

# Thèse de Doctorat

Marine BITTEL

*Mémoire présenté en vue de l'obtention du  
grade de Docteur de l'Université de Nantes  
sous le sceau de l'Université Bretagne Loire*

**École doctorale :** *Sciences Pour l'Ingénieur, Géosciences, Architectures*

**Discipline :** *Biologie de l'environnement, des populations et écologie (section 67)*

**Spécialité :** *Microbiologie - Spectroscopie*

**Unité de recherche :** *GEPEA UMR CNRS 6144*

**Soutenue le** *23 Mai 2017*

**Thèse N° :**

## Détection de polluants chimiques par biocapteurs bactériens couplés à la spectroscopie Raman

### JURY

<b>Président :</b>	<b>Douglas RUTLEDGE</b> , Professeur, AgroParisTech
Rapporteurs :	<b>Philippe GARRIGUES</b> , Directeur de recherche, CNRS, Université de Bordeaux <b>Ganesh SOCKALINGUM</b> , Professeur, Université de Reims
Examineurs :	<b>Douglas RUTLEDGE</b> , Professeur, AgroParisTech <b>Olivier GONCALVES</b> , Maître de conférences, Université de Nantes <b>Gladys OUEDRAOGO</b> , Docteur, L'Oréal
Invité(s) :	<b>Anthony MARCONI</b> , Docteur, Tronico Vigicell
Directeur de Thèse :	<b>Gérald THOUAND</b> , Professeur, Université de Nantes
Co-encadrants de Thèse :	<b>Christophe CORDELLA</b> , Docteur, AgroParisTech <b>Marie-José DURAND</b> , Maître de conférences, Université de Nantes



DETECTION DE POLLUANTS CHIMIQUES PAR  
BIOCAPTEURS BACTERIENS COUPLES A LA  
SPECTROSCOPIE RAMAN



L'avance dans l'inconnu commence par une hypothèse, et une hypothèse n'est rien de plus qu'une structure plus ou moins irrationnelle, obtenue intuitivement. Une fois établie, elle est comparée dans tout ce qu'elle implique avec l'expérience et, si possible, mise à l'épreuve et rationalisée.

Fisher Ludwig, *The Structure of Thought*.

*A ma Mère*



# REMERCIEMENTS

Au professeur Gérald Thouand mon directeur de thèse. Pour la confiance qu'il m'a accordée tout au long de ces trois années (et un peu plus). Pour avoir su apaiser les moments de doutes, canaliser les dispersions, assoir ma méthodologie, et m'avoir aidé à prendre les deux pas de recul qu'il me manquait parfois pour transformer mes premiers jets en résultats dont je serai fière. Merci aussi à Marie-José Durand pour ses conseils et nombreuses contributions aux longues discussions qui auront orientées ces travaux.

A mes rapporteurs et examinateurs Philippe Garrigues, Ganesh Sockalingum, Douglas Rutledge, Olivier Goncalves et Gladys Ouedraogo pour me faire l'honneur de juger ce travail.

A l'entreprise Tronico VigiCell et plus particulièrement à Laurent Paulic, Anthony Marconi, Judith Cargnelli, Emmanuelle Moll, mais aussi de passage Antoine Helye et plus nouvellement Erwan Michelin et Yann Pichot pour m'avoir offert autant l'opportunité de travaux de recherche enthousiasmants et concrets qu'un environnement professionnel dont l'humanité et la chaleur n'ont pas de prix. Merci de donner à Tronico VigiCell ces valeurs et cette âme qui font sa force. Merci de me laisser une place dans la barque. A défaut de savoir où nous la conduirons, votre courage, votre unité et vos sourires ne pourront que rendre beau le voyage.

A Christophe Cordella également co-encadrant de cette thèse pour avoir accompagné mes premiers pas dans l'univers nébuleux de la chimiométrie sur Matlab. Merci aussi pour la sympathie de nos échanges lorsqu'enfin nous laissons de côté les jeux de données le temps d'un ravitaillement rapide rue Mouffetard.

A l'ensemble des membres du laboratoire, Ali Assaf, Sulivan Jouanneau, Mickaël Cregut et Emilie Grangé pour le partage de leur expérience, leur soutien et leurs conseils dès les premiers jours.

Un remerciement plus particulier à Anna Hua, doctorante avec moi et au moins autant collègue qu'amie et partenaire, inestimable soutien à travers les hauts et les bas qui font le lot de toute thèse. J'espère réussir à t'apporter au moins autant et t'accompagner toi aussi jusqu'au dernier point de la dernière ligne. Merci également à Christopher Lieutaud dernier arrivant du « bureau des doctorants » pour sa bonne humeur constante et son indulgence face à nos discussions « de filles ».

A tous les amis, toujours présents ou de passage, proches ou lointains qui auront chacun apporté leur étincelle à ma vie avant, pendant, et j'espère encore longtemps après ces années de doctorat.

A ma famille, à mon père, à mon frère, à mes grands-parents, à ma tante, pour tout l'inestimable.



Cette thèse, s'est déroulée entre octobre 2013 et mai 2017, date de la soutenance.

Elle est le fruit d'une collaboration publique-privée dans le cadre du dispositif CIFRE (Conventions Industrielles de Formation par la Recherche) impliquant d'une part le laboratoire Capteurs Biologiques pour l'Analyse et le Contrôle (CBAC - GEPEA UMR CNRS 6144) dirigé par le professeur Gérald Thouand, et d'autre part l'entreprise Tronico VigiCell.

Mises en œuvre par l'ANRT (Association Nationale de Recherche et Technologie) les thèses CIFRE sont co-financées par le ministère de l'Enseignement supérieur et de la Recherche.



---

TRONICO VIGICELL

---

ALCEN





## TABLE DES MATIERES

<b>Table des matières .....</b>	<b>9</b>
<b>Table des illustrations.....</b>	<b>15</b>
<b>Table des tableaux .....</b>	<b>19</b>

### CHAPITRE I : SYNTHESE BIBLIOGRAPHIQUE

<b>1. Contexte : Les micropolluants, une menace invisible mais omniprésente.....</b>	<b>23</b>
1.1. Une problématique centrale pour les ressources en eau .....	23
1.2. Prise de conscience réglementaire et volonté d’une approche globale .....	26
1.2.1. Du contrôle des rejets.....	26
1.2.2. ... A la prise en compte des effets .....	28
1.3. Méthodes d’analyses de la toxicité.....	29
1.3.1. Méthodes physicochimiques : un étalon règlementaire insuffisant .....	29
1.3.2. Méthodes biologiques : une approche complémentaire indispensable .....	31
<b>2. Les biocapteurs microbiens : Premiers maillons de la chaine au service de la mesure .....</b>	<b>38</b>
2.1. L’approche monocellulaire monoparamétrique .....	38
2.1.1. Des méthodes d’analyse de toxicité globale.....	38
2.1.2. L’espoir d’une détection spécifique.....	39
2.1.3. Une première dimension nécessaire mais non suffisante .....	43
2.2. Stratégies d’améliorations, vers trois dimensions complémentaires .....	44
2.2.1. Croiser les témoignages : l’approche multicellulaire .....	44
2.2.2. Relever les empreintes : l’approche multiparamétriques.....	49
<b>3. La spectroscopie Raman .....</b>	<b>52</b>
3.1. Bref historique .....	52
3.2. Principe.....	53

3.3.	Du spectre Raman au biocapteur multiparamétrique .....	55
3.3.1.	Bandes caractéristiques des échantillons biologiques .....	55
3.3.2.	Lecture de l’empreinte moléculaire : de l’identification au diagnostique .....	58
3.3.3.	Mise en évidence spectrale de la toxicité : Etat de l’art .....	60
3.3.4.	Verrou : Quand l’information devient trop riche .....	65
<b>4.</b>	<b>Conclusion et perspectives .....</b>	<b>67</b>

## CHAPITRE II : MATERIELS ET METHODES

<b>1.</b>	<b>Matériels et procédures de routine .....</b>	<b>71</b>
1.1.	Stérilisation .....	71
1.2.	Incubation .....	71
1.3.	Suivi de croissance et mesure de la densité optique .....	71
1.3.1.	Suivi de croissance en Erlenmeyer .....	71
1.3.2.	Suivi en microplaques .....	72
1.4.	Centrifugation et étapes de lavages .....	72
<b>2.</b>	<b>Echantillons toxiques.....</b>	<b>72</b>
2.1.	Substances toxiques de référence .....	72
2.2.	Milieu de test .....	73
<b>3.</b>	<b>Microorganismes .....</b>	<b>74</b>
<b>4.</b>	<b>Conservation des souches et conditions de culture.....</b>	<b>75</b>
4.1.	Bactéries et levure .....	75
4.1.1.	Milieux de culture .....	75
4.1.2.	Conservation des souches .....	77
4.1.3.	Isolements et conservation sur boîte de Pétri .....	77
4.1.4.	Pré-cultures .....	77

4.1.5.	Production de biomasse .....	77
4.2.	Algues .....	77
4.2.1.	Milieux de culture .....	77
4.2.2.	Conservation des souches .....	78
4.2.3.	Pré-culture et production de biomasse .....	78
<b>5.</b>	<b>Evaluation de la toxicité.....</b>	<b>79</b>
5.1.	Inhibition de la croissance .....	79
5.1.1.	Bactéries et Levure .....	79
5.1.2.	Algue.....	79
5.2.	Inhibition de la respiration.....	80
<b>6.</b>	<b>Conditions d’analyses Raman.....</b>	<b>80</b>
6.1.	Exposition aux échantillon .....	80
6.1.1.	Bactéries et Levures.....	80
6.1.2.	Algues .....	81
6.2.	Préparation des cellules à l’observation Raman .....	81
6.3.	Paramètres d’acquisition des spectres .....	82
<b>7.</b>	<b>Traitement des données .....</b>	<b>83</b>
7.1.	Etapas de prétraitement.....	83
7.2.	Analyses chimiométriques.....	83
<b>CHAPITRE III : ANALYSE DES EFFETS DE L’ARSENIC SUR LES SPECTRES RAMAN D’E. COLI - UNE PREUVE DE CONCEPT ILLUSTRANT L’IMPORTANCE DE L’ANALYSE STATISTIQUE</b>		
<b>1.</b>	<b>Contexte : Les enjeux de l’analyse de données .....</b>	<b>87</b>
<b>2.</b>	<b>Potential of Raman spectroscopy to monitor arsenic toxicity on bacteria: insights toward multiparametric bioassays .....</b>	<b>89</b>
2.1.	Introduction.....	89

2.2.	Materials and methods.....	90
2.2.1.	Bacterial culture.....	90
2.2.2.	Arsenic exposure .....	91
2.2.3.	Conventional toxicity tests.....	91
2.2.4.	Raman tests .....	91
2.2.5.	Data analysis .....	92
2.3.	Results and discussion .....	93
2.3.1.	Conventional toxicological test versus Raman spectroscopy.....	93
2.3.2.	Improvement of Raman spectra classification through identification and elimination of aberrant spectra .....	94
2.3.3.	Observation of the arsenic impact on the cell through Raman multiparametric toxicity analysis	98
<b>3.</b>	<b>Conclusion .....</b>	<b>101</b>
<b>CHAPITRE IV : DES ESSAIS DE TOXICITE GLOBALE A LA SPECIFICITE DE SIGNATURES SPECTRALES MULTIPARAMETRIQUES .....</b>		<b>105</b>
<b>1.</b>	<b>Optimisation du mode opératoire .....</b>	<b>107</b>
1.1.	Préambule : Définition du cadre d'analyse .....	107
1.2.	Milieux de culture et contraintes opératoires .....	110
1.3.	Qualité des spectres .....	112
1.4.	Significativité des variations spectrales .....	114
1.5.	Constitution de la base de données.....	117
<b>2.</b>	<b>Effets de la toxicité sur les spectres Raman d'<i>Escherichia coli</i> NR698 .....</b>	<b>119</b>
2.1.	A chaque substance sa signature.....	119
2.1.1.	Norfloxacin.....	119
2.1.2.	CuSO <sub>4</sub> .....	125
2.1.3.	3,5-Dichlorophénol .....	130

2.1.4.	Le Diuron .....	133
2.2.	Bilan : Liens entre signatures spectrales et toxicité .....	136
<b>3.</b>	<b>Variétés des modèles pour une variété de signatures .....</b>	<b>143</b>
3.1.	Bactérie Gram+ : Bacillus subtilis subtilis .....	143
3.2.	Levure : Saccharomyces cerevisiae .....	147
3.3.	Micro-algue : Chlamydomonas Reinhardtii.....	152
3.4.	Conclusion .....	155
<b>4.</b>	<b>Complémentarité des signatures pour un criblage des effets toxiques.....</b>	<b>157</b>
4.1.	785, 810 et 1100 $\text{cm}^{-1}$ : Trois bandes caractéristique des spectres bactériens pour la mise en évidence d'un impact sur les acides nucléiques .....	159
4.2.	Bandes lipidiques et protéiques : Témoins d'une toxicité impactant les membranes.....	161
4.3.	Observation des Cytochromes : Un complément d'information apporté par les spectres de <i>S. cerevisiae</i> .....	166
4.4.	Bandes spectrales associées aux pigments, éventuels signaux d'un stress oxydant .....	168
4.5.	Discussion, un potentiel informatif en trois dimensions.....	170
<b>5.</b>	<b>Perspectives : Vers l'analyse d'échantillons réels .....</b>	<b>173</b>
5.1.	Echantillon 1 : Eau brute domestique.....	174
5.2.	Echantillon 2 : Eau de Seine .....	180
5.3.	Discussion et pistes générale d'amélioration.....	184
	<b>Conclusion générale .....</b>	<b>187</b>
	<b>References Bibliographiques.....</b>	<b>191</b>



## TABLE DES ILLUSTRATIONS

FIGURE 1 – LE CYCLE DE L’EAU DU MILIEU NATUREL A SA RESTITUTION EN PASSANT PAR SES DIFFERENTS USAGES ET LES DIFFERENTS FACTEURS GLOBAUX QUI IMPACTENT LA RESSOURCE. ....	23
FIGURE 2 – EXEMPLES DE MICROPOLLUANTS MAJEURS ISSUS DES ACTIVITES ANTHROPOMORPHIQUE <sup>5-8</sup> . FIGURE : M. BITTEL. ....	24
FIGURE 3 – RESULTATS DE LA RECHERCHE DE 950 MICROPOLLUANTS DANS LES EAUX DE SURFACE FRANÇAISES.....	25
FIGURE 4 – ILLUSTRATION DES CONDITIONS DE DETERMINATION DU "BON ETAT" D'UNE MASSE D'EAU SELON LA DCE ET LA DCSMM.....	29
FIGURE 5 – ILLUSTRATION DES CONCEPTS DE BIO-ACCESSIBILITE ET BIO-DISPONIBILITE. FIGURE : M. BITTEL. ....	31
FIGURE 6 – ILLUSTRATION DES DIFFERENTS TYPES D'EFFETS COCKTAILS POUVANT RESULTE DU MELANGE DE DEUX SUBSTANCES CHIMIQUES.	32
FIGURE 7 – PROF. YVES LEVI, FACULTE DE PHARMACIE, ANSES, LORS DES JOURNEES INTER NATIONALES DE L’EAU A POITIER EN 2014. ....	33
FIGURE 8 – REPRESENTATIONS DES DIFFERENTS NIVEAUX DE BIO-ESSAIS ET SCHEMATISATION DU PRINCIPE DE FONCTIONNEMENT D’UN BIOCAPTEUR.....	35
FIGURE 9 – PRINCIPE DE LA MESURE D’UNE TOXICITE GLOBALE PAR INHIBITION DE LA BIOLUMINESCENCE SELON LA NORME ISO 11348-1. ....	38
FIGURE 10 – DIFFERENTS BIOCAPTEURS MICROTOX <sup>®</sup> ICI COMMERCIALISES PAR LA COMPAGNIE MODERNWATER <sup>39</sup> .....	39
FIGURE 11 – SCHEMATISATION DU MECANISME DE CONSTRUCTION DE BACTERIES BIOLUMINESCENTES GENETIQUEMENT MODIFIEES.....	40
FIGURE 12 – SCHEMATISATION DU MECANISME DE DETECTION SPECIFIQUE PAR DES BACTERIES GENETIQUEMENT MODIFIEES. ....	40
FIGURE 13 – PRINCIPES ET LIMITES DES METHODES BIOLOGIQUES MONOPARAMETRIQUES. FIGURE : M. BITTEL. ....	44
FIGURE 14 – AMELIORATION DE LA REPRESENTATIVITE ENVIRONNEMENTALE PAR LA MULTIPLICATION DES BIOREPORTERS. FIGURE : M. BITTEL.....	45
FIGURE 15 – AMELIORATION DE LA SPECIFICITE GRACE A L’APPROCHE MULTICELLULAIRE. FIGURE : M. BITTEL.....	47
FIGURE 16 – MESURE DE LA TOXICITE EN TROIS DIMENSIONS. ....	51
FIGURE 17 – A) C.V. RAMAN – B) PREMIER SPECTROGRAPHE A QUARTZ – C) PHOTOGRAPHIE DES PREMIERS SPECTRES RAMAN OBTENUS EN 1928 – D) SCHEMATISATION DU DISPOSITIF EXPERIMENTAL AYANT PERMIS LA MISE EN EVIDENCE DU PHENOMENE RAMAN. ....	52
FIGURE 18 – SCHEMATISATION DES PHENOMENES RESULTANTS DE L’IRRADIATION D’UNE MOLECULE PAR UN FAISCEAU LUMINEUX. FIGURE : M. BITTEL. ....	54
FIGURE 19 – SPECTRES RAMAN CARACTERISTIQUES DE LA BACTERIE <i>E. COLI</i> , DE LA LEVURE <i>S. CEREVISIAE</i> ET DE L’ALGUE <i>C. REINHARDTII</i> . ...	56
FIGURE 20 – SCHEMA DE PRINCIPE DE L’UTILISATION DE LA SPECTROSCOPIE RAMAN POUR LA CARACTERISATION D’UN EFFET TOXIQUE. FIGURE : M. BITTEL. ....	59
FIGURE 21 – ILLUSTRATION DES RESULTATS DE L’ETUDE DE MORITZ <i>ET AL.</i> SUR L’ETUDE DES EFFETS DE DIFFERENTS ANTIBIOTIQUES SUR LA BACTERIE <i>E. COLI</i> . ....	61
FIGURE 22 - DIFFERENTS NIVEAUX D'OBSERVATIONS DES MICROORGANISMES PAR SPECTROSCOPIE RAMAN. ....	66
FIGURE 23 – EXEMPLE D’ESSAI D’INHIBITION DE LA CROISSANCE DE <i>C. REINHARDTII</i> EN MICROPLAQUE 24 PUIITS. ....	79
FIGURE 24 - SPECTRES D'ABSORPTION D'UNE CULTURE BACTERIENNE APRES AJOUT DU REACTIF PRESTOBLUE A T0 ET APRES 10 MIN DE TEMPS DE CONTACT. APRES PENETRATION DANS LA CELLULE, LA RESAZURINE EST REDUITE EN RESORUFINE.....	80
FIGURE 25 - CONVENTIONAL TOXICOLOGICAL TEST VERSUS RAMAN SPECTROSCOPY.....	94

FIGURE 26 – IMPROVEMENT OF SPECTRA CLASSIFICATION RESULTING FROM THE SELECTION PROCESS. ....	95
FIGURE 27 – ILLUSTRATION OF THE “ABERRANT” SPECTRA ELIMINATION STRATEGY. ....	96
FIGURE 28 – SPECTRA TOXIC SIGNATURE OF A 40 MIN EXPOSURE TO ARSENIC. ....	98
FIGURE 29 - SPECTRA TOXIC SIGNATURE OF A 90 MIN EXPOSURE TO ARSENIC. ....	100
FIGURE 30 – ILLUSTRATION DE LA STRATEGIE GLOBALE DE CARACTERISATION DE LA TOXICITE PAR SPECTROSCOPIE RAMAN .....	103
FIGURE 31 – ELABORATION D’UN MILIEU DE CROISSANCE SYNTHETIQUE : ESSAIS SUR LA SOURCE DE CARBONE. ....	111
FIGURE 32 - CARACTERISATION DE LA CROISSANCE D’ <i>E. COLI</i> NR690, <i>B. SUBTILIS</i> ET <i>C. CEREVISIAE</i> DANS LE MILIEU DE CROISSANCE SYNTHETIQUE ELABORE POUR L’ETUDE (CULTURES REALISEES EN ERLNMEYER DE 250 ML CONTENANT 50 ML DE MILIEU. 30°C – 250 RPM). ....	112
FIGURE 33 – EXEMPLE DE SPECTRES RAMAN DE LA BACTERIE <i>B. SUBTILIS</i> OBTENUS AVANT ET APRES SECHAGE COMPLET DU DEPOT. ....	113
FIGURE 34 – COMPARAISON DES SPECTRES DE <i>S. CEREVISIAE</i> OBTENUS GRACE A UNE LONGUEUR D’ONDE EXCITATRICE DE 785 (100 MW – EXCITATION 8 s. – 5 CO-ADDITIONS) ET 532 NM (20 MW – EXCITATION 5 s. – 5 CO-ADDITIONS). EN NOIR LES SPECTRES MOYENS. .....	114
FIGURE 35 – SCORES DE CLASSIFICATION PAR AFD OBTENUS SUR LES SPECTRES TEMOINS. ....	115
FIGURE 36 - EVALUATION DE LA RICHESSE DES SPECTRES PAR MESURE DU COEFFICIENT DE VARIATION DES BANDES RAMAN. ....	117
FIGURE 37 – ARCHITECTURE DE LA BASE DE DONNEES SPECTRALE CONSTITUEE POUR L’ETUDE DES EFFETS DE LA NORFLOXACINE, DU DIURON, DU CUIVRE ET DU 3,5-DICHLOROPHENOL SUR LES QUATRE MICROORGANISMES DE L’ETUDE ( <i>E. COLI</i> NR698, <i>B. SUBTILIS</i> , <i>S.</i> <i>CEREVISIAE</i> , <i>C. REINHARDTII</i> ). ....	118
FIGURE 38 - RESULTATS DES TESTS DE TOXICITE CLASSIQUES DE LA NORFLOXACINE SUR LA BACTERIE <i>E. COLI</i> NR698. ....	120
FIGURE 39 - <i>E. COLI</i> NR698 EXPOSEE A LA NORFLOXACINE. SPECTRES MOYENS OBTENUS POUR CHACUNE DES CONCENTRATIONS DU TOXIQUE.....	121
FIGURE 40 – MOYENNE DES RESULTATS DES AFD REALISES SUR LES SPECTRES DE LA BACTERIE <i>E. COLI</i> NR698 EXPOSEE A LA NORFLOXACINE (500 SPECTRES). ....	121
FIGURE 41 – EFFETS DE LA NORFLOXACINE SUR LES SPECTRES RAMAN D’ <i>E. COLI</i> NR698 : REPRESENTATION DES LOADINGS OBTENUS SUITES AUX ICA REALISEES A PARTIR DE CHACUN DES REPLICATS D’EXPERIENCE (3x160 SPECTRES). ....	122
FIGURE 42 – SPECTRES RAMAN CARACTERISTIQUES DE CONSTITUTANTS CELLULAIRES CARACTERISTIQUES. EXTRAITS DES TRAVAUX DE MAQUELIN ET AL. (2002) <sup>83</sup> . ....	123
FIGURE 43 – EFFETS DE LA NORFLOXACINE SUR LES SPECTRES RAMAN D’ <i>E. COLI</i> NR698 : ANALYSE DES LOADINGS LES PLUS SIGNIFICATIFS. .....	124
FIGURE 44 – SIGNATURE SPECTRALE DES EFFETS DE LA NORFLOXACINE SUR LES SPECTRES D’ <i>E. COLI</i> NR698. ....	125
FIGURE 45 – TOXICITE DU $CuSO_4$ SUR LA BACTERIE <i>E. COLI</i> NR698 : RESULTATS DES ESSAIS D’INHIBITION DE LA RESPIRATION (A) ET DE LA CROISSANCE CELLULAIRE (B).....	126
FIGURE 46 – <i>E. COLI</i> NR698 EXPOSEE AU $CuSO_4$ . SPECTRES MOYENS OBTENUS POUR CHACUNE DES CONCENTRATIONS DU TOXIQUE.....	126
FIGURE 47 – ANALYSE STATISTIQUE DES SPECTRES DE LA BACTERIE <i>E. COLI</i> NR698 EXPOSEE AU $CuSO_4$ . ....	127

FIGURE 48 – LOADINGS DES ICs LES PLUS SIGNIFICATIVES LORS DE L’ANALYSE DES SPECTRES RAMAN D’E. COLI NR698 EXPOSES AU  $\text{CuSO}_4$ . ..... 128

FIGURE 49 – SIGNATURE SPECTRALE DES EFFETS DU  $\text{CuSO}_4$  SUR LES SPECTRES D’E. COLI NR698. .... 129

FIGURE 50 – RESULTATS DES TESTS DE TOXICITE CLASSIQUES DU 3,5-DICHLOROPHENOL SUR LA BACTERIE E. COLI NR698..... 130

FIGURE 51 – ANALYSE STATISTIQUE DES SPECTRES DE LA BACTERIE E. COLI NR698 EXPOSEE AU 3,5-DICHLOROPHENOL. .... 131

FIGURE 52 – SIGNATURE SPECTRALE DES EFFETS DU 3,5-DICHLOROPHENOL SUR LES SPECTRES D’E. COLI NR698. .... 132

FIGURE 53 – EFFET DU DIURON SUR LES SPECTRES DE LA BACTERIE E. COLI NR698. .... 133

FIGURE 54 – SIGNATURE SPECTRALE DES EFFETS DU DIURON SUR LES SPECTRES D’E. COLI NR698..... 134

FIGURE 55 – BILAN DES SIGNATURES DE TOXICITES OBTENUES POUR LA NORFLOXACINE, LE  $\text{CuSO}_4$ , LE 3,5-DICHLOROPHENOL ET LE DIURON SUR LES SPECTRES RAMAN D’E. COLI NR698. .... 137

FIGURE 56 – A) LOADING DE L’IC LA PLUS SIGNIFICATIVE OBTENUE LORS DE L’ANALYSE DES EFFETS DE LA NORFLOXACINE SUR LES SPECTRES D’E. COLI NR698. B) SPECTRES RAMAN CARACTERISTIQUES D’ACIDES GRAS SATURES ET INSATURES, ISSUS DE LA BASE DE DONNEES DE GELDER *ET AL.*<sup>81</sup>. IL EST INTERESSANT DE CONSTATER QUE LE PROFIL DU LOADING PRESENTE D’IMPORTANTES SIMILARITES DE BANDES AVEC LES SPECTRES DES ACIDES GRAS. .... 139

FIGURE 57 - COMPARAISON DES SPECTRES OBTENUS SUITE A) A 40 MIN D’EXPOSITION DE LA BACTERIE E. COLI NR698 AU  $\text{CuSO}_4$ , B) A 90 MIN D’EXPOSITION DE LA BACTERIE E. COLI K12 A L’ARSENIC. .... 140

FIGURE 58 – RESULTATS DES ESSAIS DE TOXICITE SUR B. SUBTILIS ET CLASSIFICATION PAR AFD DES SPECTRES RAMAN OBTENUS SUITE A L’EXPOSITION DE LA BACTERIE A QUATRE CONCENTRATIONS DE CHACUNE DES SUBSTANCES DE L’ETUDE. .... 144

FIGURE 59 – BILAN DES SIGNATURES DE TOXICITES OBTENUES POUR LA NORFLOXACINE, LE  $\text{CuSO}_4$ , LE 3,5-DICHLOROPHENOL ET LE DIURON SUR LES SPECTRES RAMAN DE B. SUBTILIS. .... 146

FIGURE 60 – RESULTATS DES ANALYSES DE TOXICITE DU  $\text{CuSO}_4$  SUR S. CEREVISIAE PAR SUIVI DE CROISSANCE..... 147

FIGURE 61 – RESULTAT DES ESSAIS DE TOXICITE DE LA NORFLOXACINE, DU  $\text{CuSO}_4$ , DU 3,5-DICHLOROPHENOL ET DU DIURON SUR S. CEREVISIAE ET RESULTATS DE CLASSIFICATION PAR AFD DES SPECTRES RAMAN OBTENUS SUITE A L’EXPOSITION DE LA LEVURE A QUATRE CONCENTRATIONS DE CHACUNE DES SUBSTANCES. .... 148

FIGURE 62 – BILAN DES SIGNATURES DE TOXICITES OBTENUES POUR LA NORFLOXACINE, LE  $\text{CuSO}_4$ , LE 3,5-DICHLOROPHENOL ET LE DIURON SUR LES SPECTRES RAMAN DE S. CEREVISIAE..... 150

FIGURE 63 – REPRESENTATION DES LOADINGS DES TROIS ICs LES PLUS SIGNIFICATIVES OBTENUES SUITE A L’ANALYSE PAR ICA DES SPECTRES DE S. CEREVISIAE EXPOSEE AU  $\text{CuSO}_4$ , AU DIURON ET AU 3,5-DICHLOROPHENOL. .... 151

FIGURE 64 – RESULTAT DES ESSAIS DE TOXICITE DE LA NORFLOXACINE, DU  $\text{CuSO}_4$ , DU 3,5-DICHLOROPHENOL ET DU DIURON SUR C. REINHARDTII ET RESULTATS DE CLASSIFICATION PAR AFD DES SPECTRES RAMAN OBTENUS SUITE A L’EXPOSITION DE L’ALGUE A QUATRE CONCENTRATIONS DE CHACUNE DES SUBSTANCES. .... 153

FIGURE 65 – BILAN DES SIGNATURES DE TOXICITES OBTENUES POUR LA NORFLOXACINE, LE  $\text{CuSO}_4$ , LE 3,5-DICHLOROPHENOL ET LE DIURON SUR LES SPECTRES RAMAN DE C. REINHARDTII. .... 154

FIGURE 66 – BILAN DES SIGNATURES OBTENUES GRACE A L’ENSEMBLE DE LA BASE DE DONNEES. .... 158

FIGURE 67 – COMPARAISON DES SIGNATURES SPECTRALES OBTENUES SUITE A L’EXPOSITION DE *B. SUBTILIS* (A GAUCHE) ET D’*E. COLI* NR698 (A DROITE) AU  $\text{CuSO}_4$ . ..... 159

FIGURE 68 – LIENS ENTRE VARIATIONS SPECTRALES ET TOXICITE DECRITE DES SUBSTANCES SUR LES ACIDES NUCLEIQUES. .... 160

FIGURE 69 – FIGURE ADAPTEE DE ATHAMNEH *ET AL.* ILLUSTRANT LES EFFETS D’ANTIBIOTIQUES AYANT POUR CIBLES LES ACIDES NUCLEIQUES SUR LES SPECTRES RAMAN D’*E. COLI*. ..... 162

FIGURE 70 – COMPARAISON DES SIGNAUX SIGNIFICATIFS POUR LA DISCRIMINATION DES SPECTRES DES BACTERIES EXPOSEES A LA NORFLOXACINE. .... 163

FIGURE 71 – LIENS ENTRE VARIATIONS SPECTRALES ET TOXICITE DECRITE DES SUBSTANCES SUR LES MEMBRANES PLASMIQUES. .... 165

FIGURE 72 - LIENS ENTRE VARIATIONS SPECTRALES ET TOXICITE DECRITE DES SUBSTANCES SUR LES CYTOCHROMES ET LA CHAINE RESPIROATOIRE. .... 166

FIGURE 73 – LIENS ENTRE VARIATIONS SPECTRALES DES BANDES RELATIVES AUX PIGMENTS PHOTOSYNTHETIQUES ET TOXICITE DECRITE DES SUBSTANCES. .... 169

FIGURE 74 – DIAGRAMME DE LECTURE DES RESULTATS DE TOXICITE REALISES PAR L’ENTREPRISE TRONICO VIGICELL. .... 174

FIGURE 75 – SYNTHESE DES RESULTATS D’ANALYSE OBTENUS PAR TRONICO VIGICELL SUR LE PREMIER ECHANTILLON ENVIRONNEMENTAL ETUDIE. .... 174

FIGURE 76 – RESULTATS DES ANALYSES RAMAN OBTENUS POUR *E. COLI* NR698 EXPOSEE AU 1<sup>ER</sup> ECHANTILLON ENVIRONNEMENTAL. .... 175

FIGURE 77 – RESULTATS DES ANALYSES RAMAN OBTENUS *C. REINHARDTII* EXPOSEE AU 1<sup>ER</sup> ECHANTILLON ENVIRONNEMENTAL. .... 176

FIGURE 78 – RESULTATS DES ANALYSES RAMAN OBTENUS *S. CEREVISIAE* EXPOSEE AU 1<sup>ER</sup> ECHANTILLON ENVIRONNEMENTAL. .... 177

FIGURE 79 – RESULTATS DES ANALYSES RAMAN OBTENUS *B. SUBTILIS* EXPOSEE AU 1<sup>ER</sup> ECHANTILLON ENVIRONNEMENTAL. .... 178

FIGURE 80 – BILAN DE L’INFORMATION OBTENUE PAR SEPCTROSCOPIE RAMAN SUITE A L’ANALYSE DU 1<sup>ER</sup> ECHANTILLON ENVIRONNEMENTAL. .... 179

FIGURE 81 – SYNTHESE DES RESULTATS D’ANALYSE OBTENUS PAR TRONICO VIGICELL SUR LE DEUXIEME ECHANTILLON ENVIRONNEMENTAL ETUDIE. LE DEGRE DE TOXICITE EST REPRESENTÉ SELON LE DIAGRAMME FIGURE 74. .... 180

FIGURE 82 – RESULTATS DES ANALYSES RAMAN OBTENUS POUR *E. COLI* NR698 EXPOSEE AU 2<sup>EME</sup> ECHANTILLON ENVIRONNEMENTAL. .... 181

FIGURE 83 – RESULTATS DES ANALYSES RAMAN OBTENUS POUR *C. REINHARDTII* EXPOSEE AU 2<sup>EME</sup> ECHANTILLON ENVIRONNEMENTAL. .... 181

FIGURE 84 – RESULTATS DES ANALYSES RAMAN OBTENUS POUR *S. CEREVISIAE* EXPOSEE AU 2<sup>EME</sup> ECHANTILLON ENVIRONNEMENTAL. .... 182

FIGURE 85 – RESULTATS DES ANALYSES RAMAN OBTENUS *B. SUBTILIS* EXPOSEE AU 1<sup>ER</sup> ECHANTILLON ENVIRONNEMENTAL. .... 183

FIGURE 86 – BILAN DE L’INFORMATION OBTENUE PAR SEPCTROSCOPIE RAMAN SUITE A L’ANALYSE DU 2<sup>EME</sup> ECHANTILLON ENVIRONNEMENTAL. .... 184

FIGURE 87 – POSITIONNEMENT DES TRAVAUX REALISES AU COURS DE LA THESE AU SEIN DE L’ECHELLE TRL DEFINIE PAR LE CEA<sup>172</sup>. .... 186

## TABLE DES TABLEAUX

TABLEAU 1 – LISTE DES SUBSTANCES PRIORITAIRES ETABLIE PAR LA DIRECTIVE CADRE SUR L’EAU 2000/60/CE ET COMPLETEE PAR LA DIRECTIVE 2013/39/UE. SONT SURLIGNEES EN GRAS LES « SUBSTANCES DANGEREUSES PRIORITAIRES » .....	27
TABLEAU 2 – CONTROLE DE LA QUALITE DE L’EAU POTABLE - EXEMPLES DE METHODES PHYSICOCHIMIQUES DE DETECTION DECRITES PAR LES NORMES EUROPEENNES .....	30
TABLEAU 3 – CONTROLE DE LA QUALITE DE L’EAU POTABLE – EXEMPLES DE BIO-ESSAIS DECRITES PAR LES NORMES EUROPEENNES.....	34
TABLEAU 4 – EXEMPLES DE BIOCAPTEURS ELABORES POUR DES APPLICATIONS ENVIRONNEMENTALES. EXTRAIT DE LA REVUE DE RODRIGUEZ-MOZAZ <i>ET AL.</i> <sup>33</sup> .....	36
TABLEAU 5 – ILLUSTRATION DU MANQUE DE SPECIFICITE DES PRINCIPAUX PROMOTEURS UTILISES POUR LA DETECTION DES COMPOSES METALLIQUES (V : DETECTION DU METAL. ⊙: CIBLE THEORIQUE). DONNEES ISSUES DES TRAVAUX DE JOUANNEAU <i>ET. AL</i> (2011) <sup>47</sup> ..	41
TABLEAU 6 – EXEMPLE DE SOUCHES GENETIQUEMENT MODIFIEES PERMETTANT LA DETECTION SPECIFIQUE DE MECANISMES TOXIQUES. ....	42
TABLEAU 7 – ORGANISMES ET ENTREPRISES FRANÇAISES SPECIALISEES DANS LA REALISATION DE BIO-ESSAIS. ....	48
TABLEAU 8 – QUELQUES EXEMPLES D’UTILISATION DE LA SPECTROSCOPIE RAMAN AU COURS DU SUIVI DE PROCEDES INDUSTRIELS <sup>72</sup> .....	53
TABLEAU 9- SYNTHESES NON EXHAUSTIVE DES PRINCIPALES BANDES RAMAN OBSERVEES LORS DE L’ANALYSE D’ECHANTILLONS BIOLOGIQUES ET TENTATIVES D’ATTRIBUTIONS <sup>71,79,81,83-88</sup> .....	57
TABLEAU 10 - ETUDES TRAITANT LA MISE EN EVIDENCE D’UNE TOXICITE SUR DES MICROORGANISMES PAR SPECTROSCOPIE RAMAN.....	63
TABLEAU 11 - PREPARATION DES SOLUTIONS MERES DE SUBSTANCES TOXIQUES.....	73
TABLEAU 12 – COMPOSITION FINALE DU MILIEU DE TEST.....	73
TABLEAU 13 – BACTERIES ET LEVURE - COMPOSITION DES MILIEUX GELOSES.....	75
TABLEAU 14 – BACTERIES ET LEVURES – SOLUTIONS MERES POUR LA PREPARATION DES MILIEUX DE PRE-CULTURE ET CULTURE .....	75
TABLEAU 15 – BACTERIES ET LEVURES - PREPARATION DES MILIEUX DE PRE-CULTURE ET CULTURE A PARTIR DES SOLUTIONS MERES DETAILLEES	
TABLEAU 14 .....	76
TABLEAU 16 - ALGUES - COMPOSITION DES MILIEUX DE CULTURE (GELOSE TAP ET MILIEU MINIMUM LIQUIDE) .....	78
TABLEAU 17 - PREPARATION DES CELLULES A L’OBSERVATION RAMAN .....	82
TABLEAU 18 - PARAMETRES D’ACQUISITION DES SPECTRES RAMAN .....	82
TABLEAU 19 - CARACTERISTIQUES DES QUATRES SUBSTANCES TOXIQUES CHOISIES POUR L’ETUDE .....	108
TABLEAU 20 - CARACTERISTIQUES PRINCIPALES DES MICROORGANISMES DE REFERENCE CHOISIS POUR L’ETUDE.....	109



# CHAPITRE I :

## SYNTHESE BIBLIOGRAPHIQUE



# 1. CONTEXTE : LES MICROPOLLUANTS, UNE MENACE INVISIBLE MAIS OMNIPRESENTE

## 1.1. UNE PROBLEMATIQUE CENTRALE POUR LES RESSOURCES EN EAU

Lors de la première conférence internationale sur l'eau en 1977 en Argentine, l'eau est définie comme un bien commun auquel chacun doit pouvoir accéder. Cependant, l'eau douce ne représente que 2 % de l'eau de la planète et la consommation qui ne tend qu'à s'accroître, combinée à l'impact des changements climatiques laissent présager le risque de demandes concurrentes qu'il est de plus en plus nécessaire de prendre en compte<sup>1,2</sup>. Le cycle de l'eau du milieu naturel au rejet après traitement en passant par ses différents usages, est soumis à un nombre important de facteurs globaux dont les impacts conduisent à une dégradation de la qualité générale et à une raréfaction de la ressource (Figure 1).

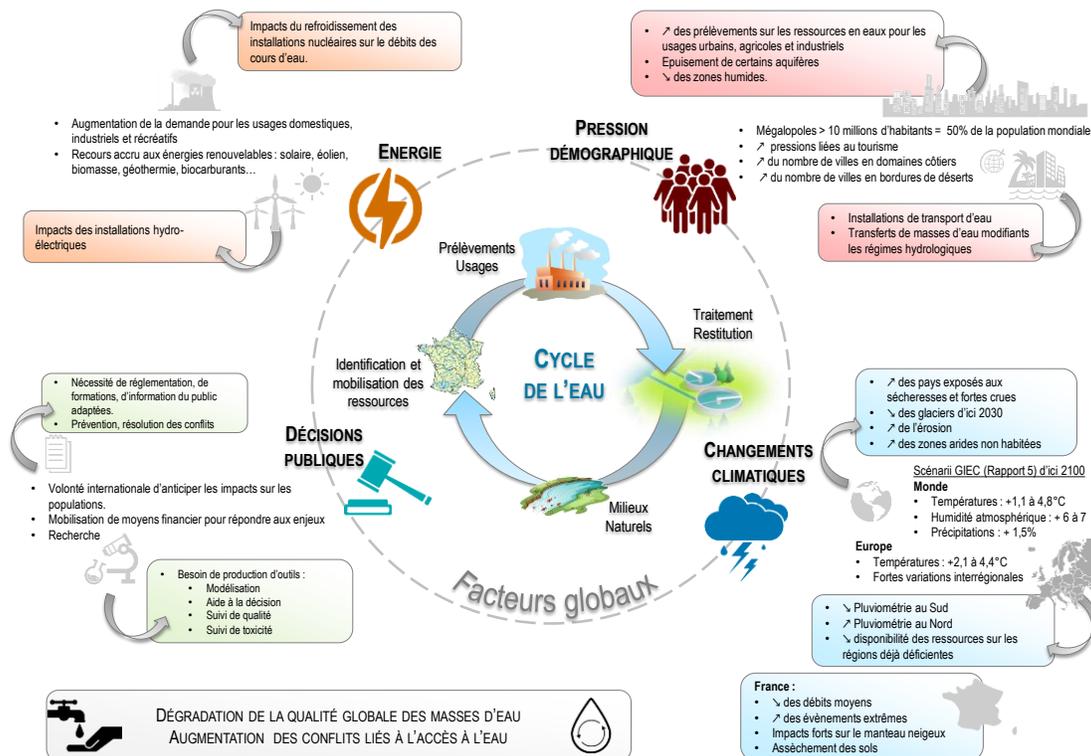
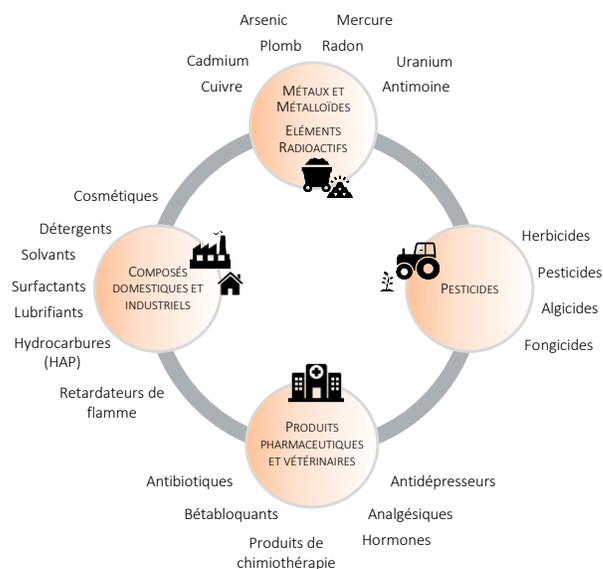


Figure 1 – Le cycle de l'eau du milieu naturel à sa restitution en passant par ses différents usages et les différents facteurs globaux qui impactent la ressource. (Figure adaptée d'une synthèse du pôle de compétitivité « Pôle Eau »<sup>a</sup> - Chiffres climat3). Figure : M. Bittel.

<sup>a</sup> Les pôles de compétitivités sont associés aux pouvoirs publics, et rassemblent sur une thématique ciblée, des entreprises, des laboratoires de recherche et des établissements de formation (Cf. competitivite.gouv.fr).

