



HAL
open science

**Évaluation des effets des nanotubes de carbone sur le
comportement d'un modèle cellulaire émergent :
Physarum polycephalum**

Manon Ternois

► **To cite this version:**

Manon Ternois. Évaluation des effets des nanotubes de carbone sur le comportement d'un modèle cellulaire émergent : Physarum polycephalum. Matériaux. Université Paul Sabatier - Toulouse III, 2023. Français. NNT : 2023TOU30206 . tel-04405011

HAL Id: tel-04405011

<https://theses.hal.science/tel-04405011>

Submitted on 19 Jan 2024

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

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



THÈSE

**En vue de l'obtention du
DOCTORAT DE L'UNIVERSITÉ DE TOULOUSE
Délivré par l'Université Toulouse 3 - Paul Sabatier**

**Présentée et soutenue par
Manon TERNOIS**

Le 25 septembre 2023

**Évaluation des effets des nanotubes de carbone sur le
comportement d'un modèle cellulaire émergent : Physarum
polycephalum.**

Ecole doctorale : **SEVAB - Sciences Ecologiques, Vétérinaires, Agronomiques et
Bioingenieries**

Spécialité : **Ecologie, biodiversité et évolution**

Unité de recherche :

CRCA - Centre de Recherches sur la Cognition Animale

Thèse dirigée par

Audrey DUSSUTOIR et Emmanuel FLAHAUT

Jury

Mme Anna BENCSIK, Rapporteur

Mme Catherine SANTAELLA, Rapporteur

Mme Mélanie AUFFAN, Examinatrice

Mme Audrey DUSSUTOIR, Directrice de thèse

M. Emmanuel FLAHAUT, Co-directeur de thèse

Mme Noélie DAVEZAC, Présidente

Remerciements

Je tiens tout d'abord à remercier **Anna Bencsik** et **Catherine Santaella** d'avoir accepté de rapporter mon manuscrit de thèse. Je remercie également les autres membres du jury, **Mélanie Auffan** et **Noélie Davezac** d'avoir accepté d'évaluer ce travail.

Je remercie la région Occitanie et l'Université Fédérale Toulouse Midi-Pyrénées d'avoir financé ce projet de thèse. Je remercie également l'université Toulouse III Paul Sabatier pour avoir financé 2 mois de mobilité doctorale à Graz (Autriche).

Je remercie chaleureusement mes deux encadrants, **Audrey Dussutour** et **Emmanuel Flahaut**. Merci à tous les deux pour votre confiance et votre bienveillance tout au long de cette thèse. J'ai énormément appris durant ces 3 années, et j'ai pu m'approprié ce sujet grâce à vous. Vous êtes tous les deux passionnés par vos recherches et ça a donné lieu à des réunions riches en idées, ce qui était motivant, et toujours avec le sourire ! Merci aussi pour votre disponibilité, car malgré vos emplois du temps surchargés vous avez toujours été joignables au besoin. Et merci de m'avoir laissé un grand nombre de libertés que ce soit pour le choix des expériences, des congrès, la demande de mobilité, ou l'intervention dans des écoles. **Audrey**, même si on ne se voyait pas régulièrement ça a toujours été avec ta bonne humeur communicative 😊. Tu es une super encadrante, et je n'oublierai pas la patience que tu as eu pour m'expliquer les stats ! Tu m'as offert plusieurs opportunités et toujours encouragée à faire de la vulgarisation, pour ça un grand merci, car je me suis rendu compte que j'adore ça et que j'ai bien l'intention de continuer. **Emmanuel**, tu es un pédagogue hors pair, un super encadrant, et tu as l'air d'être serein et optimiste en toutes circonstances, ce qui a un côté rassurant surtout quand on a dû expédier un colis en Autriche alors que les délais étaient (très) serrés. Sans oublier que j'ai « un peu » moins peur de la chimie grâce à toi !

Je souhaite remercier les membres de mon comité de suivi de thèse **Amélie Châtel** et **Martin Grube** pour leurs conseils et commentaires qui nous ont donné quelques idées d'expériences. De plus, je remercie Martin de m'avoir accueilli à l'Institut für Biologie de Graz. Cela a été une opportunité de travailler à l'étranger pendant 2 mois, et ça a été un réel plaisir de découvrir ce beau pays qu'est l'Autriche. Merci pour tes conseils aussi bien professionnellement que touristiquement. Je remercie également **Philipp** et **Doris** qui m'ont aidé pour mes expériences à Graz même si je ne parlais pas un mot d'Allemand (ou presque !). Danke schön ! Je remercie chaleureusement **Gerti**, mon hôte pendant ces 2 mois, qui m'a accueilli chez elle avec toute sa bienveillance et sa bonne humeur, et avec qui j'ai partagé de beaux moments.

Je tiens à remercier toutes les personnes qui m'ont aidé, et ont apporté leurs connaissances, pour la réalisation et l'analyse de certaines expériences. Sans vous cette thèse n'aurait pas été ce qu'elle est, un grand merci : **Marlène, Morgan, Mathieu, Stéphanie, Aurèle, Houssam, Hermès**.

Un grand merci à mes stagiaires : **Victor, Maëlle, Aymeric, Léa, Anouk, Ninon**. Vous avez amené de la bonne ambiance dans la salle de manip tout en fournissant un travail exceptionnel. Ça a été un plaisir de travailler, discuter, et plaisanter à vos côtés. Grâce à vous j'ai beaucoup appris en tant qu'encadrante.

Petite dédicace à la team blob ! **Marion, Emilie, Angèle**, j'ai passé de bons moments à vos côtés en passant une tête dans le labo blob pour discuter de choses et d'autres. Vous êtes parties vers de nouveaux horizons, et maintenant c'est à mon tour. **Valentina**, à toi d'assurer la relève ! Angèle,

Valentina, promis un jour j'arriverai à inclure des blobs en résine et je vous en enverrai 😊 Merci à mes **blobs** qui ont été des compagnons de thèse agréables (en général !).

Emilie, ma co-bureau du début à la fin, on a démarré cette aventure ensemble. Merci pour ces 3 années : pour la création du mur des animaux, pour avoir été nounou intérimaire de mes ratounettes, pour m'avoir fait croire que je gère en mise en page Word, pour ne pas avoir colonisé mon bureau avec tes affaires, ... mais plus sérieusement merci pour tous ces moments passés au quotidien, pour ta sensibilité, ton optimisme et ton humour à toute épreuve. Merci aussi à **Iulia** avec qui nous avons démarré, merci pour ta gentillesse et ta bienveillance. Il paraît bien loin le temps où nous n'étions que toutes les trois. Depuis le bureau est bien rempli, et il est même devenu « le meilleur bureau ». Merci à mes co-bureaux adorés, **Alid, Julie, Hugo**, pour toutes les cartes postales, les petits Post-it sur l'ordi, pour tous ces moments de partages, de soutien, et de bonne ambiance au quotidien tout simplement. Merci également à **Romane** et **Sébastien**, vous n'avez pas partagé notre bureau pendant longtemps mais vous avez été de belles rencontres.

Je tiens à remercier les doctorants du labo qui sont devenus bien plus que des collègues. Merci à tous pour tous les moments qu'on a passé au sein du labo, mais surtout en dehors ! Merci pour les cartes postales (aussi !) avec des mots doux qui nous font voyager, merci à tous pour votre présence, votre bonne humeur, je vous adore : **Inès**, garde ta force et ta lumière ; **Jordan**, je continuerai à pratiquer les « temps calmes » ; **Nour**, merci pour tes conseils et je me souviendrai toujours de ce superbe séjour en Tunisie ; **Mathilde**, merci pour les bons plans sortis !

Merci à **Anthony** et **Ana**, pour les p'tits instants discussion dans votre bureau et les p'tites sessions roller 😊. **Gérard**, merci pour tous ces bons moments à discuter, toujours avec la bonne anecdote, et merci pour les chasses aux fourmis 😊. **Patrick**, c'est toujours un plaisir de discuter avec toi, et encore merci pour le TP asticot, ton aide a été précieuse !

Sans oublier les (plus ou moins) anciens avec qui j'ai aussi passé de bons moments : **Louise, Stéphane, Louis, Mathieu, Alex, Greg**. J'espère que dans mon avenir professionnel je pourrai retrouver cette bonne ambiance et cette cohésion.

Grâce à vous tous, venir au labo (surtout au retour des vacances) était un plaisir !

Merci à mes amies qui m'ont encouragées à plus ou moins longue distance : **Marion, Valentine, Claire, Justine, Serena**.

Je tiens à remercier celles qui ont partagé et illuminé mon quotidien pendant près de 2 ans, qui ont déterré mes plantes, renversé plus d'une fois mon sac de tri, escaladé mon canapé avec des griffes acérées, mais surtout qui m'ont apporté de l'amour et de la joie : mes ratounettes **Laïka** et **Anouk**. Je remercie également mes souris : **Rufus, Silver, Maya, Domino, Snickers, Cobalt** et **Mirabelle**.

Pour finir je tiens à remercier ma famille. **Maman, papa**, merci infiniment. Vous m'avez toujours soutenue et fait comprendre que je pouvais le faire, vous me répétez que vous êtes fiers de moi et ça m'a aidé à tenir ces 3 ans loin de vous. Il s'est passé bien des choses ces 2 dernières années, mais je sais que je peux toujours compter sur vous. **Margaux**, ma *grande petite* sœur, je vais avoir le temps de venir t'embêter maintenant. Nos appels de 10 min qui se transforment en conversations de 3h me font un bien fou. **Nathan**, mon petit frère pas si petit, et **Lylwenn**, ma *petite petite* sœur, vous m'avez beaucoup manqué pendant ces 3 ans. Vos rires, vos sourires, et votre force de caractère me donnent de la force ❤️ **Mamie, Papi**, merci pour toutes ces heures passées au téléphone, ces belles vacances quand je viens chez vous, et de tout l'amour que vous nous donnez. **Caroline**, merci pour les messages d'encouragement sur BeReal pendant la

rédaction 😊. Merci à mes oncles **Hugues** et **Dominique**, et mes cousines **Rose** et **Violette**, quand je passe du temps avec vous c'est revivifiant. J'ajouterai même : « *Ech franchoés, ch'est ch'parlache dé m'bouque, mais ch'picard, ch'est chti éd min tchœur* »

Rémi, mon chéri, sans toi ces 3 dernières années n'auraient pas été les mêmes. Merci pour les petits tips en informatique et en code, merci pour ta bonne humeur (même si je ne rigole pas toujours à tes jeux de mots, je ris intérieurement), merci pour ton soutien, tes encouragements. Merci de me comprendre et d'être là, tout simplement.

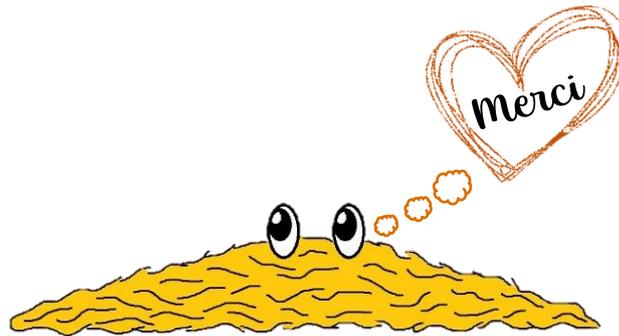


Table des matières

Table des matières.....	1
Liste des figures	6
1. Chapitre 1 : Introduction générale	15
1.1. Les nanotubes de carbone, un univers nanométrique.....	16
1.1.1. Des Nanomatériaux carbonés aux Nanotubes de carbone : propriétés et applications..	16
1.1.1.1. Marché des nanomatériaux carbonés.....	16
1.1.1.2. Réglementation européenne.....	17
1.1.1.3. Description des nanotubes de carbone.....	18
1.1.1.4. Marché des nanotubes de carbone.....	18
1.1.1.5. Propriétés et applications industrielles	19
1.1.1.6. Applications dans le domaine biomédical	20
1.1.1.7. Applications environnementales.....	21
1.1.2. Nanotubes de carbone : toxicité humaine et environnementale	22
1.1.2.1. Toxicité humaine.....	22
1.1.2.2. Prédiction des rejets dans l'environnement	22
1.1.2.3. Effets sur les écosystèmes du sol.....	23
1.2. Physarum polycephalum, un modèle hors du commun	25
1.2.1. Un être unicellulaire	25
1.2.1.1. Phylogénie.....	25
1.2.1.2. Cycle de vie	25
1.2.2. Composition et locomotion du plasmode	26
1.2.2.1. Composition du plasmode.....	26
1.2.2.2. Locomotion du plasmode	27
1.2.3. Une cellule qui présente des comportements.....	28
1.2.3.1. Adaptation du plasmode à son environnement.....	28
1.2.3.2. Comportement : Perception, mémoire et apprentissage	29
1.2.3.3. Comportement : Optimisation du réseau.....	30
1.2.4. Un modèle pour évaluer la toxicité des nanoparticules.....	31
1.3. Objectifs de la thèse.....	32
1.4. Méthodes générales.....	33
1.4.1. Synthèse des Nanotubes de carbone à double-paroi (DWCNT).....	33
1.4.1.1. Préparation de la solution de CMC.....	33
1.4.1.2. Synthèse des DWCNT.....	34
1.4.1.3. Extraction des DWCNT	34
1.4.1.4. Oxydation des DWCNT.....	34
1.4.1.5. Synthèse de l'oxyde de graphène	35
1.4.2. Élevage de Physarum polycephalum	35
1.4.2.1. Élevage de Physarum polycephalum : sans exposition aux DWCNT	35
1.4.2.2. Élevage de Physarum polycephalum : avec exposition aux DWCNT	36
1.4.2.3. Solution contrôle.....	37
1.4.3. Déroulement des expériences.....	38

1.4.4. Analyse des résultats	39
1.5. Annexe 1 : Tableaux statistiques et figures supplémentaires.....	41
1.5.1. Caractérisation des DWCNT et du GO	41
1.5.2. Expérience contrôle	43
1.5.3. Variabilité de la vitesse de déplacement des plasmodes.....	44
2. Chapitre 2 : Réponse de <i>Physarum polycephalum</i> à l'exposition aux nanotubes de carbone : de l'internalisation au comportement	45
2.1. Contexte.....	46
2.2. Résumé en français de l'étude " <i>Slime mold response to carbon nanotubes exposure: from internalization to behavior</i> "	47
2.3. <i>Slime molds response to carbon nanotubes exposure: from internalization to behavior</i>	50
2.3.1. Abstract	50
2.3.2. Introduction.....	51
2.3.3. Materials and methods	54
2.3.3.1. CNT synthesis and dispersion	54
2.3.3.2. Species and rearing conditions	55
2.3.3.3. Internalization of pristine DWCNTs by slime molds	55
2.3.3.4. Bioaccumulation of pristine DWCNTs into the slime mold	55
2.3.3.5. Persistence of pristine DWCNTs into the slime mold	56
2.3.3.6. Excretion of pristine DWCNTs from the slime mold.....	56
2.3.3.7. Migration speed following a single exposure to DWCNTs	57
2.3.3.8. First pseudopod and expansion rate following a chronic exposure to DWCNTs.....	57
2.3.3.9. Statistical analysis	57
2.3.4. Results.....	58
2.3.4.1. Internalization of pristine DWCNTs by slime molds	58
2.3.4.2. Bioaccumulation of pristine DWCNTs into the slime mold	58
2.3.4.3. Persistence of pristine DWCNTs into the slime mold	59
2.3.4.4. Excretion of pristine DWCNTs from the slime mold.....	60
2.3.4.5. Migration speed following a single exposure to DWCNTs	60
2.3.4.6. First pseudopod and expansion rate following chronic exposure to DWCNTs	62
2.3.5. Discussion.....	62
2.3.6. Conclusion	64
2.3.6.1. Authors' contributions	65
2.3.6.2. Disclosure statement.....	65
2.3.6.3. Funding	65
2.4. Expérience supplémentaire à la suite de la publication de l'article : Effet des DWCNT oxydés sur la vitesse de déplacement des plasmodes	66
2.4.1.1. Méthode.....	66
2.4.1.2. Résultats	67
2.4.1.3. Conclusion	68
2.5. Annexe 2 : Tableaux statistiques et figures supplémentaires.....	70

3. Chapitre 3 : Effets des DWCNT sur le déplacement de *Physarum polycephalum* 83

3.1. Introduction	84
3.2. Effets sur la vitesse de déplacement des plasmodes en arènes	87
3.2.1. Effet sur l'expansion du plasmode pendant 24h	87
3.2.1.1. Protocole.....	87
3.2.1.2. Résultats	88
3.2.2. Effet selon la souche du plasmode	93
3.2.2.1. Protocole.....	93
3.2.2.2. Résultats	94
3.2.3. Effet après 7 jours d'exposition : souches LU et AUS	97
3.2.3.1. Protocole.....	97
3.2.3.2. Résultats	97
3.2.4. Effet selon la durée d'exposition : de 2 à 8 semaines	98
3.2.4.1. Protocole.....	98
3.2.4.2. Résultats	99
3.3. Effets sur la vitesse de déplacement des plasmodes sur ponts	102
3.3.1. Effet selon le substrat	102
3.3.1.1. Protocole.....	102
3.3.1.2. Résultats	103
3.3.2. Effet selon la concentration d'exposition	105
3.3.2.1. Protocole.....	105
3.3.2.2. Résultats	106
3.4. Effet sur le processus de fusion des plasmodes	107
3.4.1.1. Protocole.....	107
3.4.1.2. Résultats	109
3.5. Discussion	111
3.6. Annexe 3 : Tableaux statistiques et figures supplémentaires	117
3.6.1. Effet sur l'expansion du plasmode pendant 24h	117
3.6.2. Effet selon la souche du plasmode	121
3.6.3. Effet après 7 jours d'exposition : souches LU et AUS	125
3.6.4. Effet selon la durée d'exposition : de 2 à 8 semaines	127
3.6.5. Effet selon le substrat	134
3.6.6. Croissance selon différentes concentrations d'exposition.....	137
3.6.7. Effets sur le processus de fusion des plasmodes.....	139

4. Chapitre 4 : Prise de décision de *Physarum polycephalum* : effet de l'exposition aux DWCNT, et de la combinaison avec d'autres facteurs de stress 141

4.1. Introduction	142
4.2. Effets sur la prise de décision pour un substrat attractif : montage en arène	145
4.2.1.1. Protocole.....	145
4.2.1.2. Résultats	146

4.3. Effets sur la prise de décision sur substrat répulsif ou attractif : montage en double-ponts.....	149
4.3.1. Effet sur la souche AUS.....	150
4.3.1.1. Protocole.....	150
4.3.1.2. Résultats : après 1 et 2 semaines d'exposition.....	151
4.3.1.3. Résultats : après 6 et 9 semaines d'expositions.....	153
4.3.2. Effet sur la souche LU	155
4.3.2.1. Protocole.....	155
4.3.2.2. Résultats : substrat répulsif.....	155
4.3.2.3. Résultats : substrat attractif.....	156
4.4. Effet du traitement DWCNT avec des changements brutaux de température	159
4.4.1. Effet sur la souche AUS.....	159
4.4.1.1. Protocole.....	159
4.4.1.2. Résultats : substrat aversif (double-ponts).....	160
4.4.1.3. Résultats : substrat attractif (simple pont)	162
4.4.2. Effet sur la souche LU	163
4.4.2.1. Protocole.....	163
4.4.2.2. Résultats	163
4.5. Effet des DWCNT selon l'âge de <i>Physarum polycephalum</i>.....	165
4.5.1.1. Protocole.....	165
4.5.1.2. Résultats	165
4.6. Effet des DWCNT : selon l'âge des plasmodes et la température.....	167
4.6.1.1. Protocole.....	167
4.6.1.2. Résultats : substrat aversif (double-ponts).....	167
4.6.1.3. Résultats : substrat attractif (simple pont)	169
4.7. Discussion.....	171
4.8. Annexe 4 : Tableaux statistiques et figures supplémentaires.....	178
4.8.1. Effets sur la prise de décision pour un substrat attractif : montage en arène	178
4.8.2. Prise de décision - souche AUS – substrat répulsif.....	180
4.8.3. Prise de décision - souche LU – substrat répulsif.....	184
4.8.4. Prise de décision - souche LU – substrat attractif	185
4.8.5. Effet du traitement DWCNT avec des changements brutaux de température : souche AUS	186
4.8.6. Effet du traitement DWCNT avec des changements brutaux de température : souche LU	188
4.8.7. Effet des DWCNT selon l'âge des plasmodes	189
4.8.8. Effet des DWCNT selon l'âge des plasmodes et la température.....	191
5. Chapitre 5 : Recherche d'explications à l'effet des NTC sur <i>Physarum polycephalum</i>.....	195
5.1. Partie I : Analyse de la période de contraction des veines	196
5.1.1. Introduction.....	196

5.1.2. Méthode et résultats	197
5.1.2.1. Protocole.....	197
5.1.2.2. Résultats.....	199
5.1.3. Discussion.....	201
5.2. Partie II : Analyse du stress oxydant.....	202
5.2.1. Introduction.....	202
5.2.2. Méthode et Résultats	203
5.2.2.1. Protocole.....	203
5.2.2.2. Résultats.....	205
5.2.3. Discussion.....	208
5.3. Annexe 5 : Tableaux statistiques.....	210
5.3.1. Analyse de la période de contraction des veines	210
5.3.2. Analyse du stress oxydant	213
6. Chapitre 6 : Discussion générale.....	219
6.1. Toxicité des DWCNT sur <i>Physarum polycephalum</i>	220
6.2. Variabilité de la toxicité des DWCNT.....	221
6.3. <i>Physarum polycephalum</i> : un modèle pertinent	224
6.4. Conclusion générale et perspectives	229
6.5. Annexe 6 : Tableaux statistiques.....	231
7. Annexe 7 : Tableaux récapitulatifs.....	233
8. Annexe 8 : Bibliographie.....	245
9. Annexe 9 : Renseignements personnels.....	265

Liste des figures

Figure 1 : Nanomatériaux carbonés.....	18
Figure 2 : Cycle de vie de Physarum polycephalum.....	26
Figure 3 : Photos de P. polycephalum à différentes étapes de son cycle de vie.....	27
Figure 4 : Elevage de Physarum polycephalum suivant 5 étapes.....	37
Figure 5 : Vitesse de déplacement des plasmodes selon le traitement (eau du robinet ou CMC) après 1 ou 2 jours d'exposition.....	38
Figure 6 : Représentation schématique des 3 types d'expériences réalisées pour évaluer la vitesse de déplacement et la prise de décision des plasmodes.....	39
Figure 7 : Variabilité de la vitesse de déplacement de plasmodes exposés à de la CMC selon la date d'observation.....	40
Figure 8 : Image à la loupe binoculaire d'un plasmode exposé aux DWCNT par la nourriture.....	49
Figure 9 : Pictures of P. polycephalum.....	53
Figure 10 : Internalisation of pristine DWCNTs by slime molds.....	59
Figure 11 : Bioaccumulation and persistence of pristine DWCNTs into the slime mold.....	60
Figure 12 : Excretion of pristine DWCNTs from the slime mold.....	61
Figure 13 : Migration speed following a single exposure to DWCNTs as a function of the route of exposure: environment, food or topical.....	62
Figure 14 : Behaviour analyses.....	63
Figure 15 : Croissance des plasmodes sur les ponts selon 3 voies d'exposition : nourriture (A), environnement (B), topique (C).....	67
Figure 16 : Indice de performance des plasmodes DWCNT (A) ou Ox-DWCNT (B) selon 3 voies d'exposition.: nourriture, environnement, topique.....	69
Figure 17 : Détection de la surface recouverte par le plasmode, et son périmètre.....	88
Figure 18 : Déplacement et valeur de circularité des plasmodes au cours du temps.....	88
Figure 19 : Aire (A) et périmètre (B) des plasmodes au cours du temps selon le traitement.....	90
Figure 20 : Circularité (A) et solidité (B) des plasmodes au cours du temps.....	91
Figure 21 : Aire (A), périmètre (B), circularité (C), solidité (D) pour une période délimitée entre 500 et 1250 minutes d'expérience.....	92
Figure 22 : Temps nécessaire pour que les plasmodes passent d'une morphologie isomorphe à une morphologie digitée selon le traitement.....	93

Figure 23 : Indices de performance des plasmodes DWCNT sur la latence d'apparition du 1^{er} pseudopode (A, C) ou la latence de contact (B, D) pour 5 souches suivant une exposition chronique de 3 jours.	96
Figure 24 : Indices de performance de l'apparition du 1^{er} pseudopode des souches AUS et LU (A), et de contact (B), suivant une exposition chronique de 7 jours aux DWCNT.	98
Figure 25 : Indices de performance calculés à partir de la latence d'apparition du 1^{er} pseudopode (A) et la latence de contact avec le bord de l'arène (B) pour la souche AUS suivant une exposition chronique de 2, 3, 7 et 8 semaines aux DWCNT.	100
Figure 26 : Indices de performance calculés à partir de la latence d'apparition du 1^{er} pseudopode (A) et la latence de contact avec le bord de l'arène (B) pour la souche AUS suivant une exposition chronique de 8 semaines aux N-CMC et DWCNT.	101
Figure 27 : Indice de performance des plasmodes DWCNT après 12 jours d'exposition (A) et des plasmodes N-CMC et DWCNT après 14 et 15 jours d'exposition, selon 3 substrats (neutre, aversif, attractif).	104
Figure 28: Indice de performance de la vitesse de déplacement des plasmodes selon la concentration d'exposition (1, 10, 50 ou 100 µg/g) pour chaque type de substrat (neutre (A) ; aversif (B) ; attractif (C)).	107
Figure 29 : Photos des étapes du processus de fusion de <i>P.polycephalum</i>	109
Figure 30 : Effet du traitement sur le processus de fusion à différentes étapes.	110
Figure 31 : Montage en arène pour évaluer la prise de décision des plasmodes face à des pastilles d'avoine (substance attractive).	146
Figure 32 : Indices de performance des plasmodes DWCNT pour la latence de différents événements : latence de contact avec les pastilles d'avoine à 4% ou 1% ; latence de recouvrement des pastilles à 4% ou 1%.	148
Figure 33 : Effectifs des plasmodes, pour chaque traitement, qui indiquent avec quelle pastille ils sont entrés en contact en premier (A) ; effectifs des plasmodes, pour chaque traitement, qui indiquent s'ils recouvrent la pastille à 4% dès qu'ils sont en contact (B). ...148	
Figure 34 : Montage en double-pont pour évaluer l'indice de décision quand le plasmode est confronté à deux concentrations en substance aversive.	150
Figure 35 : Indices de décision (A, B) et indices de performance calculés sur la distance parcourue (C, D) des plasmodes après 1 et 2 semaines d'exposition.	152
Figure 36 : Indices de décision (A, B) et indices de performance calculés sur la distance parcourue (C, D) des plasmodes après 6 et 9 semaines d'exposition.	154
Figure 37 : Indices de décision (A) et indices de performance calculés sur la distance parcourue (B) des plasmodes LU sur substrat répulsif.	157

Figure 38 : Indices de décision (A) et indices de performance calculés sur la distance parcourue (B) des plasmodes LU sur substrat attractif.....	158
Figure 39 : Indices de décision (A) et indices de performance calculés sur la distance parcourue (B) des plasmodes AUS selon la condition de température.....	161
Figure 40 : Vitesse de déplacement des plasmodes sur substrat attractif selon la condition de température.	162
Figure 41 : Indices de décision (A) et indices de performance calculés sur la distance parcourue (B) des plasmodes LU selon la condition de température.....	164
Figure 42 : Indices de décision (A) et indices de performance calculés sur la distance parcourue (B) des plasmodes LU selon leur âge.	166
Figure 43 : Indices de décision des plasmodes jeunes (A) ou âgés (B) selon le traitement et la condition de température.....	168
Figure 44 : Indices de performance des plasmodes DWCNT jeunes ou âgés, sur substrat aversif (double-ponts), selon la condition de température.....	169
Figure 45 : Indices de performance des plasmodes DWCNT jeunes ou âgés, sur substrat attractif (simple pont) selon la condition de température.....	170
Figure 46 : Installation permettant la prise de photo automatisée avec l'éclairage LED (A) et croissance d'un plasmode en arène (B).....	198
Figure 47 : Positions définies par l'algorithme. Cas d'une portion d'image nette (A), et une floue (B).	199
Figure 48 : Période de contraction des veines selon le traitement pour des diamètres moyens < 200 μm (A), compris entre 200 et 299 μm (B), compris entre 300 et 399 μm (C), ou > 400 μm (D).	200
Figure 49 : Plasmodes se développant dans les puits avant le dépôt de la sonde Mitosox (plaque 12 puits).....	203
Figure 50 : Description de la réalisation des 3 sessions d'expérience, et décrivant pour chaque session la souche et l'âge du plasmode, la durée d'exposition, la durée de stockage des lames avant le passage au microscope.	205
Figure 51 : Noyaux de <i>P. polycephalum</i> visibles par marquage DAPI au microscope confocal.	206
Figure 52 : Nombre de noyaux détectés (A), Aire (B) et Circularité des noyaux (C), intensité de signal Mitosox (D) selon le traitement (CMC ou DWCNT) et la souche (AUS ou LU).	207
Figure 53 : Nombre de noyaux détectés (A), Aire (B) et Circularité des noyaux (C), intensité de signal Mitosox (D) selon le traitement (CMC, Eau, ou DWCNT).	208

<i>Figure 54 : Indices de performance (calculés à partir des latences) des plasmodes GO après 7 ou 8 jours d'exposition (A) ; des plasmodes N-EDI ou GO après 9 ou 10 jours d'exposition (B).....</i>	<i>228</i>
<i>Figure 55 : Indices de performance (calculés à partir des aires) des plasmodes GO après 7 ou 8 jours d'exposition.....</i>	<i>228</i>
<i>Figure 56 : Indices de performance (calculés à partir des aires) des plasmodes selon le traitement (N-EDI ou GO) selon la durée d'exposition.....</i>	<i>229</i>
<i>Figure S1: Figure associée aux méthodes générales (DWCNT).....</i>	<i>41</i>
<i>Figure S2 : Figure associée aux méthodes générales (DWCNT oxydés).....</i>	<i>42</i>
<i>Figure S3 : Figure associée aux méthodes générales (GO).....</i>	<i>42</i>
<i>Figure S4: Figure associated to Figure 14 (A).....</i>	<i>79</i>
<i>Figure S5: Figure associated to Figure 14 (B).....</i>	<i>79</i>
<i>Figure S6 : DWCNTs excreted in the environment from the slime mold.</i>	<i>80</i>
<i>Figure S7 : Latence d'apparition du 1^{er} pseudopode (A) et d'atteinte du bord de l'arène (B) pour 5 souches suivant une exposition chronique de 3 jours aux DWCNT.</i>	<i>124</i>
<i>Figure S8 : Latence d'apparition du 1^{er} pseudopode des souches AUS (A) et LU (C), et latence de contact avec le bord de l'arène des souches AUS (B) et LU (D), suivant une exposition chronique de 7 jours aux DWCNT.</i>	<i>126</i>
<i>Figure S9 : Latence d'apparition du 1^{er} pseudopode (A) et d'atteinte du bord de l'arène (B,) pour la souche AUS suivant une exposition chronique de 2 à 7 semaines aux DWCNT.</i>	<i>132</i>
<i>Figure S10 : Latence d'apparition du 1^{er} pseudopode (A) et d'atteinte du bord de l'arène (B,) pour la souche AUS suivant une exposition chronique de 8 semaines aux DWCNT.....</i>	<i>133</i>
<i>Figure S11 : Vitesse de déplacement des plasmodes CMC et DWCNT après 12 jours d'exposition (A) et des plasmodes CMC, N-CMC et DWCNT après 13 et 14 jours d'exposition (B) pour la souche AUS.</i>	<i>136</i>
<i>Figure S12 : Vitesse de déplacement des plasmodes selon la concentration d'exposition sur un substrat neutre (A), attractif (B), ou aversif (C).</i>	<i>138</i>
<i>Figure S13 : Latence d'apparition des événements en fonction du traitement chez la souche LU après 1 semaine d'exposition.....</i>	<i>179</i>
<i>Figure S14 : Vitesse de déplacement des plasmodes sur substrat attractif selon la condition de température.</i>	<i>187</i>
<i>Figure S15 : Vitesse de déplacement des plasmodes jeunes (A), ou âgés (B), sur substrat attractif selon la condition de température.....</i>	<i>194</i>

Liste des tableaux

<i>Tableau S1 : Statistiques associées à la Figure 5.....</i>	43
<i>Tableau S2 : Statistiques associées à la Figure 5.....</i>	43
<i>Tableau S3 : Statistiques associées à la Figure 7.....</i>	44
<i>Table S4 : Statistics associated to Figure 10 (A).....</i>	70
<i>Table S5 : Statistics associated to Figure 10 (B).....</i>	71
<i>Table S6 : Statistics associated to Figure 11 (A).....</i>	72
<i>Table S7 : Statistics associated to Figure 11 (B).....</i>	72
<i>Table S8 : Statistics associated to Figure 11 (C).....</i>	73
<i>Table S9 : Statistics associated to Figure 12 (A).....</i>	74
<i>Table S10 : Statistics associated to Figure 12 (B).....</i>	74
<i>Table S11 : Statistics associated to Figure 12 (D).</i>	75
<i>Table S12 : Statistics associated to Figure 13 (A).....</i>	76
<i>Table S13 : Statistics associated to Figure 13 (B).....</i>	76
<i>Table S14 : Statistics associated to Figure 13 (C).....</i>	77
<i>Table S15 : Statistics associated to Figure 14 (A).....</i>	77
<i>Table S16 : Statistics associated to Figure 14 (B).....</i>	78
<i>Tableau S17 : Statistiques associées à la Figure 16.....</i>	81
<i>Tableau S18 : Statistiques associées à la Figure 16.....</i>	81
<i>Tableau S19 : Statistiques associées à la Figure 19 (A).....</i>	117
<i>Tableau S20 : Statistiques associées à la Figure 19 (B).....</i>	117
<i>Tableau S21 : Statistiques associées à la Figure 20 (A).....</i>	118
<i>Tableau S22 : Statistiques associées à la Figure 20 (B).....</i>	118
<i>Tableau S23 : Statistiques associées à la Figure 21 (A).....</i>	119
<i>Tableau S24 : Statistiques associées à la Figure 21 (B).....</i>	119
<i>Tableau S25 : Statistiques associées à la Figure 21 (C).....</i>	120
<i>Tableau S26 : Statistiques associées à la Figure 21 (D).</i>	120
<i>Tableau S27 : Statistiques associées à la Figure 22.....</i>	121
<i>Tableau S28 : Statistiques associées à la Figure S7 (A, B).....</i>	121
<i>Tableau S29 : Statistiques associées à la Figure S7 (A).....</i>	122
<i>Tableau S30 : Statistiques associées à la Figure S7 (B).....</i>	122
<i>Tableau S31 : Statistiques associées à la Figure 23 (C, D).</i>	123
<i>Tableau S32 : Statistiques associées à la Figure 23 (C, D).</i>	123
<i>Tableau S33 : Statistiques associées à la Figure 24 (A).....</i>	125
<i>Tableau S34 : Statistiques associées à la Figure 24 (B).....</i>	125

<i>Tableau S35 : Statistiques associées à la Figure S9 (A)</i>	127
<i>Tableau S36 : Statistiques associées à la Figure S9 (B)</i>	128
<i>Tableau S37 : Statistiques associées à la Figure 25 (A)</i>	129
<i>Tableau S38 : Statistiques associées à la Figure 25 (A)</i>	129
<i>Tableau S39 : Statistiques associées à la Figure 25 (B)</i>	130
<i>Tableau S40 : Statistiques associées à la Figure 26 (A)</i>	131
<i>Tableau S41 : Statistiques associées à la Figure 26 (B)</i>	131
<i>Tableau S42 : Statistiques associées à la Figure 27 (A)</i>	134
<i>Tableau S43 : Statistiques associées à la figure Figure 27 (B)</i>	135
<i>Tableau S44 : Statistiques associés à la Figure 28</i>	137
<i>Tableau S45 : Statistique associée à la Figure 30 (A)</i>	139
<i>Tableau S46 : Statistique associée à la Figure 30 (B)</i>	139
<i>Tableau S47 : Statistique associée à la Figure 30 (C)</i>	139
<i>Tableau S48 : Statistique associée à la Figure 30 (D)</i>	139
<i>Tableau S49 : Statistiques associées à la Figure 32</i>	178
<i>Tableau S50 : Statistiques associées à la Figure 35 (A)</i>	180
<i>Tableau S51 : Statistiques associées à la Figure 35 (B)</i>	180
<i>Tableau S52 : Statistiques associées à la Figure 35 (C,D)</i>	181
<i>Tableau S53 : Statistiques associées à la Figure 36 (A)</i>	182
<i>Tableau S54 : Statistiques associées à la Figure 36 (B)</i>	182
<i>Tableau S55 : Statistiques associées à la Figure 36 (C,D)</i>	183
<i>Tableau S56 : Statistiques associées à la Figure 37 (A)</i>	184
<i>Tableau S57 : Statistiques associées à la Figure 37 (B)</i>	184
<i>Tableau S58 : Statistiques associées à la Figure 38 (A)</i>	185
<i>Tableau S59 : Statistiques associées à la Figure 38 (B)</i>	185
<i>Tableau S60 : Statistiques associées à la Figure 39 (A)</i>	186
<i>Tableau S61 : Statistiques associées à la Figure 39 (B)</i>	186
<i>Tableau S62 : Statistiques associées à la Figure 40</i>	187
<i>Tableau S63 : Statistiques associées à la Figure 41 (A)</i>	188
<i>Tableau S64 : Statistiques associées à la Figure 41 (B)</i>	188
<i>Tableau S65 : Statistiques associées à la Figure 42 (A)</i>	189
<i>Tableau S66 : Statistiques associées à la Figure 42 (A)</i>	189
<i>Tableau S67 : Statistiques associées à la Figure 42 (B)</i>	190
<i>Tableau S68 : Statistiques associées à la Figure 43</i>	191
<i>Tableau S69 : Statistiques associées à la Figure 44</i>	192
<i>Tableau S70 : Statistiques associées à la Figure 44</i>	192

<i>Tableau S71 : Statistiques associées à la Figure 45.</i>	193
<i>Tableau S72 : Statistiques associées à la Figure 48.</i>	210
<i>Tableau S73 : Statistiques associées à la Figure 48 (A).</i>	211
<i>Tableau S74 : Statistiques associées à la Figure 48 (B).</i>	211
<i>Tableau S75 : Statistiques associées à la Figure 48 (C).</i>	212
<i>Tableau S76 : Statistiques associées à la Figure 48 (D).</i>	212
<i>Tableau S77 : Statistiques associées à la Figure 52(A).</i>	213
<i>Tableau S78 : Statistiques associées à la Figure 52(B).</i>	214
<i>Tableau S79 : Statistiques associées à la Figure 52(C).</i>	215
<i>Tableau S80 : Statistiques associées à la Figure 52(D).</i>	216
<i>Tableau S81 : Statistiques associées à la Figure 53 (A).</i>	217
<i>Tableau S82 : Statistiques associées à la Figure 53 (B).</i>	217
<i>Tableau S83 : Statistiques associées à la Figure 53 (C).</i>	218
<i>Tableau S84 : Statistiques associées à la Figure 53 (D).</i>	218
<i>Tableau S85 : Statistiques associées à la Figure 55.</i>	231
<i>Tableau S86 : Statistiques associées à la Figure 55.</i>	232
<i>Tableau S87 : Statistiques associées à la Figure 56.</i>	232
<i>Tableau S88 : Études écotoxicologiques des effets des NTC sur les micro et macroorganismes du sol.</i>	233
<i>Tableau S89 : Tableau récapitulatif des études utilisant P. polycephalum en tant que modèle cellulaire pour évaluer l'effet de différentes NPs et autres polluants.</i>	236
<i>Tableau S90 : Études toxicologiques des effets des NTC sur les cellules.</i>	239
<i>Tableau S91 : Études décrivant la toxicité des DWCNTs sur différents modèles.</i>	242

Liste des abréviations

CMC : Carboxyméthylcellulose

DWCNT : Nanotube de carbone double-paroi (Double-walled carbon nanotube)

ENMs : Nanomatériaux manufacturés (Engineered nanomaterial)

FA : Filaments d'actine

GO : Oxyde de graphène (graphene oxide)

MT : Microtubules

MWCNT : Nanotube de carbone multi-paroi (Multi-walled carbon nanotube)

NP(s) : Nanoparticule(s)

NTC (CNT) : Nanotube de carbone (Carbon nanotube)

Ox-DWCNT : DWCNT oxydés

ROS : Espèces réactives de l'oxygène (Reactive oxygen species)

SWCNT : Nanotube de carbone mono-paroi (Single-walled carbon nanotube)

1. Chapitre 1 : Introduction générale

1.1. Les nanotubes de carbone, un univers nanométrique

1.1.1. Des Nanomatériaux carbonés aux Nanotubes de carbone : propriétés et applications

1.1.1.1. *Marché des nanomatériaux carbonés*

La commission européenne définit pour la première fois en 2011 le terme « nanomatériau » comme étant « un matériau naturel, formé accidentellement ou manufacturé contenant des particules libres, sous forme d'agrégat ou sous forme d'agglomérat, dont au moins 50 % des particules, dans la répartition numérique par taille, présentent une ou plusieurs dimensions externes se situant entre 1 nm et 100 nm » (The European Commission, 2011). En 2022, cette définition a été révisée sans impacter la considération des nanotubes de carbone en tant que nanomatériaux (The European Commission, 2022).

Ces 15 dernières années, il y a eu un essor dans le développement des nanotechnologies par l'utilisation croissante des nanomatériaux manufacturés (ENMs) pour leur intégration dans divers produits de consommation afin d'améliorer leurs propriétés mécaniques, électriques, thermiques, optiques. Néanmoins, une production d'ENMs en grande quantité et une dégradation des produits lors de leur utilisation peut exposer les êtres-vivants à ces nanoparticules (NPs) et impliquer des rejets dans l'environnement. Il est donc essentiel d'évaluer le risque que représentent ces ENMs en termes de toxicité.

Afin de se rendre compte de l'intégration des nanotechnologies sur le marché de la consommation, des efforts ont été réalisés pour essayer d'inventorier les produits de consommation contenant des ENMs dans plusieurs pays. Le premier inventaire a été créé en 2005 par le Woodrow Wilson International Center for Scholars (Etats-Unis) et leur projet sur les nanotechnologies émergentes (Vance et al., 2015). A leurs débuts en 2005 ils ont répertorié 54 produits, en 2014 ils en ont répertoriés 1814 avec les nanomatériaux carbonés qui représentaient la 2^e catégorie la plus utilisée derrière les métaux (Vance et al., 2015). Cela ne représente pas le marché réel mais donne une indication quant à l'utilisation croissante des ENMs dans des produits de consommation. Les années suivantes, des organisations de plusieurs pays, notamment une compagnie allemande en 2006, l'Institut national des sciences et technologies industrielles du Japon en 2007, deux organisations de consommateurs européennes en 2009, le Conseil danois des consommateurs, le Conseil écologique, et le département d'ingénierie environnementale de l'Université technique du Danemark en 2012 ont également créé des inventaires des ENMs, démontrant une préoccupation mondiale quant à l'utilisation de ces nanomatériaux. Une base de données accessible en ligne, le Nanotechnology Products Database (NPD) (<https://product.statnano.com/>), regroupe des informations sur les produits issus des nanotechnologies actuellement utilisés.

Il en ressort que la présence des ENMs dans les produits de consommation a augmenté au fil des années. Concernant les nanomatériaux carbonés, ils sont majoritairement incorporés dans des

produits solides, et sont représentés par les fullerènes, le noir de carbone, le graphène et les nanotubes de carbone (Vance et al., 2015).

1.1.1.2. Réglementation européenne

Les NTC ont été classés comme « polluants émergents » par l'Agence américaine de protection de l'environnement (EPA) à cause de leurs effets toxiques sur les cellules et les organismes (EPA, 2008; US EPA, 2017) où ils sont régulés par la TSCA (« Toxic Substances Control Act »). D'un point de vue réglementaire, qu'en est-il de l'Europe ?

Il n'existe pas de registre harmonisé de déclaration des nanomatériaux à l'échelle européenne. Certains pays de l'Espace économique européen (la France, la Belgique, le Danemark, la Suède et la Norvège) ont lancé des systèmes nationaux de déclaration obligatoire des nanomatériaux (Pavlicek et al., 2021). La France a été le premier état membre à créer son registre national : le registre R-Nano (<https://www.r-nano.fr/>).

En application de l'article L. 523-4 du Code de l'Environnement, le décret n° 2012-232 du 17 février 2012 relatif à la déclaration annuelle des substances à l'état nanoparticulaire (Journal Officiel de la République Française, 2012) indique que depuis le 1^{er} janvier 2013, en France, il est demandé aux fabricants, importateurs et distributeurs de substances à l'état nanoparticulaire (si au minimum 100g de substance par an) de déclarer les quantités produites, importées ou distribuées sur le registre R-Nano. Cette traçabilité permet à la fois d'estimer les quantités et les sites d'exposition des populations et de l'environnement, d'avoir une idée de leurs usages réels et de leurs domaines d'applications, et d'obtenir des informations supplémentaires pour l'évaluation des risques sur la santé et l'environnement. En 2021, plus de 100 000 tonnes de substances de la catégorie "nanomatériaux carbonés" ont été déclarées. L'essentiel correspond probablement au noir de carbone qui est la substance la plus déclarée en France en termes de tonnages (> 10 000 t). Le tonnage des autres nanomatériaux carbonés n'est pas disponible dans le rapport d'étude (ANSES, 2022).

Plus récemment, à l'échelle de l'Europe, de nouvelles exigences réglementaires ont été établies afin de garantir que les entreprises fournissent suffisamment d'informations sur les nanomatériaux pour une utilisation sûre. Le règlement (UE) n°2018/1881 du 03/12/18 qui modifie les annexes I, III, VI, VII, VIII, IX, X, XI, et XII du règlement (CE) n° 1907/2006 du Parlement européen et du Conseil concernant l'enregistrement, l'évaluation et l'autorisation des substances chimiques, ainsi que les restrictions applicables à ces substances (REACH) demande depuis le 1^{er} janvier 2020 aux fabricants et importateurs de substances à l'état nanoparticulaire (si au minimum 1 tonne par an) sur le territoire de l'Union européenne de fournir des informations sur leur toxicité et écotoxicité (The European Commission, 2018).

Ces réglementations ont pour but de permettre aux entreprises et aux autorités d'obtenir davantage d'informations sur la toxicité potentielle des nanomatériaux, de contrôler leur utilisation, et à terme de permettre leur production et utilisation en toute sécurité. Afin

d'informer le grand public, la Commission européenne a mis en place en 2017 l'Observatoire de l'Union européenne pour les nanomatériaux (EUON) qui est un site internet accessible à tous fournissant des informations concernant les nanomatériaux existants sur le marché de l'UE (Pavlicek et al., 2021).

1.1.1.3. Description des nanotubes de carbone

Les nanotubes de carbone (NTC) sont des tubes, d'un diamètre de taille nanométrique pour une longueur de quelques micromètres, théoriquement composés exclusivement d'atomes de carbone. Un nanotube correspond à une feuille de graphène (**Figure 1** (A,B)) enroulée sans superposition, et un nanotube peut être composé de plusieurs tubes concentriques ce qui donne plusieurs types de NTC : les mono-paroi (SWCNT : Single-Walled Carbon Nanotube) (**Figure 1** (C,D)), les multi-parois (MWCNT : Multi-Walled Carbon Nanotube) (**Figure 1** (E,F)) dont le nombre de parois peut aller de 2 à une centaine. A l'interface se trouvent les double-parois (DWCNT : Double-Walled Carbon Nanotube) qui possèdent deux parois concentriques. Les DWCNT ont l'avantage d'avoir un diamètre similaire aux SWCNT tout en étant moins sensibles aux attaques extérieures (dégradations chimiques et physiques). Les NTC bruts sont hydrophobes mais il est possible de les fonctionnaliser, c'est-à-dire d'accrocher des groupements chimiques sur leur surface, pour modifier leurs propriétés physiques et chimiques (dispersibilité dans les liquides, conductivité électrique, propriétés optiques, etc.).

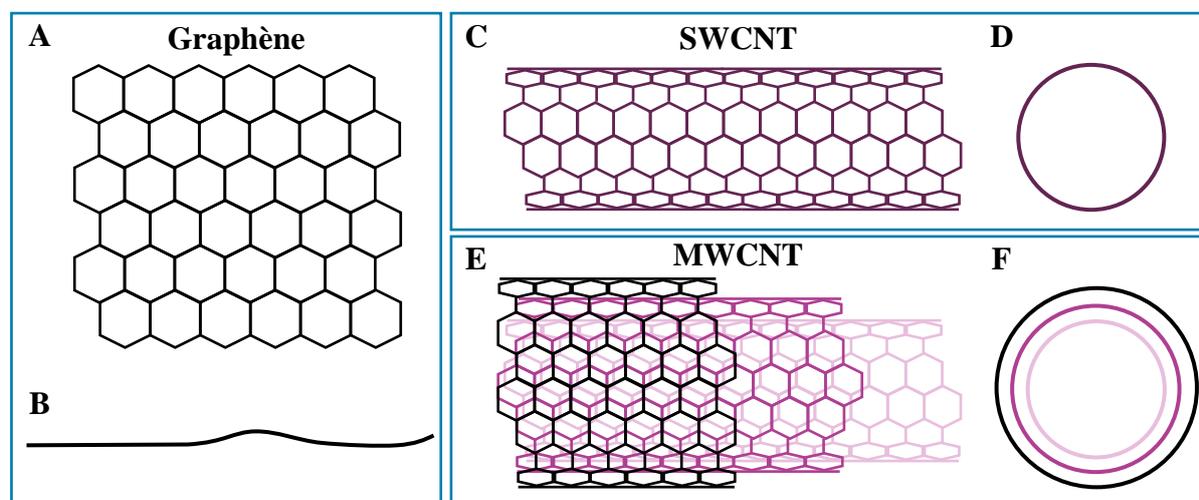


Figure 1 : Nanomatériaux carbonés

Feuille de graphène vue du dessus (A) et vu de profil (B) ; Nanotube de carbone mono-paroi vu de profil (C) et de face (D) ; Nanotube de carbone multi-paroi vu de profil (E) et de face (F).

1.1.1.4. Marché des nanotubes de carbone

Le marché des NTC représentait 800 millions de dollars en 2022, avec la prévision d'un taux de croissance annuel moyen de 19,5% entre 2023 et 2032 (Global Market Insights Inc., 2023). En effet, les NTC possèdent une gamme de propriétés intéressantes, en grande partie du fait de leur diamètre nanométrique qui leur procure une réactivité de surface élevée, d'excellentes propriétés mécaniques, une bonne conductivité électrique, une bonne conductivité thermique, mais ce qui

les rend réellement unique c'est la combinaison de toutes ces propriétés. Cela permet une utilisation dans plusieurs secteurs industriels tels que la chimie des matériaux (céramiques et métaux composites, polymères composites, revêtements de surface), la médecine et les sciences de la vie (diagnostic médical, applications médicales, cosmétique, capteurs chimiques, filtres pour traitement des eaux), l'électronique (stockage de données, capteurs électromécaniques, transistor), l'énergie (stockage d'hydrogène, stockage d'énergie, panneaux solaires, matériaux supraconducteurs, piles à combustibles) (Köhler et al., 2008).

1.1.1.5. Propriétés et applications industrielles

Toutes les extraordinaires propriétés des NTC proviennent de la liaison chimique carbone-carbone présente dans les NTC (Dresselhaus et al., 2004) ainsi que de la manière dont les atomes sont assemblés sous forme de tubes. Ces propriétés permettent d'incorporer les NTC dans des produits avec d'autres matériaux, on parle de matériaux composites, ce qui améliore le produit final à plusieurs niveaux : conductivité thermique et électrique, résistance mécanique, durabilité. Voici une liste non exhaustive de l'utilisation, actuelle ou future, des NTC qui montre qu'ils sont présents dans notre quotidien, et que l'on peut les côtoyer sans forcément nous en rendre compte.

L'avantage des NTC est qu'ils améliorent les matériaux existants en les rendant plus résistants à l'usure (matériau 100 fois plus résistants que l'acier) et plus légers (matériau 6 fois plus léger que l'acier) (Vithanage et al., 2017), ce qui conduit à leur incorporation dans des pièces automobiles, aéronautiques, astronautiques, *etc.* Les NTC peuvent être intégrés dans des matériaux cimentaires pour améliorer leurs résistance aux fissures (G. M. Kim et al., 2019), ce qui est aussi le cas en cimentoplastie (dépôt de ciment médical dans les défauts des os) où, en plus d'améliorer les propriétés mécaniques, les NTC apportent une bioactivité qui permet une meilleure fixation du ciment sur les cellules osseuses (Pahlevanzadeh et al., 2019). Autres exemples, des fibres composites avec des NTC peuvent être utilisées dans des résines appliquées sur des pâles d'éolienne et sur des coques de bateaux, ou sur des équipements sportifs où elles améliorent l'amortissement de l'énergie (Hiremath et al., 2017).

Selon leur structure, les NTC vont plus ou moins conduire les électrons et être conducteurs, jusqu'à 5 fois plus que le cuivre (Global Market Insights Inc., 2023), ou semiconducteurs. Ils peuvent entrer dans la composition de jonctions dans des nanocircuits, et dans des polymères pour améliorer le blindage contre les interférences électromagnétiques et ainsi permettre la protection de certains composants des nanocircuits (Dresselhaus et al., 2004; Hiremath et al., 2017; J. H. Kim et al., 2013). Une de leur grande utilisation est dans les batteries lithium-ion (de las Casas & Li, 2012), la combinaison de leurs propriétés électriques et de leur facteur de forme élevé (rapport longueur/diamètre) permet d'obtenir des batteries de plus longue durée, avec une capacité de charge et de décharge rapide (Köhler et al., 2008). Dans les années à venir, la production de batteries va sûrement exploser dû au développement des véhicules électriques, et à la nécessité de pouvoir stocker l'énergie qui est produite par des sources renouvelables.

Un autre enjeu de société est le remplacement des combustibles fossiles, et l'une des alternatives à l'électricité est l'utilisation de l'hydrogène, y compris pour les moyens de locomotion. Le

problème est que ce gaz est léger et difficile à stocker surtout pour un usage embarqué. Il se trouve que les NTC pourraient être de bons candidats pour palier à ces limitations, ils peuvent être recouverts de titane (Ti) ce qui améliore l'adsorption des atomes d'hydrogène (L. Yang et al., 2019), ou alors les NTC peuvent être déposés à la surface de particules, comme l'hydrure de magnésium (MgH₂), pour améliorer l'adsorption et la désorption des atomes d'hydrogène sur cette particule (Kajiwara et al., 2022; Lu et al., 2021).

1.1.1.6. Applications dans le domaine biomédical

L'utilisation des NTC pour plusieurs applications biomédicales sont à l'étude, ce qui représente un défi car les NTC utilisés ne doivent pas présenter de toxicité pour les patients. Pour ces applications les NTC ne sont pas utilisés seuls, ils sont incorporés dans des polymères.

Les NTC font partie des nanoparticules (NPs) candidates pour la création d'agents de contraste dans diverses techniques d'imagerie, permettant d'améliorer la détection des tumeurs (Gu et al., 2018) pour un diagnostic médical plus précis et plus précoce, et un suivi des cellules *in vivo* (Hernández-Rivera et al., 2017; Servant et al., 2016) pour comprendre l'interaction et la distribution des cellules dans le corps humain, un élément nécessaire en médecine régénérative. Au-delà de la détection, des recherches sont menées pour utiliser les NTC dans des traitements de thérapie cancéreuse, et pour aider à la synthèse de tissu en ingénierie tissulaire.

Grâce à leur absorption optique dans les spectres visible et proche infrarouge, les NTC pourraient servir en thérapie cancéreuse photothermique (Sobhani et al., 2017), et photoacoustique (Wen et al., 2016). Ils sont aussi de bon candidats pour la thérapie cancéreuse chimique car ils pourraient servir de transporteur grâce à leur forme tubulaire qui permet l'encapsulation de médicaments, puis la délivrance ciblée vers les cellules cancéreuses (Chadar et al., 2021; Zarghami Dehaghani et al., 2021).

La médecine régénérative a pour objectif de réparer des tissus qui ont été endommagés ou malades. L'utilisation de nanocomposites à matrices polymères incluant des NTC représente un vaste champ de recherches pour la réparation de tissus nerveux (Redondo-Gomez et al., 2020), ou cardiaques (Barrejon et al., 2021). Certains polymères sont prometteurs, comme le PCLF-CNT (polycaprolactone-fumarate-NTC) qui participe à la régénération nerveuse en améliorant la croissance et la différenciation cellulaire, et qui avec une stimulation électrique du polymère, rendue possible par l'ajout de NTC, promeut la migration et les connections intracellulaires (Zhou et al., 2018). L'idéal serait de créer des nanocomposites qui miment le microenvironnement des tissus. Des chercheurs ont créé un support composé de NTC alignés couplés à des fibroïnes (protéines de soie) pour guider la croissance de tissus cardiaques, engendrant la formation efficace de sarcomères et de jonctions gap (Zhao et al., 2020).

Les NTC sont aussi candidats pour lutter contre la prolifération des bactéries grâce à leurs propriétés antibactériennes (Giraud et al., 2021). Ainsi ils pourraient servir à la création de composites pour le revêtement de matériel médical (Nie et al., 2017), pour une application orthopédique avec à la fois une action bactéricide et un renforcement mécanique du polymère (Kumar et al., 2014), pour contrôler les infections lors de brûlures ou pendant la cicatrisation des plaies (Rahman et al., 2022), pour le revêtement d'implants leur procurant une meilleure activité antibactérienne et une résistance à la corrosion (Sivaraj & Vijayalakshmi, 2018).

L'ensemble de ces études montre qu'il y a un réel potentiel à utiliser les NTC dans le domaine de la santé. Cela ne veut pas dire que les NTC sont sans danger pour les cellules. Ces composites à matrice polymère sont développés pour limiter au maximum le risque de libération des NTC seuls dans l'organisme, afin de limiter le risque de toxicité.

1.1.1.7. Applications environnementales

Ces dernières années, il y a eu un développement des études pour l'utilisation des NTC dans des membranes de filtration pour assainir l'eau. Le nombre de publications concernant cette utilisation est passé de moins de 10.000 en 2010 à plus de 30.000 en 2020 (Khan et al., 2021). Ces membranes composites permettent de piéger les composés chimiques et organiques et de dépolluer les eaux. Elles piègent des micropolluants tels que des hormones, pesticides, produits pharmaceutiques, qui sont présents dans les eaux (eaux de surface, eaux souterraines, eaux usées, stations d'épuration) (Khan et al., 2021). En effet, la structure poreuse et la grande surface spécifique des NTC en font de bons candidats pour l'élimination de polluants organiques des milieux aqueux (Yu et al., 2014). Ils sont efficaces pour adsorber certains colorants (Rajabi et al., 2017), métaux lourds (Leroy et al., 2023; Xu et al., 2018), pesticides (Dehghani et al., 2019), produits pharmaceutiques (Avci et al., 2020), etc.

Un autre secteur qui a connu un développement de l'utilisation des nanotechnologies est le secteur agricole et une utilisation dans ce domaine pourrait engendrer un rejet de ces ENMs carbonés dans les sols.

Sans donner une liste exhaustive, les NTC peuvent être utilisés comme nano-engrais en stimulant la croissance de plants de tomates, moutarde et brocolis (Khodakovskaya et al., 2009; Martínez-Ballesta et al., 2016; Mondal et al., 2011), en stimulant la germination des graines de tomates, de maïs, de riz par exemple (Haghighi & da Silva, 2014; Khodakovskaya et al., 2009), ainsi qu'en stimulant l'élongation des racines pour le riz, le blé, et le maïs (Lahiani et al., 2015; A. Srivastava & Rao, 2014). De plus, l'ajout de NTC dans les engrais peut ralentir le relargage de ces derniers dans le milieu et ainsi limiter les pertes d'engrais et la pollution environnementale par la même occasion (M.-Y. Wu, 2013). Parfois les NTC peuvent affecter négativement des espèces qui sont nuisibles pour les plantes et ainsi protéger ces dernières. Par exemple, les NTC peuvent présenter une activité antifongique et provoquer une inhibition de la germination des spores chez le champignon *Fusarium graminearum* qui est un pathogène répandu des plantes (Wang et al., 2017). Toutefois, ces effets positifs ne sont pas valables pour toutes les plantes (Vithanage et al., 2017).

Une autre application qui a été envisagée pour la protection des plantes est l'utilisation des NTC comme transporteurs de médicaments ou de matériel génétique, ce qui est similaire à ce qui est envisagé pour le domaine biomédical. Des résultats ont montré que les SWCNT peuvent pénétrer à travers la paroi et la membrane cellulaire de cellules de tabac (*Nicotiana tabacum*) et qu'ils pourraient servir de transporteurs (Q. Liu et al., 2009), et que des MWCNT peuvent adsorber des polluants à l'intérieur des plants de moutarde et les transporter à d'autres endroits dans la plante (G. Chen et al., 2015). Cette utilisation des NTC comme transporteurs reste peu étudiée.

Les NTC ont une utilité dans des domaines d'applications très variés et en particulier, comme nous l'avons décrit, pour des secteurs avec un enjeux sociétal majeur : les énergies renouvelables, la santé publique, la préservation de la qualité de l'eau, et l'agriculture durable. Avec une utilisation croissante des NTC, les risques de rejets dans l'environnement augmentent au fil des années. Il est essentiel d'en savoir plus sur leur présence dans l'environnement et sur leurs potentiels effets toxiques sur les êtres-vivants.

1.1.2. Nanotubes de carbone : toxicité humaine et environnementale

1.1.2.1. Toxicité humaine

Évaluer la toxicité des NTC est un enjeu majeur, car l'exposition des êtres-vivants est possible tout au long du cycle de vie des NTC (Canu et al., 2016) : pour les travailleurs lors de la production, les consommateurs lors de l'utilisation du produit, les organismes vivants lors du relargage dans différents compartiments environnementaux. Il y a peu de connaissances concernant l'exposition réelle des êtres-humains lors de l'utilisation de produits de consommation contenant des NTC. Cependant nous savons qu'une exposition professionnelle est possible lors de la phase de production des produits, notamment par inhalation à cause de la petite taille des NTC, ce qui facilite leur inhalation. Cela a été noté par un groupe de travail en 2014, pour le Centre International de Recherches sur le Cancer (CIRC), visant à évaluer la cancérogénicité des NTC (Grosse et al., 2014). Il en ressort que les données obtenues sont variables selon le type de NTC, donc pour les classer en tant que cancérogène, ou non-cancérogène, il faut réaliser des tests pour chaque type de NTC et ne pas généraliser. A ce jour, seuls les MWCNT-7 sont classés comme agent cancérogène par le CIRC (Møller et al., 2021). Les autres types de NTC (SWCNT et MWCNT) ne sont pas classifiables pour l'instant, ce qui ne veut pas dire qu'ils sont sans danger.

La voie préférentielle d'exposition des travailleurs étant l'inhalation, la toxicité pulmonaire des NTC est étudiée depuis une vingtaine d'années. Des fibroses, des inflammations pulmonaires, ou des modifications morphologiques alvéolaires ont été observées sur des souris et rats exposés par inhalation, parfois accompagné de dommages à l'ADN et de stress oxydant (Gaté et al., 2019; Sager et al., 2022; Shvedova et al., 2008) (pour plus de détails concernant les concentrations et durées d'exposition voir **Tableau S90**, page 239). D'ailleurs le potentiel génotoxique des MWCNT-7 est avéré (résumé dans Møller et al., 2021).

Nous discuterons plus précisément de la cytotoxicité des NTC à la lumière des effets que nous observons sur *Physarum polycephalum* dans les chapitres suivants. Pour bien comprendre les enjeux de l'effet des NTC sur l'environnement, et le choix de *P. polycephalum* comme modèle dans notre travail, nous devons avoir une idée des rejets potentiels, et des effets sur les organismes présents dans les écosystèmes. Nous nous focalisons sur les écosystèmes du sol.

1.1.2.2. Prédiction des rejets dans l'environnement

La forme sous laquelle les NTC sont rejetés dans l'environnement, et leur quantité, est difficile à évaluer et est différente en fonction des compartiments (eau, sédiments, sols, etc.), et de la localisation géographique car la quantité produite et rejetée va varier en fonction des pays. Pas,

ou peu, de techniques fiables existent pour quantifier la présence réelle des NTC au sein de la matrice environnementale. De manière générale, le carbone du vivant empêche une quantification du carbone rejeté, les NTC d'origine naturelle et anthropique sont difficiles à distinguer, et les NTC sont représentés par une distribution de longueurs et de diamètres différents qui empêchent d'avoir une structure moléculaire unique et qui complexifie la quantification (Petersen et al., 2016). Or cette quantification faciliterait l'évaluation de l'exposition des organismes vivants aux NTC dans leur milieu.

La mesure directe étant très difficile, la prédiction par la modélisation est le meilleur moyen d'estimer les rejets. Selon les estimations, 1,4% de la production annuelle (en 2030) des matériaux à base de graphène (y compris les NTC) sera rejetée dans l'environnement, ce qui représentera 1,4 ng/L dans les eaux de surface et 20 µg/kg dans les boues d'épuration, en Europe (Hong et al., 2022).

Selon une étude menée au Danemark par Gottschalk et al. (2015), jusqu'à 90-95% de la fraction massique des NTC se retrouve dans les processus de recyclage, d'incinération des déchets et de mise en décharge. En comparaison, les quantités prédites rejetées dans les environnements terrestres et aquatiques sont faibles. Parmi ces NTC rejetés, 91,2% se retrouvent dans les sols, 3,5% dans l'eau de mer, 2,8% dans l'eau douce et 2,5% dans l'air (Gottschalk et al., 2015). Selon leur modèle les concentrations estimées dans les sols, accumulées entre les années 2000 et 2014, représentent 18 à 75 ng/kg dans les sols agricoles, 41 à 220 ng/kg dans les sols naturels, et 71 à 290 ng/kg dans les sols urbains.

D'autres modèles estiment des valeurs annuelles de rejets de NTC, qui varient mais restent à l'échelle du nanogramme par kilogramme de sol. Par exemple, Gottschalk et al. (2009) ont estimé le rejet annuel en 2008 à ~ 1,51 ng/kg/an en Europe, ~ 0,56 ng/kg/an aux États-Unis, et ~ 1,92 ng/kg/an en Suisse. Sun et al. (2014) ont estimé les rejets en 2012, en précisant que cela combine sols naturels et urbains, à ~ 5,1 ng/kg/an en Europe et ~ 22 ng/kg/an en Suisse.

D'après ces prédictions, les sols peuvent être des réceptacles majeurs des NTC dans l'environnement.

1.1.2.3. Effets sur les écosystèmes du sol

Les voies de rejets des NTC dans l'environnement sont difficiles à évaluer. Par exemple, dans le cas des matériaux composites comprenant des NTC, ils vont plutôt se dégrader et relarguer lentement les NTC. Ce type de rejets vient principalement des décharges, de l'incinération des déchets, et du traitement des eaux usées (Nowack et al., 2012). Une fois dans l'environnement, les NTC subissent des transformations (adsorption, oxydation, photochimie, biotransformation, etc.) qui vont modifier leurs propriétés physico-chimiques (Nowack et al., 2012).

Nous avons précédemment décrit les applications possibles des NTC dans le domaine de la santé grâce à leurs propriétés antibactériennes (Giraud et al., 2021), il s'avère qu'ils peuvent également affecter les microorganismes du sol qui jouent un rôle important dans les écosystèmes en

participant à la dégradation de la matière organique et en rendant les nutriments assimilables pour les plantes. Ces effets ont lieu sur l'abondance, le fonctionnement, et la diversité de communautés bactériennes et fongiques vivant naturellement dans les sols (**Tableau S88**, page 233).

Après 1 an d'exposition à 1000 µg/g de MWCNT, la quantité de bactéries dans le sol est réduite et la composition des communautés bactériennes est altérée (Ge et al., 2016). Il n'y a pas d'effet détecté sur la communauté fongique (Ge et al., 2016). Après 24h d'exposition à 10 ou 50 µg/g de SWCNT il y a une inhibition de la croissance bactérienne, et une suppression de la réduction des nitrates à la plus forte concentration (Zheng et al., 2014). À l'inverse, aucun effet sur la respiration du sol, les activités enzymatiques, et la composition des communautés bactériennes après 90 jours d'exposition à 10, 100 ou 1000 µg/g de MWCNT (Shrestha et al., 2013). Cependant, avec une concentration d'exposition extrêmement élevée, 10 000 µg/g de MWCNT il y a une modification de la composition des communautés avec la présence majoritaire de bactéries qui sont plus tolérantes (Shrestha et al., 2013).

Pour évaluer les effets toxiques des polluants sur les écosystèmes terrestres, les vers de terre sont souvent utilisés comme modèles. Concernant l'effet des NTC, ces macroorganismes du sol semblent moins impactés que les communautés bactériennes. Chez les vers de terre *Eisenia foetida* et *Lumbriculus variegatus*, il a été montré une absorption limitée, pas d'accumulation, et une élimination rapide des SWCNT, et MWCNT, après une exposition de 1 à 28 jours de 30 à 370 µg/g de sol ou sédiment (Petersen et al., 2008a, 2008b). En greffant un groupement polyéthylèneimine (PEI) aux MWCNT pour les rendre plus solubles, les mêmes auteurs n'ont pas observé plus d'absorption ou d'accumulation (Petersen et al., 2011). Chez le ver de terre *Eisenia veneta* et le nématode *Caenorhabditis elegans*, aucune mortalité n'a été observé après des expositions à 495 µg/g de DWCNT et 500 mg/L de MWCNT respectivement. En revanche, les deux subissent une altération de leur potentiel reproducteur (Eom et al., 2015; Scott-Fordsmand et al., 2008). Plus récemment, il a été montré qu'une exposition à 10, 50 et 100 µg/g de MWCNT n'engendre pas d'effet sur la croissance et la reproduction du ver de terre *E. foetida* (X. Yang et al., 2022).

Nous voyons bien avec tous ces exemples, non exhaustifs, des études concernant l'effet des NTC sur les organismes vivants, qu'il est compliqué de comparer les études entre elles à cause des différents paramètres : caractéristiques des NTC (longueur, nombre de parois, etc.), espèces modèles, paramètres mesurés, durée d'exposition, concentration d'exposition, etc. Dans cette thèse, nous avons développé des tests comportementaux pour évaluer les effets d'un seul type de NTC en utilisant un seul modèle : *Physarum polycephalum*, un unicellulaire eucaryote présent naturellement dans les écosystèmes forestiers.

1.2. *Physarum polycephalum*, un modèle hors du commun

1.2.1. Un être unicellulaire

1.2.1.1. Phylogénie

Physarum polycephalum possède des points communs avec plusieurs règnes : il se déplace pour se nourrir comme les animaux, se reproduit par des spores comme les champignons, et possède des pigments comme les plantes. Après avoir changé plusieurs fois de classification, il a été placé au sein du règne des Amibozoaires (Baldauf & Doolittle, 1997) qui regroupe des organismes unicellulaires, capables de créer de petites extensions (pseudopodes) pour se mouvoir.

Plus précisément, il appartient à la classe des Myxomycètes, un taxon monophylétique composé d'organismes eucaryotes unicellulaires, abondants dans les écosystèmes terrestres (Stephenson et al., 2008), et regroupant environ 1 000 espèces connues. La reconnaissance et la classification des différentes espèces de myxomycètes est réalisée grâce à l'aspect des organes de reproduction appelés sporanges (Cainelli et al., 2020) (**Figure 3 (E)**). Au sein des myxomycètes, *P. polycephalum* fait partie de l'ordre Physarales et de la famille Physaridae qui comprend les genres *Badhamia* et *Physarum* (nous utiliserons ces 2 genres dans une des expériences du chapitre 3).

1.2.1.2. Cycle de vie

Le stade trophique du cycle de vie des myxomycètes est la formation d'un plasmode (**Figure 2 (H)**, **Figure 3 (A,B)**), c'est-à-dire une masse cytoplasmique possédant plusieurs noyaux. Les noyaux du plasmode se divisent, mais le cytoplasme et la membrane cellulaire ne se divisent pas, cela forme un syncytium. Selon l'espèce de myxomycète il existe une grande variété de formes, de couleurs, et de tailles des plasmodes. *P. polycephalum* a une couleur plus ou moins jaune, une taille atteignant quelques centimètres (dans le milieu naturel) à plusieurs mètres carrés (en situation optimale contrôlée). Quand les conditions environnementales sont défavorables (manque de nourriture, faible humidité, etc.) le plasmode a la capacité d'entrer en dormance, il se dessèche et forme un sclérote (**Figure 2 (I)**, **Figure 3 (C)**). Cette transformation est réversible et lui permet de survivre dans cet état pendant plusieurs mois, jusqu'à ce que les conditions environnementales redeviennent favorables. Le cycle de vie de *P. polycephalum* peut être décrit en 2 grands stades : l'un macroscopique (sclérote \Leftrightarrow plasmode \rightarrow sporange) et l'autre microscopique (spores \rightarrow amibe \Leftrightarrow microcyste).

Quand les conditions sont favorables à la reproduction, *P. polycephalum* forme des éléments reproducteurs appelés corps fructifères ou sporanges (**Figure 2 (J)**, **Figure 3 (E)**). Un individu produit un ou plusieurs sporanges, mesurant généralement moins d'1 mm chacun, qui contiennent des spores d'une taille allant de 5 à 20 μm au sein desquelles se trouvent les cellules reproductrices (Everhart & Keller, 2008) (**Figure 2 (A,B)**). Ces dernières sont des amibes uninuclées de 2 types : flagellées ou non (**Figure 2 (C)**). Elles ont la capacité d'entrer en dormance par la formation de microcystes (**Figure 2 (D)**), l'équivalent des sclérotés mais pour les amibes. Deux amibes fusionnent ensemble si elles sont génétiquement différentes pour former un zygote

(Stephenson et al., 2008, 2011) (**Figure 2** (E,F)). Le zygote commence alors à initier des mitoses synchrones (division des noyaux) (**Figure 2** (G)) mais sans division de la membrane cellulaire pour former une masse multinucléée, le plasmode (Everhart & Keller, 2008).

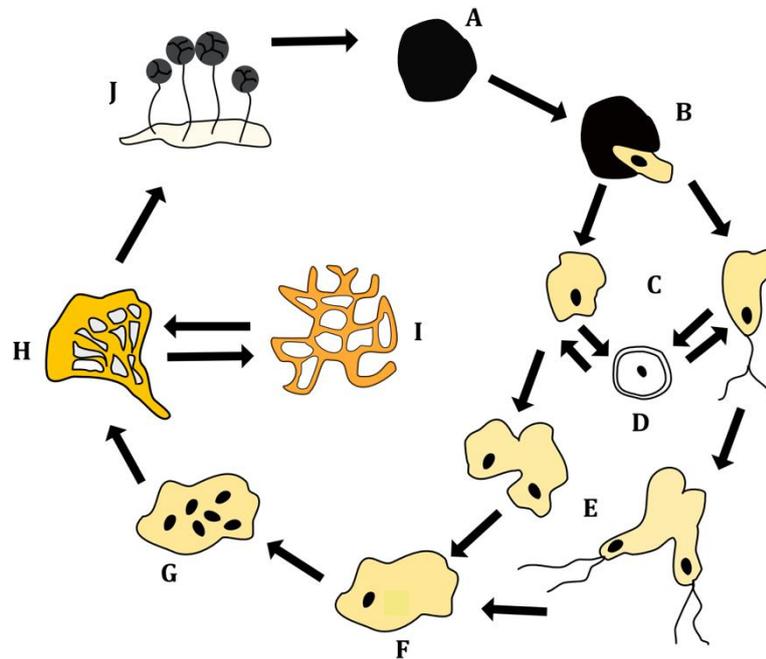


Figure 2 : Cycle de vie de *Physarum polycephalum*.

Spore (A) ; Germination d'une spore (B) ; Amibes flagellées ou non (C) ; Microcyste (D) ; Fusion des amibes (E) ; Zygote (F) ; Mitoses successives (G) ; Plasmode (H) ; Sclérote (I) ; Sporangies (J).

1.2.2. Composition et locomotion du plasmode

1.2.2.1. Composition du plasmode

P. polycephalum a beaucoup été étudié dans les années 70 et 80 en biologie cellulaire en raison de sa grande taille, à une époque où les techniques d'imagerie étaient moins développées. La plus petite unité du plasmode qui existe est le microplasmode, et il mesure déjà 50 μm , alors que les cellules eucaryotes mesurent en moyenne 25 μm (Oettmeier, 2019). Le plasmode est multinucléé, il possède des milliers de noyaux, répartis dans toute la cellule, qui se déplacent librement dans le cytoplasme avec une division synchrone toutes les 8 à 10h environ (Baldauf & Doolittle, 1997; Reid, 2023; Sachsenmaier & Hansen, 1973). Le fait qu'il soit multinucléé permet au plasmode, quand il est sectionné, de donner plusieurs plasmodes viables et autonomes, chacun possédant des noyaux et donc l'information génétique (Kobayashi et al., 2006). Un plasmode sectionné va donner plusieurs plasmodes, grâce à la cicatrisation rapide de sa membrane cellulaire (Bäuerle et al., 2017), et à l'inverse plusieurs plasmodes qui entrent en contact, peuvent fusionner leurs membranes et donner un seul plasmode, à condition qu'ils soient compatibles génétiquement (Rusch et al., 1966; Vogel & Dussutour, 2016).

A l'intérieur de la cellule, une partie du cytoplasme est rigidifié (ectoplasme) par des filaments d'actine et de myosine pour former la paroi de veines à l'intérieur desquelles circule le cytoplasme

liquide (endoplasme). Cela forme un véritable réseau veineux dynamique et permet de transporter l'oxygène, les nutriments, et les organites cellulaires à travers toute la cellule (Aldrich, 2012; Oettmeier et al., 2017) y compris quand elle atteint des tailles de plusieurs centimètres carrés. De plus, ce réseau lui permet de se déplacer.

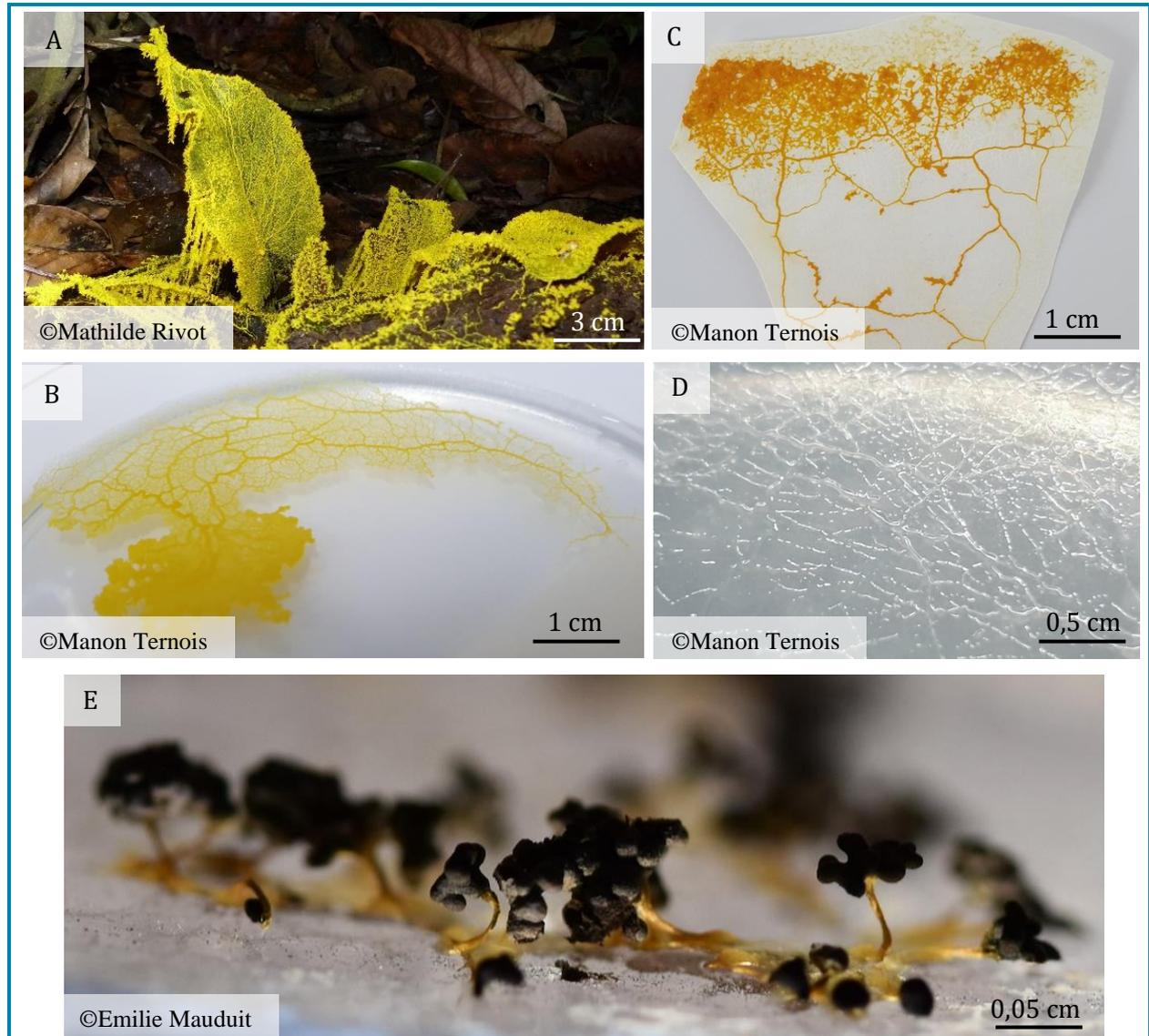


Figure 3 : Photos de *P. polycephalum* à différentes étapes de son cycle de vie.

*Plasmode de *P. polycephalum* dans son milieu naturel (A) ; sur gel agar (B) ; sclérote (C) ; traces de mucus déposés par un plasmode (D) ; Sporanges (E).*

1.2.2.2. Locomotion du plasmode

Lors de la locomotion du plasmode on peut distinguer une asymétrie antéro-postérieure. La zone avant, du côté où le plasmode avance, forme un front en éventail composé de pseudopodes. A l'arrière se trouve le réseau veineux où l'on distingue clairement les veines (Oettmeier et al., 2018) (**Figure 3 (B)**). A l'intérieur des veines, le flux de l'endoplasme est permanent et périodiquement réversible, il change de direction toutes les 1 à 3 min (Wohlfarth-Bottermann,

1977). Cette alternance est appelée « shuttle streaming » (effet navette), et est possible grâce aux filaments d'actine et de myosine qui produisent la force mécanique permettant la contraction, et la relaxation, dans les parois des veines (Kobayashi et al., 2006; Wohlfarth-Bottermann, 1979). L'activité contractile est régulée par des oscillations de composés chimiques intracellulaires, tel que le calcium (Ca^{2+}) en interaction avec les ion H^+ , l'AMPc et l'ATP (Boussard et al., 2021; Kuroda & Kuroda, 1982; Patino-Ramirez et al., 2019).

Lors d'un déplacement linéaire (en ligne droite), il y a donc une asymétrie antéro-postérieure des plasmodes. Ils peuvent atteindre une vitesse de déplacement de 4 cm/h (Vogel & Dussutour, 2016). Quand ils se réorientent, ils ralentissent, forment plusieurs pseudopodes, et ne conservent que ceux qui seront utiles au déplacement linéaire suivant (M. Ueda & Ogihara, 1994). La circulation de l'endoplasme permet aux plasmodes de traiter les stimuli environnementaux, d'adapter leur déplacement, et de réaliser des comportements.

Dans ce travail, nous avons réalisé des tests comportementaux sur *P. polycephalum* en les exposant aux NTC. Nous allons aborder une description des comportements étudiés plus largement chez cet organisme qui pourraient servir de première approche à l'évaluation de la toxicité de polluants, avant d'envisager une approche moléculaire.

1.2.3. Une cellule qui présente des comportements

1.2.3.1. Adaptation du plasmode à son environnement

Les myxomycètes vivent majoritairement sur les sols et leur distribution géographique serait mondiale. En effet, la diversité des espèces présentes augmente avec l'augmentation de la diversité et la biomasse des plantes vasculaires, car elles sont sources de débris pour les bactéries et autres microorganismes dont se nourrissent les myxomycètes (Stephenson et al., 2008). On les retrouve ainsi préférentiellement sur la litière des sols, notamment en forêt, ce qui leur permet d'accéder à des environnements tempérés, humides, avec une faible luminosité, et ainsi de se nourrir de champignons, levures, bactéries, et microparticules par phagocytose (Beekman & Latty, 2015; Reid, 2023). La présence des myxomycètes dans ces écosystèmes joue un rôle dans le maintien stable du biotope du sol.

P. polycephalum est un organisme très sensible à son environnement, capable de détecter un certain nombre de stimuli environnementaux, grâce à des récepteurs en surface (Reid, 2023), tel que la température, la luminosité, le pH, l'humidité, des composés chimiques, des forces mécaniques, etc. Par exemple il fuit la lumière de forte intensité (Marwan, 2001), préfère se diriger vers des températures autour de 29°C (Durham & Ridgway, 1976; Matsumoto et al., 1986; Tso & Mansour, 1975), est capable de détecter des changements de la gravité (Block et al., 1994). Il peut également détecter une distorsion du substrat. En plaçant des masses inertes chimiquement de chaque côté du plasmode, Murugan et al. (2021) ont montré qu'il se dirige du côté où il y a le plus de masses, et donc de distorsion du substrat, ce qui peut être interprété par le plasmode comme une zone où il y a plus de nourriture. En effet, l'une des motivations du plasmode pour se déplacer est la recherche de nourriture, son déplacement est caractérisé par

des phases exploratoires (recherche) et des phases d'exploitation (alimentation) (Halvorsrud & Wagner, 1998; Latty & Beekman, 2009, 2010).

Les plasmodes réagissent à des composés qui sont aversifs ou attractifs pour eux, et adaptent leur déplacement. Quand ils détectent un composé attractif, tel que le glucose, ils s'orientent vers ce composé et augmentent leur fréquence de contraction (Kincaid & Mansour, 1978; Knowles & Carlile, 1978; Matsumoto et al., 1986). A l'inverse, s'ils détectent un composé aversif, tel que le chlorure de sodium (NaCl), ils réduisent leur fréquence de contraction et s'éloignent du composé (Matsumoto et al., 1986; Natsume et al., 1993). Mais si les plasmodes n'ont d'autres choix que de se développer sur ces substrats comprenant des composés attractifs ou aversifs, alors ils ralentissent pour absorber des nutriments dans le cas d'un substrat attractif et pour produire du mucus qui sert de barrière de protection contre le substrat aversif (Patino-Ramirez et al., 2019). La détection de ces stimulus engendre des prises de décision de la part des plasmodes (se rapprocher du stimulus, ou s'en éloigner) (nous développerons la prise de décision de *P. polycephalum* dans le chapitre 4).

1.2.3.2. Comportement : Perception, mémoire et apprentissage

Le terme cognition a longtemps été réservé aux animaux possédant un système nerveux. Parmi les processus cognitifs décrits on retrouve la perception, la mémoire, l'apprentissage, la prise de décision et la communication. L'étude de ces aptitudes chez des êtres unicellulaires, et multicellulaires sans système nerveux est définie comme étant la cognition basale (Lyon et al., 2021). Parmi les organismes concernés on retrouve *P. polycephalum* qui, grâce à sa capacité de locomotion, présente des comportements allant d'une forme simple d'apprentissage, l'habituation (Boisseau et al., 2016), jusqu'à la prise de décisions complexes (Beekman & Latty, 2015). *P. polycephalum* ne peut pas compter sur des neurones pour le traitement de l'information, il la traite grâce à des processus mécano-chimiques liés au cytosquelette et à la circulation fluide du cytoplasme (Oettmeier, 2019).

En se déplaçant, *P. polycephalum* dépose en permanence un mucus (**Figure 3 (D)**) qui lui sert de mémoire externe, lui permettant de repérer les endroits qu'il a déjà exploré et lui évitant d'explorer deux fois le même endroit. Cela lui permet de résoudre le piège en U qui est habituellement utilisé en robotique pour évaluer le système de navigation autonome des robots. Dans ce test, le plasmode est placé sur un gel d'agar face à une source de nourriture (une goutte de glucose). Entre le plasmode et la nourriture, est placée une barrière en forme de U. Le plasmode se dirige tout d'abord vers la nourriture en raison de la diffusion des nutriments dans le gel agar puis il est contraint de s'éloigner pour contourner la barrière afin d'atteindre la source de nourriture. Les auteurs ont démontré que si le plasmode ne peut pas utiliser la présence de mucus pour naviguer, il est ralenti voire incapable de rejoindre la source de nourriture (Reid et al., 2012, 2013).

En plus de cette mémoire externe, le plasmode a aussi une mémoire interne, il est capable d'anticiper un événement qui se répète à des intervalles de temps réguliers. Saigusa & Nakagaki (2007) ont placé les plasmodes afin qu'ils se déplacent en ligne. Les conditions étaient d'abord

favorables (chaleur et humidité), puis après quelques heures de migration les conditions étaient modifiées pour devenir défavorables (fraicheur et sécheresse) pendant 10 min puis favorables à nouveau pendant un intervalle de temps choisi (entre 30 et 90 min). Les conditions défavorables étaient suffisantes pour provoquer un ralentissement des plasmodes. L'alternance conditions favorables / conditions défavorables était répétée 3 fois. A la 4^e fois, le plasmode ralentissait en l'absence des conditions défavorables, au moment où celles-ci auraient dû être enclenchées. *P. polycephalum* était capable d'anticiper l'événement périodique.

En outre, les plasmodes peuvent aussi apprendre à ignorer la présence d'une substance chimique présente dans le substrat (si elle est répulsive et non dangereuse), on parle d'habituation. L'habituation est la disparition progressive de la réponse à un stimulus qui est répétée dans le temps, cette disparition est réversible. L'habituation chez *P. polycephalum* a été testée par Boisseau et al. (2016). Les plasmodes mis en présence d'une substance aversive (quinine ou caféine) ont une vitesse de croissance plus faible. S'ils sont laissés en présence de la substance aversive pendant 5 jours (phase d'habituation), alors au bout du 6^e jour, les plasmodes présentent une vitesse de déplacement normale. Ils ont appris à ignorer cette substance. Mais s'ils restent 2 jours sans exposition, les plasmodes récupèrent et répondent à nouveau à la substance (réponse réversible).

1.2.3.3. Comportement : Optimisation du réseau

Une cellule de cette taille est coûteuse en énergie. Pour y faire face, *P. polycephalum* optimise la topologie de son réseau veineux. Ce dernier étant impliqué dans la circulation des nutriments, de l'oxygène, et de l'information, cela permet d'augmenter l'efficacité de leur diffusion au travers de la cellule.

Le réseau veineux de *P. polycephalum* évolue constamment dans le temps pour s'adapter aux situations environnementales. *P. polycephalum* réarrange notamment ce réseau en fonction de la position des sources de nourriture, en faisant en sorte que l'endoplasme parcoure la distance la plus petite possible entre les sources (Nakagaki et al., 2004), y compris s'il y a des barrières sur le chemin ou des stimuli aversifs (lumière) (Nakagaki et al., 2007). Quand le plasmode relie plusieurs sources de nourritures, les veines principales (avec le diamètre le plus grand) sont organisées pour relier chacune des sources de la manière la plus efficace possible et optimiser la circulation des nutriments (Halvorsrud & Wagner, 1998). Quand il s'étend sur un substrat homogène sans source de nourriture alors les veines principales sont arrangées de manières concentriques (Halvorsrud & Wagner, 1998).

En plaçant de la nourriture à l'entrée et à la sortie d'un labyrinthe, Nakagaki et al. (2000) ont montré que *P. polycephalum* parcourt le chemin le plus court dans le labyrinthe. Ainsi il peut explorer une surface plus grande tout en réduisant le temps de circulation des nutriments au sein de la cellule. Cette optimisation intéresse les chercheurs qui créent des modèles pour tenter de comprendre et générer par calcul le comportement de *P. polycephalum* (Elek et al., 2022; Jones, 2011), ou à comparer ce réseau à des infrastructures existantes telles que les réseaux de transports. Tero et al. (2010) ont montré que le réseau formé par *P. polycephalum*, si l'on place

des sources de nourriture pour simuler les stations, est proche du réseau de train entourant Tokyo en termes d'efficacité et de coût énergétique.

Un autre exemple que nous pouvons citer est la résolution du problème du voyageur de commerce (« traveling salesman problem »). C'est un problème d'optimisation en informatique qui consiste à déterminer le circuit le plus court entre plusieurs villes, sans jamais passer deux fois par la même ville. *P. polycephalum* inspire des calculs pour la résolution de ce problème même s'il est difficile de forcer un plasmode à passer par une source de nourriture une seule fois (Jones & Adamatzky, 2014; L. Zhu et al., 2013).

P. polycephalum est capable de prises de décisions plus complexes. La prise de décision est définie comme étant la capacité de combiner l'information provenant de sources multiples et d'agir en vue d'atteindre un objectif (Lyon et al., 2021). Cela est particulièrement étudié chez *P. polycephalum* dans le contexte de l'acquisition des nutriments (notion qui sera développée au chapitre 4), mais pas seulement, il est également capable de détecter des composés chimiques déposés par des congénères et d'adapter sa réponse en conséquence. S'il a le choix entre un substrat précédemment exploré : par un congénère nourri ou un substrat neutre non exploré ; par un congénère qui a été soumis à des stress (nutritionnel ou abiotique) ou un congénère non stressé ; par un congénère âgé ou par un congénère jeune ; alors il se dirige préférentiellement vers ceux explorés par un congénère nourri (Vogel et al., 2015), non stressé (Briard et al., 2020), et jeune (Rolland et al., 2023).

Étant donné la simplicité d'organisation (unicellulaire eucaryote) et la richesse comportementale de *P. polycephalum*, il peut servir de modèle pour beaucoup d'études allant du cellulaire (mitose, méiose, organisation des organites cellulaires), à la reproduction (sexuée et asexuée), la mécanique des fluides (flux du cytoplasme, agencement du réseau veineux), jusqu'au comportement et la cognition basale (transmission de l'information, réponse au stress, réponse aux stimuli environnementaux, prise de décision, mécanismes à la base des processus cognitifs). Ceci nous procure un large choix de tests potentiels pour évaluer la cytotoxicité d'ENMs.

1.2.4. Un modèle pour évaluer la toxicité des nanoparticules

L'utilisation de *P. polycephalum* en tant que modèle en nanotoxicologie est encore peu développée mais a déjà permis d'évaluer la toxicité de quelques nanoparticules (**Tableau S89**). A notre connaissance seulement deux études concernent l'évaluation de la toxicité des NTC, une qui fait l'objet du chapitre 2 de cette thèse, et une autre dont l'objectif des auteurs est d'évaluer l'impact de nanomatériaux (dont les SWCNT) sur *P. polycephalum* dans l'optique de pouvoir hybrider les plasmodes avec des NPs (Gizzie, Mayne, & Adamatzky, 2016; Gizzie, Mayne, Yitzchaik, et al., 2016). Ces études ont pour objectif de créer des dispositifs hybrides informatique-biologique, permettant, par l'internalisation de NPs, de contrôler les mouvements et d'exploiter les propriétés électriques de *P. polycephalum* (Dimonte et al., 2015; Mayne & Adamatzky, 2015).

Afin de valider l'hybridation, les auteurs évaluent les effets des NPs sur les propriétés électriques et la croissance de *P. polycephalum*. Ils révèlent que les SWCNT, et les NPs d'or, engendrent une

baisse du taux de croissance des plasmodes, ainsi qu'une augmentation de la période de contraction, et une diminution de la résistance électrique (Gizzie, Mayne, & Adamatzky, 2016; Gizzie, Mayne, Yitzchaik, et al., 2016). Au niveau morphologique, ils n'ont noté aucune différence après exposition aux SWCNT, mais ils ont observé une différence (visuellement, non quantifié) après exposition aux NPs d'or (Gizzie, Mayne, & Adamatzky, 2016; Gizzie, Mayne, Yitzchaik, et al., 2016). Mayne et al. (2011), ont également rapporté une altération de la morphologie des plasmodes après une exposition aux NPs de magnétite, accompagnée d'une altération de leur comportement, leur chimiotaxie était altérée. Aucune de ces NPs n'a engendré de mortalité chez les plasmodes observés.

D'autres études ont utilisé *P. polycephalum* pour évaluer l'activité biocide des NPs d'argent, ou pour évaluer la toxicité de NPs de dioxyde de titane (nTiO₂) et trouver des biomarqueurs permettant de repérer, ou de trouver des méthodes de lutte contre, l'exposition au nTiO₂. A une exposition de 10 µg-ion/L, les NP d'argent induisent une désintégration de la membrane cellulaire et une mort des microplasmodes (Matveeva et al., 2006). Sur les macroplasmodes il n'y a pas de mortalité observée mais une réduction de leur biomasse. Il a également été montré que les NP d'argent sont aversives pour les plasmodes (Matveeva et al., 2006).

Le nTiO₂ induit des perturbations métaboliques chez les plasmodes, notamment en engendrant une déplétion de certains intermédiaires du cycle de Krebs (essentiel à la production d'énergie pour la cellule) ; en perturbant les niveaux de métabolites impliqués dans la glycolyse ; en augmentant la production de quelques acides aminés dont la formononétine (flavonoïde antioxydant) ; en augmentant la production de composés phénoliques qui permettraient de protéger la cellule d'une production excessive d'espèces réactives de l'oxygène (ROS) ; en augmentant la production de glutathion (GSH), un autre piègeur de ROS ; et en augmentant le niveau de tréhalose, qui agit comme un protecteur de membrane (Zhi Zhang et al., 2018). Les mêmes auteurs ont par la suite réalisé des analyses supplémentaires en démontrant encore une fois des réarrangements métaboliques, ces derniers étant corrélés à la diminution de croissance des plasmodes (Zhi Zhang et al., 2021). Le plasmode de *P. polycephalum* a la capacité de moduler la production de certains composés (acides aminés, tréhalose, etc.) qui lui permettent de répondre au stress et de limiter les effets négatifs des NPs sur la cellule.

Ces études montrent un effet commun des NPs (SWCNT, Or, Argent, magnétite, nTiO₂) qui engendrent une diminution de la croissance de *P. polycephalum*.

1.3. Objectifs de la thèse

L'objectif de cette thèse, est d'évaluer les effets des DWCNT (en tant que représentants de l'ensemble des différents types de NTC) sur le comportement de *Physarum polycephalum*, un eucaryote unicellulaire. D'une part, grâce à sa simplicité d'organisation (unicellulaire eucaryote), *P. polycephalum* nous permet d'aborder les effets potentiels des DWCNT sur les cellules de manière générale, et d'autre part, vivant dans la litière du sol, il nous permet également d'évaluer les effets potentiels des DWCNT sur les micro-organismes qui peuplent les écosystèmes du sol. Nous introduisons dans cette thèse *P. polycephalum* comme modèle cellulaire en nanotoxicologie, en tant que modèle à l'interface de la toxicologie cellulaire et de la toxicologie environnementale.

Le premier objectif de la thèse fait l'objet du chapitre 2 : évaluer le devenir des DWCNT dans la cellule de *P. polycephalum*. Nous avons évalué la présence des DWCNT au sein de la cellule de *P. polycephalum* grâce à l'observation de leur internalisation, leur bioaccumulation, leur persistance (après une phase de dormance) et leur excrétion. En nous assurant que les NTC pouvaient être internalisés dans la cellule, nous avons pu par la suite évaluer les effets des NTC sur le comportement de *P. polycephalum*.

