



**HAL**  
open science

## Impact of contaminants on diatom's fatty acids.

Floriane Demailly

► **To cite this version:**

Floriane Demailly. Impact of contaminants on diatom's fatty acids.. Ecotoxicology. Université de Bordeaux, 2020. English. NNT : 2020BORD0039 . tel-03919772

**HAL Id: tel-03919772**

**<https://theses.hal.science/tel-03919772v1>**

Submitted on 3 Jan 2023

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

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

THÈSE PRÉSENTÉE  
POUR OBTENIR LE GRADE DE  
DOCTEUR DE  
L'UNIVERSITÉ DE BORDEAUX  
ÉCOLE DOCTORALE SCIENCES ET ENVIRONNEMENT  
SPÉCIALITÉ GÉOCHIMIE ET ÉCOTOXICOLOGIE

Par **Floriane DEMAILLY**

**Impacts de contaminants sur les acides gras des diatomées**

Sous la direction de Patrice GONZALEZ et de Soizic MORIN

Soutenue le 13 mai 2020

*Membres du jury*

|                         |  |                            |
|-------------------------|--|----------------------------|
| M GARABETIAN Frédéric   | Professeur, Université de Bordeaux,<br><i>Arcachon</i>                         | <b>Président</b>           |
| Mme LAVOIE Isabelle     | Professeure, INRS, <i>Québec</i>   | <b>Rapportrice</b>         |
| M SOUDANT Philippe      | Directeur de recherche, Université<br>de Bretagne Occidentale, <i>Brest</i>    | <b>Rapporteur</b>          |
| M BESSOULE Jean-Jacques | Directeur de recherche, LBM,<br><i>Villenave d'Ornon</i>                       | <b>Examineur</b>           |
| Mme KIM-TIAM Sandra     | Chargée de recherche, MNHN,<br><i>Paris</i>                                    | <b>Examinatrice</b>        |
| M GONZALEZ Patrice      | Chargé de recherche, Université de<br>Bordeaux, <i>Arcachon</i>                | <b>Directeur de thèse</b>  |
| Mme MORIN Soizic        | Chargée de recherche, INRAE,<br><i>Cestas</i>                                  | <b>Directrice de thèse</b> |
| Mme LE GUEDARD Marina   | Chargée de recherche, LEB<br>Aquitaine Transfert, <i>Villenave<br/>d'Ornon</i> | <b>Invitée</b>             |



## Impacts de contaminants sur les acides gras des diatomées

**Résumé :** Les acides gras, principaux composants des lipides de stockage et de structure, sont indispensables au maintien de la fluidité membranaire et au stockage de l'énergie métabolique. L'impact des pesticides sur les profils d'acides gras ont déjà été étudiés chez les microalgues marines, mais peu d'études se sont intéressées aux réponses des diatomées d'eau douce. De plus, aucune étude n'a porté sur l'impact des herbicides sur leur teneur en lipides. Les principaux objectifs de cette étude étaient : 1) de comparer les profils d'acides gras et les réponses des « descripteurs classiques » afin d'évaluer leur complémentarité, 2) d'estimer l'effet des herbicides sur la composition en lipides d'une diatomée d'eau douce et enfin, 3) d'examiner le potentiel du 20:5n3 en tant que biomarqueur de la pollution en herbicides. Pour ce faire, *Gomphonema gracile* et *Nitzschia palea* ont été exposées pendant sept jours au diuron et au S-métolachlore à 10 µg.L<sup>-1</sup>.

Le diuron s'est avéré plus toxique par rapport au S-métolachlore à 10 µg.L<sup>-1</sup> tout au long de cette étude. Les acides gras ont été impactés par le diuron à l'inverse de la teneur en pigments et ont permis d'informer sur la variation du contenu énergétique des diatomées en réponse à une pollution contrairement aux « descripteurs classiques ». La composition lipidique totale a été impactée par le diuron avec une diminution des lipides de stockage. Le diuron a affecté le contenu en 20:5n3 des lipides impliqués dans la photosynthèse.

Sur la base d'études précédentes et de ces résultats, il est suggéré que la teneur en 20:5n3 dans les diatomées pourrait être un bon biomarqueur de la pollution des eaux par le diuron.

**Mots clés :** Acide eicosapentaénoïque, Lipide, Toxicité, Herbicides, Diatomées, Ecotoxicologie microbienne

---



## **Impact of contaminants on diatom's fatty acids**

**Abstract :** Fatty acids (FA), which are the main components of storage and structural lipids, are crucial for the maintenance of membrane fluidity and play a central role in metabolic energy storage. Pesticide impacts on FA profiles have been documented in marine microalgae, but remain understudied in freshwater diatoms. In the same way, no study has focused on the impact of herbicides on their lipid content. The main aims of this study were to: 1) compare the responses of FA profiles and “classical descriptors” in order to evaluate their complementarity, 2) estimate the effect of herbicides on lipid content and composition of one freshwater diatom and finally, 3) examine the potential of 20:5n3 as a biomarker of herbicide pollution. To address these issues, *Gomphonema gracile* and *Nitzschia palea* were exposed during seven days to diuron and S-metolachlor at 10 µg.L<sup>-1</sup>.

The results demonstrated higher toxicity of diuron compared to S-metolachlor at 10 µg.L<sup>-1</sup> on all descriptors studied. FA responded to diuron contamination conversely to pigment content and permitted to document energy content variations in diatoms subjected to herbicide stress conversely to “classical descriptors”. Total lipid composition was impacted by diuron with a notable decrease of storage lipids. Diuron affected the content of 20:5n3 in lipids involved in photosynthesis.

Based on previous studies and our current findings, it is suggested that 20:5n3 content in diatoms could be a good biomarker of diuron pollution in freshwaters.

**Keywords :** Eicosapentaenoic acid, Lipid, Toxicity, Herbicides, Diatom, Microbial ecotoxicology

---

Unité de recherche

**INRAE – Unité de Recherche Écosystèmes aquatiques et changements globaux (EABX)**

**50 Avenue de Verdun 33612 Cestas cedex - France**



*A mes parents,*

*A ma famille,*

*A mes amis,*

*A toutes les personnes qui m'ont soutenue,*

*Mais surtout, à **Maxime** et à **ma petite fille...***



***Remerciements...***



En premier lieu, je tiens à remercier le LabEx COTE pour le soutien financier apporté à ce projet (LIPID, ANR-10-LABX-45).

Je tiens à remercier François Delmas de m'avoir accordé sa confiance pour mener à bien la thèse de son projet. Je le remercie pour sa bonne humeur, ses conseils et toutes les discussions partagées.

Je souhaite remercier Frédéric Garabetian, Isabelle Lavoie, Jean-Jacques Bessoule, Philippe Soudant et Sandra Kim-Tiam d'avoir accepté d'évaluer mes travaux de thèse. Je vous remercie pour les questions, remarques et échanges lors de ma soutenance qui m'auront permis d'améliorer ce manuscrit de thèse.

Je tiens à remercier les membres de mon comité de suivi de thèse ainsi que tous mes encadrants ; Agnès Feurtet-Mazel, Chloé Bonnineau, François Delmas, Jean-Jacques Bessoule, Marina Le Guédard, Magalie Baudrimont, Marie Vagner, Martin Laviale, et Nicolas Mazzella pour leurs conseils et pour leur aide.

Merci également à Frédéric Saudubray, Eric Rochard et Juliette Rosebery de m'avoir permis d'effectuer ma thèse à l'Irstea au sein de l'équipe ECOVEA.

*Je voudrais remercier mes encadrants...*

Je tiens à remercier sincèrement Soizic et Patrice, mes deux directeurs de thèse à qui je dois énormément. Vous avez été de supers directeurs de thèse et vous avez su me guider tout au long de ces années. Je vous remercie tous les deux pour votre gentillesse, vos nombreux conseils et corrections, votre patience, vos encouragements, votre disponibilité et votre sympathie. J'ai sincèrement apprécié nos réunions pour lesquelles travail et sérieux se confondaient à rire et joie.

Et puis, je pense que vous n'oublierez pas de sitôt la doctorante qui vous a annoncé un mariage et une grossesse en 3 ans. Je tenais du fond du cœur à vous remercier pour ces étapes de ma vie. Vous avez su être très gentils et compréhensifs, donc **MERCI** pour tout et surtout pour votre **HUMANITE**.

Je tenais à te remercier particulièrement, Patrice, car depuis ma première année de Master tu as toujours cru en moi et tu m'as toujours poussée à avoir confiance en moi. Grâce à toi, je sais

que je suis capable de réaliser de belles choses et je te remercie du fond du cœur car si je suis la personne que je suis professionnellement aujourd'hui c'est notamment grâce à toi.

Je tiens à exprimer toute ma gratitude à Marina. Sans toi, cette thèse n'aurait pas été là même, c'est certain. Je te remercie de m'avoir transmis ton savoir ; j'ai réellement appris à tes côtés et cela a été un réel plaisir de travailler avec toi. Je tiens du fond du cœur à te remercier pour toutes tes corrections, ton écoute, tes encouragements, ta patience, ta gentillesse, ta sympathie et tous les moments que l'on a partagé.

*Je voudrais remercier toute l'équipe ECOVEA...*

La première personne que je souhaite remercier et qui me manquera énormément c'est bien toi, Brigitte, ma deuxième maman. Ces années n'auraient pas été les mêmes sans toi. Tu as été un réel soutien pour moi tout au long de cette thèse. Je te remercie du fond du cœur pour la personne que tu es. Je suis chanceuse de t'avoir eu auprès de moi durant ces 3 années, tu es une personne avec un grand cœur et je te remercie pour tous tes conseils, les moments et discussions partagés et finalement d'avoir toujours été là pour moi. Tu as été un vrai pilier pour moi, sache-le.

Je souhaite te remercier Juliette pour ta bonne humeur et ta sympathie. Je tiens à te remercier pour tous les chocolats divers et variés que tu as apportés et qui étaient vraiment délicieux !

Merci à toi Mélissa pour tous tes conseils (on ne t'appelle pas maman Mélissa pour un rien hein). Merci à toi pour tous ces moments partagés, durant la pause déjeuner à l'Irstea, les apéros dinatoires les uns chez les autres ou durant nos pauses déjeuner au restaurant japonais.

Je tiens à remercier sincèrement David et Marie pour leur sympathie et leur aide pour le fameux et démoniaque logiciel R. Merci pour tout.

Je vous remercie pour les liens que l'on a créés. Vous êtes devenus de vrais amis et je ne doute pas que l'on gardera contact. Merci David de m'inviter à ton mariage (et merci à Justine !). Merci pour ta gentillesse légendaire.

Merci Marie tous tes conseils concernant la grossesse ou les bébés en général. Cela a été et est un réel plaisir de partager cette période de ma vie avec toi.

Merci à toi Seb pour ta sympathie, pour tes blagues, pour tous les moments qu'on a pu partager lors des pauses déjeuner. Je te remercie de m'avoir fait découvrir tant de jeux de société, c'était

vraiment sympa de jouer tous ensemble. Par contre, je suis obligée d'écrire ici que tes demandes pour manger des crêpes ont été un peu trop régulières 😊 ! Mais tu es largement pardonné grâce aux nombreux Schokobons retrouvés sur mon bureau.

Merci à toi Thibault pour ta sympathie et ta gentillesse. Tu as été un super colloc de bureau pour mes derniers mois de thèse. Cela a été un réel plaisir de partager toutes ces discussions avec toi. Je te remercie pour tous tes conseils.

Je tiens sincèrement et du fond du cœur à te remercier Cathy R pour ta gentillesse, ta bonne humeur, ton sourire, ta douceur et ton humour qui m'ont fait un bien fou à chaque fois que je te voyais. Merci pour toutes les discussions partagées et notamment celles concernant les bébés. Mon planning de vie personnelle n'aurait pas été le même sans toi... 😊

Je souhaite remercier Aurélie et Sylvia pour leur sympathie et pour toutes les discussions et tous les moments partagés. Je vous remercie sincèrement pour tous les trocs de vêtements bébé que l'on a pu faire !

Merci à Nicolas C, Aurélien, Gwilherm et Jacky pour leur bonne humeur, leur sympathie et les discussions partagées. Merci à toi Gwilherm pour les nombreuses fois où tu as fait fonctionner l'autoclave pour moi, je te remercie sincèrement pour ton aide.

Enfin je tiens à remercier Marion, Bertille, Julie, Caroline, Léa, Vincent, Christophe, Christian, Nathalie, Cristina et Léna d'avoir croisé mon chemin. A la revoyure !

Je voudrais sincèrement remercier Imane et Laura pour les supers stages effectués. Votre sérieux, votre persévérance (et surtout toi Imane, bravo à toi !) et votre enthousiasme vous ont permis d'obtenir de jolis résultats et d'écrire d'intéressant rapports. Merci à vous, car vous avez largement contribué à ces travaux de thèse. Je vous souhaite plein de réussite et de bonheur pour la suite. Bon courage à toi Laura pour la suite de ta thèse. Je n'ai aucun doute sur ta réussite, alors fonce !

*Je voudrais remercier tous mes proches...*

Un immense **MERCI**, à toi ma Bettie. Au départ simples acolytes du Master EXCE, nous sommes très vite devenues amies et quelle chance j'ai eu de croiser ton chemin... Tu sais déjà tout, mais si j'ai fait cette thèse c'est bien grâce à toi (et là je sais ce que tu penses à ce moment même 😊). On a formé un duo **FORMIDABLE** durant ces années de Master puis de thèse. Tu as été un soutien **INFAILLIBLE** pour moi durant ces 6 années. Ta simplicité, ta sympathie, ta fofolle attitude, ton Amour pour les animaux et la Nature, ta roots attitude, ton sérieux et ton intelligence ont fait que je me suis très vite liée à toi. Tu m'as apporté énormément, sache-le. Merci pour tout ce que tu as fait pour moi. Je ne vais pas te remercier pour chaque moment partagé car là je pourrai écrire de nombreuses pages, mais simplement, je te remercie d'être TOI et d'avoir été présente pour moi dans les bons comme dans les mauvais moments. La vie fait bien les choses et ça c'est le **DESTIN** (ahahah, je sais encore ce que tu penses 😊). Nous allons bientôt écrire un nouveau chapitre de notre vie. Je nous souhaite le meilleur pour notre avenir et notre vie personnelle. Et puis sache que, c'est bien que le **DEBUT** de notre amitié...

Un énorme **MERCI** à ma bizue préférée, ma bizue internationale, ma Chachou, ma future lieutenant (eh oui, félicitations ma belle !). Merci d'être là depuis ces 7 dernières années. J'ai énormément de chance de t'avoir dans ma vie. Merci de m'avoir écouté depuis tout ce temps et de m'avoir épaulé et soutenu dans les bons comme dans les mauvais moments. Tu es pour moi une oreille et une épaule sur lesquelles je peux compter à tout moment ; alors pour cela : **MERCI**.

Māuruuru (avec l'accent hein) à ma tahitienne préférée. Māuruuru pour ta joie de vivre, ta gaieté, ton enthousiasme et ton superbe accent (😊). Tu apportes du soleil et de la joie à toutes les personnes que tu croises. Tu es une personne qui fait du bien au moral alors **MERCI** d'être toi et reste comme tu es. Merci pour tous ces moments partagés et surtout de m'avoir soutenu dans les bons comme dans les mauvais durant cette thèse. Tu as été d'une aide incroyable, sache-le. Notre amitié ne fait que commencer alors à bientôt sur ton île ma jolie.

Te 'āpā atu nei ma Tiare. 'Ia tīa'i mai te Atua iā 'oe !

Je tiens à vous remercier Aurélie, Eliska, Giovanni et Sandra, pour votre gentillesse, votre sympathie et pour votre écoute. Merci pour les nombreuses soirées partagées, tous ces moments

de rigolades, de discussions et pour tous ces travaux réalisés lors du Master. Je vous remercie d'avoir croisé ma route et j'espère vous avoir auprès de moi très longtemps.

Merci à Sandra, Eliska et Giovanni pour le superbe stage à la Station Marine. Ces moments resteront gravés dans ma tête et dans mon cœur pour très longtemps...

Merci à Emilie et Lise, mes amies d'enfance, mes amies de toujours. Qui l'aurait cru que je deviendrai Docteur ? Même si ce n'est pas toujours évident de comprendre ce que je fais, pas toujours évident de me suivre dans mes études, vous avez toujours cru en moi et m'avez toujours soutenue dans les choix que j'ai pu faire. Merci pour tout ce que vous avez fait et ce que vous faites pour moi. Vous êtes de l'or. Je vous aime.

Je remercie toute ma famille pour votre soutien durant mes études et en particulier durant cette thèse. Merci à mes parents, mon petit-frère, Julie, mes beaux-parents, Justine, Quentin, Noémie et toute ma belle-famille. Je vous remercie pour tout l'Amour que vous m'apportez.

Je tiens à remercier en particulier ma petite maman : merci de m'aimer inconditionnellement depuis toujours et de me soutenir dans mes choix professionnels ou personnels. Merci d'avoir le cœur sur la main. Merci d'être toujours là pour moi, tu es une maman **EXTRAORDINAIRE**, sache-le. Merci pour l'éducation que tu m'as donnée. Si je suis la personne que je suis aujourd'hui c'est grâce à toi petite maman chérie, alors **MERCI**. Je t'aime.

Pour finir, ces remerciements n'auraient pas lieu d'être, sans toi Maxime. Je te remercie de me soutenir depuis toutes ces nombreuses années. Tu as su me **POUSSER** quand il le fallait et me faire **DECROCHER** aussi quand c'était nécessaire.

Je voudrai t'écrire ici que c'est bien grâce à toi que j'en suis là aujourd'hui. Tu as toujours su exprimer les bonnes remarques et faire naître en moi les bons questionnements. **MERCI** pour ta patience légendaire, car sans celle-ci je crois que tu te serais tiré les cheveux lors de mes périodes d'examen ou bien lors de ces années de thèse pour lesquelles il n'y a pas eu que de bonnes périodes.

Mais, grâce à toi, j'ai eu une vie personnelle durant ce doctorat et pas qu'à moitié même !! On a quand même préparé un mariage puis accueilli un bébé !! Et crois-le, ça n'a pas été de tout repos, mais si cela était à refaire je le referais 1000 fois, car oui, tu m'as appris et m'apprends encore aujourd'hui à profiter de chaque moment et aventure de la vie.

Nous allons débiter un nouveau chapitre de notre vie, ensemble, mais cette fois-ci à 3, et crois-le je trépigne d'impatience de voir ce que la vie va nous réserver. Mais qu'importe, nous serons tous ensemble et ça, c'est le principal.

La dernière personne que je souhaite remercier (qui ne sait pas encore lire, mais j'ai l'espoir que ces remerciements soient lus un jour), et finalement à qui je dédicace cette thèse toute entière, c'est toi, mon enfant, ma fille, Loïse, petit être né en Octobre 2019 durant cette thèse. Tu es bien celle qui a vécu mes ressentis et mes émotions au plus proche de moi durant ce doctorat. Grâce à toi, j'ai appris à vraiment relativiser dans la vie et surtout lors de cette fin de thèse assez particulière (#covid19). Je te remercie pour tous tes petits coups de pied quand j'écrivais cette thèse, ceux-ci m'ont permis de sourire de nombreuses fois et de me sentir moins seule face à cet ordinateur que je voyais plus que ton papa.

Finalement, on l'a écrit à 2 ce manuscrit de thèse, alors dans mon cœur tu es mon petit Docteur à moi et je sais que toi aussi tu as appris plein de choses sur les lipides et les acides gras des diatomées 😊.

Merci pour tout mon enfant que j'aime, le meilleur reste à venir...

---

# Sommaire

---



# Sommaire

|   |    |
|---|----|
| Sommaire .....  | 17 |
| Valorisations scientifiques .....   | 23 |
| Tables des illustrations .....  | 29 |
| Liste des abréviations .....  | 41 |
| Introduction générale.....  | 49 |
| Chapitre 1 – Contexte général .....                                       | 57 |
| 1. Les diatomées .....  | 59 |
| a) Définition.....  | 61 |
| b) Métabolisme des diatomées.....   | 66 |
| <i>i. La photosynthèse</i> .....  | 66 |
| <i>ii. La reproduction des diatomées</i> .....                            | 68 |
| c) Facteurs influençant le développement des diatomées .....              | 70 |
| <i>i. La lumière</i> .....  | 70 |
| <i>ii. La température</i> .....   | 71 |
| <i>iii. Les sels nutritifs</i> .....                                      | 72 |
| d) Rôle des diatomées dans l'écosystème aquatique .....                   | 73 |
| <i>i. Production d'oxygène</i> .....                                      | 73 |
| <i>ii. La base des réseaux trophiques aquatiques</i> .....                | 73 |
| e) Les diatomées : organismes bioindicateurs .....                        | 73 |
| 2. Les acides gras.....   | 75 |
| a) Terminologie .....   | 77 |
| b) Les différentes classes d'acides gras .....                            | 78 |
| c) Synthèse des acides gras.....  | 79 |
| d) Localisation des acides gras dans la cellule : les lipides .....       | 81 |
| <i>i. Lipides polaires</i> .....  | 84 |
| <i>ii. Lipides non polaires, neutres</i> .....                            | 85 |
| e) Acides gras majoritaires chez les diatomées .....                      | 87 |
| f) Importance des acides gras des diatomées dans le réseau trophique..... | 87 |

|  |   |     |
|--|---|-----|
| g)                                     | Variabilité de la composition en acides gras .....                                | 88  |
| i.                                     | <i>Stade de croissance</i> .....  | 89  |
| ii.                                    | <i>Variabilité interspécifique</i> .....  | 89  |
| iii.                                   | <i>Température</i> .....  | 90  |
| iv.                                    | <i>Intensité lumineuse</i> .....  | 91  |
| v.                                     | <i>Concentrations en nutriments</i> .....   | 91  |
| vi.                                    | <i>Contamination aux pesticides</i> .....   | 92  |
| 3.                                     | Les pesticides .....  | 95  |
| a)                                     | Définition.....   | 97  |
| b)                                     | Sources et état des lieux de la contamination aquatique en France.....            | 98  |
| c)                                     | Facteurs de transfert des pesticides dans l'environnement aquatique .....         | 100 |
| d)                                     | Toxicité des pesticides.....  | 101 |
| i.                                     | <i>Mode d'action des pesticides</i> .....   | 101 |
| ii.                                    | <i>Impact des pesticides sur les écosystèmes</i> .....                            | 102 |
| e)                                     | Caractéristiques et toxicité des pesticides sélectionnés pour cette étude.....    | 102 |
| i.                                     | <i>Diuron</i> .....   | 104 |
| ii.                                    | <i>S-métolachlore</i> .....   | 105 |
| f)                                     | Biomarqueurs de toxicité des pesticides.....                                      | 108 |
| i.                                     | <i>Qu'est-ce qu'un biomarqueur ?</i> .....  | 108 |
| ii.                                    | <i>Exemples appliqués au diuron et au S-métolachlore</i> .....                    | 109 |
| 4.                                     | Objectifs de l'étude .....  | 111 |
| Chapitre 2 – Matériel et méthode ..... |   | 115 |
| 1.                                     | Matériels biologiques .....   | 117 |
| a)                                     | <i>Gomphonema gracile Ehrenberg, 1838</i> .....                                   | 119 |
| b)                                     | <i>Nitzschia palea (Kützing) Smith, 1856</i> .....                                | 120 |
| 2.                                     | Préparation des solutions de pesticides et conditions générales d'exposition..... | 121 |
| a)                                     | Préparation des solutions de pesticides .....                                     | 123 |
| b)                                     | Conditions générales d'exposition .....   | 123 |
| 3.                                     | Paramètres chimiques.....   | 127 |
| a)                                     | Sels nutritifs.....   | 129 |
| b)                                     | Dosage des pesticides.....  | 129 |
| 4.                                     | Paramètres biologiques.....   | 131 |
| a)                                     | Evaluation de la croissance des diatomées .....                                   | 133 |
| b)                                     | Analyses fonctionnelles.....  | 135 |

|   |     |
|---|-----|
| c) Analyse des profils lipidiques et des acides gras des diatomées .....  | 143 |
| 5. Analyses statistiques.....   | 147 |
| Chapitre 3 – Article 1 .....  | 151 |
| Impact de pesticides sur les descripteurs « classiques » et acides gras de la diatomée <i>Gomphonema gracile</i> .....  |     |
|   | 151 |
| Chapitre 4 – Article 2 .....  | 195 |
| Variabilité interspécifique des profils d’acides gras et de l’impact de pesticides .....  | 195 |
| Chapitre 5 – Article 3 .....  | 239 |
| Impacts des pesticides sur les lipides de la diatomée <i>Gomphonema gracile</i> .....   | 239 |
| Chapitre 6 – Conclusions générales et perspectives.....   | 273 |
| 1. Conclusions générales .....  | 277 |
| a) Impacts des herbicides sur les lipides et acides gras des diatomées.....   | 279 |
| i. <i>Diuron</i> .....  | 280 |
| ii. <i>S-métolachlore</i> .....   | 282 |
| b) Apports des profils d’acides gras dans la détermination des impacts d’une pollution toxique en comparaison avec les descripteurs « classiques » utilisés en écotoxicologie ..... | 283 |
| i. <i>Impacts des contaminants</i> .....  | 283 |
| ii. <i>Rôle écosystémique : qualité nutritive des diatomées</i> .....   | 285 |
| iii. <i>Avantages et limites de l’analyse des profils d’acides gras</i> .....   | 287 |
| c) EPA comme biomarqueur potentiel de la pollution toxique des cours d’eau ?.....   | 291 |
| 2. Perspectives .....   | 293 |
| a) Représentativité de ces travaux de thèse .....   | 295 |
| i. <i>Espèces de diatomées étudiées</i> .....   | 295 |
| ii. <i>Facteurs environnementaux</i> .....  | 301 |
| iii. <i>Contaminants testés</i> .....   | 311 |
| iv. <i>Finalité : application des profils d’acides gras sur le terrain</i> .....  | 312 |
| b) Impacts des herbicides sur les mécanismes de synthèse des acides gras .....  | 314 |
| c) Impacts des herbicides sur la qualité nutritive des diatomées .....  | 315 |
| Bibliographie .....   | 321 |
| Annexes.....  | 371 |



---

# **Valorisations scientifiques**

---



## *Publications*

---

### **Un article publié dans un journal de rang A**

**Demailly, F.**, I. Elfeky, L. Malbezin, M. Le Guédard, M. Eon, J.-J. Bessoule, A. Feurtet-Mazel, F. Delmas, N. Mazzella, P. Gonzalez, S. Morin (2019). "Impact of diuron and S-metolachlor on the freshwater diatom *Gomphonema gracile*: Complementarity between fatty acid profiles and different kinds of ecotoxicological impact-endpoints." Science of The Total Environment **688**: 960-969.

### **Deux articles soumis dans des journaux de rang A**

**Demailly, F.**, M. Le Guédard, I. Elfeky, L. Malbezin, M. Eon, J.-J. Bessoule, A. Feurtet-Mazel, F. Delmas, N. Mazzella, P. Gonzalez, S. Morin (soumis le 10/09/2019). "Interspecific variability in diatom responses to herbicide exposure from molecular to populational scales." Ecological Indicators.

**Demailly, F.**, M. Le Guédard, M. Eon, J.-J. Bessoule, A. Feurtet-Mazel, F. Delmas, N. Mazzella, P. Gonzalez, S. Morin (soumis le 18/03/2020). "Lipid composition and eicosapentaenoic acid as biomarkers of herbicide pollution in the freshwater diatom *Gomphonema gracile*." Phytochemistry.

## Communications

---

### Cinq communications orales (dont 4 en 1<sup>er</sup> auteur)

#### Congrès internationaux :

**Demailly, F.**, M. Le Guédard, M. Eon, J.-J. Bessoule, A. Feurtet-Mazel, F. Delmas, N. Mazzella, P. Gonzalez, S. Morin. (2017, Septembre). Impact de pesticides sur les acides gras de diatomées. 36<sup>ème</sup> colloque de l'Association des Diatomistes de Langue Française (ADLaF), Dijon, France.

**Demailly, F.**, I. Elfeky, L. Malbezin, M. Le Guédard, M. Eon, J.-J. Bessoule, A. Feurtet-Mazel, F. Delmas, N. Mazzella, P. Gonzalez, S. Morin. (2018, Septembre). How can temperature modulate herbicides impact on the freshwater diatoms *Gomphonema gracile* and *Nitzschia palea*? 5<sup>th</sup> Biofilm Workshop – Omic approaches in Biofilm research: advances in ecology and ecotoxicology, Fiskebäckskil, Suède. (*poster spotlight*)

Neury-Ormanni J., C. Doose, **F. Demailly**, B. Chaumet, N. Mazzella, N. Majdi, J. Vedrenne, W. Traunspurger, **S. Morin**. (2018, Septembre). Des diatomées au menu ! Préférences gastronomiques de larves de chironomes, et impact d'une contamination toxique. 37<sup>ème</sup> colloque de l'Association des Diatomistes de Langue Française (ADLaF), Meise, Belgique.

**Demailly, F.**, I. Elfeky, L. Malbezin, M. Le Guédard, M. Eon, J.-J. Bessoule, A. Feurtet-Mazel, F. Delmas, N. Mazzella, P. Gonzalez, S. Morin. (2019, Mai). Interspecific variability of fatty acid profiles of the two freshwater diatoms, *Gomphonema gracile* and *Nitzschia palea*, in comparison with "classical descriptors" and in response to herbicide contamination. 14th International IUPAC Congress on Crop Protection (IUPAC), Gand, Belgique.

## **Séminaire national :**

**Demailly, F.**, I. Elfeky, L. Malbezin, M. Le Guédard, M. Eon, J.-J. Bessoule, A. Feurtet-Mazel, F. Delmas, N. Mazzella, P. Gonzalez, S. Morin. (2019, Avril). Impact de contaminants sur les acides gras des diatomées. Journée des Doctorants de l'École Doctorale 2019 (JDED), Talence, France.

### **Trois communications par affiche**

**Demailly, F.**, M. Le Guédard, S. Morin, B. Delest, N. Mazzella, P. Gonzalez. (2017, Novembre). Impact of three pesticides on *Gomphonema gracile*'s fatty acids. Ecotoxicology and Environmental Chemistry 2017 First International Conference on Microbial Ecotoxicology, Lyon, France.

**Demailly, F.**, I. Elfeky, L. Malbezin, M. Le Guédard, M. Eon, J.-J. Bessoule, A. Feurtet-Mazel, F. Delmas, N. Mazzella, P. Gonzalez, S. Morin. (2018, mai). Impact de trois pesticides sur les acides gras de *Gomphonema gracile*. Journée des Doctorants de l'École Doctorale 2018 (JDED), Talence, France.

**Demailly, F.**, I. Elfeky, L. Malbezin, M. Le Guédard, M. Eon, J.-J. Bessoule, A. Feurtet-Mazel, F. Delmas, N. Mazzella, P. Gonzalez, S. Morin. (2018, Mai). How can three herbicides impact the fatty acids of the freshwater diatom *Gomphonema gracile* ? SETAC Europe 28th Annual meeting, Rome, Italie.



---

# **Tables des illustrations**

---



|   |    |
|---|----|
| Figure 1 : Schéma du frustule d'une diatomée pennale (Gelabert Alexandre©)  | 61 |
| Figure 2 : Diatomées centrales. (a) <i>Melosira</i> : vue de la valve (à gauche) et vue cingulaire d'une colonie (à droite) ; (b) <i>Coscinodiscus</i> : vue de la valve ; (c) <i>Actinoptychus</i> : vue de la valve (à gauche) et valve cingulaire (à droite) ; (d) <i>Thalassiosira</i> : vue de la valve (en haut) et vue cingulaire d'une colonie (en bas). Échelle = 10 µm. (Brasier 1980).                               | 64 |
| Figure 3 : Diatomées pennales. (a) <i>Pinnularia</i> : vue oblique montrant le raphé ; (b) <i>Fragilaria</i> : valve avec le pseudoraphé (à gauche) et colonie en vue cingulaire (à droite) ; (c) <i>Achanthes</i> : vue de l'hypovalve avec le raphé (à gauche), vue de l'épivalve avec le pseudoraphé (au centre) et vue de la ceinture (à droite) ; (d) détail d'une aréole d'une diatomée. Échelle = 10 µm. (Brasier 1980). | 65 |
| Figure 4 : Différentes espèces de diatomées sous formes solitaires et coloniales (Morin, 2006, photos de Jason Oyadomari©).   | 65 |
| Figure 5 : Schéma de la photosynthèse avec la différenciation de la réaction claire et de la réaction sombre (Matthieu Simon ©).  | 68 |
| Figure 6 : Schéma de la reproduction des diatomées d'après Round et al., 1990 (Nhung Nguyen Deroche©).  | 70 |
| Figure 7 : Exemple d'un acide gras saturé (acide stéarique, en haut, noté 18:0) et d'un acide gras insaturé (acide oléique, en bas, noté 18:1n9).   | 78 |
| Figure 8 : Schéma de la voie de synthèse des PUFA chez les diatomées. Proposé par Li et al. (2014b).  | 81 |
| Figure 9 : Composition des lipides membranaires et des lipides de réserve. D'après Lehninger et al. (2004). Abréviations : Alc = alcool ; Cho = choline ; MS = monosaccharide ; OS = oligosaccharide ; DS = disaccharide. Les sphingolipides appartenant à la classe des phospholipides correspondent aux sphingomyélines.  | 83 |
| Figure 10 : Structure chimique des lipides des membranes des thylakoïdes (membranes internes des chloroplastes) (Mizuwa et al., 2012).  | 85 |

|   |     |
|---|-----|
| Figure 11 : Exemple d'un triacylglycérol (TAG) composé de trois acides gras différents reliés à un même glycérol (carré rose) : 1-stéaroyle, 2-linoléoyle, 3-palmitoyle glycérol. (Lehninger et al., 2004).....   | 86  |
| Figure 12 : Impact du diuron sur le photosystème II des organismes photosynthétiques. Issu de Giardi and Pace (2005). .....   | 105 |
| Figure 13 : Structures des quatre stéréoisomères du métolachlore. Par Kabler et Chen (2006). .....  | 106 |
| Figure 14 : Schéma de la technique de mesure de l'émission de la fluorescence modulée de la chlorophylle d'une feuille. (Cornic, 2007). .....   | 136 |
| Figure 15 : Principe de la technique de mesure de la fluorescence chlorophyllienne en lumière modulée. (Géavert, 2001). .....   | 137 |
| Figure 16 : Schéma du protocole simplifié de la RT-PCR employé dans cette étude. ....   | 139 |
| Figure 17 : Schéma simplifié de la réaction de transcription inverse (RT). .....  | 141 |
| Figure 18 : Réaction de transestérification en catalyse acide. ....   | 145 |
| Figure 19 : Percentage in SFA, MUFA, PUFA and HUFA for the species <i>Gomphonema gracile</i> without contamination and with diuron and S-metolachlor contamination (Mean ( $\pm$ SE; n = 4). * indicates significant differences between control and contaminated conditions ( $p < 0.05$ )). .....   | 174 |
| Figure 20 : Fatty acid profiles (% of fatty acid) in the species <i>Gomphonema gracile</i> at T7 for control and diuron treatment. The values are given as means (n = 4). 14:0, 16:0, 18:0 = SFA. 16:1, 18:1n9 = MUFA. 16:2n4, 16:3n4, 16:4n1, 18:2n6, 18:3n3, 18:4n3 = PUFA. 20:4n6, 20:5n3, 22:5n3, 22:6n3 = HUFA. * indicates significant differences between control and contaminated conditions for T7, ( $p < 0.05$ )). ..... | 175 |
| Figure 21 : Fatty acid profiles (% of fatty acid) in the species <i>Gomphonema gracile</i> at T7 for control and S-metolachlor treatment. The values are given as means (n = 4). 14:0, 16:0, 18:0 = SFA. 16:1, 18:1n9 = MUFA. 16:2n4, 16:3n4, 16:4n1, 18:2n6, 18:3n3, 18:4n3 = PUFA. 20:4n6, 20:5n3, 22:5n3, 22:6n3 =   |     |

HUFA. \* indicates significant differences between control and contaminated conditions for T7, ( $p < 0.05$ ). ..... 175

Figure 22 : Biplot of Principal Component Analysis for quantitative data performed for all samples with diuron, S-metolachlor and control treatments. Variables correspond to: Chloro = content of chlorophyll a; Carotene = content of carotenoid; Photo\_t7 = photosynthetic activity at T7; Growth\_rate = growth rate; SFA = percentage of saturated fatty acid; MUFA = percentage of monounsaturated fatty acid; PUFA = percentage of polyunsaturated fatty acid; HUFA = percentage of highly unsaturated fatty acid. Individuals correspond to: Diu = diuron contamination; Sm = S-metolachlor contamination; Ctrl = control condition. .... 177

Figure 23 : Biplot of Principal Component Analysis for quantitative data performed for the two species on samples with diuron, S-metolachlor and on control treatments at the end of the experiment (T7). .... 221

Figure 24 : Nitrate concentrations for Dauta medium at T0 and NPAL and GGRA treatments at T7. \* indicates significant differences between Dauta medium composition at T0 and other conditions ( $p < 0.05$ ). Ctrl = control treatment, Diu = diuron treatment, Sm = S-metolachlor treatment. .... 232

Figure 25 : Orthophosphate concentrations for Dauta medium at T0 and NPAL and GGRA treatments at T7. \* indicates significant differences between Dauta medium composition at T0 and other conditions ( $p < 0.05$ ). Ctrl = control treatment, Diu = diuron treatment, Sm = S-metolachlor treatment. .... 232

Figure 26 : Silicate concentrations for Dauta medium at T0 and NPAL and GGRA treatments at T7. \* indicates significant differences between Dauta medium composition at T0 and other conditions ( $p < 0.05$ ). Ctrl = control treatment, Diu = diuron treatment, Sm = S-metolachlor treatment. .... 233

Figure 27 : Diuron and S-metolachlor-induced changes in lipid composition over time, compared to the control treatment (ctrl) as a reference trajectory. The Principal Response Curve displays the effect of diuron (diu) and S-metolachlor

(smet) treatments on the ten ten studied lipids during the three-sampling time exposures (T1, T3 and T7), on the X-axis. A divergence  $> 0.5$  from the control line was considered a significant effect. .... 259

Figure 28 : Biplot of Principal Component Analysis for quantitative data performed for *G. gracile* samples with control, diuron and S-metolachlor treatments. Variables correspond to EPA in each lipid. Individuals correspond to: ctrl\_t1 = control treatment at T1; ctrl\_t3 = control treatment at T3; ctrl\_t7 = control treatment at T7; diu\_t1 = diuron treatment at T1; diu\_t3 = diuron treatment at T3; diu\_t7 = diuron treatment at T7; smet\_t1 = S-metolachlor treatment at T1; smet\_t3 = S-metolachlor treatment at T3; smet\_t7 = S-metolachlor treatment at T7..... 263

Figure 29 : Pourcentages d'acides gras chez GGRA (à gauche) et NPAL (à droite) aux deux températures testées sans contamination. \* : indique une différence significative entre les deux températures testées ( $p < 0.05$ ). Gg tem 17,5 = traitement témoin de la culture *Gomphonema gracile* à 17,5 °C, Gg tem 20,5 = traitement témoin de la culture *Gomphonema gracile* à 20,5 °C. NPAL tem 17,5 = traitement témoin de la culture *Nitzschia palea* à 17,5 °C, NPAL tem 20,5 = traitement témoin de la culture *Nitzschia palea* à 20,5 °C..... 306

Figure 30 : Pourcentage d'acides gras de GGRA sans et avec contamination en diuron aux deux températures testées. \* : indique une différence significative entre le traitement témoin et diuron aux deux températures testées ( $p < 0.05$ ). Gg tem 17,5 = traitement témoin de la culture *Gomphonema gracile* à 17,5 °C, Gg tem 20,5 = traitement témoin de la culture *Gomphonema gracile* à 20,5 °C, Gg diuron 17,5 = traitement contaminé en diuron à 17,5 °C, Gg diuron 20,5 = traitement contaminé en diuron à 20,5 °C..... 307

Figure 31 : Pourcentage d'acides gras de NPAL sans et avec contamination en diuron aux deux températures testées. \* : indique une différence significative entre le traitement témoin et diuron aux deux températures testées ( $p < 0.05$ ). NPAL tem 17,5 = traitement témoin de la culture *Nitzschia palea* à 17,5 °C, NPAL tem

20,5 = traitement témoin de la culture *Nitzschia palea* à 20,5 °C, NPAL diuron  
17,5 = traitement contaminé en diuron à 17,5 °C, NPAL diuron 20,5 = traitement  
contaminé en diuron à 20,5 °C..... 307

Figure 32 : Pourcentage d'acides gras de GGRA (à gauche) et de NPAL (à droite)  
sans et avec contamination en S-métolachlore aux deux températures testées. \* :  
indique une différence significative entre le traitement témoin et diuron aux deux  
températures testées ( $p < 0.05$ ). Gg tem 17,5 = traitement témoin de la culture  
*Gomphonema gracile* à 17,5 °C, Gg tem 20,5 = traitement témoin de la culture  
*Gomphonema gracile* à 20,5 °C, Gg smet 17,5 = traitement contaminé en S-  
métolachlore à 17,5 °C, Gg smet 20,5 = traitement contaminé en S-métolachlore  
à 20,5 °C. NPAL tem 17,5 = traitement témoin de la culture *Nitzschia palea* à 17,5  
°C, NPAL tem 20,5 = traitement témoin de la culture *Nitzschia palea* à 20,5 °C,  
NPAL smet 17,5 = traitement contaminé en S-métolachlore à 17,5 °C, NPAL smet  
20,5 = traitement contaminé en S-métolachlore à 20,5 °C. .... 308

Figure 33 : Système d'encagement sans renouvellement d'organismes développé  
par Vincent Roubex (Irstea). .... 313

Figure 34 : Design expérimental de l'expérience en contamination directe de  
GGRA et *D. magna* par le diuron et le S-métolachlore. .... 318

Figure 35 : Design expérimental de l'expérience en contamination indirecte (voie  
trophique) de *D. magna* par GGRA contaminée en diuron et S-métolachlore. 319

|   |     |
|---|-----|
| Tableau 1 : Acides gras majoritaires et biomarqueurs chez les Bacillariophyceae (diatomées). Extrait de Taipale et al. (2013).....  | 87  |
| Tableau 2 : Classes de pesticides et leurs cibles associées. Les classes soulignées représentent les trois catégories principales de pesticides retrouvées. ....  | 98  |
| Tableau 3 : Mode d'action des familles de pesticides les plus représentées. D'après Fauvelle (2012).....  | 103 |
| Tableau 4 : Caractéristiques des deux pesticides sélectionnés - T1/2 correspond au temps de demi-vie de la molécule. LogKow correspond au coefficient de partage octanol / eau de la molécule. ....   | 107 |
| Tableau 5 : Précédentes recherches étudiant la réponse de biomarqueurs considérés ici comme « classiques » à différents niveaux cellulaires vis-à-vis de la toxicité du diuron et du S-métolachlore. ....   | 110 |
| Tableau 6 : Numéros d'accèsion et couples de primers spécifiques aux 10 gènes de GGRA et NPAL utilisés dans ces travaux de thèse. Abréviations : <sup>a</sup> Amorce sens. <sup>b</sup> Amorce anti-sens.....   | 142 |
| Tableau 7 : Liste non exhaustive des avantages et des limites de l'analyse des profils d'acides gras des diatomées. ....  | 287 |
| Tableau 8 : Durée approximative de l'analyse de 10 échantillons pour les différents descripteurs étudiés dans ces travaux de thèse. ....  | 290 |
| Tableau 9 : Acides gras majoritaires et typiques de chaque classe d'algue. Extrait de Taipale et al. (2013).....  | 300 |
| Tableau 10 : Concentrations moyennes en nitrate, phosphate et silice (mg.L <sup>-1</sup> ) dans le milieu Dauta utilisé dans ces travaux en comparaison aux concentrations moyennes (mg.L <sup>-1</sup> ) retrouvées dans les bassins versant de la Garonne, Seine, Loire et du Rhône (données issues de l'étude de Leboucher et al. (submitted) pour la période Avril – Novembre), et en comparaison aux valeurs de concentrations moyennes (mg.L <sup>-1</sup> ) de nutriments (2009-2015) retrouvées dans les cours d'eau français et issues d'une base de données de paramètres physico-chimiques accessible dans la base Pandore. .... | 303 |

|   |     |
|---|-----|
| Tableau 11 : Concentration en sels nutritifs dans les échantillons témoins à T0 aux deux températures testées.....      | 309 |
| Tableau 12 : CE <sub>50</sub> - CL <sub>50</sub> du diuron et du S-métolachlore pour les daphnies et les diatomées..... | 316 |

## Tableaux présentés dans les articles scientifiques

|   |     |
|---|-----|
| Table 1 : Differential gene expression as compared to $\beta$ -actin for the taxon <i>Gomphonema gracile</i> exposed to diuron and S-metolachlor (Mean ( $\pm$ SE); n = 4). Only factors showing significant differences (p-value < 0.05) are shown in this table. Significant induction (> 2, grey square) are indicated by values, compared to the respective controls. / : expression identical to control levels.....   | 172 |
| Table 2 : SI.1 - Mean ( $\pm$ SE) concentration of nitrates (NO <sub>3</sub> <sup>-</sup> ), orthophosphates (PO <sub>4</sub> <sup>-</sup> ) and silicates (Si) at the beginning (T0) and the end (T7) of the experiment using the taxon <i>Gomphonema gracile</i> in control, diuron and S-metolachlor-treated conditions (n = 4). .....   | 189 |
| Table 3 : SI.3 -Ten genes studied in this experiment and their associated functions. ....   | 191 |
| Table 4 : Ten genes studied in this experiment and their associated functions.  | 211 |
| Table 5 : Differential gene expression as compared to $\beta$ -actin in <i>G. gracile</i> and <i>N. palea</i> exposed to diuron and S-metolachlor (Mean; n = 4) at the end of the experiment (T7). Only factors showing significant differences between control and contaminated conditions (p-value < 0.05) are shown in this table. Significant induction factors (> 2, grey square) and repression factors (< 0.5, hatched square) are indicated compared to the respective controls. /: expression identical to control levels. <sup>a</sup> indicates a significant difference between <i>G. gracile</i> and <i>N. palea</i> . ... | 215 |
| Table 6 : Fatty acid profiles (%) of <i>G. gracile</i> and <i>N. palea</i> for control, diuron and S-metolachlor treatment (T7). The values are given as means $\pm$ SE (n = 4). <sup>a</sup> indicates significant differences between control and contaminated treatments (10 $\mu$ g.L <sup>-1</sup> ) at T7, <sup>b</sup> indicates a significant difference between <i>G. gracile</i> and <i>N. palea</i> at T7 (p < 0.05).....  | 217 |
| Table 7 : Summary table (based on percentage of inhibition compared to control treatment) of diuron and S-metolachlor-induced damage on <i>N. palea</i> and <i>G. gracile</i> . - : decrease in studied descriptor; --: greater decrease in studied descriptor  |     |

than other species considered ( $p < 0.05$ ); +: increase in studied descriptor; ++ greater increase in studied descriptor than other species considered ( $p < 0.05$ ).  
..... 223

Table 8 : Percentage of fatty acids for *G. gracile* and *N. palea* at T0. .... 234

Table 9 : Pigment concentrations for *G. gracile* and *N. palea* at T0. .... 235

Table 10 : Proportion of total FA in each lipid (%) in control, diuron and S-metolachlor treatments at T1, T3 and T7. The values are given as means ( $n = 4$ )  $\pm$  SE. a bolded text in orange: indicates significant differences between control treatment at T7 and the other sampling times (T1 and/or T3) ( $p < 0.05$ ). \* bolded text in red: indicates significant differences between control and contaminated treatments ( $p < 0.05$ ). Ctrl = Control treatment; Diu = Diuron treatment; Smet = S-metolachlor treatment. .... 258

Table 11 : Proportions of EPA (%) in each lipid (Table 10) in control, diuron and S-metolachlor treatments at T1, T3 and T7. The values are given as means ( $n = 4$ )  $\pm$  SE. \* bolded text in red: indicates significant differences between control and contaminated treatments ( $p < 0.05$ ). Ctrl = Control treatment; Diu = Diuron treatment; Smet = S-metolachlor treatment. .... 261



---

# Liste des abréviations

---



## **Nombres**

**12s** ARN ribosomal mitochondrial 12S

## **Symboles**

**$\beta$ -act**  $\beta$ -actine

**$\Phi_{PSII}$**  rendement quantique efficace de la photochimie du photosystème II

## **A**

**ACP** analyse en composantes principales

**ADN** acide désoxyribonucléique

**ADNc** acide désoxyribonucléique complémentaire

**AIA** acide indole 3-acétique

**ALA** acide  $\alpha$ -linoléique

**ALS** acétolactate synthétase

**Alc** alcool

**AMPA** acide aminométhylphosphonique

**ARN** acide ribonucléique (RNA en anglais pour ribonucleic acid))

**ATP** adénosine triphosphate

## **C**

**cat** catalase

|                        |  |
|------------------------|--|
| <b>CE<sub>50</sub></b> | concentration efficace causant une diminution de 50 % du paramètre biologique étudié par rapport aux témoins |
| <b>Cho</b>             | choline  |
| <b>CL<sub>50</sub></b> | concentration nécessaire pour induire 50 % de mortalité  |
| <b>CO<sub>2</sub></b>  | dioxyde de carbone   |
| <b>Cox1</b>            | sous-unité 1 de la cytochrome C oxydase  |
| <b>CPG</b>             | chromatographie en phase gazeuse   |

## **D**

|              |  |
|--------------|--|
| <b>d1</b>    | protéine d1                                    |
| <b>DAG</b>   | diacylglycéride                                |
| <b>DEDIA</b> | déséthyl-désopropylatrazine                    |
| <b>DEPC</b>  | diéthyl dicarbonate                            |
| <b>DGDG</b>  | digalactosyldiacylglycérol                     |
| <b>DGTA</b>  | diacylglycérylhydroxyméthyltriméthyl-L-alanine |
| <b>DGTS</b>  | diacylglycéryltriméthylhomosérine              |
| <b>DHA</b>   | acide docosa-hexaénoïque                       |
| <b>DS</b>    | disaccharide                                   |

## **E**

|            |  |
|------------|--|
| <b>EFA</b> | acide gras essentiel (essential fatty acid)                  |
| <b>EPA</b> | acide eicosapentaénoïque                                     |
| <b>ESI</b> | ionisation par électronebulisation (electrospray ionisation) |

## **F**

|                                    |  |
|------------------------------------|--|
| <b>FA</b>                          | acide gras (fatty acid en anglais)                               |
| <b>FAMEs</b>                       | esters méthyliques d'acides gras (fatty acid methyl esters)      |
| <b>FAS</b>                         | acide gras synthase (fatty acid synthase)                        |
| <b>FFA</b>                         | acide gras libre (free fatty acid)                               |
| <b>F<sub>m</sub></b>               | fluorescence maximale  |
| <b>F<sub>m</sub>'</b>              | émission de fluorescence pendant l'application du flash lumineux |
| <b>F<sub>v</sub>/F<sub>m</sub></b> | rendement quantique maximal de la photochimie du photosystème II |

## **G**

|             |   |
|-------------|---|
| <b>GF/C</b> | filtre en fibre de verre (glass fiber filter) |
| <b>GGRA</b> | <i>Gomphonema gracile</i>                     |
| <b>gpx</b>  | <i>glutathion peroxidase</i>                  |

## **H**

|             |   |
|-------------|---|
| <b>HUFA</b> | acide gras hautement insaturé (highly unsaturated fatty acid) |
| <b>HPLC</b> | chromatographie liquide à haute performance                   |

## **I**

|               |  |
|---------------|--|
| <b>IBD</b>    | indice biologique diatomées  |
| <b>Irstea</b> | Institut national de Recherche en Sciences et Technologies pour l'Agriculture et l'Environnement |

**K**

**Kow** coefficient de partage octanol-eau

**L**

**LA** lumière actinique

**M**

**MAG** monoacylglycérine

**MGDG** monogalactosyldiacylglycérol

**MS** monosaccharide

**MS/MS** spectrométrie de masse en tandem

**MUFA** acide gras monoinsaturé (monounsaturated fatty acid)

**N**

**nad5** NADH déshydrogénase sous-unité 5

**NADP** nicotinamide adénine dinucléotide phosphate

**NADPH** forme réduite du nicotinamide adénine dinucléotide phosphate

**NPAL** *Nitzschia palea*

**O**

**OS** oligosaccharide

## **P**

|             |  |
|-------------|--|
| <b>PA</b>   | acide phosphatidique   |
| <b>PAM</b>  | pulse amplitude modulation                                       |
| <b>PAR</b>  | rayonnements photosynthétiquement actifs                         |
| <b>PC</b>   | phosphatidylcholine  |
| <b>PCR</b>  | réaction de polymérisation en chaîne (polymerase chain reaction) |
| <b>PE</b>   | phosphatidyléthanolamine   |
| <b>PG</b>   | phosphatidylglycérol   |
| <b>PRC</b>  | Principal Response Curve   |
| <b>psaA</b> | protéine psaA  |
| <b>PSI</b>  | photosystème I   |
| <b>PSII</b> | photosystème II  |
| <b>PUFA</b> | acide gras polyinsaturé (polyunsaturated fatty acid)             |

## **Q**

|                      |               |
|----------------------|---------------|
| <b>Q<sub>B</sub></b> | plastoquinone |
|----------------------|---------------|

## **R**

|             |  |
|-------------|--|
| <b>ROS</b>  | espèce réactive de l'oxygène (reactive oxygen species) |
| <b>rpl7</b> | protéine ribosomale L7                                 |
| <b>RT</b>   | transcriptase inverse (reverse transcriptase)          |

**S**

|             |   |
|-------------|---|
| <b>SFA</b>  | acide gras saturé (saturated fatty acid)              |
| <b>SI</b>   | informations supplémentaires (supporting information) |
| <b>sil1</b> | protéine silaffine 1                                  |
| <b>SQDG</b> | sulfoquinovosyldiacylglycérol                         |

**T**

|            |                    |
|------------|--------------------|
| <b>T</b>   | temps d'exposition |
| <b>TAG</b> | triacylglycéride   |
| <b>TBA</b> | terbuthylazine     |

**U**

|           |              |
|-----------|--------------|
| <b>UV</b> | ultra-violet |
|-----------|--------------|

**V**

|              |  |
|--------------|--|
| <b>VLCFA</b> | acide gras à très longue chaîne (very long chain fatty acid) |
|--------------|--|

---

# **Introduction générale**

---



Les **biofilms** ou périphyton, représentent d'important producteurs primaires dans les écosystèmes aquatiques (Stevenson et al., 1996). Dans les cours d'eau de taille moyenne, ces communautés benthiques sont considérées comme les principaux producteurs primaires (Vannote et al., 1980). Ces communautés complexes s'intègrent dans une matrice extracellulaire (Romani, 2010) et sont composées d'organismes :

- 1) **autotrophes** tels que les algues et cyanobactéries;
- 2) **hétérotrophes** tels que les bactéries, les champignons et les protozoaires.

Parmi les organismes autotrophes tels que les algues, et plus particulièrement les microalgues, les **diatomées** représentent l'essentiel du périphyton à certaines périodes de l'année (McIntire et al., 1996). Ces diatomées d'eau douce sont les organismes phototrophes dominants et jouent un rôle important dans les processus écologiques tels que la production primaire (Potapova and Charles, 2002; Rimet, 2012). Par ailleurs, les diatomées sont considérées comme des bioindicateurs pertinents en raison de leurs capacités d'adaptation et de leur tolérance aux facteurs environnementaux et à la pollution aquatique (Morin et al., 2016).

La composition biochimique des diatomées comprend quatre groupes de molécules principaux : les protéines, les glucides, les acides nucléiques et les **lipides**. Les diatomées contiennent des lipides polaires et non polaires constitués principalement d'**acides gras** saturés ou insaturés (Sajjadi et al., 2018). Les profils d'acides gras des diatomées se distinguent clairement de ceux des autres groupes de microalgues avec notamment des teneurs plus élevées en acides gras polyinsaturés tels que le 16:2n4, le 16:3n4 et le 16:4n1 (Ying et al., 2000).

De manière globale, les acides gras contribuent à la production, à la fluidité, à la perméabilité des membranes cellulaires et aux réserves d'énergie dans la cellule de chaque organisme jouant ainsi un rôle important dans le transfert d'énergie dans toute la chaîne trophique (Filimonova et al., 2018).

L'utilisation intensive de [pesticides](#) dans la protection des cultures engendre de nombreux problèmes environnementaux les classant comme polluants majeurs des écosystèmes aquatiques (Aydinalp and Porca, 2004).

En France, de nombreux herbicides sont présents dans les rivières. Par exemple, les affluents du bassin d'Arcachon sont contaminés par divers herbicides, tels que le [diuron](#) et le [S-métolachlore](#) (Fauvelle et al., 2012).

En collaboration avec les agences de l'eau et les services du Ministère de l'environnement, l'Irstea a mis au point plusieurs indices basés sur les diatomées dans le but d'estimer la qualité écologique des cours d'eau. L'Indice Biologique Diatomées a notamment été créé (IBD, Coste et al., 2009) et est utilisé en routine dans plusieurs pays européens pour la surveillance de la qualité des cours d'eau.

Néanmoins, ces indices n'ont pas été conçus pour évaluer des altérations toxiques spécifiques (métaux, polluants organiques de synthèse tels que les herbicides) et ne conviennent pas pour un diagnostic sensible de ce type de pollution.

De ce fait, de nombreuses études ont examiné et démontré l'impact des herbicides sur la croissance et la physiologie des diatomées (Debenest et al., 2010; DeLorenzo et al., 2001). Néanmoins, il a été mis en évidence que la sensibilité des diatomées benthiques d'eau douce aux herbicides différait d'un taxa à l'autre (Kim Tiam et al., 2014; Larras et al., 2012; Moisset et al., 2015; Roubéix et al., 2011; Wood et al., 2016).

De nombreuses études ont noté que la modification des profils d'acides gras était un [biomarqueur](#) sensible du stress environnemental et chimique chez les organismes aquatiques tels que le zooplancton, les poissons, les crustacés et les diatomées marines (Gonçalves et al., 2012; Gonçalves et al., 2018a; Maazouzi et al., 2008; Ramírez et al., 2013; Sánchez-Muros et al., 2013).

Cependant à notre connaissance, aucune étude n'a encore porté sur :

- 1) l'impact des herbicides sur les profils d'acides gras des diatomées d'eau douce et particulièrement sur les effets variables de composés toxiques à mode d'action distinct tels que le diuron (interdit d'usage depuis 2008 mais composé modèle inhibiteur du photosystème II) et le S-métolachlore (usage grandes cultures, inhibiteur des élongases);
- 2) De la même manière, peu d'informations sont disponibles dans la littérature scientifique sur la variabilité interspécifique des profils d'acides gras en réponse aux herbicides ;
- 3) Enfin, la modification de la composition lipidique chez les diatomées d'eau douce en réponse à une contamination aux herbicides est encore peu décrite et mérite des investigations plus poussées, étant donnée l'importance de ces composantes dans la cellule et dans la chaîne trophique ;

Cette thèse s'inscrit dans le cadre du projet **LIPID** (**L**ipids as **I**ndicators of **P**ollution **I**n **D**iatoms: towards an integrated ecotoxicity framework for aquatic and terrestrial plants, 2016-2019) du LabEx COTE (ANR-10-LABX-45) coordonné par François Delmas (Irstea, UR EABX).

L'objectif global de ce projet de thèse est d'étudier, à l'aide d'expérimentations contrôlées en laboratoire, l'impact des herbicides sur la composition des acides gras des diatomées et leur pertinence vis-à-vis des descripteurs classiquement utilisés en écotoxicologie microbienne.

Ce manuscrit est divisé en **six chapitres** :

✚ **Le chapitre 1** présente les éléments de contexte à savoir :

1. Les diatomées d'eau douce ;
2. Les lipides et les acides gras ;

3. Les pesticides et plus particulièrement deux herbicides le diuron et le S-métolachlore ;
4. Une présentation des objectifs de ces travaux de thèse ;

✚ **Le chapitre 2** est consacré à la présentation du matériel et des méthodes utilisés pour ces travaux :

1. Le matériel biologique à savoir deux espèces de diatomées d'eau douce, *Gomphonema gracile* et *Nitzschia palea* ;
2. La préparation des solutions d'herbicides ;
3. Les conditions générales d'exposition ;
4. Les paramètres chimiques et biologiques étudiés ;
5. Les analyses statistiques utilisées lors de cette étude ;

Les chapitres 3, 4 et 5 sont présentés sous la forme de publications scientifiques.

✚ **Le chapitre 3** concerne l'étude de l'impact du diuron et du S-métolachlore sur les descripteurs considérés comme « classiques » et les profils d'acides gras de *Gomphonema gracile* (cette première étude est publiée dans le journal *Science of the Total Environment*) ;

✚ **Le chapitre 4** aborde la caractérisation de la variabilité interspécifique (notamment entre *Gomphonema gracile* et *Nitzschia palea*) des profils d'acides gras et de l'impact associé du diuron et du S-métolachlore (cette seconde étude est soumise dans le journal *Ecological Indicators*) ;

- ✚ Le chapitre 5 examine l'impact du diuron et du S-métolachlore sur les lipides et les acides gras, particulièrement l'acide eicosapentaénoïque, de la diatomée *G. gracile* (cette troisième étude est soumise dans le journal *Phytochemistry*) ;
- ✚ Enfin, le chapitre 6 présente une synthèse générale de l'étude permettant de discuter des principaux résultats obtenus. Les perspectives de ces travaux sont également abordées lors de ce dernier chapitre.



---

# **Chapitre 1 – Contexte général**

---



# 1. Les diatomées



## a) Définition

Les microalgues sont divisées en plusieurs classes, les Bacillariophycées, les Chlorophycées, les Chlorodendrophycées, les Chrysophycées, etc (Guiry, 2012).

Les diatomées, appartenant à la classe des Bacillariophycées, correspondent à des microalgues brunes unicellulaires et regroupent plus de 200 000 espèces tous milieux confondus (eaux douces, saumâtres et marines) (Damien, 2013; Guiry, 2012).

Ces organismes unicellulaires dont la taille varie de quelques micromètres à plus de 500  $\mu\text{m}$  possèdent une paroi siliceuse, nommée frustule, qui se compose de deux unités imbriquées : l'épivalve (épithèque) et l'hypovalve (hypothèque, qui est de taille plus petite que l'épithèque), reliées par une bande (ou ceinture) : le cingulum (épicingulum et hypocingulum) (Round et al., 2007) (Figure 1). Des questions persistent encore sur le rôle réel du frustule, mais du fait de son architecture, le frustule est extrêmement solide et sa fonction première serait d'assurer une protection externe contre les prédateurs (Hamm et al., 2003). Le frustule est recouvert d'une fine pellicule organique, nommée mucilage, ayant comme fonction l'adhésion éventuelle de la cellule à un substrat ou à d'autres cellules. Celui-ci entre également en jeu dans la mobilité de la cellule (Kröger et al., 1994).

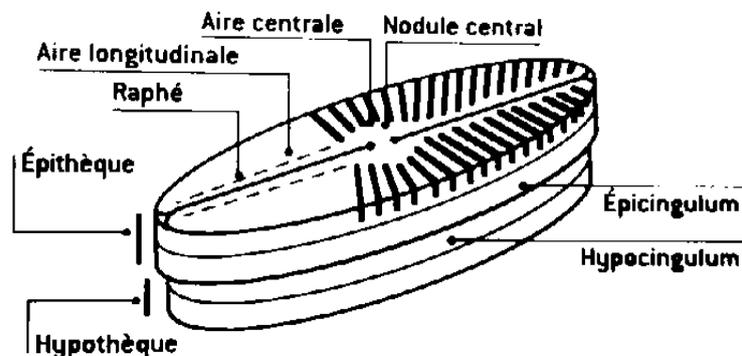


Figure 1 : Schéma du frustule d'une diatomée pennale (Gelabert Alexandre©)

Les diatomées sont définies par différentes géométries de leur frustule et sont classées en deux catégories telles que les diatomées pennales ou centrales. La description de ces différentes géométries est réalisée ci-dessous :

- 1) Les diatomées centrales, à symétrie radiale (Figure 2), sont composées d'un frustule portant des stries, rayonnant depuis un point ou une aréole (n'étant pas obligatoirement disposé au centre de la valve).
- 2) Les diatomées pennales, à symétrie bilatérale (Figure 3), sont composées d'un frustule allongé présentant des stries disposées autour d'un plan de symétrie bilatérale. De nombreuses diatomées pennales présentent sur ce plan de symétrie une fente nommée raphé qui est interrompue par un nodule de silice central. Le raphé permet une communication avec le milieu extérieur et l'excrétion de mucilage. Si le raphé est atrophié ou peu marqué, celui-ci est renommé pseudo-raphé. Les diatomées pennales sans raphé sont désignées comme diatomées araphidées ou crypto-raphidées.

Les diatomées centrales tendent à être majoritairement planctoniques alors que les diatomées pennales sont recensées de manière plus importante parmi les espèces benthiques (Gelabert, 2005) c'est-à-dire que celles-ci constituent des colonies accrochées à des supports solides dans le fond des cours d'eau. La production de ces diatomées pennales est souvent plus faible que celle des diatomées planctoniques, de l'ordre de  $100 \text{ g.m}^{-2}$  de carbone. Ceci est dû en partie à la forte turbidité de l'eau au niveau des substrats et à l'instabilité de ceux-ci au moment d'événements violents par exemple (Hamm et al., 2003).

La géométrie de la diatomée ainsi que l'ornementation du frustule sont utilisées comme critères principaux d'identification (Lavoie, 2008). En effet, le frustule est utilisé depuis de nombreuses années dans le but de classer les différentes espèces de diatomées puisque chaque espèce

synthétise une paroi siliceuse composée d'une architecture unique et reproduite à l'identique au fil des générations.

Les diatomées étant des organismes eucaryotes, celles-ci possèdent un noyau contenu dans le protoplasme et entouré par des chromatophores. Ces chromatophores correspondent aux pigments des chloroplastes et confèrent aux diatomées un aspect brunâtre. En effet, les caroténoïdes (xanthophylle, fucoxanthine...) masquent la couleur des chlorophylles et de ce fait les diatomées sont classées parmi les espèces d'algues brunes-jaunes (Gelabert, 2005). Les pigments majoritaires des diatomées sont la chlorophylle *a* et *c* et des caroténoïdes (Roy et al., 2011).

