, 302]. Toutefois, il a aussi été observé une internalisation moindre des nanoparticules indépendamment du type de paroi [172, 177, 302]. Dans cette partie, le type de paroi des microalgues *C. reinhardtii* sera étudié afin de comprendre si ce facteur influence la réponse des microalgues suite à des interactions avec des nanoparticules. Deux souches sont étudiées : la 2935, souche avec paroi et la CC400, souche mutante décrite comme ayant peu de paroi. Dans les mêmes conditions que précédemment, il a été étudié l'état physiologique des *C. reinhardtii* mutante, souche CC400, suite à huit jours avec les différents types de stress.

### 4.1 D'une souche à l'autre, une cohérence spectrale

Concernant la composition biochimique des deux souches de microalgues suite aux stress étudiés, la Figure 69 présente la comparaison des spectres infrarouge des microalgues après prétraitement LB+SNV.

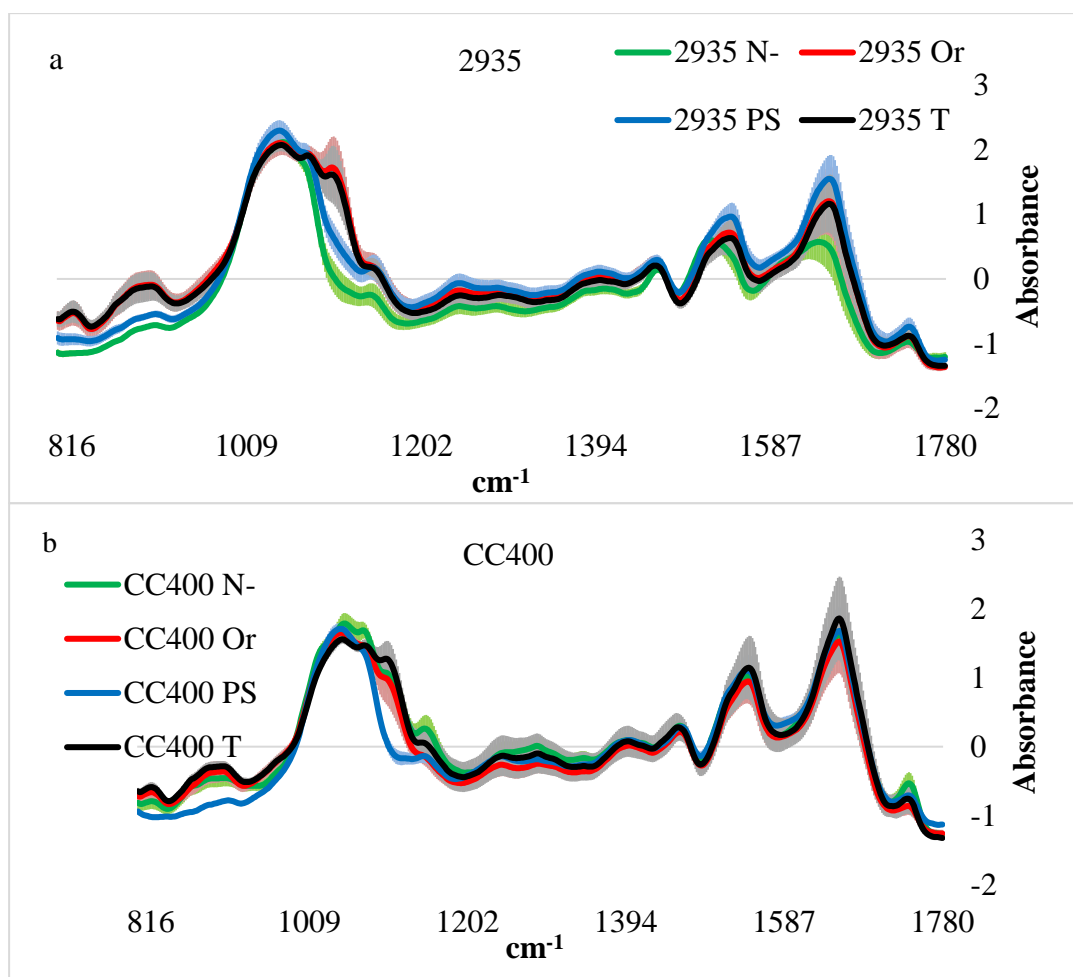


Figure 69 : Spectres infrarouge moyens après LB+SNV (1780-800  $\text{cm}^{-1}$ ) après huit jours d'interactions des deux souches *C. reinhardtii* 2935 (a) et CC400 (b) avec des NP Or (rouge), des NP PS (bleu) et en condition stress azoté (vert) et témoin (noir).

L'ACP des deux souches, toutes conditions confondues, montre que seules les conditions stress azoté 2935 et en présence de NP PS pour la souche CC400 présentent une réponse différenciée par rapport à l'ensemble des spectres (Figure 70). Les groupes CC400 NP PS et 2935 N- sont différents des autres groupes par leurs variations notamment au niveau des lipides ( $1740 \text{ cm}^{-1}$ ) et des protéines ( $1665$  et  $1545 \text{ cm}^{-1}$ ) sur la composante 1 qui représente 55 % de la variation spectrale (Figure 71b). Le groupe CC400 PS est quant à lui marqué par des variations du pic à  $1080 \text{ cm}^{-1}$  ( $\nu(\text{PO}_2)$  ou  $\nu(\text{C-O})$  des polysaccharides) en CP2 (31 % de la variance). Les autres groupes n'étant pas facilement discriminés, une analyse souche par souche a été réalisée.



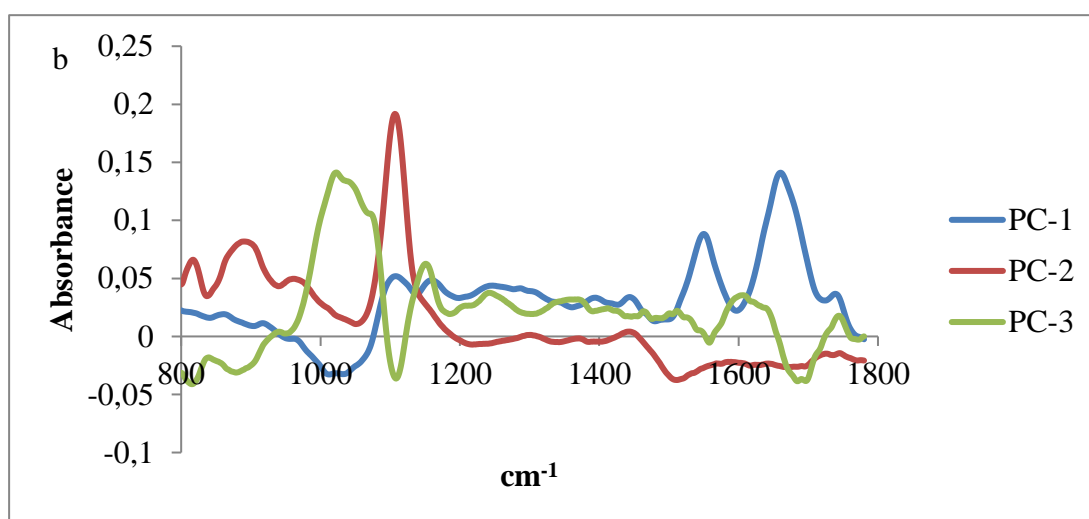
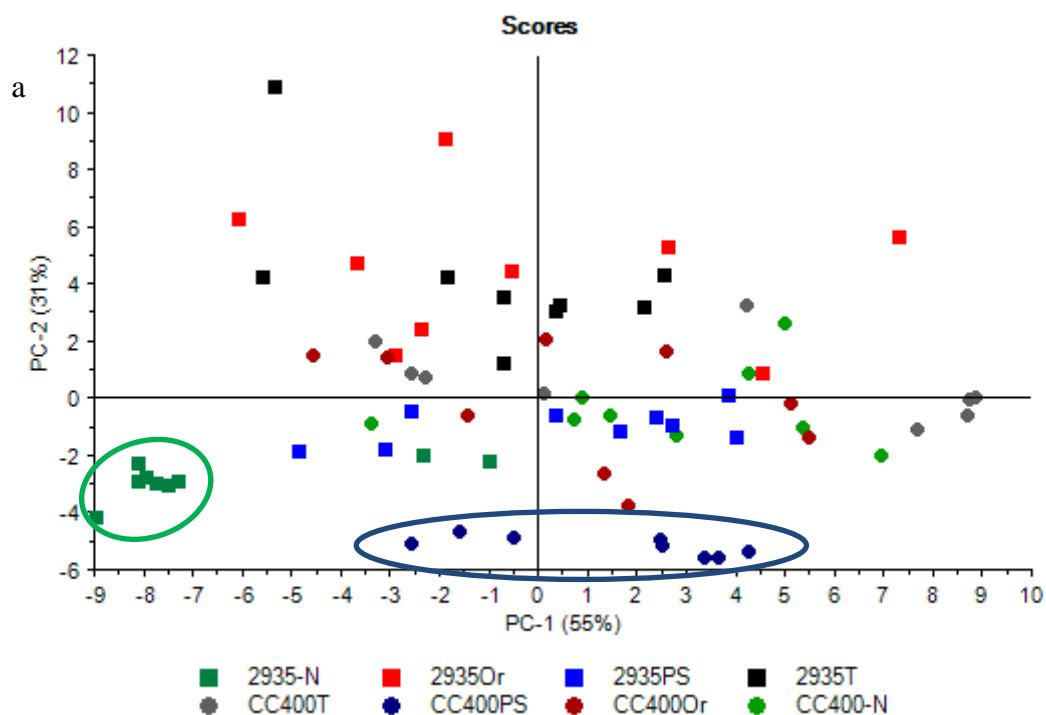


Figure 70 : (a) ACP spectres infrarouge moyens après LB+SNV (1780-800  $\text{cm}^{-1}$ ) après huit jours d'interactions des deux souches *C. reinhardtii* 2935 (carré) et CC400 (rond) avec des NP Or (rouge), des NP PS (bleu) et en condition stress azote (vert) et témoin (noir). (b) X loadings PC1 (bleu), PC2 (rouge), PC3 (vert).

Dans le cas de la souche 2935, les principaux résultats observés entre les différentes conditions ont déjà été présentés précédemment (cf §3.1). Une étude plus détaillée de la souche CC400 est donc présentée ici. Concernant la souche CC400, l'analyse multivariée discrimine de nouveau et de façon claire les spectres de microalgues ayant été en contact avec les NP PS des autres conditions par la composante 2 (29 % de la variance des spectres, Figure 71) alors qu'avec la souche 2935, le stress azoté était le seul à induire une réponse des microalgues bien séparée des autres conditions (Figure 62a).

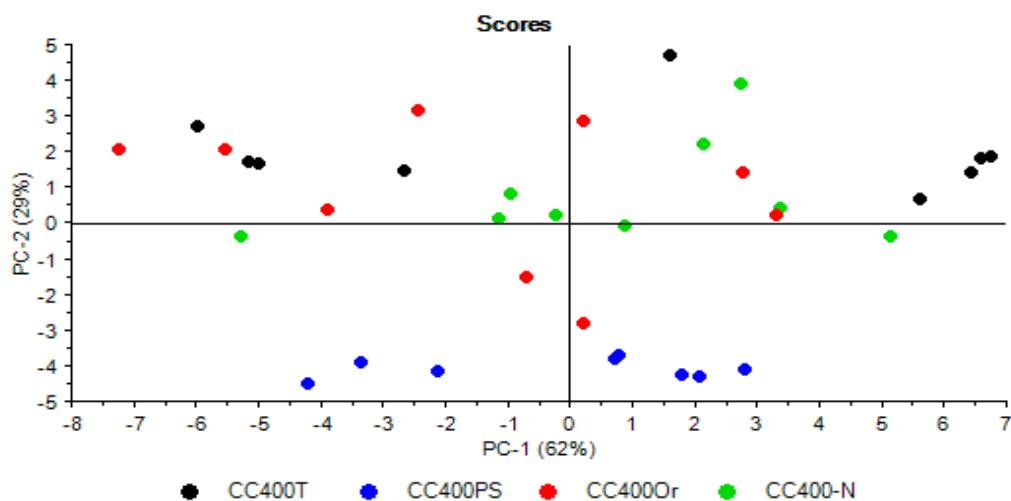


Figure 71 : ACP spectres infrarouge moyens après LB+SNV (1780-800  $\text{cm}^{-1}$ ) après huit jours d'interactions avec *C. reinhardtii* CC400 (rond) avec des NP Or (rouge), des NP PS (bleu) et en condition stress azoté (vert) et témoin (noir).

En s'intéressant uniquement à la réponse en présence des nanoparticules de la souche CC400, la Figure 72 présente une composition macromoléculaire différenciée en présence de NP PS par rapport au témoin et aux nanoparticules d'or sur la CP2 (33 %) qui est influencée par les pics à 1109, 889 et 816  $\text{cm}^{-1}$  (Figure 72b) reliés aux polysaccharides. Pour rappel, l'ACP avec les données de la souche 2935 permettait également de différencier les conditions témoin et NP Or de la condition NP PS selon la CP2 (40 %) (Figure 62b). Cependant, les variations observées étaient influencées par les pics à 1672 (protéines), 1109, 1034 (polysaccharides), 881 et 816  $\text{cm}^{-1}$ . Ainsi l'étude des variations des bandes spectrales des polysaccharides semble de nouveau importante pour étudier plus finement les différenciations entre les deux souches.

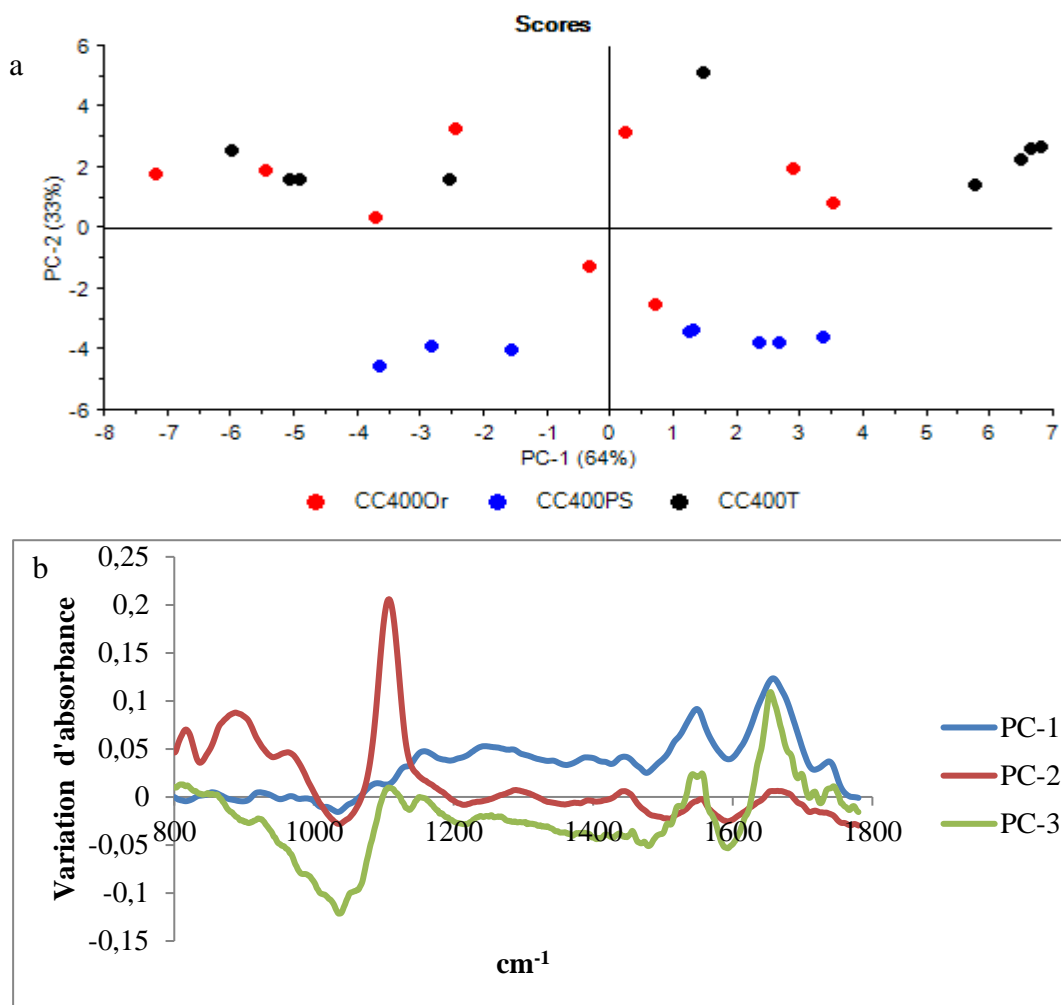


Figure 72 : (a) ACP spectres infrarouge moyens après LB+SNV (1780-800  $\text{cm}^{-1}$ ) après huit jours d'interactions des deux souches *C. reinhardtii* CC400 (carré) avec des NP Or (rouge), des NP PS (bleu) et en condition témoin (noir) (b) X loadings ACP : PC1 (bleu), PC2 (rouge) et PC3 (vert).

## 4.2 Focus sur les polysaccharides

Une déconvolution spectrale de la zone 930-1200  $\text{cm}^{-1}$  des spectres infrarouge a été réalisée pour mieux visualiser les variations des bandes des polysaccharides. Comme pour la souche 2935 (cf §3.2), les conditions témoin et NP Or de la souche CC400 présentent des proportions similaires des différents pics des polysaccharides (Figure 73 a et b). De même, la condition CC400 NP PS présente un pourcentage d'aire faible pour le pic à 1108  $\text{cm}^{-1}$ , au contraire de la condition N- qui pour la souche CC400 reste relativement stable (Figure 73 c et d). Cette diminution est compensée par l'augmentation des pics à 1078, 1049 et 1018  $\text{cm}^{-1}$ . Pour la condition N-, une diminution de la bande à 980  $\text{cm}^{-1}$  au profit de la bande à 1152  $\text{cm}^{-1}$  est observée (Figure 73d). Ainsi au niveau des polysaccharides, le stress azoté influence différemment la réponse des deux souches.

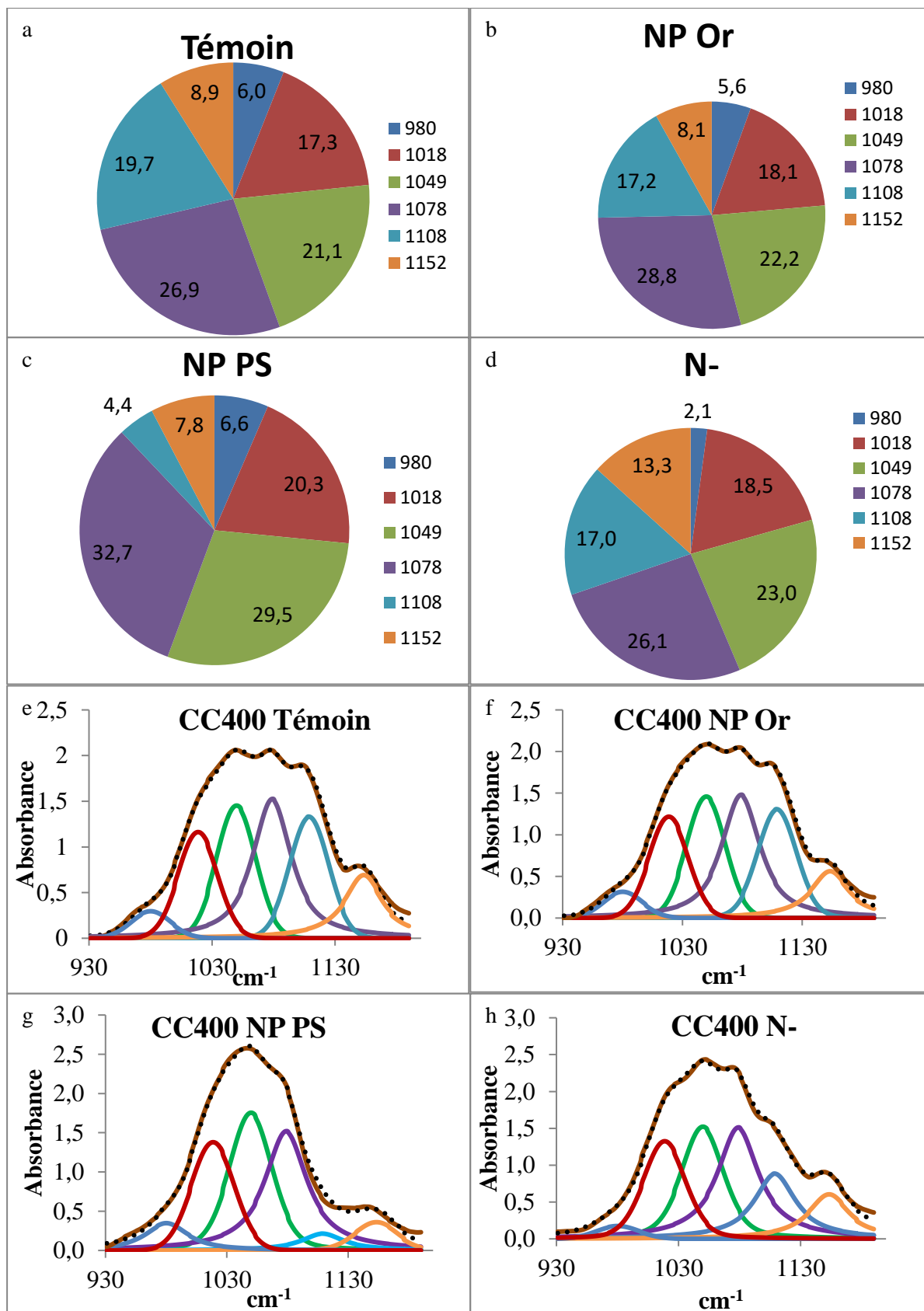


Figure 73 : (a-d) Pourcentage d'aire des bandes des polysaccharides de chaque condition après huit jours d'interaction (moyenne des spectres infrarouge LB+SNV de *C. reinhardtii* CC400) ; (e-h) Spectres déconvolués correspondant. Spectres observés (marron) et calculés (pointillés noir) ; Pics : 980 (bleu foncé), 1018 (rouge), 1049 (vert), 1078 (violet), 1108 (bleu turquoise), 1152 (orange) cm<sup>-1</sup>.

### 4.3 Réponse des gènes : deux tendances

Suite aux précédentes expériences, il a été choisi de focaliser le suivi de l'expression des gènes à ceux liés aux polysaccharides et à la voie de biosynthèse de l'astaxanthine. La Figure 74 présente une comparaison des résultats obtenus pour les deux souches de *C. reinhardtii*. Pour la souche CC400, les gènes liés aux xylose (GD), rhamnose (GLD) et galactose (GE, ME) sont sur-exprimés dans toutes les conditions (Figure 74b). De même, le gène BKT de la voie de biosynthèse de l'astaxanthine est sur-exprimé surtout dans les conditions avec des nanoparticules, au contraire du glucose et du gène CHY qui ne présentent pas de variations de leur expression. Ainsi la voie BKT semble être privilégiée pour la biosynthèse de l'astaxanthine. En résumant, l'analyse des réponses de la souche 2935 (§3.3.1), il a été observé une variation importante en fonction des conditions du gène lié au glucose qui pour les CC400 n'est pas retrouvée. Les gènes liés aux xylose, rhamnose et galactose ne sont pas sur-exprimés par la souche 2935 pour les conditions testées mais plutôt sous-exprimés quand les variations sont significatives (Figure 74a). Ainsi les deux souches ont des expressions différentes de gènes suite à l'interaction avec des nanoparticules laissant supposer un rôle de la paroi dans l'activation de la réponse au stress.

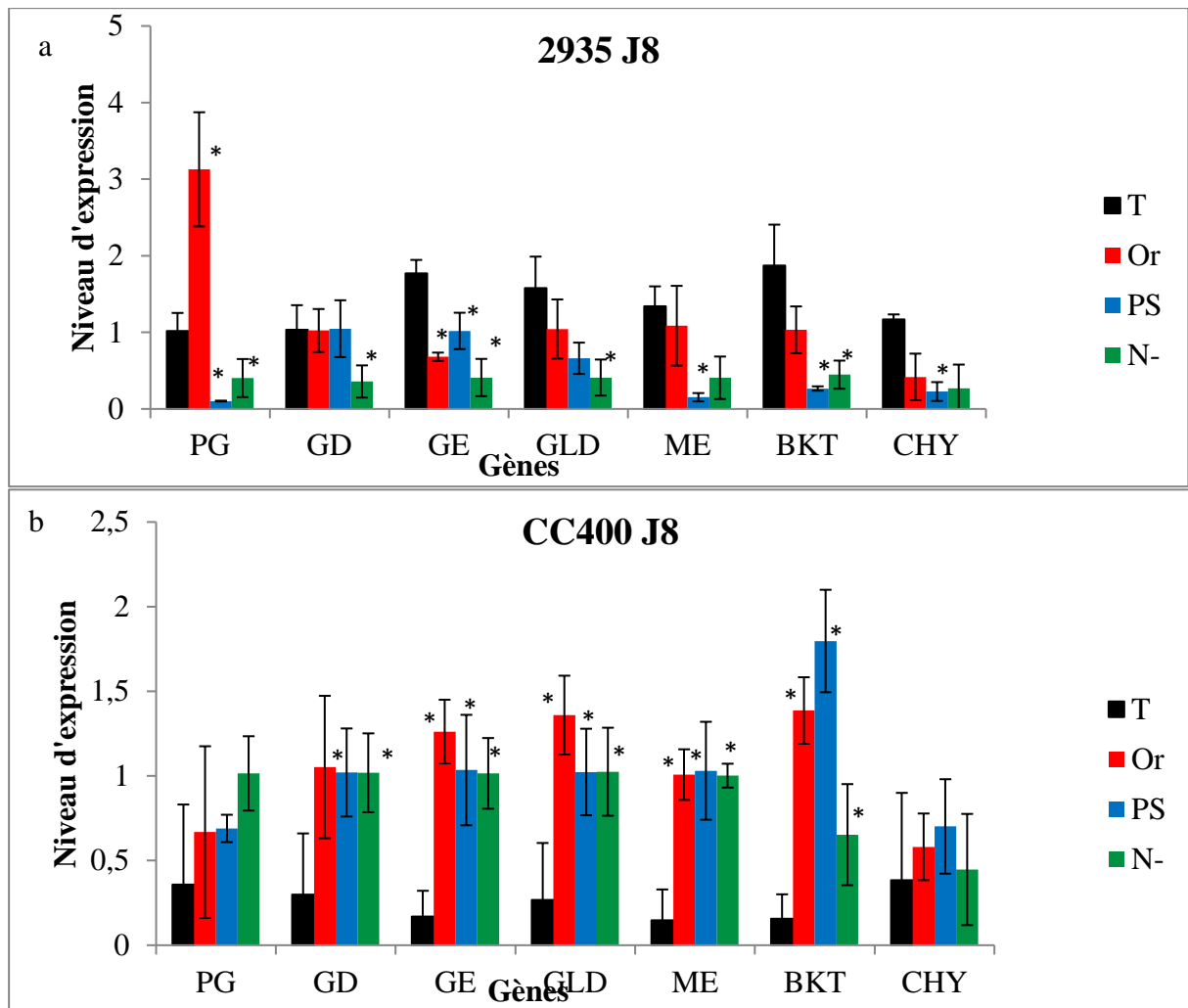


Figure 74 : Niveaux d'expression des gènes des polysaccharides (PG (glucose), GD (xylose), GE (galactose), GLD (rhamnose), ME (galactose)) et des gènes liés à la voie de biosynthèse de l'astaxanthine (BKT( $\beta$ -carotène kétolase) et CHY( $\beta$ -carotène hydrolase)) de *C. reinhardtii* après huit jours d'interaction en conditions témoin (noir), nanoparticules de polystyrène (PS, bleu), nanoparticules d'or (Or, rouge) et stress azoté (N-, vert). \* test anova  $p < 0,05$ .

## Conclusion

En conclusion, après huit jours d'interaction, la comparaison des spectres infrarouge 2935/CC400, nous permet de différencier dans les deux cas, la condition NP PS des conditions témoins et de stress azoté par des variations d'absorbance au niveau des bandes des protéines et des polysaccharides. La déconvolution du massif des bandes des polysaccharides montre une réponse similaire pour les conditions témoin et NP Or des deux souches. Dans le même sens, la condition NP PS est bien différenciée des autres suivant la même tendance pour les deux types de microalgues. Au contraire, le stress azoté affecte différenciellement la composition en polysaccharides en fonction du type de souche. Cette variation de teneur en polysaccharides est en cohérence avec l'étude de Cakmak et al. [303] qui montrent une différence de rapport des bandes infrarouges en fonction du type de souche de *C. reinhardtii* étudiée sous un stress azoté de sept jours. Contrairement à l'analyse infrarouge, une différence d'expression globale des sucres est établie entre 2935 et CC400, l'expression est respectivement sous-exprimée et sur-exprimée indiquant un métabolisme différent des deux souches. Des variations de composition biochimique entre souche sauvage et mutante ont été observées chez *Nannochloropsis sp.* en ce qui concerne les lipides [304]. Concernant les variations des polysaccharides, un lien entre les spectres infrarouge et l'expression génétique peut être établi pour la souche CC400 avec notamment le gène du galactose dans la condition NP PS qui est sur-exprimé (Figure 74b) et qui présente des variations spectrales positives en  $816\text{ cm}^{-1}$  (Figure 72b). D'autre part, l'expression des gènes indique que le gène lié à l'enzyme BKT semble être un marqueur de stress intéressant dans le cas d'interactions nanoparticules/microalgues puisqu'il présente des variations d'expression pour les deux souches en cas de stress. Ainsi l'expression des deux souches est différentielle mais pas leur composition biochimique qui semble relativement similaire en présence des deux types de nanoparticules. Ceci explique que la distinction des deux souches (Figure 70) ne soit pas évidente par infrarouge, hypothèse supportée par Driver et al.[226], dont l'étude présente les limites de la discrimination spectrale des espèces suite à des conditions stressantes. Ainsi, suite à l'interaction avec des nanoparticules, la paroi semble influencer l'activation de la réponse de *C. reinhardtii* au stress (réponse moléculaire différenciée entre les deux souches). Cette réponse implique principalement les protéines et les polysaccharides.

## 5 Evolution de la réponse dans le temps de *C. reinhardtii* en présence de nanoparticules

Enfin, la réponse des microalgues en fonction du temps d'interaction avec les nanoparticules a été étudiée pour vérifier si cette réponse augmente avec le temps d'exposition ou si au contraire, une diminution de la réponse (adaptation de la microalgue) était possible. Dans cette partie, une exploration des réponses des microalgues sur douze jours est réalisée dans le but de comprendre si au cours du temps, il y a une évolution temporelle des effets observés. Dans un premier temps, les courbes de croissance sont présentées. Ensuite, une analyse combinée infrarouge et biologie moléculaire sur les deux souches est présentée en trois points (quatre, huit et onze jours).

### 5.1 CC400 et 2935, allures de croissance différenciées

L'évolution de la croissance au cours du temps a été mesurée par comptage cellulaire et les résultats obtenus sont présentés sur les Figure 75 et Figure 76. En ce qui concerne la souche 2935, les microalgues augmentent en nombre sur toute la durée de l'expérience passant de  $1 \times 10^6$  cellules/mL pour le jour 1 à plus de  $4 \times 10^6$  cellules/mL à 12 jours. Les microalgues en présence des nanoparticules et sous stress azoté présentent une croissance significativement plus faible que le témoin les quatre premiers jours. Les microalgues de la condition stress azoté se différencie des microalgues dans les autres conditions à partir du 5<sup>ème</sup> jour et présente un taux plus faible de croissance. Ce même stress engendre une plus forte concentration en microalgues par rapport aux autres conditions pour ce qui est de la souche CC400, tout au long de l'expérience. Dans les autres conditions, les microalgues CC400 présentent une augmentation de leur croissance jusqu'au 3<sup>ème</sup> jour puis la concentration en microalgues reste relativement stable jusqu'à la fin de l'expérience (autour de  $1 \times 10^7$  cellules/mL).



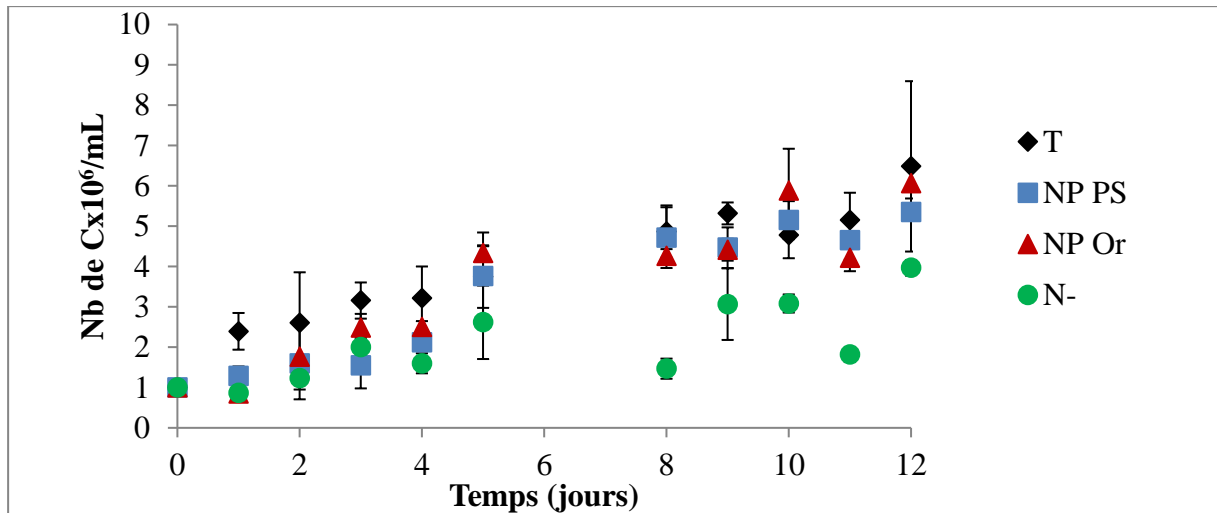


Figure 75 : Courbe de croissance de *C. reinhardtii* souche 2935 expérience sur douze jours. Conditions : témoin (losange noir), nanoparticules de polystyrène (PS, carré bleu), nanoparticules d'or (Or, triangle rouge) et stress azoté (N-, rond vert). Test de Kruskal-Wallis,  $p < 0,05$ .

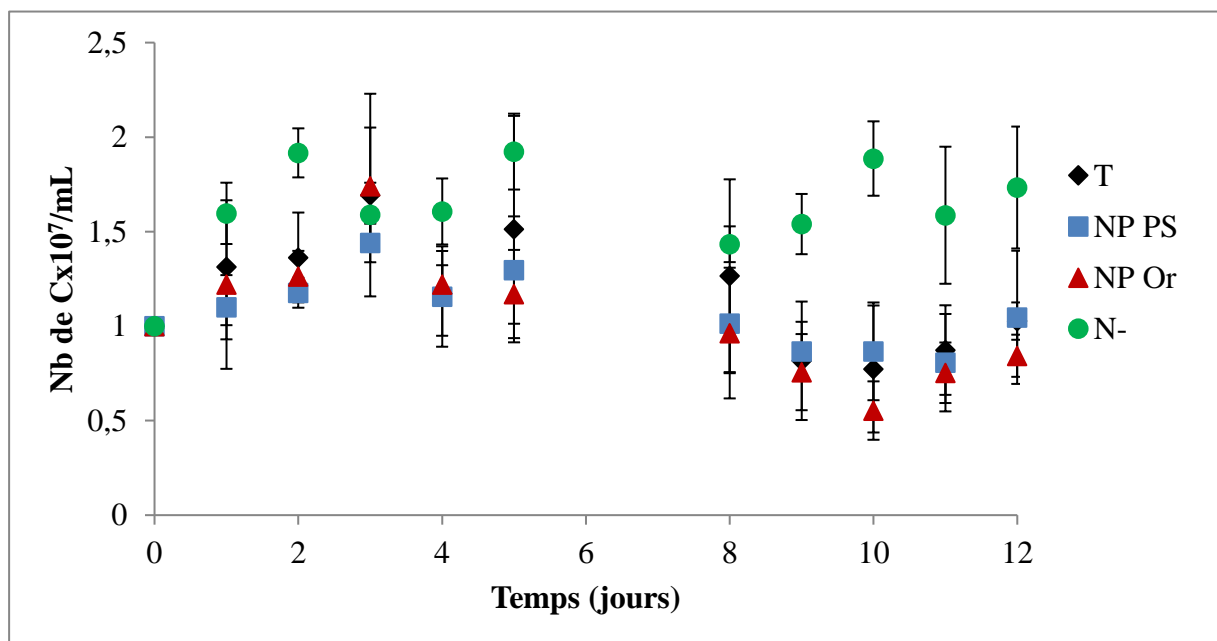


Figure 76 : Courbe de croissance de *C. reinhardtii* souche CC400 expérience sur douze jours. Conditions : témoin (losange noir), nanoparticules de polystyrène (PS, carré bleu), nanoparticules d'or (Or, triangle rouge) et stress azoté (N-, rond vert). Test Anova  $p < 0,05$ .

## 5.2 Analyse combinée de la réponse des microalgues en trois points

Une analyse comparative de la réponse biochimique et aussi moléculaire des microalgues après quatre, huit et onze jours a été réalisée pour suivre l'évolution temporelle suite aux différents stress. Les spectres infrarouge moyens des microalgues, toutes conditions confondues et aux trois temps d'interaction ainsi que les ACP correspondantes sont présentés en Annexe 4.2 et 4.3. Dans les parties 3 et 4 de ce chapitre, il a été montré qu'une partie importante des variations se déroulait au niveau des polysaccharides. Nous nous intéresserons donc spécifiquement à ces macromolécules. Après déconvolution spectrale de la région 930-1200  $\text{cm}^{-1}$ , les évolutions temporelles observées concernant les pourcentages d'aire des bandes des polysaccharides sont présentées en Figure 77 et Figure 78. Pour les conditions 2935 témoins et NP PS, aucune évolution significative dans le temps n'est observée et les aires des pics polysaccharides suivent une répartition de forme gaussienne. Globalement, il n'y a pas de différences de composition importantes dans le temps pour aucune des deux souches. Simplement pour la souche 2935, deux valeurs ressortent : pour la condition NP Or 2935, une augmentation de la bande à 1108  $\text{cm}^{-1}$  à huit jours et pour la condition 2935 N-, l'aire du pic à 980  $\text{cm}^{-1}$  diminue à onze jours. Pour la souche CC400, le témoin présente une diminution significative du pourcentage d'aire du pic 1078  $\text{cm}^{-1}$  à onze jours. Les spectres de microalgues en condition NP PS voient leur pic à 1108  $\text{cm}^{-1}$  décroître en pourcentage au cours du temps. Le stress azoté entraîne l'augmentation des pourcentages d'aire des pics à 1018 et 1049  $\text{cm}^{-1}$  à onze jours et la diminution à huit jours du pic 1078  $\text{cm}^{-1}$  et à onze jours du pic à 1108  $\text{cm}^{-1}$ . Ainsi concernant les bandes des polysaccharides, il est remarqué peu d'évolution temporelle au cours de l'étude excepté pour le stress azoté dans le cas de la souche CC400.

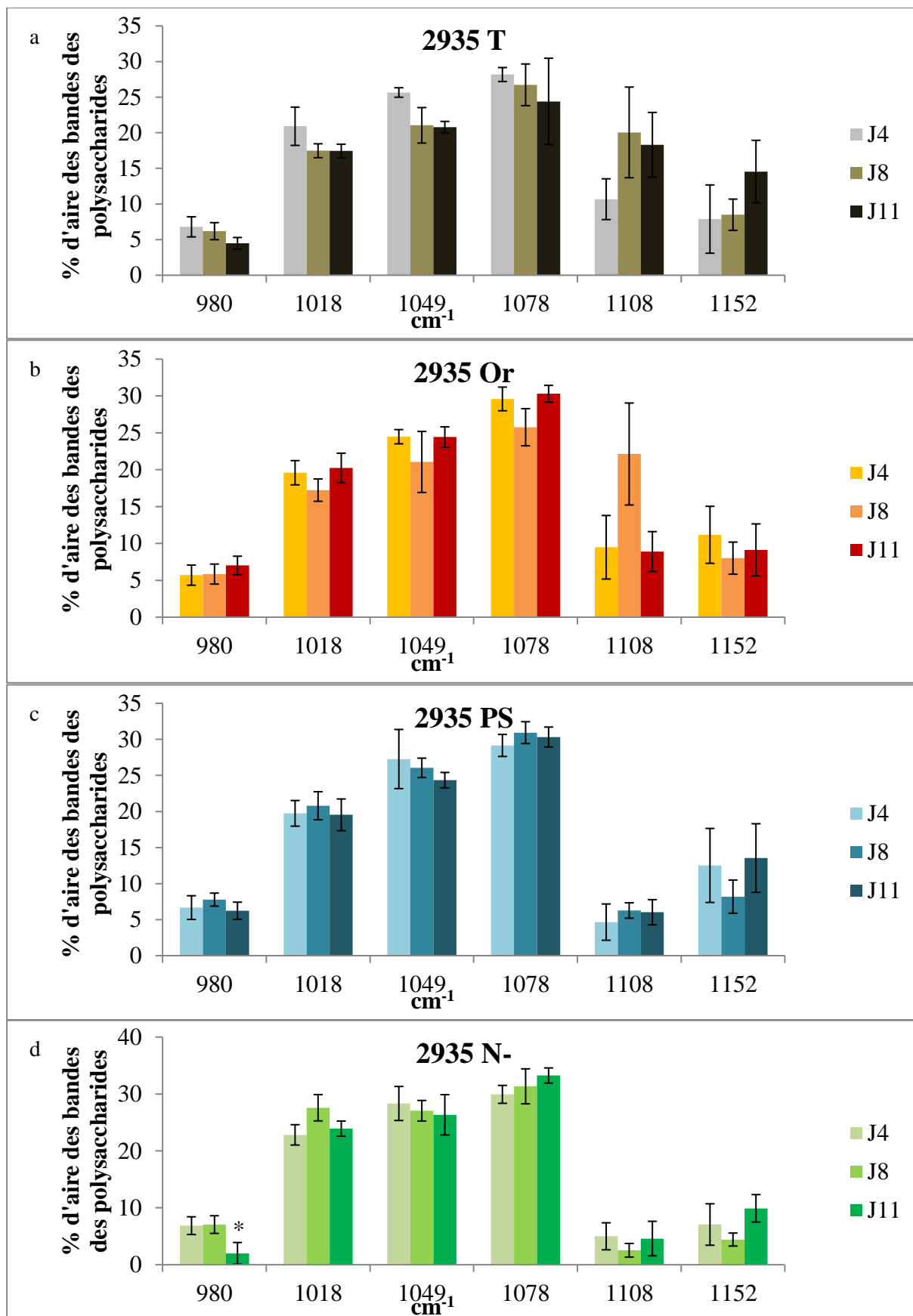


Figure 77 : Evolution temporelle du pourcentage d'aire des bandes des polysaccharides de la souche 2935 de *C. reinhardtii* à quatre, huit et onze jours. Conditions (a) Témoins (noir), (b) NP Or (rouge), (c) NP PS (bleu) et (d) N- (vert). \* Test Wilcoxon, p<0,05.

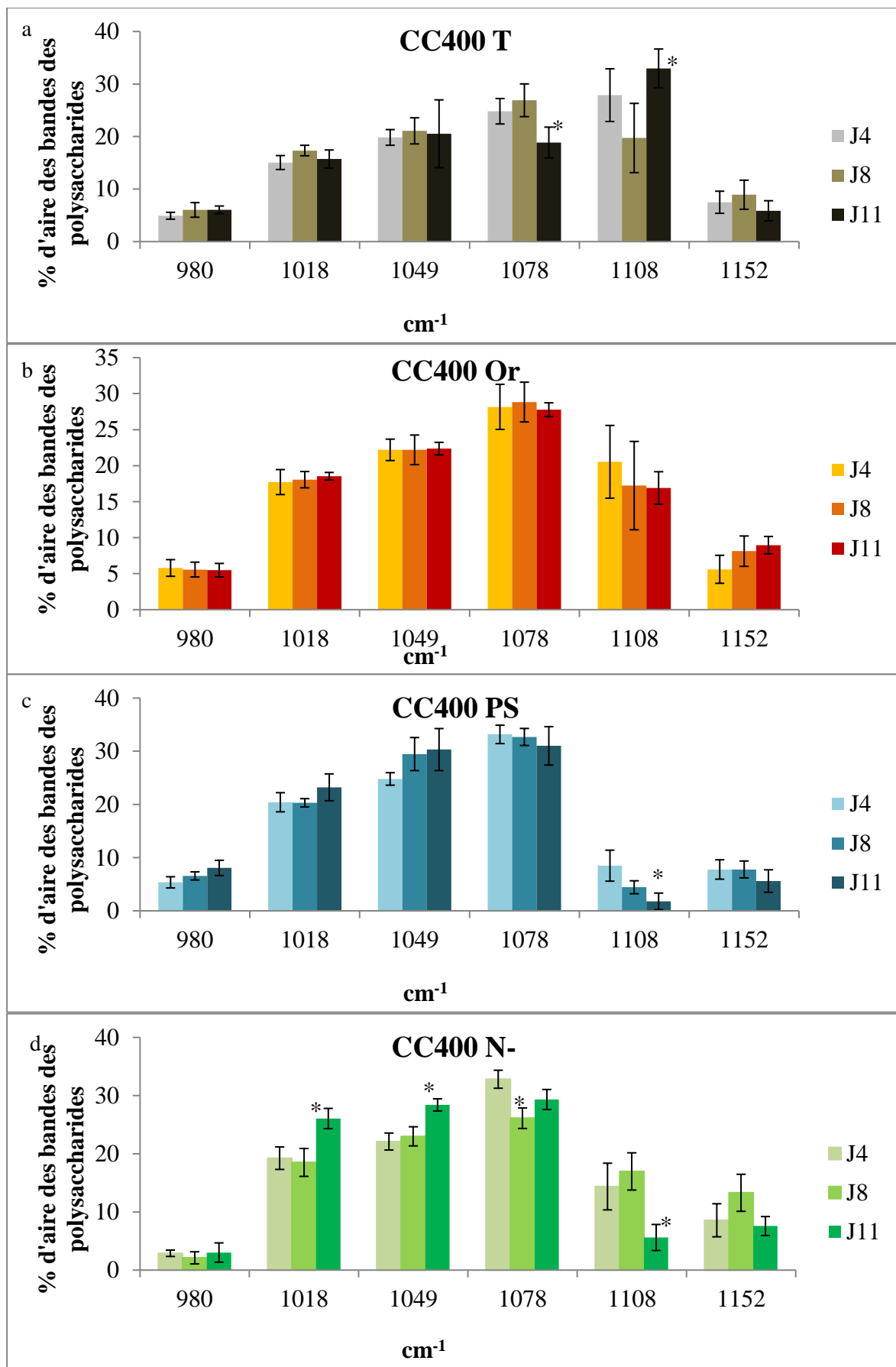


Figure 78 : Evolution temporelle du pourcentage d'aire des bandes des polysaccharides de la souche CC400 de *C. reinhardtii* à quatre, huit et onze jours. Conditions (a) Témoins (noir), (b) NP Or (rouge), (c) NP PS (bleu) et (d) N- (vert). \* Test Wilcoxon  $p < 0,05$ .

Concernant les niveaux d'expression, les Figure 79 et Figure 80 présentent leur évolution au cours de l'expérience par condition. Certains gènes de *C. reinhardtii* n'ont pas présenté d'expression après quatre jours d'interactions. La souche 2935 pour la condition témoin et NP Or présente une diminution de l'enzyme liée au glucose entre le huitième et onzième jour. Pour les témoins, des variations du niveau d'expression des gènes liés au galactose à huit jours (GE) et à onze jours (ME) sont observées. En présence de NP Or, seule l'enzyme liée au glucose présente une diminution observée à onze jours. Pour les NP PS, l'augmentation du niveau d'expression de PG (glucose) et BKT (caroténoïdes) a lieu après onze jours d'interactions tandis que l'enzyme ME voit son niveau d'expression diminuer à huit jours. Le stress azoté présente à onze jours une augmentation des niveaux d'expression de CHY. La souche CC400 présente peu de variations du niveau d'expression au niveau des témoins à part pour l'enzyme GE qui a un niveau d'expression plus faible à huit et onze jours qu'à quatre jours. Concernant les CC400 NP PS, les variations ont lieu à onze jours avec une augmentation des niveaux d'expression pour l'enzyme PG et une diminution pour l'enzyme BKT. Quant au stress azoté pour cette même souche, il implique une baisse de l'expression de l'enzyme GLD à huit jours. La  $\beta$ -carotène hydrolase voit son expression augmentée après onze jours de stress azoté.

En résumé, la plupart des effets au niveau de la réponse moléculaire ont lieu après huit ou onze jours, ce qui peut traduire la mise en place progressive des mécanismes de réponse des microalgues. Pour la souche 2935, des faibles variations temporelles sont observées (la plupart sont en dessous d'un rapport 2 de niveau d'expression) et il est difficile de montrer que le temps a un réel impact sur l'évolution de la réponse des microalgues. Pour ce qui est de la souche CC400, les conditions T et NP Or ne présentent pas de variations temporelles significatives alors que les conditions NP PS et stress azoté en présentent. Ces variations au niveau des gènes des caroténoïdes et des gènes liés à la biosynthèse du glucose et du rhamnose restent faibles. Ainsi l'évolution temporelle de la réponse moléculaire de *C. reinhardtii* au niveau des gènes des polysaccharides et des caroténoïdes testés est de faible intensité.

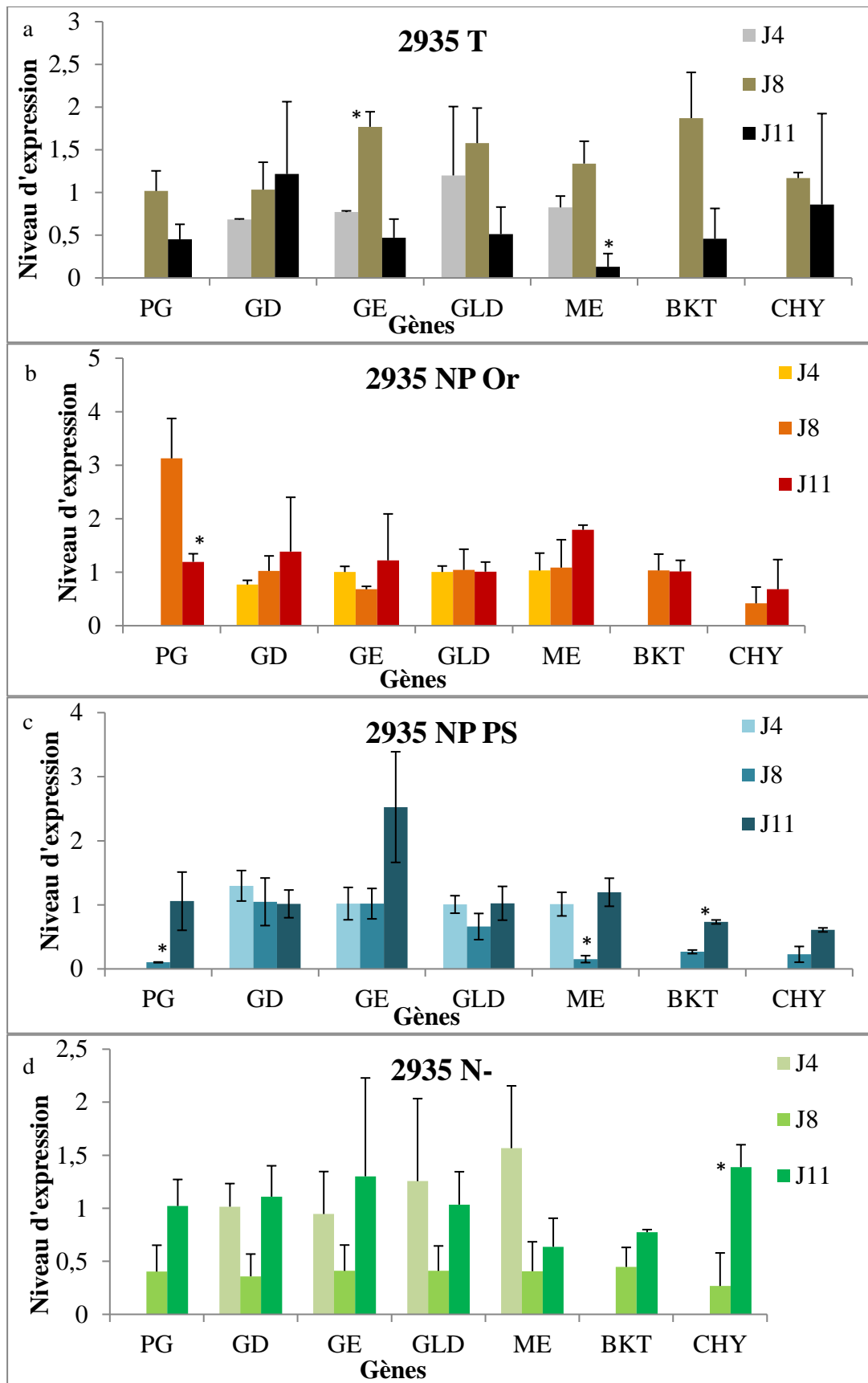


Figure 79 : Evolution temporelle du niveau d'expression des gènes des polysaccharides (PG (glucose), GD (xylose), GE (galactose), GLD (rhamnose), ME (galactose)) et des gènes liés à la voie de biosynthèse de l'astaxanthine (BKT( $\beta$ -carotène kétolase) et CHY( $\beta$ -carotène hydrolase)) pour la souche 2935 de *C. reinhardtii* à quatre, huit et onze jours pour les conditions (a) Témoins (noir), (b) NP Or (rouge), (c) NP PS (bleu) et (d) N- (vert). \* Test Wilcoxon,  $p < 0,05$ .