L'objectif du chapitre 3 est d'évaluer les effets des DWCNT sur la vitesse de déplacement des plasmodes. Nous avons fait varier les paramètres suivants : la souche du plasmode, le substrat, la durée d'exposition, et la concentration en DWCNT. Si le déplacement est affecté, cela suggère que la mobilité de la cellule et les mécanismes sous-jacents sont affectés par l'internalisation des DWCNT.

Le chapitre 4 se focalise sur les effets des DWCNT sur le comportement de prise de décision chez *P. polycephalum*. Afin de révéler l'effet potentiel des DWCNT, nous avons combiné diverses sources de stress (âge, température, stress chimique). En effet, dans l'environnement, ces différents facteurs de stress, qu'ils soient d'origine abiotique (DWCNT, température) ou biotique (vieillessement), sont susceptibles d'interagir de manière complexe.

Le dernier objectif de la thèse fait l'objet du chapitre 5 : chercher des explications moléculaires et mécaniques aux effets des DWCNT sur les plasmodes. Dans un premier temps, nous avons mesuré la période de contraction des veines des plasmodes grâce à un algorithme développé par Philipp Rosina (Doctorant à l'Institut für Biologie de Graz) permettant une mesure automatisée du diamètre des veines au cours du temps. Dans un deuxième temps, nous avons mesuré la présence d'espèces réactives de l'oxygène (ROS) en marquant les plasmodes avec la sonde MitoSOX™.

1.4. Méthodes générales

1.4.1. Synthèse des Nanotubes de carbone à double-paroi (DWCNT)

1.4.1.1. Préparation de la solution de CMC

La CMC (carboxyméthylcellulose) est un dérivé de la cellulose, soluble dans l'eau, avec une bonne stabilité chimique, elle est hydrophile, biocompatible, biodégradable, et non toxique pour les organismes vivants (Butun et al., 2011). Elle est utilisée depuis 2013 dans l'équipe Nanocomposites et Nanomatériaux Carbonés (NNCED) du CIRIMAT pour stabiliser (limiter la formation d'agglomérats et réduire la sédimentation) des suspensions de NTC bruts dans l'eau, en particulier pour les études environnementales (Bourdiol et al., 2013). Ainsi, elle a été choisie comme solution contrôle. Tout d'abord, 50 mg de poudre de CMC sont pesés et placés dans un bécher avec au maximum 20 mL d'eau du robinet, le chauffage au four micro-ondes permet de faciliter la dissolution de la CMC dans l'eau. Puis la solution est transférée et ajustée à 1 litre pour obtenir une solution à 50 mg/L de CMC.

1.4.1.2. Synthèse des DWCNT

Les DWCNT ont été synthétisés par la technique CCVD (dépôt chimique catalytique en phase vapeur). La magnésie (MgO) a été utilisée comme support inerte pour les métaux catalyseurs, le cobalt (Co) et le molybdène (Mo) (Flahaut et al., 2003). La CCVD est une méthode largement utilisée grâce à sa capacité à produire des NTC avec un rendement élevé et des conditions de réaction facilement contrôlables pour ajuster le type de nanotubes de carbone souhaité (Laurent et al., 1998). Tout d'abord, la poudre catalytique est placée dans un récipient en céramique et déposé dans un four tubulaire. La synthèse est réalisée avec un flux de mélange de dihydrogène (H₂) et de méthane (CH₄). Le méthane sert de source de carbone et permet, par réaction chimique, le dépôt successif d'atomes de carbone sur les particules de cobalt et de molybdène permettant la formation de nanotubes. La poudre composite obtenue est noire et contient à la fois les DWCNT et le support catalytique, qui est par la suite éliminé pour isoler les nanotubes.

1.4.1.3. Extraction des DWCNT

L'extraction a pour but de dissoudre les catalyseurs (Co et Mo) et le support catalytique (MgO) encore présents dans l'échantillon synthétisé par CCVD. Pour commencer, de l'acide chlorhydrique à 37% a été ajouté à la poudre composite (3,5 ml d'eau déionisée et 15 ml de HCl à 37% pour 1g de poudre) et le mélange a été laissé à reposer toute la nuit. Ensuite, une filtration sous vide a été effectuée à l'aide d'une membrane en nitrocellulose (pores de 0,45 µm). Des filtrations successives ont été effectuées pour éliminer l'excès de HCl et la solution de sels de Mg, Co et Mo. Enfin, un dernier lavage a été effectué avec de l'eau du robinet. La poudre humide de DWCNT bruts (équivalente à 50 mg sous forme sèche) a été mise en suspension dans une bouteille de 1L avec une solution de CMC (50 mg/L) afin d'obtenir une solution de DWCNT à 50 mg/L. La suspension a été homogénéisée à l'aide d'une sonde à ultrasons, refroidie dans un bain de glace (programmation de 3 sec ON et 3 sec OFF en alternance et une amplitude de 30%, pendant 30 min) (Vibra Cell 75042, 20 kHz, 500 W, diamètre sonde de 125 mm).

Les suspensions de DWCNT bruts utilisées sont les mêmes tout au long de ce manuscrit. Les suspensions sont composées à 80% de DWCNT, le reste des NTC présents est composé à 5% de TWCNT (triple-paroi) et à 15% de SWCNT (mono-paroi) (Flahaut et al., 2003). La composition massique en carbone est d'environ 90% pour 2-3% d'oxygène. D'autres caractéristiques physico-chimiques sont présentées en annexe du chapitre 2 (**Figure S1**).

1.4.1.4. Oxydation des DWCNT

Pour l'oxydation, l'échantillon humide de DWCNT est placé dans un ballon auquel on ajoute de l'acide nitrique 3M. Ensuite, le ballon est placé dans un système à reflux, avec un agitateur magnétique, pendant 24 heures à 130°C. Après refroidissement à température ambiante, le lavage des DWCNT oxydés est effectué à l'aide d'un système de filtration sous vide équipé d'une membrane en polypropylène (pores de 0,45 µm). Des filtrations successives sont effectuées pour éliminer l'excès d'acide nitrique, et enfin, un dernier lavage est effectué avec de l'eau du robinet. L'échantillon humide résultant a été mis en suspension dans une bouteille de 1L avec de l'eau du robinet pour obtenir une suspension de 50 mg/L de DWCNT et a été homogénéisé avec une sonde

à ultrasons, refroidi dans un bain de glace (programmation de 3 sec ON et 3 sec OFF en alternance et une amplitude de 30%, pendant 30 min). L'analyse des DWCNT oxydés, en comparaison avec les DWCNT bruts, met en avant une augmentation de la teneur en oxygène dont une partie est présent sous forme d'acides carboxyliques (-COOH). Au pH de l'eau du robinet, ces fonctions sont présentes sous formes de carboxylates (charge négative) et conduisent à une répulsion électrostatique qui repousse les particules et permet donc d'améliorer leur stabilité dans l'eau, l'ajout de CMC n'est donc pas nécessaire. La présence de cations métalliques dans l'eau conduit à une légère déstabilisation des suspensions dans le temps.

Les suspensions de DWCNT oxydés sont utilisées pour une expérience à la fin du chapitre 2, la composition massique en carbone est de 84% pour 16% d'oxygène. Plus d'informations sur leur caractérisation sont présentés en annexe du chapitre 2 (**Figure S2**).

1.4.1.5. Synthèse de l'oxyde de graphène

L'oxyde de graphène (GO) est un autre nanomatériau carboné. Nous l'avons utilisé pour quelques expériences présentées aux chapitres 5 et 6. Le GO a été fourni par le groupe Antolin et a été préparé par oxydation de nanofibres de carbone Grupo Antolin (GANF®) (Grupo Antolín, Burgos, Espagne) selon la méthode de Hummer (Hummers Jr & Offeman, 1958). La composition massique en carbone est de 62,5% pour 37,5% d'oxygène. La composition en % atomiques obtenue par spectrométrie XPS et plus d'informations sur leur caractérisation sont présentées en annexe du chapitre 2 (**Figure S3**). Le GO a été mis en suspension dans de l'eau désionisée afin d'obtenir une concentration de 50 mg/L.

1.4.2. Élevage de *Physarum polycephalum*

Plusieurs souches (génotypes) de *P. polycephalum* ont été utilisées pour les expériences, principalement la souche AUS (Southern Biological, Victoria, Australie) et la souche LU352 (fourni par le Professeur Dr Wolfgang Marwan du Max Planck Institute for Dynamics of Complex Technical Systems, Madgeburg, Allemagne). Toutes les expériences sont réalisées avec des *P. polycephalum* au stade macroplasmode. A ce stade la cellule double, ou triple, de taille tous les jours quand elle est élevée à 25°C (souche AUS), ou 21°C (souche LU). Nous réalisons donc un élevage, et une exposition, quotidien(ne). Lors des week-ends nous baissons la température d'élevage à 14°C ce qui permet de ralentir la croissance des plasmodes et de ne pas avoir à les manipuler.

1.4.2.1. Élevage de *Physarum polycephalum* : sans exposition aux DWCNT

Les plasmodes sont élevés dans des boîtes de Petri aérées (Ø145mm ou Ø95mm ou Ø55mm), dont les couvercles possèdent des ergots, contenant du gel agar à 1%. Les plasmodes sont nourris avec des flocons d'avoine (Quaker Oats Company®). Pour cela nous suivons 5 étapes (**Figure 4**) :

- 1/ La partie du plasmode qui a grandi sur les flocons déposés la veille est découpée et déposée dans une nouvelle boîte de Petri.

- 2/ Les flocons d'avoine sont déposés à côté de la partie jeune du plasmode, remplissant ainsi l'autre côté de la boîte de Petri.

3/ Les flocons d'avoine sont légèrement humidifiés avec de l'eau du robinet.

4/ Les plasmodes sont déposés, et croissent, dans une étuve thermorégulée pendant 24h. Dans l'étuve les plasmodes sont à l'obscurité, avec un taux d'humidité avoisinant les 70%, et une température de 25°C pour une croissance optimale.

5/ Après 24h, la partie nouvellement colonisée (désignée comme partie jeune) est transférée dans une nouvelle boîte de Petri. La partie déposée la veille (désignée comme partie vieille) est jetée.

1.4.2.2. Élevage de *Physarum polycephalum* : avec exposition aux DWCNT

Pour quelques expériences du chapitre 2 l'exposition est aiguë : les plasmodes sont exposés juste avant le début des expériences. Pour le reste des expériences nous avons réalisé une exposition chronique. La concentration d'exposition que nous avons choisie n'est pas représentative de l'exposition que les plasmodes pourraient subir en milieu naturel (de l'ordre de quelques ng/kg). Nous avons volontairement choisi une concentration plus élevée pour la majorité des expériences s'élevant à 100 µg de DWCNT par g de nourriture, qui est un ordre de grandeur retrouvé dans plusieurs études sur les organismes du sol dont voici quelques exemples.

Les concentrations d'exposition vont de 10 à 5000 µg de NTC/g de sol pour des études sur les communautés bactériennes (Chung et al., 2011; Ge et al., 2016; Jin et al., 2013, 2014; Rodrigues et al., 2013; Shrestha et al., 2013) ; elles sont de 0, 500, 1000, ou 5000 µg de MWCNT/g de sol pour une étude des effets sur les plantes (De La Torre-Roche et al., 2013) ; et elles vont de 37 à 495 µg de NTC/g de nourriture pour des études sur le ver de terre *Eisenia veneta* (Scott-Fordsmand et al., 2008; X. Yang et al., 2022).

L'élevage est similaire à celui sans exposition (**Figure 4**) :

1/ La partie jeune est découpée et déposée dans une nouvelle boîte de Petri.

2/ Une quantité précise de flocons d'avoine est déposée à côté de la partie jeune du plasmode.

3/ Un volume précis de traitement (CMC ou DWCNT) est déposé sur les flocons d'avoine pour atteindre la concentration d'exposition souhaitée.

4/ Les plasmodes CMC et DWCNT croissent dans la même étuve thermorégulée.

5/ Après 24h, la partie jeune est transférée dans une nouvelle boîte de Petri. La partie vieille est jetée.

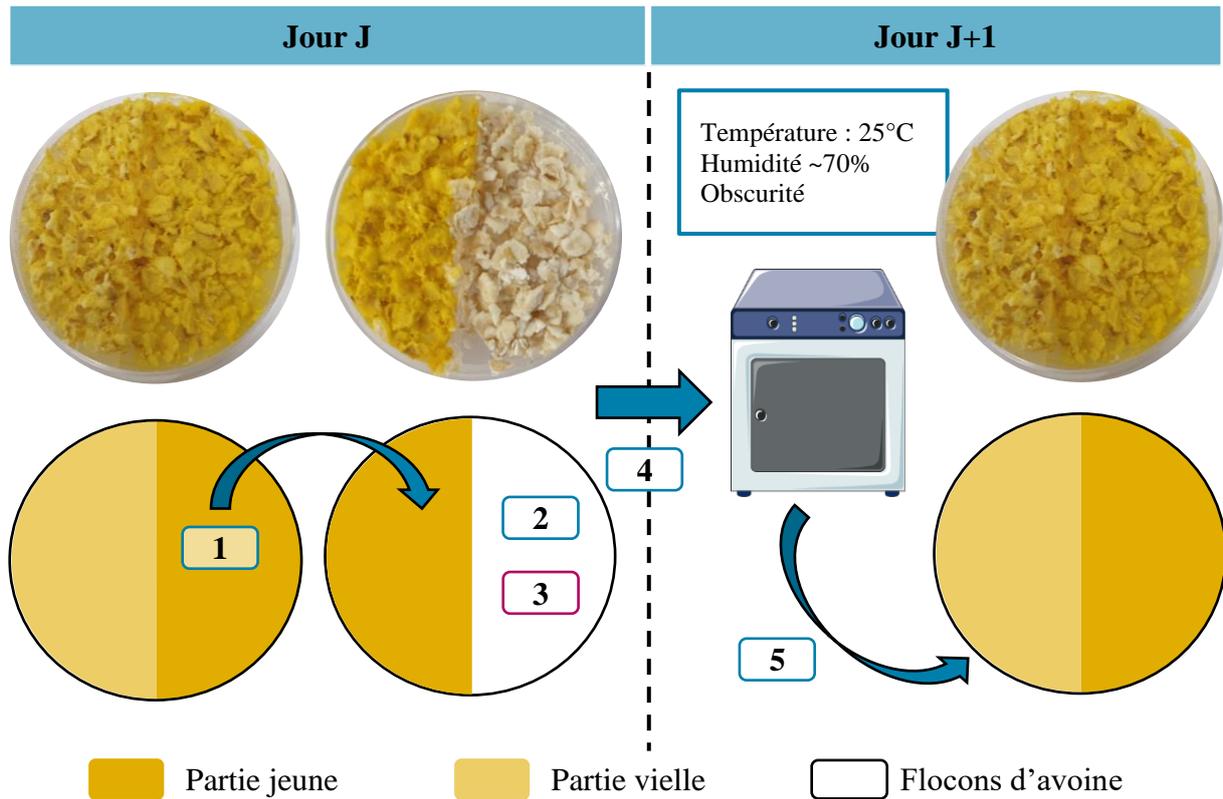


Figure 4 : Elevage de *Physarum polycephalum* suivant 5 étapes.

Transfert de la partie jeune du plasmode dans une nouvelle boîte de Petri (1) ; Dépôt des flocons d'avoine (2) ; Dépôt du traitement (eau, CMC, DWCNT) (2) ; Croissance du plasmode pendant 24h dans une étuve thermorégulée (4) ; Plasmodes sortis de l'étuve pour expérience ou élevage (5).

1.4.2.3. Solution contrôle

Pour une bonne dispersion et stabilisation dans le temps de la suspension de DWCNT, nous utilisons la CMC comme agent dispersant. Afin de pouvoir l'utiliser comme solution contrôle, nous avons vérifié si la CMC seule provoque un effet sur la vitesse de déplacement des plasmodes, qui est le paramètre principal que nous mesurons pour évaluer l'effet des DWCNT sur les plasmodes (voir chapitre 3). Nous avons mesuré la vitesse de déplacement des plasmodes après un jour d'exposition soit à de la CMC, soit à de l'eau du robinet. En temps normal, la nourriture des plasmodes est humidifiée avec de l'eau du robinet, ces derniers étant très sensibles à tout changement de leur environnement, nous avons réalisé une seconde fois l'expérience après 3 jours d'exposition pour être sûr que ce n'est pas le changement de traitement qui induise un effet.

Il y a un effet significatif de l'interaction du traitement avec la durée d'exposition ($p = 0,035$, **Tableau S1**). Les plasmodes CMC sont plus rapides que les plasmodes Eau après un jour d'exposition ($p = 0,035$, **Tableau S2**, **Figure 5**), et les deux groupes ont la même vitesse après 3 jours d'exposition ($p = 0,498$, **Tableau S2**, **Figure 5**). Pour tester la toxicité des DWCNT, nous devons être sûr que l'effet visible est dû aux DWCNT et pas à la CMC, donc la CMC est utilisée comme solution contrôle.

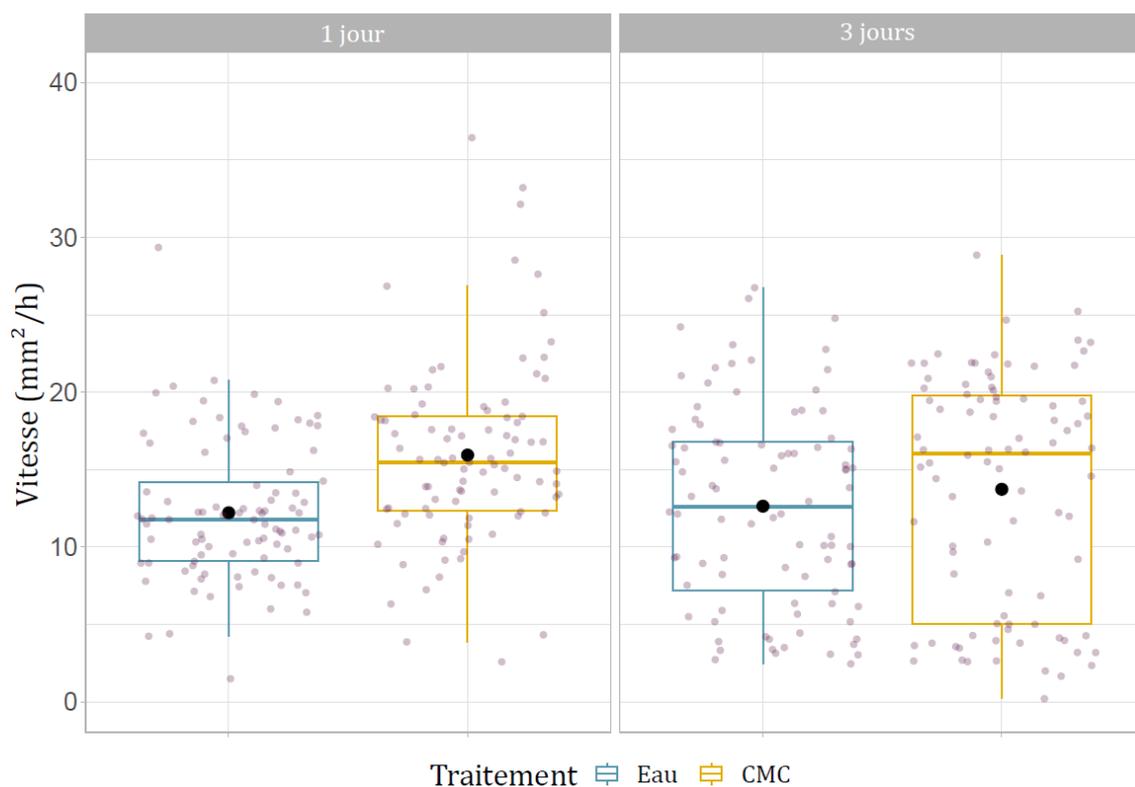


Figure 5 : Vitesse de déplacement des plasmodes selon le traitement (eau du robinet ou CMC) après 1 ou 2 jours d'exposition.

90 plasmodes par traitement et par jour d'exposition ont été testés. Les boîtes s'étendent du quartile inférieur au quartile supérieur et les lignes verticales s'étendent jusqu'au point de données le plus extrême. Les lignes horizontales indiquent les valeurs médianes et les points noirs représentent la moyenne. Un point violet représente une donnée.

1.4.3. Déroulement des expériences

A partir d'un même plasmode d'élevage, nous prélevons plusieurs pastilles de plasmodes, découpées à l'aide d'un emporte-pièce, qui sont ensuite utilisées pour les expériences. Il aurait été difficile et chronophage d'élever autant de plasmodes que de répliques d'expériences. De plus, il a déjà été montré que des clones de *P. polycephalum* ont des comportements différents (Vogel et al., 2018). Nous le prenons en compte en ajoutant l'identité des plasmodes comme effet aléatoire dans nos modèles statistiques.

Dans ces travaux nous avons utilisé 3 principaux types de montages pour réaliser les expériences (**Figure 6**) :

- Les arènes : les plasmodes sont déposés au centre d'une boîte de Petri (Ø 55 mm) et des photos sont prises régulièrement (toutes les 5 minutes en général) pour suivre le déplacement des plasmodes.
- Les ponts : les plasmodes sont placés au contact d'une des extrémités du pont. En général, une photo est prise au bout de 7 ou 16h de migration pour mesurer la distance parcourue ou l'aire recouverte.

- Les double-ponts : les plasmodes sont déposés en contact avec 2 ponts de chaque côté dont la composition est différente. Cela permet de voir le choix fait par le plasmode avec la mesure de la distance ou l'aire parcourue sur chacun des ponts après 7 ou 16h de migration.

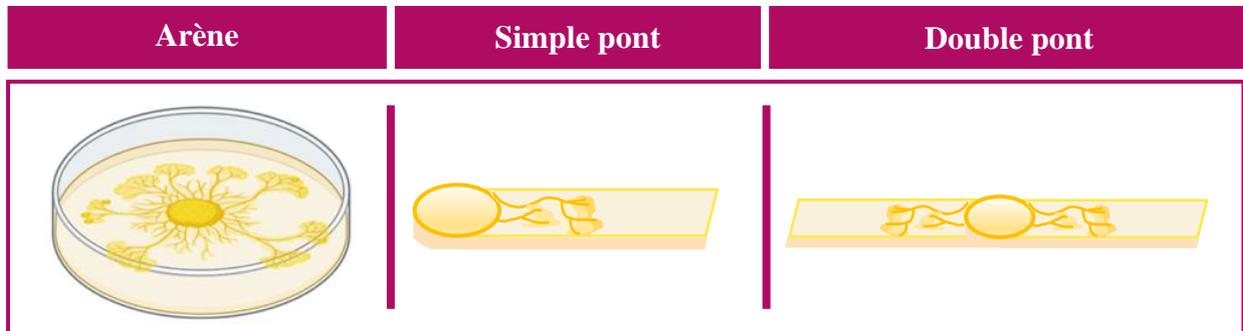


Figure 6 : Représentation schématique des 3 types d'expériences réalisées pour évaluer la vitesse de déplacement et la prise de décision des plasmodes.

1.4.4. Analyse des résultats

Il existe une variabilité naturelle dans la vitesse de déplacement des plasmodes selon les jours, indépendamment du traitement qui leur a été imposé. Par exemple nous avons mesuré la vitesse de déplacement de plasmodes exposés à de la CMC à différentes dates. Les plasmodes ont une vitesse de déplacement qui est différente selon la date où on la mesure (04/11/2021 ; 10/11/2021 ; 09/12/2021 ; 15/12/2021) (**Tableau S3, Figure 7**). D'où l'importance d'observer les plasmodes exposés aux DWCNT et à la CMC en même temps, dans les mêmes conditions (même étuve, même temporalité, etc.).

Afin de normaliser la variabilité naturelle de vitesse de déplacement en fonction du jour, et de visualiser uniquement l'effet du traitement (DWCNT par rapport à CMC), nous calculons un indice de performance (IP) :

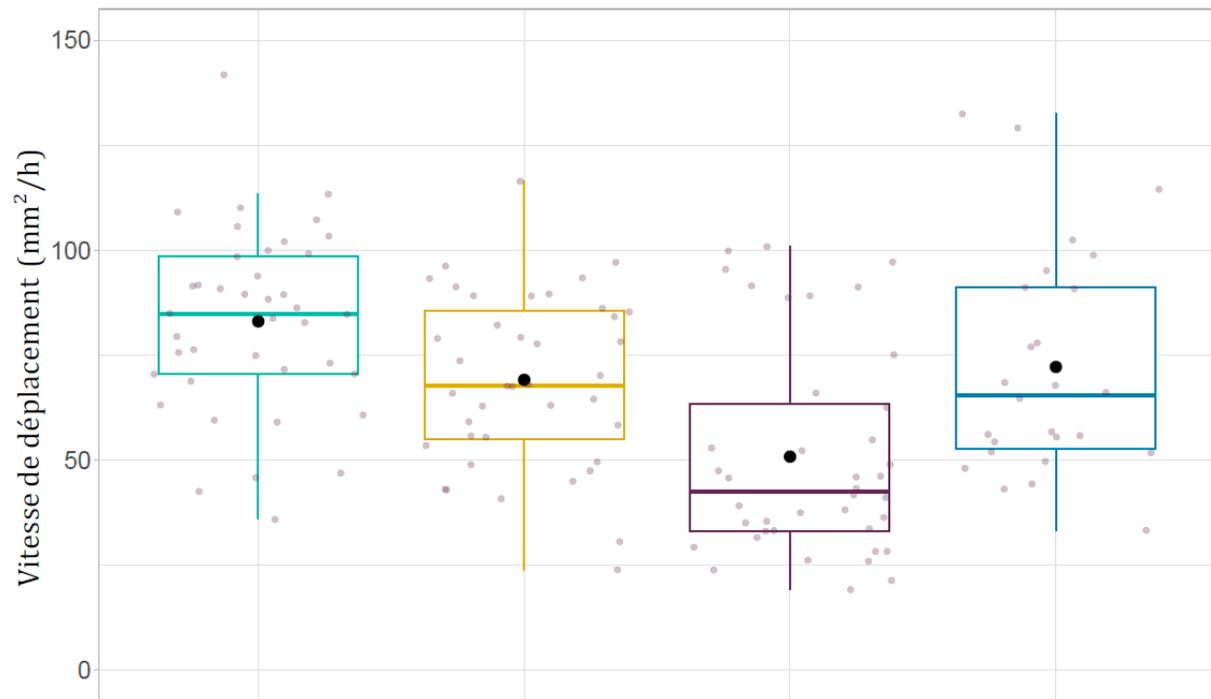
$$IP = \frac{V_{ID} - \mu_{CMC}}{\sigma_{CMC}}$$

V_{ID} : Valeur du paramètre par réplica de DWCNT

μ_{CMC} : Valeur de la moyenne du paramètre pour le traitement CMC (1 valeur par date)

σ_{CMC} : Valeur de l'écart – type du paramètre pour le traitement CMC (1 valeur par date)

Les indices de performances sont calculés soit à partir des vitesses de déplacement des plasmodes, dans ce cas la valeur de l'indice augmente avec l'augmentation de la vitesse, soit ils sont calculés à partir des latences, dans ce cas l'indice augmente avec l'augmentation de la latence (ralentissement de la vitesse).



Traitement 04/11/2021 10/11/2021 09/12/2021 15/12/2021

Figure 7 : Variabilité de la vitesse de déplacement de plasmodes exposés à de la CMC selon la date d'observation.

40 plasmodes (04/11/2021 ; 10/11/2021 ; 09/12/2021), et 26 plasmodes (15/12/2021) par traitement ont été testés.

Toutes les statistiques ont été réalisées à l'aide du logiciel Rstudio (version 1.3.1093). Pour évaluer la différence entre les différents paramètres mesurés, nous avons utilisé des modèles linéaires ou des modèles linéaires mixtes (fonction `lm` ou `lmer` respectivement) à l'aide du package `lme4`. Les modèles linéaires mixtes ont été ajustés en précisant les effets fixes (variables explicatives, le plus souvent le traitement) de chaque expérience, et l'effet aléatoire qui est pour chaque expérience l'identité du plasmode. Les variables dépendantes (variables mesurées) qui ne remplissaient pas les conditions d'utilisation du modèle ont été transformées à l'aide de la fonction `bestNormalize` du package `bestNormalize`.

1.5. Annexe 1 : Tableaux statistiques et figures supplémentaires

1.5.1. Caractérisation des DWCNT et du GO

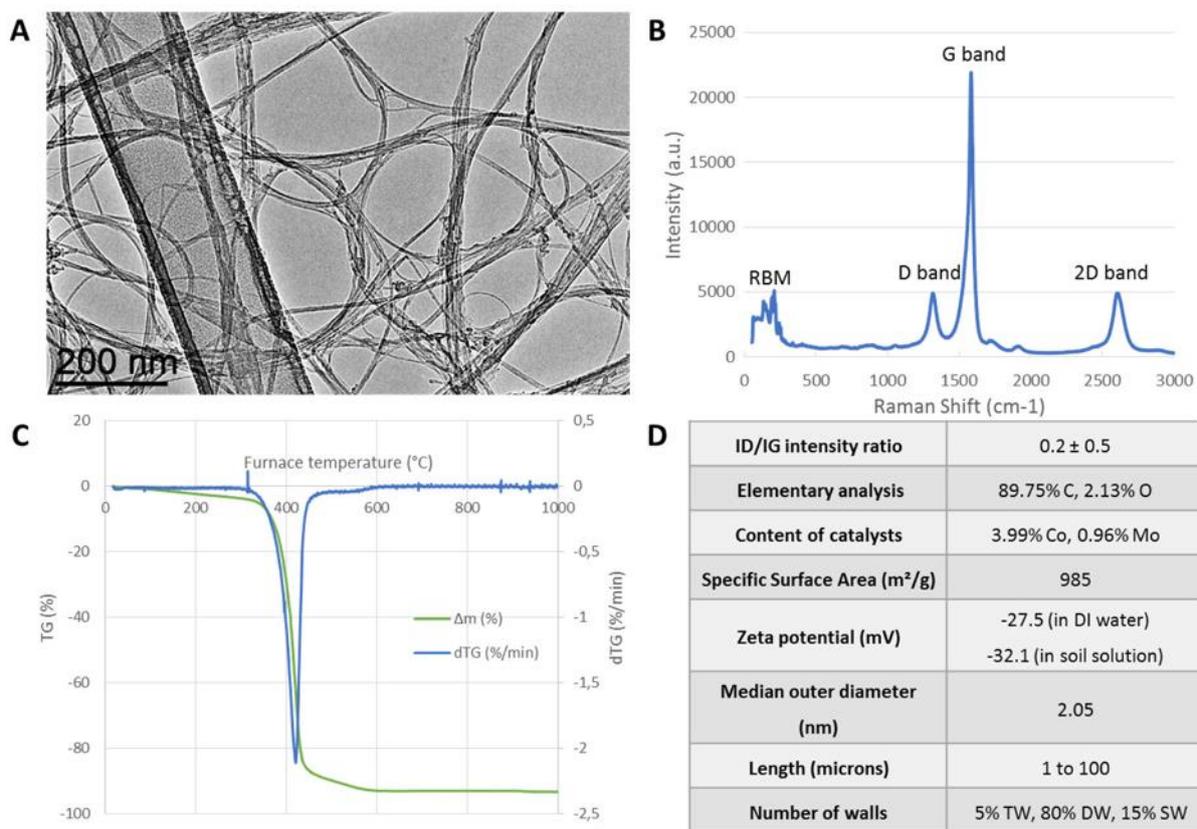


Figure S1: Figure associée aux méthodes générales (DWCNT).

Caractérisation des NTC (A) Image au microscope électronique à transmission (MET) des DWCNT. (B) Spectre Raman de la poudre de NTC obtenu à l'aide d'un laser d'une longueur d'onde de 633 nm. (C) Profil de perte de poids obtenu à partir de l'analyse ATG dans une atmosphère d'air (1°/min). (D) Tableau résumant les caractéristiques physicochimiques des DWCNTs bruts (TW = triple-paroi, DW = double-paroi, SW = simple-paroi).

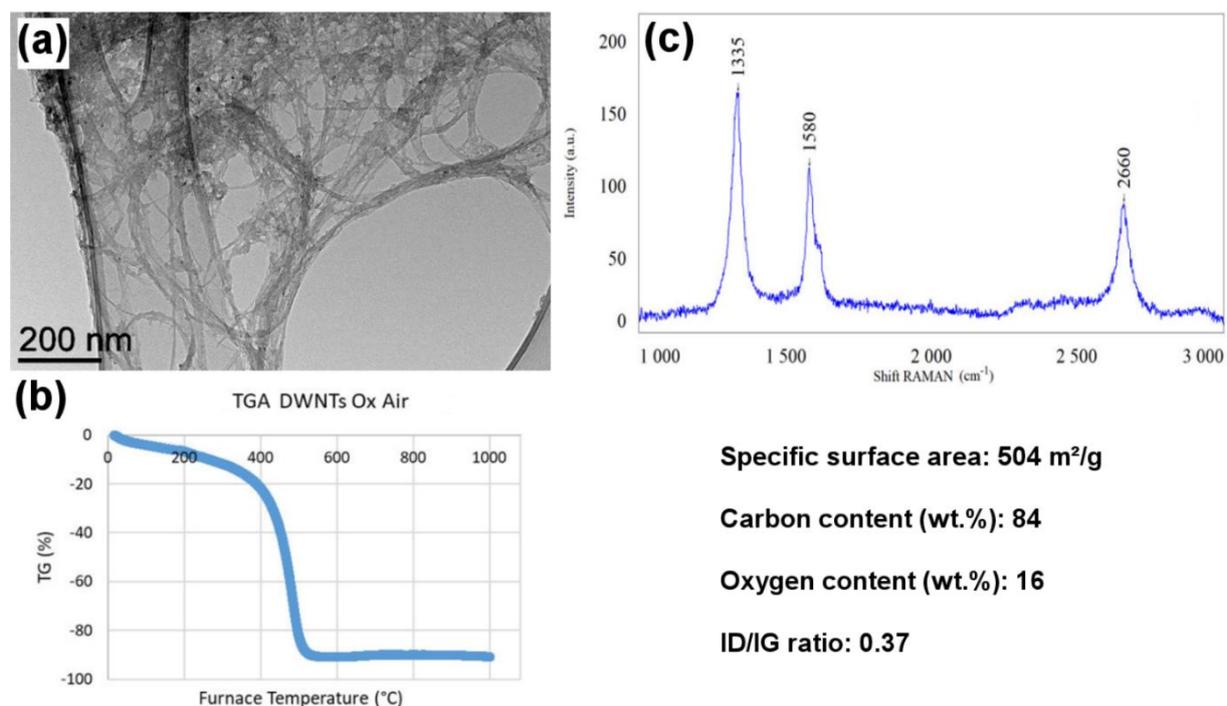


Figure S2 : Figure associée aux méthodes générales (DWCNT oxydés).

Caractérisation des NTC (A) Image au microscope électronique à transmission (MET) des DWCNT oxydés. (B) Profil de perte de poids obtenu à partir de l'analyse ATG dans une atmosphère d'air (1°/min). (C) Spectre Raman de la poudre de NTC obtenu à l'aide d'un laser d'une longueur d'onde de 633 nm.

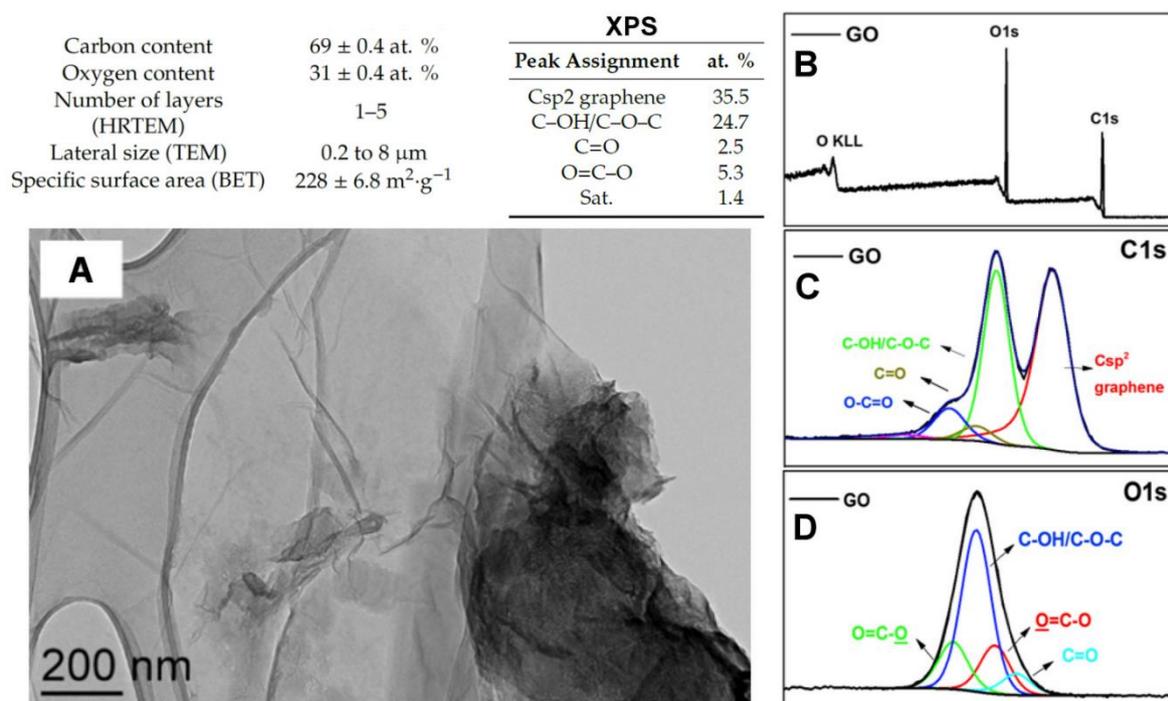


Figure S3 : Figure associée aux méthodes générales (GO).

Caractérisation du GO. (A) Image au MET du GO. (B) Spectre d'étude de la spectroscopie à rayon X (XPS) du GO. Spectres XPS déconvolués des pics C1s (C) et O1s (D) (d'après Evariste et al. (2019)).

1.5.2. Expérience contrôle

Vitesse de déplacement - Eau vs CMC					
Prédicteurs	Estimés	CI	Statistique	p	df
(Intercept)	12.21	10.04 – 14.38	11.04	< 0.001	11.29
[Eau] vs [CMC]	3.73	0.66 – 6.79	2.38	0.035	11.29
[1 jour] vs [3 jours]	0.42	-1.30 – 2.15	0.48	0.631	348.00
Traitement * Durée d'exposition	-2.63	-5.08 – -0.19	-2.11	0.035	348.00
Effets Aléatoires					
σ^2	34.96				
τ_{00} ID_plasmod	4.18				
ICC	0.11				
N ID_plasmod	10				
Observations	360				
R ² Marginal / R ² Conditionnel	0.051 / 0.152				

Tableau S1 : Statistiques associées à la Figure 5.

Pour évaluer les différences des vitesses de déplacement, nous avons utilisé un modèle mixte linéaire (fonction lmer, famille d'erreur : Gaussienne, Package lme4). Le modèle a été ajusté en spécifiant les effets fixes : traitement et durée d'exposition (prédicteurs catégoriques) ; et l'effet aléatoire : ID (identité du plasmode). La variable dépendante (Vitesse) a été normalisée à l'aide de la fonction bestNormalize (Package bestNormalize).

Vitesse de déplacement - Eau vs CMC					
Comparaison par paires					
Prédicteurs	Estimés	SE	df	t.ratio	p.value
Durée d'exposition [1 jour]					
[Eau] vs [CMC]	-3.73	1.56	11.3	-2.381	0.0359
Durée d'exposition [3 jours]					
[Eau] vs [CMC]	-1.09	1.56	11.3	-0.699	0.4989

Tableau S2 : Statistiques associées à la Figure 5.

Nous avons ensuite réalisé une comparaison par paires (correction de Satterthwaite, Package emmeans) pour chaque durée d'exposition.

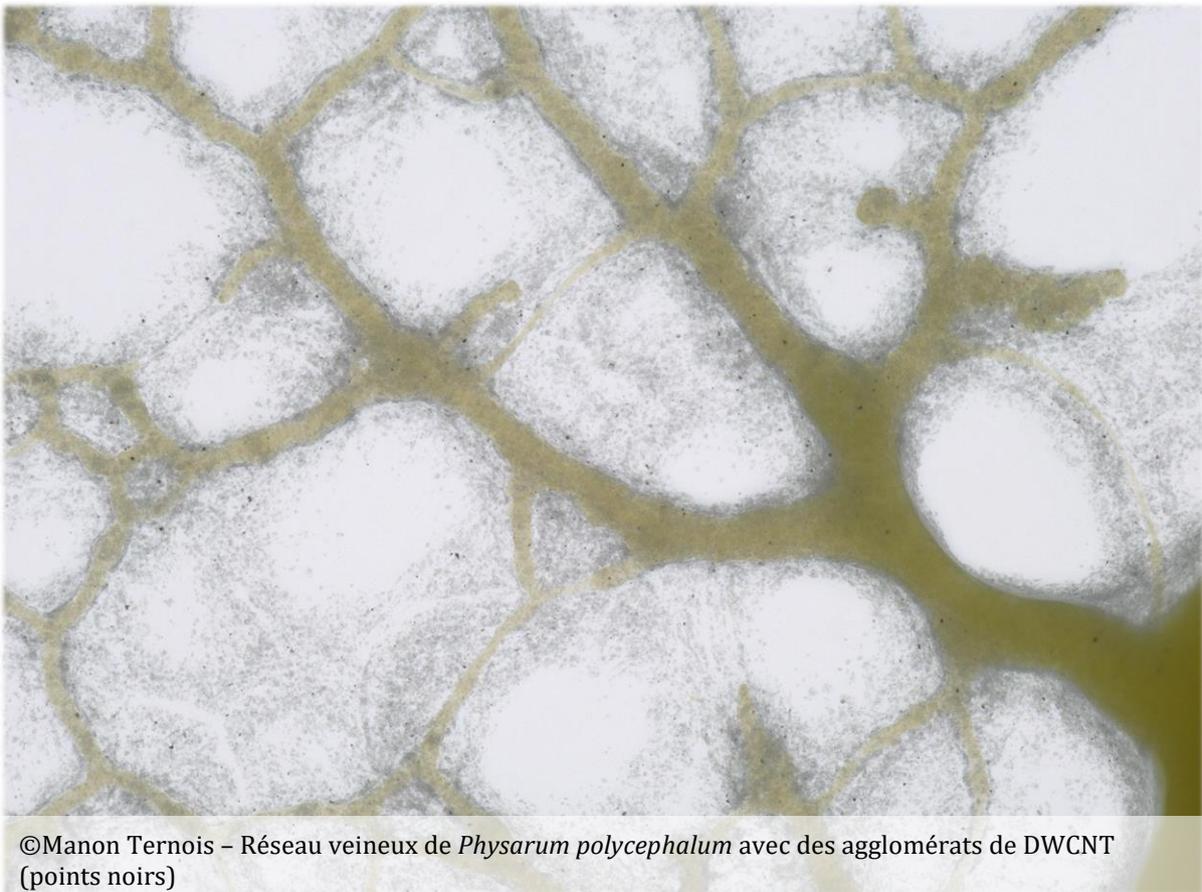
1.5.3. Variabilité de la vitesse de déplacement des plasmodes

Vitesse de déplacement selon la date					
<i>Prédicteurs</i>	<i>Estimés</i>	<i>CI</i>	<i>Statistique</i>	<i>p</i>	<i>df</i>
(Intercept)	0.56	0.24 – 0.89	3.42	0.001	140.00
Date [10/11/2021]	-0.51	-0.81 – -0.21	-3.31	0.001	140.00
Date [09/12/2021]	-1.28	-1.58 – -0.97	-8.26	<0.001	140.00
Date [15/12/2021]	-0.50	-0.84 – -0.16	-2.85	0.004	140.00
Effets Aléatoires					
σ^2	0.48				
τ_{00} ID_plasmod	0.30				
ICC	0.39				
N ID_plasmod	20				
Observations	146				
R ² Marginal / R ² Conditionnel	0.227 / 0.528				

Tableau S3 : Statistiques associées à la Figure 7.

Pour évaluer les différences des vitesses de déplacement, nous avons utilisé un modèle mixte linéaire (fonction *lmer*, famille d'erreur : Gaussienne, Package *lme4*). Le modèle a été ajusté en spécifiant l'effet fixe : Date (prédicteur catégorique) ; et l'effet aléatoire : ID (identité du plasmode). La variable dépendante (Vitesse) a été normalisée à l'aide de la fonction *bestNormalize* (Package *bestNormalize*).

2. Chapitre 2 : Réponse de *Physarum polycephalum* à l'exposition aux nanotubes de carbone : de l'internalisation au comportement



©Manon Ternois - Réseau veineux de *Physarum polycephalum* avec des agglomérats de DWCNT (points noirs)

2.1. Contexte

Les nanotubes de carbone, et plus largement les nanomatériaux, sont des composés non naturellement produits par les organismes vivants. Leur devenir dans ces organismes peut donc être étudié et décrit selon 4 étapes (ADME) : l'absorption, la distribution, la métabolisation, et l'excrétion. L'absorption consiste au passage du composé de l'extérieur vers l'intérieur de l'organisme ; la distribution est la dispersion du composé au sein de l'organisme ; la métabolisation est la transformation et/ou dégradation du composé par des enzymes de l'organisme ; l'excrétion est l'expulsion du composé en dehors de l'organisme.

Tout d'abord, dans ce chapitre, nous analysons le devenir des DWCNT dans la cellule de *P.polycephalum* avec l'observation de leur absorption (internalisation), de leur quantité au cours du temps (bioaccumulation), de leur présence après une phase de dormance (persistance), et de leur excrétion de la cellule. En complément, l'effet des DWCNT sur *P.polycephalum* est évalué par la mesure de quelques comportements élémentaires de déplacements.

Nous avons également mené un test en exposant les plasmodes à des DWCNT oxydés. L'objectif était de comparer l'effet des DWCNT bruts et des DWCNT oxydés sur la vitesse de déplacement des plasmodes.

2.2. Résumé en français de l'étude "Slime mold response to carbon nanotubes exposure: from internalization to behavior"

Les nanotubes de carbone sont utilisés dans de nombreux produits de consommation, et des rejets dans l'environnement peuvent avoir lieu à différentes étapes de leur cycle de vie (production, transport, stockage, utilisation) (Mouchet et al., 2007). Ils peuvent s'accumuler dans les milieux aquatiques et les sols (Liné et al., 2017), ce qui représente une menace potentielle pour les organismes vivants et les écosystèmes. Plusieurs études ont évalué les effets de différents types de nanotubes de carbone sur des unicellulaires aquatiques ou du sol. Nous proposons une étude sur un être unicellulaire encore très peu utilisé comme modèle, et qui pourtant possède des qualités qui en font un bon candidat : *Physarum polycephalum*. Sa présence naturelle dans les écosystèmes forestiers lui procure une importance écologique, et sa simplicité d'organisation combinée à sa complexité comportementale sont des atouts pour des études de toxicité. L'objectif de cette étude est d'évaluer le devenir des NTC dans la cellule de *P. polycephalum* au stade plasmode, et de voir s'il y a des effets sur la croissance de celui-ci. Les NTC utilisés sont des nanotubes de carbone à double-paroi (DWCNT) en suspension d'une concentration de 50 mg/L. A noter que ces DWCNT, malgré la présence de CMC qui permet de les garder stables en suspension, forment tout de même des agglomérats.

Dans un premier temps, les plasmodes ont été exposés aux DWCNT selon trois voies d'exposition (topique, nourriture, environnement) afin de trouver une méthode efficace pour internaliser les DWCNT. L'exposition topique consiste à déposer la suspension sur le plasmode ; l'exposition par la nourriture à déposer les DWCNT sur des flocons d'avoine eux-mêmes déposés sur le plasmode ; l'exposition par l'environnement consiste enfin à déposer et étaler les DWCNT sur le gel agar entourant les plasmodes. Nous avons réalisé un comptage des agglomérats de DWCNT statiques, c'est-à-dire ceux visibles et immobiles (**Figure 8**), et un comptage des agglomérats de NTC circulants, c'est-à-dire en circulation dans les veines des plasmodes. Le nombre de DWCNT statiques était supérieur pour les plasmodes exposés par l'environnement (5 fois supérieur à ceux exposés par la nourriture, et 15 fois supérieur à ceux exposés par voie topique). Le nombre de DWCNT circulants était le plus élevé pour les plasmodes exposés par l'environnement et par la nourriture par rapport à la voie topique.

Dans un deuxième temps, nous avons évalué la bioaccumulation des NTC dans la cellule par une exposition chronique quotidienne sur la nourriture (entre 1 et 6 semaines). La présence d'une bioaccumulation serait un problème car les NTC pourraient être transmis aux étages supérieurs de la chaîne alimentaire. Nous avons démontré qu'il n'y a pas de bioaccumulation visible des agglomérats de DWCNT, la quantité d'agglomérats détectée étant similaire après 1 semaine et après 6 semaines d'exposition.

Même en l'absence d'une bioaccumulation des DWCNT, la quantité détectée dans les plasmodes est non négligeable. Nous avons donc, dans un troisième temps, évalué si les DWCNT persistent après une phase de dormance des plasmodes, car cela impliquerait qu'une transmission aux

Chapitre 2 : Réponse de *Physarum polycephalum* à l'exposition aux nanotubes de carbone : de l'internalisation au comportement

génération suivante est possible. Le nombre d'agglomérats de DWCNT a été quantifié avant l'entrée en dormance (expérience de bioaccumulation) puis quantifié au réveil des plasmodes. Après la sortie de dormance, la quantité de DWCNT baisse drastiquement. Des agglomérats sont visibles sur le papier filtre (donc en dehors du plasmode) où les organismes sont entrés en dormance. De plus, nous avons remarqué que la présence des DWCNT ne perturbe pas le processus d'entrée en dormance des plasmodes, ni leur réveil.

Sachant que les plasmodes ne bioaccumulent pas et que les DWCNT sont excrétés avant l'entrée en dormance, nous avons dans un quatrième temps observé la cinétique d'excrétion des DWCNT de la cellule après une exposition unique. La quantité d'agglomérats statiques, et circulants, baisse significativement 24 heures après l'exposition. La taille des agglomérats ne change pas au cours des observations (pas de dégradation visible des agglomérats par la cellule).

Dans un dernier temps, nous avons observé s'il y a des effets sur la croissance des plasmodes étant donné que le déplacement est essentiel à la survie de ces organismes, notamment dans le cas de recherche de nourriture. Nous avons mesuré la vitesse de croissance des plasmodes, après une exposition unique, et selon les 3 voies d'exposition que nous avons précédemment investiguées (nourriture, environnement, topique). Nous n'avons pas observé de différence significative de la vitesse entre les plasmodes contrôles et les plasmodes DWCNT après les expositions topiques et environnementales. En revanche, lors de l'exposition par la nourriture, les plasmodes DWCNT ont une vitesse significativement ralentie par rapport aux plasmodes contrôles ($p < 0,001$; $n=80$). Nous avons ensuite mesuré la performance des plasmodes après une exposition chronique (de 1 à 6 semaines) selon 2 paramètres : la latence pour former le 1^{er} pseudopode et le taux d'expansion. Les plasmodes DWCNT ont un temps de latence qui est plus élevé, ils mettent plus de temps à démarrer leur croissance que les plasmodes contrôles ($p < 0,001$; $n=40$). De la même manière, les plasmodes DWCNT grandissent moins vite que les plasmodes contrôles ($p=0,026$; $n=40$). Ces observations sont valables pour toutes les semaines d'expérimentation.

L'interaction des êtres-vivants avec les NTC est un enjeu que nous devons prendre en compte. Nous avons montré dans cette étude que *P. polycephalum* est capable d'internaliser les NTC et que ces derniers peuvent donc potentiellement monter dans la chaîne alimentaire, mais surtout que les effets démontrés sur la croissance peuvent perturber la capacité d'adaptation de *P. polycephalum*. Nous avons introduit *P. polycephalum* comme un nouveau modèle pour l'étude de la toxicité des NTC, et nous avons apporté de nouveaux éléments pour la compréhension des effets cytotoxiques des DWCNT.

Résumé en français de l'étude "Slime mold response to carbon nanotubes exposure: from internalization to behavior"

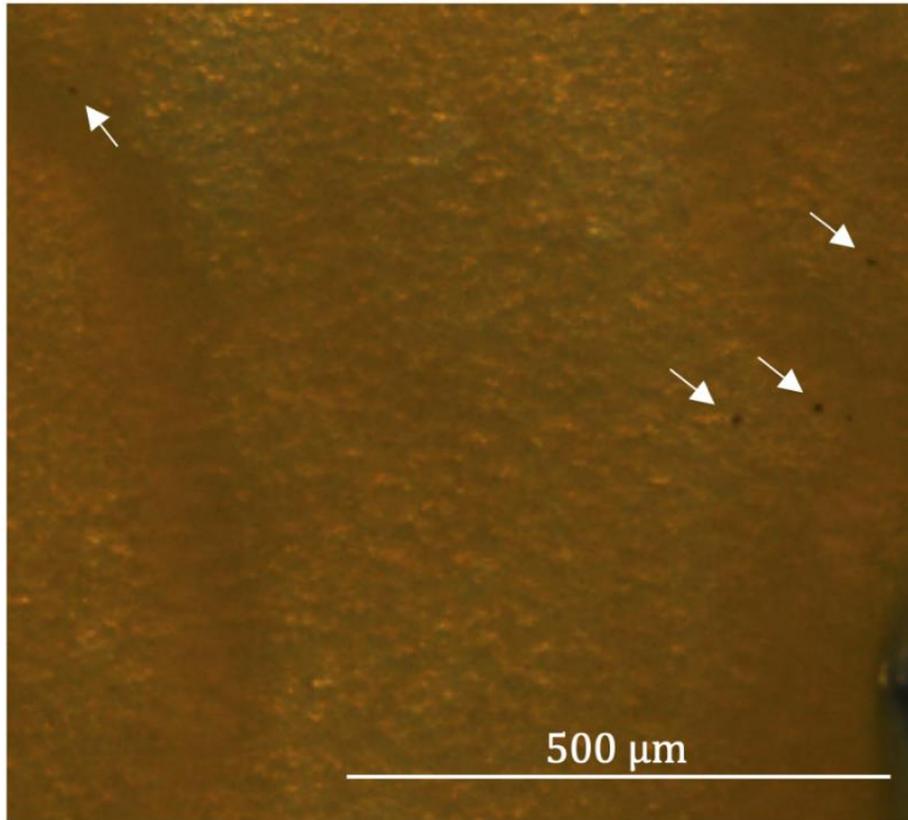


Figure 8 : Image à la loupe binoculaire d'un plasmode exposé aux DWCNT par la nourriture. Les flèches blanches indiquent la présence d'agglomérats de DWCNT.

2.3. Slime molds response to carbon nanotubes exposure: from internalization to behavior

Manon Ternois^{a,b}, Maxence Mougou^{a,b}, Emmanuel Flahaut^{b*} and Audrey Dussutour^{a*†}

^aResearch Centre on Animal Cognition (CRCA), Centre for Integrative Biology (CBI), UMR5169 CNRS, Toulouse University, Toulouse, France.

^bCIRIMAT, CNRS, INPT, UPS, UMR5085 CNRS-UPS-INPT, Toulouse University, Toulouse, France

* Equal contribution

† Authors for correspondence: audrey.dussutour@univ-tlse3.fr

Article publié : Ternois, M., Mougou, M., Flahaut, E., & Dussutour, A. (2021). Slime molds response to carbon nanotubes exposure: from internalization to behavior. *Nanotoxicology*, 15(4), 511-526. DOI : 10.1080/17435390.2021.1894615

2.3.1. Abstract

Carbon nanotubes (CNTs) offer attractive opportunities due to their physical, electrical, mechanical, optical, and thermal properties. They are used in a wide range of applications and are found in numerous consumer products. On the downside, their increasing presence in the environment poses potential threats to living organisms and ecosystems. The aim of this study was to evaluate the toxicity of double-walled carbon nanotubes (DWCNTs) on a new model system: the acellular slime mold *Physarum polycephalum*. Despite its ecological significance, its simplicity of organization, and its behavioral complexity, exposure of such organisms to nanoparticles has been poorly investigated. Slime molds were exposed to DWCNTs using three routes of exposure (topical, food, environment). We first demonstrated that DWCNTs were rapidly internalized by slime molds especially when DWCNTs were mixed with the food or spread out in the environment. Secondly, we showed that a 6-week exposure to DWCNTs did not lead to bioaccumulation nor did it lead to persistence in the slime molds when they entered a resting stage. Thirdly, we revealed that 2 days following exposure, DWCNTs were almost entirely excreted from the slime molds. Lastly, we uncovered that DWCNTs exposure altered the migration speed, the pseudopods formation, and the expansion rate of the slime molds. Our results extend our current knowledge of CNTs cytotoxicity and introduce *P. polycephalum* as an ideal organism for nanotoxicology.

2.3.2. Introduction

Recent years have witnessed a growing interest in nanomaterials due to their specific electrical, optical, thermal, and magnetic properties that enhance the performance of the final product (Guinée et al., 2017). Nanomaterials may be of different nature including metals, oxides, or carbon based. Carbon nanotubes (CNTs) were brought to the forefront in 1991 by Sumio Iijima and since then they have revolutionized several fields of research with their extraordinary properties and applications (De Volder et al., 2013). They are incorporated in a wide variety of consumer products (Guinée et al., 2017) and used in many fields of applications such as biomedical engineering, energy production and storage, nanoelectronics, mechanical engineering, and so forth (Gabaudan et al., 2019; Simon et al., 2019). CNTs can be single-walled (SWCNTs), multi-walled (MWCNTs), or at the interface such as the double-walled carbon nanotubes (DWCNTs). DWCNTs offer several advantages in comparison to both SWCNTs and MWCNTs. They show enhanced properties thanks to an outer wall protecting the inner tube. Hence, DWCNTs can be functionalized without degrading their intrinsic mechanical properties which makes them the perfect compromise for many industrial applications (Flahaut et al., 2003; Simon et al., 2019). They also offer higher stability under chemical, mechanical and thermal treatments and a longer lifetime than MWCNTs (Green & Hersam, 2011). Lastly, they enhance electron transfer and thus provide better electrochemical behavior than SWCNTs (Pumera, 2007).

Despite the attractive properties of CNTs for numerous applications, some studies have raised concerns regarding the potential risks of these nanomaterials to the environment (Francis & Devasena, 2018). CNTs are released in the environment throughout their life cycle by accidental release during production, transport, storage, uses of the final product (Mouchet et al., 2007), and as waste from sewage treatment or incineration plants (Petersen, Zhang, et al., 2011). The fate of CNTs and their impact depends on their transport, diffusion, degradation, bioaccumulation, transformation, and persistence. Hence, to evaluate the potential risks associated with CNTs, it is primordial to quantify their presence in each compartment of the environment. However, it is difficult to measure precisely the quantity of CNTs in environmental matrices, and models are often used to predict environmental concentrations (T. Y. Sun et al., 2016). Soil and water are the main environmental reservoirs for CNTs (Liné et al., 2017). Using a dynamic probabilistic material flow model, predicted CNTs concentration was estimated to be ca. $3.6 \cdot 10^{-4} \text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ in surface waters and approximately $3.5 \cdot 10^{-2} \text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ in natural and urban soil (T. Y. Sun et al., 2016).

Single-cell organisms play an important role in nutrients cycling and a change in their activity could indicate a response to an environmental stressor (Chung et al., 2011). Several studies indicate that MWCNTs and SWCNTs present in soils repress enzymatic activities of bacteria, reduce microbial biomass (Chung et al., 2011; Ge et al., 2016; Jin et al., 2013), and alter soil microbial community composition (Jin et al., 2014; Kerfahi et al., 2015). It was also shown in soil bacteria that SWCNTs inhibit growth, reduce viability (Arias & Yang, 2009), disrupt wall and membrane (Kang et al., 2007; S. Liu et al., 2009), induce stress response (Kang, Herzberg, et al., 2008; Kang, Mauter, et al., 2008), and affect denitrification activity (Zheng et al., 2014). CNTs are hydrophobic, but stable CNTs suspension can persist for over one month in natural surface water when stabilized by natural organic matter (Hyung et al., 2007). Hence negative impacts of CNTs

on aquatic single-cell organisms have also been observed. Among these single-cell organisms, ciliates and unicellular algae have been the most studied to assess CNTs' adverse effects (reviewed in Jackson et al., 2013). SWCNTs and MWCNTs can be readily ingested by various ciliates (*Tetrahymena thermophila*, *Tetrahymena thermophila pyriformis*, *Pseudocohnilembus persalinus*, and *Stylonychia mytilus*) and can alter the motility, induce growth inhibition, cause cell aggregation, decrease viability, impair predation and alter the intracellular trafficking of vesicles (Chan et al., 2009; Ghafari et al., 2008; Guo et al., 2008; Mortimer et al., 2016; Weijie et al., 2020; Y. Zhu et al., 2006). Similar to protozoa, both freshwater (*Chlorella vulgaris*, *Pseudokirchneriella subcapitata*) and marine algae (*Dunaliella tertiolecta*) are sensitive to CNTs and exhibit reduced growth and stress response when exposed (Long et al., 2012; Schwab et al., 2011; Wei et al., 2010).

Due to its comparably simple structure in relation to its behavioral complexity and due to the ease with which it can be cultivated and manipulated, the acellular slime mold *Physarum polycephalum* presents itself as an ideal model system to determine the cytotoxicity of CNTs in single cell organisms. *Physarum polycephalum* is a remarkable organism belonging to the Myxomycetes and the Amoebozoa. It is a phagotrophic organism commonly observed in association with decaying plant material in terrestrial ecosystems. *Physarum polycephalum*, as a major component of the detritus food chain, is essential in nutrient cycling. Bacteria and fungi are the primary natural food source of *P. polycephalum*, and these are phagocytized (Aldrich, 2012). Food particles are first captured in flask-like invaginations of the membrane and then isolated in vacuoles which are released into the cytoplasm. *Physarum polycephalum* can also take up droplets of medium by pinocytosis (Aldrich, 2012). The vegetative state of *P. polycephalum* is a large mobile polynucleated cell also called plasmodium. It can extend to up to hundreds of square centimeters (**Figure 9 (A)**) and be severed into viable and structurally similar yet smaller plasmodia. Upon contact, these plasmodia can fuse with each other to form a unique plasmodium (Aldrich, 2012). Lastly, a starving plasmodium can encapsulate and enter a dormant stage called sclerotium (**Figure 9 (C)**).

Both *P. polycephalum*'s motion and behavior rely on a network of interconnected veins (**Figure 9 (B)**). These veins contract and relax periodically, causing the cytoplasm to flow back and forth, a phenomenon called 'shuttle streaming' (Matsumoto et al., 2008). The veins are porous, allowing respiratory gases, molecules, nuclei and organelles to be exchanged with the surrounding cytoplasm (Oettmeier et al., 2018). This open network distributes the cytoplasm throughout the cell body and allows to maintain homeostasis. This network is also responsible for the plasmodium migration at a speed of up to 4 cm per hour, through the interplay of intracellular flow and rhythmic vein contractions (Alim et al., 2013; Matsumoto et al., 2008). These contractions produce a pressure gradient that pushes the cytoplasm toward the cell periphery where local cytoskeletal reorganization leads to the formation of fan-shaped leading fronts. These fronts extend and retract in synchrony with the shuttle streaming of the cytoplasm (Lewis et al., 2015; Matsumoto et al., 2008). The frequency and the amplitude of the contractions and by extension the shape, size, and motion of the plasmodium depend on the external cues encountered in the environment (Matsumoto et al., 1986; Ridgway & Durham, 1976). It has been shown that slime molds respond to a variety of cues such as chemicals (Aldrich, 2012), light (Hato et al., 1976; Marwan, 2001), temperature (Wolf et al., 1997), humidity (Rakoczy, 1973), etc. *P.*

polycephalum exhibits a rich repertoire of complex behaviors which makes it a model organism to study problem- solving in unicellular systems (Adamatzky, 2017; Oettmeier et al., 2017; Reid et al., 2015; Smith-Ferguson & Beekman, 2020; Vallverdú et al., 2018).

Although the importance of slime molds to the environment is well acknowledged, only a single study was found on the exposure of such organisms to carbon nanotubes (CNTs) (Gizzie, Mayne, & Adamatzky, 2016). The objective of Gizzie, Mayne, and Adamatzky (2016) study was not to measure the impact of CNTs on *P. polycephalum* but to hybridize the organism with nanomaterials. In contrast, the main objective of our work was to measure the impact of CNTs exposure on *P. polycephalum* behavior. First, we verified that CNTs could be internalized into the cell using various routes of exposure. CNTs were either mixed with food, spread in the environment, or administrated by topical application. Being a phagotrophic organism, we expected the slime molds to readily internalize CNTs. Second, we evaluated if CNTs accumulated over time when cells were continuously exposed to CNTs for 6 weeks. Bioaccumulation of CNTs is a major issue, as it means that CNTs could move up along the food chain. Third, we measured the persistence of CNTs within the cell when cells were exposed to CNTs for 6 weeks. If the CNTs remain into the cell, they might be transferred to the next generation. Fourth, we estimated the excretion rate of CNTs when cells were exposed only once to CNTs. Last, we measured the effect of CNTs exposure on behavior including movement initiation and migration speed.

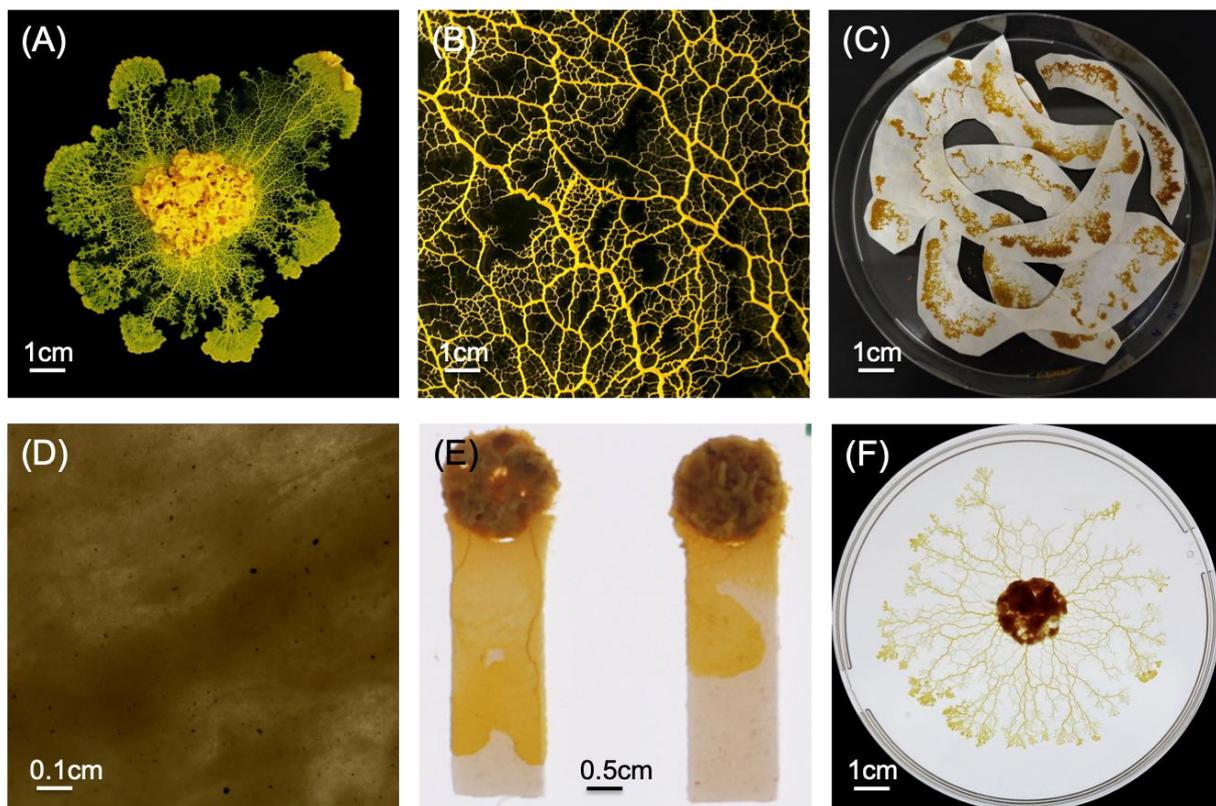


Figure 9 : Pictures of *P. polycephalum*.

These pictures illustrate (A) a macroplasmodium; the vegetative phase of *P. polycephalum*, (B) a magnified vein network, (C) a sclerotium, the dormant stage of *P. polycephalum*, (D) DWNTs agglomerates internalized in a slime mold (E) two slime molds migrating on a bridge and (F) one slime mold exploring an agar gel in a petri dish.

2.3.3. Materials and methods

2.3.3.1. CNT synthesis and dispersion

In this study, we used DWCNTs as they can be considered as a general model for carbon nanotubes, representing both thin and flexible SWCNTs and multiwall CNTs.

We used the CCVD (catalytic chemical vapor deposition) technique to synthesize the DWCNTs. Magnesia (MgO) was used as support material for *in situ* generated catalytic nanoparticles of cobalt and molybdenum (Flahaut et al., 2003). CCVD is a widely used method due to its capacity to produce CNTs with a high yield and possibly also a high purity with easily controllable reaction conditions to tune the desired type of carbon nanotubes (Yeoh et al., 2009). First, the catalytic powder was placed in a ceramic container which was positioned in a tube furnace. The synthesis was performed with dihydrogen (H₂) and a methane (CH₄) mixture flow. Methane served as the source of carbon by catalytic decomposition on the cobalt and molybdenum nanoparticles, leading to the formation of carbon nanotubes. The obtained black nanocomposite powder was composed of DWCNTs and the catalytic support, which was dissolved by addition of a concentrated aqueous solution of hydrochloric acid (3.5 mL of deionized water and 15 mL of 37% HCl for 1 g of powder) and left overnight. Then, a vacuum filtration was carried out using a nitrocellulose membrane (0.45 µm pore size). Successive filtrations were performed to remove the excess of HCl and the solution of Mg, Co and Mo salts. Finally, the last washing was carried out using tap water.

As described in our earlier work (Flahaut et al., 2003), the DWCNTs samples contained 80% of DWCNTs, 10% SWCNTs, and 5% MWCNTs (triplewalled CNTs). The outer-diameter distribution of the CNTs was between 1 and 3 nm. The length was difficult, if not impossible, to assess because the nanotubes formed entangled bundles. Considering that the length of bundles may reach 100 µm, we estimated the length of individual CNTs to be between a few µm to tens of micrometers. Bundles typically had a maximum diameter of a few tens of nanometers. The elemental analysis indicated that our DWCNTs samples contained residual cobalt (*ca.* 3.5–4 wt.%) and molybdenum (*ca.* 1.0 wt.%) mainly in the form of nanoparticles tightly encapsulated in concentric carbon shells. The chemical analysis of carboxylic groups usually led to 0–0.5 mM/g (Bortolamiol et al., 2014), and the oxygen content was typically 3–4 wt.% (see **Figure S1** for more details).

Due to their low water solubility, DWCNTs were suspended in a solution of carboxymethyl cellulose (CMC). CMC (carboxymethyl cellulose) is a cellulose derivative used as an additive in human food and is harmless for living organisms (E466). It is commonly used to provide stability to pristine CNTs suspensions (Bourdiol et al., 2013). First, 50mg of CMC were weighed and placed in a vial with a few mL of tap water. Ultrasonic bath (*ca.* 1 minute) and microwave heating (a few seconds at 500W in a classical microwave oven) were used to facilitate the dissolution. Then, the CMC was transferred in a 1 L bottle and tap water was added to obtain a 50mg.L⁻¹ CMC solution. Pristine DWCNT wet powder (equivalent of 50mg in the dry form) was suspended in a 1 L bottle with CMC solution (50mg.L⁻¹) to obtain a 50mg.L⁻¹ DWCNT solution. The suspension was homogenized with a probe sonicator (Vibra Cell 75042, 20 kHz, 500 W, 125 mm diameter probe) cooled in an ice bath (programming of 3 s ON and 3 s OFF alternately and an amplitude of 30%, for 30 min).

2.3.3.2. Species and rearing conditions

Slime molds of *P. polycephalum* strain LU352 kindly provided by Professor Dr. Wolfgang Marwan (Max Planck Institute for Dynamics of Complex Technical Systems, Magdeburg, Germany) were used for some of the experiments (§ 2.3.3.3.; § 2.3.3.6.; § 2.3.3.7.). Slime molds of strain AUS provided by Southern Biological (Victoria, Australia), were used for some of the experiments (§2.3.3.4.; § 2.3.3.5.; § 2.3.3.8.)¹. The slime molds were reared on a 1% agar medium with rolled oat flakes (Quaker Oats Company®) in Petri dishes (140mm Ø). They were kept in the dark in a thermoregulated chamber at a temperature of 25 degrees Celsius and a humidity of 80%. Slime mold were transferred every day on a new agar medium on which was spread a single layer of rolled oat flakes. All experiments were also carried out in a thermoregulated chamber and pictures were taken with a Canon 70D digital camera.

2.3.3.3. Internalization of pristine DWCNTs by slime molds

The aim of the first experiment was to find out how DWCNTs may be internalized within the slime mold. Circular slime molds (14mm Ø) were placed in the center of a Petri dish (55mm Ø) previously filled with 10 mL of 1 wt. % agar gel. 100 µL of DWCNT (50mg.L⁻¹) were either dropped on rolled oats (Food treatment, n=20), directly on top of the slime mold (Topical treatment, n=20), or in the slime mold environment (Environment treatment, n=22). For the environment treatment, 2 drops of 50 µL were put on either side of the slime mold and spread out with a brush to cover the entire gel as evenly as possible. All the petri dishes were stored in a thermoregulated chamber (25°C) for 16 h. The slime molds were then observed with a binocular microscope (Leica S9, 600 lp/mm, pi = 0.4 µm equipped with a MC170 HD camera) to quantify the DWCNTs internalization. The DWCNTs that we observed using the binocular microscope were much larger than bundles and correspond to agglomerates. 8 to 10 pictures of each slime mold were taken (depending on the size of the slime mold) to count the number of static DWCNTs agglomerates (black spots, **Figure 9**). For each picture, several zones of 0.5mm² were delimited randomly and DWCNTs were counted in each zone. Data acquisition was performed using the software ImageJ. As we could not preclude that some static agglomerates were trapped in the extracellular slime layer surrounding the cell and not actually inside the slime mold, we also tracked circulating DWCNTs agglomerates within the organism. To this end, five veins per slime mold were video-monitored for 100 s and the number of DWCNTs agglomerates circulating within the veins were counted (Movie S1).

2.3.3.4. Bioaccumulation of pristine DWCNTs into the slime mold

Beyond internalizing DWCNTs, do the slime molds accumulate the DWCNTs? The aim of the second experiment was to investigate if chronic exposure to DWCNTs led to bioaccumulation. 20 slime molds were exposed daily to either a CMC solution (Control group n=20) or DWCNTs suspension (CNT group n=20), for 6 weeks. Slime molds were reared in Petri dishes (55mm Ø) and 1mL of DWCNTs suspension (50mg.L⁻¹) or CMC was spread on the food given daily to the slime molds (1 g of rolled oats). We used food as a route of exposure as we demonstrated in the

¹ Informations ajoutées par rapport au papier original

first experiment that it was the most efficient method for DWCNTs internalization. For 9 slime molds chosen randomly, 12 pictures were taken the first week and the last week with a binocular microscope (Leica S9, 600 lp/mm, pi = 0.4 mm) and camera MC170 HD Leica. Static DWCNTs agglomerates were counted in four 0.5mm² zones chosen randomly on each picture leading to a total of 432 counts for each treatment, using the software ImageJ, to find out if there was an increase in the number of CNT agglomerates over time (bioaccumulation). We also measured the area of the agglomerates using the software ImageJ to investigate a potential deagglomeration through time.

2.3.3.5. Persistence of pristine DWCNTs into the slime mold

When environmental conditions deteriorate, slime molds enter a dormant state called sclerotium until conditions become favorable again. During the sclerotization process, slime molds lose 50% of their total protein content together with 40% of their DNA and 65% of their RNA (Aldrich, 2012). Slime mold can be easily re-activated from sclerotia if placed in favorable conditions. The aim of the third experiment was to examine if the DWCNTs internalized after a chronic exposure was excreted by the slime molds before entering the dormant stage. 240 samples of the slime molds used in the second experiment were successfully turned into a dormant state (n=20 for each treatment every week for 6 weeks). The transition from plasmodia to sclerotia was initiated by placing the slime molds on a moist filter paper for 4 days to dry. Six months after entering the dormant state, 60 samples were chosen randomly and were reactivated to test the viability of the sclerotia (5 samples per treatment and per week). To this end, the sclerotia were soaked in water and placed in petri dishes (55mm Ø) on agar gel (1%). Once revived, slime molds start to explore the agar gel, usually 24 h after the reactivation of the sclerotia.

Then, 20 sclerotia were re-activated one year later for each treatment (10 samples from week 1 and 10 samples from week 6). One sclerotium out of 20 could not be re-activated in each treatment. The day following the reactivation, 120 s videos of 3 veins per slime mold were recorded with a binocular microscope and camera MC170 HD Leica to quantify circulating DWCNTs agglomerates. Ten pictures per slime mold were also taken. DWCNTs agglomerates were counted in 5 zones of 0.5mm² chosen randomly on each picture leading to a total of 912 counts. As we used a sample from the slime molds tested in the bioaccumulation protocol, we were able to compare the number of static DWCNTs agglomerates in the slime mold before and after entering the dormant state.

2.3.3.6. Excretion of pristine DWCNTs from the slime mold

The aim of the fourth experiment was to evaluate the excretion rate of DWCNTs by the slime mold. Slime molds were exposed once to DWCNTs using food as a route of exposure. Circular slime molds (10mm Ø) were placed in a square Petri dish (120mm wide) previously filled with 10 mL of 1 wt. % agar gel. Few oat flakes soaked in a DWCNTs suspension (volume 40 mL) were placed 5mm away from the slime mold. We let the slime molds feed and explore for 24 h. Any food residues remaining after 24 h were discarded as they may provide a niche in which microorganisms can rapidly grow. As they explore, slime molds leave behind a thick mat of non-living, translucent, extracellular slime. To prevent internalization of DWCNTs that had been

already excreted and left in the extracellular slime we replaced the agar gel after 48 h so that the slime mold never explored the same area twice. Slime molds were observed with a binocular microscope and camera MC170 HD Leica 24, 31, 48, 55, 72 and 79 h post-exposure. 5–10 pictures were taken for each slime mold sample and DWCNTs agglomerates were counted using ImageJ software. Five veins per slime mold were video-monitored for 100 s to quantify circulating DWCNTs. We also measured the area of the static agglomerates using the software ImageJ to investigate a potential deagglomeration through time.

2.3.3.7. Migration speed following a single exposure to DWCNTs

The aim of the fifth experiment was to investigate how a single exposure to DWCNTs affects slime mold behavior. In this experiment, a circular slime mold (10mm \emptyset) had to migrate on a bridge (35mm long, 10mm wide) made of 10% w/v powdered oat-agar (**Figure 9 (E)**). Slime mold was first gently placed in contact with the bridge and then exposed to DWCNTs suspension (CNT group) or CMC only (Control group). Three routes of exposure were tested: a drop of DWCNTs suspension (20 μ L) was either placed directly on the slime mold (Topical treatment), on few oat flakes resting on the slime mold (Food treatment), or on the bridge (Environment treatment). Hence, 80 slime mold were tested for each treatment and each group, leading to a total of 480 assays. After one night's incubation (*ca.* 15 h), the distance traveled (in mm) on each bridge was measured with a ruler.

2.3.3.8. First pseudopod and expansion rate following a chronic exposure to DWCNTs

The aim of the sixth experiment was to investigate how chronic exposure to DWCNTs affects slime mold performance. Twenty slime molds were exposed chronically to DWCNTs or CMC control treatment (see bioaccumulation protocol) for 6 weeks. Each week, a circular sample of each slime mold (\emptyset 13 mm) was introduced in the center of a petri dish (\emptyset 55 mm) containing a layer of agar (1% in tap water) (**Figure 9 (F)**). The dishes were placed in a thermoregulated chamber and pictures were taken every 5 min for 36 h with a digital Canon 70 D camera. For each slime mold, we measured the time of appearance of the first pseudopod, which is an indicator of the slime mold healing process, as well as the expansion rate. Expansion rate was computed as the difference between the final surface (the area of the slime molds when it reached a distance of 15mm from its original location) and the initial surface (the area of the slime mold when we started the experiment) divided by the time to reach the final surface. The pictures were analyzed using the software Image J.

2.3.3.9. Statistical analysis

To assess the difference in the various parameters measured between the treatments, we used linear models, or linear mixed models, or generalized mixed model (function `lm` or `lmer` or `glmer`, Package `lme4`) in R (RStudio Version 1.2.1335). The models were fitted by specifying the fixed effects (explanatory variables) depending on the experiment: treatment (categorical predictor with two modalities: Control and CNT), the route of exposure (categorical predictor with three modalities: Food, Environment, and Topical), and/or the exposure duration (continuous

predictor, from weeks 1 to 6). When needed, a random effect: the slime mold identity was also added to the model. The dependent variables that did not fit linear model requirements were transformed using the 'bestNormalize' function ('bestNormalize' package). The outcomes of all the models are presented in the supplementary information (**Tables S1–S13**).

2.3.4. Results

Our main objective was to investigate the fate of DWCNTs in slime molds and their potential effect on behavior. *Physarum polycephalum* crawls over the soil surface where it can encounter various materials, including DWCNTs.

2.3.4.1. Internalization of pristine DWCNTs by slime molds

Our first objective was to identify the most efficient route of exposure to DWCNTs to maximize their internalization. The number of static DWCNTs agglomerates was considerably high when the slime mold encountered the DWCNTs while exploring their environment, five times higher than when DWCNTs were presented together with food ($p < 0.001$, **Figure 10(A)**, **Table S4**) and fifteen times higher than when DWCNTs were dropped directly on the slime mold ($p < 0.001$, **Figure 10(A)**, **Table S4**). The number of circulating DWCNTs agglomerates was also significantly higher when food or the environment were the routes of exposure when compared to the topical application ($p < 0.001$, $p < 0.001$, and $p = 0.513$ for Food vs Topical, Environment vs Topical and Food vs Environment respectively, **Figure 10(B)**, **Table S5**). When the slime molds were exposed to DWCNTs by topical application, black streaks were observed on the surface of the organism where the DWCNTs suspension was dropped. This clearly indicates that a significant proportion of DWCNTs was not internalized. These observations were later confirmed by picture and video analyses revealing that there were almost no static or circulating DWCNTs agglomerates in the slime mold.

2.3.4.2. Bioaccumulation of pristine DWCNTs into the slime mold

Here, the aim was to evaluate if DWCNTs accumulated within the slime mold when DWCNTs were added daily to the food for an extended period of time (6 weeks). Surprisingly despite daily exposure to DWCNTs, slime mold did not accumulate DWCNTs agglomerates over time. Both the number and the area of DWCNTs agglomerates remained constant between the first and the last week of exposure ($p = 0.213$ and $p = 0.639$, **Table S6**, **Table S7**, **Figure 11(A,B)**).

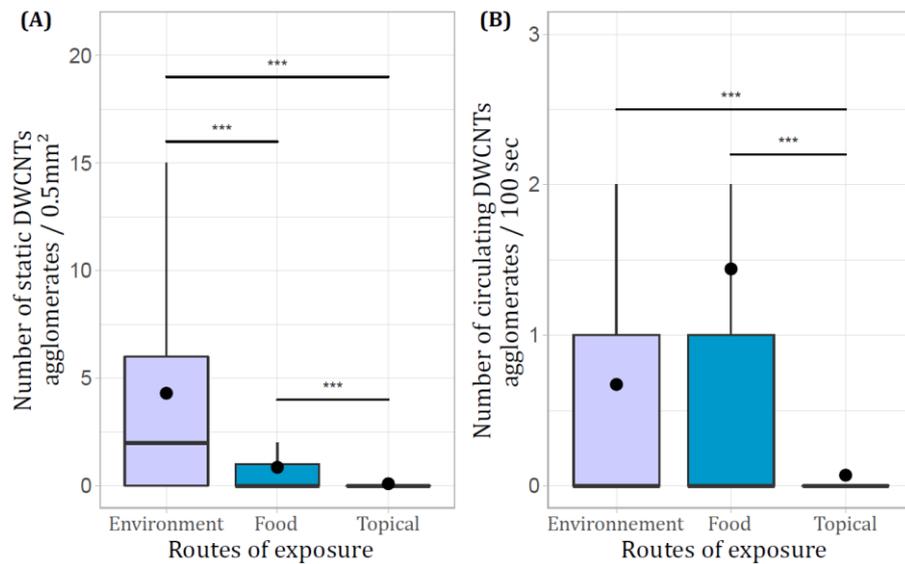


Figure 10 : Internalisation of pristine DWCNTs by slime molds.

Number of static (A) and circulating (B) DWCNTs agglomerates as a function of the route of exposure: environment, food or topical. A total of 2342 pictures and 310 videos were analysed. The boxes extend from lower to upper quartile values and vertical black lines extend to most extreme data point. The horizontal black lines indicate median values and the dots represent the mean. *** $p < 0.001$

2.3.4.3. Persistence of pristine DWCNTs into the slime mold

Even though DWCNTs did not accumulate over time, a certain quantity of DWCNTs were retained in the slime molds. Thus, we next examined if DWCNTs altered the induction of the dormant state and the reactivation of the slime mold and if they persisted throughout the dormant state. All the slime molds could enter a dormant state and be reactivated after 6 months regardless of the treatment. After one year, only 2 out of 40 slime molds could not be re-activated, one for each treatment. Hence, the DWCNTs did not alter the dormancy process. The number of static DWCNTs agglomerates dropped drastically after the dormant state ($p < 0.001$, **Table S8**, **Figure 11(C)**) regardless of the extent of exposure to DWCNTs ($p = 0.272$, **Table S8**, **Figure 11(C)**). We noticed that the filter papers holding the sclerotia were covered with black streaks which appeared to be DWCNTs agglomerates when observed with a binocular microscope. These observations provide evidence that the DWCNTs agglomerates internalized by slime molds were later excreted before entering the dormant state.

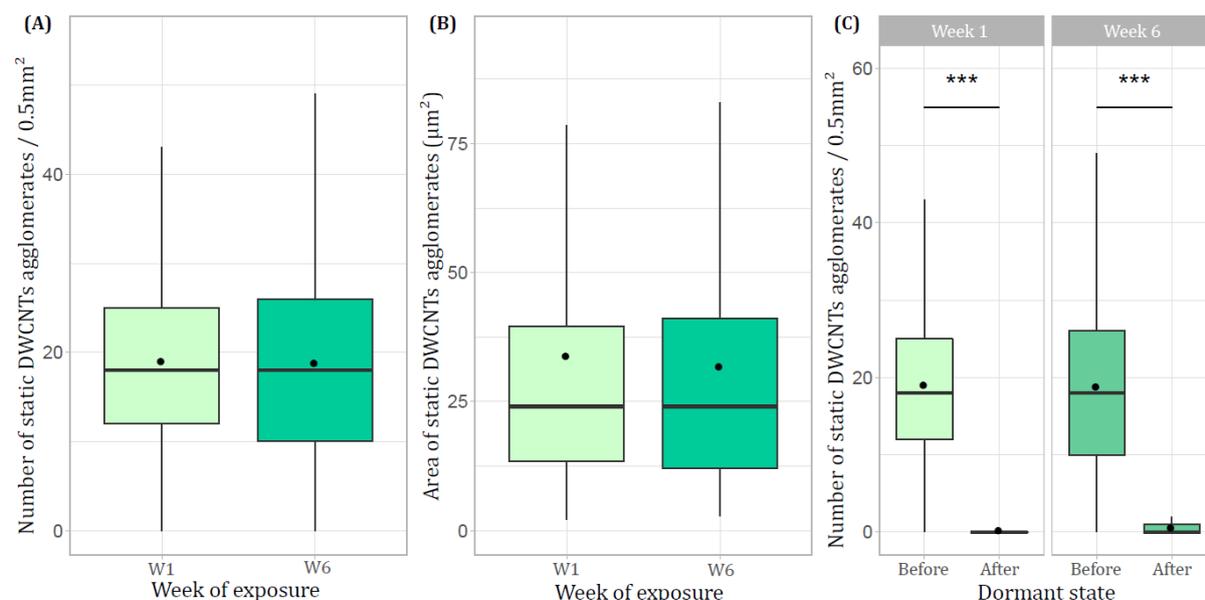


Figure 11 : Bioaccumulation and persistence of pristine DWCNTs into the slime mold.

(A) Number of static DWCNTs agglomerates as a function of the number of weeks of exposure. ($n=416$ and $n=368$ pictures analysed for week 1 and week 6 respectively); (B) Area of the static agglomerates as a function of the number of weeks of exposure ($n=317$ and $n=297$ pictures analyzed for week 1 and week 6 respectively); (C) Number of static DWCNTs agglomerates before and after entering a dormant state ($n=864$ and $n=1687$ pictures analysed before and after entering the dormant state respectively). The boxes extend from lower to upper quartile values and vertical black lines extend to most extreme data point. The horizontal black lines indicate median values and the dots represent the mean. $***p<0.001$

2.3.4.4. Excretion of pristine DWCNTs from the slime mold

Knowing that slime molds did not accumulate DWCNTs and could excrete them in the environment, we examined the duration and dynamics of excretion of DWCNTs for slime molds exposed only once to DWCNTs. Both the number of static and circulating DWCNTs agglomerates dropped drastically after 24 h (Time effect $p<0.001$, **Table S9**, **Table S10**, **Figure 12(A,B)**). 24 h after a single exposure to DWCNTS static and circulating agglomerates were spotted in half of the pictures and the videos, respectively. 79 h after the exposure only a few static DWCNTs agglomerates were spotted on 2 pictures out of 420 and a single occurrence of circulating DWCNTs agglomerates was recorded out of 60 videos. As expected, the number of static agglomerates is highly correlated to the number of circulating ones ($p<0.001$, **Figure 12(C)**). The area of the static agglomerates did not change through time (time effect $p=0.714$, **Table S11**).

2.3.4.5. Migration speed following a single exposure to DWCNTs

Here, the objective was to investigate if a single exposure to DWCNTs altered the slime mold migration speed depending on the route of exposure. When the DWCNTs were associated with the food, the slime molds were significantly slower than the controls ($p<0.001$, **Table S12**, **Figure 13(A)**). In contrast, we observed no difference in speed between the slime molds exposed to DWCNTs and the controls when they were exposed via the environment or via a topical application ($p=0.626$ and $p=0.685$, respectively, **Table S13**, **Table S14**, **Figure 13(B,C)**).

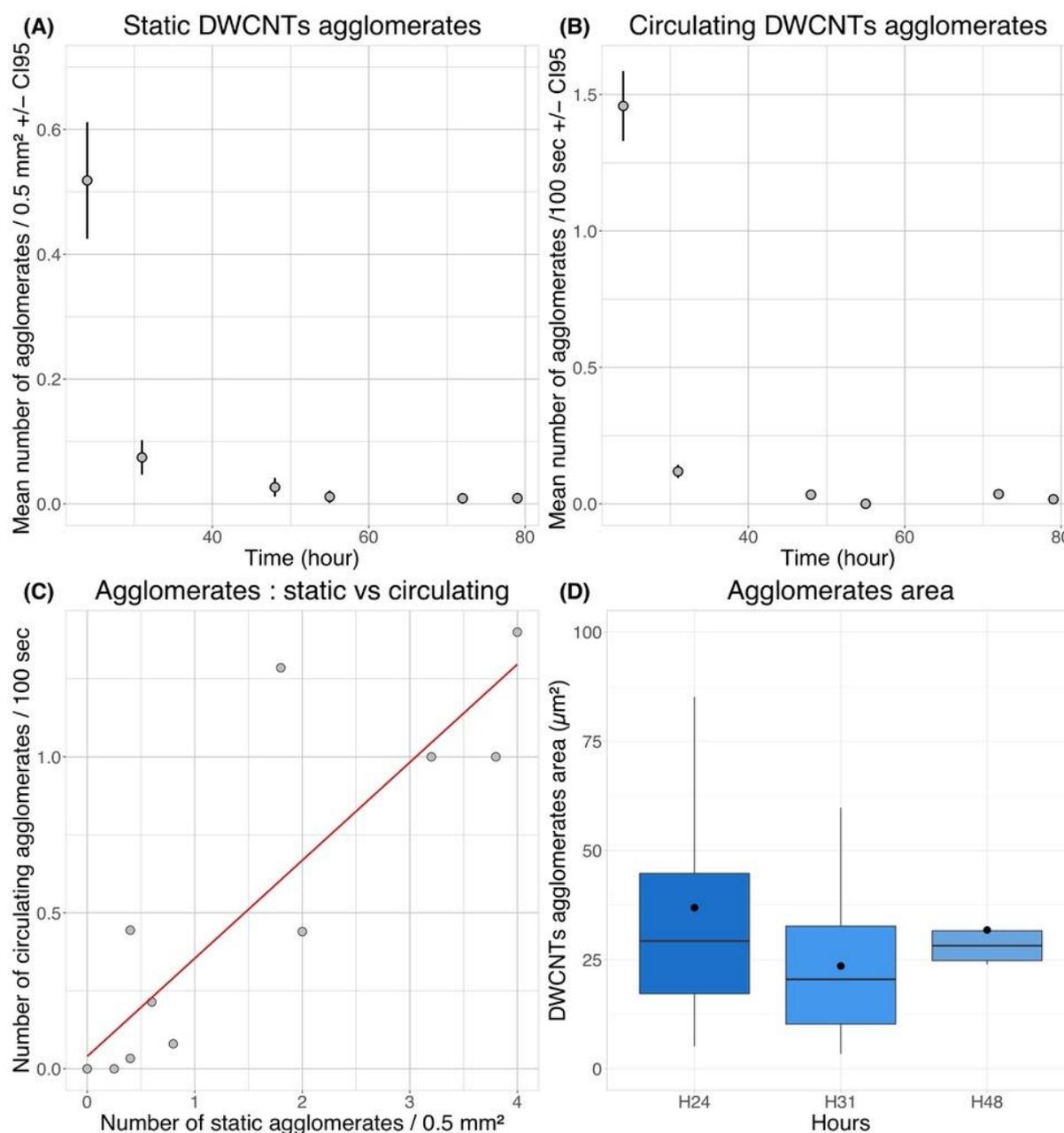


Figure 12 : Excretion of pristine DWCNTs from the slime mold.

Number of static (per 0.5 mm²) (A) and circulating (per 100s) (B) DWCNTs agglomerates observed for slime molds exposed once to DWNTs. n= 1688 pictures and n=352 videos analyzed. Error bars are Confidence intervals. (C) Correlation between the number of static aggregates and the number of circulating ones (n=12 plasmodia). The red line corresponds to the regression line (p<0.001, R²=0.77). (D) Area of the static agglomerates as a function of time (n=280 agglomerates in total). The boxes extend from lower to upper quartile values and vertical black lines extend to most extreme data point. The horizontal black lines indicate median values and the dots represent the mean.

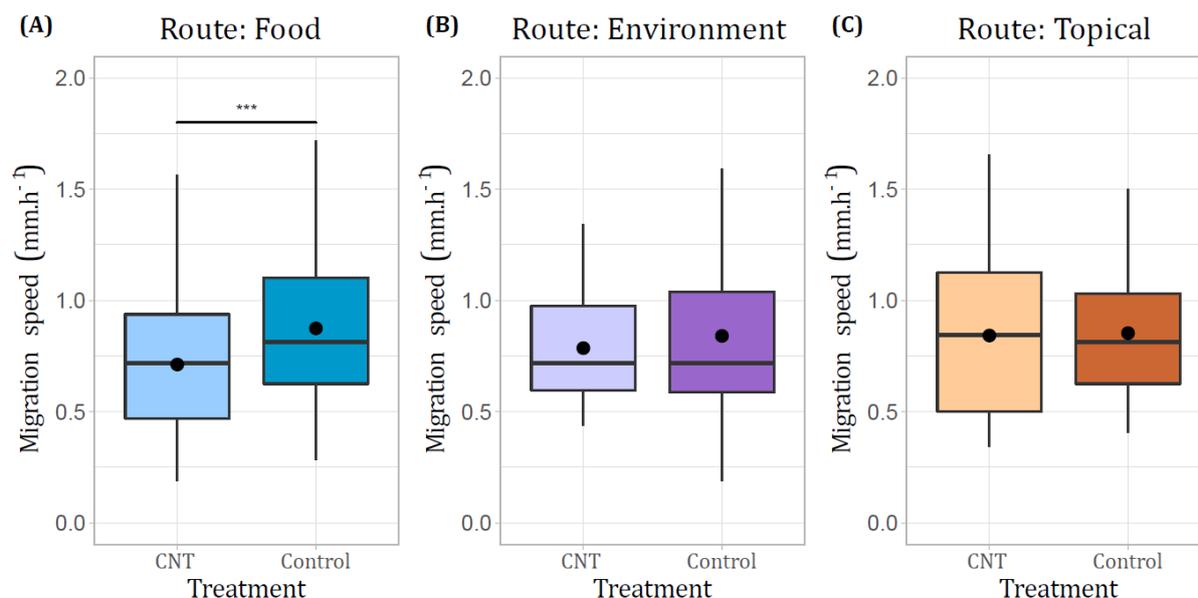


Figure 13 : Migration speed following a single exposure to DWCNTs as a function of the route of exposure: environment, food or topical.

80 slime molds per treatment and per route of exposure were observed. The boxes extend from lower to upper quartile values and vertical black lines extend to most extreme data point. The horizontal black lines indicate median values and the dots represent the mean. *** $p < 0.001$.

2.3.4.6. First pseudopod and expansion rate following chronic exposure to DWCNTs

In the last experiment, the aim was to examine the effect of DWCNTs' daily exposure on performance. We used two proxies of performance: the appearance of the first pseudopod and the expansion rate. The delay in the appearance of the first pseudopod was longer when the organisms were exposed to the DWCNTs when compared to the controls (treatment effect $p < 0.001$, **Table S16(A)**, **Figure S4**). Similarly, the expansion rate was slower for the slime mold exposed to the DWCNTs when compared to the controls (treatment effect $p = 0.026$, **Table S16(B)**, **Figure S5**).

2.3.5. Discussion

Taken together, our results indicate that slime molds can internalize DWCNTs and that DWCNTS exposure affects behavioral performances. Deciphering the mechanisms responsible for CNTs' internalization into live cells is essential both from an ecological point of view but also to design CNT-based delivery systems. CNTs' toxicity or efficacy depends on their ability to cross cell boundaries and membranes. In slime molds, we demonstrated that as in other grazing protists (Ghafari et al., 2008) spreading out the CNTs in the environment or presenting them together with food were the most effective routes of exposure. As *P. polycephalum* continuously explores its environment in search of food, it phagocytoses microorganisms and continuously secretes a thick extracellular slime (Reid et al., 2012). Hence slime molds can either internalize CNTs through phagocytosis while feeding or trapped CNTs in their own mucus while crawling on the substrate.