Aussi, lors de la conférence de 1992 la notion de « bien économique » est pour la première fois associée à celle d'eau potable. Plus d'un tiers de l'eau douce mondiale accessible est utilisée pour les besoins de l'agriculture, de l'industrie et domestiques. Même pour les territoires largement pourvus, les enjeux sont à la fois économiques, sanitaires et environnementaux, et nécessitent la limitation du gaspillage et une meilleure gestion de la qualité.

En effet, loin de n'être que quantitative, la problématique de l'eau est aussi largement qualitative. Avec 50% de la population regroupée dans les mégalopoles de plus de 10 millions d'habitants, les transports, la production d'énergie, les hôpitaux, les habitations, sont autant de sources concentrées de pollutions toujours plus diverses que les stations d'épuration actuelles ne sont pas efficaces à éliminer<sup>4</sup>. On y retrouve notamment des métaux, des pesticides, des produits pharmaceutiques et un grand nombre de composés chimiques industriels ou de résidus domestiques Figure 2.



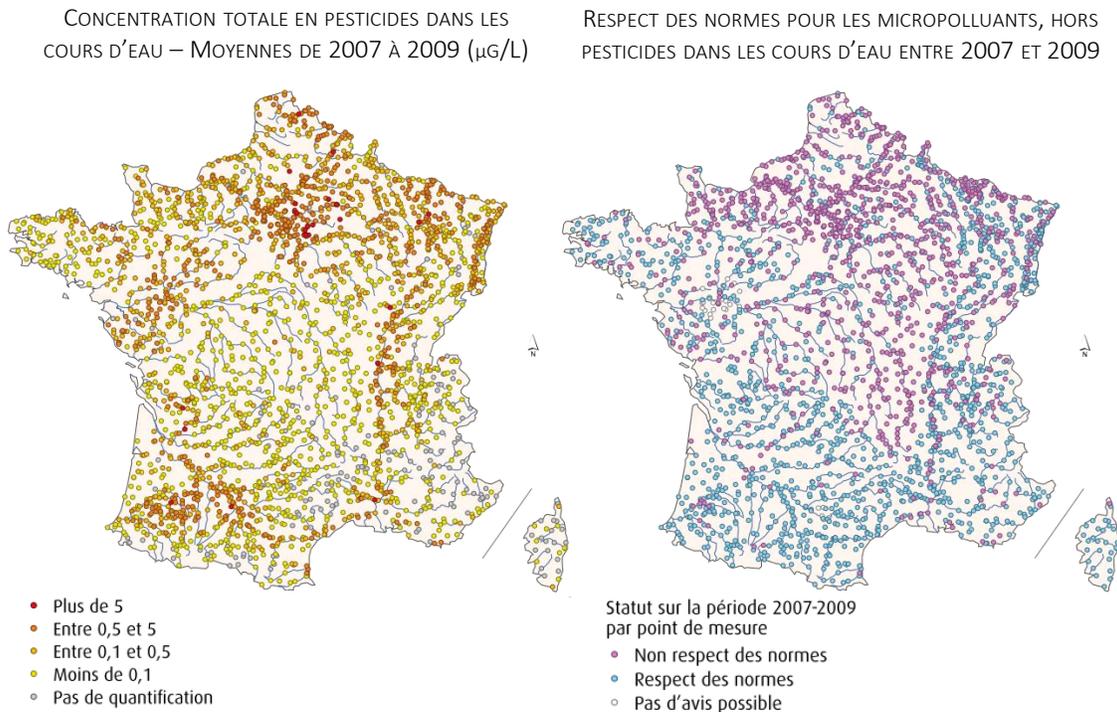
**Figure 2 – Exemples de micropolluants majeurs issus des activités anthropomorphique<sup>5-8</sup>. Figure : M. Bittel.**

Entre 2007 et 2009, le commissariat général du développement durable<sup>a</sup> réalise un bilan à partir de la recherche de près de 950 substances dans les milieux aquatiques continentaux français<sup>6</sup>. Parmi elles plus de 60% sont des pesticides. Les résultats montrent que leur présence est non seulement détectable dans 91% des points de contrôles (sur un total de 2929 points en France métropolitaine et 124 dans les DOM - Figure 3), mais aussi que leur concentration totale<sup>b</sup> est supérieure à 0,5 µg.L<sup>-1</sup> dans 21% des cours d'eau, 11% des plans d'eau et 5% des points d'eaux souterraines. Le diuron et l'isoproturon (herbicides), couramment utilisés, sont deux des substances engendrant le plus de dépassement de normes. On note cependant aussi l'occurrence au-dessus des seuils réglementaires de substances aujourd'hui interdites mais autrefois très répandues telles que l'atrazine en métropole ou le chlordécone en Martinique et en

<sup>a</sup> Ministère de l'environnement, de l'énergie et de la mer

<sup>b</sup> Les normes fixent à 0,1 µg.L<sup>-1</sup> la limite de qualité pour chaque pesticide pris individuellement et à 0,5 µg.L<sup>-1</sup> la limite de qualité pour la concentration totale tous pesticides confondus.

Guadeloupe. Autre exemple célèbre l'AMPA (acide aminométhylphosphonique), un produit de dégradation du glyphosate (Roundup), est également présent de manière généralisée sur l'ensemble du territoire avec des concentrations elles aussi souvent largement supérieures à  $0,1 \mu\text{g.L}^{-1}$ . Par ailleurs, outre les pesticides, des composés domestiques ou industriels sont retrouvés dans 85% des points de contrôles engendrant un dépassement des normes dans 40 % des cas, notamment du fait de la présence importante d'HAP<sup>a</sup> et de PBDE<sup>b</sup> (Figure 3).



**Figure 3 – Résultats de la recherche de 950 micropolluants dans les eaux de surface françaises.**

**Pour les pesticides les normes de qualité environnementale (NQE) imposent une concentration totale inférieure à  $0,5 \mu\text{g.L}^{-1}$ . Au totale les NQE sont dépassées dans 21% et 41% des cours d'eau pour respectivement les pesticides et les autres micropolluants hors pesticides (source : Agence et offices de l'eau).**

Enfin, une étude similaire menée en 2010 sur 125 polluants organiques montre que près de 80 % d'entre eux sont régulièrement retrouvés dans les effluents de stations d'épuration européennes qui peinent à les éliminer<sup>7</sup>. Parmi eux, les produits pharmaceutiques sont largement représentés. On note par exemple dans au moins 89% des points de contrôle la présence de Tramadol (antalgique) et de Diclofenac (anti-inflammatoire) avec des concentrations moyennes respectives de  $1166 \text{ ng.L}^{-1}$  et  $174 \mu\text{g.L}^{-1}$ . Et pour cause,

<sup>a</sup> Hydrocarbure aromatique polycyclique, notamment générés lors de l'incinération de déchets, de combustions domestiques ou des carburants automobiles.

<sup>b</sup> Les Polybromodiphényléthers (PBDE) sont des composés organobromés notamment utilisés comme retardateurs de flammes.

le Diclofenac consommé à hauteur de plusieurs centaines de tonnes par ans en Europe mais éliminé au mieux à hauteur de 17% par les stations d'épuration n'est qu'un exemple parmi d'autres de substances quotidiennement rejetées malgré les opérations de traitement des eaux<sup>9</sup>. Ainsi, les rejets de substances pharmaceutiques qui ne cessent de s'accroître deviennent aussi une préoccupation majeure<sup>10</sup>. Toutes catégories confondues plus de 100 000 substances chimiques sont recensées ne serait-ce qu'en Europe, dont plus de 30 000 à 70 000 sont utilisées régulièrement (EINECS – European Inventory of Existing Commercial Chemical Substances). S'y ajoutent les innombrables sous-produits issus de leur dégradation dont le recensement exhaustif et l'évaluation des effets est pratiquement impossible.

Sous l'appellation « micropolluants » sont ainsi regroupés les milliers de substances issues des activités anthropomorphiques et qui peuvent, même à faibles concentrations ( $\mu\text{g.L}^{-1}$ ,  $\text{ng.L}^{-1}$ ), être toxiques pour l'environnement et la santé humaine. Par exemple, l'exposition pendant 28 jours à des concentrations de seulement  $1 \mu\text{g.L}^{-1}$  de Diclofenac (déjà mentionné plus tôt) s'est révélé provoquer des lésions cellulaires notables au niveau du foie et des branchies de truites arc-en-ciel<sup>11</sup>. Des études de plus en plus nombreuses attestent ainsi des effets néfastes de ces substances et montrent que les expositions même à de très faibles concentrations sont responsables d'effets significatifs<sup>12-14</sup>.

## 1.2. PRISE DE CONSCIENCE REGLEMENTAIRE ET VOLONTE D'UNE APPROCHE GLOBALE

### 1.2.1. DU CONTROLE DES REJETS...

Ainsi, la gestion durable de la ressource en eau est devenue une préoccupation mondiale directement liée aux problématiques de développement et de bien-être des populations et des écosystèmes<sup>15</sup>. En 1976 la communauté européenne dresse une première liste de 157 substances avec pour objectif d'en éliminer les rejets de manière immédiate<sup>16</sup>. Bien que des exceptions soient accordées au cas par cas, tous les rejets sont dès lors soumis à autorisation. Puis, le 23 octobre 2000 la Directive Cadre sur l'eau (DCE)<sup>17</sup> vient durcir les objectifs à l'échelle de la complexité des enjeux. En déclarant en ouverture que « L'eau n'est pas un bien marchand comme les autres mais un patrimoine qu'il faut protéger, défendre et traiter comme tel. », la DCE marque une nouvelle fois la volonté de la communauté européenne d'établir une politique commune de la ressource en eau. Des actions sont prises pour identifier les causes de pollution et lutter contre les émissions à la source, notamment en réduisant les rejets d'une nouvelle liste de 13 substances dites « prioritaires » et en supprimant complètement ceux de 20 « substances prioritaires dangereuses » définies comme toxiques, persistantes et bio-accumulables (Tableau 1). En 2013, la directive 2013/39/UE élargi cette liste par l'ajout de 12 substances et la définition de normes de qualité plus strictes<sup>18</sup>. Ce sont

ainsi 45 composés chimiques dont des métaux, des pesticides et des hydrocarbures pour lesquelles sont fixées des normes de qualités environnementales (NQE) définissant le « bon état chimique » des ressources en eau. S’y ajoute la surveillance de polluants dits « spécifiques » tels que les produits phytopharmaceutiques (Directive 91/414/CE)<sup>19</sup> et biocides (Directive 98/8/CE)<sup>20</sup>.

**Tableau 1 – Liste des substances prioritaires établie par la directive cadre sur l’eau 2000/60/CE et complétée par la directive 2013/39/UE. Sont surlignées en gras les « substances dangereuses prioritaires ».**

Directive cadre sur l’eau 2000/60/CE					
N°	Substance	NQE	N°	Substance	NQE
1	Alachlore	0,3 µg.L <sup>-1</sup> (a)	24	<b>Nonylphénols</b>	<b>0,33 µg.L<sup>-1</sup></b>
2	<b>Anthracène</b>	<b>0,1 µg.L<sup>-1</sup></b>	25	Octylphénols	0,1 µg.L <sup>-1</sup>
3	Atrazine	0,6 µg.L <sup>-1</sup>	26	<b>Pentachlorobenzène</b>	<b>0,007 µg.L<sup>-1</sup></b>
4	Benzène	10 µg.L <sup>-1</sup>	27	Pentachlorophénol	0,35 µg.L <sup>-1</sup>
5	<b>Diphényléthers bromés</b>	<b>0,0085 µg.kg<sup>-1</sup> (b)</b>	28	<b>HAP</b>	<b>0,015 µg.L<sup>-1</sup> (b)</b>
6	<b>Cadmium et ses composés</b>	<b>0,08 µg.L<sup>-1</sup></b>	29	Simazine	1 µg.L <sup>-1</sup>
7	<b>Chloroalcanes, C<sub>10-13</sub></b>	<b>0,41 µg.L<sup>-1</sup></b>	30	<b>Composés du tributylétain</b>	<b>0,0002 µg.L<sup>-1</sup></b>
8	Chlorfenvinphos	0,0085 µg.kg <sup>-1</sup>	31	Trichlorobenzène	0,4 µg.L <sup>-1</sup>
9	Chlorpyrifos (éthylchlorpyrifos)	0,033 µg.L <sup>-1</sup>	32	Trichlorométhane (chloroforme)	2,5 µg.L <sup>-1</sup>
10	1,2-dichloroéthane	0,0085 µg.kg <sup>-1</sup>	33	<b>Trifluraline</b>	<b>0,03 µg.L<sup>-1</sup></b>
11	Dichlorométhane	0,0085 µg.kg <sup>-1</sup>	Ajout de la Directive 2013/39/UE		
12	<b>Di(2-ethylhexyle)phthalate (DEHP)</b>	<b>1,3 µg.L<sup>-1</sup></b>	34	<b>Dicofol</b>	<b>0,0013 µg.L<sup>-1</sup></b>
13	Diuron	0,2 µg.L <sup>-1</sup>	35	<b>Acide perfluoro sulfoné et ses dérivés</b>	<b>0,00065 µg.L<sup>-1</sup></b>
14	<b>Endosulfan</b>	<b>0,005 µg.L<sup>-1</sup></b>	36	<b>Quinoxylène</b>	<b>0,152 µg.L<sup>-1</sup></b>
15	Fluoranthène	0,0063 µg.L <sup>-1</sup>	37	<b>Dioxines et composés de type dioxines</b>	<b>0,0065 µg.kg<sup>-1</sup></b>
16	<b>Hexachlorobenzène</b>	<b>10 µg.kg<sup>-1</sup></b>	38	Aclonifène	0,012 µg.L <sup>-1</sup>
17	<b>Hexachlorobutadiène</b>	<b>55 µg.kg<sup>-1</sup></b>	39	Bifénox	0,00125 µg.L <sup>-1</sup>
18	<b>Hexachlorocyclohexane</b>	<b>0,02 µg.L<sup>-1</sup></b>	40	Cybutryne	0,0025 µg.L <sup>-1</sup>

19	Isoproturon	0,03 $\mu\text{g.L}^{-1}$	41	Cypermethrine	$8.10^{-6} \mu\text{g.L}^{-1}$
20	Plomb et ses composés	1,2 $\mu\text{g.L}^{-1}$	42	Dichlorvos	$5.80.10^{-5} \mu\text{g.L}^{-1}$
21	<b>Mercure et ses composés</b>	<b>20 <math>\mu\text{g.kg}^{-1}</math></b>	43	<b>Hexabromocyclododécane (HBCDD)</b>	<b><math>8.10^{-4} \mu\text{g.L}^{-1}</math></b>
22	Naphthalène	2 $\mu\text{g.L}^{-1}$	44	<b>Heptachlore et époxyde d'heptachlor</b>	<b><math>1.10^{-8} \mu\text{g.L}^{-1}</math></b>
20	Nickel et ses composés	4 $\mu\text{g.L}^{-1}$	45	Terbutryne	0.65 $\mu\text{g.L}^{-1}$

(a) Les NQE sont les valeurs réglementaires applicables aux eaux douces visant à la protection de l'ensemble des organismes d'eau douce et de la santé humaine applicables (valeurs en  $\mu\text{g.L}^{-1}$ ). Elles sont parfois remplacées par les valeurs applicables au biote et sont alors exprimées en  $\mu\text{g.kg}^{-1}$ . On note que d'autres valeurs existent notamment pour les eaux marines. Valeurs issues de la base de données du Portail des Substances Chimiques de l'INERIS<sup>21</sup>

(b) HAP : Hydrocarbures aromatiques polycycliques. Les valeurs des NQE pour les HAP sont déterminées à partir des tests de toxicité réalisés sur le benzo(a)pyrene.

Par ailleurs, la DCSMM (Directive cadre stratégie pour le milieu marin – 2008/56/EC) s'attache à transposer les objectifs de la DCE vis-à-vis du milieu marin<sup>22</sup>. Enfin, la France se fixe elle-même des objectifs propres notamment via l'action nationale de recherche et de réduction des rejets de substances dangereuses dans les eaux (2RSDE) qui vise à dresser un panorama de l'ensemble des substances présentes dans les rejets industriels.

### 1.2.2. ... À LA PRISE EN COMPTE DES EFFETS

Outre l'attention portée au contrôle et à la caractérisation des rejets, ces différents textes réglementaires abordent pour la première fois la problématique de la pollution chimique des eaux de surface selon une approche globale avec la reconnaissance des risques encourus non seulement pour la santé humaine mais aussi pour les milieux et organismes aquatiques (accumulation dans les écosystèmes, disparition d'habitats, pertes de biodiversité). Il est établi que le « bon état chimique » assuré par le contrôle des rejets de substances polluantes ne suffit plus et qu'il doit être associé à la notion de « bon état écologique » établissant la qualité des écosystèmes (Figure 4). En plus des valeurs physicochimiques telles que la température, le pH ou la quantité d'oxygène, les paramètres pris en compte sont aussi hydro-morphologiques (état des berges ou de la côte, continuité de la rivière, régime des marées...) et directement biologiques (composition et abondance de la flore et de la faune aquatique).

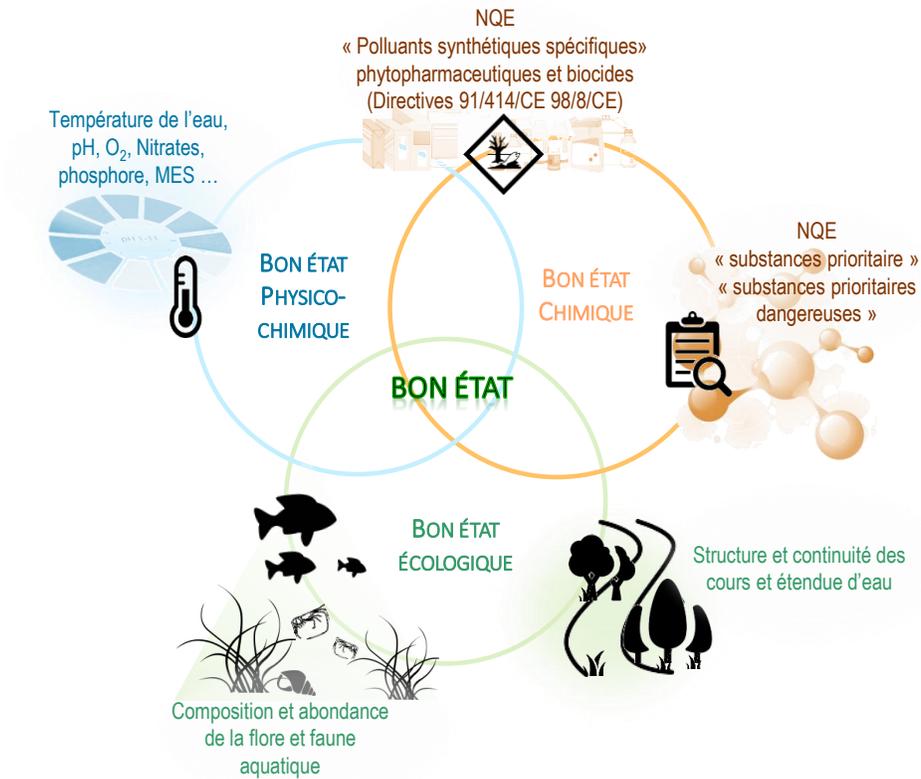


Figure 4 – Illustration des conditions de détermination du "bon état" d'une masse d'eau selon la DCE et la DCSMM. NQE : Normes de Qualité Environnementales. Figure : M. Bittel.

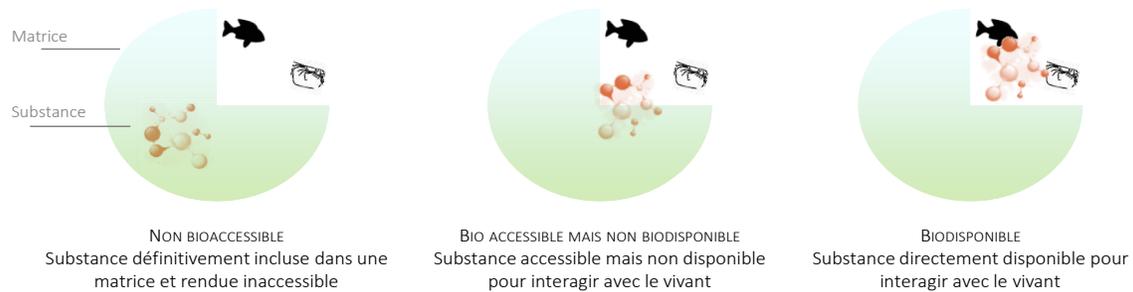
### 1.3. METHODES D'ANALYSES DE LA TOXICITE

#### 1.3.1. METHODES PHYSICOCHIMIQUES : UN ETALON REGLEMENTAIRE INSUFFISANT

Pour répondre aux objectifs réglementaires environnementaux, la multitude et la diversité des substances à surveiller représentent une contrainte majeure qui a conduit au développement d'un grand nombre de méthodes analytiques. Dans la plupart des cas le défi consiste à détecter de faibles concentrations dans un laps de temps court, permettant le cas échéant la mise en place de mesures correctives. Dans cette optique, les méthodes dites physico-chimiques, à la fois spécifiques et sensibles, obtiennent de bons résultats et plus d'une centaine de normes européennes décrivent des méthodes d'analyses quotidiennement utilisées notamment pour le contrôle de la qualité de l'eau potable en Europe (Tableau 2). Leurs résultats servent d'étalon réglementaire quant au respect des NQE fixant les seuils de concentration pour l'ensemble des substances ciblées.

**Tableau 2 – Contrôle de la qualité de l'eau potable - Exemples de méthodes physicochimiques de détection décrites par les normes européennes**

SUBSTANCES	NORME ISO	METHODE
<b>HYDROCARBURES</b>		
6 Hydrocarbures aromatiques polycycliques (HAP)	ISO 7981-1:2005	HPLC sur couche mince avec détection fluorimétrique à la suite d'une extraction liquide-liquide
	ISO 7981-2:2005	HPLC avec détection fluorimétrique à la suite d'une extraction liquide-liquide
Hydrocarbures halogénés hautement volatils	ISO 10301:1997	Chromatographie en phase gazeuse
15 hydrocarbures aromatiques polycycliques (HAP) dans l'eau	ISO 17993:2002	HPLC avec détection par fluorescence après extraction liquide-liquide
<b>BIOCIDES</b>		
Certains agents de traitement des plantes	ISO 11369:1997	HPLC avec détection UV après extraction solide-liquide
Glyphosate et AMPA (Acide aminométhylphosphonique – Produit de dégradation du glyphosate)	ISO 16308:2014	HPLC et détection fluorimétrique
	ISO 21458:2008	HPLC avec détection par spectrométrie de masse en tandem
Insecticides organochlorés, polychlorobiphényles, chlorobenzènes	ISO 6468:1996	Chromatographie en phase gazeuse après extraction liquide-liquide
Herbicides phénoxyalcanoïques, y compris bentazones et hydroxybenzonnitriles	ISO 15913:2000	Chromatographie en phase gazeuse et spectrométrie de masse après extraction en phase solide et dérivation
<b>AUTRES EXEMPLES DE POLLUANTS ORGANIQUES</b>		
Explosifs et composés apparentés	ISO 22478:2006	HPLC avec détection UV
Agents complexant	ISO 16588:2002	Chromatographie en phase gazeuse
Phénols monovalents sélectionnés	ISO 8165-1:1992	Chromatographie en phase gazeuse après enrichissement par extraction
	ISO 8165-2:1999	Chromatographie en phase gazeuse
Bromate dissous	ISO 11206:2011	Chromatographie ionique en réaction post-colonne
Benzène et certains dérivés benzéniques	ISO 11423-1:1997	Chromatographie en phase gazeuse de l'espace de tête
	ISO 11423-2:1997	Chromatographie en phase gazeuse
Composés organiques azotés et phosphorés sélectionnés	ISO 10695:2000	Chromatographie phase gazeuse
Alcanes polychlorés à chaîne courte dans les sédiments et matières en suspension	ISO 18635:2016	Chromatographie gazeuse-spectrométrie de masse et ionisation chimique négative
<b>METAUX</b>		
Chrome(VI)	ISO 18412:2005	Méthode photométrique pour des eaux faiblement contaminées
Cobalt, Nickel, Cuivre, Zinc, Cadmium, Plomb	ISO 8288:1986	Spectrométrie d'absorption atomique avec flamme
Aluminium	ISO 12020:1997	Spectrométrie d'absorption atomique
Mercure	ISO 12846:2012	Spectrométrie d'absorption atomique avec et sans enrichissement
Cadmium	ISO 5961:1994	Spectrométrie d'absorption atomique
<b>IONS</b>		
Li <sup>+</sup> , Na <sup>+</sup> , NH <sub>4</sub> <sup>+</sup> , K <sup>+</sup> , Mn <sup>2+</sup> , Ca <sup>2+</sup> , Mg <sup>2+</sup> , Sr <sup>2+</sup> et Ba <sup>2+</sup> dissous	ISO 14911:1998	Chromatographie ionique
Anions dissous : bromure chlorure fluorure nitrate nitrite phosphate et sulfate	ISO 10304-1:2007	Chromatographie des ions en phase liquide
Anions dissous : chromate iodure sulfite thiocyanate et thiosulfate	ISO 10304-3:1997	Chromatographie des ions en phase liquide



**Figure 5 – Illustration des concepts de bio-accessibilité et biodisponibilité. Figure : M. Bittel.**

Par ailleurs, on distingue dans l'environnement les composés dits non bio-accessibles, bio-accessibles mais non bio-disponible et bio-disponibles. La biodisponibilité correspond à la capacité d'un composé à interagir avec un organisme vivant (Figure 5). La question de ces interactions biologiques adresse directement une autre limite des méthodes physicochimiques : En ne permettant qu'une quantification globale des substances recherchées elles ne renseignent en rien sur des paramètres propres au vivant tels que la biodisponibilité ou la toxicité. Encore absentes des exigences réglementaires et de fait souvent non prises en compte pour l'évaluation de la qualité des eaux, ces informations sont pourtant essentielles pour l'évaluation du devenir des polluants et de leur impact réel sur l'environnement et la santé. Cette dernière limite ne relève pas de performances technologiques à repousser mais souligne le besoin d'une approche de mesure fondamentalement différente.

### 1.3.2. METHODES BIOLOGIQUES : UNE APPROCHE COMPLEMENTAIRE INDISPENSABLE

C'est à cette nécessité de prise en compte des paramètres liés au vivant que tentent de répondre les méthodes biologiques ou bio-essais. Consistant à observer l'impact d'un échantillon sur un organisme vivant, elles ne visent plus à directement mettre en évidence la présence ou absence d'une substance chimique, mais à en évaluer les effets. Des organismes unicellulaires (bactéries, levures...), pluricellulaires (phyto/zooplancton) ou même supérieurs (poissons, crustacés), sont utilisés comme sondes pour mettre en évidence et qualifier les répercussions des substances présentes par rapport à divers paramètres choisis pour leur pertinence en fonction d'un contexte donné (ex. : recherche spécifique de perturbateurs endocriniens) ou pour leur importance à l'échelle du vivant en général. On parle d'organismes sentinelles<sup>23</sup>. A l'inverse des méthodes physico-chimiques il n'est pas nécessaire de présupposer la nature des polluants présents dans les échantillons. Si l'échantillon est toxique ou exerce un quelconque effet, un bio-essai répondra même si la substance responsable était inconnue auparavant ou non référencée comme ayant un impact sur une voie métabolique particulière.

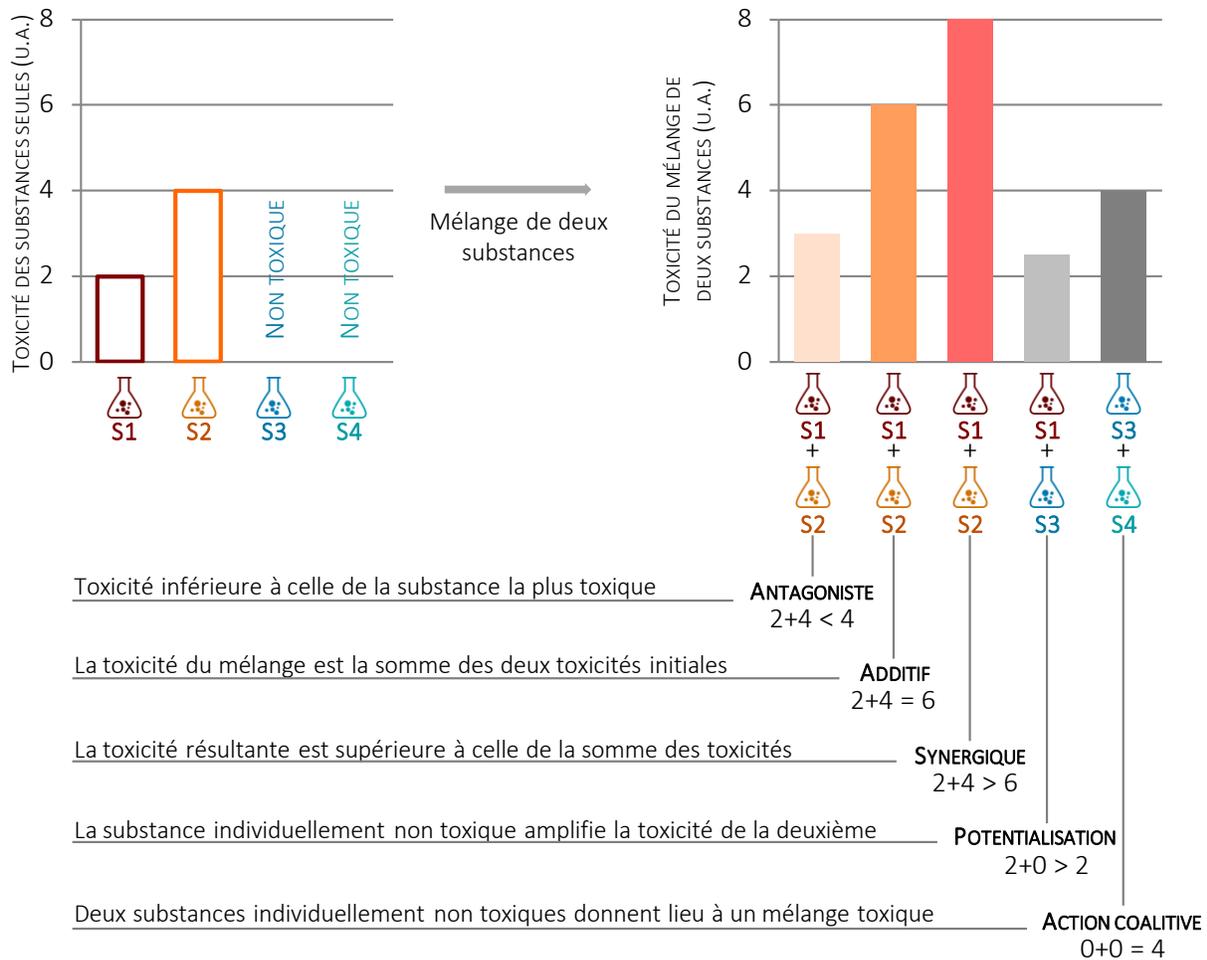


Figure 6 - Illustration des différents types d'effets cocktails pouvant résulter du mélange de deux substances chimiques. Représentation adaptée de Brillet et. al<sup>24</sup>.

En corolaire, les résultats obtenus via un bio-essai seront la résultante de l'impact de l'ensemble des substances en présence. Ils permettent ainsi la mise en évidence d'éventuels effets dits « cocktails » souvent impossibles à prédire ou sous-estimés. La toxicité résultant d'un mélange de différentes substances est en effet souvent différente de celle des substances prises individuellement (Figure 6). Et pour cause, lors d'une étude réalisée en 2009 sur des mélanges de substances issues d'industries papetières, textiles et pétrolières, les résultats reportent des interactions additives pour plus de 50% des combinaisons testées<sup>25</sup>. Dans un contexte où la pollution des ressources en eau implique la présence simultanée de millier de composés différents de tels effets sont impossibles à anticiper au cas par cas et nécessitent donc la mise en œuvre d'une surveillance que seules des méthodes de suivi biologique seront en mesure de fournir. Ainsi, en permettant une approche globale non offerte par les méthodes physico-

chimiques, ces méthodes apportent des informations complémentaires indispensables sur l'état de pollution de l'environnement <sup>26</sup>.

### 1.3.2.1. LES BIO-ESSAIS DANS LA REGLEMENTATION

A l'heure actuelle, les bio-essais ne font pas l'objet des normes de qualité environnementales (NQE) qui ne prennent en compte que des limites de concentrations pour les substances prioritaires concernées. Cependant, dans sa définition d'un « bon état écologique » la DCE souligne explicitement l'importance d'intégrer le vivant au contrôle de la pollution. Bien que les critères d'évaluations ne prennent en compte que des indices de qualité écologique (état des populations de phytoplanctons, macro algues, angiospermes, invertébrés benthiques et poissons (Cf. Annexe V de la DCE)), plusieurs documents issus des Stratégies d'Implémentation Communes (CIS) mentionnent explicitement l'importance des bio-essais en vue de l'atteinte des objectifs fixés. En particulier, le document n°19 décrit les bio-essais comme des outils à considérer pour :

- l'établissement d'un lien entre mesures chimiques et écologiques,
- la détection précoce de perturbations biologiques,
- l'établissement d'un lien dose/exposition/effets,
- la constitution d'un système d'alerte en amont,
- la mise à jour et l'évaluation de risques.<sup>27</sup>

« Il n'est plus possible de fixer des objectifs et limites de qualité sous le seul angle de la nature chimique des contaminants. La validation d'un panel d'essais biologiques doit compléter le dispositif décisionnaire »

**Figure 7 – Prof. Yves Levi, Faculté de Pharmacie, ANSES, lors des Journées Inter nationales de l'eau à Poitiers en 2014.**

Enfin, de nombreux acteurs de la communauté scientifique pointent du doigt l'importance d'intégrer un panel d'essais biologiques aux dispositifs décisionnaires de gestion de la pollution. En particuliers les réseaux européens NORMAN et SOLUTION qui soulignent le manque de données concernant la toxicité des micropolluants et enjoignent à l'élaboration de plans d'action globaux exploitant la complémentarité des méthodes physicochimiques et biologiques<sup>28,29</sup>.

Par ailleurs, dans le cadre de la régulation de l'utilisation et de la production de produit chimiques, la directive Européenne REACH oblige les acteurs de l'industrie chimique à renseigner des informations sur le risque environnemental de toute substance ou mélange de substances produites ou utilisées. Dans ce cadre la toxicité est évaluées à partir de bio-essais réalisés sur des organismes aquatiques et ou terrestres, des végétaux, ainsi que sur des micro-organismes<sup>30</sup>.

### 1.3.2.2. DIFFERENTS TYPES DE BIO-ESSAIS

Plusieurs méthodes de bio-essais ont ainsi été élaborées pour étudier l'impact d'une substance ou d'un échantillon sur l'environnement<sup>31</sup>. S'il n'existe pas vraiment de classification, on peut distinguer les observations faites directement sur la faune et la flore à l'échelle d'un biotope donné et destinées à mettre en évidence des impacts globaux sur des populations ou communautés entières. Ces observations réalisées sur le terrain permettent la qualification la plus représentative des effets finaux d'une pollution sur l'environnement. Nécessitant des observations sur le long terme et à grande échelle, elles sont cependant longues et coûteuses à mettre en œuvre. A l'autre extrême, les tests réalisés en laboratoires sont basés sur l'observation *in vitro* de microorganismes ou organismes supérieurs et permettent de tester les effets de substances données ou d'échantillons environnementaux dans des conditions contrôlées. Ils présentent ainsi les avantages d'une meilleure reproductibilité et spécificité de réponse ce qui les rend particulièrement pertinents dans une volonté de standardisation des méthodes. Plusieurs d'entre eux font dans cette optique l'objet de normes (Tableau 1).

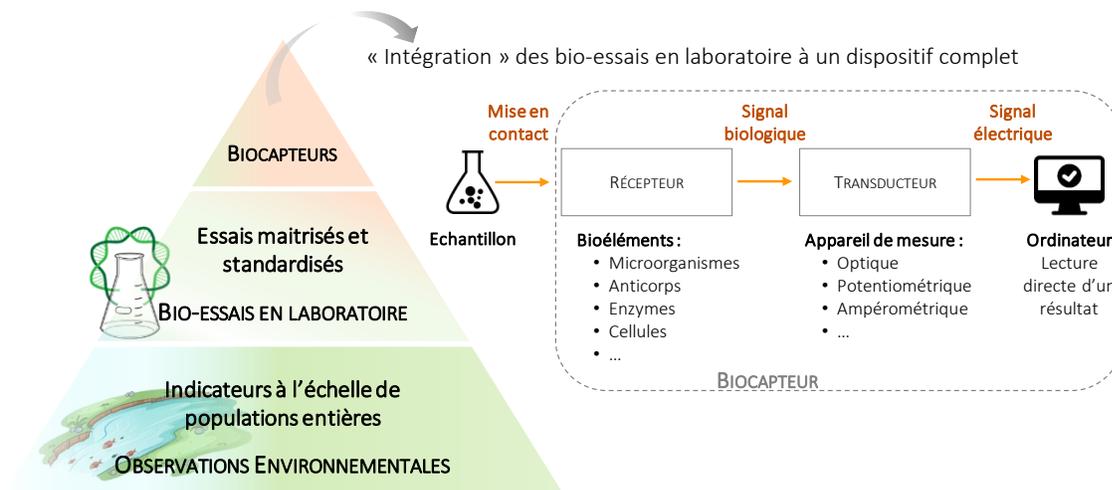
**Tableau 3 – Contrôle de la qualité de l'eau potable – Exemples de bio-essais décrits par les normes européennes**

NORME ISO	METHODE
<b>BACTERIES</b>	
ISO 9509:2006	Essai de toxicité pour l'évaluation de l'inhibition de la nitrification des micro-organismes des boues activées
ISO 10712:1995	Essai d'inhibition de la croissance de <i>Pseudomonas putida</i>
ISO 11348:2007	Détermination de l'effet inhibiteur d'échantillons d'eau sur la luminescence d' <i>Aliivibrio fischeri</i>
ISO 13641:2003	Détermination de l'inhibition de la production de gaz des bactéries anaérobies
ISO 15522:1999	Détermination de l'effet inhibiteur des constituants de l'eau sur la croissance des micro-organismes de boues activées
<b>ALGUES</b>	
ISO 8692:2012	Essai d'inhibition de la croissance des algues d'eau douce avec des algues vertes unicellulaires
ISO 10710:2010	Essai d'inhibition de croissance sur la macro algue d'eaux marine et saumâtre <i>Ceramium tenuicorne</i>
ISO 20079:2005	Détermination de l'effet toxique des constituants de l'eau et des eaux résiduaires vis-à-vis des lentilles d'eau
<b>ROTIFERES</b>	
ISO 19820:2016	Détermination de la toxicité aiguë envers le rotifère marin <i>Brachionus plicatilis</i>
ISO 19827:2016	Détermination de la toxicité aiguë envers le rotifère d'eau douce <i>Brachionus calyciflorus</i>
<b>CRUSTACES</b>	
ISO 6341:2012	Détermination de l'inhibition de la mobilité de <i>Daphnia magna Straus</i> (Cladocera, Crustacea) -- Essai de toxicité aiguë
ISO 10253:2006	Essai d'inhibition de la croissance des algues marines avec <i>Skeletonema costatum</i> et <i>Phaeodactylum tricorutum</i>
ISO 10706:2000	Détermination de la toxicité à long terme de substances vis-à-vis de <i>Daphnia magna Straus</i> (Cladocera, Crustacea)
ISO 14380:2011	Détermination de la toxicité aiguë envers <i>Thamnocephalus platyurus</i> (Crustacea, Anostraca)
ISO 14669:1999	Détermination de la toxicité létale aiguë vis-à-vis de copépodes marins (Copepoda, Crustacea)
ISO 17244:2015	Détermination de la toxicité d'échantillons aqueux sur le développement embryon-larvaire de l'huître creuse ( <i>Crassostrea gigas</i> ) et de la moule ( <i>Mytilus edulis</i> ou <i>Mytilus galloprovincialis</i> )

POISSONS	
ISO 7346-1:1996	Détermination de la toxicité aiguë létale de substances vis-à-vis d'un poisson d'eau douce
ISO 10229:1994	Détermination de la toxicité à long terme de substances vis-à-vis d'un poisson d'eau douce
ISO 12890:1999	Détermination de la toxicité vis-à-vis des embryons et larves de poissons d'eau douce -- Méthode semi-statique
ISO 15088:2007	Détermination de la toxicité aiguë des eaux résiduaires vis-à-vis des œufs de poisson-zèbre ( <i>Danio rerio</i> )

### 1.3.2.3. DU BIO-ESSAI AU BIOCAPTEUR

Malgré leur pertinence pour l'évaluation de phénomènes de pollution, les bio-essais restent des méthodes nécessitant des compétences et équipements spécifiques dont la mise en place reste difficile. Un enjeu majeur vers la démocratisation et l'intégration des méthodes biologiques aux processus réglementaires, réside ainsi dans l'élaboration de méthodes d'analyses en continu, mieux adaptées aux contraintes du terrain et permettant une lecture de résultats simplifiée<sup>32</sup>. C'est dans cette optique que sont développés les biocapteurs, définis comme « *des appareils autonomes capables de fournir une information analytique quantitative ou semi quantitative en utilisant un élément de reconnaissance biologique lié à un élément de transduction* » (Définition selon l'IUPAC – International Union of Pure and Applied Chemistry - 2001).



**Figure 8 – Représentations des différents niveaux de bio-essais et schématisation du principe de fonctionnement d'un biocapteur.**  
Figure : M. Bittel.

Selon un schéma traditionnel, le bioélément qui sert de récepteur (bio-reporter) répond sous l'effet de l'échantillon testé et le transducteur converti la réponse biologique en un signal détectable. Les biocapteurs se distinguent ainsi des bio-essais pour lesquels le transducteur ne fait pas partie intégrante

du système (Figure 8). Ces méthodes représentent les dernières avancées dans le domaine des bio-essais et plusieurs revues font le bilan des différents types de biocapteurs élaborés à ce jour (Tableau 4)<sup>33,34</sup>.

**Tableau 4 – Exemples de biocapteurs élaborés pour des applications environnementales. Extrait de la revue de Rodriguez-Mozaz et al.<sup>33</sup>.**

Bio-reporter	Méthode de transduction	Analyte ciblé	Spécificités	Matrice
Anticorps	Optique	Simazine	L.D. : 0,2 µg.L <sup>-1</sup>	Eaux naturelles (sous-sols, surface)
Anticorps	Ampérométrique	Œstradiol	L.D. : 1 ng.L <sup>-1</sup>	N.C.
Enzyme (AChE)	Ampérométrique	Paraoxon et Carbofuran (Pesticides)	L.D. : 0,2 µg.L <sup>-1</sup> (Utilisation de réseaux de neurones pour la discrimination de différents inhibiteurs de l'AChE)	Eaux usées
Enzyme (Cellobiose déshydrogénase et glucose déshydrogénase quinoprotéine-dépendant)	Electrochimique	Phénols	L.D. : 0,8 µg.L <sup>-1</sup> (Mesures terrains)	Eaux usées
Photosystème II (PSII)	Ampérométrique	Diuron Atrazine Simazine	L.D. : 0,233 µg.L <sup>-1</sup> L.D. : 0,431 µg.L <sup>-1</sup> L.D. : 0,806 µg.L <sup>-1</sup>	N.C.
ADN (Hybridation)	Electrochimique	ADN de <i>Chlamydia trachomatis</i>	L.D. : 0,2 mg.L <sup>-1</sup> (Nécessite une amplification PCR préalable)	Eau de rivière (Pré-concentrée)
ADN (Hybridation)	Piézoélectrique	<i>Aeromonas hydrophila</i> (Bactérie responsable d'infections intestinales)	Nécessite des étapes d'extraction et d'amplification par PCR	Eau potable
<i>Chlorella vulgaris</i>	Optique (Fluorescence)	Isoproturon Diuron Simazine	L.D. : 0,025 µg.L <sup>-1</sup> L.D. : 0,025 µg.L <sup>-1</sup> L.D. : 0,5 µg.L <sup>-1</sup>	N.C.
<i>Pseudomonas</i> et <i>Achromobacter</i> (Munis d'un plasmide spécifique de la dégradation anionique de surfactants)	Ampérométrique	Surfactants	L.D. : 0,25 mg.L <sup>-1</sup>	N.C.