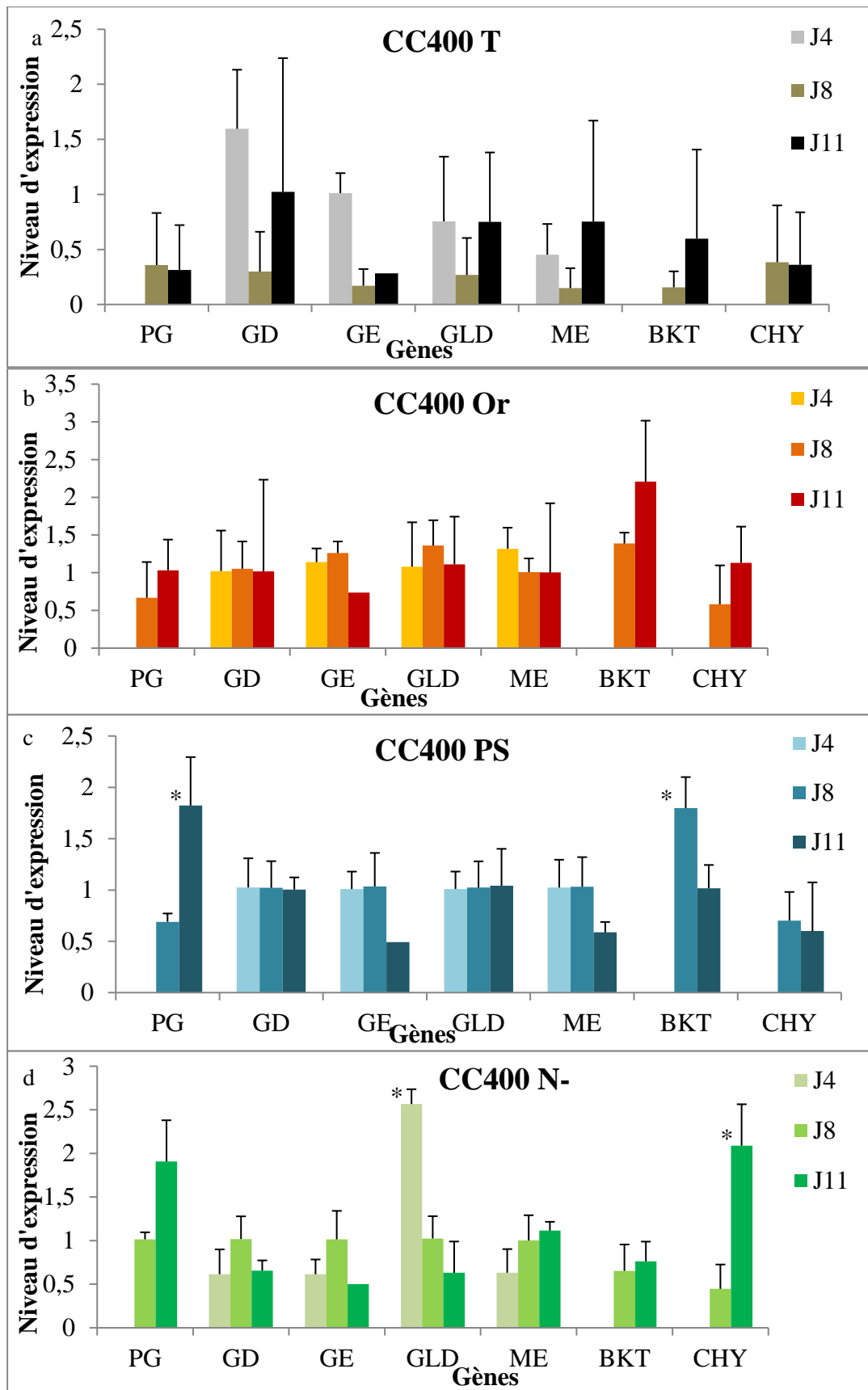


Figure 80 : Evolution temporelle du niveau d'expression des gènes des polysaccharides (PG (glucose), GD (xylose), GE (galactose), GLD (rhamnose), ME (galactose)) et des gènes liés à la voie de biosynthèse de l'astaxanthine (BKT( $\beta$ -carotène kétolase) et CHY( $\beta$ -carotène hydrolase)) pour la souche CC400 de *C. reinhardtii* à quatre, huit et onze jours pour les conditions (a) Témoins (noir), (b) NP Or (rouge), (c) NP PS (bleu) et (d) N- (vert). \* Test Wilcoxon  $p < 0,05$ .

#### **Conclusion chapitre 4 : Etude de la réponse des microalgues en présence de nanoparticules**

La caractérisation des interactions des nanoparticules chargées négativement avec *C. reinhardtii* semble indiquer l'adsorption des nanoparticules sur la paroi des microalgues avec possiblement l'excrétion d'EPS permettant leur adhésion. De plus, le test LDH indique une perte d'intégrité membranaire de *C. reinhardtii* après 72 h d'interaction avec les NP PS, confirmant le contact physique des particules avec les microalgues. Au niveau membranaire, les modifications chimiques résultantes sont probablement reliées aux variations biochimiques mises en évidence par l'analyse des spectres infrarouge et qui sont seulement relevées avec les NP PS. Nos résultats sur *C. reinhardtii* montrent que l'interaction avec les nanoplastiques conduit à une réponse modérée comparée à la carence en nutriments, les variations d'intensité lumineuse ou encore la présence d'ions cadmium. Toutefois, la présence de NP PS peut être assimilée à un changement environnemental puisqu'elle induit des modifications *in situ* chez les microalgues.

Grâce à la technique infrarouge et à sa sensibilité, la réponse des microalgues en présence de nanoparticules peut être observée et différenciée selon le type de NP. Les microalgues au contact des nanoparticules d'or ont le même comportement que les échantillons témoins (en infrarouge) indiquant que les nanoparticules d'or, aux concentrations testées, n'entraînent pas de réponses des microalgues et ne semblent donc pas constituer un stress. Ainsi ces particules pourraient donc être utilisées comme des nanoparticules inertes et possibles témoins lors d'exposition à d'autres stress particuliers chez les microalgues. En présence de NP PS et en condition de stress azoté (6 mM N), les spectres infrarouge de *C. reinhardtii* ont montré une modification des bandes des protéines et des polysaccharides. Dans cette étude, une réelle implication des sucres a été montrée dans les interactions NP PS et *C. reinhardtii* par l'utilisation de la déconvolution spectrale. Les données infrarouges sont cohérentes avec les résultats d'expression génétique, qui soulignent la variation de plusieurs gènes liés aux voies de biosynthèse des polysaccharides.

Les polysaccharides, qui ont présenté des implications au niveau moléculaire pour certains, ont pu être mis en corrélation avec des bandes des spectres infrarouge, empreintes de la composition macromoléculaire des microalgues. C'est le cas du galactose, dont l'expression des gènes ME et GE est souvent mise en corrélation avec les variations des bandes des polysaccharides (1109, 889 et 816  $\text{cm}^{-1}$ , cette dernière étant attribuée à la liaison chimique C-O-S liée au sulfate en C6 du galactose). De même, le glucose, représenté par l'enzyme de la phosphoglucomutase et la bande à 1152  $\text{cm}^{-1}$ , (liaison C-O-C liée à la conformation de cet



hexose) présente une différenciation de proportion en fonction du type de nanoparticule (Or/PS) après huit jours d'exposition notamment. Par contre, pour le xylose qui présente des variations d'expression marquées entre les conditions, aucune bande infrarouge n'a pu être associée à ce composé. Ainsi, la composition biochimique mesurée par infrarouge présente des liens avec cette expression génétique permettant de discriminer les stress et ainsi de mettre en évidence les processus impliqués dans la réponse à l'état nanoparticulaire et à la nature de ces particules.

Les interactions microalgues-nanoparticules sont dépendantes des caractéristiques physiques et chimiques des nanoparticules. La nature des nanoparticules (Or, PS) influence la réponse des microalgues que ce soit en termes de composition moléculaire (différenciation sur les bandes des protéines et des polysaccharides) que d'expression génétique (expression des gènes liés au glucose et au galactose). Ceci supporte l'idée d'implications de mécanismes de défense différents en fonction de la nature des particules. Et ces mécanismes sont également différents pour la souche mutante sans paroi CC400 pour laquelle l'exposition aux NP PS a aussi conduit à des résultats différents de l'exposition aux NP Or. Cette étude a permis également de mettre en évidence chez les deux souches 2935 et CC400, l'expression différentielle des gènes impliqués dans les voies de biosynthèse des polysaccharides et l'implication de la paroi dans la réponse cellulaire. Par ailleurs, le niveau de transcrits indique que le gène lié à l'enzyme BKT semble être un marqueur de stress intéressant dans le cas d'interaction NP/microalgues puisqu'il présente des variations d'expression pour les deux souches en cas d'exposition à des NP. Le temps d'interaction avec les nanoparticules ne semble pas influencer la réponse des microalgues au niveau biochimique, cependant des faibles différences au niveau de la réponse moléculaire sont observées ce qui pourrait traduire la mise en place progressive des mécanismes de réponse des microalgues. Toutefois, des questions restent en suspens : les microalgues s'adaptent-elles à la présence de ces nanoparticules ? Y a-t-il des effets chroniques possibles ? Comme l'impact des NP PS apparaît modéré par rapport à un stress avéré tel qu'une carence en azote sur les microalgues et malgré des concentrations testées qui sont sans aucun doute supérieures à celles éventuellement présentes dans l'environnement, il apparaît intéressant de déterminer si des effets peuvent être observés en cas de bioaccumulation (concentration des teneurs en plastiques). Ce phénomène nécessite de s'intéresser aux consommateurs des microalgues et ainsi tenter de comprendre l'impact sur la chaîne trophique aquatique de ces interactions ? Ainsi dans le chapitre suivant, les interactions entre microalgues et particules de plastiques seront étudiées en présence de daphnies, un des prédateurs de microalgues. Nous concentrerons notre étude sur l'importance de la chimie de surface dans les interactions entre organismes aquatiques et microplastiques.

## Points clés du chapitre

---

---

- Le mécanisme d'interaction entre nanoparticules et microalgues suggéré ici est l'adsorption.
  - La réponse des microalgues n'est pas la même en fonction du stress induit.
  - Les NP Or peuvent être considérées comme une référence inerte pour l'effet nanoparticule car elles entraînent une réponse similaire au groupe témoin.
  - Les NP PS bien qu'induisant une perte d'intégrité membranaire, sont plus caractéristiques d'un changement d'environnement pour les microalgues que d'un stress intense tel que le stress nutritif.
  - Les mécanismes de réponse mis en place impliquent les macromolécules dont notamment les polysaccharides.
  - Les facteurs influençant les effets des nanoparticules sur les microalgues sont la nature chimique des particules et le type de paroi.
  - Les variations d'expression génétique sont différentes en fonction des conditions et suggèrent une implication de mécanismes de défense différents en fonction de la nature des particules.
  - Le type de paroi induit une variation de l'expression des deux souches 2935 et CC400 pour les gènes impliqués dans les voies de biosynthèse des polysaccharides.
- 
-

# Chapitre 5 : Importance de la chimie de surface dans les interactions entre organismes aquatiques et microplastiques

---

## **Introduction**

Les expériences de ce chapitre ont été réalisées en collaboration avec deux stagiaires de master 1 et 2 que j'ai co-encadrées, respectivement Mathilde Constans et Kateryna Menchuk. Cette étude se base sur les interactions microplastiques-organismes avec un focus sur la surface des particules, peu étudiée dans la littérature. Toutefois cet aspect est indispensable pour comprendre en quoi la surface modifie l'impact des microplastiques sur les organismes aquatiques. Les résultats de ce chapitre sont présentés en trois parties. Premièrement, les microalgues précédemment étudiées sont mises au contact de microparticules de polyéthylène (MP PE) afin d'observer leur réponse par spectroscopie en présence de particules de plastiques de tailles plus grandes (0,8  $\mu\text{m}$ ) comportant différents surfactants. Les mêmes particules ont ensuite été mis en contact avec des organismes plus gros, les daphnies *Daphnia magna* (taille comprise entre 2 et 6 mm). Dans cette seconde partie, la toxicité aigüe et chronique de ces microparticules est évaluée sur ce consommateur primaire en présence/absence des microalgues.

# 1 Quelle réponse macromoléculaire des microalgues en présence de microplastiques ?

Les microalgues *C. reinhardtii*, présentent des variations de composition biochimique en présence de nanoplastiques, qu'en est-il en présence de microplastiques ? L'analyse en spectroscopie infrarouge de microalgues après trois jours d'interaction avec des MP PE recouverts de biosurfactant (BS), de Tween (Tw) ou sans surfactant (NS), a été réalisée dans le but de répondre à cette question. Du fait de la non disponibilité de microplastiques de polystyrène dont la surface pouvait être maîtrisée, nous avons utilisé des MP PE produits dans notre laboratoire et dont la taille et les caractéristiques de surface sont bien définies [253]. Les spectres moyens obtenus après prétraitement de la ligne de base et SNV (standard normal variate) présentent des faibles différences spectrales pour ce qui est de la position des pics (Figure 81a). De plus, les rapports de bandes relatifs aux différents groupes d'intérêts (lipides, protéines, acide nucléiques et polysaccharides) informent sur l'absence de variation significative entre les conditions (Figure 82). Seule la condition sans surfactant se différencie légèrement, sur les spectres infrarouge, avec une intensité moyenne plus faible que les autres conditions sur l'ensemble des pics - sauf les pics à  $1425\text{ cm}^{-1}$  (liaison  $\delta\text{CH}_2$ ,  $\text{CH}_3$ ) et à  $1550\text{ cm}^{-1}$  ( $\delta\text{N-H}$ , Amide II) relatif aux liaisons protéiques (Figure 81a). L'ACP permet de différencier la condition MP PE sans surfactant (NS) des spectres de microalgues en présence de MP PE Tween sur la première composante (Figure 81b). La CP1 représente 82 % de la variance des spectres infrarouge et est influencée par les variations sur les pics des protéines ( $1425$ ,  $1550\text{ cm}^{-1}$ ) et des polysaccharides ( $1070\text{ cm}^{-1}$ , Figure 81c).

Les interactions avec les MP PE NS semblent influencer légèrement la composition de *C. reinhardtii* pour ce qui est des protéines et des polysaccharides. Les effets sont peu marqués car la différence entre témoin et condition MP PE NS n'est pas statistiquement prouvée. L'impact de ces microplastiques semble plus faible que celui des nanoplastiques précédemment étudiés qui présentaient des effets significatifs au niveau des bandes des protéines et des polysaccharides (cf. Chapitre 4). Ceci suggère que la taille des particules influence les effets. De plus, par la différence de réponse aux MP PE avec surfactant Tween et sans surfactant, il semblerait que la chimie de surface de ces particules soit un facteur influençant la réponse des microalgues. Pour autant le test LDH, permettant de suivre l'impact sur les membranes, ne montre pas de différences entre les conditions (Figure 83).

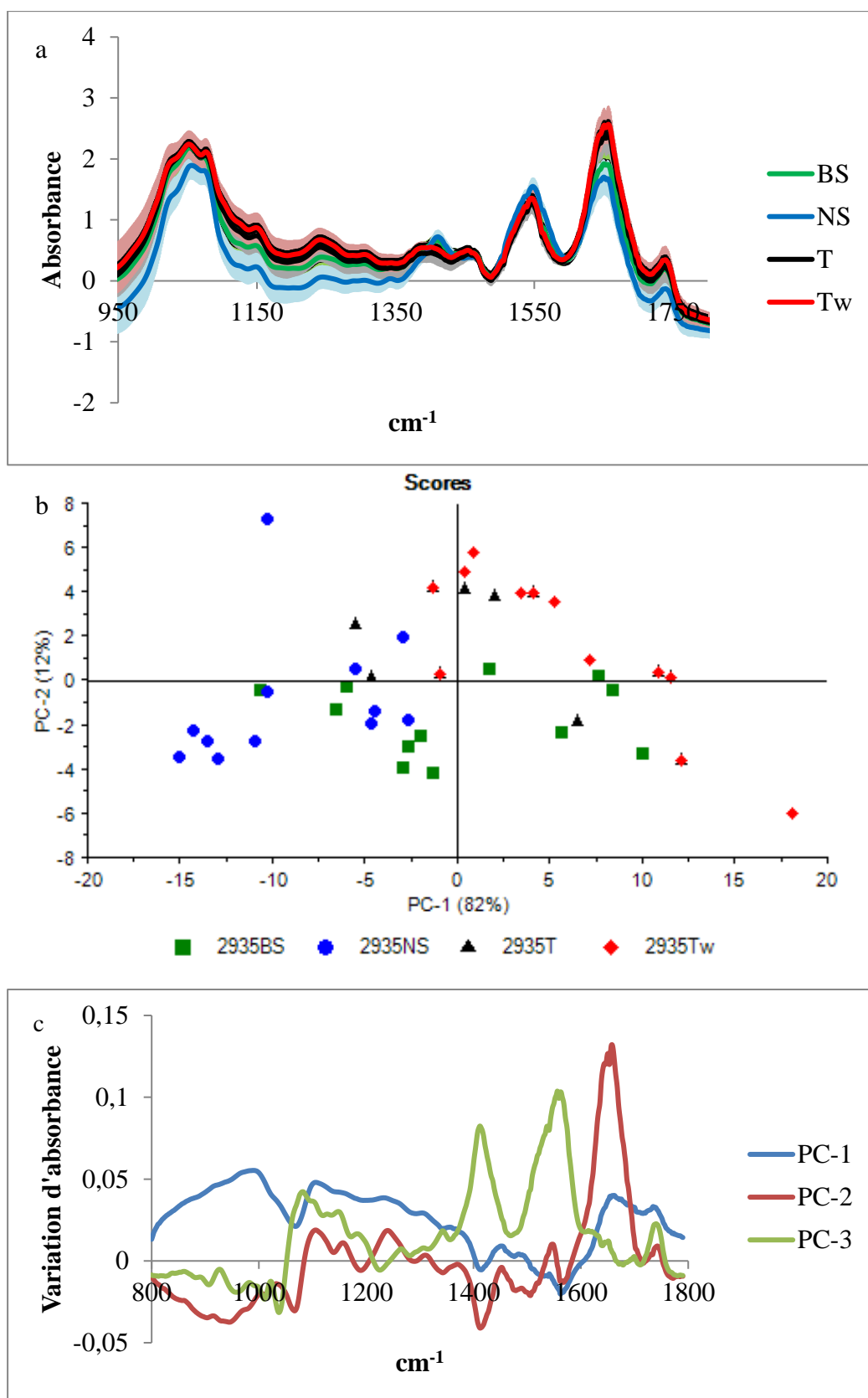


Figure 81 : (a) Spectres infrarouge de microalgues *C. reinhardtii* 2935 après trois jours d'interactions avec des microplastiques de polyéthylène sans surfactant (NS, rond bleu), avec surfactant Tween (Tw, losange rouge) ou biosurfactant (BS, carré vert) ou en condition témoin (T, triangle noir) après LB+SNV, zone : 1780-800  $\text{cm}^{-1}$ . (b) ACP (c) X loadings PC1 (bleu), PC2 (rouge) et PC3 (vert).

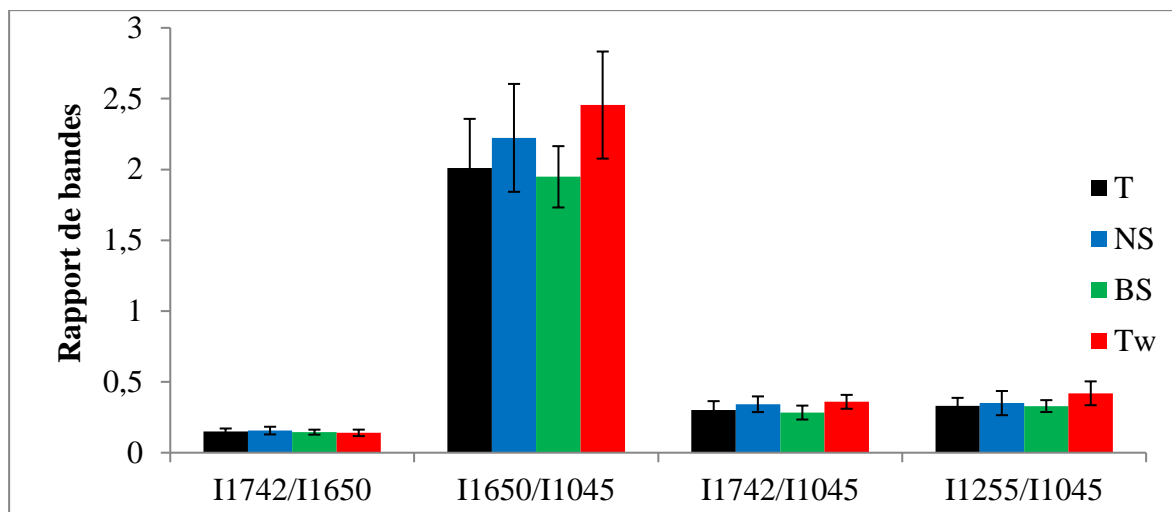


Figure 82 : Rapport de bandes des spectres infrarouge après LB+SNV de microalgues *C. reinhardtii* 2935 après trois jours d'interaction avec des microplastiques de polyéthylène sans surfactant (NS, bleu), avec surfactant Tween (Tw, rouge) ou biosurfactant (BS, vert) ou en condition témoin (T, noir). Bandes relatives aux lipides (1742  $\text{cm}^{-1}$ ), protéines (1650  $\text{cm}^{-1}$ ), aux acides nucléiques (1255  $\text{cm}^{-1}$ ) et aux polysaccharides (1045  $\text{cm}^{-1}$ ) Test Krukall-Wallis non significatif ( $p > 0,05$ ).

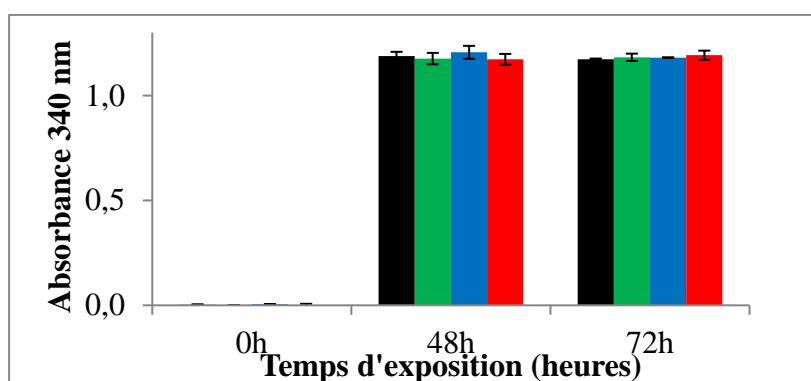


Figure 83 : Histogramme de l'absorbance à 340 nm du test LDH en fonction du temps d'exposition aux MP PE (trois jours). Conditions : Témoin (noir), Biosurfactant BS (vert), sans surfactant NS (bleu), surfactant Tween (rouge).

Une étude à 94 jours (trois mois) a été menée pour voir l'effet à long terme de ces interactions car des études précédentes menées au laboratoire avec des microplastiques de tailles autour de 400  $\mu\text{m}$  avaient révélé des effets sur le long terme avec notamment des productions d'EPS différentes selon la nature des polymères testés. Les spectres infrarouge obtenus après prétraitement sont présentés sur la Figure 84a. La position des pics des polysaccharides fluctue cette fois ci pour la condition MP PE BS (avec biosurfactant) avec un pic des polysaccharides à 1065  $\text{cm}^{-1}$  contre 1076  $\text{cm}^{-1}$  dans les autres conditions. Ceci pourrait indiquer la présence plus importante d'une autre liaison des polysaccharides, peut-être dû au fait que le biosurfactant contient lui aussi des polysaccharides. D'autre part, l'ACP différencie la condition MP PE avec surfactant Tween sur la composante principale 2 avec une augmentation au niveau des pics des protéines à 1662 et 1556  $\text{cm}^{-1}$  et une diminution au niveau du pic à 1024  $\text{cm}^{-1}$ , correspondant à la liaison polysaccharidique  $\nu(\text{C-O})$  (Figure 84b et c). La

présence de Tween en surface des MP PE engendre une réponse spécifique des microalgues sur le long terme. Au regard de la discrimination faible des conditions et des loadings qui semblent exprimés les mêmes variations, il aurait été intéressant ici de tester un autre type de prétraitement des spectres infrarouges. L'utilisation d'une dérivée seconde avec normalisation SNV en amont de l'ACP aurait pu améliorer le traitement des spectres infrarouges.

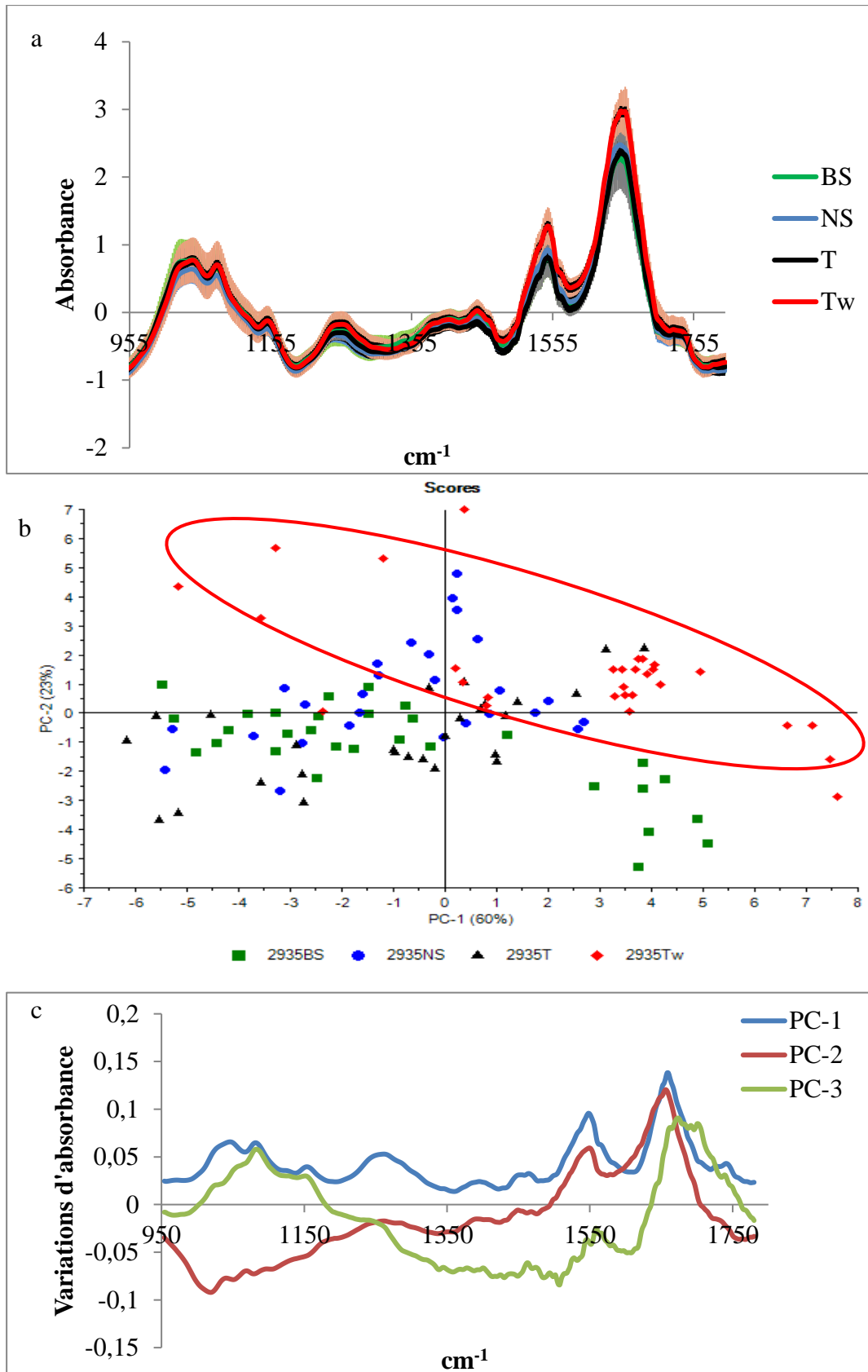


Figure 84 : (a) Spectres infrarouge de microalgues *C. reinhardtii* 2935 après 94 jours d'interactions avec des microplastiques de polyéthylène sans surfactant (NS, rond bleu), avec surfactant Tween (Tw, losange rouge) ou biosurfactant (BS, carré vert) ou en condition témoin (T, triangle noir) après LB+SNV, zone : 1780-955  $\text{cm}^{-1}$ . (b) ACP (c) X loadings PC1 (bleu), PC2 (rouge) et PC3 (vert).



## Conclusion

L'impact des MP PE avec différents surfactants sur les microalgues semble faible puisqu'à trois jours et à trois mois il n'est pas observé de différence significative entre la condition témoin et les conditions MP PE au niveau des spectres infrarouge de *C. reinhardtii*. Ceci est cohérent avec le test LDH, qui a montré des résultats similaires entre toutes les conditions. Par contre, après trois mois d'interaction, il a pu être mis en évidence des différences de composition pour la condition Tween au niveau des bandes des protéines et des polysaccharides. Ceci suggère que même à une concentration élevée par rapport à l'environnement [305], les MP PE sans surfactant ne semblent pas impacter les microalgues de type *C. reinhardtii* au niveau de l'intégrité de leur membrane (Figure 83) et de leur composition (Figure 81 et Figure 84) et que c'est la seule présence de Tween à leur surface qui pourrait causer des effets.

En comparant ces résultats avec les résultats obtenus dans le cas des nanoparticules de plastiques, l'effet taille semble primordial puisque des impacts plus importants sont observés en présence des NP PS par rapport aux MP PE. De plus, ceci est en cohérence avec d'autres études qui montre l'importance de la taille dans l'impact des plastiques [306, 307]. Néanmoins, un effet de la nature chimique des particules est possible, comme il a pu être mis en évidence précédemment avec la différence de réponse entre des nanoparticules d'or et de polystyrène (cf. Chapitre 4, partie 3). Mais cela doit être vérifié en travaillant sur des particules qui puissent être comparées, c'est-à-dire avec des caractéristiques, à part la nature chimique, semblables. Concernant la chimie de surface, un léger effet du surfactant est observé avec des différences de réponses des microalgues dans le cas de l'interaction avec les micropolyéthylènes.

Ces résultats mériteraient une étude plus approfondie avec la comparaison de particules de plastiques (MP/NP) de même nature et taille et variant seulement au niveau du surfactant. Cependant, disposer de particules de différentes natures, surfactants et tailles qui soient vraiment comparables pour les études de toxicité reste un verrou majeur de la thématique.

## 2 Interactions daphnies et MP PE +/- microalgues

Les daphnies sont des crustacés d'eau douce consommant à l'état naturel des microalgues [95]. Leur appareil de filtration permet aux daphnies d'ingérer des particules de la taille des nano/micro-plastiques (20 nm-75  $\mu\text{m}$  ; [99–102]). Durant les expériences d'interactions entre les MP PE et les daphnies *Daphnia magna*, des tests avec et sans nourriture (microalgues *C. reinhardtii*) ont été réalisés (Figure 85).

Dans cette étude, deux types de test ont été réalisés suite aux interactions daphnies-MP PE : un test de toxicité aiguë et un test de toxicité chronique. Les concentrations testées (1 et 60 mg/L) sont en cohérence avec la littérature. La valeur de concentration 60 mg/L est proche de l' $EC_{50}$  à 57,43 mg/L indiquée par Rehse et al. (2016) [100] pour des daphnies en interaction avec des MP PE d'environ 1  $\mu\text{m}$ . De plus, une concentration de 1 mg/L est testée ici pour se rapprocher des teneurs de MP PE dans l'environnement car celle-ci pourrait correspondre aux concentrations dans les zones d'accumulation des microplastiques (1 mg/L dans certains lacs, [305]).

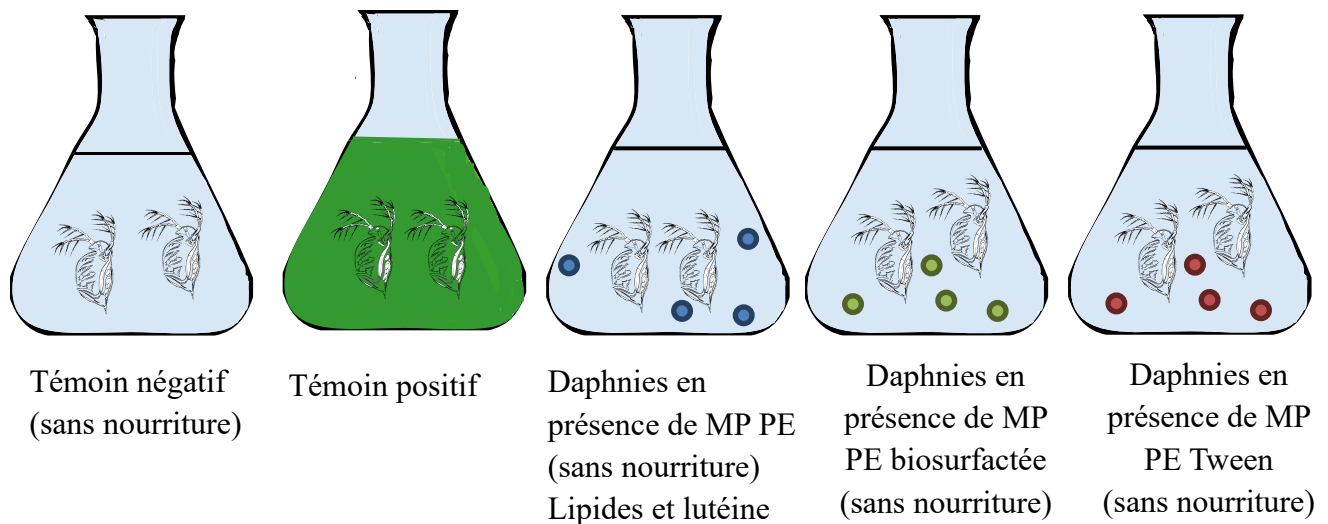
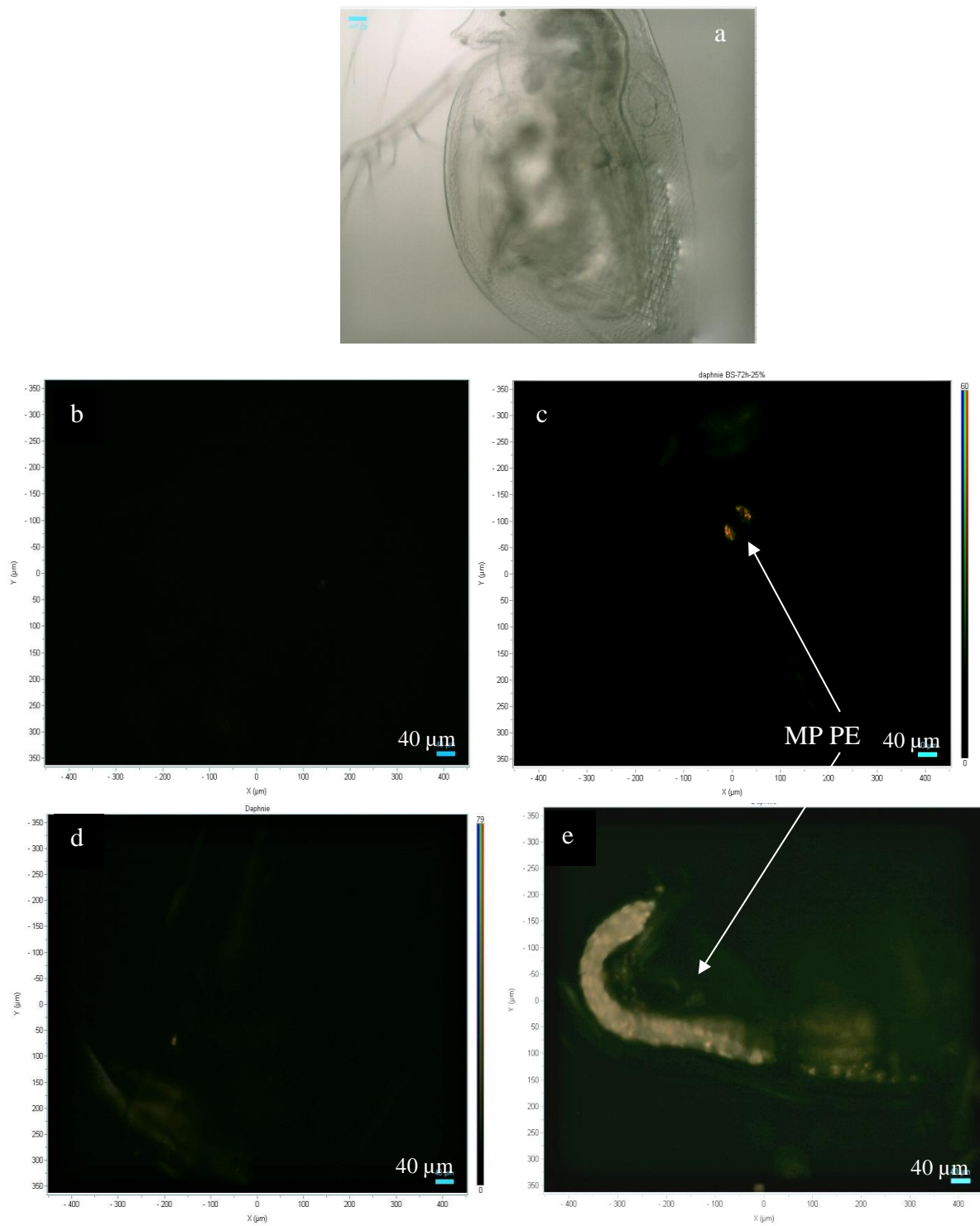


Figure 85 : Schéma des tests de toxicité des MP PE réalisées sur les daphnies.

## **2.1 Effet à court terme de la présence des MP PE**

### **2.1.1 Ingestion des microplastiques et mortalité**

La toxicité aigüe des MP PE à 60 mg/L sur les daphnies a été suivie sur trois jours. En présence de nourriture (microalgues), les observations en lumière polarisée montrent qu'au bout de 2, 24 et 48 h les daphnies n'ont pas ingéré de microparticules de polyéthylène (60 mg/L), quelles soient sans surfactant ou recouvertes de biosurfactant. En absence de nourriture, l'analyse en lumière polarisée des daphnies montre l'ingestion des particules de MP PE en petite quantité (seulement quelques spots du tube digestif sont illuminés par leur présence) sans surfactant et en grande quantité (remplissant entièrement le tube digestif) en présence du biosurfactant à trois jours (Figure 86c et e), au contraire des MP PE Tween qui ne sont pas ingérées après trois jours (Figure 86d). Cette expérience a été répétée et la présence des MP PE BS dans le système digestif est observée à 2, 24 et 48 h dans le tube digestif des daphnies, confirmant l'ingestion préférentielle et continue de ce type de microparticules (Figure 87).



**Figure 86 : Image de microscopie en lumière blanche de *Daphnia magna* (a) et lumière polarisée (b) Témoin (c) PE sans surfactant (d) PE avec du Tween (e) PE avec biosurfactant après 72 h d'interaction avec des MP PE à concentration de 60 mg/L et sans apport de nourriture.**

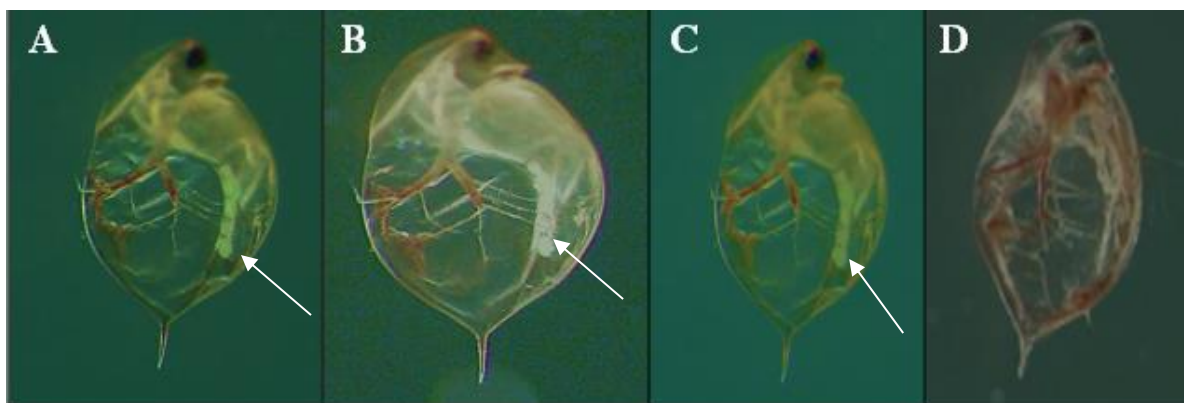


Figure 87 : Photos de *Daphnia magna* en lumière polarisée suite à l'interaction avec des MP PE BS (A) à 2 h, (B) 24 h (C) 48 h (D) témoin. Les flèches blanches indiquent la présence des MP PE BS.

L'absence/présence de nourriture semble ici être un premier facteur d'ingestion ou non des MP PE par les daphnies. De plus, l'ingestion a lieu rapidement après l'interaction puisqu'à deux heures des particules sont déjà retrouvées dans le tube digestif. Ce résultat est en cohérence avec Canniff et Hoang (2018) [102] qui ont montré que les microplastiques sont ingérés durant les six premières heures par les daphnies. La chimie de surface semble être un facteur secondaire puisqu'influençant l'ingestion seulement dans le cas d'une absence de microalgues. Cependant cette variation de la chimie de surface ne semble pas affecter le paramètre de survie des daphnies. En effet en absence de nourriture, la mortalité des daphnies au cours de l'étude augmente mais ne présente pas de différence significative entre les conditions à trois jours (Figure 88).

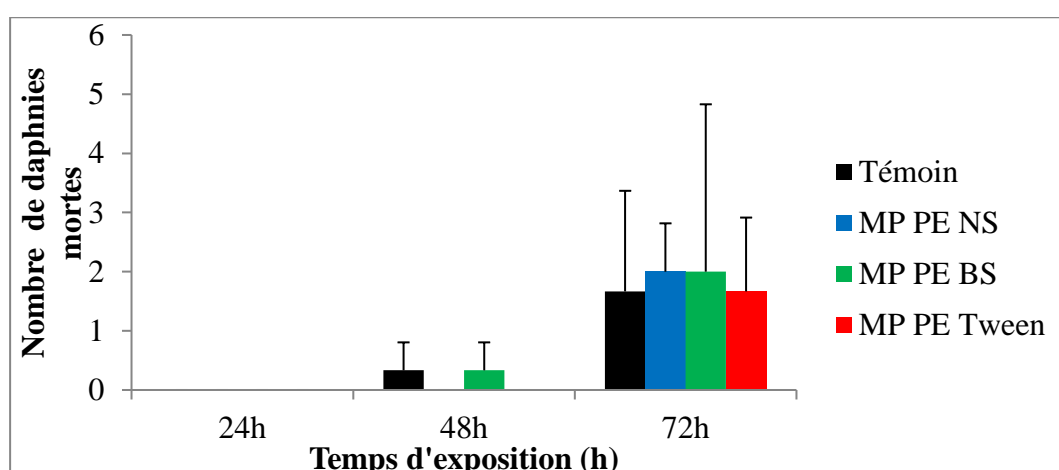


Figure 88 : Mortalité moyenne des daphnies *Daphnia magna*, en absence de nourriture, après interaction avec des microplastiques de polyéthylène (MP PE) sans surfactant (NS, bleu), avec biosurfactant (BS, vert) ou surfactant Tween (rouge) en fonction du temps d'exposition (24, 48 et 72 h). Test Wilcoxon (différence significative entre les jours mais pas entre les conditions à  $p=0,05$ ).

### 2.1.2 Analyse Raman des particules retrouvées dans le tube digestif des daphnies

Dans le but de valider la nature des microparticules observées dans le tube digestif des daphnies, celui-ci a été analysé en spectroscopie Raman (Figure 89). La présence de trois pics à  $2845\text{ cm}^{-1}$ ,  $2852\text{ cm}^{-1}$  et  $2858\text{ cm}^{-1}$  correspondant avec le signal des MP PE seules confirment la présence des microparticules de polyéthylène à l'intérieur des daphnies (Figure 89A). De plus, le spectre présente une bande de faible intensité autour de  $1527\text{ cm}^{-1}$  correspondant au signal des caroténoïdes, pigments provenant des microalgues (Figure 89B). Le biosurfactant provenant d'exopolysaccharides algaux, ce résultat est cohérent et souligne la nature biosurfactée des MP PE.

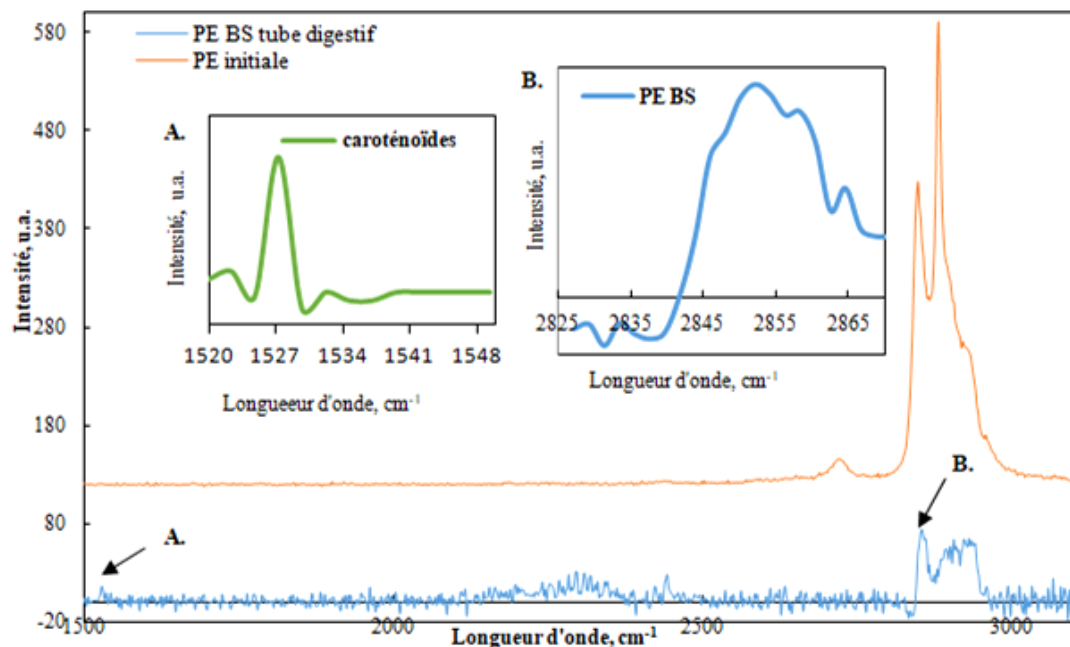


Figure 89 : Spectre Raman de micropolyéthylène (MP PE) en solution (orange) et dans le tube digestif (bleu) chez *Daphnia magna* 24 h après l'interaction avec des MP PE biosurfactée (BS). (A) Pic des caroténoïdes (B) zone agrandie des MP PE BS.

### 2.1.3 Excrétion des MP PE ?

Afin de savoir si les daphnies exposées aux MP PE BS bioaccumulent les microparticules ingérées, des daphnies exposées pendant 24 h aux particules MP PE BS à 60 mg/L ont été prélevées et transférées dans un milieu sans particules. Après 2, 24 et 48 h, la présence des MP PE BS dans le tube digestif de ces daphnies est toujours observée en quantité équivalente (Figure 90). Les daphnies n'ont pas survécu au-delà de 72 h.

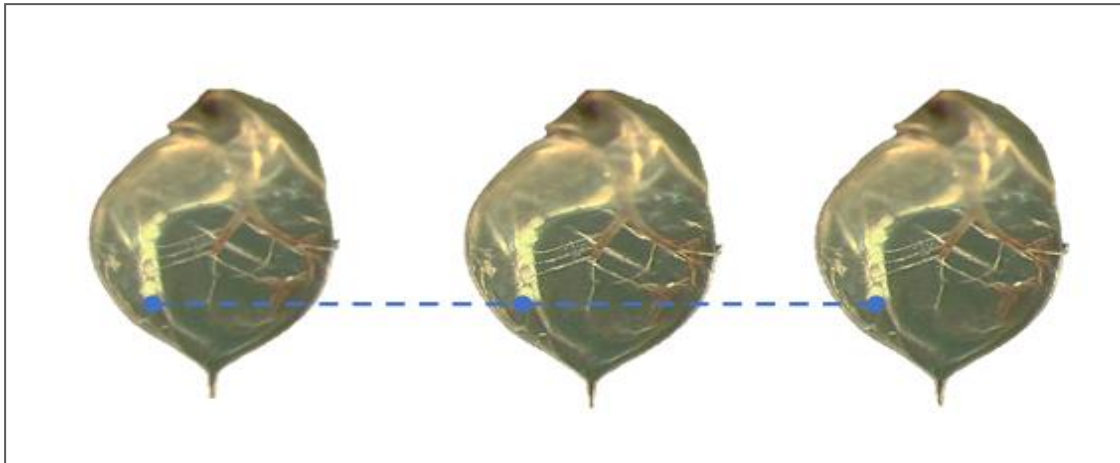


Figure 90 : Expérience d'excrétion des daphnies après 24 h d'interaction avec des MP PE BS dans un milieu ISO pur à (a) 2 h, (b) 24 h et (c) 48 h.

Dans cette expérience les daphnies n'excrètent donc pas les microplastiques comme cela a pu être le cas dans l'étude d'Ogonowski et al. (2016) [103] qui ont estimé un temps de rétention maximal dans l'estomac entre 9 et 12 min pour des particules de polyéthylène fluorescente de 2 et 4  $\mu\text{m}$  (concentration  $10^4$  MP/mL). Cependant, ces particules n'étaient pas recouvertes de biosurfactant comme c'est le cas dans notre étude. De plus, Rist et al. (2017) [308] ont quant à eux montré pour des MP PS que l'excrétion n'était pas totale en 24 h. Une autre étude montre également un non relargage dans les 96 h suivant l'ingestion des microplastiques à la plus forte concentration [309]. Il semblerait donc que les MP PE BS ingérées en grand nombre bloquent le système digestif et ne permettent pas au métabolisme de fonctionner normalement. La survie des daphnies après 72 h est probablement due au blocage du système digestif et du manque de nourriture.

#### 2.1.4 Evolution du comportement natatoire

Après ingestion de microplastiques, l'observation des daphnies a mis en évidence un comportement natatoire anormal (tournent en rond) pour certaines d'entre-elles, ce qui a déjà été identifié dans certaines études comme un paramètre à analyser lors d'études de toxicité sur des daphnies [105]. Le suivi du comportement natatoire informe sur la mobilité des daphnies. De plus, c'est un paramètre plus sensible que la mortalité puisqu'une altération du comportement natatoire peut avoir lieu sans être directement relié à une plus forte mortalité [310]. Pour vérifier cette hypothèse, des vidéos du comportement natatoire des daphnies, en présence de nourriture (témoin positif), en absence de nourriture (témoin négatif) et après exposition aux MP PE sans surfactant (NS) et avec biosurfactant (BS) ont été réalisées et retranscrites en signaux de trajectoire (Figure 91).