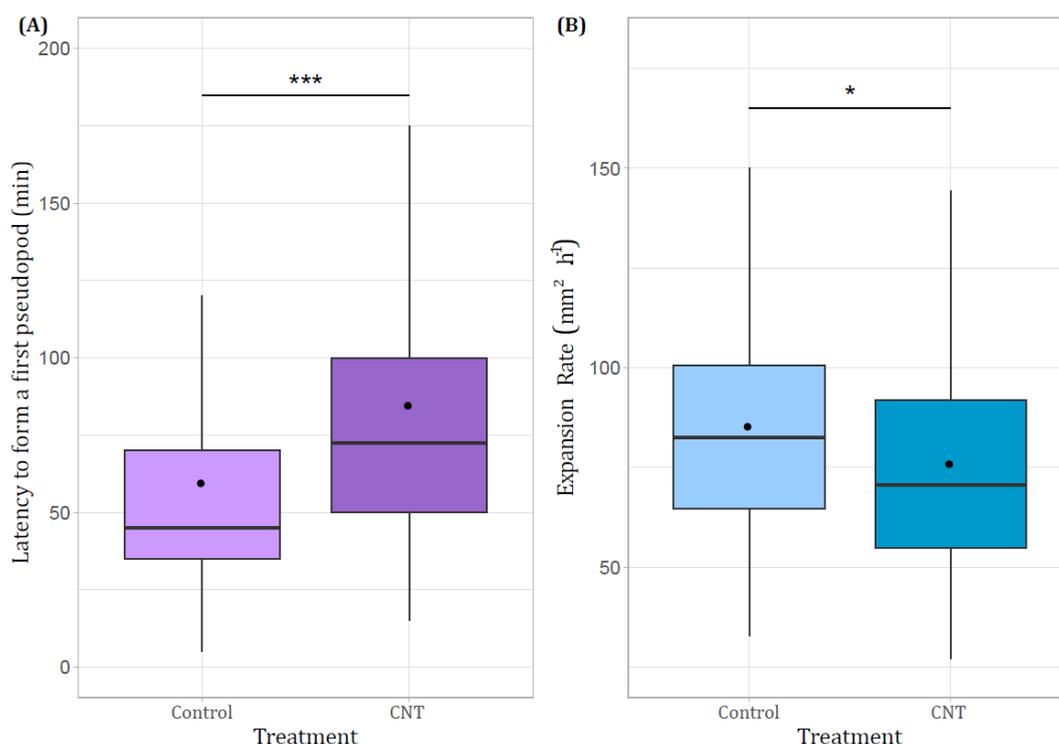


Figure 14 : Behaviour analyses.

(A) Latency to form a first pseudopod following a chronic exposure to DWCNTs. (B) Expansion rate following a chronic exposure to DWCNTs. 40 slime molds were observed per treatment and per week for a total of 480 slime molds. The boxes extend from lower to upper quartile values and vertical black lines extend to most extreme data point. The horizontal black lines indicate median values and the dots represent the mean. * $p < 0.05$; *** $p < 0.001$

The topical application of CNTs was the least effective route of exposure. The presence of black streaks where the CNTs were deposited indicates that the CNTs were not all passively internalized through membrane pores. In slime molds, objects smaller than 1 mm can be endocytosed within vesicles (Gizzie, Mayne, & Adamatzky, 2016; Mayne et al., 2011; Mayne & Adamatzky, 2015). For instance, Mayne et al. (2011) showed that magnetite nanoparticles can be internalized by endocytosis in slime molds.

CNTs are persistent in the environment due to their low biodegradation, so the assessment of their potential for bioaccumulation is of major concern (Bjorkl et al., 2017). Despite a daily exposure to CNTs via food for 6 weeks, no bioaccumulation was observed within the cell of *P. polycephalum*. Hence, slime molds were internalizing and eliminating CNTs continuously for 6 weeks. Most living organisms, when exposed to CNTs, eliminate these nanoparticles quickly. For instance, mussels, zebrafish, oligochaete, lugworms, and earthworms exposed to CNTs for more than 2 weeks eliminate the nanoparticles within a couple of days (Cheng et al., 2009; Galloway et al., 2010; Hanna et al., 2014; S. Li et al., 2013; Petersen et al., 2008b). In the excretion experiment, we showed that there was a drop in the numbers of static and circulating CNTs agglomerates after 24 h, and the majority of CNTs were excreted from the cell at 48 h post-exposure. Therefore, the egestion of CNTs from the cell occurred rapidly which explains why only a few CNTs agglomerates persisted throughout the sclerotization process which lasts at least 72 h in average. We noticed significant black streaks on the filter paper where the slime had migrated before going into dormancy. These observations corroborate that slime molds egested most of the CNTs back in the

environment before entering a dormant state. The egestion of CNTs raises the possibility that these CNTs might have been ingested again when the slime explored the filter paper upon awakening. We attempted to quantify the CNTs agglomerates excreted by the slime molds in the environment. We noticed that the number of agglomerates detected in the environment was very low (**Figure S6**). However, our counting methods were rather rough, as agglomerates smaller than 5 mm could not be detected with our binocular microscope.

CNTs have been shown to impact many microorganisms (M. Chen et al., 2019) and slime molds are no exception (Gizzie, Mayne, & Adamatzky, 2016). In our experiment, we observed that both a single and chronic exposure to CNTs affected the slime mold behavior. We noticed that slime moved more slowly when exposed to CNTs while foraging (**Figure 13(A)**) or exploring (**Figure 14**). These differences could result from a defect in the motor or growing systems as movement and growth are intimately connected in slime molds. We can propose various processes that might explain our results based on in vitro and in vivo studies performed on various eukaryotic cell lines. First, direct contact with CNTs might have damaged the cell membrane and altered its function (Kang, Mauter, et al., 2008). This could explain the delay in forming the first pseudopod (**Figure 14(A)**). Second, internalization of CNTs might have led to the production of reactive oxygen species which in turn might have altered the structure and function of the cells (Andersen et al., 2009; M. Chen et al., 2019; Müller et al., 2010; Pacurari et al., 2012; Singh et al., 2014; R. K. Srivastava et al., 2011). Last, once inside the cell, CNTs might have interacted with intracellular filaments: actin (Holt et al., 2010, 2012; Shams et al., 2014), DNA (X. Li, Peng, & Qu, 2006; Sargent et al., 2012; Singh et al., 2014) and tubulin polymers (microtubules) (X. Li, Peng, & Qu, 2006; X. Li, Peng, Ren, et al., 2006; Pampaloni & Florin, 2008) leading to migratory defects, DNA breakage and mitotic blockage. Interestingly, the deleterious effects produced by SWCNTs and MWCNT reported in the literature differ. SWCNTs interact mostly with DNA (Dong et al., 2015; García-Hevia et al., 2014; X. Li, Peng, & Qu, 2006; Rodriguez-Fernandez et al., 2012; Sargent et al., 2012; Singh et al., 2014), while MWCNTs interfere with actin and microtubules (Dong et al., 2015; García-Hevia et al., 2014; Rodriguez-Fernandez et al., 2012). However, the reason for such differences is difficult to explain because authors have worked with CNTs exhibiting different morphologies (bundling, length) and may simply have focused on different endpoints. Movement in slime molds, as mentioned earlier, relies on a driving force generated by the actin and myosin filaments surrounding the veins. Any change in actin filaments induced by CNTs might have induced a reorganization of the cell cytoskeleton at a larger scale and altered cell migration. Slime mold growth is associated with synchronous mitosis occurring every 8–10 h. Knowing that microtubules are responsible for DNA segregation during mitosis, any alteration of the microtubule cytoskeleton might have compromised cell growth.

2.3.6. Conclusion

The interaction between living organisms and CNTs is a critical issue. Here we showed that CNTs are taken up by slime molds and could therefore move up the food chain. In addition, we demonstrated that the internalization of CNTs altered the behavior of slime molds and by extend could impede their adaptability to the environment. Our results extend our current knowledge on CNTs and their effects on cellular systems and introduce the slime mold *P. polycephalum* as a

new model system to study CNTs toxicity. Slime molds offer multifaceted advantages. First, being giant cells, they allowed us to observe internalized CNTs agglomerates *in vivo* with little equipment. Second, being single-cell organisms, they enable us to measure the impact of CNTs at the cell level on multiple parameters: morphology, motility, and differentiation. Third, slime molds exhibit primitive forms of cognition (such as learning, memory, anticipation, and decision making) and thus provide an ideal model to measure the impact of CNTs on behavior (Vallverdú et al., 2018). Lastly, slime molds display many features of animal cells such as high molecular complexity and a large diversity of signaling molecules (Schaap et al., 2016). As such, they could constitute an interesting model to test CNTs application in drug delivery and medical imaging in future studies.

2.3.6.1. Authors' contributions

M.T., A.D., and E.F. conceived and designed the experiments. E.F. carried out the chemical synthesis of the CNTs sample. M.T and M.M performed the experiments and collected the data. M.T and A.D. performed the statistical analyses. M.T and A.D. produced the figures. M.T., A.D., and E.F. wrote the manuscript. A.D. and E.F. secured funding. All authors gave final approval for publication.

2.3.6.2. Disclosure statement

No potential conflict of interest was reported by the author(s).

2.3.6.3. Funding

M.T. was financially supported by a grant from the 'Agence Nationale de la recherche' (reference no. ANR-17-CE02-0019- 01-SMARTCELL, Principal investigator: A.D.) and the University of Toulouse and the Région Occitanie/Université Paul Sabatier (reference no. ALDOCT001112, Principal investigator: A.D.). A.D. and E.F. were supported by the MITI 'Mission pour les initiatives transverses et interdisciplinaires' funded by the CNRS. (reference: NTCELL - Principal investigator: A.D.).

2.4. Expérience supplémentaire à la suite de la publication de l'article : Effet des DWCNT oxydés sur la vitesse de déplacement des plasmodes

Dans l'étude décrite précédemment ce sont les effets des DWCNT bruts, c'est-à-dire non fonctionnalisés, qui ont été évalués. Mais ce ne sont pas les seuls types de NTC qui existent et dont l'évaluation de la toxicité sur les organismes vivants devrait être étudiée. En parallèle de l'expérience de croissance sur pont précédente (**Figure 13**), nous avons réalisé un test de déplacement sur pont sur des plasmodes après une exposition unique aux DWCNT oxydés (Ox-DWCNT). Ces derniers sont des DWCNT avec des groupements carboxyles (-COOH) greffés en surface, ce qui chimiquement doit les rendre plus faciles à stabiliser dans l'eau (moins hydrophobes). La méthode utilisée pour les oxyder, le chauffage dans l'acide nitrique, est souvent utilisée pour purifier les nanotubes de carbone (élimination des résidus de catalyseur) et présente donc une réelle pertinence.

2.4.1.1. Méthode

Souche(s) : LU
Concentration(s) d'exposition : 100 µg/g
Durée(s) d'exposition : 1 jours
Type(s) d'expérience : Pont
Paramètre(s) mesuré(s) : Vitesse de déplacement (mm²/h)

De la même manière que précédemment (voir § 2.3.3.7), un plasmode circulaire (Ø 10 mm) de la souche LU a été placé au bord d'un pont (35 mm de long, 10 mm de large) composé de flan d'avoine (avoine à 10% mélangé à de l'agar à 1%). Le plasmode a été exposé au traitement (contrôle CMC, DWCNT brut ou DWCNT oxydé) juste après avoir été placé au bord du pont. A noter que pour chaque type de NTC, nous avons utilisé une solution de CMC qui avait été préparée à la même date que les suspensions de NTC respectives. Il y a donc deux solutions de CMC utilisées dans cette expérience. A noter que les DWCNT-oxydés ne sont pas préparés avec ajout de CMC, mais dans un souci d'avoir le même contrôle que les DWCNT nous l'avons conservée. Dans les méthodes générales (voir § 1.4.2.3) nous avons noté que la CMC peut induire une légère accélération du déplacement des plasmodes, donc un biais est possible dans ce cas pour l'évaluation de l'effet des Ox-DWCNT.

Une goutte de traitement (20 µL) a été déposée sur quelques flocons d'avoine placés sur le plasmode (traitement nourriture) (**Figure 15 (A)**), étalée sur le pont (traitement environnement) (**Figure 15 (B)**), ou déposée directement sur le plasmode (traitement topique) (**Figure 15 (C)**). Pour chaque voie d'exposition et chaque traitement, 80 plasmodes ont été testés, ce qui mène à 480 tests. Après une nuit d'incubation (~15h), les ponts ont été photographiés. La représentation graphique et les modèles statistiques des plasmodes DWCNT sont réalisés à partir du même jeu de données que l'expérience sur pont du chapitre 2 (voir § 2.3.4.5), à la différence que nous avons

Expérience supplémentaire à la suite de la publication de l'article : Effet des DWCNT oxydés sur la vitesse de déplacement des plasmodes

mesuré l'aire recouverte (en mm²) à l'aide du logiciel ImageJ, ce qui est plus précis que les distances parcourues. De même nous avons mesuré les aires recouvertes des plasmodes Ox-DWCNT. Nous avons calculé la vitesse de croissance à partir de l'aire mesurée sur les ponts, puis nous avons calculé un indice de performance (voir § 1.4.4) pour une meilleure visualisation de l'effet des traitements DWCNT et Ox-DWCNT par rapport au contrôle.

Pour évaluer les différences des indices de performance selon le traitement, nous avons utilisé un modèle linéaire (fonction lm, famille d'erreur : Gaussienne, Package lme4). Le modèle a été ajusté en spécifiant les effets fixes : traitement, voie d'exposition (prédicteurs catégoriques). La variable dépendante a été normalisée à l'aide de la fonction bestNormalize (Package bestNormalize). Une comparaison par paires (correction de Satterthwaite, Package emmeans) des effets de la voie d'exposition sur chacune des modalités de la variable traitement a ensuite été réalisée.

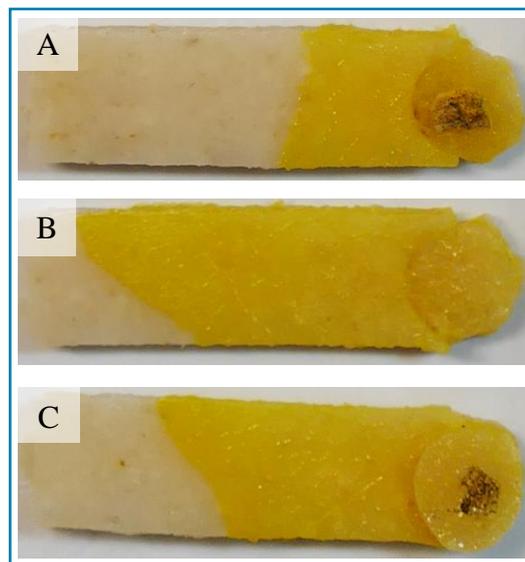


Figure 15 : Croissance des plasmodes sur les ponts selon 3 voies d'exposition : nourriture (A), environnement (B), topique (C).

2.4.1.2. Résultats

Le modèle complet (avec interaction : [Traitement] x [Voie d'exposition]) est significativement différent du modèle sans interaction, nous la gardons dans le modèle.

Il y a une différence entre les voies d'exposition par la nourriture et par l'environnement ($p = 0,001$, **Tableau S17**) indépendamment du traitement. Graphiquement nous observons que les plasmodes DWCNT semblent plus ralentis par la voie d'exposition nourriture, et les plasmodes Ox-DWCNT sont plus ralentis par la voie d'exposition environnement (**Figure 16**). Il y a également un effet d'interaction significatif du traitement et des voies d'exposition, nous réalisons une comparaison par paire.

Pour les plasmodes DWCNT, il y a une différence entre les voies d'exposition « environnement » et « nourriture », et une différence marginale entre les voies « topique » et « nourriture » ($p = 0,004$ et $p = 0,073$ respectivement, **Tableau S18**). Les plasmodes DWCNT exposés par la

nourriture sont ralentis par rapport aux plasmodes CMC. Pour les plasmodes Ox-DWCNT, il y a une différence entre les voies d'exposition « environnement » et « topique » ($p = 0,029$, **Tableau S18**). Les plasmodes Ox-DWCNT exposés par l'environnement sont ralentis par rapport aux plasmodes CMC, ceux exposés par voie topique ont des vitesses similaires aux plasmodes CMC, et ceux exposés par la nourriture ont des vitesses similaires aux plasmodes CMC avec une tendance au ralentissement (visible graphiquement).

2.4.1.3. Conclusion

Les traitements DWCNT et Ox-DWCNT impactent différemment les plasmodes selon la voie d'exposition. Comme nous l'avons précédemment décrit (voir § 2.3.4.5), les plasmodes DWCNT sont ralentis par rapport aux plasmodes CMC quand ils sont exposés par la nourriture. Cela concorde avec le fait que c'est l'une des voies pour laquelle l'internalisation des NTC circulants est la plus efficace (voir § 2.3.4.1). Pour les plasmodes Ox-DWCNT c'est l'exposition par l'environnement qui ralentit le plus les plasmodes. Nous n'avons pas évalué l'internalisation des DWCNT oxydés dans les plasmodes selon les voies d'exposition. Nous ne savons donc pas s'ils seraient présents en plus grande quantité en circulation dans les veines après une exposition par l'environnement, ce qui pourrait expliquer le ralentissement des plasmodes. Même si ce n'est pas significatif, l'exposition par la nourriture semble également ralentir les plasmodes Ox-DWCNT, comme pour les plasmodes DWCNT.

Pour cette expérience, une exposition unique a été réalisée, potentiellement les plasmodes CMC ont été accélérés à cause de cette dernière (d'après comparaison de l'exposition à l'eau et à la CMC, § 1.4.2.3). Si c'est le cas, alors l'effet des Ox-DWCNT serait plus fort que ce que l'on visualise ici.

Le potentiel effet toxique des DWCNT oxydés mériterait d'être étudié, mais pour pouvoir comparer leurs effets à ceux des DWCNT bruts, dans notre cas, il faudrait utiliser une alternative à la CMC comme agent stabilisant et la remplacer par un agent qui ne modifie pas la vitesse de déplacement des plasmodes comparé à l'eau du robinet. Une autre option serait d'ajouter de la CMC dans la suspension d'Ox-DWCNT même si cette dernière n'en a pas besoin pour être stable.

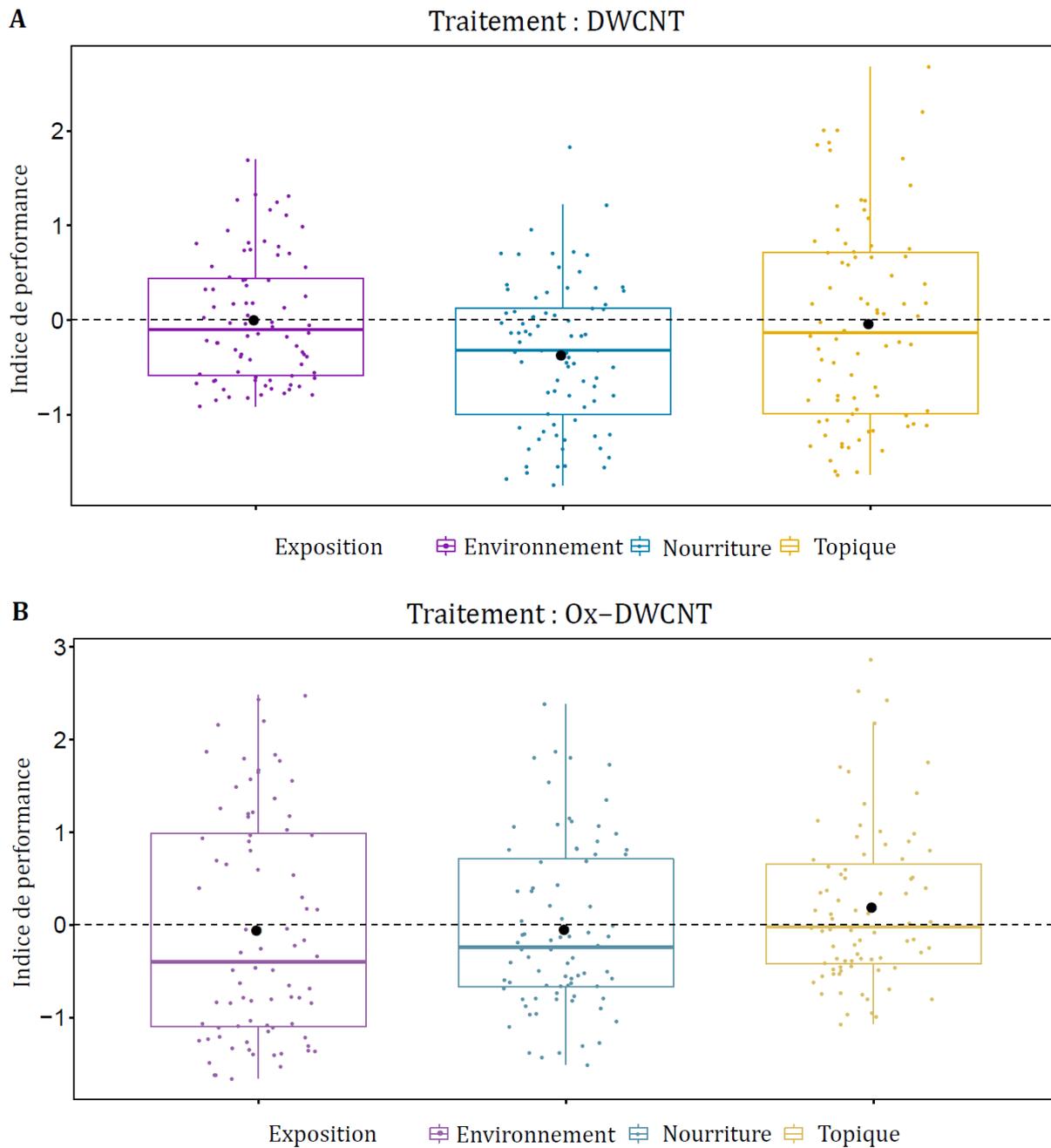


Figure 16 : Indice de performance des plasmodes DWCNT (A) ou Ox-DWCNT (B) selon 3 voies d'exposition.: nourriture, environnement, topique.

80 plasmodes par traitement et par voie d'exposition ont été testés. La médiane est représentée par une barre horizontale, la moyenne est représentée par un point noir.

2.5. Annexe 2 : Tableaux statistiques et figures supplémentaires

Internalisation: Number of static agglomerates					
<i>Predictors</i>	<i>Incidence Rate Ratios</i>	<i>CI</i>	<i>Z value</i>	<i>p</i>	<i>df</i>
Intercept	3.06	1.69 – 5.56	3.68	< 0.001	2338.00
[Environment] vs [Food]	0.17	0.08 – 0.38	-4.42	< 0.001	2338.00
[Environment] vs [Topical]	0.01	0.01 – 0.03	10.12	< 0.001	2338.00
Random Effects					
σ^2	1.46				
τ_{00} Replicate	1.10				
ICC	0.43				
N Replicate	48				
Observations	2342				
Marginal R ² / Conditional R ²	0.543 / 0.740				
Internalisation: Number of static agglomerates Pairwise comparisons					
<i>Predictors</i>	<i>Estimate</i>	<i>SE</i>	<i>z.ratio</i>	<i>p</i>	<i>df</i>
[Environment] vs [Food]	1.76	0.397	4.42	< 0.001	2338.00
[Environment] vs [Topical]	4.36	0.430	10.12	< 0.001	2338.00
[Food] vs [Topical]	2.60	0.395	-6.58	< 0.001	2338.00

Table S4 : Statistics associated to Figure 10 (A).

To assess the difference in internalization of DWCNTs between the three routes of exposure; we used a generalized linear mixed model (function *glmer*, error family: Poisson, Package *lme4*). The model was fitted by specifying the fixed effect: treatment (categorical predictor, routes of exposure) and the random effect: Replicate (slime mold identity). Pairwise comparisons were conducted using the package *emmeans* (method= pairwise).

Internalisation: Number of circulating agglomerates					
<i>Predictors</i>	<i>Incidence Rate Ratios</i>	<i>CI</i>	<i>Z value</i>	<i>p</i>	<i>df</i>
Intercept	0.43	0.25 – 0.75	-2.98	0.003	306.00
[Environment] vs [Food]	1.53	0.72 – 3.27	1.10	0.271	306.00
[Environment] vs [Topical]	0.10	0.03 – 0.29	-4.25	<0.001	306.00
Random Effects					
σ^2	1.56				
τ_{00} Replicate	1.14				
ICC	0.42				
N Replicate	62				
Observations	310				
Marginal R ² / Conditional R ²	0.345 / 0.622				

Internalisation: Number of circulating agglomerates					
Pairwise comparisons					
<i>Predictors</i>	<i>Estimate</i>	<i>SE</i>	<i>Z.ratio</i>	<i>p</i>	<i>df</i>
[Environment] vs [Food]	-0.43	0.387	-1.10	0.513	2338.00
[Environment] vs [Topical]	2.32	0.546	4.24	<0.001	2338.00
[Food] vs [Topical]	2.75	0.547	5.02	<0.001	2338.00

Table S5 : Statistics associated to Figure 10 (B).

To assess the difference in internalization of DWCNTs between the three routes of exposure; we used a generalized linear mixed model (function *glmer*, error family: Poisson, Package *lme4*). The model was fitted by specifying the fixed effect: treatment (categorical predictor, routes of exposure) and the random effect: Replicate (slime mold). Pairwise comparisons were conducted using the package *emmeans* (method= pairwise).

Accumulation: Number of static agglomerates					
<i>Predictors</i>	<i>Incidence Rate Ratios</i>	<i>CI</i>	<i>Z value</i>	<i>p</i>	<i>df</i>
Intercept	19.01	18.01 – 20.07	106.82	<0.001	781.00
[Time] (Week)	0.98	0.95 – 1.01	-1.25	0.213	781.00
Random Effects					
σ^2	0.05				
τ_{00} Replicate	0.01				
ICC	0.10				
N Replicate	9				
Observations	784				
Marginal R ² / Conditional R ²	0.002 / 0.101				

Table S6 : Statistics associated to Figure 11 (A).

To assess accumulation of DWCNTs throughout the weeks; we used a generalized linear mixed model (function *glmer*, error family: Poisson, Package *lme4*). The model was fitted by specifying the fixed effect: Time (categorical predictor: Week1 vs Week 6) and the random effect: Replicate (slime mold identity).

Area					
<i>Predictors</i>	<i>Estimates</i>	<i>CI</i>	<i>Statistic</i>	<i>p</i>	<i>df</i>
Intercept	-0.01	-0.21 – 0.19	-0.10	0.920	606.00
[Week]	-0.04	-0.20 – 0.12	-0.47	0.639	606.00
Random Effects					
σ^2	0.95				
τ_{00} Replicate	0.06				
ICC	0.06				
N Replicate	9				
Observations	610				
Marginal R ² / Conditional R ²	0.000 / 0.063				

Table S7 : Statistics associated to Figure 11 (B).

To assess the difference in agglomerates area throughout the weeks; we used a linear model (function *lmer*, Package *lme4*). We used linear mixed model (function *lmer*, error family: Gaussian, Package *lme4*). The model was fitted by specifying the fixed effects: week (continuous predictor, week 1 to week 6) and the random effect: Replicate (slime mold identity). The dependent variable (area) was normalized using the function *bestNormalize* (Package *bestNormalize*).

Persistence: Number of static agglomerates					
<i>Predictors</i>	<i>Incidence Rate Ratios</i>	<i>CI</i>	<i>Statistic p</i>		<i>df</i>
Intercept	0.40	0.31 – 0.50	-7.92	<0.001	2507.00
[Time] (after/before dormancy)	47.83	42.85 – 53.39	68.95	<0.001	2507.00
[Week]	1.02	0.99 – 1.05	1.10	0.272	2507.00
Random Effects					
σ^2	0.48				
τ_{00} Replicate	0.24				
ICC	0.33				
N _{Replicate}	20				
Observations	2511				
Marginal R ² / Conditional R ²	0.817 / 0.878				

Table S8 : Statistics associated to Figure 11 (C).

To assess persistence of DWCNTs after the dormancy period; we used a generalized linear mixed model (function *glmer*, error family: Poisson, Package *lme4*). The model was fitted by specifying the fixed effects: Time (categorical predictor: After vs Before dormancy), Week (categorical factor: Week 1 vs Week 6) and the random effect: Replicate (slime mold identity).

Excretion: Number of static agglomerates					
<i>Predictors</i>	<i>Incidence Rate Ratios</i>	<i>CI</i>	<i>Z value</i>	<i>p</i>	<i>df</i>
Intercept	0.32	0.05 – 1.99	-1.22	0.223	1625.00
[Time] (Hours)	0.93	0.89 – 0.96	-3.92	<0.001	1625.00
Random Effects					
σ^2	5.62				
τ_{00} Replicate	4.52				
ICC	0.45				
N Replicate	72				
Observations	1628				
Marginal R ² / Conditional R ²	0.177 / 0.544				

Table S9 : Statistics associated to Figure 12 (A).

To assess excretion of static DWCNTs agglomerates throughout time; we used a generalized linear mixed model (function *glmer*, error family: Poisson, Package *lme4*). The model was fitted by specifying the fixed effect: Time (continuous predictor) and the random effect: Replicate (slime mold identity).

Excretion: Number of circulating agglomerates					
<i>Predictors</i>	<i>Incidence Rate Ratios</i>	<i>CI</i>	<i>Z value</i>	<i>p</i>	<i>df</i>
Intercept	2.76	0.54 – 14.23	1.21	0.225	349.00
[Time] (Hours)	0.91	0.88 – 0.95	-4.74	<0.001	349.00
Random Effects					
σ^2	4.72				
τ_{00} Replicate	2.40				
ICC	0.34				
N Replicate	72				
Observations	352				
Marginal R ² / Conditional R ²	0.329 / 0.555				

Table S10 : Statistics associated to Figure 12 (B).

To assess excretion of circulating DWCNTs agglomerates throughout time; we used a generalized linear mixed model (function *glmer*, error family: Poisson, Package *lme4*). The model was fitted by specifying the fixed effect: Time (continuous predictor) and the random effect: Replicate (slime mold identity).

<i>Predictors</i>	<i>Estimates</i>	Area			<i>p</i>	<i>df</i>
		<i>CI</i>	<i>Statistic</i>			
Intercept	0.13	-0.72 – 0.99	0.30	0.760	275.00	
[Week]	-0.01	-0.04 – 0.02	-0.37	0.714	275.00	
Random Effects						
σ^2	0.94					
τ_{00} Replicate	0.07					
ICC	0.07					
N Replicate	17					
Observations	279					
Marginal R^2 / Conditional R^2	0.001 / 0.071					

Table S11 : Statistics associated to Figure 12 (D).

To assess the difference in agglomerates area through time; we used a linear model (function `lmer`, Package `lme4`). We used linear mixed model (function `lmer`, error family: Gaussian, Package `lme4`). The model was fitted by specifying the fixed effects: week (continuous predictor, week 1 to week 6) and the random effect: Replicate (slime mold identity). The dependent variable (area) was normalized using the function `bestNormalize` (Package `bestNormalize`).

Migration speed - Route of Exposure: Food					
<i>Predictors</i>	<i>Estimates</i>	<i>CI</i>	<i>Statistic</i>	<i>p</i>	<i>df</i>
Intercept	0.25	0.03 – 0.46	2.29	0.024	158.00
[Treatment]	-0.50	-0.80 – -0.19	-3.23	0.001	158.00
Observations	160				
R ² / R ² adjusted	0.062 / 0.056				

Table S12 : Statistics associated to Figure 13 (A).

To assess the difference in migration speed between the two treatments when the route of exposure was food; we used a linear model (function *lm*, Package *lme4*). The model was fitted by specifying the fixed effect: treatment (categorical predictor, NTC vs Control). The dependent variable (migration speed) was normalized using the function *bestNormalize* (Package *bestNormalize*).

Migration speed - Route of Exposure: Environment					
<i>Predictors</i>	<i>Estimates</i>	<i>CI</i>	<i>Statistic</i>	<i>p</i>	<i>df</i>
Intercept	0.04	-0.18 – 0.26	0.35	0.726	158.00
[NTC vs Control]	-0.08	-0.39 – 0.23	-0.49	0.626	158.00
Observations	160				
R ² / R ² adjusted	0.002 / -0.005				

Table S13 : Statistics associated to Figure 13 (B).

To assess the difference in migration speed between the two treatments when the route of exposure was Environment; we used a linear model (function *lm*, Package *lme4*). The model was fitted by specifying the fixed effect: treatment (categorical predictor, NTC vs Control). The dependent variable (migration speed) was normalized using the function *bestNormalize* (Package *bestNormalize*).

Migration speed - Route of Exposure: Topical					
<i>Predictors</i>	<i>Estimates</i>	<i>CI</i>	<i>Statistic</i>	<i>p</i>	<i>df</i>
Intercept	0.03	-0.19 – 0.25	0.29	0.774	158.00
[NTC vs Control]	-0.06	-0.38 – 0.25	-0.41	0.685	158.00
Observations	160				
R ² / R ² adjusted	0.001 / -0.005				

Table S14 : Statistics associated to Figure 13 (C).

To assess the difference in migration speed between the two treatments when the route of exposure was Topical; we used a linear model (function *lm*, Package *lme4*). The model was fitted by specifying the fixed effect: treatment (categorical predictor, NTC vs Control). The dependent variable (migration speed) was normalized using the function *bestNormalize* (Package *bestNormalize*).

Latency first pseudopod					
<i>Predictors</i>	<i>Estimates</i>	<i>CI</i>	<i>Statistic</i>	<i>p</i>	<i>df</i>
Intercept	0.04	-0.22 – 0.31	0.32	0.747	474.00
[Treatment: NTC vs Control]	1.08	0.70 – 1.46	5.58	<0.001	474.00
[Week]	-0.10	-0.16 – -0.03	-2.82	0.005	474.00
[Treatment*Week]	-0.14	-0.24 – -0.05	-2.98	0.003	474.00
Random Effects					
σ^2	0.80				
τ_{00} Replicate	0.03				
ICC	0.03				
N Replicate	40				
Observations	480				
Marginal R ² / Conditional R ²	0.179 / 0.206				

Table S15 : Statistics associated to Figure 14 (A).

To assess the difference in latency to the first pseudopod between the two treatments; we used a linear mixed model (function *lmer*, error family: Gaussian, Package *lme4*). The model was fitted by specifying the fixed effects: treatment (categorical predictor, NTC vs Control), week (continuous predictor, week 1 to week 6) and the random effect: Replicate (slime mold identity). The dependent variable (migration speed) was normalized using the function *bestNormalize* (Package *bestNormalize*).

<i>Predictors</i>	Expansion rate				
	<i>Estimates</i>	<i>CI</i>	<i>Statistic</i>	<i>p</i>	<i>df</i>
Intercept	-0.40	-0.67 – -0.12	-2.83	0.005	474.00
[Treatment: NTC vs Control]	-0.44	-0.83 – -0.05	-2.22	0.026	474.00
[Week]	0.16	0.09 – 0.23	4.63	<0.001	474.00
[Treatment*Week]	0.03	-0.07 – 0.12	0.52	0.601	474.00
Random Effects					
σ^2	0.87				
τ_{00} Replicate	0.02				
ICC	0.02				
N Replicate	40				
Observations	480				
Marginal R ² / Conditional R ²	0.121 / 0.137				

Table S16 : Statistics associated to Figure 14 (B).

To assess the difference in expansion rate between the two treatments; we used linear mixed model (function *lmer*, error family: Gaussian, Package *lme4*). The model was fitted by specifying the fixed effects: treatment (categorical predictor, NTC vs Control), week (continuous predictor, week 1 to week 6) and the random effect: Replicate (slime mold identity). The dependent variable (expansion rate) was normalized using the function *bestNormalize* (Package *bestNormalize*).

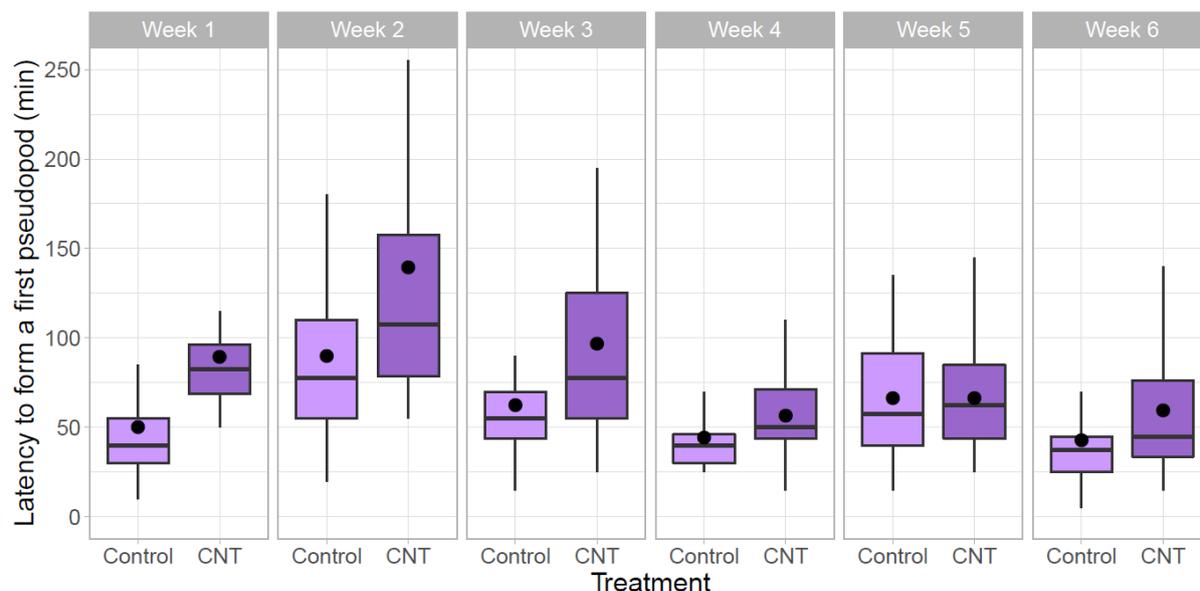


Figure S4: Figure associated to Figure 14 (A).

Latency to form a first pseudopod following a chronic exposure to DWCNTs. 40 slime molds were observed per treatment and per week for a total of 480 slime molds. The boxes extend from lower to upper quartile values and vertical black lines extend to most extreme data point. The horizontal black lines indicate median values and the dots represent the mean.

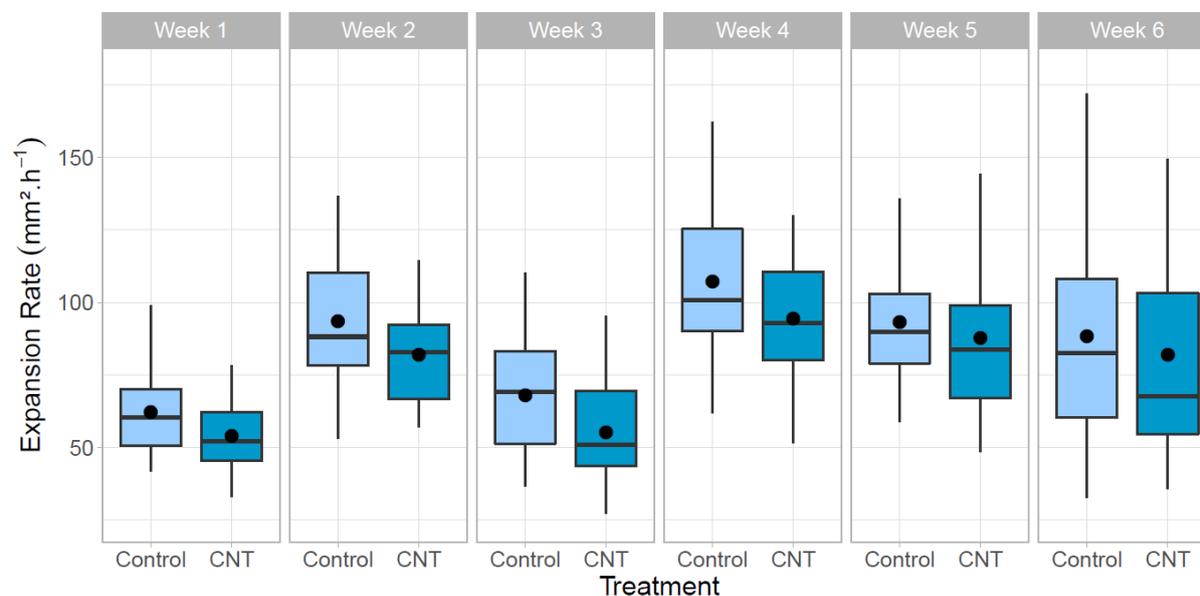


Figure S5: Figure associated to Figure 14 (B).

Expansion rate following a chronic exposure to DWCNTs. 40 slime molds were observed per treatment and per week for a total of 480 slime molds. The boxes extend from lower to upper quartile values and vertical black lines extend to most extreme data point. The horizontal black lines indicate median values and the dots represent the mean.

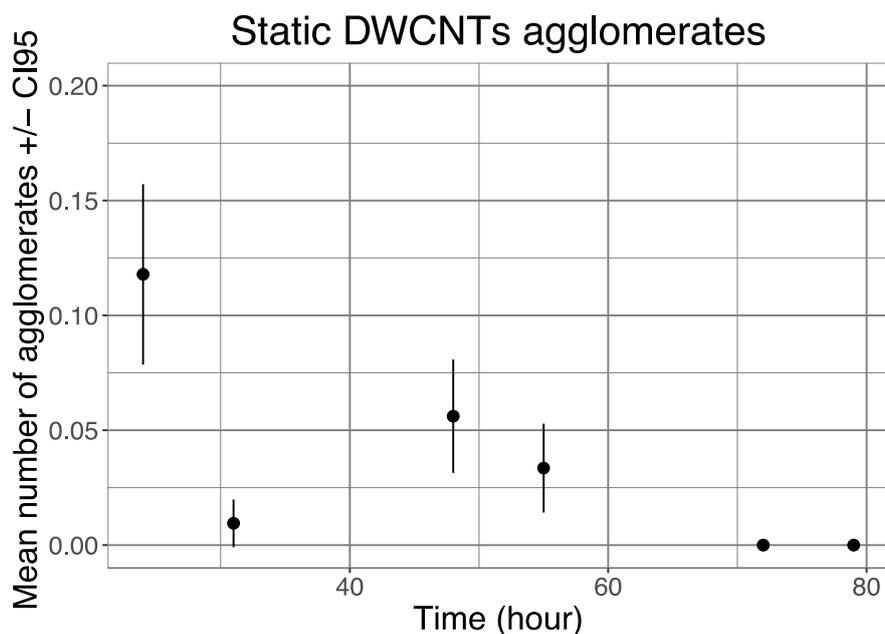


Figure S6 : DWCNTs excreted in the environment from the slime mold.

Number of static DWCNTs agglomerates observed in the mucus (in 0.5mm² zones) for slime molds exposed once to DWCNTs. N=1184 pictures analysed. Error bars are Confidence intervals.

Video S1: Video of a *P. polycephalum* vein. (<https://doi.org/10.6084/m9.figshare.14204404.v1>)

Circulation of DWCNTs in a vein of *P. polycephalum* exposed to DWCNTs via food.

Vitesse de déplacement : DWCNT et Ox-DWCNT					
Prédicteurs	Estimés	CI	Statistique	p	df
(Intercept)	0.15	-0.07 – 0.36	1.34	0.181	474.00
[DWCNT] vs [Ox-DWCNT]	-0.25	-0.55 – 0.06	-1.59	0.113	474.00
Exposition [Environnement] vs [Nourriture]	-0.50	-0.80 – -0.19	-3.20	0.001	474.00
Exposition [Environnement] vs [Topique]	-0.17	-0.48 – 0.13	-1.11	0.269	474.00
Traitement * Exposition [Nourriture]	0.62	0.19 – 1.06	2.84	0.005	474.00
Traitement * Exposition [Topique]	0.58	0.14 – 1.01	2.61	0.009	474.00
Observations	480				
R ² / R ² ajusté	0.041 / 0.031				

Tableau S17 : Statistiques associées à la Figure 16.

Pour évaluer les différences des indices de performance selon le traitement, nous avons utilisé un modèle linéaire (fonction *lm*, famille d'erreur : Gaussienne, Package *lme4*). Le modèle a été ajusté en spécifiant les effets fixes : traitement, voie d'exposition (prédicteurs catégoriques). La variable dépendante a été normalisée à l'aide de la fonction *bestNormalize* (Package *bestNormalize*).

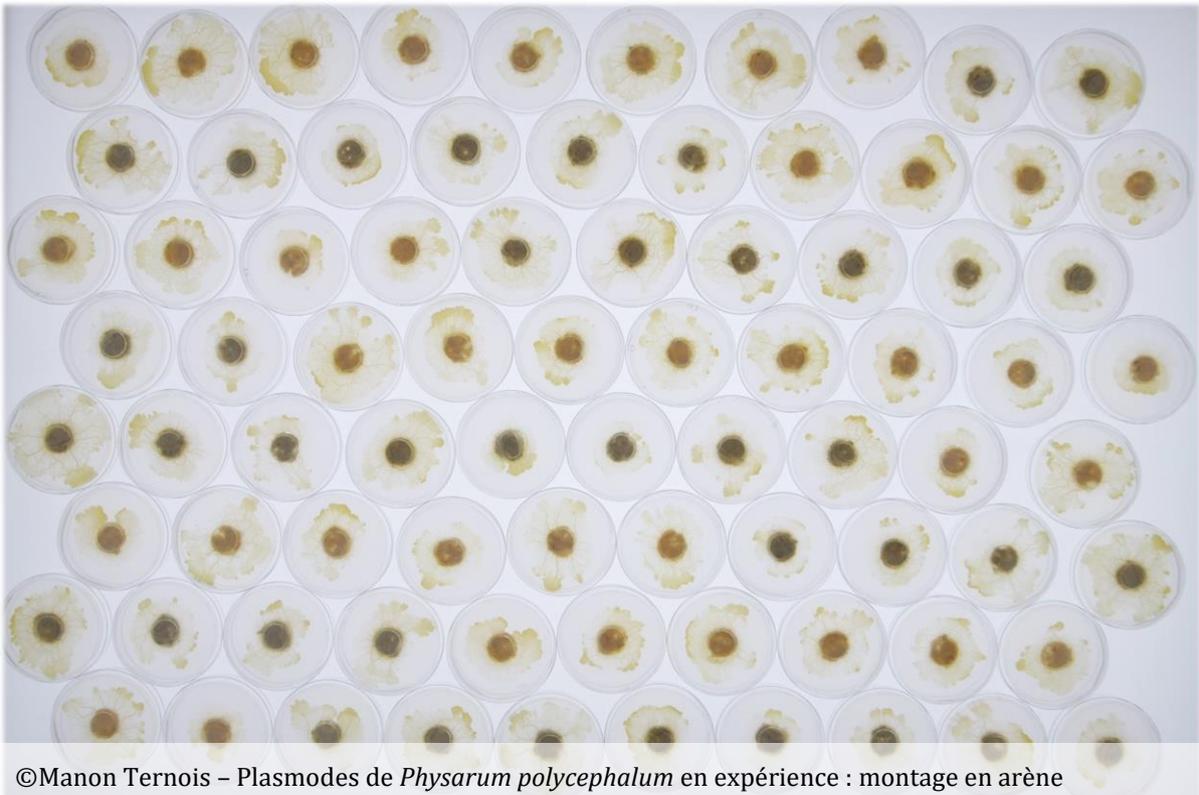
Latence 1 ^{er} pseudopode : Indice de performance Comparaison par paires					
Prédicteurs	Estimés	SE	df	t.ratio	p.value
[DWCNT]					
[Environnement] vs [Nourriture]	0.499	0.156	474	3.204	0.0043
[Environnement] vs [Topique]	0.172	0.156	474	1.108	0.2686
[Nourriture] vs [Topique]	-0.326	0.156	474	-2.097	0.0731
[Ox-DWCNT]					
[Environnement] vs [Nourriture]	-0.126	0.156	474	-0.809	0.4189
[Environnement] vs [Topique]	-0.403	0.156	474	-2.590	0.0296
[Nourriture] vs [Topique]	-0.277	0.156	474	-1.781	0.1510

Tableau S18 : Statistiques associées à la Figure 16.

Une comparaison par paires (correction de Satterthwaite, Package *emmeans*) des effets de la voie d'exposition sur chacune des modalités de la variable traitement a été réalisé.

Chapitre 2 : Réponse de *Physarum polycephalum* à l'exposition aux nanotubes de carbone :
de l'internalisation au comportement

3. Chapitre 3 : Effets des DWCNT sur le déplacement de *Physarum polycephalum*



©Manon Ternois - Plasmodes de *Physarum polycephalum* en expérience : montage en arène

3.1. Introduction

Physarum polycephalum est constamment en mouvement, le flux d'endoplasme à l'intérieur de la cellule s'écoule continuellement. Il permet à la cellule de transporter l'oxygène et les nutriments à travers toute la cellule (Aldrich, 2012; Oettmeier, 2019), et lui permet de se déplacer, ce qui est essentiel à sa survie : rejoindre une source de nourriture, éviter un environnement défavorable à sa croissance (luminosité trop forte, humidité trop faible, etc.), ou rejoindre des sources de nutriments (Kobayashi et al., 2006). L'effet des NTC sur la mobilité de cellules de différents types (Ravanbakhsh et al., 2020; Y. Sun et al., 2021; P. Zhang et al., 2020), dont *P. polycephalum* (Gizzie, Mayne, & Adamatzky, 2016; Ternois et al., 2021) a déjà été évalué (voir Chapitre 2). L'avantage de *P. polycephalum* est que son déplacement est facilement observable, et que sa vitesse peut être mesurée, nous souhaitons donc aller plus loin dans l'évaluation des effets des DWCNT sur la vitesse de déplacement des plasmodes. Pour cela nous utilisons deux expériences différentes : montage en arène, ou montage sur ponts (**Figure 6**).

L'évaluation du comportement exploratoire et de la vitesse de déplacement de *P. polycephalum* en fonction du substrat a précédemment été réalisée en plaçant les plasmodes dans des arènes (Patino-Ramirez et al., 2019, 2021; Vogel et al., 2015). L'avantage de cette méthode est qu'elle permet d'observer le déplacement des plasmodes au cours du temps sans contraindre leurs mouvements, et leur laisser la possibilité d'explorer sans contrainte spatiale. Inspiré de ces expériences, dans un premier temps, nous avons réalisé des expériences en arène pour évaluer la vitesse de déplacement. Nous avons effectué un suivi temporel des plasmodes en mesurant plusieurs paramètres morphologiques (aire, périmètre, circularité, solidité) au cours du temps pour évaluer l'effet des DWCNT. Lors du déroulement de ces expériences, nous découpons un plasmode circulaire à partir d'un large plasmode « mère » que nous déposons ensuite au centre de l'arène. Suite à cette étape, le plasmode cicatrise (Bäuerle et al., 2017) et se réorganise avant de recommencer à se déplacer et former une excroissance de la membrane que l'on appelle pseudopode. Notre objectif est d'évaluer l'effet des DWCNT sur le début du déplacement de *P. polycephalum* en mesurant la latence d'apparition du premier pseudopode, et d'évaluer sa vitesse de déplacement en mesurant la latence pour que le plasmode atteigne le bord de l'arène.

Si la majorité des expériences comportementales sur des myxomycètes sont réalisées sur le plasmode de l'espèce *P. polycephalum*, plusieurs souches (génotypes) sont disponibles dans les laboratoires. Une souche est un ensemble de plasmodes génétiquement identiques (Vogel et al., 2015). Diverses études comportementales ont montré que, selon les souches, les vitesses de déplacement et les comportements des plasmodes diffèrent (Dussutour et al., 2019; Vogel et al., 2015). Nous avons donc réalisé nos expériences sur plusieurs souches afin d'évaluer l'effet des DWCNT en fonction du génotype du plasmode. En complément, nous avons testé également une autre espèce de myxomycètes : *Badhamia utricularis* qui fait partie de la famille Physaridae comme *P. polycephalum* et dont le comportement est comparable. Notre objectif est d'évaluer si les DWCNT affectent différemment les souches.

La toxicité des NTC, que ce soit *in vivo* ou *in vitro* varie en fonction du type de nanotube (nombre de parois, longueur, fonctionnalisation, pureté chimique, dispersant) mais aussi en fonction des paramètres des tests tels que la durée d'exposition (Francis & Devasena, 2018). Les effets des NTC selon la durée d'exposition sont importants à évaluer car nous connaissons assez peu l'exposition réelle (court, moyen, long terme) des êtres-vivants aux NTC, y compris les êtres-humains (Canu et al., 2020). Des études ont évalué l'effet des NTC sur des organismes du sol en fonction de la durée d'exposition, ce dernier n'étant pas forcément linéaire (augmentation ou diminution de l'effet avec une augmentation de la durée d'exposition). Par exemple, F. Wu et al. (2019) ont observé une augmentation de la diversité bactérienne dans des sols après 4 semaines et 8 semaines d'exposition, pour une dose de 1000 µg/g de SWCNT. En revanche pour une dose plus élevée de 5000 µg/g de SWCNT, la diversité a augmenté jusqu'à 4 semaines d'exposition puis a diminué après 8 semaines. Une autre étude par les mêmes auteurs a ensuite montré que les SWCNT provoquent une augmentation de la diversité bactérienne après 4 semaines d'exposition, et qu'il y a une baisse de la diversité bactérienne après 51 semaines d'exposition (F. Wu et al., 2021). L'effet des NTC peut donc varier selon la durée d'exposition. C'est la raison pour laquelle nous avons évalué la vitesse de déplacement des plasmodes après 1, 2, 3, 7 et 8 semaines d'exposition, ce qui nous semble être des durées pertinentes si nous considérons le cycle de vie de *P. polycephalum*. Notre objectif est d'évaluer si les effets des DWCNT sont modifiés par la durée d'exposition.

Nous savons que *P. polycephalum* est résilient face à certaines perturbations environnementales : la fréquence de contraction des veines peut augmenter ou ralentir avec la présence d'un stimulus (comme la température), et redevient normale quand le stimulus n'est plus présent (S. Chen & Alim, 2023; Miyake et al., 1994; T. Ueda et al., 1980) ; le plasmode est ralenti suite à une blessure, puis cicatrise et récupère un rythme de contraction normal (Bäuerle et al., 2017) ; il est capable de s'habituer à un composé chimique et s'en déshabitue quand il n'y est plus exposé (Boisseau et al., 2016). Nous avons donc mesuré la récupération des plasmodes à la suite de l'arrêt de l'exposition aux DWCNT.

Un autre paramètre qui joue sur la toxicité des NTC est la concentration d'exposition (Francis & Devasena, 2018). Il a été montré que pour une exposition des vers de terre à 50 µg/g de MWCNT il y a une augmentation de l'activité de certains isoformes de cytochromes P450 et de l'enzyme antioxydante Superoxyde dismutase (SOD), alors que ces mêmes enzymes sont inhibées pour une exposition à 100 µg/g de MWCNT (X. Yang et al., 2022). La biomasse et la diversité des communautés bactériennes est également affectée selon la dose d'exposition en SWCNT ou en MWCNT (Jin et al., 2014; F. Wu et al., 2019). Pour évaluer l'effet des DWCNT avec différentes concentrations d'exposition, nous avons observé la vitesse de déplacement des plasmodes sur ponts. Contrairement à la croissance en arène, le déplacement des plasmodes sur les ponts est orienté et ils n'ont d'autre choix que d'avancer sur le pont. Cette méthode présente quelques avantages : elle ne nécessite pas de prise de photo régulière, elle demande moins de temps de préparation par plasmodes et permet de tester beaucoup de plasmodes simultanément, elle permet de mesurer une distance parcourue en quelques heures (de 7 à 15h) avec moins de zones de rétractation (zones que le plasmode a explorées puis quittées). Ces ponts sont composés de différents substrats sachant que *P. polycephalum* module la fréquence, et l'amplitude, de

contraction des veines selon la composition du substrat. Il a été montré que sur substrat neutre (gel agar 1%) les plasmodes sont en exploration et se déplacent plus vite que sur substrat attractif (glucose) où ils absorbent les nutriments, ou aversif (NaCl) où ils sécrètent du mucus en barrière de protection (Patino-Ramirez et al., 2019).

Tout comme la vitesse de déplacement, le processus de fusion est affecté par les conditions environnementales. Par exemple, sur des substrats attractifs, ou aversifs, les plasmodes mettent plus de temps à fusionner (Patino-Ramirez et al., 2021). Le processus de fusion est important et récurrent chez beaucoup d'espèces, comme pour la reproduction chez les levures ou la communication entre individus chez les champignons, (Bastiaans et al., 2015; Fischer & Glass, 2019; Sieber et al., 2023), ainsi que pour beaucoup de types cellulaires chez les êtres multicellulaires pour la formation des tissus (E. H. Chen et al., 2007; Mohler et al., 1998). C'est la raison pour laquelle nous avons évalué l'effet des DWCNT sur ce processus. Chez *P. polycephalum*, si deux ou plusieurs plasmodes de la même souche se trouvent proche les uns des autres, ils fusionnent. Ce processus peut leur servir à transmettre des apprentissages (Vogel & Dussutour, 2016) grâce à la mise en commun de leur cytoplasme, ou encore permettre à un plasmode âgé de compenser les effets du vieillissement sur la vitesse de déplacement quand il fusionne avec un plasmode jeune (Rolland et al., 2023). Si les DWCNT ont un impact sur la vitesse de déplacement, et le réseau veineux, alors nous pouvons nous attendre à observer un effet sur le processus de fusion.

Hypothèses :

- Les DWCNT modifient la morphologie des plasmodes.
- Les DWCNT ralentissent la vitesse de déplacement des plasmodes de plusieurs souches.
- Une durée d'exposition plus longue aux DWCNT amplifie le ralentissement des plasmodes. Un arrêt de l'exposition permet une récupération des plasmodes.
- Sur substrat aversif l'effet des DWCNT est amplifié (le plasmode fait simultanément face à 2 facteurs de stress), sur substrat attractif l'effet des DWCNT est gommé (condition optimale pour la croissance des plasmodes).
- L'effet des DWCNT est décroissant avec une baisse de la concentration d'exposition.
- Les DWCNT ralentissent le processus de fusion des plasmodes.

3.2. Effets sur la vitesse de déplacement des plasmodes en arènes

3.2.1. Effet sur l'expansion du plasmode pendant 24h

3.2.1.1. Protocole

Souche(s) : LU
Concentration(s) d'exposition : 100 µg/g
Durée(s) d'exposition : 1 jour
Type(s) d'expérience : Arène
Paramètre(s) mesuré(s) : Aire, périmètre, circularité, et solidité du plasmode au cours du temps

Les plasmodes ont été élevés sur des flans d'avoine à 10%. Au moment de l'expérience, les plasmodes (Ø 14 mm) ont été prélevés et déposés au centre d'une arène (boîte de pétri de Ø 55 mm) contenant 10 mL de gel agar à 1%. Les plasmodes ont été exposés à ce moment-là par le dépôt d'environ 40 mg de flocons d'avoine sur chaque plasmode et l'ajout de 80 µL (concentration d'exposition de 100 µg/g) de traitement (CMC ou DWCNT) par-dessus. Le mode d'exposition unique est le même que celui utilisé dans le chapitre 2, nous savons donc que les DWCNT sont ingérés en moins de 24h et que leur impact peut être évalué.

Les arènes sont ensuite déposées dans une étuve (25°C, ~70% humidité, obscurité). Une photo a été prise toutes les 5 min pendant 24h. Afin de suivre l'expansion des plasmodes au cours du temps, l'aire recouverte par les plasmodes sur le gel agar, leur périmètre, leur circularité et leur solidité ont été mesurés pour chaque photo de manière automatique à l'aide du logiciel Collect (**Figure 17**). La circularité indique à quel point le plasmode a une forme se rapprochant d'un cercle parfait. La solidité est le rapport entre l'aire réelle du plasmode et l'aire de son enveloppe convexe, ce qui représente à quel point l'aire du plasmode est compacte.

$$\text{Circularité du plasmode} = \frac{4\pi \times \text{Aire du plasmode (mm}^2\text{)}}{\text{Périmètre du plasmode}^2 \text{ (mm}^2\text{)}}$$

$$\text{Solidité du plasmode} = \frac{\text{Aire du plasmode (mm}^2\text{)}}{\text{Aire de la plus petite enveloppe convexe contenant l'aire du plasmode (mm}^2\text{)}}$$

Pour évaluer la différence d'aire, de périmètre, de circularité, ou de solidité des plasmodes, selon le traitement et au cours du temps, nous avons réalisé un modèle linéaire mixte (fonction lmer, famille d'erreur : Gaussienne, Package lme4). Le modèle a été ajusté en spécifiant les effets fixes : traitement (prédicteur catégorique), temps (prédicteur continu) ; et l'effet aléatoire : ID (identité du plasmode). La variable dépendante (Aire, Périmètre, Circularité, Solidité) a été normalisée à l'aide de la fonction bestNormalize (Package bestNormalize).

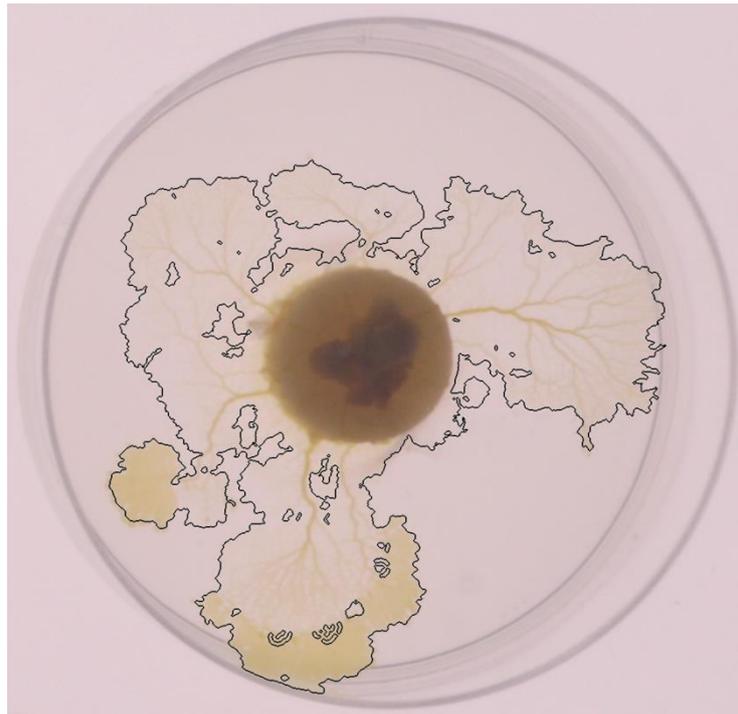


Figure 17 : Détection de la surface recouverte par le plasmode, et son périmètre.
Les contours noirs représentent la surface du plasmode qui est détectée automatiquement par le logiciel.

3.2.1.2. Résultats

Au début de l'expérience, les plasmodes déposés dans l'arène sont tous de même taille avec des aires et périmètres qui sont similaires, et des circularités et solidités proches de 1. Puis l'aire, et le périmètre, des plasmodes augmente au cours du temps. En explorant l'arène, les plasmodes ont une circularité qui baisse, car des excroissances poussent dans plusieurs directions en prenant une forme digitée (**Figure 18**). La solidité baisse aussi quand les plasmodes ont une forme moins compacte, c'est-à-dire moins proche de leur plus petite enveloppe convexe.

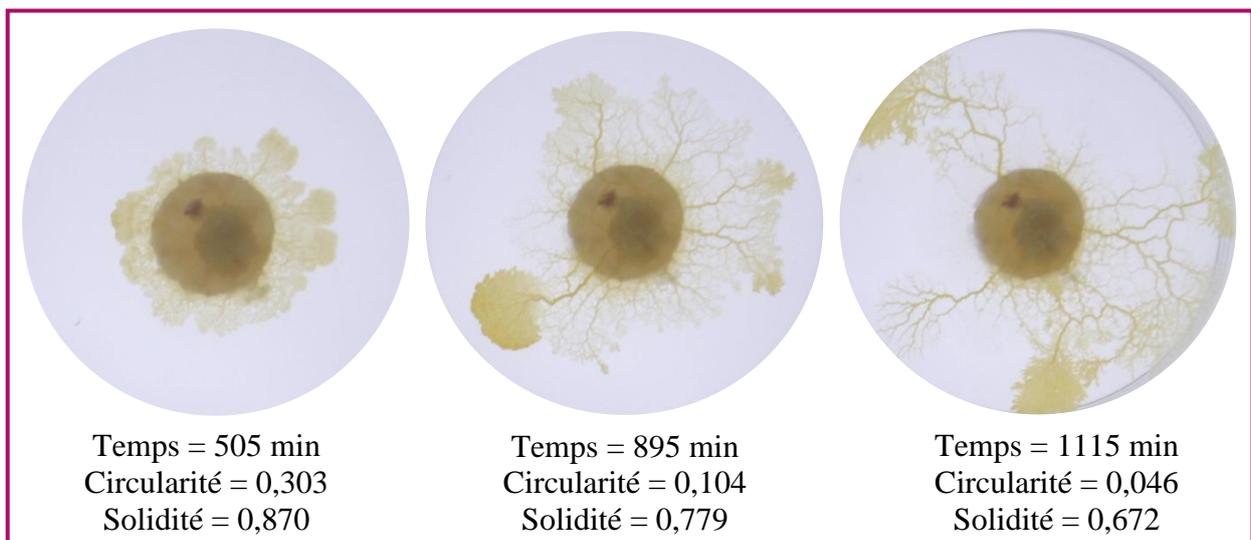


Figure 18 : Déplacement et valeur de circularité des plasmodes au cours du temps

Les plasmodes DWCNT et CMC recouvrent une aire similaire au cours du temps. Mais à partir d'environ 700 minutes le périmètre des plasmodes CMC est en moyenne plus élevé que celui des plasmodes DWCNT. Nous avons donc supposé qu'il puisse y avoir une différence de la morphologie des plasmodes à deux niveaux : la circularité, ou la solidité. Nous observons un effet significatif du temps, ce qui est tout à fait normal, sur les 4 paramètres mesurés : l'aire, le périmètre, la circularité, la solidité ($p < 0,001$, **Figure 19**, **Figure 20**). En revanche, le traitement DWCNT n'influe pas significativement sur ces paramètres ($p = 0,892$; $p = 0,884$, $p = 0,880$, et $p = 0,767$ respectivement, **Tableau S19**, **Tableau S20**, **Tableau S21**, **Tableau S22**).

Graphiquement nous voyons que les paramètres morphologiques des plasmodes des deux traitements sont similaires avant 500 minutes, c'est-à-dire quand l'aire des plasmodes commence à augmenter, et après 1250 minutes d'expériences, quand ils ont exploré toute l'arène et que leur aire n'augmente plus. Pour ne pas effacer un éventuel effet du traitement DWCNT sur les paramètres morphologiques nous avons donc évalué l'effet du traitement entre ces deux temps, qui est la période pendant laquelle les plasmodes ont leur aire qui augmente.

Le traitement DWCNT n'influe pas significativement sur l'aire et le périmètre des plasmodes ($p = 0,595$ et $p = 0,344$ respectivement, **Tableau S23**, **Tableau S24**, **Figure 21** (A)(B)). Cependant, graphiquement nous voyons que les plasmodes CMC ont tendance à avoir un périmètre qui est plus élevé que les plasmodes DWCNT. En revanche, le traitement influe sur la circularité et la solidité des plasmodes ($p = 0,047$ et $p = 0,046$ respectivement, **Tableau S25**, **Tableau S26**, **Figure 21** (C)(D)). Les plasmodes DWCNT sont plus circulaires que les plasmodes CMC, et sont plus compacts entre 500 et 900 minutes d'expérience puis globalement moins compacts jusqu'à 1250 minutes.

Nous avons également regardé à quel moment les plasmodes passent d'une morphologie isométrique (le plasmode croît de manière égale vers chaque dimension de l'arène) à une morphologie digitée (le plasmode forme des excroissances à différents endroits de l'arène). Les plasmodes DWCNT et CMC passent d'une morphologie à l'autre en un temps similaire ($p = 0,912$, **Tableau S27**, **Figure 22**).

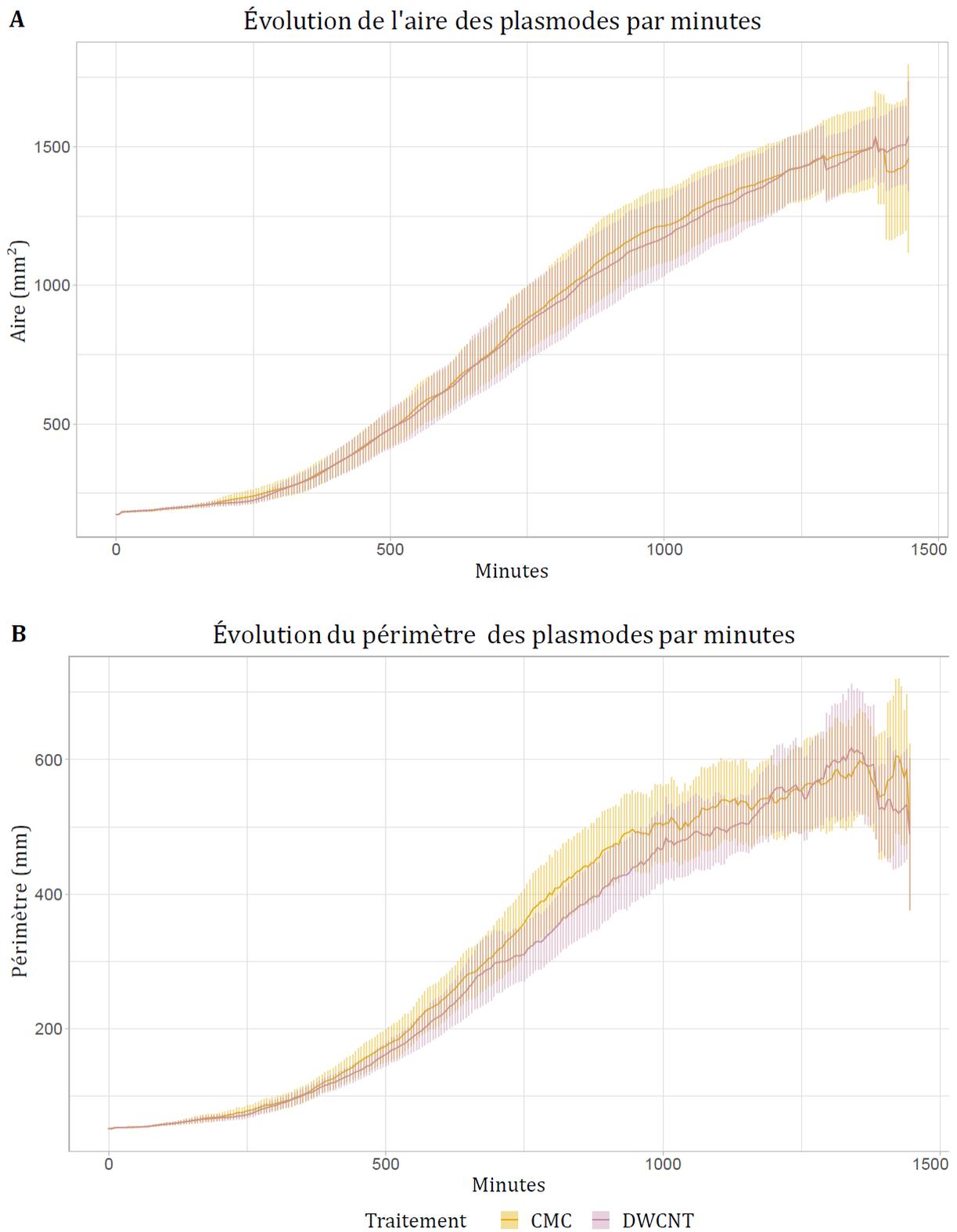


Figure 19 : Aire (A) et périmètre (B) des plasmodes au cours du temps selon le traitement.
32 plasmodes par traitement ont été testés

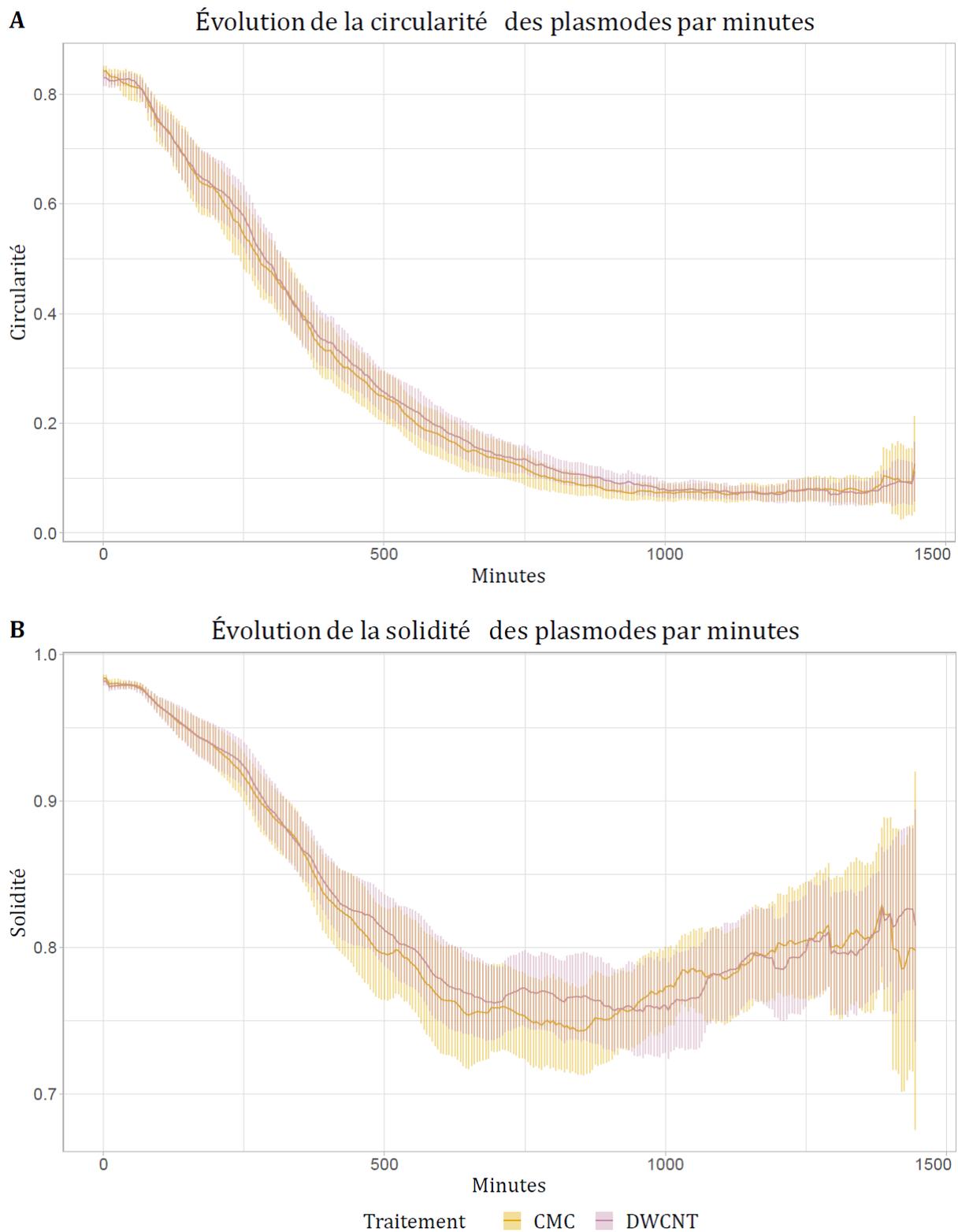


Figure 20 : Circularité (A) et solidité (B) des plasmodes au cours du temps.
32 plasmodes par traitement ont été testés

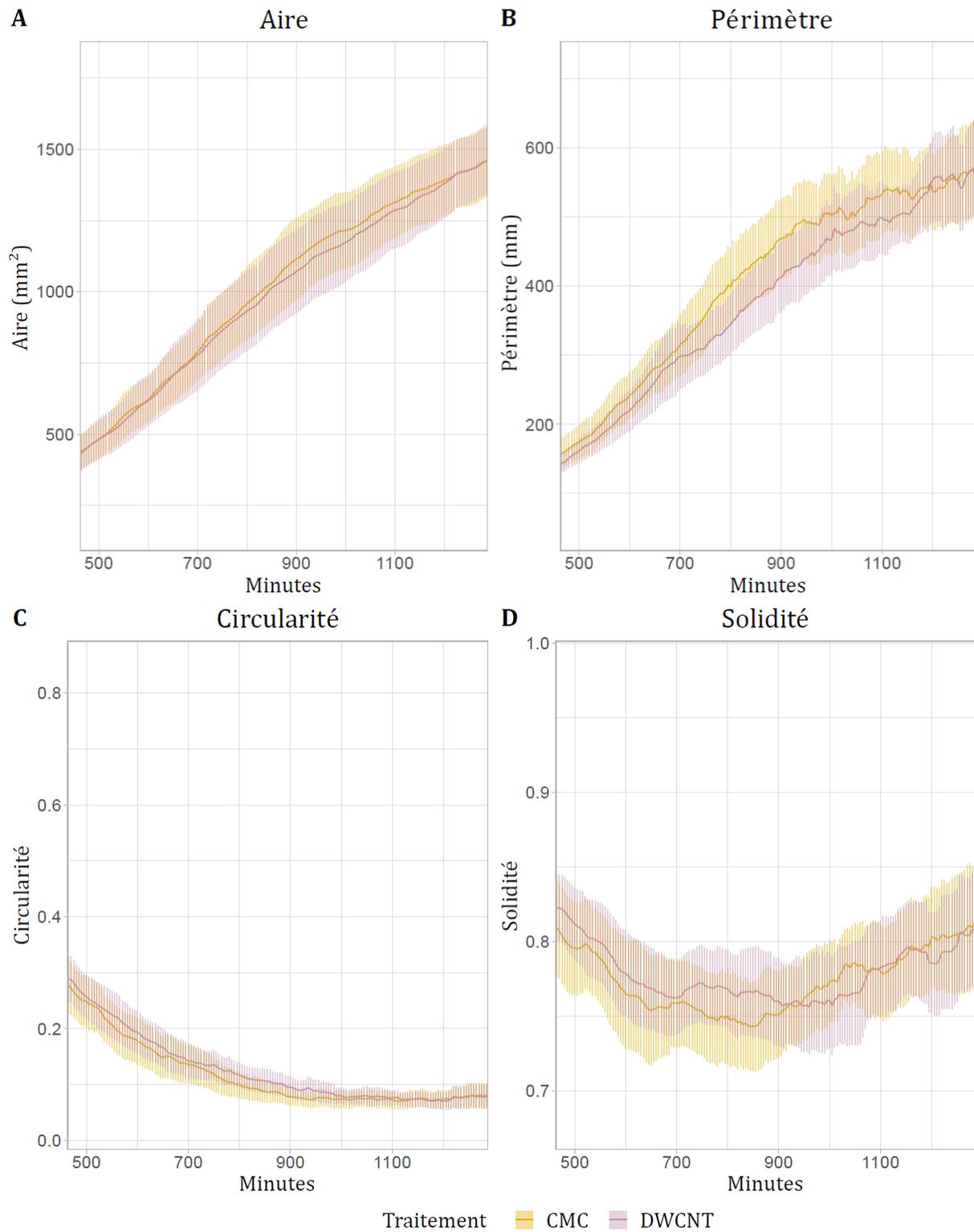


Figure 21 : Aire (A), périmètre (B), circularité (C), solidité (D) pour une période délimitée entre 500 et 1250 minutes d'expérience.

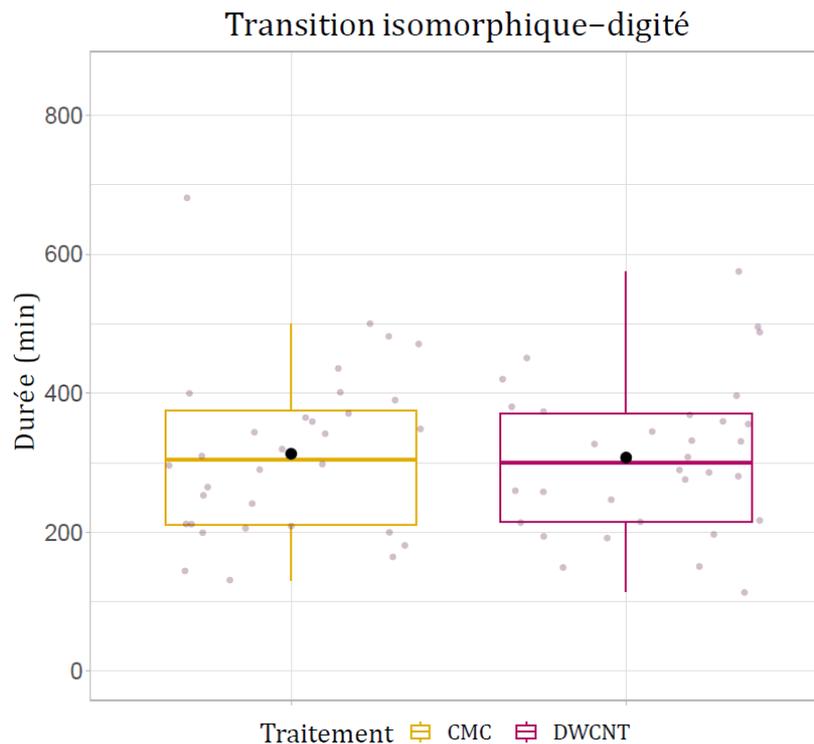


Figure 22 : Temps nécessaire pour que les plasmodes passent d'une morphologie isomorphique à une morphologie digitée selon le traitement.

3.2.2. Effet selon la souche du plasmode

Dans le chapitre 2 nous avons observé que la latence d'apparition du 1^{er} pseudopode et le taux d'expansion étaient ralentis chez des plasmodes de la souche AUS après une exposition chronique aux DWCNT (de 1 à 6 semaines), et que la vitesse de croissance des plasmodes LU sur un substrat attractif était ralentie après une exposition unique aux DWCNT. Nous avons voulu voir si différentes souches de *P. polycephalum*, ainsi qu'une souche de *B. utricularis*, sont plus ou moins affectées par une exposition aux NTC.

3.2.2.1. Protocole

Souche(s) : B1, DW, JM, Lu, Malu
Concentration(s) d'exposition : 100 µg/g
Durée(s) d'exposition : 3 jours
Type(s) d'expérience : Arène
Paramètre(s) mesuré(s) : Latence d'apparition du 1^{er} pseudopode, Latence de contact avec le bord de l'arène

Les souches que nous avons utilisées pour cette expérience sont : LU352 (University Magdeburg (Croisement au laboratoire, CLd-AXE x LU213) ; DW (Guillaume Vanderpoorte (Croisement au laboratoire, AUS Southern Biological * USA Carolina) ; Malu (University Magdeburg (Croisement au laboratoire, MA275 * LU352)) ; JM (Guillaume Vanderpoorte (Croisement au laboratoire,

Japon * USA Carolina), B1 (une souche de *Badhamia utricularis*, Coline Philibert (France)). Les plasmodes ont été exposés par la nourriture sur 3 jours consécutifs à 100 µg/g de traitement avant l'expérience.

Chaque plasmode (Ø 14 mm) est déposé au centre d'une arène (boîte de pétri de Ø 55 mm) contenant 10 mL de gel agar à 1%, qui est ensuite placée dans une étuve (25°C, ~70% humidité, obscurité). Une photo a été prise toutes les 5 min pendant 24h, puis nous avons noté 2 évènements pour chaque plasmode : à quel moment il commence à se déplacer (latence d'apparition du 1^{er} pseudopode) et à quel moment il atteint le bord de l'arène (latence de contact).

Il y a une différence dans les effectifs entre les conditions qui peut être due à plusieurs raisons : certains plasmodes d'élevage n'ont pas assez grandi au moment de mettre en route l'expérience et il manque des réplicas, la qualité de l'image ne permet pas toujours de mesurer l'évènement, l'expérience est terminée avant que l'évènement ait eu lieu (pour la latence de contact) indépendamment du traitement.

D'une part, nous avons évalué l'effet du traitement pour la souche de *B. utricularis* à l'aide d'un modèle linéaire mixte (fonction lmer, famille d'erreur : Gaussienne, Package lme4). Le modèle a été ajusté en spécifiant l'effet fixe : traitement (prédicteur catégorique) ; et l'effet aléatoire : ID (identité du plasmode). D'autre part, nous avons évalué l'effet du traitement selon les souches de *P. polycephalum* à l'aide d'un modèle linéaire mixte, ajusté en spécifiant les effets fixes : traitement, souche (prédicteurs catégoriques) ; et l'effet aléatoire : ID (identité du plasmode). La variable dépendante (Latence ou Indice de performance) a été normalisée à l'aide de la fonction bestNormalize (Package bestNormalize).

De nombreux plasmodes de la souche *B. utricularis* n'ont pas atteint le bord de l'arène en 24h (46 plasmodes CMC et 46 plasmodes DWCNT). Par conséquent, nous n'avons pas réalisé de tests statistiques pour ce paramètre sur la souche B1.

La souche LU étant la souche la plus utilisée dans les expériences de ce chapitre et du suivant, elle sert de référence et les performances des autres souches sont comparés à cette dernière.

3.2.2.2. Résultats

Nous avons observé le déplacement des plasmodes pour étudier deux évènements donnés : la latence d'apparition du 1^{er} pseudopode qui indique que le plasmode commence son déplacement après cicatrisation, et la latence de contact avec le bord de l'arène qui nous donne une indication sur le temps nécessaire au plasmode pour explorer son arène. Pour la souche de *B. utricularis* nous avons observé les effets du traitement DWCNT. Pour les souches de *P. polycephalum* nous avons comparé les effets du traitement DWCNT selon la souche.

Pour la souche de *B. utricularis*, le traitement DWCNT n'influe pas significativement sur la latence d'apparition du 1^{er} pseudopode ($p = 0,718$, **Tableau S28**, **Figure S7**). Il se dégage la même tendance pour la latence de contact. Pour les 2 paramètres mesurés, les moyennes et médianes

de l'indice de performance des plasmodes DWCNT sont proches de 0, la vitesse de déplacement des plasmodes DWCNT n'est donc pas différente de celle des plasmodes CMC (**Figure 23 (A,B)**).

Pour les souches de *P. polycephalum*, le modèle complet (avec interaction : [Traitement] x [Souche]) ne diffère pas significativement du modèle sans interaction, nous la retirons du modèle.

Comme attendu, la vitesse d'apparition du 1^{er} pseudopode est différente entre certaines souches indépendamment du traitement. La souche JM est plus lente que la souche LU et la souche DW est plus rapide ($p < 0,001$ et $p = 0,004$ respectivement, **Tableau S29, Figure S7**). Le traitement DWCNT n'induit pas d'effet sur la latence d'apparition du 1^{er} pseudopode ($p = 0,246$, **Tableau S31, Figure 23 (C)**). Les indices de performances sont similaires entre les souches. Les plasmodes DWCNT ont donc des latences similaires aux plasmodes CMC.

Les plasmodes JM sont plus lents que les plasmodes LU et les plasmodes DW sont plus rapides indépendamment du traitement ($p < 0,001$ pour les 2 souches JM et DW, **Tableau S30, Figure S7**). Le traitement a un effet sur la latence de contact ($p = 0,019$, **Tableau S30, Figure 23 (D)**). Les indices de performances sont similaires entre les souches, les moyennes et médianes (à l'exception de la médiane pour la souche Malu) sont en-dessous de la ligne pointillée (**Tableau S32**). Les plasmodes ont donc des latences de contact avec le bord de l'arène plus courtes ce qui implique que les plasmodes DWCNT sont plus rapides que les plasmodes CMC.

Les plasmodes DWCNT ne sont pas ralentis contrairement à ce que nous avons observé pour le même type d'expérience dans le chapitre 2 avec la souche AUS. Nous avons donc décidé de réaliser de nouveau l'expérience du chapitre 2 avec les souches AUS et LU et une exposition minimale de 7 jours.

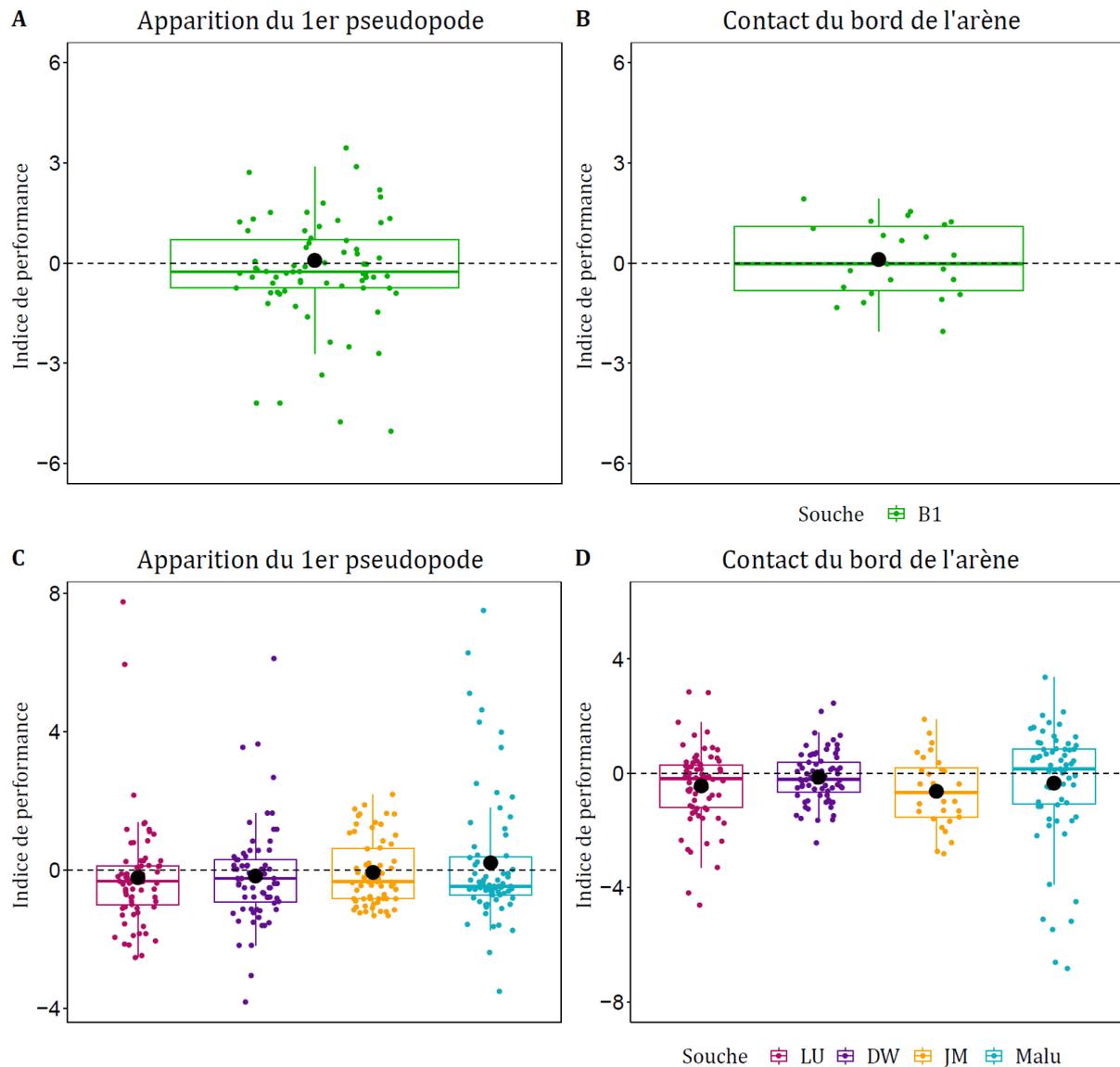


Figure 23 : Indices de performance des plasmodes DWCNT sur la latence d'apparition du 1^{er} pseudopode (A, C) ou la latence de contact (B, D) pour 5 souches suivant une exposition chronique de 3 jours.

Pour le 1^{er} événement (A, B) : $n = 71$ par traitement (souches B1 et Malu), $n = 72$ par traitement (souches DW et LU), $n = 70$ CMC et 68 DWCNT (souche JM). Pour le 2^e événement : $n = 25$ par traitement (souche B1), $n = 72$ par traitement (souche DW et LU), $n = 31$ CMC et 37 DWCNT (souche JM), $n = 64$ CMC et 67 DWCNT (souche Malu). La barre horizontale représente la médiane et les points la moyenne. Un réplica de la souche B1 exposé aux DWCNT n'est pas visible (A) car son indice de performance est très éloigné des autres réplicas (indice = 24) et pour une meilleure visualisation graphique nous avons limité l'axe des ordonnées entre -6 et 6.

3.2.3. Effet après 7 jours d'exposition : souches LU et AUS

3.2.3.1. Protocole

Souche(s) : LU, AUS
Concentration(s) d'exposition : 100 µg/g
Durée(s) d'exposition : 7 jours
Type(s) d'expérience : Arène
Paramètre(s) mesuré(s) : Latence d'apparition du 1^{er} pseudopode, Latence de contact avec le bord de l'arène

L'objectif ici est de voir si un temps d'exposition plus long, en l'occurrence 7 jours, peut induire un ralentissement chez la souche LU (comme observé avec la souche AUS dans le chapitre 2). En parallèle, nous vérifions si nous retrouvons un effet sur la souche AUS. Les plasmodes ont été exposés par la nourriture sur 7 jours consécutifs à 100 µg/g de traitement avant d'être testés.

Le protocole est le même que pour l'expérience précédente (voir §3.2.2.1) et les paramètres mesurés sont les mêmes. La seule différence est qu'une photo a été prise toutes les 5 min pendant 48h et non 24h. Les expériences pour la souche LU ont été réalisées sur une seule journée. Les expériences sur la souche AUS ont été réalisées sur 3 journées différentes (nous avons 3 élevages différents mais chaque plasmode testé a bien été exposé durant 7 jours). Le calcul d'un indice de performance (voir § 1.4.4) permet de s'affranchir de l'effet de la date.

Pour évaluer les différences entre les indices de performance, calculés à partir des latences, selon la souche de *P. polycephalum* (AUS ou LU), nous avons réalisé un modèle linéaire mixte (fonction lmer, famille d'erreur : Gaussienne, Package lme4). Le modèle a été ajusté en spécifiant l'effet fixe : souche (prédicteur catégorique) ; et l'effet aléatoire : ID (identité du plasmode). La variable dépendante (Indices de performance) a été normalisée à l'aide de la fonction bestNormalize (Package bestNormalize).

3.2.3.2. Résultats

Pour la latence d'apparition du 1^{er} pseudopode, le traitement DWCNT n'affecte pas différemment les souches AUS et LU ($p = 0,516$, **Tableau S33**, **Figure 24** (A)). Les plasmodes DWCNT ont une latence qui est similaire aux plasmodes CMC.

Pour la latence de contact avec le bord de l'arène, l'effet du traitement DWCNT varie en fonction de la souche ($p = 0,023$, **Tableau S34**, **Figure 24** (B)). Les plasmodes DWCNT de la souche AUS ont des indices de performances en moyenne supérieurs (i.e. latence plus élevée, vitesse plus faible) aux plasmodes CMC, alors que les plasmodes DWCNT de la souche LU ont des indices de performances en moyenne inférieurs (i.e. latence plus faible, vitesse plus élevée) aux plasmodes CMC. Le traitement DWCNT a tendance à ralentir les plasmodes AUS, et il a tendance à accélérer les plasmodes LU dans leur vitesse de déplacement pour atteindre le bord de l'arène (**Figure S8**).

Nous réalisons la même expérience sur la souche AUS avec des durées d'exposition plus longues pour atteindre un maximum à 8 semaines.

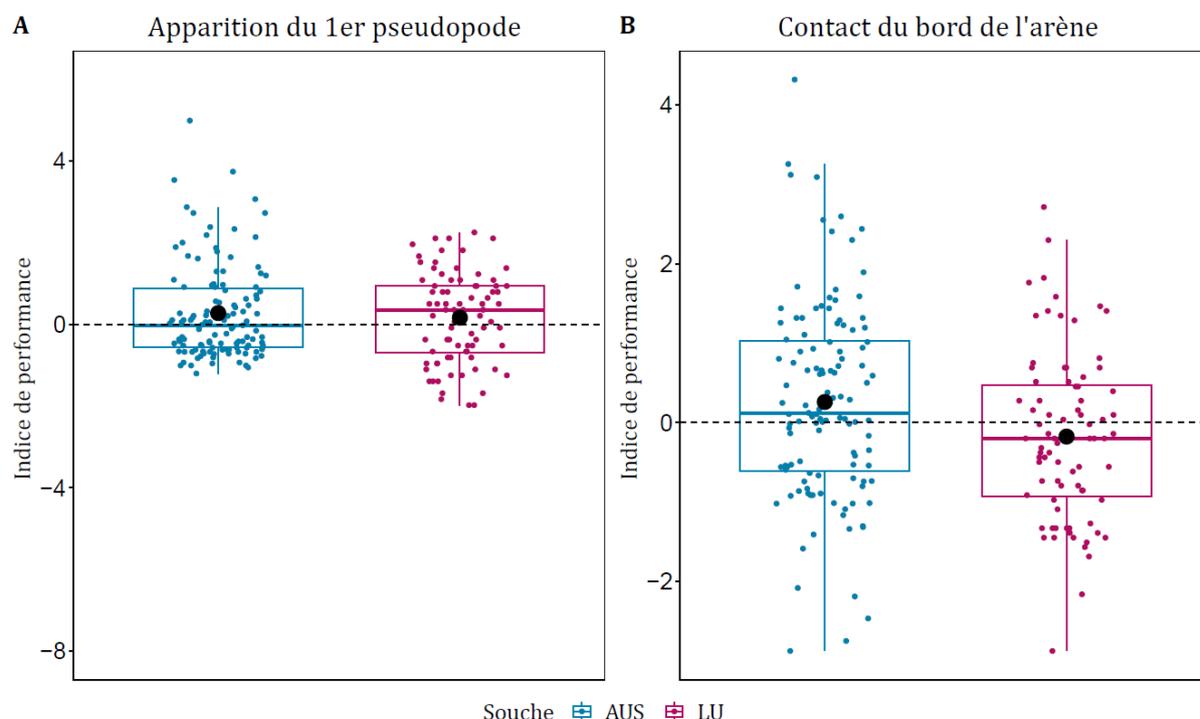


Figure 24 : Indices de performance de l'apparition du 1^{er} pseudopode des souches AUS et LU (A), et de contact (B), suivant une exposition chronique de 7 jours aux DWCNT.

80 et 120 plasmodes par traitement, pour les souches AUS et LU respectivement, ont été testés.

3.2.4. Effet selon la durée d'exposition : de 2 à 8 semaines

3.2.4.1. Protocole

Souche(s) : AUS
Concentration(s) d'exposition : 100 µg/g
Durée(s) d'exposition : 2, 3, 7 et 8 semaines
Type(s) d'expérience : Arène
Paramètre(s) mesuré(s) : Latence d'apparition du 1^{er} pseudopode, Latence de contact avec le bord de l'arène

Le protocole d'expérience est le même que précédemment (voir §3.2.2.1) avec des durées d'exposition qui sont plus longues. Les paramètres mesurés sont les mêmes (voir §3.2.3.1). L'objectif ici est de voir si l'effet des DWCNT est amplifié avec une durée d'exposition plus longue et si un arrêt de l'exposition engendre un arrêt de l'effet des NTC (récupération). Pour cela, un 3^e

groupe a été créé la veille de la 8^e semaine, avec une partie des plasmodes DWCNT qui ont été exposés à la CMC, ce sont les N-CMC (Nouveau-Contrôle).

Nous commençons par comparer l'effet du traitement DWCNT par rapport à la CMC pour les expositions de 2, 3, 7 et 8 semaines. Ensuite, nous évaluons l'effet des traitements N-CMC et DWCNT par rapport à la CMC pour l'exposition de 8 semaines.

Pour évaluer les différences des latences (apparition du 1^{er} pseudopode ou contact), nous avons utilisé un modèle mixte linéaire (fonction lmer, famille d'erreur : Gaussienne, Package lme4). Le modèle a été ajusté en spécifiant les effets fixes : traitement, durée d'exposition (prédicteur catégorique) ; et l'effet aléatoire : ID (identité du plasmode). La variable dépendante (Latence) a été normalisée à l'aide de la fonction bestNormalize (Package bestNormalize). Nous avons réalisé une comparaison par paires (correction de Satterthwaite, Package emmeans) pour comparer les latences selon la durée d'exposition du 1^{er} pseudopode des semaines 2, 3, 7 et 8.