Enfin, les diatomées peuvent se présenter aussi bien sous forme solitaire, que sous forme de colonie telle que la colonie en zigzag, en ruban, en filament, en éventail et en étoile (Figure 4) (Sajjadi et al., 2018).

## Centrales

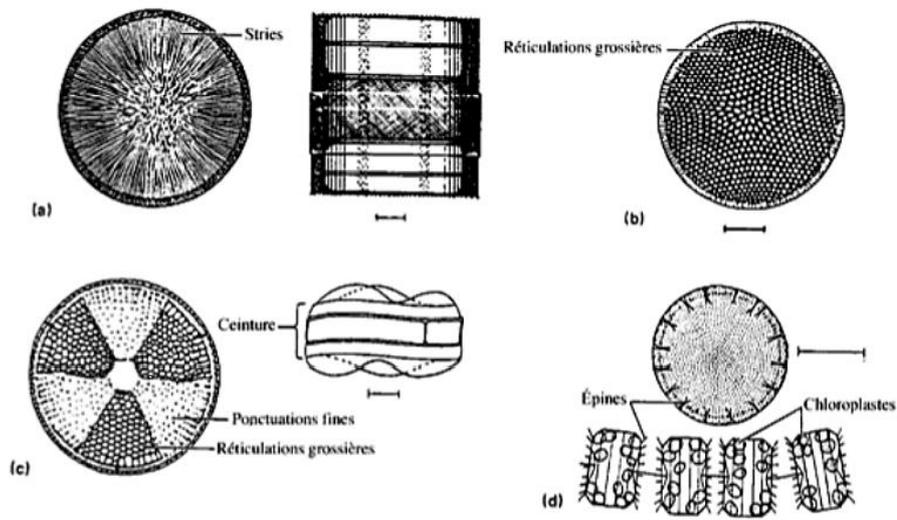
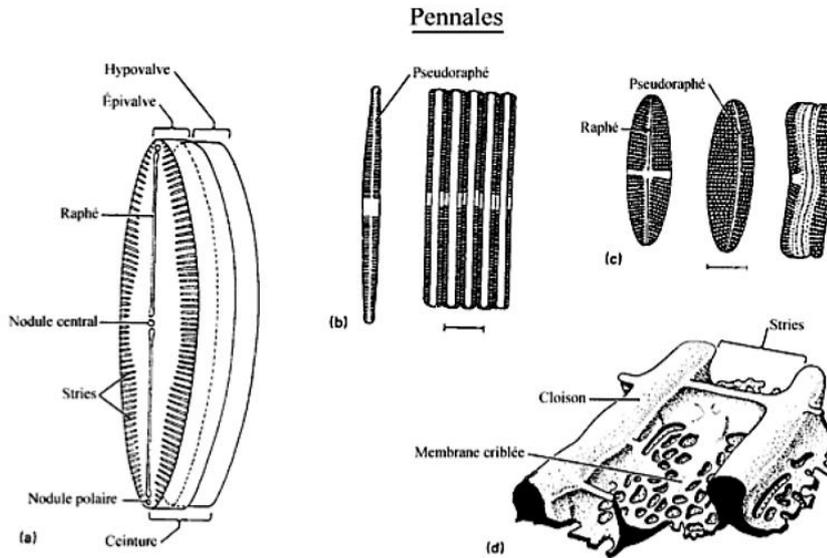
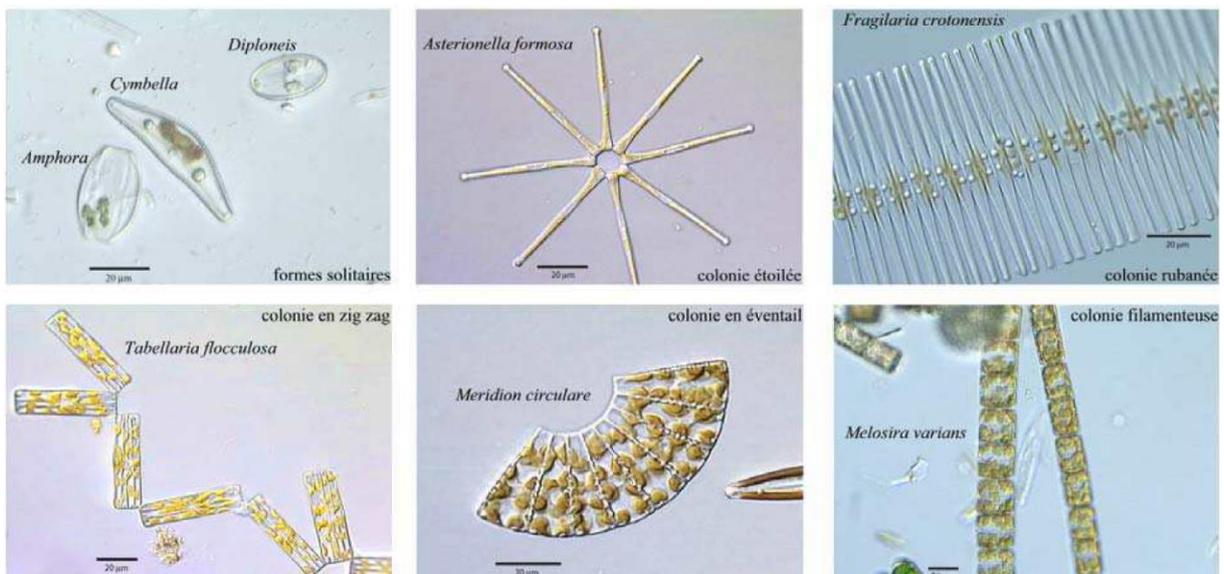


Figure 2 : Diatomées centrales. (a) *Melosira* : vue de la valve (à gauche) et vue cingulaire d'une colonie (à droite) ; (b) *Coscinodiscus* : vue de la valve ; (c) *Actinoptychus* : vue de la valve (à gauche) et valve cingulaire (à droite) ; (d) *Thalassiosira* : vue de la valve (en haut) et vue cingulaire d'une colonie (en bas). Échelle = 10 µm. (Brasier 1980).



**Figure 3 :** Diatomées pennales. (a) *Pinnularia* : vue oblique montrant le raphé ; (b) *Fragilaria* : valve avec le pseudoraphé (à gauche) et colonie en vue cingulaire (à droite) ; (c) *Achanthes* : vue de l’hypovalve avec le raphé (à gauche), vue de l’épivalve avec le pseudoraphé (au centre) et vue de la ceinture (à droite) ; (d) détail d’une aréole d’une diatomée. Échelle = 10 µm. (Brasier 1980).



**Figure 4 :** Différentes espèces de diatomées sous formes solitaires et coloniales (Morin, 2006, photos de Jason Oyadomari©).

## b) Métabolisme des diatomées

### i. *La photosynthèse*

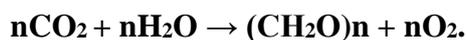
Les diatomées sont des organismes photo-autotrophes ; à partir de la réduction de dioxyde de carbone et d'une source d'énergie externe, les photons apportés par la lumière, et d'éléments minéraux, celles-ci synthétisent leur propre matière organique : c'est le processus de la photosynthèse (Hopkins, 2003; Karp, 2010; Lance, 2013).

La photosynthèse s'opère dans les chloroplastes de la cellule et plus particulièrement au niveau des membranes thylakoïdales des chloroplastes, nommée membrane thylakoïde ([Figure 5](#)).

Cette réaction se déroule en deux étapes :

- 1) La phase claire correspond à la conversion de l'énergie lumineuse en énergie chimique (le Nicotinamide Adénine Dinucléotide Phosphate (NADP) et l'Adénosine TriPhosphate (ATP)) ;
- 2) La phase sombre correspond à la fixation du carbone (réduction du carbone en glucides).

L'équation globale de la photosynthèse est :



#### Réaction claire

La réaction claire se déroule comme suit (le PSI, disposant d'une antenne collectrice de photons peut fonctionner indépendamment du PSII) :

- 1) L'énergie d'excitation, correspondant aux photons apportés par l'énergie lumineuse, est captée par l'antenne collectrice du PSII et transportée jusqu'au centre réactionnel, appelé P680, qui passe à l'état excité : P680\* ([Figure 5](#)) ;
- 2) Le P680\* transmet un électron à la phéophytine (qui est un pigment) et qui est considérée comme l'accepteur primaire ;

- 3) Par la suite, le P680\* oxydé (P680<sup>+</sup>) retourne à son état fondamental grâce aux électrons provenant de l'oxydation d'une molécule d'eau ;
- 4) L'électron transmis par le P680\* est transporté par une chaîne de transporteurs d'électrons (quinones A et B, plastoquinone, complexe cytochrome b6f jusqu'à la protéine plastocyanine) ;
- 5) L'électron est alors transféré au centre réactionnel du PSI, appelé P700, qui est à son tour excité : P700\* ;
- 6) En retournant à son état fondamental, le P700\* émet un électron qui est transporté par une chaîne de transporteurs d'électrons jusqu'à la protéine ferrédoxine ;
- 7) Cette protéine transmet l'électron à une enzyme, la ferrédoxine NADP<sup>+</sup> oxydoréductase, qui réduit le NADP<sup>+</sup> en NADPH.

En parallèle, un gradient de protons entre le stroma et le lumen favorable à l'activation de l'ATP synthase, induisant la production d'ATP, est réalisé par la production d'ions H<sup>+</sup> issue de la photolyse de l'eau et du transfert d'électrons au sein du cytochrome b6f (Hopkins, 2003; Karp, 2010; Lance, 2013).

### Réaction sombre

Cette dernière réaction de la photosynthèse est plus lente que la précédente (de l'ordre des secondes jusqu'aux heures) et peut se dérouler à la lumière comme à l'obscurité.

Celle-ci convertit le dioxyde de carbone (CO<sub>2</sub>) en carbone organique à partir du NADPH et de l'ATP produits lors de la réaction claire. Cette phase se déroule dans le stroma du chloroplaste (Figure 5), *via* le cycle de Calvin-Benson dont la réaction globale est (Raven et al., 2011) :



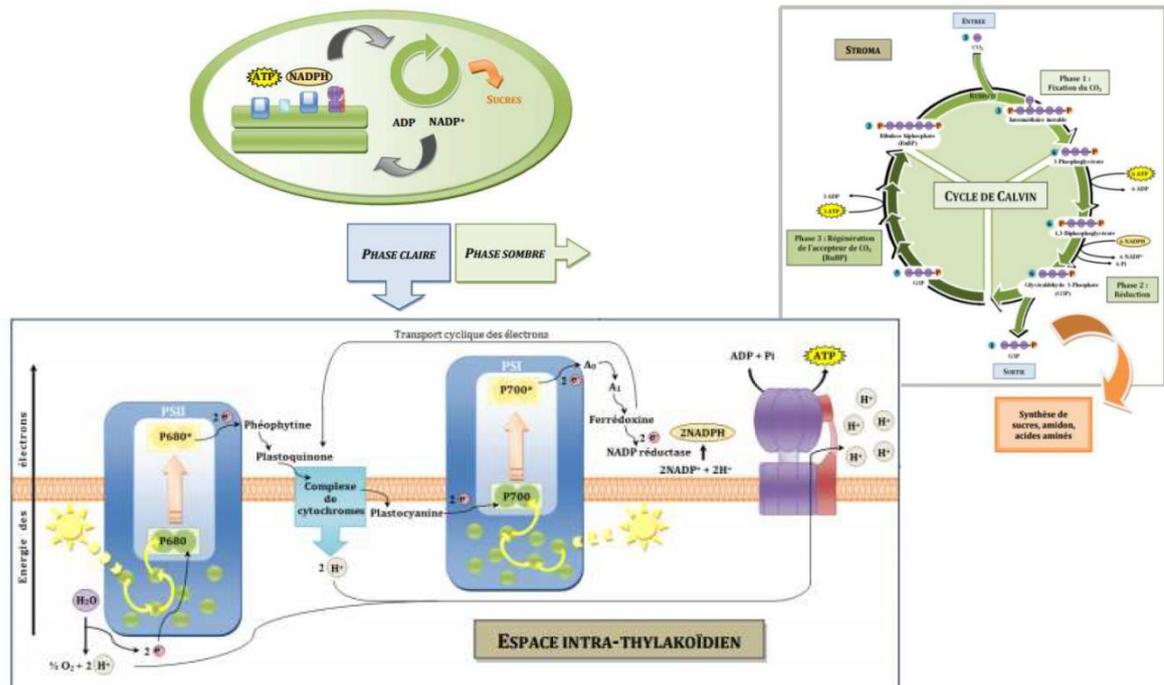


Figure 5 : Schéma de la photosynthèse avec la différenciation de la réaction claire et de la réaction sombre (Matthieu Simon ©).

## ii. La reproduction des diatomées

Les diatomées ont un cycle de vie assez court, de 3h à 3 jours (Baars, 1983; Morin et al., 2008a) et ont une cinétique de croissance de type exponentiel. Celles-ci possèdent un mode de reproduction spécifique : la reproduction asexuée par bipartition.

Les diatomées alternent phase de reproduction asexuée, qui est la phase majoritaire et privilégiée, et phase de reproduction sexuée (Lavoie, 2008). La multiplication par bipartition est une division cellulaire, et est la méthode de reproduction majoritairement employée par les diatomées. Lors de cette division cellulaire, chaque cellule fille reçoit une des deux thèques de la cellule mère comme épithèque propre et conçoit une nouvelle hypothèque.

Les étapes de cette multiplication par bipartition sont décrites ainsi :

- 1) Dans un premier lieu, l'hypocingulum (le cingulum est la paroi verticale entourant la valve : Figure 1) est formé pour chacune des deux nouvelles thèques.
- 2) La division du noyau et du cytoplasme (partie de la cellule qui contient le noyau et divers organites) est réalisée.
- 3) Les deux hypoalves sont formées.
- 4) Les deux hypoalves sont silicifiées en 10 à 20 minutes après division.
- 5) Les frustules sont conçus et les deux cellules se séparent (sauf dans le cas des espèces formant des colonies).

A chaque nouveau cycle de reproduction, une des deux nouvelles cellules filles récupère l'ancienne hypothèque de la cellule mère comme épithèque propre engendrant la diminution de taille d'une des deux cellules filles par rapport à la cellule mère (Figure 6). De ce fait, dans le temps et suite à de nombreuses multiplications, une diminution de la taille d'une partie de la population de diatomées est observée.

Lorsque celles-ci arrivent à leur taille minimale, deux cellules de diatomées débutent un processus de reproduction sexuée permettant de produire à nouveau des cellules de taille normale (Figure 6).

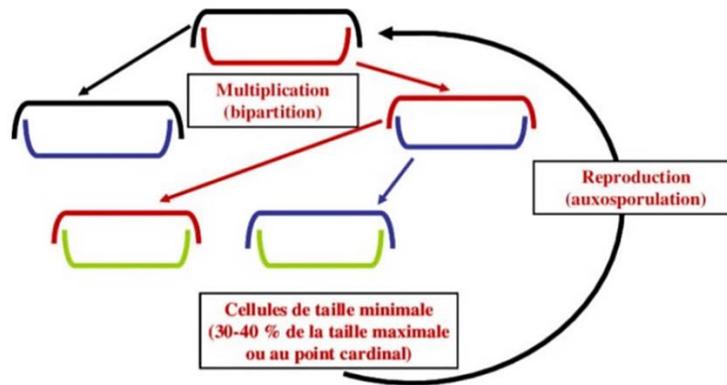


Figure 6 : Schéma de la reproduction des diatomées d'après Round et al., 1990 (Nhunh Nguyen Deroche©).

### c) Facteurs influençant le développement des diatomées

Trois facteurs principaux gouvernent le métabolisme des diatomées : la lumière, la température et les sels nutritifs. En effet, l'abondance des diatomées a tendance à être plus élevée au début du printemps, période à laquelle davantage de nutriments sont disponibles (phosphate, nitrate, silicate) et où l'intensité lumineuse et la température sont optimales.

#### i. La lumière

Les diatomées sont des organismes photosynthétiques et réagissent directement aux fluctuations de la lumière. La qualité (composition spectrale), la quantité mais également la durée de lumière reçue conditionnent le développement des diatomées (Hopkins, 2003).

Tous les organismes photosynthétiques, et notamment les diatomées, n'utilisent que la lumière visible. La gamme de longueur d'onde de cette lumière s'étend de 400 (violet) à 700 nm (rouge) et correspond aux rayonnements photosynthétiquement actifs (PAR en anglais pour photosynthetically active radiation).

La qualité de l'air, la couverture nuageuse, l'ombrage dû à la présence du couvert végétal et le moment de la journée et de l'année sont des facteurs influençant la qualité et la quantité de la lumière incidente arrivant jusqu'aux eaux de surface (Hopkins, 2003; Kirk, 2010).

La quantité de lumière reçue par les diatomées est fonction de la profondeur du milieu ; celle-ci diminue avec la profondeur en raison de l'absorption de l'énergie lumineuse par les molécules d'eau (d'Elbée, 2016).

De plus, la pénétration du rayonnement dans l'eau est modulée par les substances chimiques dissoutes et particulaires, et organiques et minérales présentes dans le milieu. En effet, la profondeur de la zone photique (zone euphotique), qui est la zone dans laquelle l'exposition lumineuse est suffisante à la photosynthèse, est conditionnée par les propriétés optiques de ces substances (Kirk, 2010). La zone euphotique correspond à quelques centimètres de profondeur en zone très turbide et à 200 m de profondeur en zone oligotrophe (d'Elbée, 2016).

Plusieurs études ont montré qu'une variation de ce paramètre environnemental entraînait une modification du développement algal.

Par exemple, il a été observé qu'une intensité trop élevée diminuait le taux de croissance des diatomées alors qu'à plus faible intensité lumineuse la densité de la population réaugmentait (Admiraal, 1976; Admiraal and Peletier, 1980).

## *ii. La température*

La croissance des diatomées est modulée par la température. En effet, la majorité des réactions biologiques sont catalysées par des enzymes aux optimums thermiques variables. L'amplitude des températures tolérées et l'optimum de croissance sont fonction de l'espèce étudiée (Lavoie, 2008; Loewe and Muischnek, 1926).

Les diatomées sont fortement présentes dans le milieu aquatique entre 5 et 20 °C (Lavoie, 2008). En raison de ces optimums de température, des concentrations en silice plus élevées en fin d'hiver, et la compétition y étant moindre avec les autres groupes algaux, les diatomées sont retrouvées majoritairement au début du printemps (Tilman et al., 1986).

De la même manière que pour l'intensité lumineuse, il a été démontré dans plusieurs études qu'une modification de la température modulait le développement des diatomées.

Par exemple, celles-ci ont noté qu'une température trop élevée diminuait le taux de croissance des diatomées alors qu'à plus faible température, la densité de la population réaugmentait (Admiraal, 1976; Admiraal and Peletier, 1980).

### *iii. Les sels nutritifs*

Outre les conditions favorables de lumière et de température, les diatomées nécessitent un certain nombre de nutriments pour leur croissance tels que l'azote, le phosphore, la silice, des oligo-éléments et des vitamines.

Dans le milieu aquatique, la disponibilité de ces nutriments est contrôlée par divers facteurs comme la localisation, la géologie, la pédologie du site étudié ; par l'anthropisation et également par les saisons et les phénomènes météorologiques (Stevenson, 1997). En effet, lors de périodes de fortes pluies et de crues et de par la continuité des écosystèmes, des apports terrestres enrichissent le milieu aquatique. Également, l'abondance et le type de végétation retrouvée le long des cours d'eau modulent la concentration et le type de sels nutritifs introduits dans le milieu aquatique.

Les saisons influencent naturellement les concentrations des nutriments retrouvés dans le milieu aquatique. En hiver, la forte turbulence des eaux remet en suspension et homogénéise les nutriments dans la colonne d'eau. En période estivale, du fait de leur forte consommation par les organismes des efflorescences printanières, la disponibilité des nutriments diminue (Coquillé, 2017).

Diverses études ont démontré l'impact de la concentration et de la composition en nutriments sur le développement des diatomées (Qiao et al., 2016; Valenzuela et al., 2013). Par exemple,

Qiao et al. ont démontré en 2016 qu'une faible concentration en nitrates provoque un stress chez *Phaeodactylum tricornutum* avec une diminution du taux de croissance.

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

##### *i. Production d'oxygène*

Les diatomées étant des organismes photosynthétiques, celles-ci synthétisent de l'oxygène et des sucres à partir de dioxyde de carbone et de molécules d'eau (section 1-b-i). Celles-ci peuvent fixer jusqu'à 20 % du CO<sub>2</sub> global, qui est alors converti en hydrates de carbone ou en lipides (Zulu et al., 2018). De plus, environ 20 % de la production d'oxygène atmosphérique est assurée par ces organismes unicellulaires (Lavoie, 2008) malgré le fait que ceux-ci représentent moins de 1 % de la biomasse végétale (d'Elbée, 2016).

##### *ii. La base des réseaux trophiques aquatiques*

Les diatomées sont qualifiées de producteurs primaires du fait de leur propre production de matière organique à partir de matière inorganique. Elles sont à la base des réseaux trophiques et participent au développement des organismes hétérotrophes. Ces derniers consomment de la matière organique (dont les diatomées) du fait de leur incapacité à synthétiser leur propre matière organique à partir de sources inorganiques (Amblard et al., 1998; Mostajir et al., 2012).

#### **e) Les diatomées : organismes bioindicateurs**

En raison de leur sensibilité spécifique à la pollution et de leur cosmopolitisme dans les écosystèmes aquatiques, les diatomées représentent de bons indicateurs de la qualité des eaux (Round et al., 2007).

En effet, les diatomées, qui sont des organismes ubiquistes, possèdent un temps de génération court et suivant les espèces étudiées présentent des *preferenda* environnementaux et des sensibilités aux toxiques variés (Kim-Tiam, 2013).

Les assemblages algaux formés par les diatomées benthiques sont composées de dizaines d'espèces différentes ayant chacune ses propres tolérances aux conditions du milieu. Sur la base des préférences de chacune et les proportions relatives de celles-ci dans un écosystème aquatique donné, il est alors possible de déterminer le niveau de pollution du milieu ou de détecter des changements environnementaux (Dixit et al., 1992).

Parallèlement aux mesures physico-chimiques, ces caractéristiques ont donc conduit à l'utilisation des diatomées dans plusieurs indices rendant compte de la qualité générale des eaux comme par exemple l'Indice Biologique Diatomées (Coste et al., 2009). Malheureusement, ces indices ne sont pas adaptés pour la détection des impacts de la pollution toxique des eaux (Kim Tiam et al., 2018; Lavoie et al., 2017).

Diverses études ont démontré le potentiel des diatomées dans l'évaluation des pollutions toxiques, notamment dans le cas des contaminations par les pesticides (Coquillé, 2017; Coquillé et al., 2015; Debenest et al., 2010; DeLorenzo et al., 2001; Larras et al., 2013; Moisset et al., 2015; Morin et al., 2009).

Récemment, le potentiel des acides gras des diatomées dans l'évaluation de la pollution des milieux aquatiques a été suggéré (Filimonova et al., 2018; Filimonova et al., 2016b; Filimonova et al., 2016c; Gonçalves et al., 2017; Robert et al., 2007).

## 2. Les acides gras



## a) Terminologie

Un acide gras est un acide carboxylique à longue chaîne carbonée (de 4 à 36 carbones). Cette chaîne peut être saturée ou non (Figure 7).

Pour préciser la longueur et le nombre de doubles liaisons d'un acide gras, les notations utilisées sont les suivantes (Lehninger, 2004) :



X = nombre de carbones

Y = nombre de doubles liaisons

$\Delta^{a,b,c,..}$  = la position des doubles liaisons ;

Ou bien,



X = nombre de carbones

Y = nombre de doubles liaisons

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

Le nombre de carbones d'un acide gras est déterminé par l'action de l'enzyme élongase et de l'enzyme acide gras synthase (FAS: fatty acid synthase), qui allonge les chaînes d'acides gras par l'ajout de deux atomes de carbone à la fin de l'acide carboxylique.

La position de la double liaison est quant à elle déterminée par l'activité de l'enzyme désaturase qui introduit les doubles liaisons dans les acides gras, dont la position est indiquée dans la notation  $\Delta(\text{position})$ -désaturase (Gonçalves et al., 2017).

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

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

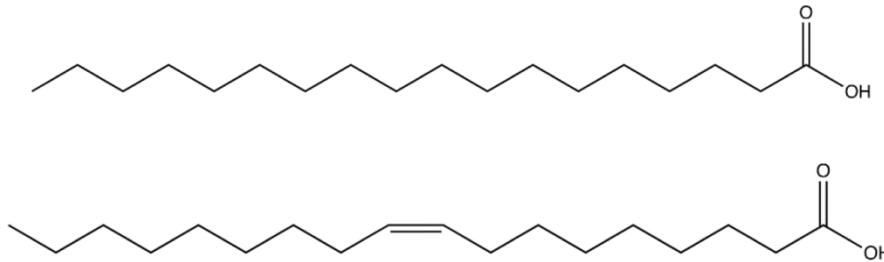


Figure 7 : Exemple d'un acide gras saturé (acide stéarique, en haut, noté 18:0) et d'un acide gras insaturé (acide oléique, en bas, noté 18:1n9).

## b) Les différentes classes d'acides gras

Les acides gras résultant de l'action des élongases et désaturases peuvent être catégorisés en quatre classes :

**SFA** (*Saturated fatty acids*) : correspondant aux acides gras saturés, ne présentant aucune double liaison ;

**MUFA** (*Monounsaturated fatty acids*) : correspondant aux acides gras mono insaturés, avec une seule double liaison ;

**PUFA** (*Polyunsaturated fatty acids*) : correspondant aux acides gras polyinsaturés, composé de 2 à 6 doubles liaisons séparées généralement par une fonction méthylène (Budge et al., 2006) ;

**HUFA** (*Highly unsaturated fatty acids*) : correspondant aux acides gras hautement insaturés, composés de 20 carbones au minimum et plus de trois doubles liaisons. Ces acides gras sont dits essentiels et sont parfois notés EFA dans la littérature correspondant à « essential fatty acids » (Saito and Aono, 2014).

Les PUFA et HUFA sont surtout présents dans les lipides membranaires intervenant dans la structure des membranes biologiques, tels que les lipides des membranes des thylakoïdes (Gonçalves et al., 2017; Li et al., 2014b).

Par exemple, il a été démontré que les acides gras PUFA assurent la fluidité membranaire dans la cellule : en raison de leur géométrie (présence de doubles liaisons carbone-carbone), ces acides gras faiblement condensés augmentent la fluidité de la membrane (Sharma et al., 2012).

A faible température, il a été observé qu'en réponse à une diminution de la fluidité membranaire, une adaptation avait lieu par une production accrue d'acides gras insaturés (Thompson Jr, 1996).

Quant à eux, les SFA et MUFA sont en proportion importante dans les lipides neutres, jouant un rôle important dans le stockage énergétique (Abida et al., 2015; Gonçalves et al., 2017; Li et al., 2014b).

### **c) Synthèse des acides gras**

La biosynthèse des acides gras polyinsaturés dans les cellules eucaryotes implique des étapes consécutives de désaturation et d'allongement de l'acide gras initial, catalysées par un ensemble de désaturases et d'élongases (Venegas-Calderón et al., 2010; Wallis et al., 2002).

Les élongases sont des enzymes localisées au niveau du réticulum endoplasmique et des mitochondries, et sont nécessaires à l'allongement des acides gras à 16, 18 et 20 carbones.

Chez les organismes photosynthétiques, et notamment les diatomées, la biosynthèse débute par la production *de novo* de l'acide palmitique saturé 16:0 ou l'acide stéarique saturé 18:0 (tandis que les cellules animales ont besoin de l'acide gras essentiel acide  $\alpha$ -linoléique 18:3 (ALA) en tant que précurseur de la voie) (Cook and Hildebrand, 2015).

Les étapes de la biosynthèse de l'acide palmitique 16:0 sont décrites ci-dessous :

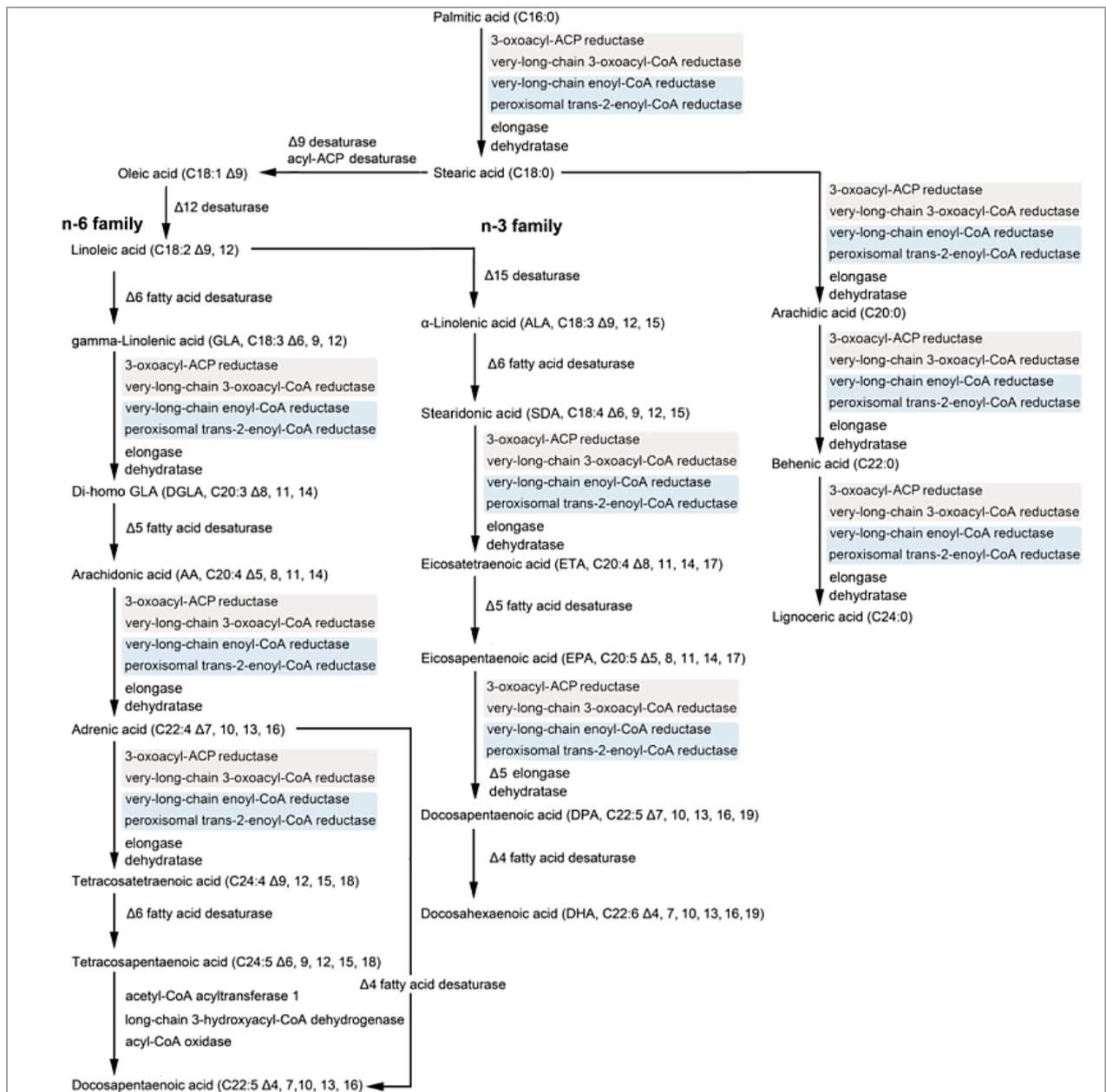
- 1) Celle-ci débute par la formation de malonyl-CoA par carboxylation de l'acétyl-CoA (annexe 1).
- 2) La malonyl-CoA est condensée avec l'acétyl-CoA et réagit avec l'enzyme acide gras synthase (en anglais FAS : fatty acid synthase) pour former après libération de CO<sub>2</sub> une chaîne acyle à deux carbones (groupe acyle saturé) (annexe 2).
- 3) L'étape précédente est réalisée 8 fois jusqu'à l'obtention d'une chaîne à 16 carbones, l'acide palmitique 16:0 (annexe 3) (Lehninger, 2004).

Une fois l'acide palmitique synthétisé, celui-ci est modifié par une série d'élongations et de désaturations produisant divers types d'acides gras insaturés (Figure 8) (Kelly and Scheibling, 2012).

Une voie de synthèse caractéristique des diatomées est celle où l'acide gras 16:0 est désaturé en 16:1n7, puis désaturé en 16:4n1. Ces deux acides gras sont couramment utilisés comme indicateurs du groupe des diatomées (Dalsgaard et al., 2003).

La conversion du 18:1n9 au 18:2n6 et 18:3n3 nécessite les enzymes désaturases  $\Delta 12$  et  $\Delta 15$  retrouvées seulement chez les producteurs primaires. Ces deux PUFA sont nommés acides gras « essentiels », car les animaux doivent les obtenir dans leur régime alimentaire plutôt que de les synthétiser *via* d'autres acides gras (Dalsgaard et al., 2003). A la suite d'allongements supplémentaires et de désaturations des acides gras 18:2n6 et 18:3n3, d'autres acides gras PUFA, sont formés tels que le 20:4n6, 20:5n3 et 22:6n3 (Gurr et al., 2002).

Les organismes tels que les microalgues *Euglena gracilis* ou *Isochrysis galbana* contiennent des gènes qui codent pour la  $\Delta 9$ -élongase et la  $\Delta 8$ -désaturase et utilisent la voie dans laquelle l'enzyme *elo9* allonge le 18:3n3 pour générer une chaîne 20:3, puis l'enzyme *des8* ajoute la double liaison pour former le 20:4 (Cook and Hildebrand, 2015).



**Figure 8 :** Schéma de la voie de synthèse des PUFA chez les diatomées. Proposé par Li et al. (2014b).

### **d) Localisation des acides gras dans la cellule : les lipides**

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

Les lipides, composés notamment d'acides gras, constituent un groupe de composés chimiquement diversifiés, dont le trait commun et déterminant est leur insolubilité dans l'eau (Lehninger, 2004).

Ceux-ci possèdent une variété de rôles dans la cellule mais représentent la principale forme de réserve énergétique. En effet, la classe de molécules la plus riche en énergie est celle des lipides ( $37,6 \text{ kJ.g}^{-1}$ ), suivi de celle des protéines ( $16,7 \text{ kJ.g}^{-1}$ ) et celle des sucres ( $15,7 \text{ kJ.g}^{-1}$ ) (Sajjadi et al., 2018).

Les lipides sont également les constituants majeurs des membranes biologiques. Ces membranes sont constituées d'une bicouche lipidique et protègent la cellule de l'entrée de molécules polaires ou d'ions dans la cellule (Lehninger, 2004).

Les lipides peuvent être classés en deux catégories :

- 1) les lipides polaires jouant un rôle dans la structure de la membrane de la cellule (Figure 9);
- 2) les lipides non polaires, appelés lipides neutres, jouant un rôle dans la réserve d'énergie métabolique (Figure 9) (Sharma et al., 2012).

Il est intéressant de noter que le taux dans la cellule de ces deux types de lipides varie suivant les stades de croissance des diatomées (Sajjadi et al., 2018) ; très peu de lipides non polaires sont accumulés dans la cellule durant la période exponentielle de croissance mais plutôt lors de la phase stationnaire (Berge et al., 1995; Brown et al., 1996; Tonon et al., 2002).

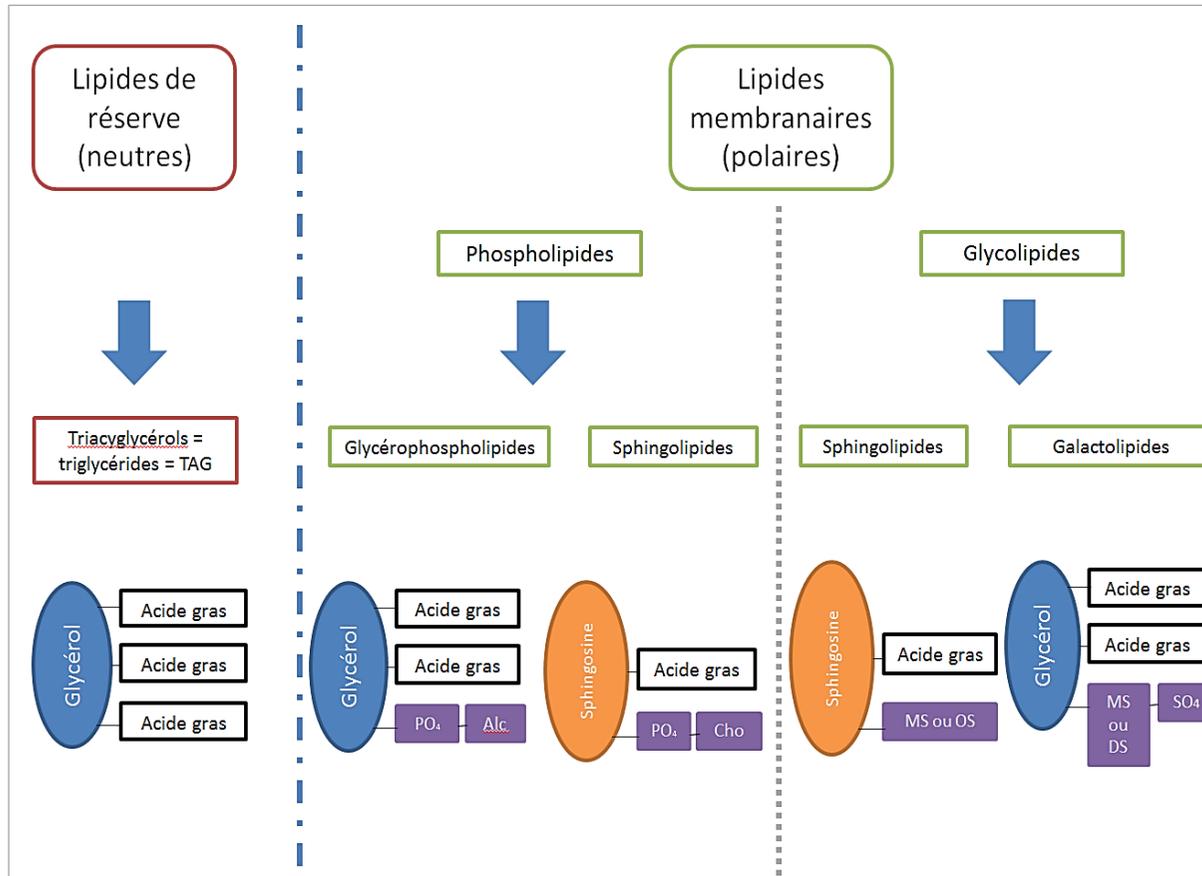


Figure 9 : Composition des lipides membranaires et des lipides de réserve. D'après Lehninger et al. (2004). Abréviations : Alc = alcool ; Cho = choline ; MS = monosaccharide ; OS = oligosaccharide ; DS = disaccharide. Les sphingolipides appartenant à la classe des phospholipides correspondent aux sphingomyélines.

### *i. Lipides polaires*

Les membranes biologiques sont composées de lipides polaires. Les lipides composant ces membranes présentent une partie hydrophile, polaire et une partie hydrophobe, apolaire.

Les trois classes de lipides membranaires sont :

- 1) **les phospholipides ;**
- 2) **les glycolipides ;**
- 3) **et les éthers lipides ;**

Deux de ces trois classes sont présentées sur la Figure 9 et sont retrouvées chez les diatomées.

Parmi ces trois classes il est possible de dénombrer cinq types de lipides membranaires : les glycérophospholipides, les galactolipides et sulfolipides, les tétraétherlipides, les sphingolipides (Lehninger, 2004). Leur structure chimique est décrite ci-dessous :

- 1) Les glycérophospholipides sont composés d'une partie hydrophobe représentée par deux acides gras liés au glycérol (qui est la partie hydrophile) lui-même relié à une molécule de phosphate et d'un alcool aminé (sérine, choline...);
- 2) Les galactolipides et les sulfolipides contiennent également deux acides gras liés au glycérol mais sont dépourvus du phosphate caractéristique des phospholipides ;
- 3) Les tétraétherlipides sont composés de deux très longues chaînes alkyles reliées aux deux extrémités par un éther au glycérol ;
- 4) Les sphingolipides sont composés d'un acide gras associé à une amine grasse, la sphingosine (Lehninger, 2004).

Chez les diatomées, les lipides constitutifs des membranes sont les phospholipides et les galactolipides. Les phospholipides sont importants dans la structure des membranes cellulaires du fait de leur rôle de barrières perméables (Sharma et al., 2012).

Les glycolipides et plus précisément les galactolipides sont prédominants (90 % des lipides totaux) dans les membranes internes des chloroplastes, appelées membranes thylakoïdes. Ces membranes sont composées de monogalactosyldiacylglycérol (MGDG), de digalactosyldiacylglycérol (DGDG) et de sulfoquinovosyldiacylglycérol (SQDG) et de phosphatidylglycérol (PG) (Figure 10). Ces lipides sont indispensables à la photosynthèse (Mizusawa and Wada, 2012).

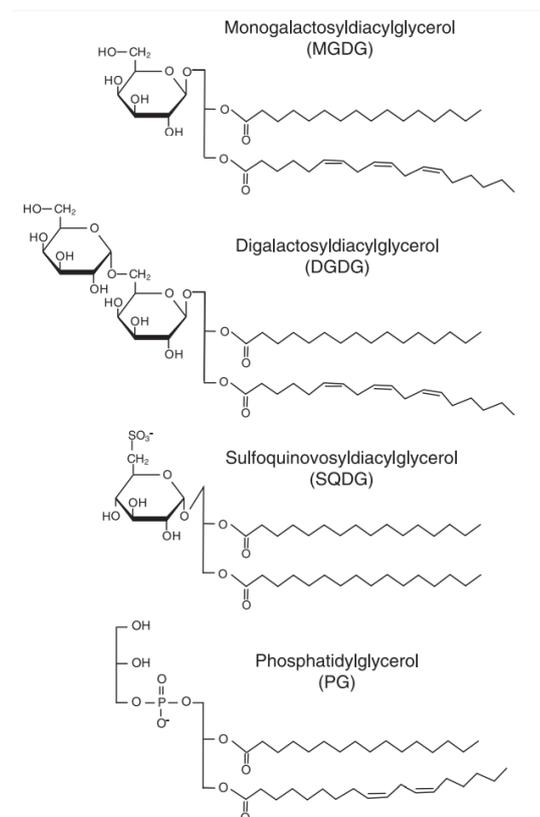


Figure 10 : Structure chimique des lipides des membranes des thylakoïdes (membranes internes des chloroplastes) (Mizuwa et al., 2012).

*ii. Lipides non polaires, neutres*

Les lipides non polaires, ou lipides neutres, jouent un rôle clé dans le stockage d'énergie métabolique.

Ces lipides sont représentés par des triglycérides ou triacylglycérols (TAG), des diglycérides (DAG), des monoglycérides (MAG), des acides gras libres (FFA = Free Fatty Acids) et des pigments (Sajjadi et al., 2018).

Les TAG sont composés de trois acides gras reliés chacun à un même glycérol par une liaison ester. Naturellement, les triacylglycérols sont mélangés ; ils sont composés de deux ou plusieurs acides gras différents. Dans le but de les nommer sans ambiguïté, il est nécessaire de spécifier le nom et la position de chaque acide gras (Lehninger, 2004) (Figure 11).

Chez les diatomées ces TAG sont stockés de différentes manières suivant l'espèce étudiée mais également suivant la phase de croissance de l'organisme et des paramètres environnementaux (Sajjadi et al., 2018). Ceux-ci peuvent représenter jusqu'à 80 % de la composition en lipides et 25 % de leur biomasse (Zulu et al., 2018).

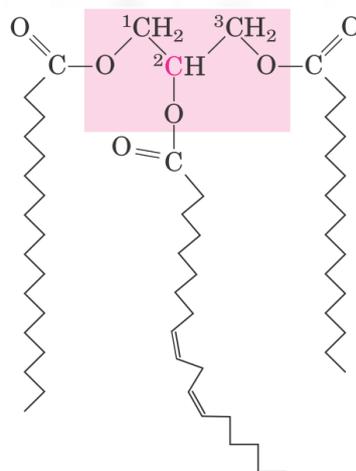


Figure 11 : Exemple d'un triacylglycérol (TAG) composé de trois acides gras différents reliés à un même glycérol (carré rose) : 1-stéaroyle, 2-linoléoyle, 3-palmitoyle glycérol. (Lehninger et al., 2004).

### e) Acides gras majoritaires chez les diatomées

La composition en acides gras des diatomées est caractérisée par une abondance en acides gras à 14, 16 et 20 carbones, notamment les acides gras 14:0, 16:0, 16:1n7 et 20:5n3 (acide eicosapentaénoïque : EPA) (Taipale et al., 2013). Il a été démontré dans une étude que les quatre acides gras cités précédemment représentaient entre 62 et 70 % de la composition totale en acides gras (Volkman et al., 1989).

Parmi ces quatre acides gras majoritaires, l'EPA est un acide gras oméga-3 (acide gras essentiel) et est présent en forte proportion chez les diatomées mais n'est pas présent chez d'autres classes de microalgues comme les chlorophycées par exemple (Hu et al., 2008).

En dehors des acides gras majoritaires des diatomées, Taipale et al. ont démontré en 2013 que d'autres acides gras, présents en plus faibles proportions, pouvaient être utilisés en tant que biomarqueurs comme indiqué sur le Tableau 1.

Tableau 1 : Acides gras majoritaires et biomarqueurs chez les Bacillariophyceae (diatomées).

Extrait de Taipale et al. (2013).

| Groupe de phytoplancton | Acides gras majoritaires      | Biomarqueurs                                  |
|-------------------------|-------------------------------|---|
| Bacillariophyceae       | 16:1n7 ; 20:5n3 ; 16:0 ; 14:0 | 16:2n7 ; 16:2n4 ; 16:3n4 ;<br>16:4n1 ; 18:4n4 |

### f) Importance des acides gras des diatomées dans le réseau trophique

Les acides gras représentent un des groupes les plus importants de molécules transférées de la plante à l'animal (Filimonova et al. 2016). Les acides gras essentiels tels que l'EPA ou l'acide docosahexaénoïque (DHA) ne peuvent être synthétisés *de novo* par les animaux ou en proportion trop faible pour le bon fonctionnement de l'organisme, d'où leur importance dans le

transfert trophique. Ils sont synthétisés par les microalgues et s'accumulent le long de la chaîne trophique (Filimonova et al., 2016b; Gonçalves et al., 2017).

Comme cité précédemment, les diatomées présentent une forte proportion d'EPA qui est une excellente source d'énergie pour les animaux. En effet, c'est un acide gras nécessaire pour le développement et la reproduction chez les organismes vivants faisant alors des microalgues et plus particulièrement des diatomées, une très bonne source d'alimentation pour les consommateurs primaires (Brett and Müller-Navarra, 1997; Taipale et al., 2013).

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

### **g) Variabilité de la composition en acides gras**

Il a été observé que les composés lipidiques étaient très sensibles aux facteurs environnementaux de stress (Gonçalves et al., 2012; Saito and Aono, 2014).

En effet, lors de conditions environnementales défavorables ou de stress, certaines microalgues sont capables de modifier leurs voies de biosynthèse lipidique vers la formation et l'accumulation de lipides neutres, principalement sous forme de TAG, permettant aux microalgues de supporter les effets de ces conditions défavorables (Sharma et al., 2012).

Par ailleurs, plusieurs études ont montré que la composition lipidique et notamment la composition en acides gras, pouvait être utilisée comme bioindicateur d'un stress ou biomarqueur d'une contamination (Filimonova et al., 2016b; Taipale et al., 2013).

Certains facteurs biotiques et abiotiques, primordiaux pour l'étude en conditions contrôlées et modulant la composition en acides gras sont décrits ci-dessous.

### *i. Stade de croissance*

Il a été constaté que le profil d'acides gras des diatomées était modulé suivant le stade de croissance de l'organisme (Boelen et al., 2017; Brown et al., 1996; Huerlimann et al., 2014; Ying et al., 2002).

Li et al. (2014b) ont noté cette variabilité avec l'accumulation de lipides neutres riches en SFA (14:0, 16:0) et MUFA (16:1) pendant la phase de croissance stationnaire. Ces types de lipides sont utilisés pour stocker l'excès de carbone accumulé pendant la photosynthèse. Les composés de structure étant nécessaires à la croissance, l'accumulation de lipides neutres a diminué durant la phase de croissance exponentielle. Enfin, la proportion de PUFA et de HUFA, qui sont des acides gras des lipides membranaires et composants structurels, sont augmentés au cours de la phase de croissance exponentielle (Kates and Volcani, 1966a).

Par exemple, chez la diatomée marine *Thalassiosira pseudonana* une augmentation des SFA et des MUFA a été observée ainsi qu'une diminution des PUFA entre la phase exponentielle et stationnaire (Brown et al., 1996).

### *ii. Variabilité interspécifique*

Les profils d'acides gras des diatomées se distinguent clairement de ceux des autres groupes de microalgues :

- 1) les diatomées ont des teneurs plus élevées de 16:2n4, 16:3n4 et 16:4n1 que celles des autres groupes de microalgues (Ying et al., 2000) ;
- 2) presque toutes les diatomées contiennent des proportions élevées d'acides gras 14:0, 16:0, 16:1n7 et 20:5n3 ;
- 3) les PUFA et les HUFA à 18 et 22 atomes de carbones sont des constituants mineurs par rapport aux autres microalgues (Volkman et al., 1989).

De nombreuses études ont montré des différences de profils d'acides gras entre des espèces de diatomées (Boelen et al., 2013; Dunstan et al., 1994; Pratoomyot et al., 2005; Ying et al., 2000) et dans les teneurs en EPA et DHA entre et au sein des classes d'algues (Brown et al., 1996; Guschina and Harwood, 2006; Lv et al., 2010). Dunstan et al. (1994) ont observé différents profils d'acides gras selon les espèces de diatomées considérées, en particulier avec l'espèce *Fragilaria pinnata* dont les teneurs plus faibles en 22:5n6 et de DHA que les autres espèces étudiées.

### *iii. Température*

La température s'est révélée avoir un effet majeur sur la composition en acides gras des microalgues (Guschina and Harwood, 2006; Morgan-Kiss et al., 2006). L'augmentation des acides gras insaturés en parallèle de la baisse de la température et l'augmentation des acides gras saturés avec l'augmentation de la température a été observée chez de nombreuses microalgues et cyanobactéries (Lynch and Thompson, 1982; Murata et al., 1975; Renaud et al., 2002; Sato and Murata, 1980).

Dû à leur géométrie, les acides gras insaturés, composés alors de doubles liaisons carbone-carbone, ne peuvent pas être aussi compactés que les acides gras saturés ; augmentant ainsi la fluidité des membranes. Au vu de la diminution de la fluidité membranaire à des températures plus basses, une augmentation des acides gras insaturés permet donc une adaptation de la cellule à cette modification (Sharma et al., 2012).

Par exemple, chez *Chlorella vulgaris* et *Botryococcus braunii*, l'augmentation de la température entraîne une diminution de la teneur relative en acides gras insaturés (Sushchik et al., 2003).

#### *iv. Intensité lumineuse*

La lumière, l'un des facteurs environnementaux les plus importants des écosystèmes aquatiques, module la croissance et l'accumulation des acides gras dans les microalgues.

En règle générale, une faible intensité lumineuse induit la formation des lipides polaires, en particulier les lipides polaires membranaires associés aux chloroplastes, tandis qu'une intensité de lumière élevée diminue la teneur totale en lipides polaires avec une augmentation simultanée de la quantité des lipides de stockage (neutres) et principalement les TAG (Brown et al., 1996; Khotimchenko and Yakovleva, 2005; Napolitano et al., 1994; Orcutt and Patterson, 1974). Une exposition élevée à la lumière diminue la teneur totale en phospholipides et augmente le niveau de lipides non polaires (à savoir TAG) dans l'algue verte filamenteuse *Cladophora* sp. (Napolitano et al., 1994).

La production de TAG dans des conditions de luminosité élevée pourrait être un mécanisme de protection de la cellule. Dans des conditions de forte luminosité, la quantité d'accepteurs d'électrons nécessaires à la photosynthèse peut être appauvrie et l'augmentation de la synthèse des acides gras (stockés sous forme de TAG) aide potentiellement la cellule à recréer son taux d'accepteurs d'électrons (Sharma et al., 2012).

#### *v. Concentrations en nutriments*

La disponibilité des nutriments a un impact significatif sur la croissance des microalgues mais aussi sur leur composition lipidique et en acides gras.

En condition de stress environnemental, lorsque les teneurs en nutriments sont limitées, une baisse du taux de division cellulaire est remarquée. Étonnamment, la biosynthèse des acides gras est maintenue chez certaines espèces d'algues à condition que les quantités de lumière et de CO<sub>2</sub> disponibles pour la photosynthèse soient suffisantes (Thompson Jr, 1996).

Lorsque la croissance des algues ralentit, la synthèse de nouveaux composés membranaires n'est pas nécessaire augmentant ainsi la proportion des TAG dans la cellule. Dans ces conditions, la production de TAG pourrait servir de mécanisme de protection. Dans des conditions de croissance normale, l'ATP et le NADPH produits par la photosynthèse sont consommés en générant de la biomasse, avec éventuellement ADP et NADP<sup>+</sup> à nouveau disponibles comme accepteurs d'électrons lors de la photosynthèse. Lorsque la croissance et la prolifération cellulaires sont altérées en raison du manque de nutriments, la quantité du principal accepteur d'électrons de la photosynthèse, le NADP<sup>+</sup>, peut être diminué. Puisque la photosynthèse est principalement contrôlée par l'abondance de lumière et ne peut pas être complètement stoppée, le NADPH produit est consommé pour la biosynthèse des acides gras (TAG) et réapprovisionne ainsi la quantité de NADP<sup>+</sup> (Hu et al., 2008; Thompson Jr, 1996). Par exemple, lorsque la culture de diatomée *Stephanodiscus minutulus* a été cultivée avec des teneurs en silice, azote et phosphore faibles, une augmentation de l'accumulation de TAG et une diminution des lipides polaires ont été constatées (Lynn et al., 2000). Chez l'algue verte *Chlamydomonas moewusii*, une limitation en nutriments entraîne une diminution des teneurs en PUFA 16:3, 16:4 et 18:3 alors que les acides gras 16:1 et 18:1 sont augmentés (Arisz et al., 2000).

#### *vi. Contamination aux pesticides*

Une contamination des eaux par les pesticides peut induire une modification dans le profil des acides gras des diatomées (De Hoop et al., 2013; Filimonova et al., 2018; Gonçalves et al., 2017; Neves et al., 2015; Robert et al., 2007; Trenkamp et al., 2004). Robert et al. ont démontré en 2007 que la diatomée *Melosira moniliformis* exposée au métolachlore racémique, qui est un herbicide inhibiteur de l'élongation des acides gras et plus particulièrement des acides gras à très longues chaînes, montrait une diminution en acides gras saturés (14:0, 16:0 et 18:0) et en

acide gras essentiel EPA, tandis qu'une augmentation de l'acide gras monoinsaturé 16:1 et des acides gras polyinsaturés à 16 et 18 carbones ont été observés (Robert et al., 2007). De la même manière, une étude du profil d'acides gras de la diatomée marine *Thalassiosira weissflogii* a montré qu'une exposition au mélange commercial Primextra® (mélange de terbuthylazine et de métolachlore) induit une diminution des HUFA et notamment une diminution des acides gras essentiels (Filimonova et al., 2016b).



# 3. Les pesticides



## a) Définition

Un pesticide (de l'anglais "pest" signifiant nuisible et du latin "caedere" signifiant frapper, abattre, tuer) est une substance (ou mélange de substances) chimique ayant comme fonction de repousser, contrôler ou détruire tout organisme considéré comme nuisible (FAO, 2003).

Un pesticide est constitué d'une ou plusieurs substances actives (molécules qui sont recherchées dans l'environnement), d'adjuvants pour faciliter ou accélérer l'action toxique des substances actives sur les organismes ciblés et d'un diluant généralement inerte (Lipok et al., 2010).

Il existe deux grandes classifications de pesticides ; ces substances peuvent être regroupées par famille chimique ou par cible.

- 1) La classification en famille regroupe des composés ayant des groupements fonctionnels identiques. Il est alors possible de noter parmi les grandes familles chimiques les organophosphorés, les organochlorés, les carbamates et thiocarbamates et les pyréthroïdes de synthèse.
- 2) La classification par cible se présente en trois catégories principales : les herbicides, les fongicides et les insecticides. Il est possible de noter la présence d'autres catégories comme les rodenticides, les nématocides, les molluscicides ou les corvicides (Tableau 2).

Tableau 2 : Classes de pesticides et leurs cibles associées. Les classes soulignées représentent les trois catégories principales de pesticides retrouvées.

| Classe de pesticide        | Cible              |
|----------------------------|--------------------|
| <b><u>Herbicides</u></b>   | Mauvaises herbes   |
| <b><u>Fongicides</u></b>   | Champignons        |
| <b><u>Insecticides</u></b> | Insectes           |
| <b>Rodenticides</b>        | Rongeurs           |
| <b>Nématocides</b>         | Nématodes          |
| <b>Molluscicides</b>       | Limaces, escargots |
| <b>Corvicides</b>          | Corbeaux           |

### **b) Sources et état des lieux de la contamination aquatique en France**

En France, environ 95 % de la consommation en pesticides concernent des usages agricoles (d'après l'union des entreprises pour la protection des jardins et des espaces publics (UPJ)). Ainsi 5 % de la consommation en pesticides correspond à des usages non agricoles tels que l'entretien des espaces publics et de la voirie, le jardinage et les campagnes de lutttes contre les insectes nuisibles. Malgré ce faible pourcentage, ces derniers usages peuvent engendrer jusqu'à 50 % de la contamination aquatique en pesticides, du fait des taux de transfert plus élevés (surfaces urbaines imperméabilisées, transfert direct vers les eaux de surface, faible dégradation biologique).

Par exemple, Blanchoud et al. (2007) ont noté que malgré des quantités appliquées cent fois plus faibles les usages non agricoles sur le bassin versant de la Marne participaient de manière similaire aux usages agricoles à la contamination de la rivière en pesticides (Blanchoud et al., 2007).

Concernant les sources de pollution, il est possible de distinguer les contaminations ponctuelles et les contaminations diffuses.

- 1) Les contaminations ponctuelles sont majoritairement accidentelles ou dues à des « bonnes pratiques phytosanitaires » non respectées. Ces rejets peuvent se présenter de manière chronique mais sont de plus en plus rares et localisés grâce à la création de circuits de récupération des résidus de pesticides (Aubertot et al., 2007).
- 2) Les contaminations diffuses sont à l'origine de la pollution généralisée des eaux de surface. En effet, il est considéré que seulement 25 à 80 % des substances actives parviennent jusqu'à leur cible en raison notamment des pertes à l'épandage (Aubertot et al., 2007).

Depuis plusieurs années, un suivi de la contamination des cours d'eau en France est réalisé et démontre la présence de pesticides et notamment d'herbicides parmi ceux-ci et classant la France 2<sup>ème</sup> pays consommateur de pesticide avec 66 659 tonnes (en Europe et d'après des données de 2013 ; l'Espagne étant classé 1<sup>er</sup> pays consommateur avec 69 587 tonnes). Cependant, la France est classée au premier rang par la surface agricole utile (29 millions d'hectares) suivie de l'Espagne (24 millions d'hectares).

La surface agricole utile de la France est essentiellement exploitée pour la production de :

-  céréales,
-  de betteraves sucrières,
-  d'oléagineux,
-  de pommes de terre,
-  mais également par des vignes,
-  et arbres fruitiers (Ecophyto, 2015).

En 2014 les dix pesticides les plus quantifiés sont retrouvés dans 60 % des cours d'eau contaminés et se présentent tous comme des herbicides à savoir : l'AMPA (acide aminométhylphosphonique), la déséthyl atrazine, le glyphosate, le métolachlore, le 2-hydroxy atrazine, l'isoproturon, l'atrazine, le diflufénicanil, la DEDIA (déséthylidéisopropylatrazine) et la bentazone.

### **c) Facteurs de transfert des pesticides dans l'environnement aquatique**

Les facteurs présentés ci-dessous influencent le type de composés chimiques retrouvés dans le milieu aquatique ainsi que leurs concentrations.

- 1) Des propriétés intrinsèques des composés : leur caractère dégradable (temps de demi-vie) et leur caractère dispersif (processus de sorption/désorption, volatilité, caractère hydrophile) (Alix et al., 2005; Aubertot et al., 2007; Gao et al., 2012; Lundberg, 1995) ;
- 2) Du mode d'application : un composé dispersé par voie aérienne, sous forme de granulés ou de peinture (antifouling) est plus facilement susceptible de contaminer le milieu aquatique qu'un composé injecté (Aubertot et al., 2007; Van Der Werf, 1997) ;
- 3) Des conditions climatiques lors de l'application et après celle-ci : la présence de vent fort, de brouillard, de pluie, ou de très fortes températures augmente la dispersion des pesticides. Après l'application, les conditions météorologiques affectent le transport des composés chimiques dans l'environnement aquatique par des phénomènes de volatilisation, drainage, ruissellement, lessivage des sols, lixiviation, érosion des sols (Aubertot et al., 2007; Van Der Werf, 1997) ;
- 4) De la fragilité du milieu : la nature du sol (caractéristiques géologiques et pédologiques), sa pente, les systèmes de culture (Alix et al., 2005; Aubertot et al., 2007; Gao et al., 2012; Van Der Werf, 1997).

- 5) De la structuration du paysage : la présence de zones d'habitation, de zone tampons, de champs agricoles, de communautés urbaines, le type de cours d'eau concerné (Alix et al., 2005).

#### **d) Toxicité des pesticides**

Une fois dans l'environnement, les substances actives des pesticides sont dissociées des adjuvants, et peuvent présenter une toxicité moindre par rapport au produit en formulation commerciale (Lipok et al., 2010). Cependant, la toxicité des substances actives demeure et provoque des effets nocifs et indésirables sur les écosystèmes.

##### *i. Mode d'action des pesticides*

Les pesticides sont conçus pour provoquer des effets toxiques sur des organismes vivants cibles et suivant leurs catégories leurs effets ne sont pas similaires (Tableau 2). Les trois classes de pesticides les plus retrouvées sont les herbicides, les fongicides et les insecticides (Tableau 2). Les insecticides peuvent agir sur le système nerveux (neurotransmission), la respiration ou sur la mue. Les fongicides impactent la respiration, la biosynthèse (stéroïdes, ARN, mélanine), la croissance ou la perméabilité cellulaire. Enfin les herbicides réagissent sur la photosynthèse (photosystèmes I et II), sur la synthèse des lipides et des acides aminés, sur la division cellulaire ou sur la croissance.

Les substances actives interviennent donc sur des processus métaboliques fondamentaux, et leur potentiel toxique est effectif à la fois sur les espèces ciblées et sur les autres espèces présentes dans les écosystèmes contaminés par leur transfert (Fauvelle, 2012).

Les modes d'action des familles de pesticides les plus représentées sont décrits dans le Tableau 3.

## *ii. Impact des pesticides sur les écosystèmes*

Plusieurs études ont démontré la toxicité des pesticides sur la faune et sur la flore (Brakes and Smith, 2005; Moreby and Southway, 1999; Prosser and Hart, 2005; Wilson et al., 1999) ; les herbicides impactant directement la flore naturelle (Fletcher et al., 1993).

Par exemple, les biofilms des cours d'eau, notamment constitués de diatomées, peuvent être affectés par des contaminations en pesticides avec des impacts physiologiques structurels, tant au niveau individuel qu'à l'échelle de la communauté (Dorigo et al., 2007; Duong et al., 2008; Morin et al., 2010).

### **e) Caractéristiques et toxicité des pesticides sélectionnés pour cette étude**

Ces travaux de thèse s'intéressent à une contamination par deux herbicides : le diuron et le S-métolachlore, ayant des modes d'action différents et impactant des cibles cellulaires distinctes. La concentration testée est de  $10 \mu\text{g.L}^{-1}$ , soit une concentration relativement au-dessus de la concentration environnementale qui est de  $1 \mu\text{g.L}^{-1}$  (Coquillé et al., 2015; Moisset et al., 2015) mais du même ordre de grandeur que celles utilisées dans d'autres études écotoxicologiques (Coquillé et al., 2015; Debenest et al., 2009a; Moisset et al., 2015).

Les caractéristiques des deux pesticides sont présentées dans le Tableau 4.

Tableau 3 : Mode d'action des familles de pesticides les plus représentées. D'après Fauvelle (2012).

| Familles de pesticides    | Mode d'action  | Cible       | Exemples                     |
|---------------------------|--|-------------|------------------------------|
| <b>Organophosphorés</b>   | Blocage de l'acétylcholinestérase (perturbation de la transmission des impulsions nerveuses)   | Insecticide | Chlorpyrifos, Malathion      |
| <b>Organochlorés</b>      | Système nerveux impacté par la perturbation des impulsions nerveuses au niveau des synapses  |             | DDT, Chlordécone, Lindane    |
| <b>Carbamates</b>         | Système nerveux impacté de la même manière que les organophosphorés  |             | Aldicarbe, Carbofuran        |
| <b>Triazines</b>          | Inhibition du photosystème II (blocage du transport d'électrons et de l'énergie lumineuse)   | Herbicide   | Atrazine, Simazine           |
| <b>Phénylurées</b>        | Mode d'action comparable à celui des triazines   |             | Diuron, Isoproturon          |
| <b>Chloroacétanilides</b> | Inhibition des élongases : enzymes intervenant dans la synthèse lipidique (acides gras à très longue chaîne)                               |             | Métolachlore, Acétochlore    |
| <b>Aryloxyacides</b>      | Perturbation de la régulation de l'auxine AIA (acide indole 3-acétique), phytohormone indispensable à la croissance végétale.              |             | 2,4 D, Mécoprop, Dichlorprop |
| <b>Sulfonylurées</b>      | Impactent la synthèse des acides aminés ramifiés (valine, leucine, isoleucine) <i>via</i> l'inhibition de l'acétolactate synthétase (ALS). |             | Chlorsulfuron, Nicosulfuron  |

### *i. Diuron*

L'herbicide et algicide diuron (1-(3,4 dichlorophényl)-3,3diméthylurée) appartient à la famille des phénylurées et est interdit en usage agricole et biocide depuis 2008 (Directive biocide 98/8/CE et arrêté du 21/08/2008) mais toujours utilisé comme antimousse en traitement de façade (Coquillé, 2017).