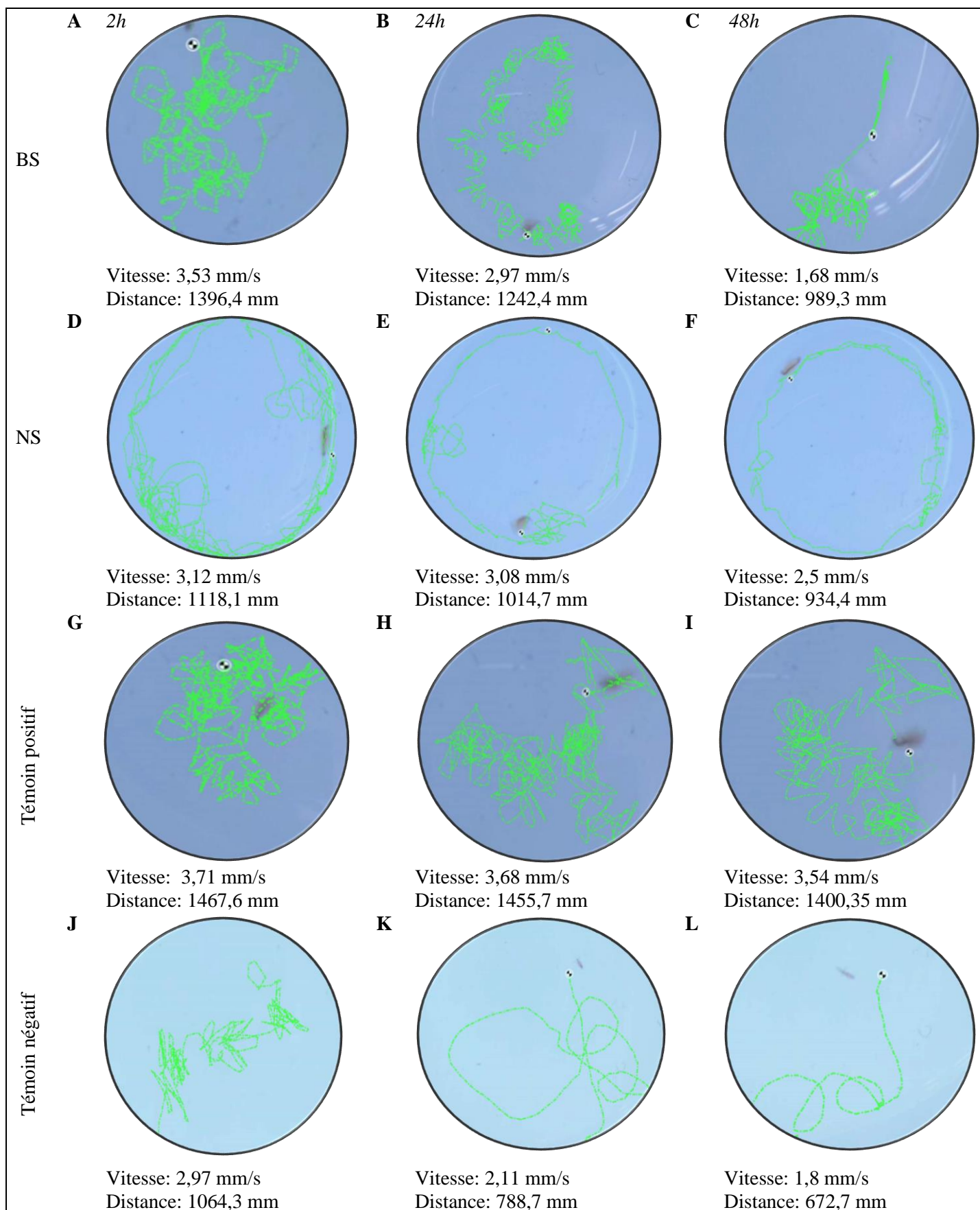


Figure 91 : Trajectoire de *D. magna* en présence de nourriture (témoin positif), en absence de nourriture (témoin négatif) et après exposition aux MP PE sans surfactant (NS) et avec biosurfactant (BS à 60 mg/L, à 2 h : images A, D, G et J, 24 h : images B, E, H et K et 48 h : images C, F, I et L. Vitesse moyenne et distance totale parcourue sur une minute.



Premièrement, la valeur optimale pour la vitesse de nage a été déterminée chez dix daphnies et est comprise entre 2,9 et 3,5 mm/s. Les daphnies en présence de nourriture montrent une vitesse de nage optimale durant les 48 h de suivi (Figure 92). Tandis que les daphnies sans source de nourriture disponible ont des vitesses de nage plus faibles par rapport aux autres conditions, cela s'explique par l'absence de source d'énergie pendant 96 h. Les témoins positifs et les témoins négatifs montrent une diminution linéaire de la fréquence de sauts (Figure 93). La vitesse de nage semble donc être influencée par la présence/absence de nourriture.

En second lieu, la présence des MP PE NS ne montre pas de variation de vitesse des daphnies après 2 et 24 h d'interaction, toutefois la vitesse moyenne diminue de 20 % à 48 h (test ANOVA,  $p = 0,013$ ) et est inférieure aux daphnies nourries mais reste cependant supérieure à la vitesse de nage des daphnies sans nourriture. La distance parcourue par minute est constante et inférieure à la condition témoin positif. Par contre, la non ingestion de particules (condition MP PE NS) conduit à une diminution de la fréquence des sauts au bout de 24 h et une diminution du nombre de rotation par minute de 12,5 % après 48 h. Le comportement des daphnies pour ces deux paramètres est pour autant globalement similaire à ce qui est observé pour les témoins en présence de microalgues et supérieur aux valeurs obtenues pour les témoins négatifs. Ceci suggère que les daphnies en présence de MP PE sans surfactant, même si elles ne les ingèrent pas, agissent de manière similaire aux daphnies en présence de nourriture au niveau de la fréquence de saut et du nombre de rotation.

Enfin concernant la présence de biosurfactant, la vitesse de nage des daphnies exposées à ces MP diminue significativement de 13 % après 24 h (test ANOVA,  $p = 0,011$ ) et de 53 % après 48 h (test ANOVA,  $p = 0,012$ ). A 48 h, la vitesse de nage de ces daphnies est inférieure à celle enregistrée en présence de MP PE NS (Figure 92A). Les daphnies en présence MP PE BS parcourent une distance plus grande à 2 et 24 h qu'en présence de MP PE NS (Figure 92B) suggérant un comportement similaire à la recherche de nourriture. De plus, en présence de MP PE BS, les daphnies montrent des valeurs de fréquence de sauts et de nombre de rotation plus élevées que pour les daphnies au contact avec des MP PE NS au long des 48 h (Figure 93). Ainsi la présence de biosurfactant dans le tube digestif des daphnies semble augmenter leur fréquence de sauts et le nombre de rotation en même temps que diminuer leur vitesse de nage.

En conclusion, le comportement natatoire dépend de l'ingestion des MP PE ainsi que de la présence de nourriture.

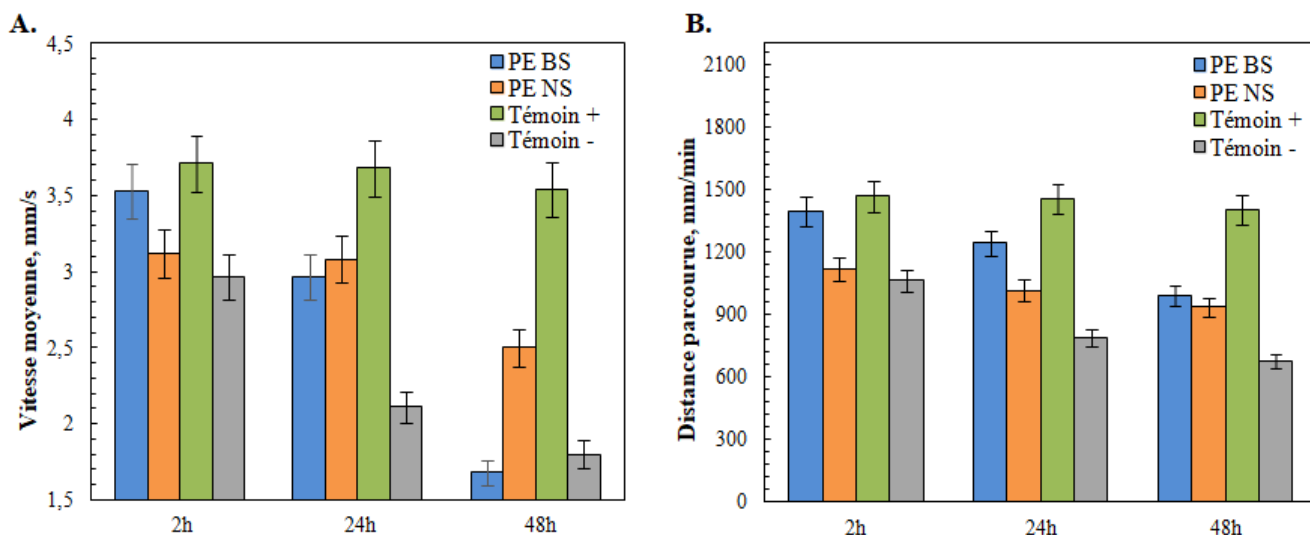


Figure 92 : Vitesse moyenne (mm/s) (A) et distance parcourue (mm/min) (B) par les daphnies *D. magna* pendant l'exposition avec des MP PE sans surfactant (NS) et avec biosurfactant (BS) ou en condition témoin en absence (Témoin -) ou en présence de nourriture (Témoin +). Le temps d'enregistrement est de 60 secondes.

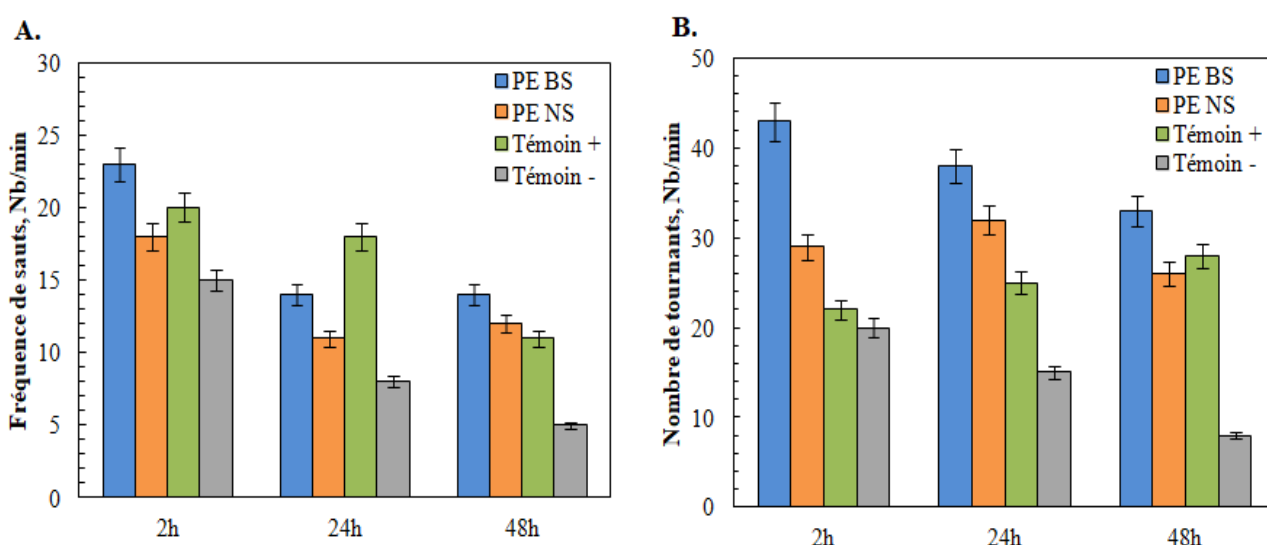


Figure 93 : Fréquence de saut (Nb/min) (A) et nombre de tours (Nb/min) (B) effectués par les daphnies *D. magna* pendant l'exposition avec des MP PE sans surfactant (NS) et avec biosurfactant (BS) ou en condition témoin en absence (Témoin -) ou en présence de nourriture (Témoin +). Le temps d'enregistrement est de 60 secondes.

### 2.1.5 Impact sur les descendants des daphnies exposées

Pour tenter de comprendre l'impact sur les générations suivantes de l'exposition aux MP PE, l'étude de daphnies nées lors de l'exposition sans nourriture a été réalisée. Des daphnies juvéniles nées dans les conditions MP PE BS et témoin ont été isolées et nourries tous les deux jours jusqu'à l'apparition de la 2<sup>ème</sup> génération. Ceci dans le but d'identifier d'éventuels impacts

sur les générations suivantes. La période d'incubation des juvéniles est plus élevée de trois jours en moyenne pour les daphnies nées en condition MP PE BS 60 mg/L par rapport aux daphnies de la condition témoin. Ces daphnies de 2<sup>ème</sup> génération montrent également une faible mobilité pendant sept jours par rapport au témoin et l'apparition des nouveau-nés pendant cette période n'a pas été observée. La 2<sup>ème</sup> génération de témoin a montré l'apparition des nouveau-nés entre six et sept jours après leur naissance. La présence de MP PE BS impacte donc la reproduction des daphnies, qu'en est-il des effets à plus long terme ?

## **2.2 Effet chronique de la présence des MP PE**

Le test de toxicité chronique a été réalisé sur 21 jours pour suivre les effets des MP PE à plus long terme sur les daphnies. Les effets ont été suivis au niveau de la mortalité des daphnies, de leur taux de reproduction ainsi que de leur comportement natatoire.

### **2.2.1 Taux de survie et reproduction**

En ce qui concerne la mortalité, seule la condition MP PE BS 60 mg/L présente une mortalité de 20 % à sept jours (Figure 94). A 14 jours, la mortalité augmente (environ 30 %) et est significativement différente du témoin pour les conditions MP PE BS (aux deux concentrations testées de 1 et 60 mg/L) et NS à la concentration haute. A 21 jours, la mortalité s'accroît à plus de 50 % dans toutes les conditions de MP PE. La présence de MP PE influence ainsi la survie des daphnies.

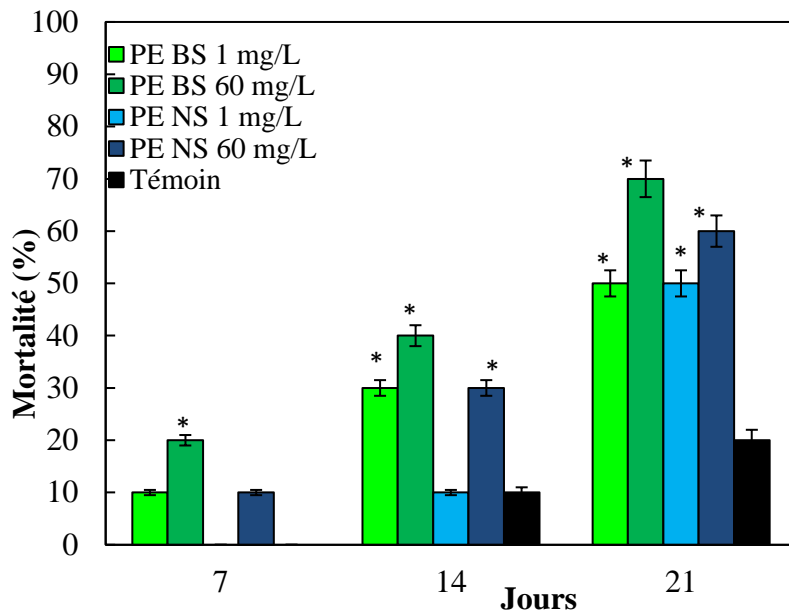


Figure 94 : Mortalité cumulative moyenne des daphnies *Daphnia magna* après interaction avec des microplastiques de polyéthylène (MP PE) sans surfactant (NS, bleu), avec biosurfactant (BS, vert) à concentration de 1 et 60 mg/L sur 21 jours. Témoin (T, noir) MP PE sans surfactant (NS, bleu), avec biosurfactant (BS, vert).

Concernant la reproduction, les daphnies en présence de MP PE BS voient malgré la mortalité, leur nombre de juvénile augmenter, notamment de façon significative pour la condition 1 mg/L (test Wilcoxon,  $p < 0,05$ ) où la reproduction est la plus élevée (Figure 95). Pour autant, il n'est pas constaté de production de daphnie mâle, ce qui signifie que les MP n'influent pas drastiquement sur les conditions environnementales. La présence de mâles étant essentiellement due à des changements de conditions environnementales [311].

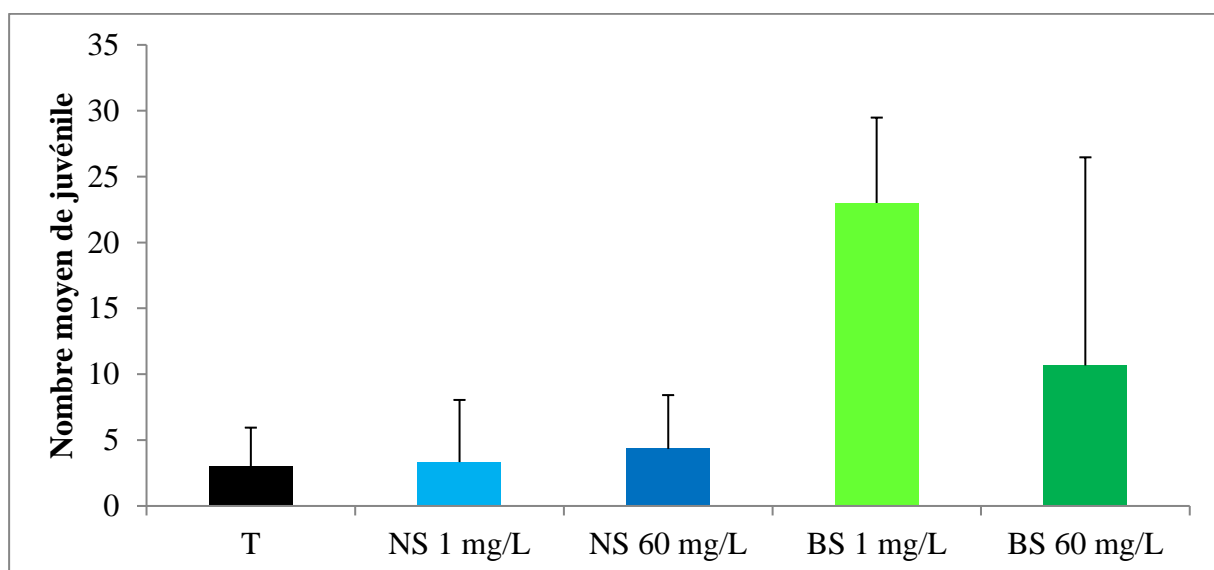


Figure 95 : Nombre moyen de *Daphnia magna* juvénile à 21 jours en fonction des conditions : Témoin (T, noir) MP PE sans surfactant (NS, bleu), avec biosurfactant (BS, vert).

## 2.2.2 Impact sur la mobilité des daphnies

Pour ce qui est de la mobilité des daphnies, globalement une décroissance de la distance parcourue est observée dans toutes les conditions au cours du temps (Tableau 8). A sept jours, les daphnies en présence d'1 mg/L de MP PE BS présentent la distance parcourue la plus élevée (1816 mm). La mobilité pour les daphnies soumises à 1 mg/L de PE NS est aussi forte (1795 mm) à sept jours. Le comportement natatoire des daphnies suite à 14 jours d'interaction est significativement différent des autres conditions en ce qui concerne la distance parcourue pour la condition MP PE BS 1 mg/L. A 21 jours, il est observé, comme au 7<sup>ème</sup> jour, une mobilité plus élevée pour les faibles concentrations en MP PE que pour les fortes concentrations. La distance parcourue par les daphnies semble être donc dépendante du temps mais aussi de la concentration en microplastiques.

**Tableau 8 : Distance moyenne parcourue par les daphnies en millimètres sur une durée d'une minute pour le 7<sup>ème</sup>, 14<sup>ème</sup> et 21<sup>ème</sup> jour d'interaction avec des MP PE sans surfactant (NS) et avec biosurfactant (BS).**

Jours PE	Concentration, mg/L	7 <sup>ème</sup> jour	14 <sup>ème</sup> jour	21 <sup>ème</sup> jour
BS	1	1816 mm	1223 mm	766 mm
NS	1	1795 mm	935 mm	736 mm
BS	60	1389 mm	976 mm	514 mm
NS	60	1115 mm	837 mm	498 mm

## 2.2.3 Etude préliminaire de l'expression des gènes chez *Daphnia magna*

Comme chez les microalgues, une réponse des daphnies au niveau moléculaire peut avoir lieu suite à l'exposition aux microplastiques. Celle-ci a été précédemment décrite par Imhof et al. (2017) [249]. Dans l'optique d'étudier l'expression de gènes de référence (glyceraldéhyde-3-phosphate déhydrogénase (GAPDH), succinate déhydrogénase (SDH), syntaxine 16 (Stx16),  $\alpha$ -tubuline ( $\alpha$ -Tub), actine (ACT), TATA-box protéine d'accroche (TBP), enzyme de conjugaison ubiquitine (UBC) et sarcoplasmique réticulum calcium ATPase (SERCA)) et des gènes définis comme étant liés à la réponse au stress chez *Daphnia magna* (heat shock proteins (HSP), glutathione-S-transférase (GST), flotiline (Flot) et hormone juvénile estérase (JHP)) [249], ceux-ci ont été amplifiés à partir de l'ADN de notre espèce

(*Daphnia magna*). Les gels d'agarose présentent une amplification des gènes  $\alpha$ -Tub, GST, HSP 60, SDH, GAPDH, SERCA, Stx16, TBP, UBC. Aucune amplification n'est relevée pour les gènes ACT, Flot, HSP 70 et JHP (Figure 96a). Les gènes UBC, GST et GAPDH liés au métabolisme énergétique ainsi que le gène de l'HSP 60 présentent les plus fortes amplifications en ADNg (ADN génomique) dans notre étude, indiquant une quantité élevée de matrice pour la transcription. L'amplification de la GST montre la présence d'enzymes antioxydantes dans le génome de *Daphnia magna*. Au contraire, les gènes JHE sont peu amplifiés ici, il semble que ces gènes ne soient que peu présents chez les daphnies *D. magna*, mais cela n'implique pas pour autant qu'ils seront peu exprimés par la suite.

Concernant l'extraction d'ARN, plusieurs essais ont été réalisés avec trois et quinze daphnies. La qualité des ARN obtenue est bonne mais la quantité (5 ng/ $\mu$ L pour quinze daphnies) est quant à elle insuffisante pour réaliser une RT-qPCR (Figure 96b). A ce jour, l'analyse n'a donc pas pu être poursuivie. Toutefois de précédentes études montrent que le gène UBC est généralement induit suite à un stress et fournit l'ubiquitine nécessaire à l'élimination des protéines endommagées permettrait une réparation de l'ADN [312]. En temps normal, l'expression de ce gène doit être constante pour que les dommages à l'ADN soient réparés [268]. Dans la littérature, le gène GST présente une sous-expression en présence de fortes concentrations de nanoplastiques indiquant les dommages causés sur le système antioxydant [313]. Quant aux HSP, ce sont des protéines impliquées dans le maintien de la structure des protéines et souvent utilisées comme des marqueurs importants du stress environnemental [314]. Chez *Daphnia pulex*, une sur-expression significative de HSP a été relevée en présence de nanoplastiques [313] ce qui pourrait être aussi le cas en présence de microplastiques.

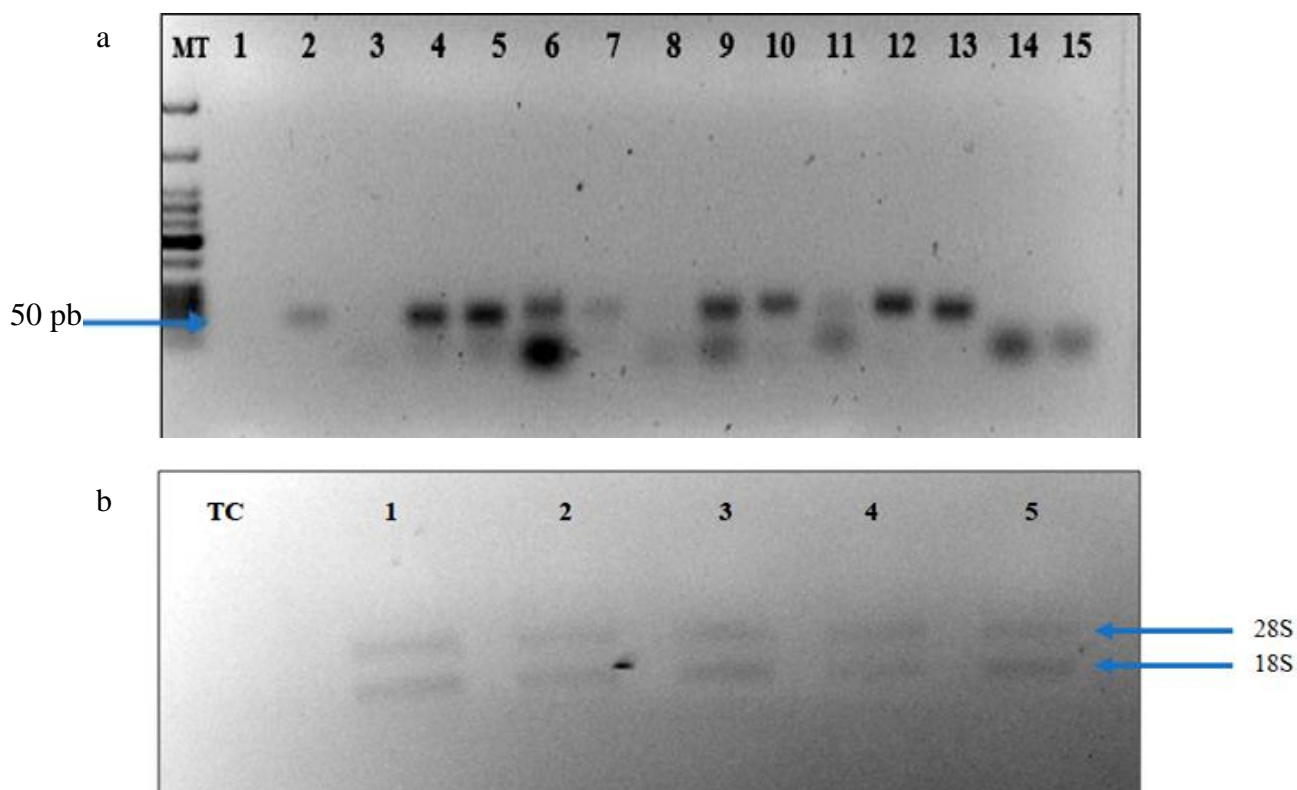


Figure 96 : Gel d'électrophorèse (a) Migration des gènes de *Daphnia magna* : MT. Marqueur de taille, 1. Act ; 2.  $\alpha$ Tub ; 3. Flot ; 4. GAPDH ; 5. GST ; 6. HSP 60 ; 7. HSP 70 ; 8. JHE ; 9. SDH ; 10. SERCA ; 11. STX16 ; 12. TBP ; 13. UBC ; 14. TSA1 ; 15. TSA2. (b) Migration de l'ARN sur le gel d'agarose 1%. TC : tampon de charge ; 1, 2, 3 : échantillon avec trois daphnies par extraction ; 4 et 5 : échantillon avec 15 daphnies par extraction.

## 2.3 Discussion sur l'impact des MP PE sur les daphnies

L'impact des MP PE sur les daphnies a été étudié à plusieurs niveaux (survie, ingestion, comportement natatoire et reproduction). Dans cette partie, une discussion sur les facteurs influençant les impacts des MP PE sur ces différents niveaux est développée.

### 2.3.1 Présence des MP PE dans le tube digestif : facteurs influents

Un premier constat est l'ingestion des MP PE par les daphnies seulement en absence de microalgues (nourriture). D'après Ogonowski et al. (2016) [103], la présence simultanée de microalgues et des microplastiques réduit l'absorption de nourriture par les daphnies. Une autre étude a montré que l'ingestion de particules de polystyrène (2  $\mu$ m) est fortement réduite en présence de nourriture [308]. De plus, il a été observé dans notre étude qu'en présence de nourriture, les daphnies se concentrent en fonction de la disponibilité de nourriture et restent dans les zones où la source d'énergie est abondante. Cette expérience réalisée en présence des

microalgues confirme que les daphnies sont capables de distinguer ce qui est comestible ou non, grâce à des récepteurs gustatifs. Ces récepteurs permettant à l'organisme de sentir son environnement de deux manières, gout (contact physique avec des objets) et odorat (détection des produits chimiques dissous dans l'eau), ont été retrouvés chez une espèce proche de *D. magna*, *Daphnia pulex* [315].

D'autre part, si les daphnies sont capables de goûter les particules, la présence ou non de surfactant sur les MP PE peut influencer la réponse des daphnies. Dans notre étude, l'ingestion des MP PE, en absence de microalgues, se fait préférentiellement quand celles-ci sont recouvertes de biosurfactant. Verge et al. (2001) [316] ont montré que la présence de surfactants comme par exemple le surfactant anionique laurylbenzènesulfonate de sodium, plus que les plastiques en eux-mêmes, entraînait des effets néfastes chez *Daphnia magna*. De même, l'étude de Pikuda et al. (2018) [310] a montré que dans le cas de nanoparticules de polystyrène, la toxicité aiguë est essentiellement due au surfactant azide de sodium et pas à la nature des particules elles-mêmes. Ainsi la nature chimique du surfactant semble être un facteur déterminant l'ingestion ou non des microplastiques.

En regardant plus en détails nos résultats concernant la toxicité aiguë, il est remarqué que l'ingestion de MP PE BS est forte alors qu'en présence de Tween, celle-ci est inexistante. Cette substance toxique pour les organismes semble dissuader les daphnies d'ingérer les microplastiques. À contrario, les MP recouverts de biosurfactants algaux (pouvant sembler plus appétissant pour les daphnies) s'accumulent dans le tube digestif des daphnies de cette condition. Les daphnies pourraient digérer la « corona » des MP PE BS contenant des macromolécules algales donnant temporairement un surplus d'énergie. De plus, Nasser et Lynch (2016) [317] ont présenté que la sécrétion de biomolécules, connue pour être une réponse proie-prédateur, entraîne la fixation par adsorption des macromolécules sur la surface de nanopolystyrènes. Ces NP PS ingérées par les daphnies ne sont pas excrétées et affectent le taux d'ingestion de nourriture. Ceci conforte notre analyse sur l'impact du biosurfactant dans la toxicité des microplastiques.



### 2.3.2 Facteurs de mortalité des daphnies

Concernant la mortalité, plusieurs facteurs semblent impacter la survie des daphnies. Dans le test de toxicité aiguë sans apport de nourriture, l'augmentation de la mortalité des daphnies, toutes conditions confondues, montre l'influence de la présence de nourriture sur la survie de ces crustacées. L'absence de nutrition des daphnies avant l'expérience est également discutée dans la littérature. Jemec et al. (2016) [318] indiquent que la mortalité sera plus forte sans pré-alimentation qu'avec. Ensuite, l'ingestion des microplastiques est le facteur prédominant la toxicité et donc la mortalité des daphnies, puisque l'ingestion de microplastiques entraîne la présence des MP PE dans le corps des daphnies et le blocage de son système digestif. De plus, la nature du surfactant est un second facteur de toxicité, puisque l'exposition aux MP PE BS entraîne les plus forts taux de mortalité comparées aux autres MP PE NS qui ne sont pas ingérées. La forte concentration des particules influence aussi la survie des daphnies, il a été montré que la concentration 60 mg/L présente des taux de survie plus faible pour les deux types de surfactant par rapport à la concentration 1 mg/L. Ce résultat est cohérent avec l'étude de Rehse et al. (2016) [100] où l' $EC_{50}$  pour des MP PE vierge de 1  $\mu\text{m}$  est de 57,43 mg/L à 96 h. Enfin, le temps d'interaction impacte également la mortalité car celle-ci est plus élevée à 21 jours dans toutes les conditions qu'à sept jours.

### 2.3.3 Modification du comportement natatoire

Dans cette étude, la vitesse de nage des daphnies est fortement diminuée après 48 h d'exposition aux MP PE avec biosurfactant et plus faiblement sans surfactant, toujours probablement pour la raison qu'elles sont plus ingérées. La distance totale parcourue reste stable si les deux types de MP PE sont comparés. Au contraire, la fréquence de saut et du nombre de tournants sont plus élevés en présence du biosurfactant. La présence de surfactant entraîne donc des modifications du comportement natatoire des daphnies. Une étude a déjà montré que la nature des microparticules affecte la nage des daphnies selon qu'elles sont minérales (kaolin) ou plastiques avec également un impact du surfactant [319]. Les résultats de cette étude montrent notamment que les MP recouverts de biofilm (BSA) rendent la nage plus coûteuse en énergie qu'en présence de microparticules minérales [319].

De plus, les fortes concentrations des MP PE provoquent également des changements de comportement natatoire avec des moments d'immobilité des daphnies (distance parcourue plus faible à 60 mg/L qu'à 1 mg/L). Ceci est en cohérence avec les résultats de Rehse et al.

(2016) [100] qui ont montré que l'ingestion de microplastiques à forte concentration pouvait entraîner l'immobilisation des daphnies. Par contre, d'autres auteurs ont montré à l'inverse que la distance parcourue et la vitesse de nage des daphnies en présence des MP PS est plus importante à forte concentration [309]. Ainsi le facteur concentration est discuté dans la littérature et ne semble pas être un facteur très important dans l'évolution du comportement des daphnies en présence de microplastiques.

#### 2.3.4 Reproduction retardée

Concernant la reproduction des daphnies, la présence des particules avec biosurfactant, surtout à faible concentration, augmente le taux de reproduction par rapport au témoin positif. Ce résultat a été également souligné en présence de MP PS (1 et 10  $\mu\text{m}$ ) par De Felice et al. (2019) [320]. Au contraire, Ogonowski et al. (2016) [103] montrent que les MP PE diminuent la reproduction des daphnies à 21 jours pour des concentrations comprises entre 0,02 à 0,20 mg/L. Notre résultat pourrait être expliqué par la source d'énergie que représente le biosurfactant pour les daphnies et suggérer ainsi que l'ingestion des particules biosurfactées influence la reproduction.

Il a également été remarqué ici un possible retard de l'apparition d'une nouvelle génération de daphnies en présence de MP PE BS, ceci est en cohérence avec la littérature existante. En effet, Pacheco et al. (2018) [97] montrent une augmentation significative du temps pour la naissance de la première génération après exposition à des microplastiques et des nanoparticules d'or. De plus, il a déjà été montré dans le cas d'un polluant chimique, le 4-nonylphenol, un impact sur la reproduction des deux premières générations de daphnies [321]. Ainsi la reproduction des daphnies semble également être influencée par l'ingestion de microplastiques au niveau de la première génération (augmentation du nombre de juvéniles) et de la deuxième génération (retard à son apparition).

## **Conclusion du chapitre 5 : Importance de la chimie de surface dans les interactions entre organismes aquatiques et microplastiques**

Les interactions des MP PE non couvertes de surfactant avec les microalgues influencent très légèrement la composition macromoléculaire de *Chlamydomonas reinhardtii* en ce qui concerne les protéines et les polysaccharides. L'impact des MP PE avec différents surfactants sur les microalgues semble faible, même à une concentration élevée par rapport à l'environnement, puisqu'à trois jours et à trois mois, il n'est pas observé de différence significative entre les microalgues témoins et les microalgues en présence de MP PE au niveau de l'intégrité membranaire et de la composition macromoléculaire de *C. reinhardtii*. Ainsi, par la différence de réponse aux MP PE avec surfactant et sans surfactant, il semblerait que la chimie de surface de ces particules soit un facteur pouvant influencer la réponse des microalgues. Mais plus globalement, les précédents résultats obtenus (cf. Chapitre 4) et ces résultats suggèrent que la taille (MP ou NP) est probablement le facteur influençant le plus la toxicité des particules de plastiques sur les microalgues puisque même lorsqu'il y a réponse avec les MP, celle-ci est minime par rapport aux modifications observées avec les NP.

En ce qui concerne les interactions daphnies-microplastiques, la présence des MP PE n'induit pas directement une toxicité aiguë pour *Daphnia magna*. C'est l'ingestion des MP PE qui est le principal facteur de la toxicité des MP sur les daphnies. Cette toxicité des microplastiques est dépendante de deux facteurs clés : la présence de nourriture (microalgues) et la nature de la chimie de surface. La concentration et le temps d'interaction influencent aussi de manière moins explicite ces interactions. Pour ce qui est des effets chroniques, les MP PE même sans ingestion semblent influencer la distance parcourue par les daphnies et leur survie.

Les effets induits par les MP PE, notamment celles biosurfactées, affectent à différents niveaux le comportement des daphnies : alimentation (blocage du tube digestif), nage (diminution de la distance de nage, de la vitesse...) et pourraient avoir une influence sur la reproduction (impact sur les générations suivantes).

En conclusion, la chimie de surface des particules de plastiques apparaît donc un paramètre important dans le suivi des interactions avec le biote bien que d'autres facteurs comme la taille et l'ingestion soit prédominants dans l'impact de ces particules.

## Points clés du chapitre

---

- La taille et le surfactant sont les deux facteurs les plus importants influençant la toxicité des particules de plastiques sur les microalgues.
  - L'ingestion des MP PE est le principal facteur de la toxicité des MP sur les daphnies.
  - La toxicité des particules de plastiques sur les organismes aquatiques est influencée par leur chimie de surface.
  - L'analyse par spectrométrie Raman a confirmé la présence des MP PE recouvertes de biosurfactant dans le tube digestif des daphnies seulement deux heures après le début de l'exposition.
  - Le comportement natatoire et la mortalité dépendent de l'ingestion des MP PE ainsi que de la présence de nourriture.
  - A moyen terme, la reproduction des daphnies est influencée par l'ingestion de MP au niveau de la première génération (augmentation du nombre de juvéniles) et de la deuxième génération (retard à son apparition).
-

# Conclusions et perspectives

---

Cette étude se place dans le contexte d'une présence maintenant avérée de nanoparticules et notamment de plastiques dans les eaux douces. Ces nanomatériaux, étant donné leurs tailles et leur grand rapport surface/volume ont des propriétés physico-chimiques différentes des matériaux bruts, ce qui fait que leur impact peut être potentiellement très différent. Dans ce cadre, il est essentiel d'étudier leur(s) interaction(s) avec des organismes des premiers maillons de la chaîne trophique aquatique (microalgues et daphnies). Effectivement, les interactions et les mécanismes de réponse des organismes en présence des particules de plastiques sont peu étudiés, notamment à l'échelle nanométrique. Si elles sont peu étudiées, c'est aussi à cause de la difficulté de suivre des particules de si petites tailles qui sont de plus souvent transparentes. Pour aborder cette problématique, le recours à la spectroscopie vibrationnelle et notamment infrarouge a montré sa capacité à suivre de manière sensible les variations de composition des microalgues suite à des stress environnementaux. Par l'utilisation d'analyse statistique telle que l'ACP et de prétraitements (LB+SNV et DISG-SNV), les spectres infrarouge ont montré des variations de composition en macromolécules en présence des nanopolystyrènes. Les interactions avec ces nanoparticules ont montré, au niveau de la composition biochimique de *Chlamydomonas reinhardtii*, **une augmentation des bandes relatives aux protéines et une diminution des bandes correspondant aux polysaccharides**. Ces modifications font suite à une adsorption des nanoparticules chargées négativement sur la paroi des microalgues. **Au contact des nanopolystyrènes, il a d'ailleurs pu être mis en évidence une perte d'intégrité membranaire confirmant le contact physique des particules avec les microalgues**. Les modifications chimiques de la membrane résultantes sont probablement liées aux variations biochimiques mis en évidence par analyse des spectres infrarouge et aux mécanismes de réponse mis en place par les microalgues.

Pour mieux comprendre les évolutions de composition macromoléculaire observées en présence des nanopolystyrènes, l'étude des réponses à des stress environnementaux plus courants et à la présence de nanoparticules d'or chez *C. reinhardtii* a également été réalisée. Les études sur les microalgues au contact avec les nanoparticules d'or n'ont pas montré de modifications ni sur l'intégrité membranaire, ni sur la composition biochimique suggérant que la présence de ces nanoparticules aux concentrations testées n'a pas eu d'impact quantifiable par notre méthodologie sur les microalgues. A ce titre, ce type de nanoparticules peuvent être suffisamment inertes pour servir de contrôle lors d'essais de toxicité menés avec d'autres types

de nanoparticules. Concernant les stress environnementaux, une forte intensité lumineuse engendre une augmentation du contenu des microalgues en astaxanthine et en polysaccharides. L'absence de lumière ou sa faible intensité se traduit par une augmentation des protéines et une diminution des lipides chez *C. reinhardtii*. La carence en azote conduit, quant à elle, aux modifications les plus importantes avec notamment une augmentation des bandes liées aux lipides et aux polysaccharides et une diminution des bandes relatives aux protéines. Enfin, le stress lié à la présence d'ions cadmium induit une diminution légère des lipides, des protéines et des polysaccharides. **Nos résultats montrent pour *C. reinhardtii* que l'interaction avec les nanoplastiques conduit à une réponse modérée comparée à la carence en nutriments, les variations d'intensité lumineuse ou encore la présence d'ions cadmium.** Ainsi les nanoplastiques aux concentrations testées ne semblent pas induire une toxicité suffisamment forte pour induire des modifications de composition importantes chez les microalgues étudiées. Cependant dans cette étude, l'utilisation de la déconvolution spectrale a permis de montrer une réelle modification au niveau des polysaccharides suite aux interactions entre *C. reinhardtii* et les nanoplastiques. Pour comprendre plus précisément ces variations, une étude de l'expression génétique nous a permis de confirmer ce type de réponse et a ainsi amélioré notre compréhension des mécanismes existants.

D'un point de vue génétique, une première analyse de l'expression des gènes suite à l'exposition aux ions cadmium a confirmé que ceux-ci induisent un stress pour les microalgues. En effet, une réponse est apportée par la sur-expression des protéines de choc thermique et des variations ont bien lieu au niveau des polysaccharides puisque le gène lié à la synthèse du xylose présente une sur-expression. **Pour ce qui est des nanoplastiques, l'expression des gènes de *C. reinhardtii* confirme un impact sur les polysaccharides avec des différences d'expression relevées pour le galactose, glucose et xylose.** Une corrélation avec la composition macromoléculaire des microalgues obtenue par la spectroscopie infrarouge a pu être mise en évidence pour les deux premiers polysaccharides. En effet, pour le galactose, l'expression des gènes ME et GE est concordante avec les variations des bandes des polysaccharides à 1109, 889 et 816  $\text{cm}^{-1}$  (liaison chimique C-O-S liée au sulfate en C6 du galactose). De même, le glucose, représenté par le gène PG et la bande à 1152  $\text{cm}^{-1}$  qui est une liaison C-O-C liée à la conformation de cet hexose, présente une différenciation de proportion en fonction du type de nanoparticule après huit jours d'interaction notamment. **Ainsi le couplage de la biologie moléculaire avec les approches spectroscopiques nous permet de mieux comprendre les interactions entre nanoparticules et microalgues en obtenant**

**notamment des informations sur les modifications subies par les microalgues et sur les réponses qu'elles mettent en place.**

Afin de pouvoir mettre à profit les résultats de cette étude dans un contexte plus global, nous avons également cherché à distinguer les facteurs qui interviennent dans ces interactions. Les interactions microalgues-nanoparticules sont évidemment dépendantes des caractéristiques physiques et chimiques des nanoparticules mais certaines de ses propriétés ont montré une influence plus ou moins importante.

i) **La nature** des particules a tout d'abord conduit à une différence de réponse des microalgues que ce soit au niveau de la composition macromoléculaire que de l'expression génétique entre les deux types de nanoparticules (Or et PS) de mêmes tailles. Néanmoins, il est difficile de savoir ce qui cause cette différence de réponse ; est-ce dû entièrement à la nature des nanoparticules ou à d'autres caractéristiques telles que le surfactant ou l'agrégation ?

ii) **La taille** bien spécifique des nanoparticules est probablement un facteur fortement influent. Dans ce travail, nous n'avons pas pu tester des particules de natures chimiques identiques avec des tailles différentes. Mais les résultats obtenus après interaction des microalgues avec des micropolyéthylène (taille moyenne autour de 0,8  $\mu\text{m}$  avec une concentration de 1 mg/L et 60mg/L) semblent indiquer que cette taille de particule a beaucoup moins d'impact que les particules de taille nanométrique, ce qui est en accord avec la littérature.

iii) **La chimie de surface** (charge et type de surfactant) des particules est un paramètre souvent négligé dans les études de toxicité alors qu'il pourrait avoir une influence très importante sur les résultats. Dans nos travaux, les deux types de nanoparticules (PS et Or) étaient chargées négativement mais le surfactant n'était pas le même, ce qui a pu influencer les interactions, peut-être plus que leur nature chimique. Cette influence du surfactant a été vérifiée grâce à nos résultats obtenus sur les micropolyéthylènes où l'effet de particules identiques mais avec des surfactants différents a pu être testé. Après interaction avec des microalgues, les résultats sont apparus assez similaires probablement parce que les impacts mesurés étaient très faibles. En revanche, sur les daphnies, des différences d'ingestion et de toxicité très significatives ont été observées en fonction du surfactant utilisé.

Si les caractéristiques des nanoparticules influencent les interactions, qu'en est-il des caractéristiques des microalgues ? La comparaison de deux souches de microalgues 2935 (type sauvage) et CC400 (mutant sans paroi) nous a permis de discriminer les deux souches au niveau

des gènes impliqués dans les voies de biosynthèse des polysaccharides, respectivement sous-exprimé et sur-exprimé indiquant un métabolisme de réponse au stress différent des deux souches. **Ainsi la paroi des microalgues a également un rôle dans ces interactions** ce qui n'est pas étonnant puisque les interactions des nanoparticules avec les microalgues ont lieu au niveau des barrières physiques des microalgues. Ces interactions donnant lieu à une adsorption sur la paroi et dans le cas des nanopolystyrènes à une modification de l'intégrité de la membrane plasmique.

Le facteur temps a également été testé puisqu'il peut aussi être un facteur de caractérisation de ces interactions. En premier lieu, l'adsorption des nanopolystyrènes s'effectue en quelques heures et les résultats d'intégrité membranaire suggèrent que des effets à court terme ont lieu (premiers jours). A ce niveau les observations sont de l'ordre de la réponse des individus. A moyen terme, peu d'évolution des mécanismes de réponse des microalgues à la présence de nanoparticules a été observée au cours de l'étude, la réponse observée est ici plus de l'ordre de la population.

Pour conclure, **les nanopolystyrènes ne semblent pas être un facteur de toxicité important pour les microalgues** puisque les effets restent modérés comparés à des polluants tels que les métaux lourds ou bien les pesticides probablement parce que les modes d'actions sont différents (internalisation des ions et molécules *vs* adsorption seulement des NP à la surface des organismes). De plus, les concentrations utilisées dans cette étude sont supérieures à celles qui sont attendues dans l'environnement d'après le modèle de prédiction de relargage de nanoparticules de Gottschalk et al. (2009). D'autre part, la chimie de surface, semble possiblement un facteur plus important que la nature même des particules. D'un point de vue expérimental, le couplage des deux approches de spectroscopie infrarouge et d'expression des gènes a montré des possibilités très intéressantes et prometteuses pour l'analyse de la réponse des microalgues à des stress. Nous avons ainsi notamment observé l'implication des polysaccharides qui sont des composés connus pour être sécrétés dans le cas d'une réponse proie-prédateur (mécanisme de défense).

Il serait d'ailleurs intéressant d'envisager **une caractérisation des polysaccharides produits par les microalgues par chromatographie en phase liquide à haute performance (HPLC) afin de confirmer l'identité des sucres impliqués** dans les variations et de pouvoir lier ces résultats à différentes natures/surfaces de nanoparticules. La possibilité de pouvoir étudier différents types de nanoplastiques avec des natures chimiques, des tailles et des chimies



de surface diverses et contrôlées reste un verrou de cette thématique. Aussi, ce type d'étude doit être poursuivi en ayant la possibilité de comparer ces divers facteurs afin de pouvoir vraiment améliorer notre compréhension des mécanismes mis en jeu durant l'interaction. Par exemple, quel est le paramètre qui influence le plus l'adsorption sur la paroi ? Pour cela, des nanoparticules d'or et de plastiques avec des surfactants identiques seraient très intéressants à observer. Concernant l'effet de la taille, il serait aussi très intéressant d'appliquer la méthodologie mise au point ici pour tester les mêmes types de nanoplastiques mais avec des tailles plus faibles, entre 5 et 20 nm de diamètre, pouvant induire une internalisation des particules. On peut supposer que les effets sur les microalgues seraient alors plus importants et cela nous permettrait de mieux comprendre la différence d'effet entre adsorption et internalisation, avec des effets peut être plus proches de certains autres stress étudiés ici. Mais pour cela, les particules doivent être rigoureusement identiques par ailleurs et leur observation serait encore plus délicate.

D'autre part, **la cartographie Raman des microalgues pourrait également nous informer sur l'évolution de la répartition des composés macromoléculaires au sein des microalgues** suite à ces interactions pour mieux comprendre leur dynamique de réponse. L'étude d'une seule microalgue, cellule unique, est possible dans notre laboratoire grâce au nouveau Raman imageur qui a été installé récemment. Malheureusement, nous n'avons pas encore eu la possibilité de mettre en place ces analyses pour suivre la réponse des microalgues au niveau individuel. Cette démarche pourrait également apporter des informations sur la localisation des mécanismes de réponse notamment dans le cas de l'étude de nanoparticules internalisées.

D'un point de vue plus général sur la pollution plastique et **pour tenter de diminuer le manque d'informations sur la diversité de réponse de polluants émergents entre chaque niveau trophique**, il pourrait également être envisagé de comparer simultanément la réponse des microalgues et d'autres organismes pour mieux comprendre les effets des micro et nanoplastiques dans un contexte écosystémique. Dans ce cadre, des travaux préliminaires ont été menés sur des consommateurs primaires *Daphnia magna*. Les résultats obtenus ont montré une sensibilité accrue (ingestion, comportement natatoire) au type de surfactant pour un même type de microparticules. La présence de récepteurs gustatifs chez ces organismes d'eaux douces leur permet de faire la différence entre la présence des microalgues (leur nourriture) et les microplastiques. Ainsi, seuls les microplastiques recouverts de biosurfactants issus d'exsudats algaux ont massivement été ingérés induisant un comportement natatoire différent et un blocage

du tube digestif chez ces organismes. **La chimie de surface des particules de plastiques est donc un paramètre important dans le suivi des interactions avec le biote.**

Enfin, il serait intéressant de poursuivre notre étude de biodisponibilité par le suivi de microalgues ayant adsorbées des nanoparticules sur des consommateurs des microalgues, les daphnies. Ceci dans le but de mimer la bioaccumulation des nanoplastiques dans la chaîne trophique aquatique et nous informer sur les effets des particules de plastique à l'échelle des communautés aquatiques.