Nombre d'entre eux exploitent les interactions existant entre deux molécules (enzyme-substrat, anticorps-antigène, inducteur-récepteur, séquence nucléiques complémentaires). Ils présentent l'avantage d'offrir une grande spécificité de détection. D'autres méthodes analysent les réactions de cellules entières, le plus souvent des microorganismes tels que des bactéries, champignons, levures ou algues unicellulaires. On parle alors de biocapteurs microbiens. De tels biocapteurs présentent l'avantage de permettre la mesure de réactions ne pouvant avoir lieu qu'au sein de cellules intactes vivantes. Des

paramètres globaux tels que la biodisponibilité ou la toxicité peuvent alors être mis en évidence. Ces techniques présentent ainsi un intérêt tout particulier en vue d'application environnementales. Cependant, la ou le biocapteur idéal se doit d'être rapide, facile à utiliser, bon marché, et robuste, ce type d'approches implique souvent de moins bonnes performances de spécificité et présente encore des difficultés de mise en œuvre qui sont un obstacle à leur utilisation à grande échelle et à leur mise sur le marché. Des avancées dans les domaines tels que l'évaluation de la biodisponibilité, ou le screening large de la toxicité d'échantillons complexes sont des enjeux majeurs qui permettront de les rendre plus compétitifs vis-à-vis des procédures de laboratoire<sup>35</sup>.

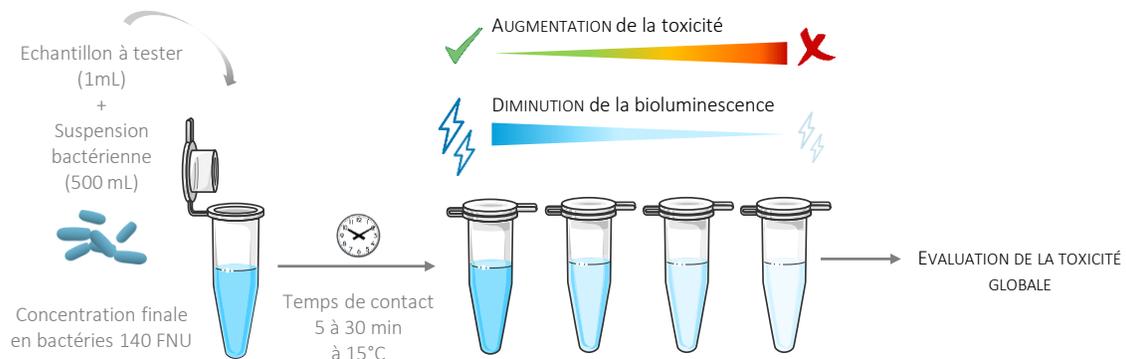
Le défis de cette thèse est ainsi de proposer une nouvelle méthode de mesure de la toxicité par biocapteurs microbiens, complémentaire des techniques actuelles et permettant d'en dépasser les limites. Le prochain chapitre s'attachera à mieux décrire les différents type de biocapteurs microbiens, à en cerner les avantages, obstacles et stratégies d'amélioration.

## 2. LES BIOCAPTEURS MICROBIENS : PREMIERS MAILLONS DE LA CHAÎNE AU SERVICE DE LA MESURE

### 2.1. L'APPROCHE MONOCELLULAIRE MONOPARAMETRIQUE

#### 2.1.1. DES METHODES D'ANALYSE DE TOXICITE GLOBALE

Destinés à évaluer l'activité des antibiotiques nouvellement découverts, c'est entre les années 1940 et 1945 sous la forme d'antibiogrammes que les premiers bio-essais mettant en jeu des microorganismes voient le jour. Les bactéries utilisées pour mesurer l'impact des substances testées acquièrent alors leur statut « *d'élément de reconnaissance biologique* »<sup>36</sup>. Suite à ces premiers travaux réalisés dans le domaine de la santé, les préoccupations grandissantes quant aux problématiques environnementales ont conduit à l'utilisation de bioéléments microbiens pour évaluer l'impact de polluants chimiques. Leur statut de premier maillon de la chaîne alimentaire en première ligne face à tout événement de pollution, les positionne comme des indicateurs de choix pour une mesure précoce des phénomènes de toxicité. En parallèle des méthodes impliquant des organismes supérieurs (poissons, crustacés), les microorganismes présentent l'avantage d'un besoin réduit en infrastructures spécifiques, d'un faible coût de production et de temps de réponse plus courts. Electrochimique, calorimétrique ou encore optiques, de nombreuses méthodes impliquant l'utilisation de signaux biologiques tels que la fluorescence ou des variations colorimétriques sont ainsi développées. Elles rendent compte d'évènements tels que la croissance ou la respiration cellulaire et évaluent les effets d'un stress global sur l'activité microbienne en général<sup>34,37</sup>.



**Figure 9 – Principe de la mesure d'une toxicité globale par inhibition de la bioluminescence selon la norme ISO 11348-1.**  
**Figure : M. Bittel.**

Parmi ces méthodes sont élaborés les premiers bio-essais basés sur la bioluminescence bactérienne. Le premier d'entre eux développé au cours des années 1980 consiste à mesurer la bioluminescence émise

naturellement par la bactérie *Aliivibrio fischeri* : Lorsqu'elle est mise en contact avec un échantillon, plus celui-ci est toxique, plus la bioluminescence diminue (Figure 9).

Aujourd'hui normalisé<sup>a</sup>, la simplicité et la fiabilité de ce test l'ont rendu mondialement connu sous le nom de « Microtox® »<sup>38</sup>. Grâce au développement de protocoles adaptés à l'utilisation de bactéries sous forme déshydratées ou lyophilisées, il est de plus automatisable au sein d'un biocapteur et commercialisé sous forme de dispositifs de laboratoire, mais aussi de suivi en ligne ou de mesure sur le terrain (Figure 10).



MICROTOX® M500  
APPAREIL DE LABORATOIRE POUR LA MESURE DE LA  
TOXICITÉ AIGÛE.

DELTA TOX®  
APPAREIL PORTABLE POUR UNE ÉVALUATION SIMPLE ET  
RAPIDE DE LA QUALITÉ DE L'EAU.



MICROTOX® CTM  
APPAREIL EN LIGNE DE MESURE CONTINUE DE LA  
TOXICITÉ. INDICATIONS EN TEMPS RÉEL DE LA QUALITÉ  
DE L'EAU TESTÉE.

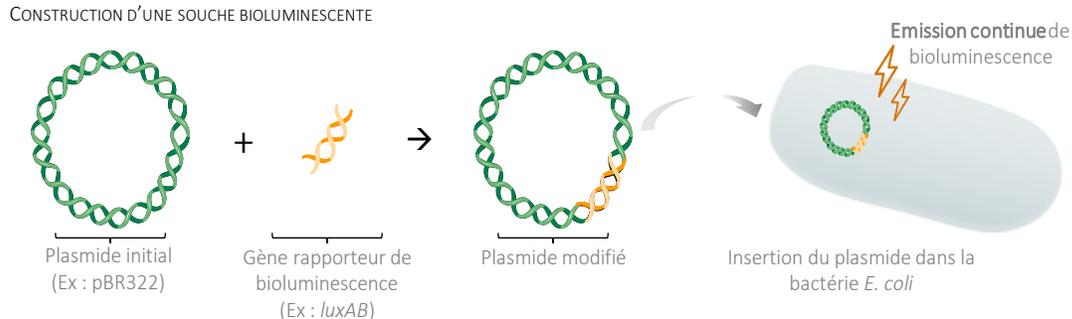
**Figure 10 – Différents biocapteurs Microtox® ici commercialisés par la compagnie ModernWater<sup>39</sup>**

### 2.1.2. L'ESPOIR D'UNE DETECTION SPECIFIQUE

Malgré ses performances, un désavantage souvent mentionné du test Microtox® concerne la provenance marine de la bactérie *Aliivibrio fischeri* qui la rend moins pertinente lors de tests réalisés en eaux douces<sup>40</sup>. Aussi, la recherche de bioreporters plus adaptés à ce type d'environnements, associée à des progrès dans le domaine des manipulations génétiques ont conduit par la suite à l'implantation des gènes luminescents

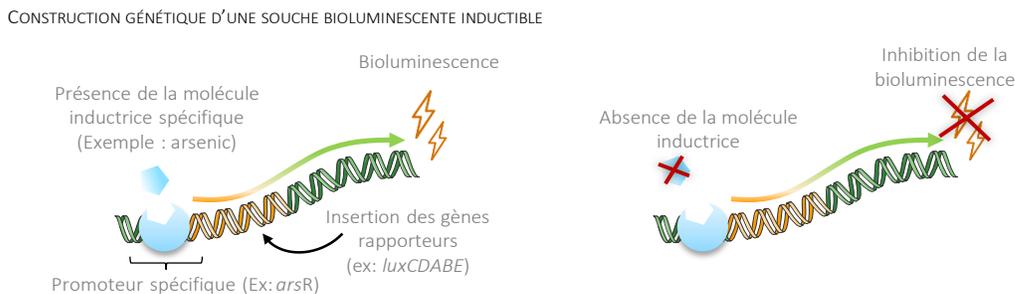
<sup>a</sup> La norme NF EN ISO 11248 « Détermination de l'effet inhibiteur d'échantillon d'eau sur la luminescence de *Vibrio fischeri* » se décline selon trois protocoles. Si le premier implique des bactéries fraîchement préparées les deux autres décrivent l'utilisation de bactéries déshydratées et lyophilisées. En découplant l'étape de production de biomasse de celle de son utilisation pour les tests, ces deux variantes permettent un gain de temps d'environ 1 journée au moment de la mesure.

dans le génome de la bactérie *Escherichia coli*. En 1984 Baldwin *et al.* sont ainsi les premiers à transférer le fragment d'ADN codant pour la luciférase<sup>a</sup> (*luxAB*) au sein du plasmide pBR322, lui-même ensuite introduit chez *E. coli*. La bactérie devient alors luminescente à son tour (Figure 11)<sup>41</sup>.



**Figure 11 – Schématisation du mécanisme de construction de bactéries bioluminescentes génétiquement modifiées.**  
Figure : M. Bittel.

Puis, améliorant encore la technique, des souches sont conçues pour la détection plus ou moins spécifique de composés ciblés. Pour ce faire, les gènes responsables de la luminescence (dits gènes rapporteurs), sont couplés à des promoteurs qui ne s'activent qu'en présence d'inducteurs donnés (molécules chimiques spécifiques)<sup>42</sup>. La bioluminescence est ainsi contrôlée de manière à n'être émise qu'en présence de ces substances ou familles de substances (ex : métaux lourds<sup>43</sup>, polluants organiques<sup>44,45</sup>).



**Figure 12 – Schématisation du mécanisme de détection spécifique par des bactéries génétiquement modifiées.**  
Figure : M. Bittel.

Un bio-essais efficace a par exemple été réalisé pour la mesure d'arsenic dans des échantillons environnementaux<sup>46</sup>. Pour ce faire, un promoteur spécifique de l'arsenic (*arsR*) est couplé aux gènes *luxCDABE* codant pour la luciférase (plasmide pSB403-*arsR*) puis inséré au sein de la bactérie *E. coli* (Figure 12). Une fois lyophilisée, la souche ainsi construite est intégrée à un kit permettant la mise en contact

<sup>a</sup> Enzyme responsable de la production de bioluminescence.

avec l'échantillon à tester. Après seulement 2h d'incubation la mesure de la bioluminescence émise permet la quantification de concentrations d'arsenic comprises entre 50 et 150  $\mu\text{g.L}^{-1}$ . L'analyse directe sur le terrain d'échantillons d'eaux souterraines est ainsi rendue possible. Au-delà de la mesure d'une toxicité globale qui n'atteste que de la mort ou de la survie des microorganismes utilisés, ces méthodes ouvrent la porte à l'élaboration d'une détection biologique plus nuancée.

**Tableau 5 – Illustration du manque de spécificité des principaux promoteurs utilisés pour la détection des composés métalliques (√ : détection du métal. ⊙: cible théorique). Données issues des travaux de Jouanneau *et. al* (2011)<sup>47</sup>**

Métaux détectés	Promoteur (Inducteur théorique)			
	Pznt (Zinc)	Pars (Arsenic)	Pmer (Mercure)	Pcop (Cuivre)
Cadmium	√	√	√	
Mercure	√		⊙	
Arsenic III	√	⊙	√	
Arsenic V	√	⊙	√	
Cuivre	√			⊙
Plomb	√	√		
Etain	√			
Zinc	⊙		√	
Nickel	√			
Cobalt	√			
Chromium VI	√			
Argent			√	√
Fer	√		√	

Ces résultats encourageants doivent cependant être tempérés par la difficulté de construction de souches vraiment spécifiques des substances pour lesquelles elles sont destinées. En effet, dans le cas de la détection des métaux lourds par exemple, les principaux promoteurs connus sont souvent induits aussi par d'autres métaux que ceux pour lesquels ils sont initialement destinés (Tableau 5). On note ainsi que le bio-essais de mesure de l'arsenic décrit dans le paragraphe précédent détecte probablement aussi, et de manière indifférenciée, d'autres substances telles que le cadmium ou l'étain. Pour pallier à ce manque de

spécificité, certaines études proposent de coupler les réponses obtenues grâce à plusieurs promoteurs et en passant de biocapteurs monocellulaires à des biocapteurs multicellulaires. Cette démarche sera traitée plus avant dans la suite de ce document.

**Tableau 6 – Exemple de souches génétiquement modifiées permettant la détection spécifique de mécanismes toxiques.**

Microorganisme	système inductible	Effet ciblé	Méthode de mesure	Référence
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Récepteur hAR (human Androgen Receptor)	Androgénicité	Optique (colorimétrie)	48
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Récepteur hER (human Androgen Receptor)	Œstrogénicité	Optique (colorimétrie)	48
<i>Escherichia coli</i>	Promoteur PkatG couplé à l'opéron <i>luxCDABE</i>	Stress oxydatif	Optique (Bioluminescence)	49
<i>Escherichia coli</i>	Promoteurs PrecA ou PuvrA ou PalkA ou PnrdA couplés à l'opéron <i>luxCDABE</i>	Lésions de l'ADN	Optique (Bioluminescence)	50,51

Par ailleurs, la détection spécifique par biocapteurs se heurte aux mêmes limites conceptuelles que les méthodes d'analyses physicochimiques : Si l'intérêt supplémentaire de l'approche biologique consiste à non plus mesurer la fraction totale du polluant mais seulement sa fraction bio disponible, il n'en reste pas moins que concevoir un bio-reporter pour chaque substance reste techniquement irréalisable. C'est pourquoi outre la détection de substances spécifiques certains capteurs microbiens sont aussi élaborés pour mettre en évidence des mécanismes de toxicité particuliers<sup>52</sup>. Il existe en effet un grand nombre d'effets toxiques qui bien que non létaux peuvent avoir un impact négatif sur les organismes ou populations. Leur mise en évidence et leur compréhension est fondamentale pour mieux appréhender d'éventuels effets sur la santé à l'échelle humaine. Les perturbateurs endocriniens représentent l'exemple le plus médiatique de ce type d'effets et de nombreuses recherches tentent d'élaborer des essais permettant de les mettre en évidence. Il existe par exemple des souches de levures recombinantes permettant la mise en évidence d'effets d'œstrogénicité ou d'androgénicité<sup>48,53</sup>. Elles sont élaborées grâce à l'intégration au sein de leur génome des gènes humains codant pour des récepteurs spécifiques aux œstrogènes (hER) ou androgènes (hAR). Lorsque les molécules cibles sont présentes (ici œstrogènes, androgènes ou molécules mimant leur structure), elles se lient à ces récepteurs conduisant à la

production de  $\beta$ -galactosidase. Une fois sécrétée cette molécule réagit avec un substrat<sup>a</sup> présent dans le milieu, provoquant un virage colorimétrique du jaune vers le rouge. La mesure est ainsi réalisée par simple lecture de l'absorbance à 540 nm. D'autres constructions ciblent quant à elles différents types de stress tels que des stress oxydatifs ou la génotoxicité (Tableau 6).

### 2.1.3. UNE PREMIERE DIMENSION NECESSAIRE MAIS NON SUFFISANTE

Qu'elle que soit la méthode de révélation (conductivité, bioluminescence, absorbance...), les bio-essais microbiens ainsi élaborés ne mesurent qu'un paramètre unique issu de la cellule ou l'organisme (méthodes « monocellulaires monoparamétriques »). De manière générale, ils permettent de mettre en évidence une toxicité globale sans toutefois en identifier la cause. A l'inverse, lorsqu'ils sont conçus pour identifier de manière spécifique une substance ou un certain mécanisme de toxicité, ils deviennent par construction aveugles à tout autre type d'interactions pouvant avoir lieu à l'échelle de l'organisme. Un bio-essais mal choisi en regard d'un évènement de pollution inconnu serait alors impuissant à le détecter<sup>54</sup>. Par ailleurs il existe dans tous les cas des limites en termes de spécificité (Figure 13). Enfin, avec des seuils moyens de détection de l'ordre du  $\text{mg.L}^{-1}$  ou du  $\mu\text{g.L}^{-1}$  les biocapteurs bactériens manquent aussi souvent de sensibilité<sup>55</sup>.

La principale fonction des méthodes monocellulaires monoparamétriques (1 cellule / 1 paramètre observé) est donc d'apporter une première dimension d'analyse. Bien qu'indispensable, celle-ci est cependant insuffisante dans une optique de contrôle de la pollution. En effet, si elles se révèlent capables d'identifier l'existence d'un phénomène de toxicité elles peinent à le caractériser rendant difficile la mise en place d'éventuelles mesures correctives. Ces limites viennent directement du manque de richesse de l'information que ces techniques fournissent. C'est pourquoi l'amélioration des biocapteurs existants passe par la capacité à compléter l'information récoltée. Dans cette optique deux stratégies parallèles se complètent. La première consiste à augmenter le nombre de bio-reporters et d'en croiser les réponses. On passe alors de capteurs monocellulaires à des capteurs multicellulaires. La deuxième, plutôt que de multiplier le nombre de bio-reporters, vise à augmenter le nombre de paramètres mesurés au sein de la même cellule, permettant ainsi de mieux décrire les évènements physiologiques ayant lieu au cours d'un phénomène de toxicité donné. On parle alors de mesures multiparamétriques. Une description plus approfondie de ces deux approches sera donnée dans les paragraphes suivants.

---

<sup>a</sup> chlorophenol red  $\beta$ -D-galactopyranoside

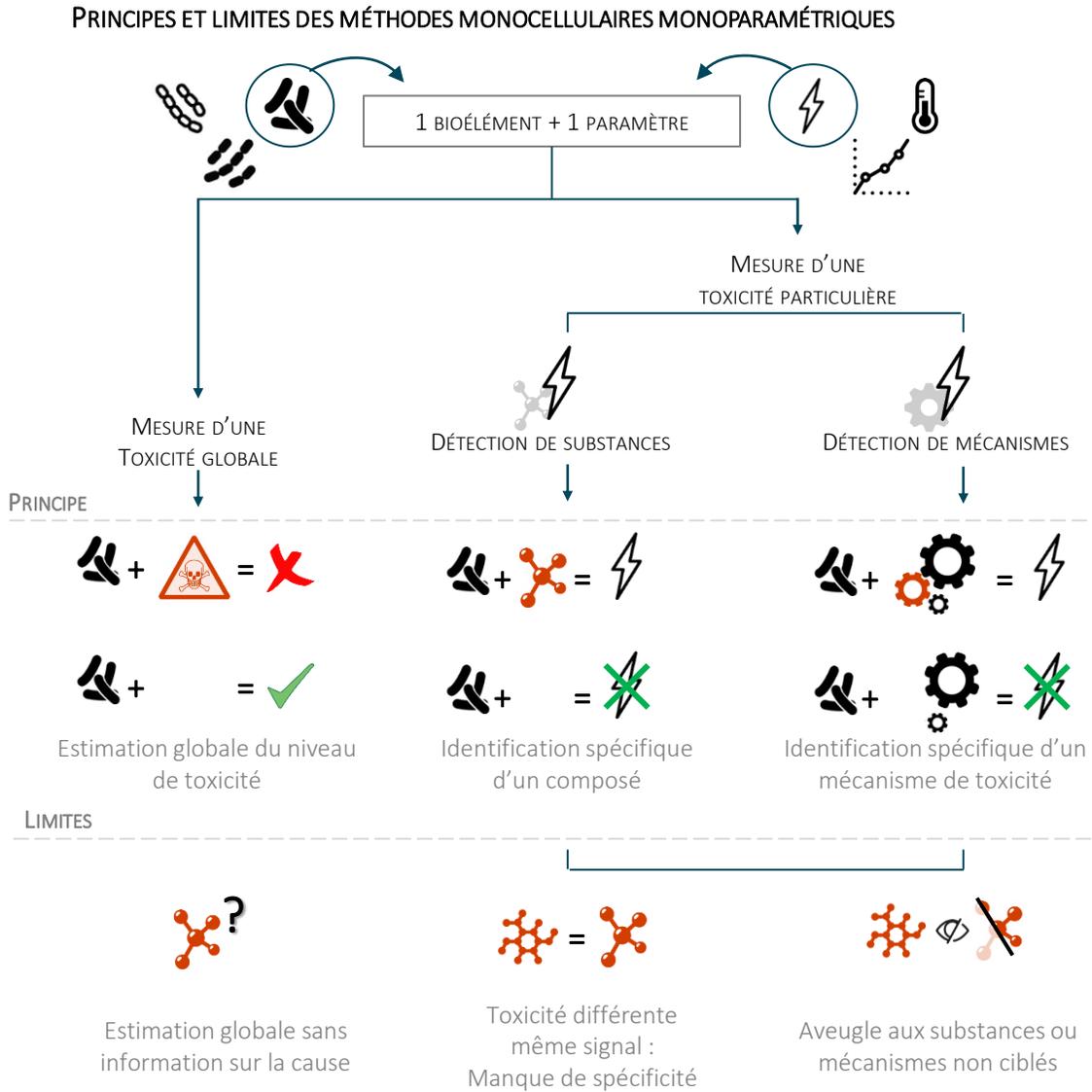


Figure 13 – Principes et limites des méthodes biologiques monoparamétriques. Figure : M. Bittel.

## 2.2. STRATEGIES D'AMÉLIORATIONS, VERS TROIS DIMENSIONS COMPLÉMENTAIRES

### 2.2.1. CROISER LES TÉMOIGNAGES : L'APPROCHE MULTICELLULAIRE

Un des enjeux majeurs du contrôle de la toxicité par des tests biologiques consiste en l'obtention d'informations pertinentes à l'échelle de l'environnement dans son ensemble. Ainsi, certains travaux

récents témoignent de l'importance de conduire des essais non plus sur des organismes isolés mais sur des gammes permettant de mimer des communautés naturelles, des fractions de la chaîne alimentaire ou plus largement de cibler différents types métaboliques (procaryote, eucaryote, animal, végétal...)<sup>56</sup>. Alors que tous sont interconnectés, la toxicité impactant un maillon de la chaîne se répercutera inévitablement sur les autres. De plus, chaque espèce présente des sensibilités variables à différents types de substances. Ainsi il n'est pas étonnant de constater lors de tests réalisés par exemples sur des algues que la majeure partie de la toxicité d'un échantillon environnemental soit due à la présence d'herbicides<sup>57</sup>. D'autres substances telles les produits pharmaceutiques et cosmétiques ont quant à elles plus d'effets sur des microorganismes bactériens<sup>58</sup>.

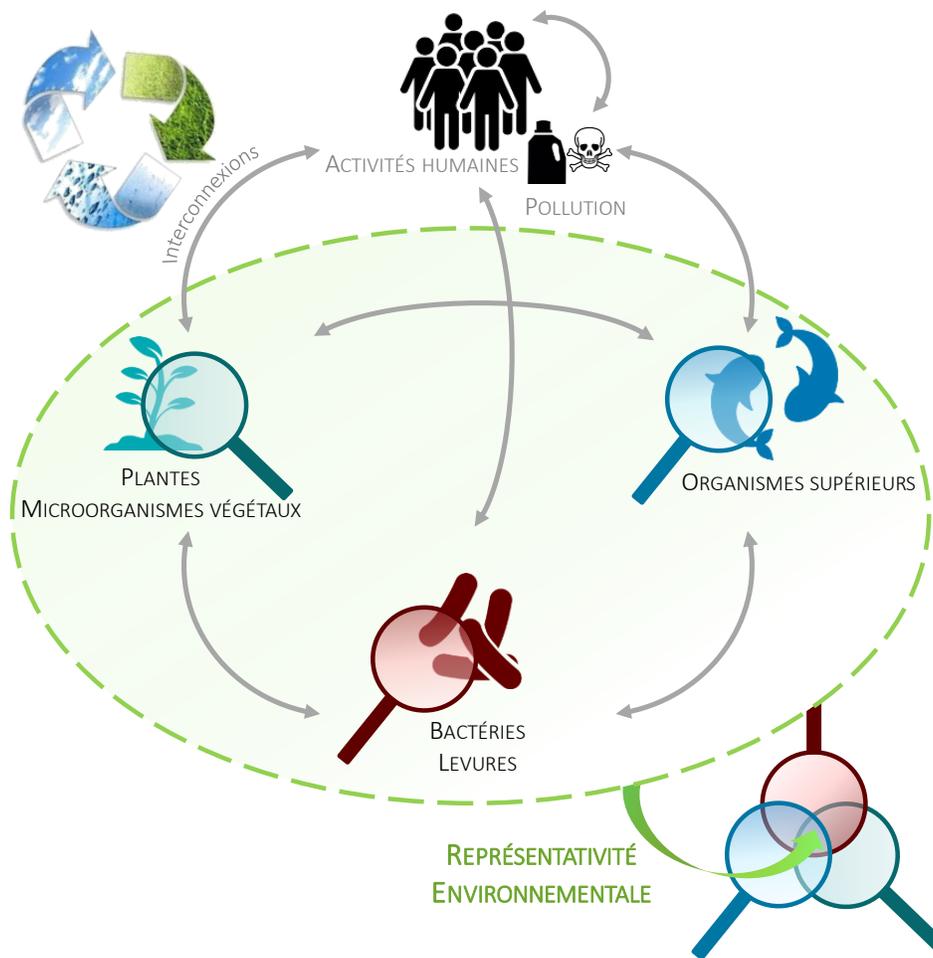


Figure 14 – Amélioration de la représentativité environnementale par la multiplication des bioreporters. Figure : M. Bittel.

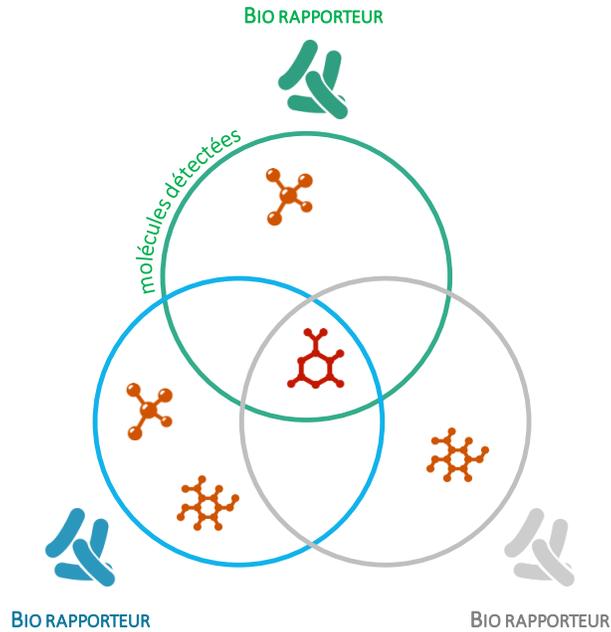
Une étude réalisée en 2013 compare les résultats obtenus à partir d'un panel de 103 bio-essais basés sur différents types de bio-reporters (cellules mammifères, bactéries, levures, embryons de poissons, algues) ciblant différents mécanismes de toxicité (réaction aux xénobiotiques, inhibition de la photosynthèse,

perturbations endocriniennes, génotoxicité...). A partir de chacun d'entre eux, la toxicité de 10 échantillons environnementaux (effluents de stations d'épurations (STEP), eau potable, pluviale, de rivière...) est analysée. Par exemple, il est intéressant de noter que quasiment aucune toxicité n'est constatée pour la majorité des tests réalisés sur l'eau potable. Lorsqu'un effet négatif est mesuré ce n'est que lorsque les essais sont réalisés sur un échantillon étant de 3 à 30 fois concentré. L'eau potable semble donc (et heureusement !) inoffensive en terme de cytotoxicité, écotoxicité, perturbation endocrinienne ou d'effet sur la reproduction et le développement. Et pourtant, bien que cela ne soit pas forcément signe de toxicité, les mesures d'induction des voies métaboliques des xénobiotiques<sup>a</sup> ressortent comme largement positives. Mais surtout, trois des essais d'induction des voies de réponse au stress montrent des effets négatifs, et ce même lorsque l'échantillon est 1 à 3 fois dilué. Les résultats montrent ainsi qu'une analyse complète de la toxicité ne peut être réalisée sans un panel de tests permettant d'en recouper les faisceaux d'observation. Seule l'analyse de résultats obtenus à partir de plusieurs bio-reporters permet un screening représentatif de la variété des substances présentes dans l'environnement et de la diversité des impacts toxiques qu'elles peuvent engendrer. Les analyses sont ainsi plus sensibles, spécifiques et représentatives de la réalité environnementale (Figure 14)<sup>59</sup>.

La même stratégie est appliquée avec des objectifs de détection ciblée. Un bon exemple en est donné avec l'utilisation combinée de plusieurs souches bactériennes génétiquement modifiées pour la détection spécifiques de composés métalliques. Comme abordé précédemment, une limite majeure de l'approche monoparamétrique vient du fait que ce type de microorganismes tend à réagir de manière identique à la présence de composés différents. Il en résulte un manque de spécificité de la mesure. L'approche multicellulaire propose au contraire d'utiliser plusieurs souches simultanément au sein du même biocapteur. Ainsi, la spécificité de détection vient de la combinaison des réponses du groupe de bioéléments utilisés et non plus d'un seul (Figure 15). Des travaux ont ainsi montré que le croisement des réponses obtenues à partir de plusieurs bactéries bioluminescentes permet de sensiblement améliorer l'identification et la quantification de métaux lourds présents dans des échantillons environnementaux<sup>47,60</sup>. Jouanneau *et al.* décrivent ainsi l'élaboration d'un biocapteur permettant la multi-détection de cadmium, d'arsenic, de mercure et de cuivre grâce à l'immobilisation de cinq souches bioluminescentes préalablement lyophilisées au sein d'une microplaque<sup>61</sup>.

---

<sup>a</sup> L'appellation xénobiotique regroupe de manière générale l'ensemble des substances retrouvées au sein d'un organisme vivant mais qui lui sont étrangères. Les pesticides en sont un exemple classique.



**Figure 15 – Amélioration de la spécificité grâce à l'approche multicellulaire. Figure : M. Bittel.**

De manière plus générale, l'équipe de Ben-Israel *et al.*<sup>52</sup> a aussi obtenu de bon résultats sur une sélection de 25 substances polluantes. Parmi elles, l'utilisation simultanée de 7 souches bactériennes luminescentes a permis d'en distinguer 23 de manière spécifique. Pour se faire, chacune des souches bio-reportrices utilisée est construite de manière à générer un signal suite à l'activation de promoteurs induits pas des stress différents. Les combinaisons de signaux obtenus sur l'ensemble des souches sont ensuite analysées grâce à un algorithme de comparaison des réponses. Chacune des substances est alors identifiée grâce à son profil de toxicité. On note qu'au-delà des substances en elles-mêmes se sont leur « signatures d'effets » qui sont mises en évidence et la majorité des erreurs d'identification concerne des substances présentant des similarités chimiques ou de mécanisme d'action (ex. :  $Zn^{2+}$  confondu avec le  $Cd^{2+}$  ou le SDS avec le CTAB<sup>a</sup>). Aussi, la détection spécifique reste ardue et la constitution de bases de données importantes est nécessaire à l'élaboration de modèles de prédiction fiables. Cette approche reste cependant particulièrement intéressante dans l'objectif nécessaire d'un screening large des phénomènes toxiques et d'une meilleure compréhension de leurs mécanismes d'action. La même stratégie est d'ailleurs aussi appliquée avec succès par Elad *et al.*<sup>54</sup>. Encore une fois, le traitement des résultats par un algorithme de classification permet une identification efficace des substances et

<sup>a</sup> Le SDS (Sodium dodécyl sulfate) et le CTAB (Cetyltriméthylammonium bromide) sont tous deux des agents surfactants utilisés notamment dans les produits cosmétiques.

l'automatisation du processus. On note cependant ici aussi que la reconnaissance spécifique est restreinte aux molécules intégrées à la base de données.

**Tableau 7 – Organismes et entreprises françaises spécialisées dans la réalisation de bio-essais.**

Nom	Types d'essais	Cibles
	Panels de bio-essais en laboratoire sur différents modèles cellulaires pour un screening d'effets toxiques variés (toxicité générale, perturbations endocriniennes, génotoxicité, stress cellulaire)	Gouvernement, collectivités, industriels, professionnels de l'eau.
	Organisme model : <i>Gammarus fossarum</i> . Macro-invertébrés permettant des analyses in vitro ou encagés dans un dispositif d'analyses in situ.  Analyse de toxicité générale ou spécifique (Insecticides, perturbation endocriniennes...).	Gouvernement, collectivités, industriels, professionnels de l'eau.
	Biocapteur en ligne pour la mesure de la toxicité globale et l'estimation de la DBO5 (a). Analyses en environnements naturels, urbains et industriels.	Gouvernement, collectivités, industriels, professionnels de l'eau.
	Réalisation de bio-essais pour l'évaluation de toxicités diverse (cytotoxicité, mutagénicité, perturbations endocriniennes)	Industries pharmaceutiques, cosmétiques, chimiques et pétrochimiques : Evaluation de la toxicité de molécules chimiques au cours de démarches de R&D. Certification dans le cadre de la réglementation REACH.  Environnement et Santé : évaluation de la qualité de matrices environnementales.
	Organismes modèles : Larves d'amphibiens et de poissons porteurs de marqueurs génétiques fluorescents pour la mise en évidence de perturbations endocriniennes.  Analyses in vitro en laboratoire et outil de mesure en ligne.	Gouvernement, collectivités, industriels, professionnels de l'eau pour l'identification et la caractérisation de substances et la surveillance de la qualité de matrices environnementales.
	Bio-essais en laboratoire, in situ et à grande échelle (Rivières artificielles).	Gouvernement, collectivités, industriels, professionnels de l'eau.  Certification dans le cadre de la réglementation REACH.

(a) DBO - Demande Biologique en Oxygène. Quantité d'oxygène nécessaire aux microorganismes pour oxyder les matières organiques présentes dans le milieu. Elle permet d'évaluer la fraction biodégradable d'une substance. Généralement calculée au bout de 5 jours, on parle alors de DBO5.

Le couplage des réponses de plusieurs bioéléments permet ainsi d'exploiter simultanément les performances et sensibilités de chacun. L'information récoltée est enrichie vers des analyses plus représentatives de la réalité environnementale, plus sensibles et plus spécifiques. En multipliant le nombre de bio-reporters, l'approche multicellulaire apporte alors une deuxième dimension d'analyse complétant la première. Pourtant, la mise en œuvre de telles approches dans le cadre de tests environnementaux est encore anecdotique. Elles nécessitent le recours à des batteries de tests impliquant un savoir-faire et des infrastructures que seuls de rares laboratoires ou entreprises spécialisés sont en

mesure de proposer (Tableau 7). De plus la reconnaissance spécifique reste restreinte aux molécules préalablement intégrées aux bases de données. Toujours plus lourdes et complexes, celles-ci rendent cruciales le recours à des outils statistiques et à des algorithmes de comparaison des réponses dont le développement est un des enjeux majeurs de la discipline.

### 2.2.2. RELEVER LES EMPREINTES : L'APPROCHE MULTIPARAMETRIQUES

Avec l'approche multicellulaire décrite dans le paragraphe précédent, une information plus riche est obtenue en multipliant les bioéléments mis en œuvre. Pour chacun d'eux la mesure reste cependant monoparamétrique. Couvrir l'ensemble des événements métaboliques pouvant être causés par un phénomène toxique nécessite l'implication d'autant de bioéléments et suppose le cas échéant la multiplication de manipulations génétiques complexes. De très bons résultats ont été obtenus par l'équipe d'Elad *et al.*<sup>63</sup> qui ont entrepris d'utiliser une banque de souches fluorescentes représentative de l'ensemble du génome de la bactérie *Escherichia coli* (banque initialement élaborée par Zaslaver *et al.*<sup>64</sup>). En d'autres termes la fluorescence de chacune des souches illustre l'expression d'un gène différent. En fonction des gènes exprimés, le croisement des signaux obtenus suite à la mise en contact de l'ensemble de la banque avec un échantillon toxique permet d'obtenir une véritable « empreinte » représentative des différents aspects du métabolisme impactés (ex.: respiration cellulaire, activation des mécanismes de réparation de l'ADN, transport du fer...). Les différentes classes de substances (agents génotoxiques, détergents, métaux, alcools, BTEX<sup>a</sup>) sont identifiées en fonction de leurs mécanismes de toxicité. Cette stratégie améliore sensiblement la représentativité des tests de toxicité en permettant une vue d'ensemble des événements physiologiques causés par l'élément nocif. Contrairement aux mesures monoparamétriques habituelles la mesure n'est pas limitée par la construction initiale d'un bio-reporter spécifique unique. Cependant ces résultats impressionnants ne nécessitent pas moins que l'implication de 2000 souches génétiquement modifiées. Leur utilisation pour des opérations de routine ou leur intégration au sein d'un biocapteur est inenvisageable.

Pour contourner ces difficultés une deuxième approche tend non plus à multiplier les bioéléments mais à augmenter le nombre de paramètres observés au sein de chacun d'eux. On passe alors d'une méthode de mesure monoparamétrique à une analyse multiparamétrique. Dans cette optique la première stratégie

---

<sup>a</sup> BTEX : Abréviation pour les groupes de composés organiques monoaromatiques benzènes, toluènes, éthylbenzènes et xylènes.

élaborée consiste à concevoir un bioélément en mesure d'émettre plusieurs signaux en fonction de la substance présente dans l'échantillon<sup>65-67</sup>. Le principe repose sur l'insertion de gènes rapporteurs contrôlés par des promoteurs différents au sein de la même souche. Ainsi, même si chaque promoteur manque de spécificité et peut être induit par la présence de plusieurs composés (Cf. Tableau 5) la combinaison des signaux représente quant à elle une empreinte propre à la substance détectée. Cette stratégie reste cependant techniquement compliquée à mettre en œuvre, nécessitant ici encore la réalisation de constructions génétiques difficiles à maintenir dans la cellule. De plus, le nombre de signaux émis est limité puisqu'il est impossible de construire une souche capable d'offrir une variété de réponses aussi complète que celles obtenues grâce à la banque décrite précédemment.

Dans ce contexte, les nouvelles technologies souvent regroupées sous l'appellation « -omiques » révolutionnent le domaine des bio-essais. Elles regroupent la transcriptomique (analyse globale de l'expression des gènes à travers l'ARNm), la protéomique (mise en évidence fonctionnelle de l'expression des gènes par l'analyse des protéines et peptides produits), la métabolomique (analyse des voies métaboliques et notamment enzymatiques en réponse à un xénobiotique) et la génomique (analyse de l'ADN en général)<sup>26</sup>. La richesse de l'information ainsi obtenues est cette fois-ci telle que l'analyse en est inenvisageable sans le recours à de puissants outils de bio-informatiques et nécessite la mise en place d'importantes bases de données. Toutes visent à permettre une analyse globale des événements métaboliques et elles représentent un potentiel inestimable de mise en évidence et de compréhension des phénomènes causés par l'exposition à un élément toxique. Elles apportent ainsi une troisième dimension d'analyse complétant les informations de toxicités cloisonnées apportées par les biocapteurs monoparamétriques (première dimension) et la diversité de réponse offerte par l'approche multicellulaire (deuxième dimension)(Figure 16). Cependant si ces méthodes sont particulièrement adaptées à la recherche médicale, la diversité des matrices complique sensiblement leur utilisation et l'élaboration de protocole pour l'analyse d'échantillons environnementaux. De plus, leur technicité les rend à la fois coûteuses et inapplicables par un personnel non qualifié ce qui les restreint à une utilisation au sein de laboratoires spécialisés sans évolution possible vers la conception de réels biocapteurs.

Pourtant de nouvelles perspectives sont ouvertes par une méthode d'analyse dont l'utilisation émerge en biologie : la spectroscopie Raman. Obtenus de manière rapide sur des échantillons cellulaires bruts (aucune préparation spécifique n'est nécessaire) les spectres Raman sont de véritables empreintes moléculaires. Ils permettent un aperçu global de l'état physiologique des microorganismes observés. Le travail réalisé au cours de cette thèse s'est ainsi attaché à étudier le potentiel encore inexploité de cette

technique pour la mise en évidence et la caractérisation d'effets toxiques dans le cadre de bio-essais et, à long terme, vers l'élaboration d'un biocapteur automatisé. La spectroscopie Raman représente ainsi une méthode novatrice d'analyse cellulaire multiparamétrique dont une utilisation étendue à l'observation simultanée de plusieurs modèles cellulaires peut être envisagée. En permettant une observation à la fois multiparamétrique et multicellulaire cette approche laisse présupposer une richesse d'information représentative de la variété des impacts physiologique au sein des cellules mais aussi de la diversité de sensibilité de différentes espèces biologiques. La prochaine partie de ce rapport en abordera de manière approfondie les spécificités.

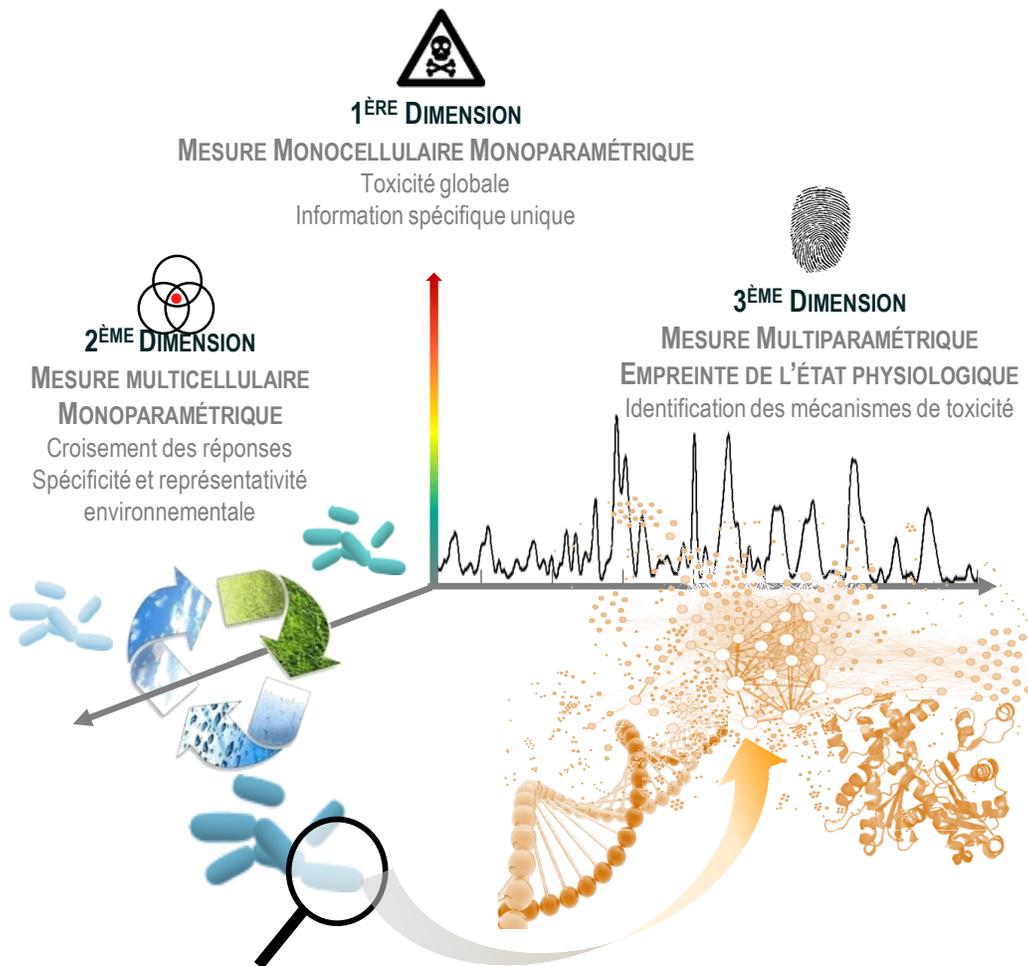


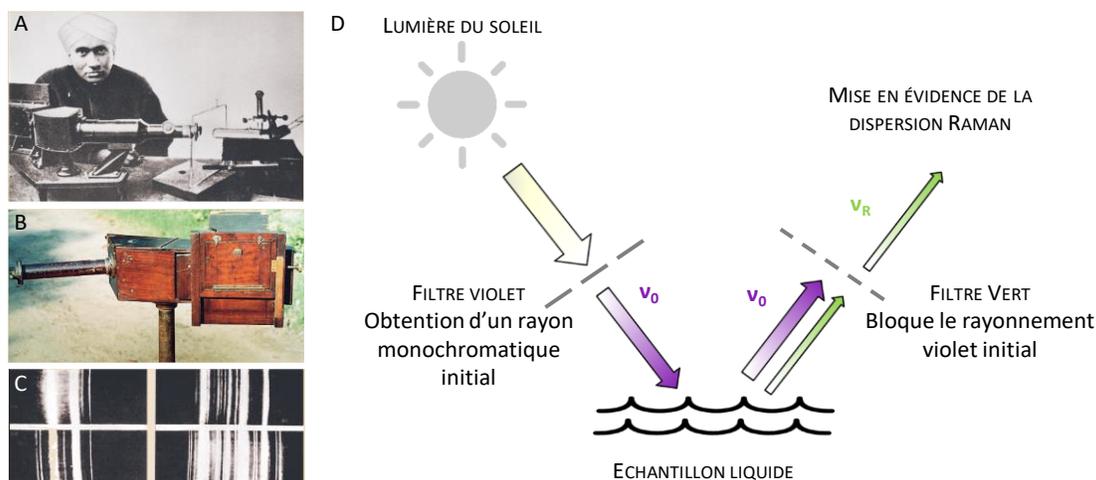
Figure 16 – Mesure de la toxicité en trois dimensions.