Des études bibliographiques ont montré que les  $CE_{50}$  du diuron basées sur la croissance de la microalgue dulçaquicole *Raphidocelis subcapitata* étaient de  $0,7 \mu\text{g.L}^{-1}$  (Ma et al., 2006) à près de  $6,6 \mu\text{g.L}^{-1}$  (Okamura et al., 2003).

Cet herbicide inhibe la photosynthèse en agissant au niveau de l'appareil photosynthétique et particulièrement au niveau du photosystème II (PS II).

Le PS II est un des deux complexes protéines-cofacteurs présents au niveau de la membrane des thylakoïdes, le second étant le PS I (Mizusawa and Wada, 2012) ([Figure 12](#)). L'herbicide se lie à la protéine D1 du PSII, ce qui bloque le transfert d'électrons de la quinone A à la quinone B. L'inhibition du transport d'électrons peut en plus entraîner une formation d'espèces réactives de l'oxygène qui endommagent les pigments, les protéines et les lipides autour de l'appareil photosynthétique (Chalifour and Juneau, 2011; González-Barreiro et al., 2004).

Par exemple, une étude déterminant l'impact de cet herbicide à une concentration de  $10 \mu\text{g.L}^{-1}$  sur trois espèces de diatomées d'eau douce a montré une diminution d'environ 50 % du rendement quantique optimal du photosystème II (Moisset et al., 2015).

De plus, Troton et al. ont démontré en 1986 que le diuron diminuait la teneur des acides gras polyinsaturés par l'inhibition du processus de désaturation lors de la synthèse des acides gras (Troton et al., 1986).

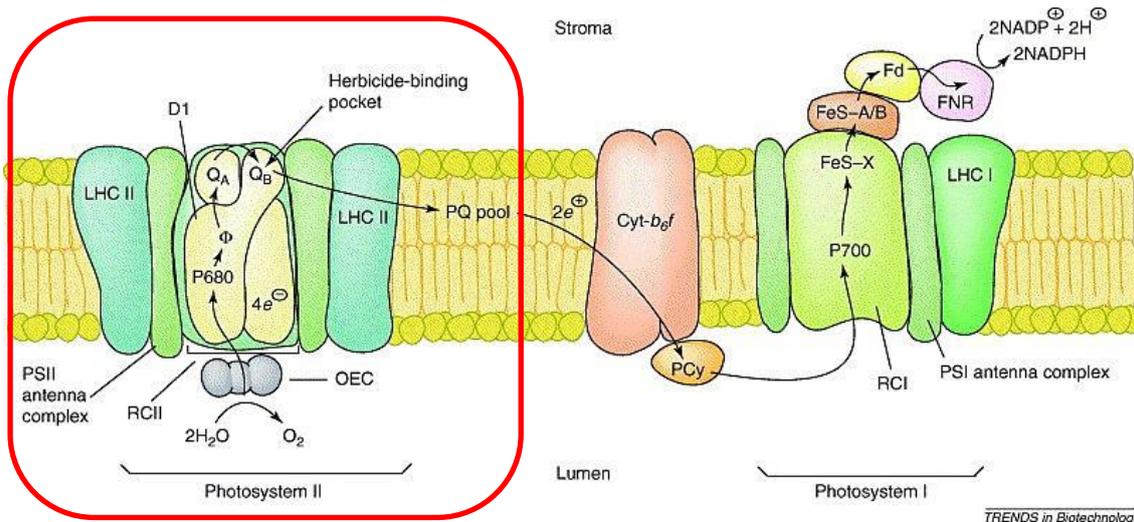


Figure 12 : Impact du diuron sur le photosystème II des organismes photosynthétiques. Issu de Giardi and Pace (2005).

*ii. S-métolachlore*

L'herbicide S-métolachlore (2-Chloro-N-(2-éthyl-6-méthylphényl)-N-[(1S)-2-méthoxy-1-méthyléthyl] acétamide) appartient quant à lui à la famille des chloroacétamides et est l'isomère du métolachlore autorisé sur le marché. La Figure 13 montre la structure des quatre énantiomères du métolachlore. Les énantiomères d'un même pesticide possèdent des propriétés physico-chimiques identiques mais peuvent se comporter différemment dans l'environnement (Lefrancq, 2014).

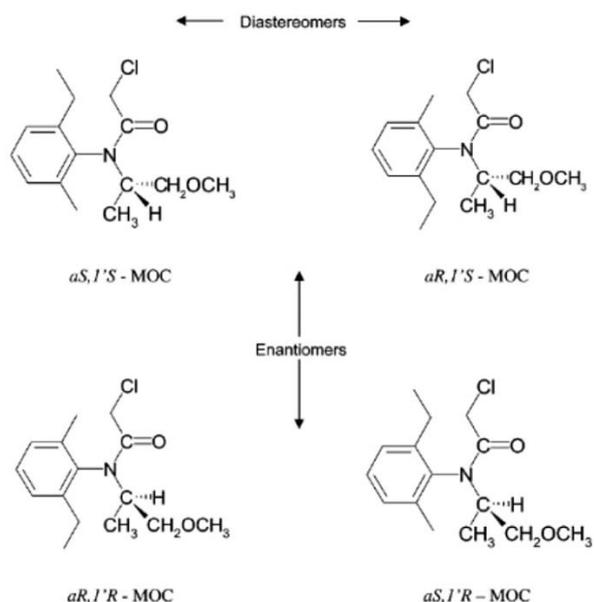
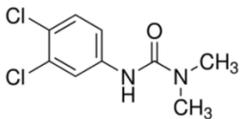
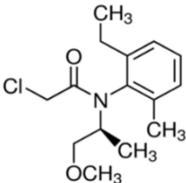


Figure 13 : Structures des quatre stéréoisomères du métolachlore. Par Kabler et Chen (2006).

La littérature a montré que la plage des  $CE_{50}$  du S-métolachlore basées sur la croissance des microalgues couvraient une gamme allant de  $68 \mu\text{g.L}^{-1}$  pour l'espèce dulçaquicole *Chlorella pyrenoidosa* (Liu and Xiong, 2009) à près de  $2300 \mu\text{g.L}^{-1}$  pour l'espèce *Scenedesmus vacuolatus* (Vallotton et al., 2008).

Cet herbicide est un inhibiteur de la synthèse des acides gras à très longues chaînes (Liu and Xiong, 2009) car il est capable de se lier aux élongases (Götz and Böger, 2004). Cette inhibition entraîne notamment un déséquilibre dans la composition des acides gras des lipides membranaires, engendrant une perte de la rigidité et de la perméabilité des parois de la membrane (Böger, 2003; Schmalfluss et al., 1998). Par exemple, comme cité précédemment, Robert et al. ont démontré en 2007 qu'une exposition au S-métolachlore diminuait la proportion d'acides gras à très longues chaînes, et notamment de l'EPA, chez *Melosira moniliformis*.

Tableau 4 : Caractéristiques des deux pesticides sélectionnés - T<sub>1/2</sub> correspond au temps de demi-vie de la molécule. LogK<sub>ow</sub> correspond au coefficient de partage octanol / eau de la molécule.

| Composé               | Famille          | Numéro CAS | Structure chimique  | Masse molaire (g.mol <sup>-1</sup> ) | Solubilité dans l'eau (mg.L <sup>-1</sup> ) | LogK <sub>ow</sub> | T <sub>1/2</sub> par hydrolyse dans l'eau stérilisée | T <sub>1/2</sub> par photolyse dans l'eau stérilisée | Références                         |
|-----------------------|------------------|------------|---|--------------------------------------|---|--------------------|--|--|------------------------------------|
| <b>Diuron</b>         | Phénylurées      | 330-54-1   |   | 233,1                                | 35  | 2,9                | Très stable  | 43 à 2180 jours                                      | (INERIS, 2007; Tetko et al., 2005) |
| <b>S-métolachlore</b> | Chloroacétamides | 51218-45-2 |  | 283,8                                | 530   | 3,4                | Très stable  | >30 jours  | (Rivard, 2003; Tetko et al., 2005) |

## **f) Biomarqueurs de toxicité des pesticides**

### *i. Qu'est-ce qu'un biomarqueur ?*

Dans le domaine de l'environnement, Lagadic et al. (1997) définissent un biomarqueur comme un changement observable et/ou mesurable au niveau moléculaire, biochimique, cellulaire, physiologique, et/ou comportemental qui révèle l'exposition présente ou passée d'un individu à au moins un polluant.

Cependant, la réponse du biomarqueur peut indiquer une variation du « statut normal » de l'organisme sans que l'organisme entier soit modifié (Van der Oost et al., 2003). En effet, en dessous d'une certaine pression toxique, les réponses biologiques utilisées comme biomarqueurs vont contribuer à maintenir l'homéostasie de l'organisme.

Lors d'une augmentation trop importante de la concentration de polluant ou de la durée d'exposition par exemple, des réactions sont mises en place par l'organisme afin de combattre et de limiter les effets toxiques des polluants. Ces réactions peuvent avoir comme finalité de dégrader ou de détoxifier la cellule et permettent de réduire l'effet toxique des contaminants. (Depledge, 1994).

Or, lorsque les concentrations de polluants sont trop élevées ou que l'exposition est trop longue, ces réactions ne suffisent plus à limiter les effets des toxiques, les capacités de défense de l'organisme étant dépassées. A ce stade, les effets des polluants pouvant être irréversibles, l'état de santé de l'organisme se dégrade de manière fatale à plus ou moins long terme, même lorsque l'exposition aux contaminants redevient nulle (Depledge, 1994; Lagadic et al., 1997).

De plus, la spécificité du biomarqueur pour certaines classes de polluants permet de révéler leur présence et leurs effets précoces sur les organismes (Amiard et al., 1998). Par exemple, les pesticides inhibiteurs du photosystème II tel que le diuron vont inhiber l'activité photosynthétique, ou bien, les inhibiteurs de la synthèse des acides gras à très longues chaînes,

tel que le S-métolachlore, vont diminuer les proportions d'acides gras PUFA ou HUFA dans la cellule.

Il est intéressant de noter par ailleurs que la surveillance de la pollution aquatique, par l'utilisation des biomarqueurs, peut s'effectuer à différents niveaux d'organisation, allant de l'individu jusqu'au niveau de la communauté (Lagadic et al., 1997)

## *ii. Exemples appliqués au diuron et au S-métolachlore*

De nombreuses études ont relevé la toxicité des pesticides sur les microalgues et notamment sur les diatomées de par l'utilisation de biomarqueurs.

La toxicité du diuron et du S-métolachlore a pu être observée, comme décrits dans le Tableau 5, à différents niveaux cellulaires tels que :

### 1) L'expression de gènes d'intérêt (seulement diuron) :

➔ Sous ou sur-expression de certains gènes d'intérêt face à une contamination au diuron.

### 2) La concentration en pigments (chlorophylle a, c et carotène par exemple) :

➔ Diminution de la concentration en pigments face à une contamination au diuron et au S-métolachlore.

### 3) L'activité photosynthétique :

➔ Diminution de l'activité photosynthétique après contamination par le diuron et le S-métolachlore.

### 4) La croissance :

➔ Diminution du taux de croissance après contamination au diuron et au S-métolachlore.

Ces biomarqueurs seront considérés comme « classiques » tout au long de ces travaux de thèse.

Tableau 5 : Précédentes recherches étudiant la réponse de biomarqueurs considérés ici comme « classiques » à différents niveaux cellulaires vis-à-vis de la toxicité du diuron et du S-métolachlore.

|                                  | Diuron  | S-métolachlore ou<br>Métolachlore               |
|----------------------------------|---|---|
| <b>Expression de gènes</b>       | Moisset et al. (2015)   | <i>non relevée</i>                              |
| <b>Concentration en pigments</b> | Ricart et al. (2009); Silkina et al. (2009)                       | Coquillé et al. (2015); Debenest et al. (2009b) |
| <b>Photosynthèse</b>             | Larras et al. (2013); Ricart et al. (2009); Silkina et al. (2009) | Coquillé et al. (2015)                          |
| <b>Croissance</b>                | Khanam et al. (2017); Silkina et al. (2009)                       | Coquillé et al. (2015); Debenest et al. (2009b) |

# 4. Objectifs de l'étude



Dans ce contexte, les hypothèses de ces travaux de thèse ont été les suivantes :

- 1) Les herbicides impactent les profils d'acides gras des diatomées d'eau douce notamment en augmentant la teneur en acides gras SFA et MUFA et en diminuant celle des PUFA et HUFA ;
- 2) Les réponses des différents descripteurs sont complémentaires ;
- 3) Les réponses des profils d'acides gras varient selon les espèces de diatomées étudiées avec et sans contamination ;
- 4) Les réponses des profils d'acides gras varient selon la température d'exposition avec et sans contamination ;
- 5) Les herbicides impactent les lipides des diatomées d'eau douce.

Ainsi les objectifs de ces travaux de thèse étaient :

- 1) D'évaluer la toxicité de deux pesticides (le diuron et le S-métolachlore), à des concentrations réalistes du point de vue environnemental, vis-à-vis des descripteurs dits « classiques » de deux espèces de diatomées d'eau douce en conditions non axéniques ;
- 2) D'évaluer dans quelle mesure ces deux pesticides influencent les profils d'acides gras de ces deux espèces de diatomées, ce descripteur étant encore très peu utilisé sur les diatomées d'eau douce ;
- 3) D'évaluer dans quelle mesure les différences interspécifiques impactent les profils d'acides gras et les descripteurs « classiques » en conditions de contamination ou non ;
- 4) D'étudier dans quelle mesure la température d'exposition impacte les profils d'acides gras en condition de contamination ou non ;
- 5) D'évaluer l'impact de ces deux pesticides sur les lipides d'une espèce de diatomée dans le but de déterminer plus en détails les fonctions touchées dans la cellule.

Pour répondre à ces objectifs de travail, la toxicité des deux pesticides a été étudiée vis-à-vis de deux espèces de diatomées d'eau douce, *Gomphonema gracile* et *Nitzschia palea*.

Les descripteurs dits « classiques » ont été analysés tels que l'inhibition de la croissance, de la photosynthèse, la concentration en chlorophylle *a* et caroténoïdes, l'induction et/ou la répression de gènes d'intérêt. Enfin, la réponse des profils d'acides gras des deux diatomées a été observée.

Dans le but de comprendre au mieux les effets biologiques notés, une caractérisation de l'environnement chimique a également été réalisée au travers de la mesure des concentrations en pesticides et celle en sels nutritifs.

---

## **Chapitre 2 – Matériels et méthodes**

---



# 1. Matériels biologiques



Deux espèces de diatomées dulçaquicoles ont été étudiées lors de ces travaux de thèse, *Gomphonema gracile* et *Nitzschia palea*. Ces espèces ont été choisies au vu de leur sensibilité différente face aux contaminations (parties suivantes).

Celles-ci, non axéniques, ont été cultivées en milieu Dauta stérile (Dauta, 1982) dans des erlenmeyer de 1 L (annexe 4) à deux températures différentes 17,5 °C et 20,5 °C. Les deux températures ont été sélectionnées vis-à-vis de précédentes études réalisées au laboratoire et des *préférences* thermiques de ces espèces.

Une armoire de culture thermostatées (610 XAP, LMS LTD®, UK) a été employée pour la température de 17,5 °C, sous une intensité lumineuse de consigne de 45  $\mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$  avec un cycle jour : nuit de 16h : 8h.

Concernant la culture à 20,5 °C, celle-ci a été réalisée dans une salle climatisée sous un dispositif composé de néon de manière à obtenir une photopériode et une intensité lumineuse identiques à celles retrouvées dans les armoires de cultures.

Chaque semaine, les cultures ont été renouvelées avec un nouveau milieu stérile Dauta dans le but de maintenir les diatomées dans une phase de croissance exponentielle.

Les travaux présentés dans les chapitres de résultats de la thèse concernent les expériences réalisées à une température de 20.5 °C mais les résultats obtenus à partir des manipulations faites à une température de 17.5 °C seront discutés dans la partie perspectives de ce manuscrit.

### **a) *Gomphonema gracile Ehrenberg, 1838***

*Gomphonema gracile* (GGRA) est une diatomée benthique pennée de la famille des Gomphonematacées. Celle-ci possède des valves striées et hétéropolaires et avec un stigma dans l'aire centrale. Les valves ont une longueur de 20 à 80  $\mu\text{m}$  et une largeur de 4,5 à 9  $\mu\text{m}$  (Reichardt, 2015). GGRA peut être mobile ou fixée au substrat par un pédoncule et vivre seule ou regroupée au sein d'une matrice, préférant les eaux légèrement acides.

GGRA est retrouvée dans diverses zones du monde (Germain, 1981; Verma and Nautiyal, 2016; Villeneuve and Pienitz, 1998) et est considérée comme **très sensible à différents types de pollution** (selon son profil écologique dans l'IBD, Coste et al., 2009).

La souche de GGRA étudiée a été isolée en décembre 2013 à partir d'un échantillon de terrain (prélevé en amont de la rivière Leyre, principal affluent du bassin d'Arcachon (sud-ouest de la France)) par micromanipulation au microscope inversé (Coquillé et al., 2015).

### **b) *Nitzschia palea* (Kützing) Smith, 1856**

*Nitzschia palea* (NPAL) est une diatomée benthique pennée de la famille des Bacillariaceae. Les valves de cette diatomée ont une largeur de 2,8 à 4,5  $\mu\text{m}$  et une longueur de 12 à 43  $\mu\text{m}$ . Son raphé est situé sur l'extrémité valvaire et n'est pas observable directement par microscopie optique. La densité de stries est de 32 à 47/10  $\mu\text{m}$  (Trobajo et al., 2009).

NPAL est fréquemment retrouvée et est décrite comme **relativement tolérante aux pesticides** (Kim Tiam et al., 2014; Larras et al., 2012; Moisset et al., 2015).

La souche lotique d'eau douce utilisée dans cette expérience a été fournie par la collection de cultures de l'INRA de Thonon (numéro de référence de la souche TCC583).

# 2. Préparation des solutions de pesticides et conditions générales d'exposition



### **a) Préparation des solutions de pesticides**

Pour chaque pesticide, une solution mère de  $1 \text{ mg.L}^{-1}$  a été préparée à partir d'eau Milli-Q ultrapure.

Le S-métolachlore se présente sous forme de liquide d'une pureté de 98 % et le diuron sous forme de poudre d'une pureté de 98,8 %. Ces deux pesticides ont été achetés chez le fournisseur CIL.

La solubilité dans l'eau du diuron étant faible,  $42 \text{ mg.L}^{-1}$  à  $25 \text{ °C}$ , la solution a été passée aux ultrasons puis chauffée dans le but de solubiliser la poudre dans l'eau. La solubilité du S-métolachlore dans l'eau étant de  $490 \text{ mg.L}^{-1}$  à  $25 \text{ °C}$ , cette solution a été préparée de manière ordinaire en diluant le pesticide dans de l'eau Milli-Q ultrapure.

Les solutions ont été préparées la veille de chaque manipulation.

### **b) Conditions générales d'exposition**

Trois expériences indépendantes ont été réalisées à  $20,5 \text{ °C}$ .

La durée des expérimentations était de sept jours pour les deux espèces de diatomées, GGRA et NPAL. Celles-ci ont été réalisées dans des ballons en verre borosilicaté ( $V = 100 \text{ mL}$ ) préalablement calcinés à  $450 \text{ °C}$  pendant 4 heures. Pour l'ensemble des expériences, le volume expérimental était de  $80 \text{ mL}$ . Pour chaque expérience, l'impact du diuron et du S-métolachlore vis-à-vis des deux espèces de diatomées à une concentration de  $10 \text{ } \mu\text{g.L}^{-1}$  a été observé.

Pour ce faire, une semaine avant la contamination, les ballons ont été inoculés avec  $40 \text{ mL}$  de culture mère de diatomées en phase de croissance exponentielle et  $40 \text{ mL}$  de milieu Dauta. Cette étape a permis l'adaptation durant une semaine des diatomées dans les ballons écartant ainsi l'effet contenant.

Après une semaine d'adaptation, la contamination a été réalisée. Les ballons ont été inoculés à  $300\,000\text{ cell.mL}^{-1}$  pour les trois manipulations. Ceux-ci ont été inoculés avec les cultures adaptées aux ballons et du milieu de culture Dauta ( $V_{\text{exp}} = 80\text{ mL}$ ).

Trois traitements (chaque traitement était répliqué quatre fois) ont été employés pour les deux espèces de diatomées cultivées de manière indépendante :

- 1) Les traitements témoins avec l'absence de pesticide ;
- 2) Les traitements diuron à une concentration nominale de  $10\ \mu\text{g.L}^{-1}$  ;
- 3) Les traitements S-métolachlore à une concentration nominale de  $10\ \mu\text{g.L}^{-1}$ .

Pour les deux premières expériences, quatre ballons supplémentaires ont été utilisés pour l'analyse à T0 de la concentration en sels nutritifs, de la concentration en pigments et de celle des profils d'acides gras.

Au cours des trois expérimentations, des prélèvements ont été effectués pour les analyses biologiques et chimiques.

Les paramètres chimiques suivis ont été les suivants :

- 1) les concentrations en sels nutritifs (nitrates, orthophosphates et silicates), mesurées le premier jour (T0) (sur un ballon supplémentaire pour les manipulations 1 et 2) et le dernier jour (T7) sur l'ensemble des traitements de chaque condition et de chaque espèce ;
- 2) les concentrations en pesticides, mesurées au début (T0), le premier jour (T1), le troisième jour (T3) et le dernier jour (T7) des expérimentations.

Les paramètres biologiques suivis ont été les suivants :

- 1) la croissance des microalgues, évaluée grâce à la mesure de la concentration cellulaire effectuée tous les jours ;
- 2) l'efficacité photosynthétique réelle, mesurée tous les jours ouvrés ;

- 3) la concentration en chlorophylle *a* et en caroténoïdes effectuée (sur le ballon supplémentaire pour les manipulations 1 et 2) au début (T0) et à la fin (T7) sur l'ensemble des traitements de chaque condition et de chaque espèce ;
- 4) la répression et/ou l'induction de gènes d'intérêt effectuée à la fin (T7) de l'expérimentation ;
- 5) l'analyse des profils d'acides gras effectuée au début (T0) (sur le ballon supplémentaire pour les manipulations 1 et 2) et à la fin (T7) sur l'ensemble des traitements de chaque condition et de chaque espèce.

L'analyse des lipides et des acides gras, pendant la 3ème expérience, a été réalisée à T0, T3 et T7 sur l'ensemble des traitements de chaque condition.

Le détail des analyses réalisées est décrit dans les parties suivantes.



# 3. Paramètres chimiques



## **a) Sels nutritifs**

L'analyse des nutriments a été réalisée au début (T0) et à la fin (T7) de chaque manipulation.

### *i. Nitrates et phosphates*

L'analyse des nitrates et des phosphates a été réalisée à partir de 15 mL d'échantillon filtré et dilué deux fois avec de l'eau ultra pure avant injection (100 µL). L'analyse a été effectuée par chromatographie ionique avec suppression chimique (COMPACT 881 IC Pro, Metrohm, Suisse) et avec un détecteur de conductivité Metrohm 850 IC. La séparation a été exécutée avec une pré-colonne Metrosep A Supp 4/5 Guard/4.0 suivie d'une colonne échangeuse d'anions Metrosep A sup 5 - 250/4.0. L'éluant était une solution de 3,2 mM Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> et 1 mM NaHCO<sub>3</sub>, et la suppression chimique était une solution de 10 mM H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>.

### *ii. Silicates*

L'analyse des silicates a été effectuée sur 20 mL d'échantillon. Les concentrations en silicates solubles ont été déterminées par colorimétrie à l'aide d'un spectrophotomètre Shimadzu UV-1800 (Shimadzu Inc., Kyoto, Japon) en suivant la norme française NF T90-007 (AFNOR, 2001).

## **b) Dosage des pesticides**

L'échantillonnage de l'eau a été effectué au début (T0), à un jour (T1), à trois jours (T3) et à la fin (T7) de chaque manipulation.

Un millilitre et demi d'eau a été prélevé pour l'analyse de la concentration en S-métolachlore et en diuron dans l'eau dans le but de déterminer la concentration réelle d'exposition des diatomées aux pesticides. Les échantillons ont été filtrés à l'aide de seringues composées de filtres en cellulose régénérée (Spartan® diamètre 13 mm, taille des pores 0,45 µm, Whatman®)

avant de les stocker à -20 °C jusqu'à l'analyse par chromatographie liquide couplée à un spectromètre de masse en tandem (HPLC-ESI-MS/MS).

Pour le dosage, les échantillons ont été décongelés puis pré-concentrés deux fois (évaporation de 1 mL à l'aide d'un système RapidVap puis dilution des résidus dans un mélange d'eau ultrapure et acétonitrile 90/10 (v/v)) avant l'analyse par chromatographie. L'analyse chromatographique a été réalisée avec une colonne Gemini-NX C18 3 µm, 110 Å, 100 mm × 2 mm équipée d'une SecurityGuard de Phenomenex (Le Pecq, France) et d'une chaîne HPLC Ultimate 3000 (DIONEX, Voisins-le-Bretonneux, France). La quantification des pesticides est faite par un spectromètre de masse à triple quadripôle API 2000 (AB SCIEX, Les Ulis, France). Le volume d'injection était de 50 µL. Les deux éluants étaient l'acétonitrile et une solution d'eau ultrapure et d'acétate d'ammonium à 5 mM avec un débit constant de 400 µLmin<sup>-1</sup>.

# 4. Paramètres biologiques



## a) Evaluation de la croissance des diatomées

L'estimation de la concentration cellulaire des diatomées a été réalisée quotidiennement. La mesure de la concentration en chlorophylle *a* et en caroténoïdes a été réalisée au début (T0) et à la fin (T7) de chaque manipulation.

### i. Concentration cellulaire des diatomées

Le taux de croissance a été déterminé par le comptage sous microscope des diatomées sur une cellule de Nageotte (Marienfield, Allemagne). Quotidiennement, 1 mL de chaque échantillon a été fixé dans du Lugol (4 %) puis stocké à 4 °C et à l'obscurité de manière à pouvoir réaliser le comptage ultérieurement. Les échantillons ont été passés au vortex puis homogénéisés par pipetages successifs et éventuellement dilués au besoin selon leur concentration. Un aliquote de 125 µL a été déposé au centre de la cellule de comptage puis a été recouvert par une lamelle planée.

Le nombre de cellules a été déterminé dans 10 champs de la zone quadrillée (1,25 µL chacune, 0,5 mm de profondeur). La distinction entre les cellules vivantes et mortes a été estimée par observation de la turgescence et de la couleur des chloroplastes (Morin et al., 2010).

La concentration cellulaire a été exprimée en individus par millilitre et a été calculée suivant la formule suivante :

$$N = (A \times B) / (10 \times 1,25 \cdot 10^{-3})$$

N = densité moyenne en cellules par mL

A = nombre de cellules dénombrées dans 10 champs

B = facteur de dilution

10 = nombre de champs comptés

$1,25 \cdot 10^{-3}$  = volume d'un champ en mL

## *ii. Concentration en chlorophylle a et caroténoïdes*

Les concentrations en chlorophylle *a* et en caroténoïdes ont été effectuées à T0 et T7 de l'expérience.

Un aliquot de 20 mL (T0) et d'environ 10 mL (T7) de chaque échantillon a été filtré à l'aide de filtres Whatman® GF/C et congelés à -20 °C jusqu'à l'analyse.

Les échantillons ont été décongelés à la température ambiante avant d'ajouter 10 mL d'acétone à 80 % (v/v). Chaque tube a été enveloppé d'aluminium (pour maintenir les extraits à l'obscurité) et agité manuellement. Les tubes ont été placés dans un béccher contenant de l'eau (pour assurer la stabilité) et soumis à une sonication pendant 20 minutes avant d'être placés dix minutes dans le noir. Chaque échantillon a été filtré sur un filtre Whatman® GF/C et les filtres ont été récupérés dans le cône du système de filtration. Les tubes ont été rincés avec de l'acétone à 80 % et les filtres ont été pressés. Les filtrats ont été recueillis dans le tube initial et le volume final a été noté (tube gradué).

Les concentrations de chlorophylle *a* ont été déterminées à l'aide d'un spectrophotomètre Shimadzu UV-1800 (Shimadzu Inc., Kyoto, Japon). Les mesures d'absorbance ont été effectuées aux longueurs d'onde suivantes : 470 nm, 663,2 nm et 648,8 nm. Les concentrations en chlorophylle *a* et en caroténoïdes ont été calculées à l'aide des équations de Lichtenthaler and Wellburn (1983) exprimées en milligrammes par litre (mg.L<sup>-1</sup>).

Les concentrations en chlorophylle *a* et en caroténoïdes ont été calculées suivant les équations suivantes :

$$Ca = 12,21A_{663} - 2,81A_{646}$$

$$Cc = 1000A_{470} - 3,27Ca - (104 * 20,13A_{646} - 5,03A_{663}) / 229$$

Avec :

- Ca : concentration en chlorophylle *a*
- Cc : concentration en caroténoïdes

## **b) Analyses fonctionnelles**

L'analyse de la fluorescence chlorophyllienne en lumière modulée a été réalisée quotidiennement (jours ouvrés). Celle de la répression et/ou induction de gènes d'intérêt a été réalisée à la fin (T7) de chaque manipulation.

### *i. Fluorescence chlorophyllienne en lumière modulée*

Comme il a été décrit dans les parties précédentes, les diatomées sont des organismes photosynthétiques transformant l'énergie lumineuse en énergie chimique dans le but de synthétiser leur propre matière organique. Cependant, la lumière absorbée par l'appareil photosynthétique n'est pas totalement transformée en énergie chimique. Celle-ci peut être dissipée sous forme de chaleur ou réémise sous forme de fluorescence. Le transfert d'énergie d'une molécule de chlorophylle excitée à une autre molécule de chlorophylle s'effectue en  $10^{11}$  secondes. Les phénomènes conduisant à la dissipation de l'énergie sous forme de chaleur ou de fluorescence se réalisent en  $10^{-9}$  secondes. Ainsi, le phénomène le plus plausible est celui du transfert de l'excitation à une autre molécule de chlorophylle (Schreiber, 2004).

Le flux lumineux émis par fluorescence est dépendant de la lumière absorbée par le PSII rendant difficile les mesures dans le cas où la luminosité varie. Dans le but de pallier ce problème, une lumière modulée est employée : l'application d'une lumière modulée provoque l'émission d'une fluorescence modulée. La lumière modulée est produite par une diode et filtrée pour ôter les longueurs d'onde au-dessus de 680 nm, de ce fait seule la fluorescence modulée avec les mêmes caractéristiques est amplifiée (Schreiber, 2004) (Figure 14).

Le rendement quantique de la photochimie du photosystème II, qui représente la probabilité pour qu'une excitation induite par un photon se désactive par la voie photochimique, est mesuré par un fluorimètre.

Différents rendements quantiques peuvent être mesurés à l'aide de ce système dont le rendement quantique efficace de la photochimie du PSII ( $\Phi$  PSII) si les mesures sont réalisées sous la lumière (Kim-Tiam, 2013).

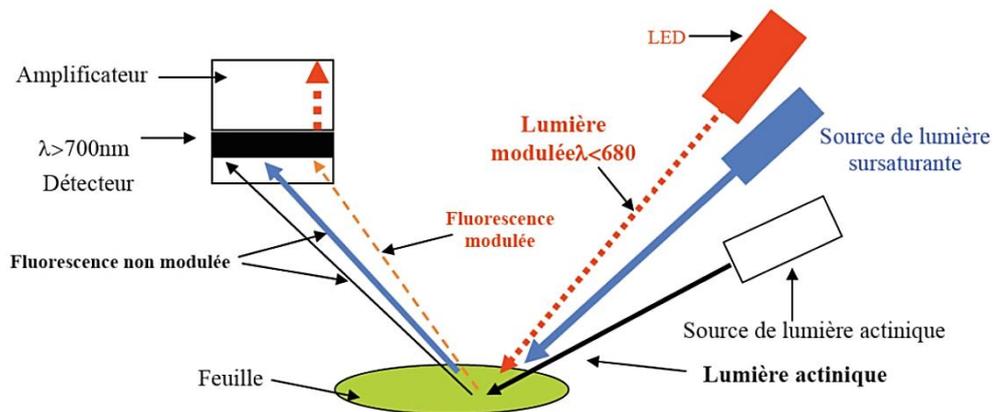


Figure 14 : Schéma de la technique de mesure de l'émission de la fluorescence modulée de la chlorophylle d'une feuille. (Cornic, 2007).

#### Le rendement quantique efficace du PSII ( $\Phi$ PSII) :

La lumière actinique (LA) active les processus photochimiques de l'échantillon. Après plusieurs minutes d'acclimatation à cette lumière un équilibre s'établit entre le nombre de centres réactionnels ouverts et fermés. Si un flash de lumière sursaturante est appliqué, les centres réactionnels ouverts se ferment :  $F_t$  et  $F_m'$  sont alors mesurés et correspondent respectivement à l'émission de fluorescence juste avant et pendant l'application du flash lumineux.

Le rendement quantique efficace de la photochimie du PSII ( $\Phi$  PSII) est calculé à l'aide de la formule suivante :

$$\Phi \text{ PSII} = (F_m' - F_t) / F_m'$$

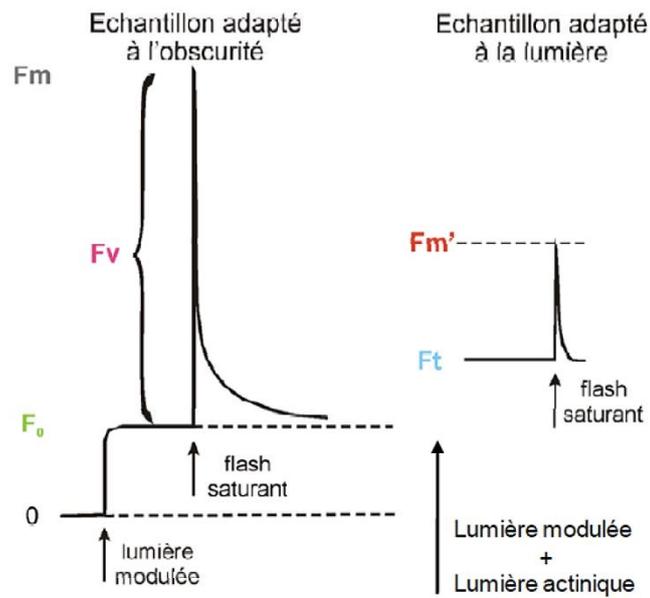


Figure 15 : Principe de la technique de mesure de la fluorescence chlorophyllienne en lumière modulée. (Géavert, 2001).

Pour cette étude, le  $\Phi$ PSII de chaque traitement a été mesuré à l'aide d'un PHYTO-PAM avec une unité émetteur-détecteur (PHYTO-ED) (Heinz Walz GmbH, Allemagne). Les mesures ont été réalisées sur 2 mL d'échantillon dans une cuve en quartz d'un centimètre de largeur. Cinq mesures ont été réalisées pour chaque traitement et chaque réplicat.

## ii. Analyse transcriptomique

Le protocole suivant a été réalisé à T7 de chaque manipulation et était basé sur celui de (Moisset et al., 2015).

Quatre millilitres ont été prélevés puis centrifugés à 1 500 g pendant 5 min dans le but de retirer entièrement le milieu de culture. Deux cent microlitres de tampon RNA later ont été ajoutés au culot dans le but d'écartier la dégradation de l'ARN dans le temps. Les échantillons ont été placés une nuit à 4 °C puis à -80 °C jusqu'à l'analyse génétique.

### Extraction des ARNs totaux

Les échantillons de diatomées ont été décongelés à température ambiante quelques minutes, centrifugés à 1 500 g pendant 5 min et le surnageant a été ôté.

Le culot de cellules de diatomées a été remis en suspension dans 1 mL de Trizol (Invitrogen). Trois cents microlitres de billes de verre (2,5 µm de diamètre, Sartorius AG) ont été ajoutés aux échantillons. Les diatomées ont été broyées par passage dans un appareil MPFastPrep (40 s à 6 m.s<sup>-1</sup>). Le surnageant a été placé dans un bain-marie à 37 °C pendant 5 min. Deux cents microlitres de chloroforme RECTAPUR (VWR) ont été ajoutés et l'échantillon a été vortexé pendant 10 s. Après homogénéisation, l'échantillon a été placé dans un bain-marie à 37 °C pendant 2 min. Après une centrifugation de 5min à température ambiante et à 8 000 g, la phase aqueuse, contenant les acides nucléiques, a été transféré dans des tubes propres.

Selon les instructions du fabricant du kit Absolutely RNA Miniprep (Stratagene), 550 µL d'éthanol à 75 % ont été ajoutés à la phase aqueuse ; l'échantillon a été mélangé et transféré sur des colonnes d'affinité. L'échantillon a été centrifugé pendant 1 min à température ambiante à 8 000 g. Une fois les filtrats éliminés, 600 µL de tampon de lavage à faible teneur en sel ont été placés sur la colonne et centrifugés pendant 2 min à température ambiante à 8 000 g. Afin d'éliminer toute trace d'ADN génomique, la colonne a été placée dans un bain-marie à 37 °C pendant 15 min après l'addition d'un mélange contenant 5 µL de DNase I [1 U], 5 µL de MgCL<sub>2</sub> [25 mM] et 40 µL de tampon d'activité (Yellow core buffer). Après l'ajout de 600 µL de tampon de lavage à forte teneur en sel, la colonne a été centrifugée pendant 1 minute à 8 000 g. Enfin, 300 µL de tampon de lavage à faible teneur en sel ont été ajoutés à la colonne qui a alors été centrifugée pendant 2 min à 8 000 g. Les colonnes ont été transférées dans des tubes propres. Afin de récupérer les ARNs totaux, 30 µL de tampon d'élution à 60 °C ont été ajoutés aux tubes. Les tubes ont été centrifugés pendant 1min à température ambiante à 8 000 g.

La quantité et la qualité de l'ARN obtenu après purification ont été évaluées par la mesure de l'absorbance à 260 nm et 280 nm par un spectromètre d'absorption. Le rapport de 260/280 rendant compte de la qualité de l'extraction (Lauritano et al., 2015) devait être supérieur à 1,8 pour une purification correcte.

Le schéma du protocole simplifié des étapes suivantes est représenté sur la Figure 16.

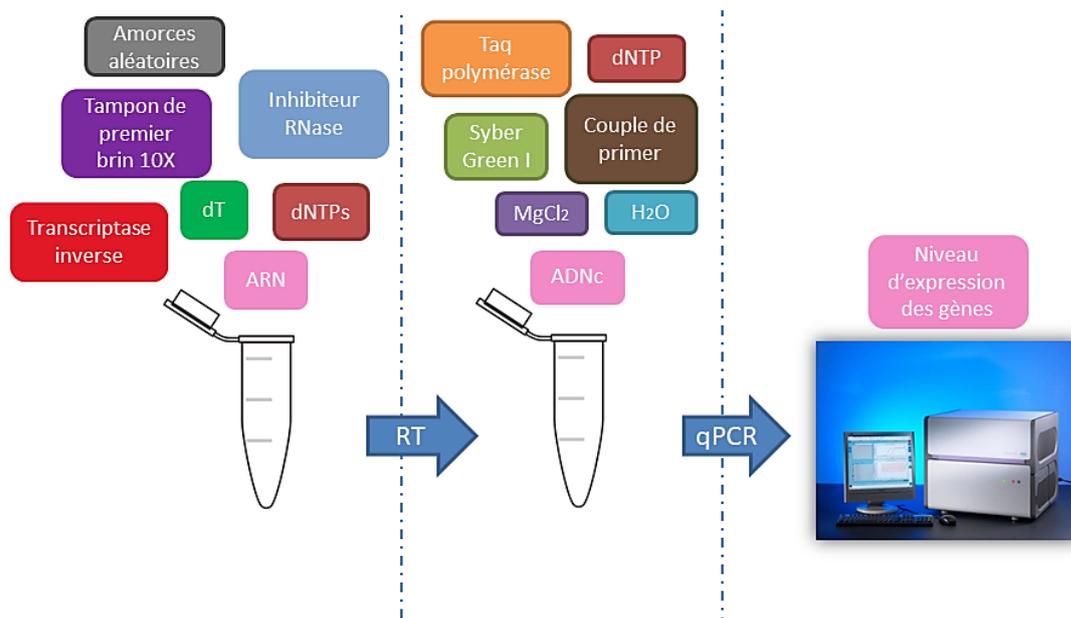


Figure 16 : Schéma du protocole simplifié de la RT-PCR employé dans cette étude.

### Transcription inverse de l'ARN (en anglais = RT : Reverse Transcriptase)

La synthèse de l'ADN complémentaire (ADNc) a été réalisée à partir de 14µL d'ARNs totaux [environ 1 µg] en utilisant le kit Stratascript first strand synthesis system (Agilent).

Aux 14 µL d'ARNs totaux, ont été ajoutés 1µL d'oligo (dT) [1 µM], 1 µL d'hexaprimier [1 µM], 0,8 µL de dNTPs [10 mM] et 2 µL de tampon d'activité 10X. Après incubation pendant 5 min à 65 °C dans un thermocycleur (Eppendorf Mastercycler), 1 µL de transcriptase inverse StrataScript [1U.µL<sup>-1</sup>] et 0,5 µL d'inhibiteur de RNase [0,5U] ont été ajoutés et incubés à 42 °C pendant 1 heure dans un Eppendorf Mastercycler.

Le mélange d'ADNc a été conservé à -20 °C jusqu'à leur utilisation en PCR quantitative.

La Figure 17 schématise simplement le principe de la réaction de transcription inverse.

### PCR quantitative (q-PCR) en temps réel

La RT-PCR est une technique qui est utilisée pour quantifier l'expression génique. Il existe deux types de PCR quantitative :

- 1) la **quantification absolue**, quantifiant l'expression des gènes d'intérêts *via* une courbe étalon ;
- 2) et la **quantification relative**, utilisée dans cette étude, comparant leur expression à celle de gènes de référence (Livak and Schmittgen, 2001).

Pour chaque gène, un couple de primers spécifiques et utilisable en q-RT-PCR a été déterminé à l'aide du logiciel LightCycler probe design (Tableau 6).

Chaque mélange réactionnel (20  $\mu$ L) était composé de 1  $\mu$ L de tampon d'activité (Syber Green I (Roche), Taq Polymerase, dNTP), 2  $\mu$ L du couple de primers spécifiques de chaque gène à une concentration finale de 300 nM, 3,2  $\mu$ L de MgCl<sub>2</sub> [25mM], 1  $\mu$ L d'ADNc et 12,8  $\mu$ L d'eau traitée au diéthyl pyrocarbonate (DEPC). La PCR en temps réel a été réalisée avec un LightCycler (Roche) avec 1 cycle à 95 °C pendant 1 min et 50 cycles d'amplification à 95 °C pendant 5 s, 60 °C pendant 5s et 72 °C pendant 20 s.

La spécificité de chaque réaction a été déterminée par une analyse de la courbe de dissociation du produit de la PCR. Cette courbe a été obtenue en suivant le niveau de fluorescence du Syber Green pendant un chauffage progressif des produits de la PCR de 60 °C à 95 °C.

La normalisation de la quantification relative du niveau d'expression de chaque gène a été réalisée suivant l'expression de 2 gènes de référence ; la  $\beta$ -actine ( $\beta$ -act) et celui codant pour la protéine ribosomale L7 (RPL7) (Tableau 6). L'expression relative des gènes étudiés a été déterminé à l'aide de la méthode du  $2^{-\Delta\Delta CT}$  (Livak and Schmittgen, 2001).

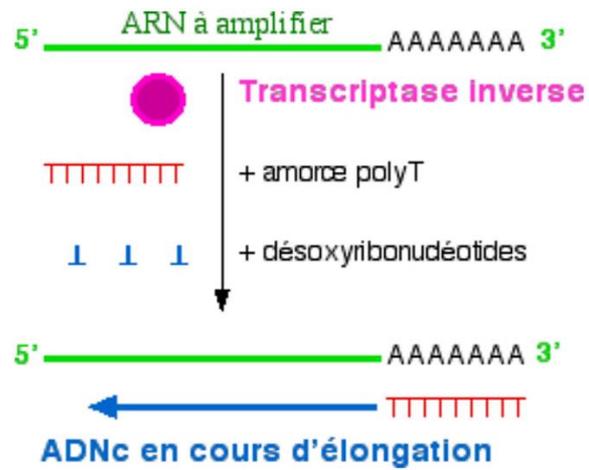


Figure 17 : Schéma simplifié de la réaction de transcription inverse (RT).

Source : [http://www.ens-lyon.fr/RELIE/PCR/ressources/apects\\_techniques/rtpcr/rtpcr02.htm](http://www.ens-lyon.fr/RELIE/PCR/ressources/apects_techniques/rtpcr/rtpcr02.htm)

**Tableau 6 :** Numéros d'accèsion et couples de primers spécifiques aux 10 gènes de GGRA et NPAL utilisés dans ces travaux de thèse. Abréviations : <sup>a</sup>Amorce sens. <sup>b</sup>Amorce anti-sens.

| Nom du gène<br>(Abréviations)                          | Numéro<br>d'accèsion | Primer (5' – 3')  | Fonction                     |
|--|----------------------|---|------------------------------|
| β-actine<br>(β-act)                                    | HM<br>449707         | CGACAGGACGGCCTGGATG<br>TT <sup>a</sup><br>CCAACCGCGAGCGCATGAC<br>G <sup>b</sup>         | Gènes de<br>référence        |
| Protéine ribosomale<br>L7<br>(RPL7)                    | CM<br>000639         | ATTTTCAAGCGCGCGGGAG<br>AAGTA <sup>a</sup><br>CGTAGCCGCGCTTGTAGATG<br>AGCTC <sup>b</sup> |                              |
| Sous-unité 1 de la<br>cytochrome C oxydase<br>(cox1)   | HM 449704            | CAGTAATTCTCACTGCCAG<br>C <sup>a</sup><br>CCGTGTACCCACCGTTG <sup>b</sup>                 | Métabolisme<br>mitochondrial |
| ARN ribosomal<br>mitochondrial 12S<br>(12S)            | HM 449710            | CGCGGTAATACGGAGGATG<br>C <sup>a</sup><br>AGTGCCCTTCGCCATCGG <sup>b</sup>                |                              |
| Sous-unité 5 de la<br>NADH<br>déshydrogénase<br>(nad5) | HM 449708            | TCAACTTGGTTTGCATACAT<br>GGC <sup>a</sup><br>TTGAACTAATCCTGTTGTGG<br>AAGC <sup>b</sup>   |                              |
| Protéine D1<br>(d1)                                    | HM 449711            | ACCACCAAATACACCAGCA<br>AC <sup>a</sup><br>GCGTCCTTGGATTTTCGTAG<br>C <sup>b</sup>        |                              |
| Protéine psaA<br>(psaA)                                | HM 449705            | CATAAAGCGGCACCCAAAC <sup>a</sup><br>CTTGGATATAACTGACTCAT<br>TAACTCAGG <sup>b</sup>      | Activité<br>photosynthétique |
| Catalase<br>(cat)                                      | XM<br>002182918      | GTTGATGATTCGGTTGGCTT<br>GGC <sup>a</sup><br>AGTTGAGAGGTGCAAGACG<br>GATG <sup>b</sup>    | Réponse au stress<br>oxydant |
| Glutathion peroxidase<br>(gpx)                         | NC<br>011678         | CAAAGGCGACGTGCTATGC<br>GTC <sup>a</sup><br>GGCTCCTGAGCTCCAAACTG<br>ATT <sup>b</sup>     |                              |
| Protéine silaffin-1<br>(sil1)                          | XM<br>002286881      | CCGTCACCCCTCCTGAAAC <sup>a</sup><br>ATGGGAGCAGCGGTAATGG <sup>b</sup>                    | Frustule                     |

## **c) Analyse des profils lipidiques et des acides gras des diatomées**

### *i. Protocole de l'analyse des profils lipidiques*

Le protocole suivant a été réalisé à T1, T3 et T7 pour l'expérience concernant le chapitre 5.

Des cellules de 30 mL de milieu de culture ont été récoltées par centrifugation puis les lipides ont été extraits selon la méthode décrite par Bligh and Dyer (1959). Deux millilitres de chloroforme/méthanol (2:1, v/v) ont été ajoutés et les échantillons ont été stockés à 4 °C jusqu'à leur analyse.

Cinq cents microlitres d'eau ont ensuite été ajoutés à chaque échantillon. Ils ont été vortexés et centrifugés pendant 10 min à 3 800 tr.min<sup>-1</sup>. Après centrifugation la phase organique a été récupérée et transférée dans un tube propre. Les lipides restants de la phase aqueuse ont été extraits en ajoutant à nouveau deux millilitres de chloroforme et en agitant. Après centrifugation pendant 10 min à 3 800 tr.min<sup>-1</sup>, les phases organiques ont ensuite été regroupées et évaporées à sec sous courant d'azote. Les lipides ont ensuite été remis en suspension dans 70 µL de chloroforme/méthanol (2:1, v/v) puis ont été vortexés avant d'être conservés à -20 °C jusqu'à l'analyse.

Les lipides ont ensuite été purifiés par chromatographie en couche mince unidimensionnelle sur des plaques de gel de silice préalablement nettoyées avec du chloroforme (VWR, 10x10 cm) en utilisant du chloroforme/n-propanol/acétate de méthyle/méthanol/0,25 % de KCl aqueux (10:10:10:4:1,6) comme solvant. Un développement unidimensionnel de routine a été effectué avec une chambre de développement automatique (ADC2, CAMAG) sous une humidité contrôlée de 33 %.

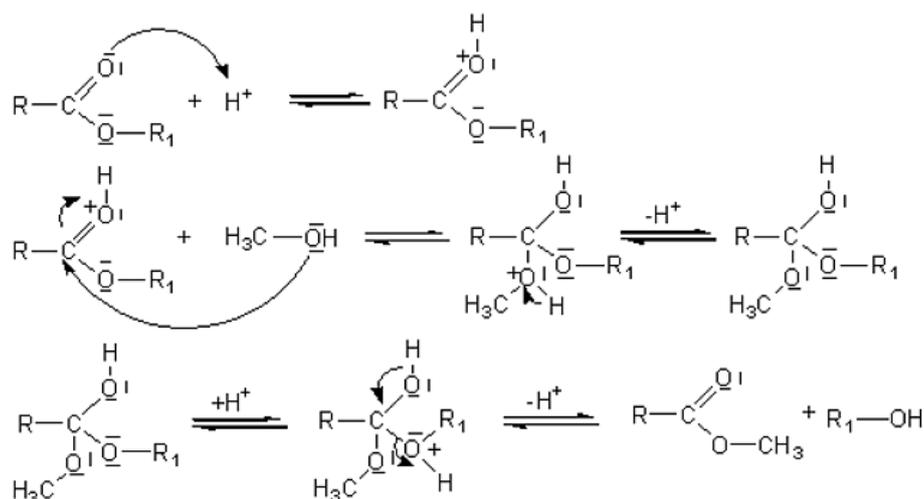
Les lipides ont ensuite été visualisés avec une solution à 0,001 % (w/v) de primuline dans 80 % d'acétone sous lumière UV. Les zones de gel de silice correspondant à chaque classe de lipides, identifiées grâce aux standards lipidiques déposés simultanément sur la plaque, ont été grattées

et transférées dans un tube propre. Ensuite, les profils d'acides gras pour chaque classe de lipide ont été analysés comme décrit ci-dessous.

*ii. Protocole de l'analyse des profils d'acides gras*

L'analyse des profils d'acides gras a été réalisée au début (T0) et à la fin (T7) des manipulations concernant les chapitres 3 et 4 et à T1, T3 et T7 pour l'expérience du chapitre 5. Le protocole d'analyse était basé sur celui de Le Guédard et al. (2008).

Vingt millilitres ont été prélevés pour chaque échantillon pour cette analyse. Après l'ajout d'un millilitre dans chaque échantillon de méthanol contenant 2,5 %  $H_2SO_4$  (v/v), les tubes ont été chauffés à 80 °C pendant 1 h et ont été finalement refroidis à température ambiante pendant 10 min. Les esters méthyliques d'acides gras (en anglais = FAMES : fatty acid methyl esters) ont été obtenus par transestérification (Figure 18) avant l'analyse par chromatographie en phase gazeuse (CPG). Cette transestérification permet de synthétiser des esters méthyliques d'acides gras (FAMES) ayant des points d'ébullition moins élevés que les acides gras. L'analyse par CPG a pu ainsi être effectuée à des températures plus basses compatibles avec la résistance de la colonne.



**Figure 18 :** Réaction de transestérification en catalyse acide.

Source : <https://tice.ac-montpellier.fr/ABCDORGA/Famille/TRANSESTER.html>

Un millilitre et demi d'eau déionisée et 0,75 mL d'hexane ont été ajoutés aux échantillons refroidis. Les échantillons ont été agités de manière vigoureuse pendant 30 s et ont été centrifugés à 1 500 g pendant 5 min ; deux phases ont été obtenues. Les FAMES ont été extraits dans l'hexane (phase supérieure des deux phases obtenues).

La séparation des FAMES a été réalisée par chromatographie gazeuse (Hewlett-Packard 5890 série II, Agilent, Waldbronn, Allemagne) sur une colonne Carbowax de 15 m par 0,53 mm (Altech, Deerfield, IL, USA) et à l'aide d'un détecteur à ionisation de flamme. La température du four a été programmée à 160 °C pendant 1 min, suivie d'une rampe de 20 °C.min<sup>-1</sup> jusqu'à 190 °C et d'une seconde rampe de 5 °C.min<sup>-1</sup> jusqu'à 210 °C. Cette dernière température a été maintenue pendant 6min (la durée totale de l'analyse est de 13 min). L'identification des acides gras a été faite en comparant leur temps de rétention à celui de standards (Sigma Chemical, St. Louis, MO, USA).



# 5. **Analyses statistiques**



Différentes analyses statistiques ont été réalisées pour chaque manipulation menée tout au long de ces travaux de thèse.

Un test non paramétrique de **Wilcoxon-Mann-Whitney** a été effectué en raison de la distribution non normale des données (avec une valeur de  $p < 0,05$  considérée comme statistiquement significative) dans le but de détecter des différences significatives entre :

- 1) le début et la fin de l'expérience (profils d'acides gras) (manipulation 1) ;
- 2) les réponses des deux espèces de diatomées *N. palea* et *G. gracile* à T7 (manipulation 2) ;
- 3) les différents traitements : cultures témoins et cultures exposées aux herbicides (tous les descripteurs) (manipulations 1, 2 et 3).

**Les analyses en composantes principales** (ACP), établies à l'aide des packages *tidyverse*, *ade4*, *FactoMineR* et *factoextra*, ont été réalisées dans le but de mettre en évidence les corrélations entre différentes variables telles que :

- 1) la teneur en chlorophylle a et en caroténoïdes (manipulations 1 et 2) ;
- 2) le pourcentage des quatre classes d'acides gras (SFA, MUFA, PUFA et HUFA) (manipulations 1 et 2) ;
- 3) le pourcentage de chaque acide gras (14: 0, 16: 0, 16: 1, etc.) (manipulations 1 et 2) ;
- 4) le facteur de répression ou d'induction de chaque gène d'intérêt (manipulations 1 et 2) ;
- 5) les concentrations en nutriments et le traitement avec des pesticides (manipulations 1 et 2) ;
- 6) la teneur en acides gras totaux dans chaque lipide (manipulation 3) ;
- 7) la teneur en acide gras 20:5n3 dans chaque lipide (manipulation 3) ;
- 8) l'activité de photosynthèse (manipulations 1, 2 et 3) ;

9) le taux de croissance (manipulations 1, 2 et 3).

Afin de montrer une différence significative entre les groupes d'individus, un test **PERMANOVA** a été effectué (avec une valeur  $p < 0,05$  considérée comme statistiquement significative) en utilisant les packages *vegan* et *devtools* et les ellipses de confiance ont été représentées sur le biplot de l'ACP (manipulations 1, 2 et 3).

Afin de noter des différences significatives entre T1, T3 et T7 pour l'activité photosynthétique, un test **Kruskal-Wallis** non paramétrique a été effectué en raison de la distribution non normale des données et suivi d'un test post-hoc Dunn (avec une valeur  $p < 0,05$  considérée comme statistiquement significative) (manipulation 3).

De la même manière, afin de montrer l'impact de la durée d'exposition sur la composition lipidique, **une courbe de réponse principale** (PRC) a été établie (manipulation 3).

Toutes les analyses statistiques ont été réalisées avec **le logiciel R studio** (RStudioTeam 2016).

---

**Chapitre 3 – Article 1**

**Impact de pesticides sur les**

**descripteurs « classiques » et acides**

**gras de la diatomée *Gomphonema***

***gracile***

---



✚ En France, les pesticides sont régulièrement détectés dans les cours d'eau en raison des activités agricoles (SOeS, 2015) et les rivières sont fréquemment contaminées par ces produits chimiques. En effet, leur utilisation s'effectue en milieu terrestre mais par le biais des pulvérisations aériennes, du lessivage, du ruissellement ou des déversements accidentels, les réceptacles finaux de ces composés deviennent les milieux aquatiques (Vidal et al., 2012).

Par ailleurs, il a été démontré dans la littérature que la pollution par les herbicides pouvait avoir une incidence sur la croissance et la physiologie des diatomées (Debenest et al., 2010; DeLorenzo et al., 2001; Moisset et al., 2015).

✚ De plus, de récentes études ont montré que la modification des profils d'acides gras était un biomarqueur précoce et sensible du stress environnemental et chimique du zooplancton, des poissons, des crustacés et des diatomées marines (Gonçalves et al., 2012; Gonçalves et al., 2018a; Maazouzi et al., 2008; Ramírez et al., 2013; Sánchez-Muros et al., 2013).

Les acides gras saturés et monoinsaturés sont les principales formes d'énergie emmagasinées (Olofsson et al., 2012), alors que les acides gras polyinsaturés (avec > 1 double liaison) et les acides gras hautement insaturés (avec  $\geq 20$  atomes de carbone et  $\geq 3$  doubles liaisons) jouent un rôle important dans l'organisme en tant que constituants majeurs des membranes cellulaires (Gonçalves et al., 2017).

✚ Cependant à notre connaissance, aucune étude n'a encore porté sur l'impact des herbicides sur les profils d'acides gras des diatomées d'eau douce.

Dans ce contexte, l'effet de deux herbicides, le diuron et le S-métolachlore, à concentration environnementale ( $10 \mu\text{g.L}^{-1}$ ) (Coquillé et al., 2015; Moisset et al., 2015) a

été testé sur les profils d'acides gras et les descripteurs considérés comme « classiques » de la diatomée d'eau douce *G. gracile* à une température de 20,5 ° C et durant sept jours.

Dans cette étude, le taux de croissance, l'activité photosynthétique, les réponses génétiques et les teneurs en pigments ont été considérés comme des descripteurs « classiques ».

✚ Ce chapitre s'attache ainsi à :

- 1) Evaluer l'impact de ces herbicides sur des descripteurs globaux « classiques » tels que le taux de croissance, la photosynthèse, le contenu en pigments et sur les niveaux d'expression de gènes d'intérêt ;
- 2) Etudier l'impact de ces herbicides, aux cibles cellulaires différentes, sur les profils d'acides gras des diatomées d'eau douce ;
- 3) Comparer les profils d'acides gras et les réponses des descripteurs « classiques » afin de montrer leur complémentarité d'un point de vue physiologique et écologique.

**Impact of diuron and S-metolachlor on the freshwater diatom *Gomphonema gracile*: complementarity between fatty acid profiles and different kinds of ecotoxicological impact-endpoints.**

Floriane Demailly<sup>a\*</sup>, Imane Elfeky<sup>a</sup>, Laura Malbezin<sup>b</sup>, Marina Le Guédard<sup>c</sup>, Mélissa Eon<sup>a</sup>, Jean-Jacques Bessoule<sup>d</sup>, Agnès Feurtet-Mazel<sup>b</sup>, François Delmas<sup>a</sup>, Nicolas Mazzella<sup>a</sup>, Patrice Gonzalez<sup>b</sup>, Soizic Morin<sup>a</sup>

<sup>a</sup> Irstea, UR EABX, 50 avenue de Verdun, 33612 Cestas cedex – France.

<sup>b</sup> Univ. Bordeaux, EPOC, UMR CNRS 5805, Station Marine d'Arcachon, Place du Docteur Bertrand Peyneau, 33120 Arcachon Cedex – France

<sup>c</sup> LEB Aquitaine Transfert, ADERA, Bâtiment A3, INRA Bordeaux Aquitaine, 71 avenue Edouard Bourlaux, CS 20032, 33140 Villenave d'Ornon – France

<sup>d</sup> CNRS – Univ. Bordeaux, Laboratoire de Biogenèse Membranaire, UMR 5200, Bâtiment A3, INRA Bordeaux Aquitaine, 71 avenue Edouard Bourlaux, CS 20032, 33140 Villenave d'Ornon – France

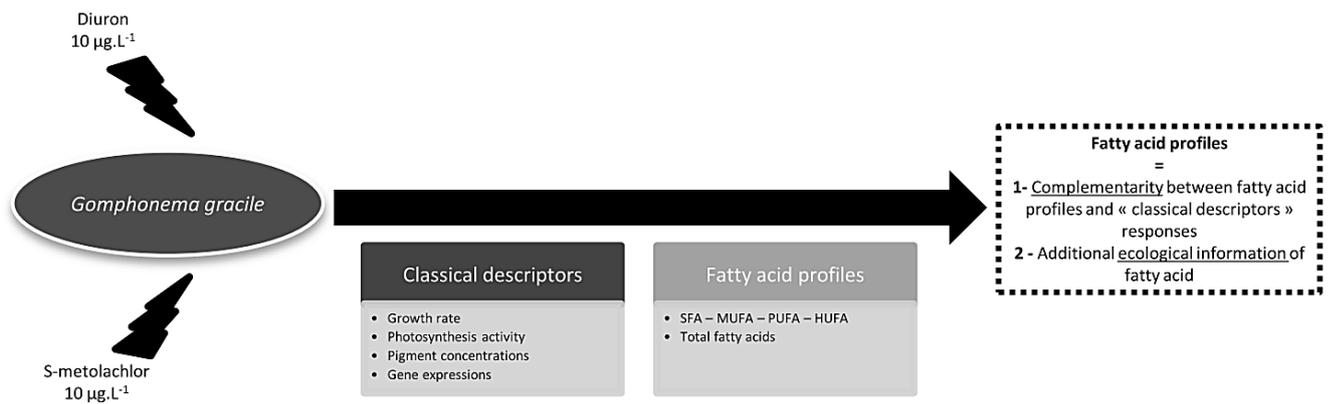
\*Corresponding author.

E-mail address: [floriane.demailly@inrae.fr](mailto:floriane.demailly@inrae.fr) (F. Demailly)

Publié dans *Science of The Total Environment* (2019) pp 960-969



## Graphical abstract



## Highlights

- Fatty acids (FA) are essential for: biological membranes and metabolic energy storage.
- Diuron and S-metolachlor effects on diatom FA and “classic descriptors” were tested.
- Diuron seemed to more toxic than S-metolachlor on all studied endpoints.
- Fatty acid profiles provided additional information on the toxicity of herbicides.
- A complementarity between FA and “classical descriptors” was shown.



## Abstract

Fatty acids (FA) are crucial for the maintenance of membrane fluidity and play a central role in metabolic energy storage. Polyunsaturated fatty acids play an essential ecological role since they are key parameters in the nutritional value of algae. Pesticide impacts on fatty acid profiles have been documented in marine microalgae, but remain understudied in freshwater diatoms. The aims of this study were to: 1) investigate the impact of diuron and S-metolachlor on “classical descriptors” (photosynthesis, growth rate, pigment contents, and on the expression levels of target genes in freshwater diatoms), 2) examine the impact of these pesticides on diatom fatty acid profiles and finally, 3) compare fatty acid profiles and “classical descriptor” responses in order to evaluate their complementarity and ecological role. To address this issue, the model freshwater diatom *Gomphonema gracile* was exposed during seven days to diuron and S-metolachlor at 10  $\mu\text{g.L}^{-1}$ .

*G. gracile* was mostly composed of the following fatty acids: 20:5n3; 16:1; 16:0; 16:3n4; 14:0 and 20:4n6 and highly unsaturated fatty acids were overall the best represented fatty acid class. S-metolachlor decreased the growth rate and chlorophyll *a* content of *G. gracile* and induced the expression of *cox1*, *nad5*, *dl* and *cat* genes, while no significant impacts were observed on photosynthesis and carotenoid content. In a more global way, S-metolachlor did not impact the fatty acid profiles of *G. gracile*. Diuron inhibited photosynthesis, growth rate, chlorophyll *a* content and induced *cat* and *dl* gene expressions but no significant effect was observed on carotenoid content. Diuron decreased the percentage of highly unsaturated fatty acids but increased the percentage of monounsaturated fatty acids. These results demonstrated that fatty acids responded to diuron conversely to pigment content, suggesting that fatty acids can inform on energy content variation in diatoms subjected to herbicide stress.



## Keywords

Microbial ecotoxicology; Microalgae; Bacillariophyceae; Fatty acid; Herbicides; Toxicity

### 1. Introduction

The intensive use of pesticides for crop protection causes many environmental problems, making pesticides major pollutants of aquatic ecosystems (Aydinalp and Porca, 2004; Vidal et al., 2012). Indeed, whereas the use of these pesticides takes place in the terrestrial environment, by aerial spraying, leaching, runoff or accidental spills, the final receptacles of these chemicals are aquatic environments (Vidal et al., 2012). In France, many different herbicides are present in rivers. For example, the tributaries of Arcachon Bay are contaminated by diverse mobile and persistent herbicides, such as diuron and S-metolachlor (Fauvelle et al., 2012).

The herbicide diuron 3-(3, 4-dichlorophenyl)-1, 1-dimethylurea, is a compound of the substituted urea family and is resistant to photolysis and hydrolysis (Okamura, 2002). This herbicide is an inhibitor of photosystem II (PSII) which inhibits photosynthesis by preventing the electron transport chain (Rutherford and Krieger-Liszkay, 2001) and stopping oxygen formation (Moisset et al., 2015). Furthermore, diuron is known to generate reactive oxygen species (ROS) which induce a gap in the balance between prooxidative and antioxidative reactions (Geoffroy et al., 2002). Moreover, it is also demonstrated that diuron inhibits polyunsaturated fatty acid synthesis by inhibiting the desaturation process (Troton et al., 1986). S-metolachlor is a compound of the chloroacetamides family and is a molecule that is potentially dangerous to the environment (Liu et al., 2006). This herbicide was developed in order to control grass weeds following pre-emergence application (Neves et al., 2015). It was shown that this pesticide inhibits synthesis of chlorophyll, proteins, fatty acids, lipids and finally, growth of the organism (Fuerst, 1987; Rivard, 2003). In fact, S-metolachlor inhibits elongases involved in the elongation of highly unsaturated fatty acid (HUFA) and especially

very long-chain fatty acids (VLCFA) (Trenkamp et al., 2004). Furthermore, its toxicity is linked with the oxidation of components of cells increasing the production of reactive oxygen species (ROS) and starting lipid peroxidation (Maronić et al., 2018).

