



# Écotoxicologie

# Développement d'une méthode de suivi de la densité cellulaire d'une culture de diatomées périphytiques (Nitzschia palea) par spectrofluorimétrie

Rapport de stage

### **ROBINSON CHRISTOPHE**

Maitre de stage : Claude Fortin Tutrice de stage : Océane Hourtané Adresse de la structure d'accueil : INRS-ETE, 490, rue de la Couronne, Québec (Québec), G1K 9A9 Canada

#### Remerciements

Aux termes de ce stage je tiens particulièrement à remercier Océane Hourtané et Claude Fortin, mes principaux encadrants.

Je remercie, tout d'abord, Océane Hourtané pour m'avoir transmis la passion de l'écotoxicologie. Elle a su faire preuve de patience, de pédagogie et n'a pas hésité à me consacrer de son temps au travers de "nos petites réunions" du vendredi matin. Plus encore, elle a tenté (et peut-être réussi) de me transmettre son expérience précieuse des travaux de rédactions, sa rigueur, son exigence. Plus généralement, je la remercie d'avoir partagé sa vision de la démarche scientifique et ses qualités d'interprétations.

J'ai particulièrement apprécié de travailler avec elle, tant en raison de sa constante bonne humeur et de ses commentaires remplis d'humour (mdr) que pour la qualité de son travail comme en témoigne par ailleurs son récent prix Dr. Richard Playle (encore félicitations).

Enfin je me considère extrêmement chanceux d'avoir eu l'opportunité d'être son stagiaire et d'avoir pu profiter de son savoir.

Je remercie Claude Fortin de m'avoir permis de réaliser ce stage particulièrement intéressant. En choisissant de le maintenir en télétravail durant cette période étrange de confinement, il m'a "ouvert" les portes de l'INRS-ETE. Merci de m'avoir donné l'opportunité de participer aux réunions d'équipe et de découvrir ainsi la dynamique de groupe (et donc celle du laboratoire), permettant d'appréhender la réflexion d'une équipe scientifique. Je le remercie également pour ses conseils avisés concernant le projet, la rédaction de ce rapport et enfin pour m'avoir donné la possibilité d'effectuer une soutenance à distance, ce qui s'est révélé être un exercice original.

Je remercie enfin toute l'équipe du professeur Claude Fortin pour m'avoir accordé son attention lors des réunions d'équipe.

#### Résumé

Les méthodes de comptage classiques (compteur de particule, cytomètre en flux, cellule de Nageotte) comportent des inconvénients pour la mesure de la densité cellulaire des diatomées périphytiques comme *Nitzschia palea*. Ces inconvénients sont liés au mode de vie adsorbé aux surfaces et/ou en amas de ces organismes, ce qui demande des remises en suspension longues et fastidieuses. Or, d'autres méthodes comme le Phyto-PAM utilisent le principe de fluorescence in vivo de la chlorophylle a pour l'étude du phytoplancton. D'où l'objectif de développer une méthode de suivi de la densité cellulaire de *Nitzschia palea* par spectrofluorimétrie *in vivo*. Pour ce faire, des spectres d'émission ont été réalisés afin de déterminer les longueurs d'ondes d'excitation optimales de la chlorophylle a. Cette étape a abouti à la sélection d'un couple excitation/émission de 436 et 680 nm. Ce couple de longueurs d'onde a pu être testé pour déterminer la fluorescence *in vivo* d'échantillons issus de trois séries de dilution. En parallèle, un comptage cellulaire a été effectué au compteur de particules et une mesure de la fluorescence de la chlorophylle *a* de chaque échantillon extraite dans l'acétone ont été réalisés pour compléter les résultats. Ils ont montré une forte relation de proportionnalité entre la densité cellulaire des échantillons et leur intensité de fluorescence *in vivo*, mais également la concentration de chlorophylle *a* extraite. Cette relation permet donc l'utilisation de l'équation de droite pour estimer l'évolution de la densité cellulaire d'une culture à partir de son simple signal de fluorescence in vivo. Enfin, pour mieux comprendre l'influence des contenant (verre, plastique) et des conditions de culture (agitation ou non) sur la croissance de Nitzschia palea, un suivi de croissance sur 9 jours a été effectué dans des erlenmeyers en verres agités (condition EA) et des cuvettes plastiques agitées (CA) et non agitées (CNA). Les résultats obtenus ont été assez hétérogènes et ont montré que la densité cellulaire mesurée variait fortement (plusieurs phases de décroissance) au cours du temps pour la condition EA, de même pour les densités cellulaires estimées des autres conditions. Il est apparu que les densités mesurées en fin de suivi n'étaient pas significativement différentes entre CA et EA et les densités mesurées/estimées EA. Enfin les densités cellulaires mesurées pour les trois conditions en toute fin de suivi n'ont pas montré de différences significatives, ce qui laisse penser que la croissance des diatomées dans les cuvettes est relativement bonne. De plus, et bien que ce résultat ne soit pas démontré statistiquement, il semble également que les diatomées croissent mieux dans un milieu non-agité, qui reproduirait davantage les conditions naturelles de leur milieu de vie. Finalement, il serait intéressant de réaliser de nouvelles expériences de comparaison intensité de fluorescence in vivo et densité cellulaire afin de consolider la relation mise en évidence au cours du projet. Ceci afin de pouvoir faciliter la réalisation de suivis de la densité cellulaire de *Nitzschia palea* dans le cadre d'expositions à des contaminants.

**Mots clés ;** Diatomées, spectrofluorimétrie, chlorophylle *a*, densité cellulaire.

#### Abstract

Usual cell counting methods (particle counter, flow cytometer, Nageotte cell) are not totally adapted for periphytic diatom cell density measurements. Nitzschia palea tends to live in aggregates or adsorbed to a substrate, which can be the flask wall. As a consequence, long and tedious stirs are needed in order to obtain an acceptably homogenous suspension. However, there are other methods like Phyto-PAM that uses in *vivo* fluorescence of chlorophyll *a* to study phytoplankton. Hence, we aimed to develop a fluorescence spectroscopy based method to measure *Nitzschia palea* cell density. To this end, emissions spectra have been conducted to determine best chlorophyll *a* molecule excitation wavelengths. This step has led to retain 436 and 680 nm as excitation and emission wavelengths respectively. These parameters were used afterwards, in order to determine *in vivo* fluorescence of samples from three dilution series. In parallel, a cell count was performed using a particle counter and a fluorescence measurement of the extracted chlorophyll *a* was also determined for each sample to complete the results. This work has led to the determination of a proportionality relationship between cell density measurements and chlorophyll *a* fluorescence intensities (extracted and *in vivo*). using a linear regression model. Thus, this relation allows using this equation to estimate cell density evolution of a culture using only its fluorescence signal. Then, to better understand the influence that both culture containers and conditions might have on Nizschia palea's growth, cell density has been measured along a 9 day culture period in stirred glass erlenmeyers (EA condition), stirred plastic cuvettes (CA) and non-stirred plastic cuvettes (CNA). The results obtained were quite heterogeneous and showed that cell density was fluctuating strongly over time for the EA condition as well as for other conditions for estimated cell density. It appears that CA and EA cells densities measured and estimated at the end of this monitoring were not statistically different. Finally, cell densities measured at the end of the experiment for each condition have not shown any significant differences, suggesting that diatoms grow as well in cuvettes as they do in Erlenmeyer flasks. Moreover, it seems that their growth might be better in a non-stirred environment, which would be similar to their natural way of living. Eventually, it would be interesting to carry further experiments to compare, once again, cell density and *in* vivo fluorescence and strengthen the mathematical relationship that has been established during this project. This would facilitate Nitzschia palea cell density monitoring during contaminant exposures.

**Keywords**; Diatoms, fluorescence spectroscopy, chlorophyll *a*, cell density.

## Sommaire

Reme	rciements	II
Résur	né	III
Abstr	act	IV
Somn	naire	V
Gloss	aire	Х
Prése	ntation de la structure d'accueil	XI
1.	Introduction	p. 1
2.	Analyse bibliographique	p. 2
	2.1 Les diatomées et l'écotoxicologie	p. 2
	2.2 Méthodes de comptage	p. 4
	2.3 Fluorescence et chlorophylle <i>a</i>	p. 7
	2.4 Extraction, dosage de la chlorophylle a et applications	p. 10
3.	Matériel et méthode	p. 12
	3.1 Détermination des longueurs d'onde d'excitation et d'émission ( $\lambda$ exc et $\lambda$ em)	p. 12
	3.2 Test de la méthode : mesure de la fluorescence <i>in vivo</i> et extraction de la chlorophylle <i>a</i>	p. 12
	3.3 Suivi de croissance des diatomées	p. 14
4.	Résultats	p. 16
	4.1 Blancs réalisés à partir du milieu de culture CHU-10 modifié	p. 16
	4.2 Spectres d'émission suite à une excitation à 430 et 680 nm de la solution a1 (fentes excitation/émission = 5/5 nm)	p.16
	4.3 Spectre d'émission suite à une excitation à 430 nm d'une culture d'algues vertes ( <i>Chlamydomonas reinhardtii</i> )	p. 17
	4.4 Comparaison des spectres d'émission pour des fentes exc/em 20/5 nm et 20/20 nm suite à l'excitation d'une culture à 436 nm	p. 18
	4.5 Relation fluorescence de la chlorophylle <i>a in vivo/</i> extraite et densité cellulaire des cultures de <i>Nitzschia palea</i>	p. 19
	4.6 Suivi de croissance de cultures de <i>Nitzschia palea</i> dans trois différentes conditions	p. 20
5.	Discussion	p. 23