Complémentarité des méthodes monocellulaires monoparamétriques (Une seule information par bio-reporter – Cf. paragraphe 2.1) multicellulaires monoparamétriques (croisement des réponses de plusieurs bio-reporters – Cf. Paragraphe 2.2.1) et multiparamétriques (multiplication de l'information récoltée grâce au même bio-reporter – Cf. Paragraphe 2.2.2 et spectroscopie Raman : Paragraphe 3.3). Figure : M. Bittel.

### 3. LA SPECTROSCOPIE RAMAN

#### 3.1. BREF HISTORIQUE

Le principe de dispersion inélastique de la lumière à la base de la spectroscopie Raman est pour la première fois supposé par l'autrichien Adolf Smekal en 1923. Mais ce n'est qu'en 1928 que la preuve expérimentale en est réalisée, notamment par le physicien indien Chandrashekara Venkata Raman qui donne du même coup son nom à la technique<sup>68</sup>. En couplant un rayon de lumière monochromatique à un filtre capable d'en bloquer la longueur d'onde, il démontre qu'après être entré en contact avec un échantillon, une faible portion de lumière change de fréquence et passe ainsi à travers le filtre (Figure 17).



**Figure 17 – A) C.V. Raman – B) Premier spectrographe à quartz – C) Photographie des premiers spectres Raman obtenus en 1928 – D) Schématisation du dispositif expérimental ayant permis la mise en évidence du phénomène Raman. (Illustrations issues du livre « The Raman Effect »<sup>69</sup>). Figure : M. Bittel.**

Les premières bases de données de fréquences moléculaires obtenues par spectroscopie Raman sont élaborées dans les années qui suivent. Cependant la technique souffre de son manque de sensibilité et des lourdes conditions expérimentales nécessaires à l'obtention d'un signal suffisamment intense pour être mesuré. Aussi la spectroscopie infrarouge, plus facile à mettre en œuvre, prend le pas sur la spectroscopie Raman avec l'apparition dans les années 40 des premiers dispositifs commercialisables. Néanmoins, les avancées réalisées plus tard dans le domaine des lasers apportent à la spectroscopie Raman une source lumineuse monochromatique intense qui permet d'augmenter la puissance du signal. Parallèlement, l'utilisation de dispositifs à transfert de charges (CCD) pour la mesure des photons en améliore la sensibilité. La technologie Raman revient ainsi sur le devant de la scène des techniques analytiques non destructives<sup>70</sup>. En utilisant des longueurs d'ondes excitatrices de l'ordre du proche

infrarouge (630-1060 nm) ou des UVs (200-260 nm) la spectroscopie Raman présente l'avantage de n'être que peu impactée par les phénomènes de fluorescence dus à l'eau. Au contraire de la spectroscopie infrarouge, les analyses sans préparation particulière des échantillons (pastillage, fabrication de films minces) sont alors rendues possibles, aspect particulièrement intéressant dans le cadre de l'observation de matériel biologique notamment. Les échantillons liquides ou gazeux peuvent aussi être analysés directement. Aujourd'hui, les spectromètres de laboratoire permettent de multiplier les longueurs d'ondes excitatrices tout en offrant une importante sensibilité de mesure avec une résolution de l'ordre du  $\mu\text{m}$ . L'utilisation de fibres optiques permet de plus l'analyse d'échantillons à distance dans le cadre de suivi de procédés industriels par exemple (Tableau 8). Mais surtout, l'arrivée de la micro-spectroscopie Raman qui combine la technologie Raman à l'utilisation d'un microscope optique rend possible l'acquisition de signaux à partir d'échantillons de très petit volume, et ouvre ainsi la porte à des analyses à l'échelle de la cellule <sup>71</sup>. Enfin, les importants progrès réalisés au cours des dernières années ont aboutis à l'apparition de dispositifs portables qui ouvrent la porte à une utilisation simplifiée de la technique et à sa démocratisation du laboratoire vers les analyses de terrain.

**Tableau 8 – Quelques exemples d'utilisation de la spectroscopie Raman au cours du suivi de procédés industriels<sup>72</sup>.**

Domaine	Exemples d'application
Industrie pétrolière	Analyse quantitative, en ligne, à distance par fibres optiques, de mélange d'hydrocarbures pour la conduite d'unités de séparation.
Industrie agroalimentaire	Suivi à distance par fibres optiques, en temps réel, de réaction de fermentation pour la conduite de fermenteurs.
Industrie pharmaceutique	Analyse en ligne, à distance par fibres optiques, de principes actifs dans des pastilles et comprimés (contrôle-qualité).
Pigments pour peinture	Analyse de la quantité de rutile (a). L'obtention du pourcentage de rutile par traitement informatique des spectres d'échantillons prélevés dans le four permet l'optimisation de leur conduite.
Electronique	Contrôle en ligne de la qualité de dépôts de matières (ex : Carbone).

(a) Le rutile est un pigment opacifiant utilisé dans toutes sortes de substances et notamment les peintures.

### 3.2. PRINCIPE

Comme la spectroscopie infrarouge, la spectroscopie Raman correspond à l'analyse de l'état vibrationnel des molécules constitutives des échantillons observés. Lorsqu'une molécule est irradiée par une lumière monochromatique (émise par un laser dans le cadre de la spectroscopie Raman) plusieurs phénomènes résultent de l'énergie qui lui est ainsi transmise (Figure 18)<sup>73</sup>.

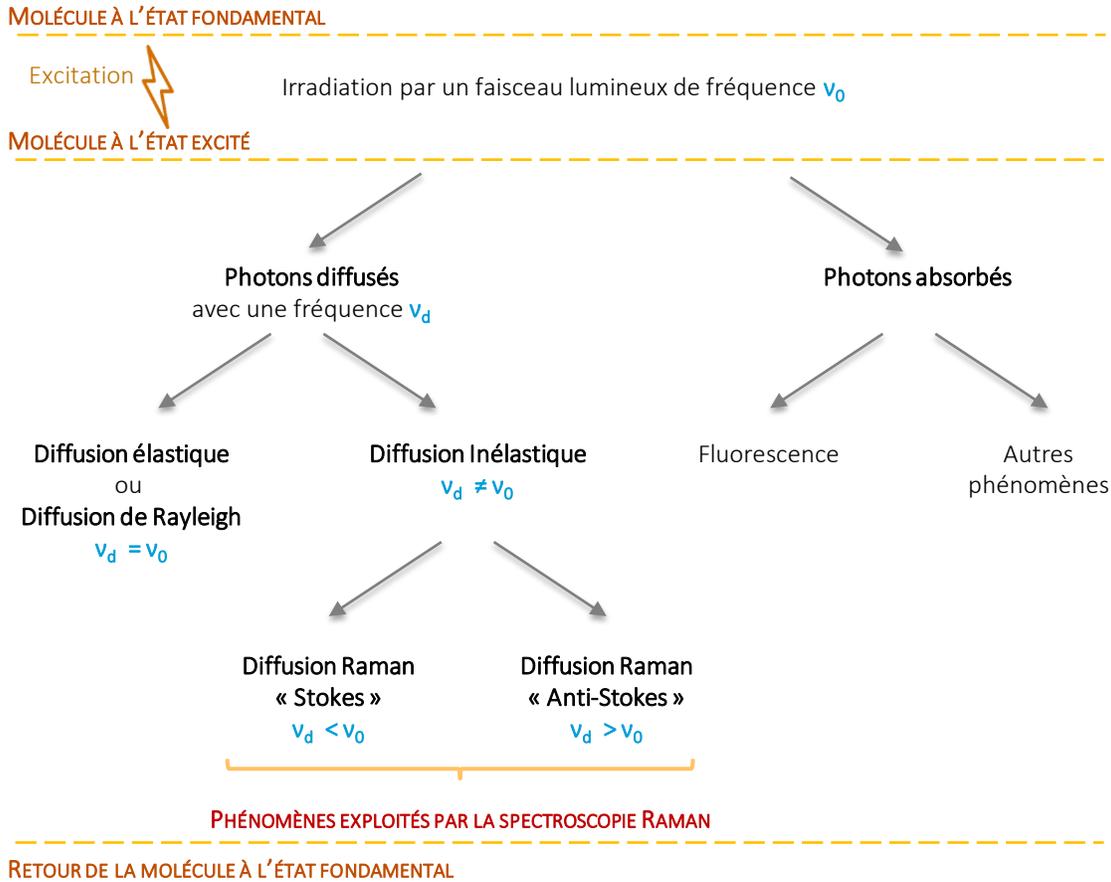


Figure 18 – Schématisation des phénomènes résultants de l’irradiation d’une molécule par un faisceau lumineux. Figure : M. Bittel.

Si l’énergie fournie est suffisante, elle est absorbée par la molécule qui passe à l’état excité supérieur. Lorsque par la suite elle retourne à son état fondamental, l’énergie qu’elle libère se traduit par un phénomène de fluorescence. Lorsque l’énergie fournie n’est pas suffisante pour faire passer la molécule à l’état excité supérieur, une partie des photons constitutifs de la lumière est dispersée. Si l’échange net d’énergie qui en résulte est égal à zéro, la molécule se retrouve dans le même état vibrationnel que son état initial. Les radiations rediffusées ont alors la même fréquence que celle du rayon excitateur ( $\nu_d = \nu_0$ ) et sont dites élastiques. On parle de diffusion de Rayleigh. Au contraire, lorsque l’échange d’énergie n’est pas nul la molécule passe dans un état énergétique vibrationnel inférieur ou supérieur à celui de départ. Les radiations qui en résultent, dites inélastiques, ont une longueur d’onde différente de celle du rayon incident et sont à la base du phénomène Raman. Quand la molécule passe à un état énergétique inférieur on parle de diffusion Raman « Anti-Stokes » et  $\nu_d < \nu_0$ . Inversement, si elle passe à un état énergétique supérieur, on parle de diffusion Raman « Stokes » et  $\nu_d > \nu_0$ .

Tout l'intérêt de la spectroscopie Raman vient de ces différences de fréquences entre le rayon incident et les rayons dispersés. En effets, les photons diffusés sont les témoins de l'état vibrationnel des molécules et chaque liaison chimique provoque la réémission de photons à une fréquence particulière. Ainsi, le spectre Raman obtenu pour une molécule donnée en est une véritable « empreinte digitale », intrinsèquement liée à sa structure. L'analyse globale d'un échantillon permet alors de caractériser sa composition moléculaire par l'identification des groupements chimiques qui le constituent.

### 3.3. DU SPECTRE RAMAN AU BIOCAPTEUR MULTIPARAMETRIQUE

#### 3.3.1. BANDES CARACTERISTIQUES DES ECHANTILLONS BIOLOGIQUES

Initialement majoritairement utilisées dans les domaines de la chimie et de la physique, ce n'est qu'au court des 20 dernières années que la spectroscopie Raman étend ses applications à l'étude de systèmes biologiques. Présentant en particulier l'avantage de permettre une analyse rapide et non destructive de petites quantités d'échantillon, c'est en médecine que la technique est d'abord sollicitée pour son potentiel d'analyse *in vivo*. En se basant sur l'hypothèse que l'évolution d'une maladie provoque inévitablement des variations chimiques au sein des organismes ou des tissus, une technique d'analyse spécifique de la composition moléculaire des échantillons telle que la spectroscopie Raman se positionne naturellement comme une alternative complémentaire de choix pour les techniques classiques de biopsie ou d'histopathologie<sup>74</sup>. De bons résultats sont notamment obtenus pour l'identification *in vivo* de cellules cancéreuses<sup>75,76</sup>. Appliquée à l'observation des microorganismes, cette technique ouvre la perspectives d'applications dans le domaine médical mais aussi de l'industrie agroalimentaire où la détection de contaminations par des organismes pathogènes se révèle être un enjeu majeur<sup>77,78</sup>.

C'est ainsi que sont identifiées les bandes Raman caractéristiques des macromolécules biologiques présentes notamment au sein des spectres bactériens<sup>79-81</sup>. Elles renseignent sur la structure secondaire des macromolécules ainsi que sur leur conformation<sup>82</sup>. A titre d'exemple, la Figure 19 représente les spectres caractéristiques de la bactérie *E. coli*, de la levure *S. cerevisiae* et de l'algue *C. reinhardtii*. Issues des vibrations des chaînes moléculaires aussi bien principales que latérales les bandes Raman les plus représentatives se situent dans une fenêtre d'analyse comprise entre 200 et 1800  $\text{cm}^{-1}$ . Certaines zones spectrales sont ainsi associées par exemple à des molécules telles que les carbohydrates, notamment de par les contributions de liaisons glycosidiques issues de cycles ou de chaînes carbonées. Ces molécules étant majoritairement retrouvées associées à des phospholipides pour constituer le peptidoglycane, les bandes Raman correspondantes (notamment entre 200 et 550  $\text{cm}^{-1}$ ) sont souvent considérées comme

caractéristiques des membranes bactériennes. Certaines bandes relatives aux molécules d'ADN et d'ARN sont aussi bien identifiées grâce à des bandes intenses entre 600 et 800  $\text{cm}^{-1}$  attribuées aux déformations des cycles des bases azotées d'une part, mais aussi aux liaisons O-P-O qui en constituent la structure. De même, des vibrations symétriques des liaisons  $\nu(\text{PO}_2^-)$  donnent lieu à 1100  $\text{cm}^{-1}$  à une bande elle aussi associée aux acides nucléiques.

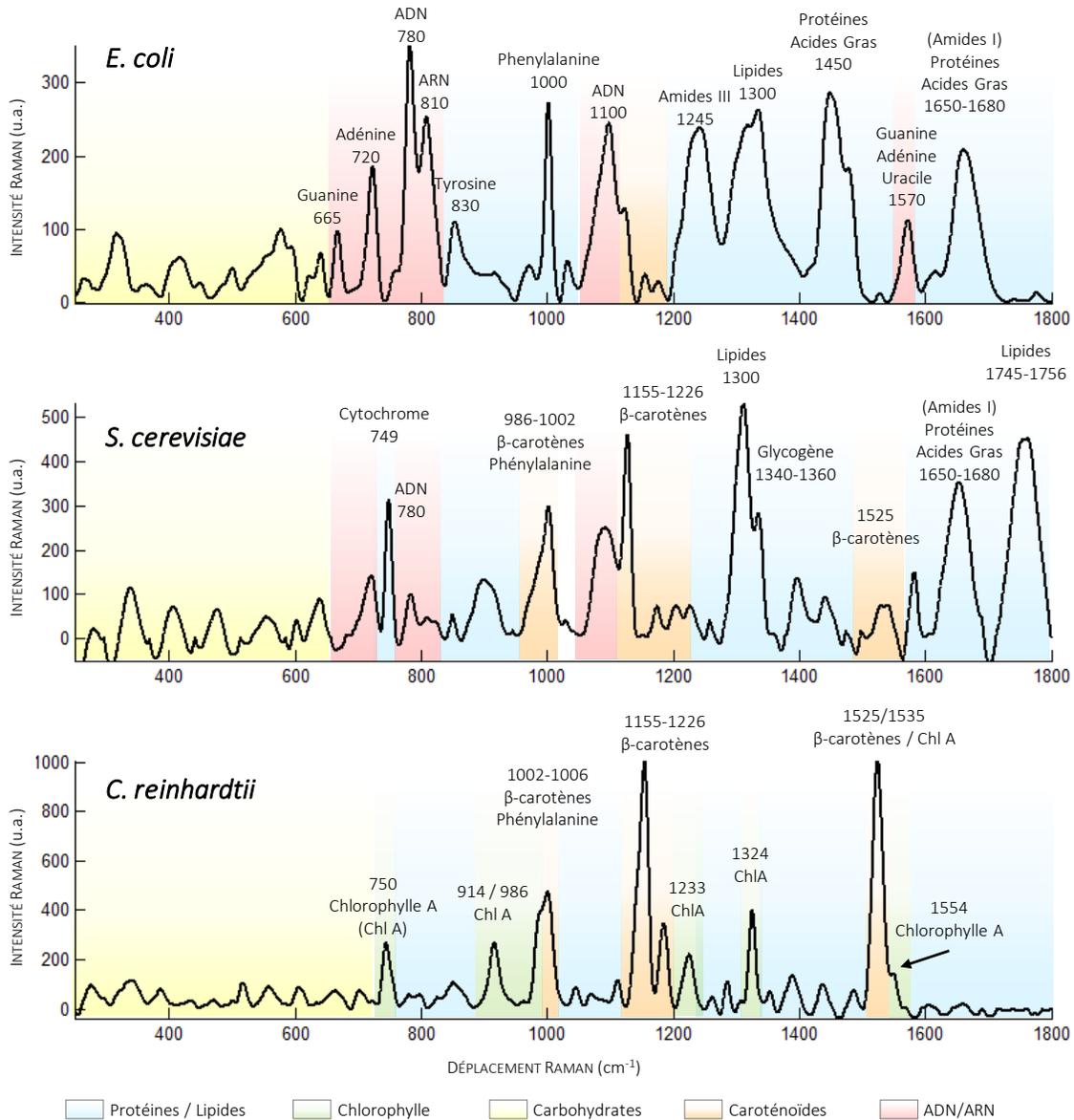


Figure 19 – Spectres Raman caractéristiques de la bactérie *E. coli*, de la levure *S. cerevisiae* et de l'algue *C. reinhardtii*. Les principales bandes remarquables sont associées par raccourci aux macromolécules auxquelles elles peuvent être associées. Une analyse plus fine en termes de liaisons chimiques est possible à l'aide du Tableau 9. (Source laboratoire GEPEA-CBAC). Figure : M. Bittel.

D'autres zones du spectre témoignent de la présence de protéines et de lipides en général notamment grâce aux contributions caractéristiques des liaisons chimiques retrouvées chez les acides aminés. On note par exemple la bande à  $1004\text{ cm}^{-1}$  très intense dans le spectre de la phénylalanine, ou celle autour de  $830\text{ cm}^{-1}$  caractéristique de la tyrosine majoritairement dues à la présence de structures benzéniques. Encore à titre d'exemple, les contributions des différentes familles d'amides donnent aussi lieu à des bandes particulières (Amides III  $\approx 1300\text{ cm}^{-1}$  – Amides I  $\approx 1650\text{ cm}^{-1}$ ). Celles-ci sont particulièrement intéressantes de par les renseignements qu'elles fournissent sur la conformation des chaînes polypeptidiques et lipidiques. Chez les algues et les levures on retrouve aussi de manière marquée la présence de caroténoïdes notamment autour de bandes intenses situées à  $986\text{-}1002\text{ cm}^{-1}$ ,  $1155\text{-}1226\text{ cm}^{-1}$  et  $1525\text{ cm}^{-1}$ . Enfin, la chlorophylle est bien visible sur les spectres végétaux à  $746$ ,  $914$  et  $1234\text{ cm}^{-1}$ .

On rappelle enfin que les spectres Raman sont avant tout le reflet des vibrations des fonctions chimiques présentes dans les molécules constitutives des échantillons observés. Certaines bandes sont ainsi attribuées à un type de liaison sans pour autant être associées à des macromolécules spécifiques. A l'inverse, dans le cas de l'observation d'échantillons complexes tels que des microorganismes, les spectres sont la résultante de l'ensemble des contributions des molécules qui les composent. Aussi certaines bandes Raman résultent de la somme des contributions de fonctions chimiques associable à différentes molécules. Ces bases étant posées, il est possible afin d'alléger la lecture que dans la suite de ce document des raccourcis soient utilisés associant directement une bande à une molécule ou famille de molécules dont elle est caractéristique sans se référer de manière systématique aux liaisons chimiques correspondantes. Pour plus de précision le lecteur pourra à tout moment se référer au Tableau 9 qui dresse une liste des principales bandes caractéristiques des spectres biologiques associées, autant que possible, aux structures chimiques dont elles résultent.

**Tableau 9- Synthèses non exhaustive des principales bandes Raman observées lors de l'analyse d'échantillons biologiques et tentatives d'attributions** <sup>71,79,81,83-88</sup>.

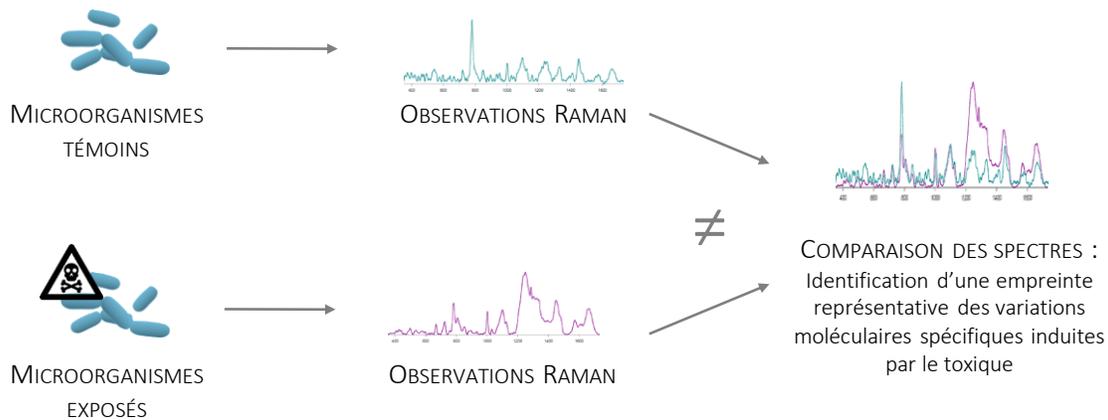
CM <sup>-1</sup>		ASSIGNEMENT
392-416	Glycérol	
407	Carbohydrates (Glucose)	(Chaines carbonées glycosidiques)
481	Carbohydrates (Amidon)	(Chaines carbonées polysaccharidiques)
540 - 570	Carbohydrates	(Liaisons C-O-C des cycles glycosidiques)
620 - 622	Phénylalanine	(Chaines linéaires)
640 - 644	Tyrosine	(Chaines linéaires)
650 - 668	ADN (Guanine)	(Cycles)
725	ADN (Adénine)	(Cycles)
730	polysaccharides	
750	Chlorophylle A	$3^1\delta(\text{HCO})$ , $\delta(\text{N}_{24} - \text{C}_{19} - \text{C}_{20})$ , $\delta(\text{N}_{21} - \text{C}_4 - \text{C}_3)$

780	ADN (Cytosine, Thymine)	(Cycles)
778 - 785	ARN (Cytosine, Uracile)	(Cycles)
810 - 820	ARN	(C-O-P-O-C)
813	ARN / Tyrosine	(Hélice $\alpha$ )
825- 840	Tyrosine « Exposée »	(cycle benzène para substitué)
820 - 850	Glycérol	
914	Chlorophylle A	$\delta(N_{24} - C_{19} - C_{20})$ , $\delta(C_{17} - 1C_{17} - 2C_{173})$
986	Chlorophylle A	$(7^1 + 8^1 + 8^2) CH_3$ bend, $\delta(C_8 - 1C_8 - C_9)$
986-1002	$\beta$ -Carotènes	$\nu(C_{12} - C_{13})$
1004	Phénylalanine	(Cycle benzène)
1030 - 1130	Carbohydrates	(Chaines C-C et liaisons C-O, C-O-H)
1054 - 1157	Acides Nucléiques	(Déformation C-O)
1098	Chaines Carbonées	(Déformations C-O-C des liaisons glycosidiques)
1100	Acides nucléiques	(Déformation des groupes $PO_2^-$ - Chaines C-C et C-O-C)
1131	Carbohydrates	
1130	Lipides (Acides gras insaturés)	(=C-C=)
1155	$\beta$ -Carotènes	(Déformations $\nu(C_{14} - C_{15})$ / C-H $\delta(C_{15} - H)$ )
1233	Chlorophylle A	$(10 + 13^2 + 2)\delta(CH)$ , $\nu_{C_{16} - C_{17}}$ , $\nu_{N_{23} - C_{14}}$
1230 - 1300	Protéines	(Amides III)
1248 - 1296	Lipides (Membranes)	(Déformations $-CH_2$ )
1324	Chlorophylle A	$\nu(C_aN)$ , $\delta(C_mH)$
1340 – 1360	Glycogène	
1358-1423	Tryptophane	(Cycle indole)
1400 - 1450	Protéines	(Déformations $\delta(CH_2)$ et $\delta(CH_3)$ des acides aminés)
1440 - 1460	Acides Gras	(Déformations C-H <sub>2</sub> )
1525	$\beta$ -Carotènes	$\nu(C=C)$
1535	Chlorophylle A	$\nu(C-C)$
1570	Guanine Adénine	(cycles)
1582 - 1583	Protéines	$\nu(C=C)$
1650 - 1680	Protéines	(Amides I)
1656	Phospholipides / Acides gras	$\nu(C=C)_{cis}$
1671	ADN (Thymine)	$\nu(C=O)$
1745 - 1756	Phospholipides / Acides gras	C=O
2935	Lipides	(CH <sub>2</sub> et CH <sub>3</sub> )

### 3.3.2. LECTURE DE L'EMPREINTE MOLECULAIRE : DE L'IDENTIFICATION AU DIAGNOSTIQUE

Les spectres Raman sont donc considérés comme des empreintes moléculaires des échantillons observés. Par la mise en évidence des macromolécules qui les constituent, des études ont montré que la spectroscopie Raman pouvait permettre de détecter la présence de microorganismes et mieux encore, de les identifier. Dans le cas des bactéries par exemple, le spectre global est fortement impacté par la contribution des molécules membranaires<sup>89</sup>. La structure différente des membranes Gram + et Gram - se

retranscrit ainsi directement sur les spectres permettant un premier degré de classification<sup>84,90,91</sup>. De manière plus fine et bien que les différences entre les spectres deviennent alors ténues, la richesse des données permet aussi un classement en fonction des genres mais aussi des espèces<sup>83,92-97</sup>. Les spectres Raman deviennent ainsi de véritables cartes d'identité. Dans un deuxième temps, les recherches se sont portées sur l'étude de la physiologie des microorganismes. Il apparaît que les spectres obtenus au cours de phases croissance différentes présentent des variations de composition moléculaires suffisantes pour être observables sur les spectres<sup>85,98,99</sup>. Ces variations apparaissent de plus être cohérentes avec des mécanismes connus du métabolisme bactérien. On constate par exemple que les bandes associées à l'ADN et à l'ARN ont une intensité maximale au début de la phase exponentielle de croissance quand les cellules sont métaboliquement actives. Elles sont au contraire moins intenses au cours de la phase de déclin<sup>100</sup>.



**Figure 20 – Schéma de principe de l'utilisation de la spectroscopie Raman pour la caractérisation d'un effet toxique. Figure : M. Bittel.**

En conséquence de ces observations la spectroscopie Raman apparaît comme un potentiel outil de diagnostic permettant par une mesure unique un aperçu global en temps réel de l'état physiologique des cellules observées<sup>101</sup>. En comparant les spectres de microorganismes témoins à ceux de microorganismes exposés elle permettrait de mettre en évidence le lien qui existe entre les effets d'un polluant et les variations moléculaires qui en résultent nécessairement (Figure 20). En d'autres termes, l'observation par spectroscopie Raman constitue une approche multiparamétrique novatrice qui dans le cadre d'applications environnementales pourrait offrir une meilleure caractérisation d'éventuels effets toxiques. Elle apporterait ainsi la troisième dimension d'analyse identifiée comme nécessaire dans les paragraphes précédents mais encore inaccessible sans l'utilisation de techniques lourdes et onéreuses. C'est dans la lignée de ces réflexions que s'inscrit le travail réalisé dans le cadre de cette thèse.

### 3.3.3. MISE EN EVIDENCE SPECTRALE DE LA TOXICITE : ETAT DE L'ART

Mettant en œuvre cette approche, certaines équipes se sont déjà attachées à mettre en évidence les effets de l'exposition à différentes substances toxiques. Plutôt qu'appliqués à une approche environnementale, les travaux existants se concentrent quasiment exclusivement sur l'étude des mécanismes d'action de différentes familles d'antibiotique.

Les résultats obtenus sont cependant notables : Une étude réalisée en 2010 par Moritz *et al.* sur *Escherichia coli* exposée à un cocktail d'antibiotique de pénicilline (famille des  $\beta$ -lactamines) et de G-streptomycine (famille des aminosides) montre tout d'abord que les spectres des bactéries exposées sont significativement différents de ceux des bactéries témoins (Figure 21). Trois bandes (729, 1245 et 1660  $\text{cm}^{-1}$ ) apparaissent comme particulièrement impactées par la toxicité. Un test comparatif est alors réalisé avec la céfazoline qui est aussi un antibiotique de la famille des  $\beta$ -lactamines. Les spectres présentent encore une fois des différences significatives notamment au niveau des bandes situées à 729 et 1245  $\text{cm}^{-1}$  déjà mises en évidence au cours des essais d'exposition à la Pénicilline / G-streptomycine. Cependant, aucune variation par rapport au témoin n'est cette fois remarquée pour la bande située à 1660  $\text{cm}^{-1}$ . Les auteurs supposent donc que les variations des bandes situées à 729 et 1245  $\text{cm}^{-1}$  correspondent à une signature commune des effets d'antibiotiques de la famille des  $\beta$ -lactamines alors que les variations de la bande à 1660  $\text{cm}^{-1}$  dont l'intensité augmente avec les concentrations en antibiotique, seraient dues à l'action spécifique de l'aminoside. Cette bande Raman peut en effet être attribuée à la contribution de ribosomes et cette observation serait alors cohérente avec les effets connus de cette famille d'antibiotique, reportée comme conduisant à l'accumulation de ribosomes 70S dans la cellule. Concernant les bandes à 729 et 1245  $\text{cm}^{-1}$ , leur intensité diminue par rapport au témoin au cours de l'incubation. Les auteurs associent ces variations à des modifications physiologiques au niveau des molécules d'adénines présentes dans les cellules<sup>102,103</sup>.

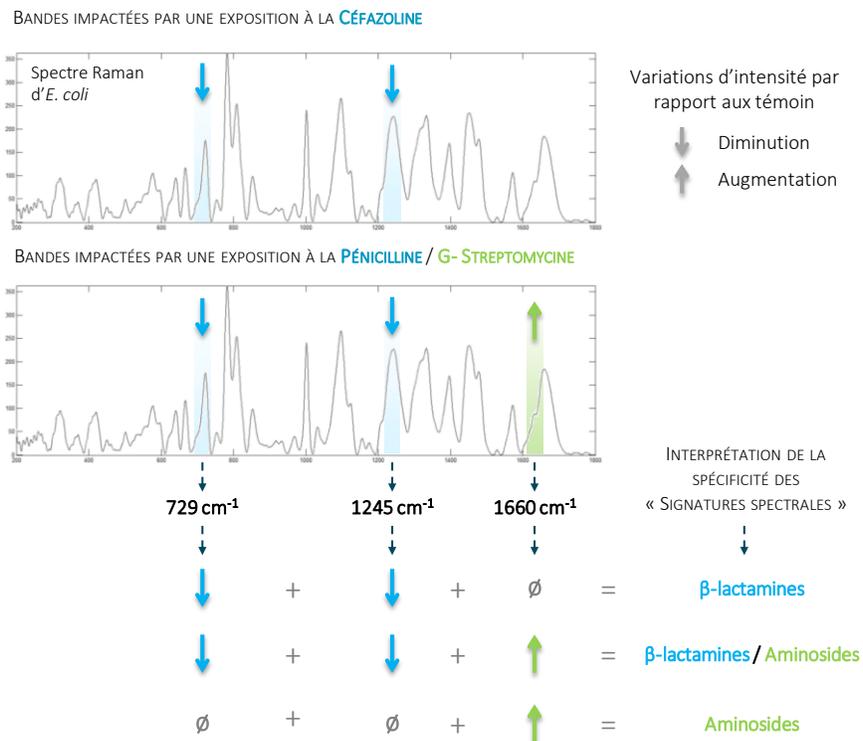


Figure 21 – Illustration des résultats de l'étude de Moritz *et al.* sur l'étude des effets de différents antibiotiques sur la bactérie *E. coli*. En fonction des antibiotiques les bandes Raman impactées par la toxicité varient. Il est alors possible de distinguer la signature spécifique des différents mécanismes de toxicité. (Les spectres Raman utilisés pour l'illustration sont des spectres caractéristiques de la bactérie *E. coli* réalisés au laboratoire CBAC – UMR CNRS GEPEA). Figure : M. Bittel.

Par ailleurs, une autre étude réalisée par López-Dièz *et al.*, cette fois ci sur *Pseudomonas aeruginosa* exposée à l'amikacine (un autre aminoside), reporte aussi des variations spectrales autour de 1600 cm<sup>-1</sup><sup>104</sup>. Ces variations pourraient correspondre à celles observées par Moritz *et al.* Toutefois les nombreux écarts qui existent entre les conditions d'analyses mises en œuvre rend difficile la comparaison stricte de ces résultats<sup>105</sup>. Quoiqu'il en soit, ces deux études montrent d'une part qu'il est possible de distinguer l'impact d'une toxicité via les spectres Raman, d'autre part que les variations spectrales observées apparaissent cohérentes avec certains des évènements physiologiques attendus. Bien que devant être complétés, ces travaux peuvent ainsi être considérés comme les premières tentatives de mise en évidence d'une signature spectrale pour un effet toxique donné et soulignent la pertinence de la spectroscopie Raman pour l'observation simultanée d'effets toxiques sur l'ensemble du métabolisme cellulaire.

Pourtant, ce potentiel est à ce jour quasiment inexploité et moins d'une vingtaine de publications sont recensées sur Web of Sciences lorsque les mots clés Bacter\*/Cell\*/Microorganism\*, Antibiotic\*/Pollutant\*/Toxicity et Raman sont simultanément recherchés dans le titre (Tableau 10). Outre l'observation des mécanismes antibiotiques (poussés par l'intérêt de la recherche médicale) rares sont les

travaux s'intéressants à d'autres types de stress. On note l'étude d'Escoriza *et al.* qui met en évidence sur *E. coli* les effets produits par différents types d'inactivation (chaleur, EDTA, NaOCl, acide nalidixic, vancomycine, famine)<sup>106</sup>. De même, les travaux de Notingher *et al.* qui sont les premiers à clairement envisager le couplage de la spectroscopie Raman à une approche « biocapteur » pour la détection de substances toxiques font figure d'exception (Non recensés dans le tableau car ils s'attachent à l'analyse de cellules humaines plutôt que de microorganismes)<sup>107</sup>. En analysant des spectres réalisés sur des cellules de poumon, ils mettent en évidence des différences significatives suite à l'exposition à la ricine et au gaz moutarde. Leurs observations leur permettent de plus d'identifier des variations qui correspondraient à des mécanismes de lyse cellulaire d'une part et d'apoptose d'autre part. Enfin, une seule étude explore l'utilisation de la spectroscopie Raman pour la détection spécifique des effets de polluants organiques sur des microorganismes bactériens. Les résultats obtenus montrent ici encore des variations caractéristiques d'un déclin cellulaire (baisse de l'activité de synthèse, altération de l'ADN, etc.). Cependant, la spécificité des réponses semble provenir non pas de l'impact de mécanismes de toxicité différents, mais de l'accumulation des substances elles-mêmes au sein des cellules<sup>108</sup>. Cette étude est cependant particulièrement intéressante de par sa démarche cherchant à effectuer une mesure de la biodisponibilité des substances par spectroscopie Raman.

**Tableau 10 - Etudes traitant la mise en évidence d'une toxicité sur des microorganismes par spectroscopie Raman.**

SOURCES	LASER (A)	MICROORGANISME	MOLÉCULES TESTÉES	OUTILS STAT. (B)	PRINCIPAUX RÉSULTATS
Maquelin et al. (2002)	830 nm	<i>Enterococcus faecalis</i>	<b>Antibiotique</b> (Vancomycine)	ACP et CAH	Essais réalisés sur des bactéries résistantes et non résistantes. Des différences n'apparaissent entre les spectres des deux types de microorganismes qu'après exposition à l'antibiotique.
Singer et al. (2004)	532 nm	<i>Burkholderia xenovarans</i> (Dégradeur spécifique biphenyl polychloré)	<b>Polluants chimiques</b> (Phenanthrene, pentachlorophenol, 3-chlorobiphenyl)	ACP	Observations de différences spectrales significatives entre les spectres des bactéries exposées et des bactéries témoins. Ces variations sont cependant imputées à une accumulation des substances au sein des cellules plutôt qu'à leurs effets.
Lopez-Diez et al (2005)	244 nm	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	<b>Antibiotique</b> (Amikacine)	ACP et PLS	Effets observés sur les spectres même en dessous de la CMI <sup>(G)</sup> estimée. Variations imputées à l'inhibition de la synthèse de protéines.
Neugebauer et al. (2007)	244 nm	<i>Bacillus pumilus</i>	<b>Antibiotique</b> (Ciprofloxacine)	CAH	Identification de variations spectrales attribuées à des effets sur l'ADN.
Escoriza et al. (2007)	532 nm	<i>Staphylococcus epidermidis</i> <i>Escherichia coli</i>	<b>Tests d'inactivations chimiques</b> (EDTA, NaOCl, Acide Nalidixique, Vancomycine) <b>et physiques</b> (Chaleur, Famine)	ACP et FDA	Observation de différences significatives entre les spectres témoins et ceux des bactéries inactivées. L'analyse simultanée de l'ensemble du jeu de données montre que la distinction entre les cellules viables et non viables se fait indépendamment de la méthode d'inactivation utilisée.
Moritz et al. (2009 et 2010)	785 nm (Laser Tweezers)	<i>Escherichia coli</i>	<b>Antibiotiques</b> (G-Streptomycine et Céfazoline)	ACP	Mise en évidence d'une signature spectrale estimée comme caractéristique des antibiotiques de type β-lactam.
Liu et al. (2009)	632,8 nm (SERS)	<i>Staphylococcus aureus</i> <i>Enterococcus faecalis</i> <i>Listeria monocytogenes</i> <i>Escherichia coli</i> <i>Serratia marcescens</i> <i>Klbsiella pneumoniae</i>	<b>Antibiotiques</b> (Oxacillin, Ampicilline, Vancomycine, Céfotaxime, Gentamicine, Tetracycline)	N.C.	Observation d'effets significatifs sur les spectres qui seraient caractéristiques de l'exposition au béta-lactamine, notamment du fait de leur impact sur la membrane. Variations différentes pour les bactéries Gram+ et Gram-. Pas de variations observées suite à l'exposition aux antibiotiques agissant sur la synthèse protéique, même après 13h de traitement.

SOURCES	LASER (A)	MICROORGANISME	MOLÉCULES TESTÉES	OUTILS STAT. (B)	PRINCIPAUX RÉSULTATS
Walter et al. (2011)	244 et 532 nm	<i>Escherichia coli</i>	<b>Antibiotique</b> (Ampicilline)	ACP, LDA, SVM	Spectres réalisés sur des bactéries possédant ou non un plasmide de résistance. Des variations significatives sont observées entre les deux types de microorganismes. Celles-ci sont visibles même en l'absence d'antibiotique dans le milieu.
Tian et al. (2012)	785 nm (SERS)	<i>Arthrobacter</i> , <i>Pseudomonas</i> , <i>Sphingomonas</i> , <i>Acinetobacter</i> (Bactéries isolées d'échantillons environnementaux )	Arsenic (V)	N.C	Observation des interactions entre l'arsenic et des bactéries qui y sont résistantes. Spectres réalisés sur les bactéries, mais aussi sur la paroi cellulaire d'une part et les protoplastes d'autre part. Excepté pour <i>Acinetobacter</i> , les résultats montrent que les variations les plus importantes ont lieu au niveau de la paroi.
Athamneh et al. (2013)	532 nm	<i>Escherichia coli</i>	<b>15 Antibiotiques de 4 classes différentes en fonction de leur mode d'action</b> (Inhibition de la synthèse de protéines, de la paroi cellulaire, de l'ADN, de l'ARN).	ACP et AFD	Exposition à 3x la CMI des antibiotiques. Bons résultats de discrimination des spectres en fonction de la classe de l'antibiotique.
Hadjigeorgiou et al. (2013)	N.C. (SERS)	<i>Escherichia coli</i> <i>Proteus spp</i> <i>Klebsiella spp</i>	<b>Antibiotiques</b>	N.C.	81 à 100% de précision de prédiction de la sensibilité des souches aux antibiotiques après 4 heures d'exposition.
Assmann et al. (2015)	532 nm	<i>Enterococcus faecalis</i>	<b>Antibiotique</b> (Vancomycine)	ALD et PLS	Variations spectrales significatives suites à l'exposition à l'antibiotique. Effets cohérents avec les mécanismes d'action connus et amplifiés par une augmentation du temps d'exposition.
liu et al. (2016)	632,8 nm (SERS)	<i>Staphylococcus aureus</i> <i>Escherichia coli</i>	<b>Antibiotiques</b> (Oxacilline et Imipenem)	ACP	Mise en évidence de la sensibilité aux antibiotiques et détermination des CMI. Bonne corrélation avec les techniques classiques.

**(A)** SERS : Surface Enhanced Raman Spectroscopy. Technique consistant à augmenter l'intensité du signal Raman en plaçant l'échantillon sur une surface de métal (souvent des nanoparticules d'argent) – Laser Tweezers : Technique consistant à utiliser les faisceaux laser comme une « pince » permettant de sélectionner qu'une seule cellule lors de l'acquisition des spectres.