Many microorganisms co-occur in watercourses, especially periphytic communities and particularly diatoms which, at certain times of the year, represent the bulk of periphyton (Moisset et al., 2015). Among primary producers in watercourses, freshwater diatoms are the dominant phototrophic organisms and play an important role in ecological processes such as primary production (Potapova and Charles, 2002; Rimet, 2012). Diatoms are relevant bioindicators because of their adaptation capacities and their tolerance of environmental factors and aquatic pollution (Potapova and Charles, 2002).

Several monitoring tools based on diatom community composition (such as the Biological Diatom Index, BDI; Coste et al., 2009) have been developed to assess the ecological quality of watercourses, but unfortunately these indices are not suitable to detect the impacts of water pollution by pesticides on diatoms (Dorigo et al., 2004; Lenoir, 1996; Prygiel and Coste, 1996). It was shown in the literature that the growth and physiology of diatoms can be impacted by herbicide pollution (Debenest et al., 2010; DeLorenzo et al., 2001). Differential gene expression proved to be an early and sensitive biomarker of toxicant exposure (Kim Tiam et al., 2012; Kim Tiam et al., 2018; Moisset et al., 2015), compared to more global endpoints.

Chemical pollution may impact organisms at the biomolecular and biochemical levels being sensitive and quick-responding bioindicators (Adams and Greeley, 2000). Alteration in FA profiles is a sensitive early bioindicator of environmental and chemical stress in zooplankton, fish, crustaceans and diatoms, as demonstrated by recent studies (Gonçalves et al., 2012; Gonçalves et al., 2018b; Maazouzi et al., 2008; Ramírez et al., 2013; Sánchez-Muros et al., 2013).

Fatty acids contribute to the fluidity, production and permeability of cell membranes, and they are the main components of lipids that play multiple roles in the cell. Moreover, saturated and monounsaturated fatty acids (SFA and MUFA) are the principal forms of stored energy (Olofsson et al., 2012), whereas polyunsaturated fatty acids (PUFA with > 1 double bonds) and highly unsaturated fatty acids (HUFA) (with  $\geq 20$  carbons and  $\geq 3$  double bonds) play a significant role in the organism, being major constituents of cellular membranes (Gonçalves et al., 2017). PUFA and HUFA take part in the regulation of membrane fluidity and serve as precursors of many hormones (Brett and Müller-Navarra, 1997). PUFA and HUFA are only synthesized by photosynthetic organisms and are thus the most important molecules to be transferred in the trophic chain (Allan et al., 2010; Dalsgaard et al., 2003).

HUFA such as eicosapentaenoic acid (20:5n3, EPA) and docosahexaenoic acid (22:6n3, DHA) are key nutritional compounds of zooplankton diet because of their energetic efficiency (Perhar and Arhonditsis, 2012). They are used as fuel in all metabolic systems for all organisms, having an important role on physiological response (Arts et al., 2009).

Some studies have demonstrated the impact of pesticides on fatty acid profiles of marine microalgae (Filimonova et al., 2018; Filimonova et al., 2016b; Robert et al., 2007). For example, Filimonova et al. (2016) observed that exposure to the Primextra® herbicide decreased the percentage of PUFA and particularly of HUFA but increased the percentage of SFA in the marine diatom *Thalassiosira weissflogii*. Likewise, Robert et al. (2007) demonstrated that the herbicide metolachlor decreased the percentage of HUFA in the microalga *Melosira moniliformis*.

Moreover, few studies have demonstrated the effect of herbicides on freshwater microalgae, such as green algae (Böger et al., 2000; Chalifour et al., 2014; El-Sheekh et al., 1994; Weisshaar et al., 1988). For instance, an increase of MUFA and a decrease of PUFA and HUFA content were found on the green algae *Scenedesmus* and *Chlamydomonas reinhardtii* after respectively

chloroacetamide treatment; norflurazon and fluridone exposure (Böger et al., 2000; Chalifour et al., 2014).

To our knowledge, no study has yet focused on the impact of pesticides on fatty acid profiles of freshwater diatoms, and on the variable impacts of distinctly-acting toxic compounds such as diuron and S-metolachlor. We therefore tested the effects environmentally realistic concentrations of both pesticides (10 µg.L<sup>-1</sup> each) (Coquillé et al., 2015; Moisset et al., 2015) on FA profiles and classical endpoints in the freshwater diatom *G. gracile* at 20.5°C for seven days. The aims of our study were: 1) to evaluate the impact of these herbicides on “classical” global descriptors such as growth rate, photosynthesis, pigment contents and to investigate the subsequent expression levels of the genes involved in mitochondrial metabolism (*coxI* (cytochrome C oxidase subunit I), *12S* (mitochondrial ribosomal RNA 12S) and *nad5* (NADH dehydrogenase subunit 5)), photosynthetic activity (*d1* (*D1 protein*) and *psA* (PsaA protein)), oxidative stress response (*cat* (catalase) and *gpx* (glutathione peroxidase)) and frustule synthesis (*sill* (silaffin-1 protein)) known to be putatively differentially expressed during pesticide exposure; 2) to explore the impact of two herbicides with contrasting cellular targets (diuron and S-metolachlor) on fatty acid profiles of freshwater diatoms, hypothesizing that diatom fatty acid responses would be similar to those of green algae; and finally, 3) to compare fatty acid profiles and “classical descriptors” responses in order to show their complementarity based on physiological and ecological responses.

## **2. Materials and methods**

### **2.1. Diatom culture: *Gomphonema gracile***

*G. gracile* Ehrenberg (1838) (Bacillariophyceae) is a benthic diatom found preferentially in biofilms from slightly acidic waters (Coste et al., 2009). It is a pennate diatom and has a bidirectional movement, as most raphid species (Cohn, 2001). According to the Specific

Pollution Sensitivity Index (Cemagref, 1982), this diatom is considered to be sensitive to macropollutants.

The freshwater diatom culture was isolated in December 2013 from a field sample (collected from an upstream section of the Leyre river, which is the main tributary of Arcachon Bay (South West France)) by micromanipulation under an inverted microscope (Coquillé et al., 2015). The diatom culture was maintained non axenic in the laboratory and was cultured in sterile Dauta medium (Dauta, 1982) at 20.5 °C in a thermostatic chamber 610 XAP (LMS LTD®, UK) at 45  $\mu\text{mol photons}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$  with a dark: light cycle of 8:16h, in 1-L erlenmeyers. Every week, the culture was renewed with new sterile Dauta medium for the purpose of keeping diatoms in an exponential growth phase.

## **2.2. Experimental design**

The experiment was carried out in round, 100 mL borosilicate sterile glass flasks previously heated to 550°C for 4h. One week before pesticide contamination, glass flasks were inoculated with 40 mL of stock culture in exponential growth phase and 40 mL of Dauta culture medium. This step allowed a one-week adaptation of the culture to the glass flasks.

The contamination experiment lasted 7 days. For the first day of contamination, glass flasks were inoculated with 300,000  $\text{cell}\cdot\text{mL}^{-1}$  using adapted cultures in exponential growth phase and Dauta medium (total volume = 80 mL). Three treatments were run: a control treatment (no pesticide) and two pesticide treatments: diuron and S-metolachlor at 10  $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ . Controls and herbicide-exposed cultures were carried out in quadruplicate.

Chemical (nutrients and pesticides) analyses were carried out at the beginning (T0) and at the end (T7) of the experiment, following the protocols described in Supplementary Material (SI 1 and 2). Detailed environmental conditions in the cultures are provided in Table 2 SI-1.

## 2.3. Biological parameters

### 2.3.1. Photosystem II effective quantum yield – Photosynthesis

The analysis of inhibition of photosynthesis was carried out using a PHYTO-PAM (Pulse-Amplitude Modulated (PAM)) (Heinz Walz, GmbH, Germany) every day of the experiment. PHYTO-PAM is a device used to evaluate the physiological state of algae. It is based on the quantitative relationship between the efficiency of photosynthetic energy conversion and chlorophyll fluorescence (Corcoll et al., 2012) and its use for determining pesticide effects on photosynthesis (Dorigo and Leboulanger, 2001).

The PSII effective quantum yield ( $\Phi'_M$ ) was determined using PHYTO-PAM with an emitter-detector unit (PHYTO-ED), in the “brown algae” mode. Measurements were performed in 1cm-wide quartz cuvettes using 2 mL of diatom culture. Five  $\Phi'_M$  measurements were performed for each condition.  $\Phi'_M$  is described by the following equation (Genty et al., 1989):

$$\Phi'_M = (F'_M - F) / F'_M$$

- With: - F being the minimum fluorescence determined after exposure to a weak far red modulated light
- $F'_M$  being the maximum level of fluorescence measured during a saturating white light pulse

### 2.3.2. Growth rate

Cellular concentrations of diatoms were quantified every day of the experiment from 1mL of each sample fixed in Lugol (4 %) and stored at 4 °C until counting. Cell density was determined by counting using a Nageotte counting chamber (Marienfeld, Germany) and following the protocol below. Each fixed sample was homogenized with a vortex. After homogenization, 125  $\mu$ L of sample was dropped into the counting chamber. The number of cells was identified, under light microscopy, in ten columns of the counting area (1.25  $\mu$ L each, 0.5 mm depth). The

distinction between live and dead organisms was estimated by the observation of the color of the chloroplasts and by the observation of their turgescence (Morin et al., 2010).

Cellular concentration was noted in number of individuals per milliliter, and then average growth rates were calculated to optimally fit the daily counting over the exponential growth phase, as the slope of the regression line of  $\text{Ln}(\text{cell.mL}^{-1})$  over time (days).

### ***2.3.3. Chlorophyll *a* and carotenoid contents***

Chlorophyll *a* and carotenoid content analyses were performed at T0 and T7 of the experiment. An aliquot of 20 mL (T0) and another of approximately 10 mL (T7) of each sample were filtered on Whatman® GF/C filters and frozen at -20 °C until the time of analysis. Samples were then defrosted at room temperature before adding 10 mL of 80 % acetone (v/v). Each tube was wrapped with aluminum (to induce darkness) and shaken. The tubes were placed in a beaker containing water (to ensure stability) and ultrasonicated for 20 min before being left to settle over a 10 min period, in the dark. Each sample was filtered on Whatman® GF/C filters and the filters were recovered in the filter cone. The tubes were rinsed with 80 % acetone and the filters were pressed. The filtrates were collected in the initial tube and the final volume was noted (graduated tube).

Chlorophyll *a* content was determined with a Shimadzu UV-1800 spectrophotometer (Shimadzu Inc., Kyoto, Japan). Absorbance measurements were made at the following wavelengths: 470 nm, 663.2 nm and 648.8 nm. The chlorophyll *a* and carotenoid contents were calculated with Lichtenthaler equations (Iummato et al., 2017; Lichtenthaler and Wellburn, 1983) and expressed as milligrams per liter ( $\text{mg.L}^{-1}$ ).

### **2.3.4. Genetic analyses**

Four milliliters, with a cell concentration of  $576400 \pm 140224$  cells.mL<sup>-1</sup>, were sampled at T7 and were centrifuged at 1.500 g during 5 min in order to the pellet cells and thus remove culture medium. To avoid degradation of RNA, 200  $\mu$ L of RNA later buffer were added to the pellet. Samples were stored one night at 4 °C and then at -80 °C until the genetic analysis.

The protocols of RNA extraction, Reverse Transcription of RNA and Real-Time q-PCR were based on the protocol of Kim Tiam et al. (2012) and carried out at the end of the experiment.

Ten genes were studied; three involved in mitochondrial metabolism (*cox1* (cytochrome C oxidase subunit I), *12S* (mitochondrial ribosomal RNA 12S) and *nad5* (NADH dehydrogenase subunit 5)), two involved in photosynthetic activity (*d1* (*D1 protein*) and *psA* (PsaA protein)), two involved in oxidative stress (*cat* (catalase) and *gpx* (glutathione peroxidase)) and one involved in frustule synthesis (*sill* (silaffin-1 protein)).

The level of expression of each gene was determined in relation to that of the reference gene ( *$\beta$ -actin*) whose expression was stable and did not show any variation depending on the experimental treatments applied. Indeed, the reference gene *rpl7* was not stable and so was not retained.

The detailed primers for each gene are provided in Table 3 SI1- 3.

### **2.3.5. Fatty acid profiles**

Twenty milliliters were sampled for each condition at T0 and T7. In order to remove medium culture samples were centrifuged at 1,500 g for 5 min and then 1 mL of methanol containing 2.5 % H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (v/v) was added to the pellet. The fatty acid methyl esters were obtained according to the protocol described by Le Guédard et al. (2008).

Separation of FAMES was carried out using gas chromatography (Agilent 7890A) on a DB-WAX column (15 m x 1  $\mu$ m x 0.53 mm, Agilent) and with flame ionization detection. The oven

temperature was 150 °C for 1 min, followed by a 5 °C.min<sup>-1</sup> ramp to 230 °C. This last temperature was maintained for a further 8min (total run time = 25 min). The limit of detection was 0.25 µg of fatty acid.

Identification of fatty acids was performed by comparing their retention times with PUFA No3 standard (Sigma, Aldrich). For each fatty acids or class of fatty acids (SFA, MUFA, PUFA, HUFA) results were expressed in percentage of total fatty acids.

## **2.4. Statistical analyses**

To detect significant differences between the beginning and the end of the experiment (FA profiles), and the control conditions and herbicide-exposed cultures (all descriptors), a non-parametric Wilcoxon-Mann-Whitney test was performed because of the non-normal distribution of the data (with a p-value < 0.05 considered as statistically significant). All statistical analyses were carried out with the R studio software (RStudioTeam, 2016).

Principal Component Analyses (PCA) were performed for the purpose of highlighting correlations between different variables such as photosynthesis activity, growth rate, contents of chlorophyll *a* and carotenoid, the percentage of the four classes of fatty acids (SFA, MUFA, PUFA and HUFA), the percentage of each fatty acid (14:0, 16:0, 16:1 etc.), the repression or induction factor of each gene of interest, nutrient concentrations and treatment with pesticides. In order to show significant difference between groups of individuals a PERMANOVA test was performed (with a p-value < 0.05 considered as statistically significant) and three confidence ellipses were represented on the PCA plot.

### 3. Results

#### 3.1. “Classical descriptors”

##### 3.1.1. Cellular concentration, growth rate, photosynthesis and pigment contents

Control cultures grew during the seven days of the experiment with an average growth rate of  $0.11 \text{ div.day}^{-1}$ . The cellular concentration increased between T1 and T7 from  $373,000 \text{ cells.mL}^{-1}$  to  $576,400 \text{ cells.mL}^{-1}$ . However, the chlorophyll a and carotenoid contents were stable over the time. Chlorophyll a content was in average of  $0.84 \pm 0.36 \text{ mg.L}^{-1}$  at T0 and  $1.49 \pm 0.61 \text{ mg.L}^{-1}$  at T7 and carotenoid content was  $0.19 \pm 0.05 \text{ mg.L}^{-1}$  at T0 and  $0.42 \pm 0.17 \text{ mg.L}^{-1}$  at T7. Moreover, the photosynthetic activity was stable over time, with an average effective quantum yield of  $0.54 \pm 0.01$ .

S-metolachlor and diuron significantly decreased the growth of *G. gracile* (p-value < 0.05) with a decrease in growth rate from  $0.11 \text{ div.day}^{-1}$  to  $0.07 \text{ div.day}^{-1}$  and to  $0.02 \text{ div.day}^{-1}$ , respectively. The cellular concentration of *G. gracile* was significantly lower in both S-metolachlor and diuron-treated cultures than in the controls (p-value < 0.05), being  $427,600 \pm 26,368 \text{ cells.mL}^{-1}$  and  $308,600 \pm 57,189 \text{ cells.mL}^{-1}$ , respectively.

No significant difference in photosynthesis was observed between control and S-metolachlor conditions, whereas diuron decreased photosynthesis with an average effective quantum yield of  $0.40 \pm 0.02$  (p-value < 0.05 for all dates). However, it was interesting to note that photosynthesis at T7 under diuron treatment was significantly higher than T1, T2, T5 and T6 with values of  $0.37 \pm 0.01$ ,  $0.37 \pm 0.00$ ,  $0.36 \pm 0.01$  and  $0.35 \pm 0.02$ , respectively.

Chlorophyll a concentration significantly decreased with the two pesticide treatments from  $1.49 \pm 0.61 \text{ mg.L}^{-1}$  to  $0.80 \pm 0.17 \text{ mg.L}^{-1}$  for diuron (p-value < 0.05) and from  $1.49 \pm 0.61 \text{ mg.L}^{-1}$  to  $0.78 \pm 0.19 \text{ mg.L}^{-1}$  for S-metolachlor (p-value < 0.05), while carotenoid contents were not impacted by either herbicide.

### ***3.1.2. Genetic analyses***

The expression of the photosynthesis gene *psaA* and the mitochondrial metabolism gene *12s* were identical with that of the control after seven days of exposure to both pesticides (Table 1). The results of the oxidative stress gene *gpx* and the frustule gene *sil1* were not exploitable in this study.

Conversely, the oxidative stress gene *cat* and photosynthetic gene *d1* were induced by 18.58 and 2.83 respectively with diuron treatment, while S-metolachlor induced the photosynthetic gene *d1*, the mitochondrial metabolism genes *cox1* and *nad5* and the oxidative stress gene *cat* respectively by 6.31, 4.99, 5.08 and 86.57 (Table 1).

**Table 1 :** Differential gene expression as compared to  $\beta$ -actin for the taxon *Gomphonema gracile* exposed to diuron and S-metolachlor (Mean ( $\pm$  SE); n = 4). Only factors showing significant differences (p-value < 0.05) are shown in this table. Significant induction (> 2, grey square) are indicated by values, compared to the respective controls. / : expression identical to control levels.

| Genes       | Exposed to   | Exposed to    |
|-------------|--------------|---------------|
|             | diuron       | S-metolachlor |
| <i>psaA</i> | /            | /             |
| <i>dl</i>   | <b>18.58</b> | <b>6.31</b>   |
| <i>cox1</i> | /            | <b>4.99</b>   |
| <i>nad5</i> | /            | <b>5.08</b>   |
| 12s         | /            | /             |
| <i>cat</i>  | <b>2.83</b>  | <b>86.57</b>  |

### 3.2. Fatty acid profiles

#### 3.2.1. Variability of fatty acid profiles with time

During the seven days of culture without herbicides, changes in the fatty acid composition of diatoms were observed. At the beginning of the experiment (T0), *G. gracile* was composed mainly of seven fatty acids: EPA ( $26.17 \pm 0.08$  %); 16:1 ( $18.63 \pm 0.18$  %); 16:0 ( $17.57 \pm 0.22$  %); 16:3n4 ( $9.45 \pm 0.06$  %); 14:0 ( $7.14 \pm 0.12$  %); 18:1n9 ( $5.71 \pm 0.12$  %) and 20:4n6 ( $5.63 \pm 0.01$  %). At the end of the experiment (T7), the six major fatty acids were 20:5n3 ( $28.49 \pm 0.53$  %); 16:1 ( $18.21 \pm 1.99$  %); 16:0 ( $16.57 \pm 0.50$  %), 16:3n4 ( $11.16 \pm 0.52$  %); 14:0 ( $7.01$

$\pm 0.33$  %) and 20:4n6 ( $5.67 \pm 0.27$  %). The rest of fatty acids that were not described previously had content lower than 5 %.

The percentage in 16:0 and 18:1n9 significantly decreased ( $p$ -value  $< 0.05$ ) respectively from  $17.57 \pm 0.22$  % to  $16.57 \pm 0.50$  % and from  $5.71 \pm 0.12$  % to  $3.11 \pm 1.78$  % between the beginning and the end of the experiment.

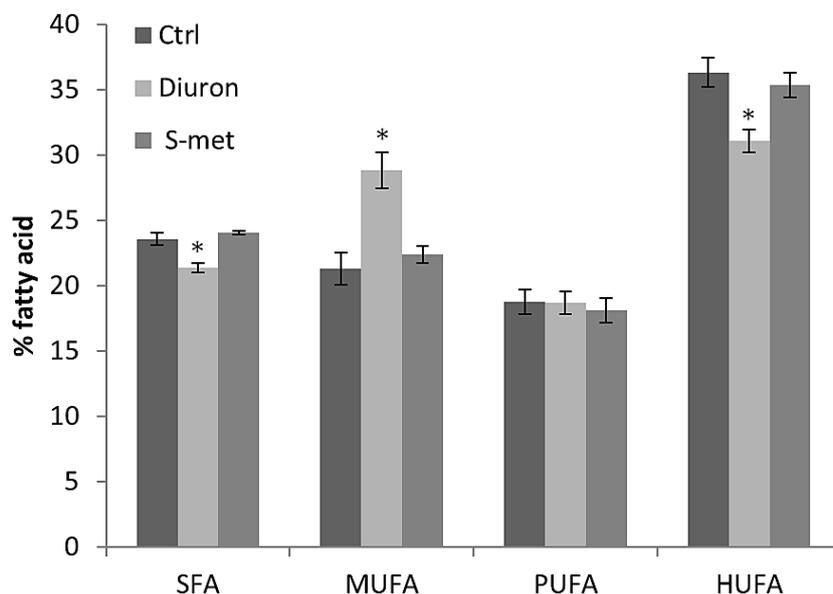
SFA were affected by the seven days of culture with a significant decrease ( $p$ -value  $< 0.05$ ) in their percentage between T0 and T7 from  $24.71 \pm 0.32$  % to  $23.58 \pm 0.48$  %. In the same way, the percentage in MUFA significantly decreased ( $p$ -value  $< 0.05$ ) between T0 and T7 from  $24.34 \pm 0.25$  % to  $21.32 \pm 1.21$  %. The percentage in polyunsaturated fatty acids 16:3n4 and 18:4n3 significantly increased ( $p$ -value  $< 0.05$ ) respectively from  $9.45 \pm 0.06$  % to  $11.16 \pm 0.52$  % and from  $0 \pm 0$  % to  $0.56 \pm 0.02$  % and significantly decreased ( $p$ -value  $< 0.05$ ) for 18:2n6 from  $1.64 \pm 0.02$  % to  $1.44 \pm 0.05$  % between T0 and T7. Overall, the percentage in PUFA significantly increased ( $p$ -value  $< 0.05$ ) from  $16.42 \pm 0.12$  % to  $18.78 \pm 0.94$  %. The percentage in highly unsaturated fatty acid EPA significantly increased ( $p$ -value  $< 0.05$ ) from  $26.17 \pm 0.08$  % to  $28.49 \pm 0.53$  % and the percentage in 22:5n3 significantly decreased ( $p$ -value  $< 0.05$ ) from  $2.42 \pm 0.04$  % to  $1.85 \pm 0.20$  %. The overall percentage in HUFA significantly increased ( $p$ -value  $< 0.05$ ) from  $34.51 \pm 0.63$  % to  $36.31 \pm 1.13$  %.

### **3.2.2. Variability of fatty acid profiles with herbicide exposure**

Under diuron treatment, the major fatty acid classes were HUFA (31.12 %); MUFA (28.84 %) (Figure 19) and the major fatty acids were EPA (24.88 %); 16:1 (20.64 %); 16:0 (14.97 %); 16:3n4 (12.73 %); 18:1n9 (8.20 %) and 14:0 (6.41 %) (Figure 20). Diuron significantly increased the percentage in MUFA from 21.32 % to 28.84 % and significantly decreased SFA and HUFA percentage from 23.58 % to 21.38 % and from 36.31 % to 31.12 %, respectively (Figure 19). Furthermore, a significant increase in the percentage of 18:1n9, 16:2n4 and 16:3n4

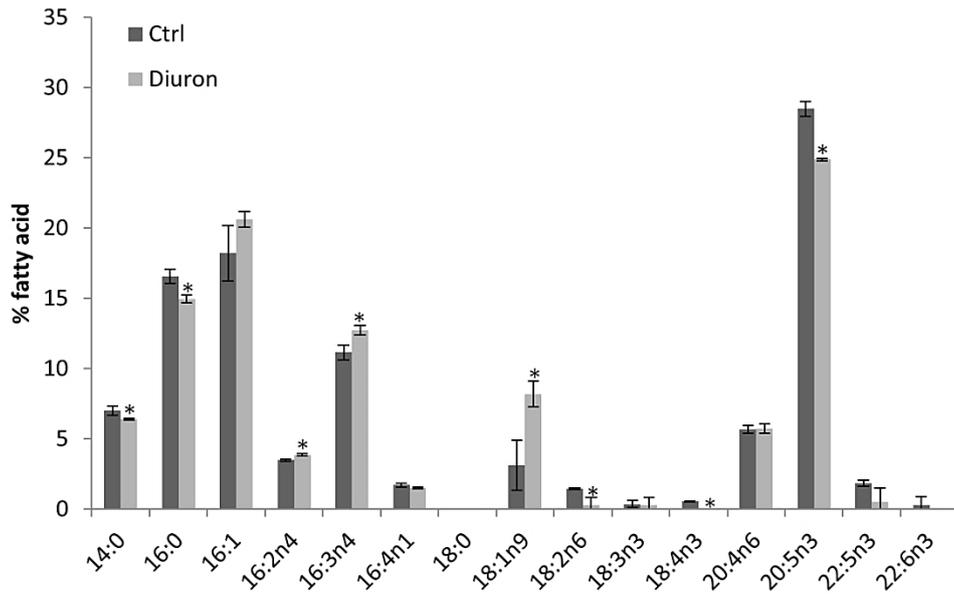
was noted between control and diuron conditions from 3.11 % to 8.20 %, from 3.51 % to 3.86 % and from 11.16 % to 12.73 %, respectively. A significant decrease in the percentage of 14:0, 16:0, 18:2n6, 18:4n3 and EPA was observed from 7.01 % to 6.41 %, from 16.57 % to 14.97 %, from 1.44 % to 0.29 %, from 0.56 % to 0 % and from 28.49 % to 24.88 %, respectively. Moreover, a non-significant decrease in the percentage of 22:5n3 and 22:6n3 was noted between control and diuron treatment from 1.85 % to 0.50 % and from 0.30 % to 0 %, respectively. Also, the percentage of 16:1 increased in a non-significant way from 18.21 % to 20.64 % (Figure 20).

Under S-metolachlor contamination, no significant impact was observed on fatty acid classes. However, a significant increase in the percentage of 16:0 from 16.57 % to 17.25 % and a significant decrease in the percentage of 18:2n6, 18:4n3 and 20:4n6 from 1.44 % to 1.28 %, from 0.56 % to 0.52 % and from 5.67 % to 5.12 %, respectively, were observed (Figure 21).

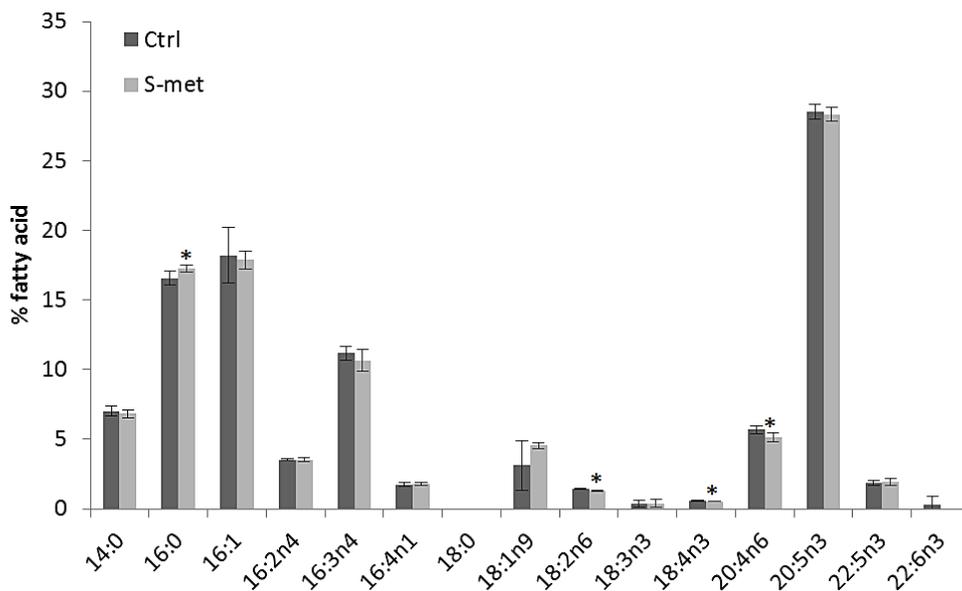


**Figure 19 :** Percentage in SFA, MUFA, PUFA and HUFA for the species *Gomphonema gracile* without contamination and with diuron and S-metolachlor contamination (Mean ( $\pm$  SE; n = 4).

\* indicates significant differences between control and contaminated conditions ( $p < 0.05$ ).



**Figure 20 :** Fatty acid profiles (% of fatty acid) in the species *Gomphonema gracile* at T7 for control and diuron treatment. The values are given as means (n = 4). 14:0, 16:0, 18:0 = SFA. 16:1, 18:1n9 = MUFA. 16:2n4, 16:3n4, 16:4n1, 18:2n6, 18:3n3, 18:4n3 = PUFA. 20:4n6, 20:5n3, 22:5n3, 22:6n3 = HUFA. \* indicates significant differences between control and contaminated conditions for T7, (p < 0.05).



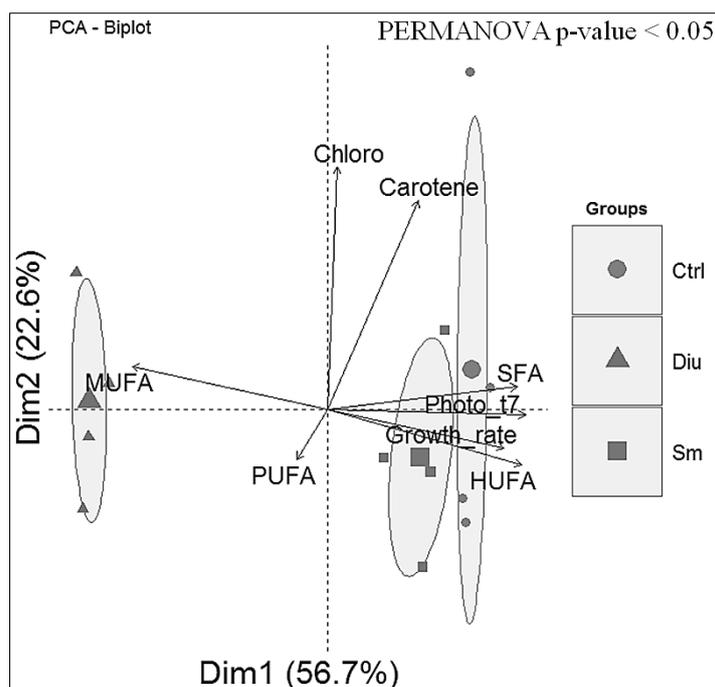
**Figure 21 :** Fatty acid profiles (% of fatty acid) in the species *Gomphonema gracile* at T7 for control and S-metolachlor treatment. The values are given as means (n = 4). 14:0, 16:0, 18:0 =

SFA. 16:1, 18:1n9 = MUFA. 16:2n4, 16:3n4, 16:4n1, 18:2n6, 18:3n3, 18:4n3 = PUFA. 20:4n6, 20:5n3, 22:5n3, 22:6n3 = HUFA. \* indicates significant differences between control and contaminated conditions for T7, ( $p < 0.05$ ).

### ***3.3. Correlations between « classical descriptors » and fatty acid profiles***

The results obtained at the end of the experiment (T7) for “classical descriptors” and fatty acid profiles were correlated using a Principal Component Analysis ([Figure 22](#)). Percentages of saturated (SFA) and highly unsaturated fatty acids (HUFA), photosynthetic activity (Photo\_t7) and growth rate were positively correlated with the axis 1 while monounsaturated fatty acid (MUFA) was negatively correlated with this axis. Control and S-metolachlor treatments were correlated with the axis 1 while diuron treatment was negatively correlated with this axis.

These results permitted to conclude that: 1) SFA, MUFA HUFA, photosynthetic activity and growth rate was impacted by herbicide pollutions conversely to pigment contents; 2) Diuron seemed more impacted on “classical descriptors” previously mentioned, conversely to S-metolachlor; 3) Diuron seemed more toxic than S-metolachlor in this study.



**Figure 22 :** Biplot of Principal Component Analysis for quantitative data performed for all samples with diuron, S-metolachlor and control treatments. Variables correspond to: Chloro = content of chlorophyll a; Carotene = content of carotenoid; Photo\_t7 = photosynthetic activity at T7; Growth\_rate = growth rate; SFA = percentage of saturated fatty acid; MUFA = percentage of monounsaturated fatty acid; PUFA = percentage of polyunsaturated fatty acid; HUFA = percentage of highly unsaturated fatty acid. Individuals correspond to: Diu = diuron contamination; Sm = S-metolachlor contamination; Ctrl = control condition.

The three ellipses correspond to confidence ellipse at 95 %.

## 4. Discussion

### 4.1. “Classical descriptors”

With chemical contamination such as pesticides, reactive centers of diatom photosystems are saturated faster, and light is used less efficiently by diatoms. Therefore, potential damages and the physiological state of the organism can be reflected by the effective quantum yield (Bonnineau et al., 2012; Coquillé et al., 2015; Laviale, 2008; Moisset et al., 2015). *G. gracile*

cultures exposed to environmental concentration of diuron showed that this herbicide targets photosynthesis and thus cell development. Larras et al. (2013) observed the sensitivity of benthic diatoms to diuron with an establishment of an EC50 value of  $9.50 \mu\text{g.L}^{-1}$  based on the 96h growth rate of the population. Diuron acts by blocking electron transport between PSII and PSI and as a consequence, it is considered to be one of the most potent photosynthetic inhibitors (Hall Jr et al., 1999; Thomas et al., 2003).

With S-metolachlor contamination, no impact was observed on photosynthetic activity of *G. gracile* culture exposed to environmental concentrations. Coquillé et al. (2015) demonstrated the same result on photosynthetic activity of *G. gracile* with this pesticide at 1, 10 and  $100 \mu\text{g.L}^{-1}$ .

However, environmental concentration of S-metolachlor impacted growth rate of *G. gracile*. Previous findings were obtained at  $100 \mu\text{g.L}^{-1}$  of S-metolachlor (Coquillé et al., 2015) and 5 and  $30 \mu\text{g.L}^{-1}$  (Debenest et al., 2009a) of this pesticide. These observations can be explained by the target of S-metolachlor: Carder and Hoagland (1998) noted that chloroacetamides disrupt fatty acid synthesis and finally inhibit cell division. The inhibition of diatom cell division can result in a decrease of chlorophyll content (Debenest et al., 2009a).

In diatoms, pigment content is also an indicator of cell physiology: in order to estimate the influence of contaminants, many studies use pigment content as a biomarker (Geoffroy et al., 2002; Teisseire and Vernet, 2001). Silkina et al. (2009) showed a decrease in pigment contents in the diatom *Staurosirella pinnata* under diuron at  $1 \text{ mg.L}^{-1}$ . The results of the present study showed the same observations for chlorophyll a content conversely to carotenoid content. The applied concentration, more environmentally realistic, was 100-fold lower than the above-mentioned one and could explain this lack of carotenoid content decrease.

As found here, Coquillé et al. (2015) demonstrated a decrease in chlorophyll a content under S-metolachlor at  $100 \mu\text{g.L}^{-1}$ .

It is also well-known that pesticides can provoke oxidative stress resulting in DNA breakage, mitochondrial and/or photosynthetic metabolism dysfunction and apoptotic mechanisms induction, leading to the death of the cell (Fukuyama et al., 2010; Rutherford and Krieger-Liszkay, 2001; Slaninova et al., 2009).

ROS are one of the earliest responses to chemical stress. When present in low quantities, ROS are rapidly converted to a less reactive form (Lauritano et al., 2015). In order to maintain healthy equilibrium of ROS, effective enzymatic mechanisms such as catalase (CAT) were developed by diatoms (Gonçalves et al., 2018a; Gonçalves et al., 2018b). However, at abnormally high quantities, they may provoke an alteration of the normal metabolism of the cell impacting nucleic acids, proteins and photosynthetic pigments resulting in an inactivation of enzymes, membrane damage and lipid peroxidation and affecting diverse physiological processes such as viability of cells (Arora et al., 2002; Jaganjac et al., 2016). This could explain differences in results observed between diuron and s-metolachlor used at the same environmental concentration.

Under S-metolachlor contamination, photosynthetic defense mechanism (gene *d1*) seemed efficient since no impact was noted on photosynthetic activity: D1 protein activity was activated increasing PSII reaction centers and allowed countering toxicant effects of this pesticide. The induction of the genes *cox1*, *nad5* suggests an increase of ATP production to counter the effects of a toxicant (Kim Tiam et al., 2012), since these genes are involved in the functioning of the respiratory chain and PS II. Moreover, the increase in ATP demand linked to the significant decrease of growth rate in *G. gracile* suggests that energy in the cell was reallocated to detoxification mechanisms to fight against the molecular effects of S-metolachlor (Kim Tiam et al., 2018).

However, *G. gracile* culture exposed to diuron showed a lower level of *d1* and *cat* than those exposed at the same environmental concentration to S-metolachlor. The antioxidative defense

mechanisms of *G. gracile* exposed to diuron seem to be not sufficiently effective to protect cells against ROS since, unlike the response with S-metolachlor, a decrease in photosynthesis was observed.

## **4.2. Fatty acid profiles**

### **4.2.1.1. Variability of fatty acid profiles with time**

Culture parameters are important to consider when analyzing biochemical composition of microalgae. It has been demonstrated in many studies that the percentage of fatty acid and particularly EPA content of algal strains is not only associated with heredity, but also influenced by different growing conditions (Alonso et al., 1992; Reitan et al., 1994; Renaud et al., 1991; Renaud et al., 1995; Tan and Johns, 1996; Teshima et al., 1983; Thompson et al., 1990; Yongmanitchai and Ward, 1991) and by the growth stage of the algae (Brown et al., 1996; Chu and Dupuy, 1980; Fernández-Reiriz et al., 1989). In the present study, the fatty acid profile of *G. gracile* was modified with the sampling time, especially with a decrease of SFA and MUFA and an increase of PUFA and HUFA.

Li et al. (2014b) noted this variability with the accumulation of neutral lipids rich in SFA (14:0, 16:0) and MUFA (16:1) during a stationary growth phase. These types of lipids are used to store excess carbon accumulated during photosynthesis. Since structural components are necessary for the growth, the surplus of neutral lipid accumulation was reduced in diatoms at the exponential growth phase. Finally the proportion of PUFA and HUFA, which are fatty acids of membrane lipids and structural components, are increased in diatoms during the exponential growth phase (Kates and Volcani, 1966a).

Concerning microalgae, it was noted that *Cylindrotheca* strains accumulated a high proportion of PUFA and HUFA at the exponential phase (29.5 %–42.9 %), particularly EPA and 20:4n6 (Ying et al., 2002). A study carried out on the diatom *Thalassiosira pseudonana* highlighted

that the proportion of total lipid content was higher in the late stationary phase of the culture, whereas PUFA and HUFA decreased during this later phase or in the early stationary phase. The proportion of PUFA and HUFA was higher in the exponential phase (Brown et al., 1996).

#### **4.2.1.2. Variability of fatty acid profiles with herbicide exposure**

Numerous studies demonstrated that marine and freshwater microalgae confronted to acute exposition to pesticides (not only herbicides) responded by a modification of their fatty acid profiles with a decrease of PUFA and HUFA content, particularly EPA and PUFA with 18-C, such as linoleic acid (18:2), linolenic acid (18:3); but also, with an increase of MUFA content with palmitoleic acid (16:1) and oleic acid (18:1) (Robert et al., 2007; Sicko-Goad et al., 1989a; Sicko-Goad et al., 1989b).

##### **4.2.1.2.1. MUFA**

The increase in the percentage of MUFA showed under diuron treatment can be explained by the inhibition of photosynthetic activity by this pesticide. Without stress factors and under normal growth conditions, ATP and NADPH, which are products of photosynthesis, are consumed to generate biomass. Various studies have highlighted that when photosystem II is altered and proliferation is finally inhibited because of stress factors such as a lack of nutrients, photoinhibition, or other sorts of damages, the major electron acceptor for photosynthesis can become depleted and NADPH is consumed in the biosynthesis of fatty acids. The cells deposit fatty acids in triacylglycerol (TAG), which are reserve lipids and contained majority of MUFA, because there is no need to produce new membrane compounds (Converti et al., 2009; Hu et al., 2008; Thompson Jr, 1996). Finally, higher neutral lipid content in algae can be a biological reaction to physiological stress and results observed in the present study are likely the result of a modification in lipid metabolism from the synthesis of membrane lipids to storage of neutral

lipids (Hu et al., 2008). To confirm this explanation, it could be relevant in future studies to carry out lipid measurement in diatoms using TAG dosage (Lupette et al., 2019) or fluorescent Nile red and BODIPY, for example (Rumin et al., 2015).

#### **4.2.1.2.2. PUFA and HUFA**

With herbicide contamination, it was suggested that the process of fatty acid desaturation is inhibited by the direct inhibition of the desaturase enzymes involved in PUFA and HUFA synthesis (Filimonova et al., 2016a). For example, it was shown in the literature that the substituted pyridazinone herbicide inhibited the desaturation process and especially the synthesis of omega-3 fatty acids, decreasing the 18:3n3 content in the glycolipids of algae. In the same way, the herbicide norflurazon inhibited desaturation system and particularly the omega 6 fatty acids (Cohen et al., 1993). Filimonova et al. (2016b) observed a decrease of HUFA content of the marine diatom *T. weissfloggi* from 16.48 % to 12.32 % under Primextra® herbicide treatment.

Under diuron treatment, the decrease of HUFA in *G. gracile* can thus be explained by the inhibition of the desaturation process. Troton et al. (1986) demonstrated identical results on the species *Euglena gracilis* with the decrease of PUFA induced by 5.8 mg.L<sup>-1</sup> of diuron. The authors explained this result by the inhibition of desaturation and the activation of elongation in the process of fatty acid synthesis with diuron contamination. In future studies, it could be relevant to explore genetic responses of desaturase genes concurrent with fatty acid profiles in order to compare their results.

Surprisingly, no effect was observed on fatty acid classes under S-metolachlor treatment. However, a significant decrease of 18:2n6, 18:4n3 and 20:4n6 was observed (p-value < 0.05). It has been shown that the chloroacetamide herbicide metolachlor modifies the synthesis of very long chain fatty acids by inhibiting the action of the enzyme involved in the condensation

of malonyl-CoA and acyl-CoA to produce CO<sub>2</sub> and 3-ketoacyl-CoA and impacts fatty acid elongase (FAE) in *Melosira cf. moniliformis* with the decrease of the fatty acid content of 18:0, 18:1n9, 18:4 and 20:5 (Thakkar et al., 2013). The marine diatom *Melosira cf. moniliformis* contains a FAE-type that converts 16:0-ACP into 18:0-ACP (ACP: Acyl Carrier Protein is an important compound in the process of fatty acid synthesis (Berg et al., 2008)), and 18:1 acid is then produced by n9-desaturation. Moreover, the inhibition of n3 and n6-desaturation induces a decrease of linoleic and linolenic acids content in diatoms (Filimonova et al., 2016b). In order to confirm these hypotheses, it could be relevant to contrast genetic responses of desaturase and elongase genes at the same time.

### **4.3. Fatty acid relevance as biomarker of water contamination**

#### **4.3.1. Complementarity between “classical descriptors” and fatty acid profiles**

The induction of the oxidative stress gene *cat* under diuron treatment suggests that alteration of HUFA content synthesis may be related to ROS production. To respond to oxidative stress, cells can activate enzymatic antioxidants including catalase (CAT), but when antioxidative defenses fail, HUFA are attacked by the free radicals on their bisallylic site resulting in lipid peroxidation (Maronić et al., 2018). Conversely, with S-metolachlor the gene *cat* was induced much more importantly than diuron and as a consequence HUFA are less impacted, even not impacted. Thus, this response could be explained by the efficiency of the antioxidant mechanism.

Studies on higher plants showed that fatty acids impacted by the organic and inorganic contaminants were the most unsaturated fatty acids and were those present in the chloroplast lipids and necessary for photosynthetic activity. Reductions of these lipids resulted in the dismantling of the photosynthetic membranes and prevented PSI and PSII activity (Kobayashi,

2016). It was shown in the literature that the fatty acids 18:4 and 20:5 were mainly linked with MGDG (monogalactosyldiacylglycerol) and DGDG (digalactosyldiacylglycerols), which are mostly chloroplastic lipids (80 %) (Nakamura and Li-Beisson, 2016; Zulu et al., 2018), which can explain the decline of these fatty acids along with photosynthesis in this study. Finally, a decrease in photosynthesis leads to a reduction of the growth rate, that it is consistent with the ACP results in this study. The decrease of photosynthesis activity despite the induction of *dl* gene under diuron treatment could be explained previous by the decrease of HUFA content. Photosynthetic yield was not impacted by S-metolachlor and this might be the result of the efficiency of the *dl* gene against contaminant exposure but also due to very low effect observed on HUFA.

The growth rate was damaged under S-metolachlor treatment but in lower proportion than under diuron stress; it could be explained by the induction of mitochondrial metabolism genes and, at the same time, by the very low effect on HUFA which are membrane structure compounds needful for diatom growth.

Finally, S-metolachlor contamination seemed to be less toxic than diuron at the same environmental concentration. Several hypotheses can be formulated: 1) contrary to other studies, the herbicide was applied alone and without adjuvant, making the toxicity of compounds lower in the present case. Filimonova et al. (2016b) studied the impact on the marine diatom *Thalassiosira weissflogii* of the commercial compound Primextra® Gold TZ, which is produced by Syngenta AG and is made-up of two main active ingredients: 17.75 % (w/w) of terbuthylazine (TBA) and 30.2 % (w/w) of S-metolachlor; 2) the applied concentration was 10 µg.L<sup>-1</sup>, a much lower concentration compared to other studies enabling the defense mechanisms to be efficient. For example, Robert et al. (2007) studied the impact of metolachlor but the concentrations applied were 5.7; 7.09 and 8.5 mg.L<sup>-1</sup>; 3) the high concentrations of nutrients provided by the Dauta medium may have stimulated diatoms metabolism and masked,

at least partially, pesticide toxicity (Guasch et al., 1998; Guasch et al., 2004); 4) the species *G. gracile* is less sensitive than those used in the previous studies. Wood et al. (2016) showed that the mode of action of herbicide did not change the most sensitive benthic diatom response used in their study, except for *G. gracile*. In fact, *G. gracile* was the third most sensitive to the PSII inhibitors but was ranked as less sensitive to herbicide with another mode of action. Larras et al. (2012) reported the same results: PSII inhibitors are more phytotoxic to diatoms than herbicides with other modes of action. In the current study, the finding of diuron being more toxic than S-metolachlor could so be an artefact of the test organism *G. gracile*.

Finally and according to the results of the PCA analysis, it was shown that fatty acid profiles provide complementary information of herbicide pollution compared to pigment content responses where no impacts were found. Conversely, fatty acid profile responses were correlated with photosynthesis and growth rate responses. However, fatty acid profiles give supplementary information of mode of action of herbicide with especially induction of ROS species, conversely to growth rate and photosynthesis descriptors.

#### **4.3.2. Ecological relevance of fatty acid profiles**

Fatty acid profiles analyses were often used to identify relationships in trophic chain (Allan et al., 2010; El-Sabaawi et al., 2009; Kelly and Scheibling, 2012; Van den Meersche et al., 2009). HUFA and especially EPA are necessary in the health and function of all animals at all trophic levels, including plankton invertebrates, fish and humans. Animals are able to convert one form of HUFA to another using elongation and desaturation process but very few can synthesize HUFA *de novo* (Brett and Müller-Navarra, 1997). Moreover, it was shown in the literature that Bacillariophyceae as diatoms had high contents of EPA and thus were excellent quality food resources for zooplankton (Taipale et al., 2013).

However, lipid components and fatty acid profiles are very sensitive to stressors and environmental modifications (Arts et al., 2009). Filimonova et al. (2016b) noted modifications in the FA profiles of the primary producer *T. weissflogii* and primary consumers *A. tonsa* and *A. franciscana* under Primextra® herbicide treatment with the increase of SFA and decrease of PUFA and especially HUFA contents. Thus, it was suggested that pesticide could affect the nutritive value of primary producers and primary consumers impacting the entire trophic chain. Conversely to “classical descriptors”, FA profiles could provide information of nutritional quality of diatom. In the way where diuron decreased HUFA and especially EPA content of *G. gracile*, it could be decreased the nutritional quality of *G. gracile* and consequently the trophic chain could be impacted, conversely to S-metolachlor where no impact where found on EPA. In this context, it could be pertinent in future studies to explore the impact of diuron and S-metolachlor at the same concentration on fatty acid profiles of a consumer of *G. gracile* contaminated by trophic and direct ways.

In summary, while pigment content did not capture pesticide effects at environmentally realistic concentrations, a combination of classical endpoints such as photosynthesis or growth rate reduction and FA profiles is recommended for future studies. The latter endpoints were able to capture pesticide effects on diatoms, with FA profiles yielding additional information on the underlying mode of action (e.g. ROS formation) and the ecological relevance (e.g. trophic impact) of pesticide pollution.

## **5. Conclusions**

The impact of diuron and S-metolachlor at 10 µg.L<sup>-1</sup> was investigated on the freshwater diatom *G. gracile*. At the same concentration, these two pesticides had different effects on “classical descriptors” of *G. gracile*. Fatty acid profiles of *G. gracile* were also affected by these two pesticides, with a considerably stronger response to diuron, suggesting that this pesticide was

more toxic to *G. gracile* in this study than S-metolachlor. Both pesticides seemed to induce ROS formation but according to impacted fatty acids, it could be possible that diuron also inactivated desaturation enzymes. The low but environmentally realistic concentrations tested in the present study did not allow to show a high effect of S-metolachlor on fatty acid profiles and it is difficult to conclude on its mode of action of *G. gracile*'s fatty acid profiles. However, considering the target specificity of herbicides, the fatty acids profiles used to assess chemical toxicity might provide additional information on the mode of action and as consequence on the type of pesticide studied.

Moreover, this study proves the complementarity between the fatty acid profiles and the “classical descriptors” since FA indicate herbicide effects conversely to pigment contents and provide additional nutritive values involving ecological information particularly on the trophic chain.

## **6. Acknowledgements**

This study was carried out with financial support from the French National Research Agency (ANR) in the framework of the Investments for the future Program, within the Cluster of Excellence COTE (ANR-10-LABX-45).

The authors would like to thank Dr Emilie Saulnier-Talbot for the correction of the manuscript language.

## **Supplementary Material**

### ***SI 1 : Nutrient analyses***

#### ***SI 1-1 : Nutrient analyses protocol***

Nutrient analyses were carried out at the beginning (T0) and at the end (T7) of the experiment. Nitrate and orthophosphate concentrations were analyzed using 15 mL (out of 35 mL) of the filtered culture samples diluted 2-fold with ultrapure water before injection (100  $\mu$ L). Analyses were performed by ionic chromatography with chemical suppression (COMPACT 881 IC Pro, Metrohm, Herisau, Switzerland) with a Metrohm 850 IC Conductivity Detector. The separation was performed with a Metrosep A Supp 4/5 Guard/4.0 pre-column followed by a Metrosep A sup 5 - 250/4.0 anion exchange column. The eluent was a solution of 3.2 mM Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> and 1mM NaHCO<sub>3</sub>, and the chemical suppressor was a solution of 10 mM H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>.

Twenty milliliters were sampled for silicate analyses. Soluble silicate concentrations were determined using the colorimetric method with a Shimadzu UV-1800 spectrophotometer (Shimadzu Inc., Kyoto, Japan) according to the French standard NF T90-007 (AFNOR, 2001).

#### ***SI 1-2 : Nutrient concentration results***

Nitrate concentrations remained stable throughout the experiment under all conditions, except for the diuron treatment, where a slight increase was noted between T0 and T7 (Table SI 1). By contrast, orthophosphate and silicate concentrations significantly decreased over time under all conditions. The consumption was similar between control and S-metolachlor-treated cultures, whereas it was less marked under diuron treatment (Table SI 1).

**Table 2 :** SI.1 - Mean ( $\pm$  SE) concentration of nitrates ( $\text{NO}_3^-$ ), orthophosphates ( $\text{PO}_4^-$ ) and silicates (Si) at the beginning (T0) and the end (T7) of the experiment using the taxon *Gomphonema gracile* in control, diuron and S-metolachlor-treated conditions (n = 4).

|                                 | Nitrates – $\text{NO}_3^-$ |                                 | Orthophosphates – $\text{PO}_4^-$ |                                | Silicates - Si        |                                 |
|---------------------------------|----------------------------|---------------------------------|-----------------------------------|--------------------------------|-----------------------|---------------------------------|
|                                 | (mg.L <sup>-1</sup> )      |                                 | (mg.L <sup>-1</sup> )             |                                | (mg.L <sup>-1</sup> ) |                                 |
|                                 | T0                         | T7                              | T0                                | T7                             | T0                    | T7                              |
| <b>Control</b>                  | 37.34 $\pm$ 0.19           | 38.29 $\pm$ 1.20                | 4.88 $\pm$ 0.06                   | 3.91 $\pm$ 0.09 <sup>1</sup>   | 37.15 $\pm$ 3.01      | 0.75 $\pm$ 0.50 <sup>1</sup>    |
| <b>Exposed to diuron</b>        | 37.34 $\pm$ 0.19           | 40.51 $\pm$ 0.50 <sup>1,2</sup> | 4.88 $\pm$ 0.06                   | 4.31 $\pm$ 0.05 <sup>1,2</sup> | 37.15 $\pm$ 3.01      | 10.79 $\pm$ 1.25 <sup>1,2</sup> |
| <b>Exposed to S-metolachlor</b> | 37.34 $\pm$ 0.19           | 38.08 $\pm$ 0.92                | 4.88 $\pm$ 0.06                   | 3.89 $\pm$ 0.07 <sup>1</sup>   | 37.15 $\pm$ 3.01      | 0.39 $\pm$ 0.23 <sup>1</sup>    |

<sup>1</sup> indicates significant differences between T0 and T7, <sup>2</sup> indicates significant differences between control and contaminated conditions (p-value < 0.05).

## **SI 2 : Pesticide analyses**

### **SI 2-1 : Pesticide analyses protocol**

Pesticide analyses were carried out at 4 different times during the experiment: T0, T1, T3 and T7. One milliliter and a half of water was collected for dissolved S-metolachlor and diuron analyses in order to assess real pesticide concentration exposure. A filtration of samples was performed with syringe filters in regenerated cellulose (Spartan®13 mm diameter, pore size 0.45  $\mu\text{m}$ , Whatman®) before storing them in a freezer until HPLC-ESI-MS/MS analyses were performed. Samples were defrosted at room temperature and then pre-concentrated 2-fold

(evaporation of the 1-mL sample using a RapidVap system and reconstitution of the residue in a 90/10 (v/v) mixture of ultrapure water and acetonitrile before the chromatographic analyses). Chromatographic separation was carried out with a Gemini-NX C18 3  $\mu\text{m}$ , 110 Å, 100 mm $\times$ 2 mm column equipped with a SecurityGuard from Phenomenex (Le Pecq, France) and an HPLC Ultimate 3000 (DIONEX, Voisins-le-Bretonneux, France). Quantification was achieved with a triple quadrupole mass spectrometer API 2000 (AB SCIEX, Les Ulis, France). Sample injection volume was 50  $\mu\text{L}$ . The two eluents were acetonitrile and ultrapure water with 5 mM ammonium acetate at a constant flow rate of 400  $\mu\text{L}\cdot\text{min}^{-1}$ .

### ***SI 2-2 : Pesticide concentration results***

Due to analytical problems we were not able to confirm undoubtedly the pesticides concentrations of exposure. However previous experiments with the same protocol have shown a good agreement between exposure (nominal) and measured concentrations (e.g. Coquillé et al. 2018).

### ***SI 3 : Genetic analyses***

**Table 3 : SI.3 -Ten genes studied in this experiment and their associated functions.**

| Gene name<br>(Abbreviation)                          | Accession<br>number | Primer (5' – 3')  | Function of<br>gene          |
|--|---------------------|---|------------------------------|
| $\beta$ -actin ( <i><math>\beta</math>-act</i> )     | HM<br>449707        | CGACAGGACGGCCTGGATGTT <sup>a</sup><br>CCAACCGCGAGCGCATGACG <sup>b</sup>           | Reference<br>genes           |
| Ribosomal protein<br>L7 ( <i>rpl7</i> )              | CM<br>000639        | ATTTTCAAGCGCGCGGAGAAGTA <sup>a</sup><br>CGTAGCCGCGCTTGTAGATGAGCTC <sup>b</sup>    |                              |
| Cytochrome C<br>oxidase subunit I<br>( <i>cox1</i> ) | HM 449704           | CAGTAATTCTCACTGCCAGC <sup>a</sup><br>CCGTGTACCCACCGTTG <sup>b</sup>               | Mitochondrial<br>metabolism  |
| Mitochondrial<br>ribosomal RNA<br>12S (12S)          | HM 449710           | CGCGGTAATACGGAGGATGC <sup>a</sup><br>AGTGCCTTCGCCATCGG <sup>b</sup>               |                              |
| NADH<br>dehydrogenase<br>subunit 5 ( <i>nad5</i> )   | HM 449708           | TCAACTGGTTTGCATACATGGC <sup>a</sup><br>TTGAACTAATCCTGTTGTGGAAGC <sup>b</sup>      |                              |
| D1 protein ( <i>d1</i> )                             | HM 449711           | ACCACCAAATACACCAGCAAC <sup>a</sup><br>GCGTCCTTGGATTTTCGTAGC <sup>b</sup>          | Photosynthetic<br>activity   |
| PsaA protein<br>( <i>psaA</i> )                      | HM 449705           | CATAAAGCGCACCCAAAC <sup>a</sup><br>CTTGGATATAACTGACTCATTAACTCAG<br>G <sup>b</sup> |                              |
| Catalase ( <i>cat</i> )                              | XM<br>002182918     | GTTGATGATTCGGTTGGCTTGGC <sup>a</sup><br>AGTTGAGAGGTGCAAGACGGATG <sup>b</sup>      | Oxidative<br>stress response |
| Glutathione<br>peroxidase ( <i>gpx</i> )             | NC<br>011678        | CAAAGGCGACGTGCTATGCGTC <sup>a</sup><br>GGCTCCTGAGCTCCAAACTGATT <sup>b</sup>       |                              |
| Silaffin-1 protein<br>( <i>sil1</i> )                | XM<br>002286881     | CCGTCACCCTCTCCTGAAAC <sup>a</sup><br>ATGGGAGCAGCGGTAATGG <sup>b</sup>             | Frustule                     |

Abbreviations: <sup>a</sup>Upward primer. <sup>b</sup>Forward primer.



### A retenir de ce *chapitre 3*

---

✓ À la même concentration ( $10 \mu\text{g.L}^{-1}$ ), le diuron et le S-métolachlore ont eu des impacts différents sur les descripteurs « classiques » (taux de croissance, activité photosynthétique, expression des gènes d'intérêt) de *G. gracile*, notamment avec une réponse plus marquée au diuron.

✓ Les profils d'acides gras de *G. gracile* ont également été impactés par ces deux pesticides avec également une réponse considérablement plus forte au diuron suggérant une toxicité plus importante dans cette étude que le S-métolachlore à la concentration testée.

Le diuron a notamment diminué le pourcentage d'acide gras 20:5n3 contrairement au S-métolachlore

✓ Sur la base des impacts observés, les deux pesticides ont semblé induire la formation de ROS, mais selon les acides gras impactés, il serait possible que le diuron ait également inactivé les désaturases.

Les faibles concentrations testées n'ont pas permis de montrer un effet important du S-métolachlore sur les profils d'acides gras rendant ainsi difficile la conclusion quant à son mode d'action toxique sur les diatomées.

✓ Compte tenu de la spécificité de cible des herbicides, les profils d'acides gras utilisés pour évaluer la toxicité chimique pourraient fournir des informations supplémentaires sur le mode d'action et, par conséquent, sur le type de pesticide étudié.

- ✓ Finalement, cette étude prouve la complémentarité entre les profils d'acides gras et les descripteurs « classiques » pour l'espèce *G. gracile* puisque les acides gras :
  - 1) Ont été impactés par les herbicides contrairement aux contenus en pigments ;
  - 2) Apportent des informations écologiques supplémentaires, notamment sur la qualité nutritive des diatomées.
  
- ✓ Cet apport de l'analyse des acides gras au diagnostic de pollution toxique reste cependant à confirmer par des études complémentaires et notamment des réponses des profils d'acides gras d'autres espèces de diatomées.

---

## **Chapitre 4 – Article 2**

# **Variabilité interspécifique des profils d'acides gras et de l'impact de pesticides**

---



✚ Dans le chapitre précédent (chapitre 3), il a été démontré que le diuron avait impacté les descripteurs « classiques » et les profils d'acides gras de la diatomée d'eau douce *G. gracile*, avec notamment la diminution de l'acide gras [20:5n3](#).

La pertinence des profils d'acides gras a également été montrée notamment vis-à-vis de leur apport d'informations supplémentaires tant physiologiques qu'écologiques.

✚ Il a été observé dans la littérature scientifique que les profils d'[acides gras](#) des diatomées se distinguent clairement de ceux des autres groupes de microalgues par des teneurs plus élevées en 16:2n4, 16:3n4 et 16:4n1 (Ying et al., 2000). De plus, presque toutes les diatomées contiennent des proportions élevées d'acides gras 14:0, 16:0, 16:1n7 et [20:5n3](#).

✚ Par ailleurs, certaines études ont montré que la [sensibilité](#) des [diatomées](#) benthiques d'eau douce vis-à-vis des [herbicides](#), basée sur l'expression de gènes d'intérêt (Moisset et al., 2015) jusqu'à la croissance des diatomées (Larras et al., 2012; Roubeix et al., 2011; Wood et al., 2016), différait d'un taxon à l'autre.

✚ Cependant peu d'études à ce jour ont été consacrées à l'analyse de la [variabilité interspécifique](#) des [diatomées](#) d'eau douce en réponse à une contamination par des [herbicides](#) basée sur des critères complémentaires allant du niveau moléculaire au niveau populationnel et en particulier considérant leurs profils d'[acides gras](#).

Dans ce contexte, deux modèles de diatomées d'eau douce, GGRA et NPAL ont été exposés au diuron et S-métolachlore à 10 µg.L<sup>-1</sup> pendant sept jours à 20,5 ° C.

Les effets des pesticides sur les diatomées ont été évalués à l'aide des paramètres biologiques décrits dans le chapitre précédent.

✚ Ce chapitre vise alors à :

- 1) Evaluer la variabilité interspécifique de deux espèces de diatomées d'eau douce en réponse aux herbicides sur des descripteurs « classiques » ;
- 2) Etudier la variabilité interspécifique des profils d'acides gras de deux espèces de diatomées d'eau douce exposées ou non aux contaminants ;
- 3) Comparer les mécanismes de défense de deux espèces de diatomées d'eau douce face à une exposition au diuron et au S-métolachlore.

# **Interspecific variability in diatom responses to herbicide exposure from molecular to populational scales.**

Floriane Demailly<sup>1</sup>, Marina Le Guédard<sup>2</sup>, Imane Elfeky<sup>1</sup>, Laura Malbezin<sup>3</sup>, Mélissa Eon<sup>1</sup>, Jean-Jacques Bessoule<sup>4</sup>, Agnès Feurtet-Mazel<sup>3</sup>, François Delmas<sup>1</sup>, Nicolas Mazzella<sup>1</sup>, Patrice Gonzalez<sup>3</sup>, Soizic Morin<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Irstea, UR EABX, 50 avenue de Verdun, 33612 Cestas cedex - France

<sup>2</sup> LEB Aquitaine Transfert, ADERA, INRA Bordeaux Aquitaine, 71 avenue Edouard Bourlaux, CS 20032, 33140 Villenave d'Ornon – France

<sup>3</sup> University of Bordeaux, EPOC, UMR CNRS 5805, Station Marine d'Arcachon, Place du Docteur Bertrand Peyneau, 33120 Arcachon Cedex – France

<sup>4</sup> CNRS-Univ. Bordeaux, Laboratoire de Biogenèse Membranaire, UMR 5200, INRA Bordeaux Aquitaine, 71 Avenue Edouard Bourlaux, CS 20032, 33140 Villenave d'Ornon – France

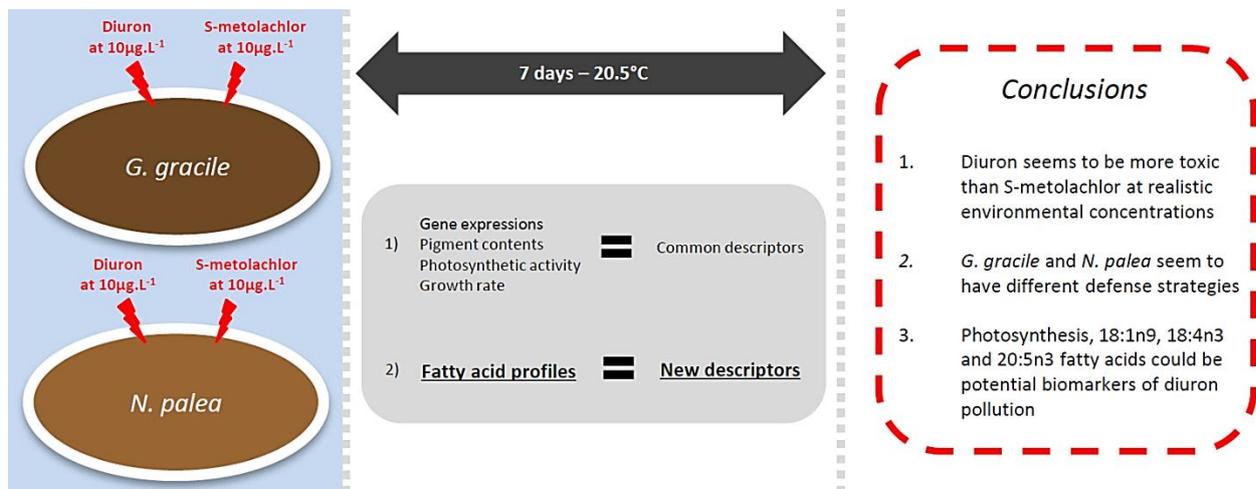
\*Corresponding author.