6.	Conclusion	p. 26
Biblio	graphie	p. 27
Annex	es I	p. 29

# Liste des figures

Figure 1 : Photographie des locaux du centre INRS-ETE	XI
Figure 2 : Photographie du professeur Claude Fortin	XI
Figure 3 : Photographie d'Océane Hourtané et Anzizatou Tadjou	XI
<b>Figure 4 :</b> Vue microscopique des variétés de formes que peuvent prendre les fru de gauche à droite : rectiligne, hétéropolaire, lancélolée, elliptique, ovoïde, cro discoïde	stules, issant, p. 2
Figure 5 : Observation microscopique d'une culture de Nitzschia palea	p. 3
Figure 6 : Photographie d'un compteur de particules type Beckman Coulter	p. 4
Figure 7 : Schéma du principe de fonctionnement d'un cytomètre en flux	p. 4
Figure 8 : Cellule de Nageotte et quadrillage de numération	p. 5
Figure 9 : Diagramme de Jablonski simplifié	p. 8
<b>Figure 10 :</b> Fonctionnement simplifié d'un spectrofluorimètre (traduit de Williams, 1981)	p. 9
Figure 11 : Représentation structurale de la molécule de chlorophylle <i>a</i>	p. 10
Figure 12 : Schéma de la préparation des solutions test a1 et a2	p. 12
Figure 13 : Schéma de la dilution en cascade réalisée pour la solution mère A	p. 13
Figure 14 : Schéma simplifié des différentes étapes du protocole	p. 13
<b>Figure 15 :</b> Reconcentration d'une culture de <i>N. palea</i> en vue d'un comptage cellulaire	p.14
Figure 16 : Répartition du volume reconcentré dans les contenants	p. 15
<b>Figure 17 :</b> Spectre d'émission du milieu de culture CHU-10 modifié suite à une excitation à 430 nm	p. 16
<b>Figure 18 :</b> Spectre d'émission de la solution $a_1$ à 430 nm	p. 16
Figure 19 : Spectre d'émission de la solution $a_1$ suite à une excitation à 680 nm	p. 17
Figure 20 : Spectre d'émission d'une culture de Chlamydomonas reinhardtii à 430 nm	p. 17
Figure 21 : Spectre d'émission d'une culture à 436 nm	p. 18

Figure 21bis : Zoom sur l'intensité de fluorescence à 680 nm (fente 20/5 nm)	p. 18
Figure 22 : Spectre d'émission à 436 nm (fente 20/20)	p. 18
Figure 22bis : Zoom sur l'intensité de fluorescence à 680 nm (fente 20/20 nm)	p. 18
<b>Figure 23 :</b> Intensité de fluorescence <i>in vivo</i> en fonction de la densité cellulaire fentes exc/em	et des p. 19
<b>Figure 24 :</b> Concentration de la chlorophylle <i>a</i> extraite (ppb) en fonction de la d cellulaire (milliers de cellules)	lensité p. 19
Figure 25 : Densités cellulaires estimées et mesurée, conditions CNA et CA	p. 20
Figure 26 : Densité cellulaire en fonction du temps, condition EA	p. 21
Figure 27 : Densité cellulaire mesurée et estimée condition EA	p. 21
<b>Figure 28 :</b> Densités cellulaires mesurées pour les conditions CNA, CA et EA à t = 216 h	p. 22
Figure 29 : Courbe de calibration d'une gamme étalon de chlorophylle a	p. 30
Figure 30 : Photographie d'une culture de Nitzschia palea	p. 31
Figure 31 : Photographie des manipulations près du spectrofluorimètre	p. 31

#### Liste des tableaux

<b>Tableau 1 :</b> Récapitulatif des caractéristiques principales des méthodes de comptcellulaire	age p. 6
<b>Tableau 2</b> : Composition du milieu de culture CHU-10 modifié pour <i>Nitzschia pale</i> (Hourtané, 2019)	<i>а</i> р. 29
<b>Tableau 3</b> : Intensité de fluorescence de la gamme étalon de chlorophylle $a$ selon l différentes fentes utilisées (x/x)	les p. 29
<b>Tableau 4</b> : Intensité de fluorescence de la chlorophylle <i>a in vivo</i> , de la chlorophyll extraite et valeur du comptage cellulaire (sigma)	le <i>a</i> p. 30

#### Liste des équations

Équation 1 : Formule de calcul de la densité cellulaire sur cellule de Nageotte	p. 5
Équation 2 : Calcul de la densité cellulaire estimée	p. 20

#### Liste des abréviations

Chl *a* : Chlorophylle *a*   $\lambda$ exc : Longueur d'onde d'excitation (nm)  $\lambda$ em : Longueur d'onde d'émission (nm) EGP : Eléments du groupe platine *N. palea* : *Nitzschia palea*  **h** : Constante de Planck (6,63.10<sup>-34</sup> J.s) **v** : Nombre d'onde (cm<sup>-1</sup>) **u.a.** : "Unités arbitraires" I<sub>f</sub> : Intensité de fluorescence (u.a.) Fentes exc/em : Fentes du faisceau d'excitation et d'émission du spectrofluorimètre

#### Glossaire

**Mode de vie benthique** : Mode de vie en contact ou en étroite interaction avec le fond d'un cours d'eau.

**Chlorophylle** *a* : Pigment photosynthétique contenu dans les chloroplastes des cellules et intervenant dans l'absorption de la lumière. C'est le principal pigment présent chez les organismes photoautotrophes. C'est une molécule fluorescente.

**Diatomées** : Groupe d'organismes phytoplanctoniques caractérisés par une enveloppe siliceuse : le frustule.

**Eucaryotes** : Branche du vivant définie par des organismes uni ou pluricellulaires possédant un noyau et des organites.

**Monochromateur** : Elément d'un spectrofluorimètre fonctionnant comme un réseau et permettant de sélectionner une longueur d'onde spécifique à partir d'une lumière polychromatique.

**Phéophytine** *a* : Pigment photosynthétique issu de la dégradation de la chlorophylle *a*. **Périphyton** : Ensemble d'organismes phytoplanctoniques benthiques vivants adsorbés sur un substrat dont la nature peut varier (sable, roches, végétaux).

**Mode de vie planctonique** : Mode de vie en suspension dans la colonne d'eau du phytoplancton.

**Photon** : Particule élémentaire, de masse et de charge nulle, le photon est l'aspect corpusculaire de la lumière. Son énergie est inversement proportionnelle à sa longueur d'onde (nm).

Polysaccharides : Polymères de sucres simples (oses).

**Production primaire** : Production de carbone organique à partir de  $CO_2$  et  $H_2O$ , typiquement réalisée par les plantes à partir de la photosynthèse.

#### Présentation de la structure d'accueil

Le stage s'est déroulé indirectement dans les locaux du centre Eau-Terre-Environnement (ETE) de l'Institut National de Recherche Scientifique (INRS), situé dans la ville de Québec (province de Québec).



Figure 1 : Photographie des locaux du centre INRS-ETE

L'INRS-ETE est une Université de recherche orientée les domaines de vers l'environnement et développement du durable aui accueille de nombreux enseignant-chercheurs, doctorants et étudiants-stagiaires de tous niveaux. Une forte collaboration a lieu avec des partenaires de recherche tel le Centre d'expertise en analyse environnementale du Québec (CEAEQ).

L'enseignement et la recherche sont centrés autour des sciences de la Terre et de l'eau. Plus particulièrement, quatre axes de recherche sont développés :

- Assainissement et valorisation des résidus
- Biogéochimie aquatique
- Hydrologie
- Sciences de la Terre

Le sujet de ce stage s'inscrit dans les thématiques de recherches de l'équipe du professeur Claude Fortin, spécialiste en biogéochimie des métaux. Les membres de l'équipe travaillent à déterminer le caractère toxique de contaminants métalliques ou organométalliques au sein des écosystèmes aquatiques. Ce, par l'évaluation et la caractérisation des effets de ces contaminants sur les organismes aquatiques.



Figure 2 : Photographie du professeur Claude Fortin

Enfin, une petite "unité de recherche" a été créée dans le cadre de ce stage afin de pallier aux contraintes du télétravail et mener le projet à bien. Constituée d'Anzizatou Tadjou (étudiante en maîtrise) et moi-même, elle était gérée par

Océane Hourtané (doctorante).



Figure 3 : Photographie d'Océane Hourtané et Anzizatou Tadjou

#### 1. Introduction

La spectroscopie de fluorescence, également appelée spectrofluorimétrie, est une méthode très sensible d'analyse des composés en solution et des solides (Williams (1981), Saint-Dizier (1981), Harbinson et al (2003)). Elle est basée sur la propriété de certaines molécules à fluorescer, notamment par la présence de doubles liaisons et de cycles dans leur structure chimique (Valeur, 2004). Cette fluorescence est possible par excitation des électrons de la molécule d'intérêt à des longueurs d'onde spécifiques, induisant un changement de niveau d'excitation. Le retour à l'état fondamental, lors de la désexcitation, mène à l'émission d'un photon. Grâce à ce phénomène, la spectrofluorimétrie permet à la fois d'identifier et de quantifier des composés dans un mélange (Albani (2001), Lakowicz (2006)). Elle trouve donc des applications multiples, à la fois en chimie analytique ou en biologie.

Un exemple de molécule fluorescente connue est celui de la chlorophylle (Gitelson, 1999). Il en existe plusieurs formes, a, b ou encore c. Elles constituent des pigments de nature protéique présents dans les photosystèmes I et II des chloroplastes, organites typiques des cellules photosynthétiques. Parmi ces organismes figurent les diatomées. Par ailleurs, la chlorophylle *a* est, à la différence des deux autres types de chlorophylle, ubiquiste chez le phytoplancton (Del Amo, 2014) : la composante végétale du plancton. Ainsi, la spectrofluorimétrie est donc compatible avec l'étude des populations phytoplanctoniques.

Au cours de ce stage, l'espèce de phytoplancton étudiée est *Nitzschia palea* (*N. palea*), une diatomée périphytique ubiquiste en eau douce. Or, les espèces périphytiques ont tendance à s'accrocher à des substrats solides et à former des amas de cellules (Lavoie et al 2008). Cela a pour conséquence de compliquer leur comptage cellulaire par les méthodes classiques, demandant notamment des remises en suspension manuelles (Hourtané, 2019) puisque les cellules s'adsorbent aux parois des contenants. Le suivi de populations de cette diatomée cultivées en laboratoire est donc difficile, et bien que déjà réalisé (Kim Tiam, 2018), le développement d'une méthode de suivi "alternative" serait bienvenu.

La mise en place d'une nouvelle méthode d'évaluation de la densité cellulaire dans le temps offrirait donc de nouvelles perspectives dans l'étude de cette espèce. Ce, notamment dans le cadre d'expositions à des éléments d'intérêt émergents en écotoxicologie. Dans cette optique, la spectrofluorimétrie se présente comme une technique de choix, de par la rapidité des mesures effectuées et son caractère non destructif envers les échantillons. Enfin, les faibles volumes exigés en échantillons ainsi que le peu de matériel nécessaire à son utilisation la rendent intéressante en termes de coûts (cuvettes jetables en plastique) et d'empreinte environnementale.

Le but de ce stage consiste donc à développer une méthode de suivi de la densité cellulaire d'une culture de diatomées périphytique telle que *N. palea* par spectrofluorimétrie. Ceci afin de la transposer à l'étude de la toxicité d'un métal sur cette espèce.