**(B)** Les outils statistiques principalement utilisés dans le cadre de la spectroscopie Raman sont des analyses multivariées qui consistent à s'intéresser à la répartition / aux correspondances des spectres les uns par rapport aux autres. Utilisées seules ou de manière combinées on retrouve en particulier : ACP : Analyse en Composante Principale – CAH : Classification Ascendante Hiérarchique – PLS : Partial least Square – AFD : Analyse Factorielle Discriminante – LDA : Analyse Discriminante Linéaire – SVM : Machines à Vecteurs de Support

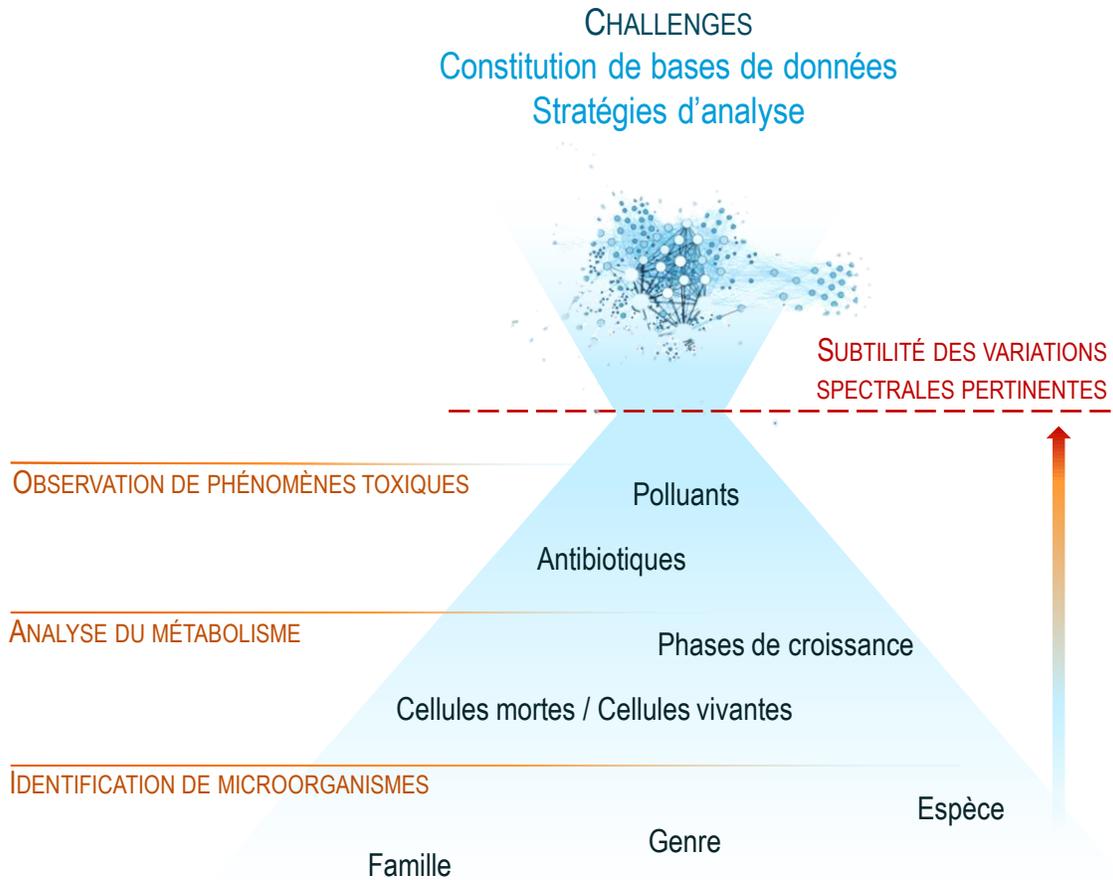
**(C)** CMI : Concentration Minimale Inhibitrice. Plus petite concentration en antibiotique permettant l'arrêt de la croissance cellulaire.

### 3.3.4. VERROU : QUAND L'INFORMATION DEVIENT TROP RICHE

Dans une optique de détection et de caractérisation d'un phénomène toxique, l'enjeu consiste dans un premier temps à être en mesure de faire la différence entre les spectres des microorganismes exposés et ceux des microorganismes témoin. Alors, la richesse et la sensibilité des spectres Raman qui font tout l'intérêt de la technique (plus de 2500 points de données par spectres), deviennent des facteurs qu'il faut parvenir à maîtriser. En effet, l'estimation aussi bien quantitative que qualitative d'éventuels impacts toxiques repose sur l'amplitude des différences spectrales et les variations recherchées sont souvent noyées dans l'ensemble de l'information récoltée. Par conséquent, en vue d'analyses fines, la précision de l'empreinte constituée par chaque spectre est fondamentale. Pourtant, plusieurs facteurs des conditions de cultures aux paramètres d'acquisition, peuvent influencer sur la qualité des spectres<sup>109-111</sup>. C'est pourquoi il est délicat de comparer les résultats obtenus au cours d'études différentes et qu'une optimisation et une standardisation des conditions de cultures et de collecte des spectres sont indispensables<sup>105</sup>. Par ailleurs, lorsque des différences existent entre les spectres leur significativité est quasiment impossible à appréhender par une simple évaluation visuelle ce qui rend indispensable l'utilisation d'outils chimiométriques<sup>74,112</sup>. Encore dans une optique d'optimisation de la qualité des empreintes spectrales, ils permettent tout d'abord de réaliser les étapes essentielles de prétraitement destinées à homogénéiser les données avant l'analyse (Correction de la ligne de base, normalisation...)<sup>113-115</sup>. Ces outils statistiques (tels que l'ACP ou l'ICA qui seront traités plus avant dans la suite de ce document) sont ensuite utilisés dans une tentative de classification des spectres en fonction des différents paramètres expérimentaux testés. Comme évoqués dans les paragraphes précédents, de très bons résultats sont obtenus lorsqu'il s'agit d'identifier les spectres de microorganismes issus de souches bactériennes différentes et ce même lorsque celles-ci appartiennent à des sous-espèces très proches. Toutefois, quand il s'agit de l'analyse de spectres obtenus à partir du même micro-organisme après exposition à des composés toxiques différents, les variations devant être détectées sont plus subtiles et peuvent partiellement ou totalement se confondre, diminuant l'efficacité de la classification résultante (Figure 22).

Par ailleurs, si la bonne classification des spectres est une condition préalable à l'utilisation future de la spectroscopie Raman dans le cadre d'une approche « biocapteur », l'objectif principal est de fournir de nouvelles perspectives complétant les réponses données par les tests toxicologiques monoparamétriques classiques. Il est donc essentiel que l'analyse des spectres permette efficacement d'associer les variations spectrales observées aux événements physiologiques qui se déroulent dans les cellules. Il reste pourtant difficile d'extraire ces « signatures d'effets » du signal global et les méthodes appliquées souvent basées

sur des comparaisons d'écart-types avec les spectres moyens ou médians ne sont pas optimales en regard de la subtilité des variations recherchées<sup>116</sup>. Ainsi, le potentiel de la spectroscopie Raman demeure intrinsèquement lié d'une part à la mise en œuvre de protocoles robuste et à la réalisation de bases de données fiables, et d'autre part à la qualité des traitements de données qui devront être en mesure de prendre en compte la réalité biologique complexe que retranscrit la richesse des spectres Raman.



**Figure 22 - Différents niveaux d'observations des microorganismes par spectroscopie Raman. Dans le cadre d'analyse de toxicité, les variations spectrales pertinentes existent mais doivent être extraites de l'information globale. Les stratégies de traitements de données sont un enjeu majeur. Figure : M. Bittel.**

## 4. CONCLUSION ET PERSPECTIVES

La réalité de la pression imposée par l'Homme sur son environnement et les conséquences autant sanitaires qu'éthiques qu'elle engendre sont aujourd'hui profondément ancrées dans la conscience collective. Les problématiques de pollution sont ainsi devenues un des enjeux majeurs de notre société. Pourtant, bien que les normes environnementales établissent des seuils pour un certain nombre de substances jugées dangereuses, les tests physico-chimiques qui leur servent d'étalon ne peuvent suffire à une surveillance efficace des milliers de composés existants. C'est pourquoi les tests biologiques apportent un éclairage nouveau aux stratégies de contrôle en proposant d'aborder la problématique de la pollution d'abord par le biais de ses effets. Là où les stratégies réglementaires actuelles conduisent à ne « ne trouver que ce que l'on cherche », l'utilisation systématique de bio-essais permettrait d'identifier un phénomène de toxicité même sans connaissance préalable des composés potentiellement présents. Utilisés de manière systématique, ils pourraient servir de système d'alarme complémentaire des méthodes physico-chimiques et permettre d'enclencher des démarches d'investigation pour cette fois « chercher jusqu'à ce que l'on trouve ». De nombreux obstacles se dressent cependant encore devant leur démocratisation et leur intégration aux processus réglementaires. Manquant souvent de sensibilité et de spécificité d'une part, ils restent d'autre part inaccessibles à des opérateurs non spécialisés, rendant impossible leur utilisation sur le terrain. C'est pourquoi le passage du bio-essais au biocapteur (bio-essais associé à un élément de transduction permettant une lecture et une analyse directe des résultats) est un enjeu majeur.

Dans ce contexte, les derniers progrès de la spectroscopie Raman, ouvrent de nouvelles perspectives. Obtenus de manière rapide et non destructive, les spectres sont de véritables empreintes moléculaires. Ils permettent un aperçu global de l'état physiologique des microorganismes observés et la mise en évidence des cibles de la toxicité. Appliquée au contrôle des impacts environnementaux de la pollution cette méthode pourrait fournir une analyse complémentaire des techniques actuelles et permettre un screening rapide de différents phénomènes toxiques. Bien que les spectromètres Raman de laboratoire soient encore des équipements chers et imposants, des modèles portables existent déjà rendant envisageable à terme une intégration au sein d'un biocapteur.

Ainsi, l'étude réalisée au cours de cette thèse s'est attachée à démontrer le potentiel de cette technique pour le suivi et la compréhension des phénomènes de toxicité. Dans un premier temps, une étude préliminaire est réalisée à travers l'observation par spectroscopie Raman des effets de l'arsenic sur la

bactérie *Escherichia coli*. En particulier, cette première phase de travail aura permis de mettre l'accent sur l'importance de toutes les étapes et méthodes statistiques de traitement de données sans lesquelles il est impossible d'extraire l'information contenue au sein des spectres. Une partie de ces travaux ayant déjà donné lieu à un article scientifique au sein de la revue *Environmental Sciences and Technology*, ils seront exposés ici sous leur forme publiée. Après cette première preuve de concept, les observations sont étendues à l'analyse des spectres de quatre modèles cellulaires supplémentaires (2 bactéries, une levure et une algue) exposés à quatre nouvelles substances polluantes caractéristiques de grandes familles retrouvées dans l'environnement (antibiotique, métal, herbicide, phénol). Le but a alors d'abord été de mettre en évidence l'existence de signatures spectrales spécifiques caractéristiques de phénomènes de toxicité donnés à l'échelle du métabolisme dans son ensemble (Approche multiparamétrique). Il s'agira enfin d'exploiter le potentiel informatif supplémentaire apporté par l'analyse simultanée des quatre microorganismes (approche multicellulaire) vers l'élaboration d'une méthodologie de mesure pertinente pour l'évaluation de toxicités environnementales.

# CHAPITRE II :

## MATERIELS ET METHODES



## 1. MATÉRIELS ET PROCÉDURES DE ROUTINE

### 1.1. STÉRILISATION

L'ensemble du matériel et des solutions utilisés au cours de cette étude ont été préalablement stérilisés, généralement par autoclavage à 121°C pendant 21 min (Advantage-Lab – AL 02-10). En cas de sensibilité à la chaleur des solutions, l'autoclavage est remplacé par une étape de filtration sur membrane acétate de cellulose de porosité 0,20 µm (Dutsher – Réf. : 146560).

### 1.2. INCUBATION

La croissance des microorganismes nécessite des conditions maîtrisées de température, d'agitation et parfois de lumière. Pour ce faire, deux incubateurs ont été utilisés :

- Pour la culture des microorganismes bactériens et levures : Incubateur IKA® KS 4000 i Control
- Pour la culture de la souche algale : Incubateur New Brunswick Innova® 42 équipé de lampes photosynthétiques (325 lumens à 25°C – RI 66)

Une étuve sans agitation a aussi été utilisée pour l'incubation des cultures sur boîtes de Pétri (Heraeus™ Instrument – Function Line).

### 1.3. SUIVI DE CROISSANCE ET MESURE DE LA DENSITÉ OPTIQUE

#### 1.3.1. SUIVI DE CROISSANCE EN ERLENMEYER

Le suivi de la croissance des microorganismes peut être facilement réalisé par mesure de la densité optique (DO) à 620 nm pour les bactéries et la levure et à 750 nm dans le cas de la souche algale.

Le suivi des cultures en Erlenmeyer a ainsi été effectué au moyen d'un spectrophotomètre Helios ε (Unicam). Les échantillons mesurés sont placés dans des cuves de 1 cm de trajet optique. Le blanc est réalisé en prenant pour référence la DO du milieu sans microorganisme. Pour assurer la validité de la mesure, la densité optique doit être comprise entre 0,01 et 0,4 afin de rester dans la zone de linéarité de

la loi de Beer-Lambert<sup>a</sup>. Lorsque la DO est supérieure à cette limite des dilutions sont réalisées au préalable. Dans le cas d'un suivi de croissance, des mesures sont réalisées toutes les 60 min environ.

### 1.3.2. SUIVI EN MICROPLAQUES

Deux lecteurs sont utilisés pour les mesures de la densité optique en microplaque :

- Le lecteur SPECTROstar Nano (BMG Labtech) permet la lecture de microplaques 96 puits. Il est utilisé pour les tests de toxicité sur bactéries et levures.
- Le lecteur Spark®10M (TECAN) est utilisé pour la lecture des plaques 24 puits nécessaires lors des tests de toxicité sur la souche algale.

## 1.4. CENTRIFUGATION ET ETAPES DE LAVAGES

Les différentes phases de cultures de la biomasse et d'exposition aux échantillons toxiques nécessitent des étapes de lavages. Pour cela, la biomasse est récupérée par centrifugation pendant 5 min à 6400g et 4°C (Awel MF20-R) puis ressuspendue dans 20 mL de solution de MgSO<sub>4</sub>. Ce cycle est répété 3 fois. La solution de MgSO<sub>4</sub> (Sigma – Réf. : M1880) est préparée dans de l'eau ultra pure à une concentration de 10<sup>-2</sup> M puis stérilisée.

Dans les autres cas où de petits volumes doivent être centrifugés, notamment juste avant les observations Raman, les échantillons sont centrifugés en eppendorfs de 2 mL pendant 3 min à 10000 rpm (MinSpin plus – Eppendorf).

## 2. ECHANTILLONS TOXIQUES

### 2.1. SUBSTANCES TOXIQUES DE REFERENCE

Choisis pour représenter quatre grandes familles de polluants retrouvés dans l'environnement (antibiotiques, métaux lourds, herbicides, composés phénolés), quatre polluants de référence sont utilisés. Les solutions mères concentrées ont toutes été préparées extemporanément (Tableau 11) avant d'être stérilisées par filtration, aliquotées et conservées à -20°C à l'abri de la lumière pendant 18 mois.

---

<sup>a</sup> La loi de Beer-Lambert permet de relier l'atténuation de la lumière aux propriétés et à l'épaisseur (trajet optique) du milieu qu'elle traverse. En d'autres termes dans le cas d'une suspension bactérienne, elle établit une proportionnalité entre la densité optique de la suspension (DO), la concentration en bactéries (c) et la longueur (l) du trajet parcouru par la lumière dans le milieu, selon la formule  $DO = \epsilon lc$ . ( $\epsilon$  est le coefficient d'extinction molaire, constante propre à l'échantillon).

Avant chaque essai, les solutions sont décongelées et diluées en fonction des conditions désirées. En cas de besoin, des solutions intermédiaires sont préparées dans le même solvant que celui utilisé pour la préparation de la solution mère. Les aliquots décongelés ne sont pas réutilisés. Quand un tiers solvant a été nécessaire pour la préparation de la solution mère, des précautions sont prises de manière à ce que le tiers solvant ne représente pas plus de 0,05 % de la solution finale.

**Tableau 11 - Préparation des solutions mères de substances toxiques**

COMPOSE	CAS	REFERENCE		SOLVANT	CONCENTRATION (MG/L)
Norfloxacine	70458-96-7	Flukar	N980-5G	Milieu de test	250
Diuron	330-54-1	CHEM SERVICE	PS-60	Ethanol	25000
3,5-dichlorophénol	591-35-5	SIGMA	D7 060-0	Eau distillée	5000
Cuivre (CuSO <sub>4</sub> )	7758-99-8	Fisher Scientific	A4778701	Eau distillée	200000

## 2.2. MILIEU DE TEST

Ce milieu n'est pas destiné à la croissance des microorganismes mais correspond à la reproduction maîtrisée d'un échantillon d'eau à tester utilisé lors des essais de toxicité. C'est un milieu synthétique minimum stérile reprenant la composition du milieu d'essai de la norme NF EN ISO 15522 « *Détermination de l'effet inhibiteur des constituants de l'eau sur la croissance des microorganismes de boues activées* ». Seule la source de carbone est modifiée, remplaçant l'acétate et un bouillon de culture par du glucose. Sa composition finale est détaillée Tableau 12. Afin de recréer un échantillon pollué, les substances toxiques testées sont ajoutées au milieu directement avant les tests. Pour chaque essai, un témoin sans substance et réalisé en parallèle.

**Tableau 12 – Composition finale du milieu de test**

COMPOSE	REFERENCE	QUANTITES (POUR 1 L)	COMPOSE	REFERENCE	QUANTITES (POUR 1 L)
Glucose	Sigma Réf. : G5500	2,0 g	FeCl <sub>3</sub> , 6H <sub>2</sub> O	Sigma Réf. : F2877	0,25 mg
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> , 2H <sub>2</sub> O	Sigma Réf. : 56814	334,0 mg	H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	Fisher Réf. : 03751	50,0 µg
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	Merck Réf. : 105101	217,5 mg	CoCl <sub>2</sub> , 6H <sub>2</sub> O	Fisher Réf. : 74101	50,0 µg
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	Sigma Réf. : 795488	85,0 mg	ZnSO <sub>4</sub> , 7H <sub>2</sub> O	Sigma Réf. : 22137-6	50,0 µg
CaCl <sub>2</sub>	Merck Réf. : 1.02382	36,4 mg	MnSO <sub>4</sub> , 2H <sub>2</sub> O	VWR Réf. : 25303.233	15,0 µg
MgSO <sub>4</sub> , 7H <sub>2</sub> O	Sigma Réf. : 63138	22,5 mg	Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> , 6H <sub>2</sub> O	Acros Réf. : 422.22	10,0 µg
NH <sub>4</sub> Cl	Merck Réf. : 1.01145	5,0 mg	NiCl <sub>2</sub> , 6H <sub>2</sub> O	Applichem Réf. : 7.0100	10,0 µg

### 3. MICROORGANISMES

Quatre microorganismes sont étudiés, sélectionnés à partir des collections utilisées par l'entreprise Tronico VigiCell qui possède des banques de données établissant leur sensibilité ainsi que leur réponse face à de nombreux échantillons environnementaux. Ils sont choisis pour représenter des modèles métaboliques différents (bactéries Gram+ et Gram-, algue, levure).

- *Escherichia coli* NR698 (MC4100 *lptD4213*) est une bactérie GRAM- obtenue auprès du département de biologie moléculaire de l'université de Princeton. Dérivée de la souche *E. coli* K-12 MC4100 et décrite par Ruiz *et al.* <sup>117</sup> elle présente une membrane externe altérée par rapport au type sauvage ce qui lui confère une grande perméabilité aux antibiotiques.
- *Bacillus subtilis subtilis* (CIP 5265) achetée auprès de l'institut pasteur est utilisée comme modèle de référence GRAM+.
- *Saccharomyces cerevisiae* de type sauvage, obtenue auprès de l'ATCC (N° 9763), est choisie comme modèle standard représentatif des levures.
- *Chlamydomonas reinhardtii* est une algue unicellulaire choisie pour représenter le règne végétal. Une souche de référence de type « sauvage » WTS est utilisée. Elle a été obtenue auprès de la « chlamystation » de l'Institut de Biologie Physico Chimique (IBPC UMR7141-CNRS).

L'élaboration des protocoles mis en œuvre dans le cadre de ces travaux a été guidée par une volonté d'uniformisation des conditions de cultures et de tests pour l'ensemble des microorganismes étudiés. Ainsi les protocoles relatifs aux deux souches bactériennes (*E. coli* NR698 et *B. subtilis*) et à la levure (*S. cerevisiae*) sont quasiment identiques et seront traités dans des parties communes. Cependant, des adaptations ont été nécessaires pour convenir aux particularités métaboliques de la souche algale (*C. reinhardtii*). Les protocoles correspondants seront exposés séparément.

## 4. CONSERVATION DES SOUCHES ET CONDITIONS DE CULTURE

### 4.1. BACTERIES ET LEVURE

#### 4.1.1. MILIEUX DE CULTURE

##### 4.1.1.1. MILIEUX GELOSES

Les cultures en boîtes de Pétri des deux souches bactériennes et de la souche de levure sont réalisées respectivement sur gélose Luria-Bertani (LB) ou Sabouraud (Tableau 13). Les milieux sont préparés dans de l'eau ultra pure et stérilisés avant d'être coulés en boîtes de Pétri. Les boîtes obtenues sont ensuite parafilmées et conservées à 4°C à l'abri de la lumière jusqu'à leur utilisation.

Tableau 13 – Bactéries et Levure - Composition des milieux gélosés

COMPOSES	FOURNISSEURS		LURIA BERTANI (POUR 1L)	SABOURAUD (POUR 1L)
<b>Tryptone</b>	Biokar	Réf. : A1401HA	10.0 g	-
<b>Extrait de Levure</b>	Biokar	Réf. : A1202HA	5.0 g	-
<b>NaCl</b>	Labogros	Réf. : 9020401	5.0 g	-
<b>Peptone</b>	Sigma	Réf. : P7750 – 500G	-	10.0 g
<b>Glucose</b>	Sigma	Réf. : G5500	-	20.0 g
<b>Agar</b>	Biokar	Réf. : A1012HA	15.0 g	15.0 g

##### 4.1.1.2. MILIEUX LIQUIDES

Tableau 14 – Bactéries et levures – Solutions mères pour la préparation des milieux de pré-culture et culture

COMPOSE	QUANTITES (POUR 1 L)	COMPOSE	QUANTITES (POUR 1L)
YNB : YEAST NITROGEN BASE 10X – DIFCO			
Sulfate d'ammonium	50.0 g	HCl Pyridoxine	4.0 mg
Monopotassium	10.0 g	Sulfate de Zinc	4.0 mg
Phosphate	5.0 g	HCl Thiamine	4.0 mg
Sulfate de Magnésium	5.0 g	Pantothénate de Calcium	4.0 mg
Chlorure de Sodium	1.0 g	Chlorure de Fer	2.0 mg
Chlorure de Calcium	1.0 g	Molybdate de Sodium	2.0 mg
L-Histidine Monohydrochloride	0.1 g	Riboflavine	2.0 mg
LD Méthionine	0.2 g	Acide p-Aminobenzoïque	2.0 mg
LD Tryptophane	0.2 g	Iodure de Potassium	1.0 mg
Inositol	20.0 mg	Sulfate de Cuivre	400.0 µg
Acide Borique	5.0 mg	Acide Folique	200.0 µg

Niacine	4.0 mg	Biotine	20.0 µg
Sulfate de Manganese	4.0 mg		

**CSM : COMPLETE SUPPLEMENTATION MEDIUM (10X) – FORMEDIUM – REF DCS0019**

Valine	1.4 g	L-Phenylalanine	0.5 g
L-Leucine	1.0 g	L-Tryptophan	0.5 g
L-Threonine	1.0 g	L-Tyrosine	0.5 g
L-Aspartic acid	0.8 g	L-Histidine HCl	0.2 g
L-Arginine	0.5 g	L-Methionine	0.2 g
L-Isoleucine	0.5 g	Uracile	0.2 g
L-Lysine HCl	0.5 g	Adénine	0.1 g

**SOLUTION TAMPON (10X)**

$KH_2PO_4$	Sigma – Réf. : 795488	8.5 g	$Na_2HPO_4$	Sigma – Réf. : 56814	33.40 g
$K_2HPO_4$	Merck – Réf. : 105101	21.75 g	$NH_4Cl$	Merck – Réf. : 1.01145	0.5 g

**GLUCOSE**

Glucose	SIGMA – Réf. : G5500	200 g
---------	----------------------	-------

Les milieux destinés à la croissance des bactéries et des levures sont des milieux synthétiques stériles dont la composition maîtrisée permet une diminution de la variabilité expérimentale lors de l'analyse des microorganismes par spectroscopie Raman. Ils sont préparés à partir d'une solution 10x de *Yeast Nitrogen Base* (YNB – DIFCO – Réf. : 233520) pour un apport maîtrisé en sels, vitamines, minéraux et sources d'azote. Cette base est supplémentée par une solution mère (10x) d'acides aminés *Complete supplementation mixtures* (CSM – Formedium – Réf. DCS0019). La source de carbone est apportée par une solution mère de glucose pour un apport final de 10 g.L<sup>-1</sup> (Pré-cultures) ou de 5 g.L<sup>-1</sup> (cultures). Le pH initialement de 5 est favorable à la croissance des levures. Il est ajusté à 6,8 pour la croissance des souches bactériennes grâce à l'ajout d'une solution tampon. Les différentes solutions mères sont préparées dans de l'eau ultra pure et stérilisées séparément. Leur composition est détaillée dans le Tableau 14. Les modalités de préparation des milieux finaux sont explicitées Tableau 15.

**Tableau 15 – Bactéries et levures - Préparation des milieux de pré-culture et culture à partir des solutions mères détaillées Tableau 14**

POUR 1L SOLUTIONS MERES	PRE-CULTURE		CULTURE	
	PH 5	PH 7	PH 5	PH 7
YNB 10X	200 mL	200 mL	200 mL	200 mL
CSM 10X	100 mL	100 mL	100 mL	100 mL
Tampon 10X	-	100 mL	-	100 mL
Glucose	50 mL	50 mL	25 mL	25 mL

#### 4.1.2. CONSERVATION DES SOUCHES

La conservation sur le long terme des deux souches bactériennes et de la levure est assurée par un stockage à  $-80^{\circ}\text{C}$ . Pour cela, des cultures overnight sont réalisées à partir de colonies isolées sur boîtes de Pétri. Elles sont ensuite aliquotées en cryotubes contenant 1 mL de suspension de microorganismes auquel est ajouté 1 mL de glycérol à 50% (Dutsher – Réf. : 91535).

#### 4.1.3. ISOLEMENTS ET CONSERVATION SUR BOITE DE PETRI

Avant les essais, la pureté des souches est vérifiée par une étape d'isolement et de culture sur boîte de Pétri. Ensemencées à partir d'un cryotube conservé à  $-80^{\circ}\text{C}$ , les boîtes sont incubées à  $30^{\circ}\text{C}$  pendant 24 heures dans le cas des souches bactériennes et 48 heures pour la levure. Les boîtes sont ensuite fermées par du parafilm et conservées à  $4^{\circ}\text{C}$  pendant une durée maximale de 15 jours.

#### 4.1.4. PRE-CULTURES

L'étape de pré-cultures permet un « redémarrage » et une bonne acclimatation des souches dans le milieu choisit. Elles sont réalisées dans des tubes de 20 mL contenant 7 mL de milieu de pré-culture. L'ensemencement est effectué à partir de colonies isolées obtenues sur boîtes de Pétri. Les pré-cultures sont ensuite incubées toute une nuit à  $30^{\circ}\text{C}$  sous agitation constante (250 rpm).

#### 4.1.5. PRODUCTION DE BIOMASSE

La culture des souches est réalisée en erlenmeyer de 250 mL contenant 50 mL du milieu de culture correspondant au microorganisme cultivé (pH 5 pour la levure ou 7 pour les souches bactériennes). L'ensemencement est effectué à partir des pré-cultures de manière à atteindre une densité optique à 620 nm initiale de 0,1. L'incubation est réalisée à  $30^{\circ}\text{C}$  sous agitation constante (250 rpm) et la croissance est surveillée par mesure de la densité optique. Lorsque la phase exponentielle de croissances est atteinte ( $\text{DO}_{620\text{nm}} \approx 0,4$ ), la biomasse est récupérée par centrifugation et lavée avant d'être directement utilisée pour les essais de toxicité ou les analyses Raman.

## 4.2. ALGUES

#### 4.2.1. MILIEUX DE CULTURE

Le milieu gélosé destiné à la culture des algues en boîte de Pétri est constitué par ajout de  $15 \text{ g.L}^{-1}$  d'agar à un milieu TAP standard préparé dans de l'eau ultra pure. Après stérilisation, le milieu est conditionné en boîtes de Pétri parafilmées et conservées à  $4^{\circ}\text{C}$  à l'abri de la lumière jusqu'à utilisation. Le milieu utilisé

pour les cultures en milieu liquide reprend une composition similaire à celle du milieu gélosé à l'exception de la source de carbone qui est cette fois supprimée pour favoriser l'activité photosynthétique. Ces deux milieux sont basés sur les recommandations issues du *Chlamydomonas Library Project* et adaptés des travaux de S. Bujaldon<sup>118</sup>. Leur composition est détaillée Tableau 16.

**Tableau 16 - Algues - Composition des milieux de culture (Gélose TAP et milieu minimum liquide)**

COMPOSES	REFERENCE	MILIEU TAP (POUR 1L)	MILIEU MINIMUM (POUR 1L)
<b>COMPOSANTS MAJEURS</b>			
NH <sub>4</sub> Cl	Merck Réf.: 1.01145	0.4 g	0.5 g
MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	Sigma Réf.: M1880	0.1 g	0.02 g
CaCl <sub>2</sub> .2H <sub>2</sub> O	Merck Réf.: 1.02382.0500	0.05 g	0.01 g
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	Merck Réf.: 105101	0.108 g	1.44 g
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	Sigma Réf.: 795488	0.056 g	0.72 g
Tris	Sigma Réf.: T5941	2.42 g	-
<b>COMPOSANTS TRACES</b>			
Na <sub>2</sub> EDTA	Sigma Réf.: E5513	50.0 mg	50.0 mg
ZnSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	Sigma Réf.: 22.137-6	22.0 mg	22.0 mg
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	Fisher Réf.: A4703751	11.4 mg	11.4 mg
MnCl <sub>2</sub> .4H <sub>2</sub> O	Sigma Réf.: M8054	5.06 mg	5.06 mg
FeSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	Labosi Réf.: A4809001	4.99 mg	4.99 mg
CoCl <sub>2</sub> .6H <sub>2</sub> O	Labogros Réf.: A4774101	1.61 mg	1.61 mg
CuSO <sub>4</sub> .5H <sub>2</sub> O	Fisher Réf.: A4778701	1.57 mg	1.57 mg
Mo <sub>7</sub> O <sub>24</sub> (NH <sub>4</sub> ) <sub>6</sub> .4H <sub>2</sub> O	Fisher Réf.: A4730058	1.1 mg	1.1 mg
KOH	Labogros Réf.: 9016501	~16 mg	~16 mg
<b>AUTRES COMPOSANTS</b>			
Acide Acétique glacial	Sigma Réf.: 45726	1/1000 <sup>eme</sup>	1/1000 <sup>eme</sup>
Agar	Biokar Réf.: A1012HA	15.0 g	-

#### 4.2.2. CONSERVATION DES SOUCHES

La cryogénéisation des souches algales étant délicate, la conservation de *C. reinhardtii* se fait au moyen de repiquages réguliers de la souche sur boîte de Pétri. Les boîtes sont conservées à 25°C en présence de lumière et les repiquages effectués toutes les 2 à 3 semaines.

#### 4.2.3. PRE-CULTURE ET PRODUCTION DE BIOMASSE

Une pré-culture en milieu liquide est réalisée en erlenmeyer de 100 mL contenant 25 mL de milieu minimum. L'ensemencement est effectué à partir de souches maintenues sur boîte Pétri. L'incubation est réalisée à 20°C sous agitation constante (200 rpm) et en présence de lumière (Incubateur New Brunswick

Innova 42 – 325 lumen – RI 66). Après 4 à 5 jours d'incubation, la pré-culture est repiquée en erlenmeyer de 250 mL contenant 50 mL de milieu minimum pour la phase de production de biomasse. Le repiquage consiste à prélever 5 mL de pré-culture et de les réintroduire dans 45 mL de milieu de culture frais. Cette étape est ensuite répétée tous les 5 jours afin de maintenir les cultures dans de bonnes conditions. Le but est de conserver des cellules jeunes ayant un bon potentiel de multiplication.

## 5. EVALUATION DE LA TOXICITE

### 5.1. INHIBITION DE LA CROISSANCE

#### 5.1.1. BACTERIES ET LEVURE

L'effet toxique des polluants testés est évalué en microplaques 96 puits (Dutscher, réf. 353072) par mesure de l'inhibition de la croissance grâce au suivi de la densité optique à 620 nm. La croissance est réalisée selon les cas dans le milieu de production de biomasse (Cf. Paragraphe 4.1.1.2) ou dans le milieu de test (Cf. Paragraphe 2.2) auquel est ajoutée la substance toxiques testée. Pour chaque essai une gamme de concentrations est réalisée, allant de concentrations subtoxiques à létales quand la toxicité de la substance le permet. 4 réplicats sont réalisés pour chaque concentration. Lorsqu'un tiers solvant a été nécessaire pour la préparation des solutions mères, sa concentration est ajustée afin d'être la même dans tous les puits. Les dilutions sont directement réalisées dans la microplaque pour un volume final de 180  $\mu$ L. La biomasse est ajoutée grâce à 20  $\mu$ L de suspension bactérienne pour une  $DO_{620nm}$  initiale de 0,1. La croissance est suivie en continue sur une période de 10 heures à 30°C sous agitation constante (300 rpm)

#### 5.1.2. ALGUE

L'évaluation de la toxicité des échantillons sur *C. reinhardtii*, est effectuée par mesure de l'inhibition de la croissance en milieu minimum. Les essais sont réalisés en microplaques 24 puits (Thermo Scientific – Réf. : 142475) par mesure de la densité optique à 750 nm (Figure 23). Les puits sontensemencés avec 1,98 mL d'une culture âgée de 3 à 4 jours dont la densité optique est ajustée à 0,02. Pour chaque essai, des dilutions des solutions mères de toxiques sont réalisées en cascade de manière à ce que la concentration finale

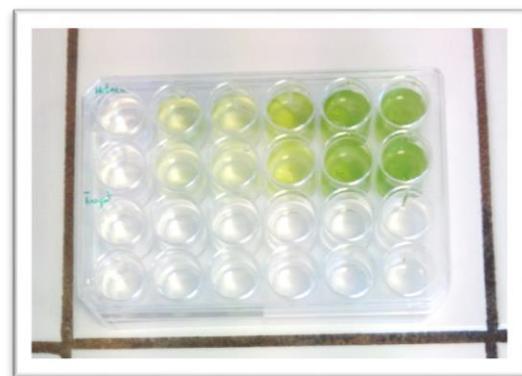


Figure 23 – Exemple d'essai d'inhibition de la croissance de *C. reinhardtii* en microplaque 24 puits.

testée dans les puits soit atteinte par ajout de 0,02 mL de solution intermédiaire. La mesure de la densité optique est réalisée toutes les 24 heures pendant 72 h. Entre chaque mesure, les plaques sont incubées à 20°C, sous agitation et luminosité constante.

## 5.2. INHIBITION DE LA RESPIRATION

Les tests d'inhibition de la respiration sont réalisés sur les souches bactériennes et sur la levure. Ils sont destinés à mesurer l'effet toxique des substances à un instant  $t$ , correspondant à une toxicité aiguë (40 min d'exposition) ou à un effet chronique (90 min d'exposition). Ils sont réalisés en microplaques 96 puits dans les mêmes conditions d'incubation que les tests d'inhibition de la croissance. A la fin de la période d'exposition, 20  $\mu$ L de réactif PrestoBlue® (résazurine – Invitrogen Réf. : A13262 ) sont ajoutés dans les puits. Après pénétration dans la cellule, la résazurine est réduite en résorufine. Le taux de conversion est proportionnel à la proportion de cellules métaboliquement actives. L'analyse est réalisée après 5 min de temps de contact, par mesure et comparaison des valeurs d'absorbance à 571 nm (résorufine) et 601 nm (résazurine).

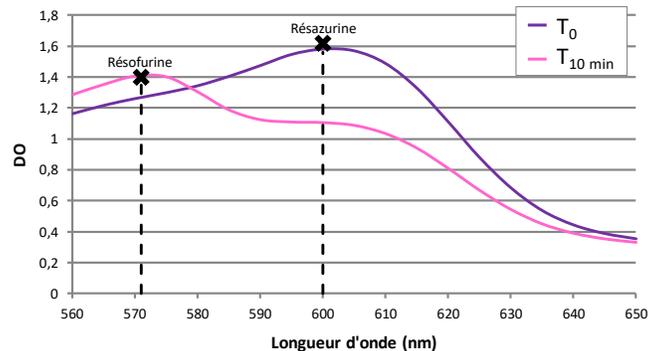


Figure 24 - Spectres d'absorption d'une culture bactérienne après ajout du réactif PrestoBlue à  $t_0$  et après 10 min de temps de contact. Après pénétration dans la cellule, la résazurine est réduite en résorufine.

## 6. CONDITIONS D'ANALYSES RAMAN

### 6.1. EXPOSITION AUX ECHANTILLON

#### 6.1.1. BACTERIES ET LEVURES

Dans le cadre des tests Raman, quatre erlenmeyers de production de biomasse sont cultivés séparément puis mélangés lors des phases de lavage. Cette précaution permet de prendre en compte la variabilité biologique et expérimentale de cette phase du protocole. Après lavage, la biomasse est réintroduite dans

des erlenmeyer différents contenant 40 mL de milieu de test auxquels ont été ajoutées les concentrations désirées en toxique. Pour chaque polluant étudié, trois concentrations sont testées choisies pour représenter si possible des concentrations subatomique, toxique et létale, conformément aux résultats des tests de toxicité classique. Un essai témoin sans toxique est réalisé en parallèle de chaque test. Ainsi, un total de 4 erlenmeyers sontensemencés en parallèle. La densité optique initiale est de 0,4 et l'incubation est effectuée à 30°C sous agitation constante de 250 rpm pendant 40 min, dans les mêmes conditions que lors de la phase de production de biomasse. Chaque essai (analyse de quatre erlenmeyers) est répété en triplicat au cours d'expériences différentes.

### 6.1.2. ALGUES

Comme pour les bactéries et la levure, les tests Raman sur algues sont réalisés à partir de 4 cultures maintenues en parallèle afin de tenir compte de la variabilité biologique et expérimentale de la phase de production de biomasse. 10 mL de chaque culture sont prélevés puis centrifugés et lavés. Après lavage, la biomasse obtenue est ressuspendue pour atteindre une  $DO_{750nm}$  de 0,2 dans un volume total de 4 mL constitué de :

- 0,8 mL de milieu minimum
- 3,2 mL de milieu de test additionné de la substance à tester

La suspension cellulaires obtenues est introduite dans des flacons transparents de 5 mL et incubée pendant 40 min à 20°C sous agitation et lumière constante. Des tests effectués après 4h d'exposition sont aussi réalisés.

## 6.2. PREPARATION DES CELLULES A L'OBSERVATION RAMAN

Après exposition, les microorganismes sont lavés (Cf. § 4.1.4) afin de les débarrasser de tous résidus de milieu ou de substance pouvant biaiser la mesure. Ensuite, 5  $\mu$ L de culot de biomasse sont récupérés, déposés sur une surface d'or et laissés à sécher à température ambiante sous hotte à flux laminaire. Ce protocole est adapté des travaux de Assaf *et al.*<sup>78</sup>. En particulier, la surface d'or est constituée d'une couche de 100 nm d'or déposée par évaporation physique en phase vapeur sur une lame de microscope standard elle-même près recouverte d'une couche de 30 nm de chromium. Les conditions de centrifugation, de dépôt et de séchage sont récapitulées Tableau 17. Un total de 40 spectres est réalisé sur chaque dépôt.

**Tableau 17 - Préparation des cellules à l'observation Raman**

SOUCHE	CENTRIFUGATIONS	DEPOTS	SECHAGE
<i>E. coli</i> NR698	3 x 5 min à 6400g dans 20 mL		
<i>B. subtilis</i>	+	5 µL	40 min
<i>S. cerevisiae</i>	1 x 3 min à 10000 rpm dans 1 mL		
<i>C. reinhardtii</i>	3 x 10 min à 5000 rpm dans 1,5 mL	5 µL	20 min

### 6.3. PARAMETRES D'ACQUISITION DES SPECTRES

L'acquisition des spectres Raman a été réalisée au moyen d'un spectromètre SENTERRA (Bruker, Allemagne) piloté par le logiciel OPUS (Bruker, version 7.2). Pour assurer la bonne focalisation du laser, la mise au point est réalisée sur le dépôt entre chaque spectre. Pour un total de 40 spectres par dépôt, la base de données correspondant à chaque expérience (1 microorganisme / 1 substance / 4 concentrations / 1 réplicat) représente l'acquisition d'au moins 160 spectres. Avec une moyenne de 1 min 30 sec par spectre, l'acquisition des données d'une expérience s'étale ainsi sur une plage moyenne d'acquisition de 4 heures. Chaque expérience est répétée en triplicat. Les analyses sont effectuées à 785 ou 532 nm selon les échantillons pour optimiser la qualité des spectres et minimiser les biais de mesures tels que d'éventuels phénomènes de fluorescence. La fenêtre spectrale mesurée est comprise entre 200 et 1800  $\text{cm}^{-1}$  avec une résolution d'environ 7  $\text{cm}^{-1}$ . Cette région des spectres contient l'ensemble des bandes Raman caractéristiques nécessaires à l'étude des microorganismes. Les paramètres d'acquisition correspondants aux différentes souches sont récapitulés dans le Tableau 18. Avec un total de 40 spectres réalisés sur chaque dépôt, la base de données correspondant à chaque expérience représente un total d'au moins 160 spectres (40 spectres x 4 concentrations).

**Tableau 18 - Paramètres d'acquisition des spectres Raman**

SOUCHE	LONGUEUR D'ONDE	PUISSANCE DU LASER	DUREE D'EXCITATION	CO ADDITIONS
<i>E. coli</i> NR698	785 nm	100 mW	8 s	5
<i>B. subtilis</i>	785 nm	100 mW	8 s	5
<i>S. cerevisiae</i>	532 nm	20 mW	5 s	5
<i>C. reinhardtii</i>	785 nm	10 mW	3 s	5

## 7. TRAITEMENT DES DONNEES

### 7.1. ETAPES DE PRETRAITEMENT

L'analyse des données spectrales nécessite différentes corrections mathématiques pour éliminer les biais dues aux conditions d'analyse (dérive instrumentale, modification non contrôlée de l'humidité de l'échantillon, influence de l'opérateur...). Ces corrections correspondent aux étapes de prétraitements des données. Les spectres sont dans un premiers temps découpés de manière à ne conserver que la zone située entre 200 et 1800  $\text{cm}^{-1}$ . Cette fenêtre contient l'ensemble des bandes caractéristiques nécessaires à l'analyse de matériel biologique. La correction de la ligne de base, réalisée directement grâce au logiciel OPUS selon une méthode d'élastique concave sur 64 points et 10 itérations. Les spectres sont ensuite normalisés en utilisant la méthode PQN (Probabilistic Quotient Normalization) en prenant les spectres médians comme référence.

### 7.2. ANALYSES CHIMIOMETRIQUES

L'analyse chimiométrique des spectres est réalisée sous Matlab (Version 2013) en utilisant les fonctions du package SAISIR<sup>®119</sup>.

Une première étape consiste en l'élimination des spectres aberrants. La stratégie de sélection élaborée est détaillée CHAPITRE 3. Elle s'appuie sur des analyses en composantes indépendantes (ICA) utilisant l'algorithme JADE<sup>120</sup>.

Des analyses factorielles discriminantes (AFD) sont par ailleurs utilisées pour quantifier les performances de classification des spectres en fonction des différentes conditions d'exposition aux toxiques. Elles sont réalisées sur les spectres issus du processus de sélection préalable. Chaque modèle discriminant a été calculé en utilisant une procédure de validation croisée (sélection aléatoire des spectres : 2/3 des spectres pour le modèle d'étalonnage et 1/3 pour l'ensemble de test de validation). Les scores finaux de classification correspondent à la moyenne de 100 itérations. On note cependant que l'AFD a par nature vocation à tenter d'optimiser au maximum la distinction entre les groupes qui lui sont donnés à analyser. Il existe en conséquence un risque que les résultats obtenus surestiment des variations qui ne seraient alors pas représentatives d'une réalité biologique. C'est pourquoi la significativité des différences existant effectivement entre les groupes de spectres est évaluée en parallèle en :

- Réduisant la dimension du jeu de données par analyse en composantes principales (ACP).

- Analysant par ANOVA Les deux composantes majoritaires issues de chaque ACP. Les résultats sont jugés significatifs lorsqu'une p-value inférieures à 0,05 est obtenue.

Enfin, une analyse fine des loadings issus des analyses par ICA permet d'identifier les portions des spectres les plus impactées par la toxicité. Le détail de la démarche d'analyse est exposé pas à pas CHAPITRE 4.