3.2.4.2. Résultats

Pour la latence du 1^{er} pseudopode, le modèle complet (avec interaction : [Traitement] x [Durée d'exposition]) ne diffère pas significativement du modèle sans interaction, nous la retirons du modèle.

Pour les 4 périodes évaluées entre les 2 et 8 semaines, le traitement a un effet significatif sur la latence d'apparition du 1^{er} pseudopode ($p = 0,010$, **Tableau S35**, **Figure S9 (A)**). Il y a également un effet de la durée d'exposition indépendamment du traitement ($p < 0,001$), qui se confond avec le jour de l'expérience et qui pourrait donc être dû à la variabilité naturelle des plasmodes dans leur vitesse de déplacement (**Figure 7**). Afin de contrôler cet effet date, le calcul des indices de performance nous permet de prendre en compte uniquement l'effet du traitement indépendamment de la date. Nous pouvons ainsi constater que les plasmodes DWCNT pour les durées d'exposition de 7 et 8 semaines sont ralentis par rapport à ceux après 2 semaines d'exposition ($p = 0,033$ et $p < 0,001$ respectivement, **Tableau S37**, **Figure 25 (A)**). De plus, une comparaison par paires nous permet de voir que les plasmodes DWCNT de la semaine 8 sont plus ralentis que ceux de la semaine 7 ($p = 0,005$, **Tableau S38**) et qu'il n'y a pas de différence de la latence entre les semaines 3 et 7 ($p = 0,407$, **Tableau S38**).

Concernant la latence de contact, il y a une interaction significative du traitement avec la durée d'exposition de 7 semaines ($p = 0,016$, **Tableau S36**, **Figure S9 (B)**) où les plasmodes DWCNT sont ralentis par rapport aux CMC. Pour les autres semaines il n'y a pas d'effet du traitement, et contrairement à la latence du 1^{er} pseudopode il n'y a pas de différence dans les latences selon la durée d'exposition. Les indices de performance donnent la même information, un ralentissement des plasmodes DWCNT par rapport aux plasmodes CMC après 7 semaines d'exposition ($p = 0,033$, **Tableau S39**, **Figure 25 (B)**).

Après 8 semaines d'exposition, l'apparition du 1^{er} pseudopode des plasmodes DWCNT est ralentie par rapport aux plasmodes CMC, ce qui n'est pas le cas pour le 3^e groupe N-CMC même si une

tendance au ralentissement est visible ($p = 0,022$ (DWCNT) et $p = 0,088$ (N-CMC), **Tableau S40, Figure S10, Figure 26 (A)**). En revanche, aucun effet du traitement n'est visible pour la latence de contact avec le bord de l'arène ($p = 0,112$ et $p = 0,341$ respectivement, **Tableau S41, Figure S10, Figure 26 (B)**). Après seulement une journée sans exposition aux DWCNT, les plasmodes N-CMC semblent récupérer une vitesse « normale ».

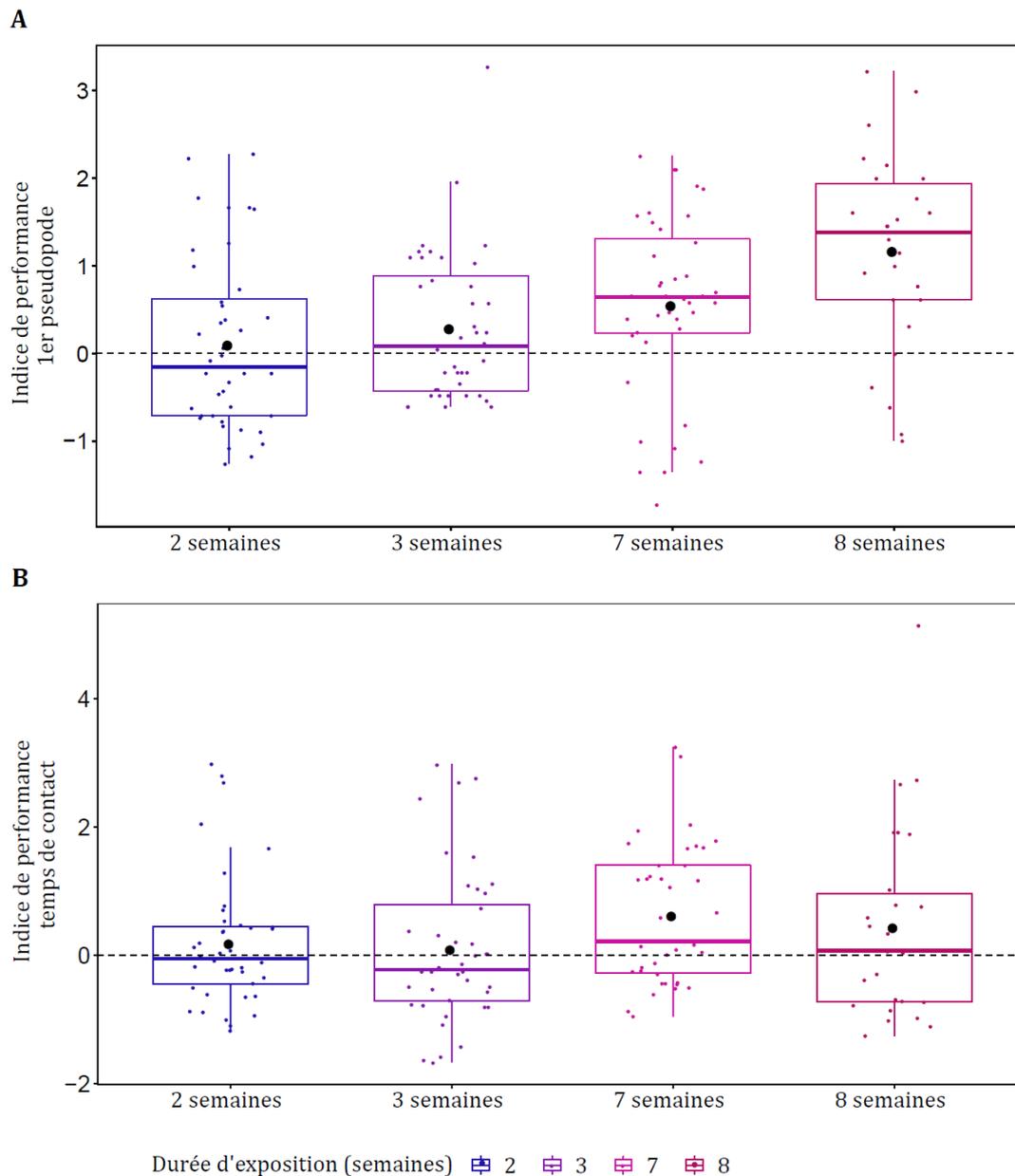


Figure 25 : Indices de performance calculés à partir de la latence d'apparition du 1^{er} pseudopode (A) et la latence de contact avec le bord de l'arène (B) pour la souche AUS suivant une exposition chronique de 2, 3, 7 et 8 semaines aux DWCNT.

40 plasmodes par traitement pour les semaines 2, 3 et 7 ont été testés (A), 26 plasmodes par traitement pour la semaine 8 ont été testés (B). La barre horizontale est la médiane, le point noir est la moyenne, la ligne pointillée est la référence des plasmodes CMC.

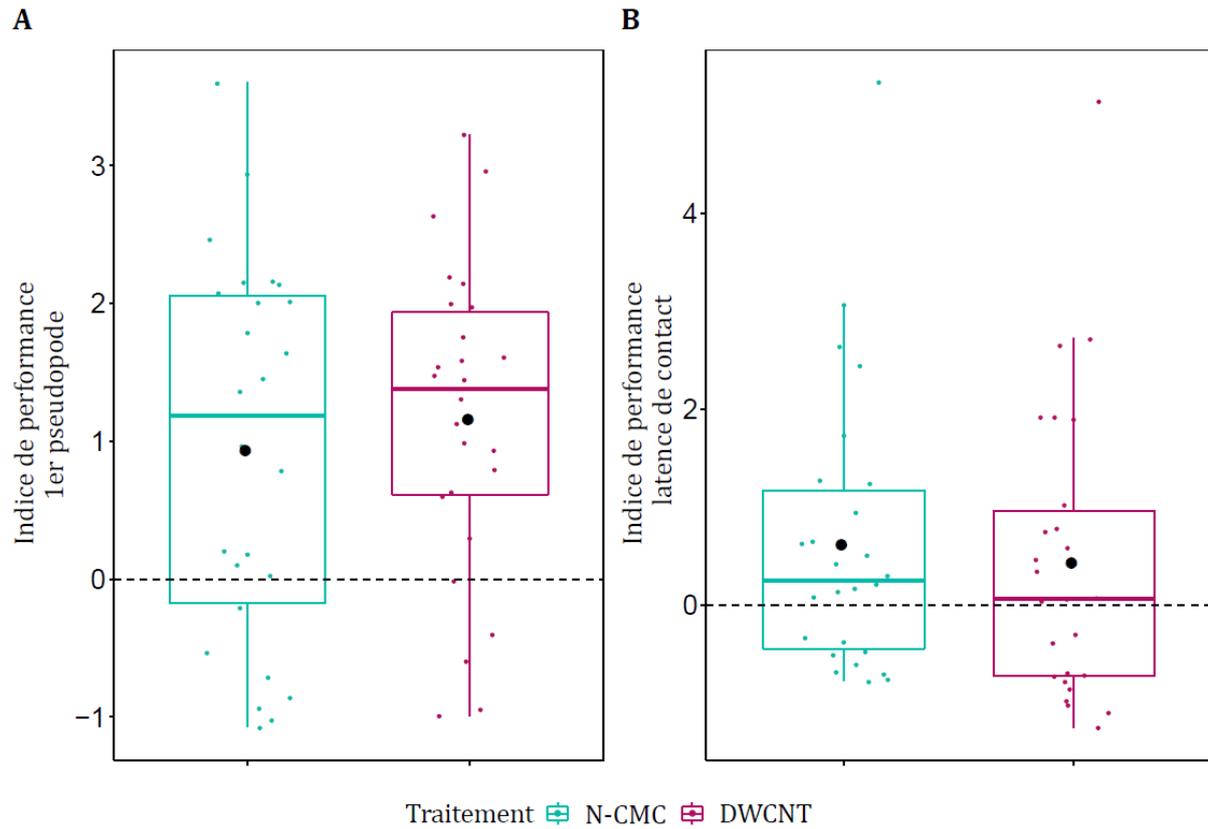


Figure 26 : Indices de performance calculés à partir de la latence d'apparition du 1^{er} pseudopode (A) et la latence de contact avec le bord de l'arène (B) pour la souche AUS suivant une exposition chronique de 8 semaines aux N-CMC et DWCNT.

26 plasmodes par traitement pour la semaine 8 ont été testés.

3.3. Effets sur la vitesse de déplacement des plasmodes sur ponts

Nous venons de montrer un effet des DWCNT sur le temps d'apparition du 1^{er} pseudopode après 7 semaines d'exposition (§ 3.2.4). Cependant, des effets sur la vitesse de déplacement ont été démontrés pour des expositions courtes (1 jour-§ 2.3.4.5 ; 3 jours-§ 3.2.2 ; 1 semaine-§ 2.3.4.6) et longues (2 à 6 semaines-§ 2.3.4.6 ; 7 semaines-§ 3.2.4). Dans cette partie nous avons fait le choix d'utiliser des durées d'exposition allant de quelques jours à deux semaines.

3.3.1. Effet selon le substrat

Le NaCl étant répulsif pour les plasmodes (Patino-Ramirez et al., 2019), nous nous demandons si sa présence, qui est déjà stressante pour les plasmodes, peut faire ressortir un effet des DWCNT sur leur vitesse de déplacement. A l'inverse, l'avoine est un attractif pour les plasmodes et nous nous demandons si sa présence, qui permet au plasmode de croître de manière optimale, va leur permettre d'avoir une vitesse de déplacement normale malgré l'exposition aux DWCNT. Nous utilisons le gel agar comme référence de substrat neutre. Comme pour l'expérience précédente (voir § 3.2.4), nous avons testé si un arrêt de l'exposition (N-CMC) accélère la vitesse de déplacement des plasmodes.

3.3.1.1. Protocole

Souche(s) : AUS
Concentration(s) d'exposition : 100 µg/g
Durée(s) d'exposition : 12, 14 et 15 jours
Type(s) d'expérience : Ponts
Paramètre(s) mesuré(s) : Vitesse de déplacement

Les expériences ont été réalisées sur 3 jours pour augmenter le nombre de réplicas, les plasmodes ont donc été exposés pendant 12, 14 ou 15 jours. Nous ne regardons pas l'effet de la durée d'exposition car nous avons vu précédemment que la durée d'exposition n'avait pas d'effet (effets similaires entre 1 et 6 semaines -§ 2.3.4.6) ou que celle-ci doit être très différente (2 semaines vs 7 semaines - § 3.2.4) pour générer une augmentation de l'effet des DWCNT.

Après 12 jours d'exposition les 2 traitements testés sont CMC et DWCNT. Au 13^e jour d'exposition nous prenons la moitié des plasmodes DWCNT et nous les exposons à de la CMC. Nous avons ainsi 3 traitements différents pour les tests des 14^e et 15^e jours : CMC, Nouveau-CMC (N-CMC), DWCNT.

Les plasmodes (Ø10 mm) sont déposés au contact d'un pont (35 mm) composé soit : de gel agar 1% (substrat neutre), de NaCl 1‰ (0,1g de NaCl + 1g de poudre agar pour 100mL d'eau = substrat aversif), ou d'avoine 1% (1g d'avoine + 1g de poudre agar pour 100mL d'eau = substrat attractif). Ils sont ensuite déposés dans une étuve (25°C, 70% humidité, obscurité) et photographiés 16h après. Les aires recouvertes par les plasmodes ont été mesurées à l'aide du logiciel ImageJ.

Pour l'analyse statistique nous avons d'abord comparé l'effet du traitement DWCNT pour le 1^{er} jour d'expérience en fonction du substrat. Puis nous avons comparé l'effet des traitements N-CMC et DWCNT sur les 2^e et 3^e jours d'expérience en fonction du substrat.

Pour évaluer les différences entre les vitesses de déplacement nous avons réalisé un modèle linéaire mixte (fonction lmer, famille d'erreur : Gaussienne, Package lme4). Le modèle a été ajusté en spécifiant les effets fixes : traitement, substrat (prédicteurs catégoriques) ; et l'effet aléatoire : ID (identité du plasmode). La variable dépendante (Vitesse ou Indice de performance) a été normalisée à l'aide de la fonction bestNormalize (Package bestNormalize).

3.3.1.2. Résultats

Après 12 jours d'exposition, il n'y a pas d'effet du traitement DWCNT sur les substrats neutres et attractifs, les plasmodes DWCNT ont une vitesse similaire aux plasmodes CMC. En revanche, il y a un effet sur le substrat aversif ($p = 0,002$, **Tableau S42**, **Figure 27 (A)**), les plasmodes DWCNT ont un indice de performance qui est en moyenne inférieur à 0, donc ils ont une vitesse plus faible par rapport aux plasmodes CMC.

Après 14 et 15 jours d'exposition, le modèle complet (avec interaction : [Traitement] x [Substrat]) ne diffère pas significativement du modèle sans interaction, nous la retirons du modèle.

Le traitement DWCNT n'affecte pas la vitesse de déplacement des plasmodes, y compris sur le substrat aversif ($p = 0,616$, **Tableau S43**, **Figure 27 (B)**). L'effet que nous avions sur le substrat aversif après 12 jours d'exposition n'est plus présent après 13 et 14 jours d'exposition.

En revanche, le traitement N-CMC affecte la vitesse de déplacement des plasmodes ($p = 0,013$, **Tableau S43**, **Figure 27 (B)**). Pour les 3 types de substrats, les indices de performances sont supérieurs à 0, les plasmodes N-CMC sont plus rapides que les plasmodes CMC et DWCNT.

L'arrêt de l'exposition aux DWCNT induit une accélération de la vitesse de déplacement des plasmodes N-CMC par rapport aux plasmodes DWCNT et CMC sur les 3 types de substrats. Les plasmodes N-CMC se démarquent ainsi du traitement DWCNT en l'espace de 2 jours alors qu'ils étaient soumis à la même exposition durant les 12 jours précédents.

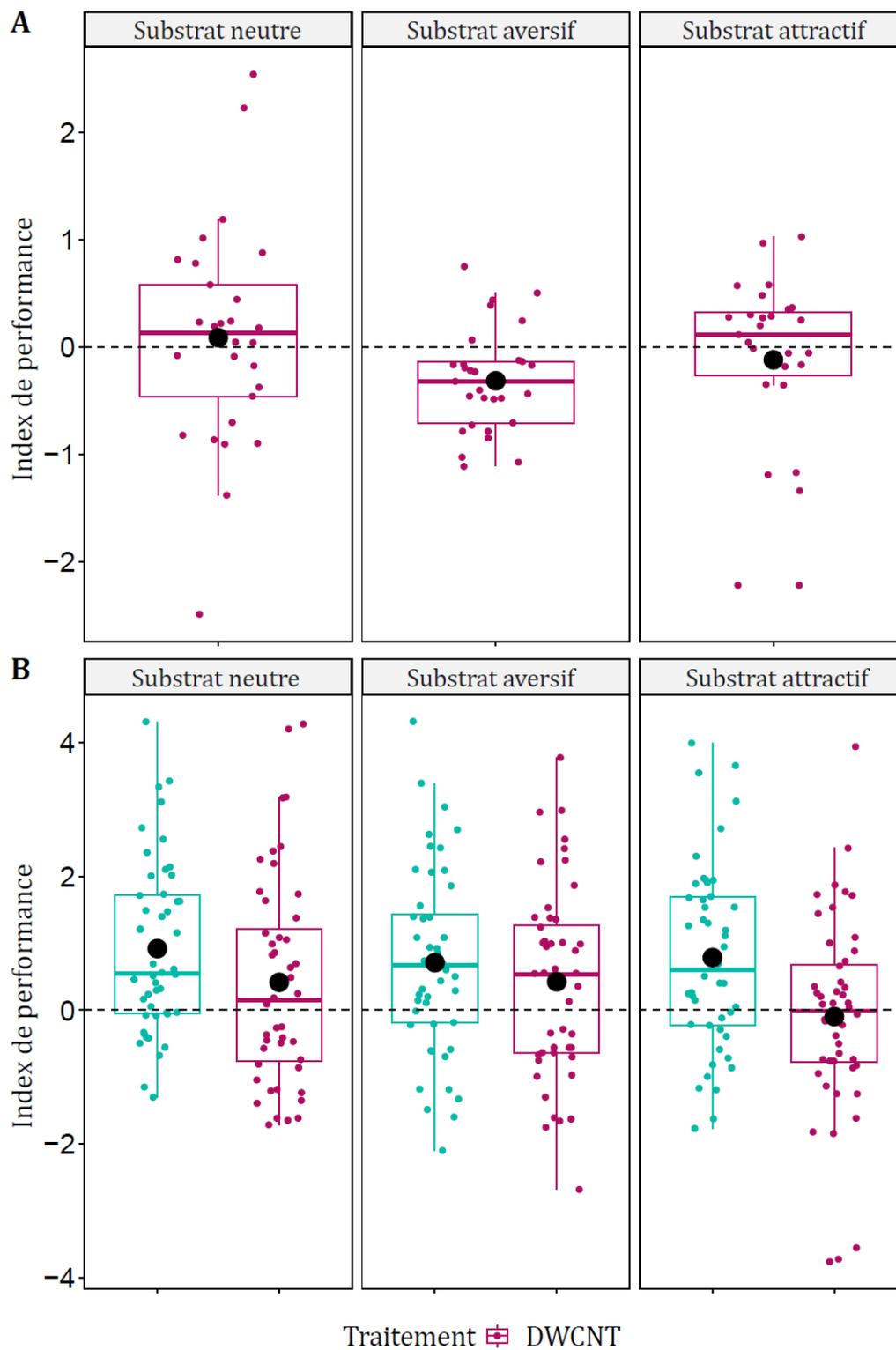


Figure 27 : Indice de performance des plasmodes DWCNT après 12 jours d'exposition (A) et des plasmodes N-CMC et DWCNT après 14 et 15 jours d'exposition, selon 3 substrats (neutre, aversif, attractif).

Substrat neutre : n=78 CMC, 77 DWCNT, 48 N-CMC ; Substrat aversif : n=78 CMC, 77 DWCNT, 48 N-CMC ; Substrat attractif : n=76 CMC, 75 DWCNT, 46 N-CMC.

3.3.2. Effet selon la concentration d'exposition

Jusqu'à présent nous avons utilisé une concentration d'exposition élevée de 100 µg/g à la fois pour les expositions uniques et chroniques. Pour rappel, dans l'environnement naturel, elles sont de l'ordre du ng/kg de sol. Ici nous évaluons la vitesse de déplacement des plasmodes en testant 4 concentrations d'exposition différentes : 1 µg/g, 10 µg/g, 50 µg/g, ou 100 µg/g. Le déplacement a été évalué sur 3 substrats différents (neutre, aversif, attractif).

3.3.2.1. Protocole

Souche(s) : LU
Concentration(s) d'exposition : 1 µg/g, 10 µg/g, 50 µg/g, ou 100 µg/g
Durée(s) d'exposition : 2 et 4 jours
Type(s) d'expérience : Ponts
Paramètre(s) mesuré(s) : Vitesse de déplacement

L'expérience a été réalisée 2 fois pour avoir un nombre de réplicas suffisant, à partir des mêmes plasmodes d'élevage, à 2 jours d'intervalles du fait du temps nécessaire à la préparation de l'expérience. L'objectif ici n'est pas de visualiser l'effet de la durée d'exposition. Les plasmodes ont donc été exposés pendant 2 et 4 jours à l'une des 4 concentrations décrites précédemment.

Chaque plasmode de la souche LU (Ø 10 mm), a été déposé à l'extrémité d'un pont de 35 mm composé soit : de gel agar 1% (substance neutre), de NaCl 6‰ (0,6g de NaCl pour 100mL d'eau = substance aversive), ou d'avoine 1% (1g d'avoine pour 100mL d'eau = substance attractive). Les plasmodes et leurs ponts ont ensuite été déposés dans une étuve (25°C, 70% humidité, obscurité) pendant approximativement 6h. Les ponts ont été photographiés à la fin de l'expérience et les aires recouvertes par les plasmodes ont été mesurées à l'aide du logiciel ImageJ.

Les aires des plasmodes qui ont exploré le fond de la boîte de pétri et non le pont, ou qui ont fusionné avec le plasmode voisin, n'ont pas été pris en compte. Il y a donc une variabilité dans les effectifs dont voici le détail :

- 1 µg/g (A) : n = 42 CMC et 40 DWCNT (substrat neutre), n = 38 CMC et 37 DWCNT (substrat aversif), n = 42 CMC et 40 DWCNT (substrat attractif)
- 10 µg/g (B) : n = 46 CMC et 44 DWCNT (substrat neutre), n = 42 CMC et 36 DWCNT (substrat aversif), n = 45 CMC et 44 DWCNT (substrat attractif)
- 50 µg/g (C) : n = 47 CMC et 52 DWCNT (substrat neutre), n = 44 CMC et 53 DWCNT (substrat aversif), n = 47 CMC et 53 DWCNT (substrat attractif)
- 100 µg/g (D) : n = 45 CMC et 53 DWCNT (substrat neutre), n = 44 CMC et 47 DWCNT (substrat aversif), n = 45 CMC et 52 DWCNT (substrat attractif)

Nous avons calculé des indices de performance, selon la formule décrite dans les méthodes générales (§ 1.4.4), afin de normaliser la variabilité naturelle de vitesse de déplacement en fonction du jour, et de visualiser uniquement l'effet du traitement (DWCNT par rapport à CMC).

Nous avons réalisé les modèles sur les indices de performances pour comparer les indices des plasmodes DWCNT entre eux. Pour évaluer les différences entre les indices de performances des vitesses de déplacement selon la concentration d'exposition et le substrat, nous avons réalisé un modèle linéaire mixte (fonction lmer, famille d'erreur : Gaussienne, Package lme4). Le modèle a été ajusté en spécifiant les effets fixes : substrat (prédicteur catégorique), concentration d'exposition (prédicteur continu) ; et l'effet aléatoire : ID (identité du plasmode). La variable dépendante (Indice de performance) a été normalisée à l'aide de la fonction bestNormalize (Package bestNormalize).

3.3.2.2. Résultats

Le modèle complet (avec interaction : [Concentration] x [Substrat]) est significativement différent du modèle sans interaction, nous la gardons dans le modèle.

La concentration en DWCNT induit un effet sur l'indice de performance ($p = 0,031$). L'effet de la concentration sur le substrat neutre est différent de l'effet de la concentration sur le substrat attractif ($p = 0,022$), et nous observons la même tendance pour le substrat aversif ($p = 0,078$, **Tableau S44, Figure 28, Figure S12**).

Graphiquement nous pouvons dire que l'indice de performance des plasmodes DWCNT sur substrat neutre baisse avec l'augmentation de la concentration d'exposition et passe en-dessous de 0 pour les concentrations d'exposition à 50 et 100 $\mu\text{g/g}$ ce qui signifie une baisse de la vitesse de déplacement des plasmodes DWCNT par rapport aux plasmodes CMC (**Figure 28 (A)**).

Sur substrat aversif, il y a une baisse de l'indice de performance observée pour les concentrations d'exposition à 10 et 100 $\mu\text{g/g}$, donc une baisse de la vitesse des plasmodes DWCNT, ce n'est pas le cas pour l'exposition à 50 $\mu\text{g/g}$ où les plasmodes DWCNT ont une vitesse de déplacement similaire aux plasmodes CMC (**Figure 28 (B)**).

Sur substrat attractif, la vitesse des plasmodes DWCNT est ralentie avec des indices de performance qui baissent pour une augmentation de la concentration d'exposition jusqu'à 50 $\mu\text{g/g}$. A une exposition de 100 $\mu\text{g/g}$ les plasmodes DWCNT ont une vitesse de déplacement, et des indices de performance, qui sont similaires à celui de l'exposition à 10 $\mu\text{g/g}$ (**Figure 28 (C)**).

Le substrat module l'effet des DWCNT sur la vitesse de croissance des plasmodes. A une exposition de 50 $\mu\text{g/g}$ on voit une baisse de l'indice de performance, et de la vitesse de déplacement des plasmodes DWCNT, sur les substrats neutres et attractifs. A une exposition de 100 $\mu\text{g/g}$ la baisse de l'indice de performance, et de la vitesse de déplacement des plasmodes DWCNT, est visible sur les 3 types de substrat. Pour le chapitre 3, nous avons continué d'exposer les plasmodes à une concentration de 100 $\mu\text{g/g}$.

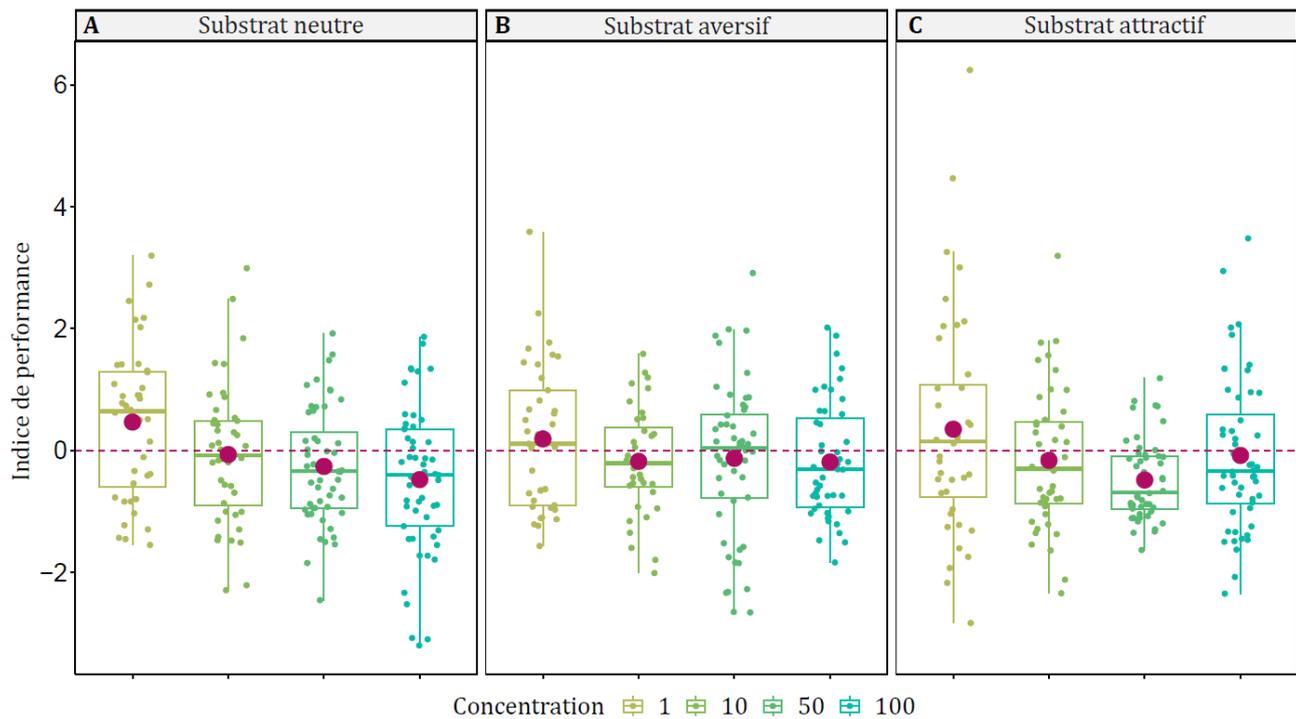


Figure 28: Indice de performance de la vitesse de déplacement des plasmodes selon la concentration d'exposition (1, 10, 50 ou 100 µg/g) pour chaque type de substrat (neutre (A) ; aversif (B) ; attractif (C)).

Entre 36 et 53 plasmodes ont été testés par condition. La barre horizontale représente la médiane, le point violet représente la moyenne.

3.4. Effet sur le processus de fusion des plasmodes

3.4.1.1. Protocole

Souche(s) : LU
Concentration(s) d'exposition : 100 µg/g
Durée(s) d'exposition : 3 jours
Type(s) d'expérience : Ponts
Paramètre(s) mesuré(s) : Latence pour que les 2 plasmodes se touchent, et durée du processus de fusion

Les plasmodes utilisés sont de la souche LU. Chaque plasmode a été exposé quotidiennement pendant les 3 jours précédant l'expérience. Au total nous avons réalisé 77 ponts par traitement, répartis sur 11 jours d'expérience.

Nous avons placé des ponts (35 mm) avec un plasmode à chaque extrémité (Ø 10 mm). Les plasmodes déposés sur un même pont ont été exposés au même traitement. Les ponts avec les plasmodes ont ensuite été déposés dans une étuve (25°C, ~70% humidité, obscurité) avec une photo prise toutes les 5 min pendant 24h.

Les paramètres mesurés grâce aux photos sont les suivants :

- Paramètre 1 (**Figure 30 (A)**) : La latence pour que les deux plasmodes entrent en contact, c'est-à-dire le temps nécessaire pour que les deux plasmodes se rejoignent et se contactent (avant la mise en commun des membranes) (**Figure 29**). La mesure n'a pas été réalisée si : un des deux plasmodes a migré et atteint le plasmode d'en face sans que ce dernier ait quitté sa pastille (4 plasmodes CMC concernés), l'événement n'est pas visible sur les photos car il a lieu sur le bord du pont (1 plasmode CMC et 2 plasmodes DWCNT concernés), l'événement a lieu alors que l'un des 2 plasmodes a déjà fusionné avec le plasmode d'un autre pont (4 plasmodes CMC et 1 plasmode DWCNT sont concernés), les plasmodes se sont touchés et l'un des 2 est parti immédiatement de l'autre côté (donc pas de fusion) (1 plasmode CMC concerné).
- Paramètre 2 (**Figure 30 (B)**) : La latence pour que la fusion débute. C'est le moment où nous commençons à percevoir des veines en commun entre les deux plasmodes sans que le flux ne soit encore synchrone entre les deux (**Figure 29**). C'est le paramètre le plus difficile à observer, en cas de doute la valeur n'a pas été prise en compte. C'est donc le paramètre pour lequel nous avons l'effectif le plus faible (59 plasmodes CMC et 69 plasmodes DWCNT).
- Paramètre 3 (**Figure 30 (C)**) : La latence pour que la fusion se termine représente la durée totale nécessaire pour que les deux plasmodes aient complètement fusionné, c'est-à-dire qu'il y a au moins une veine en commun entre les deux dont le flux est synchrone (**Figure 29**).
- Paramètre 4 (**Figure 30 (D)**) : La durée de fusion est calculée à partir des paramètres 1 et 3, et représente la durée du processus de fusion. Il diffère du paramètre précédent car il ne prend pas en compte l'effet potentiel du traitement sur la vitesse de croissance.

$$\text{Durée de fusion} = \text{Latence (paramètre 3)} - \text{Latence (paramètre 1)}$$

Pour évaluer les différences de chaque paramètre du processus de fusion selon le traitement, nous avons utilisé un modèle linéaire (fonction `lm`, famille d'erreur : Gaussienne, Package `lme4`). Le modèle a été ajusté en spécifiant l'effet fixe : traitement (prédicteur catégorique). Les variables dépendantes (Latences ou durée) ont été normalisées à l'aide de la fonction `bestNormalize` (Package `bestNormalize`).

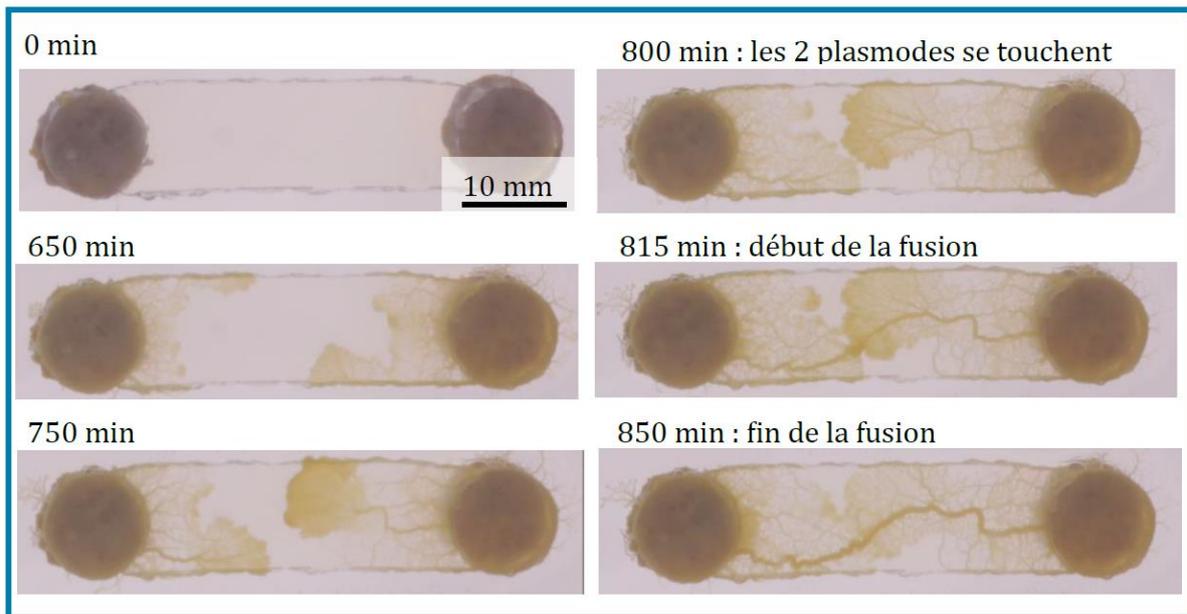


Figure 29 : Photos des étapes du processus de fusion de *P.polycephalum*

3.4.1.2. Résultats

Pour chaque paramètre, le traitement n'induit pas un effet significatif ($p = 0,542$; $p = 0,586$; et $p = 0,208$ et pour les paramètres 1, 2 et 3 respectivement, **Tableau S45**, **Tableau S46**, **Tableau S47**, **Figure 30**). Cependant, à chaque fois une tendance est observée avec des médianes et moyennes qui indiquent des temps de latence plus longs des plasmodes exposés aux DWCNT. Ainsi, deux plasmodes DWCNT mettent plus de temps à se rejoindre sur le pont et à se toucher (**Figure 30** (A)), ce ralentissement peut avoir lieu au départ de croissance (voir §2.3.4.6, §3.2.3, §3.2.4). Par conséquent, on observe également un retard pour le commencement de la fusion, et son achèvement.

Nous avons calculé la durée de fusion afin de s'affranchir de l'effet potentiel du traitement sur la vitesse de déplacement. On observe encore une fois une tendance des plasmodes DWCNT à mettre plus de temps à réaliser la fusion ($p = 0,104$, **Tableau S48**, **Figure 30** (D)).

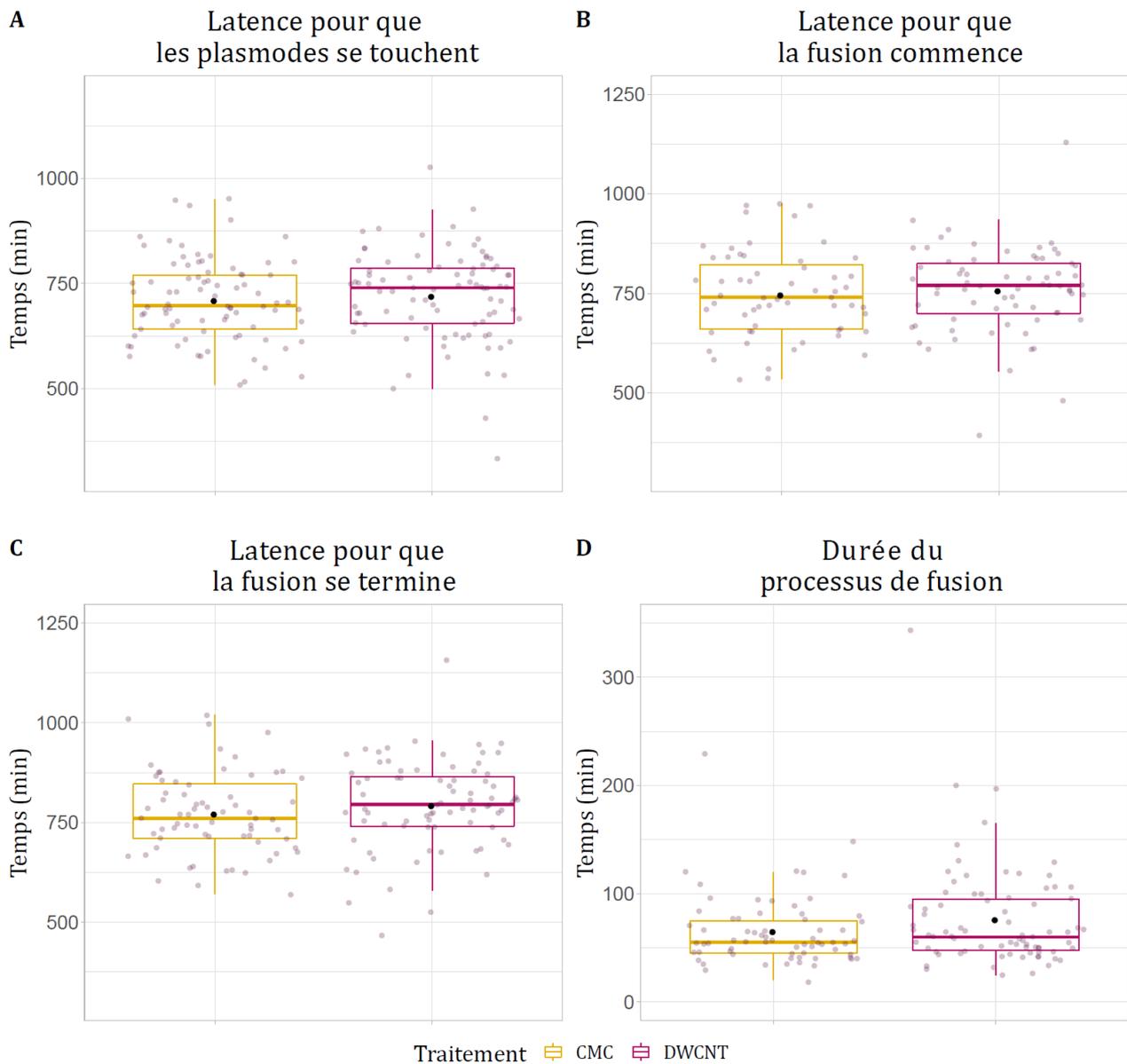


Figure 30 : Effet du traitement sur le processus de fusion à différentes étapes.

Latence pour que les 2 plasmodes se touchent ($n=82$ CMC ; $n=88$ DWCNT) (A) ; Latence pour que la fusion commence ($n=59$ CMC ; $n=69$ DWCNT) (B) ; Latence pour que la fusion se termine (C) et durée du processus de fusion ($n=68$ CMC ; $n=79$ DWCNT) (D).

3.5. Discussion

Pour résumer :

- Le traitement DWCNT n'influe pas significativement sur l'aire, et le périmètre des plasmodes. Cependant, les plasmodes DWCNT sont plus circulaires, et plus compacts (entre 500 et 900 minutes d'expérience) que les plasmodes CMC même s'ils recouvrent une aire similaire.
- La latence d'apparition du 1^{er} pseudopode n'est pas affectée par le traitement DWCNT pour la souche B1 (*B. utricularis*) et les souches LU, DW, JM, Malu (*P. polycephalum*). En revanche, les plasmodes DWCNT des souches de *P. polycephalum* sont plus rapides (latence de contact).
- Après 7 jours d'exposition, le traitement DWCNT n'affecte pas l'apparition du 1^{er} pseudopode pour aucune des souches (AUS et LU). En revanche, les plasmodes DWCNT de la souche AUS ont tendance à être ralentis, alors que la souche LU a tendance à être accélérée, par rapport aux plasmodes CMC.
- Il y a un ralentissement croissant de l'apparition du 1^{er} pseudopode des plasmodes DWCNT AUS avec l'augmentation de la durée d'exposition. Ce n'est pas le cas pour la latence de contact où on observe un ralentissement uniquement à 7 semaines d'exposition. Les plasmodes pour lesquels on stoppe l'exposition aux DWCNT (N-CMC) semblent récupérer une vitesse normale en seulement une journée.
- Un ralentissement de la vitesse de déplacement des plasmodes AUS DWCNT par rapport aux plasmodes CMC sur substrat aversif a été mesuré. Une accélération de la vitesse de déplacement des plasmodes N-CMC par rapport aux plasmodes CMC et DWCNT a été observée.
- Le substrat influe l'effet de la concentration en DWCNT sur la vitesse de déplacement des plasmodes LU. Sur substrat neutre la vitesse de déplacement des plasmodes DWCNT baisse avec l'augmentation de la concentration d'exposition. Sur substrats aversifs et attractifs l'effet est plus variable (la baisse de performance ne suit pas l'augmentation de l'exposition).
- Le processus de fusion n'est pas impacté significativement par le traitement. Cependant il y a une tendance des plasmodes LU DWCNT à être ralentis pour se rejoindre, ainsi que pour réaliser le processus de fusion.

Nos résultats indiquent que le traitement DWCNT semble influencer marginalement sur la morphologie des plasmodes durant leur expansion (augmentation de leur aire), en ayant une morphologie plus compacte et moins digitée (plus circulaire), ainsi qu'un effet sur la vitesse de déplacement des plasmodes. Ce dernier effet est variable, dans certains cas les DWCNT engendrent une accélération de leur vitesse de déplacement, dans d'autres cas ils induisent un ralentissement. L'effet des NTC sur la mobilité de *P. polycephalum* a déjà été réalisé. Gizzie, Mayne, & Adamatzky, (2016) ont observé une morphologie inchangée et un taux de croissance réduit après une exposition unique aux SWCNT. En parallèle, ils ont observé des perturbations électriques (non significatives) induisant une augmentation du potentiel membranaire et de la période d'oscillation, et une baisse de la résistance (= faire passer le courant électrique). Nous discuterons des potentiels effets des NTC sur l'oscillation de la période de contraction des plasmodes dans le Chapitre 5. Mais concernant l'effet des NTC sur le déplacement, l'étude de Gizzie, Mayne, & Adamatzky (2016) ne suffit pas à conclure sur l'effet des NTC sur *P. polycephalum*, et nos résultats montrent bien qu'en observant uniquement la vitesse de déplacement des plasmodes, l'effet varie selon les paramètres suivants : la souche, la durée d'exposition, le substrat, la concentration d'exposition.

Les DWCNT n'affectent pas la latence d'apparition du 1^{er} pseudopode pour la souche B1 (*B. utricularis*) et les souches LU, DW, JM, Malu (*P. polycephalum*). En revanche, pour atteindre le bord de l'arène, les plasmodes traités avec des DWCNT des souches de *P. polycephalum* sont plus rapides ce qui semble contredire les résultats obtenus dans le chapitre 2 (§ 2.3.4.6). Toutefois, le protocole suivi n'était pas le même. Ici, la durée d'exposition est de 3 jours, contre 7 jours minimum précédemment, et la souche utilisée dans le chapitre 2 était la souche AUS. A ce stade nous ne savons pas si la différence des effets (ralentissement de la vitesse précédemment, et aucun effet ou accélération ici) est dû à la durée d'exposition ou à la souche. L'effet sur ces 4 souches de *P. polycephalum* étant globalement similaire, nous avons utilisé la souche LU, que nous avons déjà utilisé pour une partie des expériences dans le chapitre 2. Cette souche est moins susceptible aux stress environnementaux que la souche AUS. Par exemple, la souche LU supporte des températures plus basses, est moins sujette aux contaminations durant l'élevage, croit et se déplace plus rapidement, est moins sensible à la lumière, et peut vivre plus longtemps au stade plasmode en laboratoire (> 3 ans pour la souche LU, nous n'avons jamais essayé d'élever la souche AUS au-delà de quelques mois) (observations d'A. Dussutour et observations personnelles). Nous avons pu observer, qu'après 7 jours d'exposition, la latence l'apparition du 1^{er} pseudopode n'est pas affectée par le traitement DWCNT, pour aucune des souches (AUS et LU). En revanche, les plasmodes DWCNT de la souche AUS ont tendance à être ralentis, alors que la souche LU a tendance à être accélérée, par rapport aux plasmodes CMC. Donc il y aurait un impact des DWCNT qui diffère selon la souche et qui impacterait négativement les plasmodes AUS qui sont aussi les plus susceptibles aux facteurs environnementaux.

D'après nos résultats, l'effet des DWCNT sur la vitesse de déplacement des plasmodes AUS n'est pas linéaire avec l'augmentation de la durée d'exposition. Nous avons précédemment observé que les agglomérats de DWCNT ne s'accumulent pas dans la cellule de *P. polycephalum*, et sont excrétés de la cellule en l'espace de 48h (Ternois et al., 2021), cela pourrait expliquer que l'effet

des DWCNT ne dépend pas de la durée d'exposition. Dans le chapitre 2 nous avons observé une augmentation de la latence d'apparition du 1^{er} pseudopode dès la 1^{ère} semaine d'exposition, jusqu'à la 6^e semaine d'exposition, sans augmentation de l'intensité de l'effet des DWCNT avec la durée d'exposition. Dans ce chapitre, nous avons noté que les DWCNT ralentissent également les plasmodes mais cet effet augmente avec la durée d'exposition. De même, les effets concernant la latence de contact sont contradictoires si nous les comparons aux effets observés dans le chapitre 2. Nous observons une diminution du taux d'expansion du plasmode quel que soit la durée d'exposition (§ 2.3.4.6), ce qui impliquerait une augmentation de la latence de contact avec le bord de l'arène. Or dans ce chapitre nous n'observons pas d'effet des DWCNT sur la latence de contact, sauf après 7 semaines d'exposition. Des études, sur la diversité des communautés bactériennes, ont déjà montré un effet non linéaire des NTC. Par exemple, une augmentation de la diversité bactérienne dans des sols après 4 semaines d'exposition, puis une baisse après 8 semaines d'exposition, pour une dose de 5000 µg/g de SWCNT (F. Wu et al., 2019). Une autre étude par les mêmes auteurs a ensuite montré encore une fois une augmentation de la diversité bactérienne après 4 semaines d'exposition, puis une baisse après 51 semaines d'exposition à 300 µg/g de SWCNT (F. Wu et al., 2021).

Nous ignorons quelles sont les raisons derrière les différences observées entre les expériences en arène du chapitre 2 et celles de ce chapitre. Nous avons utilisé la même souche, les mêmes durées d'exposition, des plasmodes de même âge (exposition dès le réveil), des concentrations d'exposition identique. Les seules différences sont l'expérimentateur et la suspension de DWCNT. Une nouvelle suspension a été préparée pour réaliser les expériences de ce chapitre, en suivant exactement le même protocole qui a servi à préparer la suspension de DWCNT du chapitre 2. Or nous n'avons pas quantifié la cinétique d'excrétion (§ 2.3.4.4) des plus petits agglomérats de NTC, et NTC individuels, qui sont plus facilement susceptibles d'interagir avec les composants intracellulaires alors que les gros agglomérats sont phagocytés (Garcia-Hevia et al., 2015), et qui peuvent continuer à produire des effets même quand les plus gros agglomérats sont excrétés. Il est possible que la suspension de DWCNT utilisée dans ce chapitre ait été composée en plus grande quantité de petits agglomérats, et NTC individuels, et ait amplifié les effets au cours du temps.

Nous ignorons également pourquoi le déplacement précoce (1^{er} pseudopode) est impacté, et pas la vitesse de déplacement dans l'arène par la suite. Nous pouvons nous demander si une perturbation mécanique des NTC, par leur interaction avec des composés intracellulaires (Garcia-Hevia et al., 2015), empêcherait une bonne réorganisation de la cellule après ou pendant la cicatrisation. Des études complémentaires sont nécessaires pour comprendre ce qui se passe à l'intérieur de la cellule de *P. polycephalum* en présence de NTC.

Évaluer l'effet des NTC sur la vitesse de déplacement de *P. polycephalum*, semble pertinent pour apporter des éléments sur leur effet potentiel sur la mobilité d'autres types cellulaires assurant des fonctions essentielles pour la survie des êtres-vivants (unicellulaires et multicellulaires) : développement embryonnaire, angiogenèse, cicatrisation, réponse immunitaire et inflammatoire, division cellulaire, *etc.* Des études, plus ou moins récentes, visent à utiliser les NTC pour leurs capacités à altérer la migration cellulaire (Badea et al., 2022; Nguyen et al., 2023), et à

interagir avec les structures intracellulaires tels que l'ADN (X. Li, Peng, & Qu, 2006; X. Li, Peng, Ren, et al., 2006), les microtubules (MT) (Garcia-Hevia et al., 2015), et les microfilaments d'actine (FA) (P. Zhang et al., 2020). Ces capacités peuvent servir à lutter contre les cellules cancéreuses (Garcia-Hevia et al., 2015).

Pour évaluer l'efficacité de la migration cellulaire il existe le test de cicatrisation qui consiste à créer une coupure à la surface d'une monocouche cellulaire, créant un espace libre similaire à une blessure, et de mesurer le temps que mettent les cellules environnantes à combler l'espace libre. L'utilisation de SWCNT-COOH-CDDP² engendre une baisse de la viabilité et une inhibition de la migration de cellules de cancer du sein (Badea et al., 2022). A noter que les SWCNT-COOH seuls, et le CDDP seul, ne provoquent pas ces effets. Une baisse de la viabilité cellulaire est également observée sur une autre lignée de cellules de cancer du sein après une exposition à des NTC-COOH-HAP³, en revanche il n'y a pas d'effet sur la migration cellulaire (Nguyen et al., 2023). Nous pouvons voir avec ces deux exemples que les tests sont très différents (type cellulaire, type de nanocomplexe, doses, etc.) (**Tableau S90**, page 239) et difficilement comparables entre eux. De plus, les mécanismes moléculaires impliqués restent peu connus pour l'instant, mais des effets mécaniques (interactions avec les MT et les FA) sont reportés.

Dans les cellules eucaryotes, les MT jouent un rôle important (mitose, division cellulaire). Chez *P. polycephalum*, la mitose est un phénomène important, récurrent et synchrone entre tous les noyaux (Baldauf & Doolittle, 1997), donc un effet des NTC sur les MT pourrait perturber le fonctionnement cellulaire du plasmode et expliquer un effet sur le déplacement de *P. polycephalum*. Altérer le fonctionnement du cytosquelette des cellules en perturbant le réseau de MT est le mode d'action d'une des molécules les plus connues utilisées en chimiothérapie, le paclitaxel (Garcia-Hevia et al., 2015). Des alternatives à cette molécule sont recherchées, car les cellules cancéreuses développent une résistance à cette dernière, ce qui a amené à la recherche de l'utilisation des NTC comme agents bloquants des MT. Les MT ont une forme tubulaire, similaire aux NTC (García-Hevia et al., 2014). Des études ont pour objectif d'utiliser les NTC pour perturber la division cellulaire, et la mitose, de cellules cancéreuses. Les NTC ayant une structure stable, leur interaction avec les MT perturbe la structure dynamique et le fonctionnement de ces derniers (Farajpour & Rastgoo, 2017; García-Hevia et al., 2014; Hevia & Fanarraga, 2020).

Il y a quelques années il a été montré que les NTC peuvent interagir avec un autre élément du cytosquelette, les filaments d'actines (FA). Ces derniers sont impliqués dans la forme de la cellule, la mobilité, et la division cellulaire (Holt et al., 2010). Les FA et les NTC ont des tailles d'un ordre de grandeur similaire (diamètre d'~1 nm et longueur de 100 nm à quelques µm) ce qui favorise des interactions (Holt et al., 2010), et des simulations informatiques ont démontré qu'une interaction par des forces de van der Waals énergétiquement favorables est possible (Shams et al., 2014). Expérimentalement, la présence de SWCNT dans la cellule ne provoque pas de mort cellulaire, en revanche elle engendre une redistribution des FA, une réduction de leur taille, et par

² SWCNT oxydés et couplés à la cisplatine, un médicament analogue du platine utilisé en chimiothérapie

³ NTC carboxylés couplés à de l'hydroxyapatite, type de NTC non précisé

conséquent une altération de la prolifération cellulaire ce qui peut provoquer des dommages à long terme sur les fonctions cellulaires (Holt et al., 2010, 2012). Plus récemment, il a été montré que des MWCNT peuvent perturber l'assemblage des fibres d'actine en affectant les fonctions mitochondriale de cellules cancéreuses ovariennes, en plus d'une inhibition de la migration cellulaire, et d'une baisse de la viabilité (P. Zhang et al., 2020). Les FA sont impliqués dans la contraction des veines, le flux de cytoplasme, et par conséquent dans la formation des pseudopodes chez *P. polycephalum* (Ishigami et al., 1987; Naib-Majani et al., 1982; Nakagaki, Yamada, & Ueda, 2000). Donc, l'effet des NTC sur la morphologie et le déplacement des plasmodes implique qu'ils ont peut-être une action sur le réseau veineux.

Enfin, il a été montré que les NTC peuvent être génotoxiques pour différents clades par l'induction de dommages à l'ADN, notamment chez les plantes (Ghosh et al., 2019), ou sur des cultures cellulaires (cellules de mammifères) et des modèles animaux (rongeurs) (Møller et al., 2021). Ce mode d'action des NTC pourrait perturber *P. polycephalum* dont la cellule possède des millions de noyaux. Par exemple, il a été montré que les NTC peuvent induire une cassure des brins d'ADN sur des cellules épithéliales de souris (Wils, Jacobsen, Di Ianni, et al., 2021). Les mêmes auteurs ont montré qu'en analysant le fluide de lavage de la cavité pleurale de souris après 1 ou 90 jours d'exposition, les SWCNT ont induit une augmentation des cassures de brin d'ADN, mais sans augmentation de la réponse inflammatoire, et les MWCNT ont induit une réponse inflammatoire sans provoquer de dommages à l'ADN (Wils, Jacobsen, Vogel, et al., 2021). Dans ces deux études les SWCNT et les MWCNT ont engendré une augmentation de la production d'espèces réactives de l'oxygène (ROS) (Wils, Jacobsen, Di Ianni, et al., 2021; Wils, Jacobsen, Vogel, et al., 2021). Nous évaluerons la production de ROS chez *P. polycephalum* dans le Chapitre 5.

La mobilité de *P. polycephalum* fait donc de lui un modèle pertinent pour évaluer la dynamique de la morphogenèse lors du déplacement et de l'exploration des cellules (Patino-Ramirez et al., 2019). Il serait intéressant d'aller plus loin, notamment en observant le réseau de FA chez *P. polycephalum* (Oettmeier et al., 2018) après une exposition aux NTC.

En stoppant l'exposition dans les expériences en arène (§ 3.2.4.2), nous observons une récupération de la vitesse des plasmodes en l'espace d'une journée alors qu'ils étaient soumis au traitement DWCNT pendant les 8 semaines précédentes. Dans les expériences utilisant des ponts (§ 3.3.1.2), après 2 jours de récupération et pour 3 types de substrats (neutre, aversif, attractif), nous observons une augmentation de la vitesse des plasmodes. Nous pouvons nous demander si le traitement DWCNT a engendré un stress cellulaire, pas forcément visible lorsque nous observons le déplacement, et qu'après un arrêt de l'exposition le plasmode devient plus performant (plus rapide). L'effet du traitement DWCNT est plus variable selon le substrat que le traitement N-CMC. Étonnamment, les plasmodes DWCNT (AUS) n'ont pas une vitesse diminuée sur substrat neutre, mais ils sont ralentis sur un substrat aversif. Nous pouvons alors suggérer qu'une combinaison de facteurs stressants (ici le traitement DWCNT et la substance aversive) peut amplifier l'effet des DWCNT. Nous développons cette approche dans le chapitre 4.

La vitesse de déplacement des plasmodes DWCNT baisse de manière linéaire avec l'augmentation de la concentration d'exposition sur substrat neutre. Sur substrats aversifs et attractifs l'effet est plus variable (la baisse de performance ne suit pas l'augmentation de l'exposition). Donc le substrat semble, encore une fois, jouer un rôle sur l'effet des DWCNT. En général, les concentrations utilisées pour une exposition des organismes du sol est généralement élevée. Or on pourrait se demander si des concentrations faibles pourraient impactées plus fortement les organismes. Dans notre cas, sur substrat neutre, on voit qu'à une exposition de 1 µg/g les plasmodes DWCNT sont en moyenne plus rapides que les plasmodes CMC. Ce n'est pas le cas sur les substrats aversif et attractif. Cela mériterait d'être investigué, car plusieurs NPs peuvent provoquer un phénomène d'hormésis (Iavicoli et al., 2014), qui engendre une réponse maximale à faible dose qui décroît avec l'augmentation de la dose.

Sur des cellules humaines (épithéliales alvéolaires), il a été montré une augmentation de la production de ROS dans les cellules après une exposition à 5 et 10 µg/mL, suivi d'une décroissance après une exposition à 50 et 100 µg/mL (Pulskamp, Wörle-Knirsch, et al., 2007). C'est un cas un peu particulier car les auteurs ont utilisé des SWCNT possédant une forte proportion de résidus métalliques (> 20% en masse), et ils supposent que ces impuretés ont provoqué une production de ROS en décalé et une meilleure réaction de l'organisme face au stress (diminution de la réponse) (Pulskamp, Wörle-Knirsch, et al., 2007). D'autres études, réalisées sur des macrophages alvéolaires de rats (NR8383) ou des cellules épithéliales bronchiales humaines (BEAS-2B), ont montrés une meilleure viabilité cellulaire aux plus faibles doses d'exposition de SWCNT et MWCNT suivi d'une décroissance de la viabilité cellulaire avec l'augmentation de la concentration d'exposition (Lindberg et al., 2009; Pulskamp, Diabaté, et al., 2007) (**Tableau S90**, page 239).

Comme nous l'avons déjà décrit, les DWCNT peuvent potentiellement interagir avec des filaments intracellulaires et perturber l'organisation cellulaire. Pourraient-ils interférer avec la fusion des membranes cellulaires lors du processus de fusion des plasmodes ? Nous n'avons pas observé d'effet du traitement DWCNT sur la durée du processus de fusion, même si une tendance à l'augmentation de la durée nécessaire pour le réaliser est perceptible. C'est un processus qui est affecté chez des plasmodes stressés, comme dans le cas du vieillissement (nous développons ce facteur de stress dans le chapitre 4). Deux plasmodes âgés mettent plus de temps à fusionner que deux plasmodes jeunes (Rolland et al., 2023). De plus, des plasmodes âgés qui fusionnent avec des plasmodes jeunes peuvent contrecarrer les effets négatifs du vieillissement sur la vitesse de déplacement, et à l'inverse des plasmodes jeunes qui fusionnent avec des plasmodes âgés, voient leur vitesse légèrement diminuer. Il aurait été intéressant dans notre cas de proposer à des plasmodes non exposés aux DWCNT d'avoir le choix de fusionner avec des plasmodes exposés au traitement DWCNT depuis plusieurs jours, ou des plasmodes exposés au traitement CMC.

En résumé, l'effet des DWCNT sur la vitesse de déplacement des plasmodes est variable et dépend de nombreux facteurs : la souche, la durée d'exposition, la concentration en NTC, et de la combinaison de stress. Nous avons donc décidé d'étudier par la suite l'effet des DWCNT sur la prise de décision en combinant divers facteurs de stress, des situations plus représentatives de l'exposition potentielle des organismes vivants dans leur environnement (Côté et al., 2016).

3.6. Annexe 3 : Tableaux statistiques et figures supplémentaires

3.6.1. Effet sur l'expansion du plasmode pendant 24h

Prédicteurs	Aire au cours du temps				
	Estimés	CI	Statistique	p	df
(Intercept)	-1.53	-1.67 – -1.38	-20.77	< 0.001	15706.00
[CMC] vs [DWCNT]	0.01	-0.19 – 0.22	0.14	0.892	15706.00
Temps	0.00	0.00 – 0.00	256.27	< 0.001	15706.00
Traitement*Temps	-0.00	-0.00 – -0.00	-2.11	0.035	15706.00
Effets Aléatoires					
σ^2	0.10				
τ_{00} ID_plasmod	0.15				
ICC	0.61				
N ID_plasmod	56				
Observations	15712				
R ² Marginal / R ² Conditionnel	0.763 / 0.908				

Tableau S19 : Statistiques associées à la Figure 19 (A).

Prédicteurs	Périmètre au cours du temps				
	Estimés	CI	Statistique	p	df
(Intercept)	-1.51	-1.63 – -1.40	-26.20	< 0.001	15706.00
[CMC] vs [DWCNT]	0.01	-0.15 – 0.17	0.15	0.884	15706.00
Temps	0.00	0.00 – 0.00	204.13	< 0.001	15706.00
Traitement*Temps	-0.00	-0.00 – -0.00	-6.60	< 0.001	15706.00
Effets Aléatoires					
σ^2	0.15				
τ_{00} ID_plasmod	0.09				
ICC	0.38				
N ID_plasmod	56				
Observations	15712				
R ² Marginal / R ² Conditionnel	0.761 / 0.851				

Tableau S20 : Statistiques associées à la Figure 19 (B).

Pour évaluer les différences d'aires, ou de périmètres, nous avons utilisé un modèle mixte linéaire (fonction lmer, famille d'erreur : Gaussienne, Package lme4). Le modèle a été ajusté en spécifiant les effets fixes : traitement (prédicteur catégorique), temps (prédicteur continu) ; et l'effet aléatoire : ID (identité du plasmode). La variable dépendante (Aire ou Périmètre) a été normalisée à l'aide de la fonction bestNormalize (Package bestNormalize).

Circularité au cours du temps					
<i>Prédicteurs</i>	<i>Estimés</i>	<i>CI</i>	<i>Statistique</i>	<i>p</i>	<i>df</i>
(Intercept)	1.40	1.26 – 1.53	20.22	<0.001	15706.00
[CMC] vs [DWCNT]	0.01	-0.18 – 0.21	0.15	0.880	15706.00
Temps	-0.00	-0.00 – -0.00	-160.07	<0.001	15706.00
Traitement*Temps	0.00	0.00 – 0.00	4.22	<0.001	15706.00
Effets Aléatoires					
σ^2	0.21				
τ_{00} ID_plasmod	0.13				
ICC	0.38				
N ID_plasmod	56				
Observations	15712				
R ² Marginal / R ² Conditionnel	0.661 / 0.791				

Tableau S21 : Statistiques associées à la Figure 20 (A).

Solidité au cours du temps					
<i>Prédicteurs</i>	<i>Estimés</i>	<i>CI</i>	<i>Statistique</i>	<i>p</i>	<i>df</i>
(Intercept)	0.91	0.78 – 1.05	13.19	<0.001	15707.00
[CMC] vs [DWCNT]	0.03	-0.16 – 0.22	0.30	0.767	15707.00
Temps	-0.00	-0.00 – -0.00	-87.73	<0.001	15707.00
Effets Aléatoires					
σ^2	0.58				
τ_{00} ID_plasmod	0.13				
ICC	0.18				
N ID_plasmod	56				
Observations	15712				
R ² Marginal / R ² Conditionnel	0.287 / 0.416				

Tableau S22 : Statistiques associées à la Figure 20 (B).

Pour évaluer les différences de circularité, ou de solidité, nous avons utilisé un modèle mixte linéaire (fonction lmer, famille d'erreur : Gaussienne, Package lme4). Le modèle a été ajusté en spécifiant les effets fixes : traitement (prédicteur catégorique), temps (prédicteur continue) ; et l'effet aléatoire : ID (identité du plasmode). La variable dépendante (Circularité ou Solidité) a été normalisée à l'aide de la fonction bestNormalize (Package bestNormalize).

Aire entre 500 et 1250 minutes					
<i>Prédicteurs</i>	<i>Estimés</i>	<i>CI</i>	<i>Statistique</i>	<i>p</i>	<i>df</i>
(Intercept)	-2.60	-2.87 – -2.33	-18.92	<0.001	8450.00
[CMC] vs [DWCNT]	-0.10	-0.48 – 0.28	-0.53	0.595	8450.00
Temps	0.00	0.00 – 0.00	170.71	<0.001	8450.00
Traitement*Temps	0.00	0.00 – 0.00	3.81	<0.001	8450.00
Effets Aléatoires					
σ^2	0.06				
τ_{00} ID_plasmod	0.52				
ICC	0.89				
N ID_plasmod	56				
Observations	8456				
R ² Marginal / R ² Conditionnel	0.428 / 0.940				

Tableau S23 : Statistiques associées à la Figure 21 (A).

Périmètre entre 500 et 1250 minutes					
<i>Prédicteurs</i>	<i>Estimés</i>	<i>CI</i>	<i>Statistique</i>	<i>p</i>	<i>df</i>
(Intercept)	-2.61	-2.84 – -2.37	-21.80	<0.001	8451.00
[CMC] vs [DWCNT]	-0.16	-0.49 – 0.17	-0.95	0.344	8451.00
Temps	0.00	0.00 – 0.00	149.01	<0.001	8451.00
Effets Aléatoires					
σ^2	0.17				
τ_{00} ID_plasmod	0.39				
ICC	0.70				
N ID_plasmod	56				
Observations	8456				
R ² Marginal / R ² Conditionnel	0.447 / 0.832				

Tableau S24 : Statistiques associées à la Figure 21 (B).

Pour évaluer les différences d'aire, ou de périmètre, nous avons utilisé un modèle mixte linéaire (fonction lmer, famille d'erreur : Gaussienne, Package lme4). Le modèle a été ajusté en spécifiant les effets fixes : traitement (prédicteur catégorique), temps (prédicteur continu) ; et l'effet aléatoire : ID (identité du plasmode). La variable dépendante (Aire ou Périmètre) a été normalisée à l'aide de la fonction bestNormalize (Package bestNormalize).

Circularité entre 500 et 1250 minutes					
<i>Prédicteurs</i>	<i>Estimés</i>	<i>CI</i>	<i>Statistique</i>	<i>p</i>	<i>df</i>
(Intercept)	1.93	1.67 – 2.20	14.22	<0.001	8450.00
[CMC] vs [DWCNT]	0.38	0.01 – 0.76	1.99	0.047	8450.00
Temps	-0.00	-0.00 – -0.00	-66.57	<0.001	8450.00
Traitement*Temps	-0.00	-0.00 – -0.00	-5.03	<0.001	8450.00
Effets Aléatoires					
σ^2	0.24				
τ_{00} ID_plasmod	0.49				
ICC	0.67				
N ID_plasmod	56				
Observations	8456				
R ² Marginal / R ² Conditionnel	0.282 / 0.764				

Tableau S25 : Statistiques associées à la Figure 21 (C).

Solidité entre 500 et 1250 minutes					
<i>Prédicteurs</i>	<i>Estimés</i>	<i>CI</i>	<i>Statistique</i>	<i>p</i>	<i>df</i>
(Intercept)	-0.41	-0.69 – -0.13	-2.86	0.004	8450.00
[CMC] vs [DWCNT]	0.40	0.01 – 0.80	2.00	0.046	8450.00
Temps	0.00	0.00 – 0.00	8.76	<0.001	8450.00
Traitement*Temps	-0.00	-0.00 – -0.00	-5.70	<0.001	8450.00
Effets Aléatoires					
σ^2	0.50				
τ_{00} ID_plasmod	0.51				
ICC	0.51				
N ID_plasmod	56				
Observations	8456				
R ² Marginal / R ² Conditionnel	0.005 / 0.508				

Tableau S26 : Statistiques associées à la Figure 21 (D).

Pour évaluer les différences de circularité, ou de solidité, nous avons utilisé un modèle mixte linéaire (fonction lmer, famille d'erreur : Gaussienne, Package lme4). Le modèle a été ajusté en spécifiant les effets fixes : traitement (prédicteur catégorique), temps (prédicteur continue) ; et l'effet aléatoire : ID (identité du plasmode). La variable dépendante (Circularité ou Solidité) a été normalisée à l'aide de la fonction bestNormalize (Package bestNormalize).

Transition Iso-digité					
<i>Prédicteurs</i>	<i>Estimés</i>	<i>CI</i>	<i>Statistique</i>	<i>p</i>	<i>df</i>
(Intercept)	0.01	-0.34 – 0.37	0.08	0.938	62.00
[CMC] vs [DWCNT]	-0.03	-0.53 – 0.48	-0.11	0.912	62.00
Observations	64				
R ² / R ² ajusté	0.000 / -0.016				

Tableau S27 : Statistiques associées à la Figure 22.

Pour évaluer les différences de latences de transition Iso-digité nous avons utilisé un modèle linéaire (fonction *lm*, famille d'erreur : Gaussienne, Package *lme4*). Le modèle a été ajusté en spécifiant l'effet fixe : traitement (prédicteur catégorique). La variable dépendante (Latence) a été normalisée à l'aide de la fonction *bestNormalize* (Package *bestNormalize*).

3.6.2. Effet selon la souche du plasmode

Latence 1^{er} pseudopode : <i>B.utricularis</i>					
<i>Prédicteurs</i>	<i>Estimés</i>	<i>CI</i>	<i>Statistique</i>	<i>p</i>	<i>df</i>
(Intercept)	0.07	-0.21 – 0.36	0.50	0.615	90.00
Traitement [DWCNT vs CMC]	-0.08	-0.49 – 0.33	-0.36	0.718	90.00
Effets Aléatoires					
σ^2	0.65				
τ_{00} ID_plasmod	0.18				
ICC	0.22				
N ID_plasmod	47				
Observations	94				
R ² Marginal / R ² Conditionnel	0.002 / 0.218				

Tableau S28 : Statistiques associées à la Figure S7 (A, B).

Pour évaluer les différences de latences (1^{er} pseudopode et contact), nous avons utilisé un modèle mixte linéaire (fonction *lmer*, famille d'erreur : Gaussienne, Package *lme4*). Le modèle a été ajusté en spécifiant l'effet fixe : traitement (prédicteur catégorique) ; et l'effet aléatoire : ID (identité du plasmode). La variable dépendante (Latence) a été normalisée à l'aide de la fonction *bestNormalize* (Package *bestNormalize*).

Latence 1^{er} pseudopode : <i>P.polycephalum</i>					
<i>Prédicteurs</i>	<i>Estimés</i>	<i>CI</i>	<i>Statistique</i>	<i>p</i>	<i>df</i>
(Intercept)	-0.04	-0.31 – 0.22	-0.32	0.752	456.00
Traitement [DWCNT vs CMC]	-0.13	-0.34 – 0.09	-1.16	0.246	456.00
Souche [DW vs LU]	-0.46	-0.77 – -0.15	-2.90	0.004	456.00
Souche [JM vs LU]	0.61	0.30 – 0.93	3.83	<0.001	456.00
Souche [Malu vs LU]	0.25	-0.09 – 0.58	1.46	0.145	456.00
Effets Aléatoires					
σ^2	0.54				
τ_{00} ID_plasmod	0.38				
ICC	0.41				
N ID_plasmod	208				
Observations	463				
R ² Marginal / R ² Conditionnel	0.169 / 0.511				

Tableau S29 : Statistiques associées à la Figure S7 (A).

Latence de contact : <i>P.polycephalum</i>					
<i>Prédicteurs</i>	<i>Estimés</i>	<i>CI</i>	<i>Statistique</i>	<i>p</i>	<i>df</i>
(Intercept)	0.47	0.24 – 0.70	4.04	<0.001	380.00
Traitement [DWCNT]	-0.24	-0.44 – -0.04	-2.36	0.019	380.00
Strain [DW]	-0.99	-1.26 – -0.73	-7.38	<0.001	380.00
Strain [JM]	0.67	0.37 – 0.98	4.37	<0.001	380.00
Strain [Malu]	0.05	-0.24 – 0.34	0.36	0.722	380.00
Effets Aléatoires					
σ^2	0.35				
τ_{00} ID_plasmod	0.29				
ICC	0.46				
N ID_plasmod	187				
Observations	387				
R ² Marginal / R ² Conditionnel	0.389 / 0.670				

Tableau S30 : Statistiques associées à la Figure S7 (B).

Pour évaluer les différences de latences (1^{er} pseudopode et contact), nous avons utilisé un modèle mixte linéaire (fonction *lmer*, famille d'erreur : Gaussienne, Package *lme4*). Le modèle a été ajusté en spécifiant les effets fixes : traitement, souche (prédicteurs catégoriques) ; et l'effet aléatoire : ID (identité du plasmode). La variable dépendante (Latence) a été normalisée à l'aide de la fonction *bestNormalize* (Package *bestNormalize*).

Indice 1^{er} pseudopode : <i>P.polycephalum</i>					
<i>Prédicteurs</i>	<i>Estimés</i>	<i>CI</i>	<i>Statistique</i>	<i>p</i>	<i>df</i>
(Intercept)	0.05	-0.28 – 0.38	0.31	0.760	229.00
Souche [DW vs LU]	-0.15	-0.58 – 0.28	-0.67	0.504	229.00
Souche [JM vs LU]	0.06	-0.38 – 0.50	0.26	0.797	229.00
Souche [Malu vs LU]	0.12	-0.34 – 0.59	0.52	0.604	229.00
Effets Aléatoires					
σ^2	0.59				
τ_{00} ID_plasmod	0.36				
ICC	0.38				
N ID_plasmod	106				
Observations	235				
R ² Marginal / R ² Conditionnel	0.011 / 0.387				

Tableau S31 : Statistiques associées à la Figure 23 (C, D).

Indice contact : <i>P.polycephalum</i>					
<i>Prédicteurs</i>	<i>Estimés</i>	<i>CI</i>	<i>Statistique</i>	<i>p</i>	<i>df</i>
(Intercept)	-0.16	-0.51 – 0.19	-0.89	0.374	185.00
Souche [DW vs LU]	0.27	-0.20 – 0.73	1.13	0.260	185.00
Souche [JM vs LU]	0.12	-0.47 – 0.72	0.41	0.682	185.00
Souche [Malu vs LU]	0.08	-0.42 – 0.59	0.33	0.742	185.00
Effets Aléatoires					
σ^2	0.42				
τ_{00} ID_plasmod	0.54				
ICC	0.56				
N ID_plasmod	90				
Observations	191				
R ² Marginal / R ² Conditionnel	0.012 / 0.569				

Tableau S32 : Statistiques associées à la Figure 23 (C, D).

Pour évaluer les différences des indices de performance, nous avons utilisé un modèle mixte linéaire (fonction lmer, famille d'erreur : Gaussienne, Package lme4). Le modèle a été ajusté en spécifiant l'effet fixe : souche (prédicteur catégorique) ; et l'effet aléatoire : ID (identité du plasmode). La variable dépendante (Indice) a été normalisée à l'aide de la fonction bestNormalize (Package bestNormalize).

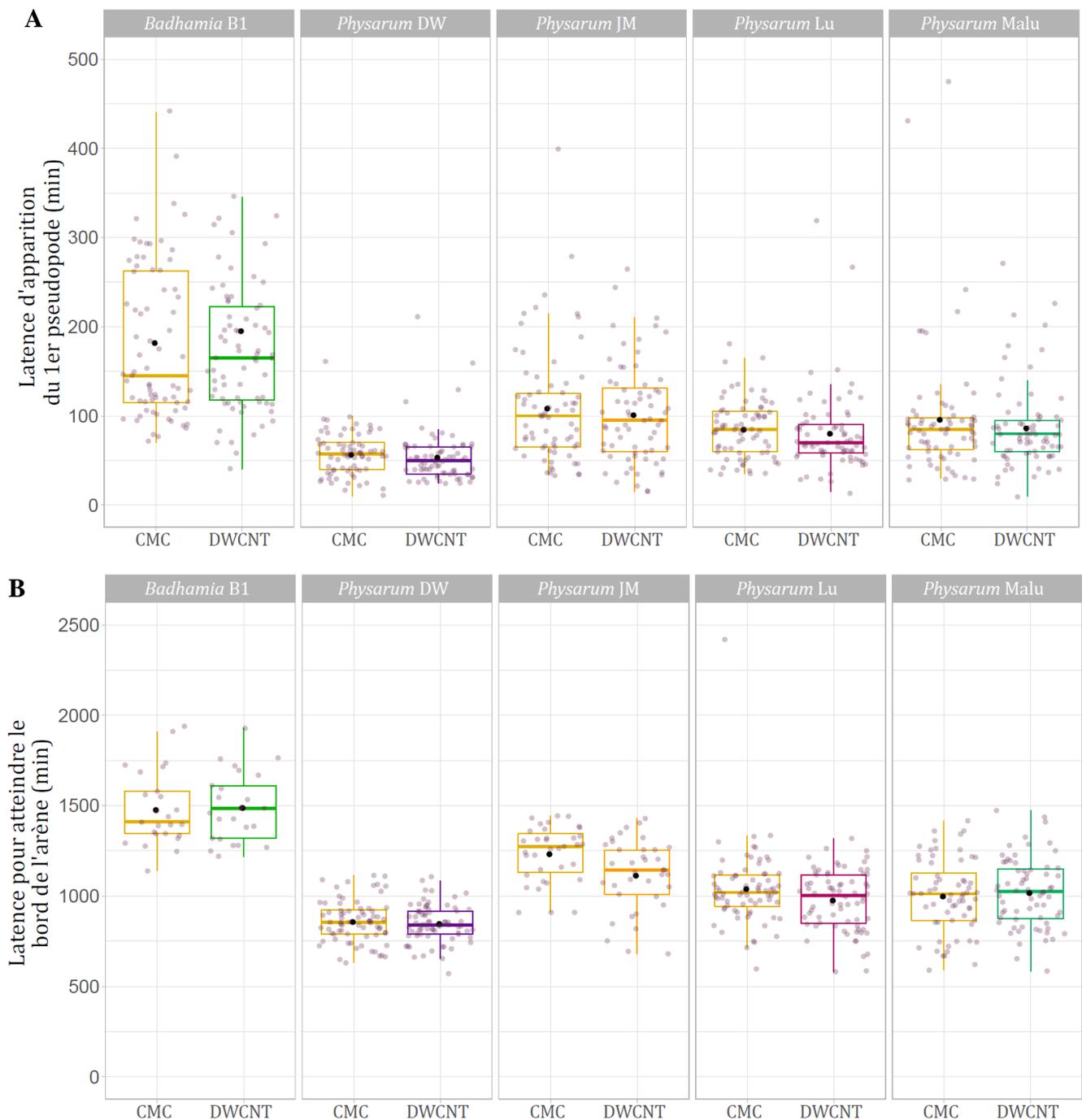


Figure S7 : Latence d'apparition du 1^{er} pseudopode (A) et d'atteinte du bord de l'arène (B) pour 5 souches suivant une exposition chronique de 3 jours aux DWCNT.

Pour le 1^{er} événement (A) : $n = 71$ par traitement (souches B1 et Malu), $n = 72$ par traitement (souches DW et LU), $n = 70$ CMC et 68 DWCNT (souche JM). Pour le 2^e événement : $n = 25$ par traitement (souche B1), $n = 72$ par traitement (souche DW et LU), $n = 31$ CMC et 37 DWCNT (souche JM), $n = 64$ CMC et 67 DWCNT (souche Malu). La barre horizontale représente la médiane et le point noir la moyenne.

3.6.3. Effet après 7 jours d'exposition : souches LU et AUS

Indice de performance : Latence 1er pseudopode					
<i>Prédicteurs</i>	<i>Estimés</i>	<i>CI</i>	<i>Statistique</i>	<i>p</i>	<i>df</i>
(Intercept)	0.06	-0.22 – 0.33	0.40	0.688	195.00
Souche [AUS] vs [LU]	-0.13	-0.54 – 0.27	-0.65	0.516	195.00
Effets Aléatoires					
σ^2	0.76				
τ_{00} ID_plasmod	0.27				
ICC	0.26				
N ID_plasmod	40				
Observations	199				
R ² Marginal / R ² Conditionnel	0.004 / 0.264				

Tableau S33 : Statistiques associées à la Figure 24 (A).

Indice de performance : Latence de contact					
<i>Prédicteurs</i>	<i>Estimés</i>	<i>CI</i>	<i>Statistique</i>	<i>p</i>	<i>df</i>
(Intercept)	0.14	-0.06 – 0.35	1.41	0.158	195.00
Souche [AUS] vs [LU]	-0.36	-0.67 – -0.05	-2.27	0.023	195.00
Effets Aléatoires					
σ^2	0.92				
τ_{00} ID_plasmod	0.06				
ICC	0.06				
N ID_plasmod	40				
Observations	199				
R ² Marginal / R ² Conditionnel	0.031 / 0.086				

Tableau S34 : Statistiques associées à la Figure 24 (B).

Pour évaluer les différences des indices de performance calculés à partir des latences (1^{er} pseudopode et contact), selon la souche, nous avons utilisé un modèle mixte linéaire (fonction lmer, famille d'erreur : Gaussienne, Package lme4). Le modèle a été ajusté en spécifiant l'effet fixe : souche (prédicteur catégorique) ; et l'effet aléatoire : ID (identité du plasmode). La variable dépendante (Indice de performance) a été normalisée à l'aide de la fonction bestNormalize (Package bestNormalize).

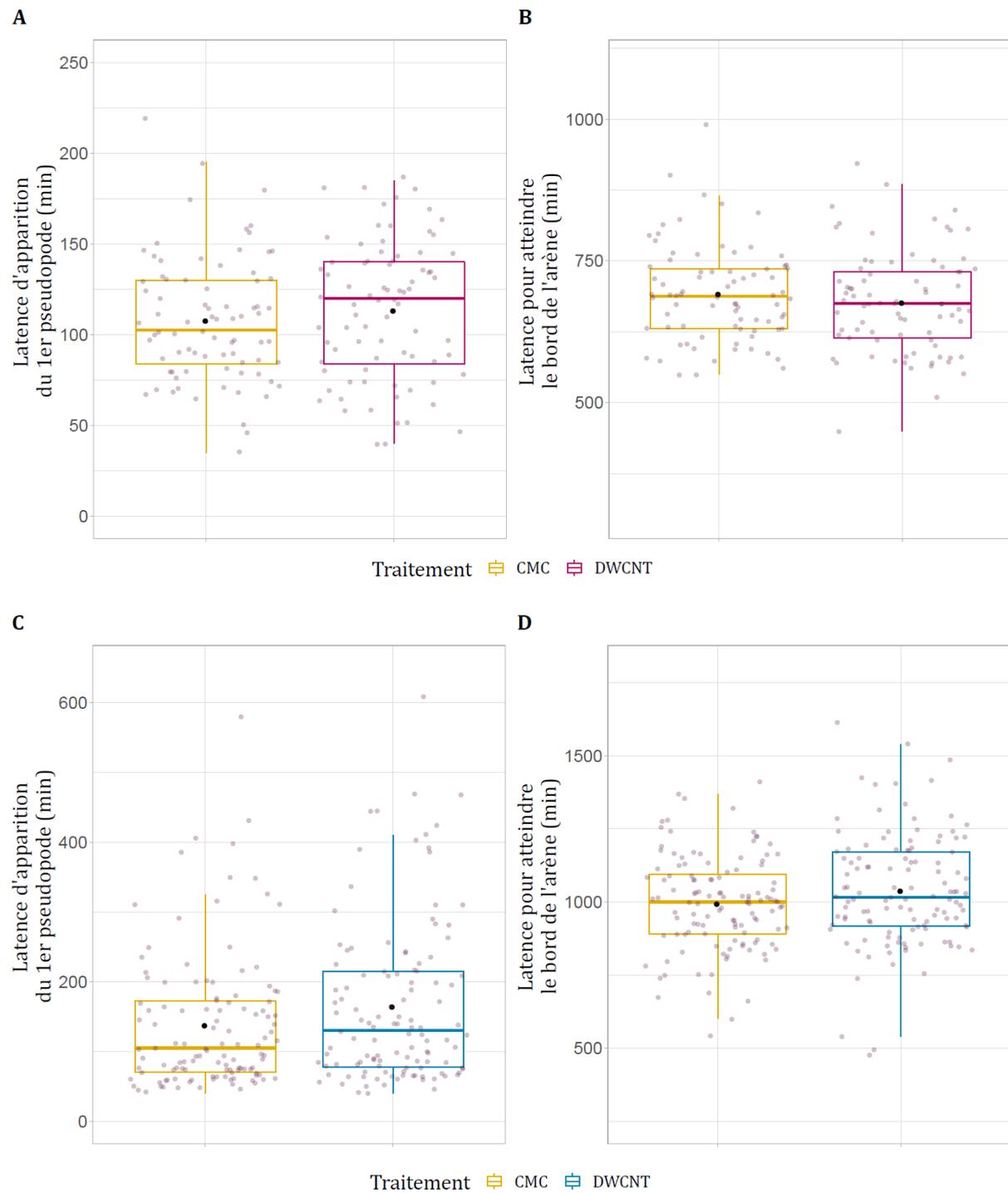


Figure S8 : Latence d'apparition du 1^{er} pseudopode des souches AUS (A) et LU (C), et latence de contact avec le bord de l'arène des souches AUS (B) et LU (D), suivant une exposition chronique de 7 jours aux DWCNT.

80 et 120 plasmodes par traitement, pour les souches AUS et LU respectivement, ont été mesurés. La barre horizontale représente la médiane et le point noir la moyenne.

3.6.4. Effet selon la durée d'exposition : de 2 à 8 semaines

Latence 1^{er} pseudopode : 2 à 8 semaines					
<i>Prédicteurs</i>	<i>Estimés</i>	<i>CI</i>	<i>Statistique</i>	<i>p</i>	<i>df</i>
(Intercept)	-0.44	-0.67 – -0.21	-3.77	<0.001	285.00
[DWCNT] vs [CMC]	0.37	0.09 – 0.65	2.60	0.010	285.00
[2 semaines] vs [3 semaines]	-0.47	-0.66 – -0.27	-4.61	<0.001	285.00
[2 semaines] vs [7 semaines]	1.23	1.04 – 1.43	12.24	<0.001	285.00
[2 semaines] vs [8 semaines]	0.32	0.09 – 0.54	2.76	0.006	285.00
Effets Aléatoires					
σ^2	0.41				
τ_{00} ID_plasmod	0.15				
ICC	0.26				
N ID_plasmod	40				
Observations	292				
R ² Marginal / R ² Conditionnel	0.454 / 0.598				

Tableau S35 : Statistiques associées à la Figure S9 (A).

Pour évaluer les différences des latences d'apparition du 1^{er} pseudopode sur la souche AUS, nous avons utilisé un modèle mixte linéaire (fonction *lmer*, famille d'erreur : Gaussienne, Package *lme4*). Le modèle a été ajusté en spécifiant les effets fixes : traitement, durée d'exposition (prédicteur catégorique) ; et l'effet aléatoire : ID (identité du plasmode). La variable dépendante (Latence) a été normalisée à l'aide de la fonction *bestNormalize* (Package *bestNormalize*).

Latence contact : 2 à 8 semaines						
<i>Prédicteurs</i>	<i>Estimés</i>	<i>CI</i>	<i>Statistique</i>	<i>p</i>	<i>df</i>	
(Intercept)	-0.13	-0.49 – 0.23	-0.72	0.469	278.00	
[DWCNT] vs [CMC]	0.17	-0.33 – 0.67	0.68	0.497	278.00	
[2 semaines] vs [3 semaines]	0.33	-0.02 – 0.69	1.84	0.066	278.00	
[2 semaines] vs [7 semaines]	-0.21	-0.57 – 0.15	-1.17	0.242	278.00	
[2 semaines] vs [8 semaines]	-0.21	-0.61 – 0.19	-1.02	0.308	278.00	
[DWCNT]*[2 semaines] vs [DWCNT]*[3 semaines]	-0.17	-0.67 – 0.33	-0.67	0.506	278.00	
[DWCNT]*[2 semaines] vs [DWCNT]*[7 semaines]	0.62	0.12 – 1.13	2.42	0.016	278.00	
[DWCNT]*[2 semaines] vs [DWCNT]*[8 semaines]	0.07	-0.50 – 0.64	0.25	0.800	278.00	
Effets Aléatoires						
σ^2	0.64					
τ_{00} ID_plasmod	0.32					
ICC	0.33					
N ID_plasmod	40					
Observations	288					
R ² Marginal / R ² Conditionnel	0.067 / 0.378					

Tableau S36 : Statistiques associées à la Figure S9 (B).

Pour évaluer les différences des latences de contact sur la souche AUS, nous avons utilisé un modèle mixte linéaire (fonction *lmer*, famille d'erreur : Gaussienne, Package *lme4*). Le modèle a été ajusté en spécifiant les effets fixes : traitement, durée d'exposition (prédicteur catégorique) ; et l'effet aléatoire : ID (identité du plasmode). La variable dépendante (Latence) a été normalisée à l'aide de la fonction *bestNormalize* (Package *bestNormalize*).

Indice de performance 1er pseudopode : 2 à 8 semaines d'exposition					
<i>Prédicteurs</i>	<i>Estimés</i>	<i>CI</i>	<i>Statistique</i>	<i>p</i>	<i>df</i>
(Intercept)	-0.33	-0.68 – 0.02	-1.89	0.061	140.00
[2 semaines] vs [3 semaines]	0.22	-0.12 – 0.57	1.28	0.203	140.00
[2 semaines] vs [7 semaines]	0.38	0.03 – 0.72	2.15	0.033	140.00
[2 semaines] vs [8 semaines]	1.03	0.63 – 1.42	5.16	<0.001	140.00
Effets Aléatoires					
σ^2	0.61				
τ_{00} ID_plasmod	0.31				
ICC	0.34				
N ID_plasmod	20				
Observations	146				
R ² Marginal / R ² Conditionnel	0.116 / 0.414				

Tableau S37 : Statistiques associées à la Figure 25 (A) .

Indice de performance 1er pseudopode Comparaison par paires					
<i>Prédicteurs</i>	<i>Estimés</i>	<i>SE</i>	<i>df</i>	<i>t.ratio</i>	<i>p.value</i>
[2 semaines] vs [3 semaines]	-0.223	0.175	123	-1.279	0.4067
[2 semaines] vs [7 semaines]	-0.376	0.175	123	-2.151	0.1002
[2 semaines] vs [8 semaines]	-1.027	0.199	125	-5.160	<.0001
[3 semaines] vs [7 semaines]	-0.152	0.175	123	-0.872	0.4067
[3 semaines] vs [8 semaines]	-0.803	0.199	125	-4.038	0.0005
[7 semaines] vs [8 semaines]	-0.651	0.199	125	-3.272	0.0055

Tableau S38 : Statistiques associées à la Figure 25 (A).

Pour évaluer les différences des indices de performances sur la souche AUS, nous avons utilisé un modèle mixte linéaire (fonction *lmer*, famille d'erreur : Gaussienne, Package *lme4*). Le modèle a été ajusté en spécifiant l'effet fixe : durée d'exposition (prédicteur catégorique) ; et l'effet aléatoire : ID (identité du plasmode). La variable dépendante (Indice) a été normalisée à l'aide de la fonction *bestNormalize* (Package *bestNormalize*). Nous avons ensuite réalisé une comparaison par paires (correction de Satterthwaite, Package *emmeans*) des durées d'exposition.

Indice de performance temps de contact : 2 à 8 semaines d'exposition					
<i>Prédicteurs</i>	<i>Estimés</i>	<i>CI</i>	<i>Statistique</i>	<i>p</i>	<i>df</i>
(Intercept)	-0.07	-0.43 – 0.29	-0.38	0.706	139.00
[2 semaines] vs [3 semaines]	-0.17	-0.54 – 0.19	-0.94	0.351	139.00
[2 semaines] vs [7 semaines]	0.40	0.03 – 0.77	2.15	0.033	139.00
[2 semaines] vs [8 semaines]	0.13	-0.29 – 0.55	0.63	0.531	139.00
Effets Aléatoires					
σ^2	0.69				
τ_{00} ID_plasmod	0.31				
ICC	0.31				
N ID_plasmod	20				
Observations	145				
R ² Marginal / R ² Conditionnel	0.046 / 0.341				

Tableau S39 : Statistiques associées à la Figure 25 (B) .

Pour évaluer les différences des indices de performances sur la souche AUS, nous avons utilisé un modèle mixte linéaire (fonction `lmer`, famille d'erreur : Gaussienne, Package `lme4`). Le modèle a été ajusté en spécifiant l'effet fixe : durée d'exposition (prédicteur catégorique) ; et l'effet aléatoire : ID (identité du plasmode). La variable dépendante (Indice) a été normalisée à l'aide de la fonction `bestNormalize` (Package `bestNormalize`).

Latence 1^{er} pseudopode : 8 semaines					
<i>Prédicteurs</i>	<i>Estimés</i>	<i>CI</i>	<i>Statistique</i>	<i>p</i>	<i>df</i>
(Intercept)	-0.42	-0.84 – -0.00	-2.01	0.048	73.00
[CMC] vs [N-CMC]	0.53	-0.08 – 1.14	1.73	0.088	73.00
[CMC] vs [DWCNT]	0.71	0.10 – 1.31	2.33	0.022	73.00
Effets Aléatoires					
σ^2	0.23				
τ_{00} ID_plasmod	0.69				
ICC	0.75				
N ID_plasmod	55				
Observations	78				
R ² Marginal / R ² Conditionnel	0.091 / 0.773				

Tableau S40 : Statistiques associées à la Figure 26 (A).

Latence contact: 8 semaines					
<i>Prédicteurs</i>	<i>Estimés</i>	<i>CI</i>	<i>Statistique</i>	<i>p</i>	<i>df</i>
(Intercept)	-0.18	-0.60 – 0.25	-0.84	0.405	73.00
[CMC] vs [N-CMC]	0.50	-0.12 – 1.11	1.61	0.112	73.00
[CMC] vs [DWCNT]	0.29	-0.32 – 0.90	0.96	0.341	73.00
Effets Aléatoires					
σ^2	0.49				
τ_{00} ID_plasmod	0.51				
ICC	0.51				
N ID_plasmod	55				
Observations	78				
R ² Marginal / R ² Conditionnel	0.041 / 0.526				

Tableau S41 : Statistiques associées à la Figure 26 (B).

Pour évaluer les différences des latences sur la souche AUS après 8 semaines d'exposition, nous avons utilisé un modèle mixte linéaire (fonction `lmer`, famille d'erreur : Gaussienne, Package `lme4`). Le modèle a été ajusté en spécifiant l'effet fixe : traitement (prédicteur catégorique) ; et l'effet aléatoire : ID (identité du plasmode). La variable dépendante (Latence) a été normalisée à l'aide de la fonction `bestNormalize` (Package `bestNormalize`).

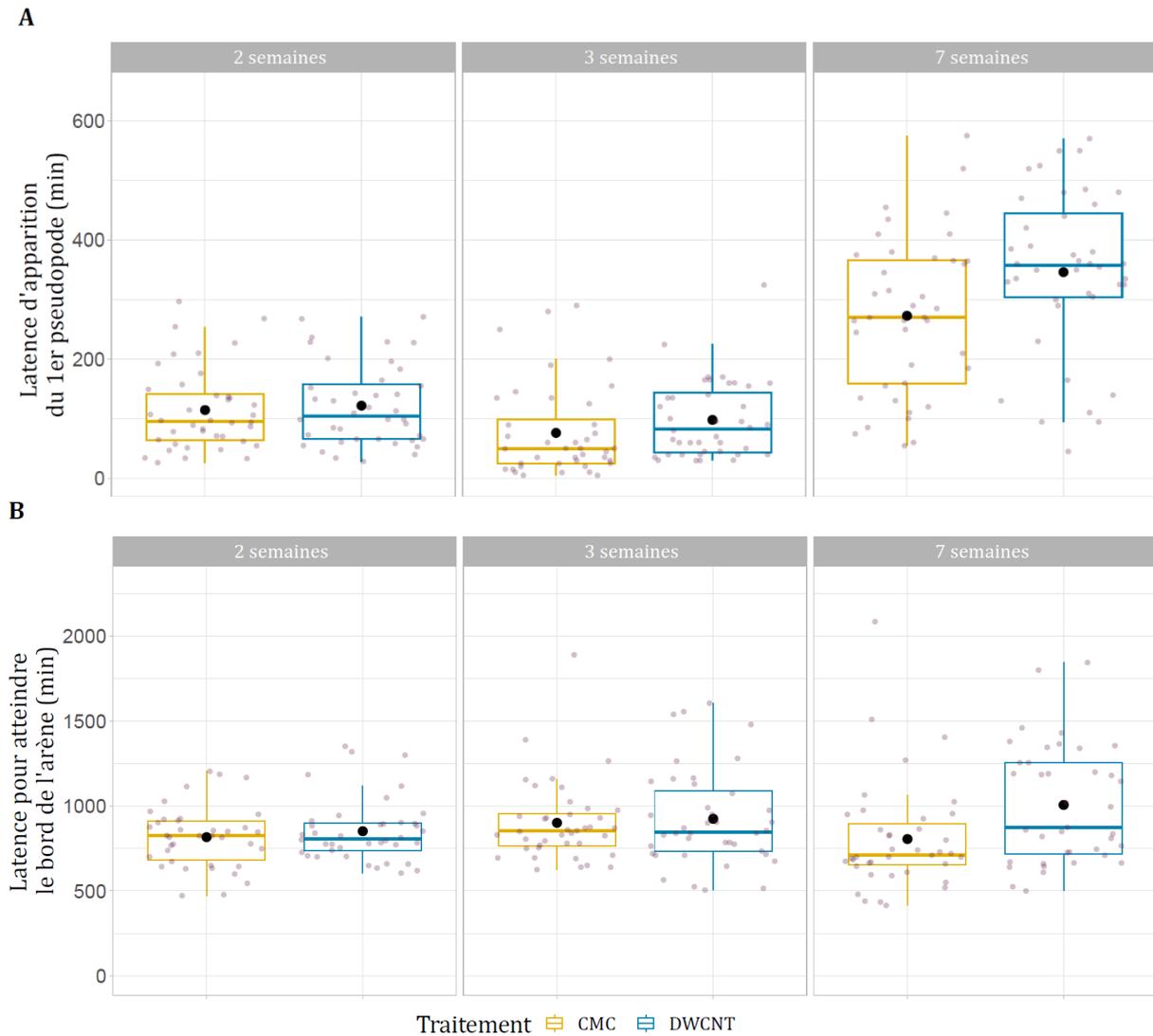


Figure S9 : Latence d'apparition du 1^{er} pseudopode (A) et d'atteinte du bord de l'arène (B,) pour la souche AUS suivant une exposition chronique de 2 à 7 semaines aux DWCNT.