#### 2. Analyse bibliographique

#### 2.1 Les diatomées et l'écotoxicologie

Les diatomées, également appelées "algues brunes" en référence à leur couleur, sont présentes dans la quasi totalité des écosystèmes aquatiques avec notamment des taxons typiques de certains milieux. Très diversifiées, elles occupent une place centrale au sein du phytoplancton, composante végétale du plancton. Bien qu'elles constituent moins d'1 % de la biomasse mondiale, leur importance écologique est non négligeable (Field et al, 1998). En tant que membres du phytoplancton elles sont photosynthétiques et autotrophes : synthétisant leur propre matière organique à partir de la lumière solaire et de composés inorganiques (CO<sub>2</sub>, NO<sub>3</sub>, PO<sub>4</sub>, H<sub>2</sub>O, etc.). De ce fait, elles se placent en tant que producteurs primaires à la base des réseaux trophiques avec plus de 20 % de la fixation globale de carbone (Mann, 1999). De plus, ce groupe figure parmi les plus diversifiés du phytoplancton avec près de 200 000 taxons selon Mann et Droop (1996). Les diatomées sont des organismes unicellulaires eucaryotes de taille comprise entre 5 et 500 µm. Une de leur particularité est la possession d'une enveloppe cellulaire siliceuse appelée "frustule", qui perdure après leur mort, permettant d'accéder à de vastes ressources fossiles de ce groupe vieux d'environ 185 millions d'années (Morin 2008, Del Amo, 2014). Le frustule peut prendre des formes variées : pennées, centrées ou encore lancéolées (figure 4). Ces formes sont, dans de nombreux cas, représentatives du mode de vie des diatomées (Lavoie et al, 2008). On distingue le mode de vie planctonique, en suspension dans l'eau (souvent associé aux diatomées de formes centriques) et le mode de vie périphytique (ou benthique, associée principalement aux diatomées pennales), en étroite relation avec le fond. En plus de ces deux modes de vies, les diatomées peuvent vivre isolées ou en colonies bien que la vie en colonies soit plus commune pour les diatomées périphytiques (Lavoie et al. 2008).



Figure 4 (issue de Lavoie et al, 2008) : Vue microscopique des variétés de formes que peuvent prendre les frustules, de gauche à droite : rectiligne, hétéropolaire, lancélolée, elliptique, ovoïde, croissant, discoïde

Par ailleurs, les diatomées périphytiques occupent une place importante dans le biofilm (Morin (2008), Pandey et al (2014), Kim Tiam (2018)). Il s'agit d'une pellicule "visqueuse" à la surface des roches, formée d'une communauté d'organismes variés (bactéries, algues ou encore cyanobactéries) enveloppée dans une matrice complexe de polysaccharides (Neckles et Neill (1994), Corcoll et al (2011), Mu (2018)). Le biofilm constitue une ressource en nutriment importante pour les organismes benthiques brouteurs ainsi que pour les macro-invertébrés (Wolters et al, 2019). Enfin, parmi les organismes composant le biofilm, les diatomées possèdent une plus forte teneur en acides gras insaturés, faisant d'elles une ressource nutritive privilégiée en général et accentuant leur importance à la base des réseaux trophiques (Brett et Müller-navarra, 1997).

L'intérêt que suscitent les diatomées en écotoxicologie provient, notamment, de leur caractère polluo-sensible (Pandley et al, 2014). En effet, de nombreuses espèces sont particulièrement sensibles à des facteurs environnementaux et anthropiques comme le pH et la charge organique du milieu (Battarbee et al 2001), faisant d'elles de bons organismes bioindicateurs (Lavoie et al (2008), Pandley et al (2014), Kim Tiam (2018)). Ainsi, les diatomées sont très utilisées dans le cadre du suivi de l'état écologique des masses d'eau, en particulier les diatomées benthiques (Lavoie et al 2008), ce qui souligne l'importance du périphyton dans la surveillance écologique. Ce suivi est effectué par l'intermédiaire d'indices biologiques permettant de dresser des bilans globaux. Parmi ces indices, on peut notamment citer l'IDEC (Indice Diatomée de l'Est du Canada), utilisé au Canada ou encore l'IBD (Indice Biologique Diatomée), employé en France dans le cadre de la politique sur l'eau définie par la DCE (Directive Cadre sur le l'Eau). D'autres indices comme le TDI (Trophic Diatom Index) au Royaume Uni ont également été développés.

En tant qu'organismes ubiquistes, peu chers et dont la biologie est relativement simple et bien connue, les diatomées sont utilisées lors d'expositions à des métaux en laboratoire (Kim Tiam, 2018). Parmi les nombreux taxons étudiés, *N. palea* (figure 5) est une espèce de choix. Ubiquiste dans les systèmes lacustres d'eau douce, elle a été l'objet de plusieurs études visant à évaluer les effets que peuvent exercer sur elle certains métaux comme le cadmium (Cd) (Branco (2010), Heredia (2012), Kim Tiam (2018)). Dominante dans les milieux méso-eutrophes à saprobes, elle se montre relativement tolérante aux pollutions d'origine anthropiques (Heredia, 2012). Cependant, on sait encore peu de choses sur les conséquences que peuvent avoir des éléments d'intérêt émergents en écotoxicologie sur cette espèce dans son milieu naturel et en expositions contrôlées de laboratoire.

Au cours de ces expositions en laboratoire, l'un des principaux paramètres permettant de déterminer la toxicité d'un élément est l'inhibition de la croissance, mesurable par suivi de la densité cellulaire dans le temps. Pour cela, des comptages cellulaires réguliers sont réalisés. Or le dénombrement cellulaire peut être compliqué par le mode de vie "en amas" des diatomées, en particulier les diatomées périphytiques comme *N. palea,* (Kützing), W. Smith 1856 (figure 5).



Figure 5 : Observation microscopique d'une culture de *Nitzschia palea* 

#### 2.2 Méthodes de comptage

Le comptage cellulaire peut être réalisé directement à l'aide d'appareils/dispositifs comme le compteur de particules, le cytomètre en flux (CMF) ou plus simplement à l'aide d'une cellule de Nageotte (figure 6, 7 et 8). Leur fonctionnement est le suivant :



Le compteur de particule (figure 6) est un appareil entièrement automatisé, piloté par l'intermédiaire d'un logiciel informatique.

Lors du comptage, une solution de densité cellulaire inconnue et placée dans un récipient adapté (accuvette) est aspirée par un tube de plusieurs dizaines de µm de diamètre. Ce tube, sépare deux électrodes formant un courant électrique. Lorsqu'une particule est aspirée, elle modifie l'impédance (résistance) de ce courant. Le nombre de fois où l'impédance est modifiée permet de déterminer le nombre de cellule tandis que l'ampleur de la modification indique la taille de la cellule.





Le cytomètre en flux (figure 7) est également relié à une interface informatique. Lors du dénombrement, la solution est aspirée vers une chambre d'écoulement puis entrainée par de l'eau ultra pure dans un conduit empêchant la superposition des cellules. Les cellules ainsi alignées sont soumises à une source d'excitation lumineuse : un laser de longueur d'onde  $\lambda = 488$  nm. Cette excitation lumineuse donne lieu à un phénomène de diffraction, dispersant la lumière qui est alors recueillie par un système de détecteurs, capables de fournir des données sur la taille et la forme des cellules en plus de leur nombre.



Figure 8 : Cellule de Nageotte et quadrillage de numération

La cellule de Nageotte est un dispositif en verre (figure 8 à gauche), permettant à un opérateur de dénombrer visuellement les cellules dans une solution faiblement concentrée. Le dénombrement est possible par un marquage spécifique : un ou deux (selon les modèles) emplacements sont divisés en 40 bandes verticales de 10 mm de côté et 5 mm de profondeur (figure 8 à droite). Ainsi, chaque bande possède un volume de 1,25  $\mu$ L. A l'aide d'une pipette, un échantillon de l'ordre d'une centaine de  $\mu$ L est déposé sur la cellule, puis le tout recouvert par une lamelle. L'opérateur détermine alors au microscope le nombre de cellule contenu dans quatre bandes au minimum. Aux termes de l'opération, la densité cellulaire de l'échantillon est déterminée avec l'équation 1 :

#### $N = (n/V) \times d$

Avec N la densité cellulaire, n le nombre de cellule compté dans le volume choisi (nombre de bandes) et d le facteur de dilution de la solution.

Chacun de ces outils possède des caractéristiques et une sensibilité qui leur est propre, les rendant plus ou moins adaptés lors de certains types de comptages (Rehnberg, 1982). Cependant, le comptage cellulaire des diatomées périphytiques comme *N. palea* pose problème par leur tendance à former des amas cellulaires difficiles à séparer, et/ou de fausser les mesures (cellule de Nageotte, compteur de particules). La taille de *N. palea* est également trop importante pour le conduit du CMF, ce qui risquerait de l'endommager. Enfin, ces dernières s'adsorbent très facilement aux parois des contenants, ce qui demande des étapes de remise en suspension préalables au comptage comme une remise en suspension manuelle et un passage dans un bain à ultrasons, chronophage (Hourtané, 2019).

Outre le comptage au sens strict, il existe des méthodes "indirectes" de comptage cellulaire qui permettraient de se libérer des contraintes induites par le comportement de *N. palea*. Ces méthodes reposent sur le principe de la fluorescence ou encore de l'absorption de la molécule de chl *a* extraite ou étudiée *in vivo*. On peut notamment citer le PhytoPAM, qui permet de déterminer des rendements photosynthétiques et la composition taxonomique d'un biofilm, mais qui est très sophistiqué et nécessite d'être maitrisé pour une bonne utilisation (Baumann, 2009). Il existe également des méthodes d'estimation de la biomasse phytoplanctonique utilisées dans le cadre de suivis des écosystèmes aquatiques.

Le tableau récapitulatif suivant (tableau 1) regroupe les avantages et inconvénients propres à un certain nombre de méthodes de comptage et estimation des densités cellulaires (d'après Saint-Dizier (1981), Rehnberg (1982), Lazaroto (1999), Walz

(2003), Baumann (2009), Kim Tiam (2018), Hourtané (2019)) des populations phytoplanctoniques, appliquées au cas de *N. palea*.