E-mail address: [floriane.demailly@inrae.fr](mailto:floriane.demailly@inrae.fr) (F. Demailly)

Soumis dans *Ecological Indicators*



## Graphical abstract



## Highlights

- Interspecific variability of diatom response to herbicides was studied.
- Diuron seems to be more toxic than S-metolachlor at an environmentally realistic concentration.
- Diuron induced global impacts on photosynthesis for both species.
- The two diatoms seemed to have different strategies to counteract toxic effects.
- 18:1n9, 18:4n3 and 20:5n3 fatty acids could be potential biomarkers of diuron pollution.



## Abstract

The aim of this study was to evaluate the interspecific variability of the responses of two freshwater diatoms to herbicide contamination on their commonly used descriptors (photosynthesis, growth rate, pigment content, expression levels of target genes) and fatty acid profiles. The targeted species, *Gomphonema gracile* and *Nitzschia palea*, were exposed separately to diuron and S-metolachlor at high environmental concentration ( $10 \mu\text{g.L}^{-1}$ ) over seven days.

Under contaminated treatments, *N. palea* and *G. gracile*'s defense mechanisms differed: 1) under diuron exposure, a higher induction of the antioxidative gene *cat*, as well as a decrease of the 20:5n3 and of pigment content and photosynthesis were noted for *N. palea* compared to *G. gracile*; 2) with S-metolachlor contamination, *N. palea* had a higher induction of the *cat* gene compared to *G. gracile*. No impact of S-metolachlor was observed on fatty acid profiles, pigment content, photosynthetic activity and growth rate of *N. palea* as opposed to *G. gracile*, where a decrease of 18:4n3, chlorophyll *a* content and growth rate were noted.

These results highlight contrasted strategies used by diatoms to cope with pesticide exposure, depending on the species and the toxic mode of action of the chemical.

Despite the different mechanisms of protection involved, global impacts on photosynthetic activity were noted for the two species under diuron contamination.

Finally, the proportions of 20:5n3 and 18:4n3 (decreasing trend) and 18:1n9 (increasing trend) under diuron contamination consistently varied for both species, suggesting they could be potential biomarkers of diuron pollution.



## Keywords

Microalgae; Fatty acids; EPA; Nutritive quality; Diuron; S-metolachlor

### 1. Introduction

Fatty acids (FA) are important molecules for diatoms particularly for the fluidity, production and permeability of cell membranes. They are the main components of lipids which play numerous roles in the cell and are the principal form of stored energy and major constituents of cellular membranes (Pasquaud et al., 2007). Indeed, fatty acids are used as fuel in all metabolic systems for all organisms, having an important role in physiological responses (Arts et al., 2009). For example, saturated and monounsaturated fatty acids (SFA and MUFA) are the principal form of stored energy (Olofsson et al., 2012), while polyunsaturated fatty acids (PUFA with  $> 1$  double bonds) and highly unsaturated fatty acids (HUFA with  $\geq 20$  carbons and  $\geq 3$  double bonds) are major components of cellular membranes with an important role in the regulation of membrane fluidity (Brett and Müller-Navarra, 1997). PUFA and HUFA, especially the 18:4 and 20:5 fatty acids, are mainly linked with MGDG (monogalactosyldiacylglycerol) and DGDG (digalactosyldiacylglycerol). These lipids are mostly chloroplastic lipids (80 %) associated with photosynthetic activity (Nakamura and Li-Beisson, 2016; Zulu et al., 2018).

The fatty acid profiles of diatoms are clearly distinguishable from those of other microalgal groups. The fatty acid fingerprints of diatoms have higher contents of 16:2n4, 16:3n4 and 16:4n1 compared with that in other microalgal groups (Ying et al., 2000). Almost all diatoms contain high proportions of 14:0, 16:0, 16:1n7 and 20:5n3 (EPA: eicosapentaenoic acid) fatty acids. PUFA and HUFA with 18 and 22 carbons are minor constituents compared to other microalgae (Volkman et al., 1989).

In France herbicides are easily detected in waterways due to agricultural activity and rivers are frequently contaminated by these chemicals (SOeS, 2015). It has been shown in the literature that herbicide pollution can impact the differential gene expressions of diatoms. The following genes; mitochondrial metabolism genes (*cox1*: cytochrome C oxidase subunit I, *12S*: mitochondrial ribosomal RNA 12S and *nad5*: NADH dehydrogenase subunit 5), photosynthetic activity genes (*dl1*: *D1 protein* and *psaA*: PsaA protein), oxidative stress response genes (*cat*: catalase and *gpx*: glutathione peroxidase) and a frustule synthesis gene (*sill1*:silaffin-1 protein) were early and sensitive biomarkers of toxicant exposure (Kim Tiam et al. 2012, Moisset et al. 2015, Kim Tiam et al. 2018). Their fatty acid profiles were also shown to be especially impacted by a decrease of HUFA under diuron exposure at high (Troton et al., 1986) and environmental concentrations (Demailly et al., 2019); and under S-metolachlor at environmental concentrations (Demailly et al., 2019; Filimonova et al., 2016b). And finally their physiology and growth were also modified (Kim Tiam et al. 2012, Moisset et al. 2015, Kim Tiam et al. 2018). Diuron is an herbicide which is included in the priority pollutant list of the EU Water Framework Directive (European Commission, 2000). This herbicide is known to generate reactive oxygen species (ROS) that impact proteins, nucleic acids and lipid content (Geoffroy et al., 2002) and can also inhibit polyunsaturated fatty acid synthesis by the inhibition of the desaturation process (Troton et al., 1986). However, its main mode of action is the inhibition of PSII, preventing oxygen production by inhibiting the photosynthetic electron transport chain (Rutherford and Krieger-Liszkay, 2001).

Herbicides belonging to the chloroacetamide family, especially metolachlor, are also found in watercourses. Its active enantiomer is S-metolachlor and is potentially dangerous to the environment, especially to aquatic ecosystems (Liu et al., 2006). Its toxicity is linked to the oxidation of cell components, increasing the production of ROS and setting off lipid peroxidation (Maronić et al., 2018). Its main mode of action, however, is the inhibition of

elongases, which are enzymes responsible for the elongation of very long-chain fatty acids (VLCFAs) (Trenkamp et al., 2004) such as PUFAs and HUFAs. It has also been shown that S-metolachlor inhibits the synthesis of chlorophyll and finally, the growth of organisms (Coquillé et al., 2015).

Numerous studies have shown that the sensitivity of freshwater benthic diatoms to herbicides differed between taxa based on biomarkers such as gene expressions (Moisset et al., 2015) through to diatom growth (Larras et al., 2012; Roubex et al., 2011; Wood et al., 2016). However, to our knowledge, scarce studies have focused on the interspecific variability of freshwater diatom responses to herbicide contamination on complementary endpoints ranging from molecular to populational levels, in particular considering their fatty acid profiles.

In this context, this study aimed: 1) to evaluate the interspecific variability of two freshwater diatom species in response to herbicide contamination on “classical” descriptors such as growth rate, cellular concentration, photosynthetic activity and pigment concentrations and to estimate the subsequent induction or repression of genes (*cox1*, *nad5*, *12s*, *d1*, *psaA*, *cat*, *gpx* and *sill*) known to be putatively differentially expressed during herbicide exposure; 2) to investigate the interspecific variability on fatty acid profiles of two freshwater diatom species with and without contamination; and finally 3) to compare the defense mechanisms of two freshwater diatom species against diuron and S-metolachlor.

## **2. Materials and methods**

To answer these questions, two model freshwater diatoms, *Gomphonema gracile* and *Nitzschia palea*, were exposed to two herbicides, diuron and S-metolachlor, at a high environmental concentration ( $10 \mu\text{g.L}^{-1}$ ) over seven days at 20.5°C. Herbicide effects on diatoms were evaluated with biological parameters and the chemical changes in microcosms were analyzed

using nutrient concentrations (nutrient protocol and results, fatty acids percentages and pigment contents results at T0 are presented in Supporting Information 1).

In this study, the growth rate, photosynthetic activity, genetic responses and pigment contents were considered as “classical descriptors”.

## **2.1. Diatom cultures**

The two cultures of freshwater diatoms were non axenic. They were cultured in sterile Dauta medium (Dauta, 1982) at 20.5°C in a thermostatic chamber 610 XAP (LMS LTD®, UK) at 45  $\mu\text{mol photons.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$  with a dark: light cycle of 8:16h. Every week, the cultures were renewed with a new sterile Dauta medium for the purpose of keeping diatoms in an exponential growth phase.

### **2.1.1. *Gomphonema gracile Ehrenberg, 1838***

*G. gracile* is a benthic pennate diatom of the Bacillariaceae family and is found in biofilm in slightly acidic waters (Germain, 1981). This diatom is considered to be sensitive to macropollutants as described in the *Indice de Polluosensibilité Spécifique* (Cemagref, 1982).

The *G. gracile* culture was isolated in December 2013 from a field sample (collected from the Leyre river, the main tributary of Arcachon Bay, South West France) by micromanipulation under an inverted microscope (Coquillé et al., 2015).

### **2.1.2. *Nitzschia palea (Kützing) Smith, 1856***

*N. palea* is a pennate benthic diatom of the Bacillariaceae family. *N. palea* is frequently found in watercourses and is described as relatively tolerant to herbicides (Larras et al., 2012; Moisset et al., 2015).

The freshwater lotic strain used in this experiment was provided by the Thonon Culture collection (strain reference number TCC583).

## **2.2. Experimental design**

One week before contamination, round borosilicate 100 mL sterile glass flasks were heated at 550 °C for 5h. Glass flasks were inoculated with 40 mL of Dauta culture medium and 40 mL of stock culture in exponential growth phase. This step was carried out in order to adapt the culture to the glass flasks and lasted 7 days.

After these 7 days of adaptation and on the first day of contamination (total of 7 days of contamination), glass flasks were inoculated at 300,000 cell.mL<sup>-1</sup> with Dauta medium and adapted cultures in exponential growth phase (total volume = 80 mL).

For each herbicide, a stock solution of 1mg.L<sup>-1</sup> was prepared from ultrapure Milli-Q water and herbicides: in the form of a 98 % purity liquid for S-metolachlor (CAS number: 87392-12-9) and in the form of powder with a purity of 98.8 % for diuron (CAS number: 330-54-1).

Since the solubility in water of the diuron was low, 42 mg.L<sup>-1</sup> at 25 °C, the solution was sonicated and then heated in order to solubilize the powder in water. The solubility of S-metolachlor in water was of 490 mg.L<sup>-1</sup> at 25 °C, so this solution was prepared in an ordinary manner by diluting the herbicide in ultrapure Milli-Q water.

The solutions being prepared in ultrapure Milli-Q water, these were prepared the day before the experiment and stored in the dark at 4 °C. Finally, three treatments were achieved: a control treatment with no herbicide contamination and two herbicide conditions: 1) diuron and 2) S-metolachlor, both at 10 µg.L<sup>-1</sup> concentration. Controls and herbicide conditions were produced in quadruplicate.

## 2.3. Biological parameters

### 2.3.1. Genetic analysis

Four milliliters of each replicate were sampled on T7 and were centrifuged at 1.500 *g* for 5 min in order to remove the culture medium. Two hundred microliters of RNA later buffer were added to the pellet in order to avoid RNA degradation. Samples were stored overnight at 4 °C and then at -80 °C until the genetic analyses were performed.

The protocols for RNA extraction, Reverse Transcription of RNA and Real-Time q-PCR followed that described by Kim Tiam et al. (2012).

Ten genes were studied; their functions are summarized in [Table 4](#).

The expression of the reference gene (*β-actin*), which was stable and did not show variation with the applied experimental treatments, was used to determine the level of expression of each gene selected for this study. Relative mRNA expression was generated using the  $2^{-\Delta CT}$  method (Livak and Schmittgen, 2001). The expression of the gene *rpl7* was not stable in this study and was not retained as a reference gene.

**Table 4 :** Ten genes studied in this experiment and their associated functions.

| <b>Gene name (<i>abbreviations</i>)</b>          | <b>Function</b>                 |
|--|---------------------------------|
| $\beta$ -actin ( <i><math>\beta</math>-act</i> ) | <u>Reference genes</u>          |
| Ribosomal protein L7 ( <i>rpl7</i> )             |                                 |
| Cytochrome C oxidase subunit I ( <i>cox1</i> )   | <u>Mitochondrial metabolism</u> |
| NADH dehydrogenase subunit 5 ( <i>nad5</i> )     |                                 |
| Mitochondrial ribosomal RNA 12S ( <i>12s</i> )   |                                 |
| D1 protein ( <i>d1</i> )                         | <u>Photosynthetic activity</u>  |
| PsaA protein ( <i>psaA</i> )                     |                                 |
| Catalase ( <i>cat</i> )                          | <u>Oxidative stress</u>         |
| Glutathione peroxidase ( <i>gpx</i> )            |                                 |
| Silaffin-1 protein ( <i>sil1</i> )               | <u>Frustule</u>                 |

### ***2.3.2. Fatty acid profiles***

Twenty milliliters of each condition were sampled at T7 and centrifuged at 1,500 g for 5 min in order to remove medium culture samples. One milliliter of methanol containing 2.5 % H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (v/v) was added to the pellet. The fatty acid methyl esters (FAMES) were obtained following the protocol described by Le Guédard et al. (2008).

FAMES separation was performed with gas chromatography (Agilent 7890A) on a DB-WAX column (15 m x 1  $\mu$ m x 0.53 mm, Agilent) and with flame ionization detection. The temperature of the oven was 150 °C during 1 min, followed by a 5 °C.min<sup>-1</sup> ramp up to 230 °C. This last temperature was maintained for a further 8 min (total run time = 25 min).

### ***2.3.3. Pigment contents***

At T7, an aliquot of 20 mL (T0) and approximately 10 mL (T7) of each sample were filtered on Whatman® GF/C filters and frozen at -20 °C until analysis of chlorophyll *a* and carotenoid contents.

Samples were defrosted at room temperature and 10 mL of 80 % acetone (v/v) were added. Each tube was wrapped with aluminum foil and shaken before being placed in a beaker containing water and sonicated for 20 minutes. Each tube was stored for 10 min in the dark and was then filtered on Whatman® GF/C filters. The filters were recovered from the filter cone. The tubes were rinsed with 80 % acetone (v/v) and the filters were pressed. After that, the filtrates were collected in the initial tube and the final volume was noted.

Chlorophyll *a* concentrations were determined with a Shimadzu UV-1800 spectrophotometer (Shimadzu Inc., Kyoto, Japan). Absorbance measurements were determined using the following wavelengths: 470 nm, 663.2 nm and 648.8 nm.

Chlorophyll *a* and carotenoid concentrations were calculated using Lichtenthaler equations (Lichtenthaler and Wellburn, 1983) and expressed as milligrams per liter (mg.L<sup>-1</sup>).

### ***2.3.4. Photosystem II effective quantum yield***

The PSII effective quantum yield ( $\Phi'_M$ ) was established every day by Pulse-Amplitude Modulated (PAM) fluorescence using a PHYTO-PAM (Heinz Walz, GmbH, Germany) with an emitter-detector unit (PHYTO-ED). The “brown algae” mode was employed. Measurements were performed in 1-cm wide quartz cuvettes on 2 mL aliquots of diatom culture. Five measurements were achieved for all replicates of each condition every day of the experiment.

### **2.3.5. Growth rate**

Every day of the experiment, 1 mL of each sample was fixed in Lugol's preservative (4 %) and stored at 4 °C until the determination of the cellular concentration of diatoms. Cell density was determined by counting using a Nageotte counting chamber (Marienfeld, Germany) and following the following protocol: 1) Each fixed sample was homogenized with a vortex and 125 µL of sample was dropped into the counting chamber; 2) The number of cells was noted in ten fields of counting area (1.25 µL each, 0.5 mm depth) under light microscopy. The distinction between live and dead organisms was estimated by the observation of the color of the chloroplasts and by the observation of their turgescence (Morin et al., 2010); 3) Cellular concentration was expressed as the number of individuals per milliliter; 4) Average growth rates of live organisms were calculated to optimally fit the daily counting over the exponential growth phase, as the slope of the regression line of  $\ln(\text{cell.mL}^{-1})$  over time (days). Control values are therefore control slopes.

### **2.4. Statistical analysis**

In order to detect significant differences between: 1) the control treatment and herbicide-exposed cultures at T7; and 2) the *N. palea* and *G. gracile* conditions at T7; a non-parametric Wilcoxon-Mann-Whitney test was performed using stats package, due to the non-normal distribution of the data (with a p-value < 0.05 considered as statistically significant).

For the purpose of highlighting correlations between different variables, Principal Component Analysis (PCA) was established using tidyverse, ade4, FactoMineR and factoextra packages. In order to show significant difference between groups of individuals, a PERMANOVA test was performed (with a p-value < 0.05 considered as statistically significant) using vegan and devtools packages and six confidence ellipses were represented on the PCA plot.

All statistical analyses were carried out with the R studio software (RStudioTeam, 2016).

### 3. Results

#### 3.1. Biological parameters

##### 3.1.1. Genetic analysis

The results of the expression of the *gpx* and *sill* genes were not exploitable in this study due to an analytical problem.

Diuron treatment induced the photosynthetic gene *d1* in both species, with a value of 18.58 for *G. gracile* and 19.48 for *N. palea* (Table 5). The mitochondrial metabolism gene *nad5* was induced (2.83) in *N. palea* but not in *G. gracile*, where the differential expression was similar to the control treatment (Table 5). The *cat* gene was overexpressed in both species with a significantly ( $p < 0.05$ ) higher expression in *N. palea* (25.14) than in *G. gracile* (2.83) (Table 5).

S-metolachlor induced the *cat* gene for both species with a significantly ( $p < 0.05$ ) higher gene induction in *N. palea* (333) than in *G. gracile* (86.57) (Table 5). The *d1* gene was overexpressed in *G. gracile* (6.31), while no effect was noted for *N. palea* (Table 5). An induction was observed for *psaA* (3.14) in *N. palea*, whereas no effect was found for *G. gracile* (Table 5). Repression of the *cox1* (0.22) and *nad5* (0.13) genes was noticed in *N. palea*, whereas an induction was observed in *G. gracile* (4.99 and 5.08, respectively) (Table 5).

**Table 5 :** Differential gene expression as compared to  $\beta$ -actin in *G. gracile* and *N. palea* exposed to diuron and S-metolachlor (Mean; n = 4) at the end of the experiment (T7). Only factors showing significant differences between control and contaminated conditions (p-value < 0.05) are shown in this table. Significant induction factors (> 2, grey square) and repression factors (< 0.5, hatched square) are indicated compared to the respective controls. /: expression identical to control levels. <sup>a</sup> indicates a significant difference between *G. gracile* and *N. palea*.

| Genes       | Exposed to diuron |                    | Exposed to S-metolachlor |                  |
|-------------|-------------------|--------------------|--------------------------|------------------|
|             | <i>G. gracile</i> | <i>N. palea</i>    | <i>G. gracile</i>        | <i>N. palea</i>  |
| <i>psaA</i> | /                 | /                  | /                        | 3.14             |
| <i>d1</i>   | 18.58             | 19.48              | 6.31                     | /                |
| <i>cox1</i> | /                 | /                  | 4.99                     | 0.22             |
| <i>nad5</i> | /                 | 2.83               | 5.08                     | 0.13             |
| <i>12s</i>  | /                 | /                  | /                        | /                |
| <i>cat</i>  | 2.83              | 25.14 <sup>a</sup> | 86.57                    | 333 <sup>a</sup> |

### 3.1.2. Fatty acid profiles

In control treatments (T7), the three major fatty acids in both species were EPA (*G. gracile*: 28.49 ± 0.53 %; *N. palea*: 27.14 ± 1.16 %), 16:1 (*G. gracile*: 18.21 ± 1.99 %; *N. palea*: 25.03 ± 1.79 %), and 16:0 (*G. gracile*: 16.57 ± 0.50 %; *N. palea*: 16.80 ± 0.25 %) (Table 6). Both species had a similar content of 16:0, 18:1n9, 18:3n3, 20:5n3 (EPA) and PUFA class (Table 6). However, *G. gracile* had a significantly (p < 0.05) higher proportion of 14:0, 16:3n4, 20:4n6, SFA and HUFA classes, and a significantly lower proportion of 16:1, 16:2n4, 16:4n1, 22:6n3

(DHA: docosahexaenoic acid) and MUFA class, compared with *N. palea* (Table 3). *N. palea* had a significantly ( $p < 0.05$ ) higher proportion of 22:6n3 (DHA) ( $4.08 \pm 0.12$  %) than *G. gracile* ( $0.30 \pm 0.60$  %) (Table 6).

Under diuron treatments, the proportion of 14:0, 16:0, 16:4n1, 18:2n6, and total SFA decreased significantly ( $p < 0.05$ ) in *G. gracile* while a significant ( $p < 0.05$ ) increase was observed for 14:0, 16:0 and total SFA in *N. palea* (Table 6). Conversely, the percentage of 16:2n4 increased significantly ( $p < 0.05$ ) in *G. gracile* while the inverse tendency was noted in *N. palea* ( $p < 0.05$ ) (Table 6). No effect was observed on the proportion of 20:4n6 in *G. gracile* while a significant ( $p < 0.05$ ) decrease was found in *N. palea* (Table 6).

However, similar responses were observed between *G. gracile* and *N. palea*, especially with the significant ( $p < 0.05$ ) decrease in the proportion of 18:4n3, 20:5n3 (EPA) and total HUFA (Table 6). It can be noted that the decrease in the proportion of 20:5n3 (EPA) was significantly ( $p < 0.05$ ) higher in *N. palea* (by  $18.55 \pm 4.77$  %) than in *G. gracile* (by  $12.70 \pm 0.34$  %) (Table 6). Furthermore, the proportion of 18:1n9 increased significantly in *G. gracile* and in *N. palea* samples ( $p < 0.05$ ) (Table 6).

Under S-metolachlor treatments, a significant decrease in the proportion of 18:2n6, 18:4n3 and 20:4n6 and a significant ( $p < 0.05$ ) increase in 16:0 were noticed in *G. gracile*, while no impact was observed in *N. palea* (Table 6).

**Table 6:** Fatty acid profiles (%) of *G. gracile* and *N. palea* for control, diuron and S-metolachlor treatment (T7). The values are given as means  $\pm$  SE (n = 4). <sup>a</sup> indicates significant differences between control and contaminated treatments (10  $\mu\text{g.L}^{-1}$ ) at T7, <sup>b</sup> indicates a significant difference between *G. gracile* and *N. palea* at T7 (p < 0.05).

|          |        | Control           |  | Exposed to diuron                              |  | Exposed to S-metolachlor                       |                  |
|----------|--------|-------------------|--|--|--|--|------------------|
|          |        | <i>G. gracile</i> | <i>N. palea</i>                                | <i>G. gracile</i>                              | <i>N. palea</i>                                | <i>G. gracile</i>                              | <i>N. palea</i>  |
|          |        | <i>G. gracile</i> | <i>N. palea</i>                                | <i>G. gracile</i>                              | <i>N. palea</i>                                | <i>G. gracile</i>                              | <i>N. palea</i>  |
| SFA (%)  | 14:0   | 7.01 $\pm$ 0.33   | <b>4.72<sup>b</sup> <math>\pm</math> 0.12</b>  | <b>6.41<sup>a</sup> <math>\pm</math> 0.08</b>  | <b>5.46<sup>a</sup> <math>\pm</math> 0.10</b>  | 6.83 $\pm$ 0.28                                | 4.95 $\pm$ 0.22  |
|          | 16:0   | 16.57 $\pm$ 0.50  | 16.80 $\pm$ 0.25                               | <b>14.97<sup>a</sup> <math>\pm</math> 0.29</b> | <b>19.94<sup>a</sup> <math>\pm</math> 0.89</b> | <b>17.25<sup>a</sup> <math>\pm</math> 0.23</b> | 17.40 $\pm$ 0.57 |
|          | 18:0   | 0                 | 0.19 $\pm$ 0.13                                | 0  | 0.08 $\pm$ 0.16                                | 0  | 0.22 $\pm$ 0.02  |
|          | Total  | 23.58 $\pm$ 0.48  | <b>21.71<sup>b</sup> <math>\pm</math> 0.40</b> | <b>21.38<sup>a</sup> <math>\pm</math> 0.35</b> | <b>25.48<sup>a</sup> <math>\pm</math> 0.88</b> | 24.08 $\pm$ 0.14                               | 22.57 $\pm$ 0.80 |
| MUFA (%) | 16:1   | 18.21 $\pm$ 1.99  | <b>25.03<sup>b</sup> <math>\pm</math> 1.79</b> | 20.64 $\pm$ 0.55                               | 24.93 $\pm$ 2.43                               | 17.88 $\pm$ 0.65                               | 26.29 $\pm$ 1.47 |
|          | 18:1n9 | 3.11 $\pm$ 1.78   | 2.18 $\pm$ 0.11                                | <b>8.20<sup>a</sup> <math>\pm</math> 0.92</b>  | <b>4.94<sup>a</sup> <math>\pm</math> 1.35</b>  | 4.53 $\pm$ 0.23                                | 1.42 $\pm$ 0.91  |
|          | Total  | 21.32 $\pm$ 1.21  | <b>27.21<sup>b</sup> <math>\pm</math> 1.81</b> | <b>28.84<sup>a</sup> <math>\pm</math> 1.36</b> | 29.87 $\pm$ 3.49                               | 22.41 $\pm$ 0.65                               | 27.71 $\pm$ 0.78 |
| PUFA (%) | 16:2n4 | 3.51 $\pm$ 0.09   | <b>6.23<sup>b</sup> <math>\pm</math> 0.33</b>  | <b>3.86<sup>a</sup> <math>\pm</math> 0.07</b>  | <b>4.89<sup>a</sup> <math>\pm</math> 0.54</b>  | 3.52 $\pm$ 0.13                                | 6.02 $\pm$ 0.14  |
|          | 16:3n4 | 11.16 $\pm$ 0.52  | <b>4.47<sup>b</sup> <math>\pm</math> 0.26</b>  | <b>12.73<sup>a</sup> <math>\pm</math> 0.34</b> | 4.52 $\pm$ 0.41                                | 10.65 $\pm$ 0.81                               | 4.20 $\pm$ 0.28  |
|          | 16:4n1 | 1.73 $\pm$ 0.15   | <b>6.25<sup>b</sup> <math>\pm</math> 0.33</b>  | <b>1.51<sup>a</sup> <math>\pm</math> 0.07</b>  | 6.00 $\pm$ 0.47                                | 1.77 $\pm$ 0.12                                | 6.28 $\pm$ 0.04  |
|          | 18:2n6 | 1.44 $\pm$ 0.05   | <b>0.24<sup>b</sup> <math>\pm</math> 0.01</b>  | <b>0.29<sup>a</sup> <math>\pm</math> 0.57</b>  | 0.23 $\pm$ 0.15                                | <b>1.28<sup>a</sup> <math>\pm</math> 0.05</b>  | 0.23 $\pm$ 0.02  |
|          | 18:3n3 | 0.37 $\pm$ 0.25   | 0.51 $\pm$ 0.04                                | 0.28 $\pm$ 0.56                                | 0.78 $\pm$ 0.52                                | 0.38 $\pm$ 0.26                                | 0.53 $\pm$ 0.04  |
|          | 18:4n3 | 0.56 $\pm$ 0.03   | <b>0.33<sup>b</sup> <math>\pm</math> 0.05</b>  | <b>0.00<sup>a</sup> <math>\pm</math> 0.00</b>  | <b>0.05<sup>a</sup> <math>\pm</math> 0.10</b>  | <b>0.52<sup>a</sup> <math>\pm</math> 0.01</b>  | 0.28 $\pm$ 0.02  |
|          | Total  | 18.77 $\pm$ 0.94  | 18.03 $\pm$ 0.86                               | 18.67 $\pm$ 0.87                               | 16.47 $\pm$ 2.05                               | 18.12 $\pm$ 0.95                               | 17.54 $\pm$ 0.41 |

|                    |        |              |                                 |                                 |                                 |                                |              |
|--------------------|--------|--------------|---------------------------------|---------------------------------|---------------------------------|--------------------------------|--------------|
| <b>HUFA</b><br>(%) | 20:4n6 | 5.67 ± 0.27  | <b>1.25<sup>b</sup> ± 0.07</b>  | 5.74 ± 0.33                     | <b>0.78<sup>a</sup> ± 0.52</b>  | <b>5.12<sup>a</sup> ± 0.30</b> | 1.25 ± 0.07  |
|                    | 20:5n3 | 28.49 ± 0.53 | 27.14 ± 1.16                    | <b>24.88<sup>a</sup> ± 0.10</b> | <b>22.11<sup>a</sup> ± 1.29</b> | 28.34 ± 0.50                   | 26.15 ± 1.21 |
|                    | 22:5n3 | 1.85 ± 0.20  | <b>0.59<sup>b</sup> ± 0.04</b>  | 0.50 ± 1.00                     | 0.58 ± 0.39                     | 1.91 ± 0.24                    | 0.59 ± 0.02  |
|                    | 22:6n3 | 0.30 ± 0.60  | <b>4.08<sup>b</sup> ± 0.12</b>  | 0                               | <b>4.72<sup>a</sup> ± 0.29</b>  | 0                              | 4.19 ± 0.07  |
|                    | Total  | 36.31 ± 1.13 | <b>33.06<sup>b</sup> ± 1.20</b> | <b>31.12<sup>a</sup> ± 0.86</b> | <b>28.19<sup>a</sup> ± 2.24</b> | 35.37 ± 0.93                   | 32.18 ± 1.24 |

### 3.1.3. Pigment concentrations

At the end of the experiment (T7) and in control treatments, *N. palea* had significantly higher chlorophyll *a* and carotenoid concentrations ( $p < 0.05$ ) than *G. gracile*. *N. palea*'s chlorophyll *a* and carotenoid concentrations were  $5.56 \pm 1.80 \text{ mg.L}^{-1}$  and  $2.42 \pm 1.03 \text{ mg.L}^{-1}$ , respectively, while those of *G. gracile* were  $1.49 \pm 0.61 \text{ mg.L}^{-1}$  and  $0.42 \pm 0.17 \text{ mg.L}^{-1}$ , respectively.

At T7 and under diuron treatments, *N. palea*'s chlorophyll *a* and carotenoid concentrations decreased significantly ( $p < 0.05$ ) ( $89.23 \pm 2.29 \%$  and  $89.77 \pm 4.39 \%$  of the controls, respectively). Chlorophyll *a* concentrations in *G. gracile* decreased significantly ( $p < 0.05$ ) ( $46.05 \pm 11.62 \%$  of the controls). Contrary to *N. palea*, no significant difference in carotenoid concentrations was observed compared to the controls in *G. gracile* after exposure to diuron.

With S-metolachlor contamination, no significant difference was found compared to the controls in carotenoid concentrations of the two studied species. Similarly, no significant difference was observed compared to the controls in chlorophyll *a* concentration of *N. palea*, while a significant decrease ( $p < 0.05$ ) was observed ( $47.58 \pm 12.64 \%$  of the controls) for *G. gracile*.

### **3.1.4. Photosynthesis**

At T7 and in the control treatments, *N. palea* and *G. gracile* samples had a similar effective quantum yield with values of  $0.52 \pm 0.01$  and  $0.55 \pm 0.02$ , respectively.

Under diuron contamination, the effective quantum yield significantly decreased in the two species: by  $49.33 \pm 1.12$  % from the controls for *N. palea* and by  $26.57 \pm 2.91$  % from the controls for *G. gracile* ( $p < 0.05$ ). Thus, the effective quantum yield of *N. palea* diuron samples was significantly lower ( $p < 0.05$ ) compared to *G. gracile* diuron samples.

With S-metolachlor contamination, no significant difference was found between the control and contaminated treatments in the effective quantum yield of the two studied species.

### **3.1.5. Growth rate**

In the control treatments, *N. palea* and *G. gracile* had a similar growth rate with a value of  $0.16 \pm 0.04$  div.day<sup>-1</sup> for *N. palea* and  $0.11 \pm 0.02$  div.day<sup>-1</sup> for *G. gracile*.

With diuron contamination, no significant difference was noted in the growth rate of *N. palea*, whereas a significant decrease ( $p < 0.05$ ) in the growth rate of *G. gracile* was found (by  $84.32 \pm 25.03$  % from the controls).

With S-metolachlor contamination, no significant difference was found between the control and contaminated treatments in the growth rate of *N. palea*, whereas a significant decrease ( $p < 0.05$ ) of  $29.64 \pm 17.59$  % from the controls was observed for *G. gracile*.

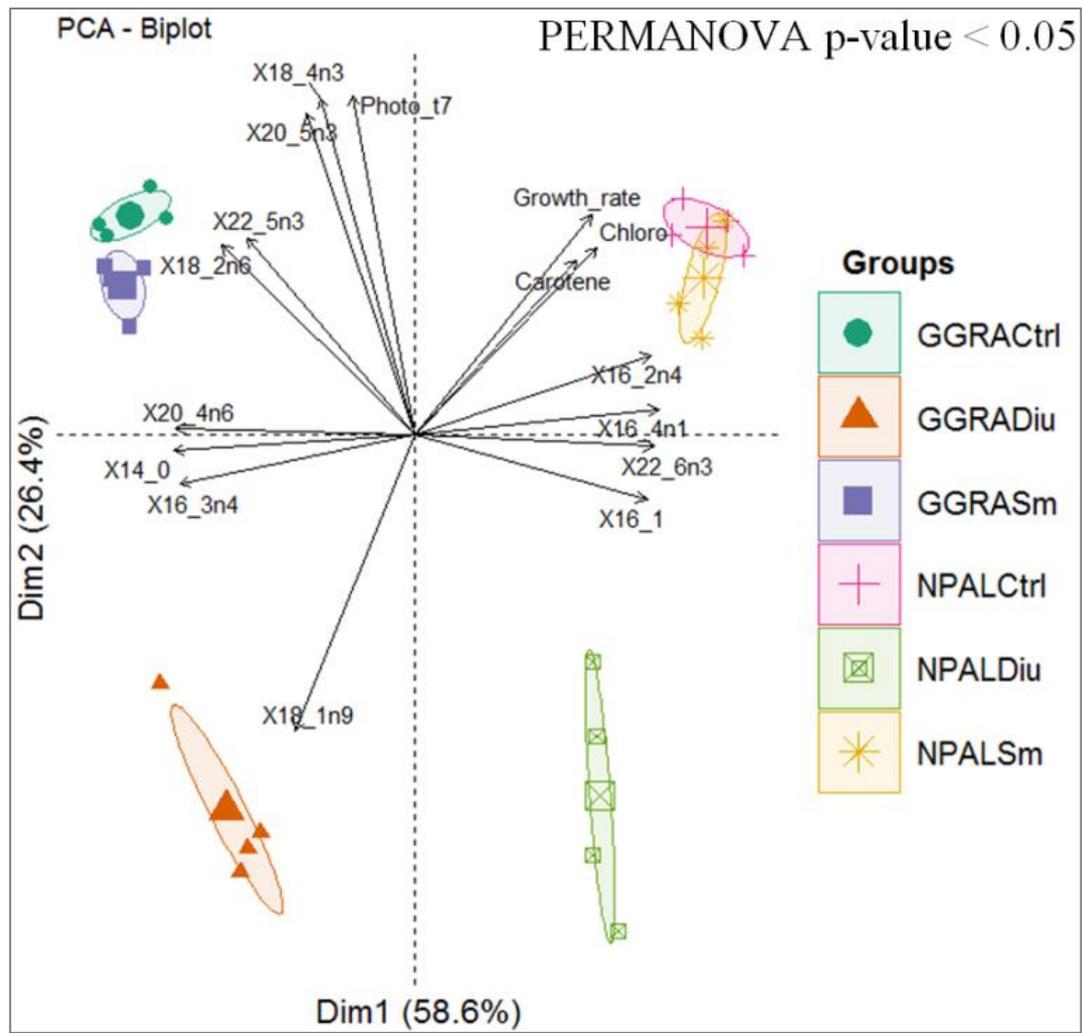
## **3.2. Comparison between *G. gracile* and *N. palea* responses**

“Classical descriptors” and fatty acid profiles were correlated using Principal Component Analysis ([Figure 23](#)). The first dimension (Dim1 on the plot) opposed *N. palea* cultures (individuals NPALCtrl, NPALDiu and NPALSm) containing more 16:1, 16:2n4, 16:4n1 and

DHA and *G. gracile* cultures (individuals GGRACtrl, GGRADiu and GGRASm) containing more 20:4n6, 14:0, 16:3n4.

Photosynthetic activity at T7, percentage of 20:5n3 (EPA) and 18:4n3 were positively correlated with the second dimension (Dim2 on the plot) and negatively correlated with the percentage of the fatty acid 18:1n9. Moreover, both diatom groups contaminated with diuron (GGRADiu and NPALDiu) were separated along the second axis from the control (GGRACtrl, NPALCtrl) and the S-metolachlor treatments (GGRASm, NPALSm) (Figure 23). The cultures exposed to S-metolachlor did not differ much from their respective controls.

The samples contaminated with diuron could be discriminated, with a decrease in the percentage of 20:5n3 (EPA), 18:4n3 and photosynthetic activity at T7 and an increase in the 18:1n9 percentage.



**Figure 23 :** Biplot of Principal Component Analysis for quantitative data performed for the two species on samples with diuron, S-metolachlor and on control treatments at the end of the experiment (T7).

Variables correspond to: Chloro = concentration of chlorophyll *a*; Carotene = concentration of carotenoids; Photo\_T7 = photosynthetic activity at T7; Growth\_rate = growth rate; percentage of each fatty acid was noted as X followed by fatty acid notation. Individuals correspond to: GGRACtrl = *G. gracile* control (green circle); GGRADiu = *G. gracile* with diuron treatment (red triangle); GGRASm = *G. gracile* with S-metolachlor treatment (purple square); NPALCtrl = *N. palea* control (pink cross); NPALDiu = *N. palea* with diuron treatment (green square); NPALSm = *N. palea* with S-metolachlor treatment (yellow star).

The six ellipses correspond to confidence ellipses at 95 %.

## 4. Discussion

### ***4.1. Interspecific variability of fatty acid profiles without contamination***

Numerous studies have shown different fatty acid profiles between diatom species (Boelen et al., 2013; Dunstan et al., 1994; Pratoomyot et al., 2005; Ying et al., 2000) and different EPA and DHA content between and within algal classes (Brown, 2002; Guschina and Harwood, 2006; Lv et al., 2010). Dunstan et al. (1994) observed different fatty acid profiles according to the considered diatom species, especially with the tropical species *Fragilaria pinnata* which lacked both 22:5n6 and DHA. The major HUFA in C-22 were the presumed precursors of these HUFA, 22:4n6 (0.2 %) and 22:5n3 (1 %).

In the current study, *N. palea* culture was made-up of a higher proportion of DHA than *G. gracile* culture. DHA is an essential omega-3 fatty acid with a major role in the maintenance of cell membrane fluidity and is nutritionally important for food webs (Nichols et al., 1993; Nishida and Murata, 1996). This is reflected in other marine studies that *Nitzschia sp* was made-up of a higher proportion of DHA compared to other species (Pratoomyot et al., 2005; Ying et al., 2000). Moreover, *N. palea* was made-up in lower proportions of 18:4n3, 20:4n6 and 22:5n3, compared to *G. gracile*.

Finally, *N. palea* seemed to have a different functioning in its synthetic route of fatty acids which could be explained by a different functioning of the delta 4 desaturase since it is the enzyme that contributes to the synthesis of DHA (Dunstan et al., 1994).

### ***4.2. Contrasted toxicity responses between herbicide treatments***

Table 7 summarizes the principal results of the current study, for both diatom species exposed to herbicides, compared to control treatment at T7.

**Table 7 :** Summary table (based on percentage of inhibition compared to control treatment) of diuron and S-metolachlor-induced damage on *N. palea* and *G. gracile*. - : decrease in studied descriptor; --: greater decrease in studied descriptor than other species considered (p < 0.05); +: increase in studied descriptor; ++ greater increase in studied descriptor than other species considered (p < 0.05).

|                            |                      | <i>Diuron</i>     |                 | <i>S-metolachlor</i> |                 |
|----------------------------|----------------------|-------------------|-----------------|----------------------|-----------------|
|                            |                      | <i>G. gracile</i> | <i>N. palea</i> | <i>G. gracile</i>    | <i>N. palea</i> |
| <b>Gene expressions</b>    | <i>cat</i>           | +                 | ++              | +                    | ++              |
|                            | <i>nad5</i>          | =                 | +               | +                    | -               |
|                            | <i>cox1</i>          | =                 | =               | +                    | -               |
|                            | <i>d1</i>            | +                 | +               | +                    | =               |
|                            | <i>psaA</i>          | =                 | =               | =                    | +               |
| <b>Fatty acid contents</b> | 18:1n9               | +                 | +               | =                    | =               |
|                            | 18:4n3               | -                 | -               | -                    | =               |
|                            | 20:5n3               | -                 | --              | =                    | =               |
|                            | HUFA                 | -                 | -               | =                    | =               |
| <b>Common descriptors</b>  | Chlorophyll <i>a</i> | -                 | --              | -                    | =               |
|                            | Carotenoid           | =                 | -               | =                    | =               |
|                            | Photosynthesis       | -                 | --              | =                    | =               |
|                            | Growth rate          | -                 | =               | -                    | =               |

## **4.2.1. Impact of diuron**

### **4.2.1.1. Different toxicity responses between diatom species**

#### **4.2.1.1.1. ROS toxicity on gene expression, fatty acids and pigment contents**

It was shown in the literature that reactive oxygen species are one of the earliest impacts of contamination stress (Liu et al., 2017). ROS are rapidly converted to a less reactive form when they are present in low quantities (Lauritano et al., 2015). However, when they are present in abnormally high quantities ROS may provoke an alteration of the normal metabolism of the cell (Jaganjac et al., 2016).

To respond to oxidative stress, cells can activate enzymatic antioxidants including *cat* but when antioxidative defenses fail, PUFA and HUFA in organisms are attacked by the free radicals on their bisallylic site resulting in lipid peroxidation (Maronić et al., 2018). Thus, although the induction of the oxidative stress gene *cat* took place in the two species, the alteration of fatty acids 18:4n3, EPA and HUFA content suggested that diuron-induced production of ROS were not sufficiently contained ([Table 7](#)).

In diatoms, pigment content is used as an indicator of cell physiology and as a biomarker of pesticide contaminations (Geoffroy et al., 2002; Teisseire and Vernet, 2001). One of the main biological functions of carotenoids is protection against ROS, carried out by quenching of singlet oxygen and the excited states of photosensitizing molecules, and by the scavenging of free radicals (Domonkos et al., 2013). In the *G. gracile* culture, no impact on carotenoid content was noted under diuron treatment, contrary to the *N. palea* culture, confirming that the neutralization of ROS was less efficient in the latter. However, it is interesting to underline that the carotenoid levels in *G. gracile* were low even in controls that may also explain there was no detectable difference compared to diuron treatment. Similarly, chlorophyll *a* content was more impacted in *N. palea* than in *G. gracile*.

Finally, these results suggest that the antioxidative defense of the two species was not efficient enough to counteract lipid peroxidation by ROS, especially in *N. palea* since the *cat* gene induction, as well as the decrease on EPA and on pigment contents were higher than in *G. gracile* (Table 7).

#### **4.2.1.1.2.     *Photosynthetic activity and growth rate inhibitions***

The potential damages to the physiological state of the organism can be indicated by the effective quantum yield (Bonnineau et al., 2012; Coquillé et al., 2015; Moisset et al., 2015). Diuron acts by blocking electron transport between PSII and PSI (Thomas et al., 2003), impacting photosynthesis in both studied-species. However, a higher inhibition was noted in *N. palea* culture (Table 7).

The fatty acids 18:4 and EPA are mainly related to the chloroplastic lipids MGDG (monogalactosyldiacylglycerol) and DGDG (digalactosyldiacylglycerol) (Zulu et al., 2018). It was suggested that their decrease resulted in the dismantling of the photosynthetic membranes and prevented PSI and PSII activity (Kobayashi, 2016) (Table 7).

Since the *nad5* gene is involved in the functioning of the respiratory chain, its induction in the *N. palea* culture in response to diuron suggests an increase of ATP production to counter the effects of a toxicant (Kim Tiam et al., 2012). Thus, the impact of diuron on the growth rate of *G. gracile* could be explained by the fact that the mitochondrial metabolism gene *nad5* was not induced, contrary to *N. palea*, where no impact was evident on this endpoint (Table 7).

#### **4.2.1.1.3.     *Conclusion on diuron toxicity***

Finally, under diuron treatment, the two studied species seemed to have different defense strategies to counteract toxicant effect: *N. palea*, compared to *G. gracile*, seemed to allocate its energy particularly to molecular defense mechanisms to keep a similar growth rate and

populational level and counteract ROS effects. However, despite a higher induction of the *cat* gene than in *G. gracile*, the antioxidative mechanisms in *N. palea* appeared not to be sufficiently efficient to counteract diuron toxicity.

#### ***4.2.1.2. Similar toxicity responses between the two species under diuron treatment***

Whatever the considered species under diuron treatment, it is interesting to note that EPA, 18:4n3, 18:1n9 and photosynthesis activity fluctuated in the same way as demonstrated by the statistical PCA analysis of the current study (Figure 23). Both diatoms seemed to increase their fatty acids associated with reserve lipids (18:1n9) as a protection mechanism. Indeed, the increase of reserve product accumulation due to toxicant contamination has been reported in many studies (Sicko-Goad and Lazinsky, 1986; Smith and Geider, 1985). Sicko-Goad et al. (1989b) suggested that cells which had a high content of reserve lipids were less vulnerable to the effects of lipophilic contaminants.

However, to confirm this result, it would be necessary in future studies to assess these potential biomarkers in a higher number of diatoms species. If consistent responses are found, fatty acids analysis would provide a good alternative to current biomarkers of diuron pollution in the field, with an ecosystemic perspective (through food quality aspects).

In the same way, it would be necessary to confirm the results of the current study by field studies because of the complexity of the natural environment compared to laboratory experiments.

Some other limitations inherent to laboratory experiments with single species cultures, in contrast with field collected communities, can be mentioned. It was shown in the literature that the sensitivity of algae to chemicals could be altered by the genetic selection in *in vitro* culture (Peterson et al., 1997). Thus, culture responses to herbicide exposure may not be representative

of the periphytic algae community responses in the field due to the different sensitivities of species present in algae community (Badr and Abou-Waly, 1997).

Indeed, natural environments are composed of a mixture of herbicides and not of single substances. Herbicide is mainly found with other contaminants as metallic or nutrient substances (Montuelle et al., 2010). Furthermore, the complexity of natural environments can modulate the effects of a pollutant: by synergism, for example between light and pesticides on periphytic algae (Guasch and Sabater, 1998) or antagonism, for example with nutrients which stimulate the growth of periphyton (Lozano and Pratt, 1994).

#### **4.2.2. Impact of S-metolachlor**

##### **4.2.2.1. ROS toxicity**

Under S-metolachlor treatment, the higher induction of the *cat* gene in the *N. palea* culture appeared to result in more efficient antioxidative defense mechanisms than in *G. gracile* (Table 7). In fact, fatty acid profile and carotenoid content in the *N. palea* culture were not impacted by S-metolachlor suggesting that the toxic impact of ROS was well countered, contrary to *G. gracile* where a decrease in 18:4n3 was shown (Table 7).

##### **4.2.2.2. Growth rate, fatty acids and pigment contents inhibitions**

Contrary to *N. palea*, the significant decrease in the growth rate of *G. gracile* could be linked to an increase in ATP demand in *G. gracile* since the energy in the cell could be reallocated to detoxification mechanisms to fight molecular effects of S-metolachlor (as shown by Kim Tiam et al., 2018 for cadmium). Coquillé et al. (2015) observed a decrease in cell concentrations of *G. gracile* with S-metolachlor contamination at 100 µg.L<sup>-1</sup>.

Furthermore, the inhibition of diatom cell division can result in a decrease of chlorophyll content (Debenest et al., 2009a) which is linked with the decrease of the 18:4 content, a fatty acid of chloroplastic lipids, as mentioned above (Zulu et al., 2018).

#### **4.2.2.3. Conclusion on S-métolachlore toxicity**

Contrary to *G. gracile*, under S-metolachlor *N. palea* seemed to allocate its energy to molecular defense mechanisms to counteract ROS impacts and to maintain a similar growth rate and populational level. Thus, defense mechanisms in *N. palea* appeared different compared to the *G. gracile* culture.

Nevertheless, at a concentration of  $10 \mu\text{g.L}^{-1}$ , S-metolachlor seemed to have lower toxicity for the two species compared to diuron. Many studies observed the toxicity of S-metolachlor on photosynthesis and growth at a concentration of the order of milligrams per liter (Ma et al., 2006; Thakkar et al., 2013). Debenest et al. (2009b) demonstrated that S-metolachlor at  $30 \mu\text{g.L}^{-1}$  decreased growth rate and cell density in periphyton. However, the present study used a lower concentration of S-metolachlor which could explain the slight effect observed on classical descriptors of the two species.

Also, it could be hypothesized in the current study that the elevated nutrient concentration in Dauta medium may have stimulated diatom metabolism and masked, at least partially, S-metolachlor effects on both species and especially on the *N. palea* culture (Guasch et al., 2004). Morin et al. (2009) showed that in the Neste system (South-West France), *N. palea* was found in water with lower pesticide and higher nutrient (nitrate, nitrite, phosphate) concentrations, while *G. gracile* was observed in water with elevated pesticide inputs and lower nutrient concentrations. However, the effect of nutrient concentration on S-metolachlor exposure in the present study was not observed and finally we can only conclude that nutrient preferences of diatoms may be a stronger parameter on their biological responses.

## 5. Conclusion

This study is one of a few to observe the variability of fatty acid profiles between freshwater diatoms with and without herbicide contaminations, namely with diuron and S-metolachlor treatments.

The current results increase knowledge about the defense mechanisms of diatom species against diuron and S-metolachlor contamination at environmental concentrations ( $10 \mu\text{g.L}^{-1}$ ). *N. palea*'s and *G. gracile*'s defense mechanisms were different under herbicide treatments.

*N. palea* seemed to preferentially allocate its energy to defense mechanisms in order to maintain a growth rate similar to the controls, unlike *G. gracile*, for which the growth rate decreased with respect to both herbicide contaminations.

Indeed, genetic analyses demonstrated that:

- The *cat* antioxidant gene, countering ROS molecules, was overexpressed for both diatom species under herbicide contaminations with, however, a higher overexpression for *N. palea*.
- The mitochondrial *nad5* gene involved in the functioning of the respiratory chain and in the production of ATP was more effective for *N. palea* than *G. gracile*.

Finally, we conclude that: 1) without herbicide contamination, fatty acid proportions are different between the two species tested; 2) the proportion of the fatty acids 18:4n3, EPA and 18:1n9 associated with photosynthesis activity could be a potential biomarker of diuron pollution.

## 6. Acknowledgements

This study was carried out with financial support from the French National Research Agency (ANR) as part of the Investments for the future Programme, within the Cluster of Excellence COTE (ANR-10-LABX-45).

The authors would like to thank Dr Emilie Saulnier-Talbot for English language revision of the manuscript, David Carayon and Marie Wach for their help in statistical analyses and Gwilherm Jan for his help in technical details of the experiment.

## Supplementary Material

### SI 1-1 : Nutrient contents protocol

Nutrient concentrations were determined at the beginning (T0) and at the end (T7) of the experiment.

Nitrate and orthophosphate concentrations were analyzed using 15 mL (out of 35 mL) of the filtered culture samples diluted 2-fold with ultrapure water. Injection volume was 100  $\mu$ L. Analyses were performed using ionic chromatography with chemical suppression (COMPACT 881 IC Pro, Metrohm, Herisau, Switzerland) with a Metrohm 850 IC Conductivity Detector. The separation was carried out with a Metrosep A Supp 4/5 Guard/4.0 pre-column followed by a Metrosep A sup 5 - 250/4.0 anion exchange column. The eluent was a solution of 1 mM  $\text{NaHCO}_3$  and 3.2 mM  $\text{Na}_2\text{CO}_3$ . The chemical suppressor was a solution of 10 mM  $\text{H}_2\text{SO}_4$ .

Twenty milliliters were sampled for the analyses of silicate. Soluble silicate concentrations were determined using colorimetric method with a Shimadzu UV-1800 spectrophotometer (Shimadzu Inc., Kyoto, Japan) according to the French standard NF T90-007 (AFNOR, 2001).

### SI 1-2 : Nutrient contents results

Nitrate concentrations significantly decreased for NPAL control treatment between T0 and T7 conversely to GGRA where the nitrate concentration was stable over the time ([Figure 24](#)). With S-metolachlor treatment a significant decrease was found between T0 and T7 for NPAL while no difference was noted for GGRA. Under diuron treatment, no significant difference was observed for NPAL while a significant increase was noted between T0 and T7 for GGRA.

Orthophosphate concentrations significantly decreased between T0 and T7 for NPAL and GGRA control treatments ([Figure 25](#)). A same tendency was shown between T0 and T7 for S-metolachlor treatments for the two studied species. No difference was found between T0 and T7 for diuron treatment for the two species.

The silicate concentrations significantly decreased between T0 and T7 for control treatment for NPAL and GGRA control treatments (Figure 26). Under S-metolachlor treatments the silicate concentrations significantly decreased between T0 and T7 for the two species conversely under diuron treatment where no effect was observed.

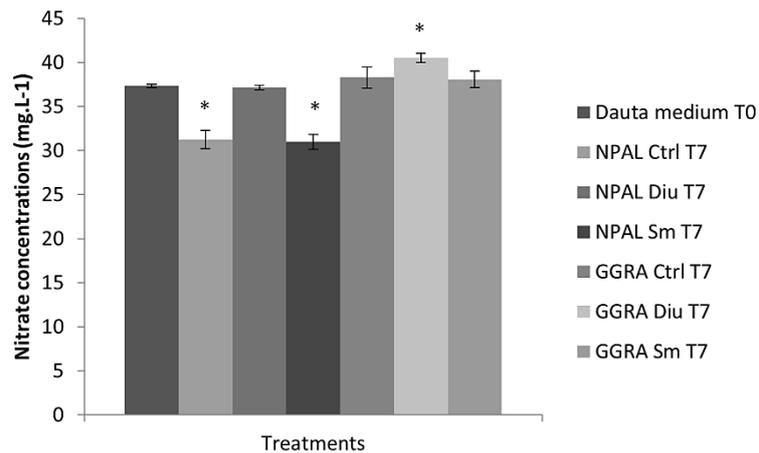


Figure 24 : Nitrate concentrations for Dauta medium at T0 and NPAL and GGRA treatments at T7. \* indicates significant differences between Dauta medium composition at T0 and other conditions ( $p < 0.05$ ). Ctrl = control treatment, Diu = diuron treatment, Sm = S-metolachlor treatment.

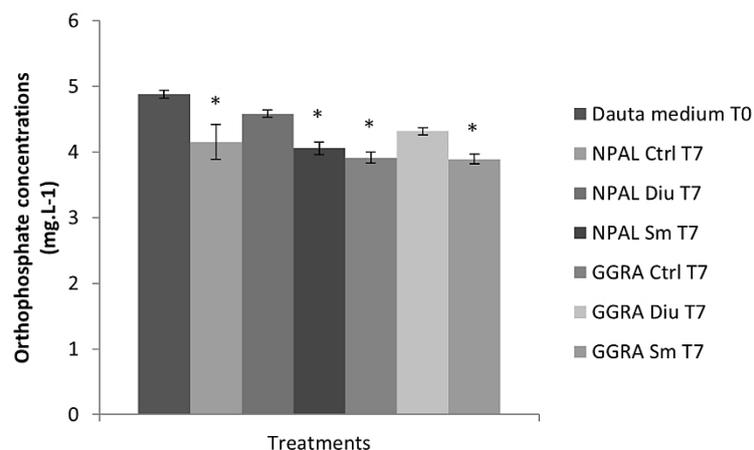


Figure 25 : Orthophosphate concentrations for Dauta medium at T0 and NPAL and GGRA treatments at T7. \* indicates significant differences between Dauta medium composition at T0

and other conditions ( $p < 0.05$ ). Ctrl = control treatment, Diu = diuron treatment, Sm = S-metolachlor treatment.

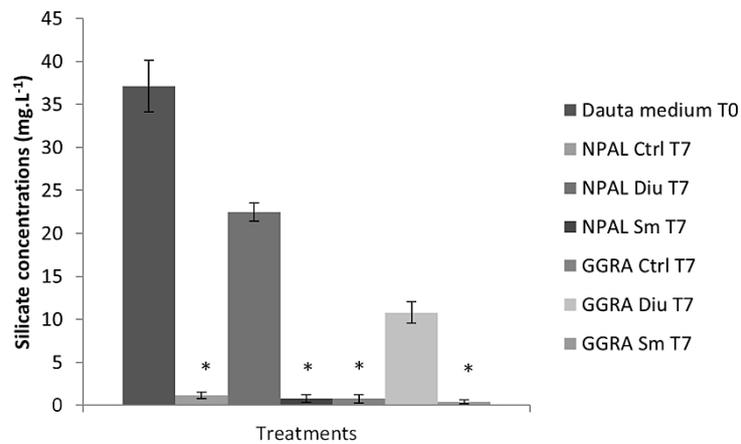


Figure 26 : Silicate concentrations for Dauta medium at T0 and NPAL and GGRA treatments at T7. \* indicates significant differences between Dauta medium composition at T0 and other conditions ( $p < 0.05$ ). Ctrl = control treatment, Diu = diuron treatment, Sm = S-metolachlor treatment.

## SI 1-2 : Biological parameters results: T0

### SI 1-2-1 : Fatty acids percentages

Table 8 : Percentage of fatty acids for *G. gracile* and *N. palea* at T0.

| T0 : control treatment |                   |                 |
|------------------------|-------------------|-----------------|
| Fatty acids (%)        | <i>G. gracile</i> | <i>N. palea</i> |
| 14:0                   | 7.14 ± 0.12       | 5.10 ± 0.08     |
| 16:0                   | 17.6 ± 0.22       | 18.1 ± 0.45     |
| 16:1                   | 18.6 ± 0.18       | 28.2 ± 1.07     |
| 16:2n4                 | 3.61 ± 0.03       | 5.44 ± 0.08     |
| 16:3n4                 | 9.45 ± 0.06       | 3.40 ± 0.11     |
| 16:4n1                 | 1.72 ± 0.02       | 5.62 ± 0.28     |
| 18:0                   | 0.00 ± 0.00       | 0.04 ± 0.09     |
| 18:1n9                 | 5.71 ± 0.12       | 3.33 ± 0.15     |
| 18:2n6                 | 1.64 ± 0.02       | 0.26 ± 0.00     |
| 18:3n3                 | 0.00 ± 0.00       | 0.41 ± 0.01     |
| 18:4n3                 | 0.00 ± 0.00       | 0.29 ± 0.00     |
| 20:4n6                 | 5.63 ± 0.01       | 0.86 ± 0.02     |
| 20:5n3                 | 26.2 ± 0.08       | 23.4 ± 1.11     |
| 22:5n3                 | 2.42 ± 0.04       | 0.70 ± 0.02     |
| 22:6n3                 | 0.29 ± 0.58       | 4.87 ± 0.20     |
| SFA                    | 24.7 ± 0.32       | 23.3 ± 0.49     |
| MUFA                   | 24.3 ± 0.25       | 31.5 ± 1.19     |
| PUFA                   | 16.4 ± 0.12       | 15.4 ± 0.32     |
| HUFA                   | 34.5 ± 0.63       | 29.8 ± 1.32     |

### SI 1-2-1 : Pigment contents

Table 9 : Pigment concentrations for *G. gracile* and *N. palea* at T0.

| T0 : control treatment                       |                   |                 |
|--|-------------------|-----------------|
| Pigment concentrations (mg.L <sup>-1</sup> ) | <i>G. gracile</i> | <i>N. palea</i> |
| Chlorophyll <i>a</i>                         | 0.84 ± 0.36       | 2.19 ± 0.15     |
| Carotenoid                                   | 0.19 ± 0.05       | 0.55 ± 0.17     |



## A retenir de ce *chapitre 4*

---

✓ Cette étude est l'une des rares à observer la **variabilité des profils d'acides gras** entre les **diatomées d'eau douce**, avec ou sans contamination au diuron et S-métolachlore. Par exemple, sans contamination, les proportions en SFA et en HUFA étaient plus importantes et celles en MUFA et DHA moins importantes chez GGRA que NPAL. Sous contamination en diuron les proportions en SFA ont diminué chez GGRA contrairement à NPAL où une augmentation a pu être observée.

✓ Les résultats de cette étude ont permis de mieux connaître les **mécanismes de défense** des espèces de diatomées en réponse à la contamination au diuron et S-métolachlore à des concentrations environnementales, avec nouvelle fois une toxicité plus élevée du le diuron par rapport au S-métolachlore.

✓ NPAL et GGRA ont montré des **mécanismes de défenses différents** face à la contamination au diuron et au S-métolachlore.

NPAL a semblé allouer préférentiellement son énergie aux **mécanismes de défense** dans le but de garder un **taux de croissance** similaire aux témoins contrairement à **GGRA** pour lequel le taux de croissance a décré face à la contamination aux deux herbicides.

En effet, les analyses génétiques ont notamment démontré que :

- **le gène antioxydant *cat*** permettant de combattre les ROS était surexprimé pour les deux espèces de diatomées sous contamination aux herbicides avec cependant une surexpression plus élevée pour NPAL.

- **le gène mitochondrial *nad5*** impliqué dans le fonctionnement de la chaîne respiratoire et dans la production d'ATP était davantage exprimé pour NPAL que GGRA.
  
- ✓ Cette étude a également permis de conclure que la proportion des acides gras **18:1n9**, **18:4n3** et **20:5n3** associés à **l'activité photosynthétique** pourrait constituer un **biomarqueur potentiel** de la pollution au diuron quelle que soit l'espèce étudiée.
  
- ✓ Au vu de ces potentiels biomarqueurs de la pollution au diuron déterminés dans la présente étude (acides gras en complément de l'activité photosynthétique), il serait intéressant d'étudier plus en détail l'impact d'une pollution sur la photosynthèse des diatomées et notamment sur **les lipides associés aux photosystèmes** ; les acides gras étant les principaux composants des **lipides polaires** (de structure, et par exemple des **membranes des thylakoïdes des chloroplastes**) et des **lipides non polaires** (de réserve)(Sajjadi et al., 2018).

---

## **Chapitre 5 – Article 3**

# **Impacts des pesticides sur les lipides de la diatomée *Gomphonema gracile***

---



- ✚ Dans le chapitre précédent (chapitre 4), il a été montré que le diuron était plus toxique que le S-métolachlore sur les profils d'acides gras totaux des diatomées d'eau douce GGRA et NPAL après sept jours de contamination à  $10 \mu\text{g.L}^{-1}$ .  
De plus, une diminution de la teneur en acide gras 20:5n3 a été notée en réponse au diuron pour les deux espèces étudiées.
- ✚ La composition biochimique des microalgues comprend quatre groupes de molécules principaux : les protéines, les glucides, les acides nucléiques et les lipides.  
Les microalgues contiennent des lipides polaires et non polaires et les acides gras sont les principaux composants des lipides (Sajjadi et al., 2018).
- ✚ Certaines études ont démontré l'impact des pesticides sur les profils d'acides gras totaux des microalgues et des diatomées notamment vis-à-vis de l'acide gras 20:5n3 (Demailly et al., 2019; Filimonova et al., 2016b; Filimonova et al., 2016c; Robert et al., 2007).  
Il a été démontré dans la littérature que cet acide gras était principalement lié aux lipides chloroplastiques (Nakamura and Li-Beisson, 2016; Zulu et al., 2018).  
Par ailleurs, il est important de souligner que l'acide gras 20:5n3 joue un rôle écologique essentiel du fait de son importance dans la qualité nutritive des diatomées (Arts et al., 2009).
- ✚ Selon nos connaissances, aucune étude n'a été consacrée à l'effet des herbicides sur la composition lipidique des diatomées d'eau douce et en particulier sur leur teneur en acide gras 20:5n3 dans les différents lipides constitutifs de ces microalgues.

De la même manière, aucune étude n'a porté sur la cinétique d'impact toxique des pesticides vis-à-vis de la composition lipidique des diatomées d'eau douce.

Dans ce contexte, *G. gracile* a été exposée au diuron et au S-métolachlore à  $10 \mu\text{g.L}^{-1}$  et à  $20,5 \text{ }^\circ\text{C}$  durant sept jours.

Dans le but d'observer un impact de la durée d'exposition, toutes les analyses ont été effectuées aux premier (T1), troisième (T3) et dernier (T7) jours de l'expérience.

✚ Cette étude avait ainsi comme objectifs :

- 1) D'évaluer l'effet de la toxicité des herbicides sur la composition lipidique d'une diatomée d'eau douce ;
- 2) De déterminer l'impact de l'herbicide sur la teneur en  $20:5n3$  de chaque lipide ;
- 3) D'examiner le potentiel de l'acide gras  $20:5n3$  en tant que biomarqueur de la pollution en herbicides.

# **Lipid composition and eicosapentaenoic acid as biomarkers of herbicide pollution in the freshwater diatom *Gomphonema gracile***

Floriane Demailly<sup>a,\*</sup>, Marina Le Guédard<sup>b</sup>, Mélissa Eon<sup>a</sup>, Jean-Jacques Bessoule<sup>d</sup>, Agnès Feurtet-Mazel<sup>c</sup>, François Delmas<sup>a</sup>, Nicolas Mazzella<sup>a</sup>, Patrice Gonzalez<sup>c</sup>, Soizic Morin<sup>a,\*</sup>

<sup>a</sup> INRAE, EABX, 50 avenue de Verdun Gazinet, F-33612 Cestas cedex – France

<sup>b</sup> LEB Aquitaine Transfert, ADERA, Bâtiment A3, INRA Bordeaux Aquitaine, 71 avenue Edouard Bourlaux, CS 20032, 33140 Villenave d'Ornon – France

<sup>c</sup> University of Bordeaux, UMR CNRS 5805 EPOC, Station Marine d'Arcachon, Place du Docteur Bertrand Peyneau, 33120 Arcachon Cedex – France

<sup>d</sup> Laboratoire de Biogenèse Membranaire, UMR 5200, Bâtiment A3, INRA Bordeaux Aquitaine, 71 avenue Edouard Bourlaux, CS 20032, 33140 Villenave d'Ornon - France

\*Corresponding authors.