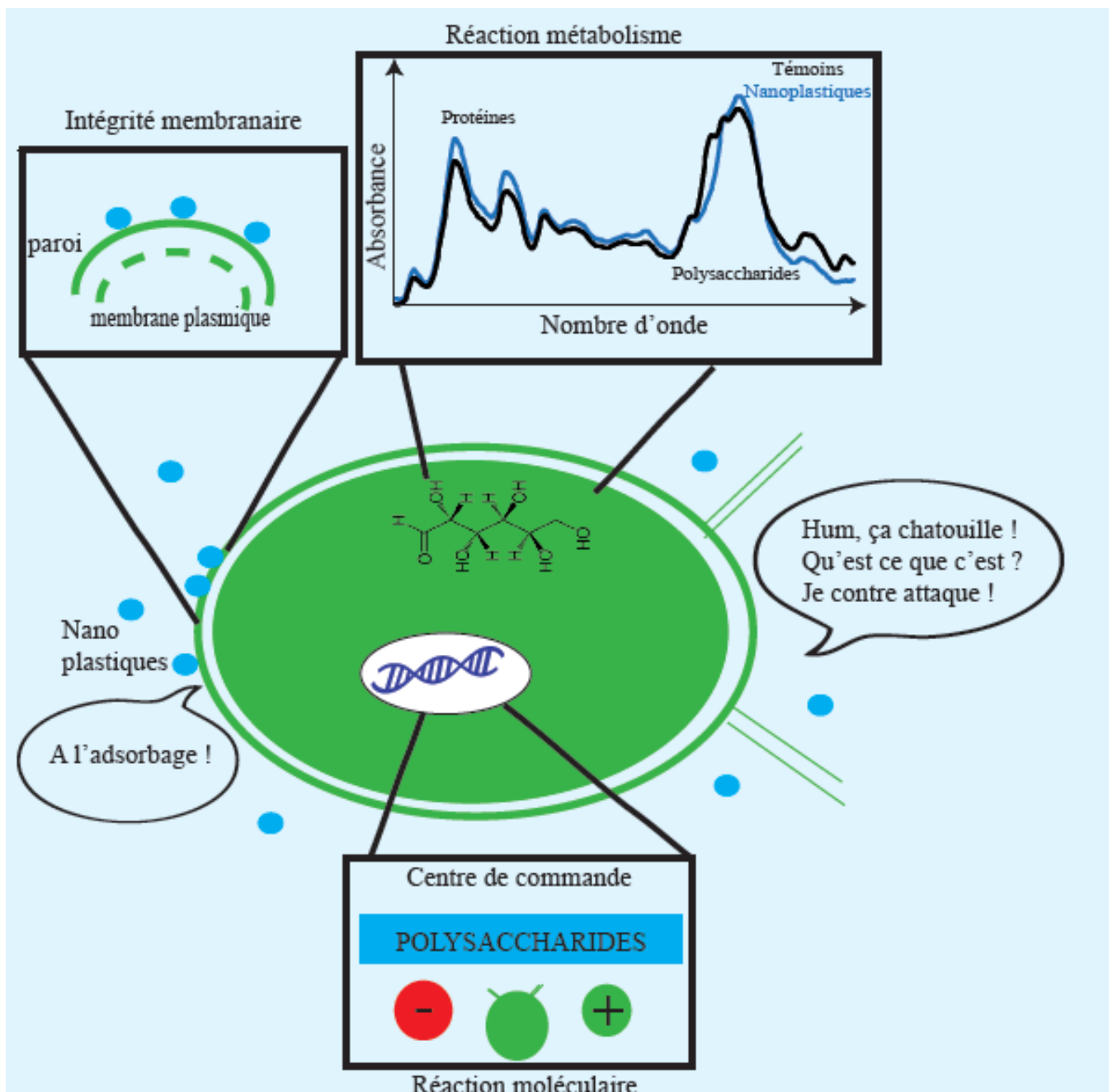


Figure décrivant les mécanismes de réponses des microalgues *Chlamydomonas reinhardtii* suite à des interactions avec les nanoplastiques.

## Conclusion annexe

Echange historique entre un passant par là et un néophyte ayant passé trois ans à regarder les interactions entre des cellules vertes et des très petits objets (si si c'est passionnant !).

Que regardez-vous comme ça ? Qu'est ce qui peut captiver autant votre attention ?

J'essaie de suivre les interactions des microalgues avec des micro et nanoparticules par spectroscopies infrarouge et Raman.

Hein ? Y'a-t-il possibilité de résumer un peu parce que c'est un incompréhensible votre baragouinage ?

Ah vous n'êtes pas breton ?

Bah non, pourquoi ?

En fait, pour tout vous dire je cherche à comprendre ce qu'il se passe quand des petits organismes verts, ou microalgues, rencontrent des particules de plastiques 100 fois plus petites (appelées nanoparticules). Comment se passe la rencontre ? Est-ce que ça les stresse ? Comment réagissent-elles ? Tout cela à partir de comparaison avec des réponses connues des microalgues aux stress environnementaux.

Ah, vous étudiez les histoires de cœur ? et c'est quoi une réponse classique des microalgues aux stress environnementaux ?

Euh en imageant on peut dire ça... En résumé, chaque stress va engendrer des « émotions » chez *Chlamydomonas reinhardtii* (nom de l'organisme) qui va donc produire des molécules. Par exemple, une forte luminosité accroît le contenu en caroténoïdes (composé qui donne la couleur aux carottes) et en sucres, tandis qu'une faible luminosité engendre une augmentation des protéines (ce qu'il faut pour construire la structure des cellules) et une diminution des lipides (graisses) chez ces microalgues. Une diminution en azote (un nutriment essentiel à la croissance des microalgues) augmente le contenu en lipides et en sucres et diminue le contenu en protéines. Alors que dans le cas du stress cadmium (métal toxique) cela induit une petite diminution de ces trois composés.

Donc les microalgues sont des êtres sensibles à leur environnement ? mais les nanoparticules, dans tout ça, peuvent-elles être un stress pour les microalgues ? les petites bêtes ne mangent pas les grosses quand même ! Et le plastique dans tout ça ?

Les nanoparticules et les matières plastiques sont de plus en plus utilisées à l'échelle mondiale, malheureusement ces entités se retrouvent dans l'environnement et dans les milieux aquatiques. Ce sont en quelque sorte des « corps étrangers » qui aujourd'hui questionnent les scientifiques sur leur possible source de pollution. Par le passé, d'autres « corps étrangers » comme les métaux lourds et les pesticides ont montré des forts impacts sur les organismes aquatiques.

Ah oui c'est embêtant ça, pas envie de m'empoisonner avec d'autres polluants ! mais du coup qu'est ce qui rend toxique les nanoparticules de plastiques ?

Les propriétés qui influencent la toxicité sont d'abord leur petite taille qui leur permet d'avoir des propriétés particulières comme une surface importante par rapport à leur volume. La charge des nanoplastiques est connue pour avoir un effet sur la toxicité et dans cette étude nous avons pu montrer que la nature des nanoparticules et notamment celle de surface (autrement dit les vêtements que les nanoplastiques vont mettre) détermine les effets sur les microalgues.

Et vous faites comment pour savoir tout ça ?

Bonne question, nous avons utilisé deux techniques, l'une, la spectroscopie infrarouge qui nous permet de distinguer de manière sensible les variations de composition des microalgues suite au stress et l'autre, la qPCR, qui permet de suivre la réponse des microalgues au niveau de l'expression des gènes.

Ok mais avec tout ça, je ne sais pas encore qu'est ce qui se passe quand les nanoplastiques rencontrent les microalgues ?

D'abord elles se disent bonjour avec un gros bisou bien baveux (comme les bébés à leur maman), ça s'appelle l'adsorption. Forcément les microalgues ne sont pas insensibles à cette marque d'attention. Il y a tout d'abord leur membrane qui est plus perméable puis cela entraîne des émotions et modifie le métabolisme au niveau des protéines et des sucres. Cela va même jusqu'à toucher leur cœur, enfin leur noyau, en influençant l'expression des gènes toujours au niveau des sucres.

Ah c'est comme ça qu'il se transmet le coronavirus ? Elles ne connaissent pas les gestes barrières ces nanoparticules ? Manque d'éducation ! Et justement en parlant de barrières, ont-elles toutes la même sensibilité ces microalgues ?

Je vous rassure tout de suite, les nanoparticules ne peuvent pas être transportées le coronavirus, elles sont trop petites. Il ne faut pas tout mélanger.

Nous avons testé deux types de microalgues (avec et sans paroi) et dans le cas des nanoplastiques, les différences ne sont pas vraiment marquées. Seule une différence au niveau de l'expression des gènes a été relevée. Mais pour répondre vraiment à votre question il faudrait comparer plusieurs espèces avec et sans paroi.

Ok et du coup, combien de temps prennent les microalgues pour réagir à cette invasion ! ?

Nous pensons que les microalgues réagissent assez vite à la présence des nanoparticules puisque l'adsorption et l'intégrité membranaire suggère que des effets à très court terme ont lieu. Alors que lorsqu'on se place à plus long terme (de l'ordre de la semaine), la réponse observée est plus stable.

Bon et à la télé ils ne parlent pas des nanoplastiques ? ils parlent des microplastiques ? Est-ce qu'on peut observer la même chose avec des microplastiques ?

D'après un premier test que nous avons réalisé, il semblerait qu'il y ait aussi des variations des protéines et des sucres mais par contre l'impact semble faible.

Dans le cadre des recherches sur les microplastiques, nous avons également étudié des petites crevettes d'eau douce, appelée daphnies.

Mais c'est quoi le rapport ?

Bah justement le rapport c'est l'échelle, la taille d'un microplastique pour une daphnie c'est à peu près la même échelle de taille qu'entre une microalgue et un nanoplastique. De plus, ce sont aussi des animaux aquatiques qui mangent les microalgues et qui vont donc potentiellement être impactés par la présence des plastiques.

Bon et alors qu'est-ce qu'elles disent les daphnies ?

Les daphnies sont sensibles surtout au type de revêtement des microplastiques car elles ont la capacité de goûter les particules avant de les manger (pas bête la bête !). Nous avons pu mettre en évidence que des microplastiques recouverts d'un revêtement, faisant penser aux microalgues, étaient avalés en nombre et impactait leur digestion et la nage des daphnies.

J'aimerais bien en savoir plus ? qu'est ce que je peux faire ?

Si vous voulez j'ai écrit un roman sur le sujet, je peux vous le faire parvenir et vous pouvez toujours vous mettre à la recherche ! 😊

# Annexes

## 1 Etat de l'art

Tableau 1-A : Synthèse des caractéristiques des nanoparticules (NP) métalliques (type, surfactant, charge, taille primaire (diamètre, agrégation (taille instable des NP) et microalgues exposées aux NP (environnement, espèce et présence/absence d'une paroi) : n.a. : pas d'indications

Auteurs	Nanoparticules					Microalgues			
	Type	Surfactant	Charge (mV)	Taille primaire (nm)	Agrégation	Environnement	Espèces	Paroi	
Renault et al. 2008	Or	amine	n.a.	10	oui	Eau douce	<i>Scenedesmus subspicatus</i>	oui	
Iswarya et al. 2016		citrate		16	non				
				27					
				37					
		PVP		16	oui				
				27					
				37					
Eroglu et al. 2013		non		30 par 14	n.a.		<i>Chlorella vulgaris</i>		
Ksiazzyk et al. 2015				Pt	51		oui		<i>Pseudokirchneriella subcapitata</i>
				Ag	34				

Simon et al. 2013		polyacrylate	-25,5	20	non		<i>Chlamydomonas reinhardtii</i>	
Eroglu et al. 2013		n.a.		10	n.a.		<i>Chlorella vulgaris</i>	
Kustov et Abramenko 2016		SDS		10-12	n.a.		<i>Chlorella vulgaris</i>	
Leclerc et Wilkinson 2014		polyacrylate	n.a.	5	non		<i>Chlamydomonas reinhardtii</i>	
Barwal et al. 2011		non		5;15				
				5;35				
Navarro et al. 2008b		carbonate	-36	25	oui			
			-36	40				
Navarro et al. 2015		chitosan	-5,1	25	non			
		citrate	-29	17				
		dexpanthenol	-3,8	456	oui			
		gélatine	-6,8	52	non			
		lactate	-3,5	350	oui			
		sodium dodécyl benzènesulfonate	-29	45	non			
		polyéthylène glycol (PEG)	-5,5	70				
	polvinylpyrrolidone (PVP)	-6,3	84	oui				

Wang et al. 2016		polvinylpyrrolidone (PVP)	-21	7,5-16,5	n.a.			
Miao et al. 2010		carbonate	n.a.	<10	oui		<i>Ochromonas danica</i>	
Zhang L. et al. 2017		fluorescent	-15,5	2	non		<i>Scenedesmus obliquus</i>	
Yue et al. 2017		citrate	-25	19,4			<i>Euglena gracilis</i>	
Sendra et al. 2017a			-5,6	16,7		Eau saumâtre	<i>Dunaliella salina</i>	non
Burchardt et al. 2012		non	-38	20	oui	Eau de mer	<i>Thalassiosira pseudonana</i>	frustule
			-49	40				
			-48	100				
Miao et al. 2009		carbonate	n.a.	60-70			<i>Thalassiosira weissflogii</i>	
Lodeiro et al. 2017		Tween 20 et Polyéthylène Glycérol Trioléate	-4	48			<i>Chaetoceros curvisetus</i>	
Zhang X. et al. 2017		n.a.	n.a.	45			<i>Chlorella vulgaris</i>	oui
Chen et al. 2018	Co	non	-13,8	30		Eau de mer	<i>Platymonas subcordiforus</i>	oui
							<i>Chaetoceros curvisetus</i>	frustule
							<i>Skeletonema costatum</i>	



Tableau 1-B: Synthèse des caractéristiques des nanoparticules (NP) d'oxydes métalliques (type, surfactant, charge, taille primaire (diamètre, agrégation (taille instable des NP) et microalgues exposées aux NP (environnement, espèce et présence/absence d'une paroi) : n.a. : pas d'indications

Auteurs	Nanoparticules					Microalgues						
	Type	Surfactant	Charge (mV)	Taille primaire (nm)	Agrégation	Environnement	Espèces	Paroi				
Cheloni et al. 2016	CuO	non	-25	30-50	oui	Eau douce	<i>Chlamydomonas reinhardtii</i>	oui				
von Moos et al. 2015			-20	30-50					non			
Perreault et al. 2012		polystyrène-co-butyl acrylate	-51	30-40								
Saison et al. 2010		PS	n.a.	80								
Melegari et al. 2013		non	non	-35				30-40				
Kulacki et Cardinale 2012	n.a.			27			oui	Eau douce	<i>Scenedesmus quadricauda</i>			
Chen et al. 2017	n.a.			20-30								
Wang et al. 2008	n.a.			21								
Hartmann et al. 2010	-23			10								
	-21			30								
	-25			300								
Dauda et al. 2017	n.a.			<25	n.a.	oui				Eau de mer	<i>Thalassiosira pseudonana</i>	frustule
Simon et al. 2013	-24			5	non							
Lee et An 2013	-13,3			21	oui							Eau de mer
Miller et al. 2010	n.a.	15-20										
	n.a.	15-20										
	-13,2	21										
Xia et al. 2015	-8,1	60	oui	Eau de mer			<i>Nitzschia closterium</i>	frustule				
	-6,4	400										
Hu et al. 2017	-19	5	oui	Eau douce	<i>Isochrysis galbana</i>		oui					
Taylor et al. 2016	PVP	n.a.						4-5	non			<i>Chlamydomonas reinhardtii</i>
	CeO <sub>2</sub>	58% Ce <sup>3+</sup>	-12,2	5	oui	<i>Pseudokirchneriella subcapitata</i>	oui					

Pulido-Reyes et al. 2015	Zn	28% Ce <sup>3+</sup>	-25,6	7						
		40% Ce <sup>3+</sup>	-21,2	18						
		26% Ce <sup>3+</sup>	-24,4	50						
		36% Ce <sup>3+</sup>	-21,1	350 sur 20						
Manier et al. 2011		non	20	25						
Manier et al. 2013		citrate triammonium non vieilli	-21	10						
		citrate triammonium vieilli 3 jours	n.a.							
		citrate triammonium vieilli 30 jours	n.a.							
Sendra et al. 2017b		non	23,6	26						
Röhder et al. 2014		non	0	140						
			0	140						
			4	26						
			-22	9						
Sendra et al. 2017a		non	3,2	26						
	3,2		26							
	-10		9							
	-10		9							
Simon et al. 2013	non	non	2,7	20	non	Eau de mer	<i>Chlamydomonas reinhardtii</i>	oui		
Lee et An 2013			-23,3	<100			<i>Pseudokirchneriella subcapitata</i>			
Yung et al. 2017			3-aminonpropyltriméthoxysilane	-			24		oui	Eau douce
		dodécyltrichlorosilane		23			<i>Chlorella pyrenoidosa</i>			
		non	n.a.	23						

		3-aminonpropyltriméthoxysilane	-	24				
		dodécyltrichlorosilane		23				
		non	n.a.	23				
		3-aminonpropyltriméthoxysilane	-	24				
		dodécyltrichlorosilane		23				
		non	n.a.	23				
		3-aminonpropyltriméthoxysilane	-	24				
		dodécyltrichlorosilane		23				
Schiavo et al. 2016			-10	100				
Suman et al. 2015				40-48	n.a.			
Miller et al. 2010				20-30				
Schiavo et al. 2017				20-30				
				<100				
				6,3-15,7				
				242-862	oui			
				6,3-15,7				
				242-862				
			6,3-15,7					
			242-862					
Balusamy et al. 2015	La <sub>2</sub> O <sub>3</sub>	non	14	60	non	Eau de mer	Chlorella sp.	frustule
Oukarroum et al. 2017	NiO			30	oui		Chlorella vulgaris	
Gong et al. 2011		n.a.	20		Thalassiosira pseudonana			
He et al. 2017	Fe <sub>2</sub> O <sub>3</sub>	n.a.	<30	n.a.	Dunaliella tertiolecta			
	MgO		<50		Thalassiosira pseudonana	frustule		
Pakrashi et al. 2013	Al <sub>2</sub> O <sub>3</sub>	non	12	82	Chaetoceros gracilis			
			17	247		Phaeodactylum tricornutum		
						Eau douce	Chlorella ellipsoidea	oui

Tableau 1-C: Synthèse des caractéristiques des nanoparticules (NP) de plastique, silice et Quantum Dot (QD) (type, surfactant, charge, taille primaire (diamètre, agrégation (taille instable des NP) et microalgues exposées aux NP (environnement, espèce et présence/absence d'une paroi) : n.a. : pas d'indications

Auteurs	Type	Nanoparticules			Microalgues				
		Surfactant	Charge (mV)	Taille primaire (nm)	Agrégation	Environnement	Espèces	Paroi	
Bhattacharya et al. 2010	PS	COOH	-40	20	oui	Eau douce	<i>Scenesdesmus</i>	oui	
		NH <sub>2</sub>	106						
		COOH	-40				<i>Chlorella</i>		
		NH <sub>2</sub>	106						
Besseling et al. 2014		SDS	n.a.	70	n.a.		<i>Scenesdesmus obliquus</i>		
Nolte et al. 2016		COOH	-54	110	oui		<i>Pseudokirchneriella subcapitata</i>		
		NH <sub>2</sub>	106	20			<i>Chlorella vulgaris</i>		
Sjollema et al. 2016		COOH	n.a.	500	n.a.		Eau de mer		<i>Thalassiosira pseudonana</i>
		non		50			Eau saumâtre		<i>Dunaliella tertiolecta</i>
				500					

Bergami et al. 2017		COOH	-66	40	oui			
		NH <sub>2</sub>	53	50				
Li 2015		Fluorophore	-24	50	non	Eau douce	<i>Euglena gracilis</i>	non
							<i>Haematococcus pluvialis</i>	oui
			-44	500			<i>Chlamydomonas reinhardtii</i>	oui
								non
Casado et al. 2013		Polyéthylèneimine	40	55	oui		<i>Pseudokirchneriella subcapitata</i>	oui
			110					
Fujiwara et al. 2008	Si	non	n.a.	5	n.a.	Eau douce	<i>Chlorella kessleri</i>	oui
				26				
Van Hoecke et al. 2008				12.5	non		<i>Pseudokirchneriella subcapitata</i>	
			-	27				
Wang et al. 2008	QD		n.a.	3,5-4,5	oui		<i>Chlamydomonas reinhardtii</i>	

Tableau 1-D: Synthèse des effets des nanoparticules métalliques sur les microalgues (temps et concentration de toxicité, types d'effet : croissance, ombrage, photosynthèse, stress oxydatif, relargage d'ions, internalisation) ; n.a. : non indiqué.

Auteurs	Nanoparticules		Microalgues	Effet toxique			Types d'effets										
	Type	Surfactant		Espèces	Oui/ Non	Concentration d'effet (mg/L)	Temps (h)	Croissance	Ombra ge	Photosynthèse	Stress oxydatif	Ions	Internalisation	Autres			
Renault et al. 2008	Au	amine	<i>Scenedesmus subspicatus</i>	oui	1,59x10 <sup>-6</sup>	24	oui	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	oui	adsorption				
Iswarya et al. 2016		citrate	<i>Chlamydomonas reinhardtii</i>		0,01	72				n.a.	n.a.	n.a.		n.a.	n.a.	n.a.	n.a.
		PVP			n.a.	n.a.				n.a.							
Eroglu et al. 2013		non	<i>Chlorella vulgaris</i>	non	n,a,	n.a.	n.a.		oui	n.a.	n.a.	production de caroténoïdes					
Ksiazzyk et al. 2015			Pt	<i>Pseudokirchneriella subcapitata</i>	oui	22,2	72		oui	n.a.	n.a.	non	baisse de la chlorophylle				
		5				oui						baisse de la chlorophylle					
		Simon et al. 2013	polyacrylate	<i>Chlamydomonas reinhardtii</i>	n.a.	1	2		oui	oui	non	oui	sur-expression des gènes				
Eroglu et al. 2013		n.a.	<i>Chlorella vulgaris</i>	non		n.a.	n.a.		oui	n.a.	n.a.	n.a.	production de caroténoïdes				
Kustov et Abramenko 2016		Ag	SDS	<i>Chlorella vulgaris</i>	oui	0,067	22		oui	n.a.	n.a.	oui	oui	n.a.	n.a.		
Leclerc et Wilkinson 2014			polyacrylate	<i>Chlamydomonas reinhardtii</i>		0,01	2		n.a.			n.a.	n.a.	sur-expression des genes			
Barwal et al. 2011	Non		n.a.			n.a.	n.a.	n.a.	oui			n.a.					
	carbonate		7,75			5	n.a.	oui	n.a.								
Navarro et al. 2008b																	

Navarro et al. 2015				2,72	1					n.a.		
	chitosan			3,03								
	citrate			4,91								
	dexpanthenol			0,26								
	gélatine			4,41								
	lactate			1,89								
	sodium dodécyl benzenesulfonate			3,51								
	polyéthylène glycol (PEG)			1,19								
	polvinylpyrrolidone (PVP)			0,74								
	polvinylpyrrolidone (PVP)			2		48						n.a.
Wang et al. 2016								n.a.			oui	
Miao et al. 2010	carbonate	<i>Ochromonas danica</i>		0,14							n.a.	
Zhang L. et al. 2017	fluorescent	<i>Scenedesmus obliquus</i>		0,03	96						oui	variation transcriptomique
Yue et al. 2017	citrate	<i>Euglena gracilis</i>		0,16	1				oui	oui		inhibition de l'activité enzymatique
Sendra et al. 2017b	non	<i>Dunaliella salina</i>		5	72						n.a.	n.a.
Burchardt et al. 2012		<i>Thalassiosira pseudonana</i>		0,01					n.a.	n.a.		
				0,02								
Miao et al. 2009	carbonate	<i>Thalassiosira weissflogii</i>	non	0,4	48				non			production d'EPS
Lodeiro et al. 2017	Tween20 et Polyéthylène Glycérol Trioléate	<i>Chaetoceros curvisetus</i>	oui	0,041					oui	non	non	

Zhang X. et al. 2017		n.a.	<i>Chlorella vulgaris</i>		1				non	oui	oui	oui	
Chen et al. 2018	Co	non	<i>Platymonas subcordiformis</i>	96	67,2	oui		oui	oui	n.a.		non	Adsorption
			<i>Chaetoceros curvisetus</i>		38,6								
			<i>Skeletonema costatum</i>		21,5								

Tableau 1-E : Synthèse des effets des nanoparticules d'oxyde métalliques sur les microalgues (temps et concentration de toxicité, types d'effet : croissance, ombrage, photosynthèse, stress oxydatif, relargage d'ions, internalisation) ; n.a. : non indiqué.

Auteurs	Nanoparticules		Microalgues	Effet toxique			Type d'effet								
	Type	Surfactant	Espèces	Oui/Non	Concentration d'effet (mg/L)	Temps (h)	Croissance	Ombrage	Photosynthèse	Stress oxydatif	Ions	Internalisation	Autres		
Cheloni et al. 2016	CuO	non	<i>Chlamydomonas reinhardtii</i>	oui	0,8	4	non	oui	n.a.	non	oui	n.a.	n.a.		
von Moos et al. 2015					10	5							non	perméabilité de la membrane	
Perreault et al. 2012		poly(styrène-co-butyl acrylate)			4	6	n.a.			oui	oui	n.a.	oui	n.a.	
Saison et al. 2010		PS			20	6			n.a.					n.a.	n.a.
Melegari et al. 2013						150	72	oui				n.a.	oui	oui	diminution des niveaux de caroténoïdes
Kulacki et Cardinale 2012	TiO <sub>2</sub>	non	<i>Scenedesmus quadricauda</i>	oui	n.a.	n.a.			n.a.	n.a.	non	non	n.a.		
Chen et al. 2017			<i>Chlamydomonas reinhardtii</i>		130	3	n.a.	oui							
Wang et al. 2008					10	72	oui	n.a.		non	oui			n.a.	sur-expression des gènes
Hartmann et al. 2010			<i>Pseudokirchneriella subcapitata</i>		241										
		71,1													
					145			n.a.					n.a.		



Dauda et al. 2017	CeO <sub>2</sub>		<i>Chlorella vulgaris</i>		0,1	96					n.a.			
Simon et al. 2013			<i>Chlamydomonas reinhardtii</i>		1	2	n.a.	oui	oui	non	non	oui	genes sous exprimés	
Lee et An 2013			<i>Pseudokirchneriella subcapitata</i>		2,5	72	oui	non	n.a.	oui	n.a.	n.a.	n.a.	
Miller et al. 2010			<i>Thalassiosira pseudonana</i>	non	> 1	96	non	n.a.		non	n.a.			n.a.
			<i>Dunaliella tertiolecta</i>											
Xia et al. 2015			<i>Nitzschia closterium</i>		89	96	oui	n.a.	oui	n.a.	oui	n.a.	oui	dommages membranaires
					119									
					179									
Hu et al. 2017			<i>Isochrysis galbana</i>	oui	20			non	non	n.a.		n.a.	n.a.	
Taylor et al. 2016			PVP	<i>Chlamydomonas reinhardtii</i>		80	72	non		non		oui	oui	gènes sur-exprimés
Pulido-Reyes et al. 2015			58% Ce <sup>3+</sup>	<i>Pseudokirchneriella subcapitata</i>	non	1		oui	n.a.	n.a.	oui	n.a.	n.a.	adsorption
			28% Ce <sup>3+</sup>			50		non			non			
			40% Ce <sup>3+</sup>											
		26% Ce <sup>3+</sup>												
		36% Ce <sup>3+</sup>												
Manier et al. 2011		non			11,5				n.a.		n.a.	n.a.		
Manier et al. 2013		citrate triammonium non vieilli	oui		5,6		oui	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	adsorption	
		citrate triammonium vieilli 3 jours		4,1										
		citrate triammonium vieilli 30 jours		6,2										
Sendra et al. 2017b		non	<i>Chlorella autotrophica</i>		1			non	non	oui		variation de la complexité cellulaire		
					4,36	2	n.a.		oui	oui		adsorption		

Röhder et al. 2014					3,66									
Sendra et al. 2017a			<i>Chlamydomonas reinhardtii</i>		100	72	oui	n.a.			n.a.	oui	dommages membranaires	
					200		non				non			
					10		oui				oui	dommages membranaires		
					200		non				non	n.a.		
	non													
Simon et al. 2013			<i>Chlamydomonas reinhardtii</i>		1	2	n.a.	oui	oui	oui	non	oui	sur expression des gènes	
Lee et An 2013			<i>Pseudokirchneriella subcapitata</i>		<0,05	72			n.a.	oui	oui		destabilisation membranaire	
Yung et al. 2017	Zn		<i>Chlamydomonas reinhardtii</i>	oui	<10	96	oui	n.a.	oui	n.a.			n.a.	n.a.
					10									
					15									
			20											
			30											
			40											
			20											
			25											
			35											
			5											
			5											
			<i>Chlorella pyrenoidosa</i>										n.a.	
			<i>Pseudokirchneriella subcapitata</i>											
			<i>Thalassiosira pseudonana</i>											diminution de la formation du frustule

		dodécyltrichlorosilane			10								n.a.	
Schiavo et al. 2016			<i>Dunaliella tertiolecta</i>		5		72				n.a.	oui		inhibition de la division cellulaire
Suman et al. 2015			<i>Chlorella vulgaris</i>		100					oui	oui			peroxydation lipidique et dommages membranaires
Miller et al. 2010			<i>Thalassiosira pseudonana</i>		0,5	96							n.a.	
Schiavo et al. 2017			<i>Dunaliella tertiolecta</i>		1									n.a.
			<i>Thalassiosira pseudonana</i>		2,2									
Peng et al. 2011			<i>Chaetoceros gracilis</i>		10		72						oui	
			<i>Phaeodactylum tricornutum</i>	non					non					n.a.
Balusamy et al. 2015	La <sub>2</sub> O <sub>3</sub>		Chlorella sp.	non	1000							n.a.	augmentation des niveaux de chlorophylle	
Oukarroum et al. 2017	NiO	non	<i>Chlorella vulgaris</i>		13,7	96			oui	oui	oui	oui	n.a.	
Gong et al. 2011					32,28	72			oui	n.a.	n.a.			
He et al. 2017	Fe <sub>2</sub> O <sub>3</sub>	n.a.	<i>Scenedesmus obliquus</i>	oui	40	96	oui							
	MgO				0,8	72								
Pakrashi et al. 2013	Al <sub>2</sub> O <sub>3</sub>	non	<i>Chlorella ellipsoidea</i>		0,001				n.a.	n.a.	non	oui	n.a.	augmentation du contenu lipidique et de l'activité de la peroxydase

Tableau 1-F : Synthèse des effets des nanoparticules de plastiques, silice et quantum dot (QD) sur les microalgues (temps et concentration de toxicité, types d'effet : croissance, ombrage, photosynthèse, stress oxydatif, relargage d'ions, internalisation) ; n.a. : non indiqué.

Auteurs	Nanoparticules		Microalgues	Effet toxique			Types d'effet											
	Type	Surfactant	Espèces	Oui/Non	Concentration d'effet (mg/L)	Temps (h)	Croissance	Ombrage	Photosynthèse	Stress oxydatif	Internalisation	Autres						
Bhattacharya et al. 2010	PS	COOH	<i>Scenedesmus</i>	oui	6,5	2	n.a.	possible	oui	non	non	n.a.						
		NH <sub>2</sub>								oui								
		COOH	<i>Chlorella</i>							non								
		NH <sub>2</sub>								oui								
Besseling et al. 2014		SDS	<i>Scenedesmus obliquus</i>	oui	1000	72	oui	n.a.	oui	n.a.	n.a.							
Nolte et al. 2016		COOH	<i>Pseudokirchneriella subcapitata</i>	non			non		n.a.				n.a.	n.a.				
		NH <sub>2</sub>		oui	40		oui								n.a.			
Sjollema et al. 2016		COOH	<i>Chlorella vulgaris</i>	oui	250		72		non				oui	non	n.a.	non		
			<i>Thalassiosira pseudonana</i>															
		non	<i>Dunaliella tertiolecta</i>														251	oui
		COOH						non									50	non
Bergami et al. 2017		COOH		non	50		non	n.a.	n.a.				non	n.a.				

		NH <sub>2</sub>		oui	12,97		oui			oui		
Li 2015		fluorophore	<i>Euglena gracilis</i>	oui	1000	2	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	non	variation morphologique
			<i>Haematococcus pluvialis</i>	non								flagelles couvert par les particules
			<i>Chlamydomonas reinhardtii wild type</i>	non								excrétion d'EPS
			<i>Chlamydomonas reinhardtii mutant</i>									excrétion d'EPS
Casado et al. 2013		Polyethyleneimine	<i>Pseudokirchneriella subcapitata</i>	oui	0,58 (55nm) 0,54 (110nm)	72	oui			n.a.		
Fujiwara et al. 2008	Si	non	<i>Chlorella kessleri</i>	oui	800(0,8% <i>m/v</i> )	96	oui	n.a.	oui	n.a.	non	oui
7100(7,1% <i>m/v</i> )												
9100 (9,1% <i>m/v</i> )												
Van Hoecke et al. 2008					<i>Pseudokirchneriella subcapitata</i>	20			72		oui	n.a.
		28,8										
Wang et al. 2008	QD		<i>Chlamydomonas reinhardtii</i>		5				non	oui	n.a.	Sur-expression des genes

## 2 Matériels et méthodes

**Tableau 2-A: Composition et préparation du milieu TAP (Tris acétate phosphate), conservé à température ambiante après autoclavage.**

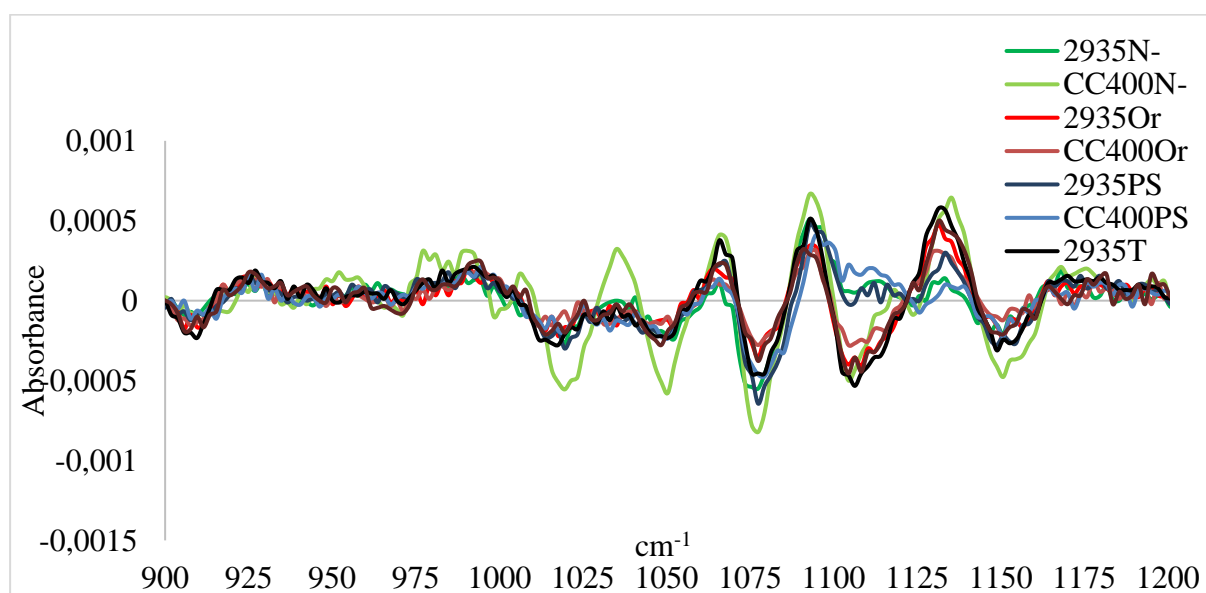
Quantité	1 L
Tris base	2,42 g
Solution TAP Sels : NH <sub>4</sub> Cl (15 g/L), MgSO <sub>4</sub> , 7H <sub>2</sub> O (4 g/L)	25 mL
Solution phosphate : K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> (28,8 g/L), KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> (14,4 g/L)	0,375 mL
Solution Hunter éléments traces : EDTA-Na <sub>2</sub> (50 g/L), ZnSO <sub>4</sub> , 7H <sub>2</sub> O (22 g/L), H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub> (11,4 g/L), MnCl <sub>2</sub> , 4H <sub>2</sub> O (5,06 g/L), CoCl <sub>2</sub> , 6H <sub>2</sub> O (1,61 g/L), CuSO <sub>4</sub> , 5H <sub>2</sub> O (1,57 g/L), (NH <sub>4</sub> ) <sub>6</sub> Mo <sub>7</sub> O <sub>24</sub> , 4H <sub>2</sub> O (1,1 g/L), FeSO <sub>4</sub> , 7H <sub>2</sub> O (4,99 g/L)	1 mL
Solution d'acide acétique (100 %)	1 mL
Eau osmosée	qsp

**Tableau 2-B : Composition du milieu ISO, milieu de culture des daphnies.**

Solutions	Poids moléculaire initial (g/mol)	Concentration finale (mol/L)	Masse (g)	Volume final
CaCl <sub>2</sub> , 2H <sub>2</sub> O	147	0,080	11,76	1 L
MgSO <sub>4</sub> , 7H <sub>2</sub> O	246,5	0,020	4,93	
NaHCO <sub>3</sub>	84	0,031	2,59	
KCl	74,5	0,003	0,23	

Les solutions mères de chaque produit présenté dans le tableau 2-B sont réalisées. Mélanger 25 mL de chaque solution et compléter avec de l'eau déminéralisée qsp 1 L. Le pH est vérifié et doit être compris entre 7,5 et 8,5 et le milieu est ensuite autoclavé.

### Déconvolution du spectre



**Figure 97 : Prétraitement D2SG sur la zone d'étude 900-1200 cm<sup>-1</sup> des spectres moyens *C. reinhardtii* (souche 2935 et CC400) suite à des interactions avec des nanoparticules d'or, de polystyrène, en limitation azoté ou condition témoin.**

### 3 Intérêt des spectroscopies vibrationnelles dans l'étude des réponses aux stress environnementaux chez *Chlamydomonas reinhardtii*

#### 3.1 Raman : résultats complémentaires : spectres bruts

Les spectres Raman bruts de *C. reinhardtii* 2935 obtenus sous différentes intensités d'éclairage sont présentés ci-dessous (Figure 98).

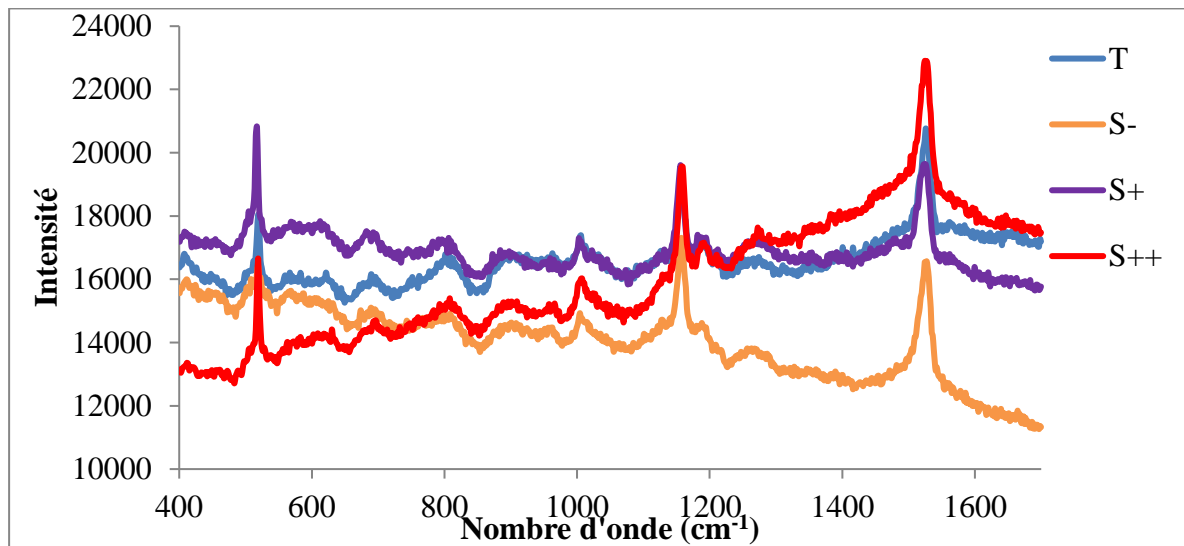


Figure 98 : Exemples de quatre spectres Raman bruts de *C. reinhardtii* 2935 sous différentes conditions lumineuses. Témoin (bleu), faible intensité lumineuse (Stress-, orange), forte intensité lumineuse (Stress+, violet), très forte intensité lumineuse (Stress ++, rouge).

Pour la souche mutante CC400, avec peu de paroi, le spectre Raman à 532 nm est présenté sur la Figure 99. Les principales bandes présentées sur la souche 2935 y sont retrouvées.

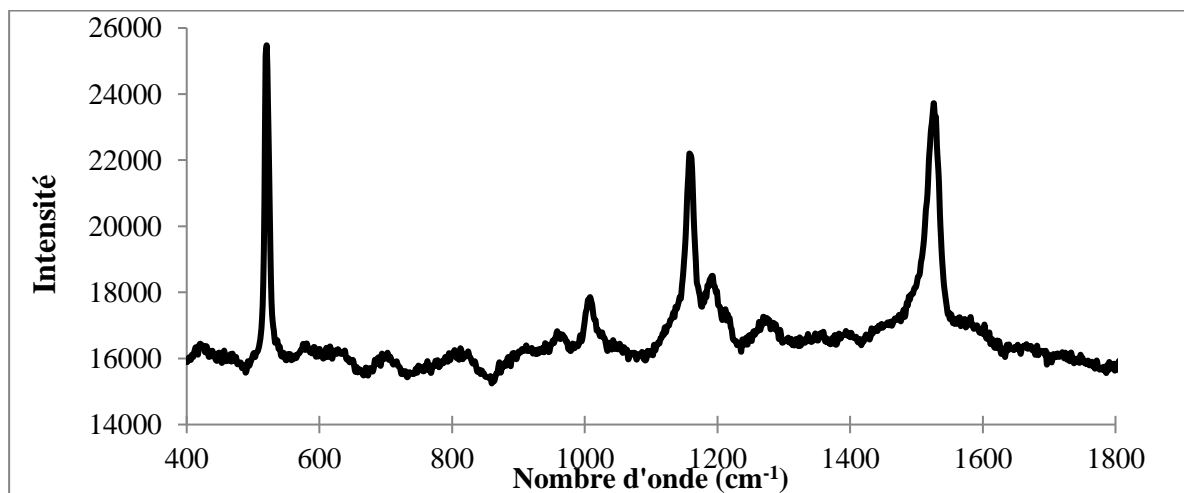


Figure 99 : Spectre Raman de *C. reinhardtii* CC400 à 532 nm (Xplora) en conditions normales

### **3.2 Raman : résultats complémentaires : comparaison 2 à 2 des conditions stress lumineux**

Une comparaison deux à deux des conditions a été réalisée pour tenter de discriminer les stress lumineux après un et quatre jours. A un jour, il n'y a pas de différenciation observée entre les conditions prises deux à deux (Figure 100 et Figure 101). Après quatre jours, il est à noter que les conditions témoins et stress lumineux – se superposent (Figure 102a). Tandis que les spectres des conditions stress + et stress ++ se différencient plus nettement du groupe témoin (Figure 102b et c). La variance expliquée par la composante 1 varie de 55 à 84 % (Figure 102), ainsi pour la comparaison stress ++/témoin, il y a ainsi seulement la moitié de l'information contenue dans le spectre qui est expliquée par la composante 1. Les graphiques des loadings des composantes sont similaires à ce qui a été observé précédemment (Figure 103).



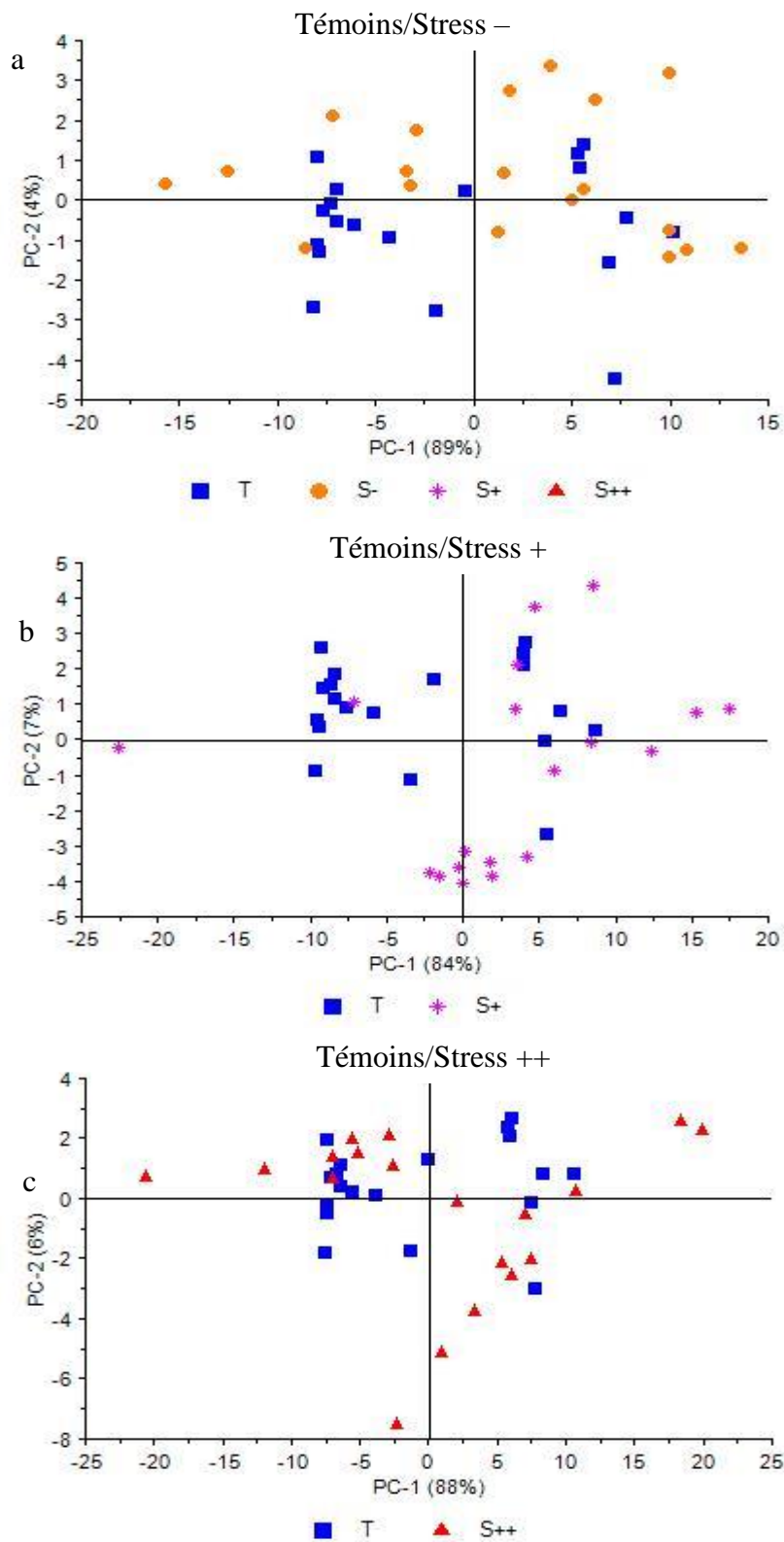


Figure 100 : ACP 2 à 2 spectres après ligne de base et normalisation moyenne (LB+Norm) des spectres Raman de *C. reinhardtii*. 2935 après un jour de stress lumineux (a) Témoin/Stress- (b) Témoin/Stress + (c) Témoin/Stress ++. Témoin (carré bleu), faible intensité lumineuse (Stress -, rond orange), forte intensité lumineuse (Stress +, étoile violet), très forte intensité lumineuse (Stress ++, triangle rouge).

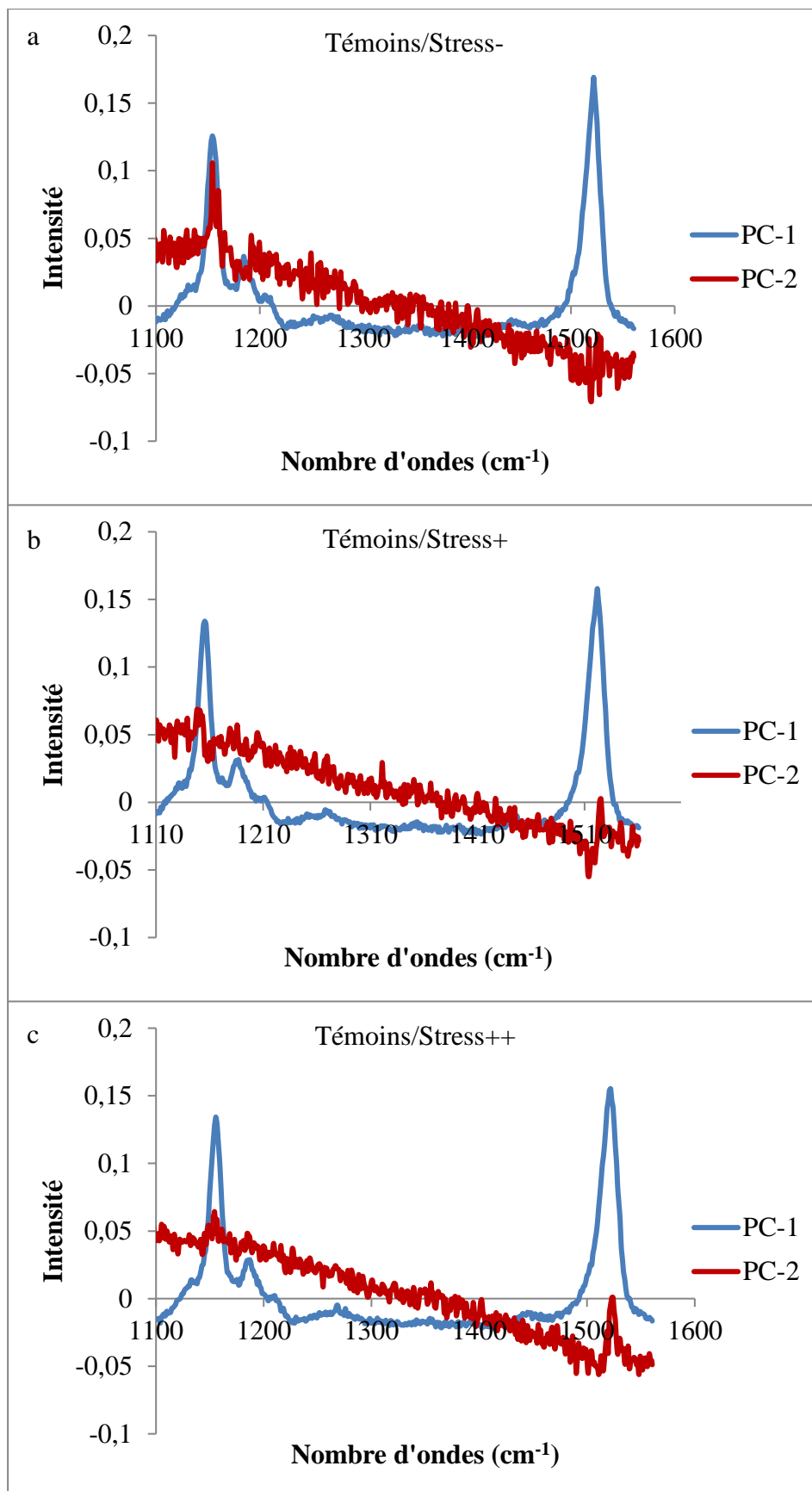


Figure 101 : X loadings ACP 2 à 2 spectres LB+Norm moyens Raman de *C. reinhardtii*, 2935 après un jour de stress lumineux (a) Témoins/Stress- (b) Témoins/Stress + (c) Témoins/Stress ++. PC1 (bleu) et PC2 (rouge).

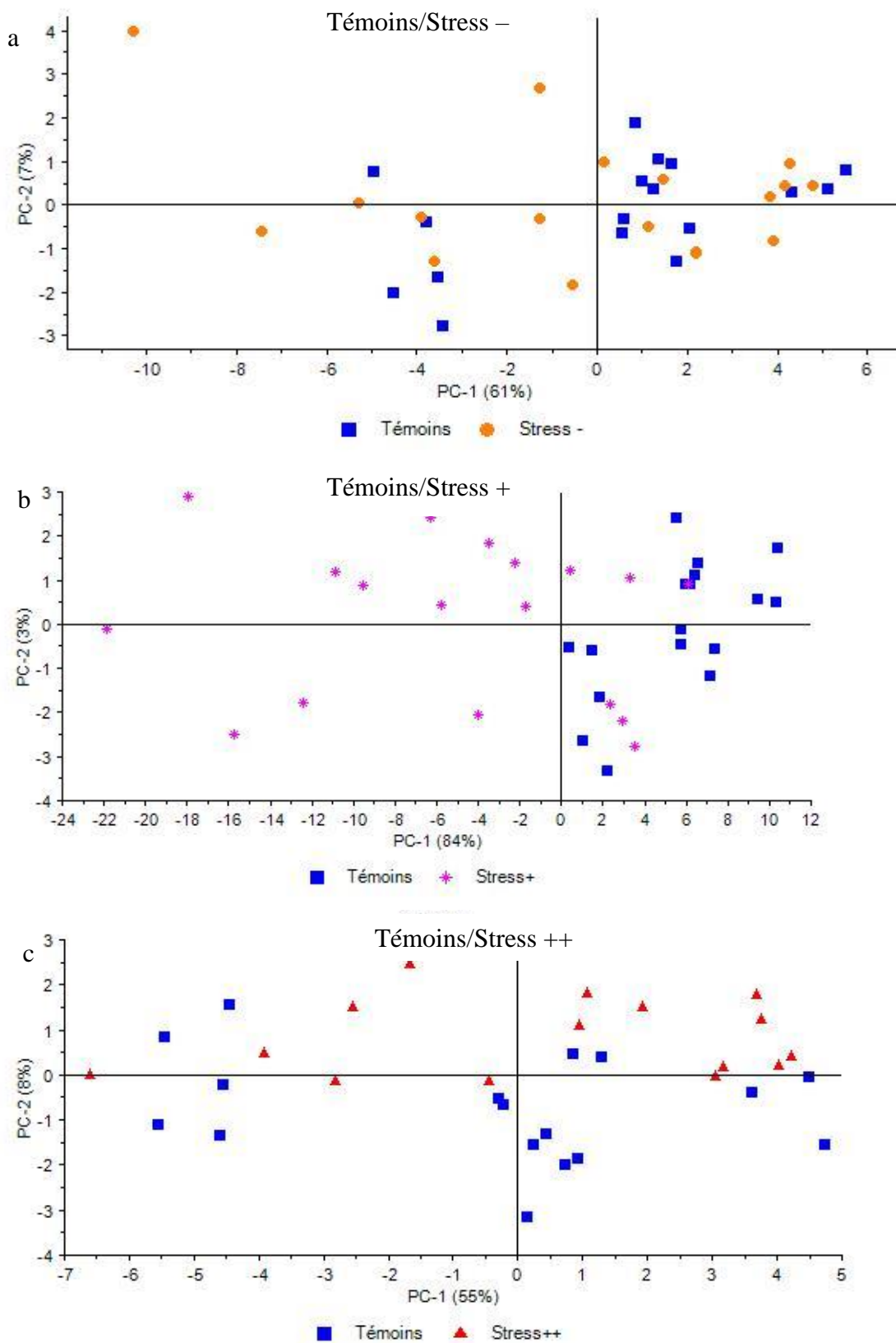


Figure 102 : ACP 2 à 2 spectres LB+Norm moyens Raman de *C. reinhardtii*. 2935 après quatre jours de stress lumineux (a) Témoin/Stress- (b) Témoin/Stress + (c) Témoin/Stress ++. Témoin (carré bleu), faible intensité lumineuse (Stress -, rond orange), forte intensité lumineuse (Stress +, étoile violet), très forte intensité lumineuse (Stress ++, triangle rouge).