40 plasmodes par traitement pour les semaines 2, 3 et 7 ont été testés. La barre horizontale représente la médiane et le point noir la moyenne.

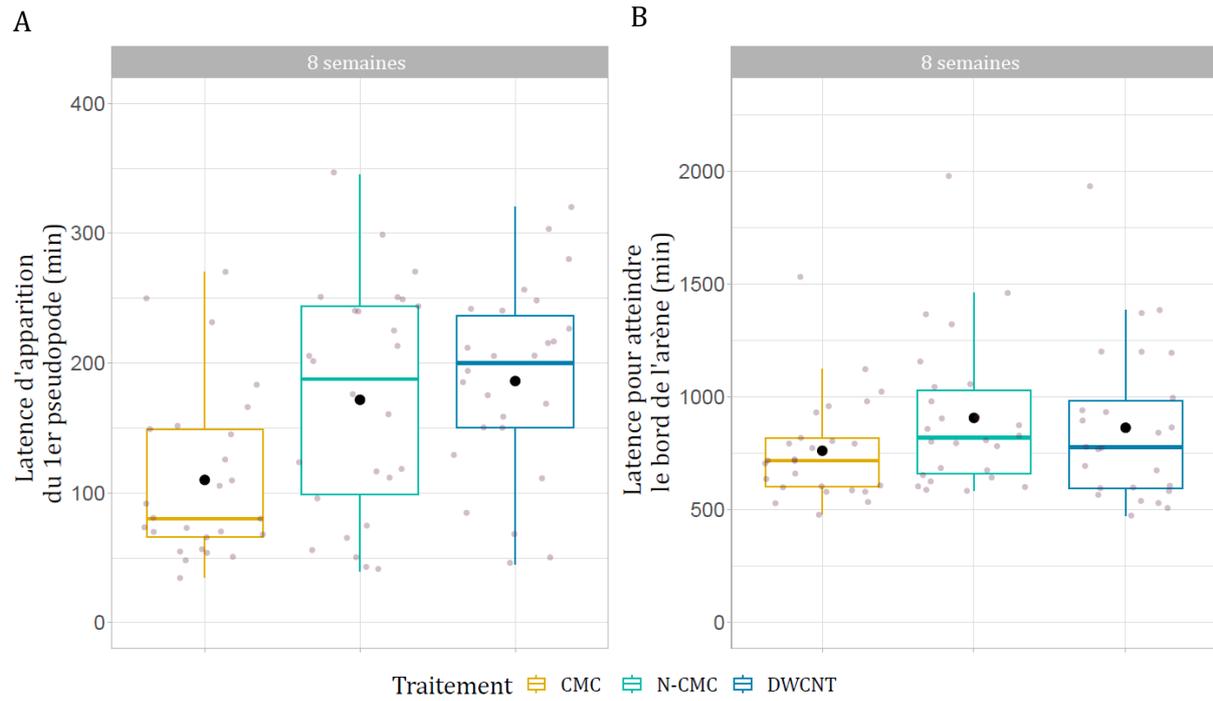


Figure S10 : Latence d'apparition du 1^{er} pseudopode (A) et d'atteinte du bord de l'arène (B,) pour la souche AUS suivant une exposition chronique de 8 semaines aux DWCNT.

26 plasmodes par traitement pour la semaine 8 ont été testés. La barre horizontale représente la médiane et le point noir la moyenne.

3.6.5. Effet selon le substrat

Indice de performance selon le substrat : CMC et DWCNT					
<i>Prédicteurs</i>	<i>Estimés</i>	<i>CI</i>	<i>Statistique</i>	<i>p</i>	<i>df</i>
(Intercept)	0.20	-0.35 – 0.74	0.70	0.483	80.00
Substrate [NaCl1]	-0.55	-0.90 – -0.20	-3.07	0.002	80.00
Substrate [Oat]	-0.18	-0.54 – 0.18	-0.98	0.329	80.00
Effets Aléatoires					
σ^2	0.47				
τ_{00} ID_plasmod	0.61				
ICC	0.57				
N ID_plasmod	10				
Observations	85				
R ² Marginal / R ² Conditionnel	0.048 / 0.589				

Tableau S42 : Statistiques associées à la Figure 27 (A).

Pour évaluer les différences des vitesses de déplacement de la souche AUS selon le traitement (CMC et DWCNT) et le substrat, nous avons utilisé un modèle mixte linéaire (fonction `lmer`, famille d'erreur : Gaussienne, Package `lme4`). Le modèle a été ajusté en spécifiant l'effet fixe : substrat (prédicteur catégorique) ; et l'effet aléatoire : ID (identité du plasmode). La variable dépendante (Vitesse) a été normalisée à l'aide de la fonction `bestNormalize` (Package `bestNormalize`).

Indice de performance selon le substrat : CMC, N-CMC et DWCNT					
<i>Predictors</i>	<i>Estimates</i>	<i>CI</i>	<i>Statistic</i>	<i>p</i>	<i>df</i>
(Intercept)	0.95	0.56 – 1.33	4.83	<0.001	280.00
Treatment [DWCNT]	-0.55	-0.99 – -0.12	-2.48	0.013	280.00
Substrate [NaCl1]	-0.10	-0.49 – 0.29	-0.50	0.616	280.00
Substrate [Oat]	-0.33	-0.73 – 0.06	-1.64	0.101	280.00
Effets Aléatoires					
σ^2	1.93				
τ_{00} ID_plasmod	0.09				
ICC	0.05				
N ID_plasmod	16				
Observations	286				
R ² Marginal / R ² Conditionnel	0.046 / 0.089				

Tableau S43 : Statistiques associées à la figure Figure 27 (B).

Pour évaluer les différences des indices de performances sur la souche AUS selon le traitement (CMC, N-CMC et DWCNT) et le substrat, nous avons utilisé un modèle mixte linéaire (fonction lmer, famille d'erreur : Gaussienne, Package lme4). Le modèle a été ajusté en spécifiant les effets fixes : traitement, substrat (prédicteurs catégoriques) ; et l'effet aléatoire : ID (identité du plasmode). La variable dépendante (Indice) a été normalisée à l'aide de la fonction bestNormalize (Package bestNormalize).

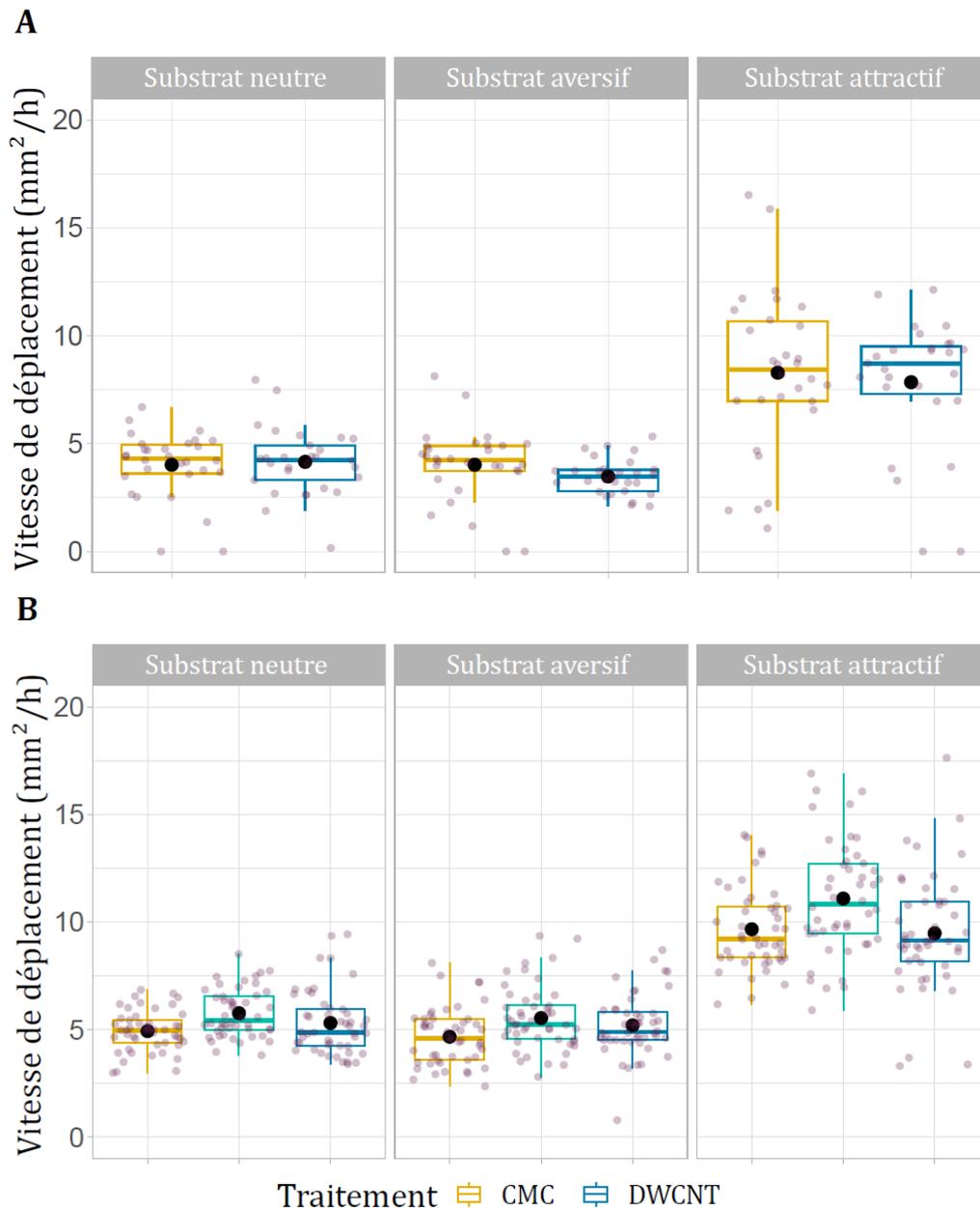


Figure S11 : Vitesse de déplacement des plasmodes CMC et DWCNT après 12 jours d'exposition (A) et des plasmodes CMC, N-CMC et DWCNT après 13 et 14 jours d'exposition (B) pour la souche AUS.

30 plasmodes CMC par substrat ; 29 plasmodes DWCNT sur substrats neutre et aversif ; 27 plasmodes DWCNT sur substrat attractif ont été testés (A). 48 plasmodes CMC et N-CMC pour les substrats neutre et aversif ; 46 plasmodes CMC et N-CMC pour le substrat attractif ; 48 plasmodes DWCNT par substrat ont été testés (B). La barre horizontale représente la médiane et le point noir la moyenne.

3.6.6. Croissance selon différentes concentrations d'exposition

Prédicteurs	Vitesse de déplacement selon la concentration d'exposition et le substrat : Indice				
	Estimés	CI	Statistique	p	df
(Intercept)	0.18	-0.12 – 0.49	1.20	0.230	537.00
Concentration en DWCNT	-0.01	-0.01 – -0.00	-2.16	0.031	537.00
[Substrat neutre] vs [Substrat aversif]	-0.10	-0.37 – 0.17	-0.74	0.459	537.00
[Substrat neutre] vs [Substrat attractif]	-0.23	-0.48 – 0.03	-1.72	0.086	537.00
Concentration*[Substrat neutre] vs Concentration*[Substrat aversif]	0.00	-0.00 – 0.01	1.77	0.078	537.00
Concentration*[Substrat neutre] vs Concentration*[Substrat attractif]	0.01	0.00 – 0.01	2.29	0.022	537.00
Effets Aléatoires					
σ^2	0.71				
τ_{00} ID_plasmod	0.29				
ICC	0.29				
N ID_plasmod	40				
Observations	545				
R ² Marginal / R ² Conditionnel	0.021 / 0.302				

Tableau S44 : Statistiques associés à la Figure 28.

Pour évaluer les différences des indices de performances selon la concentration d'exposition et le substrat, nous avons utilisé un modèle mixte linéaire (fonction *lmer*, famille d'erreur : Gaussienne, Package *lme4*). Le modèle a été ajusté en spécifiant les effets fixes : substrat (prédicteur catégorique), concentration d'exposition (prédicteur continu) ; et l'effet aléatoire : ID (identité du plasmode). La variable dépendante (Indice de performance) a été normalisée à l'aide de la fonction *bestNormalize* (Package *bestNormalize*).

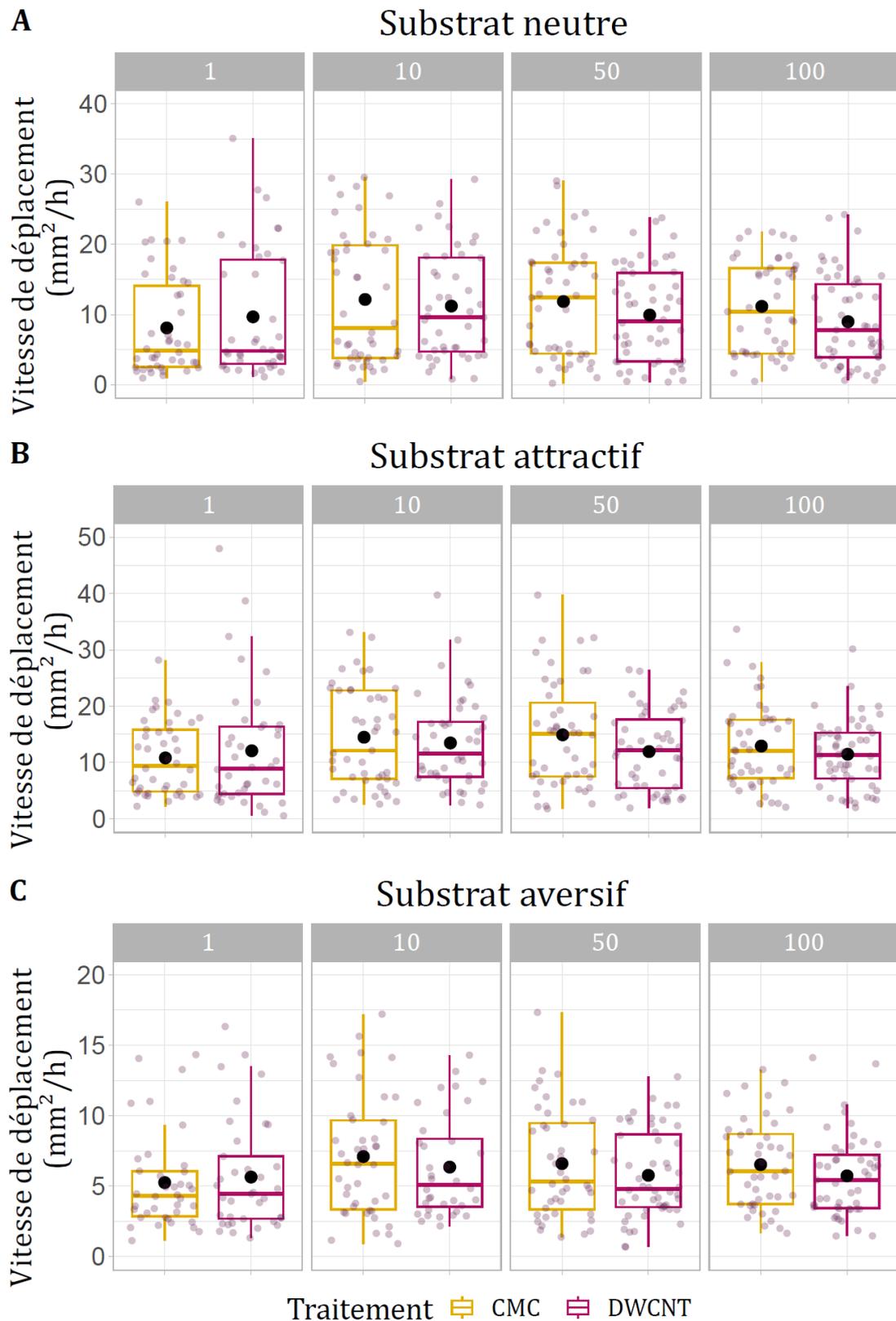


Figure S12 : Vitesse de déplacement des plasmodes selon la concentration d'exposition sur un substrat neutre (A), attractif (B), ou aversif (C).

Entre 36 et 53 plasmodes ont été testés par condition. La barre horizontale représente la médiane, le point noir représente la moyenne.

3.6.7. Effets sur le processus de fusion des plasmodes

Processus de fusion – Latence de contact					
<i>Prédicteurs</i>	<i>Estimés</i>	<i>CI</i>	<i>Statistique</i>	<i>p</i>	<i>df</i>
Intercept	710.61	688.11 – 733.11	62.35	< 0.001	168.00
[CMC] vs [DWCNT]	9.67	-21.60 – 40.95	0.61	0.542	168.00
Observations	170				
R ² / R ² ajusté	0.002 / -0.004				

Tableau S45 : Statistique associée à la Figure 30 (A).

Processus de fusion – Latence début de fusion					
<i>Prédicteurs</i>	<i>Estimés</i>	<i>CI</i>	<i>Statistique</i>	<i>p</i>	<i>df</i>
Intercept	746.95	718.96 – 774.94	52.81	< 0.001	126.00
[CMC] vs [DWCNT]	10.51	-27.61 – 48.64	0.55	0.586	126.00
Observations	128				
R ² / R ² ajusté	0.002 / -0.006				

Tableau S46 : Statistique associée à la Figure 30 (B).

Processus de fusion – Latence veine commune					
<i>Prédicteurs</i>	<i>Estimés</i>	<i>CI</i>	<i>Statistique</i>	<i>p</i>	<i>df</i>
Intercept	771.40	745.76 – 797.03	59.47	< 0.001	145.00
[CMC] vs [DWCNT]	22.40	-12.57 – 57.37	1.27	0.208	145.00
Observations	147				
R ² / R ² ajusté	0.011 / 0.004				

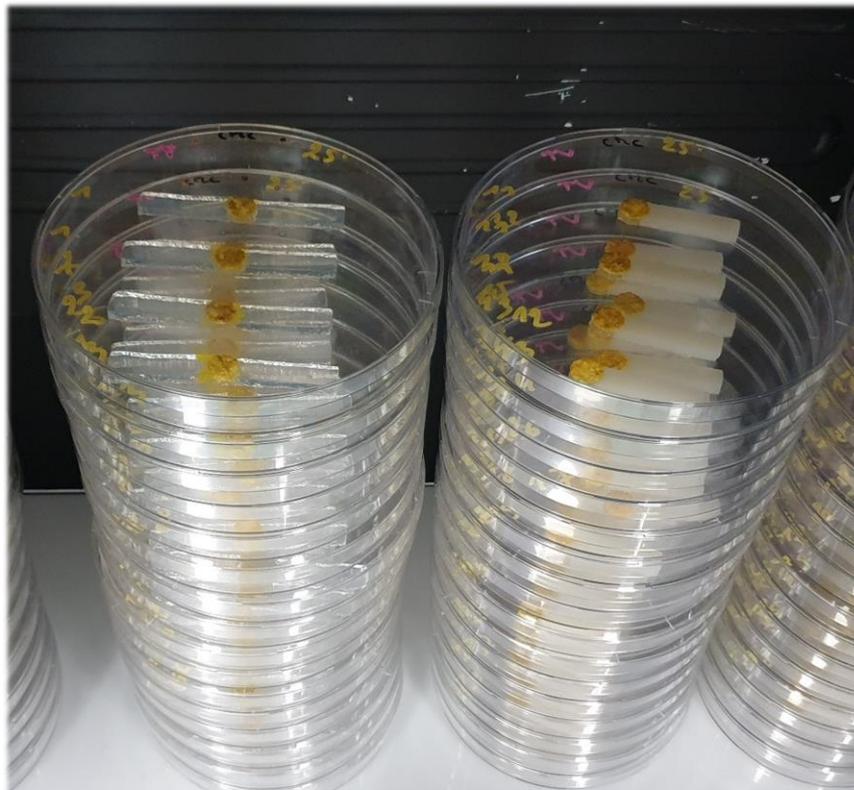
Tableau S47 : Statistique associée à la Figure 30 (C).

Processus de fusion – Durée du processus					
<i>Prédicteurs</i>	<i>Estimés</i>	<i>CI</i>	<i>Statistique</i>	<i>p</i>	<i>df</i>
Intercept	65.22	55.34 – 75.10	13.05	< 0.001	145.00
[CMC] vs [DWCNT]	11.17	-2.31 – 24.65	1.64	0.104	145.00
Observations	147				
R ² / R ² ajusté	0.018 / 0.011				

Tableau S48 : Statistique associée à la Figure 30 (D).

Pour évaluer les différences de chaque paramètre du processus de fusion selon le traitement, nous avons utilisé un modèle linéaire (fonction `lm`, famille d'erreur : Gaussienne, Package `lme4`). Le modèle a été ajusté en spécifiant l'effet fixe : traitement (prédicteur catégorique). Les variables dépendantes (Latences ou durée) ont été normalisées à l'aide de la fonction `bestNormalize` (Package `bestNormalize`).

4. Chapitre 4 : Prise de décision de *Physarum polycephalum* : effet de l'exposition aux DWCNT, et de la combinaison avec d'autres facteurs de stress



©Manon Ternois - Plasmodes de *Physarum polycephalum* en expérience : montage en double pont (pile de gauche), ou en simple pont (pile de droite)

4.1. Introduction

Dans le chapitre précédent, nous avons essayé de déterminer si les DWCNT peuvent affecter la vitesse de déplacement des plasmodes. L'effet des DWCNT est variable, selon les conditions les plasmodes sont ralentis, ou accélérés. Dans ce chapitre nous avons voulu voir si un effet des DWCNT pourrait être visible, et moins variable, sur la prise de décision. En effet, évaluer l'effet des NTC sur la mobilité des cellules est important mais d'autres paramètres peuvent être impactés, notamment la réponse comportementale d'organismes vivants face aux changements de l'environnement, ce qui existe aussi chez les organismes unicellulaires (Dussutour, 2021; Reid et al., 2015). Nous allons donc nous concentrer dans ce chapitre sur l'effet des DWCNT sur la prise de décision de *P. polycephalum*.

Nous l'avons défini en introduction, la prise de décision est la capacité de combiner l'information provenant de sources multiples et d'agir en vue d'atteindre un objectif (Lyon et al., 2021). *P. polycephalum* est particulièrement efficace dans le contexte de l'acquisition des nutriments essentiels à sa survie. En proposant plusieurs patches de nourriture avec différents ratios protéines-glucides (P:G), Dussutour et al. (2010) ont montré que les plasmodes sont capables de précisément choisir le ratio P :G qui maximise leur croissance. Si le ratio P :G optimal n'est pas proposé, les plasmodes sont capables de se développer sur plusieurs patches afin que la combinaison de ces patches leur permette d'atteindre le ratio P :G optimal (Dussutour et al., 2010). De plus, le comportement de prise alimentaire des plasmodes diffère selon la qualité du patch alimentaire. Naturellement, s'il a le choix entre plusieurs patches, le plasmode ira sur celui qui a une concentration en avoine la plus élevée (Latty & Beekman, 2009). Et si le patch a une concentration en avoine trop faible, il ne s'attarde pas dessus, et va retourner explorer l'environnement avant d'avoir fini de consommer le patch (Latty & Beekman, 2009). De la même manière, le plasmode est capable de choisir le substrat le moins répulsif quand plusieurs substrats contenant une substance répulsive sont proposés (Rolland et al., 2023).

Dans un premier temps, nous évaluons la prise de décision des plasmodes, en arène, en présence de deux patches de nourriture. Ils ont alors le choix de recouvrir et d'ingérer les patches (phase d'exploitation), ou alors d'explorer l'arène (phase d'exploration). Nous nous attendons à ce que les plasmodes DWCNT soient plus lents pour entrer en contact avec les patches, qu'ils prennent moins de risques et se nourrissent du patch le plus nutritif une fois contacté.

Dans un deuxième temps, nous avons voulu évaluer la prise de décision des plasmodes exposés aux DWCNT, cette fois en les plaçant face à 2 ponts dont l'un est composé d'une forte concentration, l'autre d'une faible concentration, en substance attractive, ou aversive. Le montage en double-ponts permet de diriger le plasmode et d'observer son choix selon la distance, ou l'aire, qu'il aura parcouru sur chacun des ponts (Rolland et al., 2023; Vogel et al., 2018). Rolland et al. (2023) ont montré que des plasmodes âgés font des choix plus optimaux sur substrat répulsif que des plasmodes jeunes. Nous en reparlerons plus loin, mais l'âge induit des changements internes à la cellule et est stressant pour les plasmodes. Nous nous attendons donc que sur substrat aversif, les plasmodes DWCNT réalisent des choix plus optimaux que les plasmodes CMC (c.-à-d.

croissance majoritaire sur concentration élevée). Sur substrat attractif, non stressant, nous supposons que les plasmodes DWCNT et CMC auront les mêmes performances en réalisant des choix optimaux (c.-à-d. croissance majoritaire sur concentration élevée).

Nous nous sommes ensuite demandé si l'application d'autres sources de stress peut engendrer une toxicité différente des DWCNT. En réalité, les organismes vivants sont soumis à de multiples sources de stress (pollution, destruction d'habitats naturels, changement climatique, *etc.*) qui peuvent engendrer des effets différents quand elles sont combinées par rapport à quand elles sont seules (Côté et al., 2016). Si deux sources de stress provoquent des effets indépendants sur l'organisme trois résultats sont possibles : un effet de dominance (l'effet combiné est égal à l'effet de l'une des sources de stress) ; un effet d'additivité (l'effet combiné est égal à la somme leur effet individuel) ; un effet multiplicatif (l'effet combiné est supérieur à l'effet dominant mais reste inférieur à la somme de leur effet individuel). A l'inverse, les deux sources de stress peuvent interagir et deux résultats sont possibles : un effet antagoniste (l'effet des 2 sources combinées est inférieur à la somme de leur effet individuel) ; un effet synergique (l'effet des 2 sources combinées est supérieur à la somme de leur effet individuel) (Côté et al., 2016).

Nous avons choisi 3 facteurs de stress auquel *P. polycephalum* peut se retrouver confronté. Tout d'abord, le NaCl qui est un composé répulsif pour *P. polycephalum*, ce n'est pas le seul (caféine, quinine, *etc.*), mais il a déjà été utilisé pour évaluer les processus de prise de décision et d'apprentissage chez *P. polycephalum* (Patino-Ramirez et al., 2019, 2021; Rolland et al., 2023; Vogel & Dussutour, 2016). Ensuite, nous avons utilisé le vieillissement du plasmode (stress biotique) qui est un stress auquel les cellules sont forcément confrontées. Pour finir, nous avons utilisé une température élevée (stress abiotique) qui dans le contexte de changement climatique peut devenir un réel facteur de stress pour les organismes vivants. Nous observons l'effet combiné de ces facteurs de stress en quatre temps : [DWCNT x NaCl] ; [DWCNT x NaCl x Température] ; [DWCNT x NaCl x Age] ; [DWCNT x NaCl x Age x Température].

La température est un facteur connu pour moduler la fréquence de contraction des veines et donc la vitesse de déplacement chez *P. polycephalum*. Naturellement, les plasmodes préfèrent se diriger vers des températures élevées. Si on leur laisse le choix entre une zone à 19°C et une zone à 29°C, il se dirigent vers la zone à 29°C (Tso & Mansour, 1975). Cependant quelques degrés Celsius au-dessus peuvent devenir dangereux pour les plasmodes. Entre 24°C et 30°C leur vitesse de déplacement n'est pas altérée, mais au-delà de 30°C elle commence à ralentir (Wohlfarth-Bottermann, 1977), au-delà de 32°C le cycle mitotique s'altère (Wright & Tollon, 1978), et à 35°C (à pH 6) il meurt au bout de 24h (Gray, 1939). Pour observer la combinaison de l'effet des DWCNT avec la température, nous avons créé 3 conditions de température. Une condition à 25°C (température normale), une condition à 35°C (température élevée), et une condition où les plasmodes seront d'abord placés à 35°C puis à 25°C (changement brutal de température). Les expériences durent moins de 24h, donc nous avons pu placer les plasmodes à 35°C sans risque de mortalité. Nous nous attendons à ce que les plasmodes DWCNT soient ralentis, et réalisent des choix moins optimaux que les plasmodes CMC, quand ils seront soumis à un changement brutal de température, ou à une température élevée.

Le plus souvent ce sont des plasmodes âgés de quelques jours à quelques semaines qui sont utilisés pour les expériences, mais nous pouvons élever les plasmodes de la souche LU pendant plusieurs mois, voire années, au laboratoire. Le vieillissement des plasmodes engendre plusieurs perturbations au niveau de l'ADN, notamment une augmentation de la taille des noyaux et de la quantité d'ADN (Adler & Holt, 1974; McCullough et al., 1973), une accumulation de noyaux polyploïdes (McCullough et al., 1973), une fragmentation élevée de l'ADN mitochondrial (Abe et al., 2000). Macroscopiquement, il y a une perte de la pigmentation jaune (Hu et al., 1985), des changements morphologiques (Adler & Holt, 1974), et un ralentissement du flux cytoplasmique associé à une baisse de la croissance (Hu et al., 1985; McCullough et al., 1973; Rolland et al., 2023). Toutes ces modifications internes sont stressantes pour le plasmode, c'est la raison pour laquelle nous utilisons le vieillissement du plasmode comme un facteur de stress supplémentaire à l'exposition aux DWCNT. Nous avons utilisé une souche LU élevée depuis presque 2 ans au laboratoire au moment de l'expérience (plasmode âgé), et une souche que nous avons réveillée depuis seulement 2 mois (plasmode jeune). Nous nous attendons à ce que le traitement DWCNT perturbe la prise de décision des plasmodes jeunes, et qu'ils réalisent des choix plus optimaux que les plasmodes CMC, et que cet effet soit d'autant plus visible sur les plasmodes DWCNT âgés.

Dans un quatrième temps, nous avons testé les plasmodes jeunes et âgés en les soumettant aux 3 conditions de températures décrites précédemment. Rolland et al. (2023) ont testé l'effet de la température sur le déplacement des plasmodes selon leur âge. Pour une température de 25°C, les plasmodes les plus jeunes (âgés de 8 semaines) étaient les plus rapides, puis la vitesse décroît avec l'augmentation de l'âge (24, 61, 81 et 101 semaines). Pour une température de 38,5°C, les plasmodes de 8 semaines étaient les plus lents, les plasmodes âgés de 24 semaines étaient les plus rapides, puis la vitesse décroît avec l'augmentation de l'âge (61, 81 et 101 semaines). Nous nous attendons à ce que la vitesse de déplacement des plasmodes DWCNT soit ralentie, et que cet effet soit amplifié pour les plasmodes âgés à des températures non optimales.

Concernant la prise de décision nous nous attendons à ce que l'effet des DWCNT (meilleure prise de décision) soit gommé à cause de la température non optimale pour les plasmodes (changement brutal de température, température élevée) à la fois pour les jeunes et les âgés.

Hypothèses :

- Les plasmodes DWCNT mettront plus de temps à entrer en contact et à recouvrir les patchs de nourriture. Ils privilégieront l'exploitation, contrairement aux plasmodes CMC.
- Les plasmodes DWCNT feront des choix plus optimaux sur substrat aversif que les plasmodes CMC. Il n'y aura pas de différence sur substrat attractif.
- Les plasmodes DWCNT parcourront une distance plus faible sur substrat aversif. Il n'y aura pas de différence sur substrat attractif.
- L'effet des DWCNT sera gommé quand les plasmodes seront soumis à un changement brutal de température, ou à une température élevée, par rapport à une température normale.
- L'effet des DWCNT sera amplifié sur les plasmodes âgés.
- Quand ils seront soumis à un changement brutal de température, ou à une température élevée, l'effet des DWCNT sera gommé pour les plasmodes jeunes et âgés.

4.2. Effets sur la prise de décision pour un substrat attractif : montage en arène

4.2.1.1. Protocole

Souche(s) : LU

Concentration(s) d'exposition : 100 µg/g

Durée(s) d'exposition : 1 semaine

Type(s) d'expérience : Arène

Paramètre(s) mesuré(s) : Temps de latence pour atteindre ou recouvrir un patch de nourriture

Les expériences ont été réalisées sur 3 jours consécutifs après 1 semaine d'exposition (plus précisément 8, 9 et 10 jours). Chaque plasmode (Ø 15 mm) est déposé au centre d'une boîte de Petri (Ø 94 mm) contenant 30 mL de gel agar 1%. D'un côté du plasmode une pastille de flan d'avoine à 1% (Ø 15 mm) est placée, de l'autre côté une pastille de flan d'avoine à 4% (**Figure 31**). Chaque pastille est placée à 18 mm de distance du plasmode. Les plasmodes sont ensuite placés dans une étuve thermorégulée (25°C, ~70% humidité, obscurité) et sont photographiés toutes les 5 minutes pendant 24h.

Plusieurs événements sont mesurés sur les photos :

- Latence de contact du plasmode avec la pastille d'avoine à 4%
- Latence de contact du plasmode avec la pastille d'avoine à 1%

- Latence pour que la pastille d'avoine à 4% soit recouverte en intégralité
- Latence pour que la pastille d'avoine à 1% soit recouverte en intégralité

Ils permettent d'évaluer la vitesse de déplacement des plasmodes. Pour évaluer la prise de décision des plasmodes nous observons l'ordre dans lesquels les événements s'enchainent. Nous considérons que le plasmode a fait un choix quand il se positionne sur le patch pour l'ingérer.

- Quelle pastille est touchée en premier ?
- Le plasmode recouvre-t-il la pastille qu'il vient de toucher ou continue-t-il d'explorer l'arène ? Est-ce que le comportement est le même entre les plasmodes DWCNT et les plasmodes CMC ?

Pour la latence de contact avec la pastille à 1%, 2 plasmodes CMC et 1 plasmode DWCNT n'ont pas réalisé l'événement pendant les 24h d'expérience. Pour la latence de recouvrement de la pastille à 1%, 9 plasmodes CMC et 10 plasmodes DWCNT n'ont pas réalisé l'événement. A partir des latences mesurées, nous avons calculé des indices de performances (§ 1.4.4). Pour évaluer les différences des indices de performance de la souche LU selon l'événement observé, nous avons utilisé un modèle mixte linéaire (fonction lmer, famille d'erreur : Gaussienne, Package lme4). Le modèle a été ajusté en spécifiant l'effet fixe : événement (prédicteur catégorique) ; et l'effet aléatoire : ID (identité du plasmode). La variable dépendante (Indice) a été normalisée à l'aide de la fonction bestNormalize (Package bestNormalize).

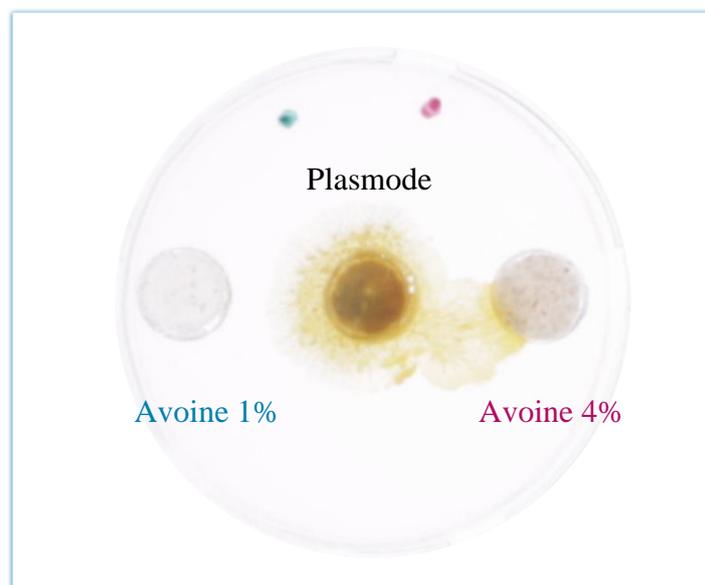


Figure 31 : Montage en arène pour évaluer la prise de décision des plasmodes face à des pastilles d'avoine (substance attractive).

4.2.1.2. Résultats

Il n'y a pas de différence entre la [latence de contact 1%] et la [latence de contact 4%], entre la [latence de recouvrement 4%] et la [latence de contact 4%], entre la [latence de recouvrement

1%] et la [latence de contact 4%] ($p = 0,467$, $p = 0,189$ et $p = 0,487$ respectivement, **Tableau S49**, **Figure 32**).

Les plasmodes DWCNT et CMC ont une vitesse similaire pour entrer en contact avec les pastilles d'avoine à 1% et 4%, et ont une vitesse similaire pour recouvrir intégralement les pastilles à 1% et 4%.

L'événement qui est le moins réalisé par les plasmodes durant les 24h d'expériences est le recouvrement de la pastille à 1% (9 plasmodes CMC et 10 plasmodes DWCNT sont concernés).

Nous avons identifié quelle était la pastille contactée en premier par les plasmodes. Naturellement les plasmodes devraient se diriger vers celle qui est la plus concentrée en avoine, dans notre cas c'est la pastille à 4%. Quand les plasmodes contactent cette pastille en premier, nous observons par la suite leur comportement afin de déterminer s'ils continuent à explorer l'environnement.

Il y a 72% des plasmodes CMC et 64% des plasmodes DWCNT, ce qui représente environ deux tiers des plasmodes, qui entrent en contact d'abord avec la pastille d'avoine à 4% (**Figure 33**). 7% des plasmodes DWCNT ont touché les deux pastilles simultanément. Ce choix est optimal et similaire entre les plasmodes CMC et DWCNT, les plasmodes DWCNT semblent donc détecter les concentrations en avoine aussi bien que les plasmodes CMC. Pour l'observation suivante, nous prenons en compte tous les plasmodes qui sont entrés en contact avec la pastille à 4%. Ce qui représente 28 plasmodes DWCNT et 31 plasmodes CMC.

Après cet événement, parmi les plasmodes concernés, 43% des plasmodes DWCNT recouvrent aussitôt la pastille à 4%, contre seulement 26% des plasmodes CMC. Au contraire, 57% des plasmodes DWCNT, et 74% des plasmodes CMC, entrent en contact avec la pastille d'avoine à 1% avant de revenir sur la pastille à 4% (**Figure 33**). Les plasmodes CMC dans la majorité des cas entrent en contact avec les deux pastilles avant de faire le choix d'en recouvrir une. Concernant les plasmodes DWCNT, la moitié des plasmodes recouvrent et ingèrent la pastille 4% avant d'explorer l'arène, et l'autre moitié explorent et entrent en contact avec les deux types de pastilles avant de recouvrir et ingérer l'une des pastilles.

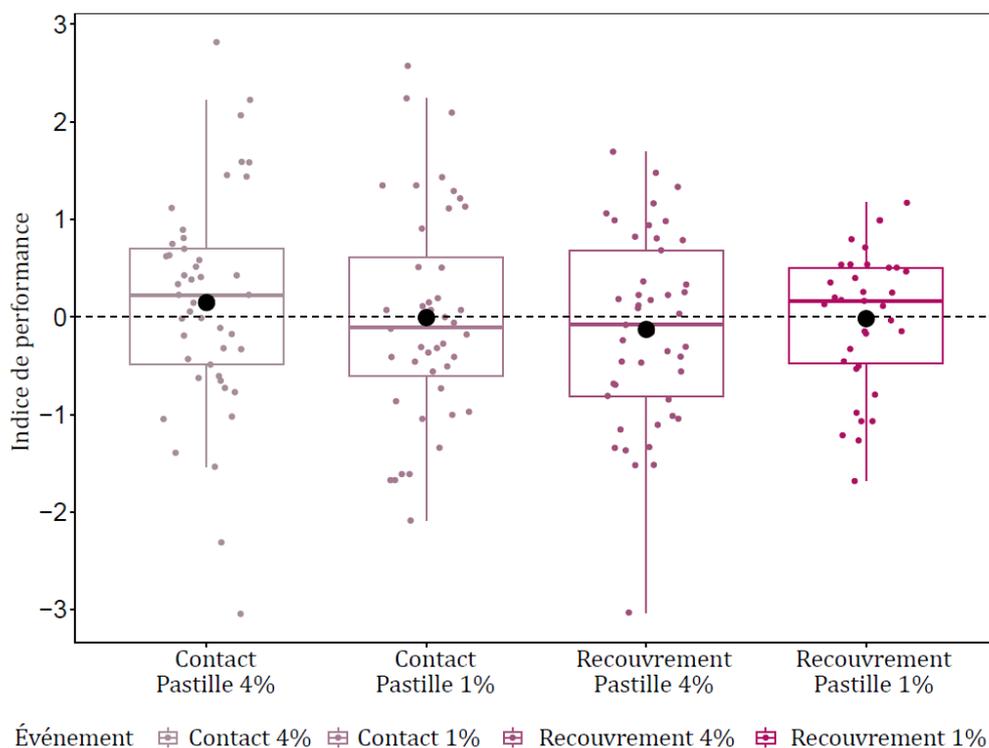


Figure 32 : Indices de performance des plasmodes DWCNT pour la latence de différents événements : latence de contact avec les pastilles d'avoine à 4% ou 1% ; latence de recouvrement des pastilles à 4% ou 1%.
45 plasmodes par traitement ont été testés.

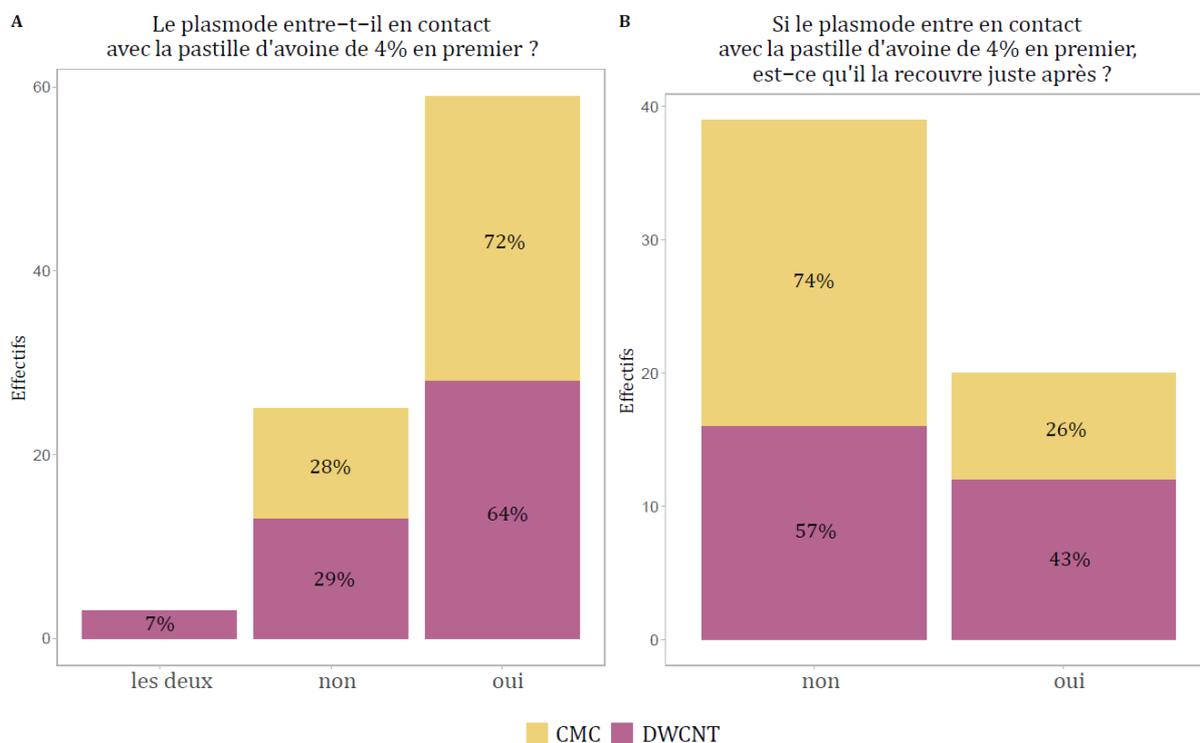


Figure 33 : Effectifs des plasmodes, pour chaque traitement, qui indiquent avec quelle pastille ils sont entrés en contact en premier (A) ; effectifs des plasmodes, pour chaque traitement, qui indiquent s'ils recouvrent la pastille à 4% dès qu'ils sont en contact (B).

28 plasmodes DWCNT et 31 plasmodes CMC ont été testés.

4.3. Effets sur la prise de décision sur substrat répulsif ou attractif : montage en double-ponts

Nous venons de tester la prise de décision en arène, où les plasmodes ont la liberté d'explorer sans que leur déplacement ne soit orienté. Nous allons maintenant utiliser des ponts pour contraindre les plasmodes à se déplacer sur les substrats aversifs, ou attractifs, et tester leur prise de décision.

Le composé aversif choisit est le même que dans le chapitre précédent, le NaCl. Les plasmodes sont capables de détecter et de différencier des petites différences de concentrations, pour la souche AUS nous utilisons des concentrations faibles (2 g/L), au-delà les plasmodes ne se déplacent pas sur le substrat. La souche LU est moins sensible au NaCl, nous avons utilisé des concentrations plus élevées (10 g/L). Le composé attractif choisit est également le même que dans le chapitre précédent, l'avoine à différentes concentrations.

Le plasmode est placé entre deux ponts dont les concentrations en NaCl, ou en avoine, sont différentes. Le choix le plus optimal pour les plasmodes est de se déplacer majoritairement sur le pont dont la concentration est la plus faible (substrat aversif), ou la plus forte (substrat attractif). En mesurant la distance parcourue sur chaque pont, nous calculons un indice de décision :

$$\text{Indice de décision (substrat répulsif)} = \frac{DC_{min} - DC_{max}}{D_{totale}}$$

$$\text{Indice de décision (substrat attractif)} = \frac{DC_{max} - DC_{min}}{D_{totale}}$$

DC_{min} : Distance parcourue sur le pont de la plus faible concentration en répulsif

DC_{max} : Distance parcourue sur le pont de la plus forte concentration en répulsif

D_{totale} : Distance totale parcourue (addition de la distance des deux ponts)

Quand le plasmode se déplace autant sur les 2 ponts, alors l'indice est égal à 0, cela implique qu'il n'a pas fait de choix (**Figure 34**). Dans le cas où le plasmode est confronté à un choix sur substrat aversif, le choix le plus optimal est de se déplacer majoritairement vers la concentration la plus faible (aversif) ou la plus forte (attractif). Si c'est le cas, alors l'indice de décision va se rapprocher de la valeur 1. Si le plasmode se déplace majoritairement vers la concentration la plus forte (aversif), ou la plus faible (attractif), alors son indice va se rapprocher de la valeur -1.

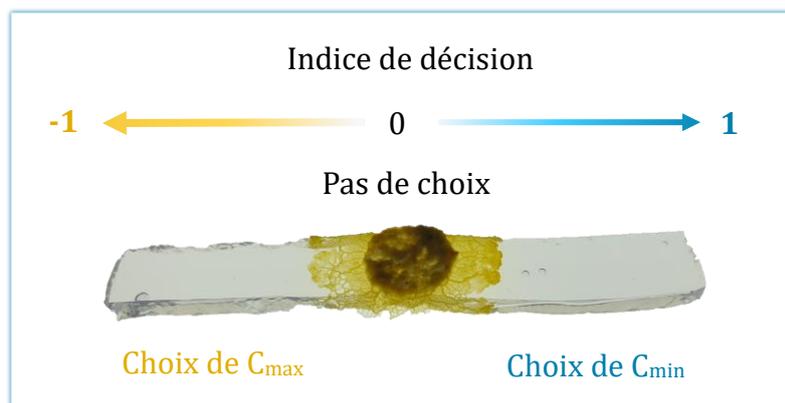


Figure 34 : Montage en double-pont pour évaluer l'indice de décision quand le plasmode est confronté à deux concentrations en substance aversive.

4.3.1. Effet sur la souche AUS

4.3.1.1. Protocole

Souche(s) : AUS
Concentration(s) d'exposition : 100 µg/g
Durée(s) d'exposition : 1, 2, 6 et 9 semaines
Type(s) d'expérience : Double-ponts
Paramètre(s) mesuré(s) : Prise de décision, Distance parcourue

Les plasmodes ont été exposés dès le réveil (à la sortie de la phase sclérote). Les expériences ont été réalisées sur 1 jour après 1 semaine d'exposition, et sur 2 jours consécutifs après 2 semaines d'exposition (pour augmenter le nombre de répliques). La même expérience a été réalisée avec d'autres plasmodes pour un temps d'exposition plus long (6 et 9 semaines d'exposition).

Les plasmodes (Ø10 mm) ont été déposés au contact de 2 ponts (35 mm) caractérisés par une concentration en NaCl différente, pour une concentration cumulée de 2 g/L, au-delà cela devient dangereux pour les plasmodes de la souche AUS. Les concentrations proposées aux plasmodes sont :

- soit 1,5 vs 0,5 ‰ : ce qui correspond à 1,5g et 0,5g de NaCl pour 1000 mL d'eau
- soit 1,25 vs 0,75 ‰ : ce qui correspond à 1,25g et 0,75g de NaCl pour 1000 mL d'eau

A noter que le choix entre 1,5 et 0,5 ‰ (différence de 1 ‰) est plus facile que celui entre 1,25 et 0,75 ‰ (différence de 0,5 ‰). Ils sont ensuite déposés dans une étuve (25°C, ~70% humidité, obscurité). Les distances parcourues après environ 14h de migration ont été mesurées à la règle.

Nous calculons également la distance totale parcourue ($DC_{min} + DC_{max}$), pour calculer un indice de performance (voir § 1.4.4), plus la distance parcourue est élevée, plus le plasmode est rapide. Cela nous permet d'évaluer, en parallèle de la prise de décision, si la vitesse de déplacement est affectée.

Pour évaluer l'effet du traitement sur l'indice de décision, nous avons utilisé un modèle mixte linéaire (fonction lmer, famille d'erreur : Gaussienne, Package lme4). Le modèle a été ajusté en spécifiant les effets fixes : traitement, choix proposé (prédicteurs catégoriques) ; et l'effet aléatoire : ID (identité du plasmode). Pour évaluer les différences des indices de performance de la souche AUS selon le choix proposé, nous avons utilisé un modèle mixte linéaire (fonction lmer, famille d'erreur : Gaussienne, Package lme4). Le modèle a été ajusté en spécifiant l'effet fixe : choix proposé (prédicteur catégorique) ; et l'effet aléatoire : ID (identité du plasmode).

La variable dépendante (Indice de décision ou Indice de performance) a été normalisée à l'aide de la fonction bestNormalize (Package bestNormalize).

4.3.1.2. Résultats : après 1 et 2 semaines d'exposition

Pour les deux durées d'exposition, le modèle complet (avec interaction : [Traitement] x [Choix proposé]) ne diffère pas significativement du modèle sans interaction, nous la retirons du modèle.

Après une semaine d'exposition, il n'y a pas d'effet du traitement DWCNT sur la décision des plasmodes que ce soit pour le choix 1,5 vs 0,5 ‰ ou le choix 1,25 vs 0,75 ‰ ($p = 0,425$, **Tableau S50, Figure 35 (A)**), les plasmodes CMC et DWCNT prennent les mêmes décisions. Il y a une différence de l'indice de décision pour les 2 types de choix ($p = 0,004$) indépendamment du traitement. En effet, le choix 2 (1,25 vs 0,75 ‰) est plus difficile, la moyenne de l'indice de décision des plasmodes est plus proche de 0 que pour le choix 1 (1,5 vs 0,5 ‰).

Après 2 semaines d'exposition, il n'y a pas de différence significative des indices de décision entre le choix 1 et le choix 2 même si c'est proche de la significativité ($p = 0,070$). L'effet du traitement DWCNT est significatif ($p = 0,044$, **Tableau S51, Figure 35 (B)**). En effet, les médianes et moyennes des indices de décision des plasmodes DWCNT sont plus faibles que ceux des plasmodes CMC pour les deux types de choix proposés, ce qui implique que les plasmodes DWCNT font des choix moins optimaux que les plasmodes CMC.

En parallèle, nous avons mesuré la distance totale parcourue sur les ponts afin d'évaluer la vitesse de déplacement des plasmodes. Le modèle complet (avec interaction : [Choix proposé] x [Durée d'exposition]) ne diffère pas significativement du modèle sans interaction, nous la retirons du modèle.

La durée d'exposition, ainsi que le choix proposé, n'influent pas sur l'indice de performance ($p = 0,234$ et $p = 0,560$ respectivement, **Tableau S52, Figure 35 (C,D)**). Pour le choix 1 (1,5 vs 0,5 ‰) les médianes et moyennes des indices de performances des plasmodes DWCNT sont très proches de 0, donc la vitesse de déplacement des plasmodes DWCNT est similaire à celle des plasmodes CMC. Pour le choix 2 (1,25 vs 0,75 ‰), et même si ce n'est pas significatif, les médianes et moyennes des indices de performance des plasmodes DWCNT sont en-dessous de 0 et inférieurs à ceux du choix 1. Les plasmodes DWCNT ont des vitesses de déplacement qui ont tendance à être plus faibles que les plasmodes CMC.

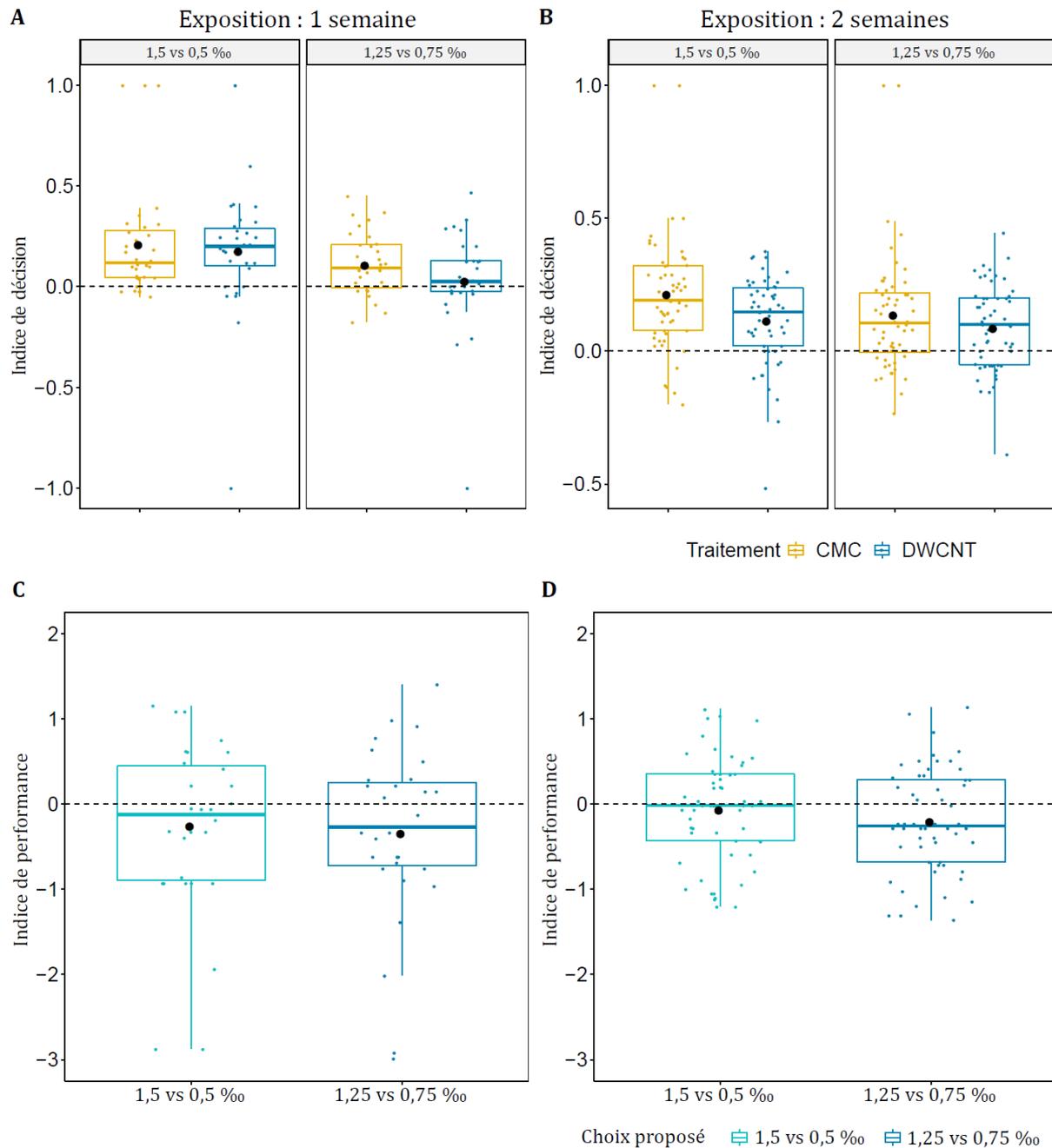


Figure 35 : Indices de décision (A, B) et indices de performance calculés sur la distance parcourue (C, D) des plasmodes après 1 et 2 semaines d'exposition.

32 plasmodes CMC et 31 plasmodes DWCNT par choix après 1 semaine d'exposition ont été testés ; 56 plasmodes par traitement et par choix ont été testés après 2 semaines d'exposition.

4.3.1.3. Résultats : après 6 et 9 semaines d'expositions

Pour les deux durées d'exposition, le modèle complet (avec interaction : [Traitement] x [Choix proposé]) ne diffère pas significativement du modèle sans interaction, nous la retirons du modèle.

Après 6 semaines d'exposition, il y a une différence significative des indices de décision entre le choix 1 et le choix 2 ($p < 0,001$). L'effet du traitement DWCNT est lui aussi significatif ($p = 0,001$, **Tableau S53, Figure 36 (A)**). En effet, les médianes et moyennes des indices de décision des plasmodes DWCNT sont plus faibles que ceux des plasmodes CMC pour les deux types de choix proposés, ce qui implique que les plasmodes DWCNT font des choix moins optimaux que les plasmodes CMC.

Après 9 semaines d'exposition, il y a encore une différence significative des indices de décision entre le choix 1 et le choix 2 ($p = 0,004$). En revanche, le traitement DWCNT n'affecte pas les indices de décision ($p = 0,598$, **Tableau S54, Figure 36 (B)**). Les médianes et moyennes des indices de décision pour le choix 1 (1,5 vs 0,5 ‰) sont similaires entre les plasmodes DWCNT et les plasmodes CMC. Ils font des choix similaires. Pour le choix 2 (1,25 vs 0,75 ‰), la médiane et la moyenne des plasmodes DWCNT ont tendance à être plus faibles que celles des plasmodes CMC, ce qui implique que les plasmodes DWCNT ont tendance à faire des choix moins optimaux que les plasmodes CMC.

Il y a un effet significatif du choix proposé sur l'indice de performance, et un effet significatif de l'interaction du choix proposé et de la durée d'exposition ($p < 0,001$ dans les deux cas, **Tableau S55, Figure 36 (C,D)**). En effet, après 6 semaines d'exposition, les plasmodes DWCNT exposés au choix 1 sont plus ralentis que les plasmodes DWCNT exposés au choix 2. Après 9 semaines d'exposition c'est l'inverse que nous observons. Finalement, les plasmodes DWCNT ont des vitesses de déplacement qui ont tendance à être plus faibles que les plasmodes CMC.

Quand les plasmodes DWCNT ne font pas des choix similaires aux plasmodes CMC, alors ils font des choix moins optimaux. Après 2 et 6 semaines d'exposition les effets du traitement DWCNT sont significatifs, après 1 et 9 semaines d'expositions ils ne le sont pas. L'effet du traitement DWCNT semble indépendant de la durée d'exposition.

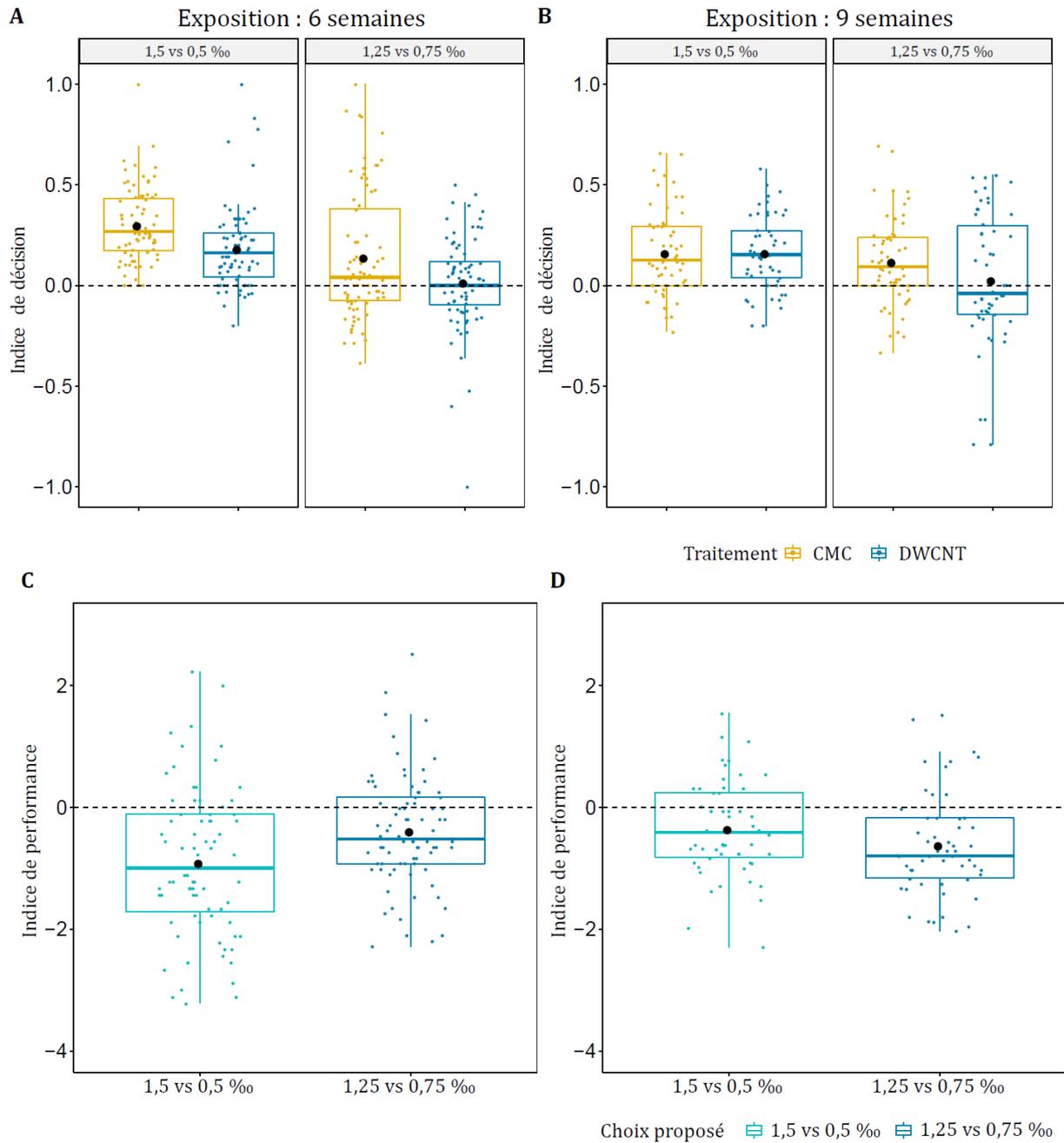


Figure 36 : Indices de décision (A, B) et indices de performance calculés sur la distance parcourue (C, D) des plasmodes après 6 et 9 semaines d'exposition.

80 plasmodes par traitement et par choix ont été testés après 4 semaines d'exposition ; 60 plasmodes CMC et 54 plasmodes DWCNT par choix ont été testés après 6 semaines d'exposition.

4.3.2. Effet sur la souche LU

Nous avons vu dans le chapitre précédent que la souche AUS semble plus sensible aux effets des DWCNT que la souche LU. Nous avons donc réalisé les expériences de prises de décision également sur la souche LU, et voir si les DWCNT peuvent engendrer un effet autre que sur la vitesse de déplacement.

4.3.2.1. Protocole

Souche(s) : LU
Concentration(s) d'exposition : 100 µg/g
Durée(s) d'exposition : 1^{1/2}, 4, et 6 semaines (substrat répulsif) ; < 1, 2, et 4 semaines (substrat attractif)
Type(s) d'expérience : Double-ponts
Paramètre(s) mesuré(s) : Prise de décision, Distance parcourue

Les plasmodes ont été exposés dès le réveil (à la sortie de la phase sclérote). Sur substrat répulsif, les expériences ont été réalisées sur 2 jours consécutifs pour chaque durée d'exposition : après 1 semaine et demi, 4 semaines, et 6 semaines. Sur substrat attractif, les expériences ont été réalisées après 5 jours, 2 semaines, et 4 semaines d'exposition.

Les plasmodes (Ø10 mm) ont été déposés au contact de 2 ponts (35 mm) composés chacun d'une concentration différente : soit 6 vs 4 ‰ (substrat aversif) qui correspond à 6g ou 4g de NaCl pour 1000 mL d'eau ; soit 4 vs 1 ‰ (substrat attractif) qui correspond à 4g ou 1g d'avoine pour 100 mL d'eau. Ils sont ensuite déposés dans une étuve (21°C, ~70% humidité, obscurité). Les distances parcourues sur substrat répulsif ont été mesurées à la règle après environ 7h de migration, et les distances sur substrat attractif après environ 15h de migration.

Nous calculons, comme précédemment, la distance totale parcourue ($DC_{min} + DC_{max}$) et un indice de performance. Pour évaluer les différences des indices de performance de la souche LU selon le traitement et la durée d'exposition, nous avons utilisé un modèle mixte linéaire (fonction lmer, famille d'erreur : Gaussienne, Package lme4). Le modèle a été ajusté en spécifiant les effets fixes : traitement (prédicteur catégorique), durée d'exposition (prédicteur continu) ; et l'effet aléatoire : ID (identité du plasmode). La variable dépendante (Indice) a été normalisée à l'aide de la fonction bestNormalize (Package bestNormalize).

4.3.2.2. Résultats : substrat répulsif

Le modèle complet (avec interaction : [Traitement] x [Durée d'exposition]) ne diffère pas significativement du modèle sans interaction, nous la retirons du modèle.

Le traitement DWCNT influe sur la décision des plasmodes ($p = 0,001$), la durée d'exposition aussi ($p = 0,001$, **Tableau S56, Figure 37 (A)**). Après 1,5 semaines d'exposition les plasmodes DWCNT

ont des indices de décision en moyenne supérieurs aux plasmodes CMC, les plasmodes DWCNT font des choix plus optimaux. Après 4 semaines d'exposition, les plasmodes DWCNT ont des indices de décision en moyenne plus faibles que les plasmodes CMC, ils font des choix moins optimaux. Après 6 semaines d'exposition, les plasmodes DWCNT ont des indices de décision en moyenne similaire, mais avec une médiane plus faible, que les plasmodes CMC. Les plasmodes DWCNT font des choix moins optimaux.

L'indice de performance des plasmodes DWCNT est similaire entre toutes les durées d'exposition ($p = 0,307$, **Tableau S57**, **Figure 37 (B)**). Les médianes et moyennes des indices de performance sont proches de 0, les plasmodes DWCNT ont une vitesse de déplacement qui est similaire aux plasmodes CMC. La vitesse de déplacement des plasmodes n'est pas affectée, et pourtant il y a une perturbation de la prise de décision. De plus, l'effet du traitement DWCNT semble, comme pour la souche AUS, indépendant de la durée d'exposition.

4.3.2.3. Résultats : substrat attractif

Le modèle complet (avec interaction : [Traitement] x [Durée d'exposition]) ne diffère pas significativement du modèle sans interaction, nous la retirons du modèle.

Les indices de décision varient en fonction de la durée d'exposition indépendamment du traitement ($p < 0,001$). Le traitement DWCNT n'induit pas de changement sur la décision des plasmodes ($p = 0,453$, **Tableau S58**, **Figure 38 (A)**). Les plasmodes DWCNT font des choix similaires aux plasmodes CMC.

L'indice de performance des plasmodes DWCNT varie en fonction de la durée d'exposition ($p < 0,001$, **Tableau S59**, **Figure 38 (B)**). Après 5 jours d'exposition les plasmodes DWCNT ont une vitesse de déplacement plus faible que les plasmodes CMC, après 2 semaines d'exposition elle est similaire, après 4 semaines d'exposition les plasmodes DWCNT sont plus rapides.

Contrairement à ce que nous venons d'observer avec le substrat aversif, il n'y a pas d'effet du traitement sur la prise de décision, mais le traitement DWCNT affecte la vitesse de déplacement des plasmodes.

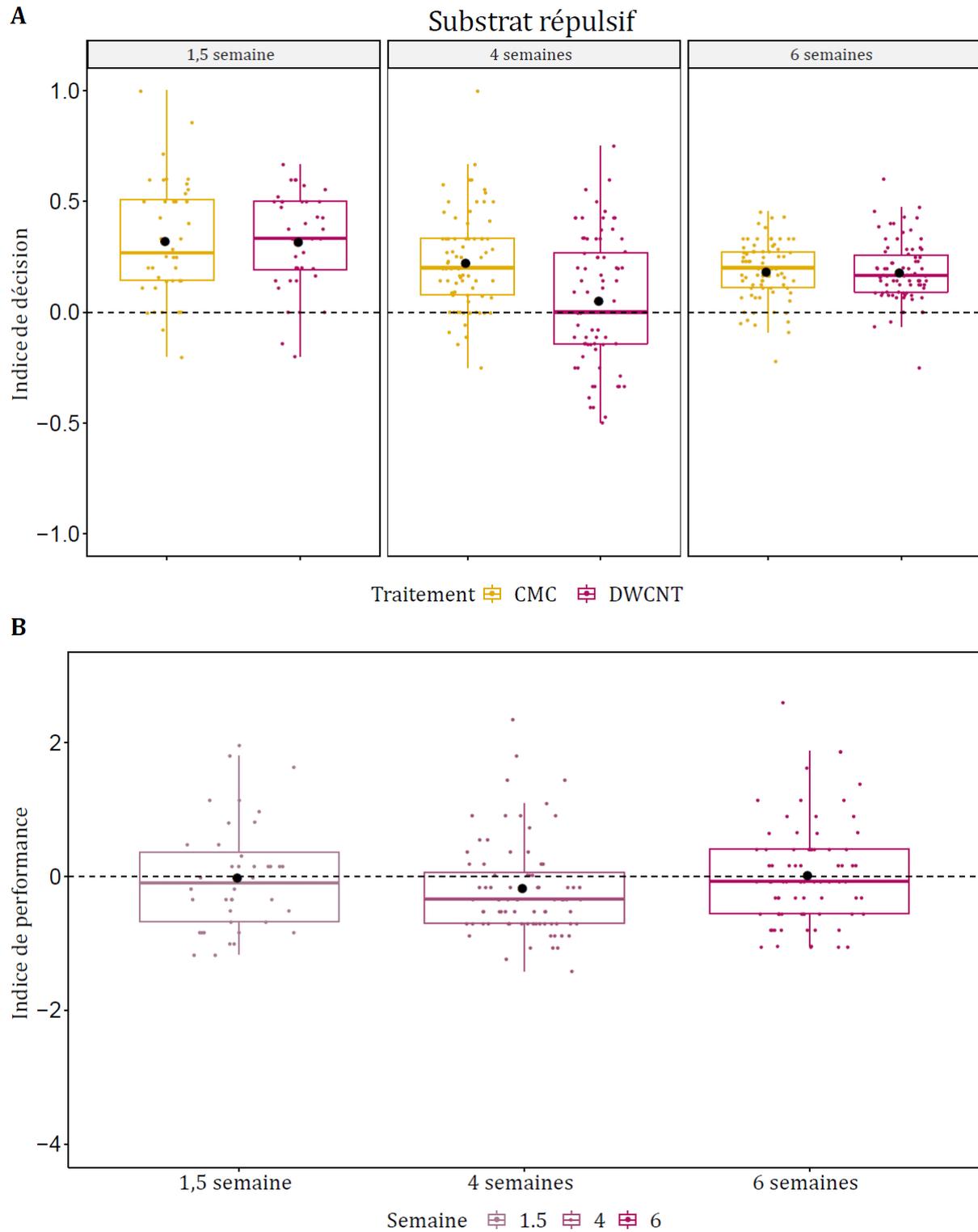


Figure 37 : Indices de décision (A) et indices de performance calculés sur la distance parcourue (B) des plasmodes LU sur substrat répulsif.

40 plasmodes par traitement ont été testés après 2 semaines d'exposition ; 80 plasmodes par traitement ont été testés après 4 semaines d'exposition ; 79 plasmodes par traitement ont été testés après 6 semaines d'exposition.

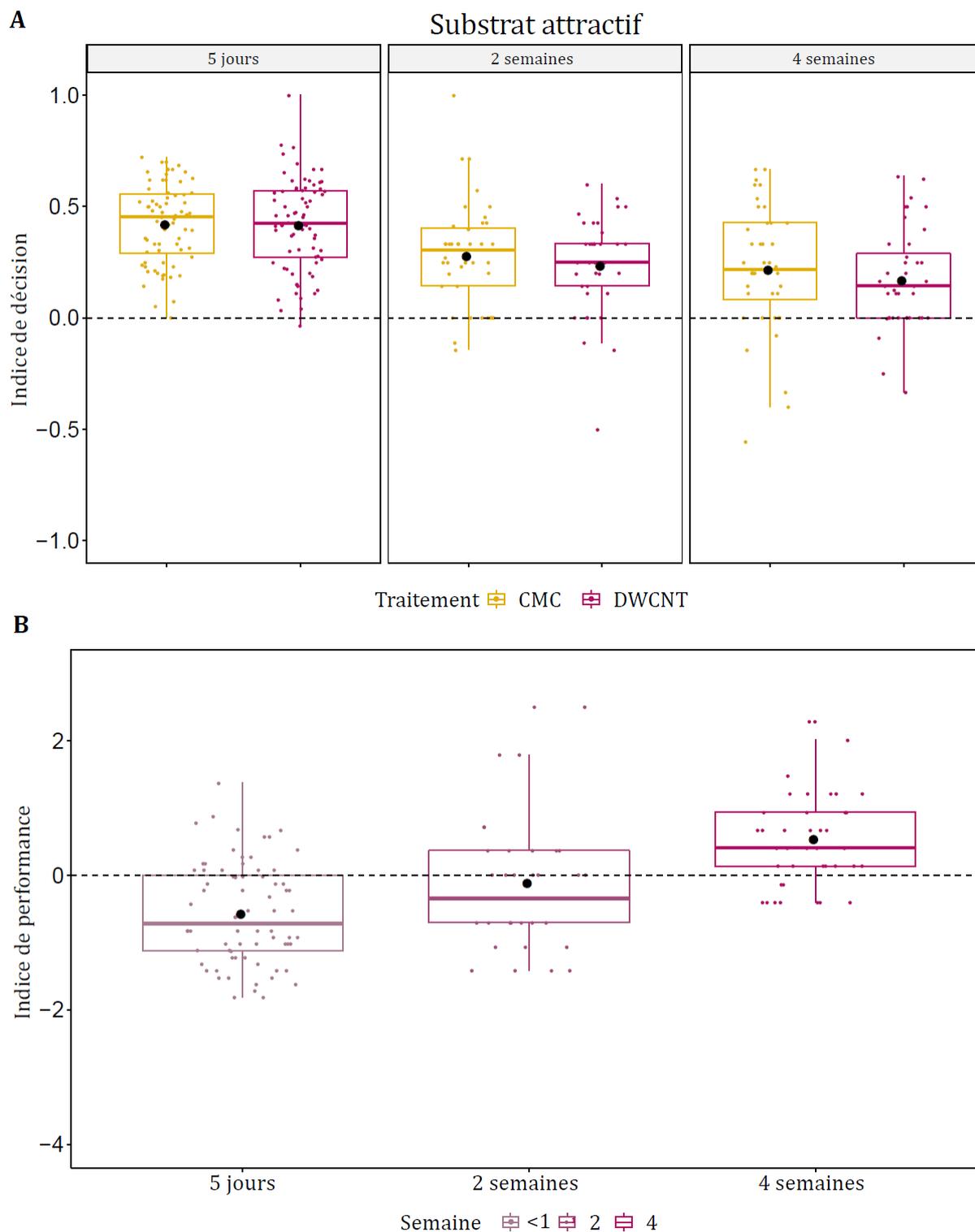


Figure 38 : Indices de décision (A) et indices de performance calculés sur la distance parcourue (B) des plasmodes LU sur substrat attractif.

72 plasmodes CMC et 76 plasmodes DWCNT par traitement après 5 jours d'exposition ; 40 plasmodes CMC et 38 plasmodes DWCNT par traitement après 2 semaines d'exposition ; 40 plasmodes par traitement après 4 semaines d'exposition ont été testés.

4.4. Effet du traitement DWCNT avec des changements brutaux de température

P. polycephalum est sensible à la température de son environnement et module sa vitesse et son orientation de déplacement en fonction des températures. Entre 24°C et 30°C, les conditions sont optimales pour la croissance du plasmode, au-delà il commence à y avoir des dérégulations à l'intérieur de la cellule. Nous regardons si une température stressante pour le plasmode va affecter sa prise de décision.

Nous réalisons les mêmes expériences de prises de décision mais avec trois conditions de températures différentes. La majorité des expériences précédentes ont été réalisées à 25°C, nous avons conservé cette température pour la condition normale. Nous avons choisi 35°C comme température maximale.

- Condition 1 : la totalité de l'expérience à 25°C (température normale)
- Condition 2 : la moitié de l'expérience à 35°C puis l'autre moitié à 25°C
- Condition 3 : la totalité de l'expérience à 35°C (température élevée)

Nous avons utilisé deux étuves thermorégulées (~70% humidité, obscurité), l'une réglée à 25°C et l'autre à 35°C. Les plasmodes qui ont été soumis aux 2 conditions de températures ont été transférés d'une étuve à l'autre.

4.4.1. Effet sur la souche AUS

4.4.1.1. Protocole

Souche(s) : AUS

Concentration(s) d'exposition : 100 µg/g

Durée(s) d'exposition : 2 semaines

Type(s) d'expérience : Double-ponts (substrat aversif), Simple pont (substrat attractif)

Paramètre(s) mesuré(s) : Prise de décision, Distance parcourue

Les plasmodes ont été exposés dès le réveil. L'expérience a été réalisée sur 2 jours consécutifs après 2 semaines d'exposition. Le protocole de dépôt sur les ponts est le même que précédemment (§ 4.3.1) sauf qu'un seul type de choix est proposé : 1,5 vs 0,5 ‰. Ils sont ensuite déposés dans les étuves (à 25°C ou à 35°C, ~70% humidité, obscurité). Les distances parcourues sur substrat répulsif ont été mesurées à la règle après environ 7h de migration. A la suite de cette expérience, sur 2 jours consécutifs, nous avons déposés des plasmodes (Ø 10 mm) au contact de ponts (35 mm) composés de flan d'avoine à 4%. Une photo a été prise après environ 7h de migration, et les aires parcourues sur les ponts ont été mesurées à l'aide du logiciel ImageJ.

Il y a eu de la mortalité dans l'élevage des plasmodes CMC pour une raison inconnue, nous avons donc moins de réplicas que pour les plasmodes DWCNT.

Nous calculons également la distance totale parcourue ($DC_{min} + DC_{max}$), et un indice de performance pour évaluer la vitesse de déplacement des plasmodes.

Pour évaluer les différences des indices de décision selon le traitement et la condition de température, nous avons utilisé un modèle mixte linéaire (fonction lmer, famille d'erreur : Gaussienne, Package lme4). Le modèle a été ajusté en spécifiant les effets fixes : traitement, température (prédicteurs catégoriques) ; et l'effet aléatoire : ID (identité du plasmode).

Pour évaluer les différences des indices de performance de la souche AUS selon la condition de température, nous avons utilisé un modèle mixte linéaire (fonction lmer, famille d'erreur : Gaussienne, Package lme4). Le modèle a été ajusté en spécifiant l'effet fixe : température (prédicteur catégorique) ; et l'effet aléatoire : ID (identité du plasmode).

La variable dépendante (Indice de décision ou Indice de performance) a été normalisée à l'aide de la fonction bestNormalize (Package bestNormalize).

4.4.1.2. Résultats : substrat aversif (double-ponts)

Le modèle complet (avec interaction : [Traitement] x [Température]) ne diffère pas significativement du modèle sans interaction, nous la retirons du modèle.

Le traitement DWCNT n'affecte pas les indices de décision ($p = 0,391$). En revanche, la température affecte les indices de décision, les plasmodes des conditions 25-35°C et 35°C ont des indices plus faibles que ceux de la condition 25°C, indépendamment du traitement ($p = 0,002$ et $p = 0,030$ respectivement, **Tableau S60, Figure 39 (A)**). A noter que les indices de décision ont des moyennes et médianes autour de 0 (pas de choix), y compris pour les plasmodes CMC donc cette absence de choix est indépendante du traitement. Précédemment (§ 4.3.1) nous avons observé un choix significatif pour la souche AUS CMC à 25°C (moyenne des indices de décision autour de 0,2 - 0,25).

Il n'y a pas d'effet de la condition de température sur la distance parcourue, elles sont similaires entre les plasmodes de la condition 25°C, et ceux de la condition 25-35°C, ou ceux de la condition 35°C ($p = 0,685$ et $p = 0,905$ respectivement, **Tableau S61, Figure 39 (B)**). Les indices de performance des plasmodes DWCNT sont supérieurs à 0, ils ont une vitesse de déplacement (c.- à d. distance parcourue) plus élevée que les plasmodes CMC.

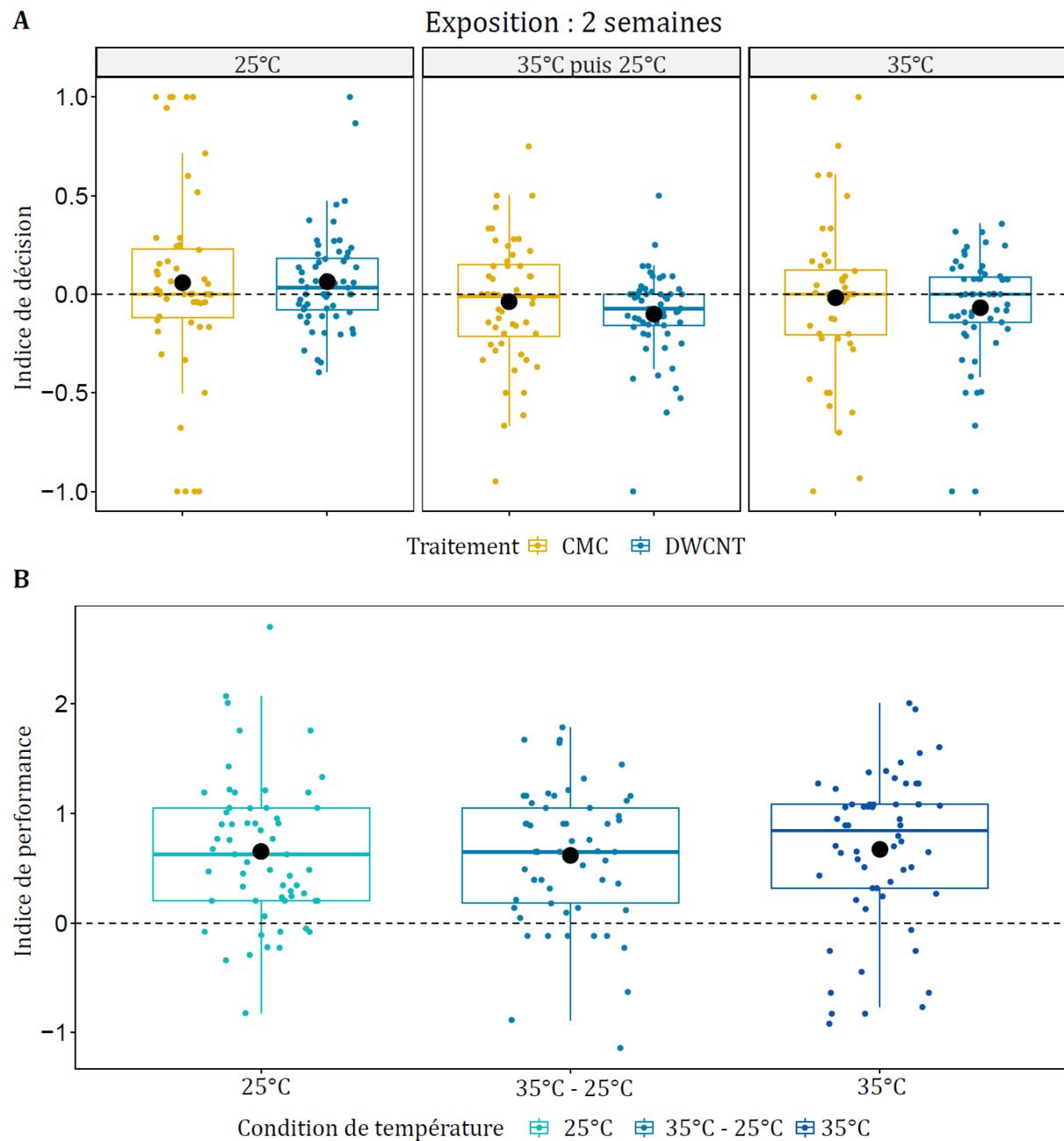


Figure 39 : Indices de décision (A) et indices de performance calculés sur la distance parcourue (B) des plasmodes AUS selon la condition de température.

44 plasmodes CMC et 60 plasmodes DWCNT par traitement pour la condition 25°C ; 45 plasmodes CMC et 57 plasmodes DWCNT par traitement pour la condition 25-35°C ; 45 plasmodes CMC et plasmodes 56 DWCNT par traitement pour la condition 35°C ont été testés.

4.4.1.3. Résultats : substrat attractif (simple pont)

La température n'influe pas sur l'indice de performance (c.-à-d. la distance parcourue) des plasmodes DWCNT. Cependant la différence entre la condition de température normale et la condition de changement brutal de température est presque significative ($p = 0,057$, **Tableau S62, Figure 40**). Les plasmodes DWCNT soumis au changement brutal de température ont des vitesses de déplacement similaires aux plasmodes CMC, les plasmodes soumis à des températures normales ou élevées ont des vitesses de déplacement supérieures aux plasmodes CMC (**Figure 40, Figure S14**).

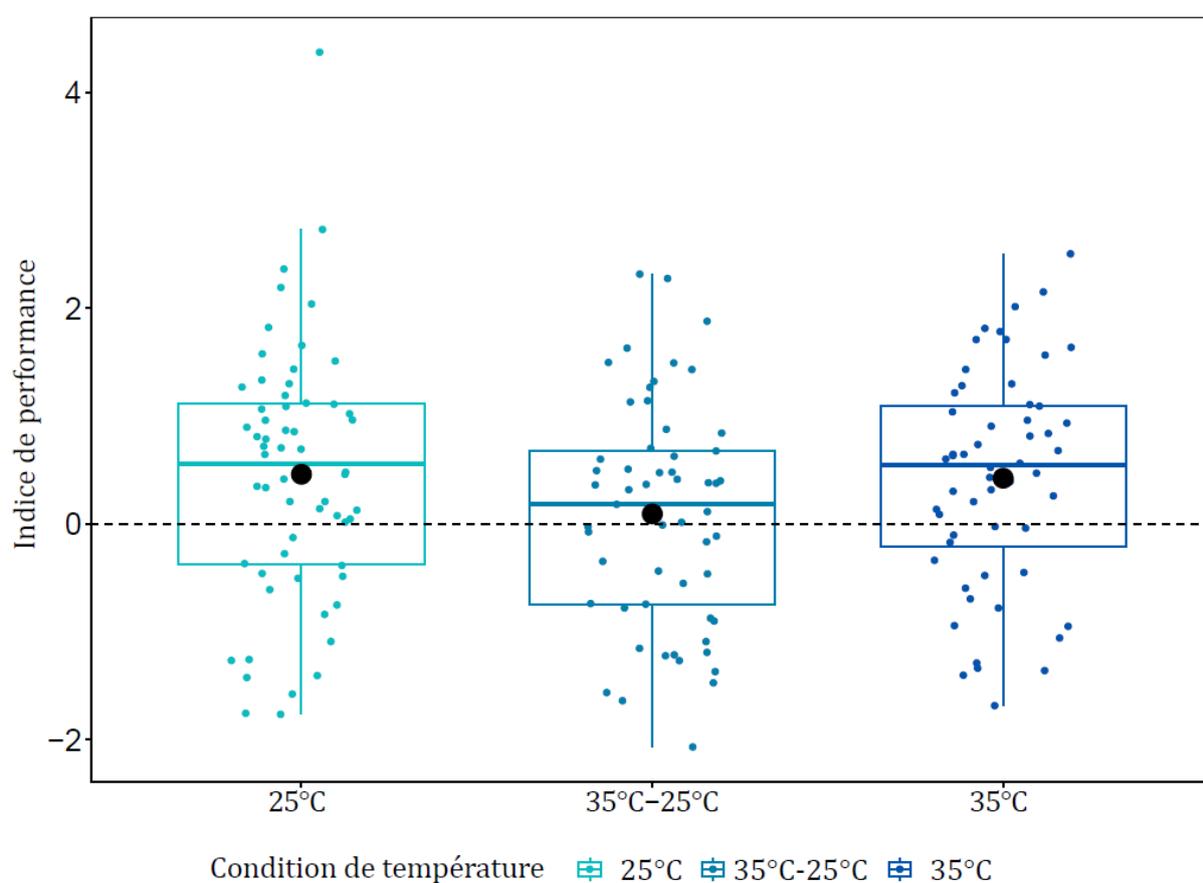


Figure 40 : Vitesse de déplacement des plasmodes sur substrat attractif selon la condition de température. 45 plasmodes CMC pour les conditions [35-25°C] et [35°C], et 44 plasmodes pour la condition [25°C] ont été testés. 57, 56 et 60 plasmodes DWCNT pour les conditions [35-25°C], [35°C] et [25°C] respectivement ont été testés.

4.4.2. Effet sur la souche LU

4.4.2.1. Protocole

Souche(s) : LU
Concentration(s) d'exposition : 100 µg/g
Durée(s) d'exposition : 3 semaines
Type(s) d'expérience : Double-ponts
Paramètre(s) mesuré(s) : Prise de décision, Distance parcourue

Les plasmodes ont été exposés dès le réveil. L'expérience a été réalisée sur 2 jours consécutifs après 3 semaines d'exposition.

Le protocole de dépôt sur les ponts est le même que précédemment. Le choix proposé est : 6 vs 4 % (voir § 4.3.2.1). Ils sont ensuite déposés dans les étuves (à 25°C ou à 35°C, ~70% humidité, obscurité). Les distances parcourues sur substrat répulsif ont été mesurées à la règle après environ 7h de migration.

Les analyses statistiques sont les mêmes que précédemment (§ 4.4.1.1).

4.4.2.2. Résultats

Le modèle complet (avec interaction : [Traitement] x [Température]) ne diffère pas significativement du modèle sans interaction, nous la retirons du modèle.

Le traitement DWCNT n'influe pas sur l'indice de décision des plasmodes, peu importe la condition de température ($p = 0,916$). Pour toutes les conditions de températures, les plasmodes DWCNT font des choix similaires aux plasmodes CMC. Les plasmodes soumis à la condition de température 35°C ont des indices de décision différents, indépendamment du traitement ($p < 0,001$, **Tableau S63, Figure 41 (A)**), ils sont plus élevés, donc ils font des choix plus optimaux que les plasmodes soumis aux conditions 25°C ou 35-25°C.

Les indices de performance des plasmodes DWCNT pour la condition de température 35°C sont en moyenne supérieurs à ceux des plasmodes DWCNT des 2 autres conditions ($p = 0,002$, **Tableau S64, Figure 41 (B)**), ce qui implique qu'ils sont plus rapides. Pour les conditions de températures [25°C] et [35°C-25°C], les plasmodes DWCNT ont tendance à être plus rapides que les plasmodes CMC.

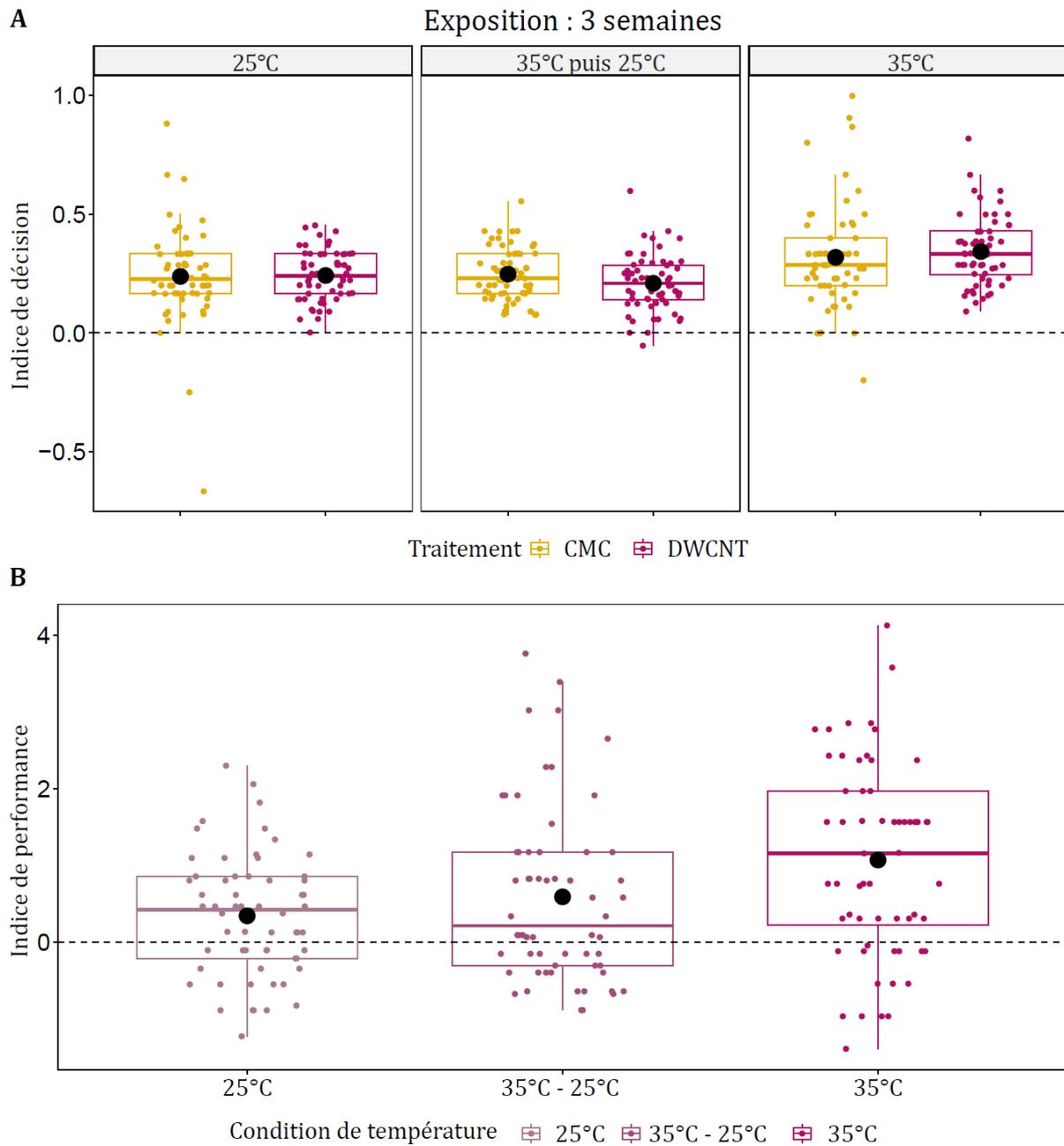


Figure 41 : Indices de décision (A) et indices de performance calculés sur la distance parcourue (B) des plasmodes LU selon la condition de température.

60 plasmodes par traitement et par condition de températures ont été testés.

4.5. Effet des DWCNT selon l'âge de *Physarum polycephalum*

Un autre paramètre qui peut affecter la vitesse de déplacement ou la prise de décision des plasmodes est le vieillissement (Rolland et al., 2023). L'objectif est de voir si des plasmodes âgés (20 mois) seront plus sensibles à l'effet des DWCNT comparé à des plasmodes jeunes (2 mois). Pour cela nous avons utilisé la souche LU, dont nous avons des plasmodes qui sont élevés depuis 2 ans dans notre laboratoire (CRCA-CBI, Toulouse).

4.5.1.1. Protocole

Souche(s) : LU de 2 âges (2 ou 20 mois)
Concentration(s) d'exposition : 100 µg/g
Durée(s) d'exposition : 2 semaines
Type(s) d'expérience : Double-ponts
Paramètre(s) mesuré(s) : Prise de décision, Distance parcourue

L'expérience a été réalisée sur 2 jours consécutifs après 2 semaines d'exposition. Le protocole de dépôt sur les ponts est le même que précédemment (voir § 4.3.2.1). Le choix proposé est : 6 vs 4 ‰. Ils sont ensuite déposés dans une étuve (25°C, ~70% humidité, obscurité). Les distances parcourues sur substrat répulsif ont été mesurées à la règle après environ 7h de migration.

Pour évaluer les différences des indices de décision selon le traitement et l'âge du plasmode, nous avons utilisé un modèle mixte linéaire (fonction lmer, famille d'erreur : Gaussienne, Package lme4). Le modèle a été ajusté en spécifiant les effets fixes : traitement, âge (prédicteurs catégoriques) ; et l'effet aléatoire : ID (identité du plasmode). Pour évaluer les différences des indices de performance selon l'âge du plasmode, nous avons utilisé un modèle mixte linéaire (fonction lmer, famille d'erreur : Gaussienne, Package lme4). Le modèle a été ajusté en spécifiant l'effet fixe : âge (prédicteur catégorique) ; et l'effet aléatoire : ID (identité du plasmode). La variable dépendante (Indice de décision ou Indice de performance) a été normalisée à l'aide de la fonction bestNormalize (Package bestNormalize). Nous avons ensuite réalisé une comparaison par paires (correction de Satterthwaite, Package emmeans) pour comparer les indices de décision selon le traitement sur chacune des modalités de la variable âge.

4.5.1.2. Résultats

Il y a une différence des indices de décision selon l'âge du plasmode ($p = 0,003$), et l'interaction du traitement DWCNT avec l'âge a un effet sur les indices de décision des plasmodes ($p = 0,006$, **Tableau S65**). Après une comparaison par paire nous pouvons dire que les indices de décision entre les plasmodes DWCNT de 2 mois et les plasmodes CMC de 2 mois ne sont pas différents ($p = 0,798$, **Tableau S66**, **Figure 42 (A)**), ils font des choix similaires. En revanche, les plasmodes DWCNT de 20 mois ont des indices de décision en moyenne plus élevés que les plasmodes CMC

de 20 mois ($p = 0,045$, **Tableau S66**, **Figure 42 (A)**), ils font donc des choix plus optimaux. Nous pouvons également noter que les plasmodes CMC de 20 mois font des choix moins optimaux que les plasmodes CMC de 2 mois ($p = 0,029$, **Tableau S66**, **Figure 42 (A)**), ce qui implique qu'avec l'augmentation de l'âge, les plasmodes font des choix moins optimaux. Pour les indices de performance, il n'y a pas de différence significative selon l'âge des plasmodes ($p = 0,432$, **Tableau S67**, **Figure 42 (B)**). Les plasmodes DWCNT de 2 et de 20 mois ont des indices de performance proches de 0, leurs vitesses de déplacement sont similaires aux plasmodes CMC d'âges respectifs.