*E-mail address:* [floriane.demailly@inrae.fr](mailto:floriane.demailly@inrae.fr) (F. Demailly); [soizic.morin@inrae.fr](mailto:soizic.morin@inrae.fr) (S. Morin)

Soumis dans *Phytochemistry*



## Highlights

- Diatoms contain non-polar (storage lipids) and polar lipids (structural lipids).
- Fatty acids are the main components of lipids.
- The effect of herbicides on diatom's lipid composition was evaluated.
- Diuron decreased storage lipids content.
- Diuron affected 20:5n3 content in lipids involved in photosynthesis.



## Abstract

Diatoms contain non-polar (storage lipids) and polar lipids (structural lipids). Fatty acids (FA) are the main components of lipids. Many studies have demonstrated an impact of herbicides on total fatty acids of diatoms and especially on eicosapentaenoic acid (EPA) 20:5n3 but no study has focused on the impact of herbicides on their lipid content and composition. This study aimed to: 1) evaluate the effect of herbicides on lipid composition of one freshwater diatom; 2) determine the impact of herbicides on the 20:5n3 content of each lipid; and 3) examine the potential of 20:5n3 as a biomarker of herbicide pollution. To do so, *Gomphonema gracile* was exposed during seven days to diuron and S-metolachlor under realistic environmental conditions ( $10 \mu\text{g.L}^{-1}$ ) and sampling was carried-out three times over its growth cycle (on days 1, 3 and 7).

Total lipid composition was impacted by diuron only at the final sampling time, with a notable decrease of non-polar lipids. Diuron affected the content of 20:5n3 in phosphatidylcholine (PC), phosphatidic acid (PA), diacylglycerylhydroxymethyltrimethyl-b-alanine (DGTA) and digalactosyldiacylglycerol (DGDG) consistently from the seven day of the experiment. These lipids are involved in several physiological processes, particularly in photosynthesis. Also, the results demonstrated that EPA content in the lipids PC, PA/DGTA and DGDG provided an earlier response to diuron exposure than total lipid content.

This study demonstrated higher toxicity of diuron compared to S-metolachlor at  $10 \mu\text{g.L}^{-1}$  on the lipid content of *G. gracile*, especially on EPA.

Based on previous studies and our current findings, it is suggested that EPA content in diatoms could be a good biomarker of diuron pollution in freshwaters.



# Keywords

Microalgae; Diuron; S-metolachlor; Toxicity; Fatty acids; EPA

## 1. Introduction

The biochemical composition of microalgae includes four principal molecule groups: proteins, carbohydrates, nucleic acids and lipids. Among lipids, non-polar (neutral) and polar lipids are found in the cell (Sajjadi et al. 2018).

Non-polar lipids are mainly composed of triacylglycerides (TAG) which act as the main form of energy storage. TAG are easily catabolized to supply the energy to metabolism. They are synthesized under light exposure, accumulated in cytosolic lipid bodies and then reused for the synthesis of polar lipids in the absence of light (Dörmann and Hölzl 2009).

Polar lipids are bound to the organelle membranes (Shimojima et al. 2009, Steffen et al. 2005). The cell membrane protects the cell, maintains its shape and participates directly in membrane fusion events. It is mainly composed of glycolipids and phospholipids (Sajjadi et al. 2018, Sakurai et al. 2007).

For example, in the chloroplast, the thylakoid membrane is composed of uncharged lipids including monogalactosyldiacylglycerol (MGDG) and digalactosyldiacylglycerol (DGDG), and of anionic lipids including sulfoquinovosyldiacylglycerol (SQDG) and phosphatidylglycerol (PG) (Somerville et al. 2000). These lipids in photosynthetic complexes avoid ion diffusion, allowing the generation of a difference in the electrochemical potential across the membrane, necessary to synthesize ATP (Mizusawa and Wada 2012).

Phosphatidylcholine (PC) and phosphatidylethanolamine (PE) are major components of extraplastidial membranes (Dorne et al. 1990). It has been shown in the literature that PC and

PE contribute to the biosynthesis of EPA because desaturation of fatty acids occurs on fatty acids associated with these phospholipids (Kaye et al. 2015, Schneider and Roessler 1994).

Finally, phosphatidic acid (PA) is a signaling molecule and is the common intermediate in the synthesis of all classes of lipids (Mizusawa and Wada 2012).

Other structural lipids are betaine lipids (Cañavate et al. 2016, Dembitsky 1996) such as diacylglyceryltrimethylhomoserine (DGTS) and diacylglycerylhydroxymethyltrimethyl-b-alanine (DGTA). These lipids are assumed to be the phosphorus (P)-free structural counterparts of phospholipids. They are located in extraplastidial membranes (Künzler et al. 1997) and are involved in the transfer of fatty acids from the endoplasmic reticulum to the chloroplasts.

However, lipid composition in microalgae depends on the species, growth phases, but also on the environmental parameters.

It has been shown in the literature that TAG are not related only to energy storage products. For example, an abrupt change in the environmental conditions induces adaptive membrane reorganization: polyunsaturated fatty acids (PUFA)-rich TAG can induce MGDG and other polar lipids with specific acyl groups (Sharma et al. 2012).

Moreover, exposure to herbicides can result in a production of reactive oxygen species (ROS). These highly reactive molecules can interact with cellular components if they are not countered and will thus trigger oxidative stress and finally produce oxidative damage to cellular macromolecules (Dayer et al. 2008). ROS can damage or modify lipid components of chloroplast thylakoid membranes; e.g. by the peroxidation of membrane lipids (Almeida et al. 2019).

Fatty acids (FA) are the main components of lipids (Sajjadi et al. 2018). FA are useful molecules particularly for the production, fluidity and permeability of cell membranes and they are used as fuel in all metabolic systems for all organisms, playing an important role in the physiological response (Arts et al. 2009).

Storage lipids have a high content of saturated and monounsaturated fatty acids (SFA and MUFA) whereas polyunsaturated (PUFA with > 1 double bonds) and highly unsaturated (with  $\geq 20$  carbons and  $\geq 3$  double bonds) fatty acids are included in the polar (mainly structural) lipid fraction (Block et al. 1983, Sakurai et al. 2007, Shimojima et al. 2009). PUFA and HUFA play an important role in the regulation of cell membrane fluidity (Brett and Müller-Navarra 1997). Recent studies have demonstrated the impact of herbicides on total fatty acid profiles of microalgae, including diatoms (Demailly et al. 2019, Filimonova et al. 2018, Filimonova et al. 2016a, Filimonova et al. 2016b, Robert et al. 2007).

In particular, (Demailly et al. submitted) showed that diuron was more toxic than S-metolachlor on total fatty acid profiles of the freshwater diatoms *Gomphonema gracile* and *Nitzschia palea* after seven days of exposure to  $10 \mu\text{g.L}^{-1}$ . Furthermore, they noted a decrease in the content of eicosapentaenoic acid (EPA: 20:5n3) under diuron contamination for the two species studied. Diuron is known to inhibit Photosystem II (PSII) activity by displacing a bound plastoquinone from the QB binding site in PSII, blocking the flow of electrons through PSII, and thus indirectly blocking the transfer of excitation energy from chlorophyll molecules to the PSII reaction centre (Kleczkowski 1994, Oettmeier 1992, Trebst and Draber 1986). This is consistent with the described location of EPA, mainly linked with the chloroplastic lipids MGDG and DGDG (Nakamura and Li-Beisson 2016, Zulu et al. 2018).

To the best of our knowledge, no studies have yet focused on the effect of herbicides on lipid composition of freshwater diatoms and especially on the EPA content of lipid classes.

In this context, this study aimed to:

- 1) Determine and quantify which lipid classes of one freshwater diatom are impacted by herbicides ;
- 2) Observe the impact of herbicides on EPA content of each lipid; and finally,
- 3) Examine the potential of EPA as a biomarker of herbicide pollution.

## 2. Materials and methods

### 2.1. Diatom culture: *Gomphonema gracile* Ehrenberg, 1838

*G. gracile* is a benthic pennate diatom of the Bacillariaceae (Germain 1981) sensitive to herbicide contamination (Coquillé et al. 2015).

*G. gracile* was collected from laboratory monospecific cultures (INRAE, France) (Coquillé et al. 2015, Coquillé and Morin 2019). The freshwater diatom culture was non-axenic and was cultured in sterile Dauta medium (Dauta 1982) in a thermostatic chamber 610 XAP (LMS LTD®, UK) at 20.5 °C and 45  $\mu\text{mol photons.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$  with a dark: light cycle of 8:16 h. In order to keep diatoms in an exponential growth phase, the culture was renewed every week with new sterile Dauta medium.

### 2.2. Experimental design

Round borosilicate sterile glass flasks (100 mL) were heated at 550 °C for 5 h before the experiment. One week before the contamination, glass flasks were inoculated with 40 mL of Dauta culture medium (Dauta 1982) and 40 mL of stock culture in exponential growth phase. This step was carried out in order to adapt the culture to the glass flasks for one week.

At the beginning of the experiment (T0), glass flasks were inoculated at 300,000  $\text{cell.mL}^{-1}$  with Dauta medium containing adapted cultures in exponential growth phase (total volume = 80 mL).

A control treatment without herbicide contamination and two herbicide treatments, one with diuron and one with S-metolachlor at 10  $\mu\text{g.L}^{-1}$ , were achieved at the beginning of the experiment. All treatments were produced in quadruplicate. The experiment lasted seven days, under a nominal temperature of 20.5 °C.

In order to assess the effects of herbicides over time, all biological analyses were performed on the first (T1), third (T3) and last (T7) days of the experiment. Herbicide effects on diatoms were

evaluated with biological parameters. Chemical changes in the microcosms were monitored by analyzing nutrient concentrations (Supporting Information 1).

## **2.3. Biological parameters**

### ***2.3.1. Photosystem II effective quantum yield***

The PSII effective quantum yield, noted  $\Phi'_M$  (Genty et al. 1989), was determined by Pulse-Amplitude Modulated (PAM) fluorescence with a PHYTO-PAM (Heinz Walz GmbH, Germany) using an emitter-detector unit (PHYTO-ED), in “brown algae” mode. Measurements were carried out in 1 cm-wide quartz cuvettes filled with 2 mL of diatom culture. Five  $\Phi'_M$  measurements were carried out for each replicate and at each time (T1, T3 and T7).

### ***2.3.2. Growth rate***

The cellular concentration of diatoms was quantified, at T1, T3 and T7 of the experiment, from 1 mL of each sample fixed in Lugol (4 %) and stored at 4°C until counting was carried out, following the protocol below.

Each fixed sample was vortexed and 125  $\mu\text{L}$  of the sample was dropped in a Nageotte counting chamber (Marienfeld, Germany). The number of cells was determined in ten counting fields (1.25  $\mu\text{L}$  each, 0.5 mm depth) under light microscopy. The difference between live and dead organisms was assessed, as described by Morin et al. (2010). Cell concentration was expressed as the number of individuals per milliliter. Growth rate averages (in divisions/day) were determined to optimally fit the daily counting over the exponential growth phase, as the slope of the regression line of  $\text{Ln}(\text{cell. mL}^{-1})$  over time (days). Control values are therefore control slopes.

### ***2.3.3. Lipid composition***

The following protocol was performed at T1, T3 and T7 of the experiment.

Cells from 30 mL of culture medium were harvested by centrifugation and lipids extracted according to Blight and Dyer (1959). Two milliliters of chloroform/methanol (2:1, v/v) were added and the samples were stored at 4°C until their analysis.

Five hundred µL of water were then added to each sample. They were vortexed and centrifuged for 10 min at 3,800 rpm. A 2-phase system was established, and the organic phase was recovered and transferred to a clean tube. The remaining lipids of the aqueous phase were further extracted by adding two milliliters of chloroform and by shaking. After centrifugation for 10 min at 3,800 rpm, the organic phases were pooled and evaporated to dryness under a stream of nitrogen. The lipids were then resuspended in 70 µL of chloroform/methanol (2:1, v/v) and vortexed before being conserved at -20 °C until separation on TLC plates.

The silica gel zones corresponding to each class of lipid, identified using lipid standards (5 µg of PE, PC, MGDG and SQDG (SIGMA)) and deposited simultaneously on the plate.

The lipids were then purified by one-dimensional thin layer chromatography on 10x10 cm silica gel plates previously cleaned with chloroform (VWR) using chloroform/n-propanol/methyl acetate/methanol/0.25 % aqueous KCl (10:10:10:4:1.6) as a solvent. Routine one-dimensional development was carried out with an automatic developing chamber (ADC2, CAMAG) under controlled humidity of 33 %.

The lipids were then visualized with a solution of 0.001 % (w/v) primulin in 80 % acetone under UV light.

Each class of lipid on the plate were scraped and transferred to a clean tube. Finally, fatty acid profiles for each lipid were analyzed as described below.

### **2.3.4. Fatty acid analyses**

The fatty acid methyl esters (FAMES) from each class of lipids were obtained according to the protocol described by Demailly et al. (2019).

The separation of FAMES was carried out using gas chromatography (Agilent 7890A) on a DB-WAX column (15 m x 1  $\mu$ m x 0.53 mm, Agilent) and with flame ionization detection. The oven temperature was 150 °C for 1 min, followed by a 5 °C.min<sup>-1</sup> ramp to 230 °C. This last temperature was maintained for a further 8 min, bringing the total run time to 25 min.

## **2.4. Statistical analysis**

To detect significant differences between the control treatment and herbicide-exposed cultures, a non-parametric Wilcoxon-Mann-Whitney was performed due to the non-normal distribution of the data (with a p-value < 0.05 considered as statistically significant).

In order to detect significant differences in photosynthetic activity between T1, T3 and T7, a non-parametric Kruskal-Wallis test was performed due to the non-normal distribution of the data and followed by a Dunn *post-hoc* test (with a p-value < 0.05 considered as statistically significant).

In the same way, in order to show the impact of exposure duration on lipid composition, a Principal Response Curve (PRC) was established.

For the purpose of highlighting correlations between different variables, Principal Component Analysis (PCA) was performed. Significant differences between groups of individuals were highlighted with a PERMANOVA test (with a p-value < 0.05 considered as statistically significant). Confidence ellipses (corresponding to 95 %-confidence intervals) were represented on the PCA plot.

All statistical analyses were carried out with the R studio software (RStudioTeam 2016).

### **3. Results**

#### ***3.1.1. Growth rate***

For the control treatment, the growth rate of *G. gracile* was  $0.33 \pm 0.06$  div/day.

With diuron contamination, a significant decrease (p-value < 0.05) in the growth rate was observed ( $0.23 \pm 0.04$  div/day).

With S-metolachlor contamination, no significant difference was observed compared to the control treatment ( $0.30 \pm 0.07$  div/day).

#### ***3.1.2. Photosynthetic activity***

In the control treatment, *G. gracile* had an effective quantum yield of  $0.42 \pm 0.03$ ,  $0.49 \pm 0.01$  and  $0.45 \pm 0.04$  at T1, T3 and T7, respectively. A significant difference (p-value < 0.05) was noted between the effective quantum yields at T1 and T3.

Diuron contamination significantly decreased (p-value < 0.05) the effective quantum yield whatever the sampling time with values of effective quantum yield of  $0.20 \pm 0.01$ ,  $0.19 \pm 0.02$  and  $0.18 \pm 0.01$  at T1, T3 and T7, respectively. However, no significant difference was observed for the value of effective quantum yield between the three sampling times. With S-metolachlor contamination, no significant difference was found compared to the control treatment for the effective quantum yield at any time, with values of  $0.40 \pm 0.02$ ,  $0.47 \pm 0.04$  and  $0.46 \pm 0.01$  at T1, T3 and T7, respectively.

#### ***3.1.3. Lipid composition***

##### ***3.1.3.1. Total lipid composition***

As shown in Table 10, *G. gracile* in the control treatment was mainly composed of neutral lipids and MGDG at the three sampling times (percentages > 5 %).

The content of DGDG was significantly higher at T7 compared to T1. Conversely, the proportion of neutral lipids decreased significantly between T3 and T7 (Table 10).

Diuron exposure significantly decreased the proportion of neutral lipids at T3 and T7. Conversely, diuron significantly increased MGDG content at T3, FFA and DGTS content at T3 and T7 and PG and PE content at T7 (Table 10).

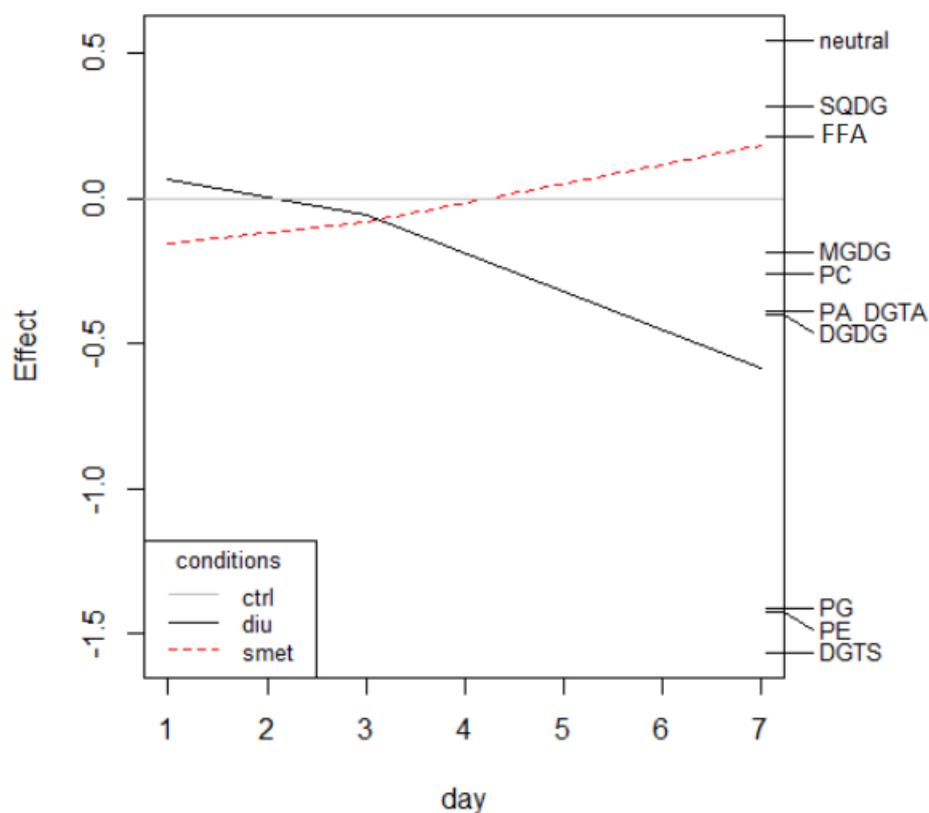
Under S-metolachlor contamination, the proportion of SQDG significantly decreased at T1, the content of neutral lipids significantly decreased at T3, the DGDG, PE and DGTS content significantly decreased at T7. Conversely, the content of PA/DGTA significantly increased at T1, DGTS content significantly increased at T1 and T3, MGDG and FFA proportion increased at T3 (Table 10).

**Table 10 :** Proportion of total FA in each lipid (%) in control, diuron and S-metolachlor treatments at T1, T3 and T7. The values are given as means (n = 4) ± SE. a bolded text in orange: indicates significant differences between control treatment at T7 and the other sampling times (T1 and/or T3) (p < 0.05). \* bolded text in red: indicates significant differences between control and contaminated treatments (p < 0.05). Ctrl = Control treatment; Diu = Diuron treatment; Smet = S-metolachlor treatment.

| Lipids   | T1           |                     |                     | T3           |                      |                      | T7                              |                       |                     |
|----------|--------------|---------------------|---------------------|--------------|----------------------|----------------------|---------------------------------|-----------------------|---------------------|
|          | Ctrl         | Diu                 | Smet                | Ctrl         | Diu                  | Smet                 | Ctrl                            | Diu                   | Smet                |
| Neutrals | 59.01 ± 3.44 | 55.80 ± 2.02        | 53.72 ± 5.20        | 70.38 ± 1.20 | <b>66.66 ± 2.99*</b> | <b>66.08 ± 0.93*</b> | <b>54.27 ± 3.27<sup>a</sup></b> | <b>42.07 ± 11.75*</b> | 56.42 ± 14.39       |
| MGDG     | 9.19 ± 6.04  | 13.79 ± 9.93        | 11.52 ± 3.95        | 9.67 ± 1.21  | <b>11.55 ± 0.50*</b> | <b>11.49 ± 0.98*</b> | 18.86 ± 1.76                    | 23.12 ± 6.22          | 21.19 ± 14.73       |
| FFA      | 2.96 ± 0.76  | 3.78 ± 1.97         | 3.42 ± 2.13         | 1.91 ± 0.35  | <b>3.23 ± 1.01*</b>  | <b>2.78 ± 0.47*</b>  | <b>3.23 ± 0.27<sup>a</sup></b>  | <b>5.85 ± 1.39*</b>   | 3.51 ± 0.58         |
| DGDG     | 2.67 ± 0.65  | 2.75 ± 0.28         | 6.76 ± 3.61         | 3.11 ± 0.96  | 3.21 ± 0.79          | 2.89 ± 0.61          | <b>4.92 ± 1.67<sup>a</sup></b>  | 3.92 ± 0.80           | <b>3.29 ± 0.28*</b> |
| SQDG     | 8.19 ± 0.55  | 6.50 ± 1.84         | <b>5.77 ± 1.67*</b> | 3.78 ± 0.54  | 3.96 ± 0.92          | 4.23 ± 0.31          | <b>4.94 ± 0.82<sup>a</sup></b>  | 3.85 ± 1.82           | 4.76 ± 1.04         |
| PG       | 2.92 ± 0.10  | 2.80 ± 1.08         | 2.04 ± 0.51         | 1.55 ± 0.11  | 1.39 ± 0.38          | 1.94 ± 0.15          | 1.28 ± 0.74                     | <b>4.71 ± 2.52*</b>   | 1.27 ± 0.18         |
| PE       | 4.27 ± 0.61  | <b>2.37 ± 0.70*</b> | 3.30 ± 1.30         | 1.68 ± 0.17  | 2.26 ± 0.20          | 2.19 ± 0.68          | <b>2.35 ± 0.43<sup>a</sup></b>  | <b>5.25 ± 1.99*</b>   | <b>1.74 ± 0.28*</b> |
| DGTS     | 1.24 ± 0.49  | 1.67 ± 0.49         | <b>2.11 ± 0.41*</b> | 0.81 ± 0.06  | <b>1.13 ± 0.24*</b>  | <b>1.19 ± 0.23*</b>  | 1.34 ± 0.35                     | <b>2.66 ± 1.15*</b>   | <b>0.60 ± 0.09*</b> |
| PA/DGTA  | 2.54 ± 1.43  | 3.82 ± 1.51         | <b>5.91 ± 1.99*</b> | 2.85 ± 0.38  | 2.85 ± 0.55          | 3.24 ± 0.26          | 3.53 ± 0.44                     | 3.46 ± 1.37           | 3.19 ± 0.31         |
| PC       | 7.00 ± 2.43  | 6.72 ± 2.00         | 5.45 ± 1.19         | 4.26 ± 0.80  | 3.76 ± 0.77          | 3.96 ± 0.30          | 5.29 ± 0.48                     | 5.11 ± 1.19           | 4.02 ± 1.46         |

According to the Principal Responses Curves ([Figure 27](#)), the effect of the S-metolachlor on lipids of *G. gracile* over time did not differ significantly from the control treatment (effect well

below 0.5). Conversely, the curve corresponding to diuron contamination showed an unmarked divergence from the control treatment at T7, correlated with increased amounts of PG, PE and DGTS lipids and with a decrease in neutral lipids compared to the control trajectories.



**Figure 27 :** Diuron and S-metolachlor-induced changes in lipid composition over time, compared to the control treatment (ctrl) as a reference trajectory. The Principal Response Curve displays the effect of diuron (diu) and S-metolachlor (smet) treatments on the ten studied lipids during the three-sampling time exposures (T1, T3 and T7), on the X-axis. A divergence  $> 0.5$  from the control line was considered a significant effect.

### 3.1.3.2. EPA distribution in lipids

As shown in Table 11, EPA in *G. gracile* in the control treatment was mainly abundant in neutral lipids, MGDG and PC at the three sampling times (percentages  $> 1\%$ ).

Diuron significantly increased EPA content in neutral lipids at T1, FFA content at T3 and PG proportion at T7. Conversely, a significant decrease in the proportion of EPA in PE was noted at T1 and in neutrals lipids, DGDG, PA/DGTA and PC at T7. The number of lipids containing impacted EPA increased with time under diuron exposure (Table 11).

Under S-metolachlor contamination, the EPA content in neutral lipids and PA/DGTA significantly increased at T1. EPA content in MGDG, FFA and SQDG significantly increased at T3. Conversely, proportions of EPA in PE significantly decreased at T7. EPA content in DGDG and DGTS significantly increased at T1 then significantly decreased at T7 (Table 11).

**Table 11 :** Proportions of EPA (%) in each lipid (Table 10) in control, diuron and S-metolachlor treatments at T1, T3 and T7. The values are given as means (n = 4) ± SE. \* bolded text in red: indicates significant differences between control and contaminated treatments (p < 0.05). Ctrl = Control treatment; Diu = Diuron treatment; Smet = S-metolachlor treatment.

| EPA in Lipids | T1          |                     |                     | T3          |                     |                     | T7          |                     |                     |
|---------------|-------------|---------------------|---------------------|-------------|---------------------|---------------------|-------------|---------------------|---------------------|
|               | <i>Ctrl</i> | <i>Diu</i>          | <i>Smet</i>         | <i>Ctrl</i> | <i>Diu</i>          | <i>Smet</i>         | <i>Ctrl</i> | <i>Diu</i>          | <i>Smet</i>         |
| Neutrals      | 2.36 ± 0.15 | <b>3.24 ± 0.63*</b> | <b>2.87 ± 0.22*</b> | 3.56 ± 0.39 | 3.44 ± 0.67         | 3.59 ± 0.30         | 3.35 ± 0.11 | <b>2.57 ± 0.67*</b> | 3.03 ± 1.09         |
|               | 1.27 ± 0.75 | 1.51 ± 0.48         | 2.17 ± 0.69         | 1.97 ± 0.25 | 2.28 ± 0.55         | <b>2.39 ± 0.28*</b> | 3.49 ± 0.44 | 2.79 ± 0.65         | 2.82 ± 1.16         |
| FFA           | 0.33 ± 0.07 | 0.36 ± 0.24         | 0.40 ± 0.28         | 0.19 ± 0.03 | <b>0.33 ± 0.12*</b> | <b>0.32 ± 0.07*</b> | 0.52 ± 0.06 | 0.61 ± 0.23         | 1.23 ± 1.65         |
|               | 0.64 ± 0.13 | 0.54 ± 0.16         | <b>1.70 ± 1.02*</b> | 0.79 ± 0.25 | 0.79 ± 0.28         | 0.77 ± 0.13         | 1.33 ± 0.37 | <b>0.71 ± 0.23*</b> | <b>0.86 ± 0.09*</b> |
| SQDG          | 0.49 ± 0.12 | 0.33 ± 0.14         | 0.32 ± 0.11         | 0.21 ± 0.02 | 0.25 ± 0.05         | <b>0.30 ± 0.02*</b> | 0.41 ± 0.09 | 0.37 ± 0.09         | 0.33 ± 0.06         |
|               | 0.29 ± 0.09 | 0.26 ± 0.16         | 0.24 ± 0.05         | 0.28 ± 0.03 | 0.26 ± 0.02         | 0.26 ± 0.02         | 0.20 ± 0.12 | <b>0.81 ± 0.42*</b> | 0.24 ± 0.05         |
| PE            | 0.23 ± 0.04 | <b>0.15 ± 0.04*</b> | 0.24 ± 0.08         | 0.11 ± 0.01 | 0.18 ± 0.03         | 0.18 ± 0.05         | 0.20 ± 0.04 | 0.31 ± 0.18         | <b>0.08 ± 0.01*</b> |
|               | 0.15 ± 0.02 | 0.24 ± 0.09         | <b>0.29 ± 0.04*</b> | 0.13 ± 0.01 | 0.16 ± 0.02         | 0.12 ± 0.02         | 0.13 ± 0.03 | 0.26 ± 0.14         | <b>0.09 ± 0.01*</b> |
| PA/DGTA       | 0.71 ± 0.51 | 1.20 ± 0.36         | <b>2.06 ± 0.55*</b> | 1.06 ± 0.18 | 0.81 ± 0.22         | 1.17 ± 0.18         | 1.35 ± 0.22 | <b>0.90 ± 0.30*</b> | 1.18 ± 1.20         |
|               | 1.26 ± 0.30 | 1.56 ± 0.83         | 1.56 ± 0.45         | 1.32 ± 0.29 | 0.84 ± 0.32         | 1.18 ± 0.10         | 1.80 ± 0.23 | <b>1.14 ± 0.17*</b> | 1.24 ± 0.46         |

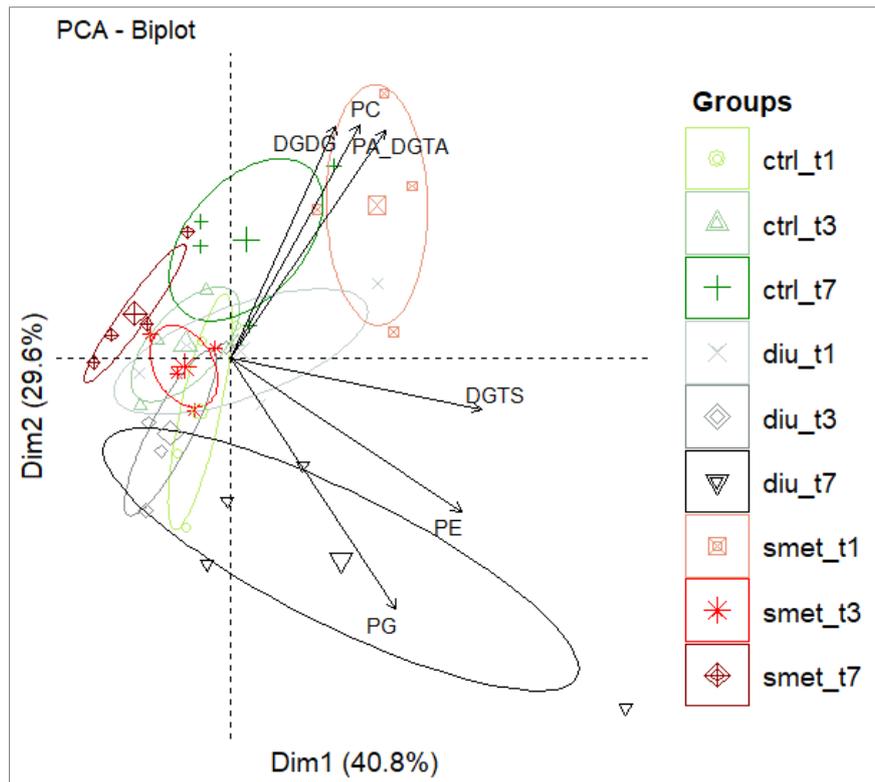
The Principal Component Analysis biplot (Figure 28) was implemented with EPA proportions of each lipid (Table 10) for all treatments (control, diuron and S-metolachlor) and the three

sampling times (T1, T3 and T7). The results were based on the values of variables that were well represented in the PCA statistical plan.

The biplot shows that the variable EPA in DGTS was mostly correlated (positively) with Dim 1. The variable EPA in PE was also highly correlated (positively) with Dim 1. The variable EPA in PG was mostly correlated (negatively) with Dim 2. The variable EPA in PC was mostly correlated (positively) with Dim 2. The variable EPA in DGDG and PA/DGTA was also highly correlated (positively) with Dim 2.

The first dimension (Dim 1) opposed ctrl\_t1 (left) and smet\_t1 (right), which can be related to an increase of EPA content in DGTS in smet\_t1 individual. Furthermore, according to the confidence ellipses, a significant difference between control and s-metolachlor individuals was observed for T1.

The second dimension opposed the ctrl\_t7 (up) and diu\_t7 (down) individuals, which can be related to the decrease of EPA content in PA/DGTA, PC and DGDG in diu\_t7 individual. Furthermore, the confidence ellipses highlighted a significant difference between control and diuron individuals for T7.



**Figure 28 :** Biplot of Principal Component Analysis for quantitative data performed for *G. gracile* samples with control, diuron and S-metolachlor treatments. Variables correspond to EPA in each lipid. Individuals correspond to: ctrl\_t1 = control treatment at T1; ctrl\_t3 = control treatment at T3; ctrl\_t7 = control treatment at T7; diu\_t1 = diuron treatment at T1; diu\_t3 = diuron treatment at T3; diu\_t7 = diuron treatment at T7; smet\_t1 = S-metolachlor treatment at T1; smet\_t3 = S-metolachlor treatment at T3; smet\_t7 = S-metolachlor treatment at T7.

The ellipses correspond to 95 %-confidence intervals.

PERMANOVA p value < 0.05.

## 4. Discussion

### 4.1.Lipid composition of diatoms

Diatoms contain polar and non-polar lipids and according to their metabolic rate, the proportion of these lipids varies over different growth phases of the organisms. PUFA and HUFA mostly

make-up the structural lipid fraction and SFA and MUFA constitute the storage lipid fraction (Hu et al. 2008, Olofsson et al. 2012, Torres et al. 2013).

The results of the present study agree with those of Opute (1974), who showed that the two freshwater diatoms *Nitzschia palea* and *N. muralis* were mainly composed of TAG, PG, PC, PE, MGDG, DGDG, SQDG.

Also, they noted that EPA was mainly found in PC, MGDG and PE in *N. palea* and in MGDG and TAG in *N. muralis*. In the current study, EPA in *G. gracile* was mainly found in neutral lipids but was abundant in MGDG and PC, approaching the results found for *N. palea* and *N. muralis* (Opute 1974).

#### **4.1.1. Storage lipids**

Non-polar (neutral) lipids play a key role in the storage of energy; as monoacylglycerides (MAG), diacylglycerides (DAG) and triacylglycerides (TAG). TAG are the main storage compounds of diatoms, which have a high content of SFA and MUFA (Sajjadi et al. 2018).

In this study, a significant decrease in neutral lipids between T3 and T7 was highlighted, in line with the knowledge that structural components are needed for growth and the surplus of neutral lipid accumulation was reduced in diatoms during the exponential growth phase (Li et al. 2014). Moreover, most microalgae preferentially accumulate TAG during the stationary phase (Berge et al. 1995, Brown et al. 1996, Tonon et al. 2002).

#### **4.1.2. Structural lipids**

Polar lipids are structure lipids, like phospholipids and glycolipids. Phospholipids make-up cell membranes and act as a selectively permeable barrier for organelles and cells. Also, they participate in membrane fusion events. Polar lipids can behave as intermediates in cell signaling

pathways, contributing to the response to environmental parameter changes (Sajjadi et al. 2018).

According to the nature of their head group, MGDG, DGDG, PG and SQDG play a specific role in photosynthesis (Mizusawa and Wada 2012). The main function of MGDG and DGDG is to serve as structural lipids (Murata and Siegenthaler 1998). DGDG are recognized as important for the proper structure and function of PSII, especially on the donor side (Sakurai et al. 2007, Steffen et al. 2005). In the current study, an increase of DGDG content was noted during the exponential growth phase and matched with results found in the literature (Kates and Volcani 1966).

## **4.2. Impact of contaminants on lipid composition of diatoms**

It is known that herbicides affect cell biological components leading to the deterioration of biological systems (Badmus et al. 2011). Also, it is interesting to note that Dupraz et al. (2016) stressed the relevance of conducting further studies on lipid responses following herbicide contamination, especially to determine and quantify which lipid classes are impacted. In fact, lipid classes could provide additional information about the effects of herbicides on the nutritional quality of diatoms, since they are commonly used in aquaculture (Dupraz et al. 2016).

### **4.2.1. Storage lipids**

In this study, we showed a decrease in the proportion of total neutral lipids after exposure to diuron as well as EPA content in neutral lipids.

Similarly, Dupraz et al. (2016, 2019) used the green lipophilic fluorochrome BODIPY<sup>505/515</sup>, which colors neutral lipids, and which corresponds to oil droplets accumulated inside cells (Hu et al. 2008). They noted a diuron-induced reduction in the production of storage lipids in the

marine microalgae *Tisochrysis lutea* and *Skeletonema marinoi* (Dupraz et al. 2019) and in *Tetraselmis suecica* (Dupraz et al. 2016).

The decrease observed in storage lipid content could be explained by the decrease of photosynthetic efficiency. In fact, depending on the photosynthesis light phase, many precursors, particularly those used in lipid biosynthesis, are produced by the Calvin cycle (Masojídek et al. 2004). Thus, the decrease of photosynthetic efficiency could impact the production of these precursors and finally, storage lipid content.

On the other hand, microalgae are known to produce storage lipids in response to stressful conditions as a result of reduced cell division; for example, under nitrogen limitation conditions (da Costa et al. 2017, Zhu et al. 2016).

#### **4.2.2. Structural lipids**

It has been shown in the literature that ROS can cause lipid peroxidation in cell membranes (Almeida et al. 2019). An increase in ROS resulted in a significant increase in lipid peroxidation levels and indicated an increase in the production of oxyl-radicals such as HO %, ROO %, RO % and ONOO- (Cheloni and Slaveykova 2013). In photosynthetic organisms, ROS can also damage lipid compounds of chloroplast thylakoid membranes such as MGDG, DGDG, SQDG and PG (Almeida et al. 2019).

The elongation of FA and omega 3 and 6 desaturation processes can be inhibited by the production of ROS, impacting HUFA molecules (Cohen et al. 1993, Robert et al. 2007). In particular, HUFA in lipids are attacked by the free radicals on their bis-allylic site (Filimonova et al. 2018, Maronić et al. 2018).

In the current study, the content of EPA in *G. gracile* decreased synchronously with photosynthesis activity impairment in the chloroplast lipid DGDG and lipid PA/DGTA,

presumably involved in the transfer of fatty acids from the endoplasmic reticulum to the chloroplasts (Sayanova et al. 2017, Zulu et al. 2018).

Also, the content of EPA in *G. gracile* decreased in PC after seven days of diuron contamination. As mentioned previously, PC contributes to the biosynthesis of EPA (Kaye et al. 2015, Schneider and Roessler 1994). The decrease of EPA content in PC could indicate an early response of PC to diuron contamination.

S-metolachlor was found to have impacted total proportion of DGTS, PE and DGDG as well as EPA content on the seven day of the experiment.

As mentioned previously, the thylakoid membrane is composed of uncharged lipids including DGDG, DGTS and PE which are located in extraplastidial membranes (Künzler et al. 1997).

However, as discussed in Demailly et al. (submitted), S-metolachlor seemed to have lower micro-algal toxicity compared to diuron at  $10 \mu\text{g.L}^{-1}$ . This could result from several factors:

- 1) S-metolachlor was applied without adjuvant, making the toxicity of compounds lower in the present case (Filimonova et al. 2016a);
- 2) the applied concentration was quite low, allowing the defense mechanisms to be effective; (Robert et al. 2007);
- 3) the toxicity of the herbicides may have been masked by the high concentrations of nutrients provided by the Dauta medium (Guasch et al. 1998, Guasch et al. 2004);
- 4) the sensitivity of *G. gracile* to herbicides is lower than other that of the diatom species used in previous studies (Wood et al. 2016).

## **5. EPA as a biomarker of herbicide pollution**

It has been shown in the literature that diatoms have high contents of EPA and are excellent quality food resources for zooplankton (Taipale et al. 2013). In fact, EPA is useful in the health

and function of all organisms at all trophic levels (Brett et al. 2006). However, lipid compounds and fatty acid profiles are sensitive to stressors and environmental modifications (Arts et al. 2009).

In the current study, conversely to total lipid analysis, a decrease of EPA content was shown mainly in PA/DGTA and PC as well as DGDG after diuron contamination; decreasing photosynthesis and leading to a reduction of the growth rate (Demailly et al. 2019) and hinting at the potential of EPA as a biomarker of diuron pollution (Figure 2).

In a previous study, Demailly et al. (2019) observed a similarly decrease of the total EPA content in *G. gracile* after seven days of diuron exposure at 10 µg.L<sup>-1</sup>. In the same way, they noted a similar result in *N. palea* (Demailly et al. submitted).

## **6. Conclusion**

The present study highlighted higher toxicity of diuron compared to S-metolachlor at 10 µg.L<sup>-1</sup> on lipid contents of *G. gracile*, and especially on EPA content.

According to previous studies and the results of the current study, it is suggested that EPA content in selected lipids (PA/DGTA, DGDG and PC) in *G. gracile* had earlier responses than total lipid content, making it a relevant biomarker of diuron pollution. In future studies, it will be useful to carry out similar experiments using different herbicides, exposure concentrations, environmental parameters (temperature and light intensity) and other diatom species in order to confirm and consolidate the usefulness of EPA content as a biomarker of herbicide pollution in freshwater diatoms.

## **7. Acknowledgments**

This study was carried out with financial support from the French National Research Agency (ANR) within the framework of the Investments for the future Program, within the Cluster of

Excellence COTE (ANR-10-LABX-45). The authors would like to thank Dr Emilie Saulnier-Talbot for correcting the manuscript language, David Carayon and Marie Wach for their help with statistical analyses.



## A retenir de ce chapitre 5

---

- ✓ Sous contamination au diuron, la teneur en **20:5n3** dans les **lipides membranaires PA/DGTA, DGDG et PC** s'est vue décroître. Ces lipides sont notamment associés à la **photosynthèse** (DGTA et DGDG).
- ✓ Cependant, la présente étude a confirmé une toxicité plus élevée du diuron par rapport au S-métolachlore à  $10\mu\text{g.L}^{-1}$  sur la **teneur en lipides totaux** et la **proportion de l'acide gras 20:5n3 dans chaque lipide** de *G. gracile*.
- ✓ Les résultats de cette étude ont suggéré que la teneur en **20:5n3** dans **des lipides PA / DGTA, DGDG et PC** chez *G. gracile* était un descripteur **plus sensible** que la teneur **en lipides totaux**.
- ✓ Selon des études antérieures et les résultats de l'étude actuelle, il semblerait que l'acide gras 20:5n3 constitue un **biomarqueur potentiel de la pollution par le diuron** dans les eaux douces, indépendamment du stade de croissance des organismes.
- ✓ Cependant, de **futures études** devraient être réalisées pour **confirmer ces résultats** notamment en étudiant l'impact de ces herbicides sur d'autres espèces de diatomées, à des températures d'exposition différentes, mais également en étudiant par exemple l'impact d'herbicides différents ou de mélanges d'herbicides par à des concentrations différentes, notamment plus proches des concentrations environnementales.



---

# **Chapitre 6 – Conclusions générales et perspectives**

---



Les objectifs de cette thèse étaient :

- 1) D'étudier les effets des pesticides et notamment de deux herbicides, le diuron et le S-métolachlore, sur les profils d'acides gras des diatomées d'eau douce ;
- 2) De démontrer l'intérêt et la complémentarité de l'analyse des acides gras dans l'évaluation des impacts d'une pollution toxique en comparaison avec les descripteurs utilisés habituellement en écotoxicologie, tels que le taux de croissance, l'activité photosynthétique, la concentration en pigments (chlorophylle *a* et carotène) et enfin l'expression de gènes d'intérêt.

Pour ce faire, les réponses de deux espèces de diatomées d'eau douce ont été étudiées après et durant (3<sup>ème</sup> article) sept jours de contamination au diuron et au S-métolachlore à une concentration environnementale haute de 10 µg.L<sup>-1</sup>. La réponse des profils d'acides gras et des lipides ainsi que ceux de descripteurs considérés comme « classiques » a été évaluée.

Ce chapitre a pour objectif de :

- 1) faire un bilan des résultats obtenus lors de ces travaux de thèse relatifs aux expositions des diatomées aux herbicides à l'aide de différents descripteurs et notamment des lipides et des profils d'acides gras.

✚ Ce premier point s'axe en trois parties :

- a) les impacts principaux des herbicides sur les acides gras et lipides des diatomées observés dans ces travaux de thèse seront présentés ;
- b) l'utilisation des profils d'acides gras dans l'étude de l'impact d'une pollution toxique en comparaison aux descripteurs « classique » sera discutée ;
- c) la pertinence de l'acide gras EPA comme biomarqueur potentiel d'une contamination sera également examinée.

2) Dans un second temps des pistes d'investigation et les perspectives proposées par cette thèse pour de futurs travaux de recherche seront présentées.

✚ Ce deuxième point s'axe en trois parties :

- a) la représentativité de ces travaux de thèse sera discutée et des améliorations seront proposées ;
- b) l'étude des impacts des herbicides sur les mécanismes de synthèse des acides gras sera présentée ;
- c) et pour finir, l'étude des impacts des herbicides sur la qualité nutritive des diatomées et sur un maillon trophique supérieur sera énoncée.

# 1. Conclusions générales



### a) Impacts des herbicides sur les lipides et acides gras des diatomées

Il est connu que les herbicides affectent les composants biologiques cellulaires entraînant la détérioration des systèmes biologiques (Badmus et al., 2011).

Dupraz et al. (2016); Dupraz et al. (2019) ont précédemment noté une réduction de la production de **lipides de stockage** dans les microalgues marines *Tisochrysis lutea*, *Skeletonema marinoi* et *Tetraselmis suecica* lors d'une contamination au diuron.

De plus, il a été démontré dans la littérature que les ROS (notamment produits dans la cellule lors d'une contamination aux herbicides) pouvaient provoquer une peroxydation des **lipides membranaires**. En effet, chez les organismes photosynthétiques, les ROS sont capables d'endommager les composés lipidiques des membranes thylakoïdiennes des chloroplastes tels que les lipides **MGDG, DGDG, SQDG et PG** (Almeida et al., 2019).

Cependant à l'heure actuelle, peu d'études ont souligné les impacts des herbicides sur le contenu lipidique des diatomées d'eau douce.

Aussi, diverses études ont démontré que les microalgues marines confrontées à une contamination aux pesticides (notamment herbicides) réagissaient par une modification de leurs profils d'acides gras telle qu'une diminution de leur proportion en **PUFA** et en **HUFA**, mais aussi, par une augmentation de la teneur en **MUFA** (Robert et al., 2007; Sicko-Goad et al., 1989a; Sicko-Goad et al., 1989b).

Cependant à l'heure actuelle, de la même manière que le contenu lipidique, peu d'études se sont intéressées aux impacts des herbicides sur les microalgues d'eaux douces et particulièrement les diatomées.

*i. Diuron*

 **Lipides neutres (de stockage) et MUFA**

Ces travaux de thèse ont démontré une diminution de la proportion des **lipides neutres** totaux chez la diatomée d'eau douce GGRA après exposition au diuron.

Cette diminution a pu être expliquée (chapitre 5, article 3) par la diminution de l'activité photosynthétique. En effet, de nombreux précurseurs, en particulier ceux utilisés dans la biosynthèse des lipides, sont produits par le cycle de Calvin (Masojidek et al., 2004). Ainsi, la diminution de l'efficacité photosynthétique pourrait avoir un impact sur la production de ces précurseurs et finalement sur le contenu en lipides de stockage.

En parallèle, ces travaux de thèse ont aussi démontré une augmentation du pourcentage total de **MUFA** sous traitement au diuron. Cette augmentation a pu être expliquée par l'inhibition de l'activité photosynthétique causée par ce pesticide comme il a été discuté dans les chapitres 3 et 4 (articles 1 et 2).

Sans facteurs de stress et dans des conditions de croissance normales, l'ATP et le NADPH, produits notamment de la photosynthèse, sont consommés afin de générer de la biomasse. Diverses études ont montré que lorsque le photosystème II est perturbé par la présence de facteurs de stress, et finalement la croissance inhibée, le principal accepteur d'électrons de la photosynthèse devient inactif et le NADPH est consommé dans la biosynthèse des acides gras. La production de composés membranaires n'étant alors pas prioritaire au vu de l'inhibition de la croissance, les acides gras produits sont alloués aux **lipides de réserve** et notamment le triacylglycérol (TAG), ce lipide contenant particulièrement une forte proportion de MUFA (Converti et al., 2009; Hu et al., 2008; Thompson Jr, 1996).

### Lipides membranaires et HUFA

Lors de ces travaux de thèse, une augmentation de la teneur en **lipides membranaires** tels que **PG, DGTS et PE** a pu être observée chez la diatomée GGRA lors de l'exposition au diuron.

Comme il a pu être expliqué dans le chapitre 5 :

- **PG** est le phospholipide majeur présent dans la membrane des thylakoïdes (Block et al., 1983; Dorne et al., 1990) et joue un rôle clé dans **la photosynthèse** (Domonkos et al., 2008; Wada and Mizusawa, 2009; Wada and Murata, 2007).
- **PE**, quant à lui, du fait de sa composition riche en acides gras désaturés C20, contribue à la biosynthèse de l'acide gras **EPA** (HUFA) (Kaye et al., 2015; Schneider and Roessler, 1994).
- **DGTS** est un bétaine lipide (Cañavate et al., 2016; Dembitsky, 1996). Ce lipide est supposé être un des homologues structurels sans phosphore (P) des phospholipides. Il est situé dans les membranes extraplastidiales (Künzler et al., 1997b) et participe au transfert des acides gras du réticulum endoplasmique aux chloroplastes.

Plus particulièrement, il a été démontré dans ces travaux que parallèlement à l'activité photosynthétique, la teneur en **EPA** chez *G. gracile* diminuait dans les lipides membranaires **PA/DGTA** après sept jours de contamination par le diuron. De la même manière, la diminution de la teneur en EPA a été notée dans les lipides membranaires **DGDG** et **PC**.

Comme il a pu être expliqué dans le chapitre 5 :

- **PA** est une molécule de **signalisation** et constitue l'intermédiaire dans la **synthèse de toutes les classes de lipides** (Mizusawa and Wada, 2012) ;
- **DGTA** joue un rôle dans la **photosynthèse** du fait de sa présence dans les membranes chloroplastiques ;

- **DGDG** est un lipide constituant les membranes thylakoïdiennes des chloroplastes (Almeida et al., 2019) et est donc associé à la photosynthèse ;
- **PC** contribue à la biosynthèse de l'acide gras **EPA** (HUFA) du fait de sa composition riche en acides gras désaturés à 20 atomes de carbone (Kaye et al., 2015; Schneider and Roessler, 1994).

Simultanément, la diminution du pourcentage total de **HUFA** chez GGRA et NPAL a pu quant à elle être expliquée tout au long de ces travaux par :

- 1) **L'action des ROS** sur leur site bis-allylique entraînant une peroxydation lipidique (Maronić et al., 2018) ;
- 2) Et par **l'inhibition des processus de désaturation** dans le mécanisme de synthèse des acides gras (Filimonova et al., 2016c).

## *ii. S-métolachlore*

Étonnamment, **de faibles effets du S-métolachlore à concentration environnementale** ont été observés sur les acides gras des deux espèces de diatomées étudiées. Plusieurs hypothèses ont pu être formulées tout au long de ces travaux de thèse (chapitres 3, 4 et 5) :

- 1) Contrairement à d'autres études, l'herbicide a été appliqué seul et **sans adjuvant**, ce qui a peut-être permis d'abaisser la toxicité du composé dans le cas présent (en comparaison avec les travaux de Filimonova et al., 2016b; Filimonova et al., 2016c) ;
- 2) La concentration appliquée était de **10 µg.L<sup>-1</sup>**, une concentration bien inférieure à celle d'autres études ayant démontré la mise en place des mécanismes de défense (Robert et al., 2007) ;

- 3) **Les fortes concentrations de nutriments** fournies par le milieu Dauta peuvent avoir stimulé le métabolisme des diatomées et masqué, au moins partiellement, la toxicité du S-métolachlore sur les deux espèces (Guasch et al., 2004).

**b) Apports des profils d'acides gras dans la détermination des impacts d'une pollution toxique en comparaison avec les descripteurs « classiques » utilisés en écotoxicologie**

*i. Impacts des contaminants*

*a. ROS*

Il a été démontré dans la littérature qu'un toxique entrant dans une cellule pouvait générer une accumulation de ROS (Wang et al., 2004). Les ROS sont connus pour avoir différentes cibles cellulaires (noyau, mitochondries et chloroplastes) et en excès ceux-ci peuvent être toxiques pour la cellule.

Les effets indésirables dans les diatomées sont le plus souvent : des perturbations sur le système photosynthétique (Knauert and Knauer, 2008) dégradant par oxydation la protéine D1 (Kale et al., 2017) et entraînant une photoinhibition (Cartaxana et al., 2013) ; des perturbations sur la chaîne de transfert d'électrons entraînant une diminution de la production d'ATP (Stohs and Bagchi, 1995) ; des dommages à l'ADN affectant la croissance algale (Stohs and Bagchi, 1995).

Les résultats des profils d'acides gras en complément de ceux de génétique, décrits dans les chapitres 3 et 4 de cette thèse, ont indiqué que :

- **L'induction du gène de défense contre le stress oxydatif *cat*** après exposition au **diuron** suggère que l'augmentation de la dégradation du contenu en **HUFA** pourrait être liée à la production de ROS.

Dans le but de combattre le stress oxydatif, les cellules peuvent activer des enzymes antioxydantes, notamment la catalase (CAT), mais lorsque celles-ci se voient défaillantes, les HUFA sont attaquées par les radicaux libres situés sur leur site bis-allylique entraînant une peroxydation lipidique (Maronić et al., 2018).

- A l'inverse, après exposition au **S-métolachlore**, le gène *cat* a été induit de manière beaucoup plus importante que pour le diuron, résultant finalement d'un impact moins important (voire nul) sur les HUFA.

Ainsi, l'absence d'impact sur les **HUFA** peut être expliquée ici par **l'efficacité des mécanismes antioxydants**.

Finalement, ces travaux de recherches ont démontré que l'analyse des **profils d'acides gras** (et particulièrement celle du contenu en **HUFA**) associée aux résultats de génétique (et notamment la réponse du gène de la catalase *cat*), contrairement aux descripteurs classiques utilisés en écotoxicologie tels que l'inhibition de croissance ou de la photosynthèse, sont en mesure d'apporter des informations complémentaires sur l'**impact cellulaire des contaminants** tels que la production excessive de **ROS**.

#### *b. Inhibition de l'activité photosynthétique, du taux de croissance et du contenu en pigments*

Ces travaux de thèse (chapitres 3, 4 et 5) ont démontré que les résultats des analyses des **profils d'acides gras et lipidiques** de GGRA étaient corrélés à ceux de **l'activité photosynthétique** et du **taux de croissance**.

En effet, le taux de croissance de GGRA a été inhibé après l'exposition au S-métolachlore, mais de manière moins importante qu'avec le diuron. Ces résultats sont corrélés à ceux de l'activité photosynthétique et des profils d'acides gras (notamment HUFA et EPA) où les diminutions

les plus significatives ont été notées sous contamination au diuron contrairement au S-métolachlore.

Comme il a pu être évoqué dans le chapitre 3 et discuté dans le chapitre 5, des études sur les plantes supérieures ont montré que les acides gras impactés par les contaminants organiques et inorganiques étaient les acides gras les plus insaturés et étaient ceux présents dans les lipides du chloroplaste et nécessaires à l'activité photosynthétique. Ainsi, la réduction de ces lipides a entraîné une perturbation de la structure des membranes photosynthétiques et a empêché l'activité du PSI et du PSII (Kobayashi, 2016). Finalement, une diminution de la photosynthèse a conduit à une réduction du taux de croissance.

De plus, il a été montré dans le chapitre 3 que les **profils d'acides gras** étaient des indicateurs plus sensibles vis-à-vis de l'impact du diuron et du S-métolachlore à  $10 \mu\text{g.L}^{-1}$  sur les diatomées d'eau douce par rapport aux **teneurs en pigments** pour lesquelles **aucun impact** n'a été constaté.

#### *ii. Rôle écosystémique : qualité nutritive des diatomées*

L'analyse des profils d'acides gras est régulièrement utilisée dans **l'identification des relations dans les chaînes trophiques** (Allan et al., 2010; El-Sabaawi et al., 2009; Kelly and Scheibling, 2012; Van den Meersche et al., 2009).

Les HUFA et en particulier l'EPA sont nécessaires au bon fonctionnement de l'organisme de tous les animaux et à tous les niveaux trophiques. Les animaux sont capables de convertir un acide gras HUFA en un autre en utilisant des processus d'élongation et de désaturation, mais très peu sont capables de synthétiser des HUFA *de novo* (Brett and Müller-Navarra, 1997). De plus, il a été démontré dans la littérature que les diatomées avaient une teneur élevée en EPA et constituaient donc une excellente ressource alimentaire pour le zooplancton (Taipale et al., 2013).

À l'inverse des « descripteurs classiques », les profils d'acides gras pourraient alors fournir des informations supplémentaires notamment sur la qualité nutritive des diatomées. De la même manière que le diuron a diminué la teneur en HUFA et en particulier en EPA des deux espèces de diatomées, leur qualité nutritive pourrait être diminuée et, par conséquent, la chaîne trophique pourrait être affectée, contrairement au S-métolachlore où aucun impact n'a été constaté dans ces conditions expérimentales.

Dans le but de pallier la diminution de la qualité nutritive des diatomées, leur consommateur pourrait augmenter sa quantité d'algues ingérées, ou diversifier (voire modifier complètement) son régime alimentaire (Neury-Ormanni et al., submitted). En effet, si la nourriture est disponible et diversifiée les consommateurs sélectionneraient préférentiellement des aliments de haute qualité composés d'une teneur en lipides élevée ; à l'inverse les consommateurs pourraient se voir devenir opportunistes (Vos et al., 2000).

Neury-Ormanni et al. (submitted) ont également montré que la contamination au diuron conduisait les chironomidés à augmenter leur consommation d'algues afin de compenser la perte nutritionnelle probable (Ruiz et al., 2018). Dans le cas des composés bioaccumulables, cette augmentation est susceptible d'impacter la quantité de toxiques ingérés pouvant résulter en une biomagnification des composés le long de la chaîne trophique.

Finalement les profils d'acides gras ont permis de noter les impacts des herbicides sur les diatomées, en fournissant des informations sur leurs mécanismes d'action et la réponse des algues (par exemple, la formation des ROS et leur gestion) mais également sur leurs **effets écologiques** (par exemple, **l'impact trophique**).

### iii. *Avantages et limites de l'analyse des profils d'acides gras*

Le Tableau 7 présente un résumé non exhaustif des avantages et des limites de l'analyse des profils d'acides gras des diatomées ;

Tableau 7 : Liste non exhaustive des avantages et des limites de l'analyse des profils d'acides gras des diatomées.

| Avantages  | Limites   |
|--|---|
| Apport d'informations complémentaires sur les cibles intracellulaires des contaminants   | Analyse plus longue et plus onéreuse que celle des descripteurs « classiques »  |
| Apport d'informations écologiques complémentaires (qualité nutritive des diatomées)  | Nécessité d'un volume d'échantillon plus important que celui nécessaire pour les « descripteurs classiques »                      |
| Analyse des acides gras réalisable à différentes échelles d'organisation biologique (de l'individu à la communauté), et sur tous types d'êtres vivants | Nécessité de peser l'échantillon ou de disposer d'une concentration cellulaire exacte pour l'analyse quantitative des acides gras |

#### Avantages :

Comme présenté tout au long de ces travaux de thèse, les profils d'acides gras ont permis d'apporter des informations complémentaires sur les **cibles intracellulaires des contaminants**, tels que le diuron et le S-métolachlore à concentration environnementale. En effet, grâce à l'étude des acides gras, une échelle d'organisation biologique intermédiaire et complémentaire entre l'induction/répression de gènes (réponse "potentielle") et des réponses "réalisées" aux

niveaux fonctionnel (photosynthèse) et populationnel (taux de croissance) a pu être mis en place.

L'induction du gène de défense contre le stress oxydatif *cat* après exposition au diuron suggère que l'altération de la synthèse du contenu en HUFA, présents dans les lipides de la membrane du chloroplaste, pourrait être liée à la production de ROS. Ainsi, la réduction de ces lipides a entraîné une perturbation de la structure des membranes photosynthétiques et a empêché l'activité du PSI et du PSII (Kobayashi, 2016). Finalement, une diminution de la photosynthèse a conduit à une réduction du taux de croissance.

De plus, les profils d'acides gras ont permis d'apporter des **informations écologiques complémentaires** notamment sur la qualité nutritive des diatomées, comme il a pu être présenté tout au long de ces travaux de thèse.

Les diatomées contiennent une teneur élevée en EPA et constituent une excellente ressource alimentaire pour le zooplancton (Taipale et al., 2013). De la même manière que le diuron a diminué la teneur en HUFA et en particulier en EPA des deux espèces de diatomées, leur qualité nutritive pourrait être diminuée et, par conséquent, la chaîne trophique pourrait être affectée.

Par ailleurs, il est intéressant de souligner le fait que les teneurs en acides gras peuvent être analysées à **différentes échelles d'organisation biologique** (de l'individu à la communauté), et sur **tous types d'êtres vivants** appuyant l'**universalité** de ce type d'analyse.

#### Limites :

Malgré les avantages les plus importants des profils d'acides gras relevés dans la section précédente, il est important de noter différentes limites de ce type d'analyse.

Tout d'abord, **le temps** de ce type d'analyse peut être présenté comme une première limite. Le Tableau 8 présente la durée approximative de l'analyse de 10 échantillons.

Contrairement à celles des descripteurs étudiés classiquement en écotoxicologie tels que l'activité photosynthétique, le taux de croissance, la concentration en pigments, le temps de préparation des échantillons et le temps d'analyse est beaucoup plus important pour les profils d'acides gras (Tableau 8). En effet pour 10 échantillons la durée approximative de l'analyse (préparation comprise) est de 6h30 pour les profils d'acides gras contre 1h, 1h30 et 3h30 pour l'activité photosynthétique, la concentration en pigments et le taux de croissance respectivement.

Cependant il est nécessaire de souligner que la méthode analytique utilisée pour ces travaux de thèse était la méthode existante du laboratoire (LBM) prenant en compte le plus d'acides gras possible. Il aurait été intéressant d'optimiser la méthode dans le but de diminuer le temps d'analyse de ces présentes études.

Tableau 8 : Durée approximative de l'analyse de 10 échantillons pour les différents descripteurs étudiés dans ces travaux de thèse.

| Durée approximative de l'analyse de 10 échantillons |        |
|---|--------|
| <b>Analyse génétique</b>                            | 4 h 30 |
| <b>Concentration en pigment</b>                     | 1 h 30 |
| <b>Activité photosynthétique</b>                    | 1 h    |
| <b>Taux de croissance</b>                           | 3 h 30 |
| <b>Acides gras</b>                                  | 6 h 30 |

Par ailleurs lors des manipulations préliminaires, **le volume d'échantillon** a pu être déterminé dans le but de posséder une **quantité suffisante de biomasse** pour que l'analyse des profils d'acides gras soit optimale. Ce volume, correspondant à environ 20 mL tout au long de ces travaux de thèse, peut cependant différer dans d'autres études notamment du fait de la taille de la diatomée étudiée impactant ainsi la biomasse présente.

En comparaison aux volumes d'essai nécessaires pour l'analyse des descripteurs « classiques » tels que l'activité photosynthétique où seulement 2 mL d'échantillon sont nécessaires (et potentiellement utilisables par la suite pour d'autres analyses, la mesure étant non destructive) ou 1 mL pour le taux de croissance, l'analyse des profils d'acides gras contraint à limiter les analyses de descripteurs dans le cas d'expérimentations au laboratoire ou bien à utiliser des unités expérimentales avec un volume plus important que les 80 mL utilisés tout au long de ces travaux de thèse.

Dans le cas d'études sur le terrain, l'analyse des profils d'acides gras nécessite donc de prélever une quantité de biomasse importante et donc d'appréhender en amont toutes les analyses à effectuer sur ces échantillons dans le but d'avoir une quantité suffisante de biomasse.

Pour finir, une limite intéressante à souligner est celle concernant la nécessité de disposer d'une concentration cellulaire similaire entre les réplicats si l'objectif est de réaliser une **analyse quantitative des acides gras**.

Tout au long de ces travaux de thèse l'analyse des profils d'acides gras s'est vue qualitative du fait de la difficulté à obtenir une concentration cellulaire similaire entre chaque réplicat après l'étape de lavage des échantillons.

De plus, suivant la concentration cellulaire de départ, les centrifugations utilisées dans le but de retirer le milieu de culture peuvent ne pas culotter suffisamment les diatomées engendrant alors une perte de cellule lors du retrait du milieu de culture.

Ainsi, lors d'**études prochaines** il semble intéressant :

- 1) D'étudier l'impact de la **lyophilisation** sur les acides gras des diatomées ;
- 2) Dans le cas où la lyophilisation n'impacterait pas les profils d'acides gras des diatomées, de remplacer les étapes de centrifugations par le procédé de **lyophilisation** dans le but de conserver des concentrations cellulaires similaires entre chaque échantillon et de s'affranchir de la perte de cellule lors du retrait du milieu de culture.

### **c) EPA comme biomarqueur potentiel de la pollution toxique des cours d'eau ?**

Il a été démontré dans la littérature que les diatomées avaient une teneur élevée en EPA et constituaient une excellente ressource alimentaire pour le zooplancton (Taipale et al., 2013).

Cependant, les composés lipidiques et les profils d'acides gras répondent sensiblement aux facteurs de stress et aux modifications de l'environnement (Arts et al., 2009).

En effet, ces travaux de thèse (chapitres 3 et 4) ont démontré une **diminution de la teneur totale en EPA** chez GGRA et NPAL après sept jours d'exposition au diuron à  $10 \mu\text{g.L}^{-1}$ .

Dans le chapitre 5, contrairement à l'analyse lipidique totale, une diminution de la teneur en EPA a été mise en évidence principalement pour les lipides PA/DGTA, DGDG et PC après contamination par le diuron. Aussi, contrairement à l'analyse des lipides totaux, la durée d'exposition n'a pas eu d'incidence sur la réponse du contenu en EPA dans les lipides sous traitement au diuron (à partir de T3), suggérant une stabilité de la réponse de l'EPA au diuron en faveur de son utilisation comme biomarqueur.

Cependant, afin de confirmer cette hypothèse il serait nécessaire dans **des études futures** de réaliser des expériences similaires avec **d'autres herbicides, concentrations d'exposition, paramètres environnementaux (température et intensité lumineuse) et autres espèces étudiées**, afin de prouver la pertinence du contenu en EPA en tant que biomarqueur de la pollution par certaines classes d'herbicides.