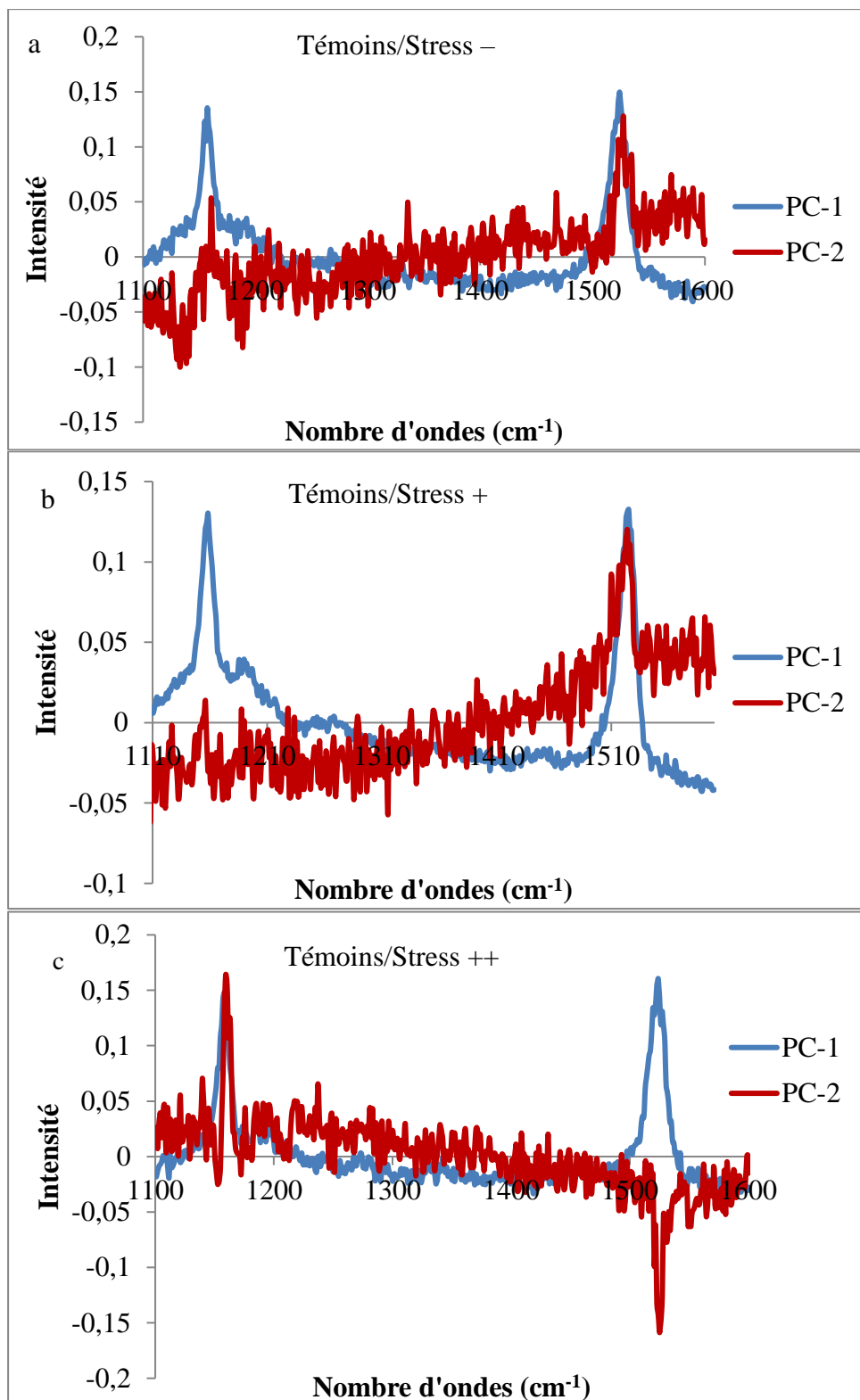


Figure 103 : X loadings ACP 2 à 2 spectres LB+Norm moyens Raman de *C. reinhardtii*. 2935 après quatre jours de stress lumineux (a) Témoin/Stress- (b) Témoin/Stress + (c) Témoin/Stress ++. PC1 (bleu) et PC2 (rouge).

### 3.3 La question de la variabilité des témoins

Afin de savoir si les expériences peuvent être comparées entre elles, les spectres de microalgues des différentes expériences en condition témoin ont été regroupés. Une ACP est réalisée sur l'ensemble du jeu de données après correction de la ligne de base et normalisation par SNV des spectres (Figure 104 et 105) qui explique 82 % de la variance des spectres. Il est observé qu'il y a une variabilité de réponse des témoins entre les différentes expériences. Afin d'éviter tout biais d'interprétation que pourrait entraîner cette variabilité, les expériences ont été, dans ce manuscrit, étudiées chacune séparément et pas au sein d'un même jeu de données. La variation de réponse de *C. reinhardtii* 2935 semble majoritairement dépendre de la CP1. La CP1 présente des variations positives au niveau des bandes des protéines (surtout la bande à  $1660\text{ cm}^{-1}$ ) et des bandes des polysaccharides (sauf  $1050\text{ cm}^{-1}$ ) et des acides nucléiques ( $1255\text{ cm}^{-1}$ ). En conditions contrôlées, des variabilités spectrales de réponse sur *C. reinhardtii* et *C. concordia* ont déjà été décrites par Driver et al. (2015) [226]. Cela a aussi été montré chez *Scenedesmus quadricauda* où les spectres de microalgues soumis à un stress phosphore présentent une grande variabilité de réponse en termes de composition biochimique [218].

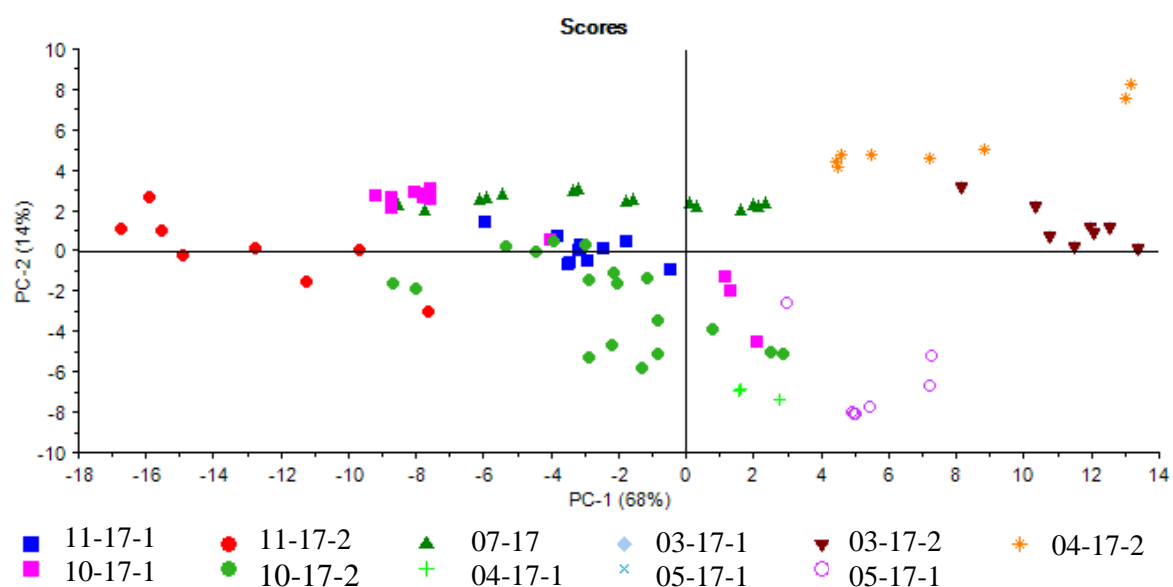


Figure 104 : ACP LB+SNV *C. reinhardtii* 2935 Témoins de toutes les expériences

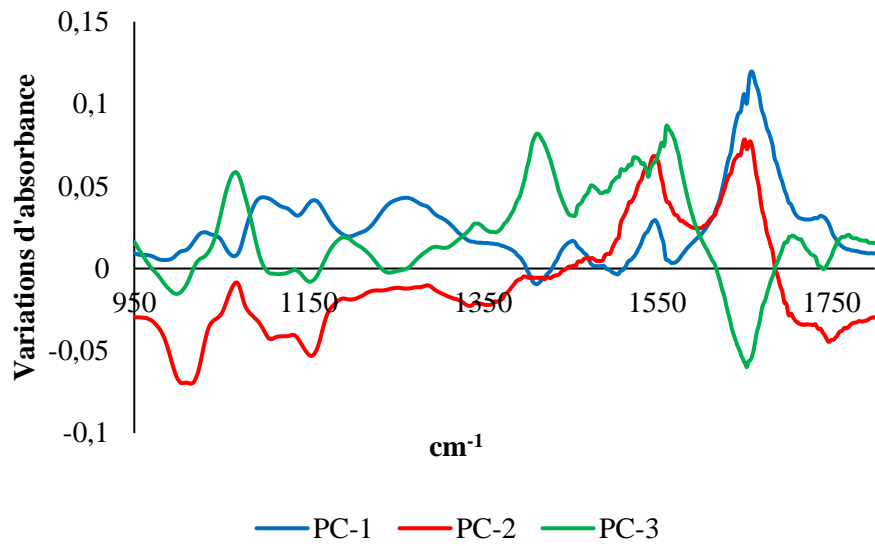


Figure 105 : Loadings ACP LB+SNV *C. reinhardtii* 2935 Témoins de toutes les expériences. PC1 (bleu), PC2 (rouge) et PC3 (vert).

### 3.4 Prétraitements des spectres infrarouge de microalgues

Les spectres, ACP et loadings sont présentés après chaque prétraitement (Figure 106 à Figure 117).

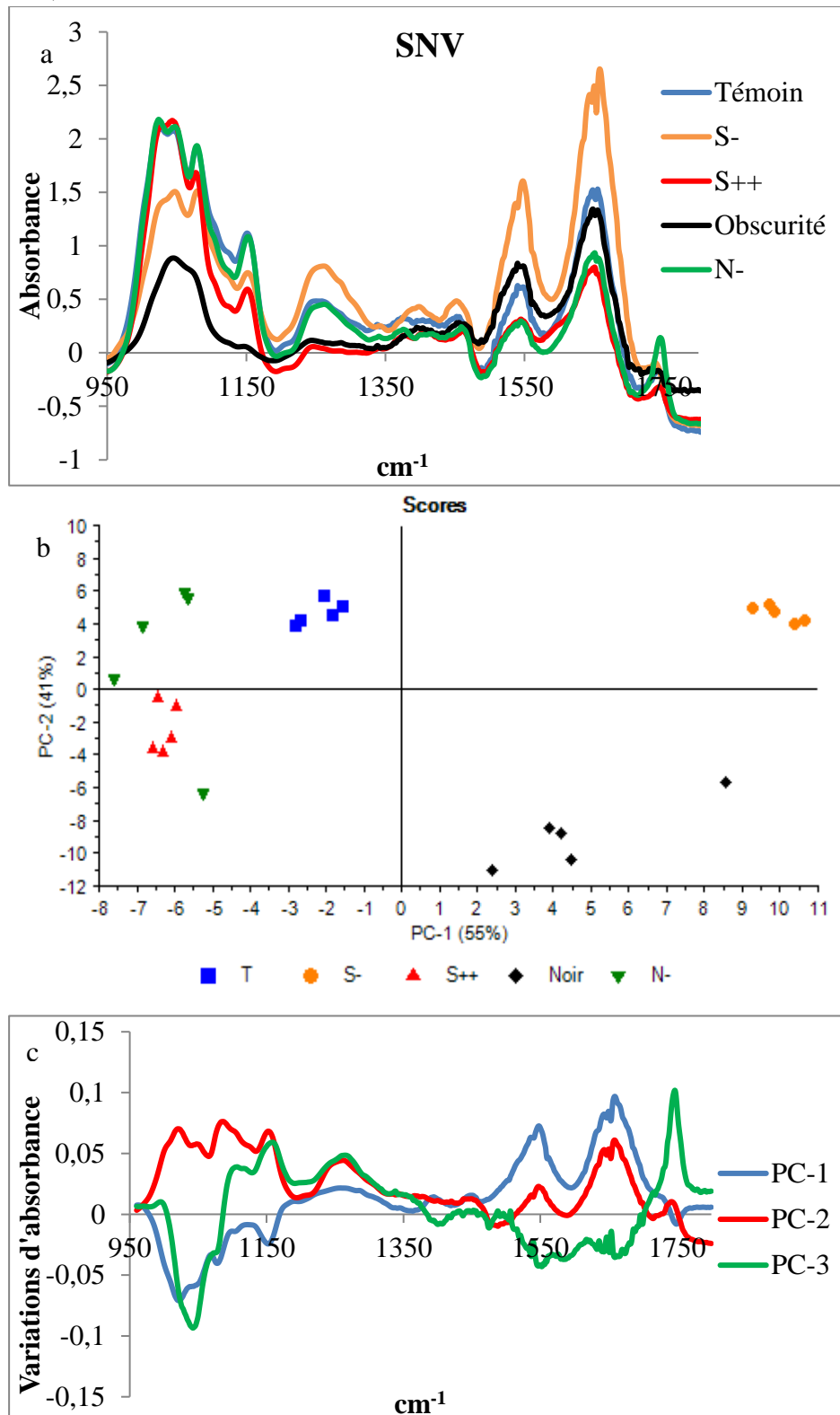


Figure 106 : Prétraitement SNV sur la zone d'étude 950-1800  $\text{cm}^{-1}$  : (a) spectres moyens *C. reinhardtii* suite à différents stress lumineux ; (b) ACP Témoin (carré bleu), faible intensité lumineuse (S-, rond orange), forte intensité lumineuse

(S++, triangle rouge), obscurité (Noir, losange noir), stress azoté (N-, triangle inversé vert) ; (c) Loadings PC1 (bleu), PC2 (rouge) et PC3 (vert).

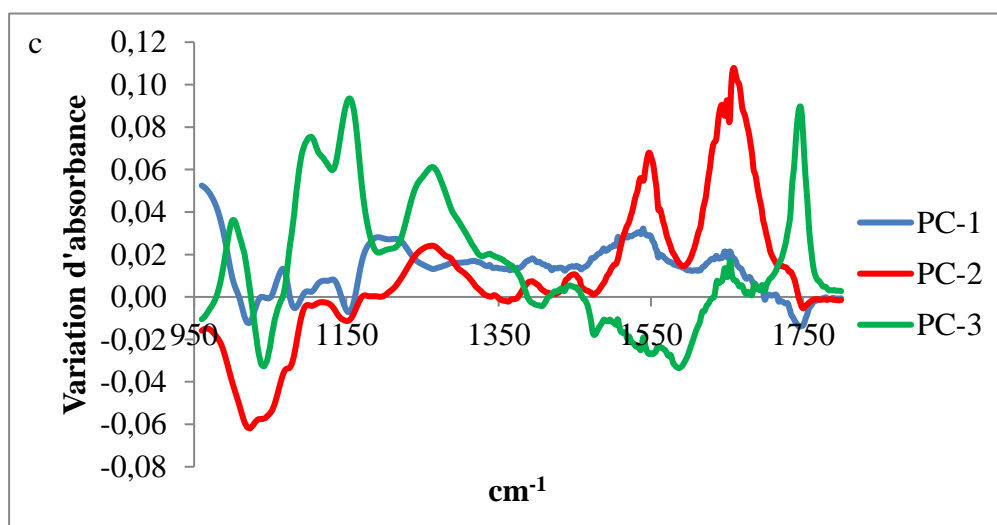
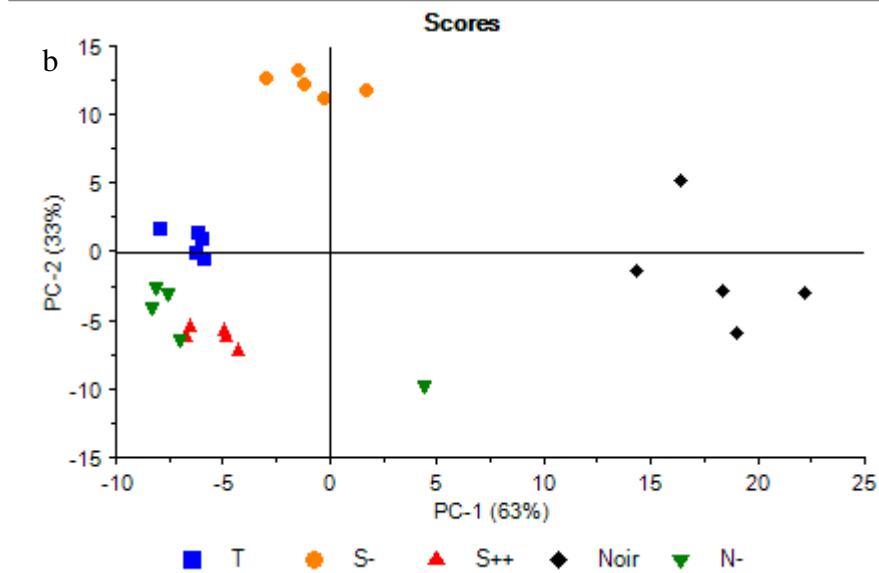
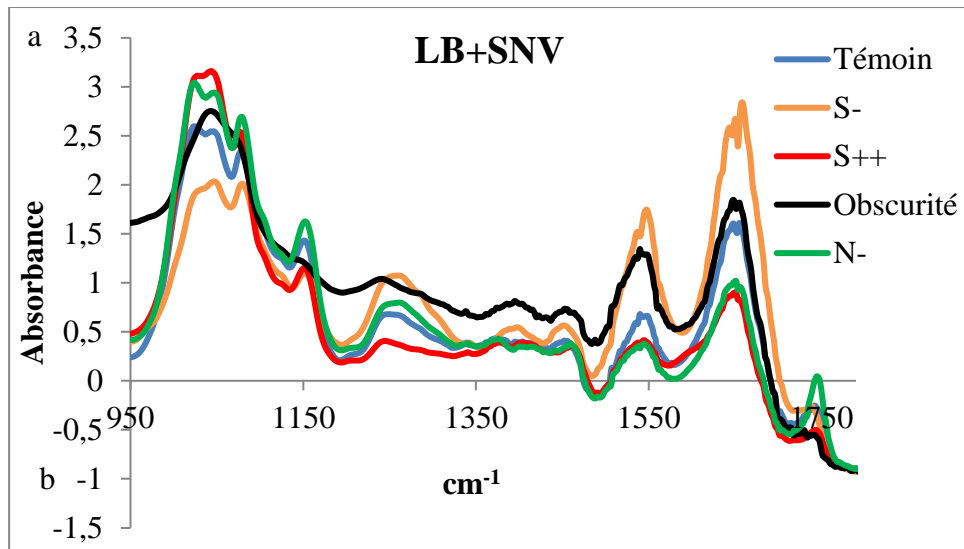
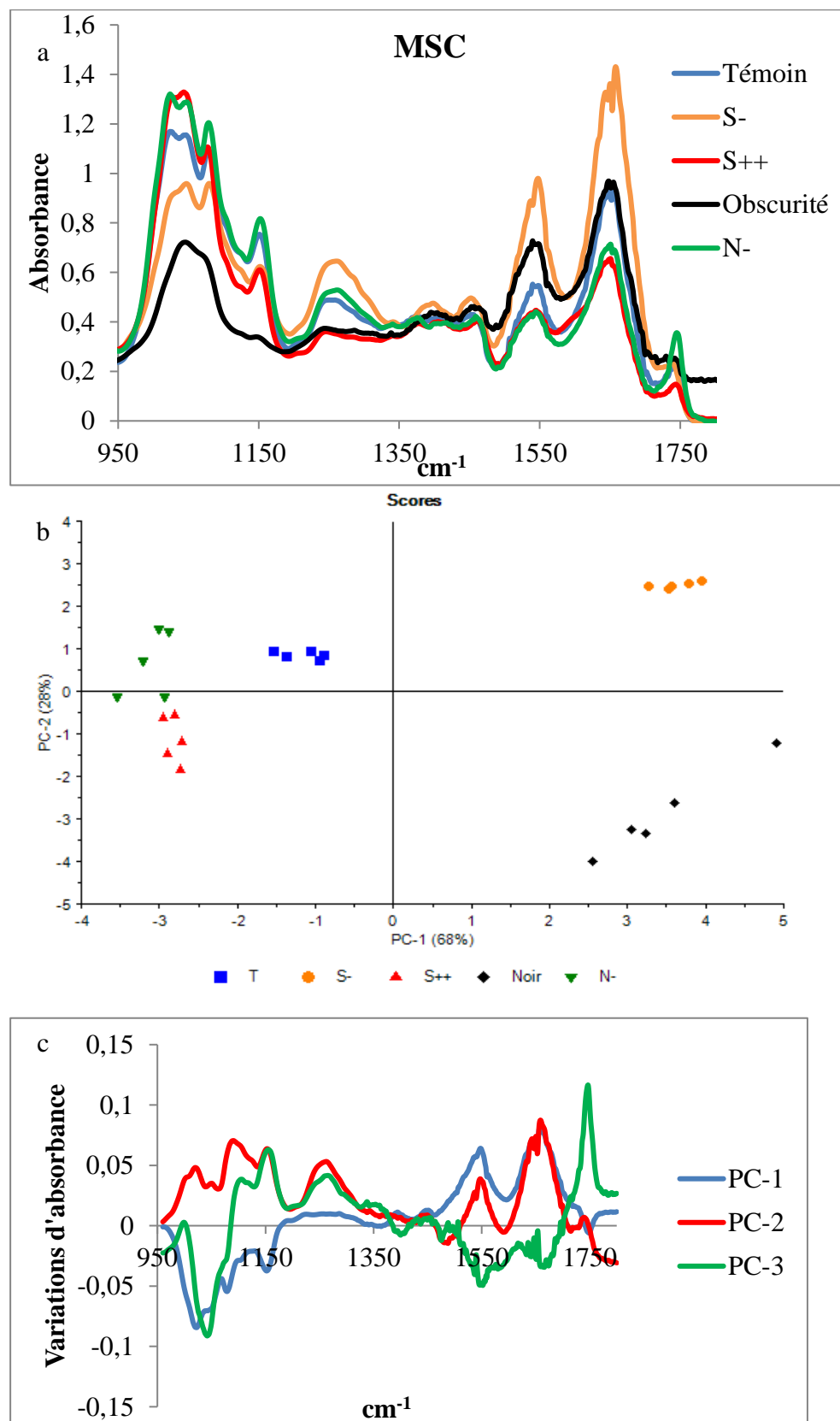




Figure 107 : Prétraitement LB+SNV sur la zone d'étude 950-1800  $\text{cm}^{-1}$  : (a) spectres moyens *C. reinhardtii*. suite à différents stress lumineux ; (b) (b) ACP Témoin (carré bleu), faible intensité lumineuse (S-, rond orange), forte intensité lumineuse (S++, triangle rouge), obscurité (Noir, losange noir), stress azoté (N-, triangle inversé vert) ; (c) Loadings PC1 (bleu), PC2 (rouge) et PC3 (vert).



**Figure 108 : Prétraitement MSC sur la zone d'étude 950-1800  $\text{cm}^{-1}$  : (a) spectres moyens *C. reinhardtii* suite à différents stress lumineux ; (b) ACP Témoin (carré bleu), faible intensité lumineuse (S-, rond orange), forte intensité lumineuse (S++, triangle rouge), obscurité (Noir, losange noir), stress azoté (N-, triangle inversé vert) ; (c) Loadings PC1 (bleu), PC2 (rouge) et PC3 (vert).**

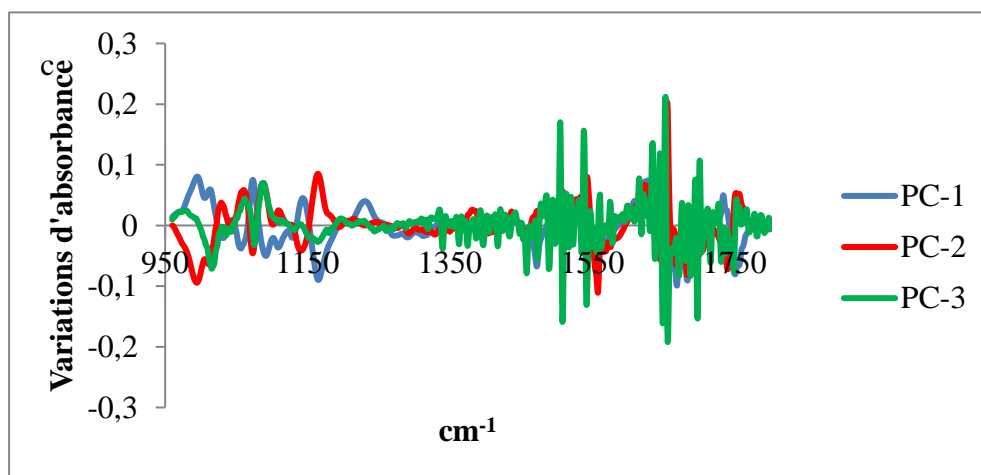
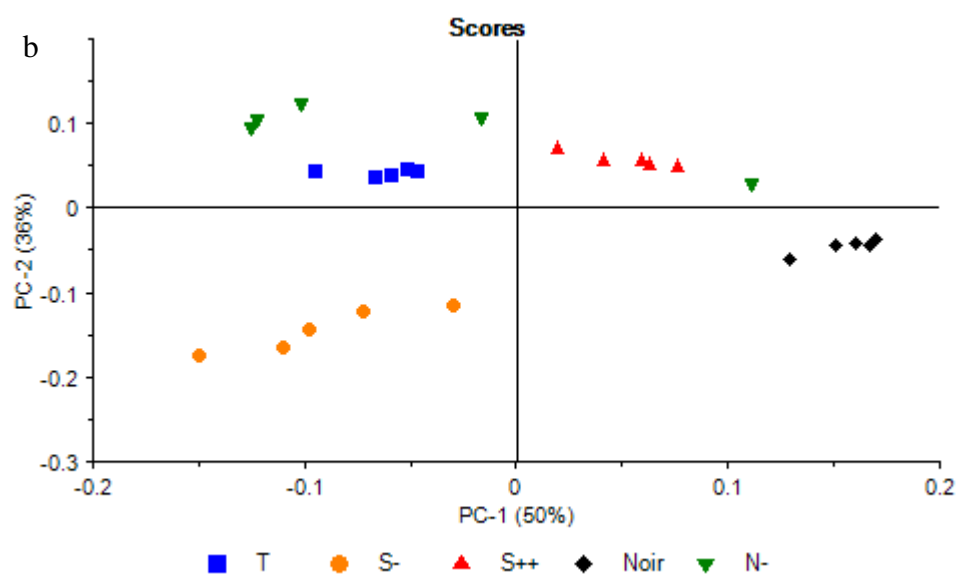
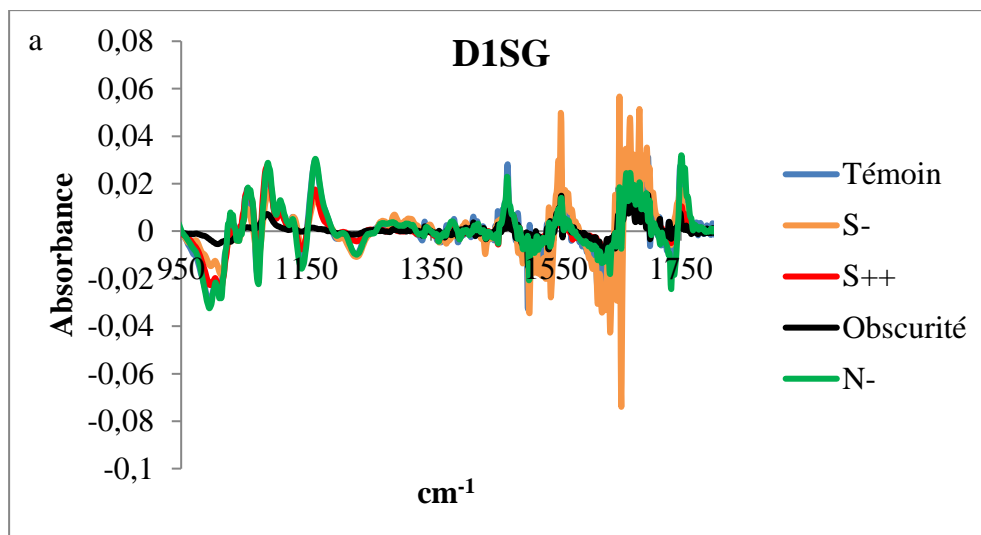


Figure 109 : Prétraitement D1SG sur la zone d'étude 950-1800  $\text{cm}^{-1}$  : (a) spectres moyens *C. reinhardtii* suite à différents stress lumineux ; (b) ACP Témoïn (carré bleu), faible intensité lumineuse (S-, rond orange), forte intensité lumineuse (S++, triangle rouge), obscurité (Noir, losange noir), stress azoté (N-, triangle inversé vert) ; (c) Loadings PC1 (bleu), PC2 (rouge) et PC3 (vert).

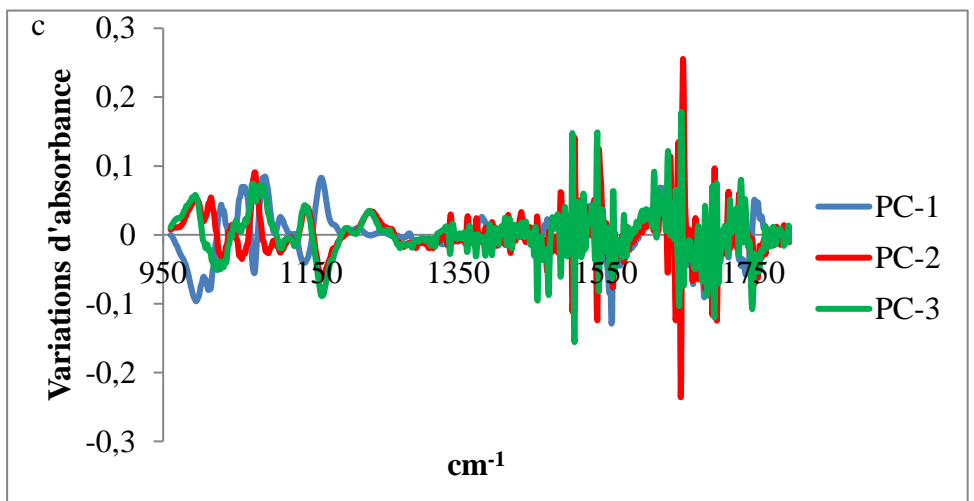
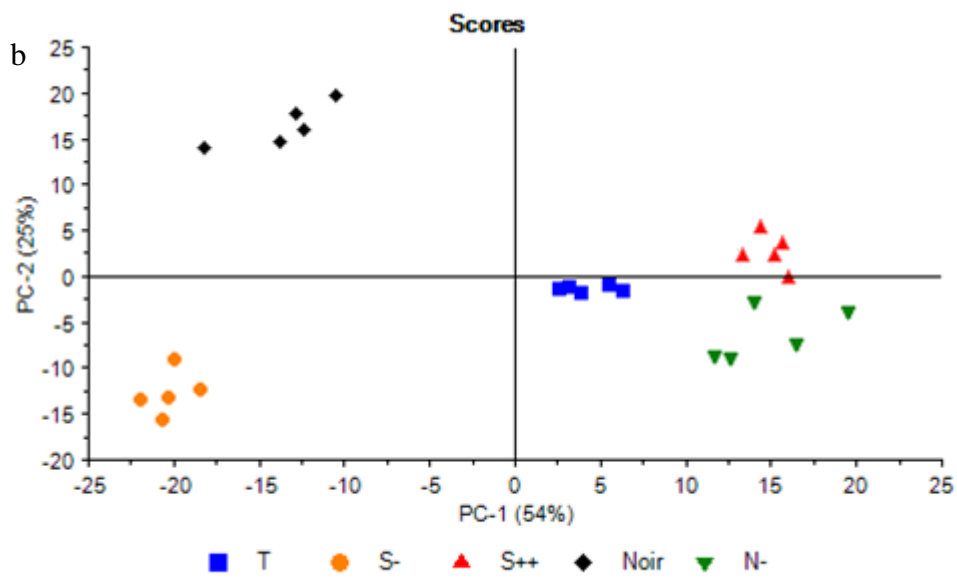
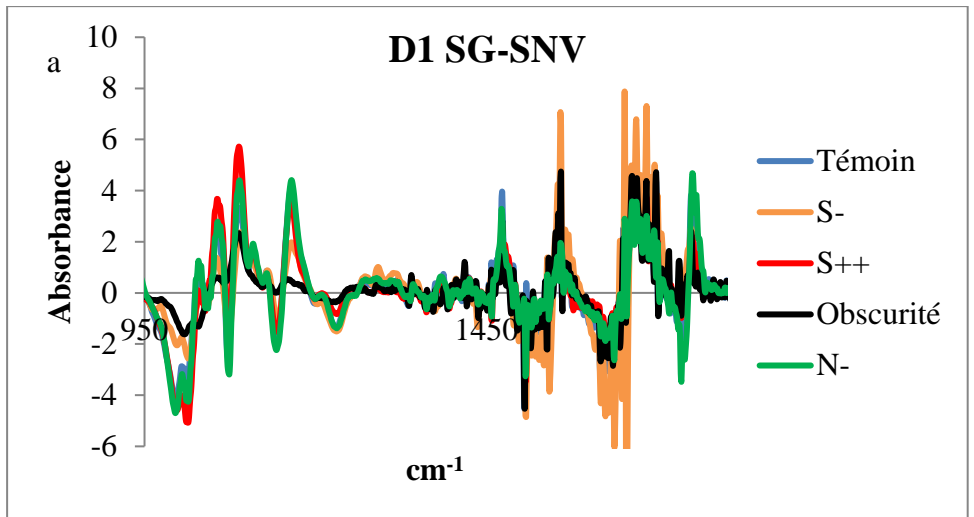


Figure 110 : Prétraitement D1SG SNV sur la zone d'étude 950-1800  $\text{cm}^{-1}$  : (a) spectres moyens *C. reinhardtii* suite à différents stress lumineux ; (b) ACP Témoin (carré bleu), faible intensité lumineuse (S-, rond orange), forte intensité lumineuse (S++, triangle rouge), obscurité (Noir, losange noir), stress azoté (N-, triangle inversé vert) ; (c) Loadings PC1 (bleu), PC2 (rouge) et PC3 (vert).

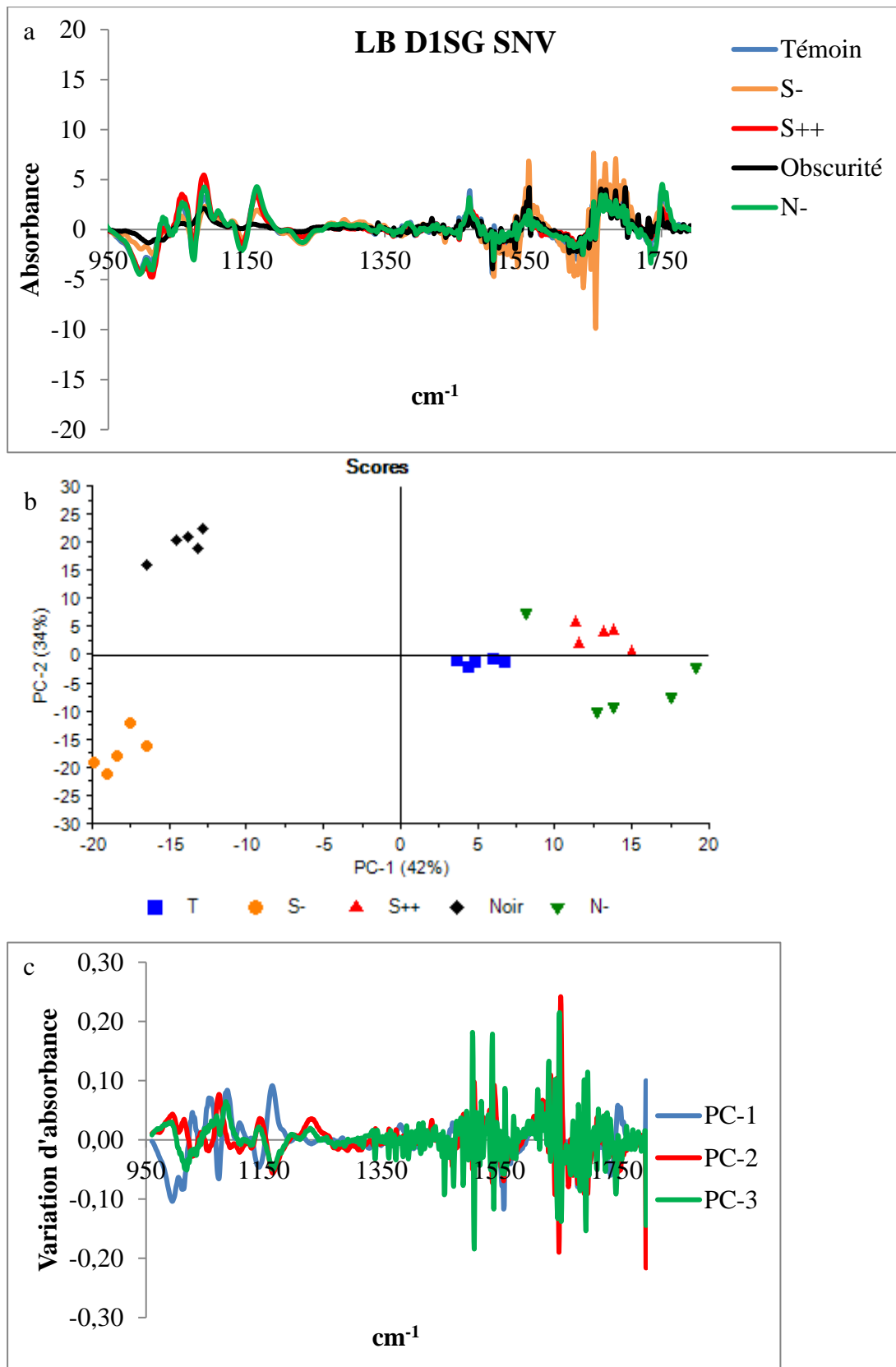


Figure 111 : Prétraitement LB D1SG SNV sur la zone d'étude 950-1800  $\text{cm}^{-1}$ : (a) spectres moyens *C. reinhardtii* suite à différents stress lumineux ; (b) ACP Témoin (carré bleu), faible intensité lumineuse (S-, rond orange), forte intensité lumineuse (S++, triangle rouge), obscurité (Noir, losange noir), stress azoté (N-, triangle inversé vert) ; (c) Loadings PC1 (bleu), PC2 (rouge) et PC3 (vert).

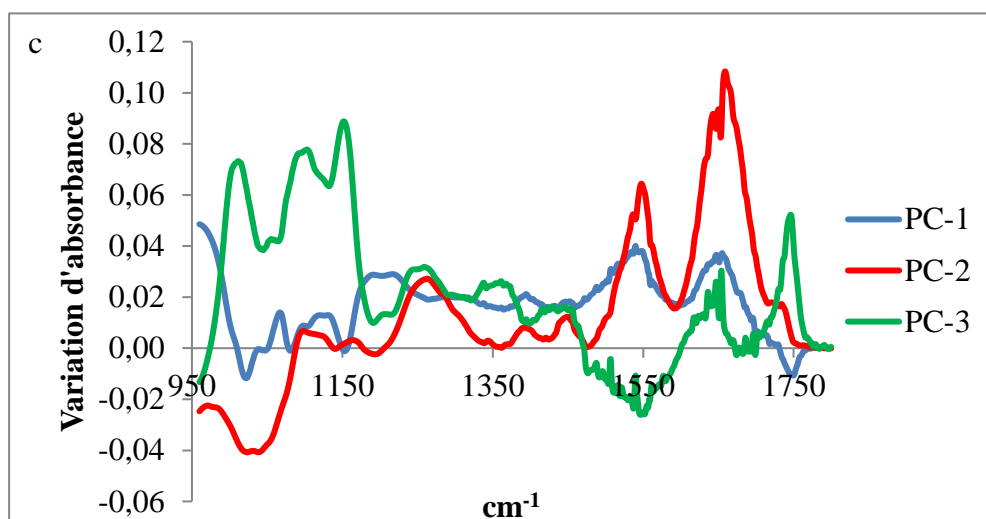
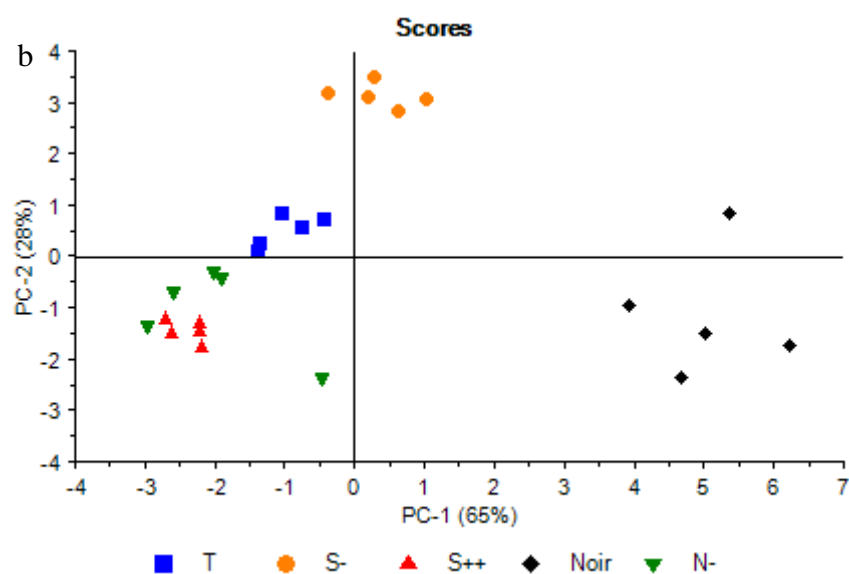
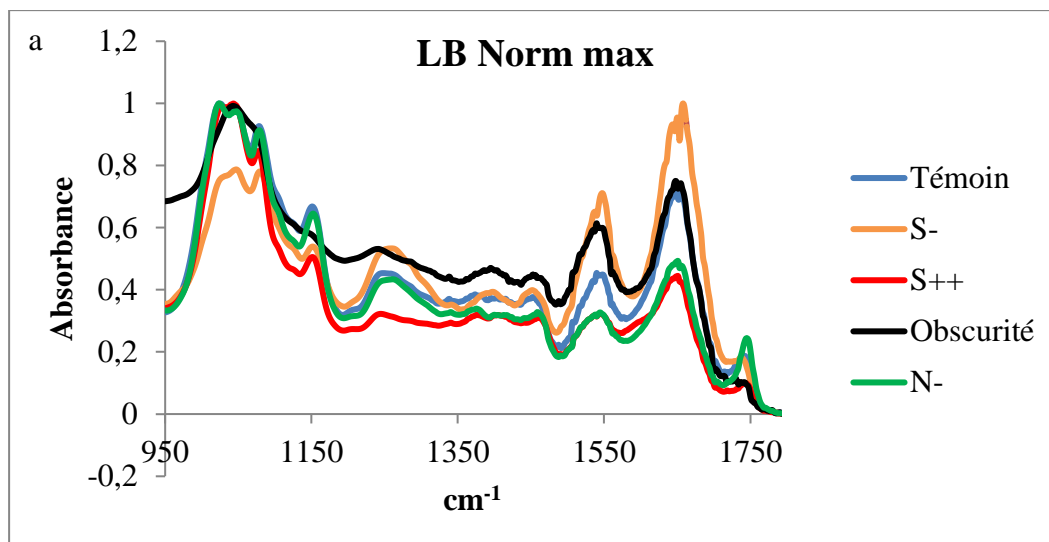


Figure 112 : Prétraitement LB+Norm max. sur la zone d'étude 950-1800  $\text{cm}^{-1}$  : (a) spectres moyens *C. reinhardtii* suite à différents stress lumineux ; (b) ACP Témoin (carré bleu), faible intensité lumineuse (S-, rond orange), forte intensité lumineuse (S++, triangle rouge), obscurité (Noir, losange noir), stress azoté (N-, triangle inversé vert) ; (c) Loadings PC1 (bleu), PC2 (rouge) et PC3 (vert).

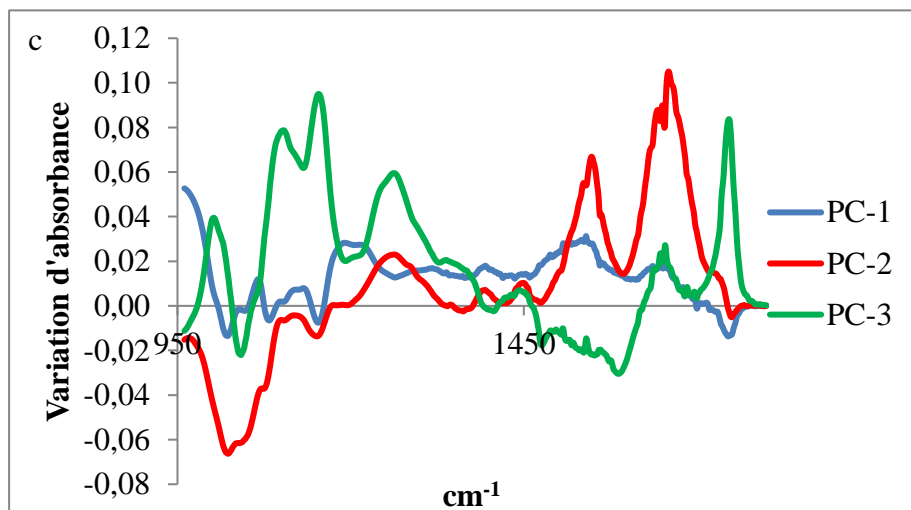
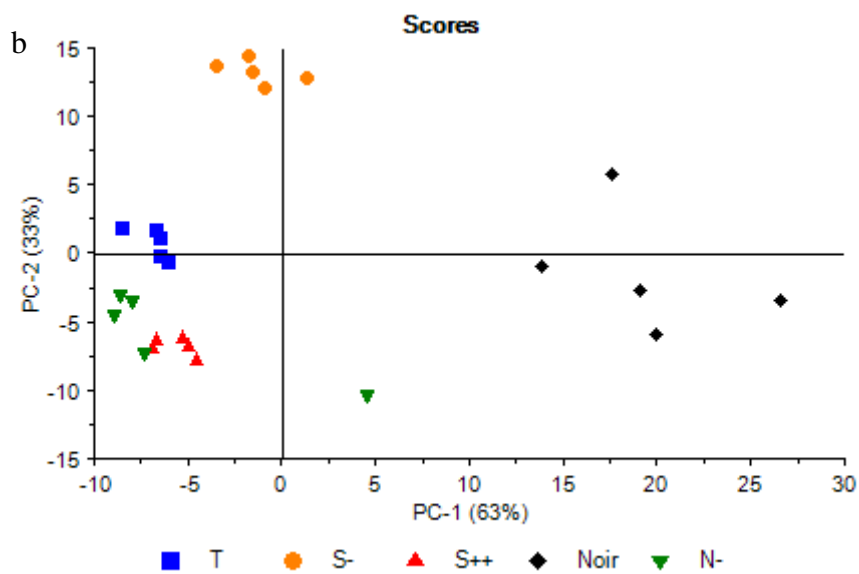
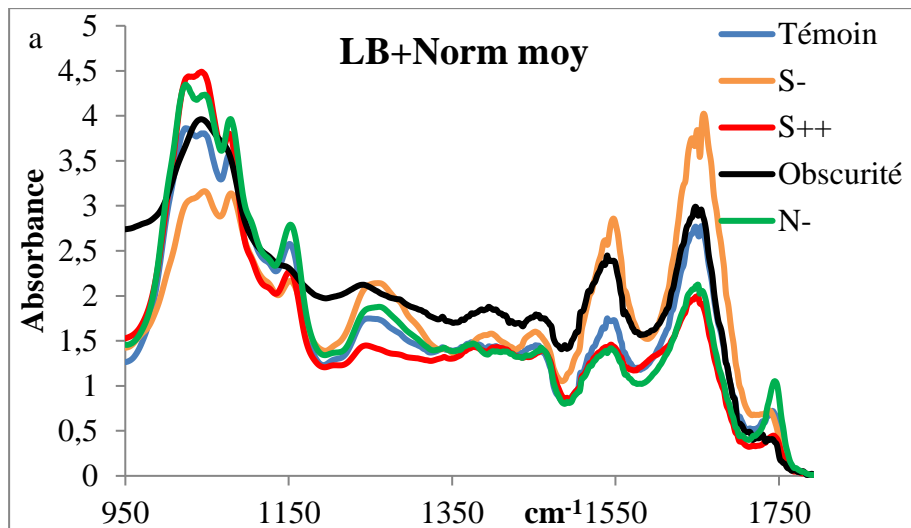


Figure 113 : Prétraitement LB+Norm moyenne sur la zone d'étude 950-1800  $\text{cm}^{-1}$  : (a) spectres moyens *C. reinhardtii* suite à différents stress lumineux ; (b) ACP Témoïn (carré bleu), faible intensité lumineuse (S-, rond orange), forte intensité lumineuse (S++, triangle rouge), obscurité (Noir, losange noir), stress azoté (N-, triangle inversé vert) ; (c) Loadings PC1 (bleu), PC2 (rouge) et PC3 (vert).