#### Tableau 1 : Récapitulatif des caractéristiques principales des méthodes de comptage cellulaire

Méthode de comptage ou d'analyse	Avantages	Inconvénients		
Compteur de particule	<ul> <li>Rapidité d'analyse</li> <li>Facilité d'emploi</li> <li>Fenêtre de sensibilité connue</li> <li>Analyses peu couteuse</li> <li>Permet d'effectuer un comptage satisfaisant si les diatomées sont suffisamment resuspendues</li> <li>Recommandé dans de nombreuses publications pour les suivis de croissance algale</li> </ul>	<ul> <li>Ne différencie pas les cellules vivantes des cellules mortes et prend également en compte les débris cellulaire ou autres petites particules (comptage non sélectif)</li> <li>Si amas cellulaires trop importants, obstruction du tube</li> <li>Technique destructive pour l'échantillon</li> <li>Non utilisable pour des densités cellulaire inférieures à 10 000 cellules/mL</li> </ul>		
Cytométrie en flux (CMF)	<ul> <li>Rapidité d'analyse</li> <li>Facilité d'emploi</li> <li>Très grande sensibilité</li> <li>Faible volume d'échantillon requis</li> <li>Possibilité de dénombrer de faibles densités cellulaires</li> </ul>	<ul> <li><i>N. palea</i> trop longue pour le conduit (risque d'endommagement du CMF)</li> <li>Technique destructive pour l'échantillon.</li> </ul>		
Cellule de Nageotte	<ul> <li>Facilité d'utilisation</li> <li>Peu ou pas de coûts d'analyse</li> <li>Faible volume d'échantillon requis</li> </ul>	<ul> <li>Comptage manuel long</li> <li>Incertitudes liées à l'opérateur</li> <li>Uniquement valable pour de faibles densités cellulaires</li> </ul>		

Méthode de comptage ou d'analyse	Avantages	Inconvénients		
Spectrophotométrie (absorbance de la chlorophylle <i>a</i> )	<ul> <li>Rapidité d'analyse</li> <li>Facilité d'emploi</li> <li>Faible volume d'échantillon requis</li> <li>Peu de coûts d'analyse</li> <li>Non destructive</li> </ul>	<ul> <li>Manque de sensibilité par rapport à la spectrofluorimétrie.</li> <li>Besoin de formules spécifiques afin de calculer la concentration (correction de l'interaction entre les différents pigments)</li> </ul>		
Spectrofluorimétrie (Phyto- PAM) Spectrofluorimétrie et extraction chimique de la chlorophylle a	<ul> <li>Simple d'utilisation une fois calibré</li> <li>Peu de coûts d'analyse</li> <li>Non destructive</li> <li>Rapide, pratique pour des analyses de routine</li> <li>Très grande sensibilité</li> <li>Très grande sensibilité</li> <li>Rapidité d'analyse une fois l'extraction réalisée</li> <li>Simple d'utilisation une fois l'extraction réalisée</li> </ul>	<ul> <li>La calibration du PhytoPam est complexe et demande une grande connaissance de cet outil.</li> <li>Longueur de la calibration (temps)</li> <li>Nécessite le rinçage de l'unique cuvette correspondante entre chaque échantillon</li> <li>Extraction destructive</li> <li>Besoin de solvants spécifiques et de solutions étalon de chlorophylle a</li> <li>Méthode non valable avec de faibles volumes d'échantillons</li> </ul>		
Spectrofluorimétrie <i>in vivo</i> de la chlorophylle <i>a</i> (méthode à développer)	<ul> <li>Rapidité d'analyse</li> <li>Reproductible</li> <li>Facilité d'emploi</li> <li>Facilité d'emploi</li> <li>Peu de coûts d'analyse</li> <li>Non destructive</li> <li>Compatible avec des cuvettes en plastique jetable</li> <li>Faible volume d'échantillon requis</li> <li>Grande sensibilité</li> </ul>	Sensibilité diminuée par les mesures <i>in vivo</i>		

Dans le détail, Hourtané 2019 montre que les incertitudes sur la mesure sont plus importantes avec la cellule de Nageotte que le compteur de particules.

Finalement, l'utilisation du phénomène de fluorescence pourrait permettre de suivre les populations de diatomées de façon indirecte par l'intermédiaire de la molécule de chl *a* extraite ou étudiée *in vivo*. De plus, cela offre la possibilité de travailler de façon non destructive avec des diatomées cultivées directement dans des cuvettes, ce qui représente un avantage majeur.

#### 2.3 Fluorescence et chlorophylle a

La fluorescence fait partie des réactions de luminescence. C'est un phénomène physique d'interaction onde-matière qui a pour origine l'absorption de photons (lumière) par une molécule fluorescente (fluorochrome). Laquelle émet à son tour des photons d'énergie inférieure (Williams, 1981). Cette émission de lumière ne peut se produire que pour des photons de longueur d'onde propres à chaque fluorochrome. C'est à cette seule condition que l'on peut observer correctement le phénomène. Par exemple, la molécule de quinine, premier fluorochrome découvert en 1845, émet une forte intensité de fluorescence pour des longueurs d'onde de 250 et 350 nm. Cette fluorescence se manifeste par une émission de lumière bleue à 450 nm (Locquet, 2019).

Dans le détail, lors de l'excitation d'une molécule par une source lumineuse, des photons vont apporter une énergie hv (proportionnelle à leur longueur d'onde) aux électrons moléculaires du fluorochrome. Ces derniers passent alors d'un état énergétique stable dit "fondamental" à un état "excité" non stable. Après dissipation d'une partie de l'énergie acquise par des processus de conversion interne (ex : chaleur) et de relaxation vibrationnelle, les électrons regagnent leur état fondamental par émission de photons de longueurs d'onde supérieures à celles des photons incidents. Ces derniers sont par conséquent moins énergétiques, c'est la fluorescence. Par ailleurs, l'intensité de fluorescence est proportionnelle à celle de la source d'excitation (Williams, 1981).

Le diagramme de Jablonksi (figure 9) décrit le phénomène de fluorescence à partir des transitions énergétiques que subissent les électrons des orbitales moléculaires périphériques (Harbinson et al, 2003).



Figure 9 : Diagramme de Jablonski simplifié

Sur cette figure, le terme  $S_0$  représenté par un trait épais sur le diagramme correspond à un état singulet des électrons qui est l'état fondamental. Les autres traits épais ( $S_1$ ,  $S_2$ ) représentent des états excités correspondant aux différents niveaux d'énergie vibrationnels que peuvent prendre les électrons. Chaque niveau d'énergie vibrationnel possède d'autres niveaux d'énergie, plus faibles et appelés niveaux d'énergie rotationnels (Valeur & Berberan-Santos, 2012). Ces derniers sont représentés par les traits plus fins sur le diagramme.

L'excitation, correspondant au passage de l'électron du niveau  $S_0$  à un niveau  $S_n$  a lieu par absorption d'un photon. Cette transition se produit en  $10^{-15}$  secondes environ. Le temps passé par l'électron à l'état excité (qui comprend également les processus de relaxation interne) appelé temps de vie en fluorescence dure environ  $10^{-12}$  à  $10^{-9}$  secondes (Guay, 2017, Jameson 2014). Enfin, la désexcitation par l'émission du photon de fluorescence a lieu en  $10^{-10}$  à  $10^{-7}$  secondes (Valeur, 2004).

On peut étudier la fluorescence avec un spectrofluorimètre qui permet de détecter et même de quantifier des concentrations de composés de l'ordre de la trace et ultra-trace (termes désignant des quantités très faibles et difficilement détectables : ng-µg) en fonction de la fluorescence (Valeur, 2004). Il est donc employé dans des laboratoires spécialisés dans les contaminations environnementales aux éléments traces notamment. Son fonctionnement est le suivant : la source d'excitation émet une lumière dont les radiations sont filtrées par un monochromateur, qui sélectionne une longueur d'onde d'excitation ( $\lambda$ exc) propre à la molécule d'étude. Passé ce premier monochromateur, cette longueur d'onde excite spécifiquement les électrons de la molécule d'intérêt contenue dans l'échantillon. Ceux-ci émettent alors une fluorescence, caractérisée par une lumière polychromatique multidirectionnelle. Cette lumière est filtrée de sorte que seule la principale longueur d'onde émise par la molécule ressorte du second monochromateur. Enfin, le détecteur mesure l'intensité de cette longueur d'onde et retranscrit la mesure par une valeur de fluorescence en unités arbitraires (u.a.). On note que le monochromateur d'émission et le détecteur sont placés à 90° par rapport au faisceau incident pour éviter que ce dernier n'interfère dans les mesures de fluorescence (voir figure 10).



Figure 10 : Fonctionnement simplifié d'un spectrofluorimètre (traduit de Williams, 1981)

Sur le plan moléculaire, les fluorochromes sont caractérisés par des structures rigides, planes et par la présence de cycles et liaisons saturées ( $\pi$ ) (Valeur (2004), Lakowicz, (2006)). Parmi les molécules fluorescentes on compte les hydrocarbures aromatiques polycycliques (HAP) et plus généralement les aromatiques (Lakowicz, 2006), mais aussi les chlorophylles ainsi que certains acides aminés comme la tyrosine et phénylalanine (Valeur, 2004). La molécule de chl *a* (figure 11) possède ces caractéristiques grâce à la présence dans sa structure moléculaire d'un macrocycle prolongé en C<sub>17</sub> par un queue phytol (Bolling, 2007). L'ensemble forme une structure rigide et relativement plane (figure 11).



Figure 11 : Représentation structurale de la molécule de chlorophylle a

Ces éléments confèrent à la molécule la propriété de fluorescer lorsqu'elle est exposée à des longueurs d'ondes particulières : autour de 430 et 660 nm (Saint-Dizier (1981), Falkowski (1985), Gitelson (1999), Harbinson et al (2003), Valeur (2004), Conceição Marques et al (2013), Del Amo (2014)). La molécule de chl *a* joue un rôle essentiel dans la photosynthèse en tant que pigment majeur des photosystèmes I et II des chloroplastes (Bolling, 2007). Elle est le "centre réactionnel" des photosystèmes I et II, c'est à dire l'endroit vers lequel convergent et sont absorbés les photons de longueurs d'onde spécifique venant de la lumière solaire. L'énergie accumulée est alors libérée sous forme d'électrons qui transitent le long d'une chaîne de transfert à l'origine de la photosynthèse (Coumoul et al 2018). Enfin, elle est ubiquiste chez tous les organismes photosynthétiques (Lazzaroto, 1999) rendant possible l'étude des diatomées par spectrofluorimétrie.