## 2. Perspectives



## a) Représentativité de ces travaux de thèse

### i. *Espèces de diatomées étudiées*

#### Nombre d'espèces étudiées

Lors de ces travaux de thèse, les réponses de **deux cultures monospécifiques de diatomées d'eau douce** ont été analysées. Ces deux espèces ont été sélectionnées sur la base de leurs écologies très différentes et de leurs réponses contrastées à une exposition aux herbicides, de manière à couvrir une gamme de réponses possibles larges.

En effet, Morin et al. (2009) avaient montré que les abondances relatives élevées de NPAL étaient plutôt associées à des concentrations de pesticides faibles *in situ*, tandis que les abondances de GGRA étaient plus importantes dans les sites présentant des apports de pesticides élevés.

A l'inverse, Larras et al. (2012) ont montré, à partir de courbes d'écotoxicité basées sur la croissance algale en 96 h, que NPAL faisait partie des espèces de diatomées les moins sensibles à l'atrazine, au terbutryne, au diuron et à l'isoproturon parmi une sélection de 11 espèces de diatomées d'eau douce.

Wood et al. (2016) ont quant à eux démontré, à partir de l'état général de la cellule (les cellules intactes contenant des chloroplastes étaient considérées comme saines, alors que les cellules vides, cassées, déformées étaient considérées comme en mauvais état), que GGRA était la troisième espèce la plus sensible aux herbicides inhibiteurs du photosystème II, tel que le diuron, parmi une sélection de huit espèces de diatomées d'eau douce. GGRA a été cependant classée comme une des espèces les moins sensibles aux herbicides ayant une cible cellulaire différente au photosystème II.

Cependant, par analogie aux résultats obtenus lors de ces travaux de thèse, les données citées précédemment sont issues d'études n'observant la réponse que d'un seul descripteur suite à une contamination en herbicides. En effet, une espèce peut paraître sensible sur un paramètre, tel

que la photosynthèse par exemple, mais peut allouer en parallèle toute son énergie plutôt à la croissance et donc au maintien de sa population.

Les résultats de ces travaux de thèse ont montré que NPAL était composée d'une proportion plus élevée de DHA que GGRA ; le DHA étant un acide gras oméga-3 essentiel dans le maintien de la fluidité membranaire et important sur le plan nutritionnel dans la chaîne trophique (Nichols et al., 1993; Nishida and Murata, 1996).

De nombreuses études ont montré des profils d'acides gras différents entre les espèces de diatomées (Boelen et al., 2013; Dunstan et al., 1994; Pratoomyot et al., 2005; Ying et al., 2000) et différentes teneurs en EPA et DHA entre et au sein des classes d'algues (Brown, 2002; Guschina and Harwood, 2006; Lv et al., 2010).

Par exemple, Pratoomyot et al. (2005), mais aussi Ying et al. (2000) ont montré que les espèces de diatomée *Nitzschia* sp. étaient composées d'une proportion plus élevée de DHA par rapport à d'autres espèces, en ligne avec les résultats obtenus dans ces travaux de thèse.

Il a été observé dans le chapitre 4 que GGRA et NPAL présentaient des réponses similaires vis-à-vis de la contamination aux herbicides mais des différences d'intensité de réponse ont pu être également relevées.

En effet, la réponse de certains gènes d'intérêt s'est présentée de manière plus intense pour NPAL (notamment le gène antioxydant *cat*) que pour GGRA. Malgré cette intensité différente, les profils d'acides gras et particulièrement le contenu en HUFA chez les deux espèces de diatomées se sont vu modifiés, en particulier pour NPAL.

Ainsi dans de  **futures recherches**  il serait nécessaire de tester un  **nombre plus important**  d'espèces de diatomées d'eau douce afin de confirmer les résultats de ces travaux de recherches.

Par exemple, il serait pertinent d'étudier en plus de ces deux espèces la réponse **d'autres diatomées pennées** mais également de **diatomées centriques** afin d'élargir nos connaissances sur les réponses des profils d'acides gras des diatomées d'eau douce vis-à-vis d'une contamination ; et d'évaluer la généralité des réponses des profils d'acides gras observées dans la classe des diatomées.

En effet, Larras et al. (2014) ont relevé le lien entre la phylogénie des diatomées et leur sensibilité aux herbicides et notamment à quatre herbicides inhibiteurs du photosystème II tels que l'atrazine, le terbutryne le diuron et l'isoproturon. Parmi les 14 espèces de diatomées sélectionnées, les diatomées centriques et pennées araphides se sont vues plus sensibles aux herbicides que les diatomées pennées.

Cependant, Larras et al. (2014) ont noté l'importance de considérer les **préférences trophiques des diatomées** (autotrophes ou hétérotrophes) en complément de la phylogénie pour expliquer au mieux les différences de sensibilité des diatomées. Larras et al. (2012) ont effectivement observé que la sensibilité des diatomées aux herbicides et notamment aux inhibiteurs du PSII dépendait du **mode trophique** des espèces mais également de leur **guilde écologique** (Passy, 2007). Les espèces hétérotrophes et appartenant à la guilde « motile » (espèces pouvant se déplacer au sein du biofilm) étaient plus tolérantes aux inhibiteurs du PSII alors que les espèces autotrophes et appartenant à la guilde « low profile » (espèces adhérentes au substrat vivant dans les couches inférieures du biofilm) et « high profile » (espèces érigées formant des colonies leur permettant d'atteindre les couches supérieures du biofilm) étaient les plus sensibles (Larras et al., 2012) ; NPAL étant classée comme hétérotrophe et « motile » et GGRA étant classée comme « high profile ».

Ainsi, il semble nécessaire, en plus de la phylogénie, d'ajouter les notions de préférences trophiques et de guilde écologique dans l'étude des réponses des profils d'acides gras en

réponse à une contamination aux herbicides dans le but d'évaluer la généricité de ces descripteurs.

#### A l'échelle de la communauté : groupes algaux et biofilm

Lors de ces travaux de thèse, les réponses de **deux cultures monospécifiques de diatomées** face à la contamination aux herbicides ont été étudiées. Cependant, certaines limitations liées aux expériences de laboratoire avec des cultures monospécifiques, par opposition aux communautés, peuvent être mentionnées :

- ✓ Par exemple, il a été démontré dans la littérature que la sélection génétique en culture *in vitro* pouvait modifier la sensibilité des algues aux produits chimiques (Peterson et al., 1997).
- ✓ En raison des différentes sensibilités des espèces présentes dans les communautés d'algues, les réponses des cultures face à une contamination aux herbicides peuvent ne pas être représentatives des réactions des communautés d'algues périphtiques (Badr and Abou-Waly, 1997).
- ✓ De plus, dans le milieu naturel, les interactions des espèces et la sensibilité différentielle des taxons modulent la réponse d'une communauté de diatomées à une perturbation (DeNoyelles et al., 1982).

Il serait pertinent dans une **future recherche** de comparer les réponses des **différents groupes algaux**, par exemple en choisissant en plus des diatomées des modèles d'algues vertes et de cyanobactéries, face à une contamination au diuron et au S-métolachlore à une concentration de 10 µg.L<sup>-1</sup> chacun.

En effet, Coquillé (2017) a mis en évidence un contenu intracellulaire 5 à 8 fois moins important en lipides pour l'algue verte *Sphaerellopsis* en comparaison à la diatomée GGRA. Lors de cette

étude aucune différence n'a été notée dans les lipides de stockage de GGRA et de *Sphaerellopsis* ni après une exposition au diuron (0,05 et 0,5  $\mu\text{g.L}^{-1}$ ) ni après celle au S-métolachlore (0,5 et 5  $\mu\text{g.L}^{-1}$ ).

De plus, Taipale et al. (2013) ont montré des différences entre les profils d'acides gras de plusieurs classes d'algues. Le Tableau 9 présente ces résultats ; par exemple les Chlorophyceae sont composées majoritairement d'acides gras 18:3n3, 16:0, 18:1n9 et 18:2n6 tandis que les Bacillariophyceae sont quant à elles composées en majorité d'acides gras 16:1n7, 20:5n3, 16:0 et 14:0. Par ailleurs, les acides gras typiques de la classe des Bacillariophyceae ont été notés comme étant les 16:2n7, 16:4n1 et 18:4n4.

Par la suite, il serait finalement intéressant, d'analyser les profils d'acides gras d'un **biofilm** exposé aux herbicides. Dans le but de comparer les résultats obtenus avec ceux de ces travaux de thèse et de l'étude décrite précédemment, la toxicité du diuron et du S-métolachlore pourrait être examinée à une concentration de 10  $\mu\text{g.L}^{-1}$ . Il serait ainsi possible d'observer la réponse face à une contamination des profils d'acides gras et notamment de l'EPA dans le biofilm dans sa globalité, dans le but de se rapprocher au plus près des **conditions environnementales** sur le terrain.

En effet, une étude préliminaire réalisée au sein du laboratoire par Sandra Kim-Tiam (2014, non publiée), a révélé des changements sur les profils d'acides gras (notamment en effectuant le ratio 20:5/16:0) des biofilms exposés à des mélanges de pesticides dominés par les chloroacétanilides. Aucune modification n'avait été notée sur l'activité photosynthétique. A l'inverse, des différences sur le nombre de diatomées avaient été relevées à l'aide de comptages microscopiques.

Il est intéressant de noter que les résultats de ces travaux de thèse ont déjà conduit à des réflexions entre INRAE et des partenaires Québécois (INRS). Les travaux de thèse de Laura Malbezin à l'INRS (2019-...) traiteront notamment ce type d'approche globale de la composition en acides gras des biofilms, et de son évolution en contexte de pollution agricole.

Tableau 9 : Acides gras majoritaires et typiques de chaque classe d'algue. Extrait de Taipale et al. (2013).

| Classes d'algues         | Acides gras majoritaires     | Acides gras typiques de la classe d'algues |
|--------------------------|------------------------------|--|
| <b>Chlorophyceae</b>     | 18:3n3, 16:0, 18:1n9, 18:2n6 | /  |
| <b>Trebouxiophyceae</b>  | 18:3n3, 16:0, 18:1n9, 18:2n6 | /  |
| <b>Cryptophyceae</b>     | 18:3n3, 16:0, 18:4n3         | /  |
| <b>Synuraphyceae</b>     | 18:4n3, 14:0, 18:3n3, 16:0   | /  |
| <b>Ochromonadales</b>    | 16:1n7, 16:0, 18:2n6, 18:1n7 | /  |
| <b>Raphidophyceae</b>    | 16:0, 20:5n3, 18:4n3, 18:3n3 | 16:3n4                                     |
| <b>Bacillariophyceae</b> | 16:1n7, 20:5n3, 16:0, 14:0   | 16:2n7, 16:4n1, 18:4n4                     |
| <b>Euglenophyceae</b>    | 16:0, 18:3n3, 20:5n3, 22:6n3 | 15:3n3, 17:2n2, 17:2n7                     |

## ii. Facteurs environnementaux

### Concentration en nutriments

Les cultures de diatomées ont été cultivées tout au long de ces travaux dans un milieu **Dauta**, qui est un **milieu riche en nutriments** et particulièrement plus riche que dans de nombreuses conditions naturelles (Tableau 10). L'analyse des nutriments (chapitres 3, 4 et 5) a permis de confirmer que le milieu s'appauvrisait peu sur la durée totale des expérimentations.

Or il a été observé dans plusieurs études que la composition en nutriments impactait le profil d'acides gras des diatomées (Hill et al., 2011; Huerlimann et al., 2014; Lin et al., 2018; Lynn et al., 2000; Qiao et al., 2016; Sayanova et al., 2017a; Sharma et al., 2012; Sitnik et al., 2017). Par exemple, chez la diatomée marine *Phaeodactylum tricornutum* une augmentation de la concentration en silice a provoqué une diminution de la production des HUFA notamment de l'acide gras EPA (Meiser et al., 2004). Qiao et al. (2016) ont démontré qu'une limitation en nitrate augmentait les SFA et MUFA mais diminuait les PUFA. Hill et al. (2011) ont quant à eux noté une diminution des SFA et MUFA et une augmentation des PUFA avec un enrichissement du milieu en phosphate.

Par ailleurs un herbicide se présente principalement avec d'autres molécules dans les milieux aquatiques naturels tels que des substances métalliques ou nutriments (nitrate, phosphate, silice) (Montuelle et al., 2010).

Il a été démontré dans la littérature que la complexité des environnements naturels pouvait moduler les effets d'un polluant : par antagonisme, par exemple avec la stimulation de la croissance du périphyton par une forte concentration en nutriments (Lozano and Pratt, 1994; Morin et al., 2008b).

En effet, ces travaux de thèse n'ont pas démontré d'impacts importants du S-métolachlore sur les paramètres biologiques étudiés tels que les profils d'acides gras. Plusieurs hypothèses ont pu être formulées pour expliquer ces résultats, notamment celle stipulant que les fortes

concentrations en nutriments présentes dans le milieu Dauta (surtout nitrate et phosphate) auraient pu masquer partiellement les effets de ce pesticide.

Il serait donc intéressant dans **une future étude** d'étudier l'impact de ces fortes concentrations en nutriments, et notamment les ratios N/P (nitrate/phosphate) sur la toxicité du S-métolachlore et du diuron sur les profils d'acides gras de *G. gracile*. Pour ce faire *G. gracile* pourrait être exposée à des traitements similaires à ceux utilisés lors des recherches actuelles mais en y ajoutant :

- 1) Un témoin avec une concentration plus faible en nitrate et un second avec une concentration plus faible en phosphate dans le but de modifier le ratio N/P (divisé par 2) ;
- 2) De la même manière que précédemment, un témoin avec une seconde concentration plus faible en nitrate et un second avec une concentration plus faible en phosphate (divisée par 10) ;
- 3) Un traitement S-métolachlore et un traitement diuron, mélangés au milieu Dauta composé d'une concentration plus faible en nitrate puis en phosphate (divisée par 2) ;
- 4) Un traitement S-métolachlore et un traitement diuron, mélangés au milieu Dauta composé d'une seconde concentration plus faible en nitrate puis en phosphate (divisée par 10).

**Tableau 10 :** Concentrations moyennes en nitrate, phosphate et silice (mg.L<sup>-1</sup>) dans le milieu Dauta utilisé dans ces travaux en comparaison aux concentrations moyennes (mg.L<sup>-1</sup>) retrouvées dans les bassins versant de la Garonne, Seine, Loire et du Rhône (données issues de l'étude de Leboucher et al. (submitted) pour la période Avril – Novembre), et en comparaison aux valeurs de concentrations moyennes (mg.L<sup>-1</sup>) de nutriments (2009-2015) retrouvées dans les cours d'eau français et issues d'une base de données de paramètres physico-chimiques accessible dans la base Pandore.

|  | Nitrate (mg.L <sup>-1</sup> ) | Phosphate (mg.L <sup>-1</sup> ) | Silice (mg.L <sup>-1</sup> ) |
|--|-------------------------------|---------------------------------|------------------------------|
| <b>Dauta expérimental T0</b>   | 39,6                          | 4,21                            | 36,24                        |
| <b>Dauta expérimental T7</b>   | 26,98                         | 3,49                            | 1,76                         |
| <b>Bassin versant de la Garonne</b><br>(Leboucher et al., submitted) | 2,49                          | 0,13                            | /                            |
| <b>Bassin versant de la Seine</b><br>(Leboucher et al., submitted)   | 4,15                          | 0,14                            | /                            |
| <b>Bassin versant de la Loire</b><br>(Leboucher et al., submitted)   | 2,91                          | 0,22                            | /                            |
| <b>Bassin versant du Rhône</b><br>(Leboucher et al., submitted)      | 1,69                          | 0,15                            | /                            |
| <b>Cours d'eau français (2009-2015)</b><br>(base Pandore)            | 13,9                          | 0,16                            | 9,62                         |

## Température

Les résultats publiés ou soumis issus de ces travaux de thèse portent sur l'exposition des cultures de diatomées à **une seule température**, qui a été sélectionnée en fonction de recherches bibliographiques et d'études déjà réalisées au sein du laboratoire. La température alors choisie a été celle de **20,5 °C** représentant la température optimale de croissance des cultures étudiées.

Cependant, il a été démontré dans plusieurs études que la température impactait la composition en acides gras des diatomées (Aussant et al., 2018; Bojko et al., 2017; Nalley et al., 2018; Steinrücken et al., 2018).

De manière générale, une augmentation de la température engendre une augmentation de la proportion des SFA. A l'inverse, quand la température diminue, une augmentation des PUFA est observée (Sharma et al., 2012). Ces variations sont expliquées par un ajustement de la production de lipides membranaires par la cellule : une surproduction de lipides composés d'acides gras à haut degré d'insaturations permet de compenser la diminution de la fluidité membranaire aux basses températures, l'augmentation de lipides à longue chaîne et composés d'acides gras saturés au contraire rigidifie la membrane en réponse à une augmentation de fluidité produite par une hausse de température (Gonçalves et al., 2018b).

Chez les diatomées benthiques marines, une accumulation en PUFA a été observée à faible température (Li et al., 2014b). Une étude de Jiang and Gao (2004) sur la diatomée *Phaeodactylum tricornutum*, soumise à différentes températures (25, 20, 15 puis 10 °C) a démontré que le passage de 25 °C à 10 °C s'est marqué par une diminution de 30 % de l'acide gras saturé 16:0 et d'une augmentation de 85 % de l'acide gras polyinsaturé EPA (Jiang and Gao, 2004).

Il est intéressant de noter que durant ces travaux de thèse, l'impact du diuron et du S-métolachlore sur les profils d'acides gras de GGRA et NPAL a pu être étudié à une température de **17,5 °C**.

Les résultats obtenus sont présentés ci-dessous ;

- ***Témoins :***

Les mêmes tendances ont pu être notées entre les deux espèces étudiées ; l'augmentation de la température de 17,5 °C à 20,5 °C a engendré une diminution de la teneur en SFA, MUFA et une augmentation de celle en PUFA et HUFA (Figure 29). Les résultats ainsi observés ne concordent pas avec la littérature évoquée précédemment.

Cependant, une récente étude a étudié l'impact de la température sur les acides gras de huit espèces de microalgues expliquant l'importance de considérer les conditions optimales de croissances sur leur production de lipides (Aussant et al., 2018). Il a été montré que la production maximale d'EPA chez les espèces étudiées a été observée pour les températures optimales de croissance (températures pour lesquelles la croissance cellulaire est maximale).

Cette approche pourrait alors expliquer les résultats obtenus lors ces travaux de thèse. En effet l'augmentation de la température de 17,5 °C à 20,5 °C s'est traduite par l'augmentation de l'activité photosynthétique des diatomées, suggérant une amélioration de leur état physiologique, ainsi que leur proportion en acides gras insaturés et une diminution des proportions en acides gras saturés.

Finalement, il est possible que la variation des acides gras insaturés due à un stress de température soit observée à des températures plus extrêmes.

- **Diuron :**

Il a été démontré qu'à 17,5 °C la présence de diuron n'a pas entraîné de modifications significatives chez GGRA contrairement à 20,5 °C où une diminution de la teneur en SFA et HUFA et une augmentation en MUFA ont été observées (Figure 30).

Concernant NPAL, à 17,5 °C le diuron a augmenté la proportion de PUFA et diminué celle en SFA. A une température de 20,5 °C, le diuron a augmenté la teneur en SFA et a diminué celle en HUFA (Figure 31).

- **S-métolachlore :**

Aucune évolution significative n'a été observée pour la composition en acides gras de GGRA et NPAL en réponse à la contamination en S-métolachlore et aux deux températures testées (Figure 32).

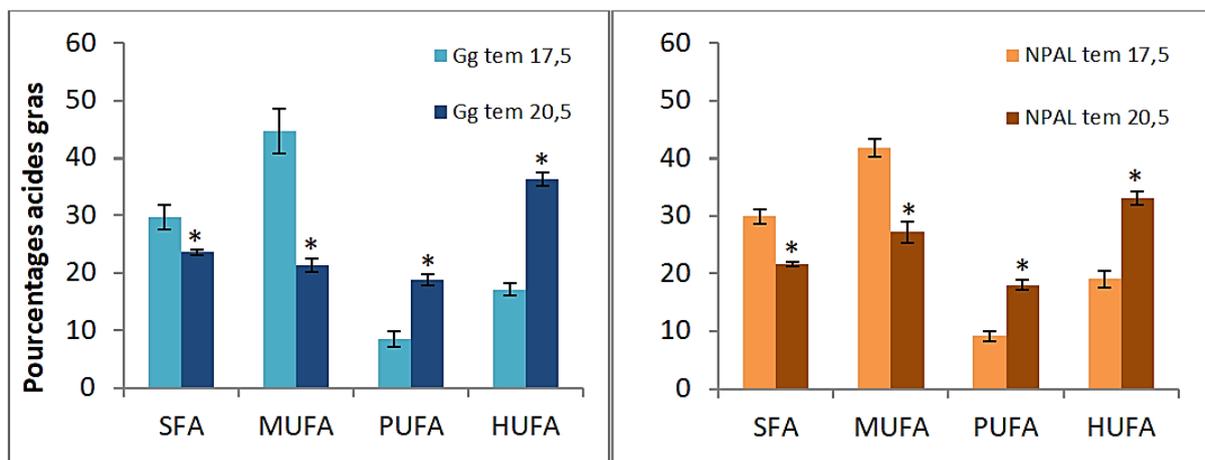


Figure 29 : Pourcentages d'acides gras chez GGRA (à gauche) et NPAL (à droite) aux deux températures testées sans contamination. \* : indique une différence significative entre les deux températures testées ( $p < 0.05$ ). Gg tem 17,5 = traitement témoin de la culture *Gomphonema gracile* à 17,5 °C, Gg tem 20,5 = traitement témoin de la culture *Gomphonema gracile* à

20,5 °C. NPAL tem 17,5 = traitement témoin de la culture *Nitzschia palea* à 17,5 °C, NPAL tem 20,5 = traitement témoin de la culture *Nitzschia palea* à 20,5 °C.

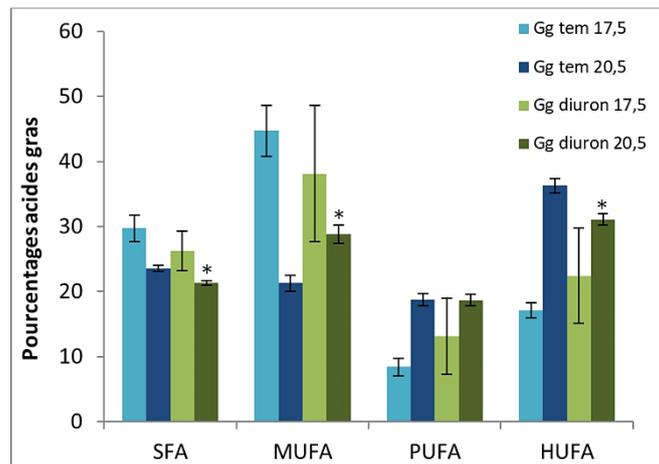


Figure 30 : Pourcentage d'acides gras de GGRA sans et avec contamination en diuron aux deux températures testées. \* : indique une différence significative entre le traitement témoin et diuron aux deux températures testées ( $p < 0.05$ ). Gg tem 17,5 = traitement témoin de la culture *Gomphonema gracile* à 17,5 °C, Gg tem 20,5 = traitement témoin de la culture *Gomphonema gracile* à 20,5 °C, Gg diuron 17,5 = traitement contaminé en diuron à 17,5 °C, Gg diuron 20,5 = traitement contaminé en diuron à 20,5 °C.

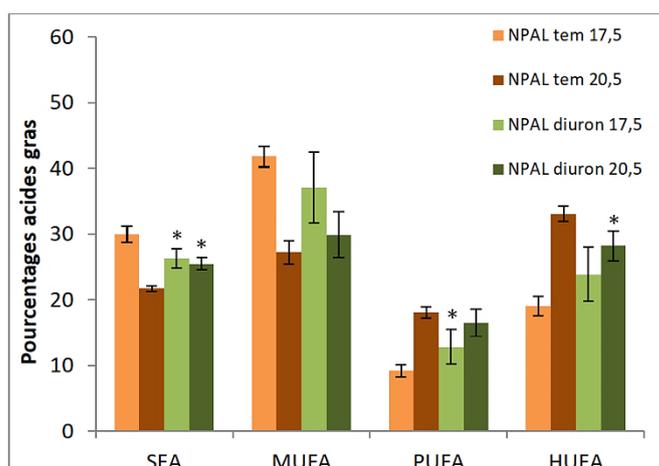
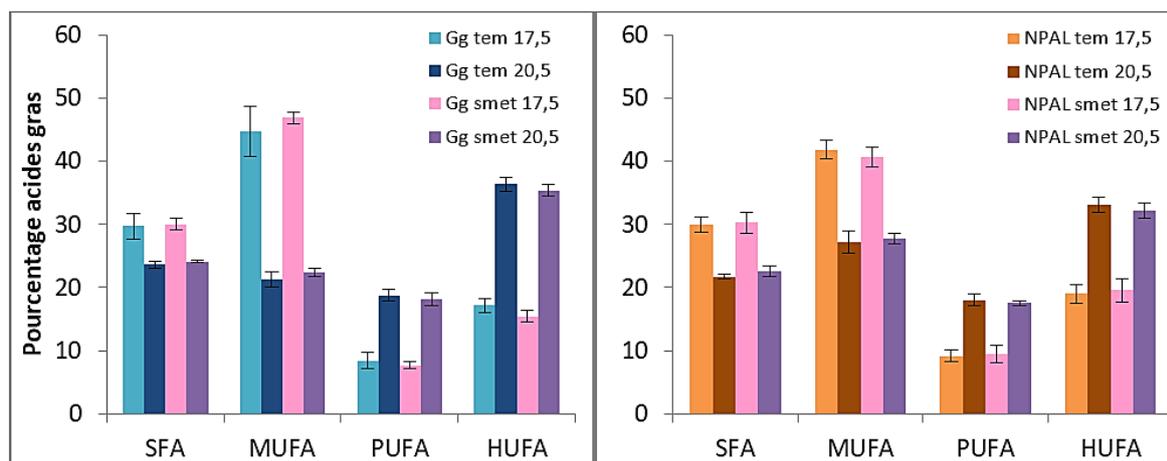


Figure 31 : Pourcentage d'acides gras de NPAL sans et avec contamination en diuron aux deux températures testées. \* : indique une différence significative entre le traitement témoin et diuron

aux deux températures testées ( $p < 0.05$ ). NPAL tem 17,5 = traitement témoin de la culture *Nitzschia palea* à 17,5 °C, NPAL tem 20,5 = traitement témoin de la culture *Nitzschia palea* à 20,5 °C, NPAL diuron 17,5 = traitement contaminé en diuron à 17,5 °C, NPAL diuron 20,5 = traitement contaminé en diuron à 20,5 °C.



**Figure 32 :** Pourcentage d'acides gras de GGRA (à gauche) et de NPAL (à droite) sans et avec contamination en S-métolachlore aux deux températures testées. \* : indique une différence significative entre le traitement témoin et diuron aux deux températures testées ( $p < 0.05$ ). Gg tem 17,5 = traitement témoin de la culture *Gomphonema gracile* à 17,5 °C, Gg tem 20,5 = traitement témoin de la culture *Gomphonema gracile* à 20,5 °C, Gg smet 17,5 = traitement contaminé en S-métolachlore à 17,5 °C, Gg smet 20,5 = traitement contaminé en S-métolachlore à 20,5 °C. NPAL tem 17,5 = traitement témoin de la culture *Nitzschia palea* à 17,5 °C, NPAL tem 20,5 = traitement témoin de la culture *Nitzschia palea* à 20,5 °C, NPAL smet 17,5 = traitement contaminé en S-métolachlore à 17,5 °C, NPAL smet 20,5 = traitement contaminé en S-métolachlore à 20,5 °C.

La modulation par la température de l'effet du contaminant a donc été davantage visible avec le diuron qu'avec le S-métolachlore.

Cependant il est nécessaire de considérer ces résultats avec précautions du fait du design expérimental mis en place. En effet, par soucis de gestion des échantillons il a été convenu de réaliser les deux expériences (17,5 °C et 20,5 °C) sur deux semaines distinctes.

Or, suite aux analyses de concentrations en nitrate dans les échantillons, une concentration plus importante à T7 a été notée pour les témoins de l'expérience réalisée à 20,5 °C en comparaison de celle réalisée à 17,5 °C (Tableau 11). Ces différentes concentrations ont pu ainsi engendrer des modifications différentes des profils d'acides gras (comme présenté dans la partie précédente) résultant alors de l'impossibilité de conclure sur la modulation réelle par la température de l'impact du diuron.

Tableau 11 : Concentration en sels nutritifs dans les échantillons témoins à T0 aux deux températures testées.

|                                      | 17,5 °C      | 20,5 °C      |
|--------------------------------------|--------------|--------------|
| <b>Nitrate (mg.L<sup>-1</sup>)</b>   | 33,64 ± 0.18 | 37,34 ± 0.19 |
| <b>Phosphate (mg.L<sup>-1</sup>)</b> | 4.68 ± 0.02  | 4,88 ± 0.06  |
| <b>Silice (mg.L<sup>-1</sup>)</b>    | 30.14 ± 1.85 | 37,15 ± 3,01 |

Ainsi lors de **recherches ultérieures** il serait nécessaire de réaliser des expériences similaires à celles effectuées lors de ces travaux de recherches mais en y insérant **deux températures supplémentaires** (15 °C et 25 °C dans le but de rester dans des conditions environnementales). De ce fait il serait possible de comparer les résultats obtenus avec ceux de ces travaux de recherches et finalement de déterminer l'influence de la température sur les résultats de nos travaux de thèse.

En effet, une étude réalisée sur la diatomée *Navicula pelliculosa*, soumise à une contamination en atrazine (connue pour inhiber le photosystème II), a montré une modulation possible de la

toxicité de l'atrazine par la température (Chalifour and Juneau, 2011). Pour des descripteurs tels que le taux de croissance, la teneur en pigments et la photosynthèse, la diatomée s'est montrée plus sensible à l'atrazine à basse température. D'autres études ont suggéré qu'une température élevée pouvait diminuer la toxicité des herbicides (Guasch et al., 1997; Larras et al., 2013).

### Intensité lumineuse

De la même manière que pour la température, lors de ces travaux de thèse GGRA et NPAL n'ont été exposées qu'à **une seule intensité lumineuse**, choisie à partir d'expériences précédentes réalisées au sein du laboratoire et pour laquelle la croissance des diatomées paraissait optimale pour l'espèce GGRA. Cette intensité était de **45  $\mu\text{mol photons}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$** . Pour des raisons logistiques et pratiques et dans le but d'avoir des paramètres environnementaux similaires entre les deux espèces de diatomées étudiées, l'intensité lumineuse appliquée pour l'espèce NPAL a été la même que celle appliquée pour GGRA.

Or il a été noté dans plusieurs études que la composition en pigments, la biomasse mais aussi la composition en acides gras des diatomées, étaient modulées par l'intensité lumineuse (Admiraal and Peletier, 1980; Li et al., 2014b).

Pour des intensités lumineuses élevées, un dommage oxydatif des PUFA ainsi qu'une augmentation des lipides neutres de stockage riches en SFA et MUFA sont observés.

Ce stress est utilisé en biotechnologie et particulièrement dans le domaine de la bioénergie, comme technique d'induction des lipides neutres de stockage pour la production de biocarburant. A l'inverse, une faible intensité lumineuse induit la formation de PUFA. Par exemple, des études sur la diatomée marine *Phaeodactylum tricornutum* ont noté l'augmentation de la production de l'acide gras EPA à faible intensité lumineuse (Sharma et al., 2012).

Par ailleurs, l'étude de Bonnineau et al. (2012) portant sur l'impact du glyphosate sur le biofilm à différentes intensités lumineuses a démontré que la lumière modulait la réponse du biofilm au glyphosate, particulièrement au niveau de l'activité photosynthétique. Une autre étude évaluant la toxicité de l'atrazine sur une communauté de périphyton à différentes intensités lumineuses a démontré que l'inhibition de la photosynthèse était plus importante à forte intensité lumineuse (Guasch et al., 1997).

Il serait alors nécessaire dans **des études prochaines** de déterminer l'influence de l'intensité lumineuse sur les résultats de ces travaux de thèse. Des expériences similaires à celles de cette thèse pourraient être réalisées en y ajoutant **deux intensités lumineuses complémentaires** par exemple (plus basse et plus forte que celle utilisée actuellement).

Par exemple, pour le choix de ces intensités lumineuses complémentaires, il pourrait être envisagé de se baser sur les résultats des Rapid Light Curves obtenues par Coquillé and Morin (2019), qui présentent une valeur d'intensité pour laquelle démarre la saturation lumineuse pour GGRA à  $420 \mu\text{mol photons.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ .

### *iii. Contaminants testés*

#### Mélange de composés

Dans ces travaux de thèse, les impacts des deux herbicides isolés ont été observés. Cependant, les milieux aquatiques naturels sont composés de mélange d'herbicides et non de substances isolées.

Il serait ainsi nécessaire dans de  **futures recherches**  d'étudier l'impact de mélange d'herbicides sur les profils d'acides gras d'une seule espèce de diatomée pour commencer telle que GGRA, puis sur plusieurs espèces et pour finir sur un biofilm, dans le but de se rapprocher au mieux des conditions environnementales.

Lors d'**une première recherche** il serait pertinent d'étudier les impacts du mélange diuron et S-métolachlore sur les profils d'acides gras de GGRA. Les concentrations testées pourraient être similaires à celles utilisées dans cette thèse, à savoir 10 µg.L<sup>-1</sup> chacun. Finalement il serait approprié de comparer ces résultats avec ceux obtenus lors de ces travaux de thèse dans le but de déterminer si les effets du mélange concordent avec ces travaux de thèse ou si au contraire les effets de ce mélange se présentent comme **antagonistes, synergiques ou additifs**.

En effet, Dupraz et al. (2019) ont mené une étude sur l'impact de mélanges de pesticides notamment sur la croissance, la photosynthèse et la teneur lipidique des microalgues marines *Skeletonema marinoi* et *Tisochrysis lutea*.

Celle-ci a montré :

- Un effet synergique du mélange d'isoproturon et de métazachlore sur l'activité photosynthétique et la teneur lipidique de l'espèce *S. marinoi* ;
- Le mélange d'isoproturon et de diuron à quant à lui montré un effet additif notamment sur la teneur lipidique des deux espèces de microalgues.

#### *iv. Finalité : application des profils d'acides gras sur le terrain*

Finalement, il serait nécessaire de confronter les résultats de ces travaux de thèse ainsi que ceux des études supplémentaires proposées dans les parties précédentes, par des études sur le terrain en raison de la complexité de l'environnement naturel par rapport aux expériences en laboratoire.

Si des réponses cohérentes sont trouvées, l'analyse des acides gras constituerait une bonne alternative aux biomarqueurs actuels de la pollution au diuron sur le terrain, dans une perspective écosystémique (à travers les aspects de la qualité nutritive des organismes dans la chaîne trophique).

Des recherches précédentes réalisées au laboratoire Irstea ont permis de développer un système d'encagement (Vincent Roubex, Irstea) composé d'un tube en plastique obturé par des membranes dont la porosité permet le transfert de substances dissoutes uniquement et permettant ainsi le passage des expérimentations aux conditions environnementales parfaitement maîtrisées utilisant des cultures mono- ou plurispécifiques à des expositions *in situ* d'organismes "encagés" (Figure 33).

L'impact uniquement des conditions abiotiques du milieu sur les profils d'acides gras et lipidiques des diatomées serait alors envisageable *via* ce système (encagement de populations par exemple) tout en s'affranchissant de la variabilité de réponses inter-espèces.

Le transfert de substances au travers de la membrane composant ce système a pu être étudié et validé lors du stage de Audrey Lasserre (2016) offrant ainsi des perspectives prometteuses à ce type d'encagement pour l'exposition semi-contrôlée de populations aux mélanges réels de contaminants présents *in situ*.



Figure 33 : Système d'encagement sans renouvellement d'organismes développé par Vincent Roubex (Irstea).

## **b) Impacts des herbicides sur les mécanismes de synthèse des acides**

### **gras**

En plus des dix gènes d'intérêt présentés dans les chapitres 3 et 4, cinq autres gènes impliqués dans la synthèse des acides gras ont été recherchés et testés lors de ces travaux de thèse et particulièrement lors du stage de Laura Malbezin (2018).

- Trois gènes codant pour les enzymes  **$\Delta 5$ ,  $\Delta 6$  et  $\Delta 9$  désaturases** ;
- Un gène codant pour l'**énoyl-ACP-réductase** ;
- Et un gène codant pour la **3-oxoacyl-ACP-synthase**.

Concernant le clonage de ces gènes, les produits de PCR codant pour la  $\Delta 9$  désaturase, la 3-oxoacyl-ACP-synthase et l'énoyl-ACP-réductase ont été envoyés au séquençage. Parmi les séquences obtenues, seule la  $\Delta 9$  désaturase s'est montrée exploitable ; elle est composée de 494 nucléotides. Une interrogation de banque de donnée via l'algorithme Blast a montré que cette séquence code pour une protéine de 164 acides aminés possédant de fortes homologies avec des  $\Delta 9$  désaturases.

Finalement, en plus des dix gènes d'intérêt de ce travail, il serait intéressant d'étudier la réponse du gène  **$\Delta 9$  désaturase** obtenue lors de la recherche de gènes, face à une contamination aux herbicides.

Il serait donc pertinent de réaliser des **études complémentaires** en y insérant la réponse de ce gène face à une contamination et notamment aux herbicides afin de compléter ces travaux de thèse.

De même, il serait intéressant de poursuivre la recherche des gènes codant pour la **3-oxoacyl-ACP-synthase** et l'**énoyl-ACP-réductase** et de les intégrer dans le cas de résultats positifs dans des études complémentaires.

L'étude de la réponse de ces gènes permettrait de renseigner sur les effets des herbicides (ou autres contaminants) au niveau des **voies de synthèse des acides gras**. En comparant les niveaux d'expression induits par les herbicides et les profils d'acides gras obtenus, il serait ainsi possible d'obtenir des **informations supplémentaires** sur le **mode d'action** de ces contaminants.

Aussi, il serait intéressant de coupler des analyses transcriptomiques (RNAseq) à des analyses protéomiques haut débit dans le but d'observer la corrélation des réponses, face à une contamination, des étapes de transcription et de traduction réalisées pour la synthèse des acides gras.

De plus, il serait envisageable de coupler ces analyses à des analyses de métabolomiques qui permettraient d'obtenir une vision plus exhaustive de la réponse des diatomées face à une contamination et ainsi d'observer des modifications de certaines voies de synthèse comme celle des lipides par exemple.

### **c) Impacts des herbicides sur la qualité nutritive des diatomées**

Ces travaux de thèse ont démontré que le diuron diminuait **les proportions d'EPA** chez les diatomées d'eau douce GGRA et NPAL.

Comme ces organismes constituent la base de la **chaîne trophique**, nous pouvons supposer des effets directs et indirects de la diminution de la qualité nutritionnelle des diatomées pour les maillons supérieurs (Filimonova et al., 2018; Gonçalves et al., 2017; Neury-Ormanni et al., submitted).

Il serait finalement intéressant dans de  **futures recherches** d'étudier l'impact de contaminants, et notamment des herbicides pour compléter ces travaux de thèse, sur les diatomées ainsi

que sur un **maillon trophique supérieur** tel qu'un brouteur, *Daphnia magna* par exemple (Tifnouti et al., 1994).

Une **future recherche** pourrait avoir l'objectif d'étudier les impacts directs et indirects de deux contaminants : le S-métolachlore et le diuron sur une chaîne trophique simplifiée. Celle-ci permettrait d'évaluer l'ampleur des impacts directs et trophiques de ces polluants à deux concentrations distinctes, une environnementale et une élevée. Ces deux concentrations seraient choisies à partir des valeurs d'écotoxicité ( $CE_{50}$ ) retrouvées dans la littérature pour les daphnies et les diatomées (Tableau 12).

Tableau 12 :  $CE_{50}$  -  $CL_{50}$  du diuron et du S-métolachlore pour les daphnies et les diatomées.

|                  | Diuron   | S-métolachlore  |
|------------------|--|---|
| <b>Daphnies</b>  | <p><b><math>CE_{50} = 8600 \mu\text{g.L}^{-1}</math></b><br/>           (Fernández-Alba et al., 2002)<br/>           (% inhibition de la mobilité)</p>   | <p><b><math>CL_{50} = 51200 \mu\text{g.L}^{-1}</math></b><br/>           (Liu et al., 2006)</p>   |
| <b>Diatomées</b> | <p><b><math>CE_{50} = 0,7 \mu\text{g.L}^{-1}</math></b><br/>           (Ma et al., 2006)<br/> <b><math>CE_{50} = 6,6 \mu\text{g.L}^{-1}</math></b><br/>           (Okamura et al., 2003)<br/> <b><math>CE_{50} = 4,3 \mu\text{g.L}^{-1}</math></b><br/>           (Ma et al., 2002)<br/>           (% inhibition de la croissance)</p> | <p><b><math>CE_{50} = 68 \mu\text{g.L}^{-1}</math></b><br/>           (Liu and Xiong, 2009)<br/> <b><math>CE_{50} = 2300 \mu\text{g.L}^{-1}</math></b><br/>           (Vallotton et al., 2008)<br/>           (% inhibition de la croissance)</p> |

- 1) Dans un premier temps, l'impact de la **contamination directe** serait étudié dans deux expériences à court terme sur une diatomée d'une part et sur un brouteur d'autre part (Figure 34).
- a) D'une part, la diatomée d'eau douce GGRA serait exposée seule pendant sept jours à ces contaminants ;
- ❖ Chaque jour, l'inhibition de la croissance serait déterminée par un comptage quotidien des cellules sur cellule de Nageotte et l'activité photosynthétique à l'aide d'un fluorimètre PHYTO-PAM.
  - ❖ La bioaccumulation des contaminants dans GGRA serait déterminée à T1 et T7 suivant le protocole de Coquillé et al. (2015).
  - ❖ Après 7 jours d'exposition, le profil lipidique et le profil d'acides gras (notamment EPA) de GGRA seraient analysés.
- b) D'autre part, le brouteur *Daphnia magna* (nourri quotidiennement par une culture non contaminée de GGRA) serait exposé pendant sept jours avec les mêmes contaminants et les mêmes concentrations que l'expérience sur GGRA.
- ❖ Chaque jour, la survie et l'immobilisation de *Daphnia magna* seraient déterminées.
  - ❖ La bioaccumulation des contaminants serait également étudiée à T1 et T7.
  - ❖ Après les 7 jours d'exposition, le profil lipidique et le profil en acides gras (notamment EPA) du brouteur seraient analysés.
  - ❖ Entre T0 et T7, des comptages de diatomées seraient réalisés pour chaque traitement dans le but de connaître la quantité de diatomées ingérées par *Daphnia magna* sans et avec contamination ; le prélèvement pour le comptage étant réalisé avant l'ajout quotidien de nourriture.

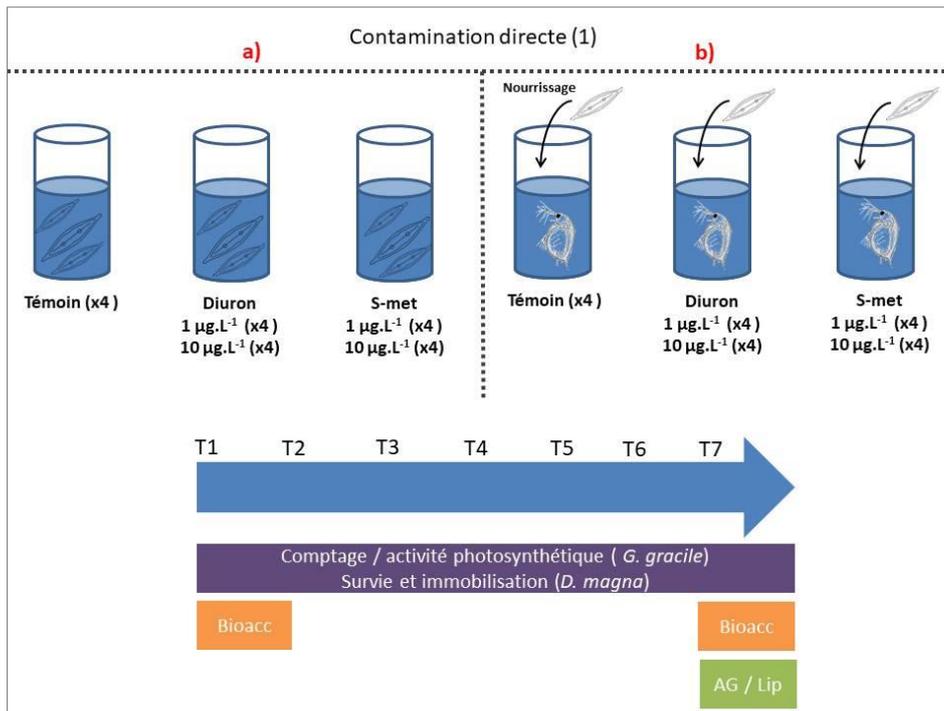


Figure 34 : Design expérimental de l'expérience en contamination directe de GGRA et *D. magna* par le diuron et le S-métolachlore.

2) Dans un second temps, l'impact de la **contamination indirecte** (par la voie trophique) serait étudié (Figure 35).

Pour répondre à cette question, *Daphnia magna* serait exposée à de la nourriture contaminée : GGRA préalablement cultivée dans un milieu contaminé selon les mêmes modalités qu'en 1), et renouvelée quotidiennement.

- ❖ Chaque jour, la survie et l'immobilisation de *Daphnia magna* seraient déterminées.
- ❖ La bioaccumulation des deux contaminants chez *Daphnia magna* serait analysée à T1 et T7.
- ❖ Après les 7 jours d'exposition, le profil lipidique et le profil d'acides gras (notamment EPA) du brouteur seraient analysés.

- ❖ A T7, des comptages de diatomées seraient effectués pour chaque traitement afin de noter la quantité de diatomées ingérées par *Daphnia magna* sans et avec contamination de la nourriture.

Par comparaison avec la question précédente (1), cette analyse pourrait finalement démontrer la dépendance entre la quantité et la qualité des diatomées broutées par *Daphnia magna*.

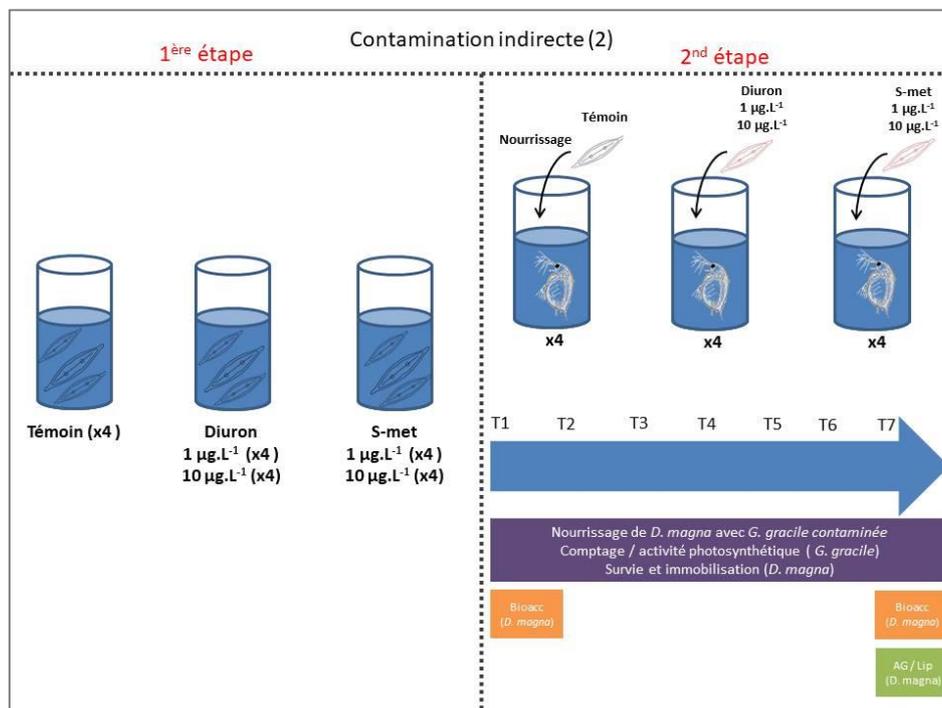


Figure 35 : Design expérimental de l'expérience en contamination indirecte (voie trophique) de *D. magna* par GGRA contaminée en diuron et S-métolachlore.

Suites aux résultats obtenus, des analyses statistiques seraient réalisées dans le but :

- ✓ D'analyser les effets des deux contaminants sur les deux organismes séparés (expérience 1) ;
- ✓ D'analyser les effets des deux contaminants sur le brouteur alimenté par des diatomées contaminées (expérience 2) ;

- ✓ Et finalement de déterminer l'impact des contaminants sur la **qualité nutritionnelle des diatomées**, sur le **comportement alimentaire de *Daphnia magna*** et sur le **transfert des contaminants et des acides gras** d'intérêt dans une **chaîne trophique** simplifiée.

---

# **Bibliographie**

---



## A

- Abida, H., Dolch, L.-J., Meï, C., Villanova, V., Conte, M., Block, M. A., Finazzi, G., Bastien, O., Tirichine, L., and Bowler, C., 2015, Membrane glycerolipid remodeling triggered by nitrogen and phosphorus starvation in *Phaeodactylum tricorutum*: Plant Physiology, v. 167, no. 1, p. 118-136.
- Adams, S. M., and Greeley, M. S., 2000, Ecotoxicological indicators of water quality: Using multi-response indicators to assess the health of aquatic ecosystems: Water, Air, and Soil Pollution, v. 123, no. 1-4, p. 103-115.
- Admiraal, W., 1976, Influence of light and temperature on the growth rate of estuarine benthic diatoms in culture: Marine Biology, v. 39, no. 1, p. 1-9.
- Admiraal, W., and Peletier, H., 1980, Influence of seasonal variations of temperature and light on the growth rate of cultures and natural populations of intertidal diatoms: Marine Ecology Progress Series, v. 2, no. 35-43.
- AFNOR, 2001, Water quality - Determination of soluble silicates - Molecular absorption spectrometric method - NF T 90-007.
- Alix, A., Barriuso, E., Bedos, C., Bonicelli, B., Caquet, T., Dubus, I., Gascuel, C., Gril, J.-J., and Voltz, M., 2005, Devenir et transfert des pesticides dans l'environnement et impacts biologiques: Pesticides, agriculture et environnement. Réduire l'utilisation des pesticides et limiter leurs impacts environnementaux. Rapport d'Expertise scientifique collective, INRA et CEMAGREF.
- Allan, E. L., Ambrose, S. T., Richoux, N. B., and Froneman, P. W., 2010, Determining spatial changes in the diet of nearshore suspension-feeders along the South African coastline: Stable isotope and fatty acid signatures: Estuarine, Coastal and Shelf Science, v. 87, no. 3, p. 463-471.

- Almeida, A. C., Gomes, T., Langford, K., Thomas, K. V., and Tollefsen, K. E., 2019, Oxidative stress potential of the herbicides bifenoxy and metribuzin in the microalgae *Chlamydomonas reinhardtii*: *Aquatic Toxicology*, v. 210, p. 117-128.
- Alonso, D. L., Grima, E. M., Pérez, J. S., Sánchez, J. G., and Camacho, F. G., 1992, Isolation of clones of *Isochrysis galbana* rich in eicosapentaenoic acid: *Aquaculture*, v. 102, no. 4, p. 363-371.
- Amblard, C., Boisson, J., Bourdier, G., Fontvieille, D., Gayte, X., and Sime-Ngando, T., 1998, Ecologie microbienne en milieu aquatique: des virus aux protozoaires: *Revue des sciences de l'eau/Journal of Water Science*, v. 11, p. 145-162.
- Amiard, J., Caquet, T., and Lagadic, L., 1998, Les biomarqueurs parmi les méthodes d'évaluation de la qualité de l'environnement: Utilisation de biomarqueurs pour la surveillance de la qualité de l'environnement. Lavoisier Publ., Tec & Doc, Paris, p. 320.
- Arisz, S. A., van Himbergen, J. A., Musgrave, A., van den Ende, H., and Munnik, T., 2000, Polar glycerolipids of *Chlamydomonas moewusii*: *Phytochemistry*, v. 53, no. 2, p. 265-270.
- Arora, A., Sairam, R., and Srivastava, G., 2002, Oxidative stress and antioxidative system in plants: *Current science*, p. 1227-1238.
- Arts, M. T., Brett, M. T., and Kainz, M., 2009, *Lipids in Aquatic Ecosystems*, Springer New York.
- Aubertot, J.-N., Barbier, J. M., Carpentier, A., Gril, J.-N., Guichard, L., Lucas, P., Savary, S., and Voltz, M., 2007, Pesticides, agriculture et environnement. Réduire l'utilisation des pesticides et en limiter les impacts environnementaux. Expertise scientifique collective Inra-Cemagref (décembre 2005).

Aussant, J., Guihéneuf, F., and Stengel, D. B., 2018, Impact of temperature on fatty acid composition and nutritional value in eight species of microalgae: *Applied Microbiology and Biotechnology*, v. 102, no. 12, p. 5279-5297.

Aydinalp, C., and Porca, M., 2004, The effects of pesticides in water resource: *Journal of Central European Agriculture*, v. 5, no. 1, p. 5-12.

## B

- Baars, J. W., 1983, Autecological investigations on freshwater diatoms-1. Generation times of some species: *Algological Studies/Archiv für Hydrobiologie, Supplement Volumes*, p. 11-18.
- Badmus, J. A., Adedosu, T. O., Fatoki, J. O., Adegbite, V. A., Adaramoye, O. A., and Odunola, O. A., 2011, Lipid peroxidation inhibition and antiradical activities of some leaf fractions of *Mangifera indica*: *Acta Poloniae Pharmaceutica*, v. 68, no. 1, p. 23-29.
- Badr, S., and Abou-Waly, H., 1997, Growth response of freshwater algae to continuous flow of terbutryn: *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, v. 59, no. 2, p. 298-305.
- Berg, J. M., Tymoczko, J. L., and Stryer, L., 2008, *Biochemistry (Loose-Leaf)*, Macmillan.
- Berge, J.-P., Gouygou, J.-P., Dubacq, J.-P., and Durand, P., 1995, Reassessment of lipid composition of the diatom, *Skeletonema costatum*: *Phytochemistry*, v. 39, no. 5, p. 1017-1021.
- Blanchoud, H., Moreau-Guigon, E., Farrugia, F., Chevreuril, M., and Mouchel, J., 2007, Contribution by urban and agricultural pesticide uses to water contamination at the scale of the Marne watershed: *Science of the Total Environment*, v. 375, no. 1-3, p. 168-179.
- Bligh, E., and Dyer, W., 1959, A rapid method for lipid extraction for use in determining vitamin E} lipid ratios: *Canadian Journal of Biochemistry and Physiology*, v. 37, p. 911-917.
- Block, M. A., Dorne, A.-J., Joyard, J., and Douce, R., 1983, Preparation and characterization of membrane fractions enriched in outer and inner envelope membranes from spinach chloroplasts. II. Biochemical characterization: *Journal of Biological Chemistry*, v. 258, no. 21, p. 13281-13286.

- Boelen, P., van Dijk, R., Damsté, J. S. S., Rijpstra, W. I. C., and Buma, A. G., 2013, On the potential application of polar and temperate marine microalgae for EPA and DHA production: *AMB Express*, v. 3, no. 1, p. 26.
- Boelen, P., van Mastrigt, A., van de Bovenkamp, H. H., Heeres, H. J., and Buma, A. G., 2017, Growth phase significantly decreases the DHA-to-EPA ratio in marine microalgae: *Aquaculture International*, v. 25, no. 2, p. 577-587.
- Böger, P., 2003, Mode of action for chloroacetamides and functionally related compounds: *Journal of Pesticide Science*, v. 28, no. 3, p. 324-329.
- Böger, P., Matthes, B., and Schmalfuß, J., 2000, Towards the primary target of chloroacetamides—new findings pave the way: *Pest Management Science: formerly Pesticide Science*, v. 56, no. 6, p. 497-508.
- Bojko, M., Olchawa-Pajor, M., Chyc, M., Goss, R., Schaller-Laudel, S., and Latowski, D., Acclimatization of *Thalassiosira pseudonana* photosynthetic membranes to environmental temperature changes, in *Proceedings Proceedings of the 3rd World Congress on New Technologies (NewTech'17) Rome, Italy2017*.
- Bonnineau, C., Sague, I. G., Urrea, G., and Guasch, H., 2012, Light history modulates antioxidant and photosynthetic responses of biofilms to both natural (light) and chemical (herbicides) stressors: *Ecotoxicology*, v. 21, no. 4, p. 1208-1224.
- Brakes, C., and Smith, R. H., 2005, Exposure of non-target small mammals to rodenticides: short-term effects, recovery and implications for secondary poisoning: *Journal of Applied Ecology*, v. 42, no. 1, p. 118-128.
- Brett, M. T., and Müller-Navarra, D. C., 1997, The role of highly unsaturated fatty acids in aquatic foodweb processes: *Freshwater Biology*, v. 38, no. 3, p. 483-499.

- Brett, M. T., Müller-Navarra, D. C., Ballantyne, A. P., Ravet, J. L., and Goldman, C. R., 2006, Daphnia fatty acid composition reflects that of their diet: *Limnology and Oceanography*, v. 51, no. 5, p. 2428–2437.
- Brown, M. R., 2002, Nutritional value and use of microalgae in aquaculture: Avances en Nutrición Acuícola VI. Memorias del VI Simposium Internacional de Nutrición Acuícola, v. 3, p. 281-292.
- Brown, M. R., Dunstan, G. A., Norwood, S. J., and Miller, K. A., 1996, Effects of harvest stage and light on the biochemical composition of the diatom *Thalassiosira pseudonana* *Journal of Phycology*, v. 32, p. 64-73.
- Budge, S. M., Iverson, S. J., and Koopman, H. N., 2006, Studying trophic ecology in marine ecosystems using fatty acids: a primer on analysis and interpretation: *Marine Mammal Science*, v. 22, no. 4, p. 759-801.



- Cañavate, J. P., Armada, I., Ríos, J. L., and Hachero-Cruzado, I., 2016, Exploring occurrence and molecular diversity of betaine lipids across taxonomy of marine microalgae: *Phytochemistry*, v. 124, p. 68-78.
- Carder, J. P., and Hoagland, K. D., 1998, Combined effects of alachlor and atrazine on benthic algal communities in artificial streams: *Environmental Toxicology and Chemistry*, v. 17, no. 7, p. 1415-1420.
- Cartaxana, P., Domingues, N., Cruz, S., Jesus, B., Laviale, M., Serôdio, J., and da Silva, J. M., 2013, Photoinhibition in benthic diatom assemblages under light stress: *Aquatic Microbial Ecology*, v. 70, no. 1, p. 87-92.
- Cemagref, 1982, Etude des Méthodes Biologiques Quantitatives d'appréciation de la qualité des eaux - Rapport Division Qualité des Eaux Lyon, p. 218.
- Chalifour, A., Arts, M. T., Kainz, M. J., and Juneau, P., 2014, Combined effect of temperature and bleaching herbicides on photosynthesis, pigment and fatty acid composition of *Chlamydomonas reinhardtii*: *European Journal of Phycology*, v. 49, no. 4, p. 508-515.
- Chalifour, A., and Juneau, P., 2011, Temperature-dependent sensitivity of growth and photosynthesis of *Scenedesmus obliquus*, *Navicula pelliculosa* and two strains of *Microcystis aeruginosa* to the herbicide atrazine: *Aquatic Toxicology*, v. 103, no. 1-2, p. 9-17.
- Cheloni, G., and Slaveykova, V. I., 2013, Optimization of the C11-BODIPY<sup>581/591</sup> dye for the determination of lipid oxidation in *Chlamydomonas reinhardtii* by flow cytometry: *Cytometry Part A*, v. 83, no. 10, p. 952-961.
- Chu, F.-L. E., and Dupuy, J. L., 1980, The fatty acid composition of three unicellular algal species used as food sources for larvae of the American oyster (*Crassostrea virginica*): *Lipids*, v. 15, no. 5, p. 356.

- Cohen, Z., Norman, H. A., and Heimer, Y. M., 1993, Potential use of substituted pyridazinones for selecting polyunsaturated fatty acid overproducing cell lines of algae: *Phytochemistry*, v. 32, no. 2, p. 259-264.
- Cohn, S. A., 2001, Chapter 13 Photo-stimulated effects on diatom motility, *in* Häder, D.-P., and Breure, A. M., eds., *Comprehensive Series in Photosciences, Volume 1*, Elsevier, p. 375-401.
- Converti, A., Casazza, A. A., Ortiz, E. Y., Perego, P., and Del Borghi, M., 2009, Effect of temperature and nitrogen concentration on the growth and lipid content of *Nannochloropsis oculata* and *Chlorella vulgaris* for biodiesel production: *Chemical Engineering and Processing: Process Intensification*, v. 48, no. 6, p. 1146-1151.
- Cook, O., and Hildebrand, M., 2015, Enhancing LC-PUFA production in *Thalassiosira pseudonana* by overexpressing the endogenous fatty acid elongase genes: *Journal of Applied Phycology*, v. 28, no. 2, p. 897-905.
- Coquillé, N., 2017, Influence de la matière organique dissoute naturelle et d'herbicides, seuls et combinés, sur des microalgues marines et d'eau douce. [PhD: Université de Bordeaux.
- Coquillé, N., Jan, G., Moreira, A., and Morin, S., 2015, Use of diatom motility features as endpoints of metolachlor toxicity: *Aquatic Toxicology*, v. 158, p. 202-210.
- Coquillé, N., and Morin, S., 2019, Fitness of teratological morphotypes and heritability of deformities in the diatom *Gomphonema gracile*: *Ecological Indicators*, v. 106, p. 105442.
- Corcoll, N., Ricart, M., Franz, S., Sans-Piché, F., Schmitt-Jansen, M., and Guasch, H., 2012, The use of photosynthetic fluorescence parameters from autotrophic biofilms for monitoring the effect of chemicals in river ecosystems, *Emerging and priority pollutants in rivers*, Springer, p. 85-115.

Coste, M., Boutry, S., Tison-Rosebery, J., and Delmas, F., 2009, Improvements of the Biological Diatom Index (BDI): Description and efficiency of the new version (BDI-2006): *Ecological Indicators*, v. 9, no. 4, p. 621-650.

## D

- d'Elbée, J., 2016, *Mémento de planctonologie marine*, Editions Quae.
- da Costa, F., Le Grand, F., Quéré, C., Bougaran, G., Cadoret, J. P., Robert, R., and Soudant, P., 2017, Effects of growth phase and nitrogen limitation on biochemical composition of two strains of *Tisochrysis lutea*: *Algal Research*, v. 27, p. 177-189.
- Dalsgaard, J., St. John, M., Kattner, G., Müller-Navarra, D., and Hagen, W., 2003, Fatty acid trophic markers in the pelagic marine environment, *Advances in Marine Biology*, Volume 46, Academic Press, p. 225-340.
- Damien, A., 2013, *La biomasse énergie: Définitions, ressources et modes de transformation*, Dunod.
- Dauta, A., 1982, Conditions for phytoplankton development, a comparative study of the behaviour of eight species in culture. I. Determination of growth parameters in relation to light and temperature: *Annales de Limnologie*, v. 18, no. 3, p. 217-262.
- Dayer, R., Fischer, B. B., Eggen, R. I. L., and Lemaire, S. D., 2008, The peroxiredoxin and glutathione peroxidase families in *Chlamydomonas reinhardtii*: *Genetics*, v. 179, p. 41-57.
- De Hoop, L., De Troch, M., Hendriks, A. J., and De Laender, F., 2013, Modeling toxic stress by atrazine in a marine consumer-resource system: *Environmental Toxicology and Chemistry*, v. 32, no. 5, p. 1088-1095.
- Debenest, T., Pinelli, E., Coste, M., Silvestre, J., Mazzella, N., Madigou, C., and Delmas, F., 2009a, Sensitivity of freshwater periphytic diatoms to agricultural herbicides: *Aquatic Toxicology*, v. 93, no. 1, p. 11-17.
- Debenest, T., Pinelli, E., Coste, M., Silvestre, J., Mazzella, N., Madigou, C., and Delmas, F., 2009b, Sensitivity of freshwater periphytic diatoms to agricultural herbicides: *Aquatic Toxicology*, v. 93, no. 1, p. 11-17.

- Debenest, T., Silvestre, J., Coste, M., and Pinelli, E., 2010, Effects of Pesticides on Freshwater Diatoms, *in* Whitacre, D. M., ed., *Reviews of Environmental Contamination and Toxicology*: New York, NY, Springer New York, p. 87-103.
- DeLorenzo, M. E., Scott, G. I., and Ross, P. E., 2001, Toxicity of pesticides to aquatic microorganisms: A review: *Environmental Toxicology and Chemistry*, v. 20, no. 1, p. 84-98.
- Demailly, F., Elfeky, I., Malbezin, L., Le Guédard, M., Eon, M., Bessoule, J.-J., Feurtet-Mazel, A., Delmas, F., Mazzella, N., Gonzalez, P., and Morin, S., 2019, Impact of diuron and S-metolachlor on the freshwater diatom *Gomphonema gracile*: Complementarity between fatty acid profiles and different kinds of ecotoxicological impact-endpoints.: *Science of The Total Environment*, p. 960-969.
- Demailly, F., Le Guédard, M., Elfeky, I., Malbezin, L., Eon, M., Bessoule, J.-J., Feurtet-Mazel, A., Delmas, F., Mazzella, N., Gonzalez, P., and Morin, S., submitted, Interspecific variability in diatom responses to herbicide exposure from molecular to populational scales: *Ecological Indicators*.
- Dembitsky, V. M., 1996, Betaine ether-linked glycerolipids: Chemistry and biology: *Progress in Lipid Research*, v. 35, no. 1, p. 1-51.
- DeNoyelles, F., Kettle, W. D., and Sinn, D. E., 1982, The responses of plankton communities in experimental ponds to atrazine, the most heavily used pesticide in the United States: *Ecology*, v. 63, no. 5, p. 1285-1293.
- Depledge, M., 1994, The rational basis for the use of biomarkers as ecotoxicological tools: *Nondestructive biomarkers in vertebrates*, p. 271-295.
- Dixit, S. S., Smol, J. P., Kingston, J. C., and Charles, D. F., 1992, Diatoms: powerful indicators of environmental change: *Environmental Science & Technology*, v. 26, no. 1, p. 22-33.