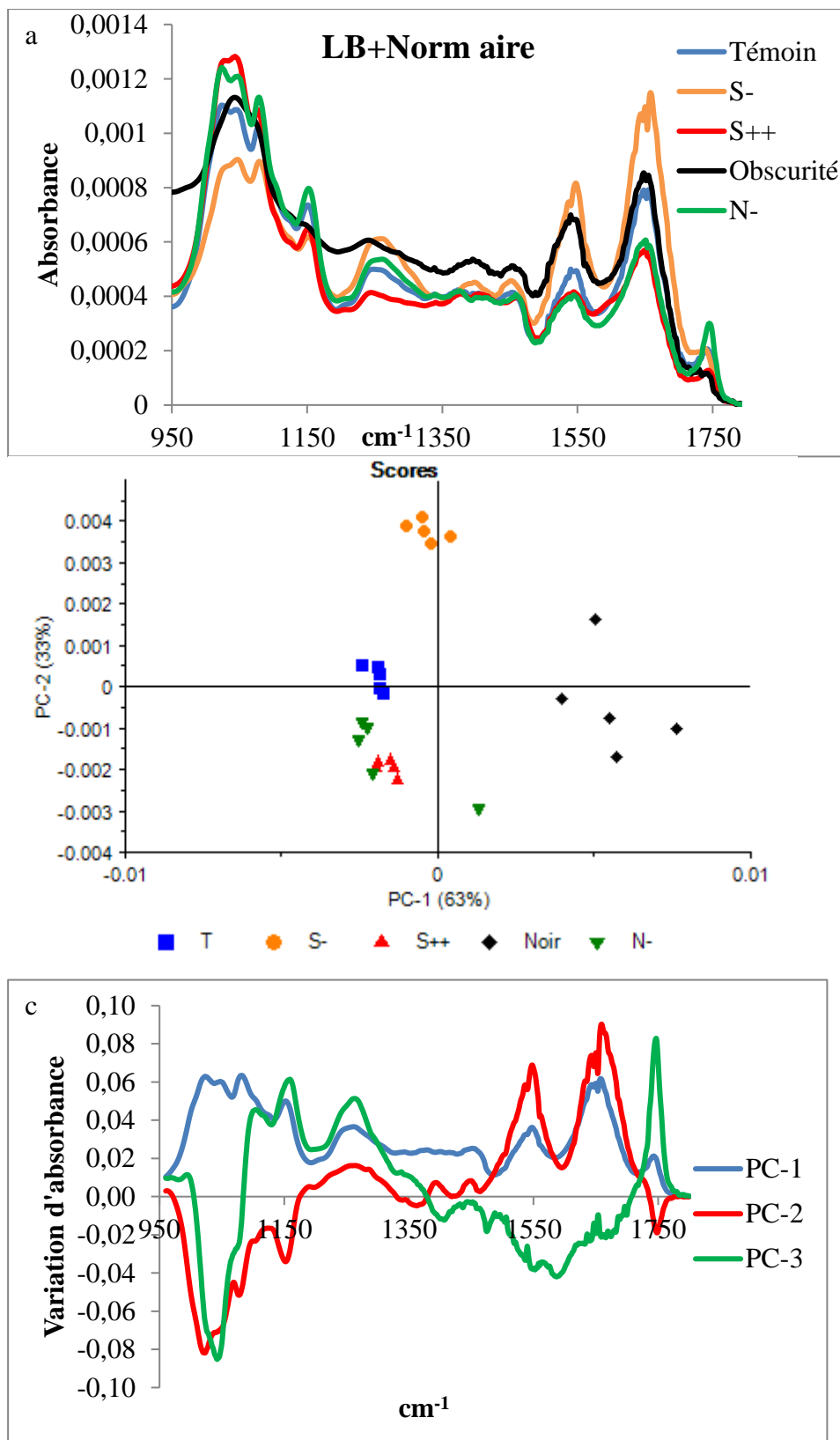


Figure 114 : Prétraitement LB+Norm aire sur la zone d'étude 950-1800 cm<sup>-1</sup> : (a) spectres moyens *C. reinhardtii* suite à différents stress lumineux ; (b) ACP Témoïn (carré bleu), faible intensité lumineuse (S-, rond orange), forte intensité lumineuse (S++, triangle rouge), obscurité (Noir, losange noir), stress azoté (N-, triangle inversé vert) ; (c) Loadings PC1 (bleu), PC2 (rouge) et PC3 (vert).



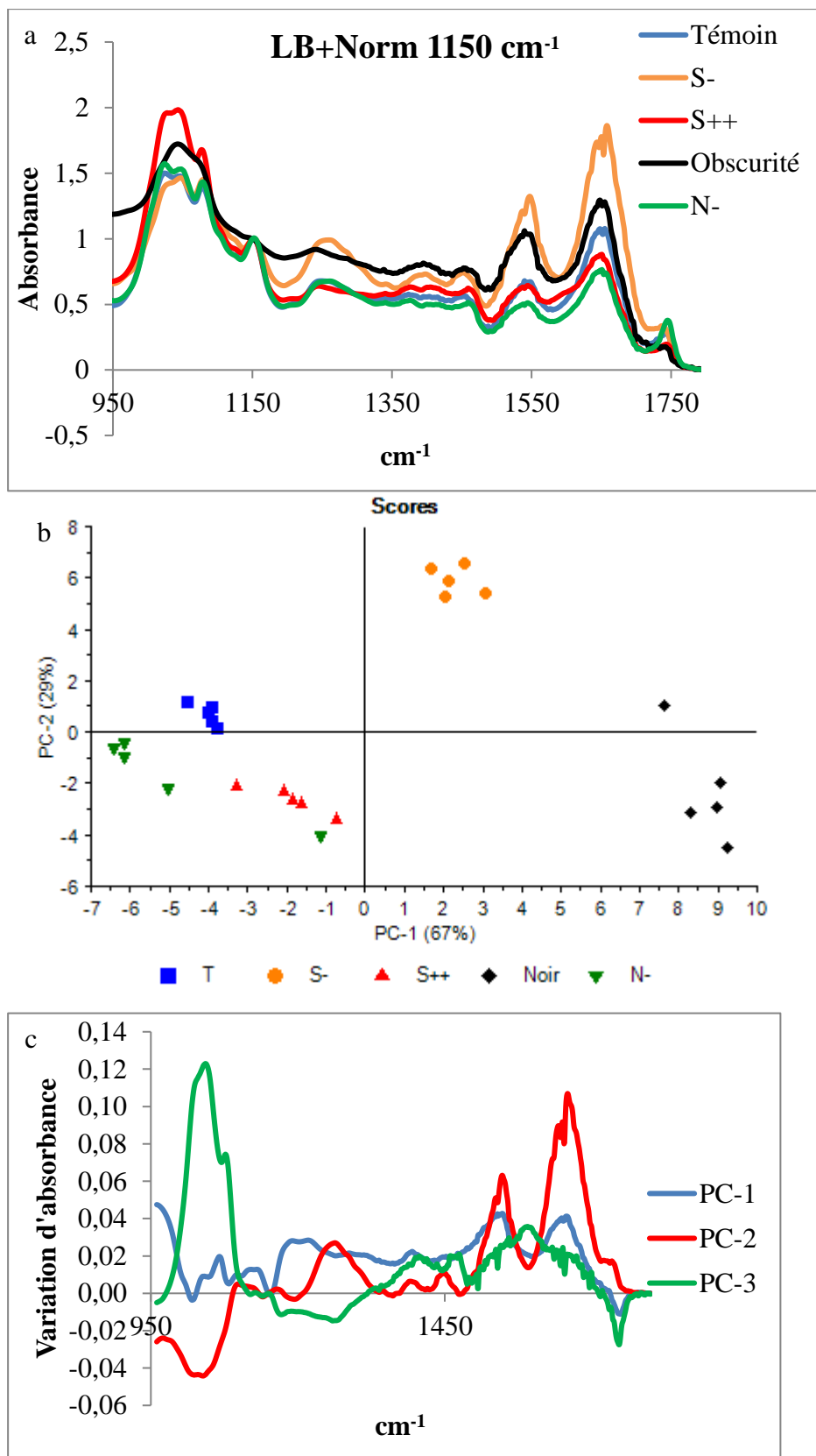


Figure 115 : Prétraitement LB+Norm 1150 cm<sup>-1</sup> sur la zone d'étude 950-1800 cm<sup>-1</sup> : (a) spectres moyens *C. reinhardtii* suite à différents stress lumineux ; (b) ACP Témoin (carré bleu), faible intensité lumineuse (S-, rond orange), forte intensité lumineuse (S++, triangle rouge), obscurité (Noir, losange noir), stress azoté (N-, triangle inversé vert) ; (c) Loadings PC1 (bleu), PC2 (rouge) et PC3 (vert).

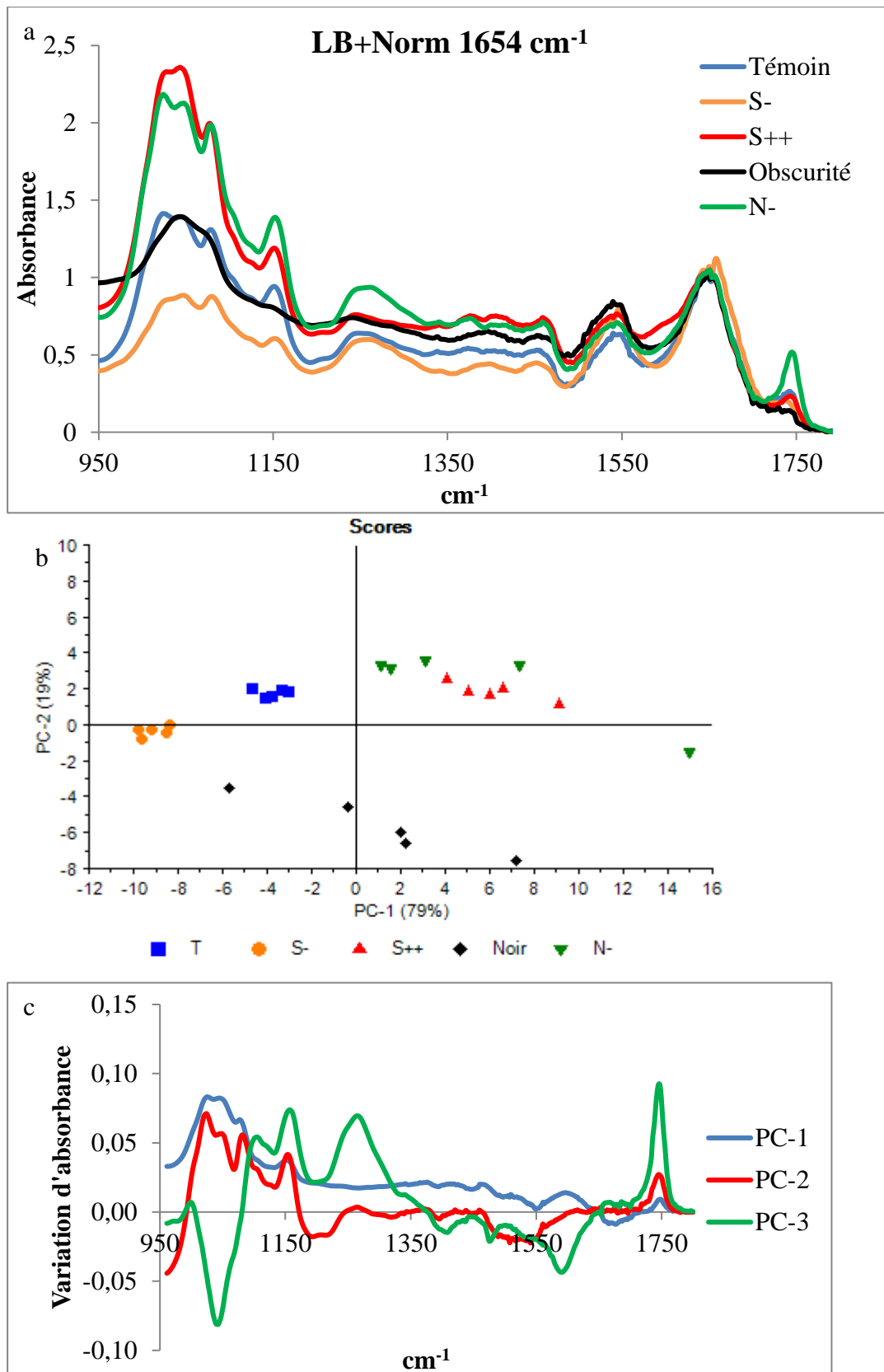


Figure 116 : Prétraitement LB+Norm 1654 cm<sup>-1</sup> sur la zone d'étude 950-1800 cm<sup>-1</sup> : (a) spectres moyens *C. reinhardtii* suite à différents stress lumineux ; (b) ACP Témoin (carré bleu), faible intensité lumineuse (S-, rond orange), forte intensité lumineuse (S++, triangle rouge), obscurité (Noir, losange noir), stress azoté (N-, triangle inversé vert) ; (c) Loadings PC1 (bleu), PC2 (rouge) et PC3 (vert).

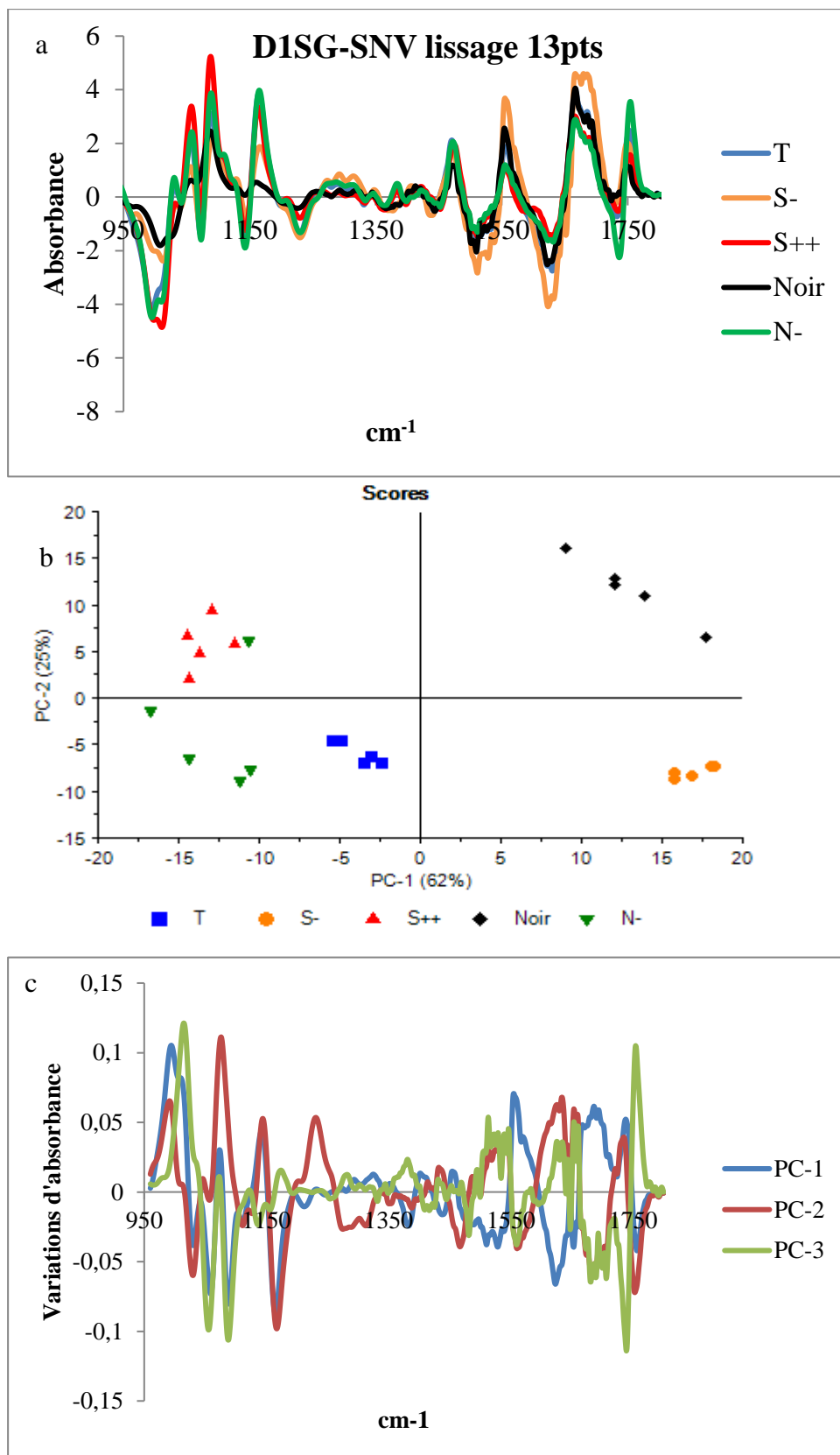


Figure 117 : Prétraitement D1SG-SNV et lissage SG 13 points sur la zone d'étude 950-1800 cm<sup>-1</sup> : (a) spectres moyens *C. reinhardtii* suite à différents stress lumineux ; (b) ACP Témoin (carré bleu), faible intensité lumineuse (S-, rond orange), forte intensité lumineuse (S++, triangle rouge), obscurité (Noir, losange noir), stress azoté (N-, triangle inversé vert) ; (c) Loadings PC1 (bleu), PC2 (rouge) et PC3 (vert).

### 3.5 Différences de réponses infrarouges des microalgues par rapport au milieu de culture

Dans le cadre du stage BTS d'Amélie Bâcle, une étude sur l'impact du milieu de culture environnant sur la réponse infrarouge des microalgues a été réalisée. Trois milieux de culture référencés dans la littérature comme étant utilisés pour la culture de *C. reinhardtii* ont été mis en parallèle : le milieu TAP [93], le milieu Johnson modifié [136] et le milieu high salt (HS, Sueoka 1960; Harris et al. 2009). Les microalgues ont également été cultivées dans de l'eau prélevée dans la Sarthe. Le suivi de la réponse des microalgues est réalisé à deux niveaux : suivi de la croissance et suivi de la composition biochimique par spectroscopie infrarouge.

#### 3.5.1 Croissance

Par dénombrement sur cellule de Malassez, le comptage des microalgues a été réalisé toutes les semaines dans chaque milieu en duplicat pendant trois semaines. Les courbes de croissance obtenues sont présentées sur la Figure 118. Premièrement, l'eau de la Sarthe ne convient pas aux microalgues car la concentration en microalgues dans les Erlenmeyers décroît rapidement. Cet impact peut être dû à la perte de vitamines naturellement présentes dans l'eau de rivière lors de la stérilisation du milieu à l'autoclave. Cependant après ajout de 10 µL de vitamines dans le milieu, la culture n'est pas repartie jusqu'à extinction de la population. La présence/absence des vitamines n'est donc pas le facteur impactant. Il est possible que d'autres paramètres comme le pH ou des éléments polluants soient la cause de la mortalité des microalgues. Étant donné les résultats obtenus pour la croissance, ce milieu de culture n'a pas été gardé pour la suite de l'analyse. Les milieux Johnson et HS présentent quant à eux une baisse de croissance des microalgues après 21 jours, tandis que le milieu TAP montre une croissance d'allure logarithmique.

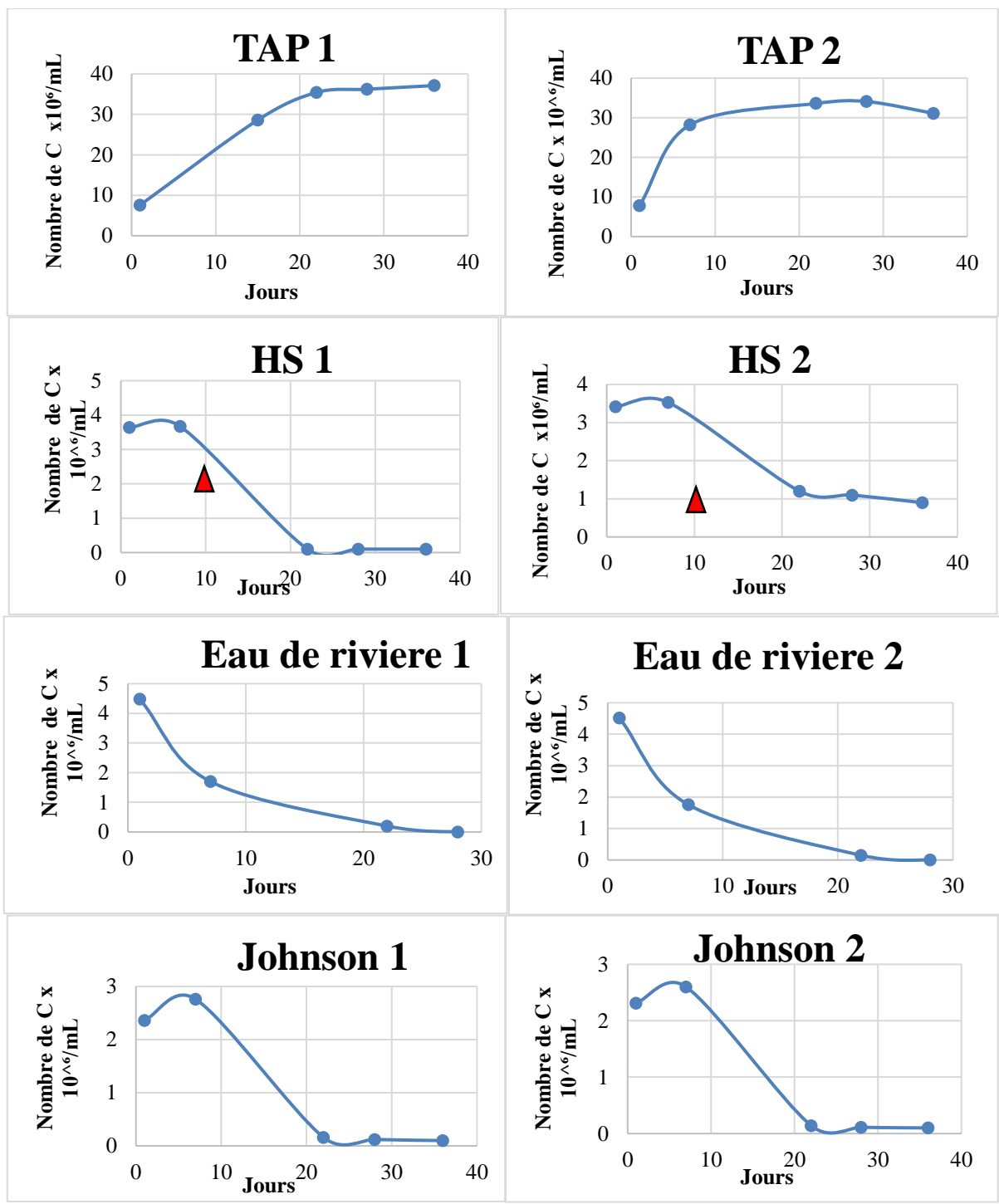


Figure 118: Courbes de croissance de *Chlamydomonas reinhardtii* pour chaque milieu testé (triangle rouge : ajout de vitamines).

### 3.5.2 Spectres infrarouge

Les microalgues *C. reinhardtii* souche 2935, sont séchées 1 h à l'air libre puis analysée en transmission par spectroscopie infrarouge sur du fluorure de calcium ( $\text{CaF}_2$ ), surface transparente qui absorbe peu les rayons infrarouges. Les spectres obtenus sont le résultat de 32 accumulations dans la zone  $500\text{-}4000\text{ cm}^{-1}$  et d'un processus de correction de la ligne de base (Figure 119).

Le milieu de culture Johnson influence grandement le spectre infrarouge des microalgues qui est d'une part très faible en termes d'intensité et d'autre part qui présente des pics décalés par rapport aux deux autres milieux de culture étudiés. Premièrement, les bandes correspondantes aux liaisons  $\nu(\text{C-O})$  des polysaccharides sont grandement impactées, seule la bande à  $1025\text{ cm}^{-1}$  présente une intensité suffisante à sa détection. Le contenu en polysaccharides, composés de réserve énergétique, chez *C. reinhardtii* dans le milieu Johnson, semble donc faible. De plus, la liaison N-H ( $1550\text{ cm}^{-1}$ ), qui correspond à une liaison amide secondaire relative aux protéines, est de très faible intensité. Ceci indique des modifications à ce niveau ce qui conforte l'idée d'un mauvais état physiologique de la microalgue.

L'augmentation de la bande à  $1400\text{ cm}^{-1}$  est aussi un témoin clair du mauvais état de la microalgue puisqu'il indique la liaison  $\nu(\text{COO}^-)$  qui correspond à la formation de site carboxyles déprotonés [324]. Enfin, les liaisons C=O ( $1740\text{ cm}^{-1}$ ) - correspondant aux lipides (composés de réserve et aussi de structure de la paroi) - sont aussi de faible intensité par rapport aux autres conditions. Cette analyse spectrale permet de confirmer que le milieu de culture Johnson n'offre pas de bonnes conditions de développement de *Chlamydomonas reinhardtii*.

L'analyse des autres spectres montre un décalage entre HS et TAP au niveau des liaisons  $\nu(\text{P=O})$  à  $1260\text{ cm}^{-1}$  lié aux acides nucléiques. De plus, une augmentation des lipides pour la condition HS indique l'influence d'un stress nutritif. Les bandes liées aux protéines ( $1660$  et  $1550\text{ cm}^{-1}$ ) présentent des intensités plus importantes que celles liées aux polysaccharides pour les microalgues du milieu HS et inversement pour les microalgues dans le milieu TAP. Enfin, l'établissement des rapports de bandes entre les composés d'intérêt montrent que les milieux HS et TAP se différencient par leurs rapports protéines/polysaccharides ( $I_{1650}/I_{1045}$ ) et acides nucléiques/ polysaccharides ( $I_{1255}/I_{1045}$ ) (Figure 120). Cette étude nous permet de justifier l'usage du milieu TAP comme milieu favorable à la culture de *C. reinhardtii*.

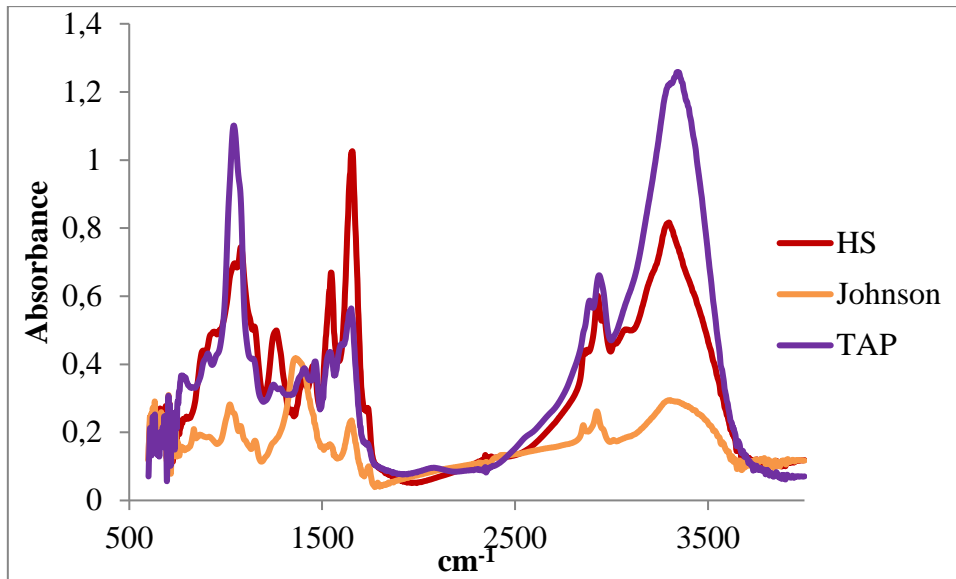


Figure 119 : Spectres infrarouge moyens avec correction de la ligne de base de *C. reinhardtii* 2935 après une semaine dans chaque milieu de culture : HS (bordeaux), Johnson (olive), TAP (lavande).

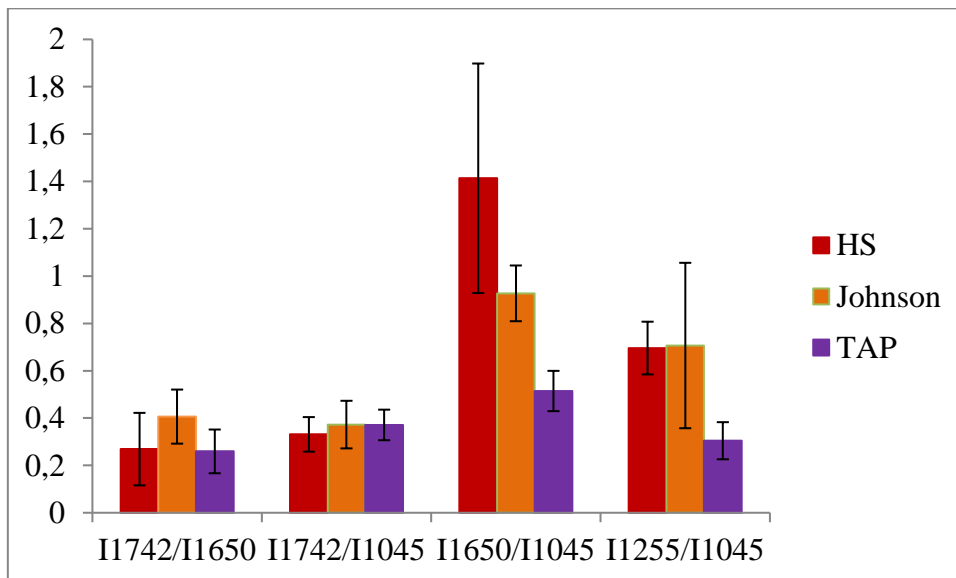


Figure 120 : Rapport de bandes des spectres infrarouge moyens LB de *C. reinhardtii* 2935 après une semaine dans différents milieux : HS (bordeaux), Johnson (olive), TAP (lavande)

## 4 Etude de la réponse des microalgues en présence de nanoparticules

### 4.1 Correspondance des sigles en biologie moléculaire et efficacité des gènes

Tableau 4-A : Liste des gènes testés, efficacité et séquence des amorces : gènes de ménage (rps 2, 8, 14, 19), gènes impliqués dans la voie de biosynthèse des polysaccharides (GD, GE, GLD, ME, PG), gènes de la voie de biosynthèse de l'astaxanthine (BKT, CHY)

Nom du gène	Abréviation	Efficacité	Sens (F)/ Antisens (R)	Séquence des amorces 5'=> 3'
petite unité 2 protéine ribosomale	rps 2	1,99	F	CGAACGGTAAAGAAAATGCT
			R	ACAAATTGCAGCCCAAAAAC
petite unité 8 protéine ribosomale	rps 8	1,97	F	TCGCCTTAAATATCGTTCAAAA
			R	CCTTCAGGCGTTGTAAACAAT
petite unité 14 protéine ribosomale	rps 14	2,07	F	ACGGTTGTGTAACGACTG
			R	GCGTGAATTAAACGCCAAA
petite unité 19 protéine ribosomale	rps 19	2,08	F	CACGTCATCAATGATTGTTCC
			R	TTAGCATGGCCACGATATGTA
UDP-glucuronate décarboxylase, xylose	GD	1,85	F	GTGACTACCTGGTGGCTCGT
			R	GATTTGGTCCACCTCCAAGA
UDP glucose 4 épimérase, galactose	GE	2,11	F	CAAGCCGCTCGAGTACTACC
			R	ACATGTCCTCCTGGAACAGC
UDP glucose 4-6déhydratase, rhamnose	GLD	1,88	F	CATCAAGGGCGATATCCAGT
			R	GGTCTCGCCATACACCTCAT
GDP mannose 3-5 épimérase, galactose	ME	1,89	F	GTCCTTCGACGACAAGAAGC
			R	TGCTGTGGCTGTACTTGGTT
Phosphoglucomutase, glucose	PG	2,08	F	CGACCGTGTTATTTGCCTTCG
			R	GGTCTCGCCATACACCTCAT
β-carotène hydrolase voie de biosynthèse de l'astaxanthine	CHY	1,91	F	GAGCTCAACGACATCTACGC
			R	TTGGTGTGGTGGATCTGATG
β-carotène kétolase voie de biosynthèse de l'astaxanthine	BKT	1,89	F	TTCCGCCTGTTCTACTACGG
			R	GTGCTCCCAGTGCAGGTC



## 4.2 Spectroscopie IR : Evolution temporelle toutes les conditions confondues

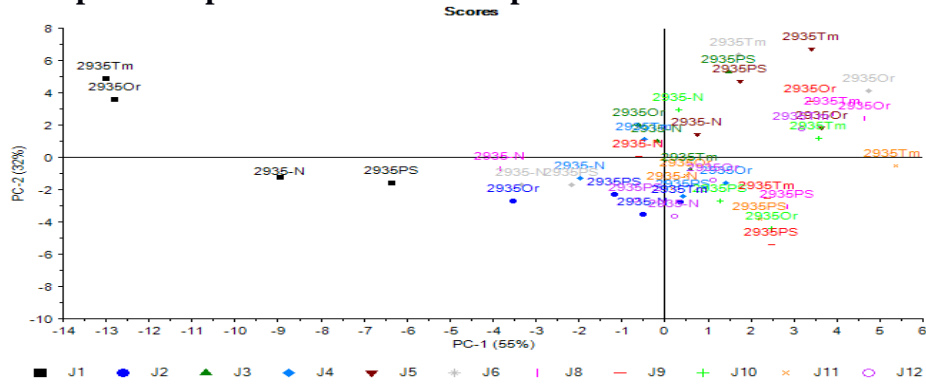


Figure 121 : ACP Evolution temporelle spectres IR 2935 800-1780  $\text{cm}^{-1}$  T, PS, Or, -N

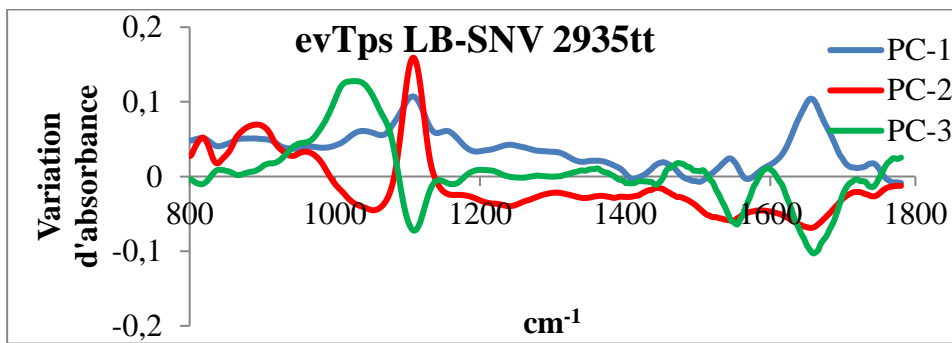


Figure 122 : Loading ACP Evolution temporelle spectres IR 2935 800-1780  $\text{cm}^{-1}$  T, PS, Or, -N.

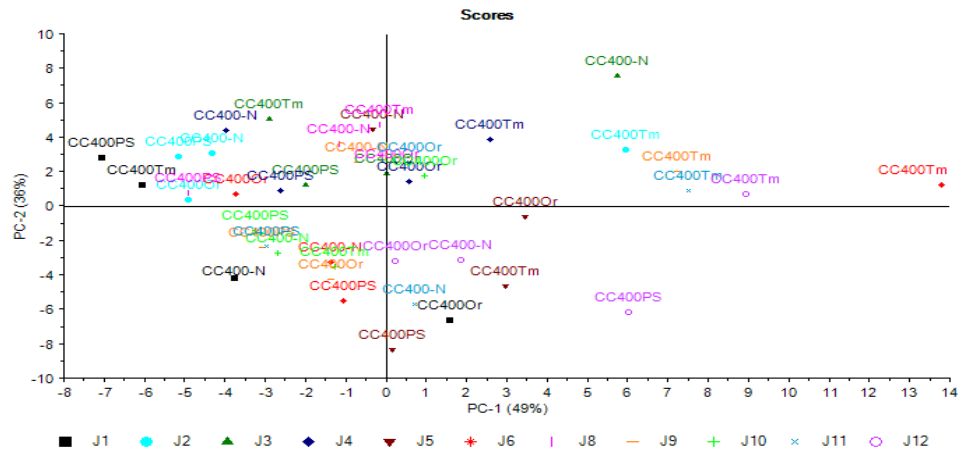


Figure 123 : ACP Evolution temporelle spectres IR CC400, 800-1780  $\text{cm}^{-1}$ .

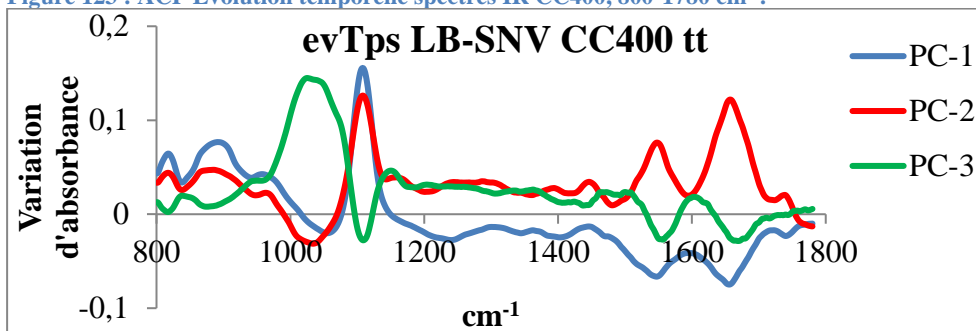


Figure 124 : Loading ACP Evolution temporelle spectres IR CC400, 800-1780  $\text{cm}^{-1}$ .

### 4.3 Spectroscopie IR : Evolution temporelle à 4, 8 et 11 jours

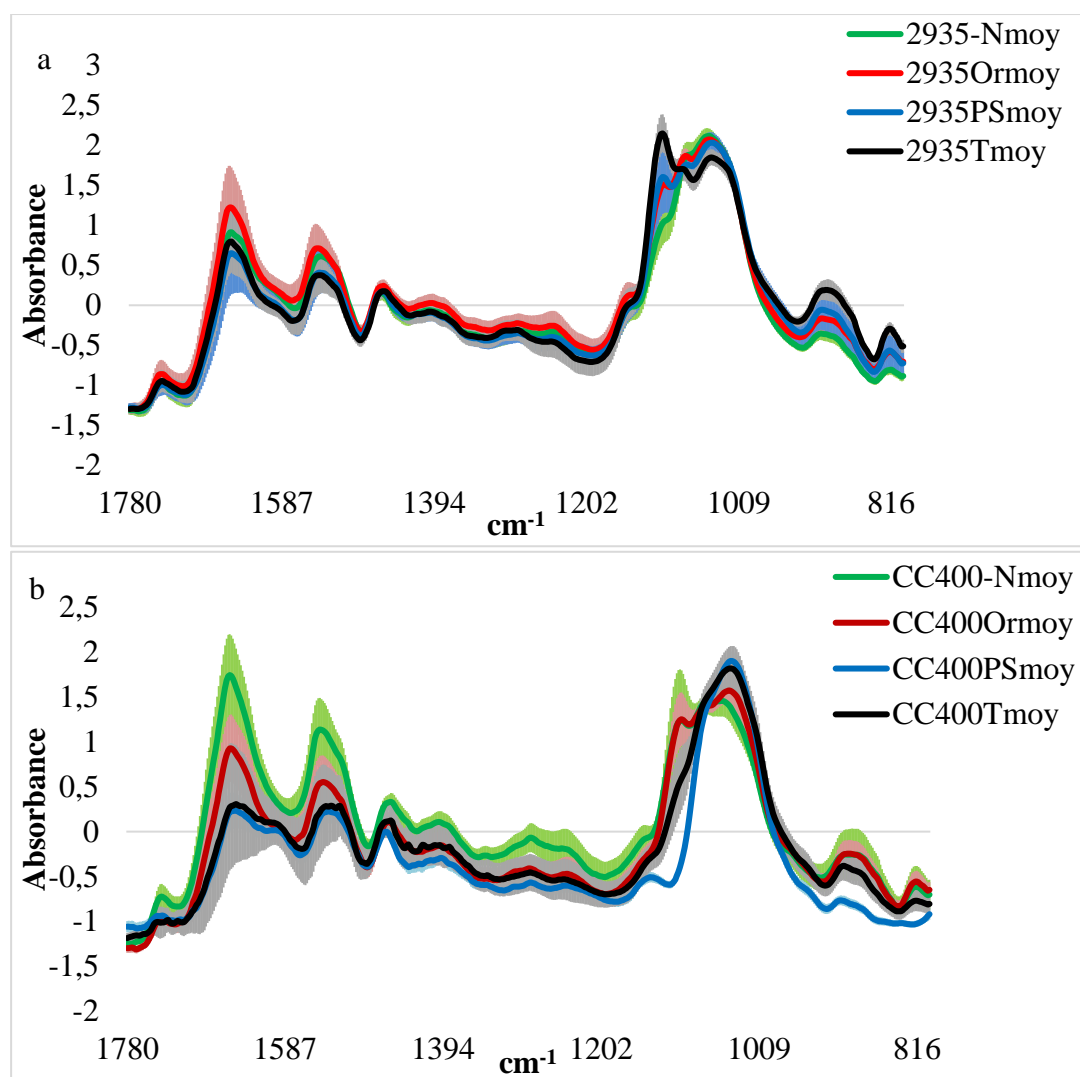


Figure 125 : Spectres infrarouge moyens après LB+SNV (1780-800  $\text{cm}^{-1}$ ) après quatre jours d'interactions des deux souches *C. reinhardtii* 2935 (a) et CC400 (b) avec des NP Or (rouge), des NP PS (bleu) et en condition stress azote (vert) et témoin (noir).

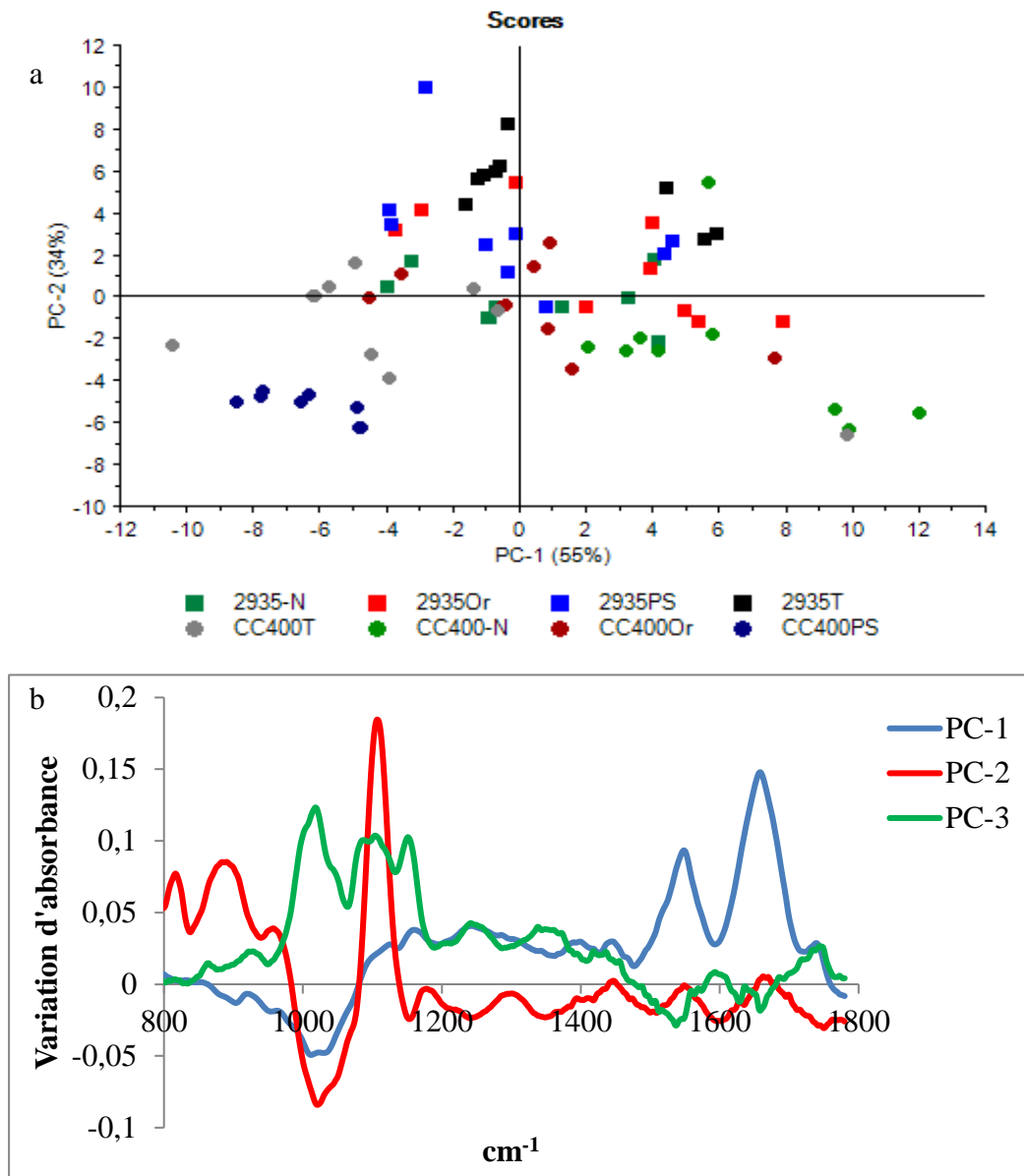


Figure 126 : (a) ACP spectres infrarouge moyens après LB+SNV (1780-800  $\text{cm}^{-1}$ ) après quatre jours d'interactions des deux souches *C. reinhardtii* 2935 (carré) et CC400 (rond) avec des NP Or (rouge), des NP PS (bleu) et en condition stress azote (vert) et témoin (noir). (b) X loadings PC1 (bleu), PC2 (rouge), PC3 (vert).

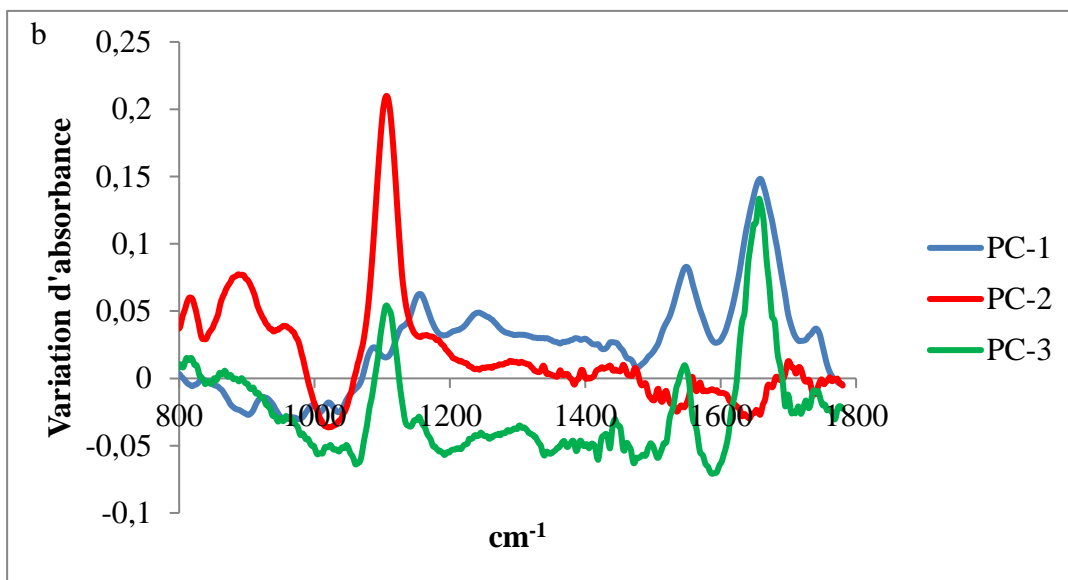
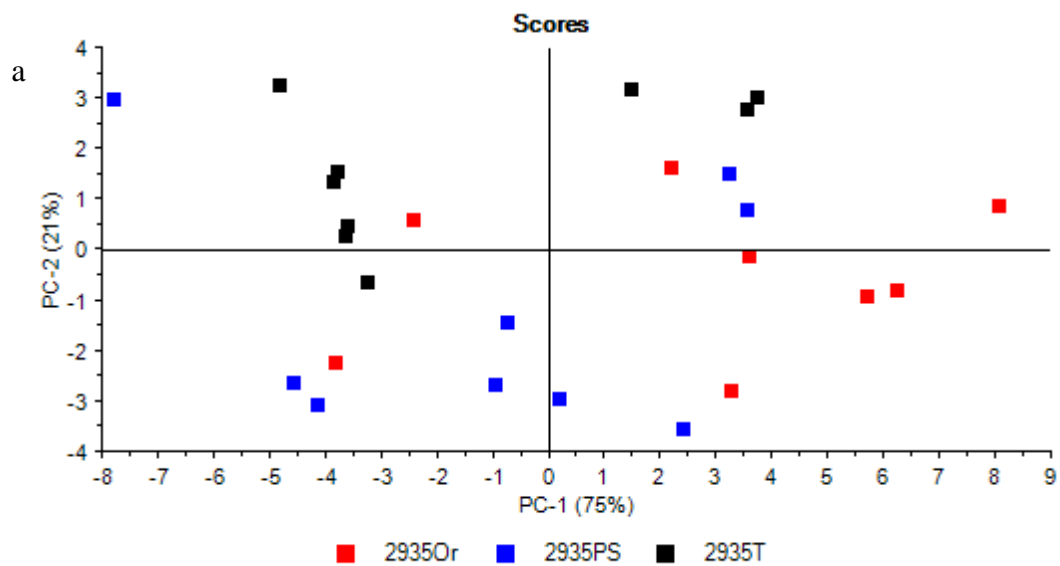


Figure 127 : (a) ACP spectres infrarouge moyens après LB+SNV (1780-800  $\text{cm}^{-1}$ ) après quatre jours d'interactions avec *C. reinhardtii* 2935 (carré) avec des NP Or (rouge), des NP PS (bleu) et en condition témoin (noir) (b) X loadings ACP : PC1 (bleu), PC2 (rouge) et PC3 (vert).

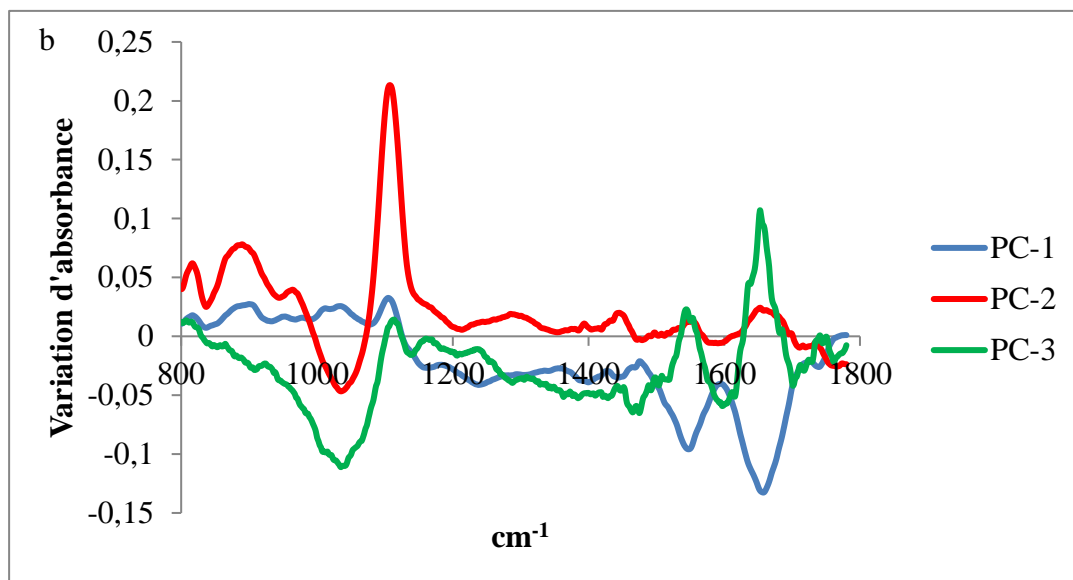
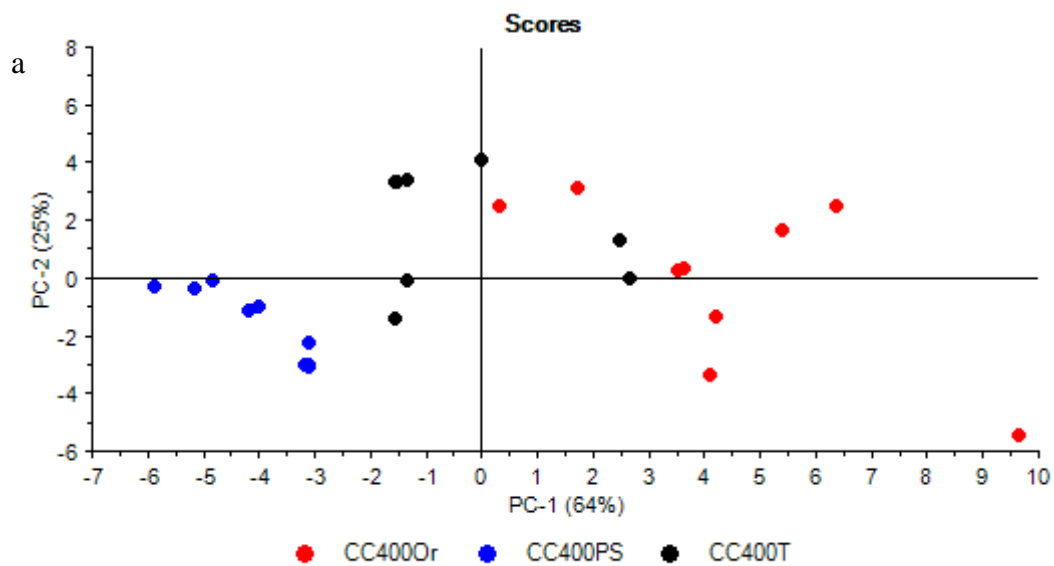


Figure 128 : (a) ACP spectres infrarouge moyens après LB+SNV (1780-800  $\text{cm}^{-1}$ ) après quatre jours d'interactions avec *C. reinhardtii* CC400 (rond) avec des NP Or (rouge), des NP PS (bleu) et en condition témoin (noir) (b) X loadings ACP : PC1 (bleu), PC2 (rouge) et PC3 (vert).