Une des applications qui en découle est la détermination de la biomasse phytoplanctonique par volume d'eau échantillonné à partir de la concentration de chl *a* mesurée ou extraite chimiquement (Lazaroto, 1999). Cette quantification permet notamment la caractérisation du statut trophique des masses d'eau (Vollenweider et Kerekes (1982), CEAEQ (2012)).

#### 2.4 Extraction, dosage de la chlorophylle a et applications

Le statut trophique des masses d'eau est étroitement lié à la prolifération d'espèces phytoplanctoniques. En effet, la biomasse algale a tendance à augmenter avec le niveau trophique des lacs et rivières (Lazaroto, 1999). Les espèces phytoplanctoniques ayant en commun la possession de chl *a*, la quantification de la molécule à partir d'échantillons

d'eau permet donc non seulement de définir le statut trophique des masses d'eau, mais également de fournir une donnée qualitative sur la concentration en phytoplancton par sa biomasse.

Ainsi, selon Vollenweider et Kerekes (1982), les différents états trophiques peuvent être associés aux concentrations en chl *a* suivantes : oligotrophe : [chl *a*] < 35 µg/L, mésotrophe :  $35 \mu g/L < [chl$ *a*] < 100 µg/L et eutrophe > 100 µg/L.

Le dosage de la molécule est couramment réalisé par extraction, acidification puis par mesure spectrophotométrique ou spectrofluorimétrique. Pour y parvenir, la molécule doit au préalable être extraite puis dosée. L'extraction peut être réalisée à l'aide de solvants organiques comme l'éthanol ou l'acétone (Saint-Dizier, 1981). Elle peut être accessoirement suivie d'une "purification" de l'extrait par méthodes chromatographiques. En effet, la chl a n'étant pas le seul pigment photosynthétique chez les diatomées, l'extraction conduit à un mélange de pigments (Saint-Dizier (1981), CEAEQ (2012), Del Amo (2014)). La purification permet alors de ne sélectionner que la chl a.

Lorsqu'aucune purification n'est faite, on procède à une mesure de la fluorescence ou de l'absorption (bien moins précis) de l'extrait avant et après acidification à l'acide chlorhydrique (HCl). L'utilité de cette étape vient principalement du fait que la phéophytine a (produit de dégradation de la chl a), possède une bande d'absorption proche de celle de la chl a et émet donc à des longueurs d'onde proches (Saint-Dizier (1981), CEAEQ, (2012)). Ainsi, la mesure finale de fluorescence d'un mélange risquerait de fausser l'estimation du contenu en chl a par interférence du signal émis. L'astuce consistant à faire des mesures de fluorescence avant et après acidification, vient du fait que la chl a se transforme en phéophytine a en présence d'HCl (Saint-Dizier, 1981). On parvient alors par soustraction des valeurs mesurées, à déduire la fluorescence imputée aux deux molécules. Enfin, ces valeurs sont alors introduites dans des équations qui permettent de déduire la concentration de chl a et/ou phéophytine a de l'échantillon.

Parmi les différentes techniques de comptage/estimation cellulaire décrites précédemment, les méthodes basées sur le principe de la fluorescence in vivo ont l'avantage d'être non destructives, sensibles, peu exigeantes en volume et d'éviter les manipulations directes des échantillons. Ceci pour un gain de temps et une reproductibilité optimale. Ainsi, la vérification d'une relation de linéarité entre la densité cellulaire mesurée au compteur de particules (qui s'avère être une méthode de choix pour l'étude de la croissance algale) et la fluorescence in vivo des échantillons permettrait de valider une approche de suivi de la densité cellulaire de N. palea. L'utilisation de la fluorescence de la chl *a in vivo* serait donc au cœur de cette approche. Si une relation de linéarité est vérifiée, de simples mesures de fluorescence permettraient d'obtenir (par le biais d'une formule) une estimation du nombre de diatomées dans un échantillon. Cela permettrait de s'affranchir des procédures de remise en suspension et autres difficultés rencontrées avec les méthodes de comptage directes mais aussi de limiter les coûts et la longueur des manipulations dans le cas d'extractions chimiques. Ainsi, avec la mise au point de cette méthode, la chl a ferait office de biomarqueur de croissance ou encore de toxicité (inhibition de croissance) dans le cas d'expositions à des métaux.

#### 3. Matériel et méthode

#### 3.1 Détermination des longueurs d'onde de travail

Une phase de validation des longueurs d'onde de travail précède l'application du protocole. Après avoir effectué des blancs par mesure de la fluorescence du milieu de culture CHU-10 modifié, des spectres d'émission de fluorescence à 430, 436, 440, 660 et 680 nm ont été réalisés à partir des solutions préparées  $a_1$  et  $a_2$  (figure 12). Les longueurs d'onde d'excitation utilisées ont été choisies dans la littérature pour leur forte capacité à exciter la chl *a*. Il s'ensuit un comptage cellulaire et une extraction de la chl *a* pour  $a_1$  et  $a_2$ .



Figure 12 : Schéma de la préparation des solutions test a1 et a2

Cette première étape a permis la détermination du couple optimal de longueurs d'onde exc/em de la chl *a* utilisé dans la suite des expériences, mais également la calibration du spectrofluorimètre.

# <u>3.2 Test de la méthode : mesure de la fluorescence *in vivo* et extraction de la chlorophylle *a*</u>

Une fois les longueurs d'onde exc/em de la chl *a* déterminées, un plan expérimental a été mis au point (cf fig. 13 et 14) afin de comparer les intensités de fluorescence d'une quinzaine d'échantillons (dans une large gamme de densités cellulaires) de cultures de *N. palea* avec leur densité cellulaire respective. Ceci afin de mettre en évidence une potentielle relation entre ces deux paramètres. Par la suite, la chl *a* des diatomées contenues dans chaque cuvette a été extraite, sa fluorescence mesurée, puis sa concentration déterminée à partir d'une courbe de calibration. Ainsi une comparaison [chl *a*]/densité cellulaire a aussi pu être réalisée (cf Résultats)

Afin de travailler sur une large gamme de densités cellulaires : 15 échantillons ont été préparés par des dilutions en cascade à partir de trois solutions mères indépendantes de culture de diatomées. Le schéma suivant illustre le principe de cette dilution (figure 13). Cette opération a été réalisée trois fois (solutions mères A, B et C).



Figure 13 : Schéma de la dilution en cascade réalisée pour la solution mère A

Avant chaque prélèvement, une attention particulière est accordée à la reprise des cultures à l'aide d'une pipette jusqu'à homogénéisation totale du contenu. Une fois les échantillons obtenus et répartis en trois séries de cinq cuvettes diluées graduellement, pour chaque volume d'échantillon :

- 3 mL sont placés dans une cuvette et utilisés pour la mesure de la fluorescence (1)
- 1 mL sont dilués dans une solution tampon pour le compteur de particule (2)
- 0,5 mL sont mélangés à de l'acétone pour l'extraction de la chl *a* (3)



Figure 14 : Schéma simplifié des différentes étapes du protocole

#### 3.3 Suivi de croissance des diatomées

Puisqu'une relation de proportionnalité a pu être déterminée entre la fluorescence *in vivo* et la densité cellulaire mesurée (cf. Résultats), la réalisation d'un suivi de croissance des diatomées sur 9 jours a été décidée à la suite du test de la méthode. Ceci afin de comprendre l'influence de différents contenants et de leurs caractéristiques (nature du matériau et surface d'échange air-solution) en parallèle du paramètre "agitation" sur la croissance cellulaire.

Dans un premier temps, une solution mère de culture de *N. palea* a été filtrée puis reconcentrée (figure 15) et la densité cellulaire du volume reconcentré mesurée.





Figure 15 : Reconcentration d'une culture de *N. palea* en vue d'un comptage cellulaire

Dans un second temps, une fraction de ce volume, complétée par du milieu de culture CHU-10 modifié a été ajoutée aux cuvettes et erlenmeyers afin de fixer leur densité cellulaire initiale à 50 000 cellules/mL (figure 16).

Pour ce faire, les diatomées ont été placées dans deux types de contenants : cinq erlenmeyers (verre) et dix cuvettes plastiques. Parmi les dix cuvettes, cinq étaient "agitées" par resuspension manuelle à l'aide d'une pipette et constituaient la condition **CA** (cuvettes agitées), le reste des cuvettes représentent la condition **CNA** (cuvettes non agitées).



#### Figure 16 : Répartition du volume reconcentré dans les contenants

- Un comptage cellulaire a été effectué à t<sub>0</sub> et t<sub>9</sub> pour les cuvettes et la fluorescence *in vivo* mesurée cinq fois (tous les 2 à 3 jours) au cours du suivi.
- A l'inverse, la densité cellulaire a été mesurée cinq fois dans les erlenmeyers agités (EA) et la fluorescence *in vivo* à t<sub>0</sub> et t<sub>9</sub>.

#### 4. Résultats



4.1 Blancs réalisés à partir du milieu de culture CHU-10 modifié

Figure 17 : Spectre d'émission du milieu de culture CHU-10 modifié suite à une excitation à 430 nm Les spectres d'émission des blancs (milieu de culture CHU-10 modifié) montrent une fluorescence quasi-nulle pour toutes les longueurs d'onde testées. Ainsi, la preuve est apportée que le milieu de culture des diatomées n'influe pas sur la fluorescence mesurée des échantillons. La figure 17 illustre le blanc effectué pour une longueur d'onde de 430 nm. Aucun signal d'intensité significative n'est décelé.





Le spectre (figure 18) comporte un premier pic d'émission de forte intensité et de longueur d'onde égale à  $\lambda$ exc. On remarque un second pic beaucoup moins intense aux alentours de 680 nm.

On peut faire les mêmes observations pour  $a_2$  à 430 nm à la différence que les intensités des deux pics sont diminuées d'un facteur 2, correspondant au facteur de dilution appliqué pour  $a_1$  et  $a_2$ .

Figure 18 : Spectre d'émission de la solution  $a_1$  à 430 nm

Les précédents résultats obtenus avec  $a_1$  et  $a_2$  (composition indiquée dans "Matériel et méthodes") présentent les mêmes caractéristiques pour  $\lambda exc = 440$ , 660 et 680 nm, à ceci près qu'un bruit de fond important apparait sur les spectres réalisés à 660 et 680 nm (voir figure 19).



Figure 19 : Spectre d'émission de la solution a<sub>1</sub> suite à une excitation à 680 nm

Figure 19, le spectre montre un pic d'émission très important pour la même longueur d'onde que  $\lambda$ exc. De plus, un bruit de fond important est observé dans la gamme de longueur d'onde d'émission.