# CHAPITRE III :

## ANALYSE DES EFFETS DE L'ARSENIC SUR LES SPECTRES RAMAN D'*E. COLI* - UNE PREUVE DE CONCEPT ILLUSTRANT L'IMPORTANCE DE L'ANALYSE STATISTIQUE



## 1. CONTEXTE : LES ENJEUX DE L'ANALYSE DE DONNEES

La bibliographie développée au cours du premier chapitre illustre les perspectives ouvertes par la spectroscopie Raman dans le domaine de la mesure de la toxicité par bio-essais. Cependant comme évoqué au cours des derniers paragraphes, le développement de cette technique ne peut avoir lieu sans une recherche intensive en termes de méthodologie d'analyse. L'importance des jeux de données collectés confronte la spectroscopie Raman aux mêmes problématiques que lors de l'utilisation des technologies dites « omiques » : Leurs résultats riches de plusieurs milliers de points de données ne peuvent être exploités sans le recours à des bases de données solides et à des algorithmes d'analyses complexes. Plus que technologiques, les verrous sont alors analytiques et il est probable que les surmonter représente, dans ces domaines, un des enjeux majeurs des années à venir<sup>121</sup>.

Dans une optique d'utilisation future de la spectroscopie Raman couplée à une approche « biocapteur » il est d'abord nécessaire d'être en mesure de classer les spectres en fonction de la toxicité. En d'autres termes, dans le cas d'un échantillon toxique, les spectres d'un microorganisme exposé sont-ils significativement différents de ceux du même microorganisme en conditions témoins ? Dans un deuxième temps, l'intérêt principal de la spectroscopie Raman est de fournir de nouvelles perspectives complétant les réponses données par les tests toxicologiques monoparamétriques classiques. En effet, en leur qualité de véritables empreintes moléculaires des échantillons observés, identifier les bandes Raman présentant le plus de variabilité sous l'effet du toxique, revient à identifier les éléments du métabolisme sur lequel il a le plus d'influence et donc les cibles de la toxicité. En vue d'obtenir une première preuve de concept, une étude préliminaire a été réalisée à partir de l'analyse par spectroscopie Raman des effets de l'arsenic sur la bactérie *Escherichia coli*. Les premiers résultats obtenus sont encourageants, laissant percevoir l'existence d'un effet dose-réponse du métal sur les spectres, mais aussi un effet du temps d'exposition. Cependant, les résultats obtenus avec les premiers processus de classification des spectres conduisent à des résultats insuffisants avec un nombre significatif de spectres mal classés en fonction de la concentration d'exposition au toxique. L'une des causes identifiées de ce manque de précision réside dans la qualité des spectres obtenus. En effet, la fiabilité de l'analyse est intrinsèquement liée à la précision de l'empreinte représentée par chacun des spectres. Pourtant, de nombreux facteurs aussi bien expérimentaux que liés à la nature biologique des échantillons observés peuvent engendrer une importante variabilité. Bien que parfois directement identifiables à l'œil nu, dans la majorité des cas la complexité des spectres rends impossible une sélection manuelle objective des « bons spectres » par opposition à d'autres considérés comme « aberrants » qui ne représentent pas une empreinte fiable de

l'état physiologique des microorganismes observés. Leur élimination est pourtant fondamentale afin de ne pas biaiser les analyses.

C'est pourquoi une première étape du travail réalisé au cours de cette thèse a été de mettre en place par des outils d'analyse statistique une stratégie de détection de ces spectres aberrants, permettant d'optimiser la richesse des informations extraites des spectres Raman. Elaborée à partir du jeu de données issu de l'étude des effets de l'arsenic sur la bactérie *Escherichia coli*, le détail de cette stratégie ainsi que les résultats qu'elle a permis d'obtenir ont donné lieu en 2015 à une publication au sein de la revue scientifique internationale de rang A « *Environmental sciences and technology* » sous le titre :

**«Potential of Raman Spectroscopy To Monitor Arsenic Toxicity on Bacteria: Insights Toward Multiparametric Bioassays»** M. Bittel, C.B.Y. Cordella, A. Assaf, S. Jouanneau, M.J. Durand, G. Thouand. *Environ. Sci. Technol.*, 2015 , 49(20), pp 12324-12332.

C'est sous cette forme publiée qu'ils seront exposés dans la suite de ce document.

#### Résumé :

In the field of toxicological bioassays, the latest progress in Raman spectroscopy opens new research perspectives on a fast method of observing metabolic responses against toxic agents. This technique offers a multiparametric approach, providing an overview of the physiological changes that are caused by pollutants. However, physiological spectral fingerprints require complex chemometric methods for proper analysis.

In this study, particular attention has been given to the elaboration of an "aberrant spectra" detection strategy to highlight the effects of arsenic on the bacteria *Escherichia coli*. This strategy significantly improved spectra classification, consistent with a dose-response effect of the four tested concentrations of the metal. Indeed, the correct classification score of the spectra increased from 88% to more than 99%. The exposure time effect has also been investigated. The fine analysis of Raman spectroscopy fingerprints enabled the design of different "spectral signatures", highlighting early and late effects of arsenic on bacteria. The observed variations are in agreement with the expected toxicity and encourage the use of Raman spectroscopy for toxic element detection.

## 2. POTENTIAL OF RAMAN SPECTROSCOPY TO MONITOR ARSENIC TOXICITY ON BACTERIA: INSIGHTS TOWARD MULTIPARAMETRIC BIOASSAYS

### 2.1. INTRODUCTION

To cope with today's ecological issues, there is a continuous and increasing demand for sensors that can detect toxic agents in the environment. Many physicochemical and photochemical methods have been developed<sup>122–125</sup>. These methods have the advantage of being accurate and specific. However, such approaches cannot provide information about specific parameters of living organisms. Bioavailability or toxicity, for example, are essential parameters for understanding the real impact of pollutants on the environment<sup>29</sup>. In the last decade, new approaches such as cell-based biosensors have been proposed to detect changes in cell behavior or metabolism following exposure to toxic agents<sup>34,40</sup>. However, these methods often lack sensitivity and specificity<sup>34,55</sup>, mostly due to the limited number of observed cellular factors<sup>107</sup>. To overcome these drawbacks, several research teams have proposed multiplying the number of sensing bio-elements by combining the responses of several bacterial strains in the same biosensor<sup>47,54,60,62,126</sup>. Another strategy consists in the construction of luminescent strains that can emit different signals depending on the detected analyte<sup>63,66,67</sup>. However, although the obtained results are promising, these techniques involve complex genetic manipulations, are time consuming and costly.

In this context, the latest progress in Raman spectroscopy opens new research perspectives by allowing a fast and non-destructive method for observing metabolic responses against toxic agents. Indeed, Raman spectra can be considered molecular fingerprints of the observed sample. This technique has been widely used in the last two decades as an alternative optical method for rapid microbial detection and classification<sup>78,92,93,96,97</sup>. In addition, differences between microorganism physiological states as well as the effects of toxic molecules such as antibiotics can be highlighted through Raman spectra<sup>85,99,102,104,127</sup>. Furthermore, the observed differences can be matched with physiological events, such as fragmentation of the DNA in dying cells or decreasing proteins synthesis. In other words, observation by Raman spectroscopy offers a multiparametric approach that provides an overview of the physiological changes that are caused by the toxic agent. In the view of environmental application, this approach could provide a screening method to complement and overcome the limitations of other biosensor techniques<sup>107</sup>.

However, the richness of the Raman spectroscopy signal (more than 2500 data points) is both an advantage and a drawback of the method. The differences in the spectra are difficult to distinguish by

simple visual evaluation, and the researched effects are often hidden among all of the information. Consequently, the accuracy of the fingerprint constituted by each spectrum is a central issue, which is why pre-processing steps for the homogenization of the dataset are considered essential before spectral data analysis<sup>113–115</sup>. To highlight the differences between spectra, statistical tools such as multivariate algorithms are needed<sup>74</sup>. These analyses show good results in the field of microorganism identification, and this technique allows a good classification of spectra at the strain level<sup>78,92,93,96,97</sup>. However, when categorizing the spectra of the same microorganism according to exposure to several toxic compounds, the detected variations are more subtle and groups are often overlapping<sup>91,102,104,106,107</sup>. Furthermore, if the good classification of spectra is a prerequisite for the future use of Raman spectroscopy as a biosensor technique, the main goal is to provide new insights alongside the answers given by conventional monoparametric toxicological tests. It is essential to improve this aspect of the analysis so that the observed spectral variations can be better linked with the physiological events happening in the cells. In this context, the main barriers come from the difficulty in extracting this signature from the global signal: the post-processing of data is a central issue.

Raman spectroscopy aims to overcome the limits in sensitivity and specificity of the conventional monoparametric methods and suggests a new vision for the environmental biosensors of tomorrow. The work presented in this paper proposes an original exploitation of Raman spectra toward a better characterization of the bacterial responses to toxic substances

## 2.2. MATERIALS AND METHODS

### 2.2.1. BACTERIAL CULTURE

The bacterium *Escherichia coli* K12-MG1655 (ATCC 700926 - genotype: F-lambda-*ilvG-rfb-50 rph-1*) was used as a model organism. Bacteria were cultured in Luria Bertani (LB) medium, which was prepared as follows: 1 L of distilled water was supplemented with 10 g of tryptone (Biokar Diagnostics, ref. A1401HA), 5 g of yeast extract (Biokar Diagnostics, ref. A1202HA) and 5 g of NaCl (Acros Organics, ref. 479687). Sterilization was performed by autoclaving at 120°C for 20 min. Cultures were generated from overnight pre-cultures, both shaken at 250 rpm at 30°C (IKA KS 4000 ic control). The initial optical density (OD<sub>620nm</sub>) was 0.1. Growth was followed over time until OD<sub>620nm</sub> = 0.4 (Hitachi U 1800), which corresponds to the middle of the exponential growth phase.

### 2.2.2. ARSENIC EXPOSURE

A 1 M concentrated metal solution was prepared by the dilution of 0.989 g of  $\text{As}_2\text{O}_3$  (Sigma Aldrich, ref. A1010) in 10 mL of 2 M NaOH solution (Panreac, ref. 141687). For each experiment, dilutions were carried out in deionized water and added to cultures to reach a range of concentrations from 0 to  $5 \cdot 10^3 \mu\text{M}$  (conventional toxicity tests). For the Raman observations, only the 0, 5, 50 and 500  $\mu\text{M}$  concentrations were chosen. A 2 M NaOH solution was used to adjust the NaOH concentration in each flask according to the quantity that was brought by the highest arsenic addition. The exposure was carried out for 40 or 90 min.

### 2.2.3. CONVENTIONAL TOXICITY TESTS

Standard toxicity tests were performed by measuring the inhibition of respiration resulting from arsenic exposure. After exposure, 180  $\mu\text{L}$  of the bacterial mix (culture + arsenic) was transferred to a transparent 96 microwell plate (Dutcher, ref. 353072), and 20  $\mu\text{L}$  of *PrestoBlue*<sup>®</sup> cell viability reagent (Thermo Fisher Scientific Inc.) was added to the wells. Upon entering a living cell, the *PrestoBlue*<sup>®</sup> reagent is reduced from resazurin to resorufin. The conversion rate is proportional to the number of metabolically active cells. Four replicate wells were attributed to each tested concentration. The analysis was then performed by measuring and comparing the absorbance value at 571 nm (resorufin) and 601 nm (resazurin). The toxicity curve and Efficient Concentration 50% (EC50) profile were calculated with the REGTOX Excel Macro using the Hill equation<sup>128</sup>.

### 2.2.4. RAMAN TESTS

#### 2.2.4.1. SAMPLE PREPARATION

The Raman protocol was adapted from the work of Assaf *et al.* (2014)<sup>78</sup>. After exposure, 40 mL of bacterial mix was centrifuged at 6400 g for 10 min and washed 3 times with  $\text{MgSO}_4$  sterile solution ( $10^{-2}$  M). The cell pellet was collected in a 2 mL Eppendorf tube and centrifuged one more time for 3 min at 10,000 g (AOL, MF 20-R). Then, 10  $\mu\text{L}$  of the collected biomass was spread onto a gold surface and dried for 20 min at room temperature before analysis. A total of 45 spectra were acquired for each deposit. Each exposure condition was performed three times, and the total dataset corresponded to 1620 spectra.

#### 2.2.4.2. RAMAN MICROSPECTROSCOPY MEASUREMENTS

Raman spectra were performed using a SENTERRA spectrometer (Bruker, Germany) that was driven by the OPUS software (Bruker, V7.2). Analyses were performed at 785 nm and 100 mW (approximately 30

mW on the sample). The spectral resolution was approximately  $7 \text{ cm}^{-1}$ , and the spectral range was recorded from  $400$  to  $1800 \text{ cm}^{-1}$ . This region contains all of the useful Raman bands for the study of bacteria. Each spectrum was obtained after the co-addition of 8 Raman acquisitions of 5 seconds.

## 2.2.5. DATA ANALYSIS

### 2.2.5.1. PRE-PROCESSING STEPS

The baseline correction of the Raman spectra was processed using the Opus software by an elastic concave method ( $64^\circ$  and 10 iterations). Data processing was then performed with MATLAB (v.2013) using the SAISIR© package<sup>119</sup>. The spectra were first normalized using the probabilistic quotient normalization (PQN) method regarding the median spectra.

### 2.2.5.2. STATISTICAL ANALYSIS

The statistical analysis strategy was based on Independent Component Analysis (ICA). ICA was performed using the JADE algorithm<sup>129</sup>. Along with ICA, in order to quantify the classification results of the spectra, Stepwise Factorial Discriminant Analysis (sFDA) procedures were performed on a selection of 3 independent components from the ICA procedure. Each discriminant model was calculated using a cross-validation procedure (random selection of 2/3 of spectra for the calibration model and 1/3 for the validation test). The final classification rates correspond to the average of 100 sFDA iterations. All the statistical steps were also performed with MATLAB (v.2013) using the SAISIR© package<sup>119</sup>

## 2.3. RESULTS AND DISCUSSION

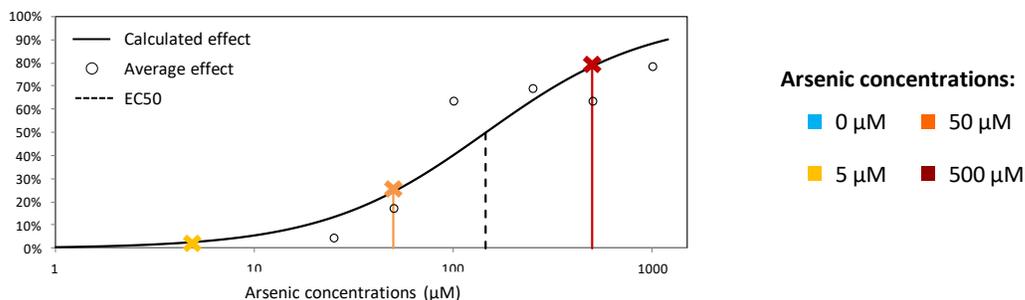
### 2.3.1. CONVENTIONAL TOXICOLOGICAL TEST VERSUS RAMAN SPECTROSCOPY

Prior to the analysis through Raman spectra, conventional respiration inhibition toxicity tests were performed on the bacteria *Escherichia coli* after a 40 min exposure to arsenic (Figure 25A). As expected, the results show a low toxicity (2.5% of inhibition) with 5  $\mu\text{M}$  arsenic, while a marked inhibition is provoked by 500  $\mu\text{M}$  (78%). Using these results as a reference, the Raman spectra of the bacteria that were exposed to the same arsenic concentrations were compared (Figure 25B). Variations can be observed on several bands, such as those corresponding to carbohydrates (400-550  $\text{cm}^{-1}$ ) or to proteins (1200-1500  $\text{cm}^{-1}$ ). These differences in the molecular fingerprint of the bacteria result from the physiological changes that are provoked by arsenic toxicity. However, the significance of these changes is difficult to evaluate, and the classification of each spectrum according to the arsenic concentrations is impossible through mere visual inspection.

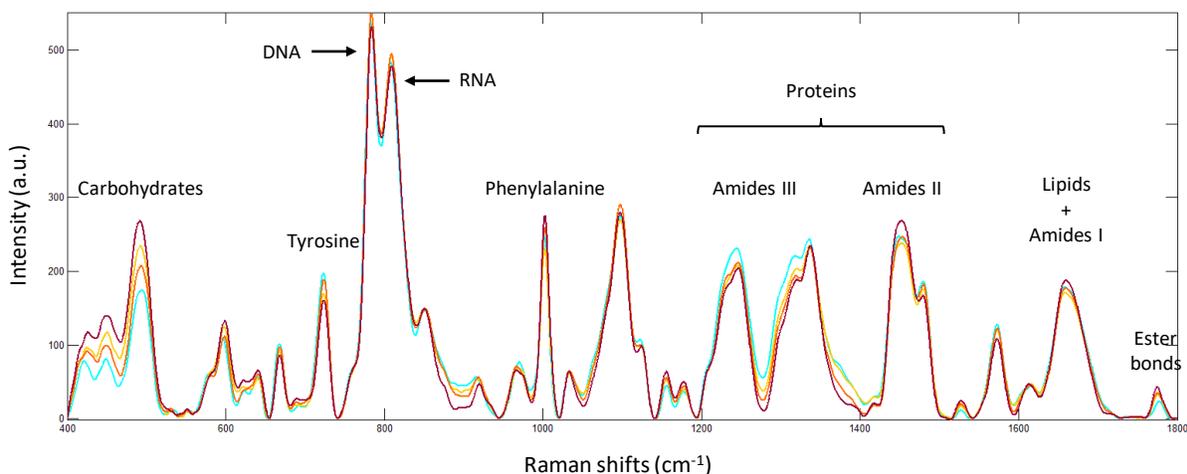
Thus, to capture the main chemical differences between spectra, chemometric tools have been applied: the collected spectra were analyzed by Independent Component Analysis (ICA). This approach is different from PCA, which produces combinations of original variables and results in principal components carrying a mix of chemical signals. The spectra analysis by ICA is thus expected to be more effective to link the observed variations to physiological events resulting of arsenic toxicity. Consequently, this method has been selected for both its ability to classify the spectra (first essential step of spectra analysis) and its potential of obtaining a better characterization of the bacterial responses to toxic substances. This second aspect, exploited paragraph 3.3, is one of the main purposes of using Raman spectroscopy for bioassay applications. The results of the classification performed by ICA on the collected spectra are shown Figure 2A. As explained above, this method allowed to identify the original “sources-signals” (ICs) and their impact on the data set. Three of the most discriminant ICs have been selected (IC3, IC4, and IC6) in order to observe the spectra repartition in a 3D scatter plot. These ICs are those that best illustrate the differences between the four groups of spectra corresponding to each arsenic concentration. On the resulting graph, four groups appear, consistent with the dose-response effect that was observed in the respiration inhibition test. However, they are overlapping, indicating that some spectra are misclassified. These results are relevant with those of a stepwise Factorial Discriminant Analysis (sFDA) that was performed on the same spectra (Figure 26A). This analysis quantifies the classification results of the spectra. The correct classification scores for the control and the 5, 50 and 500  $\mu\text{M}$  arsenic concentrations

are, respectively, 85%, 86%, 90% and 93%. Although these results are encouraging, they still need improvement, especially at the lowest concentrations.

**A Inhibition of bacterial respiration after 40 min exposure to arsenic**



**B Average Spectra and molecular attribution of the main Raman bands**



**Figure 25 - Conventional toxicological test versus Raman spectroscopy.**

(A) Measure of the inhibition of bacterial respiration resulting from a 40 min exposure to arsenic. The toxicity curve and EC50 were calculated with the REGTOX Excel Macro. (B) Average spectra of E.coli exposed for 40 min to 0, 5, 50, and 500 µM arsenic.

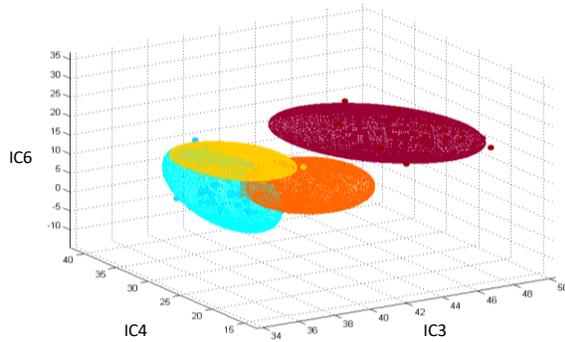
**2.3.2. IMPROVEMENT OF RAMAN SPECTRA CLASSIFICATION THROUGH IDENTIFICATION AND ELIMINATION OF ABERRANT SPECTRA**

The best classification rate is obtained for the 500 µM group, which is not surprising because this high concentration has a marked lethal effect. This concentration causes important physiological damages that must also lead to significant molecular variations. The results are not as clear-cut for the lower concentrations. Furthermore, most of the misclassified spectra are attributed to the neighboring groups. For example, 10.82% of the control spectra are attributed to the 5 µM arsenic concentration. Similarly, the misclassified spectra of the 5 µM group are reciprocally attributed to the control (7.76%) and 50 µM (5.49%) groups. This non optimal classification is mainly due to the high similarity of the spectra. The 5

and 50  $\mu\text{M}$  concentrations lead to poorly-distinguishable effects, which have more risk of being hidden by the intrinsic variability. The contours of the spectral “toxic signatures” of each concentration are not well defined with respect to one another.

ICA 3D scatter plots: Arsenic concentrations : ■ 0  $\mu\text{M}$  ■ 5  $\mu\text{M}$  ■ 50  $\mu\text{M}$  ■ 500  $\mu\text{M}$

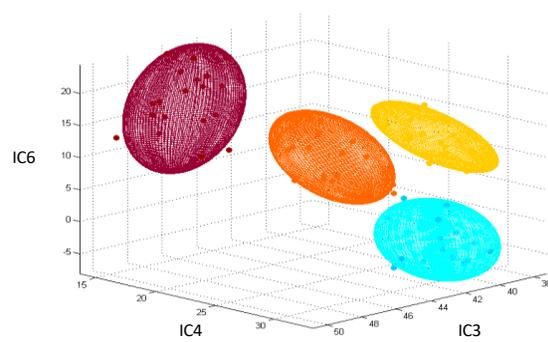
**A Before selection: Overlapping of groups**



sFDA Classification (%)

Samples	Control	5 $\mu\text{M}$	50 $\mu\text{M}$	500 $\mu\text{M}$
Control	<b>85.01</b>	10.39	4.60	-
5 $\mu\text{M}$	7.76	<b>86.75</b>	5.49	-
50 $\mu\text{M}$	4.38	4.88	<b>90.53</b>	0.21
500 $\mu\text{M}$	-	6.22	0.75	<b>93.03</b>

**B After selection: Good classification of spectra**



sFDA Classification (%)

Samples	Control	5 $\mu\text{M}$	50 $\mu\text{M}$	500 $\mu\text{M}$
Control	<b>99.81</b>	-	0.19	-
5 $\mu\text{M}$	0.27	<b>99.18</b>	0.55	-
50 $\mu\text{M}$	-	1.86	<b>98.14</b>	-
500 $\mu\text{M}$	-	-	0.16	<b>99.84</b>

Figure 26 – Improvement of spectra classification resulting from the selection process.

The 3D scatter plot of ICA and classification results of the sFDA performed (A) before and (B) after the pre-processing steps of spectra selection. After selection, the analysis results show four distinct groups corresponding to the different arsenic concentrations. The ellipsoid represents the limit of each group, with a confidence interval of 95%. The sFDA results also show a significant improvement of the classification.

Consequently, to improve the classification rates, it would be essential to identify and select the spectra that best represent the effects of each arsenic concentration. A “quality test” should eliminate the spectra that do not represent an accurate fingerprint of the sample. For this purpose, a selection strategy based on the exploitation of the Independent Component Analysis (ICA) results has been designed.

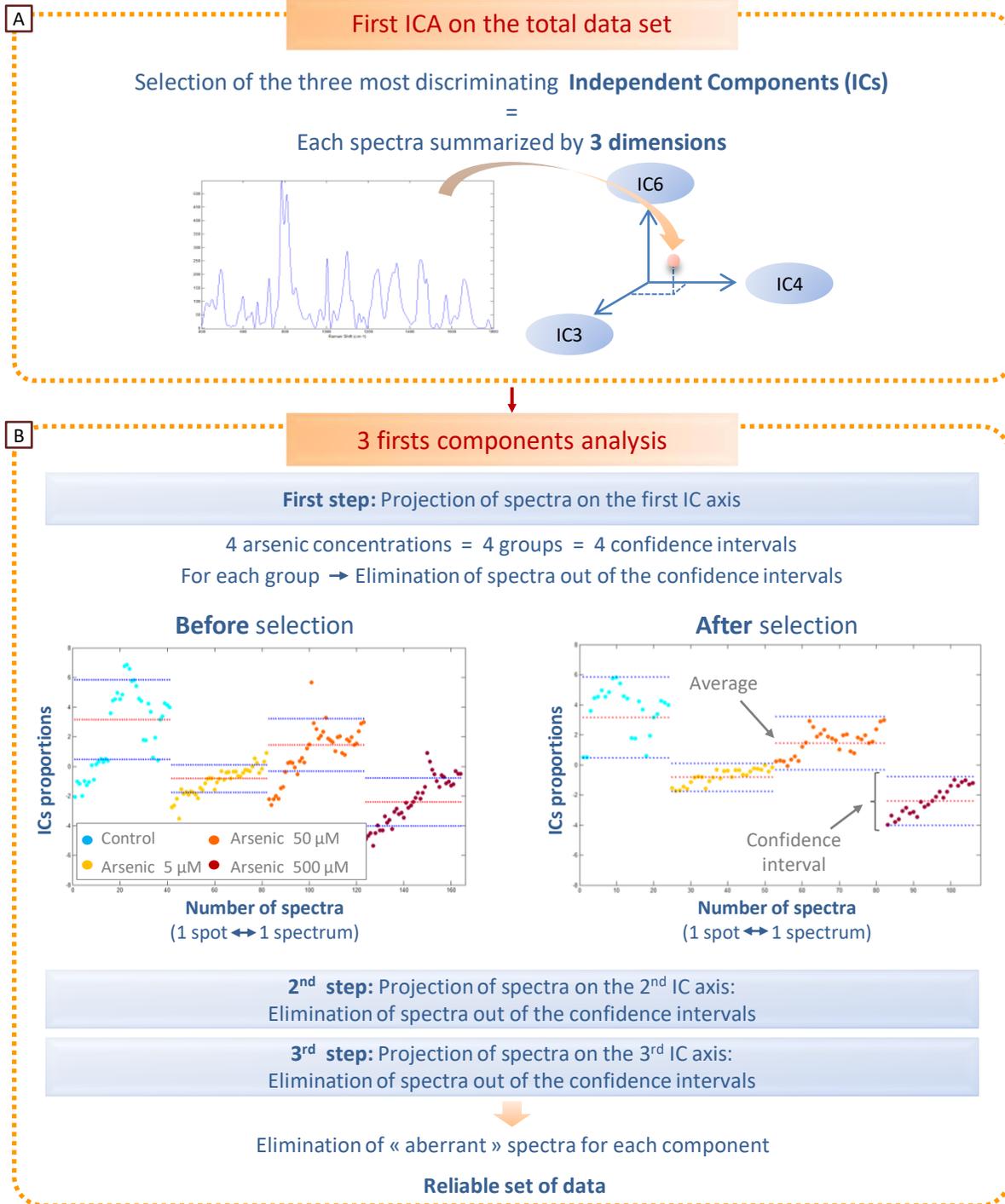


Figure 27 – Illustration of the “aberrant” spectra elimination strategy.

A) A first ICA was performed on the total dataset. Each spectrum is summarized by the 3 most discriminant components. B) The scores of the 3 selected components were analyzed separately. A confidence interval was calculated component by component for each group of spectra. These intervals correspond to the mean of the proportions from which the corresponding standard deviation was added or subtracted. If the proportion of a spectrum is outside the confidence interval of one or more of the 3 ICA components, it is considered as “aberrant” and eliminated.

As a first step, the ICA that was performed on all the acquired spectra reduced the dimension of the dataset: the main extracted signals from the initial matrix of spectra have been captured in 8 Independent Components (ICs). For the second step of the selection strategy, the three selected ICs among the most discriminant (here IC3, IC4, and IC6) were analyzed separately (Figure 27A): for each IC, the average and standard deviation of the proportions were calculated for each group of spectra. The upper and lower acceptability limits were then set by, respectively, adding and subtracting the corresponding standard deviation to each average (Figure 27B). As a consequence, for each IC a spectrum which proportion falls outside of the confidence interval corresponding to its arsenic concentration can be statistically considered as “aberrant” based on the considered component: it does not fit with the “signature” of its group of spectra. At the end of the selection process, only the spectra that were found statistically acceptable for all three components were selected.

A second ICA was performed at the end of the selection process (Figure 26B). Only the spectra that were deemed reliable were considered. In contrast to the previous results, the spectra corresponding to each arsenic concentration appear in four well-separated groups. With a success rate greater than 98% for all groups, there is a significant improvement of the spectra classification. Those results highlight the efficiency of this spectra selection procedure and demonstrate that despite the traditional pre-processing steps for the elimination of the instrumental and random variations, some aberrant spectra may remain non representative of their group. Impacted by the intrinsic or biological variability, these spectra skew the classification model and should be eliminated. That is why removing outliers through a data quality control has been identified as essential for data analysis. Several methods exist but commonly use statistical criteria based on the variance of the data, usually by excluding spectra too far from the mean (or median) or according to a signal-to-noise ratio <sup>93,114</sup>. However, considering the subtlety of the variations that must be highlighted in the view of toxic effects detection, these criteria are not optimal with regards to extracting characteristic signals of biological phenomena. The main advantage of the ICA strategy is that by defining the acceptability thresholds on the use of IC proportions, the conservation or elimination of spectra is based on the analysis of a given and identified “source-signal” (i.e., significant Raman band). This is in contrast with the methods using the global variability or that follow a maximum variance direction (as PCA proceeds) to detect outliers. That way, the selection of spectra is expected to be more consistent with actual cellular chemical modifications and allows a physiological interpretation of the arsenic impact on the cells. Furthermore, distinct acceptability limits are calculated for each condition. In other words, the variability that is induced by each experimental condition is separately considered in the evaluation process of the toxic effects.

### 2.3.3.OBSERVATION OF THE ARSENIC IMPACT ON THE CELL THROUGH RAMAN MULTIPARAMETRIC TOXICITY ANALYSIS

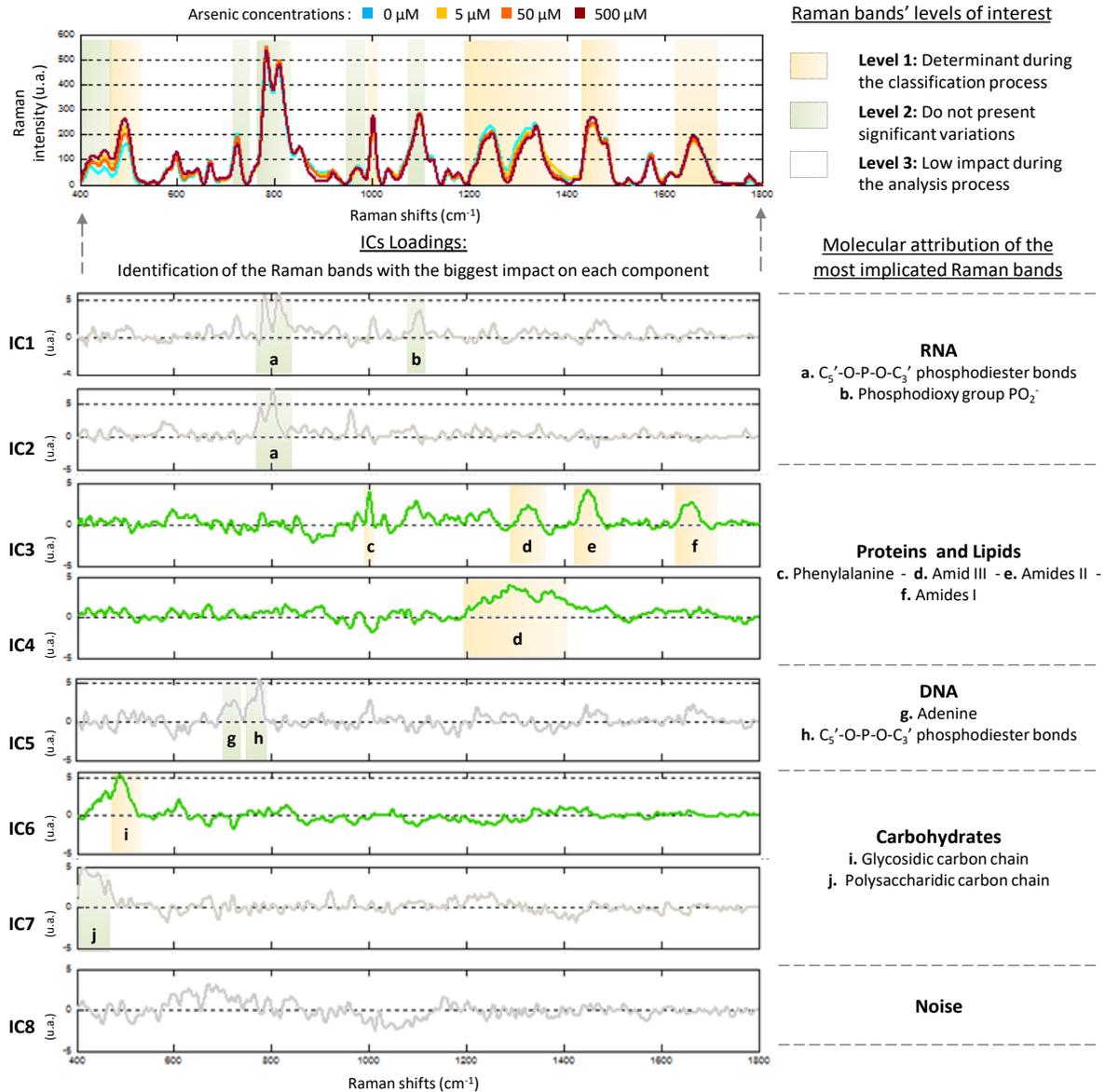


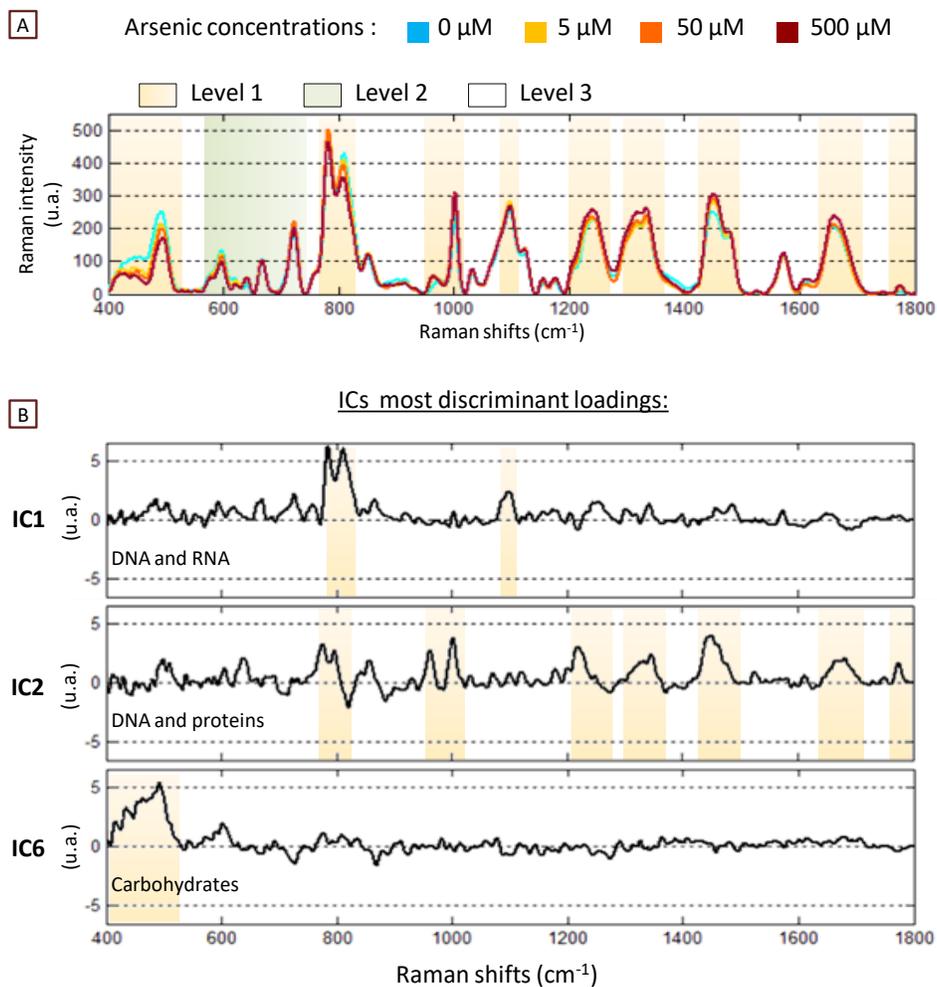
Figure 28 – Spectra toxic signature of a 40 min exposure to arsenic.

A) Average Raman spectra that were obtained after 40 min of exposure to the four tested arsenic concentrations. The Raman bands have been highlighted according to their level of interest in the classification process, defining a “spectral signature” of the arsenic effect on the bacteria. B) Loadings of the 8 ICA components. The most discriminant components (IC3, IC4 and IC6) are highlighted in bold. The profile of each component is characteristic of the contribution of specific cellular components. The Raman bands that have a strong contribution on the most discriminant ICs correspond to the macromolecules that are the most impacted by the toxicity.

The main advantage of using Raman spectroscopy as an observation method for bioassays and biosensors is the analysis of a multiparametric signal rather than the monoparametric measurements that are traditionally obtained with other techniques. Importantly and as mentioned before, the ICA procedure allows a chemical interpretation of the results. Indeed, by analyzing the ICs “profiles” (referred to as loadings), it is possible to observe that they separately represent “source-signals” corresponding to the main biopolymers that are found in the cells (Figure 28B)<sup>81,107</sup>. For example, the first two loadings (IC1 and IC2) are mainly impacted by the RNA contribution, while IC3 and IC4 show the typical profile of proteins. However, not all of the ICs allow for spectra classification, as some are more discriminant than others. Consequently, through the study of IC loadings according to their discriminating power, it is possible to classify the different areas of the spectra depending on their pertinence in the detection of the toxicity effects.

Three levels of interest have been defined and highlighted on the spectra, characterizing the 40 min “spectral signature” of the arsenic effects (Figure 28A). The Raman bands of level 1 are identified by their high contribution on the loadings of the most discriminant ICs (IC3, IC4, and IC6, highlighted in bold on Figure 28B). Determinant during the classification process, they illustrate that the toxicity impact is significant on the related biomolecules. Among these molecules, the Raman band between 465 and 525  $\text{cm}^{-1}$  corresponds to the carbohydrate molecules that are present on the surface of the bacterial strains<sup>85</sup>. Variations could be linked to the production of specific membrane transporters for the evacuation of the toxic compounds or to the accumulation of arsenic on the bacterial cell wall. The bands corresponding to amides III (1200-1400  $\text{cm}^{-1}$ ) also have a strong impact on the classification; their intensities decrease with the increase in arsenic concentration, which could correspond to a denaturation phenomenon or to the decrease of protein production accompanying cell growth slowdown<sup>89,106</sup>. Finally, the bands that are attributed to phenylalanine (1000  $\text{cm}^{-1}$ ), amides II (1400-1520  $\text{cm}^{-1}$ ) and amides I (1625-1700  $\text{cm}^{-1}$ ) can also be classified in level 1; their intensities increase only with the highest arsenic concentration, explainable by a denaturation of proteins that would provoke over-exposition or discharge of the corresponding molecules. This phenomenon has been described in the literature as the observation of a lethal effect<sup>107</sup> and is consistent with the respiration test, which showed that a 40 min exposure to 500  $\mu\text{M}$  of arsenic provoked a significant inhibition. In contrast, level 2 corresponds to Raman bands having a strong impact on ICs that are not as discriminant. In other words, the corresponding cellular components have been identified during the analysis process but are not significant for the classification. The bands that are attributed to DNA (785  $\text{cm}^{-1}$ ) and RNA (810  $\text{cm}^{-1}$ ) can be classified at this level, showing that the effect of a 40 min exposure to arsenic is not visible on these molecules. Finally, some Raman bands do not

significantly appear on the loadings of any components, have a very low impact during all analyses and are thus classified in the third level of interest.



**Figure 29 - Spectra toxic signature of a 90 min exposure to arsenic.**

A) Average Raman spectra that were obtained after 90 min of exposure to the four tested arsenic concentrations. The Raman bands have been highlighted according to their level of interest in the classification process. The defined “spectral signature” is different from that obtained after only 40 min of exposure to the metal. It shows the exposure time effect of the arsenic on the bacteria. Furthermore, the molecules that were identified as the most impacted by the toxicity are consistent with regard to the expected arsenic toxicity mechanisms. B) Loadings of the 3 most discriminant ICA components. These components are not impacted by the same cellular components than those observed for the experiment with a 40 min exposure time.

Following the first arsenic exposure tests, the same experiment has been repeated by increasing the exposure time to 90 min. The three most discriminant ICs resulting from the ICA analysis are shown in Figure 29 (IC1, IC2 and IC6). As observed on the 40 min experiment, these ICs are strongly impacted by the protein and carbohydrate contributions (IC2 and IC6). In addition, IC1 and IC2 also show the characteristic profiles of DNA and RNA meaning that, in contrast to what is observed on the 40 min spectra, these

Raman bands can be classified in the first level of interest. The intensity of the band attributed to RNA ( $810\text{ cm}^{-1}$ ) decreases with the increase in arsenic concentration, consistent with the decrease in cell activity due to arsenic toxicity<sup>98,108</sup>. Another band ( $1100\text{ cm}^{-1}$ ) that corresponds to phosphodioxy groups  $\text{PO}_2^-$  and is also characteristic of nucleic acids was classified in level 2 in the 40 min exposure test but has been upgraded to level 1 after 90 min. These results are particularly interesting because arsenic is a structural analog of phosphate and damages DNA by breaking the phosphate bonds<sup>130,131</sup>. Consequently variations in this band could represent a specific marker of this arsenic toxicity mechanism. Finally, also classified in level 1, the band at  $1776\text{ cm}^{-1}$  corresponds to ester C=O bonds, highlighted in the literature because it could be linked to the accumulation of poly- $\beta$ -hydroxybutyrate. Known as a reserve of nutrients by prokaryote organisms, its accumulation would be a reaction to stressful conditions<sup>132</sup>. Thus, the spectral variations are coherent with the expected toxicity effects. The “spectral signatures” that were obtained after 40 and 90 min of exposure are different and allow characterization of arsenic toxicity. Only the early effects appear highlighted in the 40 min fingerprint. Indeed, this exposure time is shorter than the cellular division time recorded in this study and probably not long enough to observe all of the toxicity phenomena. In contrast, the late effects are visible through the 90 min “signature”. On the other hand, it is also important to notice that with a longer time of exposure, the number of “level 1” Raman bands increases. These results support the likelihood that a longer exposure leads to more pronounced effects.

### 3. CONCLUSION

Thus, the identification of the Raman bands that are decisive during calculations enables us to identify the physiological changes and to characterize the bacterial responses to the arsenic exposure. In addition, the “spectral signatures” that were obtained for the 40 and 90 min arsenic exposures differ and are in accordance with the expected toxic effects. They allowed characterization of both the dose-response and the exposure-time effects of the metal. Furthermore, the selection step that was designed in this study permitted a significant improvement of the spectra classification according to the arsenic concentrations. The ICA calculation has already been exploited in other biosciences fields<sup>76,112,133–135</sup>. However, its particular application in the scope of this work showed crucial benefits for the extraction of specific signals which is a central issue in regards of the complexity of linking the observed spectral variations with the physiological phenomena. It allowed us to take advantage of the multiparametric aspect of the Raman spectroscopy measurements by splitting up the global signal according to the contribution of the different cell components. These, results encourage the use of Raman spectroscopy for the monitoring or detection of toxic elements. The “spectral signature” approach could improve the sensitivity and specificity in

detection and complete the results that are obtained with traditional biosensor techniques. By opening the access to several biological parameters it offers new perspectives in contrast with the traditional monoparametric measurement techniques applied for environmental applications. In the future, additional research must be carried out to extend these results to other substances and microorganisms.