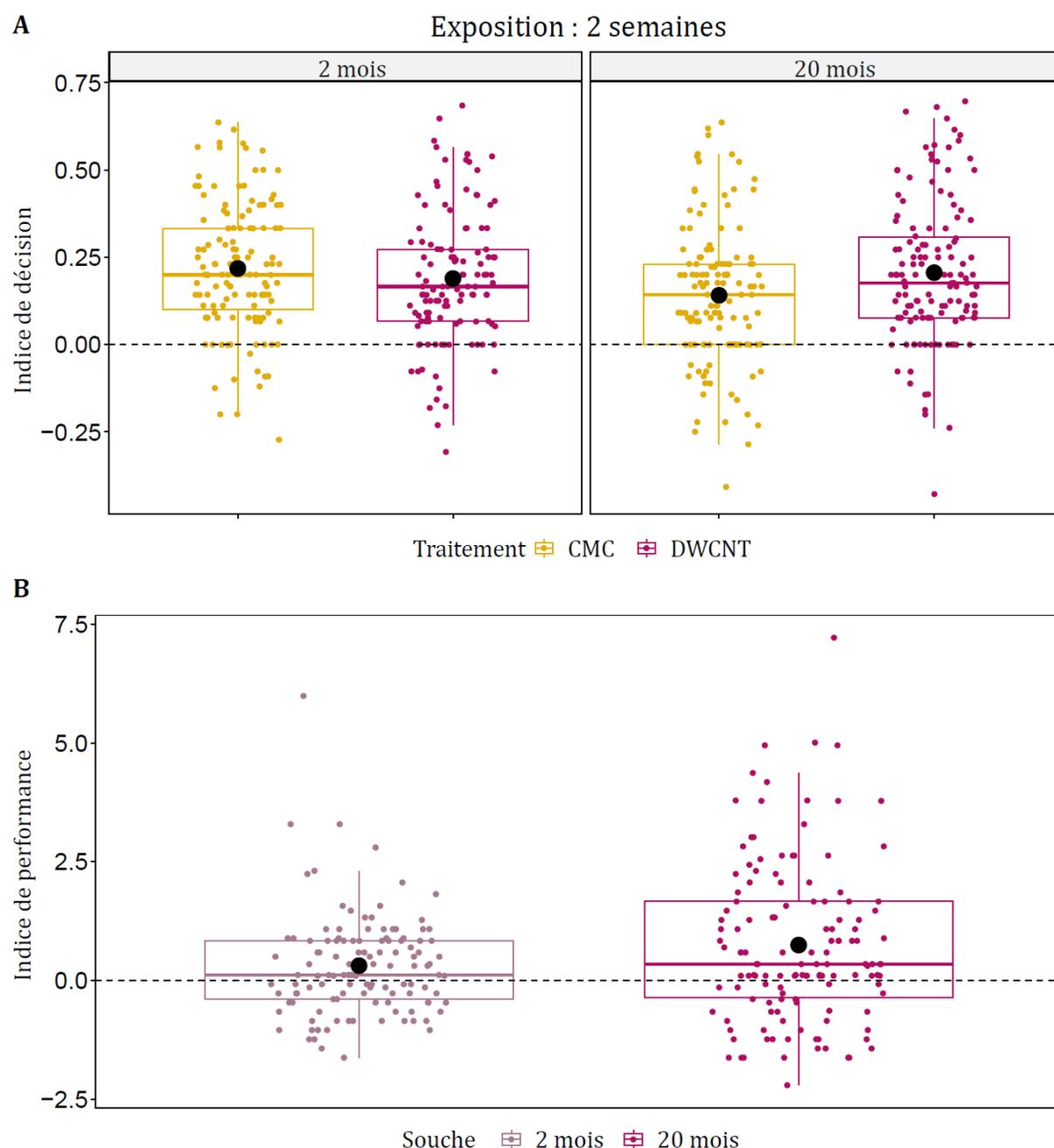


Figure 42 : Indices de décision (A) et indices de performance calculés sur la distance parcourue (B) des plasmodes LU selon leur âge.

131 plasmodes CMC et 121 plasmodes DWCNT de 2 mois ; 129 plasmodes CMC et 134 plasmodes DWCNT de 20 mois ont été testés.

4.6. Effet des DWCNT : selon l'âge des plasmodes et la température

Maintenant nous combinons les deux paramètres stressants dont nous avons décrit les effets individuellement : température et âge des plasmodes. L'objectif ici est de voir si des plasmodes âgés (20 mois), soumis à des températures non optimales, peuvent être sensibles à un effet des DWCNT.

4.6.1.1. Protocole

Souche(s) : LU de 2 âges (2 ou 20 mois)
Concentration(s) d'exposition : 100 µg/g
Durée(s) d'exposition : 2 semaines
Type(s) d'expérience : Double-ponts (substrat répulsif) et simple pont (substrat attractif)
Paramètre(s) mesuré(s) : Prise de décision, Distance parcourue

L'expérience a été réalisée à 2 jours d'intervalle. Le protocole de dépôt sur les ponts est le même que précédemment (§ 4.3.1). Le choix proposé est : 6 vs 4 ‰. Les plasmodes des 2 âges (2 ou 20 mois) sont ensuite déposés dans les étuves (à 25°C ou à 35°C, ~70% humidité, obscurité). Les distances parcourues sur substrat répulsif ont été mesurées à la règle après environ 7h de migration.

En parallèle, nous avons déposés des plasmodes (Ø 10 mm) âgés de 2 mois ou de 20 mois au contact de ponts (35 mm) composés de flan d'avoine à 4%. Une photo a été prise après 7h de migration, et les aires parcourues sur les ponts ont été mesurées à l'aide du logiciel ImageJ.

4.6.1.2. Résultats : substrat aversif (double-ponts)

Le modèle complet (avec interaction : [Traitement] x [Age]) ne diffère pas significativement du modèle sans interaction, nous la retirons du modèle.

Le traitement DWCNT, et l'âge des plasmodes, n'influent pas sur les indices de décision ($p = 0,222$ et $p = 0,825$ respectivement, **Tableau S68, Figure 43**). Pour chaque condition de température, et chaque âge donné, les plasmodes DWCNT font des choix similaires aux plasmodes CMC. Les indices de décision des conditions de températures [35-25°C] et [35°C] sont différents de la condition [25°C] indépendamment du traitement ($p < 0,001$, **Tableau S68, Figure 43**).

Concernant les indices de performance, le seul effet significatif qui ressort est l'interaction de la condition intermédiaire (35-25°C) avec l'âge du plasmode ($p = 0,018$, **Tableau S69, Figure 44**). Pour savoir si cet effet concerne les plasmodes âgés de 2 mois ou de 20 mois, nous avons réalisé un test post-hoc.

Les plasmodes DWCNT de 20 mois soumis à la condition de température intermédiaire [35-25°C] ont des indices de performances en moyenne plus faibles que les plasmodes CMC correspondants ($p < 0,001$, **Tableau S70, Figure 44**). Ce qui implique une vitesse de déplacement plus faible. Les

plasmodes DWCNT de 20 mois des conditions [25°C] et [35°C] ont des indices de performance proches de 0, ils ont des vitesses de déplacement similaires aux plasmodes CMC des conditions correspondantes.

En conclusion, le traitement DWCNT induit un ralentissement des plasmodes quand ils sont âgés et soumis à un changement brutal de température, mais il n'affecte pas leur prise de décision.

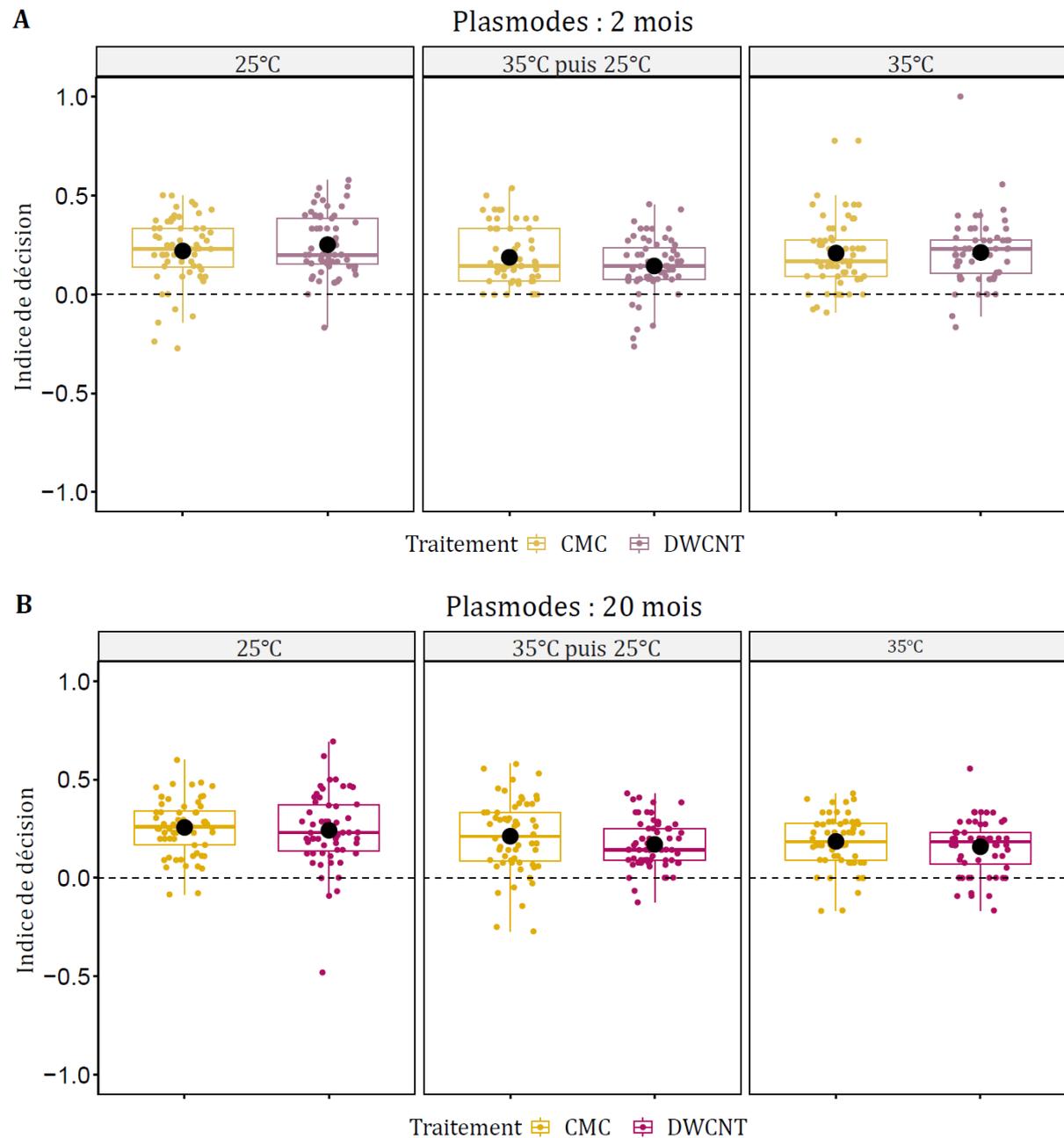


Figure 43 : Indices de décision des plasmodes jeunes (A) ou âgés (B) selon le traitement et la condition de température.

60 plasmodes par traitement, par âge, et par condition ont été testés sauf pour une condition où 56 plasmodes DWCNT âgés pour la température [25°C] ont été testés.

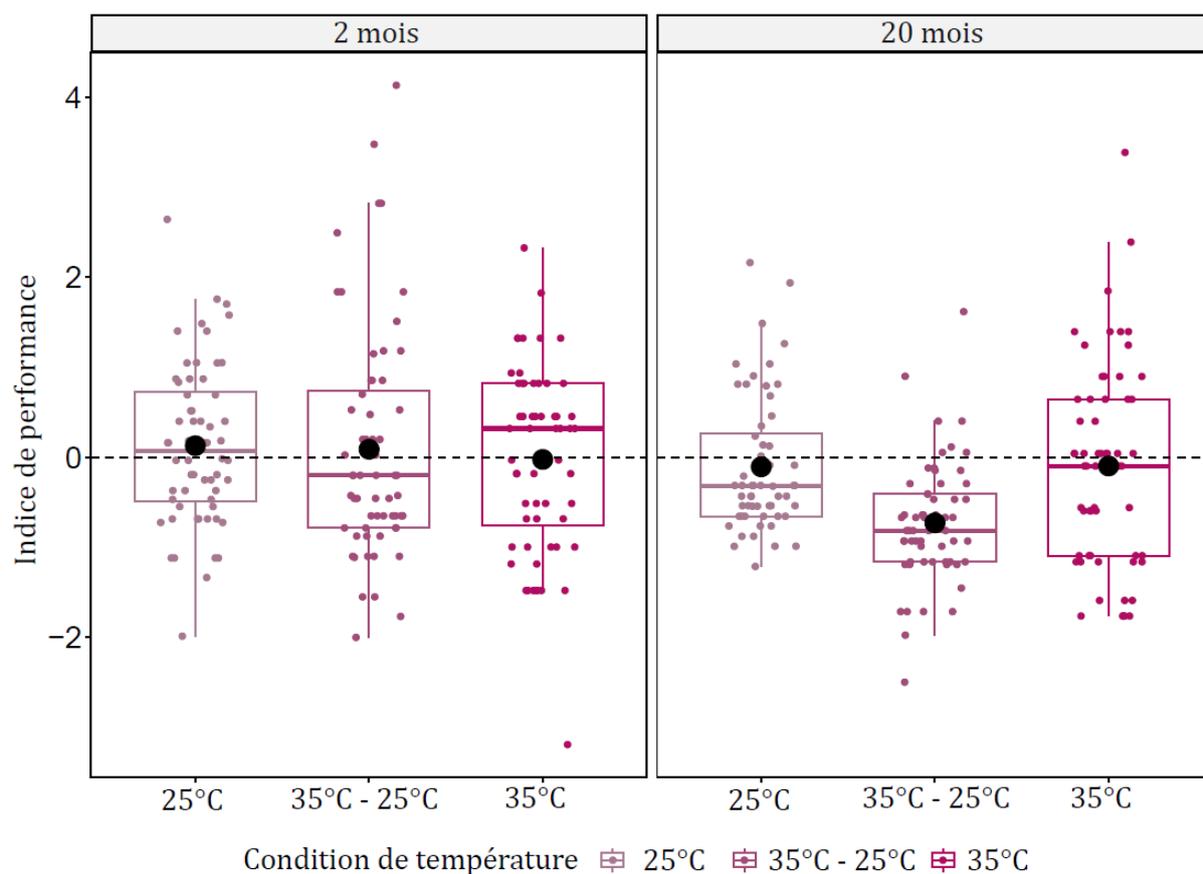


Figure 44 : Indices de performance des plasmodes DWCNT jeunes ou âgés, sur substrat aversif (double-ponts), selon la condition de température.

60 plasmodes par âge, et par condition ont été testés sauf pour une condition où 56 plasmodes DWCNT âgés pour la température [25°C] ont été testés.

4.6.1.3. Résultats : substrat attractif (simple pont)

Il n'y a pas d'effet de l'âge sur les vitesses de déplacement des plasmodes DWCNT sur substrat attractif ($p = 0,701$, **Tableau S71**, **Figure S15**, **Figure 45**). Peu importe l'âge, les indices de performance de la condition à 25°C et la condition à 35°C sont différentes ($p < 0,001$, **Tableau S71**, **Figure 45**). Les plasmodes DWCNT soumis à 35°C ont des vitesses similaires aux plasmodes CMC, alors que les plasmodes soumis à 25°C, et ceux soumis à un changement brutal de température, sont plus rapides que les plasmodes CMC.

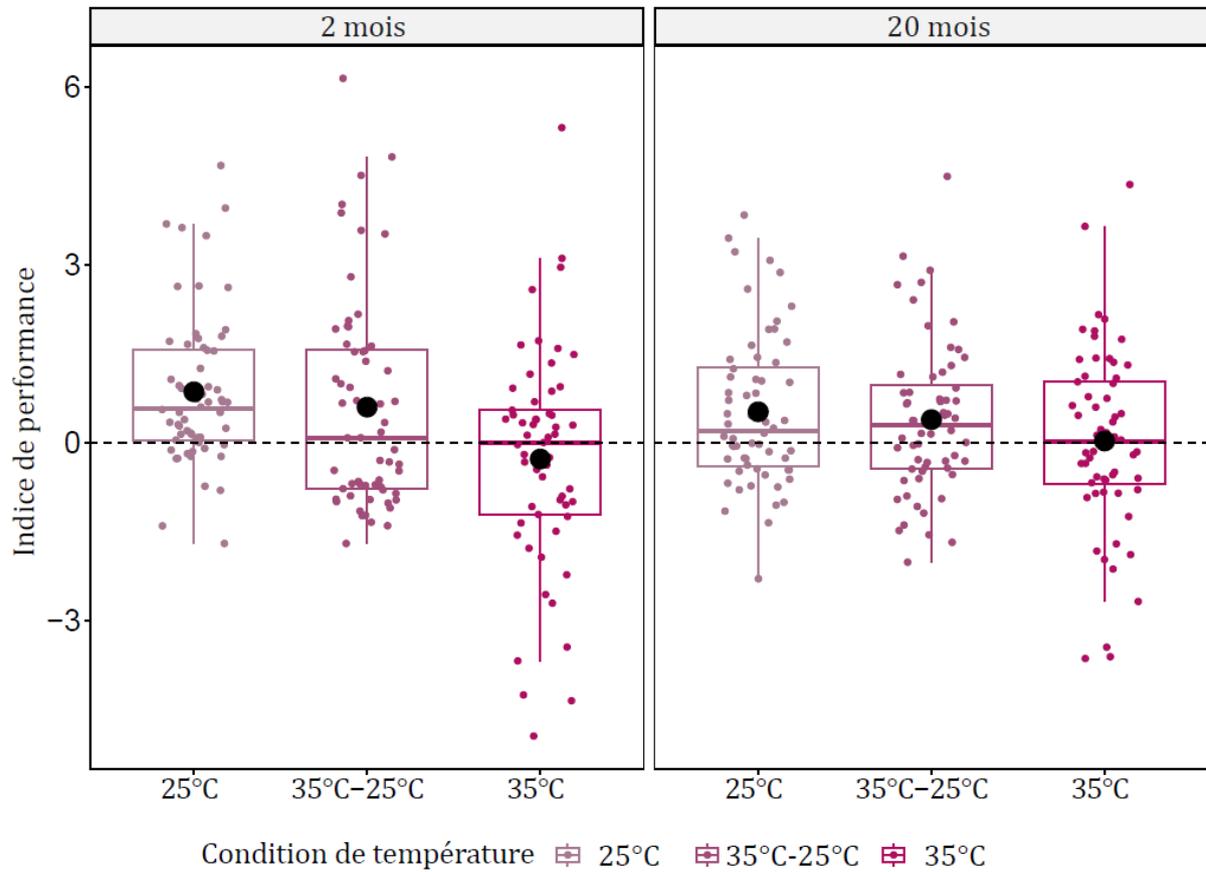


Figure 45 : Indices de performance des plasmodes DWCNT jeunes ou âgés, sur substrat attractif (simple pont) selon la condition de température.

60 plasmodes par âge, et par condition ont été testés sauf pour une condition où 57 plasmodes DWCNT jeunes pour la température [35°C] ont été testés.

4.7. Discussion

Pour résumer :

- Souche LU : Face à la possibilité d'explorer une arène contenant 2 pastilles de nourriture, la proportion de plasmodes DWCNT à préférer ingérer la source la plus riche avant d'explorer d'autres options est plus élevée que la proportion de plasmodes CMC. Ces derniers explorent en majorité l'arène avant d'ingérer la source la plus riche.
- Souche AUS : Face aux choix 1 (1,5 vs 0,5 ‰) et 2 (1,25 vs 0,75 ‰), les plasmodes DWCNT font des choix similaires (1 et 9 semaines d'exposition) ou moins optimaux que les plasmodes CMC (2 et 6 semaines d'exposition). Après 1 et 2 semaines d'exposition, les plasmodes DWCNT face au choix 2 ont tendance à être ralentis par rapport aux plasmodes CMC. Après 6 et 9 semaines d'exposition les plasmodes DWCNT sont ralentis par rapport aux plasmodes CMC.
- Souche LU : Sur substrat répulsif, la prise de décision est affectée par le traitement DWCNT, leur décision est légèrement meilleure après 1,5 semaines d'exposition, elle est moins optimale après 4 semaines d'exposition, elle est similaire avec les plasmodes CMC après 6 semaines d'exposition. Sur substrat attractif, la prise de décision est similaire entre les plasmodes DWCNT et CMC.
- Souche LU : Sur substrat répulsif les plasmodes ont une vitesse de déplacement qui est similaire après 1,5, 4 et 6 semaines d'exposition avec les plasmodes CMC, sur substrat attractif les plasmodes ont une vitesse de déplacement qui est plus faible après 5 jours d'exposition, similaire après 2 semaines d'exposition, et plus élevée après 4 semaines d'exposition que les plasmodes CMC.
- Souche AUS : Le traitement DWCNT n'affecte pas la prise de décision des plasmodes même avec des conditions de températures non optimales. Étonnamment les plasmodes DWCNT ont une vitesse de déplacement plus élevée que les plasmodes CMC. Sur substrat attractif, à des températures normales ou élevées, les plasmodes AUS DWCNT sont plus rapides que les plasmodes CMC. Les plasmodes AUS DWCNT soumis à un changement brutal de température ont des vitesses de déplacement similaires aux plasmodes CMC.
- Souche LU – 2 âges : Les plasmodes CMC les plus âgés (20 mois) font un choix plus optimal par rapport aux plasmodes CMC de 2 mois. Les plasmodes DWCNT les plus âgés (20 mois) font un choix plus optimal par rapport aux plasmodes CMC de 20 mois. Les plasmodes DWCNT de 20 mois ont tendance à être plus rapide que les plasmodes CMC de 20 mois.

Pour résumer (suite) :

- Souche LU : Le traitement DWCNT, combiné au vieillissement et à un changement brutal de température, n'affecte pas la prise de décision des plasmodes. En revanche, la vitesse de déplacement des plasmodes DWCNT âgés et soumis à la condition [35-25°C] est ralentie. Sur substrat attractif, à des températures élevées, les plasmodes DWCNT ont des vitesses similaires aux plasmodes CMC, alors que les plasmodes DWCNT soumis à une température normale ou à un changement brutal de température, sont plus rapides que les plasmodes CMC.

Physarum polycephalum est un bon modèle pour observer la prise de décision car il est capable de faire des choix précis (Dussutour et al., 2010, 2019; Latty & Beekman, 2009). Chez *P. polycephalum*, la prise de décision peut être affectée par l'état physiologique du plasmode (affamement, stress environnemental, (Latty & Beekman, 2010)). Nos résultats montrent que l'exposition aux DWCNT peut également affecter la prise de décision des plasmodes. Ainsi que nous l'avons observé pour la vitesse de déplacement, cet effet est variable. En effet, les plasmodes exposés aux DWCNT font des choix plus optimaux que les plasmodes contrôles, ou moins optimaux.

Prise de décision en arène

Nos résultats ont montré que les plasmodes exposés aux DWCNT ont une stratégie différente de prise de décision face à un choix entre deux 2 patchs de nourritures de qualités différentes. L'événement qui est le moins réalisé par les plasmodes durant les 24h d'expérience est le recouvrement du patch à 1% (9 plasmodes CMC et 10 plasmodes DWCNT sont concernés) (voir §4.2.1.2). Nos résultats démontrent que le patch d'avoine à 1% est moins attractif pour les plasmodes quel que soit le traitement. En revanche, leur comportement face au patch de 4% change en fonction du traitement. Les plasmodes CMC et DWCNT entrent en contact et recouvrent les patchs dans un même laps de temps mais ne réalisent pas les événements dans le même ordre. Approximativement la moitié des plasmodes DWCNT (43%) ont recouvert et ingéré le patch d'avoine à 4% avant de continuer à explorer l'arène, contre seulement 26% des plasmodes CMC. En effet, 74% des plasmodes CMC ont continué d'explorer l'arène et sont entrés en contact avec les 2 patchs avant de faire le choix d'ingérer celui à 4%.

Naturellement les plasmodes alternent entre des phases d'exploration et d'exploitation (alimentation) (Halvorsrud & Wagner, 1998). Lors de l'exploration la biomasse des plasmodes est limitée, quand ils se dirigent vers une zone ils doivent se rétracter d'une autre (Gao et al., 2019). Lors de l'exploitation, les plasmodes sont sédentaires et gagnent en biomasse. Quand le plasmode entre en contact avec un patch nutritif il a alors deux options : exploiter le patch ou quitter le patch et continuer d'explorer le milieu à la recherche d'une meilleure option. Nous avons utilisé un ratio de concentration de 4 dans notre cas (le patch le plus nutritif est 4 fois plus concentré que l'autre), ce qui est considéré comme étant un choix facile (la majorité des plasmodes se dirigent vers le patch le plus concentré en nourriture) (Latty & Beekman, 2010).

Latty & Beekman (2010) ont montré que lorsque les plasmodes sont en conditions optimales, ils choisissent d'exploiter le patch le plus concentré en nourriture (Latty & Beekman, 2010). A l'inverse quand une condition stressante est ajoutée (lumière sur le patch le plus concentré en nourriture), ils exploitent le patch le moins concentré (situé à l'obscurité) Toutefois, lorsque la qualité du patch placé à la lumière augmente de façon à être au moins 5 fois plus riche que le patch placé à l'obscurité, alors les plasmodes se dirigeront vers le patch le plus situé à la lumière (Latty & Beekman, 2010). *P. polycephalum* est donc capable d'adapter ses prises de décision face à un stress environnemental et d'évaluer la balance bénéfice-risque. Nous pouvons alors nous demander si, en réponse au stress engendré par les DWCNT, les plasmodes DWCNT font le choix d'exploiter le patch le plus nutritif au lieu de dépenser de l'énergie et du temps à explorer l'arène pour trouver une meilleure option, par rapport aux plasmodes CMC.

Combinaison des effets sur substrat attractif

Nous avons évalué les prises de décision des plasmodes exposés aux DWCNT, sur substrat attractif, d'abord sans autre facteur de stress puis avec les combinaisons suivantes : [DWCNT x Température] et [DWCNT x Age x Température].

Lorsque les plasmodes ont le choix entre deux options nutritives de qualité différente, le traitement DWCNT n'engendre aucun effet sur la prise de décision. Cela concorde avec les résultats de l'expérience de prise de décision en arène qui avaient montrés que les plasmodes CMC et DWCNT sont capables de reconnaître le patch le plus nutritif. Dans le cas des double-ponts, les plasmodes sont en contact dès le début avec les deux options, sans exploration possible, il est donc attendu que les choix soient similaires entre les plasmodes CMC et DWCNT. En revanche, la vitesse de déplacement est modifiée par le traitement DWCNT, les plasmodes sont ralentis (à 5 jours d'exposition) ou accélérés (à 4 semaines d'exposition). Mais il n'y a aucun lien apparent entre la vitesse de déplacement et l'optimalité de la prise de décision.

En combinant une exposition aux DWCNT avec différentes températures, on observe que le traitement DWCNT (souche AUS) induit une accélération de la vitesse pour des conditions stables de température (soit 25°C, soit 35°C), mais n'affecte pas la vitesse de déplacement quand il y a un changement brutal de température (de 35°C à 25°C). En combinant une exposition aux DWCNT avec différentes températures, et le vieillissement, on observe que le traitement DWCNT (souche LU) induit une accélération de la vitesse des plasmodes à 25°C et lors d'un changement brutal de température (de 35°C à 25°C), il n'affecte pas la vitesse de déplacement à 35°C. Cette observation est valable à la fois pour les plasmodes jeunes (2 mois) et les plasmodes âgés (20 mois). Donc on observe, pour les deux génotypes, une accélération induite par le traitement DWCNT à une température normale (25°C). Quand les conditions de température ne sont plus optimales, les DWCNT n'affectent plus les deux génotypes de la même manière.

La température est connue pour affecter la vitesse de déplacement des plasmodes, les hautes températures diminuent la période de contraction des veines (Matsumoto et al., 1988; Wohlfarth-Bottermann, 1977), et la combinaison de l'âge avec la température a déjà montré que des plasmodes jeunes et âgés ne seront pas affectés de la même manière. Des plasmodes âgés de plus

de 25 semaines ont des vitesses de déplacement sur ponts d'avoine qui sont supérieures à des plasmodes jeunes (8 semaines) à une température de 38,5°C (Rolland et al., 2023). A une température de 25°C c'est l'inverse qui se produit, les plasmodes jeunes sont plus rapides que les plasmodes âgés (Rolland et al., 2023). Donc la combinaison des facteurs de stress [Température] et [Age] a induit une augmentation de la vitesse des plasmodes dans leur cas. En ajoutant une exposition aux DWCNT, nous n'avons pas de différence avec nos plasmodes contrôle à 35°C, donc les DWCNT ne changent pas l'effet combiné de la température et du vieillissement. En revanche, à 25°C et lors du changement brutal de température, nos plasmodes DWCNT sont plus rapides que les plasmodes CMC. Les DWCNT amplifient l'effet combiné de la température ([25°C] et [35-25°C]) et du vieillissement.

Combinaison des effets sur substrat aversif

Nous avons observé l'effet résultant de l'exposition à plusieurs facteurs de stress, sur substrat aversif, en quatre temps : [DWCNT x NaCl] ; [DWCNT x NaCl x Température] ; [DWCNT x NaCl x Age] ; [DWCNT x NaCl x Age x Température].

Lorsque les plasmodes ont le choix entre deux options aversives de concentration différente, le choix le plus optimal pour les plasmodes est d'éviter le substrat le plus aversif, et de croître majoritairement sur le moins aversif. Pour la souche AUS, nous observons que les plasmodes exposés aux DWCNT ont des prises de décision qui sont similaires, ou moins optimales, que les plasmodes CMC (selon les concentrations en substances aversive ou la durée d'exposition). Les plasmodes LU DWCNT réalisent des choix plus optimaux (après 1,5 semaines d'exposition), moins optimaux (après 4 semaines d'exposition), ou similaires aux plasmodes CMC (après 6 semaines d'exposition). Les plasmodes DWCNT (souche AUS) sont ralentis sur le substrat aversif (effet plus ou moins marqué selon la durée d'exposition), ce n'est pas le cas des plasmodes LU. Il n'y a pas de lien entre la vitesse de déplacement et l'optimalité de la prise de décision.

Le NaCl, utilisé ici comme substance aversive, est connu pour diminuer la vitesse de déplacement de *P. polycephalum* (Patino-Ramirez et al., 2019) du moins quand ils y sont confrontés pour la première fois, car si l'exposition se répète pendant au minimum 5 jours consécutifs alors les plasmodes s'y habituent et récupèrent une vitesse de déplacement normale (Boisseau et al., 2016; Boussard et al., 2019; Vogel & Dussutour, 2016). Dans notre cas les plasmodes rencontrent le NaCl pour la 1^{ère} fois et pendant moins de 24h, donc ils ne peuvent pas l'ignorer, ce qui nous a permis d'évaluer la prise de décision et la vitesse des plasmodes. Dans notre cas, quand les plasmodes sont ralentis cela implique que le traitement DWCNT amplifie l'effet du NaCl, et quand il n'y a pas de différence de vitesse alors les DWCNT gomment le ralentissement qui devrait être produit par le NaCl. Il est donc difficile d'évaluer l'effet combiné des DWCNT et du NaCl.

Nous avons discuté dans le chapitre 3 du fait que les NTC peuvent interagir avec les MT (voir §3.5). Il s'avère que ces derniers sont impliqués dans la réorientation des plasmodes en réponse à un stimulus chimique. Il a été montré que si *P. polycephalum* est traité avec des agents chimiques perturbant le fonctionnement des MT, alors le chimiotactisme est inhibé (M. Ueda & Ogihara, 1994). Si les DWCNT perturbent le réseau de MT et affectent par la même occasion le

chimiotactisme, alors cela pourrait empêcher une bonne orientation des plasmodes sur les ponts selon les concentrations détectées, et expliquer pourquoi ils font des choix moins optimaux. Cependant, dans ces cas-là nous devrions également observer une variabilité dans la prise de décision des plasmodes DWCNT sur substrat attractif, ce qui n'est pas le cas. Donc l'hypothèse de l'action mécanique des DWCNT n'est pas privilégiée dans le cas de la variabilité de la prise de décision sur substrat aversif, en revanche elle reste plausible pour expliquer la variabilité de l'effet des DWCNT sur la vitesse de déplacement qui est observée à la fois sur substrat attractif et aversif.

Nous avons par la suite combiné l'exposition aux DWCNT sur substrat aversif, à des températures non optimales.

Pour la souche AUS, nous n'observons aucun choix des plasmodes à la fois pour ceux exposés aux DWCNT et ceux exposés à la CMC. Cette observation est étonnante car nous observions une prise de décision dans l'expérience précédente réalisée à 25°C. Il est probable qu'un facteur autre que ceux que nous contrôlons ait affecté la prise de décision des plasmodes. Pour la souche LU, les plasmodes CMC et DWCNT font des choix plus optimaux à 35°C qu'à 25°C, une température élevée semble rendre les plasmodes plus optimaux dans leurs décisions. Le traitement seul n'agit pas sur la prise de décision, les plasmodes CMC et DWCNT font des choix similaires peu importe la condition de température. La température a un effet sur la prise de décision des plasmodes (choix plus optimaux à 35°C), pas le traitement, il n'y a aucune interaction des effets entre le traitement et la température.

En revanche, le traitement DWCNT induit une accélération des plasmodes pour toutes les conditions de température pour la souche AUS, et uniquement pour la condition de température élevée (35°C) pour la souche LU. Lors de la combinaison de la température avec le traitement DWCNT, on observe l'effet du traitement (accélération de la vitesse) mais aucun effet de la température sur la souche AUS. Sur la souche LU, lors de la combinaison de la température avec le traitement DWCNT, on observe une amplification de l'accélération de la vitesse des plasmodes à 35°C (interaction des facteurs [DWCNT] et [Température]).

Une amplification de l'effet des DWCNT, les mêmes que ceux que nous utilisons dans cette thèse (synthétisés au CIRIMAT), avec une température élevée a déjà été montré sur le développement du colza (*Brassica napus*). L'application des DWCNT combinée à un stress thermique inhibe la germination et le développement des plantes, ce qui n'est pas le cas quand la température est optimale (Liné, 2019). Quand les conditions environnementales sont défavorables, notamment quand la température atteint 40°C, l'amibe de *P. polycephalum* s'apprête à entrer en dormance et augmente la production d'une protéine HSP (famille 66-kDa) (Shimada et al., 1992). Certaines protéines HSP peuvent protéger les organismes exposés à des NPs. Des auteurs ont évalué la survie de bactéries transgéniques (*E. coli*) exprimant le DcHsp17.7 (une HSP d'une autre famille que celle produite par *P. polycephalum*) exposés à des NPs d'argent et des MWCNT. Il s'avère qu'elles ont une meilleure survie que les bactéries non-transgéniques (Park et al., 2014). Une autre protéine HSP (famille 70-kDa) est présente durant le cycle cellulaire des macropasmodes, avec une quantité qui diffère selon la phase du cycle (Gevers et al., 1997). Donc la production de HSP en réponse à un stress thermique est possible chez *P. polycephalum* et

pourrait le protéger de l'exposition aux DWCNT selon la phase du cycle cellulaire. A l'inverse, les NTC eux-mêmes peuvent induire l'expression de protéines HSP aussi bien chez des végétaux (Park et al., 2014), que des cellules humaines (Cicchetti et al., 2011), et protéger les cellules contre d'autres facteurs de stress y compris un stress thermique (Shehata et al., 2020).

Nous avons ensuite combiné l'exposition aux DWCNT sur substrat aversif, au vieillissement des plasmodes.

Chez les plasmodes âgés, les plasmodes DWCNT font des choix plus optimaux que les plasmodes CMC, alors que chez les plasmodes jeunes les choix sont similaires entre les traitements. De plus, nos résultats indiquent que les plasmodes CMC âgés font des choix moins optimaux que les plasmodes jeunes CMC. Cela entre en contradiction avec ce qu'avait observé Rolland et al. (2023) où les plasmodes âgés faisaient des choix plus optimaux que les plasmodes jeunes. Deux explications sont possibles. Tout d'abord, la composition des ponts n'est pas la même, ceux de Rolland et al. (2023) sont composés de NaCl avec de l'avoine, les nôtres uniquement de NaCl. L'autre explication serait que la CMC seule combinée au vieillissement provoque la diminution de l'optimalité du choix. Finalement, l'exposition aux DWCNT empêche la diminution de l'optimalité qui est engendrée par l'âge (et potentiellement la CMC seule), l'effet des DWCNT prend donc le pas sur l'effet du vieillissement (combiné à la CMC seule).

Les études évaluant l'effet combiné d'une exposition aux NPs et de l'âge des organismes sont majoritairement réalisées sur des modèles rongeurs pour des études en toxicologie humaine. C'est important du fait que les populations sont composées d'individus de tous âges dont les cellules sont amenées à vieillir. Le vieillissement peut parfois protéger les individus contre la toxicité de NPs et parfois les rendre plus sensibles. Prenons l'exemple de l'exposition de souris jeunes (6 mois) et plus âgées (21 mois) à des nPM (nanoparticules en suspension dans l'air). Les auteurs ont mesuré l'induction d'un facteur de transcription (Nrf2) qui est impliqué dans la régulation d'enzymes détoxifiantes. Ils ont montré que l'expression et le niveau de protéines Nrf2 est naturellement plus élevé dans les tissus des souris âgées, et qu'en réponse à l'exposition aux nPM l'induction de ce facteur est augmentée chez les souris jeunes, et reste inchangée chez les souris âgées (H. Zhang et al., 2012). Ainsi ils ont démontré que les souris âgées avaient déjà une quantité suffisante de ce facteur pour répondre au stress induit par les nPM. Un autre exemple de l'exposition de rats jeunes (3 semaines), adultes (8 semaines), âgés (20 mois) à des NP de dioxyde de silicium (SiO₂) par inhalation. Les NP de SiO₂ causent plus de problèmes cardiaques et d'inflammation pulmonaire chez les rats âgés par rapport aux rats adultes et jeunes (Z. Chen et al., 2008). Finalement, différents âges nécessitent la recherche de différents biomarqueurs pour évaluer la toxicité des NPs.

Pour terminer, nous avons combiné l'exposition des plasmodes aux DWCNT sur substrat aversif, au vieillissement et à des températures non optimales.

Peu importe la condition de température, les plasmodes DWCNT âgés ont des prises de décision similaires aux plasmodes CMC. Ceci nous montre encore une fois l'effet variable des DWCNT, car

précédemment nous avons observé un choix plus optimal des plasmodes DWCNT âgés à 25°C (§ 4.5). En revanche, la vitesse de déplacement des plasmodes DWCNT âgés est ralentie quand ils subissent un changement brutal de température par rapport aux plasmodes CMC âgés, ce n'est pas le cas pour les plasmodes soumis à 25°C ou à 35°C. La combinaison du vieillissement avec le traitement DWCNT et un changement brutal de température crée un effet qui n'est visible qu'avec ces trois conditions réunies.

Plusieurs études posent question de la toxicité des NPs envers les organismes plus âgés , ou de leur toxicité en cas d'une augmentation de la température. Mais finalement il n'y en a pas (ou très peu) qui traitent de la toxicité de ces 3 facteurs combinés, alors que les populations y seront confrontées avec le changement climatique.

Tout au long de ces expériences nous avons utilisé un substrat composé de NaCl qui est un composé chimique ionique (chargé). D'autres substances non chargées sont également répulsives pour *P. polycephalum* tels que la caféine et la quinine. Il serait intéressant de faire les tests avec ces composés neutres pour voir si la nature de la substance aversive peut jouer un rôle dans l'effet des DWCNT, notamment du fait que ces substances peuvent affecter différemment le potentiel de membrane de *P. polycephalum* (T. Ueda et al., 1975), et aussi du fait que les interactions de ces composés chimiques avec les NTC pourrait différer.

Cherchant une explication de l'effet variable des DWCNT sur *P. polycephalum*, nous avons, dans le chapitre qui suit, observé l'oscillation des périodes de contraction des veines des plasmodes pour percevoir s'il y a un effet mécanique lié aux DWCNT. Nous avons aussi observé le stress oxydant, qui est un marqueur de stress cellulaire (Maiese et al., 2010).

4.8. Annexe 4 : Tableaux statistiques et figures supplémentaires

4.8.1. Effets sur la prise de décision pour un substrat attractif : montage en arène

Indice des latence - en arène - LU					
<i>Prédicteurs</i>	<i>Estimés</i>	<i>CI</i>	<i>Statistique</i>	<i>p</i>	<i>df</i>
(Intercept)	0.15	-0.19 – 0.48	0.87	0.385	163.00
[Latence contact 4%] vs [Latence contact 1%]	-0.15	-0.57 – 0.26	-0.73	0.467	163.00
[Latence contact 4%] vs [Latence couvrir 4%]	-0.27	-0.69 – 0.14	-1.32	0.189	163.00
[Latence contact 4%] vs [Latence couvrir 1%]	-0.16	-0.60 – 0.29	-0.70	0.487	163.00
Effets Aléatoires					
σ^2	0.98				
τ_{00} ID_plasmod	0.03				
ICC	0.03				
N ID_plasmod	5				
Observations	169				
R ² Marginal / R ² Conditionnel	0.010 / 0.044				

Tableau S49 : Statistiques associées à la Figure 32.

Pour évaluer les différences des indices de performance de la souche LU selon l'événement observé, nous avons utilisé un modèle mixte linéaire (fonction *lmer*, famille d'erreur : Gaussienne, Package *lme4*). Le modèle a été ajusté en spécifiant l'effet fixe : événement (prédicteur catégorique) ; et l'effet aléatoire : ID (identité du plasmode). La variable dépendante (Indice) a été normalisée à l'aide de la fonction *bestNormalize* (Package *bestNormalize*).

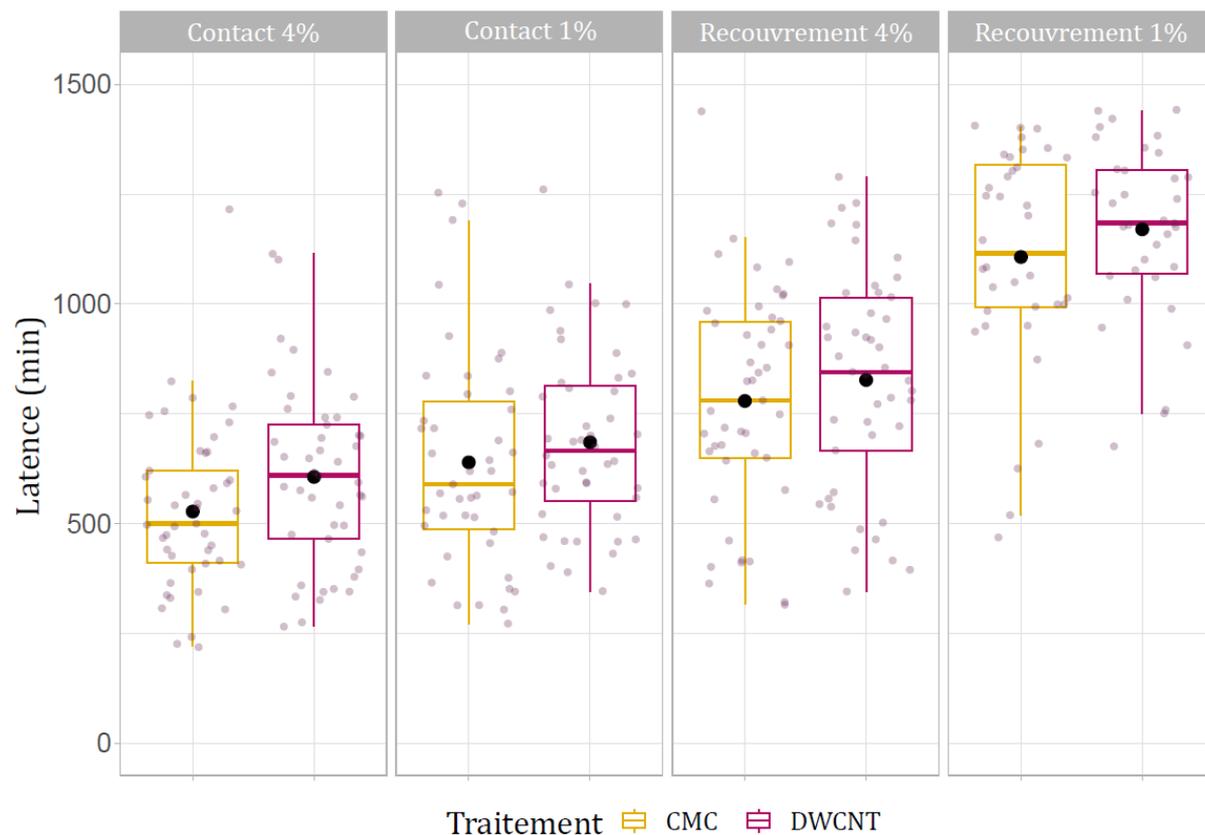


Figure S13 : Latence d'apparition des événements en fonction du traitement chez la souche LU après 1 semaine d'exposition.

45 plasmodes par traitement pour la latence de contact avec la pastille 4% ; 43 plasmodes CMC et 44 plasmodes DWCNT pour la latence de contact avec la pastille 1% ; 45 plasmodes par traitement pour la latence de recouvrement de la pastille 4% ; 36 plasmodes CMC et 35 plasmodes DWCNT pour la latence de recouvrement de la pastille 1% ont été testés.

4.8.2. Prise de décision - souche AUS – substrat répulsif

Indice de décision - AUS - 1 semaine d'exposition					
<i>Prédicteurs</i>	<i>Estimés</i>	<i>CI</i>	<i>Statistique</i>	<i>p</i>	<i>df</i>
(Intercept)	-0.18	-0.47 – 0.11	-1.25	0.212	121.00
Traitement [CMC] vs [DWCNT]	-0.14	-0.47 – 0.20	-0.80	0.425	121.00
Choix [1,25 vs 0,75] vs Choix [C1,5vs0,5]	0.50	0.16 – 0.84	2.92	0.004	121.00
Effets Aléatoires					
σ^2	0.93				
$\tau_{00 \text{ ID}}$	0.00				
N_{ID}	18				
Observations	126				
R ² Marginal/ R ² Conditionnel	0.068 / NA				

Tableau S50 : Statistiques associées à la Figure 35 (A).

Indice de décision - AUS - 2 semaines d'exposition					
<i>Prédicteurs</i>	<i>Estimés</i>	<i>CI</i>	<i>Statistique</i>	<i>p</i>	<i>df</i>
(Intercept)	0.06	-0.21 – 0.33	0.42	0.671	219.00
Traitement [CMC] vs [DWCNT]	-0.35	-0.69 – -0.01	-2.01	0.044	219.00
Choix [1,25 vs 0,75] vs Choix [C1,5vs0,5]	0.23	-0.02 – 0.48	1.81	0.070	219.00
Effets Aléatoires					
σ^2	0.92				
$\tau_{00 \text{ ID}}$	0.05				
ICC	0.05				
N_{ID}	14				
Observations	224				
R ² Marginal/ R ² Conditionnel	0.044 / 0.091				

Tableau S51 : Statistiques associées à la Figure 35 (B).

Pour évaluer les différences des indices de décision de la souche AUS selon le traitement (CMC et DWCNT) et le choix proposé, nous avons utilisé un modèle mixte linéaire (fonction `lmer`, famille d'erreur : Gaussienne, Package `lme4`). Le modèle a été ajusté en spécifiant les effets fixes : traitement, choix (prédicteurs catégoriques) ; et l'effet aléatoire : ID (identité du plasmode). La variable dépendante (Indice) a été normalisée à l'aide de la fonction `bestNormalize` (Package `bestNormalize`).

Indice de performance - AUS - Distance parcourue 1 et 2 semaines d'exposition					
<i>Prédicteurs</i>	<i>Estimés</i>	<i>CI</i>	<i>Statistique</i>	<i>p</i>	<i>df</i>
(Intercept)	-0.32	-1.12 – 0.48	-0.78	0.436	169.00
Choix [1,25 vs 0,75] vs Choix [C1,5vs0,5]	0.16	-0.10 – 0.42	1.19	0.234	169.00
[1 Semaine] vs [2 Semaines]	-0.08	-0.37 – 0.20	-0.58	0.560	169.00
Effets Aléatoires					
σ^2	0.78				
$\tau_{00 \text{ ID}}$	0.95				
ICC	0.55				
N_{ID}	9				
Observations	174				
R^2 Marginal/ R^2 Conditionnel	0.005 / 0.550				

Tableau S52 : Statistiques associées à la Figure 35 (C,D).

Pour évaluer les différences des indices de performance de la souche AUS selon le choix proposé et la durée d'exposition, nous avons utilisé un modèle mixte linéaire (fonction lmer, famille d'erreur : Gaussienne, Package lme4). Le modèle a été ajusté en spécifiant les effets fixes : choix (prédicteur catégorique), durée d'exposition (prédicteur continu) ; et l'effet aléatoire : ID (identité du plasmode). La variable dépendante (Indice) a été normalisée à l'aide de la fonction bestNormalize (Package bestNormalize).

Indice de décision - AUS - 6 semaines d'exposition					
<i>Prédicteurs</i>	<i>Estimés</i>	<i>CI</i>	<i>Statistique</i>	<i>p</i>	<i>df</i>
(Intercept)	-0.14	-0.35 – 0.06	-1.37	0.171	314.00
[CMC] vs [DWCNT]	-0.43	-0.69 – -0.18	-3.34	0.001	314.00
Choix [1,25 vs 0,75] vs Choix [C1,5vs0,5]	0.72	0.53 – 0.92	7.24	<0.001	314.00
Effets Aléatoires					
σ^2	0.79				
τ_{00} ID_plasmod	0.04				
ICC	0.04				
N ID_plasmod	20				
Observations	319				
R ² Marginal/ R ² Conditionnel	0.178 / 0.212				

Tableau S53 : Statistiques associées à la Figure 36 (A).

Indice de décision - AUS - 9 semaines d'exposition					
<i>Prédicteurs</i>	<i>Estimés</i>	<i>CI</i>	<i>Statistique</i>	<i>p</i>	<i>df</i>
(Intercept)	0.10	0.02 – 0.18	2.42	0.015	223.00
[CMC] vs [DWCNT]	-0.03	-0.13 – 0.08	-0.53	0.598	223.00
Choix [1,25 vs 0,75] vs Choix [C1,5vs0,5]	0.09	0.03 – 0.14	2.89	0.004	223.00
Effets Aléatoires					
σ^2	0.05				
τ_{00} ID_plasmod	0.01				
ICC	0.16				
N ID_plasmod	20				
Observations	228				
R ² Marginal/ R ² Conditionnel	0.033 / 0.189				

Tableau S54 : Statistiques associées à la Figure 36 (B).

Pour évaluer les différences des indices de décision de la souche AUS selon le traitement (CMC et DWCNT) et le choix proposé, nous avons utilisé un modèle mixte linéaire (fonction *lmer*, famille d'erreur : Gaussienne, Package *lme4*). Le modèle a été ajusté en spécifiant les effets fixes : traitement, choix (prédicteurs catégoriques) ; et l'effet aléatoire : ID (identité du plasmode). La variable dépendante (Indice) a été normalisée à l'aide de la fonction *bestNormalize* (Package *bestNormalize*).

Indice de performance - AUS - Distance parcourue 6 et 9 semaines d'exposition					
<i>Prédicteurs</i>	<i>Estimés</i>	<i>CI</i>	<i>Statistique</i>	<i>p</i>	<i>df</i>
(Intercept)	-0.01	-0.80 – 0.78	-0.02	0.987	261.00
Choix [1,25 vs 0,75] vs Choix [C1,5vs0,5]	-2.19	-3.19 – -1.20	-4.32	<0.001	261.00
Durée d'exposition	-0.01	-0.02 – 0.00	-1.29	0.197	261.00
Choix * Durée d'exposition	0.04	0.02 – 0.06	3.99	<0.001	261.00
Effets Aléatoires					
σ^2	0.64				
τ_{00} ID_plasmod	0.34				
ICC	0.35				
N ID_plasmod	10				
Observations	267				
R ² Marginal/ R ² Conditionnel	0.058 / 0.383				

Tableau S55 : Statistiques associées à la Figure 36 (C,D).

Pour évaluer les différences des indices de performance de la souche AUS selon le choix proposé et la durée d'exposition, nous avons utilisé un modèle mixte linéaire (fonction lmer, famille d'erreur : Gaussienne, Package lme4). Le modèle a été ajusté en spécifiant les effets fixes : choix (prédicteur catégorique), durée d'exposition (prédicteur continu) ; et l'effet aléatoire : ID (identité du plasmode). La variable dépendante (Indice) a été normalisée à l'aide de la fonction bestNormalize (Package bestNormalize).

4.8.3. Prise de décision - souche LU – substrat répulsif

Indice de décision - LU - Substrat répulsif					
<i>Prédicteurs</i>	<i>Estimés</i>	<i>CI</i>	<i>Statistique</i>	<i>p</i>	<i>df</i>
(Intercept)	0.65	0.33 – 0.96	4.06	<0.001	393.00
[CMC] vs [DWCNT]	-0.32	-0.51 – -0.12	-3.23	0.001	393.00
Semaine	-0.11	-0.18 – -0.05	-3.41	0.001	393.00
Effets Aléatoires					
σ^2	0.95				
$\tau_{00 ID}$	0.00				
N_{ID}	10				
Observations	398				
R ² Marginal/ R ² Conditionnel	0.053 / NA				

Tableau S56 : Statistiques associées à la Figure 37 (A).

Indice de performance - LU - substrat répulsif					
<i>Prédicteurs</i>	<i>Estimés</i>	<i>CI</i>	<i>Statistique</i>	<i>p</i>	<i>df</i>
(Intercept)	-0.21	-0.64 – 0.22	-0.96	0.335	195.00
Semaine	0.05	-0.04 – 0.14	1.02	0.307	195.00
Effets Aléatoires					
σ^2	0.99				
$\tau_{00 ID_plasmod}$	0.00				
$N_{ID_plasmod}$	10				
Observations	199				
R ² Marginal/ R ² Conditionnel	0.005 / NA				

Tableau S57 : Statistiques associées à la Figure 37 (B).

Pour évaluer les différences des indices de performance de la souche LU selon le traitement et la durée d'exposition, nous avons utilisé un modèle mixte linéaire (fonction *lmer*, famille d'erreur : Gaussienne, Package *lme4*). Le modèle a été ajusté en spécifiant les effets fixes : traitement (prédicteur catégorique), durée d'exposition (prédicteur continu) ; et l'effet aléatoire : ID (identité du plasmode). La variable dépendante (Indice) a été normalisée à l'aide de la fonction *bestNormalize* (Package *bestNormalize*).

4.8.4. Prise de décision - souche LU – substrat attractif

Indice de décision - substrat attractif - LU					
<i>Prédicteurs</i>	<i>Estimés</i>	<i>CI</i>	<i>Statistique</i>	<i>p</i>	<i>df</i>
(Intercept)	0.48	0.42 – 0.55	15.48	< 0.001	301.00
[CMC] vs [DWCNT]	-0.02	-0.09 – 0.04	-0.75	0.453	301.00
Semaine	-0.07	-0.09 – -0.05	-7.39	< 0.001	301.00
Effets Aléatoires					
σ^2	0.05				
τ_{00} ID_plasmod	0.00				
ICC	0.05				
N ID_plasmod	20				
Observations	306				
R ² Marginal/ R ² Conditionnel	0.148 / 0.190				

Tableau S58 : Statistiques associées à la Figure 38 (A)

Indice de performance - substrat attractif - LU					
<i>Prédicteurs</i>	<i>Estimés</i>	<i>CI</i>	<i>Statistique</i>	<i>p</i>	<i>df</i>
(Intercept)	-0.83	-1.11 – -0.55	-5.83	< 0.001	150.00
Semaine	0.41	0.30 – 0.52	7.40	< 0.001	150.00
Effets Aléatoires					
σ^2	0.72				
τ_{00} ID_plasmod	0.03				
ICC	0.04				
N ID_plasmod	10				
Observations	154				
R ² Marginal/ R ² Conditionnel	0.257 / 0.285				

Tableau S59 : Statistiques associées à la Figure 38 (B).

Pour évaluer les différences des indices de performance de la souche LU selon le traitement et la durée d'exposition, nous avons utilisé un modèle mixte linéaire (fonction *lmer*, famille d'erreur : Gaussienne, Package *lme4*). Le modèle a été ajusté en spécifiant les effets fixes : traitement (prédicteur catégorique), durée d'exposition (prédicteur continu) ; et l'effet aléatoire : ID (identité du plasmode). La variable dépendante (Indice) a été normalisée à l'aide de la fonction *bestNormalize* (Package *bestNormalize*).

4.8.5. Effet du traitement DWCNT avec des changements brutaux de température : souche AUS

<i>Prédicteurs</i>	Indice de décision				
	<i>Estimés</i>	<i>CI</i>	<i>Statistique</i>	<i>p</i>	<i>df</i>
(Intercept)	0.29	0.06 – 0.52	2.48	0.013	321.00
[CMC] vs [DWCNT]	-0.11	-0.35 – 0.14	-0.86	0.391	321.00
Condition [25°C] vs [35-25°C]	-0.41	-0.66 – -0.15	-3.15	0.002	321.00
Condition [25°C] vs [35°C]	-0.28	-0.54 – -0.03	-2.17	0.030	321.00
Effets Aléatoires					
σ^2	0.94				
$\tau_{00 \text{ ID}}$	0.02				
ICC	0.02				
N _{ID}	20				
Observations	327				
R ² Marginal/ R ² Conditionnel	0.033 / 0.051				

Tableau S60 : Statistiques associées à la Figure 39 (A).

<i>Prédicteurs</i>	Indice de performance – Substrat répulsif				
	<i>Estimés</i>	<i>CI</i>	<i>Statistique</i>	<i>p</i>	<i>df</i>
(Intercept)	0.65	0.45 – 0.85	6.36	<0.001	170.00
Condition [25°C] vs [35-25°C]	-0.05	-0.28 – 0.18	-0.41	0.685	170.00
Condition [25°C] vs [35°C]	0.01	-0.21 – 0.24	0.12	0.905	170.00
Effets Aléatoires					
σ^2	0.40				
$\tau_{00 \text{ ID}}$	0.04				
ICC	0.09				
N _{ID}	10				
Observations	175				
R ² Marginal/ R ² Conditionnel	0.002 / 0.088				

Tableau S61 : Statistiques associées à la Figure 39 (B).

Pour évaluer les différences des indices de performance selon le traitement et la condition de température, nous avons utilisé un modèle mixte linéaire (fonction *lmer*, famille d'erreur : Gaussienne, Package *lme4*). Le modèle a été ajusté en spécifiant les effets fixes : traitement, condition de température (prédicteur catégorique) ; et l'effet aléatoire : ID (identité du plasmode). La variable dépendante (Indice) a été normalisée à l'aide de la fonction *bestNormalize* (Package *bestNormalize*).

Indice de performance – Substrat attractif					
<i>Prédicteurs</i>	<i>Estimés</i>	<i>CI</i>	<i>Statistique</i>	<i>p</i>	<i>df</i>
(Intercept)	0.12	-0.17 – 0.41	0.83	0.407	168.00
Condition [25°C] vs [35-25°C]	-0.34	-0.70 – 0.01	-1.92	0.057	168.00
Condition [25°C] vs [35°C]	-0.04	-0.39 – 0.31	-0.22	0.823	168.00

Effets Aléatoires	
σ^2	0.93
τ_{00} ID_plasmod	0.06
ICC	0.06
N ID_plasmod	10

Observations	173
R ² Marginal/ R ² Conditionnel	0.023 / 0.084

Tableau S62 : Statistiques associées à la Figure 40.

Pour évaluer les différences des indices de performance selon le traitement et la condition de température, nous avons utilisé un modèle mixte linéaire (fonction lmer, famille d'erreur : Gaussienne, Package lme4). Le modèle a été ajusté en spécifiant les effets fixes : traitement, condition de température (prédicteur catégorique) ; et l'effet aléatoire : ID (identité du plasmode). La variable dépendante (Indice) a été normalisée à l'aide de la fonction bestNormalize (Package bestNormalize).

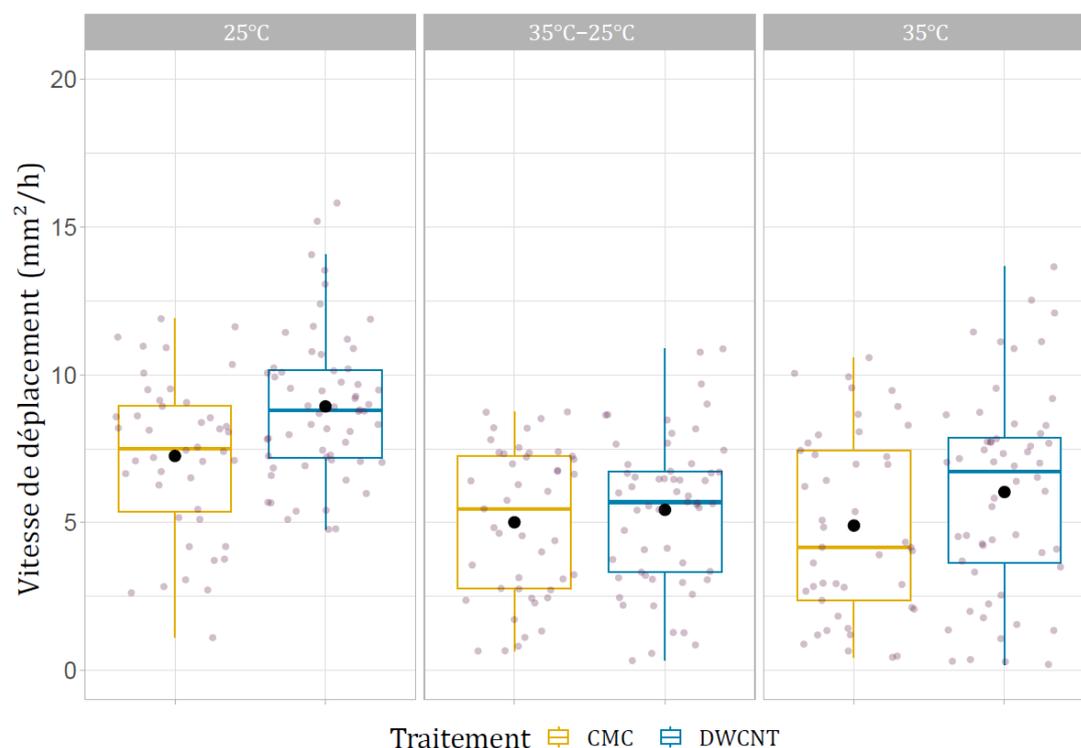


Figure S14 : Vitesse de déplacement des plasmodes sur substrat attractif selon la condition de température. 45 plasmodes CMC pour les conditions [35-25°C] et [35°C], et 44 plasmodes pour la condition [25°C] ont été testés. 57, 56 et 60 plasmodes DWCNT pour les conditions [35-25°C], [35°C] et [25°C] respectivement ont été testés.

4.8.6. Effet du traitement DWCNT avec des changements brutaux de température : souche LU

Prédicteurs	Indice de décision - Changement de T° - LU				
	Estimés	CI	Statistique	p	df
(Intercept)	-0.13	-0.36 – 0.09	-1.18	0.238	354.00
[CMC] vs [DWCNT]	-0.01	-0.26 – 0.23	-0.11	0.916	354.00
Condition [25°C] vs [35-25°C]	-0.11	-0.35 – 0.13	-0.89	0.374	354.00
Condition [25°C] vs [35°C]	0.53	0.29 – 0.77	4.33	<0.001	354.00
Effets Aléatoires					
σ^2	0.90				
τ_{00} ID_plasmod	0.03				
ICC	0.03				
N ID_plasmod	21				
Observations	360				
R ² Marginal/ R ² Conditionnel	0.078 / 0.106				

Tableau S63 : Statistiques associées à la Figure 41 (A).

Prédicteurs	Indice de performance - Changement de T° - LU				
	Estimés	CI	Statistique	p	df
(Intercept)	-0.24	-0.52 – 0.05	-1.64	0.102	175.00
Condition [25°C] vs [35-25°C]	0.18	-0.16 – 0.53	1.06	0.292	175.00
Condition [25°C] vs [35°C]	0.56	0.21 – 0.90	3.19	0.002	175.00
Effets Aléatoires					
σ^2	0.91				
τ_{00} ID_plasmod	0.05				
ICC	0.06				
N ID_plasmod	10				
Observations	180				
R ² Marginal/ R ² Conditionnel	0.053 / 0.106				

Tableau S64 : Statistiques associées à la Figure 41 (B).

Pour évaluer les différences des indices de performance selon le traitement et la condition de température, nous avons utilisé un modèle mixte linéaire (fonction *lmer*, famille d'erreur : Gaussienne, Package *lme4*). Le modèle a été ajusté en spécifiant les effets fixes : traitement, condition de température (prédicteur catégorique) ; et l'effet aléatoire : ID (identité du plasmode). La variable dépendante (Indice) a été normalisée à l'aide de la fonction *bestNormalize* (Package *bestNormalize*).

4.8.7. Effet des DWCNT selon l'âge des plasmodes

Indice de décision - LU - 2 âges					
Prédicteurs	Estimés	CI	Statistique	p	df
(Intercept)	0.15	-0.03 – 0.33	1.64	0.102	497.00
[CMC] vs [DWCNT]	-0.15	-0.41 – 0.11	-1.13	0.259	497.00
[2 mois] vs [20 mois]	-0.40	-0.66 – -0.14	-3.01	0.003	497.00
Traitement *Age	0.52	0.15 – 0.89	2.75	0.006	497.00
Effets Aléatoires					
σ^2	0.98				
τ_{00} ID_plasmod	0.01				
ICC	0.01				
N ID_plasmod	40				
Observations	503				
R ² Marginal / R ² Conditionnel	0.025 / 0.036				

Tableau S65 : Statistiques associées à la Figure 42 (A).

Pour évaluer les différences des indices de décision selon le traitement et l'âge du plasmode, nous avons utilisé un modèle mixte linéaire (fonction lmer, famille d'erreur : Gaussienne, Package lme4). Le modèle a été ajusté en spécifiant les effets fixes : traitement, âge (prédicteurs catégoriques) ; et l'effet aléatoire : ID (identité du plasmode). La variable dépendante (Indice de décision) a été normalisée à l'aide de la fonction bestNormalize (Package bestNormalize).

Indice de décision - LU - 2 âges Comparaisons 2 à 2						
Prédicteurs	Estimés	SE	df	t.ratio	p.value	
CMC [2 mois] vs DWCNT [2 mois]	0.1510	0.134	36.6	1.129	0.7988	
CMC [2 mois] vs CMC [20 mois]	0.3967	0.132	34.8	3.010	0.0290	
CMC [2 mois] vs DWCNT [20 mois]	0.0273	0.134	36.0	0.204	0.8393	
DWCNT [2 mois] vs CMC [20 mois]	0.2457	0.134	37.1	1.832	0.3002	
DWCNT [2 mois] vs DWCNT [20 mois]	-0.1237	0.136	38.2	-0.910	0.7988	
CMC [20 mois] vs DWCNT [20 mois]	-0.3694	0.134	36.4	-2.757	0.0453	

Tableau S66 : Statistiques associées à la Figure 42 (A).

Une comparaison par paires (correction de Satterthwaite, Package emmeans) des effets du traitement et de l'âge a été réalisé.

Indice de performance - LU - 2 âges					
<i>Prédicteurs</i>	<i>Estimés</i>	<i>CI</i>	<i>Statistique</i>	<i>p</i>	<i>df</i>
(Intercept)	-0.14	-0.48 – 0.20	-0.80	0.426	239.00
[2 mois] vs [20 mois]	0.19	-0.29 – 0.67	0.79	0.432	239.00
Effets Aléatoires					
σ^2	0.82				
τ_{00} ID_plasmod	0.23				
ICC	0.22				
N ID_plasmod	20				
Observations	243				
R ² Marginal / R ² Conditionnel	0.009/ 0.224				

Tableau S67 : Statistiques associées à la Figure 42 (B).

Pour évaluer les différences des indices de performance selon l'âge du plasmode, nous avons utilisé un modèle mixte linéaire (fonction *lmer*, famille d'erreur : Gaussienne, Package *lme4*). Le modèle a été ajusté en spécifiant l'effet fixe : âge (prédicteur catégorique) ; et l'effet aléatoire : ID (identité du plasmode). La variable dépendante (Indice de performance) a été normalisée à l'aide de la fonction *bestNormalize* (Package *bestNormalize*).

4.8.8. Effet des DWCNT selon l'âge des plasmodes et la température

Indice de décision - Changement de T° - LU					
<i>Prédicteurs</i>	<i>Estimés</i>	<i>CI</i>	<i>Statistique</i>	<i>p</i>	<i>df</i>
(Intercept)	0.30	0.13 – 0.46	3.53	<0.001	709.00
[CMC] vs [DWCNT]	-0.09	-0.25 – 0.06	-1.22	0.222	709.00
[25°C] vs [35-25°C]	-0.43	-0.60 – -0.25	-4.74	<0.001	709.00
[25°C] vs [35°C]	-0.35	-0.52 – -0.17	-3.88	<0.001	709.00
[2 mois] vs [20 mois]	0.02	-0.13 – 0.17	0.22	0.825	709.00
Effets Aléatoires					
σ^2	0.96				
τ_{00} ID_plasmod	0.01				
ICC	0.01				
N ID_plasmod	40				
Observations	716				
R ² Marginal / R ² Conditionnel	0.037 / 0.043				

Tableau S68 : Statistiques associées à la Figure 43.

Pour évaluer les différences des indices de décision selon le traitement, la température et l'âge du plasmode, nous avons utilisé un modèle mixte linéaire (fonction *lmer*, famille d'erreur : Gaussienne, Package *lme4*). Le modèle a été ajusté en spécifiant les effets fixes : traitement, âge, température (prédicteurs catégoriques) ; et l'effet aléatoire : ID (identité du plasmode). La variable dépendante (Indice de décision) a été normalisée à l'aide de la fonction *bestNormalize* (Package *bestNormalize*).

Indice de performance - Changement de T°- 2 âges - LU					
<i>Prédicteurs</i>	<i>Estimés</i>	<i>CI</i>	<i>Statistique</i>	<i>p</i>	<i>df</i>
(Intercept)	0.28	-0.01 – 0.57	1.92	0.056	348.00
[25°C] vs [35-25°C]	-0.11	-0.45 – 0.22	-0.67	0.503	348.00
[25°C] vs [35°C]	-0.19	-0.52 – 0.15	-1.10	0.274	348.00
[2 mois] vs [20 mois]	-0.19	-0.60 – 0.22	-0.92	0.359	348.00
Condition [35-25°C] * Age	-0.58	-1.06 – -0.10	-2.38	0.018	348.00
Condition [35°C] * Age	0.10	-0.38 – 0.58	0.41	0.681	348.00
Effets Aléatoires					
σ^2	0.87				
τ_{00} ID_plasmod	0.07				
ICC	0.07				
N ID_plasmod	20				
Observations	356				
R ² Marginal / R ² Conditionnel	0.081 / 0.147				

Tableau S69 : Statistiques associées à la Figure 44.

Pour évaluer les différences des indices de performance selon l'âge du plasmode et la température, nous avons utilisé un modèle mixte linéaire (fonction *lmer*, famille d'erreur : Gaussienne, Package *lme4*). Le modèle a été ajusté en spécifiant les effets fixes : âge, température (prédicteurs catégoriques) ; et l'effet aléatoire : ID (identité du plasmode). La variable dépendante (Indice de performance) a été normalisée à l'aide de la fonction *bestNormalize* (Package *bestNormalize*).

Indice de performance – Substrat aversif Comparaisons 2 à 2					
<i>Prédicteurs</i>	<i>Estimés</i>	<i>SE</i>	<i>df</i>	<i>t.ratio</i>	<i>p.value</i>
2 mois : [25°C] vs [35-25°C]	0.1142	0.170	332	0.671	1.0000
2 mois : [25°C] vs [35°C]	0.1864	0.170	332	1.095	0.8229
2 mois : [35-25°C] vs [35°C]	0.0722	0.170	332	0.424	1.0000
20 mois : [25°C] vs [35-25°C]	0.6929	0.173	333	3.994	0.0002
20 mois : [25°C] vs [35°C]	0.0864	0.173	333	0.498	0.6190
20 mois : [35-25°C] vs [35°C]	-0.6065	0.170	332	-3.563	0.0008

Tableau S70 : Statistiques associées à la Figure 44.

Une comparaison par paires (correction de Satterthwaite, Package *emmeans*) des effets de la température sur chacune des modalités de la variable âge a été réalisé.

Indice de performance – Substrat attractif					
<i>Prédicteurs</i>	<i>Estimés</i>	<i>CI</i>	<i>Statistique</i>	<i>p</i>	<i>df</i>
(Intercept)	0.25	-0.02 – 0.53	1.81	0.072	351.00
[35-25°C]	-0.20	-0.43 – 0.04	-1.63	0.105	351.00
[35°C]	-0.51	-0.75 – -0.28	-4.25	<0.001	351.00
[20 mois]	-0.04	-0.23 – 0.16	-0.38	0.701	351.00
Effets Aléatoires					
σ^2	0.87				
τ_{00} ID_plasmod	0.10				
ICC	0.10				
N ID_plasmod	10				
Observations	357				
R ² Marginal / R ² Conditionnel	0.045 / 0.145				

Tableau S71 : Statistiques associées à la Figure 45.

Pour évaluer les différences des indices de performance selon l'âge du plasmode et la température, nous avons utilisé un modèle mixte linéaire (fonction *lmer*, famille d'erreur : Gaussienne, Package *lme4*). Le modèle a été ajusté en spécifiant les effets fixes : âge, température (prédicteurs catégoriques) ; et l'effet aléatoire : ID (identité du plasmode). La variable dépendante (Indice de performance) a été normalisée à l'aide de la fonction *bestNormalize* (Package *bestNormalize*).

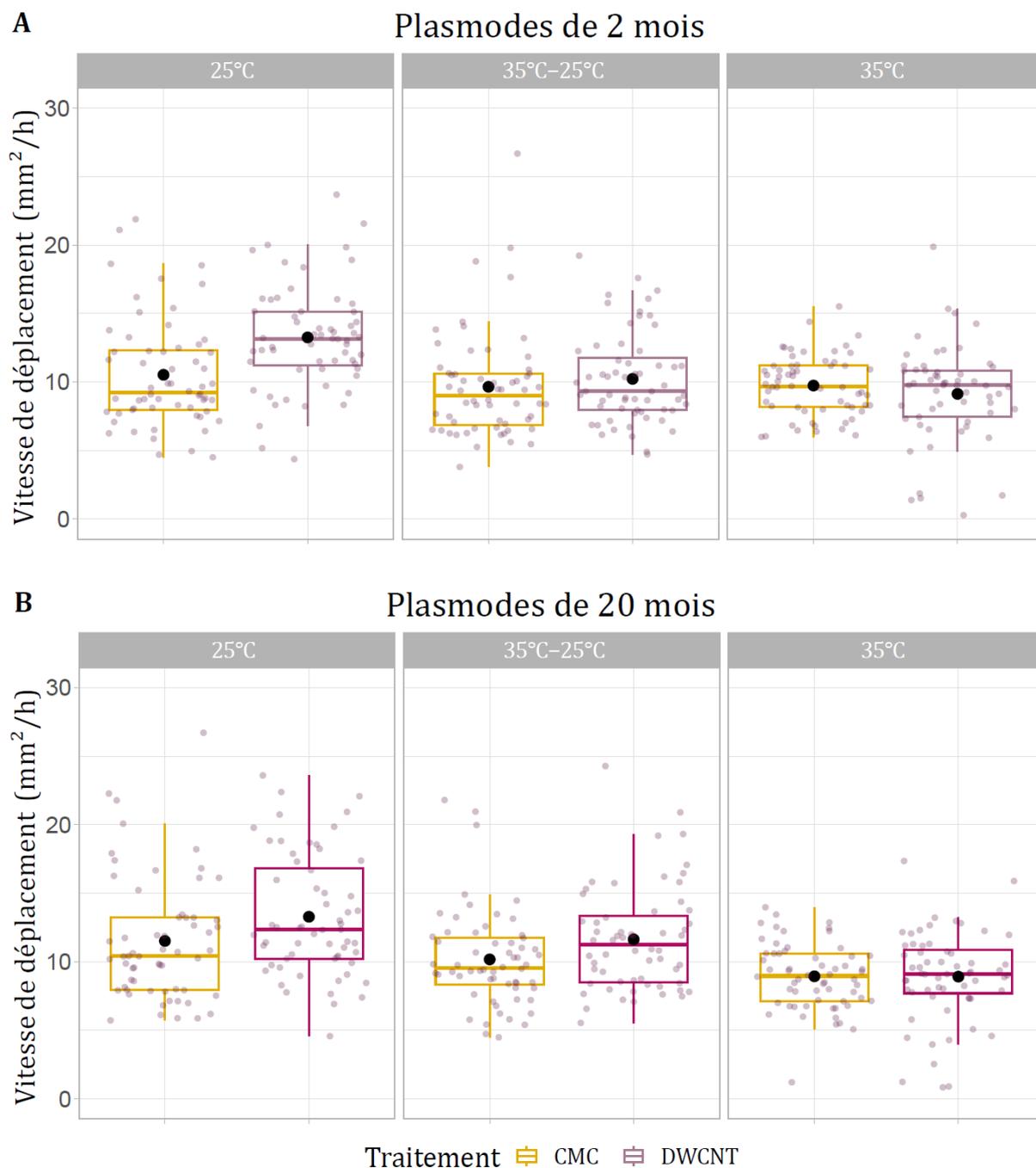


Figure S15 : Vitesse de déplacement des plasmodes jeunes (A), ou âgés (B), sur substrat attractif selon la condition de température.

57 plasmodes DWCNT (jeunes, conditions [35°C]) ont été testés ; 60 plasmodes par traitement, par âge et par condition de températures ont été testés pour le reste.

Jusqu'à présent nous avons observé une variabilité de l'effet des DWCNT sur la vitesse de déplacement et la prise de décision de *P. polycephalum*. Les deux explications potentielles sont une action mécanique, ou un stress intracellulaire. Pour vérifier ces hypothèses, nous avons dans un premier temps, mesuré l'effet des DWCNT sur la période de contraction des veines des plasmodes. Puis, dans un second temps, nous avons évalué le stress oxydant au sein de la cellule de *P. polycephalum*.

5.1. Partie I : Analyse de la période de contraction des veines

5.1.1. Introduction

Le réseau veineux de *P. polycephalum* est essentiel aussi bien pour la mobilité de la cellule que pour la circulation intracellulaire des nutriments, de l'oxygène, et autres composés chimiques (Aldrich, 2012; Oettmeier, 2019). La contraction des veines est ce qui donne le rythme au plasmode (vitesse de déplacement, orientation par rapport aux stimuli, etc.). Cette alternance de contraction-relaxation est régulée par des phénomènes oscillatoires impliquant des substances chimiques intracellulaires tels que le calcium (Ca^{2+}), l'ATP, l'AMPc, les ions H^+ , et l'actine (Boussard et al., 2021).

Le Ca^{2+} chez *P. polycephalum* joue un rôle d'inhibiteur des fibres de myosine. A l'inverse des cellules musculaires animales, une concentration élevée en Ca^{2+} permet la relaxation des veines et une concentration faible permet la contraction (Kohama, 2016). C'est l'oscillation entre ces concentrations faibles et élevée qui permet d'avoir un rythme de contraction et le mouvement du flux cytoplasmique. En présence de stimuli cette oscillation de $[\text{Ca}^{2+}]$ est modifiée, une substance attractive augmente la fréquence des oscillations et une substance aversive la réduit (Boussard et al., 2021). La quantité d'AMPc oscille de la même manière mais avec un léger décalage, donc il y a un pic d'AMPc suivi de près par un pic de Ca^{2+} et la relaxation de la veine (T. Ueda et al., 1986). A la fin de la relaxation c'est la quantité d'ATP et d'ions H^+ qui augmente, ce qui procure de l'énergie aux filaments d'actine et de myosine pour la contraction (Boussard et al., 2021; T. Ueda et al., 1986). L'ensemble de ces oscillations crée une boucle de contrôle par rétroaction et génère une alternance de contraction-relaxation permettant ensuite de calculer des périodes de contraction liées à la vitesse de déplacement des plasmodes.

La période de contraction-relaxation est comprise selon les études entre 1 et 3 minutes (Wohlfarth-Bottermann, 1979), 3 et 5 minutes (Ishigami et al., 1987), 2,5 et 3 minutes (Yoshiyama et al., 2010). L'agencement des filaments d'actine et de myosine se modifie, selon le moment de l'oscillation, et permet la formation d'un réseau organisé en 3 dimensions avec la présence de nœud à l'intersection de chaque veine (Ishigami et al., 1987). Grâce au marquage des filaments par une sonde Phalloïdine-rhodamine, les fibres sont bien visibles au moment de la contraction, ce qui implique une structure organisée, et disparaissent presque complètement pendant la relaxation (Ishigami et al., 1987).

Ayant observé des effets des DWCNT sur la vitesse de déplacement des plasmodes, nous nous sommes intéressés aux périodes de contraction. C'est un paramètre qui a déjà été observé après

une exposition des plasmodes à des métaux lourds (cadmium, plomb, mercure), et dans tous les cas la durée de la période était augmentée en engendrant un ralentissement de la vitesse de déplacement ainsi que de la vitesse de croissance des plasmodes (Maraqa et al., 2015; Shraideh, 2006, 2007, 2010). Elle a également été observée à la suite d'une exposition aux NTC (SWCNT) avec les mêmes conclusions. Après une exposition unique aux SWCNT, la période d'oscillation des plasmodes était augmentée (Gizzie, Mayne, & Adamatzky, 2016). Nous nous attendons à ce que nos plasmodes exposés aux DWCNT aient également une période d'oscillation de contraction qui soit augmentée.

5.1.2. Méthode et résultats

5.1.2.1. Protocole

Souche(s) : AUS

Concentration(s) d'exposition : 100 µg/g

Durée(s) d'exposition : 3 jours

Type(s) d'expérience : Arène

Paramètre(s) mesuré(s) : Période de contraction des veines

Note supplémentaire : Cette expérience a été réalisée au sein de l'Institut für Biologie de Graz.

Les plasmodes ont été exposés pendant 3 jours. Quatre nanomatériaux ont été testés : les DWCNT (n=6), les MWCNT (n=3), le FLG (graphène à faible nombre de couches) (n=3), GO (oxyde de graphène) (n=6). Le traitement contrôle est la CMC pour tous les nanomatériaux. Seuls les résultats concernant les DWCNT sont présentés ici puisque les autres images n'ont pas pu être analysées dans les délais.

Chaque plasmode (Ø 15 mm) est déposé au bord d'une boîte de Petri (Ø 94 mm) (**Figure 46**) contenant quelques millilitres de gel agar 1,2% représentant une épaisseur d'environ 3mm. Les plasmodes sont ensuite placés dans un placard, à l'obscurité, à environ 21°C (qui est également la température de maintien des élevages à l'institut de Graz). Les plasmodes grandissent dans l'arène pendant au minimum 17h, et au maximum 23h. Les temps de migration diffèrent car nous avons besoin que les plasmodes aient exploré suffisamment l'arène pour capturer le réseau le plus large possible.

Les images ont été prises à l'aide d'une caméra (The Imaging Source DFK 38UX541) permettant de couvrir une surface de 4x4 cm. Une photo a été prise toutes les 4 secondes pendant 1h. L'acquisition a eu lieu dans le noir avec un éclairage par des LED vertes uniquement au moment de la prise de photo (des tests préalables ont montré que c'est la lumière verte qui dérange le moins les plasmodes (T. Ueda et al., 1988)). Les images obtenues ont ensuite été analysées par un algorithme développé par Philipp Rosina, doctorant au sein de l'Institut für Biologie (Graz) (sous la supervision de Martin Grube).

L'algorithme repère les veines sur les images, sélectionne des positions (numérotées en bleu sur la **Figure 47**) dont il mesure le diamètre au cours du temps (une valeur toute les 4 secondes pendant 1 heure). Nous avons commencé par sélectionner les positions à conserver pour le calcul des périodes de contraction en éliminant : les positions situées aux endroits de l'image où la qualité était mauvaise, la plupart du temps cela concerne les points sur les bords des images (**Figure 47** (B)), les positions placées sur des nœuds, les positions où la veine était peu visible ou en train de disparaître (par exemple la position 941, **Figure 47** (A)). Nous avons ensuite attribué un numéro de veine aux positions situées sur les mêmes portions de veines, c'est-à-dire entre deux nœuds (par exemple les positions 907, 911, 925 et 939 appartiennent à la même portion de veine, **Figure 47** (A)).

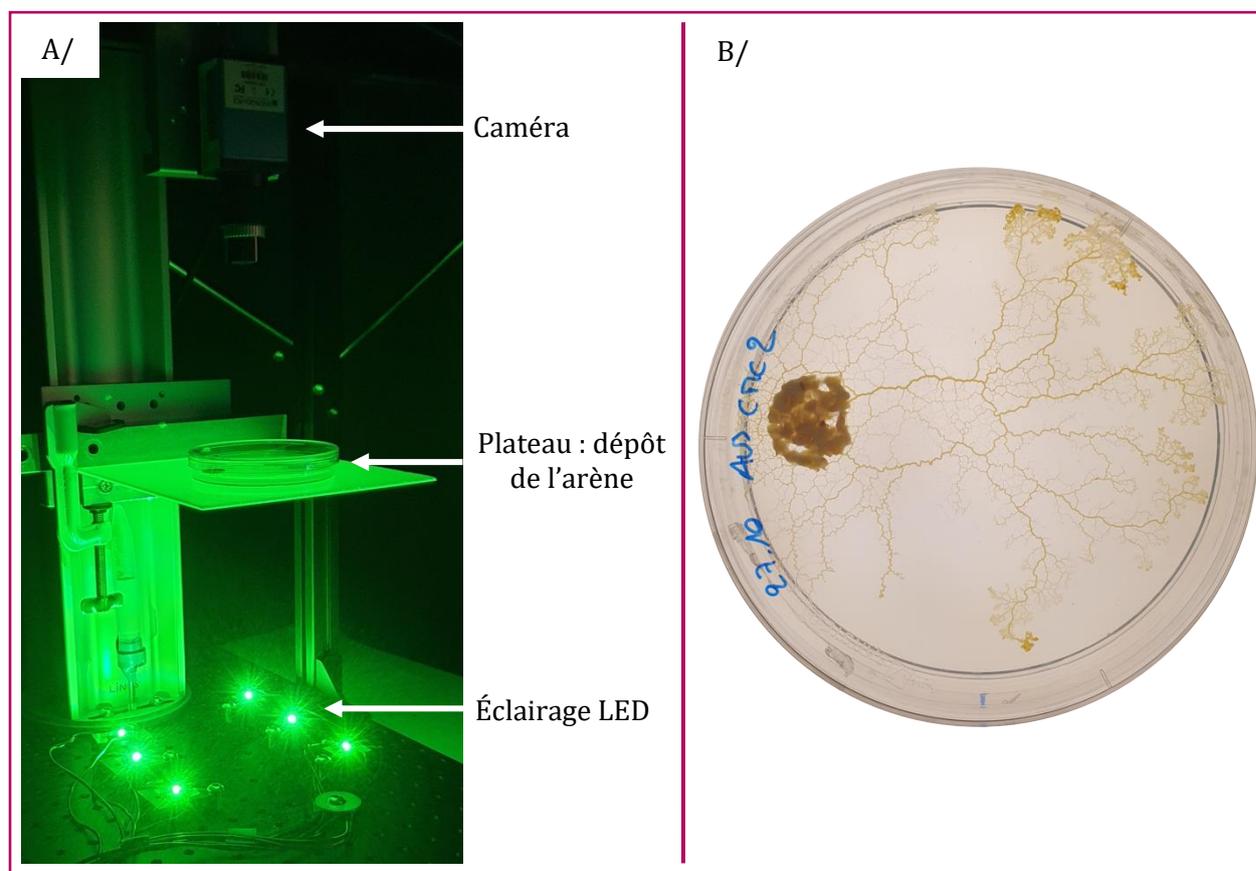


Figure 46 : Installation permettant la prise de photo automatisée avec l'éclairage LED (A) et croissance d'un plasmode en arène (B).

A partir des données nettoyées, les périodes de contraction ont été calculées à l'aide d'un code développé sur Rstudio par Mathieu Moreau (CRCA-CBI, Toulouse). Certaines périodes calculées ont des valeurs très élevées, probablement en raison d'une mauvaise détection du diamètre des veines par l'algorithme. Les périodes d'oscillations / périodes de contractions documentées sont comprises entre 1 et 5 minutes (soit 60 et 300 secondes) (Ishigami et al., 1987; Wohlfarth-Bottermann, 1979; Yoshiyama et al., 2010), nous avons donc décidé de prendre en compte les périodes de contractions jusqu'à un maximum de 350 secondes.

Pour évaluer la différence des périodes de contraction selon le traitement et le diamètre des veines, nous avons utilisé un modèle mixte linéaire (fonction lmer, famille d'erreur : Gaussienne, Package lme4). Le modèle a été ajusté en spécifiant les effets fixes : traitement (prédicteur catégorique) et diamètre (prédicteur continu) ; et l'effet aléatoire : ID (identité du plasmode). La variable dépendante a été normalisée à l'aide de la fonction bestNormalize (Package bestNormalize).

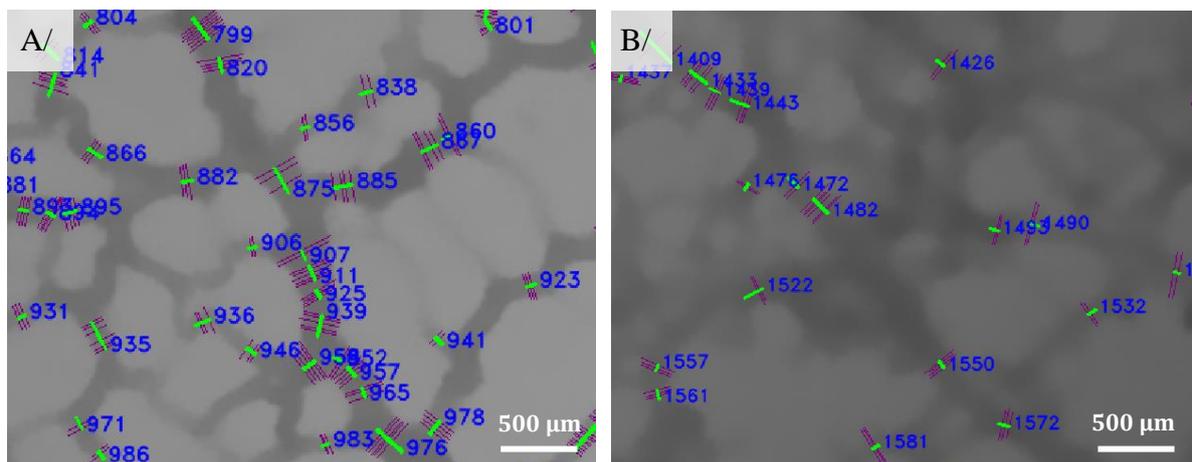


Figure 47 : Positions définies par l'algorithme. Cas d'une portion d'image nette (A), et une floue (B).

5.1.2.2. Résultats

La période de contraction des veines est différente selon leur diamètre moyen ($p = 0,001$, **Tableau S72**). De plus, il y a un effet de l'interaction du traitement avec le diamètre des veines sur la période de contraction ($p = 0,016$, **Tableau S72**). Ce qui veut dire que selon le diamètre, le traitement influe différemment la période de contraction.

Pour visualiser l'effet du traitement DWCNT sur la période de contraction, indépendamment de l'effet du diamètre moyen des veines, nous avons réparti les diamètres par gammes de taille en vérifiant à chaque fois que le diamètre n'avait aucun effet sur la période de contraction. Elles sont réparties de la manière suivante : les plus petites veines inférieures à $200 \mu\text{m}$ (29,9% des veines), les moyennes comprises entre 200 et $299 \mu\text{m}$ (43,6% des veines), les larges compris entre 300 et $399 \mu\text{m}$ (20,4% des veines), et les très larges supérieures à $400 \mu\text{m}$ (6,1% des veines).

Le traitement DWCNT n'a aucun effet sur les veines dont le diamètre moyen est $< 200 \mu\text{m}$ ($p = 0,427$, **Tableau S73**, **Figure 48** (A)). En revanche, nous avons un effet du traitement DWCNT pour les veines ayant une taille comprise entre 200 et $299 \mu\text{m}$ ($p < 0,001$, **Tableau S74**, **Figure 48** (B)), celles comprises entre 300 et $399 \mu\text{m}$ ($p = 0,001$, **Tableau S75**, **Figure 48** (C)), et celles supérieures à $400 \mu\text{m}$ ($p = 0,047$, **Tableau S76**, **Figure 48** (D)). Le traitement induit une baisse de la période de contraction des veines, sauf pour les plus petites ($< 200 \mu\text{m}$), ce qui implique un rythme de contraction plus rapide.

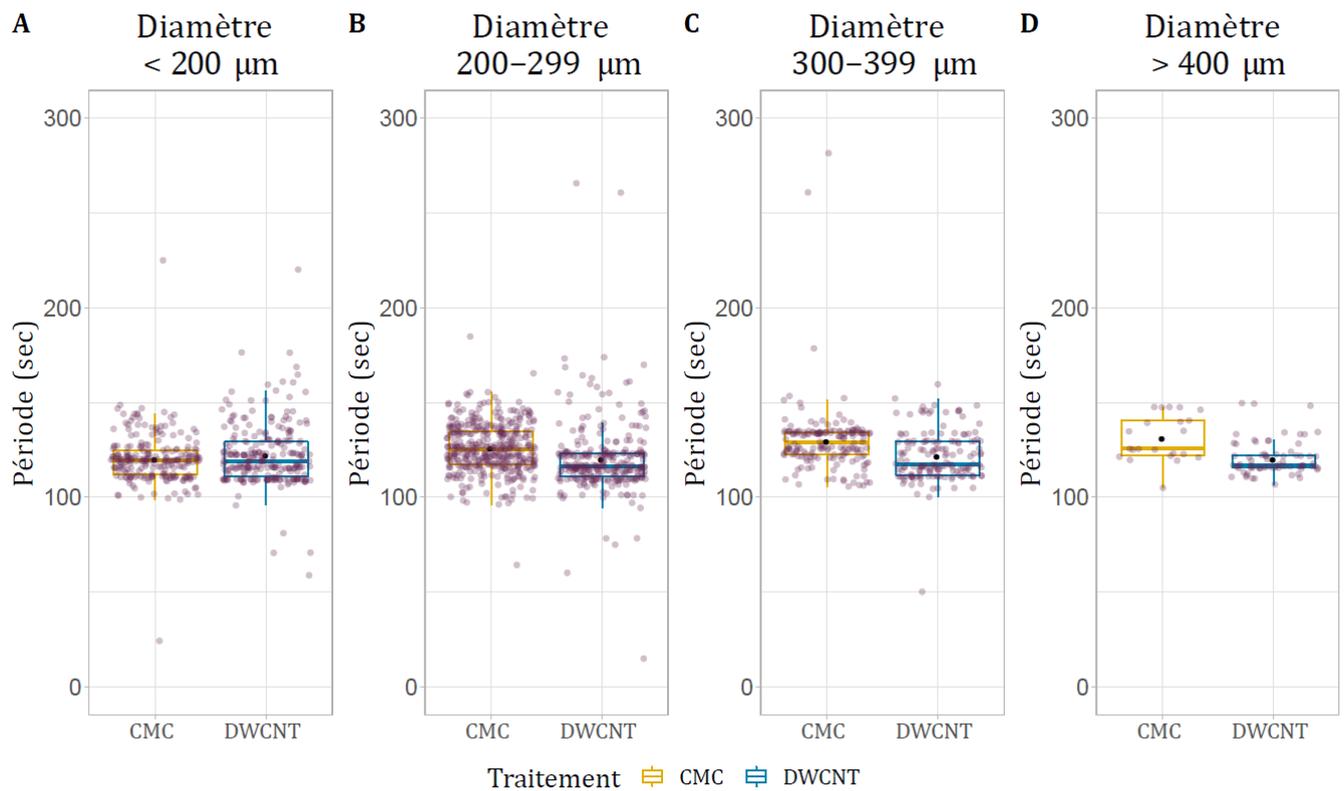


Figure 48 : Période de contraction des veines selon le traitement pour des diamètres moyens < 200 μm (A), compris entre 200 et 299 μm (B), compris entre 300 et 399 μm (C), ou > 400 μm (D).

6 plasmodes par traitement ont été testés, pour un total de 233 positions CMC et 246 positions DWCNT (A) ; 408 positions CMC et 290 positions DWCNT (B) ; 172 positions CMC et 155 positions DWCNT (C) ; 22 positions CMC et 75 positions DWCNT (D).

5.1.3. Discussion

Contrairement à ce à quoi nous nous attendions, la période de contraction est réduite pour les plasmodes exposés aux DWCNT par rapport aux plasmodes CMC. Si la période est réduite cela est probablement accompagné d'une accélération de la vitesse de déplacement. L'idéal aurait été de contrôler en parallèle de cette expérience la vitesse de déplacement des plasmodes. Jusqu'à présent nous avons observé une variabilité de l'effet des DWCNT sur la vitesse de déplacement (ralentissement, accélération), il est donc possible que l'effet observé ici (baisse de la période de contraction) ne le soit pas toujours en réponse aux DWCNT.

Cette expérience a été réalisée après 3 jours d'exposition, sur la souche AUS. Jusqu'à présent nous avons exposé cette souche plus longtemps (minimum 7 jours), et la seule autre expérience réalisée après 3 jours d'exposition a montré que les plasmodes avaient une vitesse de déplacement accélérée (§ 3.2.2). Il est donc possible qu'une accélération soit engendrée par les DWCNT lors des 3 premiers jours de l'exposition, c'est-à-dire juste après que les premiers agglomérats de DWCNT ont été excrétés (entre 24 et 48h, § 2.3.4.4).

Gizzie, Mayne, & Adamatzky (2016) avaient montré une augmentation de la période d'oscillation des plasmodes après une exposition unique aux SWCNT. Trop de paramètres sont différents (type de NTC, durée d'exposition, etc.) pour pouvoir comparer nos résultats aux leurs.

Les oscillateurs (Ca^{2+} , ATP, AMPc, ions H^+ , actine) sont interconnectés, ils doivent être synchronisés pour assurer un déplacement normal de la cellule (Boussard et al., 2021). Si les DWCNT agissent sur les filaments d'actine alors une désynchronisation peut avoir lieu et conduire à une perturbation du déplacement. Pour pouvoir vérifier cette idée il faudrait imager les FA et voir si l'alternance de leur organisation – désorganisation concorde avec le rythme de contraction des veines et avec les oscillations des concentrations des autres composés. Le marquage des filaments d'actine chez *P. polycephalum* a déjà été réalisé à l'aide de la sonde phalloïdine-rhodamine (Ishigami et al., 1987; Oettmeier et al., 2018).