Figure 20 : Spectre d'émission d'une culture de *Chlamydomonas reinhardtii* à 430 nm

Deux pics d'émission (figure 20) sont également observés ; un premier de forte intensité obtenu pour la même longueur d'onde que  $\lambda$ exc, et un second d'intensité fortement atténuée aux alentours de 680 nm. Ici encore, les fentes d'excitation et d'émission (fentes exc/em) sont de 5 nm.

#### <u>4.4 Comparaison des spectres d'émission pour des fentes exc/em = 20/5 nm et 20/20</u> nm suite à l'excitation d'une culture à 436 nm



Figure 21 : Spectre d'émission d'une culture à 436 nm (fente 20/5)



On observe (figure 21 et 21bis) que le passage d'une fente d'excitation de diamètre 5 à 20 nm augmente de façon très significative l'intensité des pics et en particulier le second, apparenté à un pic de fluorescence. L'intensité du second pic d'émission est ainsi multipliée d'un facteur 100 par rapport à la figure 9, passant d'environ 0,15 à 15 u.a.



Figure 22 : Spectre d'émission à 436 nm (fente 20/20)

Figure 22bis : Zoom sur l'intensité de fluorescence à 680 nm (fente 20/20 nm)

De la même façon que pour les deux figures précédentes, l'augmentation de la fente d'excitation ET d'émission (20/20 nm) entraine une hausse d'intensité des signaux (figure 22). Le deuxième pic voit ainsi son intensité augmenter de plus d'un facteur 10 (figure 22bis par rapport à la figure 21bis).

#### <u>4.5 Relation fluorescence de la chlorophylle *a in vivo/*extraite et densité cellulaire des <u>cultures de *Nitzschia palea*</u></u>

Le graphe suivant (figure 23) présente la densité cellulaire (milliers de cellule) des échantillons, déterminée au compteur de particule en fonction de leur fluorescence, mesurée avec le couple  $\lambda$ exc = 436 nm et  $\lambda$ em = 680 nm et des fentes exc/em.



Figure 23 : Densité cellulaire en fonction de l'intensité de fluorescence in vivo et des fentes exc/em

On observe que l'intensité de fluorescence ( $I_f$ ) mesurée augmente avec le nombre de diatomées pour les deux couples de largeur de fente testés. Cette augmentation est environ dix fois plus importante avec le couple 20/20 nm que 20/5 nm, comme en témoigne le rapport des coefficients directeurs des deux droites.

Enfin, les coefficients de corrélation (R<sup>2</sup>) des deux droites sont très proches de 1, permettant d'appuyer la relation linéaire des deux paramètres **pour cette gamme de fluorescence**. En effet deux valeurs de fluorescence égales à 1000 et donc non exploitables (saturation du détecteur) ont été mesurées pour les échantillons les plus concentrés. La fluorescence suit donc une augmentation linéaire en fonction du nombre de cellule quelles que soient les fentes utilisées pour une densité cellulaire inférieure à 100 000 cellules/mL.



Figure 24 : Densité cellulaire (millie de cellule) en fonction de la concentration de la chlorophylle *a* extraite (ppb) Ce graphique (figure 24) représente l'évolution de la densité cellulaire des échantillons en fonction de la concentration en chl *a* extraite (ppb). La réalisation au préalable d'une courbe d'étalonnage (figure 29, Annexe 1) à partir d'une gamme étalon de chl *a* et de sa fluorescence, a permis de déduire la relation suivante (équation 2) :

#### $[Chl a] = (I_f)/1,2879.$

Les concentrations présentées figure 24 sont donc calculées à partir de cette relation et des intensités de fluorescence (fente 20/5 nm) de la chl *a* extraite des échantillons (tableau 2, Annexe 1). Ainsi, on peut observer que la concentration en chl *a* augmente avec la densité cellulaire. Le coefficient  $R^2 = 0,88$ , proche de 1, permet raisonnablement de qualifier cette augmentation de linéaire et confirmer une relation de proportionnalité entre ces deux paramètres comme ceux de la figure 20.



4.6 Suivi de croissance de cultures de Nitzschia palea dans trois différentes conditions

Figure 25 : Densités cellulaires estimées et mesurée, conditions CNA et CA

Le graphique ci-dessus (figure 25) permet d'effectuer une première comparaison entre les densités cellulaires mesurées et estimées au cours du suivi pour les conditions CNA et CA. Il apparait que les densités cellulaires estimées à  $t_0$  et  $t_9$  diffèrent fortement de celles mesurées pour les deux conditions. Cela est particulièrement vrai pour la condition CNA dont la différence densité mesurée/estimée à  $t_9$  est d'environ 400 000 cellules/mL contre un peu plus de 130 000 cellules pour CA.

Également, on peut observer que les densités cellulaires mesurées au terme du suivi (t = 9 j) ne sont pas significativement différentes bien que la croissance cellulaire semble un peu plus importante pour CNA. Enfin, contrairement à ce qui était prévu, la densité cellulaire initiale des contenants a été mesurée à environ 120 000 cellules/mL.



Figure 26 : Densité cellulaire mesurée en fonction du temps, condition EA

La figure 26 décrit la croissance cellulaire des diatomées pour la condition EA à travers l'évolution dans le temps de leur densité cellulaire mesurée. Cette évolution est marquée par une courbe à l'allure sigmoïdale. En effet, une baisse de la densité cellulaire mesurée est remarquée à t = 2 j (48 h) et en toute fin de suivi t = 9 j (216 h). Néanmoins, la croissance cellulaire est globalement positive entre t<sub>0</sub> et t<sub>9</sub>.



Figure 27 : Densité cellulaire mesurée et estimée condition EA

L'histogramme ci-dessus (figure 27) compare la densité cellulaire mesurée et estimée à t = 9 j. Premièrement, on peut constater que les deux densités cellulaires sont très proches avec un  $\Delta \sim 8500$  cellules/mL. De plus, les écarts types des barres montrent que les différences mesurées ne sont pas significatives.



Figure 28 : Densités cellulaires mesurées pour les conditions CNA, CA et EA à t = 9 j

La figure 28 présente les densités cellulaires mesurées en fin d'expérience (à t = 9 j) pour les trois conditions expérimentales du suivi de croissance ainsi que les écarts-types associés. En premier lieu on observe que la densité cellulaire mesurée pour la condition CNA est la plus élevée avec environ 418 000 cellules/mL contre environ 277 000 et 271 000 cellules/mL pour les conditions CA et EA. Les écarts-types permettent également d'affirmer que les différences entre les trois conditions ne sont pas significatives. Enfin, il est à noter que les densités cellulaires mesurées pour les conditions CA et EA sont très proches affichant une différence de seulement 6000 cellules/mL environ.

#### 5. Discussion

Des spectres d'émission ont d'abord été réalisés en utilisant des longueurs d'onde d'excitation de la chl *a in vivo* issues de la littérature. Les premiers résultats n'ont pas permis de mettre en évidence un signal de fluorescence exploitable, mais d'observer un pic d'émission particulièrement intense situé aux mêmes longueurs d'onde que celles d'excitation, constat répété pour toutes les longueurs d'onde testées. Cependant, un très faible signal était observé pour  $\lambda$ exc = 430 et 440 nm autour de 680 nm, apparenté à de la fluorescence. De plus, un bruit de fond important était enregistré pour  $\lambda$ exc = 660 et 680 nm, excluant ces valeurs de la suite des manipulations. Enfin, ces spectres étaient réalisés avec une fente exc/em de 5/5 nm.

Au vu de ces résultats, non exploitables de par la faiblesse du signal de fluorescence, plusieurs hypothèses ont été émises. Le principal pic d'émission serait dû à :

- H1 : Une réflexion importante du faisceau d'excitation par le frustule des diatomées

- H2 : Un phénomène de diffraction du faisceau incident

Enfin, la faiblesse du signal de fluorescence serait due à :

- H3 : Une intensité lumineuse du faisceau liée à la largeur de fente ne permettant pas de fournir une source d'excitation lumineuse suffisante.

Un spectre d'émission a donc été réalisé à 430 nm (fente 5/5 nm), à partir d'une culture d'algues vertes (cf. fig. 16), pour rappel, dépourvues de frustule. Or le même résultat fut obtenu, invalidant la première hypothèse.

L'hypothèse 2, bien qu'elle n'ait pas été vérifiée semble probable sur le plan théorique du fait de l'ordre de grandeur de la longueur d'onde du faisceau, proche de la taille des cellules et augmentant ainsi la probabilité qu'un phénomène de diffraction de la lumière incidente arrive.

Pour vérifier l'hypothèse 3, la largeur de fente des faisceaux d'excitation et d'émission est augmentée à 20 nm et on observe une forte augmentation de l'intensité du signal associée à de la fluorescence, le rendant ainsi exploitable ; résultat souhaité (cf. fig. 21bis et 22bis).

Forts de ce résultat, une série de spectres d'émission à 430, 436 et 440 nm sont réalisés pour des couples de fentes exc/em de 20/20 nm et de 20/20 nm. Cette progression permet d'intensifier le signal de fluorescence. Nous choisissons alors comme  $\lambda$ exc et  $\lambda$ em 436 et 680 nm pour la suite des expériences (cf. Matériel et méthodes).

Les résultats sont représentés par les figures 23 et 24 (cf. Résultats).

La figure 23 met en évidence une relation de proportionnalité entre la fluorescence *in vivo* des échantillons et leurs densités cellulaires respectives, ceci pour les deux couples de fentes exc/em. En effet, les nuages de points obtenus pour chaque couple peuvent être illustrés par deux courbes de tendance, d'équation y = ax (fonction linéaire), chacune ayant un coefficient de corrélation  $R^2 \ge 0.93$  confirmant le lien de proportionnalité entre ces deux paramètres.

Afin d'appuyer ce résultat, une courbe d'étalonnage (figure 29, Annexe I) a été réalisée à partir d'une gamme étalon de chl *a* pour déterminer sa concentration dans chaque échantillon à partir de leur fluorescence. Ainsi, en mesurant celle de la chl *a* extraite dans l'acétone pour chaque échantillon (fente 20/5 nm) on a pu la quantifier au sein de chaque échantillon et la relier à la densité cellulaire illustrée par la figure 24, dont la courbe de tendance affiche un  $R^2 = 0,88$ .