- Domonkos, I., Kis, M., Gombos, Z., and Ughy, B., 2013, Carotenoids, versatile components of oxygenic photosynthesis: *Progress in lipid research*, v. 52, no. 4, p. 539-561.
- Domonkos, I., Laczkó-Dobos, H., and Gombos, Z., 2008, Lipid-assisted protein–protein interactions that support photosynthetic and other cellular activities: *Progress in lipid research*, v. 47, no. 6, p. 422-435.
- Dorigo, U., Bourrain, X., Bérard, A., and Leboulanger, C., 2004, Seasonal changes in the sensitivity of river microalgae to atrazine and isoproturon along a contamination gradient: *Science of The Total Environment*, v. 318, no. 1, p. 101-114.
- Dorigo, U., and Leboulanger, C., 2001, A pulse-amplitude modulated fluorescence-based method for assessing the effects of photosystem II herbicides on freshwater periphyton: *Journal of Applied Phycology*, v. 13, no. 6, p. 509-515.
- Dorigo, U., Leboulanger, C., Bérard, A., Bouchez, A., Humbert, J.-F., and Montuelle, B., 2007, Lotic biofilm community structure and pesticide tolerance along a contamination gradient in a vineyard area: *Aquatic Microbial Ecology*, v. 50, no. 1, p. 91-102.
- Dörmann, P., and Hölzl, G., 2009, The role of glycolipids in photosynthesis, *Lipids in Photosynthesis*, Springer, p. 265-282.
- Dorne, A.-J., Joyard, J., and Douce, R., 1990, Do thylakoids really contain phosphatidylcholine?: *Proceedings of the National Academy of Sciences*, v. 87, no. 1, p. 71-74.
- Dunstan, G. A., Volkman, J. K., Barrett, S. M., Leroi, J.-M., and Jeffrey, S. W., 1994, Essential polyunsaturated fatty acids from 14 species of diatom (Bacillariophyceae) *Phytochemistry*, v. 35, no. 1, p. 155-161.
- Duong, T. T., Morin, S., Herlory, O., Feurtet-Mazel, A., Coste, M., and Boudou, A., 2008, Seasonal effects of cadmium accumulation in periphytic diatom communities of freshwater biofilms: *Aquatic Toxicology*, v. 90, no. 1, p. 19-28.

- Dupraz, V., Coquillé, N., Ménard, D., Sussarellu, R., Haugarreau, L., and Stachowski-Haberkorn, S., 2016, Microalgal sensitivity varies between a diuron-resistant strain and two wild strains when exposed to diuron and irgarol, alone and in mixtures: *Chemosphere*, v. 151, p. 241-252.
- Dupraz, V., Ménard, D., Akcha, F., Budzinski, H., and Stachowski-Haberkorn, S., 2019, Toxicity of binary mixtures of pesticides to the marine microalgae *Tisochrysis lutea* and *Skeletonema marinoi*: Substance interactions and physiological impacts: *Aquatic Toxicology*, v. 211, p. 148-162.

## **E**

- Ecophyto, 2015, Plan Ecophyto II, Ministère de l'agriculture, de l'agroalimentaire et de la forêt, Ministère de l'écologie, de développement durable et de l'énergie.
- El-Sabaawi, R., Dower, J. F., Kainz, M., and Mazumder, A., 2009, Characterizing dietary variability and trophic positions of coastal calanoid copepods: insight from stable isotopes and fatty acids: *Marine biology*, v. 156, no. 3, p. 225-237.
- El-Sheekh, M. M., Kotkat, H. M., and Hammouda, O. H., 1994, Effect of atrazine herbicide on growth, photosynthesis, protein synthesis, and fatty acid composition in the unicellular green alga *Chlorella kessleri*: *Ecotoxicology and Environmental Safety*, v. 29, no. 3, p. 349-358.
- European Commission, 2000, Directive 2000/60/EC of the European Parliament and of the Council – Establishing a Framework for Community Action in the Field of Water Policy: Belgium.

## F

- FAO, 2003, International code of conduct on the distribution and use of pesticides (revised version: adopted by the hundred and twenty-third session of the FAO Council in november 2002). Rome: Food Agriculture Organization (FAO) of the United Nations, Rome 2003.
- Fauvelle, V., 2012, Evaluation de la contamination en pesticides des tributaires du bassin d'Arcachon et développement d'un échantillonneur passif spécifique des herbicides anioniques. [PhD: Université de Bordeaux.
- Fauvelle, V., Mazzella, N., Delmas, F., Madarassou, K., Eon, M., and Budzinski, H., 2012, Use of Mixed-Mode Ion Exchange Sorbent for the Passive Sampling of Organic Acids by Polar Organic Chemical Integrative Sampler (POCIS): *Environmental Science & Technology*, v. 46, no. 24, p. 13344-13353.
- Fernández-Alba, A., Hernando, M., Piedra, L., and Chisti, Y., 2002, Toxicity evaluation of single and mixed antifouling biocides measured with acute toxicity bioassays: *Analytica Chimica Acta*, v. 456, no. 2, p. 303-312.
- Fernández-Reiriz, M. J., Perez-Camacho, A., Ferreiro, M., Blanco, J., Planas, M., Campos, M., and Labarta, U., 1989, Biomass production and variation in the biochemical profile (total protein, carbohydrates, RNA, lipids and fatty acids) of seven species of marine microalgae: *Aquaculture*, v. 83, no. 1-2, p. 17-37.
- Filimonova, V., De Troch, M., Goncalves, F., Marques, J. C., Marques, S. M., Goncalves, A. M. M., and De Laender, F., 2018, Effects of a herbicide and copper mixture on the quality of marine plankton: *Ecotoxicology and Environmental Safety*, v. 156, p. 9-17.
- Filimonova, V., Gonçalves, F., Marques, J. C., De Troch, M., and Goncalves, A. M., 2016a, Fatty acid profiling as bioindicator of chemical stress in marine organisms: a review: *Ecological indicators*, v. 67, p. 657-672.

- Filimonova, V., Gonçalves, F., Marques, J. C., De Troch, M., and Gonçalves, A. M. M., 2016b, Biochemical and toxicological effects of organic (herbicide Primextra®Gold TZ) and inorganic (copper) compounds on zooplankton and phytoplankton species: *Aquatic Toxicology*, v. 177, p. 33-43.
- Filimonova, V., Gonçalves, F., Marques, J. C., De Troch, M., and Gonçalves, A. M. M., 2016c, Fatty acid profiling as bioindicator of chemical stress in marine organisms: A review: *Ecological Indicators*, v. 67, p. 657-672.
- Fletcher, J. S., Pflieger, T. G., and Ratsch, H. C., 1993, Potential environmental risks associated with the new sulfonylurea herbicides: *Environmental Science & Technology*, v. 27, no. 10, p. 2250-2252.
- Fuerst, E. P., 1987, Understanding the mode of action of the chloroacetamide and thiocarbamate herbicides: *Weed Technology*, v. 1, no. 4, p. 270-277.
- Fukuyama, T., Tajima, Y., Ueda, H., Hayashi, K., Shutoh, Y., Harada, T., and Kosaka, T., 2010, Apoptosis in immunocytes induced by several types of pesticides: *Journal of Immunotoxicology*, v. 7, no. 1, p. 39-56.



- Gao, J., Wang, Y., Gao, B., Wu, L., and Chen, H., 2012, Environmental fate and transport of pesticides: Pesticides—evaluation of environmental pollution. CRC Press Taylor and Francis Group, Boca Raton, p. 29-41.
- Gelabert, A., 2005, Caractérisation physico-chimique des interactions métaux-diatomées. [PhD: Université Paul-Sabatier de Toulouse III.
- Genty, B., Briantais, J.-M., and Baker, N. R., 1989, The relationship between the quantum yield of photosynthetic electron transport and quenching of chlorophyll fluorescence: *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects*, v. 990, no. 1, p. 87-92.
- Geoffroy, L., Teisseire, H., Couderchet, M., and Vernet, G., 2002, Effect of oxyfluorfen and diuron alone and in mixture on antioxidative enzymes of *Scenedesmus obliquus*: *Pesticide Biochemistry and Physiology*, v. 72, no. 3, p. 178-185.
- Germain, H., 1981, Flore des diatomées : eaux douces et saumâtres, Editions N. Boubée & Cie.
- Giardi, M. T., and Pace, E., 2005, Photosynthetic proteins for technological applications: *TRENDS in Biotechnology*, v. 23, no. 5, p. 257-263.
- Gonçalves, A., Azeiteiro, U., Pardal, M., and De Troch, M., 2012, Fatty acid acid profiling reveals seasonal and spatial shifts in zooplankton diet in a temperate estuary: *Estuarine Coastal and Shelf Science* v. 109, p. 70-80.
- Gonçalves, A. M., Marques, J. C., and Gonçalves, F., 2017, Fatty Acids' Profiles of Aquatic Organisms: Revealing the Impacts of Environmental and Anthropogenic Stressors, *Fatty Acids*, InTech.
- Gonçalves, S., Kahlert, M., Almeida, S. F., and Figueira, E., 2018a, A freshwater diatom challenged by Zn: Biochemical, physiological and metabolomic responses of *Tabellaria flocculosa* (Roth) Kützing: *Environmental Pollution*, v. 238, p. 959-971.

- Gonçalves, S., Kahlert, M., Almeida, S. F. P., and Figueira, E., 2018b, Assessing Cu impacts on freshwater diatoms: biochemical and metabolomic responses of *Tabellaria flocculosa* (Roth) Kützing: *Science of The Total Environment*, v. 625, p. 1234-1246.
- González-Barreiro, Ó., Rioboo, C., Cid, A., and Herrero, C., 2004, Atrazine-induced chlorosis in *Synechococcus elongatus* cells: *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, v. 46, no. 3, p. 301-307.
- Götz, T., and Böger, P., 2004, The very-long-chain fatty acid synthase is inhibited by chloroacetamides: *Zeitschrift für Naturforschung C*, v. 59, no. 7-8, p. 549-553.
- Guasch, H., Ivorra, N., Lehmann, V., Paulsson, M., Real, M., and Sabater, S., 1998, Community composition and sensitivity of periphyton to atrazine in flowing waters: the role of environmental factors: *Journal of Applied Phycology*, v. 10, no. 2, p. 203.
- Guasch, H., Munoz, I., Rosés, N., and Sabater, S., 1997, Changes in atrazine toxicity throughout succession of stream periphyton communities: *Journal of applied phycology*, v. 9, no. 2, p. 137-146.
- Guasch, H., Navarro, E., Serra, A., and Sabater, S., 2004, Phosphate limitation influences the sensitivity to copper in periphytic algae: *Freshwater Biology*, v. 49, no. 4, p. 463-473.
- Guasch, H., and Sabater, S., 1998, Light history influences the sensitivity to atrazine in periphytic algae: *Journal of Phycology*, v. 34, no. 2, p. 233-241.
- Guiry, M. D., 2012, How many species of algae are there?: *Journal of Phycology*, v. 48, no. 5, p. 1057-1063.
- Gurr, M. I., Harwood, J. L., and Frayn, K. N., 2002, *Lipid biochemistry*, Springer.
- Guschina, I. A., and Harwood, J. L., 2006, Lipids and lipid metabolism in eukaryotic algae: *Progress in lipid research*, v. 45, no. 2, p. 160-186.



- Hall Jr, L. W., Giddings, J. M., Solomon, K. R., and Balcomb, R., 1999, An ecological risk assessment for the use of Irgarol 1051 as an algaecide for antifoulant paints: *Critical Reviews in Toxicology*, v. 29, no. 4, p. 367.
- Hamm, C. E., Merkel, R., Springer, O., Jurkojc, P., Maier, C., Prechtel, K., and Smetacek, V., 2003, Architecture and material properties of diatom shells provide effective mechanical protection: *Nature*, v. 421, no. 6925, p. 841.
- Hill, W. R., Rinchar, J., and Czesny, S., 2011, Light, nutrients and the fatty acid composition of stream periphyton: *Freshwater Biology*, v. 56, no. 9, p. 1825-1836.
- Hopkins, W. G., 2003, *Physiologie végétale*, De Boeck Supérieur.
- Hu, Q., Sommerfeld, M., Jarvis, E., Ghirardi, M., Posewitz, M., Seibert, M., and Darzins, A., 2008, Microalgal triacylglycerols as feedstocks for biofuel production: perspectives and advances: *The plant journal*, v. 54, no. 4, p. 621-639.
- Huerlimann, R., Steinig, E. J., Loxton, H., Zenger, K. R., Jerry, D. R., and Heimann, K., 2014, Effects of growth phase and nitrogen starvation on expression of fatty acid desaturases and fatty acid composition of *Isochrysis* aff. *galbana* (TISO): *Gene*, v. 545, no. 1, p. 36-44.

## I

INERIS, 2007, Données technico-économiques sur les substances chimiques en France :  
Diuron.

Iummato, M. M., Pizarro, H., Cataldo, D., Di Fiori, E., Dos Santos Afonso, M., Del Carmen Rios de Molina, M., and Juarez, A. B., 2017, Effect of glyphosate acid on biochemical markers of periphyton exposed in outdoor mesocosms in the presence and absence of the mussel *Limnoperna fortunei*: *Environmental Toxicology and Chemistry*, v. 36, no. 7, p. 1775-1784.

## J

Jaganjac, M., Cipak, A., Schaur, R. J., and Zarkovic, N., 2016, Pathophysiology of neutrophil-mediated extracellular redox reactions: *Frontiers in Bioscience* v. 21, p. 839-855.

Jiang, H., and Gao, K., 2004, Effects of lowering temperature during culture on the production of polyunsaturated fatty acids in the marine diatom *Phaeodactylum tricorutum* (Bacillariophyceae): *Journal of Phycology*, v. 40, no. 4, p. 651-654.

## K

- Kale, R., Hebert, A. E., Frankel, L. K., Sallans, L., Bricker, T. M., and Pospíšil, P., 2017, Amino acid oxidation of the D1 and D2 proteins by oxygen radicals during photoinhibition of Photosystem II: Proceedings of the National Academy of Sciences, v. 114, no. 11, p. 2988-2993.
- Karp, G., 2010, Biologie cellulaire et moléculaire: Concepts and experiments, De Boeck Supérieur.
- Kates, M., and Volcani, B., 1966a, Lipid components of diatoms: Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Lipids and Lipid Metabolism, v. 116, no. 2, p. 264-278.
- Kates, M., and Volcani, B. E., 1966b, Lipid components of diatoms: Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Lipids and Lipid Metabolism, v. 116, no. 2, p. 264-278.
- Kaye, Y., Grundman, O., Leu, S., Zarka, A., Zorin, B., Didi-Cohen, S., Khozin-Goldberg, I., and Boussiba, S., 2015, Metabolic engineering toward enhanced LC-PUFA biosynthesis in *Nannochloropsis oceanica*: Overexpression of endogenous  $\Delta 12$  desaturase driven by stress-inducible promoter leads to enhanced deposition of polyunsaturated fatty acids in TAG: Algal research, v. 11, p. 387-398.
- Kelly, J. R., and Scheibling, R. E., 2012, Fatty acids as dietary tracers in benthic food webs: Marine Ecology Progress Series, v. 446, p. 1-22.
- Khanam, M. R. M., Shimasaki, Y., Hosain, M. Z., Mukai, K., Tsuyama, M., Qiu, X., Tasmin, R., Goto, H., and Oshima, Y., 2017, Diuron causes sinking retardation and physiochemical alteration in marine diatoms *Thalassiosira pseudonana* and *Skeletonema marinoi-dohrnii* complex: Chemosphere, v. 175, p. 200-209.
- Khotimchenko, S. V., and Yakovleva, I. M., 2005, Lipid composition of the red alga *Tichocarpus crinitus* exposed to different levels of photon irradiance: Phytochemistry, v. 66, no. 1, p. 73-79.

- Kim-Tiam, S., 2013, Effets de mélanges de pesticides sur les biofilms périphytiques d'eau douce. [PhD: Université de Bordeaux.
- Kim Tiam, S., Feurtet-Mazel, A., Delmas, F., Mazzella, N., Morin, S., Daffe, G., and Gonzalez, P., 2012, Development of q-PCR approaches to assess water quality: effects of cadmium on gene expression of the diatom *Eolimna minima*: *Water Research*, v. 46, no. 4, p. 934-942.
- Kim Tiam, S., Lavoie, I., Doose, C., Hamilton, P. B., and Fortin, C., 2018, Morphological, physiological and molecular responses of *Nitzschia palea* under cadmium stress: *Ecotoxicology*, v. 27, p. 675-688.
- Kim Tiam, S., Morin, S., Pesce, S., Feurtet-Mazel, A., Moreira, A., Gonzalez, P., and Mazzella, N., 2014, Environmental effects of realistic pesticide mixtures on natural biofilm communities with different exposure histories: *Science of the Total Environment*, v. 473, p. 496-506.
- Kirk, J. T., 2010, *Light and photosynthesis in aquatic ecosystems*, Cambridge University Press p. pp 662.
- Kleczkowski, L. A., 1994, Inhibitors of photosynthetic enzymes/carriers and metabolism: *Annual Review of Plant Biology*, v. 45, p. 339-367.
- Knauert, S., and Knauer, K., 2008, The role of reactive oxygen species in copper toxicity to two freshwater green algae *Journal of Phycology*, v. 44, no. 2, p. 311-319.
- Kobayashi, K., 2016, Role of membrane glycerolipids in photosynthesis, thylakoid biogenesis and chloroplast development: *Journal of Plant Research*, v. 129, no. 4, p. 565-580.
- Kröger, N., Bergsdorf, C., and Sumper, M., 1994, A new calcium binding glycoprotein family constitutes a major diatom cell wall component: *The EMBO Journal*, v. 13, no. 19, p. 4676-4683.

Künzler, K., Eichenberger, W., and Radunz, A., 1997a, Intracellular localization of two betaine lipids by cell fractionation and immunomicroscopy: *Zeitschrift für Naturforschung C, Journal of Biosciences*, v. 52, no. 7-8, p. 487-495.

Künzler, K., Eichenberger, W., and Radunz, A., 1997b, Intracellular localization of two betaine lipids by cell fractionation and immunomicroscopy: *Zeitschrift für Naturforschung*, v. 52, p. 487-495.



- Lagadic, L., Caquet, T., and Amiard, J., 1997, Biomarqueurs en écotoxicologie: principes et définitions., *in* Lagadic, L., Caquet, T., Amiard, J. C., and Ramade, F., eds., Biomarqueurs en Ecotoxicologie: Aspects Fondamentaux: Paris, Masson, p. 1-9.
- Lance, C., 2013, Respiration et photosynthèse: Histoire et secrets d'une équation.
- Larras, F., Bouchez, A., Rimet, F., and Montuelle, B., 2012, Using bioassays and species sensitivity distributions to assess herbicide toxicity towards benthic diatoms: PloS One, v. 7, no. 8, p. e44458.
- Larras, F., Keck, F. o., Montuelle, B., Rimet, F. d. r., and Bouchez, A. s., 2014, Linking diatom sensitivity to herbicides to phylogeny: a step forward for biomonitoring?: Environmental Science & Technology, v. 48, no. 3, p. 1921-1930.
- Larras, F., Lambert, A. S., Pesce, S., Rimet, F., Bouchez, A., and Montuelle, B., 2013, The effect of temperature and a herbicide mixture on freshwater periphytic algae: Ecotoxicology and Environmental Safety, v. 98, p. 162-170.
- Lauritano, C., Orefice, I., Procaccini, G., Romano, G., and Ianora, A., 2015, Key genes as stress indicators in the ubiquitous diatom *Skeletonema marinoi*: BMC Genomics, v. 16, no. 1, p. 411.
- Laviale, M., 2008, Effet des polluants sur les communautés périphytiques naturelles: Apport des mesures de fluorescence chlorophyllienne en lumière modulée (PAM). [PhD: Université de Lille 1.
- Lavoie, I., 2008, Guide d'identification des diatomées des rivières de l'Est du Canada, PUQ.
- Lavoie, I., Hamilton, P. B., Morin, S., Tiam, S. K., Kahlert, M., Gonçalves, S., Falasco, E., Fortin, C., Gontero, B., and Heudre, D., 2017, Diatom teratologies as biomarkers of contamination: Are all deformities ecologically meaningful?: Ecological Indicators, v. 82, p. 539-550.

- Le Guédard, M., Schraauwers, B., Larrieu, I., and Bessoule, J. J., 2008, Development of a biomarker for metal bioavailability: the lettuce fatty acid composition: *Environmental Toxicology and Chemistry*, v. 27, p. 1147-1151.
- Leboucher, T., Tison-Rosebery, J., Budnick, W. R., Jamoneau, A., Vyverman, W., Soininen, J., Boutry, S., and Passy, S. I., submitted, A new metacommunity approach for detecting species influenced by mass effect: *Journal of Applied Ecology*.
- Lefrancq, M., 2014, Transport and attenuation of pesticides in runoff from agricultural headwater catchments: from field characterisation to modelling [PhD: Université de Strasbourg].
- Lehninger, A. L., 2004, *Principles of Biochemistry*.
- Lenoir, A., 1996, Development of a practical diatom index of overall water quality applicable to the French national water board network: Use of algae for monitoring rivers, p. 29-43.
- Li, H.-Y., Lu, Y., Zheng, J.-W., Yang, W.-D., and Liu, J.-S., 2014a, Biochemical and Genetic Engineering of Diatoms for Polyunsaturated Fatty Acid Biosynthesis: *Marine Drugs*, v. 12, no. 1, p. 153-166.
- Li, H. Y., Lu, Y., Zheng, J. W., Yang, W. D., and Liu, J. S., 2014b, Biochemical and genetic engineering of diatoms for polyunsaturated fatty acid biosynthesis: *Marine Drugs*, v. 12, no. 1, p. 153-166.
- Lichtenthaler, H. K., and Wellburn, A. R., 1983, Determinations of total carotenoids and chlorophylls a and b of leaf extracts in different solvents, Portland Press Limited.
- Lin, Q., Zhuo, W.-H., Wang, X.-W., Chen, C.-P., Gao, Y.-H., and Liang, J.-R., 2018, Effects of fundamental nutrient stresses on the lipid accumulation profiles in two diatom species *Thalassiosira weissflogii* and *Chaetoceros muelleri*: *Bioprocess and Biosystems Engineering*, p. 1-12.

- Lipok, J., Studnik, H., and Gruyaert, S., 2010, The toxicity of Roundup® 360 SL formulation and its main constituents: glyphosate and isopropylamine towards non-target water photoautotrophs: *Ecotoxicology and Environmental Safety*, v. 73, no. 7, p. 1681-1688.
- Liu, H., Xia, Y., Cai, W., Zhang, Y., Zhang, X., and Du, S., 2017, Enantioselective oxidative stress and oxidative damage caused by Rac- and S-metolachlor to *Scenedesmus obliquus*: *Chemosphere*, v. 173, p. 22-30.
- Liu, H., and Xiong, M., 2009, Comparative toxicity of racemic metolachlor and S-metolachlor to *Chlorella pyrenoidosa*: *Aquatic Toxicology*, v. 93, no. 2-3, p. 100-106.
- Liu, H., Ye, W., Zhan, X., and Liu, W., 2006, A comparative study of rac- and S-metolachlor toxicity to *Daphnia magna*: *Ecotoxicology and Environmental Safety*, v. 63, no. 3, p. 451-455.
- Livak, K. J., and Schmittgen, T. D., 2001, Analysis of Relative Gene Expression Data Using Real-Time Quantitative PCR and the  $2^{-\Delta\Delta CT}$  Method: *Methods*, v. 25, no. 4, p. 402-408.
- Loewe, S., and Muischnek, H., 1926, Combined effects / Announcement-Implements to the problem: *Naunyn-Schmiedebergs Archiv Fur Experimentelle Pathologie Und Pharmakologie*, v. 114, p. 313-326.
- Lozano, R. B., and Pratt, J., 1994, Interaction of toxicants and communities: the role of nutrients: *Environmental Toxicology and Chemistry: An International Journal*, v. 13, no. 3, p. 361-368.
- Lundberg, I., 1995, Pesticides et eaux de surface : Etude sur la situation concernant la pollution des eaux de surface par des résidus de pesticides dans les pays nordiques, en Allemagne et aux Pays-Bas, et les problèmes associés à la contamination par des pesticides, Council of Europe.

- Lupette, J., Jaussaud, A., Seddiki, K., Morabito, C., Brugière, S., Schaller, H., Kuntz, M., Putaux, J.-L., Jouneau, P.-H., and Rébeillé, F., 2019, The architecture of lipid droplets in the diatom *Phaeodactylum tricornutum*: *Algal Research*, v. 38, p. 101415.
- Lv, X., Zou, L., Sun, B., Wang, J., and Sun, M.-Y., 2010, Variations in lipid yields and compositions of marine microalgae during cell growth and respiration, and within intracellular structures: *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, v. 391, no. 1-2, p. 73-83.
- Lynch, D. V., and Thompson, G. A., 1982, Low temperature-induced alterations in the chloroplast and microsomal membranes of *Dunaliella salina*: *Plant Physiology*, v. 69, no. 6, p. 1369-1375.
- Lynn, S. G., Kilham, S. S., Kreeger, D. A., and Interlandi, S. J., 2000, Effect of nutrient availability on the biochemical and elemental stoichiometry in the freshwater diatom *Stephanodiscus minutulus* (Bacillariophyceae): *Journal of Phycology*, v. 36, no. 3, p. 510-522.

# M

- Ma, J., Wang, S., Wang, P., Ma, L., Chen, X., and Xu, R., 2006, Toxicity assessment of 40 herbicides to the green alga *Raphidocelis subcapitata*: Ecotoxicology and Environmental Safety, v. 63, no. 3, p. 456-462.
- Ma, J., Xu, L., Wang, S., Zheng, R., Jin, S., Huang, S., and Huang, Y., 2002, Toxicity of 40 herbicides to the green alga *Chlorella vulgaris*: Ecotoxicology and Environmental Safety, v. 51, no. 2, p. 128-132.
- Maazouzi, C., Masson, G., Izquierdo, M. S., and Pihan, J.-C., 2008, Chronic copper exposure and fatty acid composition of the amphipod *Dikerogammarus villosus*: Results from a field study: Environmental Pollution, v. 156, no. 1, p. 221-226.
- Maronić, D. Š., Čamagajevac, I. Š., Horvatić, J., Pfeiffer, T. Ž., Stević, F., Žarković, N., Waeg, G., and Jaganjac, M., 2018, S-metolachlor promotes oxidative stress in green microalga *Parachlorella kessleri*-A potential environmental and health risk for higher organisms: Science of The Total Environment, v. 637, p. 41-49.
- Masojídek, J., Koblížek, M., and Torzillo, G., 2004, Photosynthesis in Microalgae, Handbook of Microalgal Culture, p. 20-39.
- Masojídek, J., Kopecký, J., Koblížek, M., and Torzillo, G., 2004, The xanthophyll cycle in green algae (Chlorophyta): its role in the photosynthetic apparatus: Plant Biology, v. 6, no. 03, p. 342-349.
- McIntire, C. D., Gregory, S. V., Steinman, A. D., and Lamberti, G. A., 1996, Modeling benthic algal communities: an example from stream ecology, Academic Press, San Diego, CA, p. 669-704.
- Meiser, A., Schmid-Staiger, U., and Trösch, W., 2004, Optimization of eicosapentaenoic acid production by *Phaeodactylum tricornutum* in the flat panel airlift (FPA) reactor: Journal of Applied Phycology, v. 16, no. 3, p. 215-225.

- Mizusawa, N., and Wada, H., 2012, The role of lipids in photosystem II: *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Bioenergetics*, v. 1817, no. 1, p. 194-208.
- Moisset, S., Kim Tiam, S., Feurtet-Mazel, A., Morin, S., Delmas, F., Mazzella, N., and Gonzalez, P., 2015, Genetic and physiological responses of three freshwater diatoms to realistic diuron exposures: *Environmental Science and Pollution Research* v. 22, no. 6, p. 4046-4055.
- Montuelle, B., Dorigo, U., Bérard, A., Volat, B., Bouchez, A., Tlili, A., Gouy, V., and Pesce, S., 2010, The periphyton as a multimetric bioindicator for assessing the impact of land use on rivers: an overview of the Ardières-Morcille experimental watershed (France), *Global Change and River Ecosystems—Implications for Structure, Function and Ecosystem Services*, Springer, p. 123-141.
- Moreby, S., and Southway, S., 1999, Influence of autumn applied herbicides on summer and autumn food available to birds in winter wheat fields in southern England: *Agriculture, Ecosystems & Environment*, v. 72, no. 3, p. 285-297.
- Morgan-Kiss, R. M., Priscu, J. C., Pockock, T., Gudynaite-Savitch, L., and Huner, N. P., 2006, Adaptation and acclimation of photosynthetic microorganisms to permanently cold environments: *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, v. 70, no. 1, p. 222-252.
- Morin, S., Bottin, M., Mazzella, N., Macary, F., Delmas, F., Winterton, P., and Coste, M., 2009, Linking diatom community structure to pesticide input as evaluated through a spatial contamination potential (Phytotoxicity): a case study in the Neste river system (South-West France): *Aquatic Toxicology*, v. 94, no. 1, p. 28-39.
- Morin, S., Coste, M., and Delmas, F., 2008a, A comparison of specific growth rates of periphytic diatoms of varying cell size under laboratory and field conditions: *Hydrobiologia*, v. 614, no. 1, p. 285-297.

- Morin, S., Duong, T. T., Boutry, S., and Coste, M., 2008b, Modulation de la toxicité des métaux vis-à-vis du développement des biofilms de cours d'eau (bassin versant de Decazeville, France): *Cryptogamie Algologie*, v. 29, no. 3, p. 201-216.
- Morin, S., Gómez, N., Tornés, E., Licursi, M., and Rosebery, J., 2016, Benthic diatom monitoring and assessment of freshwater environments: standard methods and future challenges, *Aquatic Biofilms: Ecology, Water Quality and Water Treatment*, Caister Academic Press UK, p. 111-124.
- Morin, S., Pesce, S., Tlili, A., Coste, M., and Montuelle, B., 2010, Recovery potential of periphytic communities in a river impacted by a vineyard watershed: *Ecological Indicators*, v. 10, no. 2, p. 419-426.
- Mostajir, B., Amblard, C., Buffan-Dubau, E., De Wit, R., Lensi, R., and Sime-Ngando, T., 2012, *Les réseaux trophiques microbiens des milieux aquatiques et terrestres.*, Presses Universitaires de Pau et des Pays de l'Adour.
- Murata, N., and Siegenthaler, P.-A., 1998, Lipids in photosynthesis: an overview, *Lipids in photosynthesis: structure, function and genetics*, Springer, p. 1-20.
- Murata, N., Troughton, J. H., and Fork, D. C., 1975, Relationships between the transition of the physical phase of membrane lipids and photosynthetic parameters in *Anacystis nidulans* and lettuce and spinach chloroplasts: *Plant Physiology*, v. 56, no. 4, p. 508-517.



- Nakamura, Y., and Li-Beisson, Y., 2016, Lipids in plant and algae development, Springer.
- Nalley, J. O., O'Donnell, D. R., and Litchman, E., 2018, Temperature effects on growth rates and fatty acid content in freshwater algae and cyanobacteria: *Algal Research*, v. 35, p. 500-507.
- Napolitano, G. E., Hill, W. R., Guckert, J. B., Stewart, A. J., Nold, S. C., and White, D. C., 1994, Changes in Periphyton Fatty Acid Composition in Chlorine-Polluted Streams: *Journal of the North American Benthological Society*, v. 13, no. 2, p. 237-249.
- Neury-Ormanni, J., Doose, C., Majdi, N., Vedrenne, J., Traunspurger, W., and Morin, S., submitted, Selective grazing behaviour of chironomids on microalgae under pesticide pressure: *Science of The Total Environment*.
- Neves, M., Castro, B. B., Vidal, T., Vieira, R., Marques, J. C., Coutinho, J. A. P., Gonçalves, F., and Gonçalves, A. M. M., 2015, Biochemical and populational responses of an aquatic bioindicator species, *Daphnia longispina*, to a commercial formulation of a herbicide (Primextra® Gold TZ) and its active ingredient (S-metolachlor): *Ecological Indicators*, v. 53, p. 220-230.
- Nichols, D. S., Nichols, P. D., and McMeekin, T. A., 1993, Polyunsaturated fatty acids in Antarctic bacteria: *Antarctic Science*, v. 5, no. 2, p. 149-160.
- Nishida, I., and Murata, N., 1996, Chilling sensitivity in plants and cyanobacteria: the crucial contribution of membrane lipids: *Annual Review of Plant Biology*, v. 47, no. 1, p. 541-568.



- Oettmeier, W., 1992, Herbicides and photosystem, *in* Barber, J., ed., *Topics in Photosynthesis*: Amsterdam, Elsevier, p. 349–408.
- Okamura, H., 2002, Photodegradation of the antifouling compounds Irgarol 1051 and Diuron released from a commercial antifouling paint: *Chemosphere*, v. 48, no. 1, p. 43-50.
- Okamura, H., Nishida, T., Ono, Y., and Shim, W., 2003, Phytotoxic effects of antifouling compounds on nontarget plant species: *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, v. 71, no. 5, p. 881-886.
- Olofsson, M., Lamela, T., Nilsson, E., Bergé, J. P., Del Pino, V., Uronen, P., and Legrand, C., 2012, Seasonal variation of lipids and fatty acids of the microalgae *Nannochloropsis oculata* grown in outdoor large-scale photobioreactors: *Energies*, v. 5, no. 5, p. 1577-1592.
- Opute, F. I., 1974, Lipid and fatty-acid composition of diatoms: *Journal of Experimental Botany*, p. 823-835.
- Orcutt, D. M., and Patterson, G. W., 1974, Effect of light intensity upon lipid composition of *Nitzschia closterium* (*Cylindrotheca fusiformis*): *Lipids*, v. 9, no. 12, p. 1000-1003.

## P

- Pasquaud, S., Lobry, J., and Elie, P., 2007, Facing the necessity of describing estuarine ecosystems: a review of food web ecology study techniques: *Hydrobiologia*, v. 588, no. 1, p. 159-172.
- Passy, S. I., 2007, Diatom ecological guilds display distinct and predictable behavior along nutrient and disturbance gradients in running waters: *Aquatic Botany*, v. 86, no. 2, p. 171-178.
- Perhar, G., and Arhonditsis, G. B., 2012, Examination of the role of detritus food quality, phytoplankton intracellular storage capacity, and zooplankton stoichiometry on planktonic dynamics: *Ecological Informatics*, v. 11, p. 76-89.
- Peterson, H. G., Boutin, C., Freemark, K. E., and Martin, P. A., 1997, Toxicity of hexazinone and diquat to green algae, diatoms, cyanobacteria and duckweed: *Aquatic Toxicology*, v. 39, no. 2, p. 111-134.
- Potapova, M. G., and Charles, D. F., 2002, Benthic diatoms in USA rivers: distributions along spatial and environmental gradients: *Journal of Biogeography*, v. 29, no. 2, p. 167-187.
- Pratoomyot, J., Srivilas, P., and Noiraksar, T., 2005, Fatty acids composition of 10 microalgal species: *Songklanakarin Journal of Science and Technology*, v. 27, no. 6, p. 1179-1187.
- Prosser, P., and Hart, A., 2005, Assessing potential exposure of birds to pesticide-treated seeds: *Ecotoxicology*, v. 14, no. 7, p. 679-691.
- Prygiel, J., and Coste, M., 1996, Diatoms and diatom indices in the networks for quality measurement of French watercourses : Short history and future: *BFPP - Bulletin Français de la Pêche et de la Protection des Milieux Aquatiques*, v. 69, no. 341-42, p. 65-79.

## Q

Qiao, H., Cong, C., Sun, C., Li, B., Wang, J., and Zhang, L., 2016, Effect of culture conditions on growth, fatty acid composition and DHA/EPA ratio of *Phaeodactylum tricornutum*: Aquaculture, v. 452, p. 311-317.

## R

Ramírez, B., Montero, D., Izquierdo, M., and Haroun, R., 2013, Aquafeed imprint on bogue (*Boops boops*) populations and the value of fatty acids as indicators of aquaculture-ecosystem interaction: Are we using them properly?: Aquaculture, v. 414-415, p. 294-302.

Raven, P., Johnson, G., Mason, K., Loson, J., and Singer, S., 2011, Biologie.

Reichardt, E., 2015, *Gomphonema gracile* Ehrenberg sensu stricto et sensu auct. (Bacillariophyceae): A taxonomic revision: Nova Hedwigia, v. 101, no. 3-4, p. 367-393.

Reitan, K. I., Rainuzzo, J. R., and Olsen, Y., 1994, Effect of nutrient limitation on fatty acid and lipid content of marine microalgae Journal of Phycology, v. 30, no. 6, p. 972-979.

Renaud, S., Parry, D., Thinh, L.-V., Kuo, C., Padovan, A., and Sammy, N., 1991, Effect of light intensity on the proximate biochemical and fatty acid composition of *Isochrysis* sp. and *Nannochloropsis oculata* for use in tropical aquaculture: Journal of Applied Phycology, v. 3, no. 1, p. 43-53.

Renaud, S. M., Thinh, L.-V., Lambrinidis, G., and Parry, D. L., 2002, Effect of temperature on growth, chemical composition and fatty acid composition of tropical Australian microalgae grown in batch cultures: Aquaculture, v. 211, no. 1-4, p. 195-214.

Renaud, S. M., Zhou, H. C., Parry, D. L., Thinh, L.-V., and Woo, K. C., 1995, Effect of temperature on the growth, total lipid content and fatty acid composition of recently

- isolated tropical microalgae *Isochrysis* sp., *Nitzschia closterium*, *Nitzschia paleacea*, and commercial species *Isochrysis* sp. (clone T.ISO): *Journal of Applied Phycology*, v. 7, no. 6, p. 595-602.
- Ricart, M., Barceló, D., Geiszinger, A., Guasch, H., López de Alda, M., Romaní, A. M., Vidal, G., Villagrasa, M., and Sabater, S., 2009, Effects of low concentrations of the phenylurea herbicide diuron on biofilm algae and bacteria: *Chemosphere*, v. 76, no. 10, p. 1392-1401.
- Rimet, F., 2012, Recent views on river pollution and diatoms: *Hydrobiologia*, v. 683, no. 1, p. 1-24.
- Rivard, L., 2003, Environmental fate of metolachlor: *Chemistry*, v. 51218, no. 45, p. 42.
- Robert, S., Mansour, M. P., and Blackburn, S. I., 2007, Metolachlor-mediated selection of a microalgal strain producing novel polyunsaturated fatty acids: *Marine Biotechnology* (NY), v. 9, no. 2, p. 146-153.
- Romani, A. M., 2010, *Freshwater biofilms: Biofouling*. Wiley-Blackwell, Oxford, p. 137-153.
- Roubex, V., Mazzella, N., Schouler, L., Fauvelle, V., Morin, S., Coste, M., Delmas, F., and Margoum, C., 2011, Variations of periphytic diatom sensitivity to the herbicide diuron and relation to species distribution in a contamination gradient: implications for biomonitoring: *Journal of Environmental Monitoring*, v. 13, no. 6, p. 1768-1774.
- Round, F. E., Crawford, R. M., and Mann, D. G., 2007, *Diatoms: biology and morphology of the genera*, Cambridge university press.
- Roy, S., Llewellyn, C. A., Egeland, E. S., and Johnsen, G., 2011, *Phytoplankton pigments: characterization, chemotaxonomy and applications in oceanography*, Cambridge University Press.
- RStudioTeam, 2016, *RStudio: Integrated Development for R*.

- Ruiz, T., Bec, A., Danger, M., Koussoroplis, A. M., Aguer, J. P., Morel, J. P., and Morel-Desrosiers, N., 2018, A microcalorimetric approach for investigating stoichiometric constraints on the standard metabolic rate of a small invertebrate: *Ecology Letters*, v. 21, no. 11, p. 1714-1722.
- Rumin, J., Bonnefond, H., Saint-Jean, B., Rouxel, C., Sciandra, A., Bernard, O., Cadoret, J.-P., and Bougaran, G., 2015, The use of fluorescent Nile red and BODIPY for lipid measurement in microalgae: *Biotechnology for Biofuels*, v. 8, no. 1, p. 42.
- Rutherford, A. W., and Krieger-Liszkay, A., 2001, Herbicide-induced oxidative stress in photosystem II: *Trends in Biochemical Sciences*, v. 26, no. 11, p. 648-653.

**S**

- Saito, H., and Aono, H., 2014, Characteristics of lipid and fatty acid of marine gastropod *Turbo cornutus*: high levels of arachidonic and n-3 docosapentaenoic acid: *Food Chemistry*, v. 145, p. 135-144.
- Sajjadi, B., Chen, W. Y., Raman, A. A. A., and Ibrahim, S., 2018, Microalgae lipid and biomass for biofuel production: A comprehensive review on lipid enhancement strategies and their effects on fatty acid composition: *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, v. 97, p. 200-232.
- Sakurai, I., Mizusawa, N., Wada, H., and Sato, N., 2007, Digalactosyldiacylglycerol is required for stabilization of the oxygen-evolving complex in photosystem II: *Plant Physiology* v. 145, no. 4, p. 1361-1370.
- Sánchez-Muros, M. J., Villacreces, S., Miranda-de la Lama, G., de Haro, C., and García-Barroso, F., 2013, Effects of chemical and handling exposure on fatty acids, oxidative stress and morphological welfare indicators in gilt-head sea bream (*Sparus aurata*): *Fish Physiology and Biochemistry*, v. 39, no. 3, p. 581-591.
- Sato, N., and Murata, N., 1980, Temperature shift-induced responses in lipids in the blue-green alga, *Anabaena variabilis*: the central role of diacylmonogalactosylglycerol in thermo-adaptation: *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Lipids and Lipid Metabolism*, v. 619, no. 2, p. 353-366.
- Sayanova, O., Mimouni, V., Ulmann, L., Morant-Manceau, A., Pasquet, V., Schoefs, B., and Napier, J. A., 2017a, Modulation of lipid biosynthesis by stress in diatoms: *Philosophical Transactions B*, v. 372, no. 1728, p. 20160407.
- Sayanova, O., Mimouni, V., Ulmann, L., Morant-Manceau, A., Pasquet, V., Schoefs, B., and Napier, J. A., 2017b, Modulation of lipid biosynthesis by stress in diatoms:

- Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences, v. 372, no. 1728, p. 20160407.
- Schmalfuss, J., Matthes, B., Mayer, P., and Böger, P., 1998, Chloroacetamide mode of action, I: Inhibition of very long chain fatty acid synthesis in *Scenedesmus acutus*: Zeitschrift für Naturforschung C, v. 53, p. 995-1003.
- Schneider, J. C., and Roessler, P., 1994, Radiolabeling studies of lipids and fatty acids in *Nannochloropsis* (Eustigmatophyceae), an oleaginous marine alga Journal of Phycology, v. 30, no. 4, p. 594-598.
- Schreiber, U., 2004, Pulse-amplitude-modulation (PAM) fluorometry and saturation pulse method: an overview, Chlorophyll a fluorescence, Springer, p. 279-319.
- Sharma, K. K., Schuhmann, H., and Schenk, P. M., 2012, High lipid induction in microalgae for biodiesel production: Energies, v. 5, no. 5, p. 1532-1553.
- Shimajima, M., Ohta, H., and Nakamura, Y., 2009, Biosynthesis and function of chloroplast lipids, Lipids in Photosynthesis, Springer, p. 35-55.
- Sicko-Goad, L., Evans, M., Lazinsky, D., Hall, J., and Simmons, M., 1989a, Effects of chlorinated benzenes on diatom fatty acid composition and quantitative morphology. IV. Pentachlorobenzene and comparison with trichlorobenzene isomers: Archives of Environmental Contamination and Toxicology, v. 18, no. 5, p. 656-668.
- Sicko-Goad, L., Hall, J., Lazinsky, D., and Simmons, M., 1989b, Effects of chlorinated benzenes on diatom fatty acid composition and quantitative morphology. III. 1, 2, 3-Trichlorobenzene: Archives of Environmental Contamination and Toxicology, v. 18, no. 5, p. 647-655.
- Sicko-Goad, L., and Lazinsky, D., 1986, Quantitative ultrastructural changes associated with lead-coupled luxury phosphate uptake and polyphosphate utilization: Archives of Environmental Contamination and Toxicology, v. 15, no. 6, p. 617-627.

- Silkina, A., Bazes, A., Vouvé, F., Le Tilly, V., Douzenel, P., Mouget, J.-L., and Bourgougnon, N., 2009, Antifouling activity of macroalgal extracts on *Fragilaria pinnata* (Bacillariophyceae): a comparison with Diuron: *Aquatic Toxicology*, v. 94, no. 4, p. 245-254.
- Sitnik, S., Shtaida, N., Guihéneuf, F., Leu, S., Popko, J., Feussner, I., Boussiba, S., and Khozin-Goldberg, I., 2017, DGAT1 from the arachidonic-acid-producing microalga *Lobosphaera incisa* shows late gene expression under nitrogen starvation and substrate promiscuity in a heterologous system: *Journal of Applied Phycology*, p. 1-19.
- Slaninova, A., Smutna, M., Modra, H., and Svobodova, Z., 2009, Reviews Oxidative stress in fish induced by pesticides: *Neuroendocrinology Letters*, v. 30, no. 1, p. 2.
- Smith, R. E., and Geider, R. J., 1985, Kinetics of intracellular carbon allocation in a marine diatom: *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, v. 93, no. 3, p. 191-210.
- SOeS, 2015, Les pesticides dans les cours d'eau français en 2013.
- Steffen, R., Kelly, A. A., Huyer, J., Dörmann, P., and Renger, G., 2005, Investigations on the reaction pattern of photosystem II in leaves from *Arabidopsis thaliana* wild type plants and mutants with genetically modified lipid content: *Biochemistry*, v. 44, no. 9, p. 3134-3142.
- Steinrücken, P., Prestegard, S. K., de Vree, J. H., Storesund, J. E., Pree, B., Mjøs, S. A., and Erga, S. R., 2018, Comparing EPA production and fatty acid profiles of three *Phaeodactylum tricornutum* strains under western Norwegian climate conditions: *Algal Research*, v. 30, p. 11-22.
- Stevenson, R. J., 1997, Scale-dependent determinants and consequences of benthic algal heterogeneity: *Journal of the North American Benthological Society*, v. 16, no. 1, p. 248-262.

- Stevenson, R. J., Bothwell, M. L., Lowe, R. L., and Thorp, J. H., 1996, Algal ecology: Freshwater benthic ecosystem, Academic press.
- Stohs, S. J., and Bagchi, D., 1995, Oxidative mechanisms in the toxicity of metal ions: Free Radical Biology and Medicine, v. 18, no. 2, p. 321-336.
- Sushchik, N., Kalacheva, G., Zhila, N., Gladyshev, M., and Volova, T., 2003, A temperature dependence of the intra-and extracellular fatty-acid composition of green algae and cyanobacterium: Russian Journal of Plant Physiology, v. 50, no. 3, p. 374-380.



- Taipale, S., Strandberg, U., Peltomaa, E., Galloway, A. W. E., Ojala, A., and Brett, M. T., 2013, Fatty acid composition as biomarkers of freshwater microalgae: analysis of 37 strains of microalgae in 22 genera and in seven classes: *Aquatic Microbial Ecology*, v. 71, no. 2, p. 165-178.
- Tan, C. K., and Johns, M. R., 1996, Screening of diatoms for heterotrophic eicosapentaenoic acid production: *Journal of Applied Phycology*, v. 8, no. 1, p. 59-64.
- Teisseire, H., and Vernet, G., 2001, Effects of the fungicide folpet on the activities of antioxidative enzymes in duckweed (*Lemna minor*): *Pesticide Biochemistry and Physiology*, v. 69, no. 2, p. 112-117.
- Teshima, S., Yamasaki, S., Kanazawa, A., and Hirata, H., 1983, Effects of water temperature and salinity on eicosapentaenoic acid level of marine *Chlorella* [*Chlorella saccharophila*]: *Bulletin of the Japanese Society of Scientific Fisheries (Japan)*, v. 49, no. 5.
- Tetko, I. V., Gasteiger, J., Todeschini, R., Mauri, A., Livingstone, D., Ertl, P., Palyulin, V. A., Radchenko, E. V., Zefirov, N. S., and Makarenko, A. S., 2005, Virtual computational chemistry laboratory—design and description: *Journal of Computer-Aided Molecular Design*, v. 19, no. 6, p. 453-463.
- Thakkar, M., Randhawa, V., and Wei, L., 2013, Comparative responses of two species of marine phytoplankton to metolachlor exposure: *Aquatic Toxicology*, v. 126, p. 198-206.
- Thomas, K. V., McHugh, M., Hilton, M., and Waldock, M., 2003, Increased persistence of antifouling paint biocides when associated with paint particles: *Environmental Pollution*, v. 123, no. 1, p. 153-161.
- Thompson Jr, G. A., 1996, Lipids and membrane function in green algae: *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Lipids and Lipid Metabolism*, v. 1302, no. 1, p. 17-45.

- Thompson, P. A., Harrison, P. J., and Whyte, J. N., 1990, Influence of irradiance on the fatty acid composition of phytoplankton 1: *Journal of Phycology*, v. 26, no. 2, p. 278-288.
- Tifnouti, A., Chérifi, O., and Chifaa, A., 1994, Etude du régime alimentaire de cinq espèces de Cladocères dans la retenue Lalla Takerkoust (Maroc): *Annales de Limnologie-International Journal of Limnology*, v. 30, no. 4, p. 285-296.
- Tilman, D., Kiesling, R., Sterner, R., Kilham, S., and Johnson, F., 1986, Green, bluegreen and diatom algae: taxonomic differences in competitive ability for phosphorus, silicon and nitrogen: *Archiv für Hydrobiologie*, v. 106, no. 4, p. 473-485.
- Tonon, T., Harvey, D., Larson, T. R., and Graham, I. A., 2002, Long chain polyunsaturated fatty acid production and partitioning to triacylglycerols in four microalgae: *Phytochemistry*, v. 61, no. 1, p. 15-24.
- Torres, C. M., Ríos, S. D., Torras, C., Salvadó, J., Mateo-Sanz, J. M., and Jiménez, L., 2013, Microalgae-based biodiesel: a multicriteria analysis of the production process using realistic scenarios: *Bioresource Technology*, v. 147, p. 7-16.
- Trebst, A., and Draber, W., 1986, Inhibitors of photosystem II and the topology of herbicide and Q<sub>B</sub> binding polypeptide in the thylakoid membrane: *Photosynthesis Research*, v. 10, p. 381-392.
- Trenkamp, S., Martin, W., and Tietjen, K., 2004, Specific and differential inhibition of very-long-chain fatty acid elongases from *Arabidopsis thaliana* by different herbicides: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, v. 101, no. 32, p. 11903-11908.
- Trobajo, R., Clavero, E., Chepurinov, V. A., Sabbe, K., Mann, D. G., Ishihara, S., and Cox, E. J., 2009, Morphological, genetic and mating diversity within the widespread bioindicator *Nitzschia palea* (Bacillariophyceae): *Phycologia*, v. 48, no. 6, p. 443-459.

Troton, D., Calvayrac, R., Thit, A. T. P., and Laval-Martin, D., 1986, Modifications of thylakoid lipids in *Euglena gracilis* during diuron-adaptation: *Phytochemistry*, v. 25, no. 2, p. 393-399.

## V

- Valenzuela, J., Carlson, R. P., Gerlach, R., Cooksey, K., Peyton, B. M., Bothner, B., and Fields, M. W., 2013, Nutrient resupplementation arrests bio-oil accumulation in *Phaeodactylum tricornutum*: Applied Microbiology and Biotechnology, v. 97, no. 15, p. 7049-7059.
- Vallotton, N., Moser, D., Eggen, R. I., Junghans, M., and Chèvre, N., 2008, S-metolachlor pulse exposure on the alga *Scenedesmus vacuolatus*: effects during exposure and the subsequent recovery: Chemosphere, v. 73, no. 3, p. 395-400.
- Van den Meersche, K., Van Rijswijk, P., Soetaert, K., and Middelburg, J. J., 2009, Autochthonous and allochthonous contributions to mesozooplankton diet in a tidal river and estuary: Integrating carbon isotope and fatty acid constraints: Limnology and Oceanography, v. 54, no. 1, p. 62-74.
- Van der Oost, R., Beyer, J., and Vermeulen, N. P., 2003, Fish bioaccumulation and biomarkers in environmental risk assessment: a review: Environmental Toxicology and Pharmacology, v. 13, no. 2, p. 57-149.
- Van Der Werf, H. M., 1997, Evaluer l'impact des pesticides sur l'environnement: Le Courrier de l'environnement de l'INRA, v. 31, no. 31, p. 5-22.
- Vannote, R. L., Minshall, G. W., Cummins, K. W., Sedell, J. R., and Cushing, C. E., 1980, The river continuum concept: Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences, v. 37, no. 1, p. 130-137.
- Venegas-Calación, M., Sayanova, O., and Napier, J. A., 2010, An alternative to fish oils: metabolic engineering of oil-seed crops to produce omega-3 long chain polyunsaturated fatty acids: Progress in Lipid Research, v. 49, no. 2, p. 108-119.
- Verma, J., and Nautiyal, P., 2016, Pennate diatoms *Gomphonema* Ehrenberg from the Vindhya (Central Highland) and the Himalaya, Volume 46(1), Phytos, p. 16-20.

- Vidal, T., Abrantes, N., Goncalves, A. M., and Goncalves, F., 2012, Acute and chronic toxicity of Betanal®Expert and its active ingredients on nontarget aquatic organisms from different trophic levels: *Environmental Toxicology*, v. 27, no. 9, p. 537-548.
- Villeneuve, V., and Pienitz, R., 1998, Composition diatomifère de quatre sources thermales au Canada, en Islande et au Japon: *Diatom Research*, v. 13, no. 1, p. 149-175.
- Volkman, J., Jeffrey, S., Nichols, P., Rogers, G., and Garland, C., 1989, Fatty acid and lipid composition of 10 species of microalgae used in mariculture: *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, v. 128, no. 3, p. 219-240.
- Vos, J., Ooijevaar, M., Postma, J., and Admiraal, W., 2000, Interaction between food availability and food quality during growth of early instar chironomid larvae: *Journal of the North American Benthological Society*, v. 19, no. 1, p. 158-168.

## W

- Wada, H., and Mizusawa, N., 2009, The role of phosphatidylglycerol in photosynthesis, *Lipids in Photosynthesis*, Springer, p. 243-263.
- Wada, H., and Murata, N., 2007, The essential role of phosphatidylglycerol in photosynthesis: *Photosynthesis Research*, v. 92, no. 2, p. 205-215.
- Wallis, J. G., Watts, J. L., and Browse, J., 2002, Polyunsaturated fatty acid synthesis: what will they think of next?: *Trends in Biochemical Sciences*, v. 27, no. 9, p. 467-473.
- Wang, Y., Fang, J., Leonard, S. S., and Rao, K. M. K., 2004, Cadmium inhibits the electron transfer chain and induces reactive oxygen species: *Free Radical Biology and Medicine*, v. 36, no. 11, p. 1434-1443.
- Weisshaar, H., Retzlaff, G., and Böger, P., 1988, Chloroacetamide inhibition of fatty acid synthesis: *Pesticide Biochemistry and Physiology*, v. 32, no. 3, p. 212-216.
- Wilson, J. D., Morris, A. J., Arroyo, B. E., Clark, S. C., and Bradbury, R. B., 1999, A review of the abundance and diversity of invertebrate and plant foods of granivorous birds in northern Europe in relation to agricultural change: *Agriculture, Ecosystems & Environment*, v. 75, no. 1-2, p. 13-30.
- Wood, R. J., Mitrovic, S. M., Lim, R. P., and Kefford, B. J., 2016, How benthic diatoms within natural communities respond to eight common herbicides with different modes of action: *Science of Total Environment*, v. 557-558, p. 636-643.

**Y**

- Ying, L., Kang-sen, M., and Shi-chun, S., 2000, Total lipid and fatty acid composition of eight strains of marine diatoms: *Chinese Journal of Oceanology and Limnology*, v. 18, no. 4, p. 345-349.
- , 2002, Effects of harvest stage on the total lipid and fatty acid composition of four *Cylindrotheca* strains: *Chinese Journal of Oceanology and Limnology*, v. 20, no. 2, p. 157-161.
- Yongmanitchai, W., and Ward, O. P., 1991, Growth of and omega-3 fatty acid production by *Phaeodactylum tricornutum* under different culture conditions: *Applied and Environmental Microbiology*, v. 57, no. 2, p. 419-425.

**Z**

- Zhu, L., Li, Z., and Hiltunen, E., 2016, Strategies for lipid production improvement in microalgae as a biodiesel feedstock: *BioMed Research International*, v. 2016.
- Zulu, N. N., Zienkiewicz, K., Vollheyde, K., and Feussner, I., 2018, Current trends to comprehend lipid metabolism in diatoms: *Progress in Lipid Research*, v. 70, p. 1-16.



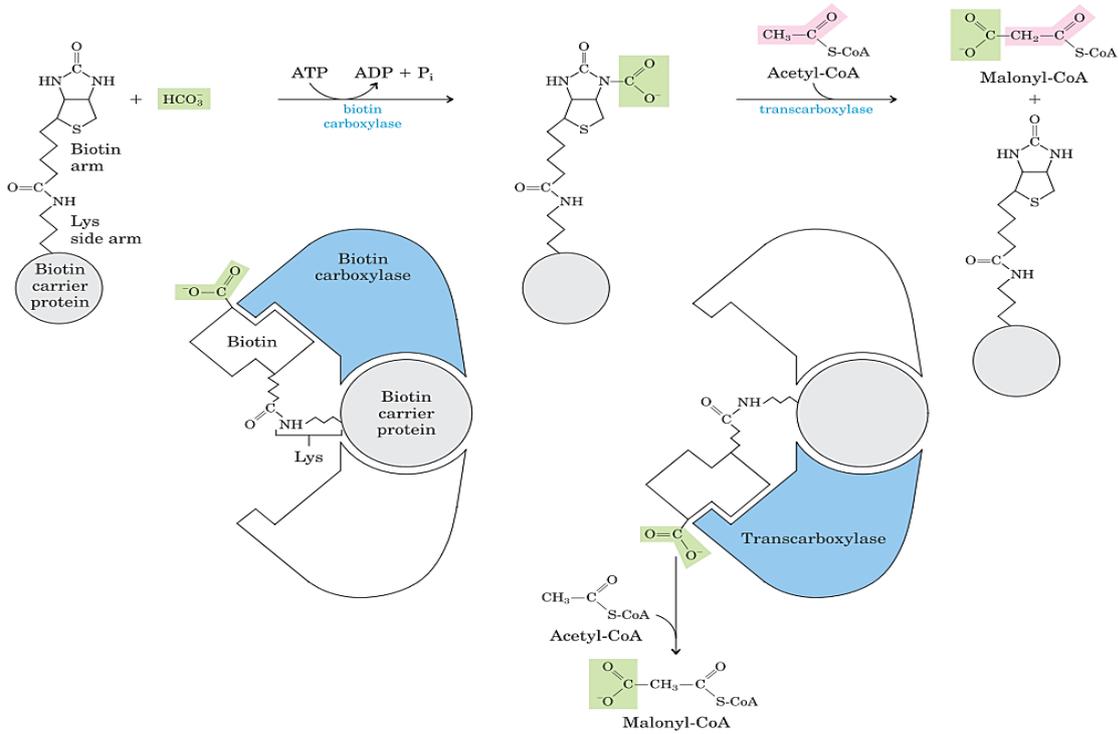
---

# **Annexes**

---

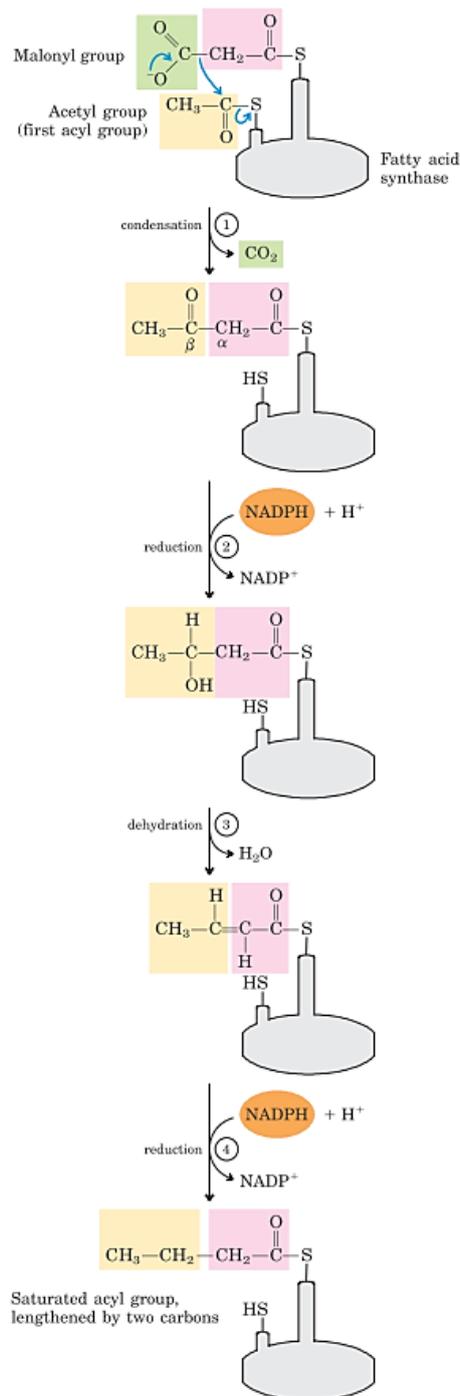


**Annexe 1 : Schéma de la réaction catalysée par l'acétyl-CoA carboxylase formant le malonyl-CoA.  
Par Lehninger et al., 2004.**



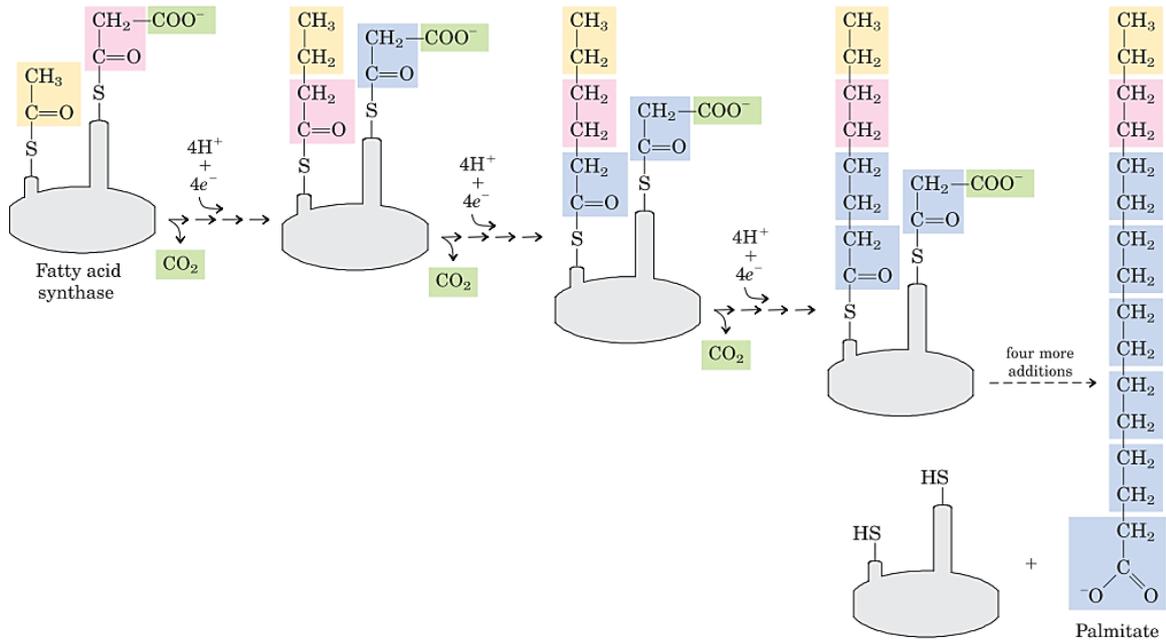
**Annexe 2 : Schéma de la réaction entre la malonyl-CoA, l'acétyl-CoA et l'enzyme acide gras synthase formant comme produit final un groupe acyl saturé.**

**Par Lehninger et al., 2004.**



# Annexe 3 : Schéma du processus de synthèse de l'acide palmitique.

Par Lehninger et al., 2004.



#### Annexe 4 : Composition du milieu de culture Dauta (Dauta, 1982)

Pour 1 Litre de Dauta :

- 1 mL de  $\text{FeSO}_4, 7 \text{H}_2\text{O}$  à  $1 \text{ g.L}^{-1}$
- 1 mL de  $\text{NaHCO}_3$  à  $50 \text{ g.L}^{-1}$
- 1 mL de  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  à  $5 \text{ g.L}^{-1}$
- 1 mL de  $\text{MgSO}_4, 7 \text{H}_2\text{O}$  à  $25 \text{ g.L}^{-1}$
- 1 mL de  $\text{CaCl}_2, 2 \text{H}_2\text{O}$  à  $25 \text{ g.L}^{-1}$
- 3,6 mL de  $\text{Na}_2\text{SiO}_3, 9 \text{H}_2\text{O}$  à  $28,42 \text{ g.L}^{-1}$  (correspondant à environ  $10 \text{ mg.L}^{-1}$  de Si)
- 1 mL de solution d'oligoéléments contenant :
  - $\text{ZnSO}_4, 7 \text{H}_2\text{O}$  à  $20 \text{ mg.L}^{-1}$
  - $\text{CuCl}_2, 2 \text{H}_2\text{O}$  à  $20 \text{ mg.L}^{-1}$
  - $\text{MnCl}_2, 4 \text{H}_2\text{O}$  à  $400 \text{ mg.L}^{-1}$
  - $\text{CoCl}_2, 2 \text{H}_2\text{O}$  à  $10 \text{ mg.L}^{-1}$
  - $\text{H}_3\text{BO}_3$  à  $1 \text{ mg.L}^{-1}$
  - $\text{Na}_2\text{MoO}_4$  à  $35 \text{ mg.L}^{-1}$
- 1 mL de  $\text{KNO}_3$  à  $200 \text{ g.L}^{-1}$
- 1 mL de  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  à  $25 \text{ g.L}^{-1}$
- Eau distillée (pour compléter jusqu'à 1 L)
- $\text{HCl}$  (pour ajuster le pH entre 7,5 et 8 en toute fin de préparation)