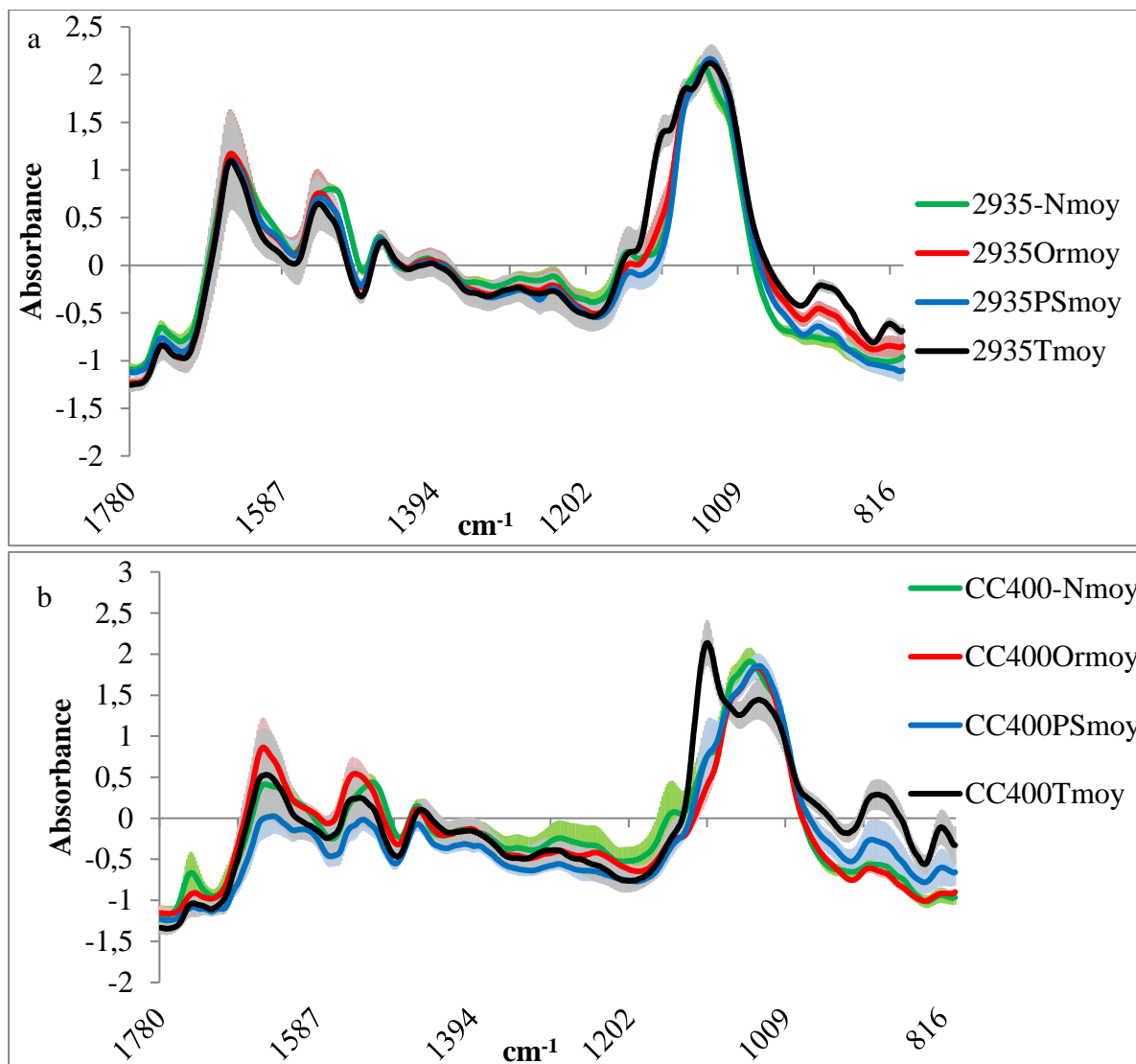


Figure 129 : Spectres infrarouge moyens après LB+SNV (1780-800  $\text{cm}^{-1}$ ) après onze jours d'interactions des deux souches *C. reinhardtii* 2935 (a) et CC400 (b) avec des NP Or (rouge), des NP PS (bleu) et en condition stress azote (vert) et témoin (noir).

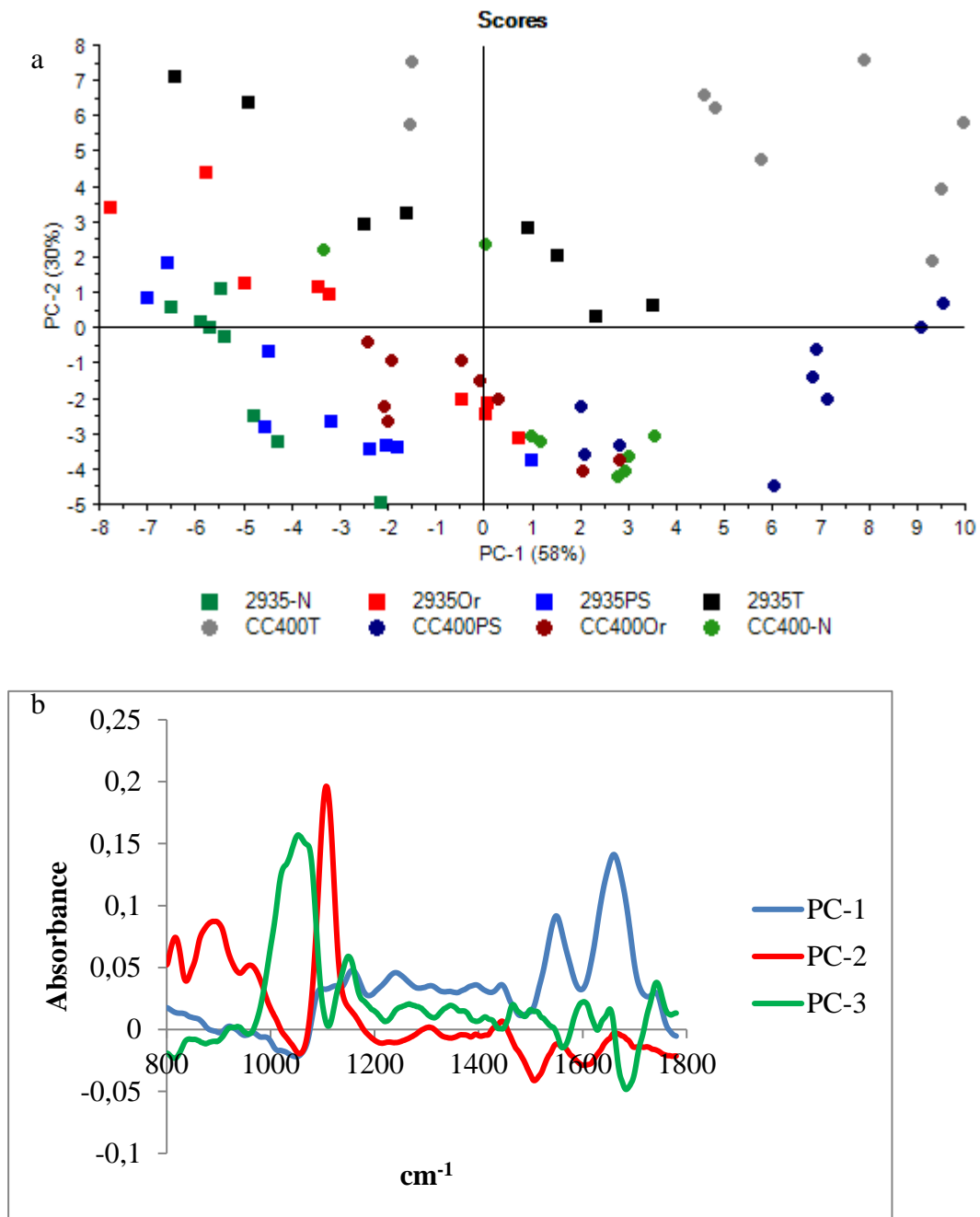


Figure 130 : a) ACP spectres infrarouge moyens après LB+SNV (1780-800 cm<sup>-1</sup>) après onze jours d'interactions des deux souches *C. reinhardtii* 2935 (carré) et CC400 (rond) avec des NP Or (rouge), des NP PS (bleu) et en condition stress azote (vert) et témoin (noir). (b) X loadings PC1 (bleu), PC2 (rouge), PC3 (vert).

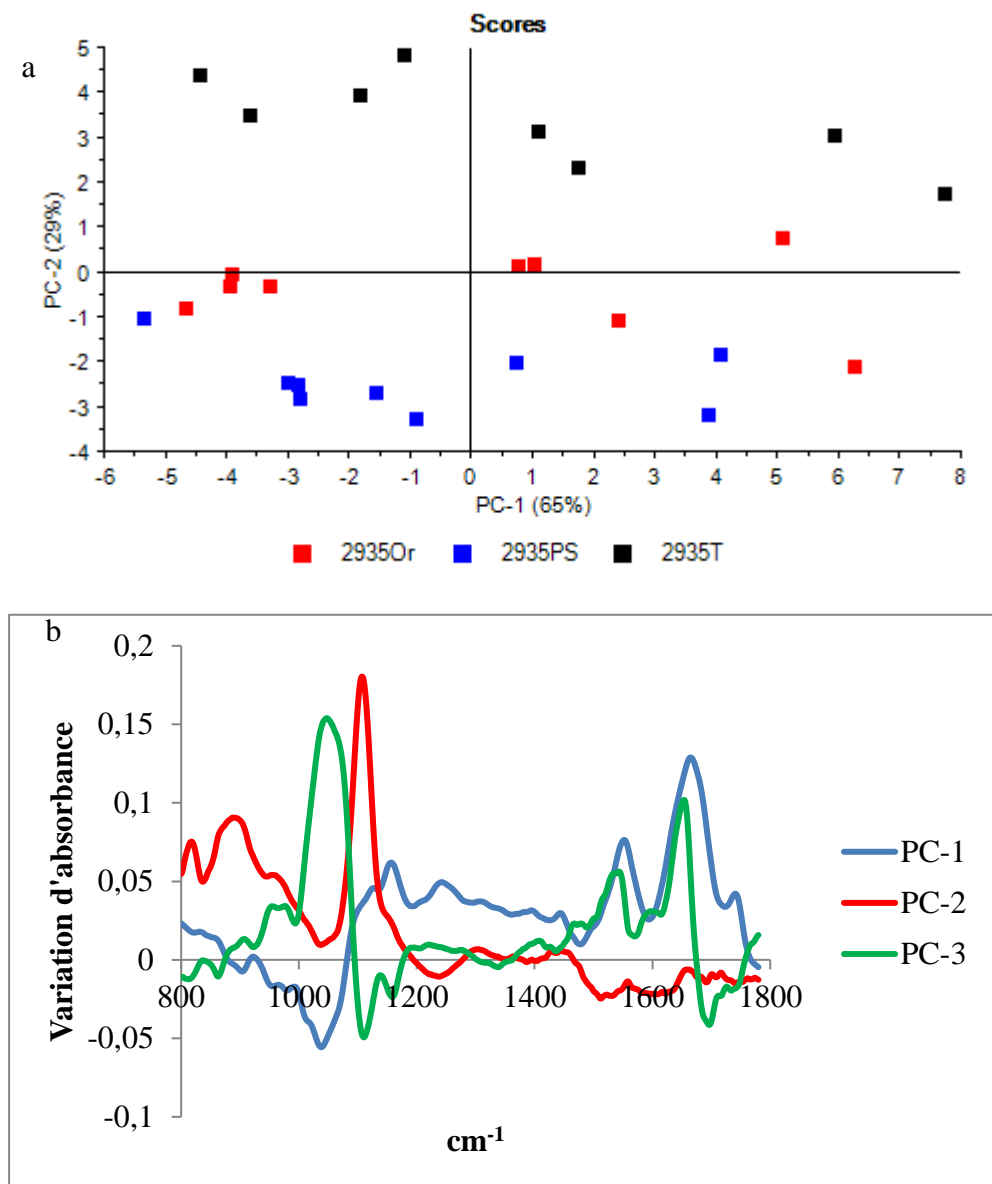


Figure 131 : (a) ACP spectres infrarouge moyens après LB+SNV ( $1780-800 \text{ cm}^{-1}$ ) après onze jours d'interactions avec *C. reinhardtii* 2935 (carré) avec des NP Or (rouge), des NP PS (bleu) et en condition témoin (noir) (b) X loadings ACP : PC1 (bleu), PC2 (rouge) et PC3 (vert).



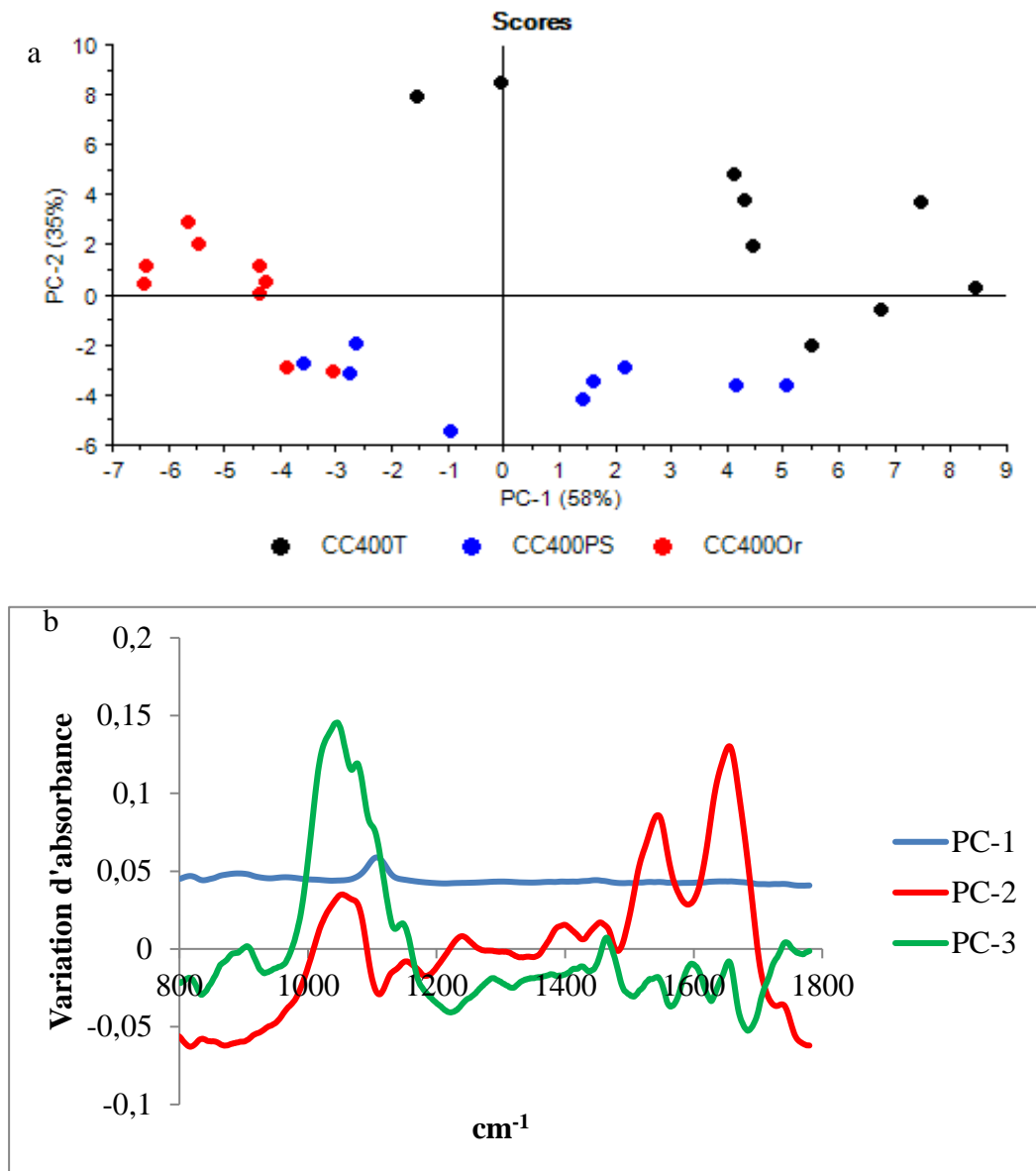


Figure 132 : (a) ACP spectres infrarouge moyens après LB+SNV ( $1780-800 \text{ cm}^{-1}$ ) après onze jours d'interactions avec *C. reinhardtii* CC400 (rond) avec des NP Or (rouge), des NP PS (bleu) et en condition témoin (noir) (b) X loadings ACP : PC1 (bleu), PC2 (rouge) et PC3 (vert).

# Bibliographie

---

1. ANSES (2014) Évaluation des risques liés aux nanomatériaux Enjeux et mise à jour des connaissances
2. López-Serrano A, Olivás RM, Landaluze JS, Cámara C (2014) Nanoparticles: a global vision. Characterization, separation, and quantification methods. Potential environmental and health impact. *Anal Methods* 6:38–56 . <https://doi.org/10.1039/C3AY40517F>
3. Biswas JK, Sarkar D (2019) Nanopollution in the Aquatic Environment and Ecotoxicity: No Nano Issue! *Curr Pollut Reports* 5:4–7 . <https://doi.org/10.1007/s40726-019-0104-5>
4. Lapresta-Fernández A, Fernández A, Blasco J (2012) Nanoecotoxicity effects of engineered silver and gold nanoparticles in aquatic organisms. *TrAC - Trends Anal Chem* 32:40–59 . <https://doi.org/10.1016/j.trac.2011.09.007>
5. Renault S, Baudrimont M, Mesmer-Dudons N, Gonzalez P, Mornet S, Brisson A (2008) Impacts of gold nanoparticle exposure on two freshwater species: a phytoplanktonic alga (*Scenedesmus subspicatus*) and a benthic bivalve (*Corbicula fluminea*). *Gold Bull* 41:116–126 . <https://doi.org/10.1007/BF03216589>
6. Zhang C, Hu Z, Deng B (2015) Silver nanoparticles in aquatic environments: Physicochemical behavior and antimicrobial mechanisms. *Water Res* 88:403–427 . <https://doi.org/10.1016/j.watres.2015.10.025>
7. Ksiazek M, Asztemborska M, Steborowski R, Bystrzejewska-Piotrowska G (2015) Toxic effect of silver and platinum nanoparticles toward the freshwater microalga *Pseudokirchneriella subcapitata*. *Bull Environ Contam Toxicol* 94:554–558 . <https://doi.org/10.1007/s00128-015-1505-9>
8. Ansari SM, Bhor RD, Pai KR, Sen D, Mazumder S, Ghosh K, Kolekar YD, Ramana C V. (2017) Cobalt nanoparticles for biomedical applications: Facile synthesis, physicochemical characterization, cytotoxicity behavior and biocompatibility. *Appl Surf Sci* 414:171–187 . <https://doi.org/10.1016/j.apsusc.2017.03.002>
9. Almeida E, Diamantino TC, De Sousa O (2007) Marine paints: The particular case of antifouling paints. *Prog Org Coatings* 59:2–20 . <https://doi.org/10.1016/j.porgcoat.2007.01.017>
10. Sandberg J, Odenvall Wallinder I, Leygraf C, Virta M (2007) Release and chemical speciation of copper from anti-fouling paints with different active copper compounds in artificial seawater. *Mater Corros* 58:165–172 . <https://doi.org/10.1002/maco.200604002>
11. Lee WM, An YJ (2013) Effects of zinc oxide and titanium dioxide nanoparticles on green algae under visible, UVA, and UVB irradiations: No evidence of enhanced algal toxicity under UV pre-irradiation. *Chemosphere* 91:536–544 . <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2012.12.033>
12. Yung MMN, Fougères P-A, Leung YH, Liu F, Djurišić AB, Giesy JP, Leung KMY (2017) Physicochemical characteristics and toxicity of surface-modified zinc oxide nanoparticles to freshwater and marine microalgae. *Sci Rep* 7:15909 . <https://doi.org/10.1038/s41598-017-15988-0>
13. Celardo I, Pedersen JZ, Traversa E, Ghibelli L (2011) Pharmacological potential of cerium oxide nanoparticles. *Nanoscale* 3:1411 . <https://doi.org/10.1039/c0nr00875c>
14. Trovarelli A, De Leitenburg C, Boaro M, Dolcetti G (1999) The utilization of ceria in industrial catalysis. *Catal Today* 50:353–367 . [https://doi.org/10.1016/S0920-5861\(98\)00515-X](https://doi.org/10.1016/S0920-5861(98)00515-X)
15. Gong N, Shao K, Feng W, Lin Z, Liang C, Sun Y (2011) Biototoxicity of nickel oxide nanoparticles and bio-remediation by microalgae *Chlorella vulgaris*. *Chemosphere* 83:510–516 . <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2010.12.059>
16. Oukarroum A, Zaidi W, Samadani M, Dewez D (2017) Toxicity of nickel oxide nanoparticles on a freshwater green algal strain of *Chlorella vulgaris*. *Biomed Res Int* 2017: . <https://doi.org/10.1155/2017/9528180>
17. Wang J, Zhang X, Chen Y, Sommerfeld M, Hu Q (2008) Toxicity assessment of manufactured nanomaterials using the unicellular green alga *Chlamydomonas reinhardtii*. *Chemosphere* 73:1121–1128 . <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2008.07.040>
18. Robichaud CO, Uyar AE, Darby MR, Zucker LG, Wiesner MR (2009) Estimates of Upper Bounds and Trends in Nano-TiO<sub>2</sub> Production As a Basis for Exposure Assessment. *Environ Sci Technol* 43:4227–4233 . <https://doi.org/10.1021/es8032549>
19. Vance ME, Kuiken T, Vejerano EP, McGinnis SP, Hochella MF, Hull DR (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>
20. Osmond MJ, Mccall MJ (2010) Zinc oxide nanoparticles in modern sunscreens: An analysis of potential exposure and hazard. *Nanotoxicology* 4:15–41 . <https://doi.org/10.3109/17435390903502028>
21. Suman TY, Radhika Rajasree SR, Kirubakaran R (2015) Evaluation of zinc oxide nanoparticles toxicity

- on marine algae *Chlorella vulgaris* through flow cytometric, cytotoxicity and oxidative stress analysis. *Ecotoxicol Environ Saf* 113:23–30 . <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2014.11.015>
22. Balusamy B, Taştan BE, Ergen SF, Uyar T, Tekinay T (2015) Toxicity of lanthanum oxide (La<sub>2</sub>O<sub>3</sub>) nanoparticles in aquatic environments. *Environ Sci Process Impacts* 17:1265–70 . <https://doi.org/10.1039/c5em00035a>
  23. Kadar E, Rooks P, Lakey C, White DA (2012) The effect of engineered iron nanoparticles on growth and metabolic status of marine microalgae cultures. *Sci Total Environ* 439:8–17 . <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2012.09.010>
  24. Adeleye AS, Keller AA (2016) Interactions between Algal Extracellular Polymeric Substances and Commercial TiO<sub>2</sub> Nanoparticles in Aqueous Media. *Environ Sci Technol* 50:12258–12265 . <https://doi.org/10.1021/acs.est.6b03684>
  25. Fujiwara K, Suematsu H, Kiyomiya E, Aoki M, Sato M, Moritoki N (2008) Size-dependent toxicity of silica nano-particles to *Chlorella kessleri*. *J Environ Sci Heal Part A* 43:1167–1173 . <https://doi.org/10.1080/10934520802171675>
  26. Aruoja V, Pokhrel S, Sihtmäe M, Mortimer M, Mädlar L, Kahru A (2015) Toxicity of 12 metal-based nanoparticles to algae, bacteria and protozoa. *Environ Sci Nano* 2:630–644 . <https://doi.org/10.1039/C5EN00057B>
  27. Athinarayanan J, Periasamy VS, Alsaif MA, Al-Warthan AA, Alshatwi AA (2014) Presence of nanosilica (E551) in commercial food products: TNF-mediated oxidative stress and altered cell cycle progression in human lung fibroblast cells. *Cell Biol Toxicol* 30:89–100 . <https://doi.org/10.1007/s10565-014-9271-8>
  28. Jambeck JR, Geyer R, Wilcox C, Siegler TR, Perryman M, Andrady A, Narayan R, Lavender K (2015) Plastic waste inputs from land into the ocean. *Science* (80- ) 347:768–771 . <https://doi.org/10.1126/science.1260352>
  29. Wilber RJ (1987) Plastic in the North Atlantic. *Oceanus* 30:61–68
  30. Plastics Europe (2017) Plastic - The Facts 2017. *Eur Assoc Plast Recycl* 44
  31. Julienne F, Delorme N, Lagarde F (2019) From macroplastics to microplastics: Role of water in the fragmentation of polyethylene. *Chemosphere* 236:124409 . <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2019.124409>
  32. Cooper DA, Corcoran PL (2010) Effects of mechanical and chemical processes on the degradation of plastic beach debris on the island of Kauai, Hawaii. *Mar Pollut Bull* 60:650–654 . <https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2009.12.026>
  33. Ye S, Andrady AL (1991) Fouling of floating plastic debris under Biscayne Bay exposure conditions. *Mar Pollut Bull* 22:608–613 . [https://doi.org/10.1016/0025-326X\(91\)90249-R](https://doi.org/10.1016/0025-326X(91)90249-R)
  34. Hadad D, Geresh S, Sivan A (2005) Biodegradation of polyethylene by the thermophilic bacterium *Brevibacillus borstelensis*. *J Appl Microbiol* 98:1093–1100 . <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2005.02553.x>
  35. Singh B, Sharma N (2008) Mechanistic implications of plastic degradation. *Polym Degrad Stab* 93:561–584 . <https://doi.org/10.1016/j.polymdegradstab.2007.11.008>
  36. Falco F De, Pia M, Gentile G, Di E, Escudero R, Villalba R, Mossotti R, Montarsolo A, Gavignano S, Tonin C, Avella M (2017) Evaluation of microplastic release caused by textile washing processes of synthetic fabrics. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2017.10.057>
  37. Horton AA, Walton A, Spurgeon DJ, Lahive E, Svendsen C (2017) Microplastics in freshwater and terrestrial environments: Evaluating the current understanding to identify the knowledge gaps and future research priorities. *Sci Total Environ* 586:127–141 . <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2017.01.190>
  38. Phuong NN, Zalouk-Vergnoux A, Poirier L, Kamari A, Châtel A, Mouneyrac C, Lagarde F (2016) Is there any consistency between the microplastics found in the field and those used in laboratory experiments? *Environ Pollut* 211:111–123 . <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2015.12.035>
  39. Long M, Moriceau B, Gallinari M, Lambert C, Huvet A, Raffray J, Soudant P (2015) Interactions between microplastics and phytoplankton aggregates: Impact on their respective fates. *Mar Chem* 175:39–46 . <https://doi.org/10.1016/j.marchem.2015.04.003>
  40. Libralato G, Galdiero E, Falanga A, Carotenuto R, de Alteriis E, Guida M (2017) Toxicity Effects of Functionalized Quantum Dots, Gold and Polystyrene Nanoparticles on Target Aquatic Biological Models: A Review. *Molecules* 22:1439 . <https://doi.org/10.3390/molecules22091439>
  41. Davarpanah E, Guilhermino L (2015) Single and combined effects of microplastics and copper on the population growth of the marine microalgae *Tetraselmis chuii*. *Estuar Coast Shelf Sci* 167:269–275 . <https://doi.org/10.1016/j.ecss.2015.07.023>
  42. Lagarde F, Olivier O, Zanella M, Daniel P, Hiard S, Caruso A (2016) Microplastic interactions with freshwater microalgae: Hetero-aggregation and changes in plastic density appear strongly dependent on

- polymer type. *Environ Pollut* 215:331–339 . <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2016.05.006>
43. Zhang C, Wang J, Tan L, Chen X (2016) Toxic effects of microplastic on marine microalgae *Skeletonema costatum* : Interactions between microplastic and algae. *Aquat Toxicol* 178:158–164 . <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2016.07.020>
  44. Andrady AL (2017) The plastic in microplastics: A review. *Mar Pollut Bull* 119:12–22 . <https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2017.01.082>
  45. Ter Halle A, Jeanneau L, Martignac M, Jardé E, Pedrono B, Brach L, Gigault J (2017) Nanoplastic in the North Atlantic Subtropical Gyre. *Environ Sci Technol* 51:13689–13697 . <https://doi.org/10.1021/acs.est.7b03667>
  46. Gigault J, Pedrono B, Maxit B, Ter Halle A (2016) Marine plastic litter: The unanalyzed nano-fraction. *Environ Sci Nano* 3:346–350 . <https://doi.org/10.1039/c6en00008h>
  47. Daniel M-C, Astruc D (2004) Gold Nanoparticles: Assembly, Supramolecular Chemistry, Quantum-Size-Related Properties, and Applications toward Biology, Catalysis, and Nanotechnology. *Chem Rev* 104:293–346 . <https://doi.org/10.1021/cr030698+>
  48. Salata O V (2004) Applications of nanoparticles in biology and medicine. *J Nanobiotechnology* 6:1–6 . <https://doi.org/10.1186/1477-3155-2-12>
  49. Aitken RJ, Chaudhry MQ, Boxall ABA, 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>
  50. Besseling E, Wang B, Lüring M, Koelmans AA (2014) Nanoplastic Affects Growth of *S. obliquus* and Reproduction of *D. magna*. *Environ Sci Technol* 48:12336–12343 . <https://doi.org/10.1021/es503001d>
  51. Nolte TM, Hartmann NB, Kleijn JM, Garnæs J, van de Meent D, Jan Hendriks A, Baun A (2016) The toxicity of plastic nanoparticles to green algae as influenced by surface modification, medium hardness and cellular adsorption. *Aquat Toxicol* 183:11–20 . <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2016.12.005>
  52. Handy RD, Cornelis G, Fernandes T, Tsyusko O, DECHO A, Sabo-attwood T, Metcalfe C, Steevens JA, Klaine SJ, Koelmans AA, Horne N (2012) Ecotoxicity test methods for engineered nanomaterials: practical experiences and recommendations from the bench. *Environ Toxicol Chem* 31:15–31 . <https://doi.org/10.1002/etc.706>
  53. Sadiq IM, Dalai S, Chandrasekaran N, Mukherjee A (2011) Ecotoxicity study of titania (TiO<sub>2</sub>) NPs on two microalgae species: *Scenedesmus* sp. and *Chlorella* sp. *Ecotoxicol Environ Saf* 74:1180–1187 . <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2011.03.006>
  54. Barwal I, Ranjan P, Kateriya S, Yadav S (2011) Cellular oxido-reductive proteins of *Chlamydomonas reinhardtii* control the biosynthesis of silver nanoparticles. *J Nanobiotechnology* 9:56 . <https://doi.org/10.1186/1477-3155-9-56>
  55. Leclerc S, Wilkinson KJ (2014) Bioaccumulation of nanosilver by *Chlamydomonas reinhardtii* - Nanoparticle or the free ion? *Environ Sci Technol* 48:358–364 . <https://doi.org/10.1021/es404037z>
  56. Pulido-Reyes G, Rodea-Palomares I, Das S, Sakthivel TS, Leganes F, Rosal R, Seal S, Fernández-Piñas F (2015) Untangling the biological effects of cerium oxide nanoparticles: the role of surface valence states. *Sci Rep* 5:15613 . <https://doi.org/10.1038/srep15613>
  57. Van Hoecke K, De Schamphelaere KAC, Van der Meeren P, Lucas S, Janssen CR (2008) Ecotoxicity of Silica Nanoparticles To the Green Alga *Pseudokirchneriella subcapitata*: Importance of Surface Area. *Environ Toxicol Chem* 27:1948 . <https://doi.org/10.1897/07-634.1>
  58. Selck H, Handy RD, Fernandes TF, Klaine SJ, Petersen EJ (2016) Nanomaterials in the Aquatic Environment: A European Union–United States Perspective on the Status of Ecotoxicity Testing, Research Priorities, and Challenges Ahead. *Environ Toxicol Chem* 35:1055–1067 . <https://doi.org/10.1002/etc.3385>
  59. Hartmann NB, Von der Kammer F, Hofmann T, Baalousha M, Ottofuelling S, Baun A (2010) Algal testing of titanium dioxide nanoparticles-Testing considerations, inhibitory effects and modification of cadmium bioavailability. *Toxicology* 269:190–197 . <https://doi.org/10.1016/j.tox.2009.08.008>
  60. Casado MP, Macken A, Byrne HJ (2013) Ecotoxicological assessment of silica and polystyrene nanoparticles assessed by a multitrophic test battery. *Environ Int* 51:97–105 . <https://doi.org/10.1016/j.envint.2012.11.001>
  61. Pakrashi S, Dalai S, T.C. P, Trivedi S, Myneni R, Raichur AM, Chandrasekaran N, Mukherjee A (2013) Cytotoxicity of aluminium oxide nanoparticles towards fresh water algal isolate at low exposure concentrations. *Aquat Toxicol* 132–133:34–45 . <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2013.01.018>
  62. Adeleye AS, Stevenson LM, Su Y, Nisbet RM, Zhang Y, Arturo AK (2016) Influence of Phytoplankton on Fate and Effects of Modified Zerovalent Iron Nanoparticles. *Environ Sci Technol*
  63. Iswarya V, Johnson JB, Parashar A, Pulimi M, Chandrasekaran N, Mukherjee A (2016) Modulatory effects of Zn<sup>2+</sup> ions on the toxicity of citrate- and PVP-capped gold nanoparticles towards freshwater

- algae, *Scenedesmus obliquus*. Environ Sci Pollut Res. <https://doi.org/10.1007/s11356-016-8131-x>
64. Bergami E, Pugnali S, Vannuccini ML, Manfra L, Faleri C, Savorelli F, Dawson KA, Corsi I (2017) Long-term toxicity of surface-charged polystyrene nanoplastics to marine planktonic species *Dunaliella tertiolecta* and *Artemia franciscana*. Aquat Toxicol 189:159–169 . <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2017.06.008>
  65. Yue Y, Li X, Sigg L, Suter MJF, Pillai S, Behra R, Schirmer K (2017) Interaction of silver nanoparticles with algae and fish cells: A side by side comparison. J Nanobiotechnology 15:1–11 . <https://doi.org/10.1186/s12951-017-0254-9>
  66. Chen X, Zhang C, Tan L, Wang J (2018) Toxicity of Co nanoparticles on three species of marine microalgae. Environ Pollut 236:454–461 . <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2018.01.081>
  67. Haiss W, Thanh TKN, Aveyard J, Fernig GD (2007) Determination of size and concentration of gold nanoparticles from extinction spectra. Anal Chem 79:4215–4221 . <https://doi.org/10.1021/ac800834n>
  68. Bhattacharya P, Sijie L, James PT, Pu Chun K (2010) Physical Adsorption of Charged Plastic Nanoparticles Affects Algal Photosynthesis. J Phys Chem C 114:16556 . <https://doi.org/10.1021/jp1054759>
  69. Saison C, Perreault F, Daigle JC, Fortin C, Claverie J, Morin M, Popovic R (2010) Effect of core-shell copper oxide nanoparticles on cell culture morphology and photosynthesis (photosystem II energy distribution) in the green alga, *Chlamydomonas reinhardtii*. Aquat Toxicol 96:109–114 . <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2009.10.002>
  70. Perreault F, Oukarroum A, Melegari SP, Matias WG, Popovic R (2012) Polymer coating of copper oxide nanoparticles increases nanoparticles uptake and toxicity in the green alga *Chlamydomonas reinhardtii*. Chemosphere 87:1388–1394 . <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2012.02.046>
  71. Manier N, Bado-Nilles A, Delalain P, Aguerre-Chariol O, Pandard P (2013) Ecotoxicity of non-aged and aged CeO<sub>2</sub> nanomaterials towards freshwater microalgae. Environ Pollut 180:63–70 . <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2013.04.040>
  72. von Moos N, Slaveykova VI (2014) Oxidative stress induced by inorganic nanoparticles in bacteria and aquatic microalgae--state of the art and knowledge gaps. Nanotoxicology 8:605–630 . <https://doi.org/10.3109/17435390.2013.809810>
  73. Cheloni G, Marti E, Slaveykova VI (2016) Interactive effects of copper oxide nanoparticles and light to green alga *Chlamydomonas reinhardtii*. Aquat Toxicol 170:120–8 . <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2015.11.018>
  74. Sendra M, Yeste PM, Moreno-Garrido I, Gatica JM, Blasco J (2017) CeO<sub>2</sub> NPs, toxic or protective to phytoplankton? Charge of nanoparticles and cell wall as factors which cause changes in cell complexity. Sci Total Environ. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2017.03.007>
  75. Kustov LM, Abramenko NB (2016) Study of ecotoxicity of silver nanoparticles using algae. Russ J Phys Chem A 90:2217–2220 . <https://doi.org/10.1134/S0036024416110121>
  76. Sjollem SB, Redondo-Hasselerharm P, Leslie HA, Kraak MHS, Vethaak AD (2016) Do plastic particles affect microalgal photosynthesis and growth? Aquat Toxicol 170:259–261 . <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2015.12.002>
  77. Tallec K, Blard O, González-Fernández C, Brotons G, Berchel M, Soudant P, Huvet A, Paul-Pont I (2019) Surface functionalization determines behavior of nanoplastic solutions in model aquatic environments. Chemosphere 225:639–646 . <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2019.03.077>
  78. Misra SK, Dybowska A, Berhanu D, Luoma SN, Valsami-Jones E (2012) The complexity of nanoparticle dissolution and its importance in nanotoxicological studies. Sci Total Environ 438:225–232 . <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2012.08.066>
  79. Navarro E, Wagner B, Odzak N, Sigg L, Behra R (2015) Effects of differently coated silver nanoparticles on the photosynthesis of *Chlamydomonas reinhardtii*. Environ Sci Technol 49:8041–8047 . <https://doi.org/10.1021/acs.est.5b01089>
  80. Miller RJ, Lenihan HS, Muller EB, Tseng N, Hanna SK, Keller AA (2010) Impacts of Metal Oxide Nanoparticles on Marine Phytoplankton. Environ Sci Technol 44:7329–7334 . <https://doi.org/10.1021/es100247x>
  81. MacIntyre HL, Kana TM, Geider RJ (2000) The effect of water motion on short-term rates of photosynthesis by marine phytoplankton. Trends Plant Sci 5:12–17
  82. Geider RJ, Delucia EH, Falkowski PG, Finzi a C, Grime JP, Grace J, Kana TM, La Roche J, Long SP, Osborne B a, Platt T, Prentice IC, Raven J a, Schlesinger WH, Smetacek V, Stuart V, Sathyendranath S, Thomas RB, Vogelmann TC, Williams P, Woodward FI (2001) Primary productivity of planet earth: biological determinants and physical constraints in terrestrial and aquatic habitats. Glob Chang Biol 7:849–882 . <https://doi.org/10.1046/j.1365-2486.2001.00448.x>
  83. Bowler C, Karl DM, Colwell RR (2009) Microbial oceanography in a sea of opportunity. Nature

- 459:180–184 . <https://doi.org/10.1038/nature08056>
84. Guiry MD (2012) How many species of algae are there? *J Phycol* 48:1057–1063 . <https://doi.org/10.1111/j.1529-8817.2012.01222.x>
  85. Sagan L (1967) On the origin of mitosing cells. *J Theor Biol* 14:225-IN6 . [https://doi.org/10.1016/0022-5193\(67\)90079-3](https://doi.org/10.1016/0022-5193(67)90079-3)
  86. Hedges SB, Blair JE, Venturi ML, Shoe JL (2004) A molecular timescale of eukaryote evolution and the rise of complex multicellular life. *BMC Evol Biol* 4:1–9 . <https://doi.org/10.1186/1471-2148-4-2>
  87. Becker EW (2007) Micro-algae as a source of protein. *Biotechnol Adv* 25:207–210 . <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2006.11.002>
  88. Choi SP, Nguyen MT, Sim SJ (2010) Enzymatic pretreatment of *Chlamydomonas reinhardtii* biomass for ethanol production. *Bioresour Technol* 101:5330–5336 . <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2010.02.026>
  89. Mishra A, Jha B (2009) Isolation and characterization of extracellular polymeric substances from micro-algae *Dunaliella salina* under salt stress. *Bioresour Technol* 100:3382–3386 . <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2009.02.006>
  90. Bafana A (2013) Characterization and optimization of production of exopolysaccharide from *Chlamydomonas reinhardtii*. *Carbohydr Polym* 95:746–752 . <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2013.02.016>
  91. Vogeler HP, Voigt J, König WA (1990) Polypeptide pattern of the insoluble wall component of *Chlamydomonas reinhardtii* and its variation during the vegetative cell cycle. *Plant Sci* 71:119–128 . [https://doi.org/10.1016/0168-9452\(90\)90075-Y](https://doi.org/10.1016/0168-9452(90)90075-Y)
  92. Fleischer A, O'Neill MA, Ehwald R (1999) The pore size of non-graminaceous plant cell walls is rapidly decreased by borate ester cross-linking of the pectic polysaccharide rhamnogalacturonan II. *Plant Physiol* 121:829–838 . <https://doi.org/10.1104/pp.121.3.829>
  93. Harris EH, Stern DB, Witman GB (2009) The chlamydomonas sourcebook. Elsevier San Diego, CA
  94. Cedervall T, Hansson LA, Lard M, Frohm B, Linse S (2012) Food chain transport of nanoparticles affects behaviour and fat metabolism in fish. *PLoS One* 7:1–6 . <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0032254>
  95. Ebert D (2005) Introduction to *Daphnia* Biology. In: Ecology, Epidemiology, and Parasitism in *Daphnia*, National c. pp 1–25
  96. Mattsson K, Aguilar R, Torstensson O, Perry D, Bernfur K, Linse S, Hansson LA, Åkerfeldt KS, Cedervall T (2018) Disaggregation of gold nanoparticles by *Daphnia magna*. *Nanotoxicology* 12:885–900 . <https://doi.org/10.1080/17435390.2018.1485982>
  97. Pacheco A, Martins A, Guilhermino L (2018) Toxicological interactions induced by chronic exposure to gold nanoparticles and microplastics mixtures in *Daphnia magna*. *Sci Total Environ* 628–629:474–483 . <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2018.02.081>
  98. Chevalier J (2014) Utilisation du comportement natatoire de *Daphnia magna* comme indicateur sensible et précoce de toxicité pour l'évaluation de la qualité de l'eau
  99. Rosenkranz P, Chaudhry Q, Stone V, Fernandes TF (2009) A comparison of Nanoparticle and Fine Particle Uptake By *Daphnia Magna*. *Environ Toxicol Chem* 28:2142–2149
  100. Rehse S, Kloas W, Zarfl C (2016) Short-term exposure with high concentrations of pristine microplastic particles leads to immobilisation of *Daphnia magna*. *Chemosphere* 153:91–99 . <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2016.02.133>
  101. Cui R, Kim SW, An YJ (2017) Polystyrene nanoplastics inhibit reproduction and induce abnormal embryonic development in the freshwater crustacean *Daphnia galeata*. *Sci Rep* 7:1–10 . <https://doi.org/10.1038/s41598-017-12299-2>
  102. Canniff PM, Hoang TC (2018) Microplastic ingestion by *Daphnia magna* and its enhancement on algal growth. *Sci Total Environ* 633:500–507 . <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2018.03.176>
  103. Ogonowski M, Schür C, Jarsén Å, Gorokhova E (2016) The effects of natural and anthropogenic microparticles on individual fitness in *Daphnia magna*. *PLoS One* 11:1–20 . <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0155063>
  104. Heindler FM, Alajmi F, Huerlimann R, Zeng C, Newman SJ, Vamvounis G, van Herwerden L (2017) Toxic effects of polyethylene terephthalate microparticles and Di(2-ethylhexyl)phthalate on the calanoid copepod, *Parvocalanus crassirostris*. *Ecotoxicol Environ Saf* 141:298–305 . <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2017.03.029>
  105. Duquesne S, Küster E (2010) Biochemical, metabolic, and behavioural responses and recovery of *Daphnia magna* after exposure to an organophosphate. *Ecotoxicol Environ Saf* 73:353–359 . <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2009.11.008>
  106. Bownik A (2017) *Daphnia* swimming behaviour as a biomarker in toxicity assessment: A review. *Sci*

- Total Environ 601–602:194–205 . <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2017.05.199>
107. Haap T, Köhler HR (2009) Cadmium tolerance in seven *Daphnia magna* clones is associated with reduced hsp70 baseline levels and induction. *Aquat Toxicol* 94:131–137 . <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2009.06.006>
  108. Rabus M, Söllradl T, Clausen-Schaumann H, Laforsch C (2013) Uncovering Ultrastructural Defences in *Daphnia magna* - An Interdisciplinary Approach to Assess the Predator-Induced Fortification of the Carapace. *PLoS One* 8:1–10 . <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0067856>
  109. Avio CG, Gorbi S, Milan M, Benedetti M, Fattorini D, D’Errico G, Pauletto M, Bargelloni L, Regoli F (2015) Pollutants bioavailability and toxicological risk from microplastics to marine mussels. *Environ Pollut* 198:211–222 . <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2014.12.021>
  110. Kim H, Kim JS, Kim PJ, Won EJ, Lee YM (2018) Response of antioxidant enzymes to Cd and Pb exposure in water flea *Daphnia magna*: Differential metal and age — Specific patterns. *Comp Biochem Physiol Part - C Toxicol Pharmacol* 209:28–36 . <https://doi.org/10.1016/j.cbpc.2018.03.010>
  111. Tatarazako N, Oda S (2007) The water flea *Daphnia magna* (Crustacea, Cladocera) as a test species for screening and evaluation of chemicals with endocrine disrupting effects on crustaceans. *Ecotoxicology* 16:197–203 . <https://doi.org/10.1007/s10646-006-0120-2>
  112. Prado R, Rioboo C, Herrero C, Cid Á (2011) Characterization of cell response in *Chlamydomonas moewusii* cultures exposed to the herbicide paraquat: Induction of chlorosis. *Aquat Toxicol* 102:10–17 . <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2010.12.013>
  113. Miller R, Wu G, Deshpande RR, Vieler A, Gärtner K, Li X, Moellering ER, Zäuner S, Cornish AJ, Liu B, Bullard B, Sears BB, Kuo M-HM-H, Hegg EL, Shachar-Hill Y, Shiu S-HS-H, Benning C, Gartner K, Li X, Moellering ER, Zauner S, Cornish AJ, Liu B, Bullard B, Sears BB, Kuo M-HM-H, Hegg EL, Shachar-Hill Y, Shiu S-HS-H, Benning C (2010) Changes in Transcript Abundance in *Chlamydomonas reinhardtii* following Nitrogen Deprivation Predict Diversion of Metabolism. *Plant Physiol* 154:1737–1752 . <https://doi.org/10.1104/pp.110.165159>
  114. Jamers A, Blust R, De Coen W, Griffin JL, Jones OAH (2013) An omics based assessment of cadmium toxicity in the green alga *Chlamydomonas reinhardtii*. *Aquat Toxicol* 126:355–364 . <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2012.09.007>
  115. Minhas AK, Hodgson P, Barrow CJ, Adholeya A (2016) A review on the assessment of stress conditions for simultaneous production of microalgal lipids and carotenoids. *Front Microbiol* 7:1–19 . <https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.00546>
  116. Irihimovitch V, Yehudai-Resheff S (2008) Phosphate and sulfur limitation responses in the chloroplast of *Chlamydomonas reinhardtii*. *FEMS Microbiol Lett* 283:1–8 . <https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.2008.01154.x>
  117. Dean A, Nicholson J, Sigeo D (2008) Impact of phosphorus quota and growth phase on carbon allocation in *Chlamydomonas reinhardtii*: an FTIR microspectroscopy study. *Eur J Phycol* 43:345–354 . <https://doi.org/10.1080/09670260801979287>
  118. Nama S, Madireddi SK, Devadasu ER, Subramanyam R (2015) High light induced changes in organization, protein profile and function of photosynthetic machinery in *Chlamydomonas reinhardtii*. *J Photochem Photobiol B Biol* 152:367–376 . <https://doi.org/10.1016/j.jphotobiol.2015.08.025>
  119. Koch M, Zagermann S, Kniggendorf A-K, Meinhardt-Wollweber M, Roth B (2017) Violaxanthin cycle kinetics analysed *in vivo* with resonance Raman spectroscopy. *J Raman Spectrosc*. <https://doi.org/10.1002/jrs.5102>
  120. González L, Díaz G, Aranda D, Cruz Y (2015) Biodiesel production based in microalgae: a biorefinery approach. *Nat Sci* 358–369 . <https://doi.org/10.4236/ns.2015.77039>
  121. Poojary M, Barba F, Aliakbarian B, Donsì F, Pataro G, Dias D, Juliano P (2016) Innovative Alternative Technologies to Extract Carotenoids from Microalgae and Seaweeds. *Mar Drugs* 14:214 . <https://doi.org/10.3390/md14110214>
  122. Lemoine Y, Schoefs B (2010) Secondary ketocarotenoid astaxanthin biosynthesis in algae: A multifunctional response to stress. *Photosynth Res* 106:155–177 . <https://doi.org/10.1007/s11120-010-9583-3>
  123. McCarthy SS, Kobayashi MC, Niyogi KK (2004) White mutants of *Chlamydomonas reinhardtii* are defective in phytoene synthase. *Genetics* 168:1249–1257 . <https://doi.org/10.1534/genetics.104.030635>
  124. Huang J, Zhong Y, Sandmann G, Liu J, Chen F (2012) Cloning and selection of carotenoid ketolase genes for the engineering of high-yield astaxanthin in plants. *Planta* 236:691–699 . <https://doi.org/10.1007/s00425-012-1654-6>
  125. Grünwald K, Eckert M, Hirschberg J, Hagen C (2000) Phytoene desaturase is localized exclusively in the chloroplast and up-regulated at the mRNA level during accumulation of secondary carotenoids in *Haematococcus pluvialis* (Volvocales, Chlorophyceae). *Plant Physiol* 122:1261–1268 .