Il en ressort que la relation de proportionnalité obtenue figure 23 pour la courbe « fente 20/5 » est très proche de celle obtenue pour le graphe 24 qui illustre une

autre utilisation indirecte de la fluorescence pour l'estimation de densités cellulaire. Ainsi, la fluorescence *in vivo* est un outil suffisant et fiable pour estimer la densité cellulaire, permettant de ce fait de se passer d'une extraction chimique coûteuse et à forte empreinte environnementale.

Aussi, la droite de régression décrivant l'évolution de I<sub>f</sub> en fonction de la densité cellulaire (fente 20/20) arrive à saturation rapidement (~ 300 000 cellules/mL). Ce, alors que le seuil de saturation est loin d'être atteint du côté de la courbe relative à la fente 20/5. Cela laisse penser que l'utilisation de ce couple de fentes exc/em et de l'équation de cette droite dans un but d'estimer la densité cellulaire serait plus sensible aux faibles densités cellulaires. Il serait ainsi judicieux d'utiliser l'équation de la droite de régression (fente 20/20) pour déterminer les densités cellulaires d'échantillons peu concentrés et l'équation relative à la droite de régression (fente 20/5) pour l'estimation de densités cellulaires plus élevées afin d'obtenir un signal exploitable et non saturé.

En ce qui concerne les résultats du suivi de croissance effectué sur 9 jours (cf 4.5, Résultats), ces derniers sont assez hétérogènes et témoignent avant tout d'une grande variabilité de croissance des diatomées dans le temps.

La figure 25 (cf. Résultats) montre de fortes différences entre les estimations réalisées pour les conditions CA et CNA à partir de la formule tirée de l'équation de la droite de régression 20/5. Il semble normal de constater des écarts entre ces deux conditions sensiblement différentes, en effet, les estimations dépendent avant tout de l'importance du signal de fluorescence, lui-même lié au nombre de diatomées en suspension au sein de la cuvette. Or il y a naturellement davantage de diatomées en suspension pour la condition CA par rapport à la condition CNA dont les cuvettes de cette dernière ne sont jamais agitées et dont les diatomées ont davantage tendance à sédimenter.

Néanmoins, de très forts écarts sont constatés entre la courbe d'estimation de la densité cellulaire pour la condition CNA et les valeurs mesurées. Comme énoncé précédemment, ces écarts, qui tendraient à invalider la formule d'estimation, peuvent s'expliquer par le simple fait que les dénombrements cellulaires réalisés au compteur de particules sont systématiquement effectués après resuspension des cuvettes tandis que les mesures de fluorescence étaient au contraire réalisées avant resuspension pour la condition CNA. La conséquence est que les densités cellulaires estimées ne sont pas réellement comparables aux densités cellulaires mesurées.

En revanche cette comparaison illustre particulièrement le fait que la resuspension des cultures est indispensable à 1) L'obtention d'un signal de fluorescence représentatif de la densité cellulaire réelle et 2) L'obtention d'une densité cellulaire représentative lors du passage du compteur de particules.

Enfin, il y avait également des différences entre les densités cellulaires mesurées au compteur de particules et estimées par fluorimétrie dans les cuvettes CA. Cela pourrait être dû à une variabilité de l'état physiologique des diatomées par rapport au test de la méthode ou encore à une variabilité des lectures du spectrofluorimètre liée à un manque d'inter-calibration. Si tel était le cas, cela amènerait à la conclusion suivante : il peut être difficile de prévoir la densité cellulaire de cultures de diatomées tel que cela a été réalisé. Afin de remédier à ce problème, une calibration inter-mesure pourrait être envisagée à l'aide de sulfate de quinine, un standard bien connu en spectroscopie de fluorescence (Lawaetz et Stedmon, 2009).

En ce qui concerne l'évolution temporelle de la densité cellulaire pour la condition EA (figure 26, cf. Résultats), l'allure de la courbe, qualifiée de sigmoïde témoigne également

d'une variation "inattendue" de la croissance cellulaire. En effet, les courbes de croissance habituellement consignées dans la littérature possèdent une allure exponentielle typique de la croissance des microalgues. Il est difficile d'avancer avec certitude les causes de ces variations, néanmoins, il est possible d'émettre certaines hypothèses, en particulier pour les baisses de croissances observées à t = 2 j et t = 9 j. La première hypothèse concerne la baisse notable de la densité cellulaire, 2 j après le lancement du suivi de croissance. En effet, préalablement à la mise en place de ce suivi de densité cellulaire, la solution placée dans les cuvettes et les erlenmeyers a été filtrée, resuspendue, agitée afin de déterminer sa densité cellulaire et finalement inoculée. Les diverses resuspensions, la pression exercée sur les diatomées lors de la filtration (bien que faible) et les changements de contenants ont pu induire un stress ou encore une mortalité importante au sein des cultures dans un court laps de temps après le début du suivi. L'hypothèse du stress lié aux manipulations est d'autant plus plausible que *Nitzschia palea* est une diatomée au mode de vie périphytique.

La seconde hypothèse concerne la baisse finale de densité mesurée à t = 9 j (dernière mesure effectuée). Les diatomées étant cultivées dans un volume de milieu de culture relativement faible (10 mL pour les erlenmeyers et 3 mL pour les cuvettes), il se peut qu'à partir d'une certaine densité cellulaire, les ressources nutritives restantes ne soient pas suffisamment importantes ou bien simplement épuisées, entrainant une phase de mortalité importante. Cette hypothèse est appuyée par un constat similaire observé pour la courbe d'estimation de la densité cellulaire de la condition CA au même temps.

Parmi les autres résultats notables obtenus lors du suivi se trouvent ceux présentés par la figure 27 (cf. Résultats) qui montre que les densités moyennes mesurées et estimées pour la condition EA à t = 9 j ne sont pas significativement différentes. Qui plus est, la différence affichée entre ces deux moyennes est minime avec un  $\Delta \sim 18\,000$  cellules/mL, soit une variation de 6,2 %. On peut donc en déduire que la formule d'estimation de la densité cellulaire fonctionne bien ici contrairement aux conditions CA et CNA.

Le bilan du suivi de croissance est représenté par la figure 28 (cf. Résultats) qui compare les densités moyennes mesurées à t = 9 j pour les trois conditions CA, CNA et EA. Il est tout d'abord intéressant de rappeler que les trois densités cellulaires finales mesurées ne sont pas significativement différentes, mais également que les densités cellulaires finales mesurées pour les conditions CA et EA sont très proches ( $\Delta \sim 8500$  cellules/mL). Enfin malgré des différences non significatives, la condition CNA enregistre la densité cellulaire mesurée la plus importante.

Ces observations permettent d'affirmer d'une part que la croissance cellulaire des diatomées dans les cuvettes plastiques est bonne et comparable à celle dans les erlenmeyers, et ce, malgré un volume de milieu de culture très faible (3 mL). D'autre part, la forte densité cellulaire moyenne mesurée pour la condition CNA laisse place à une hypothèse : cette condition pourrait être la plus favorable à la croissance des diatomées. Ceci pourrait être expliqué par le fait qu'elle reconstitue le mieux les conditions de vie des diatomées et leur évite le stress associé aux resuspensions régulières. Enfin, les densités cellulaires moyennes obtenues aux termes de ce suivi ne semblent pas aberrantes si ces dernières sont comparées à celles obtenues dans Hourtané 2019. Enfin, dans le but de confirmer les précédentes affirmations et constatations, la réalisation de suivis similaires pourrait être envisagée. Si tel est le cas, l'utilisation d'un nombre supérieur de réplications qui seraient "sacrifiées" au cours du temps pourrait apporter des informations jusqu'alors manquantes dans les expériences

réalisées (ex : mesure de la densité cellulaire des cuvettes aux différents temps de mesure avec le compteur de particules).

#### 6. Conclusion

Les premiers résultats obtenus au cours de ce projet ont montré qu'il était possible d'étudier la densité cellulaire d'une culture de *Nitzschia palea* avec un spectrofluorimètre en utilisant la fluorescence *in vivo* de la chlorophylle *a*. Ces résultats ont notamment abouti sur une relation de proportionnalité intensité de fluorescence/densité cellulaire : ce qui était souhaité. De plus, cette relation a pu être modélisée par une droite dont l'équation a fourni une formule permettant d'estimer la densité cellulaire à partir de l'intensité de fluorescence. En outre, ces résultats prometteurs ont également mis en évidence l'importance de la largeur des fentes d'excitation et d'émission des faisceaux du spectrofluorimètre pour obtenir un signal de fluorescence exploitable.

Cependant, les résultats du suivi de croissance des diatomées réalisé par la suite ont été assez hétérogènes dans l'ensemble. En effet, cette seconde partie du projet a montré des limites à l'utilisation de la fluorescence *in vivo*, notamment au travers des différences obtenues entre densités cellulaires estimées et mesurées (condition CA et CNA).

Cela pourrait être lié au fait que l'état physiologique de *Nitzschia palea* est très variable et qu'elles sont potentiellement très sensibles aux stress que peut engendrer les manipulations. Enfin il est apparu que les cuvettes plastiques étaient un contenant de choix, notamment pour l'étude de *Nitzschia palea*. En effet, elles semblent fournir un milieu permettant une bonne croissance des diatomées assurant une bonne reproductibilité des mesures dans le temps. Elles peuvent être facilement agitées et permettent de réaliser des mesures rapidement. D'autre part, leur faible volume permet un allègement supplémentaire des coûts liés à l'utilisation de milieu de culture (ou éventuellement de solvants).

Finalement, il serait intéressant de peaufiner la méthode mise en place au cours de ce projet par la réalisation d'un ou plusieurs suivis de croissance de la densité cellulaire similaires. En effet, on note parmi les estimations du suivi de croissance certains résultats cohérents (estimation de la densité cellulaire finale, condition EA) et donc encourageants.

Également, une calibration inter-mesure du spectrofluorimètre à l'aide de sulfate de quinine (par exemple) permettrait de corriger d'éventuelles variations de la sensibilité de mesure. Une formule d'estimation plus robuste pourrait alors être déterminée.

Une telle formule pourrait ensuite être utilisée dans le cadre d'exposition de *Nitzschia palea* à des métaux en utilisant l'intensité de fluorescence *in vivo* comme mesure indirecte de la densité cellulaire et donc comme indicateur de toxicité. En effet, bien que les mesures de fluorescence *in vivo* soient moins sensibles, la spectrofluorimétrie en elle-même est une méthode d'analyse sensible, compensant cet inconvénient. Elle mérite donc de faire l'objet de plus amples investigations. De plus, elle s'impose comme une méthode plus rapide que celles habituellement employées pour le comptage cellulaire, moins couteuse et non destructive. Toutefois, une incertitude demeure sur l'éventualité d'un impact du métal sur la production de chlorophylle *a* par les cellules.