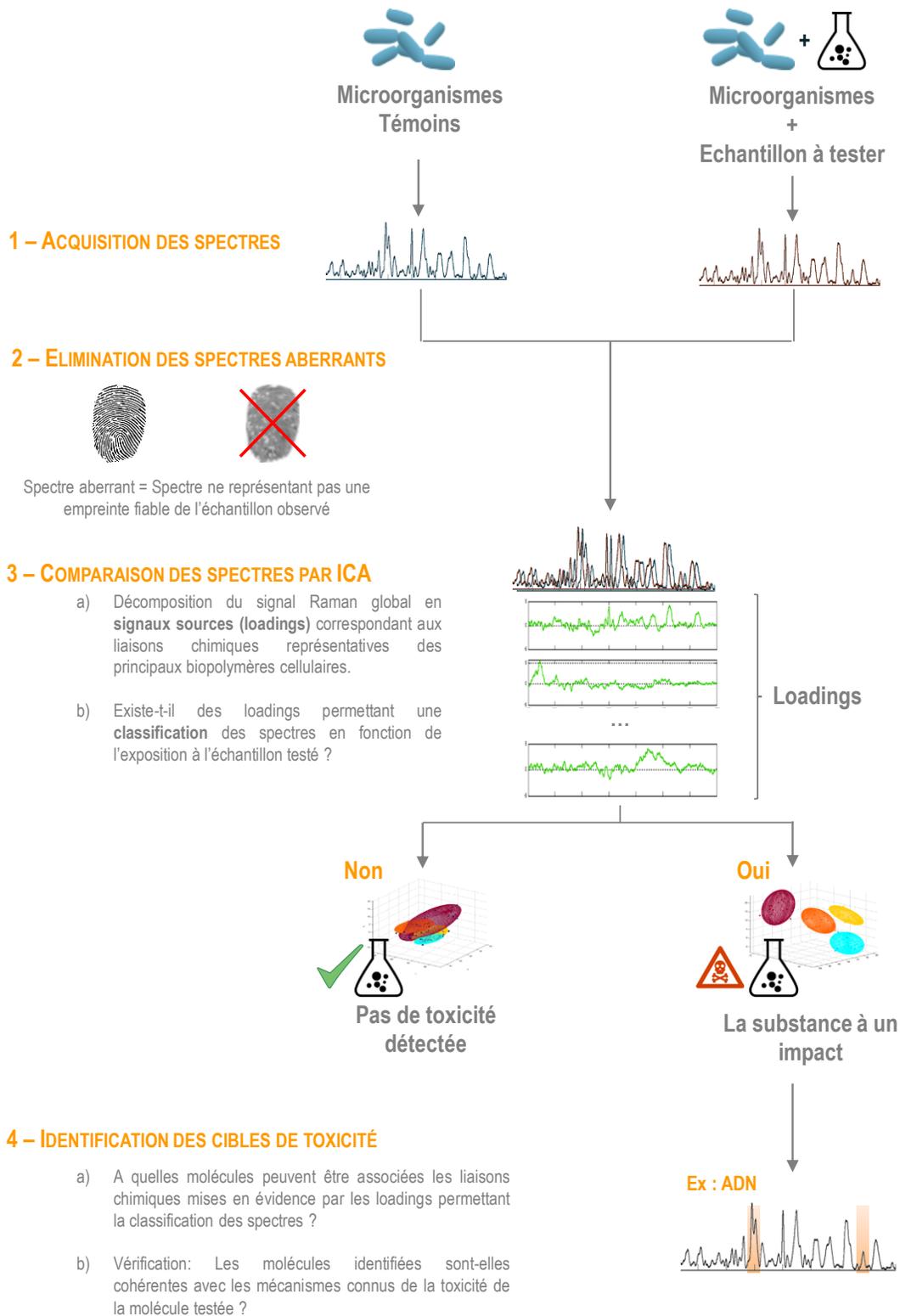


Figure 30 – Illustration de la stratégie globale de caractérisation de la toxicité par spectroscopie Raman



# CHAPITRE IV :

## DES ESSAIS DE TOXICITE GLOBALE A LA SPECIFICITE DE SIGNATURES SPECTRALES MULTIPARAMETRIQUES



## 1. OPTIMISATION DU MODE OPERATOIRE

### 1.1. PREAMBULE : DEFINITION DU CADRE D'ANALYSE

Les résultats d'observation des effets de l'arsenic sur la bactérie *Escherichia coli* ont confirmé la possibilité d'une mise en évidence de la toxicité par spectroscopie Raman. L'utilisation d'outils chimiométriques est cependant indispensable pour une analyse fine de l'information contenue dans les spectres. La stratégie d'analyse élaborée a permis non seulement d'améliorer les performances de classification des spectres en fonction des concentrations d'exposition au métal, mais aussi de mettre en évidence les bandes Raman les plus impactées par cette toxicité. En exploitant le lien qui existe entre ces bandes et la composition moléculaire du microorganisme étudié, les variations spectrales observées sont interprétables afin d'identifier les cibles métaboliques de la toxicité ou tout au moins, dans une stratégie de screening pour orienter un diagnostic d'effet. En effet, comme explicité au cours du chapitre précédent, les résultats obtenus permettent de mettre en évidence les bandes ayant été les plus significatives lors du processus de classification des spectres par rapport aux spectres témoins. De plus, elles semblent correspondre à des éléments du métabolisme associés à des mécanismes connus de la toxicité de l'arsenic. On établit ainsi une « signature spectrale » des effets de la toxicité du métal sur la bactérie.

Dans la suite de ces travaux de thèse, nous nous sommes attachés à vérifier la spécificité de cette signature. Outre l'observation de variations témoignant de l'impact général de la toxicité sur le métabolisme bactérien, les modifications observées sur les spectres sont-elles assez précises pour obtenir des signatures significativement distinctes en fonction d'effets toxiques différents ? En effet, les rares études réalisant une comparaison simultanée des effets de plusieurs substances se limitent à l'observation de différentes familles d'antibiotiques et n'identifient que peu les corrélations qui peuvent exister entre les variations spectrales observés et les effets physiologiques réels (Cf. Chapitre 1 § 3.3.3). L'objectif est ici de confronter ces résultats encourageants à d'autres catégories de composés afin de vérifier l'existence de signatures spectrales associables à différents types d'impacts toxiques. Quatre substances chimiques ont donc été choisies pour répéter à partir de molécules aux effets variés les tests déjà réalisés sur l'arsenic. La norfloxacine, le cuivre ( $\text{CuSO}_4$ ), le diuron et le 3,5-dichlorophénol (DCP), sont sélectionnés pour leur appartenance à différentes classes de polluants fréquemment retrouvés dans l'environnement (Tableau 19). Un premier axe de recherche s'attache ainsi à explorer les performances de spécificité offertes par la dimension multiparamétrique de la spectroscopie Raman. **En d'autres termes, les**

spectres Raman d'un microorganisme donné sont-ils impactés de manière spécifique en fonction des substances auxquelles il est exposé ?

**Tableau 19 - Caractéristiques des quatre substances toxiques choisies pour l'étude.**

SUBSTANCE	CATEGORIE	SOURCES ET OCCURRENCE ENVIRONNEMENTALE
<b>Norfloxacine</b> 70458-96-7	Antibiotique de type quinolone de 2 <sup>ème</sup> génération	Les quinolones se trouvent en 4 <sup>ème</sup> position des antibiotiques les plus consommés en France. Principalement employée pour le traitement des infections urinaires, la norfloxacine en est l'une des molécules les plus utilisées. Bien que globalement éliminée par les STEP's cette molécule reste largement présente dans les eaux de surface françaises à des concentrations allant de 1 à près de 200 ng.L <sup>-1</sup> 136.
<b>Diuron</b> 330-54-1	Herbicide	D'abord interdit en 2007 avant d'être ré autorisée en 2008 suite à la décision 2009/91/CE, le diuron est présent dans 77% des eaux de station d'épuration européennes. Il reste cependant considéré comme nocif et fait partie des listes de substances dangereuses dont l'utilisation doit être progressivement interdite. En 2014 il était toujours retrouvé dans les eaux de sortie de STEP à des concentrations allant de 0.002 à 2.53 µg.L <sup>-1</sup> 4.
<b>3,5-dichlorophénol</b> 591-35-5	Dichlorophénol	Les dichlorophénols sont utilisés comme intermédiaires de synthèse notamment dans la fabrication d'herbicides et d'antiseptiques. Dans la nature, leur présence est essentiellement anthropique. On les retrouve en majorité dans les eaux de surface provenant de la chloration des eaux usées, de l'eau de boisson ou de l'incinération des ordures ménagères <sup>137</sup> . Il est utilisé comme toxique de référence dans plusieurs normes d'évaluation de la toxicité environnementale (Ex : NF EN ISO 11348 – Détermination de l'effet inhibiteur d'échantillons d'eau sur la luminescence de <i>Vibrio fischeri</i> – Concentration de référence 6 mg.L <sup>-1</sup> pour une inhibition attendue de 20 à 80% en 30 min).
<b>Cuivre (CuSO<sub>4</sub>)</b> 7758-99-8	Métal Lourd	Très largement utilisé de manière industrielle pour la fabrication de matériels électriques, dans la plomberie, les équipements industriels, l'automobile... De manière plus spécifique, il entre notamment dans la composition d'herbicides et de fongicides. Bien que les données expérimentales démontrent une toxicité pour les organismes aquatiques à des concentrations souvent largement inférieures, la valeur seuils fixée par la réglementation pour les eaux de consommation est de 2 mg.L <sup>-1</sup> 138.

En parallèle, un deuxième axe est consacré à l'évaluation du potentiel représenté par l'élargissement de cette stratégie à l'analyse simultanée de plusieurs microorganismes. **En d'autres termes, l'analyse**

simultanée de plusieurs modèles cellulaires permet-elle un gain d'informations conduisant à une amélioration de la spécificité d'analyse ? Intuitivement positive, la réponse à cette question est confirmée dans d'autres domaines d'analyses. Par exemple dans le cadre de la détection des métaux par biocapteurs déjà évoquée précédemment<sup>47</sup>, mais aussi dans le domaine de la détection par nez ou langue électroniques dont les performances sont souvent obtenues grâce à leur architecture regroupant un large panel de récepteurs différents permettant d'en surpasser les limites individuelles de sensibilité et de spécificité<sup>139</sup>. De plus, comme développé dans le paragraphe 2.2.1 de l'étude bibliographique il apparaît en effet indispensable de ne plus uniquement observer des organismes isolés mais de les multiplier afin d'obtenir une meilleure représentativité environnementale.

**Tableau 20 - Caractéristiques principales des microorganismes de référence choisis pour l'étude**

MICRO-ORGANISME	CARACTERISTIQUES	REMARQUES
<i>Escherichia coli</i> (NR698)	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Bactérie GRAM -</li> <li>- Souche NR698 mutée <sup>117</sup>; <i>araDl39,Δ(lac)U139,stra,thi,imp4213</i></li> <li>- Taille : 0,5 à 3 μm</li> </ul>	<p>Model cellulaire Tronico VigiCell. Les mutations dont elle est affectée lui confèrent une perméabilité de la membrane la rendant particulièrement sensible aux antibiotiques. Cette caractéristique est intéressante dans une optique d'abaissement des limites de détection.</p>
<i>Bacillus sub. sub.</i> (CIP 5265)	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Bactérie GRAM +</li> <li>- Souche sauvage</li> <li>- Taille : 2 à 4 μm</li> </ul>	<p>Les modèles cellulaires Tronico VigiCell n'incluent pas de bactérie GRAM+. Il nous semblait pourtant intéressant d'intégrer ce type de microorganisme à l'étude. Par souci de simplicité et de représentativité la souche choisie et une souche sauvage classique.</p>
<i>Chlamydomonas Reinhardtii</i> (WTS)	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Algue unicellulaire</li> <li>- Souche sauvage</li> <li>- Taille : 10 μm</li> </ul>	<p>Model cellulaire Tronico VigiCell qui l'utilise comme référence des organismes photosynthétiques.</p>
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> (ATTCC 9763)	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Levure</li> <li>- Souche sauvage</li> <li>- Taille : 6 à 12 μm</li> </ul>	<p>Model cellulaire Tronico VigiCell classiquement utilisé comme référence des organismes eucaryotes non photosynthétiques.</p>

Les bénéfices de cette approche sont quotidiennement exploités par l'entreprise TRONICO VIGICELL qui lors de ses prestations d'analyse de l'eau propose un panel de bio-essais regroupant plus d'une trentaine de tests différents, destinés à représenter une diversité biologique aussi vaste que possible (bactéries, algues, champignons, cellules humaines)<sup>140</sup>. C'est donc naturellement en concertation avec l'entreprise et sur la base de leur panel, que quatre microorganismes sont sélectionnés pour les travaux de cette thèse.

On y retrouve deux bactéries (Gram - et Gram +), une algue et une levure permettant de balayer différentes familles métaboliques (Tableau 20). Les performances des dispositifs multicateurs apparaissent en effet liés non seulement au nombre de capteurs étudiés mais surtout à leur non équivalence permettant d'augmenter le spectre des phénomènes observés<sup>141</sup>. Par la multiplication des capteurs biologiques, l'objectif est ainsi de déterminer le potentiel informatif d'analyses Raman non seulement multiparamétrique mais aussi multicellulaire avec pour principal challenge une réflexion sur les moyens de comparaisons et d'exploitation des réponses les unes par rapport aux autres.

## 1.2. MILIEUX DE CULTURE ET CONTRAINTES OPERATOIRES

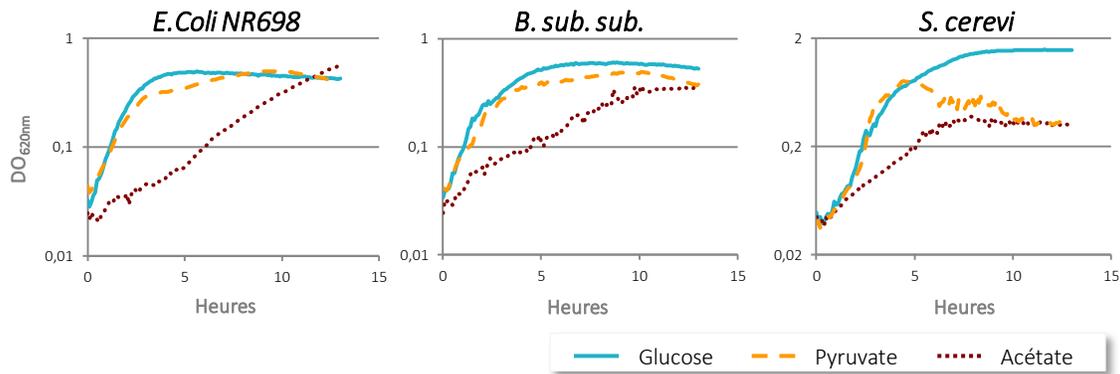
La grande sensibilité de la spectroscopie Raman permet la collecte d'un signal dont la richesse est indispensable à la mise en évidence des phénomènes de toxicité. Cependant, en exacerbant aussi l'impact de la variabilité expérimentale cet atout peut du même coup se transformer en obstacle. C'est pourquoi les protocoles d'acquisition des spectres, mais aussi de culture des microorganismes doivent être élaborés afin de minimiser cette variabilité. Des études montrent en effet que pour un microorganisme donné des différences significatives apparaissent sur les spectres en fonction de la composition des milieux de culture sur lequel il est cultivé. Encore plus subtilement, des variations sont aussi observables lorsque les milieux sont identiques mais de marques ou même de lots différents<sup>109-111</sup>. Cette variabilité s'explique notamment par la nature des milieux riches traditionnellement utilisés. En effet, les composés dont ils sont constitués sont souvent issus de matières premières biologiques (hydrolysats de protéines d'origines animales, laitières ou végétales, levures...) dont la composition moléculaire précise présente une variabilité intrinsèque<sup>a</sup>.

Pour pallier à cette problématique un des premiers enjeux de cette étude a été de concevoir un milieu de culture synthétique à la composition maîtrisée. De plus, l'objectif à long terme étant que ces travaux aboutissent à l'élaboration d'un système opérationnel en conditions de routine industrielle, l'ensemble des modes opératoires ont été élaborés dans un souci de simplification des étapes expérimentales. Dans cette optique en plus d'une composition maîtrisée, il était aussi avantageux que le milieu de culture final permette une croissance satisfaisante de l'ensemble des microorganismes (bactéries et levure).

---

<sup>a</sup> Des analyses physico-chimiques réalisées au laboratoire dans le cadre d'un autre projet de recherche ont montré que d'importantes variations pouvaient exister en fonction des fournisseurs, notamment en ce qui concerne les profils d'acides aminés (CBAC - Assaf *et. al*).

Sa composition est basée sur l'utilisation de *Yeast Nitrogen Base* (YNB) qui contient de manière synthétique une source d'azote, des vitamines, des sels et des oligo-éléments. Commercialisé sous forme de poudre par la société DIFCO, sa composition est garantie par le fournisseur (Cf. Matériels & Méthodes – paragraphe 4.1.1).



**Figure 31 – Elaboration d'un milieu de croissance synthétique : Essais sur la source de carbone.**  
**Courbes de croissance réalisées en milieux YNB avec un apport de 2 g.L<sup>-1</sup> de carbone fourni par du glucose, du pyruvate ou de l'acétate. Pour les bactéries le pH est ajusté à 6,8 par l'ajout d'un tampon phosphaté.**

La source de carbone est apportée par du glucose, plus favorable à la croissance des bactéries et de la levure que l'acétate et le pyruvate (Figure 31). Les concentrations finales sont de 10 g.L<sup>-1</sup> pour les pré-cultures et de 5 g.L<sup>-1</sup> pour les cultures. Elles correspondent à un apport de respectivement 2 et 4 g de carbone par litre et ont été déterminées avec pour objectifs de limiter l'excès tout en permettant d'atteindre rapidement une biomasse suffisante pour les essais. En effet, avant la réalisation des tests de toxicité et des essais Raman, la biomasse produite doit être lavée afin d'éviter les impuretés pouvant biaiser l'analyse. Tout glucose non consommé représente un déchet supplémentaire que les lavages devront éliminer. Par ailleurs, classiquement utilisé pour la sélection des levures sur la base de leurs besoins en acides aminés, le milieu YNB n'en contient pas de manière initiale. C'est pourquoi il est complété par un mélange de supplémentation complet commercialisé par la société Formedium (Complete supplementation mixture (CSM)). Pour finir, une fois le milieu préparé son pH est d'environ 5,3 ce qui convient à la croissance de *S. cerevisiae* mais est trop acide pour celles d'*E. coli* et *B. subtilis*. Un tampon phosphaté permet donc d'ajuster cette valeur à 6,8 dans le cas de la croissance des bactéries. Le milieu ainsi élaboré permet d'atteindre la phase exponentielle de croissance ainsi qu'une biomasse suffisante pour les essais Raman dans une fenêtre de temps restreinte et homogène qui permet une harmonisation du protocole pour l'ensemble de ces trois microorganismes (Figure 32).

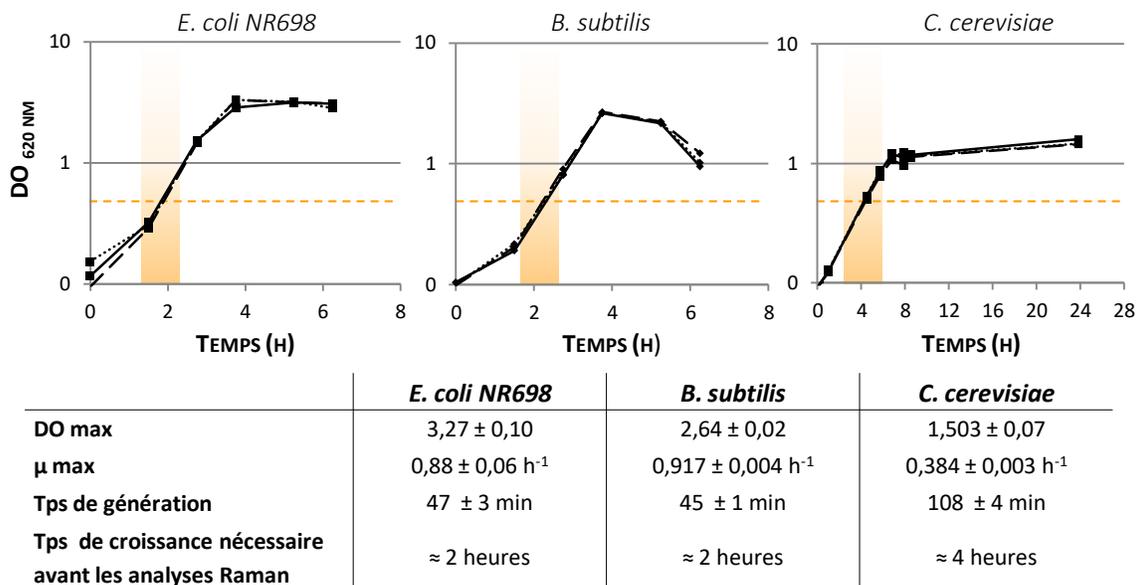


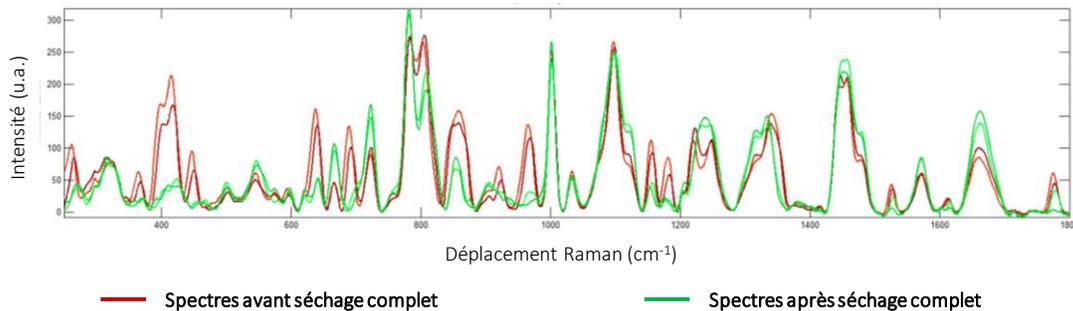
Figure 32 - Caractérisation de la croissance d'*E. coli* NR690, *B. subtilis* et *C. cerevisiae* dans le milieu de croissance synthétique élaboré pour l'étude (Cultures réalisées en erlenmeyer de 250 mL contenant 50 mL de milieu. 30°C – 250 rpm).

Ce travail d'élaboration d'un milieu synthétique n'a pas été nécessaire pour l'algue *R. reinhardtii* dont la culture s'effectue déjà habituellement dans un milieu maîtrisé (Cf. Chap.2 § 4.2.1). Cependant, avec un temps de répliation de l'ordre de 8h en phase exponentielle, son protocole de culture et de production de biomasse a dû être adapté afin de permettre un rythme d'analyse suffisant pour le bon déroulement de l'étude. Aussi, au lieu de lancer de nouvelles cultures pour chacune des analyses, l'algue est maintenue en phase exponentielle de croissance par repiquages successifs. Un bon potentiel de répliation nécessaire aux analyses est ainsi garanti (Cf. Chap.2 § 4.2.3).

### 1.3. QUALITE DES SPECTRES

Outre la maîtrise de la composition des milieux et l'obtention d'une croissance satisfaisante des microorganismes, il s'agissait lors de l'élaboration des protocoles de s'assurer de la qualité des spectres Raman qu'ils permettent d'obtenir. Pour l'évaluer, le principal critère réside en leur reproductibilité, mesurée grâce au coefficient de corrélation moyen des spectres les uns par rapport aux autres. Celui-ci est calculé à partir de spectres témoins de microorganismes non exposés aux substances testées. Comme déjà évoqué, les conditions de cultures influent sur l'empreinte moléculaire des cellules et donc sur leur spectre Raman. D'autres paramètres tels que les étapes de préparation juste avant l'acquisition des spectres peuvent aussi impacter leur qualité. Préalable à l'acquisition, le temps de séchage des dépôts de microorganismes revêt par exemple une importance particulière. Des essais réalisés notamment sur *B.*

*subtilis* montrent qu'un temps de séchage trop court conduit à une diminution notable de la reproductibilité des spectres et à une importante variabilité des bandes Raman (Figure 33). C'est pourquoi initialement établi à 20 min, le temps de séchage est finalement fixé à un minimum de 40 min sous hotte à flux laminaire. Ces conditions d'acquisition permettent d'obtenir des taux de corrélation moyens de  $99,93 \pm 0,002\%$  et  $99,61 \pm 0,3\%$  pour *E. coli* et *B. subtilis* respectivement.



**Figure 33 – Exemple de spectres Raman de la bactérie *B. subtilis* obtenus avant et après séchage complet du dépôt. (785 nm – 100 mW – Excitation 8 s. – 5 Co-additions). Lorsque l'ensemble des spectres est considéré, le taux de corrélation moyen n'est que de  $95,98 \pm 0,2\%$ . Il grimpe à  $99,61 \pm 0,3\%$  lorsque seuls les spectres obtenus après séchage complet sont pris en compte.**

Par ailleurs dans un souci d'optimisation des protocoles visant le cas échéant à simplifier leur transfert vers un dispositif de biocapteur, l'utilisation d'une longueur d'onde excitatrice commune pour l'observation de l'ensemble des microorganismes est privilégiée. Les spectres Raman bactériens sont ainsi acquis grâce à un laser de 785 nm selon le protocole adapté d'Assaf *et al*<sup>142</sup>. Il correspond également à celui déjà optimisé pour l'observation des effets de l'arsenic sur la bactérie *E. coli* (Cf. Chapitre 3). Cependant, des tests réalisés sur l'algue *C. reinhardtii* ont montré que l'utilisation des mêmes paramètres pour l'acquisition des spectres algaux engendre un phénomène de fluorescence masquant le signal Raman. Des ajustements de la puissance du laser et de la durée d'excitation ont cependant permis de contrôler ce phénomène sans avoir à changer la longueur d'onde. Les spectres finalement obtenus présentent un coefficient de corrélation de  $98,95 \pm 0,68\%$ . Enfin une concession a malgré tout été nécessaire concernant l'observation de la levure *S. cerevisiae* pour laquelle une longueur d'onde excitatrice de 785 nm n'a pas permis d'obtenir une reproductibilité satisfaisante. En effet, une fluorescence du dépôt apparaît progressivement au court de l'acquisition engendrant une variabilité croissante des spectres dans la fenêtre 250-600  $\text{cm}^{-1}$ . Un tel phénomène n'apparaît plus en utilisant une longueur d'onde excitatrice de 532 nm et permet d'obtenir un taux de corrélation des spectres de  $99,06 \pm 0,4\%$  assurant une excellente reproductibilité.

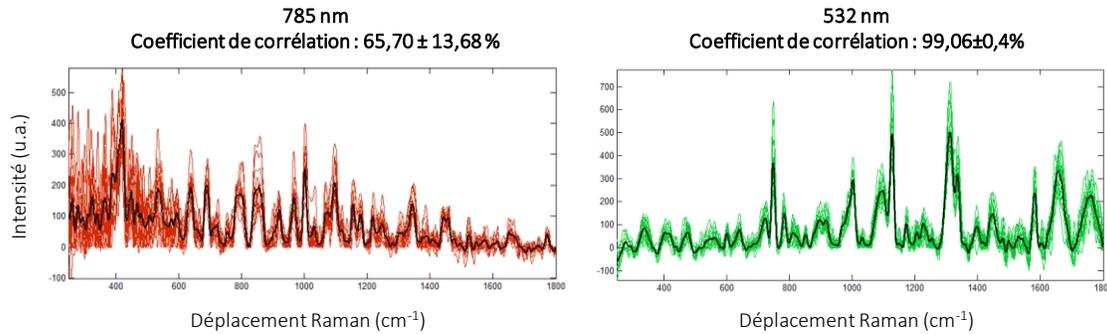


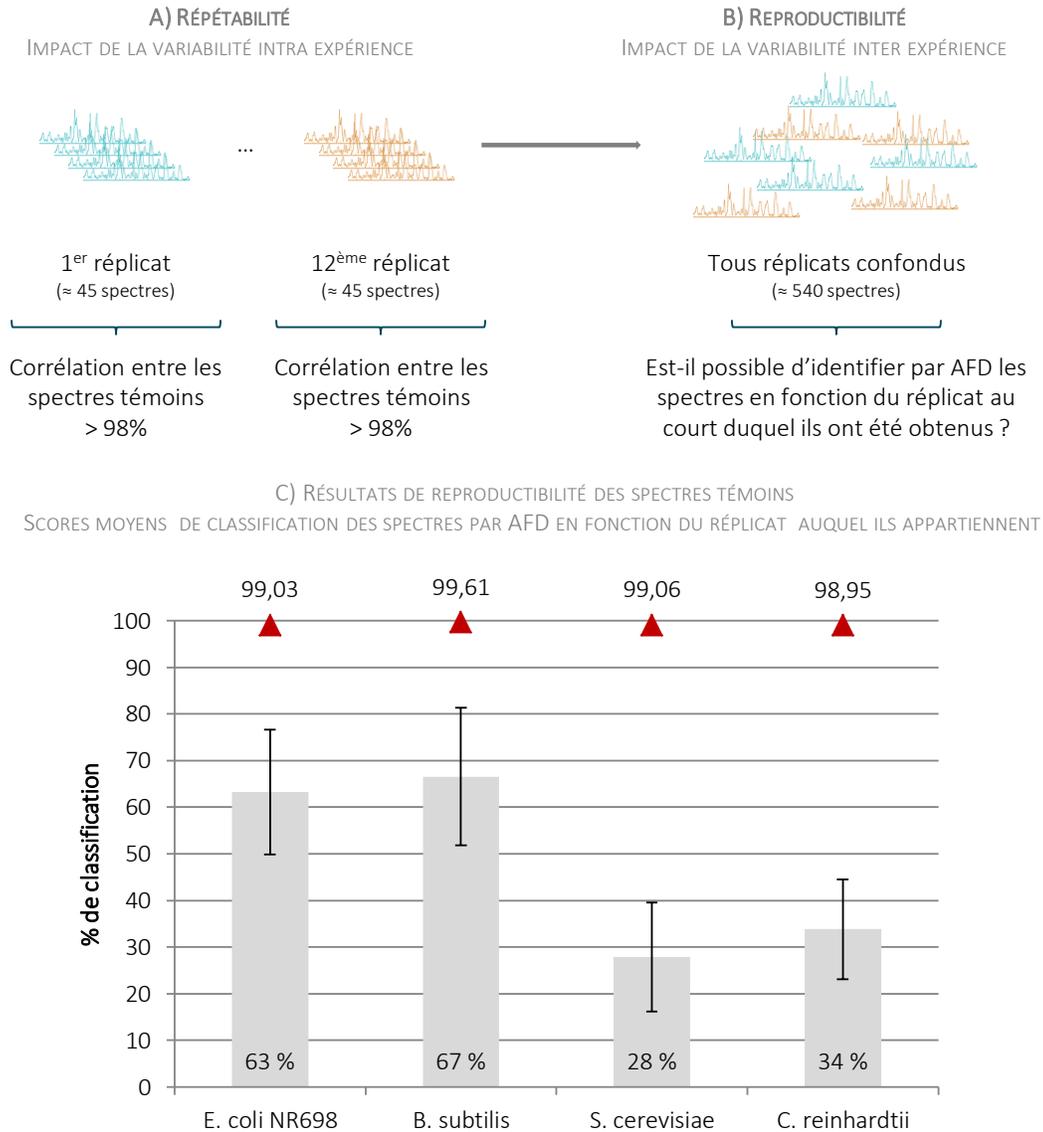
Figure 34 – Comparaison des spectres de *S. cerevisiae* obtenus grâce à une longueur d’onde excitatrice de 785 (100 mW – Excitation 8 s. – 5 Co-additions) et 532 nm (20 mW – Excitation 5 s. – 5 Co-additions). En noir les spectres moyens.

#### 1.4. SIGNIFICATIVITE DES VARIATIONS SPECTRALES

Les protocoles de culture des microorganismes et les modes d’acquisition des spectres décrits dans les paragraphes précédents permettent d’en optimiser la répétabilité. Celle-ci est indispensable devant la subtilité des variations spectrales à mettre en évidence. Le cas échéant, celles-ci résultent en effet de changements moléculaires causés par la toxicité des substances mais dont l’amplitude est infime à l’échelle de la cellule. Les variations recherchées se trouvent enfouies au sein de la richesse d’informations que fournissent les spectres Raman. Comme exposé plus haut les taux de corrélation obtenus pour les spectres témoins de chacun des microorganismes sont de l’ordre de 99% (Figure 35 A). Lorsque ces taux sont recalculés en incluant les spectres obtenus suite à l’exposition des microorganismes aux différentes substances, on constate qu’ils n’engendrent en moyenne que  $2,28 \pm 3,07$  % de variabilité supplémentaire. C’est dans cette fenêtre exigüe que se trouve la variabilité provoqué par une éventuelle toxicité et dont la significativité doit être évaluée.

Dans cette optique, des analyses factorielles discriminantes (AFD) sont utilisées pour évaluer la faisabilité de classification des spectres en différents groupes en fonction par exemple des différentes conditions d’expositions aux toxiques. Cet outil statistique utilise les deux premiers tiers des jeux de données pour élaborer un modèle de classification. Dans un deuxième temps, le dernier tiers des données est utilisé pour valider à l’aveugle la robustesse du model. Plus il existe de différences significatives, plus le model est robuste. Il doit alors permettre de classer correctement les spectres en fonction du groupe auquel ils appartiennent. Au contraire, en l’absence de variabilité, les scores de classification chutent. Afin d’évaluer la ligne de base des performances de classification de ce tests, des AFD sont réalisés sur les spectres témoins de chacun des microorganismes étudiés. Pour chaque espèce, un jeu de données de 540 spectres

témoins (c.à.d.: de microorganismes non exposés aux substances toxiques) systématiquement obtenus au cours d'une douzaine d'expériences différentes sont analysés (Figure 35 B). Le but est d'évaluer la capacité de l'AFD à les classer en fonction du réplicat d'expérience auquel ils appartiennent. Cela permet d'estimer l'impact de la variabilité inter expérience sur ces analyses (reproductibilité).



**Figure 35 – Scores de classification par AFD obtenus sur les spectres témoins.**

Pour chacun des microorganismes, un jeu de données de plus de 500 spectres obtenus au cours de 12 réplicats d'expériences différents est utilisé. Les triangles rouges rappellent les taux de corrélation moyens obtenus pour les spectres témoins de chacune des espèces.

S'agissant de spectres témoins dont la répétabilité est supérieure à 98%, de faibles taux de classification indiquant une répartition aléatoire des spectres étaient attendus. Pourtant, pour *E. coli* et *B. subtilis*, plus

de 60% des spectres sont correctement identifiés en fonction du réplicat d'expérience auquel ils appartiennent. Pour *S. cerevisiae* et *C. reinhardtii*, ces scores sont respectivement de 28 et 34 % (Figure 35 C). Ainsi, malgré une répétabilité des spectres de plus de 98%, l'utilisation d'AFD permet une identification des spectres en fonction de variations ne pouvant être attribuées qu'à une variabilité inter expérience (reproductibilité)<sup>a</sup>. Cela implique d'une part la nécessité d'analyser les résultats de chaque expérience séparément par rapport à leur témoins respectif, d'autre part que les impacts de la toxicité sur les spectres ne pourront être validés par AFD, qu'à condition d'engendrer une variabilité, et donc des scores de classification supérieurs à ceux obtenus en moyenne lors de l'analyse des réplicats des spectres témoins. Pour en assurer la significativité, les seuils fixés correspondront pour chaque espèce au score moyen de classification obtenus lors de l'analyse des spectres témoins, additionnés de l'écart-type (Par exemple, supérieurs à  $63 \pm 13\%$  pour *E. coli* NR698 (Figure 35)).

Par ailleurs la classification des spectres en fonction du réplicat apparait deux fois plus précise pour les bactéries ( $\approx 60\%$ ) que pour la levure et l'algue ( $\approx 30\%$ ). Ce résultat s'explique de par la richesse des spectres de chaque microorganisme. Celle-ci est évaluée en mesurant le coefficient de variation de chacune des bandes Raman. Les bandes pour lesquelles le coefficient est inférieur à 0,3 sont considérées comme stables et représentatives<sup>143</sup>. On constate alors que les spectres bactériens présentent un nombre de bandes représentatives environs deux fois supérieur à ceux de *S. cerevisiae* et *C. reinhardtii* comparativement constitués d'un nombre limité de bandes très intenses (Figure 36). Les bandes plus discrètes se trouvent alors noyées dans le bruit de fond qui empêche l'exploitation efficace de l'information qu'elles contiennent. En d'autres termes, le nombre de « critères » permettant la classification des spectres est en quelque sorte plus important, et peut expliquer une plus grande sensibilité de la mesure.

On note enfin que ces résultats sont probablement liés aux caractéristiques intrinsèques des microorganismes. Avec une taille moyenne généralement comprise entre 0,5 et 3  $\mu\text{m}$ , les cellules bactériennes sont beaucoup plus petites que celles de la levure (6 à 12  $\mu\text{m}$ ) ou de l'algue (10  $\mu\text{m}$ ). De plus la structure des bactéries est homogène et les spectres Raman obtenus peuvent en conséquence correspondre à l'obtention de la signature moléculaire des cellules dans leur ensemble et à la somme des contributions spectrales de l'ensemble des constituants cellulaires. A l'inverse, les levures de mêmes que

---

<sup>a</sup> La significativité de ces variations est aussi vérifiée par des analyses ANOVA et l'obtention d'une p-value  $< 0,05$  (Cf. Matériel et Méthode (§ 7.2)).

les algues, présentent des compartiments cellulaires différents tandis que leur taille est comparativement très grande par rapport au spot relativement petit du laser (de l'ordre d' $1\mu\text{m}$  de diamètre). Les spectres d'algue et de levure ne peuvent ainsi correspondre qu'à l'analyse des portions cellulaires englobées par le spot et sont en conséquence, en moyenne, moins riches<sup>144</sup>.

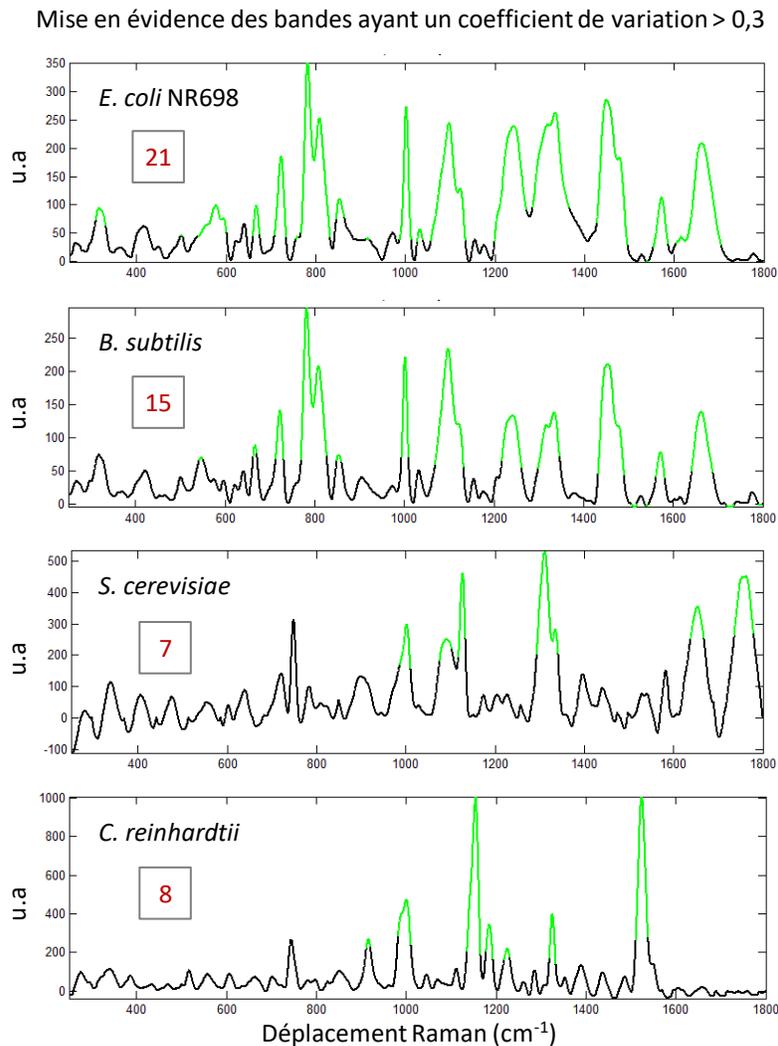


Figure 36 - Evaluation de la richesse des spectres par mesure du coefficient de variation des bandes Raman. Pour chaque spectre, les bandes ayant un coefficient de variation inférieur à 0,3 sont surlignées en vert. Leur nombre est indiqué sur chaque spectre.

## 1.5. CONSTITUTION DE LA BASE DE DONNEES

Pour constituer la base de données finale, chaque microorganisme a été exposé à trois concentrations de chacune des quatre substances étudiées. Des spectres Raman ont ensuite été réalisés avant d'être comparés à ceux obtenus en conditions témoins. Tout modèles cellulaires confondus, il en résulte une

banque de près de 7700 spectres dont la seule acquisition aura nécessité près de 600 heures de travail (Figure 37). Au préalable la toxicité de chacune des substances est évaluée sur chacun des microorganismes à l'aide de méthodes de référence. Des essais classiques d'inhibition de la croissance (suivi de la densité optique) et de la respiration cellulaire (conversion de la résazurine) ont donc été mis en œuvre. Leurs résultats seront exploités parallèlement aux données spectrales. Les spectres Raman obtenus sont ensuite analysés selon la méthode présentée au chapitre précédent. Pour rappel, une première étape consiste à éliminer les spectres dits « aberrants » qui ne représentent pas une empreinte fiable des microorganismes observés et biaisent l'analyse. Comme précédemment avec l'arsenic, l'objectif est ensuite de mettre en évidence à partir des spectres les effets physiologiques des substances étudiées. Il s'agit d'abord de classer les spectres en fonction des différentes concentrations testées. Si la substance est toxique, différents groupes représentatifs de l'effet dose-réponse de la toxicité doivent apparaître (Résultats d'AFD). Pour être jugés significatifs, les scores de classification devront être supérieurs à ceux provoqués par la variabilité expérimentale. Dans un deuxième temps, les bandes Raman ayant eu l'impact le plus significatif lors du processus de classement des spectres sont identifiées. Elles permettent de mettre en évidence au niveau moléculaire les principaux impacts de la toxicité et donc d'en identifier les cibles.

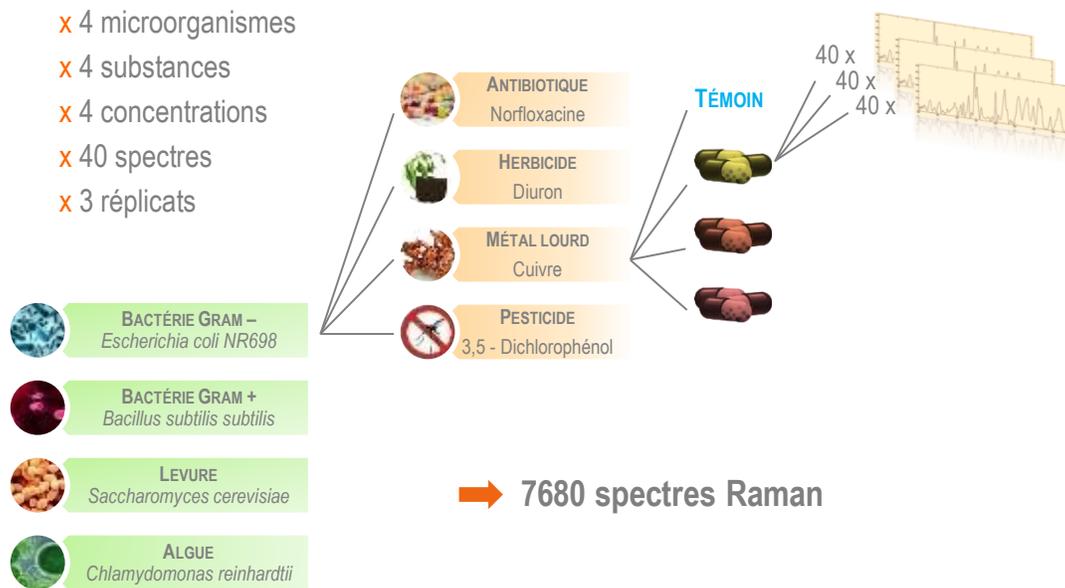


Figure 37 – Architecture de la base de données spectrale constituée pour l'étude des effets de la norfloxacin, du diuron, du cuivre et du 3,5-dichlorophénol sur les quatre microorganismes de l'étude (*E. coli NR698*, *B. subtilis*, *S. cerevisiae*, *C. reinhardtii*).