- <https://doi.org/10.1104/pp.122.4.1261>
126. Sánchez JF, Fernández JM, Ación FG, Rueda A, Pérez-Parra J, Molina E (2008) Influence of culture conditions on the productivity and lutein content of the new strain *Scenedesmus almeriensis*. *Process Biochem* 43:398–405 . <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2008.01.004>
  127. Lee C, Ahn JW, Kim JB, Kim JY, Choi YE (2018) Comparative transcriptome analysis of *Haematococcus pluvialis* on astaxanthin biosynthesis in response to irradiation with red or blue LED wavelength. *World J Microbiol Biotechnol* 34:1–14 . <https://doi.org/10.1007/s11274-018-2459-y>
  128. Mulders KJM, Lamers PP, Martens DE, Wijffels RH (2014) Phototrophic pigment production with microalgae: Biological constraints and opportunities. *J Phycol* 50:229–242 . <https://doi.org/10.1111/jpy.12173>
  129. Mata TM, Martins AA, Caetano NS (2010) Microalgae for biodiesel production and other applications: A review. *Renew Sustain Energy Rev* 4:217–232 . <https://doi.org/10.1016/j.rser.2009.07.020>
  130. Tripathi U, Sarada R, Ravishankar GA (2002) Effect of culture conditions on growth of green alga — *Haematococcus pluvialis* and astaxanthin production. *Acta Physiol Plant* 24:323–329 . <https://doi.org/10.1007/s11738-002-0058-9>
  131. Stohs SJ, Bagchi D (1995) Oxidative mechanisms in the toxicity of metal ions. *Free Radic Biol Med* 18:321–336 . [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/0891-5849\(94\)00159-H](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/0891-5849(94)00159-H)
  132. Choi KM, Lee MY (2012) Differential protein expression associated with heat stress in Antarctic microalga. *BioChip J* 6:271–279 . <https://doi.org/10.1007/s13206-012-6310-5>
  133. Ho SH, Nakanishi A, Ye X, Chang JS, Hara K, Hasunuma T, Kondo A (2014) Optimizing biodiesel production in marine *Chlamydomonas* sp. JSC4 through metabolic profiling and an innovative salinity-gradient strategy. *Biotechnol Biofuels* 7:1–16 . <https://doi.org/10.1186/1754-6834-7-97>
  134. Kobayashi M, Kakizono T, Nagai S (1993) Enhanced Carotenoid Biosynthesis by Enhanced Carotenoid Biosynthesis by Oxidative Stress in Acetate-Induced Cyst Cells of a Green Unicellular Alga, *Haematococcus pluvialis*. *Appl Environ Microbiol* 59:867–873
  135. Ranga Rao A, Sarada R, Ravishankar GA (2010) Enhancement of carotenoids in green alga *Botyrococcus braunii* in various autotrophic media under stress conditions. *Int J Biomed* 4:87–92
  136. Borowitzka M (1988) Algal growth media and sources of cultures. In: *Microalgal biotechnology*. Cambridge University Press, Cambridge, pp 456–465
  137. Illman A., Scragg AH, Shales SW (2000) Increase in *Chlorella* strains calorific values. *Enzyme Microb Technol* 27:631–635 . [https://doi.org/10.1016/S0141-0229\(00\)00266-0](https://doi.org/10.1016/S0141-0229(00)00266-0)
  138. Moellering ER, Benning C (2010) RNA interference silencing of a major lipid droplet protein affects lipid droplet size in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Eukaryot Cell* 9:97–106 . <https://doi.org/10.1128/EC.00203-09>
  139. Markou G, Angelidaki I, Georgakakis D (2012) Microalgal carbohydrates: An overview of the factors influencing carbohydrates production, and of main bioconversion technologies for production of biofuels. *Appl Microbiol Biotechnol* 96:631–645 . <https://doi.org/10.1007/s00253-012-4398-0>
  140. Pal D, Khozin-Goldberg I, Cohen Z, Boussiba S (2011) The effect of light, salinity, and nitrogen availability on lipid production by *Nannochloropsis* sp. *Appl Microbiol Biotechnol* 90:1429–1441 . <https://doi.org/10.1007/s00253-011-3170-1>
  141. Belotti G, De Caprariis B, De Filippis P, Scarsella M, Verdone N (2014) Effect of *Chlorella vulgaris* growing conditions on bio-oil production via fast pyrolysis. *Biomass and Bioenergy* 61:187–195 . <https://doi.org/10.1016/j.biombioe.2013.12.011>
  142. Wykoff DD, Davies JP, Melis A, Grossman AR (1998) The regulation of photosynthetic electron transport during nutrient deprivation in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Plant Physiol* 117:129–139 . <https://doi.org/10.1104/pp.117.1.129>
  143. Grossman A (2000) Acclimation of *Chlamydomonas reinhardtii* to its nutrient environment. *Protist* 151:201–224 . <https://doi.org/10.1078/1434-4610-00020>
  144. Siderius M, Musgrave A, Van Den Ende H, Koerten H, Cambier P, Van Der Meer P (1996) *Chlamydomonas eugametos* (Chlorophyta) stores phosphate in polyphosphate bodies together with calcium. *J Phycol* 32:402–409 . <https://doi.org/10.1111/j.0022-3646.1996.00402.x>
  145. Komine Y, Eggink LL, Park H, Hooper JK (2000) Vacuolar granules in *Chlamydomonas reinhardtii*: Polyphosphate and a 70-kDa polypeptide as major components. *Planta* 210:897–905 . <https://doi.org/10.1007/s004250050695>
  146. Quisel JD, Wykoff DD, Grossman AR (1996) Biochemical Characterization of the Extracellular Phosphatases Produced by Phosphorus-Deprived *Chlamydomonas reinhardtii*. *Plant Physiol* 111:839–848 . <https://doi.org/10.1104/pp.111.3.839>
  147. de Hostos EL, Schilling J, Grossman AR (1989) Structure and expression of the gene encoding the periplasmic arylsulfatase of *Chlamydomonas reinhardtii*. *Mol Gen Genet* 218:229–239 .



- [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1097-0061\(19990330\)15:5<385::AID-YEA382>3.0.CO;2-6](https://doi.org/10.1002/(SICI)1097-0061(19990330)15:5<385::AID-YEA382>3.0.CO;2-6)
148. Zhang Z, Shrager J, Jain M, Chang C, Vallon O, Grossman AR (2004) Insights into the Survival of *Chlamydomonas reinhardtii* during Sulfur Starvation Based on Microarray Analysis of Gene Expression. *Eukariotic cell* 3:1331–1348 . <https://doi.org/10.1128/EC.3.5.1331>
  149. Happe T, Hemschemeier A, Winkler M, Kaminski A (2002) Hydrogenases in green algae: Do they save the algae's life and solve our energy problems? *Trends Plant Sci* 7:246–250 . [https://doi.org/10.1016/S1360-1385\(02\)02274-4](https://doi.org/10.1016/S1360-1385(02)02274-4)
  150. Melis A (2007) Photosynthetic H<sub>2</sub> metabolism in *Chlamydomonas reinhardtii* (unicellular green algae). *Planta* 226:1075–1086 . <https://doi.org/10.1007/s00425-007-0609-9>
  151. Beardal J, Raven J (2004) The potential effects of global climate change on microalgal photosynthesis, growth and ecology. *Phycologia* 43:26–40
  152. Chiu SY, Kao CY, Tsai MT, Ong SC, Chen CH, Lin CS (2009) Lipid accumulation and CO<sub>2</sub> utilization of *Nannochloropsis oculata* in response to CO<sub>2</sub> aeration. *Bioresour Technol* 100:833–838 . <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2008.06.061>
  153. Jamers A, Lenjou M, Deraedt P, Bockstaele D Van, Blust R, Coen W de (2009) Flow cytometric analysis of the cadmium-exposed green alga *Chlamydomonas reinhardtii* (Chlorophyceae). *Eur J Phycol* 44:541–550 . <https://doi.org/10.1080/09670260903118214>
  154. Liu ZY, Wang GC, Zhou BC (2008) Effect of iron on growth and lipid accumulation in *Chlorella vulgaris*. *Bioresour Technol* 99:4717–4722 . <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2007.09.073>
  155. Szivák I, Behra R, Sigg L (2009) Metal-induced reactive oxygen species production in *Chlamydomonas reinhardtii* (chlorophyceae). *J Phycol* 45:427–435 . <https://doi.org/10.1111/j.1529-8817.2009.00663.x>
  156. Howe G, Merchant S (1992) Heavy Metal-Activated Synthesis of Peptides in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Plant Physiol* 98:127–136 . <https://doi.org/10.1104/pp.98.1.127>
  157. Stoiber TL, Shafer MM, Armstrong DE (2010) Differential effects of copper and cadmium exposure on toxicity endpoints and gene expression in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Environ Toxicol Chem* 29:191–200 . <https://doi.org/10.1002/etc.6>
  158. Dussud C, Ghiglione J-F (2014) La dégradation des plastiques en mer. In: SFE. <https://www.sfecologie.org/regard/r63-plastiques-en-mer-dussud-et-ghiglione/>
  159. Melegari SP, Perreault F, Costa RHR, Popovic R, Matias WG (2013) Evaluation of toxicity and oxidative stress induced by copper oxide nanoparticles in the green alga *Chlamydomonas reinhardtii*. *Aquat Toxicol* 142–143:431–40 . <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2013.09.015>
  160. von Moos N, Maillard L, Slaveykova VI (2015) Dynamics of sub-lethal effects of nano-CuO on the microalga *Chlamydomonas reinhardtii* during short-term exposure. *Aquat Toxicol* 161:267–275 . <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2015.02.010>
  161. Schwab F, Bucheli TD, Lukhele LP, Magrez A, Nowack B, Sigg L, Knauer K (2011) Are Carbon Nanotube Effects on Green Algae Caused by Shading and Agglomeration? *Environ Sci Technol* 45:6136–6144 . <https://doi.org/10.1021/es200506b>
  162. Hu J, Wang J, Liu S, Zhang Z, Zhang H, Cai X, Pan J, Liu J (2017) Effect of TiO<sub>2</sub> nanoparticle aggregation on marine microalgae *Isochrysis galbana*. *J Environ Sci* 1–8 . <https://doi.org/10.1016/j.jes.2017.05.026>
  163. Navarro E, Piccapietra F, Wagner B, Marconi F, Kaegi R, Odzak N, Sigg L, Behra R (2008) Toxicity of Silver Nanoparticles to *Chlamydomonas reinhardtii*
  164. Navarro E, Baun A, Behra R, Hartmann NB, Filser J, Miao AJ, Quigg A, Santschi PH, 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>
  165. Leclerc S (2013) La bioaccumulation d'une nanoparticule d'argent (nAg) par l'algue verte *Chlamydomonas reinhardtii*: distinguer la contribution de la particule de celle de l'ion Ag<sup>+</sup>
  166. Wang Z-H, Nie X-P, Yue W-J, Li X (2016) Physiological Responses of Three Marine Microalgae Exposed to Cypermethrin. *Int J Clin Exp Med* 9:14247–14253 . <https://doi.org/10.1002/tox>
  167. Zhang X, Zhang T, Manzoor R (2017) Toxicity of Silver Nanoparticles to Marine Microalgae *Chlorella vulgaris*. 433–437
  168. Lee AK, Lewis DM, Ashman PJ (2013) Force and energy requirement for microalgal cell disruption: An atomic force microscope evaluation. *Bioresour Technol* 128:199–206 . <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2012.10.032>
  169. Pinto E, Sigaud- Kutner TCS, Leitao MAS, Okamoto OK (2003) Review heavy metals : induced oxydative stress in algae. *J Phycol* 39:1008–1018 . <https://doi.org/10.1111/j.0022-3646.2003.02-193.x>
  170. Dauda S, Chia MA, Bako SP (2017) Toxicity of titanium dioxide nanoparticles to *Chlorella vulgaris* Beyerinck (Beijerinck) 1890 (Trebouxiophyceae, Chlorophyta) under changing nitrogen conditions. *Aquat Toxicol* 187:108–114 . <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2017.03.020>

171. Röhder LA, Brandt T, Sigg L, Behra R (2014) Influence of agglomeration of cerium oxide nanoparticles and speciation of cerium(III) on short term effects to the green algae *Chlamydomonas reinhardtii*. *Aquat Toxicol* 152:121–130 . <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2014.03.027>
172. Sendra M, Blasco J, Araújo CVM (2017) Is the cell wall of marine phytoplankton a protective barrier or a nanoparticle interaction site? Toxicological responses of *Chlorella autotrophica* and *Dunaliella salina* to Ag and CeO<sub>2</sub> nanoparticles. *Ecol Indic* 0–1 . <https://doi.org/10.1016/j.ecolind.2017.08.050>
173. Xia B, Chen B, Sun X, Qu K, Ma F, Du M (2015) Interaction of TiO<sub>2</sub> nanoparticles with the marine microalga *Nitzschia closterium*: Growth inhibition, oxidative stress and internalization. *Sci Total Environ* 508:525–533 . <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2014.11.066>
174. Li J, Ou D, Zheng L, Gan N, Song L (2011) Applicability of the fluorescein diacetate assay for metabolic activity measurement of *Microcystis aeruginosa* (Chroococcales, Cyanobacteria). *Phycol Res* 59:200–207 . <https://doi.org/10.1111/j.1440-1835.2011.00618.x>
175. Chen X, Lu R, Liu P, Li X (2017) Effects of nano-TiO<sub>2</sub> on *Chlamydomonas reinhardtii* cell surface under UV, natural light conditions. *J Wuhan Univ Technol Sci Ed* 32:217–222 . <https://doi.org/10.1007/s11595-017-1583-0>
176. Metzler DM, Li M, Erdem A, Huang CP (2011) Responses of algae to photocatalytic nano-TiO<sub>2</sub> particles with an emphasis on the effect of particle size. *Chem Eng J* 170:538–546 . <https://doi.org/10.1016/j.cej.2011.02.002>
177. Röhder LA (2014) Interaction of cerium dioxide nanoparticles with the green alga *Chlamydomonas reinhardtii* of physico-chemical characteristics and cerium III. Bremen (GERMANY)
178. Hui X-D, Duan X-Q, Yuan H, Liu K, Du L-F (2010) The effects of Co(2+) on the growth of *Chlamydomonas reinhardtii* and the functions of thylakoid membrane. *J Sichuan Univ (Natural Sci Ed)* 46
179. Taylor NS, Merrifield R, Williams TD, Chipman JK, Lead JR, Viant MR (2016) Molecular toxicity of cerium oxide nanoparticles to the freshwater alga *Chlamydomonas reinhardtii* is associated with supra-environmental exposure concentrations. *Nanotoxicology* 10:1–10 . <https://doi.org/10.3109/17435390.2014.1002868>
180. Simon DF, Domingos RF, Hauser C, Hutchins CM, Zerges W, Wilkinson KJ (2013) Transcriptome sequencing (RNA-seq) analysis of the effects of metal nanoparticle exposure on the transcriptome of *Chlamydomonas reinhardtii*. *Appl Environ Microbiol* 79:4774–4785 . <https://doi.org/10.1128/AEM.00998-13>
181. Schiavo S, Oliviero M, Miglietta M, Rametta G, Manzo S (2016) Genotoxic and cytotoxic effects of ZnO nanoparticles for *Dunaliella tertiolecta* and comparison with SiO<sub>2</sub> and TiO<sub>2</sub> effects at population growth inhibition levels. *Sci Total Environ* 550:619–627 . <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2016.01.135>
182. Yang H, Liu C, Yang D, Zhang H, Xi Z (2009) Comparative study of cytotoxicity, oxidative stress and genotoxicity induced by four typical nanomaterials: The role of particle size, shape and composition. *J Appl Toxicol* 29:69–78 . <https://doi.org/10.1002/jat.1385>
183. Drescher D, Kneipp J (2012) Nanomaterials in complex biological systems: insights from Raman spectroscopy. *Chem Soc Rev* 41:5780 . <https://doi.org/10.1039/c2cs35127g>
184. Wang S, Lv J, Ma J, Zhang S (2016) Cellular internalization and intracellular biotransformation of silver nanoparticles in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Nanotoxicology* 5390:1–7 . <https://doi.org/10.1080/17435390.2016.1179809>
185. Lodeiro P, Browning TJ, Achterberg EP, Guillou A (2017) Mechanisms of silver nanoparticle toxicity to the coastal marine diatom *Chaetoceros curvisetus*. *Sci Rep* 1–10 . <https://doi.org/10.1038/s41598-017-11402-x>
186. Miao AJ, Schwehr KA, Xu C, Zhang SJ, Luo Z, Quigg A, Santschi PH (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>
187. Eroglu E, Eggers PK, Winslade M, Smith SM, Raston CL (2013) Enhanced accumulation of microalgal pigments using metal nanoparticle solutions as light filtering devices. *Green Chem* 15:3155–3159 . <https://doi.org/10.1039/C3GC41291A>
188. Rebello S, Asok AK, Mundayoor S, Jisha MS (2014) Surfactants: Toxicity, remediation and green surfactants. *Environ Chem Lett* 12:275–287 . <https://doi.org/10.1007/s10311-014-0466-2>
189. Schrand AM, Schlager JJ, Dai L, Hussain SM (2010) Preparation of cells for assessing ultrastructural localization of nanoparticles with transmission electron microscopy. *Nat Protoc* 5:744–757 . <https://doi.org/10.1038/nprot.2010.2>
190. Peng X, Palma S, Fisher NS, Wong SS (2011) Effect of morphology of ZnO nanostructures on their toxicity to marine algae. *Aquat Toxicol* 102:186–196 . <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2011.01.014>

191. Salvati A, Åberg C, dos Santos T, Varela J, Pinto P, Lynch I, Dawson KA (2011) Experimental and theoretical comparison of intracellular import of polymeric nanoparticles and small molecules: toward models of uptake kinetics. *Nanomedicine Nanotechnology, Biol Med* 7:818–826 .  
<https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.nano.2011.03.005>
192. Dorney J, Bonnier F, Garcia A, Casey A, Chambers G, Byrne HJ (2012) Identifying and localizing intracellular nanoparticles using Raman spectroscopy. *Analyst* 137:1111 .  
<https://doi.org/10.1039/c2an15977e>
193. Ivask A, Mitchell AJ, Malysheva A, Voelcker NH, Lombi E (2017) Methodologies and approaches for the analysis of cell-nanoparticle interactions. *Wiley Interdiscip Rev Nanomedicine Nanobiotechnology* e1486 . <https://doi.org/10.1002/wnan.1486>
194. Lahr R, Vikesland P (2014) Surface-enhanced Raman spectroscopy (SERS) cellular imaging of intracellularly biosynthesized gold nanoparticles. *ACS Sustain Chem Eng* A-J .  
<https://doi.org/10.1021/sc500105n>
195. Kneipp K, HaKa AS, Kneipp H, Badizadegan KAMRAN, Yoshizawa N, Boone C, Feld MIS (2002) Surface-Enhanced Raman Spectroscopy in Single Living Cells using gold nanoparticles. *Appl Spectrosc* 56:150–154
196. Dalibert M (2008) Spectroscopie dans l'infrarouge. *Tech l'ingénieur* 33:1–2
197. Murdock JN, Wetzel DL (2009) FT-IR microspectroscopy enhances biological and ecological analysis of algae. *Appl Spectrosc Rev* 44:335–361 . <https://doi.org/10.1080/05704920902907440>
198. Verdu J (2013) Spectrométries infrarouge et Raman. *Tech l'ingénieur* 33:0–13
199. Barbillat J, Bougeard D, Delhaye M, Fillaux F (1999) Spectrométrie Raman. *Tech. l'ingénieur - Mes. - Anal.*
200. Wei X, Jie D, Cuello JJ, Johnson DJ, Qiu Z, He Y (2014) Microalgal detection by Raman microspectroscopy. *TrAC - Trends Anal Chem* 53:33–40 . <https://doi.org/10.1016/j.trac.2013.09.012>
201. Vandenabeele P (2013) Practical Raman Spectroscopy : An introduction
202. Chauvet R (2016) Mise en oeuvre d'une technique alternative d'identification de microorganismes pathogènes par utilisation de la spectroscopie Raman exaltée. Université du Maine
203. Jourdain M (2016) Complémentarités de la spectroscopie Infrarouge et Raman
204. Levenson E, Lerch P, Martin MC (2006) Infrared imaging: Synchrotrons vs. arrays, resolution vs. speed. *Infrared Phys Technol* 49:45–52 . <https://doi.org/10.1016/j.infrared.2006.01.026>
205. Rubens H, Ladenburg E (1909) Les propriétés optiques de l'eau dans le spectre infra-rouge. Paris
206. Heraud P, Wood BR, Tobin MJ, Beardall J, McNaughton D (2005) Mapping of nutrient-induced biochemical changes in living algal cells using synchrotron infrared microspectroscopy. *FEMS Microbiol Lett* 249:219–225 . <https://doi.org/10.1016/j.femsle.2005.06.021>
207. Andrew Chan KL, Kazarian SG (2016) Attenuated total reflection Fourier-transform infrared (ATR-FTIR) imaging of tissues and live cells. *Chem Soc Rev* 45:1850–1864 .  
<https://doi.org/10.1039/C5CS00515A>
208. Heraud P, Beardall J, McNaughton D, Wood BR (2007) In vivo prediction of the nutrient status of individual microalgal cells using Raman microspectroscopy. *FEMS Microbiol Lett* 275:24–30 .  
<https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.2007.00861.x>
209. Samek O, Jonáš A, Pilát Z, Zemánek P, Nedbal L, Tríska J, Kotas P, Trtílek M (2010) Raman microspectroscopy of individual algal cells: Sensing unsaturation of storage lipids in vivo. *Sensors* 10:8635–8651 . <https://doi.org/10.3390/s100908635>
210. Collins AM, Jones HDT, Han D, Hu Q, Beechem TE, Timlin JA (2011) Carotenoid distribution in living cells of *Haematococcus pluvialis* (chlorophyceae). *PLoS One* 6:1–7 .  
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0024302>
211. Popov KI, Pegoraro AF, Stolow A, Ramunno L (2012) Image formation in CARS and SRS: effect of an inhomogeneous nonresonant background medium. *Opt Lett* 37:473–475 .  
<https://doi.org/10.1364/OL.37.000473>
212. Merlin JC (1985) Resonance Raman spectroscopy of carotenoids and carotenoid-containing systems. *Pure Appl Chem* 57:785–792 . <https://doi.org/10.1351/pac198557050785>
213. Andreeva A, Velitchkova M (2009) Resonance raman studies of carotenoid molecules within photosystem I particles. *Biotechnol Biotechnol Equip* 23:488–492 .  
<https://doi.org/10.1080/13102818.2009.10818470>
214. Kacurakova M, Wilson RH (2001) Developments in mid-infrared FT-IR spectroscopy of selected carbohydrates. *Carbohydr Polym* 44:291–303
215. Sigeo DC, Bahrami F, Estrada B, Webster RE, Dean AP (2007) The influence of phosphorus availability on carbon allocation and P quota in *Scenedesmus subspicatus*: A synchrotron-based FTIR analysis. *Phycologia* 46:583–592 . <https://doi.org/10.2216/07-14.1>

216. Meng Y, Yao C, Xue S, Yang H (2014) Application of fourier transform infrared (FT-IR) spectroscopy in determination of microalgal compositions. *Bioresour Technol* 151:347–354 . <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2013.10.064>
217. Stehfest K, Toepel J, Wilhelm C (2005) The application of micro-FTIR spectroscopy to analyze nutrient stress-related changes in biomass composition of phytoplankton algae. *Plant Physiol Biochem* 43:717–726 . <https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2005.07.001>
218. Heraud P, Stojkovic S, Beardall J, McNaughton D, Wood BR (2008) Intercolonial variability in macromolecular composition in P-starved and P-replete *Scenedesmus* populations revealed by infrared microspectroscopy. *J Phycol* 44:1335–1339 . <https://doi.org/10.1111/j.1529-8817.2008.00564.x>
219. Beardall J, Young E, Roberts S (2001) Approaches for determining phytoplankton nutrient limitation. *Aquat Sci* 63:44–69 . <https://doi.org/10.1007/PL00001344>
220. Jakob T, Wagner H, Stehfest K, Wilhelm C (2007) A complete energy balance from photons to new biomass reveals a light- and nutrient-dependent variability in the metabolic costs of carbon assimilation. *J Exp Bot* 58:2101–2112 . <https://doi.org/10.1093/jxb/erm084>
221. Wagner H, Liu Z, Langner U, Stehfest K, Wilhelm C (2010) The use of FTIR spectroscopy to assess quantitative changes in the biochemical composition of microalgae. *J Biophotonics* 3:557–566
222. Patel SA, Currie F, Thakker N, Goodacre R (2008) Spatial metabolic fingerprinting using FT-IR spectroscopy: Investigating abiotic stresses on *Micrasterias hardyi*. *Analyst* 133:1707–1713 . <https://doi.org/10.1039/b809441a>
223. Bartošová A, Blinová L, Gerulová K (2015) Characterisation of Polysaccharides And Lipids From Selected Green Algae Species By FTIR-ATR Spectroscopy. *Res Pap Fac Mater Sci Technol Slovak Univ Technol* 23:97–102 . <https://doi.org/10.1515/rput-2015-0011>
224. Kansiz M, Heraud P, Wood B, Burden F, Beardall J, McNaughton D (1999) Fourier transform infrared microspectroscopy and chemometrics as a tool for the discrimination of cyanobacterial strains. *Phytochemistry* 52:407–417 . [https://doi.org/10.1016/S0031-9422\(99\)00212-5](https://doi.org/10.1016/S0031-9422(99)00212-5)
225. Giordano M, Ratti S, Domenighini A, Vogt F (2009) Spectroscopic classification of 14 different microalga species: First steps towards spectroscopic measurement of phytoplankton biodiversity. *Plant Ecol Divers* 2:155–164 . <https://doi.org/10.1080/17550870903353088>
226. Driver T, Bajhaiya AK, Allwood JW, Goodacre R, Pittman JK, Dean AP (2015) Metabolic responses of eukaryotic microalgae to environmental stress limit the ability of FT-IR spectroscopy for species identification. *Algal Res* 11:148–155 . <https://doi.org/10.1016/j.algal.2015.06.009>
227. Kneipp J, Kneipp H, McLaughlin M, Brown D, Kneipp K (2006) In Vivo Molecular Probing of Cellular Compartments with Gold Nanoparticles and Nanoaggregates. *Nano Lett* 6:2225–2231 . <https://doi.org/10.1021/nl061517x>
228. Oyelere AK, Chen PC, Huang X, El-Sayed IH, El-Sayed MA (2007) Peptide-conjugated gold nanorods for nuclear targeting. *Bioconjug Chem* 18:1490–1497 . <https://doi.org/10.1021/bc070132i>
229. Gao Y, Masuda Y, Seo WS, Ohta H, Koumoto K (2004) TiO<sub>2</sub> nanoparticles prepared using an aqueous peroxotitanate solution. *Ceram Int* 30:1365–1368 . <https://doi.org/10.1016/j.ceramint.2003.12.105>
230. Rao MD, Pennathur G (2017) Green synthesis and characterization of cadmium sulphide nanoparticles from *Chlamydomonas reinhardtii* and their application as photocatalysts. *Mater Res Bull* 85:64–73 . <https://doi.org/10.1016/j.materresbull.2016.08.049>
231. Shakibaie M, Forootanfar H, Mollazadeh-Moghaddam K, Bagherzadeh Z, Nafissi-Varcheh N, Shahverdi AR, Faramarzi MA (2010) Green synthesis of gold nanoparticles by the marine microalga *Tetraselmis suecica* . *Biotechnol Appl Biochem* 57:71–75 . <https://doi.org/10.1042/ba20100196>
232. Bharathiraja S, Manivasagan P, Bui NQ, Oh Y (2016) Cytotoxic Induction and Photoacoustic Imaging of Breast Cancer Cells Using Astaxanthin-Reduced Gold Nanoparticles. *Nanomaterials* 6:78 . <https://doi.org/10.3390/nano6040078>
233. Perreault F, Bogdan N, Morin M, Claverie J, Popovic R (2012) Interaction of gold nanoglycodendrimers with algal cells (*Chlamydomonas reinhardtii*) and their effect on physiological processes. *Nanotoxicology* 6:109–120 . <https://doi.org/10.3109/17435390.2011.562325>
234. Higuchi, R., Dollinger, G., Walsh, P. S. and Griffith R (1992) Simultaneous amplification and detection of specific DNA sequences. *Biotechnology* 10:413–417
235. McCord JM, Fridovich I (1969) Superoxide Dismutase: an enzymatic function for erythrocyte hemocuprein. *J Biol Chem* 244:6049–6055
236. Aebi H (1984) Catalase in vitro. *Methods Enzymol* 105:121–126
237. Valledor L, Furuhashi T, Hanak AM, Weckwerth W (2013) Systemic cold stress adaptation of *Chlamydomonas reinhardtii*. *Mol Cell Proteomics* 12:2032–2047 . <https://doi.org/10.1074/mcp.M112.026765>
238. Puzanskiy R, Romanyuk D, Shishova M (2018) Coordinated alterations in gene expression and

- metabolomic profiles of *Chlamydomonas reinhardtii* during batch autotrophic culturing. Biol Commun 63:87–99 . <https://doi.org/10.21638/spbu03.2018.110>
239. Morlon H (2005) Mécanismes de prise en charge du sélénite – Se(IV)- chez l’algue verte unicellulaire *Chlamydomonas reinhardtii*. Bioaccumulation et effets induits sur la croissance et l’ultrastructure. Université de Bordeaux 1
240. Sunda WG, Huntsman SA (1998) Processes regulating cellular metal accumulation and physiological effects: Phytoplankton as model systems. Sci Total Environ 219:165–181 . [https://doi.org/10.1016/S0048-9697\(98\)00226-5](https://doi.org/10.1016/S0048-9697(98)00226-5)
241. Imam SH, Buchanan MJ, Shin HC, Snell WJ (1985) The Chlamydomonas cell wall: Characterization of the wall framework. J Cell Biol 101:1599–1607 . <https://doi.org/10.1083/jcb.101.4.1599>
242. Brock TD, Madigan MT, Martinko JM, Parker J (2003) Brock biology of microorganisms. Upper Saddle River (NJ): Prentice-Hall, 2003.
243. Zemke-White WL, Clements KD, Harris PJ (2000) Acid lysis of macroalgae by marine herbivorous fishes: effects of acid pH on cell wall porosity. J Exp Mar Bio Ecol 245:57–68
244. Roberts K, Gurney-Smith M, Hills GJ (1972) Structure, composition and morphogenesis of the cell wall of *Chlamydomonas reinhardtii*. J Ultrastruct Res 40:599–613 . [https://doi.org/10.1016/0047-7206\(74\)90021-1](https://doi.org/10.1016/0047-7206(74)90021-1)
245. Sack L, Zeyl C, Bell G, Sharbel T, Reboud X, Bernhardt T, Koelewyn H (1994) Isolation of four new strains of *Chlamydomonas reinhardtii* (Chlorophyta) from soil samples. J Phycol 30:770–773 . <https://doi.org/10.1088/1742-6596/194/4/042018>
246. Pröschold T, Harris EH, Coleman AW (2005) Portrait of a Species : *Chlamydomonas reinhardtii*. Genetics 1610:1601–1610 . <https://doi.org/10.1534/genetics.105.044503>
247. Davies DR, Plaskitt A (1971) Genetical and structural analyses of cell-wall formation in *Chlamydomonas reinhardtii*. Genet Res (Camb) 17:33–43
248. Gorman SD, Levine RP (1965) Cytochrome F and plastocyanin : their sequence in the photosynthetic electron transport chain of *Chlamydomonas reinhardtii*. Proc Natl Acad Sci 54:1665–1669 . <https://doi.org/10.1104/pp.126.1.69>
249. Imhof HK, Rusek J, Thiel M, Wolinska J, Laforsch C (2017) Do microplastic particles affect *Daphnia magna* at the morphological, life history and molecular level? PLoS One 12:e0187590 . <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0187590>
250. Chae Y, An Y-J (2017) Effects of micro- and nanoplastics on aquatic ecosystems: Current research trends and perspectives. Mar Pollut Bull 1–9 . <https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2017.01.070>
251. Lawrence SG (1982) Manuel d’élevage d’invertébrés dulçaquicoles choisis, Publicatio. Gouvernement du Canada : Pêches et Océans
252. OCDE (2012) Ligne directrice de l’ocde pour les essais de produits chimiques: absorption cutanée; méthode in vivo 427. 1–10
253. Balakrishnan G, Déniel M, Nicolai T, Chassenieux C, Lagarde F (2019) Towards more realistic reference microplastics and nanoplastics: preparation of polyethylene micro/nanoparticles with a biosurfactant. Environ Sci Nano 6:315–324 . <https://doi.org/10.1039/C8EN01005F>
254. Xiu-huan LI, Hua LI, Cheng-yu C, Jian-tao LI, Feng LIU (2013) Acute toxicity of different type pesticide surfactants to *Daphnia magna*. Yingyong Shengtai Xuebao 24:
255. Hu M, Novo C, Funston A, Wang H, Staleva H, Zou S, Mulvaney P, Xia Y, Hartland G V. (2008) Dark-field microscopy studies of single metal nanoparticles: understanding the factors that influence the linewidth of the localized surface plasmon resonance. J Mater Chem 18:1949 . <https://doi.org/10.1039/b714759g>
256. Ako K (2010) Etude de la structure des gels protéiques par Microscopie confocale. 153
257. Maxwell K, Johnson GN (2000) Chlorophyll fluorescence—a practical guide. J Exp Bot 51:659–668
258. Elfving T, Blidberg E, Sison M, Tedengren M (2003) A comparison between sites of growth, physiological performance and stress responses in transplanted *Tridacna gigas*. Aquaculture 219:815–828
259. Rech M, Mouget JL, Tremblin G (2003) Modification of the Hansatech FMS fluorometer to facilitate measurements with microalgal cultures. Aquat Bot 77:71–80 . [https://doi.org/10.1016/S0304-3770\(03\)00076-7](https://doi.org/10.1016/S0304-3770(03)00076-7)
260. de Sá LC, Oliveira M, Ribeiro F, Rocha TL, Futter MN (2018) Studies of the effects of microplastics on aquatic organisms: What do we know and where should we focus our efforts in the future? Sci Total Environ 645:1029–1039 . <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2018.07.207>
261. Carpin S, Laffer S, Schoentgen F, Valenta R, Chénieux JC, Rideau M, Hamdi S (1998) Molecular characterization of a cytokinin-inducible periwinkle protein showing sequence homology with pathogenesis-related proteins and the bet v1 allergen family. Plant Mol Biol 36:791–798 .

- <https://doi.org/10.1023/A:1005951208815>
262. Pfaffl MW, Tichopad A, Prgomet C, Neuvians TP (2004) Determination of stable housekeeping genes, differentially regulated target genes and sample integrity: BestKeeper – Excel-based tool using pair-wise correlations. *Biotechnol Lett* 26:509–515 . <https://doi.org/10.1016/j.ejor.2016.09.013>
263. Rammal A (2017) Mathématiques appliquées et traitement du signal pour l' évaluation de la dégradation de la biomasse lignocellulosique. Université de Reims Champagne-Ardenne
264. Barnes RJ, Dhanoa MS, Lister SJ (1989) Standard normal variate transformation and de-trending of near-infrared diffuse reflectance spectra. *Appl Spectrosc* 43:772–777 . <https://doi.org/10.1366/0003702894202201>
265. Jebson C, Norici A, Wagner H, Palmucci M, Giordano M, Wilhelm C (2012) FTIR spectra of algal species can be used as physiological fingerprints to assess their actual growth potential. *Physiol Plant* 146:427–438 . <https://doi.org/10.1111/j.1399-3054.2012.01636.x>
266. Palmucci M, Ratti S, Giordano M (2011) Ecological and evolutionary implications of carbon allocation in marine phytoplankton as a function of nitrogen availability: A fourier transform infrared spectroscopy approach. *J Phycol* 47:313–323 . <https://doi.org/10.1111/j.1529-8817.2011.00963.x>
267. Giordano M, Kansiz M, Heraud P, Beardall J (2001) Fourier transform infrared spectroscopy as a novel tool to investigate changes in intracellular macromolecular pools in the marine microalga *Chaetoceros muelleri* (Bacillariophyceae). *Jour of Phyc* 37:271–279
268. Heckmann LH, Connon R, Hutchinson TH, Maund SJ, Sibly RM, Callaghan A (2006) Expression of target and reference genes in *Daphnia magna* exposed to ibuprofen. *BMC Genomics* 7: . <https://doi.org/10.1186/1471-2164-7-175>
269. Poynton HC, Lazorchak JM, Impellitteri CA, Blalock BJ, Rogers K, Allen HJ, Loguinov A, Heckman JL, Govindasmaw S (2012) Toxicogenomic responses of nanotoxicity in *Daphnia magna* exposed to silver nitrate and coated silver nanoparticles. *Environ Sci Technol* 46:6288–6296 . <https://doi.org/10.1021/es3001618>
270. Steinberg CEW, Ouerghemmi N, Herrmann S, Bouchnak R, Timofeyev MA, Menzel R (2010) Stress by poor food quality and exposure to humic substances: *Daphnia magna* responds with oxidative stress, lifespan extension, but reduced offspring numbers. *Hydrobiologia* 652:223–236 . <https://doi.org/10.1007/s10750-010-0334-4>
271. Rmiki N-E (1999) Réponses photoadaptatives de la chlorophycée *Haematococcus pluvialis* floto et production d'astaxanthine. Université Lille 1
272. Fu D, Lu F-K, Zhang X, Freudiger C, Pernik DR, Holtom G, Xie XS (2012) Quantitative Chemical Imaging with Multiplex Stimulated Raman Scattering Microscopy. *J Am Chem Soc* 134:3623–3626 . <https://doi.org/10.1021/ja210081h>
273. He Q, Yang H, Wu L, Hu C (2015) Effect of light intensity on physiological changes, carbon allocation and neutral lipid accumulation in oleaginous microalgae. *Bioresour Technol* 191:219–228 . <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2015.05.021>
274. Wagner H, Dunker S, Liu Z, Wilhelm C (2013) Subcommunity FTIR-spectroscopy to determine physiological cell states. *Curr Opin Biotechnol* 24:88–94 . <https://doi.org/10.1016/j.copbio.2012.09.008>
275. Dean AP, Sigee DC, Estrada B, Pittman JK (2010) Using FTIR spectroscopy for rapid determination of lipid accumulation in response to nitrogen limitation in freshwater microalgae. *Bioresour Technol* 101:4499–4507 . <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2010.01.065>
276. Duygu D (Yalcin), Udoh AU, Ozer T (Baykal), Akbulut A, Erkaya I, Yildiz K, Guler D (2012) Fourier transform infrared (FTIR) spectroscopy for identification of *Chlorella vulgaris* Beijerinck 1890 and *Scenedesmus obliquus* (Turpin) Kützing 1833. *African J Biotechnol* 11:3817–3824 . <https://doi.org/10.5897/ajb11.1863>
277. Dean AP, Nicholson JM, Sigee DC (2012) Changing patterns of carbon allocation in lake phytoplankton: An FTIR analysis. *Hydrobiologia* 684:109–127 . <https://doi.org/10.1007/s10750-011-0973-0>
278. Hu Q (2004) Environmental effects on cell composition. In: *Handbook of microalgal culture: biotechnology and applied phycology*, Richmond A. Oxford
279. Benavente-Valdés JR, Aguilar C, Contreras-Esquivel JC, Méndez-Zavala A, Montañez J (2016) Strategies to enhance the production of photosynthetic pigments and lipids in chlorophyceae species. *Biotechnol Reports* 10:117–125 . <https://doi.org/10.1016/j.btre.2016.04.001>
280. Gillet S, Decottignies P, Chardonnet S, Le Maréchal P (2006) Cadmium response and redoxin targets in *Chlamydomonas reinhardtii*: A proteomic approach. *Photosynth Res* 89:201–211 . <https://doi.org/10.1007/s11120-006-9108-2>
281. Xu M, Deng G, Liu S, Chen S, Cui D, Yang L, Wang Q (2010) Free cadmium ions released from CdTe-based nanoparticles and their cytotoxicity on *Phaeodactylum tricornutum*. *Metallomics* 2:469 . <https://doi.org/10.1039/c005387m>

282. Prasad MN V, Drej K, Skawińska A, Strałka K (1998) Toxicity of cadmium and copper in *Chlamydomonas reinhardtii* wild-type (WT 2137) and cell wall deficient mutant strain (CW 15). *Bull Environ Contam Toxicol* 60:306–311 . <https://doi.org/10.1007/s001289900626>
283. Mainard M, Jacob D (2016) Comprendre. La mesure de taille de nanoparticules par diffusion dynamique de la lumière. *Photoniques* 1827:40–44 . <https://doi.org/10.1051/photon/20168340>
284. Déniel M, Errien N, Daniel P, Caruso A, Lagarde F (2019) Current methods to monitor microalgae-nanoparticle interaction and associated effects. *Aquat Toxicol* 217:105311 . <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2019.105311>
285. He M, Yan Y, Pei F, Wu M, Gebreluel T, Zou S, Wang C (2017) Improvement on lipid production by *Scenedesmus obliquus* triggered by low dose exposure to nanoparticles. *Sci Rep* 7:15526 . <https://doi.org/10.1038/s41598-017-15667-0>
286. Rueler JG, Ades DR (1987) The role of iron nutrition in photosynthesis and nitrogen assimilation in *Scenedesmus quadricauda* (Chlorophyceae) 1. *J Phycol* 23:452–457
287. Mao Y, Ai H, Chen Y, Zhang Z, Zeng P, Kang L, Li W, Gu W, He Q, Li H (2018) Phytoplankton response to polystyrene microplastics: Perspective from an entire growth period. *Chemosphere* 208:59–68 . <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2018.05.170>
288. Coronado E, Galán-Mascarós JR, Martí-Gastaldo C (2009) Design of bimetallic magnetic chains based on oxalate complexes: Towards single chain magnets. *CrystEngComm* 11:2143–2153 . <https://doi.org/10.1039/b910490a>
289. Umezawa I, Komiyama K (1985) Acidic polysaccharide CH-1 isolated from *Chlorella pyrenoidosa* and the use thereof. U.S. Pat. 5976719 6
290. Liu N, Wu X, Fu X, Duan D, Xu J, Gao X (2018) Characterization of Polysaccharides Extracted from a Cultivated Brown Alga *Costaria costata* During the Harvest Period. *J Ocean Univ China* 17:1209–1217 . <https://doi.org/10.1007/s11802-018-3621-8>
291. Ananthi S, Raghavendran HRB, Sunil AG, Gayathri V, Ramakrishnan G, Vasanthi HR (2010) In vitro antioxidant and in vivo anti-inflammatory potential of crude polysaccharide from *Turbinaria ornata* (Marine Brown Alga). *Food Chem Toxicol* 48:187–192 . <https://doi.org/10.1016/j.fct.2009.09.036>
292. Chopin T, Whalen E (1993) A new and rapid method for carrageenan identification by FTIR diffuse reflectance spectroscopy directly on dried, ground algal material. *Carbohydrates Res* 246:51–59
293. Connor EE, Mwamuka J, Gole A, Murphy CJ, Wyatt MD (2005) Gold nanoparticles are taken up by human cells but do not cause acute cytotoxicity. *Small* 1:325–327 . <https://doi.org/10.1002/smll.200400093>
294. Stone V, Nowack B, Baun A, van den Brink N, von der Kammer F, Dusinska M, Handy R, Hankin S, Hassellöv M, Jøner E, Fernandes TF (2010) Nanomaterials for environmental studies: Classification, reference material issues, and strategies for physico-chemical characterisation. *Sci Total Environ* 408:1745–1754 . <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2009.10.035>
295. Buslov DK, Nikonenko NA, Sushko NI, Zhibankov RG (2000) Resolution enhancement in IR spectra of carbohydrates by deconvolution method and comparison of the results with low temperature spectra. *Appl Spectrosc* 54:1651–1658
296. Wiercigroch E, Szafraniec E, Czamara K, Pacia MZ, Majzner K, Kochan K, Kaczor A, Baranska M, Malek K (2017) Raman and infrared spectroscopy of carbohydrates: A review. *Spectrochim Acta - Part A Mol Biomol Spectrosc* 185:317–335 . <https://doi.org/10.1016/j.saa.2017.05.045>
297. Nikonenko NA, Buslov DK, Sushko NI, Zhibankov RG (2000) Investigation of stretching vibrations of glycosidic linkages in disaccharides and polysaccharides with use of IR spectra deconvolution. *Biopolym - Biospectroscopy Sect* 57:257–262 . [https://doi.org/10.1002/1097-0282\(2000\)57:4<257::AID-BIP7>3.0.CO;2-3](https://doi.org/10.1002/1097-0282(2000)57:4<257::AID-BIP7>3.0.CO;2-3)
298. Hofman WU, Witanowski M (1959) The Infrared Spectra of Some Carbohydrates. *Bull l'académie Pol des Sci VII*:619–624
299. Liu M, Chao J, Deng S, Wang K, Li K, Fan C (2014) Dark-field microscopy in imaging of plasmon resonant nanoparticles. *Colloids Surfaces B Biointerfaces* 124:111–117 . <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2014.06.001>
300. Li X (2015) Interactions of silver and polystyrene nanoparticles with algae. *École polytechnique de Lausanne*
301. Wei C, Zhang Y, Guo J, Han B, Yang X, Yuan J (2009) Effects of silica nanoparticles on growth and photosynthetic pigment contents of *Scenedesmus obliquus*. *J Environ Sci* 22:155–160 . [https://doi.org/10.1016/S1001-0742\(08\)62367-0](https://doi.org/10.1016/S1001-0742(08)62367-0)
302. Piccapietra F, Allué CG, Sigg L, Behra R (2012) Intracellular Silver Accumulation in *Chlamydomonas reinhardtii* upon Exposure to Carbonate Coated Silver Nanoparticles and Silver Nitrate. *Environ Sci Technol* 46:7390–7397 . <https://doi.org/10.1021/es300734m>

303. Cakmak T, Angun P, Demiray YE, Ozkan AD, Elibol Z, Tekinay T (2012) Differential effects of nitrogen and sulfur deprivation on growth and biodiesel feedstock production of *Chlamydomonas reinhardtii*. *Biotechnol Bioeng* 109:1947–1957 . <https://doi.org/10.1002/bit.24474>
304. Anandarajah K, Mahendrapurumal G, Sommerfeld M, Hu Q (2012) Characterization of microalga *Nannochloropsis* sp. mutants for improved production of biofuels. *Appl Energy* 96:371–377 . <https://doi.org/10.1016/j.apenergy.2012.02.057>
305. Lasee S, Mauricio J, Thompson WA, Karnjanapiboonwong A, Kasumba J, Subbiah S, Morse AN, Anderson TA (2017) Microplastics in a freshwater environment receiving treated wastewater effluent. *Integr Environ Assess Manag* 13:528–532 . <https://doi.org/10.1002/ieam.1915>
306. Kögel T, Bjørøy Ø, Toto B, Bienfait AM, Sanden M (2020) Micro- and nanoplastic toxicity on aquatic life: Determining factors. *Sci Total Environ* 709:136050 . <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2019.136050>
307. Lehtiniemi M, Hartikainen S, Näkki P, Engström-Öst J, Koistinen A, Setälä O (2018) Size matters more than shape: Ingestion of primary and secondary microplastics by small predators. *Food Webs* 17:e00097 . <https://doi.org/10.1016/j.fooweb.2018.e00097>
308. Rist S, Baun A, Hartmann NB (2017) Ingestion of micro- and nanoplastics in *Daphnia magna* – Quantification of body burdens and assessment of feeding rates and reproduction. *Environ Pollut* 228:398–407 . <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2017.05.048>
309. De Felice B, Bacchetta R, Tremolada P, Parolini M (2018) Polystyrene microplastic uptake and effects on feeding behaviour and reproduction in the cladoceran *Daphnia magna*. In: SETAC Europa. Roma
310. Pikuda O, Xu EG, Berk D, Tufenkji N (2018) Toxicity Assessments of Micro- and Nanoplastics Can Be Confounded by Preservatives in Commercial Formulations. *Environ Sci Technol Lett* acs.estlett.8b00614 . <https://doi.org/10.1021/acs.estlett.8b00614>
311. Olmstead AW, Leblanc GA (2001) Temporal and quantitative changes in sexual reproductive cycling of the cladoceran *Daphnia magna* by a Juvenile Hormone Analog. *J Exp Zool* 290:148–155
312. Ryu K, Maehr R, Gilchrist C, Long M, Bouley D, Mueller B, Ploegh H, Kopito R (2007) The mouse polyubiquitin gene UbC is essential for fetal liver development, cell-cycle progression and stress tolerance. *EMBO J* 26:2693–2706
313. Liu Z, Yu P, Cai M, Wu D, Zhang M, Huang Y, Zhao Y (2019) Polystyrene nanoplastic exposure induces immobilization, reproduction, and stress defense in the freshwater cladoceran *Daphnia pulex*. *Chemosphere* 215:74–81 . <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2018.09.176>
314. Rhee JS, Raisuddin S, Lee KW, Seo JS, Ki JS, Kim IC, Park HG, Lee JS (2009) Heat shock protein (Hsp) gene responses of the intertidal copepod *Tigriopus japonicus* to environmental toxicants. *Comp Biochem Physiol - C Toxicol Pharmacol* 149:104–112 . <https://doi.org/10.1016/j.cbpc.2008.07.009>
315. Peñalva-Arana DC, Lynch M, Robertson HM (2009) The chemoreceptor genes of the waterflea *Daphnia pulex*: Many Grs but no Ors. *BMC Evol Biol* 9:8–11 . <https://doi.org/10.1186/1471-2148-9-79>
316. Verge C, Moreno A, Bravo J, Berna JL (2001) Influence of water hardness on the bioavailability and toxicity of linear alkylbenzene sulphonate (LAS). *Chemosphere* 44:1749–1757
317. Nasser F, Lynch I (2016) Secreted protein eco-corona mediates uptake and impacts of polystyrene nanoparticles on *Daphnia magna*. *J Proteomics* 137:45–51 . <https://doi.org/10.1016/j.jprot.2015.09.005>
318. Jemec A, Horvat P, Kunej U, Bele M, Kržan A (2016) Uptake and effects of microplastic textile fibers on freshwater crustacean *Daphnia magna*. *Environ Pollut* 219:201–209 . <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2016.10.037>
319. Gorokhova E, Könnicke O, Ogonowski M, Gerdes Z, Eriksson Wiklund A (2017) Alterations in swimming behavior of *Daphnia* exposed to polymer and mineral particles : Towards understanding effects of microplastics on planktonic filtrators. 15th Int Conf Environ Sci Technol
320. De Felice B, Sabatini V, Antenucci S, Gattoni G, Santo N, Bacchetta R, Ortenzi MA, Parolini M (2019) Polystyrene microplastics ingestion induced behavioral effects to the cladoceran *Daphnia magna*. *Chemosphere* 231:423–431 . <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2019.05.115>
321. Brennan SJ, Brougham CA, Roche JJ, Fogarty AM (2006) Multi-generational effects of four selected environmental oestrogens on *Daphnia magna*. *Chemosphere* 64:49–55 . <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2005.11.046>
322. Gottschalk F, Sonderer T, Scholz RW, Nowack B (2009) Modeled Environmental Concentrations of Engineered Fullerenes ) for Different Regions. *Environ Sci Technol* 43:9216–9222
323. Sueoka N (1960) Mitotic Replication of Deoxyribonucleic Acid in *Chlamydomonas Reinhardtii*. *Proc Natl Acad Sci* 46:83–91 . <https://doi.org/10.1073/pnas.46.1.83>
324. Yee N, Benning LG, Phoenix VR, Ferris FG (2004) Characterization of Metal–Cyanobacteria Sorption Reactions: A Combined Macroscopic and Infrared Spectroscopic Investigation. *Environ Sci Technol* 38:775–782 . <https://doi.org/10.1021/es0346680>





**Titre :** Spectroscopies infrarouge et Raman de microalgues : étude des interactions avec des micro et nanoparticules

**Mots clés :** Spectroscopie infrarouge ; Microalgues d'eau douce ; Nanoparticules ; Expression génétique ; Interactions ; Plastiques

**Résumé :** Dans un contexte de contamination des eaux naturelles par des micro et nanoparticules (NP), l'étude de leurs interactions avec la base de la chaîne trophique aquatique est primordiale. Les techniques de spectroscopie vibrationnelle (Raman et infrarouge) permettant des analyses sensibles ont ici été testées sur une microalgue modèle pour détecter rapidement des stress environnementaux (lumière, nutriment et métallique). La spectroscopie infrarouge s'est révélée être un bon outil pour l'obtention de la composition macromoléculaire de *Chlamydomonas reinhardtii* en discriminant les différents stress subis. Les impacts de la présence de polluants nanoparticulaires ont été ainsi évalués et comparés avec un stress connu. L'exposition aux NP montre leur non toxicité immédiate aux concentrations testées. Cependant, une perte d'intégrité membranaire au contact des polystyrènes (PS) suggère une

interaction physique plus forte qu'avec les NP d'or. Une modification des bandes protéiques et polysaccharidiques a été observée. La déconvolution spectrale souligne une implication des polysaccharides, composants de structure des microalgues, dans les interactions NP PS et *C. reinhardtii*. Pour comprendre les mécanismes de réponse impliqués, l'expression des gènes (RT-qPCR) liés au stress et à la production de polysaccharides a été suivie. Ainsi l'effet type de nanoparticules a été discriminé notamment par l'expression du gène lié à la biosynthèse du galactose. La comparaison de deux souches de *C. reinhardtii* a permis de comprendre le rôle de la paroi dans la réponse des microalgues évoluant dans le temps. Par ailleurs, l'importance du surfactant dans les interactions avec le biote aquatique a également été étudié.

**Title :** Infrared and Raman spectroscopy of microalgae: study of interactions with micro and nanoparticles

**Keywords :** Infrared spectroscopy ; Freshwater microalgae ; Nanoparticles ; Gene expression ; Interactions ; Plastics

**Abstract:** In a context of contamination of natural waters by micro and nanoparticles (NP), the study of their interactions with the base of the trophic chain, is essential. Techniques such as vibrational spectroscopy (Raman and infrared), which are sensitive analysis have been tested here on a model microalga to quickly detect the effects of environmental stresses (light, nutrients and metals). Infrared spectroscopy has proved to be a good tool for obtaining the macromolecular composition of *Chlamydomonas reinhardtii* by discriminating the different stresses undergone. The impact of the presence of nanopollutants were thus evaluated and compared with a known stress. Exposure to NP shows immediate non toxicity at the concentrations tested. However, a loss of membrane integrity in contact with PS

(polystyrene) NP suggests a stronger interaction than with gold NP. Changes in protein and polysaccharide bands were observed. The spectral deconvolution highlights an involvement of polysaccharides, structural components of microalgae, in NP PS and *C. reinhardtii* interactions. To understand the response mechanisms involved, gene expression (RT-qPCR) related to stress and polysaccharide production was monitored. Thus the typical effect of nanoparticles was discriminated in particular by the gene expression linked to galactose biosynthesis. The comparison of two strains of *C. reinhardtii* allowed to understand the role of the cell-wall in the microalgae response, evolving over time. In addition, the importance of surfactant in interactions with aquatic biota was also investigated.