5.2. Partie II : Analyse du stress oxydant

5.2.1. Introduction

L'ATP est principalement généré par phosphorylation oxydative (phosphorylation de l'ADP en ATP) dans les mitochondries grâce en partie à la conversion de l'oxygène en espèces réactives de l'oxygène (ROS) dont la génération correspond à environ 2% de l'oxygène consommé (Inoue et al., 2003). Ces ROS sont nécessaires pour la vie aérobie des cellules mais, étant très réactives, elles causent des dommages aux composants cellulaires (ADN, protéines, lipides, *etc.*) si elles sont présentes en trop grande quantité. Cette production est contrebalancée par les systèmes antioxydants de la cellule (enzymes antioxydantes telles que la catalase ou la glutathion peroxydase) (Sies, 1991). Ce déséquilibre, appelé stress oxydant, est associé à de nombreuses maladies (cardiométaboliques, neurodégénératives, cancéreuses, psychosociales) (Münzel & Daiber, 2018) ainsi qu'en réponse à l'exposition à divers polluants. Le stress oxydant est souvent présent lors d'une réponse au stress, et est incontournable à étudier quand on souhaite évaluer la toxicité de nanoparticules.

Les SWCNT et MWCNT sont connus pour induire du stress oxydant sur le nématode *C. elegans* (Eom et al., 2015), sur les rongeurs (Sager et al., 2022; Shvedova et al., 2008; Wils, Jacobsen, Vogel, et al., 2021), et sur des cellules épithéliales pulmonaires de souris ou alvéolaires humaines (Pulskamp, Wörle-Knirsch, et al., 2007; Wils, Jacobsen, Di Ianni, et al., 2021) (liste non exhaustive). Qu'en est-il des DWCNT ? Il a été montré que les DWCNT abaissent la production de ROS dans des poumons de souris après 24h et 48h d'exposition (Crouzier et al., 2010) ; qu'ils n'induisent aucun changement de la production de ROS sur des monocytes humains après 18h (Meunier et al., 2012) ; et qu'ils augmentent la production de ROS chez 2 espèces de bactéries et 1 espèce de levure après 5h d'exposition (Olivi et al., 2013). Ces études, bien que toutes réalisées sur les mêmes DWCNT que ceux utilisés lors de cette thèse, mettent en œuvre des modèles très différents les uns des autres (**Tableau S91**), et il est donc au final difficile de dire si les DWCNT induisent ou non du stress oxydant de manière systématique.

De la même manière, est-ce qu'observer le stress oxydant chez *P. polycephalum* est pertinent ? Il s'avère qu'en vieillissant, la présence des ROS au sein des plasmodes augmente (données non publiées). De plus, le processus de sclérotisation des plasmodes, qui a lieu quand les conditions environnementales sont défavorables, est associé à un changement d'activité des enzymes antioxydantes (Allen et al., 1985). L'activité de la SOD (superoxyde dismutase) augmente, celle de la GSH est basse, et aucune activité de la catalase n'a été détectée, cela engendre une augmentation de la quantité de peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) dans la cellule (Allen et al., 1985). Donc le stress oxydant est impliqué dans le passage du stade plasmode vers le stade sclérote chez *P. polycephalum*. Pour finir, l'induction d'un stress oxydant en réponse à une nanoparticule ($nTiO_2$) chez *P. polycephalum* a été montré à la suite d'une exposition de quelques jours (Zhi Zhang et al., 2018, 2021).

Le fait que les NTC soient susceptibles d'induire du stress oxydant, et que *P. polycephalum* puisse répondre au stress (environnemental, vieillissement, NPs) par la production de ROS, nous a

amené à observer ce paramètre en particulier. Nous nous attendons à ce que le traitement DWCNT induise du stress oxydant chez les plasmodes.

5.2.2. Méthode et Résultats

5.2.2.1. Protocole

Souche(s) : AUS et LU
Concentration(s) d'exposition : 100 µg/g
Durée(s) d'exposition : 1 ou 2 semaines
Type(s) d'expérience : Marquage à la sonde MitoSOX™ et au DAPI, Imagerie confocale
Paramètre(s) mesuré(s) : Nombre de noyaux, Aire des noyaux, Circularité des noyaux, Intensité du signal MitoSOX™

Marquage des plasmodes

Pour préparer la sonde Mitosox, nous avons dissous les 50 µg de la fiole de départ (MitoSOX™ Red mitochondrial superoxide indicator, référence M36008 de Thermo Fischer Scientific) dans 13 µL de DMSO (diméthylsulfoxyde) pour obtenir une concentration de 5mM. Puis nous en prélevons 5 µL dilués dans 1 mL d'eau osmosée pour obtenir une concentration de 25µM. La solution est stockée à -20°C. En parallèle, nous avons préparé la solution contenant le fluorochrome DAPI : 0,1% de DAPI (concentration finale de 1ng/µL), 11,6% de PFA 32%, 88,3% de PBS 1%.

La veille du marquage, les plasmodes ont été déposés dans des boîtes de Petri (Ø 94 mm), contenant 30 mL de gel agar 1%, pour qu'ils se développent pendant une nuit (~15h). Ensuite, pour chaque plasmode, un petit morceau de front de croissance a été prélevé pour être déposé dans un puits contenant 1mL de gel agar à 2% (plaques 12 puits). Nous les laissons cicatriser et se développer pendant 1 à 2 heures (**Figure 49**), le temps d'attente étant adapté en fonction de la vitesse à laquelle les plasmodes se développent dans le puits.

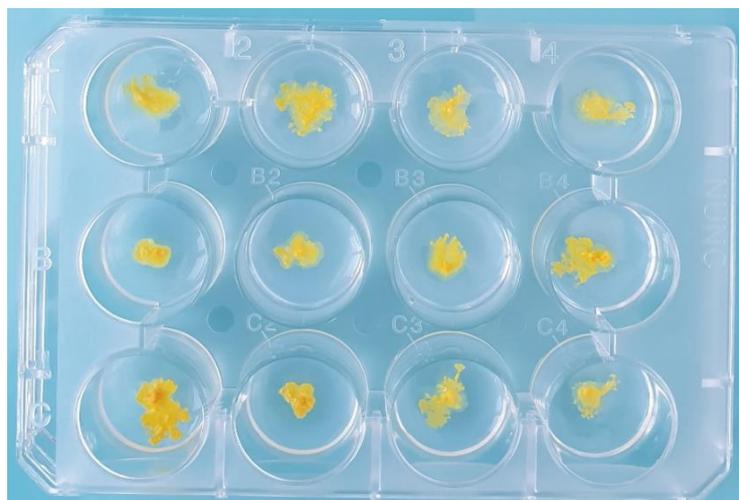


Figure 49 : Plasmodes se développant dans les puits avant le dépôt de la sonde Mitosox (plaque 12 puits).

Pour appliquer la sonde Mitosox aux plasmodes nous avons déposé 80 μL de la sonde à 25 μM dans chaque puits, ce qui recouvre les plasmodes, qui sont ensuite incubés en étuve (23°C, ~70% humidité, obscurité). Après 4h, nous avons fixé les plasmodes en ajoutant 500 μL de solution contenant du PFA (paraformaldéhyde) et le DAPI. Au bout de 10 min, nous avons vidé les puits et effectué deux rinçages (ajout puis retrait de 1 mL de PBS 1% réalisé deux fois). Dans chaque puits nous avons prélevé un morceau du front de plasmode (~ 2mm² pour la session 1, 6 mm² pour les sessions 2 et 3) , que nous avons déposé sur une lame avec 5,5 μL de milieu de montage Vectashield® (référence H-1000, Vector Laboratories, Inc.), le tout a ensuite été recouvert d'une microlame. Les lames peuvent ainsi être conservées pendant une semaine à 4°C.

Nous avons réalisé 3 sessions d'expériences, chacune comportant une période d'exposition, un marquage des plasmodes avec la sonde Mitosox et le DAPI, et un passage au microscope confocal. Pour plus de détails sur chaque session voir la **Figure 50**.

Nous avons réalisé une première session, après une semaine d'exposition, avec les souches AUS (2 plasmodes par traitement) et LU (2 plasmodes par traitement). Puis nous avons réalisé les sessions 2 et 3, après deux semaines d'exposition, avec de nouveaux plasmodes LU. Les créneaux au microscope confocal étant espacés dans le temps, nous avons adapté les expositions pour que chaque plasmode ait été exposé pendant 2 semaines avant les marquages Mitosox et DAPI. Pour les sessions 2 et 3 nous avons décidé d'ajouter un groupe de plasmodes traités à l'eau car nous ignorions si la CMC pouvait engendrer du stress oxydant chez *P. polycephalum* (7 plasmodes CMC, 7 plasmodes Eau, 9 plasmodes DWCNT). Nous avons privilégié l'imagerie confocale de la souche LU car cette souche est actuellement utilisée au laboratoire pour la quantification du stress oxydant en réponse au vieillissement. Par manque de temps nous n'avons pas réalisé de nouvelles sessions pour la souche AUS.

Acquisition d'image

Les images ont été acquises par Stéphanie Bosch (plateforme LITC, CBI) à l'aide d'un microscope confocal Leica SP8 inversé en utilisant un objectif X63 à huile. Durant l'acquisition nous avons obtenu le signal Mitosox sur un premier canal (émission dans le rouge – excitation à 405 nm) et le signal DAPI sur un second canal (émission dans le bleu – excitation à 552 nm) (**Figure 51**). Pour chaque plasmode, entre 6 et 9 zones ont été acquises selon la taille de l'échantillon. Le choix des zones a été réalisé à l'aide du canal DAPI afin d'acquérir des zones avec un nombre suffisant de noyaux, avec la possibilité de les individualiser, et avec le moins d'espaces noirs possibles. Le canal Mitosox n'était visualisé qu'après acquisition.

Traitement d'images

Le traitement d'image et la quantification du signal Mitosox a été réalisé par Hermès Desgrez-Dautet (CRCA-CBI) grâce à une macro ImageJ améliorée à partir d'une précédente macro développée par Christian Rouvière (Service Image Processing – CBI).

Tout d'abord le nombre de noyaux a été extrait à l'aide de l'outil StarDist qui permet la détection d'objets (Schmidt et al., 2018; Weigert & Schmidt, 2022). Puis, après traitement des images par la

macro ImageJ, les paramètres suivants ont été extraits : nombre de noyaux (sur 1000 μm^3), aire des noyaux (en μm^2), circularité des noyaux, intensité de signal Mitosox.

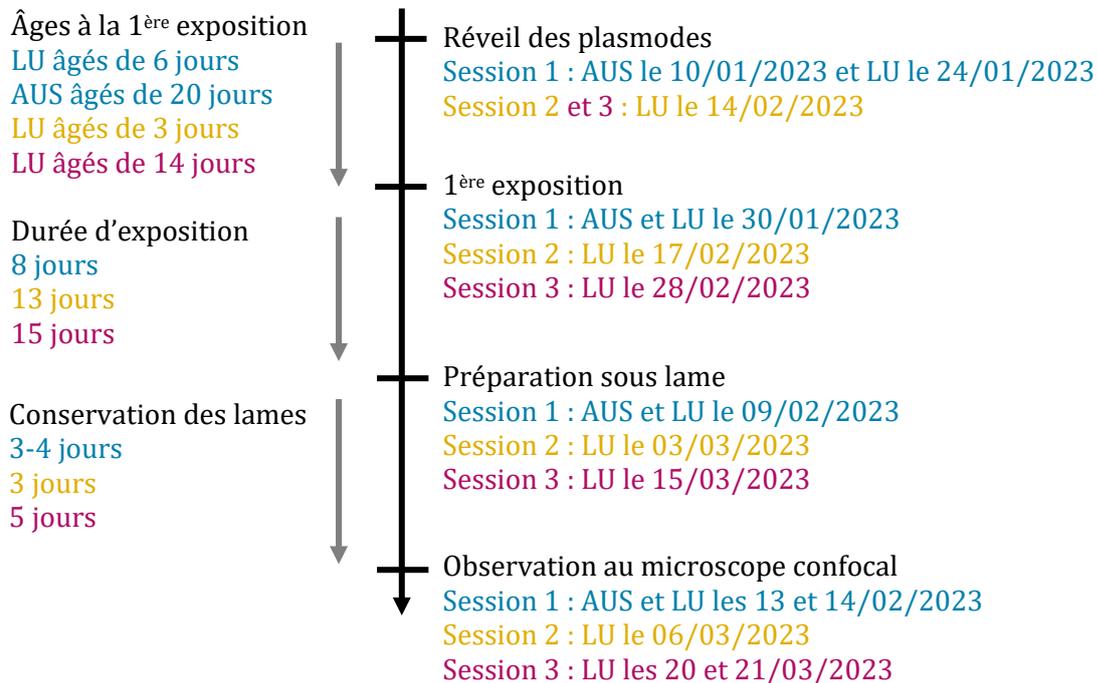


Figure 50 : Description de la réalisation des 3 sessions d'expérience, et décrivant pour chaque session la souche et l'âge du plasmode, la durée d'exposition, la durée de stockage des lames avant le passage au microscope.

Analyses statistiques

Pour la 1^{ère} session, nous avons comparé le nombre, l'aire et la circularité des noyaux, et l'intensité du signal Mitosox après 1 semaine d'exposition aux traitements CMC ou DWCNT. Nous ne comparons pas les souches entre elles car elles n'ont pas le même âge et cela peut influencer sur la quantité de stress oxydant détecté (données non publiées). Pour les 2^e et 3^e sessions, nous comparons le nombre, l'aire et la circularité des noyaux, et l'intensité du signal Mitosox après 2 semaines d'exposition aux traitements CMC, Eau ou DWCNT.

5.2.2.2. Résultats

Le nombre de noyaux est représenté en effectif par μm^3 ce qui veut dire dans un cube de $10 \times 10 \times 10 \mu\text{m}$. La circularité des noyaux est calculée par le rapport du plus petit diamètre sur le plus grand diamètre.

Le traitement n'a pas d'influence sur le nombre de noyaux ($p = 0,842$ et $p = 0,478$ pour les souches AUS et LU respectivement, **Figure 52 (A), Tableau S77**), l'aire des noyaux ($p = 0,351$ et $p = 0,501$ pour les souches AUS et LU respectivement, **Figure 52 (B), Tableau S78**), et leur circularité ($p = 0,724$ et $p = 0,806$ pour les souches AUS et LU respectivement, **Figure 52 (C), Tableau S79**). Les noyaux des plasmodes DWCNT ont des morphologies similaires aux plasmodes CMC pour chaque souche respective après 1 semaine d'exposition.

Concernant le signal Mitosox, il n'y a pas de différence entre les traitements pour la souche LU ($p = 0,838$). En revanche, il y a une quantité de signal un peu plus élevée pour les plasmodes CMC de la souche AUS par rapport aux DWCNT ($p = 0,030$, **Figure 52 (D)**, **Tableau S80**). Le traitement CMC semble induire un stress oxydant sur la souche AUS, mais nous avons peu de répliques, il serait nécessaire de l'augmenter, et de tester plus de plasmodes, pour valider cette observation.

En dehors de l'effet du traitement, nous observons que la souche LU possède un nombre plus élevé de noyaux, et des aires qui sont inférieures. Il est normal que les aires soient plus petite car le plasmode de la souche LU est haploïde (Benard et al., 1992), contrairement à la souche AUS dont le plasmode est diploïde, donc la quantité d'ADN dans les noyaux de la souche LU est plus faible, et par conséquent la taille des noyaux aussi.

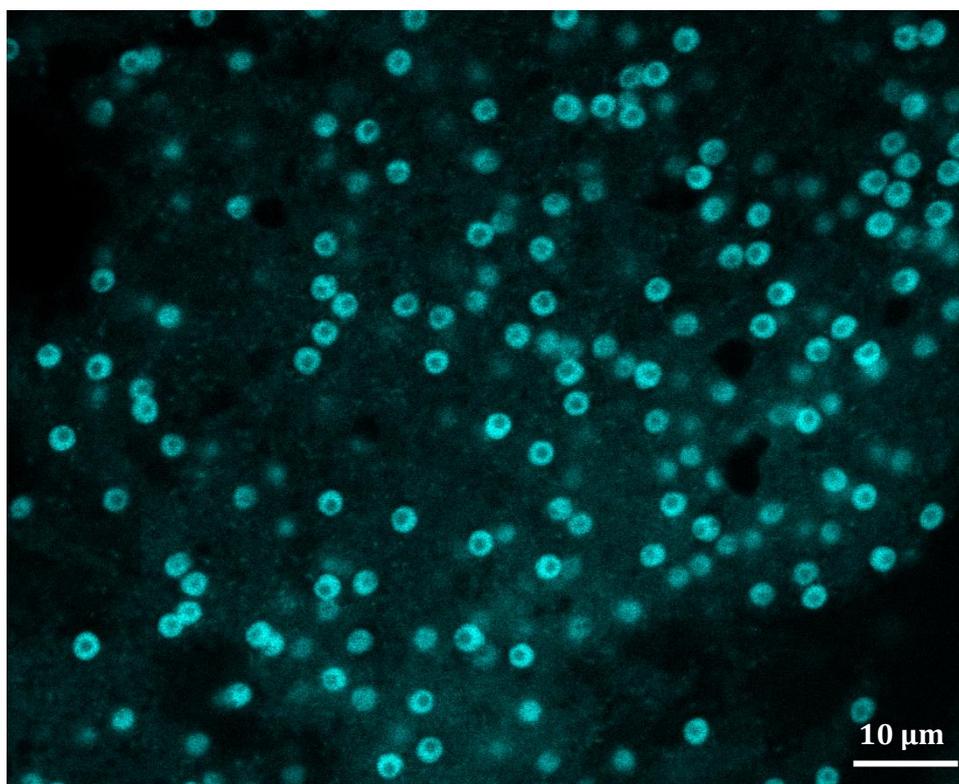


Figure 51 : Noyaux de P. polycephalum visibles par marquage DAPI au microscope confocal.

Le nombre et l'aire des noyaux est similaire entre les plasmodes des différents traitements même si, graphiquement, les plasmodes CMC ont tendance à posséder moins de noyaux ($p = 0,233$ ([CMC] vs [Eau]) et $p = 0,144$ ([CMC] vs [DWCNT]), **Figure 53 (A)**, **Tableau S81**), et d'une aire plus grande que les plasmodes Eau et DWCNT ($p = 0,387$ ([CMC] vs [Eau]) et $p = 0,293$ ([CMC] vs [DWCNT]), **Figure 53 (B)**, **Tableau S82**). La circularité des noyaux est similaire entre les traitements ($p = 0,416$ ([CMC] vs [Eau],) et $p = 0,651$ ([CMC] vs [DWCNT]), **Figure 53 (C)**, **Tableau S83**). Il n'y a donc pas de déformation morphologique des noyaux des plasmodes CMC ou DWCNT. Pour finir, le traitement n'influe pas sur l'intensité du signal Mitosox ($p = 0,686$ ([CMC] vs [Eau]) et $p = 0,479$ ([CMC] vs [DWCNT]), **Figure 53 (D)**, **Tableau S84**). Graphiquement nous observons que l'intensité du signal des plasmodes CMC est un peu plus élevée que celui des plasmodes Eau et

DWCNT. La CMC semble induire une tendance à l'augmentation du stress oxydant, des réplicas supplémentaires seraient nécessaires pour valider cette observation.

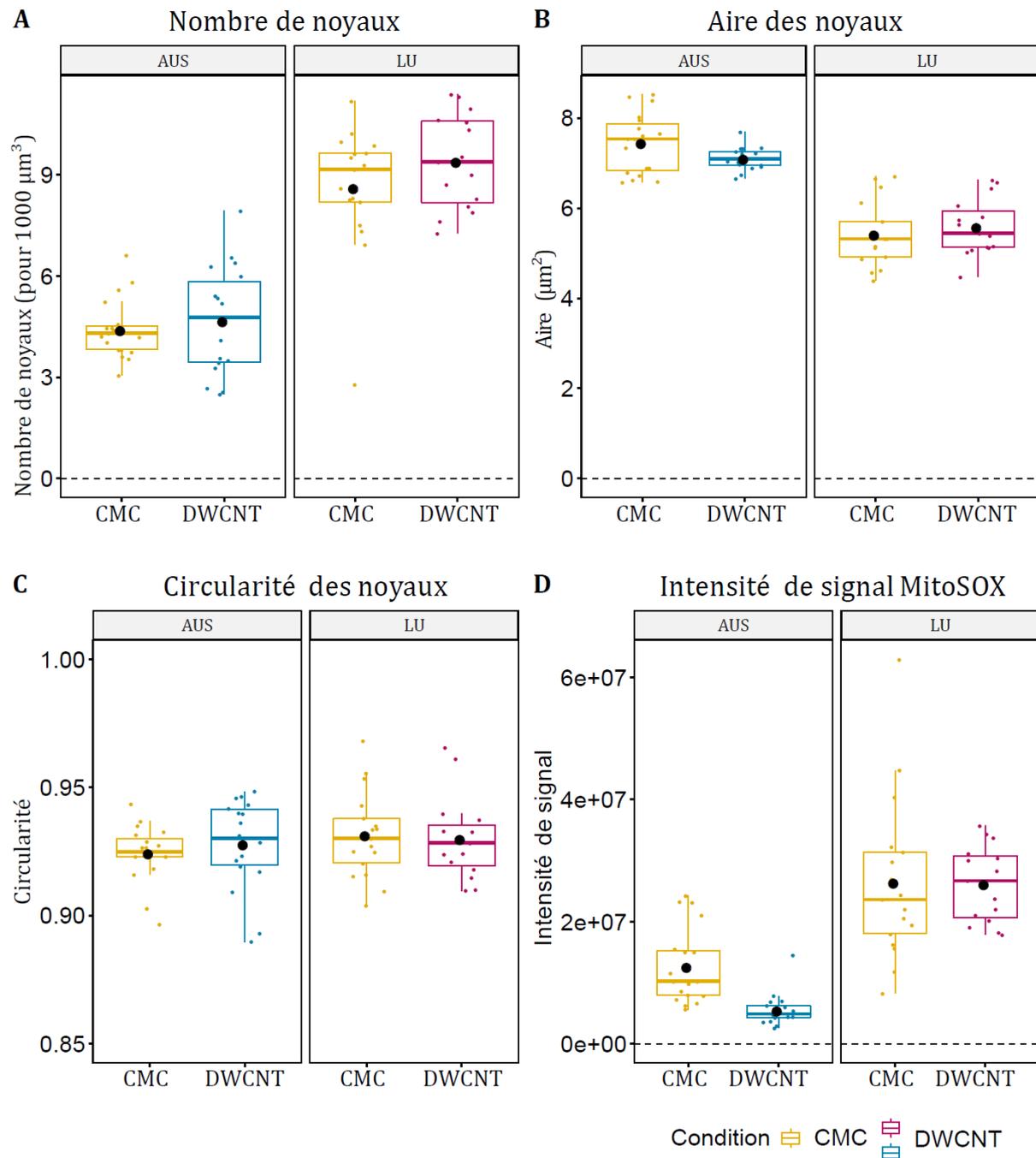


Figure 52 : Nombre de noyaux détectés (A), Aire (B) et Circularité des noyaux (C), intensité de signal Mitosox (D) selon le traitement (CMC ou DWCNT) et la souche (AUS ou LU).

2 plasmodes par traitement et par souche ont été testés, pour un total de 19 zones pour le traitement CMC et 18 zones pour le traitement DWCNT (souche AUS) ; pour un total de 17 zones pour le traitement CMC et 15 zones pour le traitement DWCNT (souche LU).

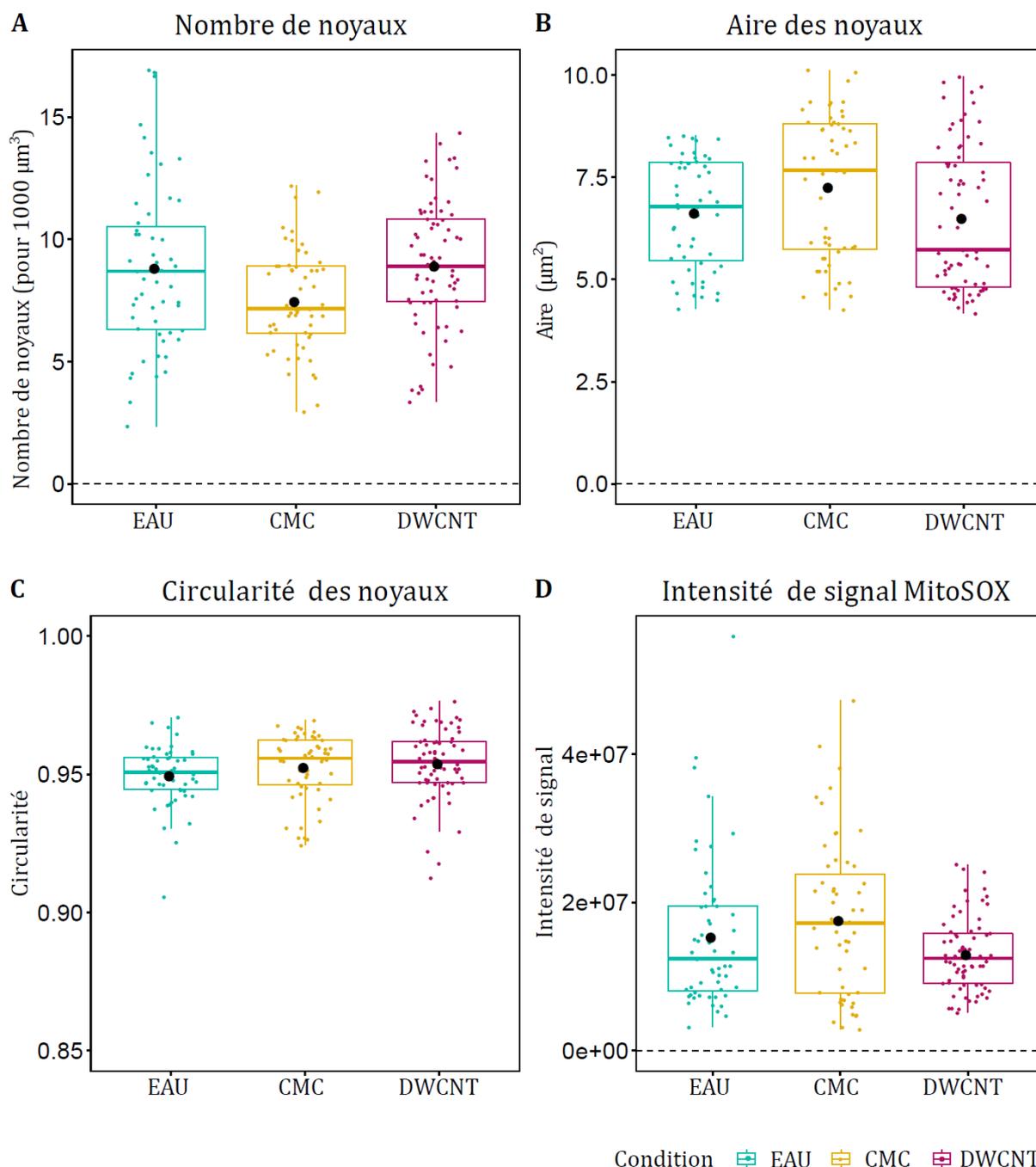


Figure 53 : Nombre de noyaux détectés (A), Aire (B) et Circularité des noyaux (C), intensité de signal Mitosox (D) selon le traitement (CMC, Eau, ou DWCNT).

7 plasmodes CMC, 7 plasmodes Eau, et 9 plasmodes DWCNT ont été testés, pour un total de 55 zones pour le traitement CMC, 55 zones pour le traitement Eau, et 70 zones pour le traitement DWCNT.

5.2.3. Discussion

D'après nos résultats, la morphologie des noyaux (circularité) ne semble pas impactée par les traitements CMC et DWCNT, à la fois pour la souche AUS et la souche LU. En revanche, nous avons observé que les plasmodes LU CMC ont un nombre de noyaux plus faible et une aire plus grande

de leurs noyaux (résultats non significatifs), ce qui n'est pas le cas pour la 1^{ère} session (souche AUS et LU), par rapport aux plasmodes Eau et DWCNT.

Lors de la 1^{ère} session, les plasmodes AUS du traitement CMC ont un signal MitoSox qui est plus élevé que les plasmodes DWCNT, ce n'est pas le cas pour la souche LU. Nous n'avons pas comparé ces plasmodes au traitement Eau donc nous ignorons si c'est la CMC qui a induit une augmentation de signal ou si c'est les DWCNT qui ont réduit le signal. Il s'avère que les NTC peuvent parfois être piègeur de ROS. C'est ce qui a été montré pour des MWCNT, ce serait probablement dû à des défauts présents à la surface des nanotubes (Fenoglio et al., 2006, 2008). Concernant les 2^e et 3^e sessions, il n'y a pas de différence dans l'intensité du signal MitoSox entre les traitements, même si graphiquement la médiane et la moyenne des plasmodes CMC sont un peu plus élevées que pour l'Eau et les DWCNT.

Nous nous sommes pour l'instant limité à l'observation du stress oxydant mais il est possible d'aller plus loin. La production de ROS et la réponse inflammatoire des organismes sont souvent des réponses reliées. L'augmentation de l'un peut signifier l'augmentation de l'autre, comme ça a été observé après une exposition aux SWCNT et MWCNT sur des rongeurs (Sager et al., 2022; Shvedova et al., 2008; Wils, Jacobsen, Vogel, et al., 2021). La réduction de l'un peut signifier la réduction de l'autre, comme ça a été observé après une exposition de rongeurs aux SWCNT (Wils, Jacobsen, Vogel, et al., 2021). Mais il y a des cas où, à la suite d'une exposition à des DWCNT, les deux réponses ne sont pas liées, et il peut y avoir la présence d'une réponse inflammatoire sans augmentation de la production de ROS (Crouzier et al., 2010; Meunier et al., 2012). Ainsi, la mesure de la réponse inflammatoire chez *P. polycephalum* en parallèle de l'évaluation de la production de ROS serait intéressante, ainsi que la recherche de biomarqueurs liés au stress oxydant. Il a déjà été montré que le macroplasmode de *P. polycephalum* peut se défendre face à la production de ROS en augmentant la production de flavonoïdes ou de composés phénoliques qui ont des activités antioxydantes, et ce après seulement 3 jours d'exposition à des nTiO₂ (Zhi Zhang et al., 2018). Ce qui implique que nos résultats ne veulent pas forcément dire qu'il n'y a pas de stress oxydant engendré par les DWCNT, mais que peut-être la cellule réussit à y faire face par le déclenchement de voies métaboliques. Des analyses métabolomiques seraient essentielles pour avoir des informations supplémentaires.

Il faut aussi garder en tête qu'il existe plusieurs techniques pour détecter et quantifier la présence de ROS dans les cellules, et que d'autres sont peut-être meilleures. Nous avons fait le choix d'utiliser une sonde fluorescente (MitoSOX™), mais d'autres sont disponibles comme la sonde H₂DCFDA utilisée par Zhi Zhang et al. (2018) sur *P. polycephalum*. Une autre méthode de détection est la spectroscopie ESR (résonance de spin électronique) (Fenoglio et al., 2006) qui permet de détecter la présence d'électrons non appariés comme ceux qui sont présents chez les ROS (H₂O₂, O₂[•], etc.). Dans tous les cas, la vérification d'interférences possibles entre les NTC et les sondes fluorescente doit être estimée.

5.3. Annexe 5 : Tableaux statistiques

5.3.1. Analyse de la période de contraction des veines

<i>Prédicteurs</i>	Période de contraction des veines				
	<i>Estimés</i>	<i>CI</i>	<i>Statistique</i>	<i>p</i>	<i>df</i>
(Intercept)	-0.52	-0.84 – -0.21	-3.25	0.001	1595.00
[CMC] vs [DWCNT]	0.25	-0.16 – 0.66	1.18	0.237	1595.00
[Diamètre moyen]	0.00	0.00 – 0.00	3.40	0.001	1595.00
[DWCNT] *[Diamètre moyen] vs [CMC] *[Diamètre moyen]	-0.00	-0.00 – -0.00	-2.41	0.016	1595.00
Effets Aléatoires					
σ^2	0.42				
τ_{00} ID_plasmod	0.56				
ICC	0.57				
N ID_plasmod	803				
Observations	1601				
R ² Marginal / R ² Conditionnel	0.025 / 0.578				

Tableau S72 : Statistiques associées à la Figure 48.

Pour évaluer la différence des périodes de contraction selon le traitement et le diamètre des veines, nous avons utilisé un modèle mixte linéaire (fonction `lmer`, famille d'erreur : Gaussienne, Package `lme4`). Le modèle a été ajusté en spécifiant les effets fixes : traitement (prédicteur catégorique) et diamètre (prédicteur continue) ; et l'effet aléatoire : ID (identité du plasmode). La variable dépendante a été normalisée à l'aide de la fonction `bestNormalize` (Package `bestNormalize`).

Période de contraction des veines - Veines < 200 µm					
<i>Prédicteurs</i>	<i>Estimés</i>	<i>CI</i>	<i>Statistique</i>	<i>p</i>	<i>df</i>
(Intercept)	-0.57	-1.55 – 0.42	-1.13	0.260	474.00
[Diamètre moyen]	0.00	-0.00 – 0.01	1.04	0.299	474.00
[CMC] vs [DWCNT]	0.09	-0.13 – 0.31	0.79	0.427	474.00
Effets Aléatoires					
σ^2	0.45				
τ_{00} ID_plasmod	0.60				
ICC	0.57				
N ID_plasmod	304				
Observations	479				
R ² Marginal / R ² Conditionnel	0.004 / 0.576				

Tableau S73 : Statistiques associées à la Figure 48 (A).

Période de contraction des veines - Veines de 200 à 299 µm					
<i>Prédicteurs</i>	<i>Estimés</i>	<i>CI</i>	<i>Statistique</i>	<i>p</i>	<i>df</i>
(Intercept)	0.27	-0.39 – 0.93	0.81	0.417	693.00
[Diamètre moyen]	-0.00	-0.00 – 0.00	-0.75	0.452	693.00
[CMC] vs [DWCNT]	-0.36	-0.54 – -0.18	-3.92	<0.001	693.00
Effets Aléatoires					
σ^2	0.40				
τ_{00} ID_plasmod	0.56				
ICC	0.58				
N ID_plasmod	403				
Observations	698				
R ² Marginal / R ² Conditionnel	0.032 / 0.596				

Tableau S74 : Statistiques associées à la Figure 48 (B).

Pour évaluer la différence des périodes de contraction selon le traitement et le diamètre des veines, nous avons utilisé un modèle mixte linéaire (fonction `lmer`, famille d'erreur : Gaussienne, Package `lme4`). Le modèle a été ajusté en spécifiant les effets fixes : traitement (prédicteur catégorique) et diamètre (prédicteur continue) ; et l'effet aléatoire : ID (identité du plasmode). La variable dépendante a été normalisée à l'aide de la fonction `bestNormalize` (Package `bestNormalize`).

Période de contraction des veines - Veines de 300 à 399 μm					
<i>Prédicteurs</i>	<i>Estimés</i>	<i>CI</i>	<i>Statistique</i>	<i>p</i>	<i>df</i>
(Intercept)	-0.01	-1.44 – 1.43	-0.01	0.991	322.00
[Diamètre moyen]	0.00	-0.00 – 0.00	0.24	0.810	322.00
[CMC] vs [DWCNT]	-0.48	-0.76 – -0.19	-3.30	0.001	322.00
Effets Aléatoires					
σ^2	0.48				
τ_{00} ID_plasmod	0.50				
ICC	0.51				
N ID_plasmod	164				
Observations	327				
R ² Marginal / R ² Conditionnel	0.054 / 0.537				

Tableau S75 : Statistiques associées à la Figure 48 (C).

Période de contraction des veines - Veines > 400 μm					
<i>Prédicteurs</i>	<i>Estimés</i>	<i>CI</i>	<i>Statistique</i>	<i>p</i>	<i>df</i>
(Intercept)	1.68	-0.82 – 4.18	1.32	0.187	92.00
[Diamètre moyen]	-0.00	-0.01 – 0.00	-1.03	0.305	92.00
[CMC] vs [DWCNT]	-0.60	-1.20 – -0.01	-1.99	0.047	92.00
Effets Aléatoires					
σ^2	0.20				
τ_{00} ID_plasmod	0.77				
ICC	0.79				
N ID_plasmod	57				
Observations	97				
R ² Marginal / R ² Conditionnel	0.074 / 0.808				

Tableau S76 : Statistiques associées à la Figure 48 (D).

Pour évaluer la différence des périodes de contraction selon le traitement et le diamètre des veines, nous avons utilisé un modèle mixte linéaire (fonction *lmer*, famille d'erreur : Gaussienne, Package *lme4*). Le modèle a été ajusté en spécifiant les effets fixes : traitement (prédicteur catégorique) et diamètre (prédicteur continue) ; et l'effet aléatoire : ID (identité du plasmode). La variable dépendante a été normalisée à l'aide de la fonction *bestNormalize* (Package *bestNormalize*).

5.3.2. Analyse du stress oxydant

Nombre de noyaux (pour 1000 μm^3) Souche LU					
<i>Prédicteurs</i>	<i>Estimés</i>	<i>CI</i>	<i>Statistique</i>	<i>p</i>	<i>df</i>
(Intercept)	8.64	7.10 – 10.18	10.98	<0.001	28.00
[CMC] vs [DWCNT]	0.80	-1.40 – 2.99	0.71	0.478	28.00
Effets Aléatoires					
σ^2	2.29				
τ_{00} ID_plasmod	0.97				
ICC	0.30				
N ID_plasmod	4				
Observations	32				
R ² Marginal / R ² Conditionnel	0.048 / 0.331				

Nombre de noyaux (pour 1000 μm^3) Souche AUS					
<i>Prédicteurs</i>	<i>Estimés</i>	<i>CI</i>	<i>Statistique</i>	<i>p</i>	<i>df</i>
(Intercept)	-0.04	-0.57 – 0.50	-0.13	0.896	33.00
[CMC] vs [DWCNT]	0.08	-0.69 – 0.84	0.20	0.842	33.00
Effets Aléatoires					
σ^2	1.00				
τ_{00} ID_plasmod	0.04				
ICC	0.04				
N ID_plasmod	4				
Observations	37				
R ² Marginal / R ² Conditionnel	0.001 / 0.044				

Tableau S77 : Statistiques associées à la Figure 52(A).

Pour évaluer les différences des paramètres selon le traitement, nous avons utilisé un modèle mixte linéaire (fonction lmer, famille d'erreur : Gaussienne, Package lme4). Le modèle a été ajusté en spécifiant l'effet fixe : traitement (prédicteur catégorique) ; et l'effet aléatoire : ID (identité du plasmode). La variable dépendante a été normalisée à l'aide de la fonction bestNormalize (Package bestNormalize).

Aire des noyaux (μm^2) Souche LU					
<i>Prédicteurs</i>	<i>Estimés</i>	<i>CI</i>	<i>Statistique</i>	<i>p</i>	<i>df</i>
(Intercept)	-0.12	-0.65 – 0.40	-0.46	0.642	28.00
[CMC] vs [DWCNT]	0.26	-0.50 – 1.02	0.67	0.501	28.00
Effets Aléatoires					
σ^2	1.00				
τ_{00} ID_plasmod	0.02				
ICC	0.02				
N ID_plasmod	4				
Observations	32				
R ² Marginal / R ² Conditionnel	0.017 / 0.040				

Aire des noyaux (μm^2) Souche AUS					
<i>Prédicteurs</i>	<i>Estimés</i>	<i>CI</i>	<i>Statistique</i>	<i>p</i>	<i>df</i>
(Intercept)	0.28	-0.61 – 1.17	0.61	0.540	33.00
[CMC] vs [DWCNT]	-0.60	-1.87 – 0.66	-0.93	0.351	33.00
Effets Aléatoires					
σ^2	0.74				
τ_{00} ID_plasmod	0.34				
ICC	0.31				
N ID_plasmod	4				
Observations	37				
R ² Marginal / R ² Conditionnel	0.079 / 0.366				

Tableau S78 : Statistiques associées à la Figure 52(B).

Pour évaluer les différences des paramètres selon le traitement, nous avons utilisé un modèle mixte linéaire (fonction *lmer*, famille d'erreur : Gaussienne, Package *lme4*). Le modèle a été ajusté en spécifiant l'effet fixe : traitement (prédicteur catégorique) ; et l'effet aléatoire : ID (identité du plasmode). La variable dépendante a été normalisée à l'aide de la fonction *bestNormalize* (Package *bestNormalize*).

Circularité des noyaux Souche LU					
<i>Prédicteurs</i>	<i>Estimés</i>	<i>CI</i>	<i>Statistique</i>	<i>p</i>	<i>df</i>
(Intercept)	0.04	-0.44 – 0.52	0.17	0.867	28.00
[CMC] vs [DWCNT]	-0.09	-0.79 – 0.62	-0.25	0.806	28.00
Effets Aléatoires					
σ^2	1.03				
τ_{00} ID_plasmod	0.00				
N ID_plasmod	4				
Observations	32				
R ² Marginal / R ² Conditionnel	0.002 / NA				

Circularité des noyaux Souche AUS					
<i>Prédicteurs</i>	<i>Estimés</i>	<i>CI</i>	<i>Statistique</i>	<i>p</i>	<i>df</i>
(Intercept)	-0.11	-1.05 – 0.82	-0.24	0.811	33.00
[CMC] vs [DWCNT]	0.24	-1.09 – 1.57	0.35	0.724	33.00
Effets Aléatoires					
σ^2	0.82				
τ_{00} ID_plasmod	0.37				
ICC	0.31				
N ID_plasmod	4				
Observations	37				
R ² Marginal / R ² Conditionnel	0.012 / 0.319				

Tableau S79 : Statistiques associées à la Figure 52(C).

Pour évaluer les différences des paramètres selon le traitement, nous avons utilisé un modèle mixte linéaire (fonction `lmer`, famille d'erreur : Gaussienne, Package `lme4`). Le modèle a été ajusté en spécifiant l'effet fixe : traitement (prédicteur catégorique) ; et l'effet aléatoire : ID (identité du plasmode). La variable dépendante a été normalisée à l'aide de la fonction `bestNormalize` (Package `bestNormalize`).

Intensité du signal MitoSOX Souche LU					
<i>Prédicteurs</i>	<i>Estimés</i>	<i>CI</i>	<i>Statistique</i>	<i>p</i>	<i>df</i>
(Intercept)	-0.06	-0.93 – 0.80	-0.14	0.885	28.00
[CMC] vs [DWCNT]	0.13	-1.10 – 1.36	0.20	0.838	28.00
Effets Aléatoires					
σ^2	0.88				
τ_{00} ID_plasmod	0.28				
ICC	0.24				
N ID_plasmod	4				
Observations	32				
R ² Marginal / R ² Conditionnel	0.004 / 0.248				

Intensité du signal MitoSOX Souche AUS					
<i>Prédicteurs</i>	<i>Estimés</i>	<i>CI</i>	<i>Statistique</i>	<i>p</i>	<i>df</i>
(Intercept)	0.68	-0.20 – 1.56	1.52	0.128	33.00
[CMC] vs [DWCNT]	-1.38	-2.63 – -0.13	-2.17	0.030	33.00
Effets Aléatoires					
σ^2	0.35				
τ_{00} ID_plasmod	0.37				
ICC	0.51				
N ID_plasmod	4				
Observations	37				
R ² Marginal / R ² Conditionnel	0.407 / 0.711				

Tableau S80 : Statistiques associées à la Figure 52(D).

Pour évaluer les différences des paramètres selon le traitement, nous avons utilisé un modèle mixte linéaire (fonction *lmer*, famille d'erreur : Gaussienne, Package *lme4*). Le modèle a été ajusté en spécifiant l'effet fixe : traitement (prédicteur catégorique) ; et l'effet aléatoire : ID (identité du plasmode). La variable dépendante a été normalisée à l'aide de la fonction *bestNormalize* (Package *bestNormalize*).

Nombre de noyaux (pour 1000 μm^3)						
Sessions 2 et 3						
<i>Prédicteurs</i>	<i>Estimés</i>	<i>CI</i>	<i>Statistique</i>	<i>p</i>	<i>df</i>	
(Intercept)	-0.32	-0.82 – 0.18	-1.26	0.209	175.00	
[CMC] vs [EAU]	0.43	-0.28 – 1.13	1.19	0.233	175.00	
[CMC] vs [DWCNT]	0.50	-0.17 – 1.16	1.46	0.144	175.00	
Effets Aléatoires						
σ^2	0.63					
τ_{00} ID_plasmod	0.37					
ICC	0.37					
N ID_plasmod	23					
Observations	180					
R ² Marginal / R ² Conditionnel	0.045 / 0.400					

Tableau S81 : Statistiques associées à la Figure 53 (A).

Aire des noyaux (μm^2)						
Sessions 2 et 3						
<i>Prédicteurs</i>	<i>Estimés</i>	<i>CI</i>	<i>Statistique</i>	<i>p</i>	<i>df</i>	
(Intercept)	0.32	-0.39 – 1.02	0.88	0.380	174.00	
[CMC] vs [EAU]	-0.44	-1.44 – 0.56	-0.87	0.387	174.00	
[CMC] vs [DWCNT]	-0.51	-1.45 – 0.44	-1.05	0.293	174.00	
Effets Aléatoires						
σ^2	0.17					
τ_{00} ID_plasmod	0.89					
ICC	0.84					
N ID_plasmod	23					
Observations	179					
R ² Marginal / R ² Conditionnel	0.045 / 0.849					

Tableau S82 : Statistiques associées à la Figure 53 (B).

Pour évaluer les différences des paramètres selon le traitement, nous avons utilisé un modèle mixte linéaire (fonction lmer, famille d'erreur : Gaussienne, Package lme4). Le modèle a été ajusté en spécifiant l'effet fixe : traitement (prédicteur catégorique) ; et l'effet aléatoire : ID (identité du plasmode). La variable dépendante a été normalisée à l'aide de la fonction bestNormalize (Package bestNormalize).

Circularité des noyaux						
Sessions 2 et 3						
<i>Prédicteurs</i>	<i>Estimés</i>	<i>CI</i>	<i>Statistique</i>	<i>p</i>	<i>df</i>	
(Intercept)	0.02	-0.41 – 0.44	0.09	0.930	174.00	
[CMC] vs [EAU]	-0.25	-0.85 – 0.35	-0.81	0.416	174.00	
[CMC] vs [DWCNT]	0.13	-0.44 – 0.70	0.45	0.651	174.00	
Effets Aléatoires						
σ^2	0.79					
τ_{00} ID_plasmod	0.23					
ICC	0.23					
N ID_plasmod	23					
Observations	179					
R ² Marginal / R ² Conditionnel	0.024 / 0.244					

Tableau S83 : Statistiques associées à la Figure 53 (C).

Intensité du signal MitoSOX						
Sessions 2 et 3						
<i>Prédicteurs</i>	<i>Estimés</i>	<i>CI</i>	<i>Statistique</i>	<i>p</i>	<i>df</i>	
(Intercept)	0.17	-0.43 – 0.78	0.57	0.572	175.00	
[CMC] vs [EAU]	-0.18	-1.03 – 0.68	-0.40	0.686	175.00	
[CMC] vs [DWCNT]	-0.29	-1.09 – 0.51	-0.71	0.479	175.00	
Effets Aléatoires						
σ^2	0.46					
τ_{00} ID_plasmod	0.60					
ICC	0.57					
N ID_plasmod	23					
Observations	180					
R ² Marginal / R ² Conditionnel	0.014 / 0.574					

Tableau S84 : Statistiques associées à la Figure 53 (D).

Pour évaluer les différences des paramètres selon le traitement, nous avons utilisé un modèle mixte linéaire (fonction `lmer`, famille d'erreur : Gaussienne, Package `lme4`). Le modèle a été ajusté en spécifiant l'effet fixe : traitement (prédicteur catégorique) ; et l'effet aléatoire : ID (identité du plasmode). La variable dépendante a été normalisée à l'aide de la fonction `bestNormalize` (Package `bestNormalize`).

6. Chapitre 6 : Discussion générale

6.1. Toxicité des DWCNT sur *Physarum polycephalum*

Nos résultats suggèrent que la vitesse de déplacement peut être affectée par les DWCNT (chapitres 2 et 3), ainsi que la prise de décision (chapitre 4), et que ces effets sont variables. De plus l'ajout de plusieurs facteurs de stress ne nous a pas permis de faire ressortir un effet qui nous permettrait de réellement conclure sur l'effet des DWCNT sur le déplacement et le choix des plasmodes. Nous avons remarqué que l'effet des DWCNT sur la vitesse et la prise de décision est variable selon le génotype de *P. polycephalum* utilisé. La souche AUS semblent être celle qui est la plus impactée par rapport aux autres souches testées. Naturellement cette souche est plus sensible à d'autres facteurs tel que la température ou la concentration en sel. Elle est aussi celle qui se déplace le plus lentement par rapport aux autres souches testées. Cela n'empêche pas une variabilité intra-souche dans les résultats obtenus.

L'effet des DWCNT sur les vitesses de déplacement et prises de décision est variable selon la durée d'exposition et non linéaire. Cependant nous avons pu remarquer que lors de l'arrêt de l'exposition au traitement DWCNT, il y a une récupération presque immédiate des plasmodes. En une journée les plasmodes commencent à récupérer une latence d'apparition du 1^{er} pseudopode « normal » (proche des plasmodes CMC) alors qu'ils étaient exposés aux DWCNT depuis 8 semaines. Lors de la mesure des vitesses de déplacement sur ponts nous avons également montré que, pour 2 types de substrats (neutre et attractif), les plasmodes dont l'exposition était stoppée (2 jours de récupération après 2 semaines d'exposition) étaient plus rapides que les plasmodes DWCNT, et plus rapides que les plasmodes CMC. Les DWCNT ne semblent pas affecter durablement les plasmodes, si l'exposition est stoppée, alors les effets qu'ils provoquent s'arrêtent aussi. Par conséquent, il est probable que l'excrétion rapide que nous avons mesurée dans le chapitre 2 ne concerne pas que les gros agglomérats, mais aussi les plus petits. Nous soupçonnons qu'un stress est induit chez les plasmodes DWCNT, mais que les plasmodes s'y habituent, et que quand l'exposition est stoppée, leurs performances soient augmentées. Cependant une question demeure : à quoi est-ce que les plasmodes s'habituent ? quel stress est engendré au sein de la cellule ? C'est un effet que l'on a aussi parfois observé sur la vitesse et/ou sur la prise de décision quand les plasmodes étaient soumis à un changement brutal de température. Le mécanisme sous-jacent est-il le même ?

Nous avons observé une diminution des périodes de contraction de la souche AUS, après 3 jours d'exposition, ce qui est en accord avec l'expérience conduite sur les 5 souches pour lesquelles nous avons observé une accélération du déplacement. Ce qui est étonnant est que nous observons cette diminution sur la souche AUS alors que cette souche est ralentie par les DWCNT. Toutefois, les autres expériences réalisées sur cette souche l'ont été après une semaine d'exposition minimum. Il serait donc intéressant de tester des durées d'exposition plus courtes de l'ordre de 1 à 4 jours pour voir si les DWCNT ont un effet accélérateur, et voir s'ils induisent un ralentissement par la suite, pour la souche AUS. Pour la souche LU nous avons d'autres expériences avec des courtes périodes d'exposition : ralentissement sur pont (§ 2.3.4.5) et morphologie modifiée (plasmodes DWCNT plus circulaires, § 3.2.1) après une exposition unique (au début de l'expérience) ; une vitesse ralentie sur ponts après 2 et 4 jours d'exposition (§ 3.3.2)

ou accélérée en arène après 3 jours d'exposition (§ 3.2.2) ; et une tendance au ralentissement de la fusion après 3 jours d'exposition (§ 3.4). Il serait donc intéressant d'observer pour les souches AUS et LU s'il y a une modification de l'effet des DWCNT entre une exposition courte (1, 2 et 3 jours) et une exposition longue (> 3 jours).

La diminution de la durée des périodes de contraction nous a conforté dans l'idée que les DWCNT peuvent avoir un impact sur le réseau veineux des plasmodes et par conséquent sur leur vitesse de déplacement, et potentiellement sur leur prise de décision aussi. La prochaine étape serait de chercher si des interactions mécaniques (avec les MT ou les FA) sont présentes et si elles expliqueraient ces effets.

Un autre mode d'action possible serait au niveau moléculaire. Nous n'avons pas observé d'augmentation du stress oxydant chez les plasmodes DWCNT, ce qui concorde avec des résultats trouvés sur des cellules alvéolaires de souris et des monocytes humains (Crouzier et al., 2010; Meunier et al., 2012). Il y a cependant une tendance à l'augmentation du stress oxydant chez les plasmodes CMC, il est donc possible que les DWCNT piègent les ROS. Si c'est le cas, les DWCNT induisent peut-être une balance entre un effet mécanique négatif et un effet protecteur positif contre le stress oxydant. Une autre possibilité est que les DWCNT induisent la mise en route de voies métaboliques qui protègent les plasmodes d'un stress oxydant. Par exemple, une exposition de 3 jours à des nTiO₂ induit la surproduction de tréhalose chez les plasmodes ce qui leur permettrait de se protéger contre le stress oxydant. Mais pas que, car le tréhalose peut aussi protéger contre un stress osmotique, salé, ou thermique (Zhi Zhang et al., 2018). En complément nous avons réalisé des extractions ARN, malheureusement les échantillons ont été perdus lors de l'expédition à l'entreprise qui devait en réaliser le séquençage.

Finalement, la mesure du stress oxydant ne nous a pas permis de faire un lien avec les tests comportementaux, cependant d'autres mesures sont possibles (réponse inflammatoire, métabolique), nous en discuterons plus loin. Nous pouvons aussi nous demander si la variabilité dans nos résultats est due à une faible toxicité des DWCNT envers les plasmodes de *P. polycephalum*, si elle est liée à la variabilité d'effet des DWCNT selon les conditions expérimentales, ou si elle est due à la variabilité naturelle des plasmodes qui les rend plus ou moins sensibles à l'effet des DWCNT.

6.2. Variabilité de la toxicité des DWCNT

Beaucoup de paramètres jouent sur la toxicité des NTC en général comme la nature exacte des NTC : leur diamètre, leur longueur, leur pureté (résidus de catalyseurs : quels métaux et quelle quantité ?). En effet, la présence de résidus catalytiques peut modifier la toxicité des NTC même après une étape de purification (Kiciński & Dyjak, 2020). Les DWCNT que nous utilisons ne sont pas concernés, car les résidus de cobalt et de molybdène (dans une moindre mesure) qui restent présents sont piégés à l'intérieur des DWCNT ou encore de coques carbonées présentes dans les échantillons (Flahaut et al., 2002) et sont de ce fait non biodisponibles. L'état de dispersion des DWCNT, leur méthode de purification (qui implique souvent une oxydation), leur concentration, la durée d'exposition, et enfin le modèle cellulaire sont aussi responsables de la variabilité des

effets observés dans la bibliographie. Finalement il est difficile de tirer une conclusion générale quant à la cytotoxicité des DWCNT, et plus largement des NTC.

Pour pouvoir comparer nos résultats entre eux et conclure sur la toxicité des DWCNT, nous avons utilisé le même protocole de préparation pour les suspensions de DWCNT et la solution de CMC. Nous avons réalisé la dispersion des DWCNT par sonication. Des auteurs ont montré que la toxicité des DWCNT variait selon la méthode de dispersion utilisée, les DWCNT dispersés par sonication étaient plus toxiques pour des organismes aquatiques (plus forte inhibition de croissance ou de la reproduction) qu'après une dispersion par agitation (Kwok et al., 2010). Cela vient du fait qu'une dispersion par sonication est plus efficace pour casser les agglomérats, finalement leur taille est plus petite et ils sont susceptibles d'être plus facilement ingérés par les organismes et moins facilement phagocytés (Garcia-Hevia et al., 2015). Une autre source de variabilité peut provenir des conditions dans lesquelles les organismes sont testés. Dans cette thèse, les conditions étaient dans la mesure du possible les mêmes (température d'expérience, âge des plasmodes, concentration d'exposition, méthode d'élevage, etc.).

P. polycephalum est lui-même source de variabilité. Nous prélevons toujours plusieurs petits plasmodes à partir d'un même plasmode, ce sont des clones. Et pourtant leur comportement est variable. En élevant des plasmodes clones dans les mêmes conditions, selon trois traitements, Vogel et al. (2018) ont identifié 3 groupes de plasmodes ayant chacun une vitesse de déplacement différente indépendamment du traitement. Les plasmodes clones ont donc des vitesses de déplacement différentes alors qu'ils étaient un même individu quelques heures auparavant. Cette caractéristique nous permet de considérer chaque clone comme un plasmode à part entière, et qu'ils peuvent être impactés différemment par les DWCNT.

La toxicité des DWCNT est très peu étudiée comparé à celle des SWCNT et des MWCNT, et parmi les études disponibles très peu sont réalisées sur l'effet des DWCNT sur les organismes du sol. A notre connaissance, une étude a été réalisée sur les vers de terre (Scott-Fordsmand et al., 2008), aucune n'est disponible sur les communautés bactériennes du sol, une étude existe sur les plantes terrestres (Liné et al., 2021), et l'étude sur *P. polycephalum* qui fait l'objet du chapitre 2 (Ternois et al., 2021). La majorité des études portant sur les DWCNT sont réalisées sur des organismes aquatiques, et sont réalisées avec des DWCNT synthétisées au CIRIMAT tout comme ceux utilisés dans cette thèse (Kwok et al., 2010; Mouchet et al., 2007, 2008, 2011; Verneuil et al., 2015) (**Tableau S91**, page 242). Ces tests portent essentiellement sur l'évaluation de leurs effets sur des paramètres que nous n'avons pas mesurés chez *P. polycephalum* : la génotoxicité, la réponse inflammatoire, le stress oxydant, la croissance, et la viabilité (**Tableau S91**).

Effets des DWCNT sur la génotoxicité

Les DWCNT ne semblent pas induire de génotoxicité sur les larves d'amphibiens (Mouchet et al., 2007, 2008), à l'exception d'une exposition à 1 mg/L de DWCNT pendant 12 jours avec un milieu enrichi en gomme arabique (qui sert de stabilisant pour la suspension de DWCNT) (Mouchet et al., 2011).

Effets des DWCNT sur la production de ROS et l'inflammation

Nous n'avons pas observé d'augmentation de la quantité de ROS chez les plasmodes de *P. polycephalum* exposés aux DWCNT, et nous n'avons pas mesuré la réponse inflammatoire. Il semblerait que les DWCNT puissent engendrer une réponse inflammatoire sans engendrer du stress oxydant. Dans des cellules alvéolaires de souris, les DWCNT ont induit une baisse de la quantité de ROS, mais ont provoqué une sécrétion des cytokines pro-inflammatoire leptine et IL-6 (Crouzier et al., 2010). Sur des monocytes humains, les DWCNT ont provoqué une activation de l'inflammasome⁴ NLRP3 mais pas de production de ROS (Meunier et al., 2012). En revanche, les DWCNT provoquent une augmentation des ROS chez 2 espèces de bactéries (*S. aureus* et *P. aeruginosa*) et une levure (*C. albicans*) (Olivi et al., 2013).

Effets des DWCNT sur la croissance

Nous n'avons pas pesé nos plasmodes donc nous ne connaissons pas leur biomasse, ni par conséquent si leur croissance était affectée. Cependant, les plasmodes recouvraient quotidiennement leur avoine pendant les élevages, sauf cas exceptionnels qui pouvaient avoir lieu dans les deux élevages, ce n'était pas exclusif aux DWCNT. Cela nous laisse penser que leur croissance n'était pas affectée.

Des études sur des larves de *X. laevis* ont montré que les MWCNT inhibaient la croissance à 50 mg/L alors que les DWCNT inhibaient la croissance à 10 et 50 mg/L. Il semblerait que les DWCNT soient plus toxique pour la croissance des larves d'amphibien que les MWCNT (Mouchet et al., 2010, 2011), du moins lorsque la concentration est exprimée en valeur massique. Si l'on tient compte du fait que les DWCNT sont beaucoup moins lourds que les MWCNT, cela implique que pour une même concentration massique, le nombre de DWCNT est beaucoup plus élevé (Laurent et al., 2010), ce qui peut expliquer un impact plus marqué. Chez les plantes les effets des DWCNT vont dépendre des espèces. Il a été montré une augmentation de la biomasse des feuilles (colza, concombre), une baisse de la biomasse totale (maïs), mais aucun effet sur les plants de tomate après 5 semaines en présence de DWCNT dans le sol (Liné et al., 2021). Chez la diatomée *N. palea*, il y a une inhibition de la croissance engendrée après 48h d'exposition aux DWCNT qui augmente avec l'augmentation de la concentration (1, 10, ou 50 mg/L), mais après 6 jours les diatomées récupèrent une croissance normale sauf pour une concentration de 50 mg/L où elle est encore un peu réduite (Verneuil et al., 2015). Autre effet intéressant, l'exposition aux DWCNT entraîne une surproduction de substance polymère extracellulaire chez la diatomée, ce qui pourraient être un moyen de protection en piégeant les NTC dans la matrice (Verneuil et al., 2015). Nous avons essayé de quantifier les DWCNT dans le mucus des plasmodes par analyse thermogravimétrique, mais la sensibilité de la méthode était trop faible. La présence des NTC dans le mucus a été démontrée par spectroscopie Raman, mais de manière non quantitative (par Maxence Mougou, avant le projet de thèse). En revanche mesurer la quantité de mucus produit quand les plasmodes sont exposés serait intéressant. Surtout s'ils sont exposés par voie environnementale (substrat), car les plasmodes augmentent leur production de mucus s'il y a une substance aversive dans le milieu (Patino-Ramirez et al., 2019).

⁴ Complexe protéique responsable de l'activation des réponses inflammatoires

Effets des DWCNT sur la viabilité

Nous n'avons pas observé de changement de la morphologie des plasmodes durant l'élevage, à part une coloration verte qui est due à la coloration de l'avoine par les DWCNT plutôt que du plasmode en lui-même, car dès que ce dernier croît sur le gel agar il apparaît jaune à nouveau, et ça ne correspond pas à une élimination rapide des NTC. De plus, il n'y a pas eu de différence de mortalité entre nos élevages exposés aux DWCNT et ceux exposés à la CMC, y compris pour des élevages de plusieurs mois. Pourtant il semblerait que les DWCNT soient capables d'engendrer une augmentation de la mortalité chez d'autres organismes.

Sur la levure *C. albicans*, ce sont les DWCNT qui engendrent la mortalité la plus élevée comparé aux SWCNT et aux MWCNT (Olivi et al., 2013). Sur des larves de *X. laevis*, la toxicité des DWCNT a été évaluée selon 2 types de milieux aquatiques : l'un statique, et l'autre semi-statique grâce à la présence d'un bulleur pour alimenter le milieu en oxygène. Dans le milieu statique, la mortalité était moins élevée à faible concentration en DWCNT, mais plus élevée à forte concentration, que le milieu semi-statique (Mouchet et al., 2008). Plus tard la même équipe a réalisé deux études en parallèle pour comparer l'effet des DWCNT à celui des MWCNT sur des larves de *X. laevis* en milieu semi-statique (Mouchet et al., 2010, 2011). Il s'avère que les MWCNT n'induisent pas de mortalité des larves, à aucune des concentrations testées, alors que les DWCNT ont induit 5% de mortalité à 10 mg/L et 15% de mortalité à 50 mg/L.

Si *P. polycephalum* est capable de survivre à une exposition quotidienne de 100 µg/g aux DWCNT pendant 9 semaines, et probablement plus, alors cela fait de lui un bon modèle pour évaluer leur toxicité.

6.3. *Physarum polycephalum* : un modèle pertinent

Au-delà de l'évaluation de la toxicité des DWCNT, nous souhaitons également évaluer la pertinence de l'utilisation de *Physarum polycephalum* en tant que modèle cellulaire en (éco)toxicologie. Le fait que ce soit un unicellulaire eucaryote nous permet d'évaluer la cytotoxicité potentielle des NTC aussi bien au niveau de la mobilité cellulaire, mais plus largement pour des analyses métabolomiques par exemple. De plus sa présence naturelle dans les écosystèmes permet d'appréhender les effets potentiels sur d'autres organismes du sol (bioaccumulation, biopersistance, bioamplification, etc.).

Nous avons pu noter quelques avantages à l'utilisation de *P. polycephalum*. C'est un organisme qui est simple à élever en laboratoire, à tous les stades de son cycle de vie (Halvorsrud & Wagner, 1998), qui vit relativement longtemps (quelques mois à quelques années selon la souche) ce qui permet d'effectuer un suivi et une exposition sur le long terme. Dans cette thèse nous n'avons pas dépassé 9 semaines d'expositions, mais nous aurions pu, même si souvent les expositions des plasmodes aux polluants se font sur une durée allant de quelques heures à quelques jours (**Tableau S91**, page 242). Pour réaliser les expériences, *P. polycephalum* permet d'avoir des clones viables facilement et rapidement, et d'obtenir un nombre de répliques élevé en peu de temps. Grâce à sa richesse comportementale il est possible de réaliser beaucoup de tests comportementaux différents, et sa taille de plusieurs centimètres carrés procure une bonne

quantité de matériel biologique pour des analyses en biologie moléculaire (génomique, transcriptomique, métabolomique).

Nous avons cependant fait face à quelques inconvénients. Nos élevages n'étaient pas réalisés en conditions stériles, il y a donc parfois eu le développement de contaminations et la perte de plasmodes (aussi bien dans les élevages CMC que DWCNT). L'élevage stérile est possible, il est juste plus contraignant. Pendant les expériences, il y a une variabilité naturelle de la réponse des plasmodes que nous avons contrebalancée par le calcul d'indices permettant de s'affranchir de l'effet jour. Cette variabilité peut être due à des facteurs abiotiques non contrôlés de notre part (pression atmosphérique, *etc.*), ou des facteurs biotiques comme la phase du cycle cellulaire. L'ensemble des noyaux présents dans le macroplasmode se divisent de manière synchrone toutes les 8 à 10h selon 2 phases (il n'y a pas de phase G1) : la phase S qui dure 2 à 3h, puis la phase G2 et la mitose qui dure 30 minutes (Aldrich, 2012; Boussard et al., 2021). A la fin il n'y a pas de division cellulaire et la quantité de noyaux est doublée. Pendant le cycle cellulaire, il y a une réorganisation des éléments intracellulaires, ce qui peut affecter la performance (mémoire, apprentissage) de *P. polycephalum* (Boussard et al., 2021). Il est donc possible que, selon la phase du cycle cellulaire, les DWCNT impactent différemment les plasmodes, surtout si ces derniers interagissent avec les MT. De la même manière, nous ne savons pas dans quelle phase du cycle cellulaire étaient chaque plasmode avant de les découper et de les placer en expérience. Cela pourrait influencer leur régénération, leur réorganisation cellulaire, et modifier l'effet du traitement.

La question d'utiliser *P. polycephalum* comme modèle cellulaire en toxicologie s'est déjà posée dans les années 80. Entre le 1^{er} mai 1982 et le 30 juin 1983 un projet a été conduit par le « Air Force Aerospace Medical Research Laboratory », ayant pour objectif d'évaluer si *P. polycephalum* pourrait servir de modèle pour tester la toxicité et la mutagénicité de quelques combustibles (hydrocarbures, hydrazine (Hz) et éthanol) (Mohberg, 1984). Ce projet est né du fait que *P. polycephalum* a été utilisé dans les années 60 en recherche sur le cancer pour trouver des agents antitumoraux (Becker et al., 1963). Ils ont trouvé plusieurs avantages à son utilisation dont le fait que ce soit un eucaryote avec une mitose synchrone des noyaux, et sa facilité de croissance dans un milieu d'élevage simple (Mohberg, 1984). Dans ces études c'est le stade microplasmode qui a été utilisé. Finalement, le rapport trouve des avantages à l'utilisation de *P. polycephalum* par la facilité à mettre en place et observer la viabilité des microplasmodes, ou la reproduction (mesures diamètres et nombre de spores). Cependant quelques inconvénients sont aussi signalés, notamment que la manipulation des microplasmodes peut être difficile car ils sont fragiles (plus que les bactéries par exemple) et peuvent être abîmées durant leur manipulation (pipetage, centrifugation).

Malgré tout assez peu d'études ont utilisé *P. polycephalum* comme modèle cellulaire pour les études de toxicité, et dans la majorité des cas, comme dans cette thèse, c'est le macroplasmode qui est utilisé. Nous l'avons décrit en introduction, *P. polycephalum* a déjà servi de modèle dans quelques études pour évaluer la toxicité de NPs : NPs d'argent (Matveeva et al., 2006) ; NPs de magnétite et microsphères d'argent (Mayne et al., 2011), NPs d'or (Gizzie, Mayne, Yitzchaik, et al.,

2016), nTiO₂ (Zhi Zhang et al., 2018, 2021). Mais il a également servi de modèle pour évaluer la toxicité d'autres types de polluants tel que des insecticides et des métaux lourds (Terayama et al., 1978) dont le cadmium (Shraideh, 2006; Sina & Chin, 1978), le plomb (Shraideh, 2007, 2010), et le mercure (Maraqa et al., 2015).

P. polycephalum supporte des concentrations d'exposition de nTiO₂ plus élevées que d'autres types cellulaires (parmi les levures, bactéries, ou cellules humaines), cela fait de lui un modèle cellulaire potentiel, tolérant aux nTiO₂, pour évaluer les mécanismes impliqués dans la protection contre cette NP et de développer par la suite des mécanismes de lutte contre l'exposition à ces NP (Zhi Zhang et al., 2021). Les DWCNT n'affectant pas la survie des plasmodes, cela fait de lui un bon modèle pour la recherche de biomarqueurs et pour la compréhension des mécanismes sous-jacents de la cytotoxicité des DWCNT. Ce n'est pas le cas avec les insecticides et les métaux lourds qui sont toxiques pour *P. polycephalum*, affectent rapidement l'intégrité des membranes cellulaires, la mobilité et la croissance des plasmodes, leur survie, ce qui ne permet pas la recherche de biomarqueurs ou de mécanismes.

Une équipe a testé l'effet de plusieurs métaux lourds sur des plasmodes de *P. polycephalum* (cadmium, plomb, mercure). Pour tous (selon les concentrations d'exposition), et pour des durées d'exposition courtes, ils ont trouvé des effets communs : une dépigmentation des plasmodes, une désintégration de la membrane plasmique, une vacuolisation du cytoplasme, une augmentation de la période de contraction avec une baisse de la vitesse de déplacement et de la vitesse de croissance ; un arrêt immédiat du flux cytoplasmique pour les doses testées les plus élevées (différentes selon l'élément testé) (Maraqa et al., 2015; Shraideh, 2006, 2007, 2010). En testant plusieurs métaux lourds et insecticides, Terayama et al. (1978) ont pu observer rapidement (exposition aiguë) une baisse de la force motrice suivie d'un arrêt irréversible du flux cytoplasmique, ainsi qu'une augmentation du potentiel de membrane.

Avec une augmentation de la durée et de la concentration d'exposition au cadmium, des modifications morphologiques des nucléoles sont visibles, ainsi qu'une inhibition progressive de la synthèse d'ARN (Sina & Chin, 1978). Ces effets diffèrent selon où en est la phase du cycle cellulaire des plasmodes au moment de l'exposition au cadmium. Lorsque l'exposition a eu lieu avant le début de la prophase (PE), ou 2h et plus après la PE, les lésions nucléolaires étaient moins visibles et la synthèse de l'ARN était moins inhibée (Sina & Chin, 1978). Nous en discutons plus haut, nous n'avons pas pris en compte la phase du cycle cellulaire des plasmodes mais elle pourrait expliquer la variabilité de l'effet des DWCNT.

Si nous souhaitons utiliser *P. polycephalum* comme un modèle cellulaire de référence, nous devons le tester avec d'autres polluants. Nous avons donc réalisé des expériences supplémentaires avec d'autres nanomatériaux carbonés. Nous avons réalisé l'expérience permettant d'obtenir la période de contraction des veines (aussi réalisée avec les DWCNT, § 5.1) avec une exposition aux MWCNT, au FLG, et au GO (les images ne sont pas encore analysées). Nous avons également réalisé quelques expériences comportementales supplémentaires avec le GO. Le GO correspond à plusieurs feuilles de graphène sur lesquelles sont greffés des atomes

d'oxygène, des groupements hydroxyle (-OH), des groupements carboxyle (-COOH), etc. Il a un potentiel génotoxique (Domenech et al., 2022), et est également synthétisés au CIRIMAT. La solution contrôle utilisée était ici de l'eau déionisée (EDI) en l'absence de CMC car le GO est stable dans l'eau, du fait de la présence de nombreuses fonctions oxygénées.

L'effet du GO est variable sur la latence d'apparition du 1^{er} pseudopode (protocole similaire à § 3.2.3). Après 7 jours d'exposition la latence des plasmodes GO est similaire à celle des EDI, après 8 jours d'exposition la latence est plus courte ($p < 0,001$; **Tableau S85, Figure 54 (A)**), donc les plasmodes GO sont plus rapides. Si l'exposition au GO est stoppée (N-EDI) (comme nous l'avions fait avec les DWCNT, § 3.2.4 et § 3.3.1), à 10 jours d'exposition (2 jours après l'arrêt) les plasmodes n'ont plus la même vitesse de déplacement que ceux qui continuent à être exposés au GO, ils deviennent plus lents ($p = 0,006$; **Tableau S85, Figure 54 (B)**).

Concernant l'aire recouverte par les plasmodes sur les ponts (protocole similaire à § 3.3.1, substrat neutre), il n'y a pas de différence du GO avec l'EDI après 7 et 8 jours d'exposition ($p = 0,292$; **Tableau S86, Figure 55**). Entre 9 et 16 jours d'exposition, l'effet varie selon les jours (**Tableau S87, Figure 56**). Comme nous l'avions observé avec les DWCNT, le GO est capable de ralentir (1^{er} pseudopode : à 10 jours d'exposition ; Ponts : à 9, 10, et 15 jours d'exposition) ou d'accélérer (1^{er} pseudopode : à 8 et 9 jours d'exposition ; Ponts : à 13, 14, et 16 jours d'exposition) les plasmodes. Ces effets ne sont pas linéaires dans le temps et semblent indépendants de la durée d'exposition.

Nous considérons que *Physarum polycephalum* est un bon modèle pour évaluer la toxicité des DWCNT, et d'autres nanomatériaux carbonés (FLG, MWCNT, GO). Nous ne savons pas si les tests comportementaux sur *P. polycephalum* seraient de bons indicateurs de leur toxicité, ce qui est sûr c'est qu'ils ne sont pas suffisants. Les études sur *P. polycephalum* offrent une large gamme de tests possibles en réponse à un polluant : génomique, métabolomique, électrophysiologie, comportement (**Tableau S89**, page 236). La réalisation en parallèle d'analyses moléculaires permettrait de mieux comprendre les mécanismes d'action de ces nanomatériaux.

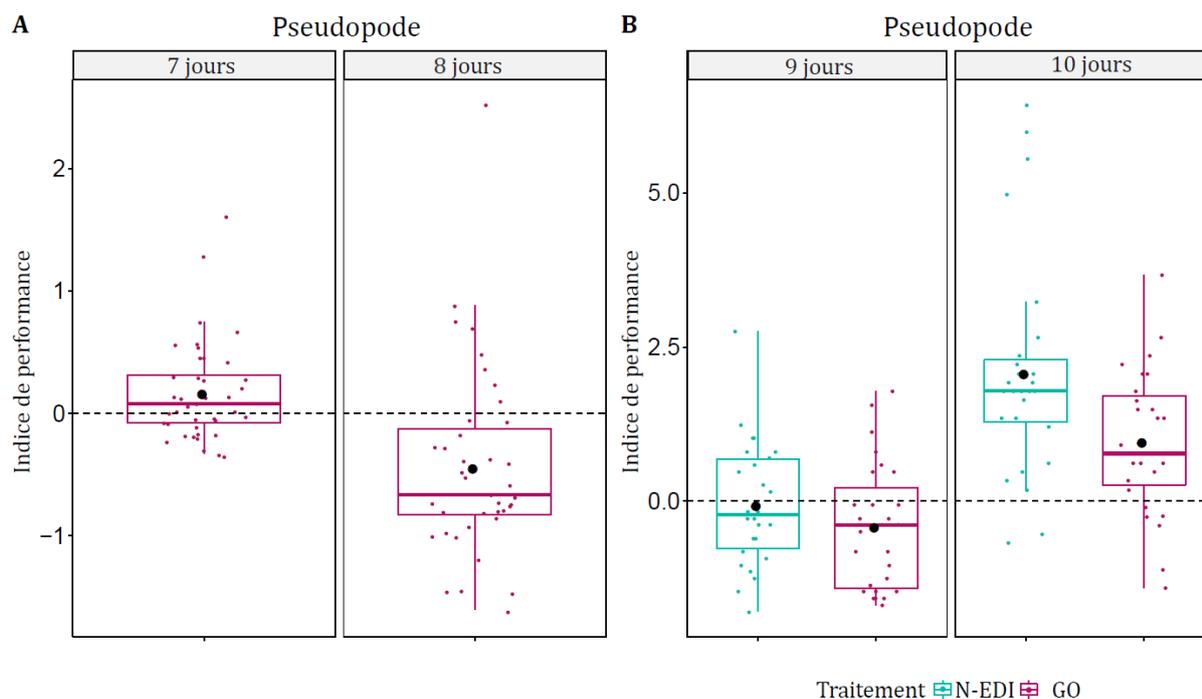


Figure 54 : Indices de performance (calculés à partir des latences) des plasmodes GO après 7 ou 8 jours d'exposition (A) ; des plasmodes N-EDI ou GO après 9 ou 10 jours d'exposition (B).

40 plasmodes par traitement ont été testés après 7 jours d'exposition ; 40 plasmodes EDI et 39 plasmodes GO ont été testés après 8 jours d'exposition ; 26 plasmodes par traitement ont été testés après 9 et 10 jours d'exposition.

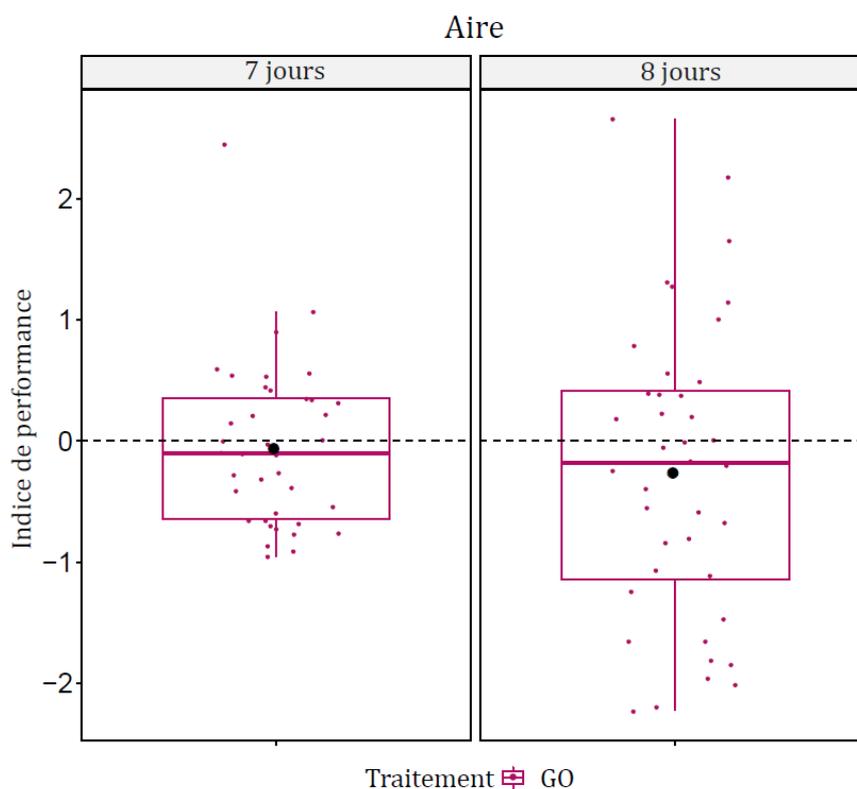


Figure 55 : Indices de performance (calculés à partir des aires) des plasmodes GO après 7 ou 8 jours d'exposition.

35 plasmodes EDI et 38 plasmodes GO ont été testés après 7 jours d'exposition ; 40 plasmodes par traitement ont été testés après 8 jours d'exposition.

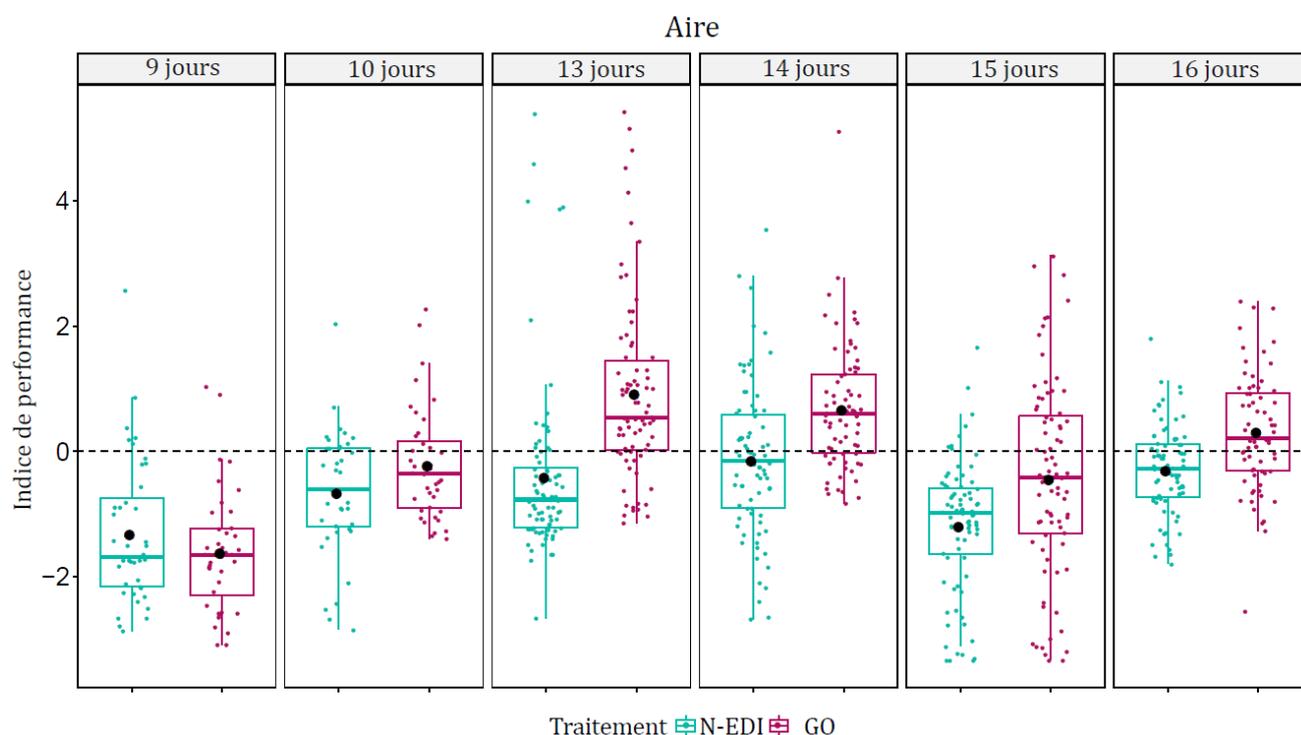


Figure 56 : Indices de performance (calculés à partir des aires) des plasmodes selon le traitement (N-EDI ou GO) selon la durée d'exposition.

40 plasmodes par traitement ont été testés après 9 et 10 jours d'exposition ; 77 plasmodes EDI, 80 plasmodes N-EDI, et 78 plasmodes GO ont été testés après 13 jours d'exposition ; 80 plasmodes EDI et N-EDI, et 74 plasmodes GO ont été testés après 14 jours d'exposition ; 80 plasmodes par traitement ont été testés après 15 jours d'exposition ; 77 plasmodes EDI, 78 plasmodes N-EDI, et 70 plasmodes GO ont été testés après 16 jours d'exposition

6.4. Conclusion générale et perspectives

Physarum polycephalum est devenu un modèle pour l'étude de la cognition chez des organismes non-neuraux, pour de la modélisation de réseaux, l'étude de la morphogenèse, *etc.* Dans cette thèse nous avons cherché à utiliser *P. polycephalum* comme modèle cellulaire pour des études en toxicologie environnementale et humaine.

P. polycephalum est un bon modèle cellulaire pour évaluer la toxicité des nanomatériaux carbonés, et plus largement des nanoparticules. Les tests comportementaux permettent d'évaluer l'effet des NPs sur le déplacement et la prise de décision des plasmodes, ce qui conditionne leur survie. Mais ce type de test n'est pas suffisant pour évaluer la toxicité des NPs. De plus, l'évaluation d'une partie du cycle de vie des NTC dans la cellule nous renseigne sur les effets potentiels de ces nanomatériaux sur les écosystèmes (bioaccumulation, bioamplification, *etc.*).

Mais pour aller plus loin et faire de lui un modèle en toxicologie il faut comprendre les mécanismes d'action sous-jacents des NPs pour comprendre les impacts sur les cellules et à l'échelle de l'individu.

Concernant le cycle de vie des DWCNT dans la cellule, des études complémentaires sont nécessaires. La composition chimique des NTC, essentiellement des atomes de carbone, les rends difficiles à localiser au sein des organismes vivants, eux-mêmes composés d'atomes de carbone (Petersen et al., 2016). Nous ignorons si les DWCNT se localisent préférentiellement dans certaines zones de la cellule (vacuoles, piégés dans l'ectoplasme, *etc.*), ni si leur répartition est homogène, ou non, dans la cellule. Nous n'avons pas pu quantifier les DWCNT présents dans le plasmode, ou dans le mucus. Nous avons essayé par analyse thermogravimétrique mais aucun signal n'est ressorti (sensibilité de la méthode trop faible). Un élément que nous n'avons pas du tout aborder dans cette thèse mais qui serait intéressant à prendre en compte : les effets des DWCNT sur la reproduction de *P. polycephalum*. Il suffirait pour cela de compter le nombre de spores produites (et donc une quantité de descendants potentiels), et d'évaluer leur viabilité.

Concernant les études comportementales, de longues durées d'exposition ne nous ont pas permis de faire ressortir une amplification de l'effet des DWCNT. Il n'est donc peut-être pas nécessaire de faire de longues durées d'exposition mais de se limiter à évaluer l'effet sur les premiers jours. Des études complémentaires aideront à comprendre la variabilité des effets que nous avons observé tout au long de cette thèse. Tout d'abord l'observation de l'organisation du réseau de filaments d'actine, car si les DWCNT perturbent ce réseau cela expliquerai les effets des DWCNT sur les vitesses de déplacement. La prise en compte de la phase du cycle cellulaire des plasmodes serait une amélioration pour voir si c'est corrélé aux effets des DWCNT.

Pour terminer, des analyses métabolomiques et génomiques seraient complémentaires aux études comportementales et permettraient d'avoir une approche intégrale de l'évaluation de la toxicité des DWCNT (et autres nanoparticules). De plus, l'utilisation d'un modèle ayant une pertinence écologique, comme *P. polycephalum*, permettrait de mieux comprendre l'effet des nanoparticules sur les écosystèmes.

6.5. Annexe 6 : Tableaux statistiques

Indice de performance (1 ^{er} pseudopode) 7 et 8 jours d'exposition					
<i>Prédicteurs</i>	<i>Estimés</i>	<i>CI</i>	<i>Statistique</i>	<i>p</i>	<i>df</i>
(Intercept)	0.17	-0.04 – 0.37	1.62	0.106	75.00
[7 jours] vs [8 jours]	-0.61	-0.87 – -0.35	-4.60	<0.001	75.00
Effets Aléatoires					
σ^2	0.35				
$\tau_{00 \text{ ID}}$	0.04				
ICC	0.11				
N_{ID}	20				
Observations	79				
R ² Marginal / R ² Conditionnel	0.195 / 0.283				

Indice de performance (1 ^{er} pseudopode) 9 et 10 jours d'exposition					
<i>Prédicteurs</i>	<i>Estimés</i>	<i>CI</i>	<i>Statistique</i>	<i>p</i>	<i>df</i>
(Intercept)	-0.34	-0.61 – -0.07	-2.48	0.013	102.00
[9 jours] vs [10 jours]	1.13	0.83 – 1.43	7.42	<0.001	102.00
[EDI] vs [GO]	-0.44	-0.76 – -0.13	-2.75	0.006	102.00
Effets Aléatoires					
σ^2	0.62				
$\tau_{00 \text{ ID}}$	0.02				
ICC	0.03				
N_{ID}	28				
Observations	107				
R ² Marginal / R ² Conditionnel	0.369 / 0.389				

Tableau S85 : Statistiques associées à la Figure 54.

Pour évaluer les différences des indices de performances (1^{er} pseudopode), nous avons utilisé un modèle mixte linéaire (fonction *lmer*, famille d'erreur : Gaussienne, Package *lme4*). Le modèle a été ajusté en spécifiant les effets fixes : traitement et durée d'exposition (prédicteur catégorique) ; et l'effet aléatoire : ID (identité du plasmode). La variable dépendante (Indice) a été normalisée à l'aide de la fonction *bestNormalize* (Package *bestNormalize*).

Indice de performance (Aire) 7 et 8 jours d'exposition						
<i>Prédicteurs</i>	<i>Estimés</i>	<i>CI</i>	<i>Statistique</i>	<i>p</i>	<i>df</i>	
(Intercept)	0.09	-0.30 – 0.48	0.45	0.651	74.00	
[7 jours] vs [8 jours]	-0.17	-0.49 – 0.15	-1.05	0.292	74.00	
Effets Aléatoires						
σ^2	0.51					
τ_{00} ID	0.50					
ICC	0.50					
N_{ID}	20					
Observations	78					
R^2 Marginal / R^2 Conditionnel	0.007 / 0.499					

Tableau S86 : Statistiques associées à la Figure 55.

Indice de performance (Aire) Entre 9 et 16 jours d'exposition Comparaison par paires						
Contraste	Estimés	SE	df	t.ratio	p.value	
[RDI] vs [GO] (J9)	0.242	0.195	387	1.239	0.2162	
[RDI] vs [GO] (J10)	-0.317	0.195	387	-1.625	0.1049	
[RDI] vs [GO] (J13)	-0.994	0.161	102	-6.170	<.0001	
[RDI] vs [GO] (J14)	-0.584	0.163	105	-3.589	0.0005	
[RDI] vs [GO] (J15)	-0.538	0.160	100	-3.354	0.0011	
[RDI] vs [GO] (J16)	-0.437	0.165	111	-2.647	0.0093	

Tableau S87 : Statistiques associées à la Figure 56.

Pour évaluer les différences des indices de performances (Aire), nous avons utilisé un modèle mixte linéaire (fonction lmer, famille d'erreur : Gaussienne, Package lme4). Le modèle a été ajusté en spécifiant les effets fixes : traitement et durée d'exposition (prédicteur catégorique) ; et l'effet aléatoire : ID (identité du plasmode). La variable dépendante (Indice) a été normalisée à l'aide de la fonction bestNormalize (Package bestNormalize). Nous avons ensuite réalisé une comparaison par paires (correction de Satterthwaite, Package emmeans) des durées d'exposition.

7. Annexe 7 : Tableaux récapitulatifs

Tableau S88 : Études écotoxicologiques des effets des NTC sur les micro et macroorganismes du sol.

Étude	Modèle	Type de NTC	Durée	Concentration	Effets
(Chung et al., 2011)	Bactéries du sol	MWCNT	30 min 1, 4, et 11 jours	500 et 5000 µg/g	↓ activité enzymatique
			20 jours	5000 µg/g	↓ biomasse
(Jin et al., 2013)	Bactéries du sol	SWCNT	3 semaines	1000 µg/g	↓ activité enzymatique
				> 300 µg/g	↓ biomasse
(Ge et al., 2016)	Bactéries du sol	MWCNT	1 an	1000 µg/g	↓ biomasse Altération de la composition des communautés
(Jin et al., 2014)	Bactéries du sol	SWCNT	25 jours	30 à 1000 µg/g	Altération de la composition des communautés
(Shrestha et al., 2013)	Bactéries du sol	MWCNT	90 jours	10, 100, 1000 µg/g	Pas d'effet sur la respiration du sol, les activités enzymatiques, et la composition des communautés
				10 000 µg/g	Modification de la composition des communautés
(F. Wu et al., 2019)	Bactéries du sol	SWCNT	0, 7, 28 et 56 jours	500, 1000, ou 5000 µg/g	Augmentation de la biomasse Augmentation de la diversité bactérienne (variable selon la durée et la concentration d'exposition)
		MWCNTs 10-20 nm			Pas de changement ou augmentation de la biomasse

		20-30 nm			Augmentation de la diversité bactérienne
		30-50 nm			Réduction de la biomasse Augmentation de la diversité bactérienne
(F. Wu et al., 2021)	Bactéries du sol	SWCNTs	30 et 360 jours	300 µg/g	Augmentation de la diversité bactérienne (après 30 jours) ; Baisse de la diversité bactérienne (après 360 jours)
(Zheng et al., 2014)	Bactéries du sol <i>Paracoccus denitrificans</i>	SWCNT	24h	10 and 50 µg/g	Inhibition de la croissance bactérienne Suppression de la réduction du nitrate (50 µg/g)
(Petersen et al., 2008a)	Ver de terre <i>Eisenia fetida</i>	SWCNT	1, 7, 14, ou 28 jours	30 µg/g de sol	Peu d'absorption Pas de bioaccumulation Elimination rapide
		MWCNT		30 ou 300 µg/g de sol	
(Petersen et al., 2008b)	Ver de terre <i>Lumbriculus variegatus</i>	SWCNT	7, 14 ou 28 jours	3 ou 30 µg/g de sédiment	Peu d'absorption Pas de bioaccumulation Elimination rapide
		MWCNT		37 ou 370 µg/g de sédiment	
(Petersen, Pinto, et al., 2011)	Ver de terre <i>Eisenia fetida</i>	MWCNT-PEI		500 µg/g de sol	Peu d'absorption Pas de bioaccumulation Elimination rapide
(Eom et al., 2015)	Nématode <i>Caenorhabditis elegans</i>	MWCNT	48 ou 72h	1 mg/L	↓ 15% du potentiel reproducteur Stress oxydant et stress du réticulum endoplasmique
				> 500 mg/L	Pas de mortalité
(Scott-Fordsmand et al., 2008)	Ver de terre <i>Eisenia veneta</i>	DWCNT	Expositions aux jours 7, 14 et 21	> 37 µg/g, ou 495 µg/g de nourriture	Eclosion, croissance et mortalité non affectés ↓ 60% du nombre de cocons

(X. Yang et al., 2022)	Vers de terre - <i>Eisenia fetida</i>	MWCNT	28 jours	10, 50, 100 µg/g	<p>Pas d'effet sur la croissance et la reproduction</p> <p>A 50 mg/kg : augmentation de l'activité des cytochrome P450 (isoformes 2C9, 34A), SOD, CAT, GST</p> <p>A 100 mg/kg : augmentation de l'activité des cytochrome P450 (isoformes 1A2, 2C9, 34A), SOD</p>
------------------------	--	-------	----------	------------------	---

Tableau S89 : Tableau récapitulatif des études utilisant *P. polycephalum* en tant que modèle cellulaire pour évaluer l'effet de différentes NPs et autres polluants.

Étude	Stade de <i>P. polycephalum</i>	Polluant testé	Durée	Concentration	Effets
(Mayne et al., 2011)	Macroplasmode	Nanoparticules de magnétite	< 1 jour	200 µL / plasmode (Concentration non précisée)	Altération de la morphologie Altération du comportement nutritif
(Gizzie, Mayne, & Adamatzky, 2016)	Macroplasmode	SWCNT	< 1 jour	800 µg / plasmode (200 µL de suspension à 4 mg/mL)	↓ taux de croissance Morphologie inchangée ↑ du potentiel membranaire ↑ période d'oscillation ↓ de la résistance
(Gizzie, Mayne, Yitzchaik, et al., 2016)	Macroplasmode (souche HU554 x HU560)	Nanoparticules d'or	2 jours	25 µL / plasmode (Concentration non précisée)	Morphologie affectée ↓ taux de croissance Tendance à l'↑ de la période de contraction ↓ résistance électrique
(Matveeva et al., 2006)	Microplasmode	Nanoparticules d'argent	1h	1 µg-ion/L	Pas ↑ mortalité
	Macroplasmode (souche VKM F-3283)		36h	10 µg-ion/L	↑ mortalité
(Z Zhang et al., 2018)	Macroplasmode (souche M3CVII)	Nanoparticules de dioxyde de titane	3 jours	0, 9, 15, ou 18 mg/mL	↑ biomasse (9 mg/mL) ↓ biomasse (15 et 18 mg/mL) Stress oxydant Perturbations métaboliques
(Zhi Zhang et al., 2021)	Macroplasmode	Nanoparticules de dioxyde de titane	3 jours	0, 5, 9, 15, ou 18 mg/mL	↑ biomasse (5 et 9 mg/mL) ↓ biomasse (15 et 18 mg/mL) ↑ activité de la catalase ↑ glutathion Perturbations métaboliques

(Terayama et al., 1978)	Macroplasmode	Métaux lourds	< 1 jour	> 10 mg/L CdCl ₂ > 2 mg/L HgCl ₂ > 20 mg/L Pb (CH ₃ CO ₂) ₂ > 40 mg/L CuSO ₄	↓ Force motrice et arrêt du flux protoplasmique (irréversible) ↑ potentiel de membrane (irréversible)
		Insecticides		> 100 mg/L EPN > 300 mg/L DDVP > 350 mg/L Phosvel > 400 mg/L Baycid	
(Sina & Chin, 1978)	Microplasmode	Cadmium	30 min ou 4h	< 10 ⁻⁴ M CdSO ₄	Pas de toxicité observée
			4h	5.10 ⁻⁴ M ou 1,5.10 ⁻³ M CdSO ₄	↓ synthèse ARN Modification structure du nucléole
(Shraideh, 2006)	Macroplasmode (souche ATCC 44912)	Cadmium	2h	< 5 mM CdCl ₂	Pas de toxicité observée
				< 7,5 - 20 mM CdCl ₂	Perturbation du flux cytoplasmique ↑ de la période de contraction (7,5 et 10 mM) Dépigmentation ↓ vitesse de déplacement et de croissance Vacuolisation du cytoplasme
(Shraideh, 2007)	Macroplasmode	Plomb	1-2h	15, 30, 45 µg/mL PbCl ₂	Vacuolisation du cytoplasme ↑ de la période de contraction (réversible à 15 µg/mL) Désintégration de la membrane (30 et 45 µg/mL)
				50 µg/mL PbCl ₂	Dose létale Désorganisation et fragmentation du plasmode Arrêt du flux cytoplasmique

(Shraideh, 2010)	Macroplasmode (souche ATCC 44912)	Plomb	4h	< 10 μM TriEL	Pas de toxicité observée
				20 - 50 μM TriEL	Vacuolisation du cytoplasme \uparrow de la période de contraction \downarrow vitesse de déplacement Désintégration de la membrane
				60 μM TriEL	Dépigmentation Dose létale Désorganisation et fragmentation du plasmode Arrêt du flux cytoplasmique
(Maraqa et al., 2015)	Macroplasmode (souche ATCC 44912)	Mercure	1h	5 - 10 μM HgCl_2	Condensation cytoplasmique Rupture des veines fines Vacuolisation \uparrow de la période de contraction \downarrow de la croissance (10 μM)
				15 $\mu\text{g/mL}$ HgCl_2	Dépigmentation Vacuolisation Désorganisation et désintégration de la membrane plasmique Arrêt du flux cytoplasmique en quelques minutes
				20 $\mu\text{g/mL}$ HgCl_2	Arrêt immédiat du flux cytoplasmique

CdCl₂ : Chlorure de cadmium ; CdSO₄ : Sulfate de cadmium ; CuSO₄ : Sulfate de cuivre (II) ; DDVP : Dichlorvos (Phosphate de 2,2-dichlorovinyle et de diméthyle), acaricide ; HgCl₂ : Chlorure de mercure (II) ; Pb (CH₃CO₂)₂ : Acétate de plomb (II) ; PbCl₂ : Chlorure de plomb (II) ; TriEL : Chlorure de triéthyl de plomb.