#### Bibliographie

Albani JR. (2001) Absorption et fluorescence Principes et applications - Lavoisier, Paris, 248 pages

Bauman HA., Morrison L. Stengel DB. (2009) Metal accumulation and toxicity measured by PAM- Chlorophyll Fluorescence inseven species of marine macroalae. Ecotoxicology and Environnemental Safety. 72, 1063-1075

Bolling L. In vivo study of the Protochorophyllide Oxydoreductase A function in Arabidopsis thaliana. [en ligne] Thèse de doctorat en Biologie végétale. Grenoble : Université Joseph-Fourier - Grenoble I, 2007, 133 pages <HAL archive-ouvertes.fr> (consult. le 02/06/2020)

Branco D., Lima A., Almeida SFP., Figueira E. (2010) Sensitity of biochemical markers to evaluate cadmium stress in the freshwater diatom Nitzschia palea (Kützing) W. Smith. Aquatic Toxicology. 99, 109-117

Brett, Michael, et Dörthe Müller - Navarra. « The Role of Highly Unsaturated Fatty Acids in Aquatic Foodweb Processes ». *Freshwater Biology* 38, n°3 (1997): 483-99.

https://doi.org/10.1046/j.1365-2427.1997.00220.x.

CENTRE D'EXPERTISE EN ANALYSE ENVIRONNEMENTALE DU QUÉBEC. Détermination de la chlorophylle a : méthode par fluorométrie, MA. 800 – Chlor. 1.0, Rév. 2, Ministère du Développement durable, de l'Environnement et des Parcs du Québec, 2012, 16 pages.

Conceição Marques M., Williams Araújo Do Nascimento C. (2013) Analysis of chlorophyll fluorescence spectra for the monitoring of Cd toxicity in a bio-energy crop (jatropha curcas). Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology. 127, 88-93

Corcoll N., Bonet B., • Leira M., Guasch H (2011) Chl-a fluorescence parameters as biomarkers of metaltoxicity in fluvial biofilms: an experimental study. Hydrobiologia . 673, 119-136

Del Amo, Yolanda. *LE PHYTOPLANCTON et la CHLOROPHYLLE*. Arcachon : EPOC, 30 sept au 02 oct 2014, 65p.

Falkowski P., Kiefer DA. (1985) Chlorophyll a fluorescence in phytoplankton: relationship to photosynthesis and biomass. Journal of Plankton research. Vol. 7 no.5, 715-731

Gitelson AA., Buschmann C., Lichtenthaler HK. (1999) The Chlorophyll Fluorescence Ratio F735/F700 as an Accurate Measure of the Chlorophyll Content in Plants. Elsevier. 69, 296-302

Guay M. Utilisation de la spectroscopie de fluorescence pour la vérification du nettoyage d'un ingrédient pharmaceutique actif sur les surfaces des équipements de production - Mémoire de maîtrise en génie chimique. Laval : Université Laval Québec, 2017, 122 p.

Harbinson J., Rosenqvist E. (2003) Practical applications of chlorophyll fluorescence in plant biology - Jennifer R. De Ell and Peter M.A. Toivonon, Canada, 270 pages

Heredia A., Figueira E., Rodrigues CT., Rodriguez-Galvan A., Basiuk VA., Vrieling EG. and Almeida F.P. (2012) Cd<sup>2+</sup> affects the growth, hierarchical structure and peptide composition of the biosilica of the freshwater diatom Nitzschia palea (Küntzing) W.Smith. Phycological Research. 60, 229-240 Hourtané O. Etude du rôle de la matière organique naturelle dans l'accumulation et la toxicité du platine chez différents producteurs primaires d'eau douce - Mémoire Maître è.s sciences en sciences de l'eau, Québec : Université du Québec INRS-ETE, 2019, 154 p.

Kim Tiam S., Lavoie I., Doose C., Hamilton PB., Fortin C. (2018) Morphological, physiological and molecular responses of Nitzschia palea under cadmium stress. Ecotoxicology. 10646-018-1945-1, 1-14

Lakowicz JR. (2006) Principles of Fluorescence Spectroscopy - 3rd.dition. Springer, New York, 954 pages

Lavoie I., Hamilton PB., Campeau S., Grenier M., Dillon PJ. (2008) guide d'identification des diatomées des rivières de l'Est du Canada - Presses de l'Université du Québec

Lawaetz, Anders, et Colin Stedmon. « Fluorescence Intensity Calibration Using the Raman Scatter Peak of Water ». *Applied spectroscopy* 63 (1 septembre 2009): 936-40.

https://doi.org/10.1366/000370209788964548.

Locquet N. (2019) Les principes de la spectroscopie de la fluorescence : de la théorie à la pratique. INRA, Paris, 34p.

Mann DG., Droop SJM. (1996). Biodiversity, biogeography and conservation of diatoms. Hydrobiologia, 336, 19-32.

Mann, David G. « The Species Concept in Diatoms ». *Phycologia* 38, n° 6 (novembre 1999): 437-95. https://doi.org/10.2216/i0031-8884-38-6-437.1.

Neckles, HA., Neill C. (1994). Hydrologic control of litter decomposition in seasonally flooded prairie marshes. Hydrobiologia, 286, 155-165.

Pandey LK., Kumar D., Yadav A., Rai J., Gaur JP. (2014) Morphological abnormalities in periphytic diatoms as a tool for biomonitoring of heavy metal pollution in a river. Elsevier. 36, 272-279

Rehnberg BG., Schultz DA., Raschke RL. (1982) Limitations of Electronic Particle Counting in Reference to Algal Assays. Wiley. 54-2, 181-186

Rhy-Williams AT. (1981) An Introduction to Fluorescence Spectroscopy - PerkinElmer, Beaconsfield, 36 pages

Saint-Dizier M. (1981) Comparaison des méthodes d'extraction et de dosage pour le calcul des pigments chlorophylliens phytoplanctoniques. Revue de la bibliographie récente. 31 pages

Valeur B. Invitation à la fluorescence moléculaire (2004) - 1ère édition. De Boeck, 208 pages

Vollenweider, R.A., and Kerekes, J. (1982) Eutrophication of waters. Monitoring, assessment and control. OECD Cooperative programme on monitoring of inland waters (Eutrophication control), Environment Directorate, OECD, Paris. P. 154

Wolters, Jan-Willem, Reitsema, Rosanne E, Verdonschot, Ralf C. M, Schoelynck, Jonas, Verdonschot, Piet F. M, & Meire, Patrick. (2019). Macrophyte-specific effects on epiphyton quality and quantity and resulting effects on grazing macroinvertebrates. *Freshwater Biology*, *64*(6), 1131-1142.

#### Annexe I

#### <u>Tableau 2 : Composition du milieu de culture CHU-10 modifié pour *Nitzschia palea* (Hourtané, 2019)</u>

Composition de la solution mère	Concentrations (g/L)	Volume pour 1 L de milieu (mL)	
NaSiO <sub>3</sub> 9H <sub>2</sub> O	5,80	1	
Ca(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> -4H <sub>2</sub> O	57,6	1	
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	10,0	1	
MgSO <sub>4</sub> -7H <sub>2</sub> O	25,0	1	
Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>	20,0	1	
Na <sub>2</sub> EDTA-2H <sub>2</sub> O	1,00	1	
H <sub>2</sub> SeO <sub>3</sub>	0,163	0,5	
Na <sub>2</sub> EDTA-2H <sub>2</sub> O FeCl <sub>3</sub> -6H <sub>2</sub> O	3,15 4,36	1	
$\label{eq:h3BO3} \begin{array}{c} H_3BO_3\\ MnCl_2\text{-}4H_2O\\ ZnSO_4\text{-}7H_2O\\ \end{array}\\ \text{ & Oligoéléments } & Na_2MoO_4\text{-}2H_2\\ CuSO_4\text{-}5H_2O\\ Co(NO_3)_2\text{-}6H_2O\\ \end{array}$	2,86 1,81 0,222 0,390 0,079 0,094	1	
Tampon HEPES	0,953	100	
Base	4,00 (0,100 M)	Variable	

Tableau 3 : Intensité de fluorescence de la gamme étalon de chlorophylle a selon lesdifférentes fentes utilisées (x/x)

Gamme étalon de Chl a (ppb)	Int fluo 20-05	Int fluo 20-20	
0	4,000. 10 <sup>-2</sup>	8,140. 10 <sup>-1</sup>	
10	12,86	227,4	
50	68,09	1000 (saturé)	
100	109,4	1000 (saturé)	
200	291,3	1000 (saturé)	
500	633,9 1000 (saturé)		
1000	1000 (saturé)	1000 (saturé)	

Tableau 4 : Intensité de fluorescence de la	<u>chloroph</u>	ylle a in	vivo,	de la	chloro	phy	lle a
<u>extraite et valeur du comptage cellulaire (</u>	<u>sigma)</u>	-					

Echantillons	Sigma	Int fluo 20-0	Int fluo 20-20	Int fluo Chl a extraite 20-5	Int fluo Chl a extraite 20-5
a1	30014	211,6	1000 (saturé)	109,2	1000
a2	16805	91,92	1000 (saturé)	45,28	814,9
a3	105552	46,30	640,5	23,56	425,8
a4	3943	28,63	363,1	10,79	192,3
a5	1682	14,03	182,6	6,302	114,9
b1	14325	74,49	946,0	36,11	652,8
b2	7804	34,72	437,2	19,89	363,0
b3	4254	20,88	275,8	8,674	158,2
b4	2015	11,05	143,6	4,209	76,69
b5	1197	5,337	72,81	2,490	45,71
c1	12902	54,34	697,2	19,86	359,7
c2	5020	31,52	388,8	14,13	257,4
c3	2592	16,01	200,0	5,909	108,0
c4	1251	7,161	91,96	3,569	63,44
c5	667	3,279	41,82	1,568	29,03
Blanc	29	-	-	-	-

<u>Courbe d'étalonnage réalisée à partir d'une gamme étalon de chlorophylle *a* permettant d'obtenir la concentration (ppb) d'un échantillon en fonction de sa fluorescence</u>



Figure 29 : Courbe de calibration d'une gamme étalon de chlorophylle *a* 



Figure 30 : Photographie d'une culture de Nitzschia palea



Figure 31 : Photographie des manipulations près du spectrofluorimètre