Tableau S90 : Études toxicologiques des effets des NTC sur les cellules.

Étude	Espèce	Type de NTC	Durée	Concentration	Effets
(Shvedova et al., 2008)	Souris C57BL/6	SWCNT	4 jours	Inhalation : 5 mg/m ³ (5h/jour) Aspiration : 5 à 20 µg/souris	Réponse inflammatoire Fibrose Effets par inhalation > Effets par aspiration Stress oxydant
(Sager et al., 2022)	Rats Fischer 344	MWCNT-7	3 jours	22,5 à 180 mg/m ³ (6h/jour)	Réponse inflammatoire Fibrose Formation de granulomes Modifications morphologiques alvéolaires (180 mg/m ³) Stress oxydant
(Gaté et al., 2019)	Rats Sprague Dawley	MWCNT (NM-401 et NM-403)	4 semaines Observation des tissus à : 1, 3, 28, 30, 90 et 180 jours	Inhalation : 0,5 ou 1,5 mg/m ³ (2x3h/jour, 5 jours/semaine)	Réponse inflammatoire dose-dépendante Pas de fibrose Dommages à l'ADN
				Intratrachéal : 0,5 ou 1,5 mg/m ³ (2x3h/jour, 5 jours/semaine)	Réponse inflammatoire dose-dépendante Fibrose (NM-401) Dommages à l'ADN
(P. Zhang et al., 2020)	Cellules du cancer de l'ovaire SKOV3	MWCNT	1 ou 2 jours	1, 5, 20, 50, 100, 200 µg/mL	Baisse de la viabilité cellulaire
			1 jour	0, 20, 50, 100 µg/mL	Perturbation du réseau d'actine
			1 jour	20, 100 µg/mL	Suppression de la migration cellulaire
			0, 6, 12 et 24h	0, 20, 100 µg/mL	Inhibition de la cicatrisation

(Badea et al., 2022)	Cellules de cancer du sein (MDA-MB-231)	SWCNT-COOH-CDDP	1 et 2 jours	0.01–2 µg/mL SWCNT-COOH et 0.00632–1.26 µg/mL CDDP	Baisse de la viabilité cellulaire Inhibition de la migration cellulaire (inhibition de la voie PI3K/Akt)
(Nguyen et al., 2023)	Cellules de cancer du sein (MCF-7 et SUM-159)	CNT-COOH-HAP	1 et 2 jours	5–50 µg/mL	Baisse de la viabilité cellulaire (MCF-7 < SUM-159) Inhibition de la capacité clonogénique des cellules Pas d'inhibition de la migration cellulaire
(Shams et al., 2014)	Filaments d'actine (simulations informatiques)	SWCNT			Interaction énergétiquement favorable possible
(Holt et al., 2010)	Cellules HeLa	SWCNT	2 jours	50, 200 µg/mL	Pas de mort cellulaire Pas de dommages à l'ADN Altération de la prolifération cellulaire (formation de faisceaux de FA)
(Holt et al., 2012)	Cellules HeLa Cellules NIH-3T3 Cellules hMSC	SWCNT	1 jour 1 jour 3 jours	100 µg/mL	Interaction avec les FA Réduction de la longueur des FA Pas d'effet sur la myosine II
(Wils, Jacobsen, Vogel, et al., 2021)	Souris (analyse du liquide de lavage pleural)	MWCNT (MWCNT-7 et NM-401)	1 ou 90 jours après une exposition unique	5µg/souris (administration intrapleurale)	↑ réponse inflammatoire ↑ production de ROS Pas de cassures de brin d'ADN selon MWCNT
		SWCNT (NM-411)			Pas de réponse inflammatoire

					Pas de production de ROS ↑ cassures de brin d'ADN
(Wils, Jacobsen, Di Ianni, et al., 2021)	Cellules épithéliales pulmonaires de souris (FE1-Muta™)	SWCNT (NM-411) MWCNT (MWCNT-7 et NM-401)	70 jours	> 40 µg/mL	↑ dommages à l'ADN ↑ production de ROS
(Pulskamp, Wörle-Knirsch, et al., 2007)	Cellules épithéliales alvéolaires humaines (A549)	SWCNT (NT1-AP)	10 min et 24h	5, 10, 50 et 100 µg/mL	↑ production de ROS (5 et 10 µg/mL) puis ↓ production de ROS (50 et 100 µg/mL)
(Lindberg et al., 2009)	Cellules épithéliales bronchiales humaines (BEAS-2B)	SWCNT (> 50%) et autres NTC (~ 40%)	24h, 48h, 72h	3,8 – 380 µg/mL	↑ de la viabilité cellulaire aux faibles doses (à 48h, 38 et 76 µg/mL ; à 72h, de 3,8 à 76 µg/mL) ↓ de la viabilité cellulaire aux plus fortes doses
(Pulskamp, Diabaté, et al., 2007)	Macrophages alvéolaires de rats (NR8383)	SWCNT MWCNT	24h	5, 10, 50 et 100 µg/mL	↑ de la viabilité cellulaire (5-50 µg/mL) ↓ de la viabilité cellulaire (>50 µg/mL)

PEI : polyéthylèneimine ; CDDP : cisplatine (médicament analogue du platine utilisé en chimiothérapie) ; HAP : hydroxyapatite (espèce minérale de la famille des phosphates, que l'on retrouve dans la composition de nos dents)

Tableau S91 : Études décrivant la toxicité des DWCNTs sur différents modèles.

Étude	Modèle	Type de NTC	Durée	Concentration	Effets
(Mouchet et al., 2007)	Larves d' <i>Ambystoma mexicanum</i> (amphibien)	DWCNT	12 jours	1, 10, 125, 250, 500 1000 mg/L	Pas de mortalité Pas de génotoxicité
(Mouchet et al., 2008)	Larves de <i>Xenopus laevis</i> (amphibien)	DWCNT	12 jours	10 mg/L	0% de mortalité (milieu statique) 15% de mortalité (milieu renouvelé) Pas de génotoxicité
				100 mg/L	0% de mortalité (milieu statique) 5% de mortalité (milieu renouvelé) Pas de génotoxicité
				500 mg/L	85% de mortalité (milieu statique) 5% de mortalité (milieu renouvelé) Pas de génotoxicité
(Mouchet et al., 2011)	Larves de <i>Xenopus laevis</i> (amphibien)	DWCNT	12 jours	1 mg/L	Génotoxicité (milieu avec gomme arabique (GA))
				0.1, 10, ou 50 mg/L	Pas de génotoxicité 5% et 15% de mortalité (à 10 et 50 mg/L respectivement, milieu sans GA)

					↓ croissance (10 et 50 mg/L) (milieu avec et sans GA)
(Kwok et al., 2010)	<i>Thalassiosira pseudonana</i> (diatomée)	DWCNT (so-DWCNT dispersés par sonication ; st-DWCNT dispersés par agitation)	na	EC ₅₀ : 1,86 mg/l (so-DWNT) ; 22,7 mg/l (st-DWNT)	↓ croissance
	0,1 mg/l (so-DWNT)			↑ délai reproduction	
	<i>Tigriopus japonicus</i> (copépode)		20-30 jours	10 mg/l (st-DWNT)	↑ délai reproduction
				50 et 100 mg/l (so-DWCNT et st-DWNT)	↑ mortalité
	<i>Oryzias melastigma</i> (poisson)	14 jours	10 mg/l (so-DWNT) 100 mg/l (st-DWNT)	↓ croissance	
(Crouzier et al., 2010)	Poumons de souris	DWCNT	6, 24, ou 48h	1,5 mg/kg	↑ épaisseur paroi alvéolaire (24 et 48h) ↓ ROS (24 et 48h) ↑ Réponse inflammatoire (cytokine leptine)
(Meunier et al., 2012)	Monocytes humains (PHMs)	DWCNT	5h (RT-PCR) 18h (quantification médiateurs inflammation)	25 µg/mL	Pas de génération de ROS Activation de l'inflammasome NLRP3 ↑ de certaines interleukines
(Olivi et al., 2013)	<i>Staphylococcus aureus</i> (bactérie Gram-positive)	SWCNT DWCNT MWCNT (2 types)	24h (test de viabilité et morphologiques)	100 µg/mL	↓ viabilité (DWCNT et MWCNT) ↑ ROS

Annexe 7 : Tableaux récapitulatifs

	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> (bactérie Gram-négative)		5h (quantification de ROS)		↓ viabilité ↑ ROS (DWCNT et MWCNT)
	<i>Candida albicans</i> (levure)				↓ viabilité (DWCNT et MWCNT) ↑ ROS
(Verneuil et al., 2015)	<i>Nitzschia palea</i> (diatomée)	DWCNT	48h	1, 10, ou 50 mg/L	↓ croissance (de 29% à 84% selon la [C]) Pas de mortalité Surproduction de substances polymères extracellulaires
					144h (6 jours)
(Liné et al., 2021)	<i>Solanum lycopersicum</i> (Tomate)	DWCNT		100 mg/kg de sol	Aucun effet
	<i>Brassica napus</i> (Colza)				↑ 58% biomasse des feuilles
	<i>Cucumis sativus</i> (Concombre)				↑ 64% biomasse des feuilles ↑ 29% [chlorophylle]
	<i>Zea mays</i> (Maïs)				↓ 14% biomasse
	Les 4 espèces confondues				Pas d'effet sur taux de germination, nombre de feuilles, biomasse des racines, biomasse totale, teneur en eau des racines.

EC₅₀ : concentration efficace médiane (concentration pour laquelle il y a 50% d'inhibition de croissance)

8. Annexe 8 : Bibliographie

- Abe, T., Takano, H., Sasaki, N., Mori, K., & Kawano, S. (2000). In vitro DNA fragmentation of mitochondrial DNA caused by single-stranded breakage related to macroplasmoidal senescence of the true slime mold, *Physarum polycephalum*. *Current Genetics*, *37*, 125–135.
- Adamatzky, A. (2017). Thirty seven things to do with live slime mould. In *Advances in Unconventional Computing* (pp. 709–738). Springer.
- Adler, P. N., & Holt, C. E. (1974). Change in properties of *Physarum polycephalum* amoebae during extended culture. *Journal of Bacteriology*, *120*(1), 532–533.
- Aldrich, H. (2012). *Cell biology of Physarum and Didymium VI: organisms, nucleus, and cell cycle* (Academic P). Elsevier.
- Alim, K., Amselem, G., Peaudecerf, F., Brenner, M. P., & Pringle, A. (2013). Random network peristalsis in *Physarum polycephalum* organizes fluid flows across an individual. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *110*(33), 13306–13311. <https://doi.org/10.1073/pnas.1305049110>
- Allen, R. G., Newton, R. K., Sohal, R. S., Shipley, G. L., & Nations, C. (1985). Alterations in superoxide dismutase, glutathione, and peroxides in the plasmodial slime mold *Physarum polycephalum* during differentiation. *Journal of Cellular Physiology*, *125*(3), 413–419.
- Andersen, A. J., Hashemi, S. H., Andresen, T. L., Hunter, A. C., & Moghimi, S. M. (2009). Complement: alive and kicking nanomedicines. *Journal of Biomedical Nanotechnology*, *5*(4), 364–372.
- ANSES. (2022). *Déclaration des substances à l'état nanoparticulaire exercice 2021*.
- Arias, L. R., & Yang, L. (2009). Inactivation of bacterial pathogens by carbon nanotubes in suspensions. *Langmuir*, *25*(5), 3003–3012.
- Avcı, A., İnci, İ., & Baylan, N. (2020). Adsorption of ciprofloxacin hydrochloride on multiwall carbon nanotube. *Journal of Molecular Structure*, *1206*, 127711.
- Badea, M. A., Balas, M., Prodana, M., Cojocaru, F. G., Ionita, D., & Dinischiotu, A. (2022). Carboxyl-Functionalized Carbon Nanotubes Loaded with Cisplatin Promote the Inhibition of PI3K/Akt Pathway and Suppress the Migration of Breast Cancer Cells. *Pharmaceutics*, *14*(2), 469.
- Baldauf, S. L., & Doolittle, W. F. (1997). Origin and evolution of the slime molds (Mycetozoa). *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *94*(22), 12007–12012.
- Barrejon, M., Marchesan, S., Alegret, N., & Prato, M. (2021). Carbon nanotubes for cardiac tissue regeneration: State of the art and perspectives. *Carbon*, *184*, 641–650.
- Bastiaans, E., Debets, A. J. M., & Aanen, D. K. (2015). Experimental demonstration of the benefits of somatic fusion and the consequences for allorecognition. *Evolution*, *69*(4), 1091–1099.
- Bäuerle, F. K., Kramar, M., & Alim, K. (2017). Spatial mapping reveals multi-step pattern of wound healing in *Physarum polycephalum*. *Journal of Physics D: Applied Physics*, *50*(43). <https://doi.org/10.1088/1361-6463/aa8a21>
- Becker, J., Daniel, J. W., & Rusch, H. P. (1963). Growth inhibition of *physarum polycephalum* for the evaluation of chemotherapeutic agents. *Cancer Research*, *23*(10_Part_2), 1910–1929.
- Beekman, M., & Latty, T. (2015). Brainless but multi-headed: decision making by the acellular slime mould *Physarum polycephalum*. *Journal of Molecular Biology*, *427*(23), 3734–3743.
- Benard, M., Pallotta, D., & Pierron, G. (1992). Structure and identity of a late-replicating and

- transcriptionally active gene. *Experimental Cell Research*, 201(2), 506–513.
- Bjorkl, R., Tobias, D. A., & Petersen, E. J. (2017). Increasing evidence indicates low bioaccumulation of carbon nanotubes. *Environmental Science: Nano*, 4(4), 747–766. <https://doi.org/10.1039/c6en00389c>
- Block, I., Wolke, A., & Briegleb, W. (1994). Gravitational response of the slime mold *Physarum*. *Advances in Space Research*, 14(8), 21–34.
- Boisseau, R. P., Vogel, D., & Dussutour, A. (2016). Habituation in non-neural organisms: Evidence from slime moulds. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, 283(1829), 2–8. <https://doi.org/10.1098/rspb.2016.0446>
- Bortolamiol, T., Lukanov, P., Galibert, A.-M., Soula, B., Lonchambon, P., Datas, L., & Flahaut, E. (2014). Double-walled carbon nanotubes: quantitative purification assessment, balance between purification and degradation and solution filling as an evidence of opening. *Carbon*, 78, 79–90.
- Bourdiol, F., Mouchet, F., Perrault, A., Fourquaux, I., Datas, L., Gancet, C., Boutonnet, J.-C., Pinelli, E., Gauthier, L., & Flahaut, E. (2013). Biocompatible polymer-assisted dispersion of multi walled carbon nanotubes in water, application to the investigation of their ecotoxicity using *Xenopus laevis* amphibian larvae. *Carbon*, 54, 175–191.
- Boussard, A., Delescluse, J., Pérez-Escudero, A., & Dussutour, A. (2019). Memory inception and preservation in slime moulds: the quest for a common mechanism. *Philosophical Transactions of the Royal Society B*, 374(1774), 20180368.
- Boussard, A., Fessel, A., Oettmeier, C., Briard, L., Döbereiner, H.-G., & Dussutour, A. (2021). Adaptive behaviour and learning in slime moulds: the role of oscillations. *Philosophical Transactions of the Royal Society B*, 376(1820), 20190757.
- Briard, L., Goujarde, C., Bousquet, C., & Dussutour, A. (2020). Stress signalling in acellular slime moulds and its detection by conspecifics. *Philosophical Transactions of the Royal Society B*, 375(1802), 20190470.
- Butun, S., Ince, F. G., Erdugan, H., & Sahiner, N. (2011). One-step fabrication of biocompatible carboxymethyl cellulose polymeric particles for drug delivery systems. *Carbohydrate Polymers*, 86(2), 636–643.
- Cainelli, R., de Haan, M., Meyer, M., Bonkowski, M., & Fiore-Donno, A. M. (2020). Phylogeny of Physarida (Amoebozoa, Myxogastria) Based on the Small-Subunit Ribosomal RNA Gene, Redefinition of *Physarum pusillum* s. str. and Reinstatement of *P. gravidum* Morgan. *Journal of Eukaryotic Microbiology*, 67(3), 327–336.
- Canu, I. G., Bateson, T. F., Bouvard, V., Debia, M., Dion, C., Savolainen, K., & Yu, I.-J. (2016). Human exposure to carbon-based fibrous nanomaterials: A review. *International Journal of Hygiene and Environmental Health*, 219(2), 166–175.
- Canu, I. G., Batsungnoen, K., Maynard, A., & Hopf, N. B. (2020). State of knowledge on the occupational exposure to carbon nanotubes. *International Journal of Hygiene and Environmental Health*, 225, 113472.
- Chadar, R., Afzal, O., Alqahtani, S. M., & Kesharwani, P. (2021). Carbon nanotubes as an emerging nanocarrier for the delivery of doxorubicin for improved chemotherapy. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 208, 112044.
- Chan, T. S. Y., Nasser, F., St-Denis, C. H., Bols, N. C., & Tang, S. (2009). Interactions between Single-Walled Carbon Nanotubes (SWNT) and Ciliates: SWNT Interfere with Ciliate Ecological Functions and Ciliates Transport/Transform SWNT. *MRS Online Proceedings Library (OPL)*, 1204.
- Chen, E. H., Grote, E., Mohler, W., & Vignery, A. (2007). Cell-cell fusion. *FEBS Letters*, 581(11), 2181–2193.
- Chen, G., Qiu, J., Liu, Y., Jiang, R., Cai, S., Liu, Y., Zhu, F., Zeng, F., Luan, T., & Ouyang, G. (2015). Carbon nanotubes act as contaminant carriers and translocate within plants.

Scientific Reports, 5(1), 1–9.

- Chen, M., Sun, Y., Liang, J., Zeng, G., Li, Z., Tang, L., Zhu, Y., Jiang, D., & Song, B. (2019). Understanding the influence of carbon nanomaterials on microbial communities. *Environment International*, 126, 690–698.
- Chen, S., & Alim, K. (2023). Network topology enables efficient response to environment in *Physarum polycephalum*. *Physical Biology*, 20(4), 46003.
- Chen, Z., Meng, H., Xing, G., Yuan, H., Zhao, F., Liu, R., Chang, X., Gao, X., Wang, T., Jia, G., & others. (2008). Age-related differences in pulmonary and cardiovascular responses to SiO₂ nanoparticle inhalation: nanotoxicity has susceptible population. *Environmental Science & Technology*, 42(23), 8985–8992.
- Cheng, J., Chan, C. M., Veca, L. M., Poon, W. L., Chan, P. K., Qu, L., Sun, Y. P., & Cheng, S. H. (2009). Acute and long-term effects after single loading of functionalized multi-walled carbon nanotubes into zebrafish (*Danio rerio*). *Toxicology and Applied Pharmacology*, 235(2), 216–225. <https://doi.org/10.1016/j.taap.2008.12.006>
- Chung, H., Son, Y., Yoon, T. K., Kim, S., & Kim, W. (2011). The effect of multi-walled carbon nanotubes on soil microbial activity. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 74(4), 569–575.
- Cicchetti, R., Divizia, M., Valentini, F., & Argentin, G. (2011). Effects of single-wall carbon nanotubes in human cells of the oral cavity: Geno-cytotoxic risk. *Toxicology in Vitro*, 25(8), 1811–1819.
- Côté, I. M., Darling, E. S., & Brown, C. J. (2016). Interactions among ecosystem stressors and their importance in conservation. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, 283(1824), 20152592.
- Crouzier, D., Follot, S., Gentilhomme, E., Flahaut, E., Arnaud, R., Dabouis, V., Castellarin, C., & Debouzy, J.-C. (2010). Carbon nanotubes induce inflammation but decrease the production of reactive oxygen species in lung. *Toxicology*, 272(1–3), 39–45.
- De La Torre-Roche, R., Hawthorne, J., Deng, Y., Xing, B., Cai, W., Newman, L. A., Wang, Q., Ma, X., Hamdi, H., & White, J. C. (2013). Multiwalled carbon nanotubes and C60 fullerenes differentially impact the accumulation of weathered pesticides in four agricultural plants. *Environmental Science & Technology*, 47(21), 12539–12547.
- de las Casas, C., & Li, W. (2012). A review of application of carbon nanotubes for lithium ion battery anode material. *Journal of Power Sources*, 208, 74–85. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.jpowsour.2012.02.013>
- De Volder, M. F. L., Tawfick, S. H., Baughman, R. H., & Hart, A. J. (2013). Carbon nanotubes: present and future commercial applications. *Science*, 339(6119), 535–539.
- Dehghani, M. H., Kamalian, S., Shayeghi, M., Yousefi, M., Heidarinejad, Z., Agarwal, S., & Gupta, V. K. (2019). High-performance removal of diazinon pesticide from water using multi-walled carbon nanotubes. *Microchemical Journal*, 145, 486–491.
- Dimonte, A., Cifarelli, A., Berzina, T., Chiesi, V., Ferro, P., Besagni, T., Albertini, F., Adamatzky, A., & Erokhin, V. (2015). Magnetic nanoparticles-loaded *Physarum polycephalum*: Directed growth and particles distribution. *Interdisciplinary Sciences: Computational Life Sciences*, 7, 373–381.
- Domenech, J., Rodriguez-Garraus, A., de Cerain, A., Azqueta, A., & Catalán, J. (2022). Genotoxicity of Graphene-Based Materials. *Nanomaterials*, 12(11), 1795.
- Dong, C., Eldawud, R., Sargent, L. M., Kashon, M. L., Lowry, D., Rojanasakul, Y., & Dinu, C. Z. (2015). Carbon nanotube uptake changes the biomechanical properties of human lung epithelial cells in a time-dependent manner. *Journal of Materials Chemistry B*, 3(19), 3983–3992.
- Dresselhaus, M. S., Dresselhaus, G., Charlier, J.-C., & Hernandez, E. (2004). Electronic, thermal and mechanical properties of carbon nanotubes. *Philosophical Transactions of*

- the Royal Society of London. Series A: Mathematical, Physical and Engineering Sciences*, 362(1823), 2065–2098.
- Durham, A. C., & Ridgway, E. B. (1976). Control of chemotaxis in *Physarum polycephalum*. *The Journal of Cell Biology*, 69(1), 218–223.
- Dussutour, A. (2021). Learning in single cell organisms. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 564, 92–102.
- Dussutour, A., Latty, T., Beekman, M., & Simpson, S. J. (2010). Amoeboid organism solves complex nutritional challenges. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 107(10), 4607–4611.
<https://doi.org/10.1073/pnas.0912198107>
- Dussutour, A., Ma, Q., & Sumpter, D. (2019). Phenotypic variability predicts decision accuracy in unicellular organisms. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, 286(1896). <https://doi.org/10.1098/rspb.2018.2825>
- Elek, O., Burchett, J. N., Prochaska, J. X., & Forbes, A. G. (2022). Monte Carlo *Physarum* Machine: Characteristics of Pattern Formation in Continuous Stochastic Transport Networks. *Artificial Life*, 28(1), 22–57.
- Eom, H.-J., Roca, C. P., Roh, J.-Y., Chatterjee, N., Jeong, J.-S., Shim, I., Kim, H.-M., Kim, P.-J., Choi, K., Giralt, F., & others. (2015). A systems toxicology approach on the mechanism of uptake and toxicity of MWCNT in *Caenorhabditis elegans*. *Chemico-Biological Interactions*, 239, 153–163.
- EPA. (2008). Toxic substances control act inventory status of carbon nanotubes. *Federal Register*, 73(212), 64946–64947.
- Evariste, L., Lagier, L., Gonzalez, P., Mottier, A., Mouchet, F., Cadarsi, S., Lonchambon, P., Daffe, G., Chimowa, G., Sarrieu, C., & others. (2019). Thermal reduction of graphene oxide mitigates its in vivo genotoxicity toward *xenopus laevis* tadpoles. *Nanomaterials*, 9(4), 584.
- Everhart, S. E., & Keller, H. W. (2008). Life history strategies of corticolous myxomycetes: the life cycle, plasmodial types, fruiting bodies, and taxonomic orders. *Fungal Diversity*, 29(1), 1–16.
- Farajpour, A., & Rastgoo, A. (2017). Influence of carbon nanotubes on the buckling of microtubule bundles in viscoelastic cytoplasm using nonlocal strain gradient theory. *Results in Physics*, 7, 1367–1375.
- Fenoglio, I., Greco, G., Tomatis, M., Muller, J., Raymundo-Pinero, E., Béguin, F., Fonseca, A., Nagy, J. B., Lison, D., & Fubini, B. (2008). Structural defects play a major role in the acute lung toxicity of multiwall carbon nanotubes: physicochemical aspects. *Chemical Research in Toxicology*, 21(9), 1690–1697.
- Fenoglio, I., Tomatis, M., Lison, D., Muller, J., Fonseca, A., Nagy, J. B., & Fubini, B. (2006). Reactivity of carbon nanotubes: free radical generation or scavenging activity? *Free Radical Biology and Medicine*, 40(7), 1227–1233.
- Fischer, M. S., & Glass, N. L. (2019). Communicate and fuse: how filamentous fungi establish and maintain an interconnected mycelial network. *Frontiers in Microbiology*, 10, 619.
- Flahaut, E., Agnoli, F., Sloan, J., O'Connor, C., & Green, M. L. H. (2002). CCVD synthesis and characterization of cobalt-encapsulated nanoparticles. *Chemistry of Materials*, 14(6), 2553–2558.
- Flahaut, E., Bacsá, R., Peigney, A., & Laurent, C. (2003). Gram-scale CCVD synthesis of double-walled carbon nanotubes. *Chemical Communications*, 12, 1442–1443.
- Francis, A. P., & Devasena, T. (2018). Toxicity of carbon nanotubes: A review. In *Toxicology and Industrial Health* (Vol. 34, Issue 3, pp. 200–210).
<https://doi.org/10.1177/0748233717747472>

- Gabaudan, V., Touja, J., Cot, D., Flahaut, E., Stievano, L., & Monconduit, L. (2019). Double-walled carbon nanotubes, a performing additive to enhance capacity retention of antimony anode in potassium-ion batteries. *Electrochemistry Communications*, *105*, 106493.
- Galloway, T., Lewis, C., Dolciotti, I., Johnston, B. D., Moger, J., & Regoli, F. (2010). Sublethal toxicity of nano-titanium dioxide and carbon nanotubes in a sediment dwelling marine polychaete. *Environmental Pollution*, *158*(5), 1748–1755. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2009.11.013>
- Gao, C., Liu, C., Schenz, D., Li, X., Zhang, Z., Jusup, M., Wang, Z., Beekman, M., & Nakagaki, T. (2019). Does being multi-headed make you better at solving problems? A survey of Physarum-based models and computations. *Phfile:///Users/Manonvernois/Desktop/Données NTC M2/Biblio/Blob/Gao_al_2019.Pdf* *physics of Life Reviews*, *29*, 1–26. <https://doi.org/10.1016/j.plrev.2018.05.002>
- García-Hevia, L., Fernández, F., Grávalos, C., García, A., Villegas, J. C., & Fanarraga, M. L. (2014). Nanotube interactions with microtubules: Implications for cancer medicine. In *Nanomedicine* (Vol. 9, Issue 10, pp. 1581–1588). <https://doi.org/10.2217/nnm.14.92>
- García-Hevia, L., Valiente, R., González, J., Luis Fernandez-Luna, J., C Villegas, J., & L Fanarraga, M. (2015). Anti-cancer cytotoxic effects of multiwalled carbon nanotubes. *Current Pharmaceutical Design*, *21*(15), 1920–1929.
- Gaté, L., Knudsen, K. B., Seidel, C., Berthing, T., Chézeau, L., Jacobsen, N. R., Valentino, S., Wallin, H., Bau, S., Wolff, H., & others. (2019). Pulmonary toxicity of two different multi-walled carbon nanotubes in rat: Comparison between intratracheal instillation and inhalation exposure. *Toxicology and Applied Pharmacology*, *375*, 17–31.
- Ge, Y., Priester, J. H., Mortimer, M., Chang, C. H., Ji, Z., Schimel, J. P., & Holden, P. A. (2016). Long-Term Effects of Multiwalled Carbon Nanotubes and Graphene on Microbial Communities in Dry Soil. *Environmental Science and Technology*, *50*(7), 3965–3974. <https://doi.org/10.1021/acs.est.5b05620>
- Gevers, M., Fracella, F., & Rensing, L. (1997). Nuclear translocation of constitutive heat shock protein 70 during S phase in synchronous macroplasmidia of Physarum polycephalum. *FEMS Microbiology Letters*, *152*(1), 89–94.
- Ghafari, P., St-Denis, C. H., Power, M. E., Jin, X., Tsou, V., Mandal, H. S., Bols, N. C., & Tang, X. (2008). Impact of carbon nanotubes on the ingestion and digestion of bacteria by ciliated protozoa. *Nature Nanotechnology*, *3*(6), 347–351. <https://doi.org/10.1038/nnano.2008.109>
- Ghosh, M., Ghosh, I., Godderis, L., Hoet, P., & Mukherjee, A. (2019). Genotoxicity of engineered nanoparticles in higher plants. *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, *842*, 132–145.
- Giraud, L., Tourrette, A., & Flahaut, E. (2021). Carbon nanomaterials-based polymer-matrix nanocomposites for antimicrobial applications: A review. *Carbon*, *182*, 463–483.
- Gizzie, N., Mayne, R., & Adamatzky, A. (2016). On modulating the Physarum polycephalum plasmodium's electrical resistance, resting membrane potential and capacitance by application of nanoparticles and nanostructures. *Organic Electronics*, *32*, 267–273.
- Gizzie, N., Mayne, R., Yitzchaik, S., Ikbali, M., & Adamatzky, A. (2016). Living Wires — Effects of Size and Coating of Gold Nanoparticles in Altering the Electrical Properties of Physarum polycephalum and Lettuce Seedlings. *Nano LIFE*, *06*(01), 1650001. <https://doi.org/10.1142/s179398441650001x>
- Global Market Insights Inc. (2023). *Carbon Nanotubes Market - By Product (Single Wall, Multi Wall), By Technology (Chemical Vapor Deposition, Catalytic CVD, Arc Discharge), By Application (Batteries, Automotive, A&D, Medical, Chemical &*

- Polymers, Energy*), *By Region - Global Forecast to 2032*.
<https://www.gminsights.com/industry-analysis/carbon-nanotubes-market>
- Gottschalk, F., Lassen, C., Kjoelholt, J., Christensen, F., & Nowack, B. (2015). Modeling flows and concentrations of nine engineered nanomaterials in the Danish environment. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, *12*(5), 5581–5602.
- Gottschalk, F., Sonderer, T., Scholz, R. W., & Nowack, B. (2009). Modeled environmental concentrations of engineered nanomaterials (TiO₂, ZnO, Ag, CNT, fullerenes) for different regions. *Environmental Science & Technology*, *43*(24), 9216–9222.
- Gray, W. D. (1939). The relation of pH and temperature to the fruiting of *Physarum polycephalum*. *American Journal of Botany*, 709–714.
- Green, A. A., & Hersam, M. C. (2011). Properties and application of double-walled carbon nanotubes sorted by outer-wall electronic type. *Acs Nano*, *5*(2), 1459–1467.
- Grosse, Y., Loomis, D., Guyton, K. Z., Lauby-Secretan, B., El Ghissassi, F., Bouvard, V., Benbrahim-Tallaa, L., Guha, N., Scoccianti, C., Mattock, H., & others. (2014). Carcinogenicity of fluoro-edenite, silicon carbide fibres and whiskers, and carbon nanotubes. *The Lancet Oncology*, *15*(13), 1427–1428.
- Gu, F., Hu, C., Xia, Q., Gong, C., Gao, S., & Chen, Z. (2018). Aptamer-conjugated multi-walled carbon nanotubes as a new targeted ultrasound contrast agent for the diagnosis of prostate cancer. *Journal of Nanoparticle Research*, *20*, 1–10.
- Guinée, J. B., Heijungs, R., Vijver, M. G., & Peijnenburg, W. J. G. M. (2017). Setting the stage for debating the roles of risk assessment and life-cycle assessment of engineered nanomaterials. In *Nature Nanotechnology* (Vol. 12, Issue 8, pp. 727–733). Nature Publishing Group. <https://doi.org/10.1038/NNANO.2017.135>
- Guo, J., Zhang, X., Zhang, S., Zhu, Y., & Li, W. (2008). The different bio-effects of functionalized multi-walled carbon nanotubes on *Tetrahymena pyriformis*. *Current Nanoscience*, *4*(3), 240–245.
- Haghighi, M., & da Silva, J. A. (2014). The effect of carbon nanotubes on the seed germination and seedling growth of four vegetable species. *Journal of Crop Science and Biotechnology*, *17*, 201–208.
- Halvorsrud, R., & Wagner, G. (1998). Growth patterns of the slime mold *Physarum* on a nonuniform substrate. *Physical Review E*, *57*(1), 941.
- Hanna, S. K., Miller, R. J., & Lenihan, H. S. (2014). Deposition of carbon nanotubes by a marine suspension feeder revealed by chemical and isotopic tracers. *Journal of Hazardous Materials*, *279*, 32–37.
- Hato, M., Ueda, T., Kurihara, K., & Kobatake, Y. (1976). Phototaxis in true slime mold *Physarum polycephalum*. *Cell Structure and Function*, *1*(3), 269–278.
- Hernández-Rivera, M., Kumar, I., Cho, S. Y., Cheong, B. Y., Pulikkathara, M. X., Moghaddam, S. E., Whitmire, K. H., & Wilson, L. J. (2017). High-performance hybrid bismuth--carbon nanotube based contrast agent for X-ray CT imaging. *ACS Applied Materials & Interfaces*, *9*(7), 5709–5716.
- Hevia, L. G., & Fanarraga, M. L. (2020). Microtubule cytoskeleton-disrupting activity of MWCNTs: applications in cancer treatment. *Journal of Nanobiotechnology*, *18*, 1–11.
- Hiremath, N., Mays, J., & Bhat, G. (2017). Recent developments in carbon fibers and carbon nanotube-based fibers: a review. *Polymer Reviews*, *57*(2), 339–368.
- Holt, B. D., Shams, H., Horst, T. A., Basu, S., Rape, A. D., Wang, Y., Rohde, G. K., Mofrad, M. R. K., Islam, M. F., & Dahl, K. N. (2012). Altered Cell Mechanics from the Inside: Dispersed Single Wall Carbon Nanotubes Integrate with and Restructure Actin. *Journal of Functional Biomaterials*, *3*(2), 398–417. <https://doi.org/10.3390/jfb3020398>
- Holt, B. D., Short, P. A., Rape, A. D., Wang, Y., Islam, M. F., & Dahl, K. N. (2010). Carbon nanotubes reorganize actin structures in cells and ex vivo. *ACS Nano*, *4*(8), 4872–4878.

- Hong, H., Part, F., & Nowack, B. (2022). Prospective Dynamic and Probabilistic Material Flow Analysis of Graphene-Based Materials in Europe from 2004 to 2030. *Environmental Science & Technology*.
- Hu, F.-S., Clark, J., & Lott, T. (1985). Recurrent senescence in axenic cultures of *Physarum polycephalum*. *Microbiology*, *131*(4), 811–815.
- Hummers Jr, W. S., & Offeman, R. E. (1958). Preparation of graphitic oxide. *Journal of the American Chemical Society*, *80*(6), 1339.
- Hyung, H., Fortner, J. D., Hughes, J. B., & Kim, J. H. (2007). Natural organic matter stabilizes carbon nanotubes in the aqueous phase. *Environmental Science and Technology*, *41*(1), 179–184. <https://doi.org/10.1021/es061817g>
- Iavicoli, I., Fontana, L., Leso, V., & Calabrese, E. J. (2014). Hormetic dose--responses in nanotechnology studies. *Science of the Total Environment*, *487*, 361–374.
- Inoue, M., Sato, E. F., Nishikawa, M., Park, A.-M., Kira, Y., Imada, I., & Utsumi, K. (2003). Mitochondrial generation of reactive oxygen species and its role in aerobic life. *Current Medicinal Chemistry*, *10*(23), 2495–2505.
- Ishigami, M., Kuroda, K., & Hatano, S. (1987). Dynamic aspects of the contractile system in *Physarum plasmodium*. III. Cyclic contraction-relaxation of the plasmodial fragment in accordance with the generation-degeneration of cytoplasmic actomyosin fibrils. *The Journal of Cell Biology*, *105*(1), 381–386. <https://doi.org/10.1083/jcb.105.1.381>
- Jackson, P., Jacobsen, N. R., Baun, A., Birkedal, R., Kühnel, D., Jensen, K. A., Vogel, U., & Wallin, H. (2013). Bioaccumulation and ecotoxicity of carbon nanotubes. *Chemistry Central Journal*, *7*(1), 1–21.
- Jin, L., Son, Y., DeForest, J. L., Kang, Y. J., Kim, W., & Chung, H. (2014). Single-walled carbon nanotubes alter soil microbial community composition. *Science of the Total Environment*, *466*, 533–538.
- Jin, L., Son, Y., Yoon, T. K., Kang, Y. J., Kim, W., & Chung, H. (2013). High concentrations of single-walled carbon nanotubes lower soil enzyme activity and microbial biomass. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, *88*, 9–15.
- Jones, J. (2011). Influences on the formation and evolution of *Physarum polycephalum* inspired emergent transport networks. *Natural Computing*, *10*, 1345–1369.
- Jones, J., & Adamatzky, A. (2014). Computation of the travelling salesman problem by a shrinking blob. *Natural Computing*, *13*, 1–16.
- Journal Officiel de la République Française. (2012). *Décret n°2012-232 du 17 février 2012 relatif à la déclaration annuelle des substances à l'état nanoparticulaire pris en application de l'article L. 523-4 du code de l'environnement. Texte 4 sur 44.*
- Kajiwara, K., Sugime, H., Noda, S., & Hanada, N. (2022). Fast and stable hydrogen storage in the porous composite of MgH₂ with Nb₂O₅ catalyst and carbon nanotube. *Journal of Alloys and Compounds*, *893*, 162206.
- Kang, S., Herzberg, M., Rodrigues, D. F., & Elimelech, M. (2008). Antibacterial effects of carbon nanotubes: size does matter! *Langmuir*, *24*(13), 6409–6413.
- Kang, S., Mauter, M. S., & Elimelech, M. (2008). Physicochemical determinants of multiwalled carbon nanotube bacterial cytotoxicity. *Environmental Science & Technology*, *42*(19), 7528–7534.
- Kang, S., Pinault, M., Pfefferle, L. D., & Elimelech, M. (2007). Single-walled carbon nanotubes exhibit strong antimicrobial activity. *Langmuir*, *23*(17), 8670–8673.
- Kerfahi, D., Tripathi, B. M., Singh, D., Kim, H., Lee, S., Lee, J., & Adams, J. M. (2015). Effects of functionalized and raw multi-walled carbon nanotubes on soil bacterial community composition. *PLoS One*, *10*(3), e0123042.
- Khan, F. S. A., Mubarak, N. M., Khalid, M., Tan, Y. H., Abdullah, E. C., Rahman, M. E., & Karri, R. R. (2021). A comprehensive review on micropollutants removal using carbon

- nanotubes-based adsorbents and membranes. *Journal of Environmental Chemical Engineering*, 9(6), 106647.
- Khodakovskaya, M., Dervishi, E., Mahmood, M., Xu, Y., Li, Z., Watanabe, F., & Biris, A. S. (2009). Carbon nanotubes are able to penetrate plant seed coat and dramatically affect seed germination and plant growth. *ACS Nano*, 3(10), 3221–3227.
- Kiciński, W., & Dyjak, S. (2020). Transition metal impurities in carbon-based materials: Pitfalls, artifacts and deleterious effects. *Carbon*, 168, 748–845.
- Kim, G. M., Nam, I. W., Yang, B., Yoon, H. N., Lee, H.-K., & Park, S. (2019). Carbon nanotube (CNT) incorporated cementitious composites for functional construction materials: The state of the art. *Composite Structures*, 227, 111244.
- Kim, J. H., Fernandes, G. E., Deisley, D., Jung, S. W., Jokubaitis, M., Kim, H. M., Kim, K. B., & Xu, J. M. (2013). Carbon nanotube composite for electromagnetic interference shielding and thermal signature reduction. *Journal of Composite Materials*, 47(1), 119–124.
- Kincaid, R. L., & Mansour, T. E. (1978). Chemotaxis toward carbohydrates and amino acids in *Physarum polycephalum*. *Experimental Cell Research*, 116(2), 377–385.
- Knowles, D. J., & Carlile, M. J. (1978). The chemotactic response of plasmodia of the myxomycete *Physarum polycephalum* to sugars and related compounds. *Journal of General Microbiology*, 108(1), 17–25. <https://doi.org/10.1099/00221287-108-1-17>
- Kobayashi, R., Tero, A., & Nakagaki, T. (2006). Mathematical Model for Rhythmic Protoplasmic Movement in the True Slime Mold. *Journal of Mathematical Biology*, 53(2), 273–286. <https://doi.org/10.1007/s00285-006-0007-0>
- Kohama, K. (2016). Calcium inhibition as an intracellular signal for actin--myosin interaction. *Proceedings of the Japan Academy, Series B*, 92(10), 478–498.
- Köhler, A. R., Som, C., Helland, A., & Gottschalk, F. (2008). Studying the potential release of carbon nanotubes throughout the application life cycle. *Journal of Cleaner Production*, 16(8–9), 927–937.
- Kumar, S., Bose, S., & Chatterjee, K. (2014). Amine-functionalized multiwall carbon nanotubes impart osteoinductive and bactericidal properties in poly (ϵ -caprolactone) composites. *RSC Advances*, 4(37), 19086–19098.
- Kuroda, R., & Kuroda, H. (1982). Relation of cytoplasmic calcium to contractility in *Physarum polycephalum*. *Journal of Cell Science*, 53(1), 37–48.
- Kwok, K. W. H., Leung, K. M. Y., Flahaut, E., Cheng, J., & Cheng, S. H. (2010). Chronic toxicity of double-walled carbon nanotubes to three marine organisms: influence of different dispersion methods. *Nanomedicine*, 5(6), 951–961.
- Lahiani, M. H., Chen, J., Irin, F., Poretzky, A. A., Green, M. J., & Khodakovskaya, M. V. (2015). Interaction of carbon nanohorns with plants: uptake and biological effects. *Carbon*, 81, 607–619.
- Latty, T., & Beekman, M. (2009). Food quality affects search strategy in the acellular slime mould, *Physarum polycephalum*. *Behavioral Ecology*, 20(6), 1160–1167.
- Latty, T., & Beekman, M. (2010). Food quality and the risk of light exposure affect patch-choice decisions in the slime mold *Physarum polycephalum*. *Ecology*, 91(1), 22–27.
- Laurent, C., Flahaut, E., & Peigney, A. (2010). The weight and density of carbon nanotubes versus the number of walls and diameter. *Carbon*, 48(10), 2994–2996.
- Laurent, C., Flahaut, E., Peigney, A., & Rousset, A. (1998). Metal nanoparticles for the catalytic synthesis of carbon nanotubes. *New Journal of Chemistry*, 22(11), 1229–1237.
- Leroy, M., Flahaut, E., & Larue, C. (2023). Carbon based nanomaterial interactions with metals and metalloids in terrestrial environment: A review. *Carbon*, 206, 325–339.
- Lewis, O. L., Zhang, S., Guy, R. D., & Del Álamo, J. C. (2015). Coordination of contractility, adhesion and flow in migrating *Physarum amoebae*. *Journal of the Royal Society*

- Interface*, 12(106). <https://doi.org/10.1098/rsif.2014.1359>
- Li, S., Irin, F., Atore, F. O., Green, M. J., & Cañas-Carrell, J. E. (2013). Determination of multi-walled carbon nanotube bioaccumulation in earthworms measured by a microwave-based detection technique. *Science of the Total Environment*, 445–446, 9–13. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2012.12.037>
- Li, X., Peng, Y., & Qu, X. (2006). Carbon nanotubes selective destabilization of duplex and triplex DNA and inducing B→A transition in solution. *Nucleic Acids Research*, 34(13), 3670–3676.
- Li, X., Peng, Y., Ren, J., & Qu, X. (2006). Carboxyl-modified single-walled carbon nanotubes selectively induce human telomeric i-motif formation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 103(52), 19658–19663. <https://doi.org/10.1073/pnas.0607245103>
- Lindberg, H. K., Falck, G. C.-M., Suhonen, S., Vippola, M., Vanhala, E., Catalán, J., Savolainen, K., & Norppa, H. (2009). Genotoxicity of nanomaterials: DNA damage and micronuclei induced by carbon nanotubes and graphite nanofibres in human bronchial epithelial cells in vitro. *Toxicology Letters*, 186(3), 166–173.
- Liné, C. (2019). *Evaluation of parameters influencing plant response to carbon nanotube contamination*. <http://www.theses.fr/2019INPT0082/document>
- Liné, C., Larue, C., & Flahaut, E. (2017). Carbon nanotubes: Impacts and behaviour in the terrestrial ecosystem - A review. In *Carbon* (Vol. 123, pp. 767–785). <https://doi.org/10.1016/j.carbon.2017.07.089>
- Liné, C., Manent, F., Wolinski, A., Flahaut, E., & Larue, C. (2021). Comparative study of response of four crop species exposed to carbon nanotube contamination in soil. *Chemosphere*, 274, 129854. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2021.129854>
- Liu, Q., Chen, B., Wang, Q., Shi, X., Xiao, Z., Lin, J., & Fang, X. (2009). Carbon nanotubes as molecular transporters for walled plant cells. *Nano Letters*, 9(3), 1007–1010.
- Liu, S., Wei, L., Hao, L., Fang, N., Chang, M. W., Xu, R., Yang, Y., & Chen, Y. (2009). Sharper and faster “nano darts” kill more bacteria: a study of antibacterial activity of individually dispersed pristine single-walled carbon nanotube. *ACS Nano*, 3(12), 3891–3902.
- Long, Z., Ji, J., Yang, K., Lin, D., & Wu, F. (2012). Systematic and quantitative investigation of the mechanism of carbon nanotubes’ toxicity toward algae. *Environmental Science & Technology*, 46(15), 8458–8466.
- Lu, X., Zhang, L., Yu, H., Lu, Z., He, J., Zheng, J., Wu, F., & Chen, L. (2021). Achieving superior hydrogen storage properties of MgH₂ by the effect of TiFe and carbon nanotubes. *Chemical Engineering Journal*, 422, 130101.
- Lyon, P., Keijzer, F., Arendt, D., & Levin, M. (2021). Reframing cognition: getting down to biological basics. In *Philosophical transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological sciences* (Vol. 376, Issue 1820, p. 20190750). <https://doi.org/10.1098/rstb.2019.0750>
- Maiese, K., Chong, Z. Z., Hou, J., & Shang, Y. C. (2010). Oxidative stress: Biomarkers and novel therapeutic pathways. *Experimental Gerontology*, 45(3), 217–234.
- Maraq, A. D., Naik, R. R., Shraideh, Z. A., & Shakya, A. K. (2015). Effect of mercuric chloride (HgCl₂) on cytoplasmic shuttle streaming, morphology and structure of the plasmodial slime mold: *Physarum polycephalum*. *Fresenius Environmental Bulletin*, 24(12 B), 4567–4573.
- Martínez-Ballesta, M., Zapata, L., Chalbi, N., & Carvajal, M. (2016). Multiwalled carbon nanotubes enter broccoli cells enhancing growth and water uptake of plants exposed to salinity. *Journal of Nanobiotechnology*, 14(1), 1–14.

- Marwan, W. (2001). Photomovement and photomorphogenesis in *Physarum polycephalum*: targeting of cytoskeleton and gene expression by light. In *Comprehensive Series in Photosciences* (Vol. 1, pp. 561–587). Elsevier.
- Matsumoto, K., Takagi, S., & Nakagaki, T. (2008). Locomotive mechanism of *Physarum* plasmodia based on spatiotemporal analysis of protoplasmic streaming. *Biophysical Journal*, *94*(7), 2492–2504. <https://doi.org/10.1529/biophysj.107.113050>
- Matsumoto, K., Ueda, T., & Kobatake, Y. (1986). Propagation of phase wave in relation to tactic responses by the plasmodium of *Physarum polycephalum*. *Journal of Theoretical Biology*, *122*(3), 339–345. [https://doi.org/10.1016/S0022-5193\(86\)80125-4](https://doi.org/10.1016/S0022-5193(86)80125-4)
- Matsumoto, K., Ueda, T., & Kobatake, Y. (1988). Reversal of thermotaxis with oscillatory stimulation in the plasmodium of *Physarum polycephalum*. *Journal of Theoretical Biology*, *131*(2), 175–182.
- Matveeva, N. B., Egorova, E. M., Beilina, S. I., & Lednev, V. V. (2006). Chemotactic assay for biological effects of silver nanoparticles. *Biophysics*, *51*(5), 758–763. <https://doi.org/10.1134/S0006350906050150>
- Mayne, R., & Adamatzky, A. (2015). Toward Hybrid Nanostructure-Slime Mould Devices. *Nano LIFE*, *05*(01), 1450007. <https://doi.org/10.1142/s179398441450007x>
- Mayne, R., Patton, D., de Lacy Costello, B., Adamatzky, A., & Patton, R. C. (2011). On the internalisation, intraplasmoidal carriage and excretion of metallic nanoparticles in the slime mould, *Physarum polycephalum*. *International Journal of Nanotechnology and Molecular Computation (IJNMC)*, *3*(3), 1–14.
- McCullough, C. H. R., Cooke, D. J., Foxon, J. L., Sudbery, P. E., & Grant, W. D. (1973). Nuclear DNA content and senescence in *Physarum polycephalum*. *Nature New Biology*, *245*, 263–265.
- Meunier, E., Coste, A., Olagnier, D., Authier, H., Lefèvre, L., Dardenne, C., Bernad, J., Béraud, M., Flahaut, E., & Pipy, B. (2012). Double-walled carbon nanotubes trigger IL-1 β release in human monocytes through Nlrp3 inflammasome activation. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine*, *8*(6), 987–995.
- Miyake, Y., Tada, H., Yano, M., & Shimizu, H. (1994). Relationship between Intracellular Period Modulation and External Environment Change in *Physarum* Plasmodium. *Cell Structure and Function*, *19*(6), 363–370. <https://doi.org/10.1247/csf.19.363>
- Mohberg, J. (1984). *The Use of Physarum for Testing of Toxicity/Mutagenicity*.
- Mohler, W. A., Simske, J. S., Williams-Masson, E. M., Hardin, J. D., & White, J. G. (1998). Dynamics and ultrastructure of developmental cell fusions in the *Caenorhabditis elegans* hypodermis. *Current Biology*, *8*(19), 1087–1091.
- Møller, P., Wils, R. S., Di Ianni, E., Gutierrez, C. A. T., Roursgaard, M., & Jacobsen, N. R. (2021). Genotoxicity of multi-walled carbon nanotube reference materials in mammalian cells and animals. *Mutation Research/Reviews in Mutation Research*, *788*, 108393.
- Mondal, A., Basu, R., Das, S., & Nandy, P. (2011). Beneficial role of carbon nanotubes on mustard plant growth: an agricultural prospect. *Journal of Nanoparticle Research*, *13*, 4519–4528.
- Mortimer, M., Petersen, E. J., Buchholz, B. A., Orias, E., & Holden, P. A. (2016). Bioaccumulation of multiwall carbon nanotubes in *Tetrahymena thermophila* by direct feeding or trophic transfer. *Environmental Science & Technology*, *50*(16), 8876–8885.
- Mouchet, F., Landois, P., Datsyuk, V., Puech, P., Pinelli, E., Flahaut, E., & Gauthier, L. (2011). International amphibian micronucleus standardized procedure (ISO 21427-1) for in vivo evaluation of double-walled carbon nanotubes toxicity and genotoxicity in water. *Environmental Toxicology*, *26*(2), 136–145.
- Mouchet, F., Landois, P., Flahaut, E., Pinelli, E., & Gauthier, L. (2007). Assessment of the potential in vivo ecotoxicity of double-walled carbon nanotubes (DWNTs) in water,

- using the amphibian *Ambystoma mexicanum*. *Nanotoxicology*, *1*(2), 149–156.
- Mouchet, F., Landois, P., Puech, P., Pinelli, E., Flahaut, E., & Gauthier, L. (2010). Carbon nanotube ecotoxicity in amphibians: assessment of multiwalled carbon nanotubes and comparison with double-walled carbon nanotubes. *Nanomedicine*, *5*(6), 963–974.
- Mouchet, F., Landois, P., Sarremejean, E., Bernard, G., Puech, P., Pinelli, E., Flahaut, E., & Gauthier, L. (2008). Characterisation and in vivo ecotoxicity evaluation of double-wall carbon nanotubes in larvae of the amphibian *Xenopus laevis*. *Aquatic Toxicology*, *87*(2), 127–137.
- Müller, L., Riediker, M., Wick, P., Mohr, M., Gehr, P., & Rothen-Rutishauser, B. (2010). Oxidative stress and inflammation response after nanoparticle exposure: differences between human lung cell monocultures and an advanced three-dimensional model of the human epithelial airways. *Journal of the Royal Society Interface*, *7*(1), 27–40.
- Münzel, T., & Daiber, A. (2018). Environmental stressors and their impact on health and disease with focus on oxidative stress. *Antioxidants & Redox Signaling*, *28*(9), 735–740.
- Murugan, N. J., Kaltman, D. H., Jin, P. H., Chien, M., Martinez, R., Nguyen, C. Q., Kane, A., Novak, R., Ingber, D. E., & Levin, M. (2021). Mechanosensation Mediates Long-Range Spatial Decision-Making in an Aneural Organism. *Advanced Materials*, *33*(34), 2008161.
- Naib-Majani, W., Stockem, W., Wohlfarth-Bottermann, K. E., Osborn, M., & Weber, K. (1982). Immunocytochemistry of the acellular slime mold *Physarum polycephalum*. II. Spatial organization of cytoplasmic actin. *European Journal of Cell Biology*, *28*(1), 103–114.
- Nakagaki, T., Iima, M., Ueda, T., Nishiura, Y., Saigusa, T., Tero, A., Kobayashi, R., & Showalter, K. (2007). Minimum-risk path finding by an adaptive amoebal network. *Physical Review Letters*, *99*(6), 1–4. <https://doi.org/10.1103/PhysRevLett.99.068104>
- Nakagaki, T., Yamada, H., & Hara, M. (2004). Smart network solutions in an amoeboid organism. *Biophysical Chemistry*, *107*(1), 1–5.
- Nakagaki, T., Yamada, H., & Tóth, Á. (2000). Maze-solving by an amoeboid organism. *Nature*, *407*(6803), 470. <https://doi.org/10.1038/35035159>
- Nakagaki, T., Yamada, H., & Ueda, T. (2000). Interaction between cell shape and contraction pattern in the *Physarum plasmodium*. *Biophysical Chemistry*, *84*(3), 195–204.
- Natsume, K., Miyake, Y., Yano, M., & Shimizu, H. (1993). Information propagation by spatio-temporal pattern change of Ca²⁺ concentration throughout *Physarum polycephalum* with repulsive stimulation. *Cell Structure and Function*, *18*(2), 111–115.
- Nguyen, T., Maniyar, A., Sarkar, M., Sarkar, T. R., & Neelgund, G. M. (2023). The Cytotoxicity of Carbon Nanotubes and Hydroxyapatite, and Graphene and Hydroxyapatite Nanocomposites against Breast Cancer Cells. *Nanomaterials*, *13*(3), 556.
- Nie, C., Yang, Y., Cheng, C., Ma, L., Deng, J., Wang, L., & Zhao, C. (2017). Bioinspired and biocompatible carbon nanotube-Ag nanohybrid coatings for robust antibacterial applications. *Acta Biomaterialia*, *51*, 479–494.
- Nowack, B., Ranville, J. F., Diamond, S., Gallego-Urrea, J. A., Metcalfe, C., Rose, J., Horne, N., Koelmans, A. A., & Klaine, S. J. (2012). Potential scenarios for nanomaterial release and subsequent alteration in the environment. *Environmental Toxicology and Chemistry*, *31*(1), 50–59.
- Oettmeier, C. (2019). *Integrated mechanisms of cellular behavior: cell biology and biological physics of the slime mold Physarum polycephalum*. Universität Bremen.
- Oettmeier, C., Brix, K., & Döbereiner, H. G. (2017). *Physarum polycephalum* - A new take on a classic model system. In *Journal of Physics D: Applied Physics* (Vol. 50, Issue 41). <https://doi.org/10.1088/1361-6463/aa8699>

- Oettmeier, C., Lee, J., & Döbereiner, H. G. (2018). Form follows function: Ultrastructure of different morphotypes of *Physarum polycephalum*. *Journal of Physics D: Applied Physics*, *51*(13). <https://doi.org/10.1088/1361-6463/aab147>
- Olivi, M., Zanni, E., De Bellis, G., Talora, C., Sarto, M. S., Palleschi, C., Flahaut, E., Monthieux, M., Rapino, S., Uccelletti, D., & others. (2013). Inhibition of microbial growth by carbon nanotube networks. *Nanoscale*, *5*(19), 9023–9029.
- Pacurari, M., Qian, Y., Fu, W., Schwegler-Berry, D., Ding, M., Castranova, V., & Guo, N. L. (2012). Cell permeability, migration, and reactive oxygen species induced by multiwalled carbon nanotubes in human microvascular endothelial cells. *Journal of Toxicology and Environmental Health, Part A*, *75*(2), 112–128.
- Pahlevanzadeh, F., Bakhsheshi-Rad, H. R., Ismail, A. F., Aziz, M., & Chen, X. B. (2019). Development of PMMA-Mon-CNT bone cement with superior mechanical properties and favorable biological properties for use in bone-defect treatment. *Materials Letters*, *240*, 9–12.
- Pampaloni, F., & Florin, E.-L. (2008). Microtubule architecture: inspiration for novel carbon nanotube-based biomimetic materials. *Trends in Biotechnology*, *26*(6), 302–310.
- Park, H., Ko, E., & Ahn, Y.-J. (2014). Small heat shock proteins can confer tolerance to nanomaterial-induced toxicity. *HortScience*, *49*(8), 1116–1121.
- Patino-Ramirez, F., Arson, C., & Dussutour, A. (2021). Substrate and cell fusion influence on slime mold network dynamics. *Scientific Reports*, *11*(1), 1–20.
- Patino-Ramirez, F., Boussard, A., Arson, C., & Dussutour, A. (2019). Substrate composition directs slime molds behavior. *Scientific Reports*, *9*(1), 1–14.
- Pavlicek, A., Part, F., Rose, G., Praetorius, A., Miernicki, M., Gazsó, A., & Huber-Humer, M. (2021). A European nano-registry as a reliable database for quantitative risk assessment of nanomaterials? A comparison of national approaches. *NanoImpact*, *21*, 100276.
- Petersen, E. J., Flores-Cervantes, D. X., Bucheli, T. D., Elliott, L. C. C., Fagan, J. A., Gogos, A., Hanna, S., Ka gi, R., Mansfield, E., Bustos, A. R. M., & others. (2016). Quantification of carbon nanotubes in environmental matrices: current capabilities, case studies, and future prospects. *Environmental Science & Technology*, *50*(9), 4587–4605.
- Petersen, E. J., Huang, Q., & Weber, W. J. (2008a). Bioaccumulation of radio-labeled carbon nanotubes by *Eisenia foetida*. *Environmental Science and Technology*, *42*(8), 3090–3095. <https://doi.org/10.1021/es071366f>
- Petersen, E. J., Huang, Q., & Weber, W. J. (2008b). Ecological uptake and depuration of carbon nanotubes by *Lumbricus variegatus*. *Environmental Health Perspectives*, *116*(4), 496–500. <https://doi.org/10.1289/ehp.10883>
- Petersen, E. J., Pinto, R. A., Zhang, L., Huang, Q., Landrum, P. F., & Weber, W. J. (2011). Effects of polyethyleneimine-mediated functionalization of multi-walled carbon nanotubes on earthworm bioaccumulation and sorption by soils. *Environmental Science and Technology*, *45*(8), 3718–3724. <https://doi.org/10.1021/es103004r>
- Petersen, E. J., Zhang, L., Mattison, N. T., O’Carroll, D. M., Whelton, A. J., Uddin, N., Nguyen, T., Huang, Q., Henry, T. B., Holbrook, R. D., & Chen, K. L. (2011). Potential release pathways, environmental fate, and ecological risks of carbon nanotubes. In *Environmental Science and Technology* (Vol. 45, Issue 23, pp. 9837–9856). <https://doi.org/10.1021/es201579y>
- Pulskamp, K., Diabaté, S., & Krug, H. F. (2007). Carbon nanotubes show no sign of acute toxicity but induce intracellular reactive oxygen species in dependence on contaminants. *Toxicology Letters*, *168*(1), 58–74. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.toxlet.2006.11.001>
- Pulskamp, K., Wörle-Knirsch, J. M., Hennrich, F., Kern, K., & Krug, H. F. (2007). Human

- lung epithelial cells show biphasic oxidative burst after single-walled carbon nanotube contact. *Carbon*, 45(11), 2241–2249.
<https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.carbon.2007.06.054>
- Pumera, M. (2007). Electrochemical properties of double wall carbon nanotube electrodes. *Nanoscale Research Letters*, 2(2), 87.
- Rahman, M. A., Abul Barkat, H., Harwansh, R. K., & Deshmukh, R. (2022). Carbon-based nanomaterials: carbon nanotubes, graphene, and fullerenes for the control of burn infections and wound healing. *Current Pharmaceutical Biotechnology*, 23(12), 1483–1496.
- Rajabi, M., Mahanpoor, K., & Moradi, O. (2017). Removal of dye molecules from aqueous solution by carbon nanotubes and carbon nanotube functional groups: critical review. *Rsc Advances*, 7(74), 47083–47090.
- Rakoczy, L. (1973). The myxomycete *Physarum nudum* as a model organism for photobiological studies. *Berichte Der Deutschen Botanischen Gesellschaft*, 86(1–4), 141–164.
- Ravanbakhsh, H., Bao, G., & Mongeau, L. (2020). Carbon nanotubes promote cell migration in hydrogels. *Scientific Reports*, 10(1), 2543.
- Redondo-Gomez, C., Leandro-Mora, R., Blanch-Bermudez, D., Espinoza-Araya, C., Hidalgo-Barrantes, D., & Vega-Baudrit, J. (2020). Recent advances in carbon nanotubes for nervous tissue regeneration. *Advances in Polymer Technology*, 2020, 1–16.
- Reid, C. R. (2023). Thoughts from the forest floor: a review of cognition in the slime mould *Physarum polycephalum*. *Animal Cognition*, 1–15.
- Reid, C. R., Beekman, M., Latty, T., & Dussutour, A. (2013). Amoeboid organism uses extracellular secretions to make smart foraging decisions. *Behavioral Ecology*, 24(4), 812–818.
- Reid, C. R., Garnier, S., Beekman, M., & Latty, T. (2015). Information integration and multiattribute decision making in non-neuronal organisms. *Animal Behaviour*, 100, 44–50. <https://doi.org/10.1016/j.anbehav.2014.11.010>
- Reid, C. R., Latty, T., Dussutour, A., & Beekman, M. (2012). Slime mold uses an externalized spatial “memory” to navigate in complex environments. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 109(43), 17490–17494. <https://doi.org/10.1073/pnas.1215037109>
- Ridgway, E. B., & Durham, A. C. H. (1976). Oscillations of calcium ion concentrations in *Physarum Polycephalum*. *Journal of Cell Biology*, 69(1), 223–226. <https://doi.org/10.1083/jcb.69.1.223>
- Rodrigues, D. F., Jaisi, D. P., & Elimelech, M. (2013). Toxicity of functionalized single-walled carbon nanotubes on soil microbial communities: implications for nutrient cycling in soil. *Environmental Science & Technology*, 47(1), 625–633.
- Rodriguez-Fernandez, L., Valiente, R., Gonzalez, J., Villegas, J. C., & Fanarraga, M. L. (2012). Multiwalled carbon nanotubes display microtubule biomimetic properties in vivo, enhancing microtubule assembly and stabilization. *ACS Nano*, 6(8), 6614–6625.
- Rolland, A., Pasquier, E., Malvezin, P., Craig, C., Dumas, M., & Dussutour, A. (2023). Behavioural changes in slime moulds over time. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*.
- Rusch, H. P., Sachsenmaier, W., Behrens, K., & Gruter, V. (1966). Synchronization of mitosis by the fusion of the plasmodia of *Physarum polycephalum*. *The Journal of Cell Biology*, 31(1), 204.
- Sachsenmaier, W., & Hansen, K. (1973). Long-and short-period oscillations in a myxomycete with synchronous nuclear divisions. In *Biological and biochemical oscillators* (pp. 429–447). Elsevier.
-

- Sager, T. M., Umbright, C. M., Mustafa, G. M., Roberts, J. R., Orandle, M. S., Cumpston, J. L., McKinney, W. G., Boots, T., Kashon, M. L., & Joseph, P. (2022). Pulmonary toxicity and gene expression changes in response to whole-body inhalation exposure to multi-walled carbon nanotubes in rats. *Inhalation Toxicology*, *34*(7–8), 200–218.
- Saigusa, T., & Nakagaki, T. (2007). Anticipation of periodic environmental changes in an amoeba. *AIP Conference Proceedings*, *922*(1), 655–660.
- Sargent, L. M., Hubbs, A. F., Young, S.-H., Kashon, M. L., Dinu, C. Z., Salisbury, J. L., Benkovic, S. A., Lowry, D. T., Murray, A. R., Kisin, E. R., & others. (2012). Single-walled carbon nanotube-induced mitotic disruption. *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, *745*(1–2), 28–37.
- Schaap, P., Barrantes, I., Minx, P., Sasaki, N., Anderson, R. W., Bénard, M., Biggar, K. K., Buchler, N. E., Bundschuh, R., Chen, X., & others. (2016). The *Physarum polycephalum* genome reveals extensive use of prokaryotic two-component and metazoan-type tyrosine kinase signaling. *Genome Biology and Evolution*, *8*(1), 109–125.
- Schmidt, U., Weigert, M., Broaddus, C., & Myers, G. (2018). Cell detection with star-convex polygons. *Medical Image Computing and Computer Assisted Intervention--MICCAI 2018: 21st International Conference, Granada, Spain, September 16-20, 2018, Proceedings, Part II 11*, 265–273.
- Schwab, F., Bucheli, T. D., Lukhele, L. P., Magrez, A., Nowack, B., Sigg, L., & Knauer, K. (2011). Are carbon nanotube effects on green algae caused by shading and agglomeration? *Environmental Science & Technology*, *45*(14), 6136–6144.
- Scott-Fordsmand, J. J., Krogh, P. H., Schaefer, M., & Johansen, A. (2008). The toxicity testing of double-walled nanotubes-contaminated food to *Eisenia veneta* earthworms. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, *71*(3), 616–619.
- Servant, A., Jacobs, I., Bussy, C., Fabbro, C., Da Ros, T., Pach, E., Ballesteros, B., Prato, M., Nicolay, K., & Kostarelos, K. (2016). Gadolinium-functionalised multi-walled carbon nanotubes as a T1 contrast agent for MRI cell labelling and tracking. *Carbon*, *97*, 126–133.
- Shams, H., Holt, B. D., Mahboobi, S. H., Jahed, Z., Islam, M. F., Dahl, K. N., & Mofrad, M. R. K. (2014). Actin reorganization through dynamic interactions with single-wall carbon nanotubes. *ACS Nano*, *8*(1), 188–197. <https://doi.org/10.1021/nn402865e>
- Shehata, A. M., Saadeldin, I. M., Tukur, H. A., & Habashy, W. S. (2020). Modulation of heat-shock proteins mediates chicken cell survival against thermal stress. *Animals*, *10*(12), 2407.
- Shimada, Y., Kasakura, T., Yokota, M., Miyata, Y., Murofushi, H., Sakai, H., Yahara, I., & Murakami-Murofushi, K. (1992). Expression of a 66-kD heat shock protein associated with the process of cyst formation of a true slime mold, *Physarum polycephalum*. *Cell Structure and Function*, *17*(5), 301–309.
- Shraideh, Z. A. (2006). Effect of Cadmium Chloride ($CdCl_2$) on Cytoplasmic Shuttle Streaming , Structure , Growth and Migration of the Plasmodial Slime Mold *Physarum polycephalum*. *Pure Sciences*, *33*(1), 1–12.
- Shraideh, Z. A. (2007). Effect of Lead on Growth, Viability and Structure of the Slime Mold *Physarum polycephalum*. *Dirasat, Pure Sciences*, *34*(2).
- Shraideh, Z. A. (2010). Toxicity of triethyllead chloride (TriEL) on cytoplasmic shuttle streaming, structure, growth and migration of the plasmodial slime mold *Physarum polycephalum*. *Jordan Journal of Biological Sciences*, *147*(612), 1–16.
- Shrestha, B., Acosta-Martinez, V., Cox, S. B., Green, M. J., Li, S., & Cañas-Carrell, J. E. (2013). An evaluation of the impact of multiwalled carbon nanotubes on soil microbial community structure and functioning. *Journal of Hazardous Materials*, *261*(2013), 188–197. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2013.07.031>

- Shvedova, A. A., Kisin, E., Murray, A. R., Johnson, V. J., Gorelik, O., Arepalli, S., Hubbs, A. F., Mercer, R. R., Keohavong, P., Sussman, N., & others. (2008). Inhalation vs. aspiration of single-walled carbon nanotubes in C57BL/6 mice: inflammation, fibrosis, oxidative stress, and mutagenesis. *American Journal of Physiology-Lung Cellular and Molecular Physiology*, 295(4), L552--L565.
- Sieber, B., Coronas-Serna, J. M., & Martin, S. G. (2023). A focus on yeast mating: From pheromone signaling to cell-cell fusion. *Seminars in Cell & Developmental Biology*, 133, 83–95. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.semcdb.2022.02.003>
- Sies, H. (1991). Oxidative stress: From basic research to clinical application. *The American Journal of Medicine*, 91(3, Supplement 3), S31–S38. [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/0002-9343\(91\)90281-2](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/0002-9343(91)90281-2)
- Simon, J., Flahaut, E., & Golzio, M. (2019). Overview of carbon nanotubes for biomedical applications. *Materials*, 12(4), 624.
- Sina, J. F., & Chin, B. (1978). Cadmium modification of nucleolar ultrastructure and RNA synthesis in Physarum polycephalum. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 43(3), 449–459.
- Singh, A. V., Mehta, K. K., Worley, K., Dordick, J. S., Kane, R. S., & Wan, L. Q. (2014). Carbon nanotube-induced loss of multicellular chirality on micropatterned substrate is mediated by oxidative stress. *ACS Nano*, 8(3), 2196–2205.
- Sivaraj, D., & Vijayalakshmi, K. (2018). Enhanced corrosion resistance and antibacterial activity of Zn-HA decorated MWCNTs film coated on medical grade 316L SS implant by novel spray pyrolysis technique. *Journal of Analytical and Applied Pyrolysis*, 134, 176–182.
- Smith-Ferguson, J., & Beekman, M. (2020). Who needs a brain? Slime moulds, behavioural ecology and minimal cognition. *Adaptive Behavior*, 28(6), 465–478.
- Sobhani, Z., Behnam, M. A., Emami, F., Dehghanian, A., & Jamhiri, I. (2017). Photothermal therapy of melanoma tumor using multiwalled carbon nanotubes. *International Journal of Nanomedicine*, 12, 4509.
- Srivastava, A., & Rao, D. P. (2014). Enhancement of seed germination and plant growth of wheat, maize, peanut and garlic using multiwalled carbon nanotubes. *Eur Chem Bull*, 3(5), 502–504.
- Srivastava, R. K., Pant, A. B., Kashyap, M. P., Kumar, V., Lohani, M., Jonas, L., & Rahman, Q. (2011). Multi-walled carbon nanotubes induce oxidative stress and apoptosis in human lung cancer cell line-A549. *Nanotoxicology*, 5(2), 195–207.
- Stephenson, S. L., Fiore-Donno, A. M., & Schnittler, M. (2011). Myxomycetes in soil. *Soil Biology and Biochemistry*, 43(11), 2237–2242.
- Stephenson, S. L., Schnittler, M., & Novozhilov, Y. K. (2008). Myxomycete diversity and distribution from the fossil record to the present. *Biodiversity and Conservation*, 17, 285–301.
- Sun, T. Y., Bornhöft, N. A., Hungerbühler, K., & Nowack, B. (2016). Dynamic Probabilistic Modeling of Environmental Emissions of Engineered Nanomaterials. *Environmental Science and Technology*, 50(9), 4701–4711. <https://doi.org/10.1021/acs.est.5b05828>
- Sun, T. Y., Gottschalk, F., Hungerbühler, K., & Nowack, B. (2014). Comprehensive probabilistic modelling of environmental emissions of engineered nanomaterials. *Environmental Pollution*, 185, 69–76.
- Sun, Y., Liu, X., George, M. N., Park, S., Gaihre, B., Terzic, A., & Lu, L. (2021). Enhanced nerve cell proliferation and differentiation on electrically conductive scaffolds embedded with graphene and carbon nanotubes. *Journal of Biomedical Materials Research Part A*, 109(2), 193–206.
- Terayama, K., Honma, H., & Kawarabayashi, T. (1978). Toxicity of heavy metals and

- insecticides on slime mold *Physarum polycephalum*. *Journal of Toxicological Sciences*, 3(4), 293–303. <https://doi.org/10.2131/jts.3.293>
- Ternois, M., Mougou, M., Flahaut, E., & Dussutour, A. (2021). Slime molds response to carbon nanotubes exposure: from internalization to behavior. *Nanotoxicology*, 1–16.
- Tero, A., Takagi, S., Saigusa, T., Ito, K., Bebbler, D. P., Fricker, M. D., Yumiki, K., Kobayashi, R., & Nakagaki, T. (2010). Rules for biologically inspired adaptive network design. *Science*, 327(5964), 439–442.
- The European Commission. (2011). Commission recommendation of 18 October 2011 on the definition of nanomaterial. *Official Journal of the European Union*, 2011/696/EU, 38–40.
- The European Commission. (2018). Règlement (UE) 2018/1881 de la Commission du 3 décembre 2018 modifiant les annexes I, III, VI, VII, VIII, IX, X, XI, et XII du règlement (CE) n° 1907/2006 du Parlement européen et du Conseil. *Journal Officiel de l'Union Européenne*, 1–20.
- The European Commission. (2022). Recommandation de la commission du 10 juin 2022 relative à la définition des nanomatériaux. *Journal Officiel de l'Union Européenne*.
- Tso, W. W., & Mansour, T. E. (1975). Thermotaxis in a slime mold, *Physarum polycephalum*. *Behavioral Biology*, 14(4), 499–504. [https://doi.org/10.1016/S0091-6773\(75\)90672-0](https://doi.org/10.1016/S0091-6773(75)90672-0)
- Ueda, M., & Ogihara, S. (1994). Microtubules are required in amoeba chemotaxis for preferential stabilization of appropriate pseudopods. *Journal of Cell Science*, 107(8), 2071–2079.
- Ueda, T., Hirose, T., & Kobatake, Y. (1980). Membrane biophysics of chemoreception and taxis in the plasmodium of *Physarum polycephalum*. *Biophysical Chemistry*, 11(3–4), 461–473.
- Ueda, T., Matsumoto, K., Akitaya, T., & Kobatake, Y. (1986). Spatial and temporal organization of intracellular adenine nucleotides and cyclic nucleotides in relation to rhythmic motility in *Physarum plasmodium*. *Experimental Cell Research*, 162(2), 486–494. [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/0014-4827\(86\)90352-6](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/0014-4827(86)90352-6)
- Ueda, T., Mori, Y., Nakagaki, T., & Kobatake, Y. (1988). Action spectra for superoxide generation and UV and visible light photoavoidance in plasmodia of *Physarum polycephalum*. *Photochemistry and Photobiology*, 48(5), 705–709.
- Ueda, T., Terayama, K., Kurihara, K., & Kobatake, Y. (1975). Threshold phenomena in chemoreception and taxis in slime mold *Physarum polycephalum*. *The Journal of General Physiology*, 65(2), 223–234.
- US EPA. (2017). EPA Technical Fact Sheet – Nanomaterials. *United States Environmental Protection Agency*, November, 9. https://www.epa.gov/sites/production/files/2014-03/documents/ffrrofactsheet_emergingcontaminant_nanomaterials_jan2014_final.pdf
- Vallverdú, J., Castro, O., Mayne, R., Talanov, M., Levin, M., Baluška, F., Gunji, Y., Dussutour, A., Zenil, H., & Adamatzky, A. (2018). Slime mould: The fundamental mechanisms of biological cognition. *BioSystems*, 165, 57–70. <https://doi.org/10.1016/j.biosystems.2017.12.011>
- Vance, M. E., Kuiken, T., Vejerano, E. P., McGinnis, S. P., Hochella Jr, M. F., Rejeski, D., & Hull, M. S. (2015). Nanotechnology in the real world: Redeveloping the nanomaterial consumer products inventory. *Beilstein Journal of Nanotechnology*, 6(1), 1769–1780.
- Verneuil, L., Silvestre, J., Randrianjatovo, I., Marcato-Romain, C.-E., Girbal-Neuhauser, E., Mouchet, F., Flahaut, E., Gauthier, L., & Pinelli, E. (2015). Double walled carbon nanotubes promote the overproduction of extracellular protein-like polymers in *Nitzschia palea*: An adhesive response for an adaptive issue. *Carbon*, 88, 113–125. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.carbon.2015.02.053>

- Vithanage, M., Seneviratne, M., Ahmad, M., Sarkar, B., & Ok, Y. S. (2017). Contrasting effects of engineered carbon nanotubes on plants: a review. *Environmental Geochemistry and Health*, *39*, 1421–1439.
- Vogel, D., & Dussutour, A. (2016). Direct transfer of learned behaviour via cell fusion in non-neural organisms. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, *283*(1845), 20162382.
- Vogel, D., Dussutour, A., & Deneubourg, J.-L. (2018). Symmetry breaking and inter-clonal behavioural variability in a slime mould. *Biology Letters*, *14*(12), 20180504.
- Vogel, D., Nicolis, S. C., Perez-Escudero, A., Nanjundiah, V., Sumpter, D. J. T., & Dussutour, A. (2015). Phenotypic variability in unicellular organisms: From calcium signalling to social behaviour. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, *282*(1819). <https://doi.org/10.1098/rspb.2015.2322>
- Wang, X., Zhou, Z., & Chen, F. (2017). Surface modification of carbon nanotubes with an enhanced antifungal activity for the control of plant fungal pathogen. *Materials*, *10*(12), 1375.
- Wei, L., Thakkar, M., Chen, Y., Ntim, S. A., Mitra, S., & Zhang, X. (2010). Cytotoxicity effects of water dispersible oxidized multiwalled carbon nanotubes on marine alga, *Dunaliella tertiolecta*. *Aquatic Toxicology*, *100*(2), 194–201. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2010.07.001>
- Weigert, M., & Schmidt, U. (2022). Nuclei instance segmentation and classification in histopathology images with Stardist. *2022 IEEE International Symposium on Biomedical Imaging Challenges (ISBIC)*, 1–4.
- Weijie, M., Chongnv, W., Xuming, P., Weixin, J., Yuhang, W., & Benhui, S. (2020). TiO₂ nanoparticles and multi-walled carbon nanotubes monitoring and bioremediation potential using ciliates *Pseudocohnilembus persalinus*. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, *187*, 109825.
- Wen, L., Ding, W., Yang, S., & Xing, D. (2016). Microwave pumped high-efficient thermoacoustic tumor therapy with single wall carbon nanotubes. *Biomaterials*, *75*, 163–173.
- Wils, R. S., Jacobsen, N. R., Di Ianni, E., Roursgaard, M., & Møller, P. (2021). Reactive oxygen species production, genotoxicity and telomere length in FE1-MutaTM Mouse lung epithelial cells exposed to carbon nanotubes. *Nanotoxicology*, *15*(5), 661–672.
- Wils, R. S., Jacobsen, N. R., Vogel, U., Roursgaard, M., & Møller, P. (2021). Inflammatory response, reactive oxygen species production and DNA damage in mice after intrapleural exposure to carbon nanotubes. *Toxicological Sciences*, *183*(1), 184–194.
- Wohlfarth-Bottermann, K. E. (1977). Oscillating contractions in protoplasmic strands of *Physarum*: Simultaneous tensiometry of longitudinal and radial rhythms, periodicity analysis and temperature dependence. *Journal of Experimental Biology*, *67*(1), 49–59.
- Wohlfarth-Bottermann, K. E. (1979). Oscillatory contraction activity in *Physarum*. *Journal of Experimental Biology*, *81*(1), 15–32.
- Wolf, R., Niemuth, J., & Sauer, H. (1997). Thermotaxis and protoplasmic oscillations in *Physarum* plasmodia analysed in a novel device generating stable linear temperature gradients. *Protoplasma*, *197*(1–2), 121–131.
- Wright, M., & Tollon, Y. (1978). Heat sensitive factor necessary for mitosis onset in *Physarum polycephalum* (temperature shift/heat shock/cycloheximide/ts mutant). *Molecular and General Genetics MGG*, *163*(1), 91–99.
- Wu, F., Jiao, S., Hu, J., Wu, X., Wang, B., Shen, G., Yang, Y., Tao, S., & Wang, X. (2021). Stronger impacts of long-term relative to short-term exposure to carbon nanomaterials on soil bacterial communities. *Journal of Hazardous Materials*, *410*, 124550.
- Wu, F., You, Y., Zhang, X., Zhang, H., Chen, W., Yang, Y., Werner, D., Tao, S., & Wang,

- X. (2019). Effects of various carbon nanotubes on soil bacterial community composition and structure. *Environmental Science & Technology*, 53(10), 5707–5716.
- Wu, M.-Y. (2013). Effects of incorporation of nano-carbon into slow-released fertilizer on rice yield and nitrogen loss in surface water of paddy soil. *2013 Third International Conference on Intelligent System Design and Engineering Applications*, 676–681.
- Xu, J., Cao, Z., Zhang, Y., Yuan, Z., Lou, Z., Xu, X., & Wang, X. (2018). A review of functionalized carbon nanotubes and graphene for heavy metal adsorption from water: Preparation, application, and mechanism. *Chemosphere*, 195, 351–364.
- Yang, L., Yu, L. L., Wei, H. W., Li, W. Q., Zhou, X., & Tian, W. Q. (2019). Hydrogen storage of dual-Ti-doped single-walled carbon nanotubes. *International Journal of Hydrogen Energy*, 44(5), 2960–2975.
- Yang, X., Zhang, X., Shu, X., Zhang, W., Kai, J., Tang, M., Gong, J., Yang, J., Lin, J., Chai, Y., & others. (2022). Effects of multi-walled carbon nanotubes in soil on earthworm growth and reproduction, enzymatic activities, and metabolomics. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 246, 114158.
- Yeoh, W.-M., Lee, K.-Y., Chai, S.-P., Lee, K.-T., & Mohamed, A. R. (2009). Synthesis of high purity multi-walled carbon nanotubes over Co-Mo/MgO catalyst by the catalytic chemical vapor deposition of methane. *New Carbon Materials*, 24(2), 119–123.
- Yoshiyama, S., Ishigami, M., Nakamura, A., & Kohama, K. (2010). Calcium wave for cytoplasmic streaming of *Physarum polycephalum*. *Cell Biology International*, 34, 35–40. <https://doi.org/10.1042/cbi20090158>
- Yu, J.-G., Zhao, X.-H., Yang, H., Chen, X.-H., Yang, Q., Yu, L.-Y., Jiang, J.-H., & Chen, X.-Q. (2014). Aqueous adsorption and removal of organic contaminants by carbon nanotubes. *Science of The Total Environment*, 482–483, 241–251. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2014.02.129>
- Zarghami Dehaghani, M., Yousefi, F., Sajadi, S. M., Tajammal Munir, M., Abida, O., Habibzadeh, S., Mashhadzadeh, A. H., Rabiee, N., Mostafavi, E., & Saeb, M. R. (2021). Theoretical encapsulation of fluorouracil (5-fu) anti-cancer chemotherapy drug into carbon nanotubes (cnt) and boron nitride nanotubes (bnnt). *Molecules*, 26(16), 4920.
- Zhang, H., Liu, H., Davies, K. J. A., Sioutas, C., Finch, C. E., Morgan, T. E., & Forman, H. J. (2012). Nrf2-regulated phase II enzymes are induced by chronic ambient nanoparticle exposure in young mice with age-related impairments. *Free Radical Biology and Medicine*, 52(9), 2038–2046.
- Zhang, P., Teng, J., & Wang, L. (2020). Multiwalled carbon nanotubes inhibit cell migration and invasion by destroying actin cytoskeleton via mitochondrial dysfunction in ovarian cancer cells. *Aging (Albany NY)*, 12(24), 25294.
- Zhang, Z., Liang, X. Y., Zhang, T. R., Xia, Q. Y., Zhang, J. H., Qu, J. L., Tang, J. N., & Liu, S. D. (2018). Identification of a glutathione S-transferase gene of *Physarum polycephalum* as a biomarker for nanosized TiO₂ exposure under dark conditions. *Letters in Applied Microbiology*, 67(4), 370–376.
- Zhang, Zhi, Liang, Z. C., Liang, X. Y., Zhang, Q. H., Wang, Y. J., Zhang, J. H., & De Liu, S. (2021). *Physarum polycephalum macroplasmodium* exhibits countermeasures against TiO₂ nanoparticle toxicity: A physiological, biochemical, transcriptional, and metabolic perspective. *Environmental Pollution*, 279, 116936. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2021.116936>
- Zhang, Zhi, Liang, Z. C., Zhang, J. H., Tian, S. L., Le Qu, J., Tang, J. N., & De Liu, S. (2018). Nano-sized TiO₂ (nTiO₂) induces metabolic perturbations in *Physarum polycephalum macroplasmodium* to counter oxidative stress under dark conditions. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 154, 108–117.
- Zhao, G., Zhang, X., Li, B., Huang, G., Xu, F., & Zhang, X. (2020). Solvent-free fabrication

- of carbon nanotube/silk fibroin electrospun matrices for enhancing cardiomyocyte functionalities. *ACS Biomaterials Science & Engineering*, 6(3), 1630–1640.
- Zheng, X., Su, Y., Chen, Y., Wan, R., Li, M., Wei, Y., & Huang, H. (2014). Carboxyl-modified single-walled carbon nanotubes negatively affect bacterial growth and denitrification activity. *Scientific Reports*, 4(July). <https://doi.org/10.1038/srep05653>
- Zhou, Z., Liu, X., Wu, W., Park, S., Miller II, A. L., Terzic, A., & Lu, L. (2018). Effective nerve cell modulation by electrical stimulation of carbon nanotube embedded conductive polymeric scaffolds. *Biomaterials Science*, 6(9), 2375–2385.
- Zhu, L., Aono, M., Kim, S.-J., & Hara, M. (2013). Amoeba-based computing for traveling salesman problem: Long-term correlations between spatially separated individual cells of *Physarum polycephalum*. *Biosystems*, 112(1), 1–10.
- Zhu, Y., Zhao, Q., Li, Y., Cai, X., & Li, W. (2006). The interaction and toxicity of multi-walled carbon nanotubes with *Stylonychia mytilus*. *Journal of Nanoscience and Nanotechnology*, 6(5), 1357–1364.

9. Annexe 9 : Renseignements personnels

Expériences professionnelles

Auteure, Éditions Fleurus 2022 – présent | Paris
Auteure du livre « Blob et espèces étonnantes » de la collection La Grande Imagerie, parut le 21/04/2023

Mobilité doctorale (2 mois), Institut für Biologie 2022 | Graz, Autriche
Mobilité doctorale à l'Institut für Biologie de l'université Karl-Franzens de Graz (Autriche), sous la direction du Professeur Martin Grube. Acquisition d'images de hautes qualités du réseau veineux de *Physarum polycephalum*, et accès à un algorithme réalisant des mesures automatisées. Réalisation d'extractions ARN. Réalisation de tests afin d'appliquer le test COMET sur *Physarum polycephalum*.

Chargée de TP / TD (3 ans), 2020 – 2023 | Toulouse
Faculté Sciences et Ingénierie, Université Toulouse III
Biologie du comportement (45h) – Écologie comportementale (21h) – Éthologie (28h) – Introduction au comportement animal (35h) – Introduction à la méthodologie expérimentale (26h)

École Thématique ERIN2 (5 jours), C'Nano 2021 | Erquy
École Résidentielle Interdisciplinaire en Nanosciences et Nanotechnologies

Encadrements de stage

L2 Biologie des Organismes, des Populations et des Écosystèmes - Université Toulouse III
Impacts de 2 nanomatériaux (nanotubes de carbone ou oxyde de graphène) sur la croissance de *Physarum polycephalum* sur différents substrats (neutre, attractif, répulsif)
Ninon Mollaret (du 04/07 au 29/07/2022) - Anouk Gaboriaud (du 13/06 au 08/07/2022) - Léa Soler (du 01/06 au 01/07/2022)

L3 Biologie des Organismes, des Populations et des Écosystèmes - Université Toulouse III
Maëlle Delbos - Impacts des nanotubes de carbone sur la prise de décision chez *Physarum polycephalum* (du 04/10 au 03/11/2021)

M1 Biodiversité, Écologie et Évolution - Université Toulouse III
Aymeric Buronfosse - Impacts des nanotubes de carbone, combiné au stress thermique et au vieillissement, sur l'exploration de *Physarum polycephalum* (du 28/03 au 13/05/2022)
Victor Rigal - Impacts des nanotubes de carbone sur la croissance de différentes souches de *Physarum polycephalum* (du 02/06 au 30/07/2021)

Communications

Communications écrites

M. Ternois, M. Mougou, E. Flahaut & A. Dussutour. Slime molds response to carbon nanotubes exposure: from internalization to behavior. *Nanotoxicology* 15, 511-526 (2021). ([doi:10.1080/17435390.2021.1894615](https://doi.org/10.1080/17435390.2021.1894615))

Facteur d'impact : 5.881

M. Ternois. Blob et espèces étonnantes. Collection La Grande Imagerie, éditions Fleurus (2023) (<https://www.fleuruseditions.com/9782215179689-blob-et-especes-etonnantes.html>)

Communications orales scientifiques

Titre : *Physarum polycephalum* : un nouveau modèle cellulaire pour l'étude des effets écotoxicologiques des nanotubes de carbone

Auteurs : **M. Ternois**, E. Flahaut, A. Dussutour

Présentation orale : Colloque annuel de la Société d'Ecotoxicologie Fondamentale et Appliquée

Dates : 30 juin – 1 juillet 2022, Metz (France)

Titre : Impacts des nanotubes de carbone sur un modèle cellulaire émergent : *Physarum polycephalum*

Auteurs : **M. Ternois**, E. Flahaut, A. Dussutour

Présentation orale (invitée jeune) : **Société Francophone d'Etude des Carbones**, Rencontre Carb-ON « Carbone en biologie et santé »

Dates : 16 novembre 2020, en distanciel

Poster

Titre : *Physarum polycephalum*: a new cellular model for studying the ecotoxicological effects of carbon nanotubes

Auteurs : **M. Ternois**, M. Delbos, A. Buronfosse, E. Flahaut, A. Dussutour

Poster : Society of Environmental Toxicology And Chemistry Europe 32nd annual meeting

Dates : 15-19 mai 2022, Copenhague (Danemark)



Titre : Slime molds response to carbon nanotubes exposure: from internalization to behavior

Auteurs : **M. Ternois**, M. Mougou, E. Flahaut, A. Dussutour

Poster : C'Nano 2021 The nanoscience Meeting

Dates : 23-25 novembre 2021, Toulouse (France)



Communications orales Grand Public

Événement : **Emission CQFD « Le point sur 10 ans d'éthologie »** - [Radio Télévision Suisse](#)

Intervenants : Anne-Cécile Dagaëff, **Manon Ternois**, Claudia Dubuis

Public ciblé : Tout public

Description : Emission dont le but était de faire le point sur l'évolution de l'éthologie, et de discuter du fait que l'on commence à s'intéresser au comportement d'organismes dépourvus de cerveau, dont le blob.

Dates : 31 janvier 2023, en distanciel

Événement : **Le blob, un ovni de la biologie - Les sentiers de la connaissance**

Intervenants : **Manon Ternois**

Public ciblé : Tout public

Description : Conférence grand public pour présenter le blob, sa biologie, son comportement, et les recherches scientifiques le concernant. J'ai également fait cette présentation lors d'un séminaire au Centre Médicale Génétique de Marseille.

Dates : 12 & 13 janvier 2023, Allauch & Marseille

Événement : **Concours Ma Thèse en 180 secondes** – pré-sélections

Intervenants : **Manon Ternois**

Public ciblé : Jury, Lycéens

Description : Participation aux pré-sélections de l'académie de Toulouse avec la présentation « Impacts des nanotubes de carbone sur *Physarum polycephalum* »

Dates : 7 mars 2022, Toulouse

Événement : **Les chercheurs passent le Grand Oral - Nuit des chercheurs 2021**

Intervenants : **Manon Ternois**

Public ciblé : Lycéens

Description : J'ai passé Le Grand Oral (une épreuve du baccalauréat) face aux lycéens sur le sujet « Comment le blob (*Physarum polycephalum*) peut-il apprendre et transmettre des informations sans posséder de système nerveux ? ». Nous avons ensuite échangé sur mon sujet de thèse ainsi que mon parcours universitaire.

Dates : 23 septembre 2021, Muséum de Toulouse

Événement : **Table ronde « Métiers, sciences et genres » - Festival Pariscience 2021**

Intervenants : Elisabeth Roman, Salima Maloufi Talhi, **Manon Ternois**

Public ciblé : collégiens et lycéens

Description : Les élèves ont visionné le film « Le blob, un génie sans cerveau », puis ont assisté à la table ronde numérique. Nous avons ainsi discuté des métiers de la recherche scientifique, traité de l'accessibilité à ces métiers par le prisme des genres (place des femmes dans les carrières scientifiques, difficultés rencontrées par les femmes, ...), et les élèves ont également pu me poser des questions sur le blob. *Dates* : 15 octobre 2021

Autres actions

Rencontres Exploreur MT180 (2022)

Intervention dans des classes de lycéens (à Figeac et Fronton) pour leur parler de mon projet de thèse et du monde de la recherche

Intervention dans une classe de CE2

Organisation d'une rencontre dans l'école primaire de Saint-Maxent pour leur présenter le blob

Actions au sein du laboratoire CRCA-CBI

Animations auprès d'étudiants, lycéens, collégiens

Portraits de femmes scientifiques : un des portraits des jeunes chercheuses mises à l'honneur au CRCA-CBI à l'occasion de la journée du droit des femmes (2022)

Organisation et accueil de l'équipe enseignante de SVT du lycée de Fronton pour une visite du laboratoire (2022)

Participation à la réalisation du film de présentation des activités du laboratoire (2021)

Bourses obtenues

Appel d'offre Mobilité Doctorale UT3 2022

Obtention d'un financement pour travailler dans un laboratoire de recherche à l'étranger pendant 2 mois

SETAC Europe Annual Meeting Grants – Student Grant for Europe, the Middle East and Russia (2022)

Obtention d'une bourse pour l'inscription au 32^e congrès annuel SETAC Europe

Abstract

Carbon nanotubes (CNTs) are carbon nanomaterials with industrial development having reached a stage of maturity enabling them to be used in many everyday applications (composite materials, coatings, energy storage, biomedical, *etc.*). They are a source of concern for human and environmental health because they can be released into the environment at each stage of their life cycle (production, use and end-of-life of finished products). Even though studies relating to their potential impact on health and the environment started some fifteen years ago, many questions remain unanswered. The aim of this thesis is to assess the effects of CNTs (we used double-walled CNTs (DWCNTs) as representatives of all the different types of CNTs) on an emerging cellular model at the interface between environmental toxicology and cellular toxicology: the myxomycete *Physarum polycephalum*. On the one hand, *P. polycephalum* lives mainly in soil litter, a medium that receives and concentrates pollution, where it plays an essential role in the ecosystem by actively participating in the recycling of organic matter. In addition, the simple organization of *P. polycephalum* (a unicellular eukaryote) enabled us to assess the internalization and bioaccumulation of CNTs within the cell. Finally, the behavioral complexity of *P. polycephalum* (problem solving and adaptation of their behavior to environmental diversity) enabled us to measure the effects of CNTs on different behavioral variables such as migration speed and decision making. We first demonstrated that CNTs are internalized in the cell, do not bioaccumulate and are rapidly excreted. We then demonstrated that CNTs induce variable effects on the behavior of *P. polycephalum* (slowed or accelerated speed, optimal or non-optimal decision-making), which differ depending on the strain used, the duration of exposure, the exposure concentration and the substrate used. By combining exposure to CNT with other stress factors (aversive compound, ageing, temperature), we observed a behavioral response that remains extremely variable. This work shows that CNTs have moderate and difficult-to-quantify effects on the behavioral response of *P. polycephalum*. In the future, it will be interesting to examine the effects of CNTs on the physiological and molecular response of this organism.

Keywords: Carbon nanotubes, *Physarum polycephalum*, Cytotoxicity, Behavior, Stress combination

Résumé

Les nanotubes de carbone (NTC) sont des nanomatériaux carbonés dont le développement industriel a atteint un stade de maturité qui permet leur utilisation dans de nombreuses applications de la vie courante (matériaux composites, revêtements, stockage d'énergie, biomédical, etc.). Ils sont une source de préoccupation pour la santé humaine et environnementale car ils peuvent être disséminés dans l'environnement à chacune des étapes de leur cycle de vie (production, utilisation et fin de vie de produits finis). Même si les études consacrées à leur impact potentiel sur la santé et l'environnement ont débuté il y a une quinzaine d'années, de nombreuses questions restent en suspens. L'objectif de cette thèse, est d'évaluer les effets des NTC (nous avons travaillé ici avec des NTC à double-paroi (DWCNT) en tant que représentants de l'ensemble des différents types de NTC) sur un modèle cellulaire émergent, à l'interface de la toxicologie environnementale et de la toxicologie cellulaire : le myxomycète *Physarum polycephalum*. D'une part, *P. polycephalum* vit principalement dans la litière du sol, un milieu réceptacle et concentrateur de pollution, où il occupe une place essentielle dans l'écosystème en participant activement au recyclage de la matière organique. D'autre part, la simplicité d'organisation de *P. polycephalum* (unicellulaire eucaryote) nous a permis d'évaluer l'internalisation et la bioaccumulation des NTC au sein de la cellule. Finalement, la complexité comportementale (résolution de problèmes et adaptation de leur comportement face aux hétérogénéités de l'environnement) de *P. polycephalum* nous a permis de mesurer les effets des NTC sur différentes variables comportementales telles que la vitesse de déplacement et la prise de décision. Dans un premier temps, nous avons mis en évidence une internalisation des NTC dans la cellule, une absence de bioaccumulation, et une élimination rapide. Nous avons ensuite démontré que les NTC induisent des effets variables sur le comportement de *P. polycephalum* (vitesse ralentie ou accélérée, prise de décision optimale ou non-optimale), qui diffèrent selon la souche utilisée, la durée d'exposition, la concentration d'exposition, et le substrat utilisé. En combinant l'exposition aux NTC à d'autres facteurs de stress (composé aversif, vieillissement, température), nous avons observé une réponse comportementale qui demeure extrêmement variable. Ces travaux révèlent que les NTC ont des effets modérés et difficilement quantifiables sur la réponse comportementale de *P. polycephalum*. Par la suite, il sera intéressant d'examiner les effets NTC sur la réponse physiologique et moléculaire de cet organisme.

Mots-clés : Nanotubes de carbone, *Physarum polycephalum*, Cytotoxicité, Comportement, Combinaison de stress