## 2. EFFETS DE LA TOXICITE SUR LES SPECTRES RAMAN D'*ESCHERICHIA COLI* NR698

Premier microorganisme observé, l'étude des spectres de la bactérie *Escherichia coli* NR698 sera utilisée pour exposer les détails du raisonnement d'analyse statistique appliqué au cours de cette étude. Basée sur l'utilisation d'outils tels que l'AFD (Analyse Factorielle Discriminante) et l'ICA (Analyse en Composantes Indépendantes), la démarche a pour but de mettre en évidence, de valider la significativité, et d'interpréter les variations spectrales éventuellement causées par la toxicité des substances auxquelles le microorganisme est exposé. Cette démarche est expliquée en détails étape par étape tout au long des deux sous parties à venir (traitants des effets de la norfloxacine et du  $\text{CuSO}_4$  sur les spectres de la bactérie *E. coli* NR698). Malgré un souci de pédagogie, il est possible que leur lecture soit fastidieuse. Cependant, une fois ces bases posées, le schéma de lecture restera le même sur la suite du document dont la lecture sera ainsi rendue plus fluide.

### 2.1. A CHAQUE SUBSTANCE SA SIGNATURE

#### 2.1.1. NORFLOXACINE

La toxicité de la norfloxacine sur *E. coli* NR698 est testée par inhibition de la respiration. Les résultats montrent que les concentrations croissantes provoquent une augmentation graduelle de la respiration par rapport au témoin jusqu'à une moyenne maximale de  $80 \pm 2\%$  pour  $5 \text{ mg.L}^{-1}$  d'antibiotique (Figure 38 A). A partir de cette concentration seuil, le phénomène s'inverse. Dès  $12,5 \text{ mg.L}^{-1}$  les valeurs atteintes ne représentent plus qu'une variation de  $37 \pm 18\%$ . En regard de l'inhibition intuitivement attendue, ces résultats sont surprenants. Cependant, des tests comparatifs réalisés par suivi de croissance conduisent à l'observation de la même tendance, s'inversant pour une concentration de  $7,81 \text{ mg.L}^{-1}$  (Figure 38 B). Enfin, la comparaison au microscope de cellules témoins par rapport à des cellules exposées à  $25 \text{ mg.L}^{-1}$  permet de constater une augmentation de la taille des bactéries suite à l'exposition à l'antibiotique. Ce phénomène biaise les observations réalisées par mesure de la densité optique et apporte un élément d'explication à l'apparente induction de la croissance observée. Les seuils à partir desquels les tendances de respiration et de croissance s'inversent, correspondent ainsi entre 5 et  $12,5 \text{ mg.L}^{-1}$  aux concentrations à partir desquelles le phénomène de gonflement est contrebalancé par la mort cellulaire.

Dans un deuxième temps, les résultats de ces analyses préliminaires permettent de déterminer les concentrations utilisées dans le cadre des analyses Raman. Elles sont choisies pour correspondre à des conditions n'ayant pas permis d'observer d'effet ( $0,25 \text{ mg.L}^{-1}$ ) et justes inférieures ( $2,5 \text{ mg.L}^{-1}$ ) et

supérieures ( $25 \text{ mg.L}^{-1}$ ) aux valeurs de la concentration seuil relevée. Des spectres témoins à partir de bactéries non exposées à l'antibiotique sont réalisés en parallèle. La même expérience est répétée en triplicat et les spectres analysés.

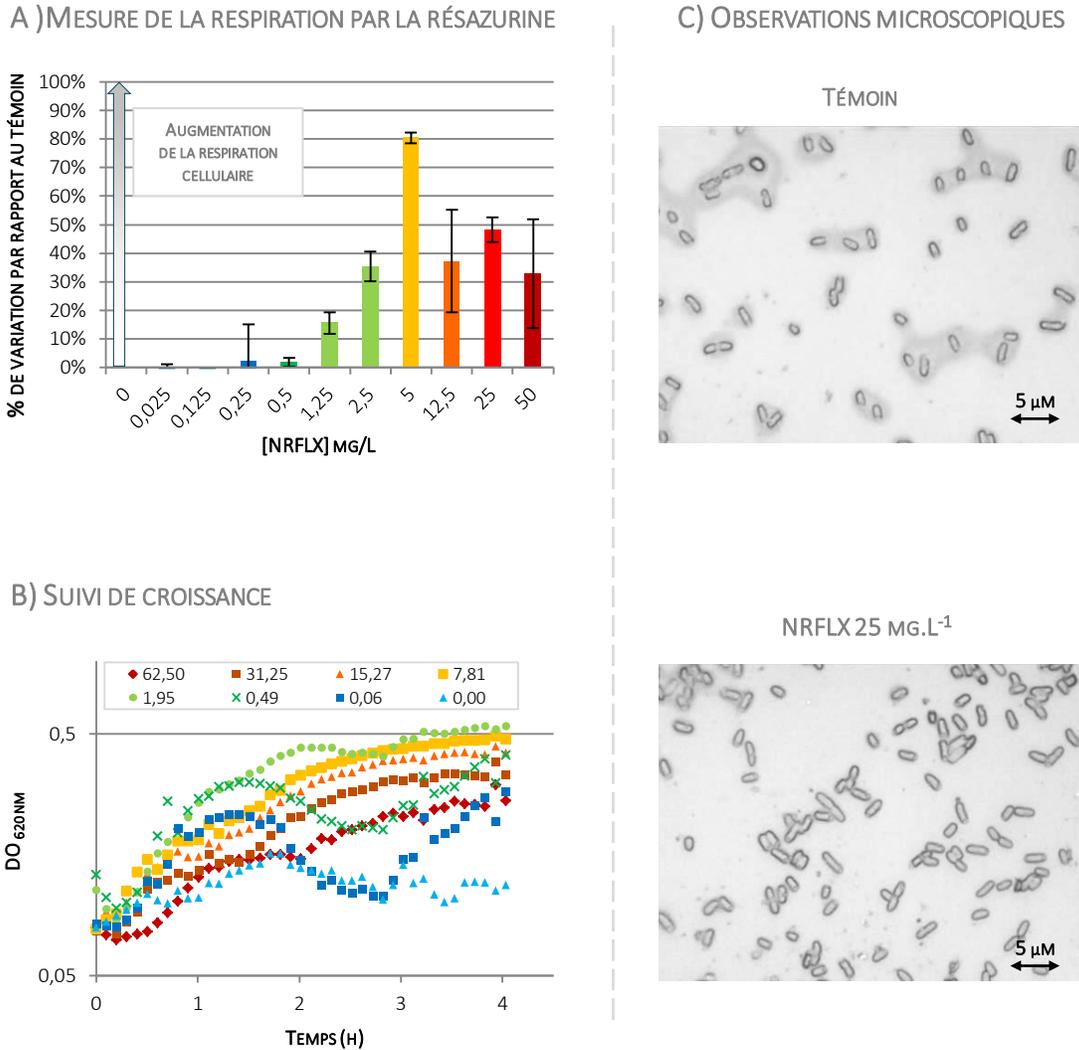


Figure 38 - Résultats des tests de toxicité classiques de la norfloxacine sur la bactérie *E. coli* NR698.

Pour faciliter la comparaison les résultats obtenus pour des concentrations similaires sont représentés avec la même couleur pour la mesure de l'inhibition de la respiration (A) et le suivi de croissance (B). Lors du suivi, la faible croissance du témoin s'explique par la faible teneur en carbone et en nutriments essentiels contenus dans le milieu de test. Celui-ci est conçu pour se substituer à une eau naturelle et n'est initialement pas destiné à la croissance des bactéries. La comparaison au microscope de cellules témoins par rapport aux cellules exposées (C) permet d'observer une augmentation de la taille des cellules suite à l'exposition à l'antibiotique.

La Figure 39 expose les spectres moyens obtenus pour chacune des concentrations du toxique. Des variations spectrales sont observables notamment au niveau des bandes associées à l'ADN et à l'ARN à  $785$  et  $810 \text{ cm}^{-1}$ , ainsi que dans la fenêtre spectrale associées aux liaisons chimiques caractéristiques des protéines et des lipides entre  $1200$  et  $1500 \text{ cm}^{-1}$ . Cependant, comme précédemment dans le cas de

l'analyse des spectres d'*E. coli* exposée à l'arsenic, l'analyse visuelle graphique est insuffisante pour attester de la significativité des différences observées en regard des effets du toxique. Des analyses statistiques sont donc réalisées.

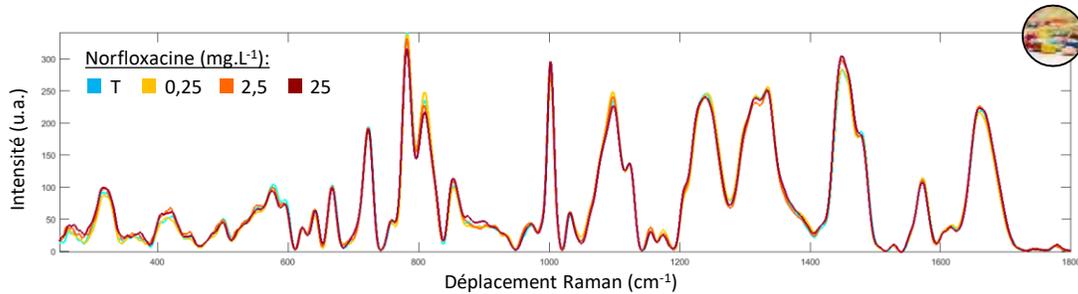


Figure 39 - *E. coli* NR698 exposée à la norfloxacine. Spectres moyens obtenus pour chacune des concentrations du toxique.

Les spectres sont d'abord analysés par analyse factorielle discriminante (AFD) dans le but d'évaluer l'existence de variations assez significatives pour permettre leur classification en fonction des différentes concentrations d'antibiotique testées (Figure 40). Sur les trois expériences, le score de classifications correctes moyen est de  $91,33 \pm 5,29\%$ , c'est-à-dire supérieur au seuil de  $63 \pm 13\%$  imputable à la variabilité expérimentale défini précédemment (Figure 35).

La norfloxacine apparaît donc avoir un impact sur les spectres de la bactérie non seulement significatif mais aussi différentiable en fonction de la dose. Cette première analyse ne permet cependant qu'une estimation quantitative du degré de variation des spectres sous l'effet de la substance. L'objectif est maintenant de les associer à des phénomènes physiologiques et moléculaires particuliers. Pour ce faire, le but est d'identifier les bandes du spectre sur lesquelles l'effet de l'antibiotique est le plus significatif: Elles permettront de déterminer les macromolécules les plus impactées par la toxicité.

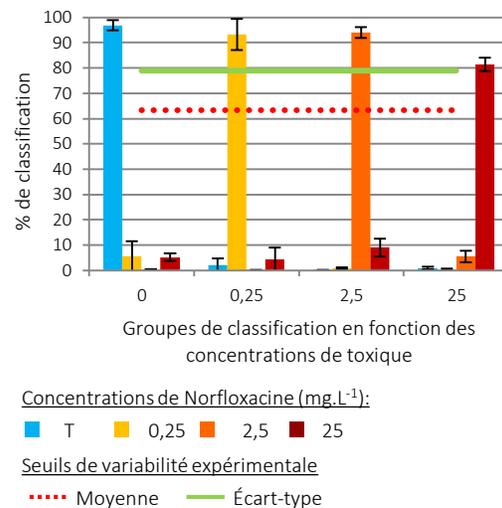
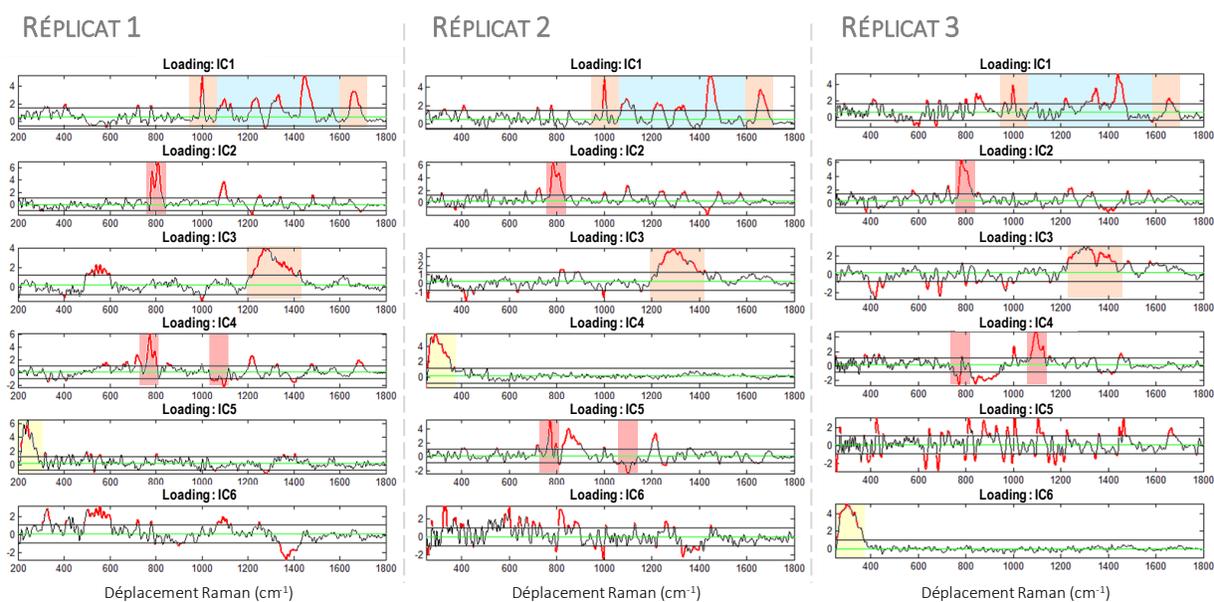


Figure 40 – Moyenne des résultats des AFD réalisés sur les spectres de la bactérie *E. coli* NR698 exposée à la norfloxacine (500 spectres). Les scores de classifications correctes sont supérieurs au seuil de variabilité expérimentale.

Les spectres sont donc analysés par analyse en composante indépendante (ICA). Pour rappel, le but de l'ICA est d'extraire du signal Raman global les signaux sources qui le constituent (i.e. : composantes indépendantes (ICs)). A chaque composante est associé un loading qui permet de visualiser les bandes Raman par lesquelles elles sont impactées. Dans l'idéal, et bien que cela soit difficile dans le cas d'échantillons biologiques complexes, les loadings sont en quelque sorte la décomposition du spectre global du microorganisme en fonction des contributions spectrales de chaque grandes familles de molécules dont il est la somme. L'étude des loadings permet alors une analyse chimiquement fiable des variations observées entre les spectres.



**Figure 41 – Effets de la norfloxacine sur les spectres Raman d’*E. coli* NR698 : Représentation des loadings obtenus suites aux ICA réalisées à partir de chacun des réplicats d’expérience (3x160 spectres). On constate que les profils obtenus sont similaires pour les trois réplicats : Les signaux Raman sont décomposés trois fois de la même manière. Les zones surlignées mettent en évidence la répétition des signaux.**

L'ensemble des loadings obtenus pour chacun des trois jeux de données correspondants aux spectres d’*E. coli* NR698 exposée à la norfloxacine sont représentés Figure 41. Leur observation en détails n’est pas nécessaire, l’objet de leur représentation ici étant simplement de remarquer que pour chacun des jeux de données, des profils similaires apparaissent. Cela signifie que pour chacun des réplicats, les signaux Raman sont décomposés de la même manière ce qui est cohérent avec le fait qu’il s’agisse toujours du même microorganisme : son spectre global est toujours la somme des mêmes signaux sources et l’ICA parvient à les dissocier. De plus, en comparant ces résultats aux travaux réalisés notamment par Maquelin *et. al*, (Figure 42 ) on constate que les ICs parviennent effectivement à dissocier les signaux représentatifs de différents constituants cellulaires caractéristiques. Par exemple, les ICs 1 isolent en particulier des bandes

relatives à la fois aux lipides et aux protéines. D'autres bandes spécifiques des protéines entre 1230 et 1300  $\text{cm}^{-1}$  sont aussi plus spécifiquement isolées sur les profils des loadings des ICs 3. Les ICs 2 isolent enfin ici les signaux relatifs à l'ADN et à l'ARN.

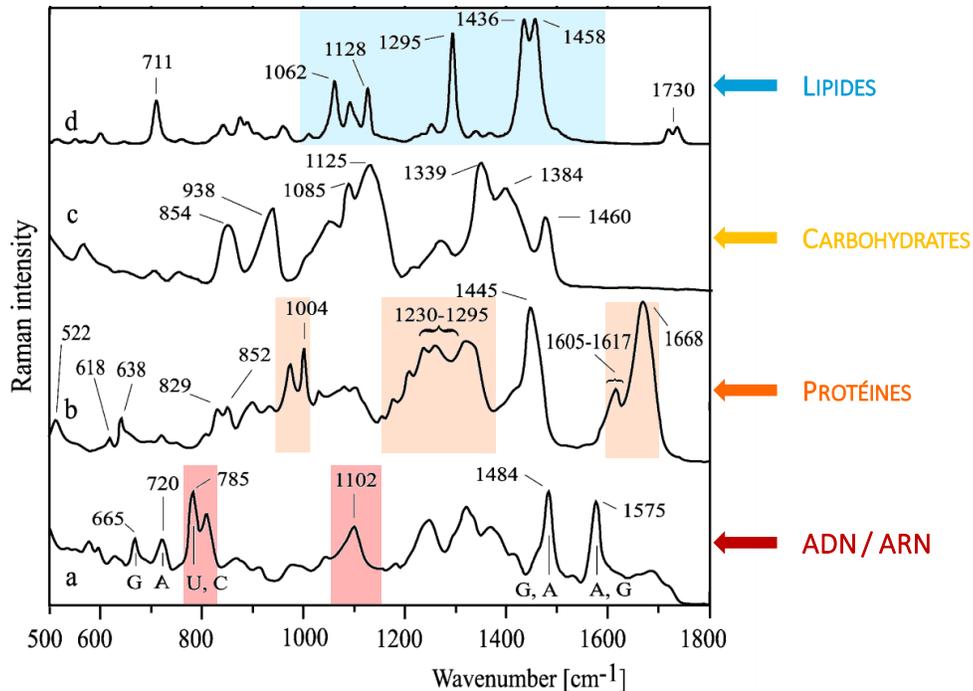
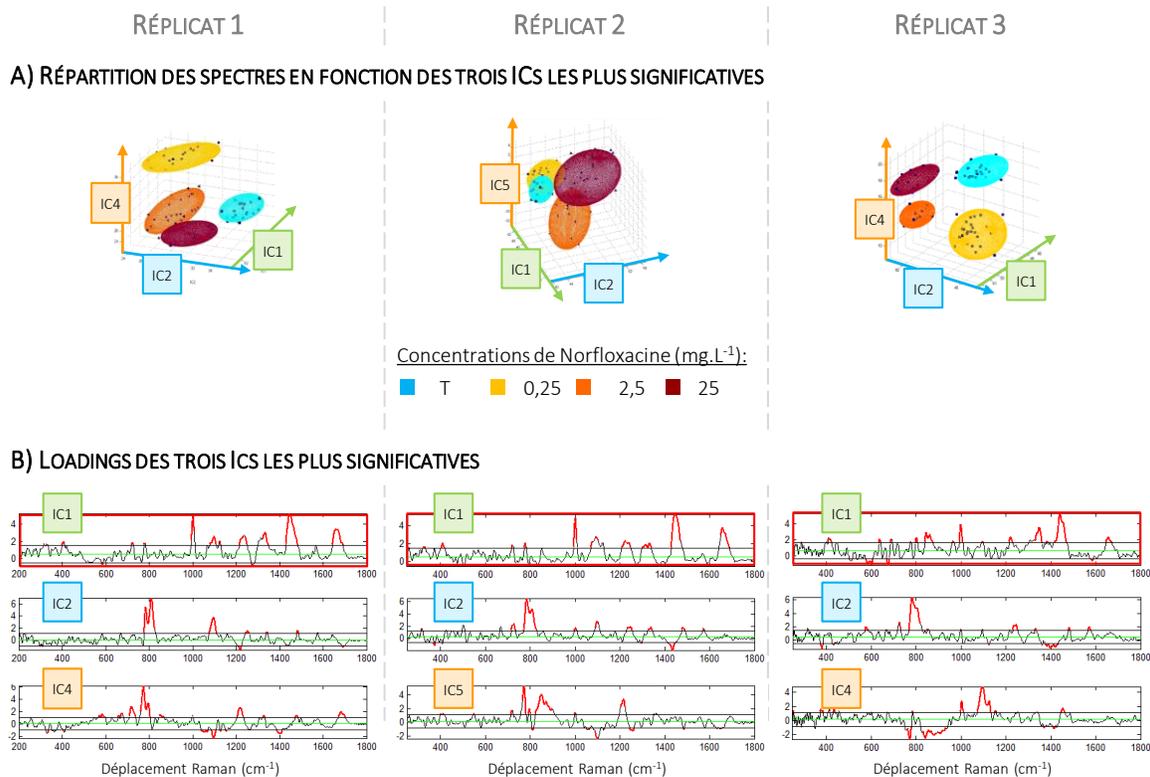


Figure 42 – Spectres Raman caractéristiques de constituants cellulaires caractéristiques. Extraits des travaux de Maquelin et al. (2002)<sup>83</sup>.

Une fois le signal Raman décomposé, on s'intéresse plus particulièrement, pour chaque réplicat, aux ICs mettant le mieux en évidence les effets du toxique. Sur la Figure 43, seules les loadings des trois ICs témoignant de la plus grande variabilité des spectres en fonction des concentrations d'antibiotique sont donc sélectionnées<sup>a</sup>. Cohérentes avec les résultats des AFD, on constate tout d'abord que la répartition des spectres en fonction de ces composantes permet bien de distinguer les différents groupes de concentrations (Représentations 3D Figure 43 A). Mais surtout, leur profil est identique pour chacune des expériences (Figure 43 B). A trois reprises ce sont donc des variations sur les mêmes bandes Raman qui ont permis de distinguer les spectres en fonction des différentes conditions d'exposition à la norfloxacine. On note en particulier les bandes entre 1200 et 1700  $\text{cm}^{-1}$  correspondants aux zones du spectres

<sup>a</sup> Cette sélection est faite par le calcul en observant la répartition des spectres en fonction de chacune des ICs. Les ICs choisies sont celles pour lesquelles la variabilité des spectres intragroupe (i.e. : en fonction des concentrations) est la plus faible possible tout en maximisant l'écart moyen avec les autres groupes. La significativité des écarts entre les groupes est vérifiée par ANOVA ( $p$ -value < 0,05).

associées aux contributions spectrales des protéines et des lipides (IC1), mais aussi la mise en évidence nette des deux bandes relatives à l'ADN et à l'ARN à 785 et 810  $\text{cm}^{-1}$  (IC2).



**Figure 43 – Effets de la norfloxacine sur les spectres Raman d'*E. coli* NR698 : Analyse des loadings les plus significatifs.**  
**A) Répartition des spectres en fonction des trois ICs les plus significatives. Des groupes correspondants à chacune des concentrations de toxique se distinguent. B) Loading des ICs significatives : Leur profil est quasiment identique pour tous les réplicats. Cela signifie que ce sont toujours des variations sur les mêmes bandes Raman qui permettent de distinguer les spectres en fonction des conditions d'exposition au toxique.**

Le loading de l'IC la plus significative des trois, identique pour les trois réplicats, est finalement utilisé pour définir la signature spectrale des effets de l'antibiotique sur les spectres de la bactérie (Figure 44 A). Les analyses par ANOVA montrent que la répartition des spectres selon cette composante est cohérente avec un effet « dose-réponse » de la substance (Figure 44 C). Enfin, les portions qui y sont représentées en rouge correspondent aux signaux dont l'intensité est supérieure à la variabilité moyenne. Ils indiquent en d'autres termes les portions significatives du spectre et permettent d'identifier les bandes Raman les plus impactées par la toxicité de l'antibiotique (Figure 44 B). Une analyse plus détaillée des implications de ces variations sur la physiologie de la bactérie sera faite plus loin dans le document.

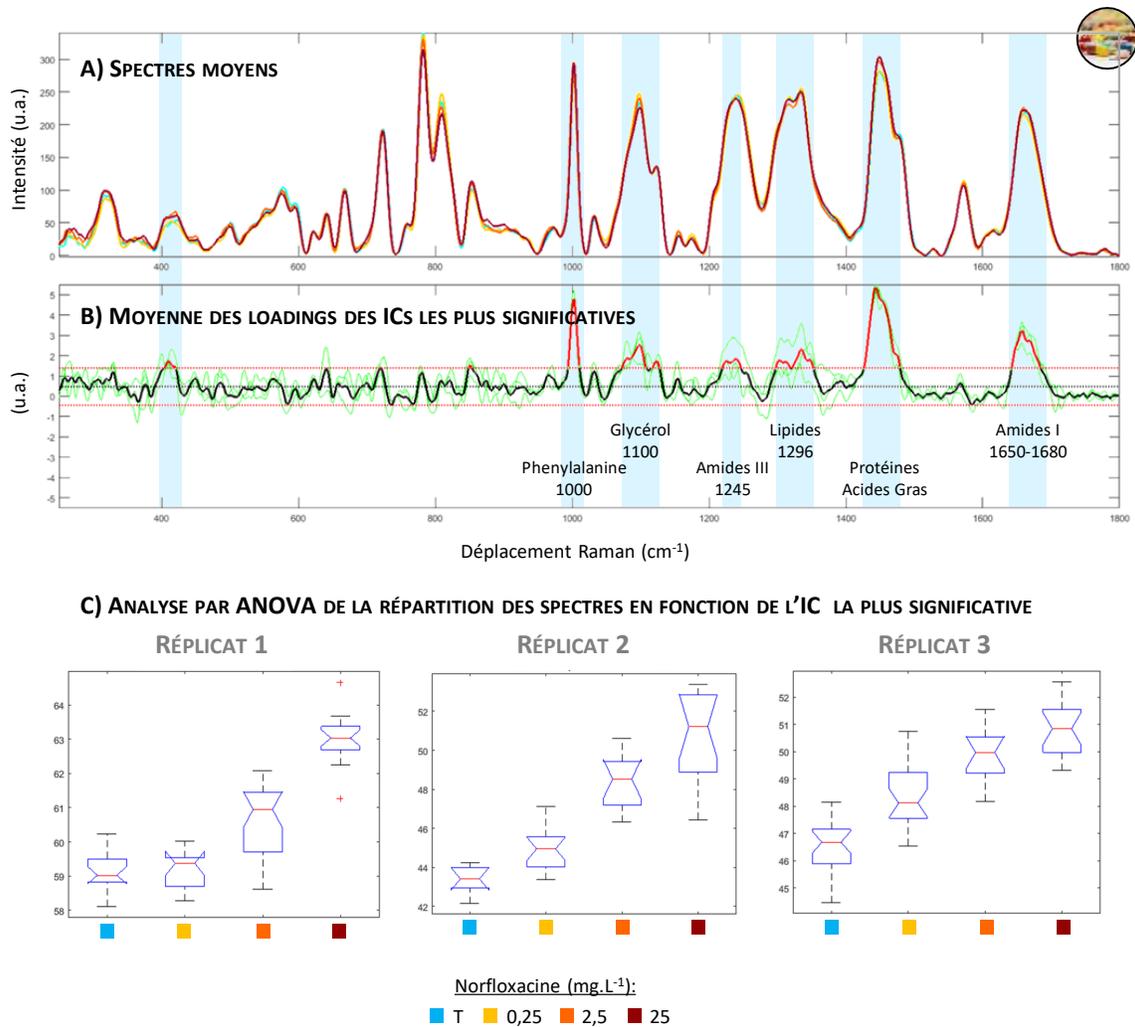


Figure 44 – Signature spectrale des effets de la norfloxacin sur les spectres d'*E. coli* NR698.

A) Spectres moyens. Les bandes surlignées sont celles dont les variations sont significatives des effets de l'antibiotique sur la bactérie. B) En vert les loadings de l'IC la plus significative de chacun des réplicats. En noir la moyenne. En rouge les portions dont l'intensité est supérieure à l'écart-type. C) Analyse par ANOVA de la répartition des spectres selon la composante utilisée pour définir la signature spectrale des effets de la substance (p-value < 0,05).

### 2.1.2. CuSO<sub>4</sub>

Comme avec la norfloxacin des tests préliminaires de toxicité sont réalisés pour évaluer la toxicité du cuivre sur *E. coli* NR698 (Figure 45). Une inhibition de la respiration de 31±8% par rapport au témoin est observée pour 0,05 mg.L<sup>-1</sup>. Cependant, au-delà de cette concentration, la variation par rapport au témoin diminue et une augmentation apparente de la respiration de 51±26%, similaire à celle mesurée sous l'effet de la norfloxacin, est observée pour une concentration de 1,25 mg.L<sup>-1</sup>. Pour les concentrations supérieures, la respiration est inhibée jusqu'à un maximum de 80±4% pour une concentration de 25 mg.L<sup>-1</sup>. Les tests de suivi de croissance confirment ces résultats. Le développement des bactéries diminue de

manière significative dès 0,25 mg.L<sup>-1</sup> avec une inhibition de l'ordre de 50% par rapport au témoin. La croissance est totalement interrompue à partir de 1,25 mg.L<sup>-1</sup> ce qui correspond à la valeur seuil observée au cours des tests de respiration.

TOXICITÉ DU CuSO4 SUR *E. coli* NR698

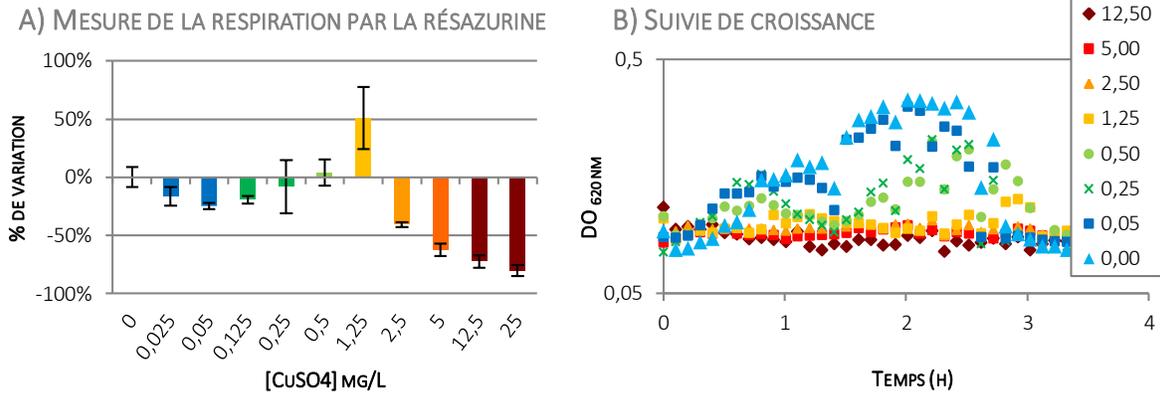


Figure 45 – Toxicité du CuSO4 sur la bactérie *E. coli* NR698 : Résultats des essais d'inhibition de la respiration (A) et de la croissance cellulaire (B).

A nouveau, comme lors des essais de toxicité de la norfloxacine, la croissance globalement très faible s'explique par la pauvreté du milieu d'essai. On remarque cependant que la croissance est interrompue à partir de 1,25 mg.L<sup>-1</sup> ce qui correspond à la concentration seuil observée au cours des tests de respiration (en jaune sur les graphiques). Pour faciliter la comparaison, les résultats obtenus pour des concentrations équivalentes sont représentés avec la même couleur sur les deux graphiques.

Suite à ces tests, les concentrations choisies pour les observations Raman sont de 0,25, 2,5 et 25 mg.L<sup>-1</sup>. La Figure 46 expose les spectres moyens obtenus. Encore une fois, des variations spectrales sont observables au niveau des bandes relatives à l'ADN et à l'ARN (785 et 810 cm<sup>-1</sup>). On observe de plus ici une forte diminution de l'intensité de la bande située à 1100 cm<sup>-1</sup> qui n'était pas visible sur les spectres de la bactérie exposée à la norfloxacine.

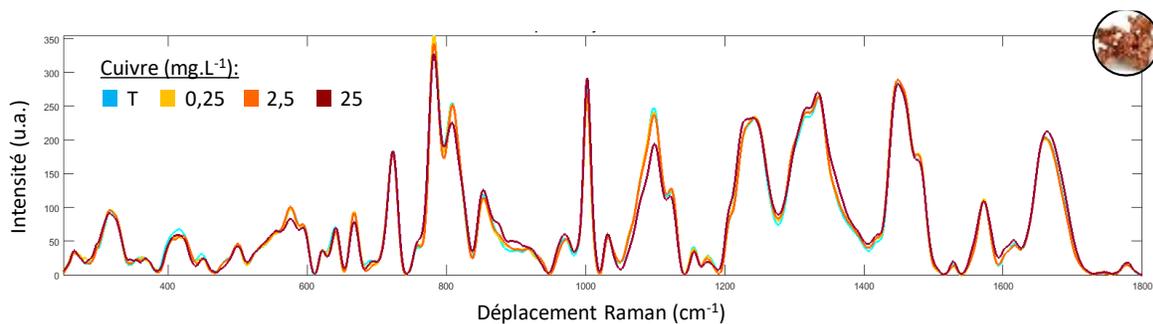
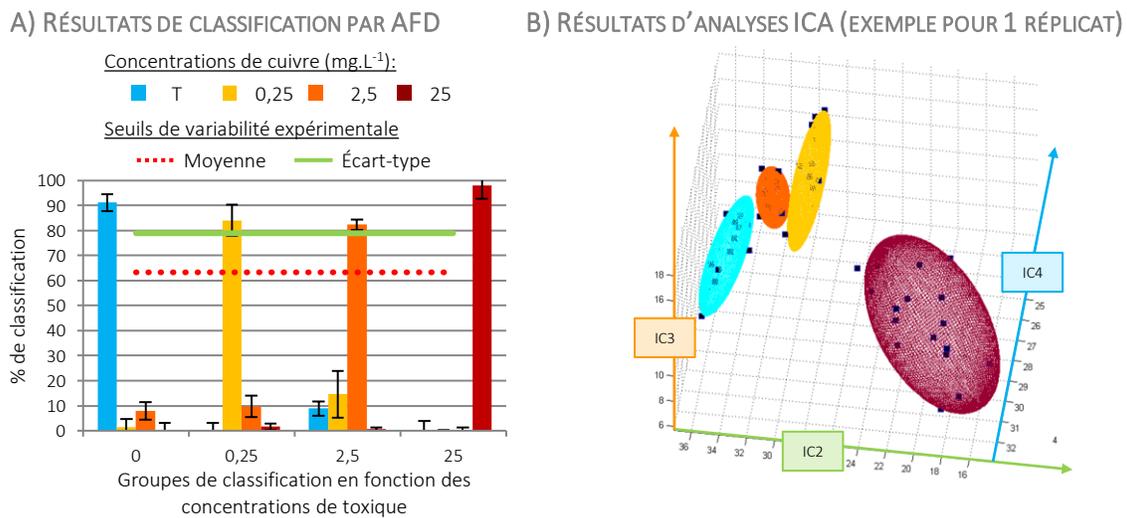


Figure 46 – *E. coli* NR698 exposée au CuSO4. Spectres moyens obtenus pour chacune des concentrations du toxique.

La significativité de ces variations est ensuite étudiée par analyse statistique. La classification des spectres par AFD conduit à un score moyen d'identifications correctes de 88,9±5,7% soit supérieur au seuil de

significativité fixé (Figure 47). Il est intéressant de remarquer que les confusions les plus fréquentes concernent les deux concentrations les plus faibles de l'essai (0,25 et 2,5 mg.L<sup>-1</sup>). Lorsqu'ils sont mal identifiés, les spectres correspondant à 0,25 mg.L<sup>-1</sup> de cuivre sont classés avec ceux du groupe associé à la concentration juste supérieure. Inversement, la majorité des erreurs de classement des spectres correspondants à une exposition à 2,5 mg.L<sup>-1</sup> de métal, témoignent d'une confusion avec ceux de la concentration inférieure. Ces erreurs entre des concentrations voisines sont cohérentes avec l'hypothèse d'un caractère dose-réponse des modifications induites sur les spectres par l'exposition des bactéries au métal.



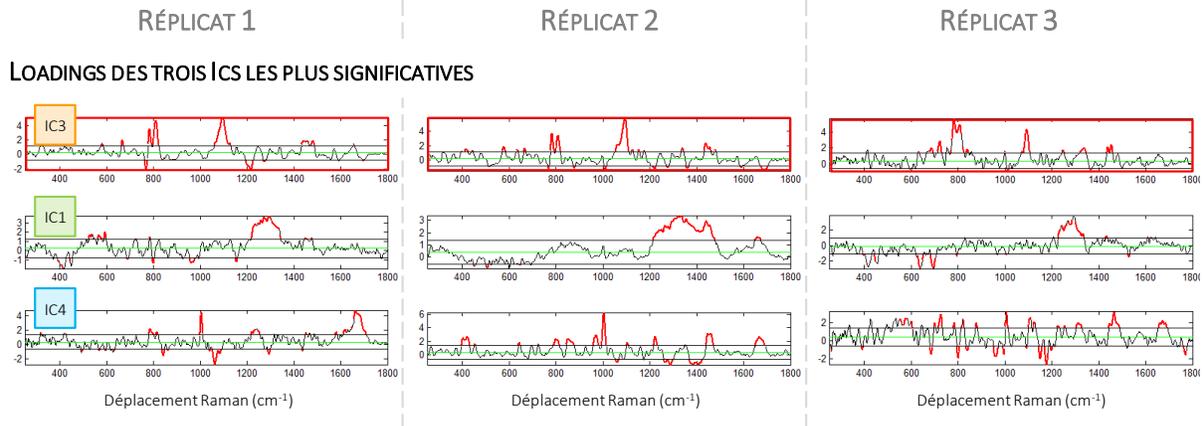
**Figure 47 – Analyse statistique des spectres de la bactérie *E. coli* NR698 exposée au CuSO<sub>4</sub>.**

**A) Résultats moyens de classification des spectres par AFD. B) Exemple de représentation 3D de la répartition des spectres selon les trois composantes les plus significatives issues de l'ICA. Les résultats représentés correspondent à ceux du 1<sup>er</sup> réplicat Figure 48.**

Selon la même démarche que celle précédemment décrite pour l'étude des effets de la norfloxacine, les spectres sont ensuite analysés par ICA. Réplicat par réplicat, ils sont d'abord décomposés selon 6 composantes indépendantes (ICs) dont les trois plus significatives sont sélectionnées. Les loadings correspondants sont représentés Figure 48. Encore une fois, leur reproductibilité d'un réplicat à l'autre est notable. Ils mettent en évidence les bandes les plus variables selon les différentes concentrations du métal et il est particulièrement intéressant de constater que leur profil est différent de ceux des loadings mis en évidence lors de l'étude des effets de la norfloxacine : La toxicité du cuivre et de l'antibiotique n'ont pas les mêmes impacts sur les spectres Raman de la bactérie. Un exemple de représentation 3D de la répartition des spectres selon ces ICs est représenté pour un réplicat Figure 47. Quatre groupes distincts correspondants à chacune des concentrations de cuivre y apparaissent. Cohérents avec les

résultats des AFD, les groupes correspondants à 0,25 et 25 mg.L<sup>-1</sup> sont accolés, témoignant de similitudes entre les spectres qui les constituent.

### ANALYSE DES SPECTRES D'*E. COLI* NR698 EXPOSÉE AU CUSO4



**Figure 48 – Loadings des ICs les plus significatives lors de l’analyse des spectres Raman d’*E. coli* NR698 exposés au CuSO4. Les spectres sont décomposés par ICA puis les ICs les plus significatives sont sélectionnées. Les loadings correspondants sont représentés ici pour chacun des réplicats. On constate la reproductibilité de leur profil d’un réplicat à l’autre. Encadré en rouge le loading correspondant pour chaque réplicat à l’IC la plus significative (significativité déterminée par ANOVA).**

Enfin, les loadings de l’IC la plus significative des trois réplicats (encadrés en rouge Figure 48) sont utilisés pour définir la signature spectrale de l’effet du CuSO4 sur les spectres de la bactérie (Figure 49). La significativité des variations observées sur les bandes relatives à l’ADN et à l’ARN est ainsi confirmée. De plus, la variabilité des spectres selon cette composante est analysée par ANOVA. Les résultats permettent d’observer une répartition des groupes cohérente avec un effet dose-réponse de la substance tandis que les p-values obtenues, toutes inférieures à 0,05, attestent de la significativité des différences (Figure 49 C).

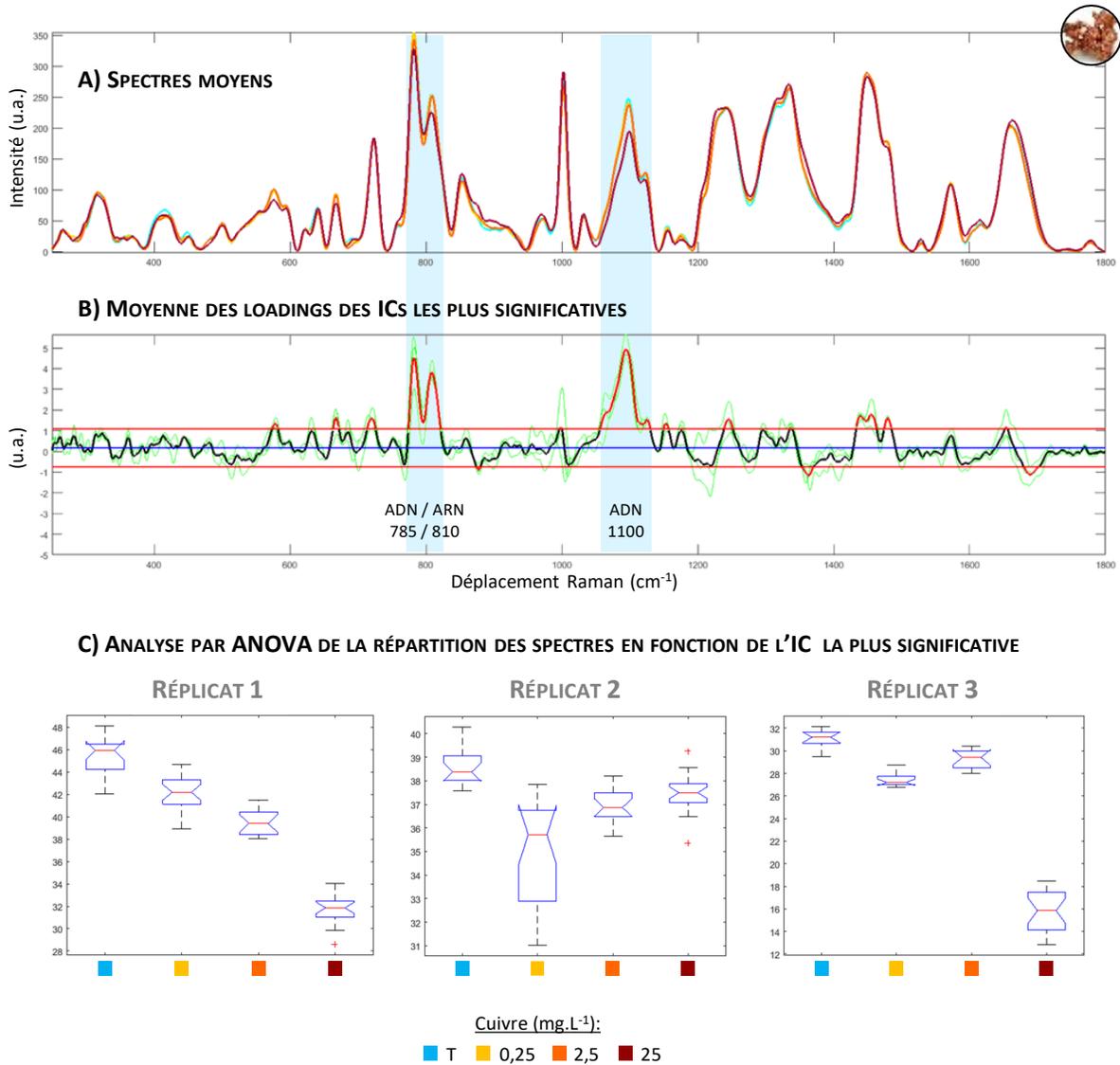
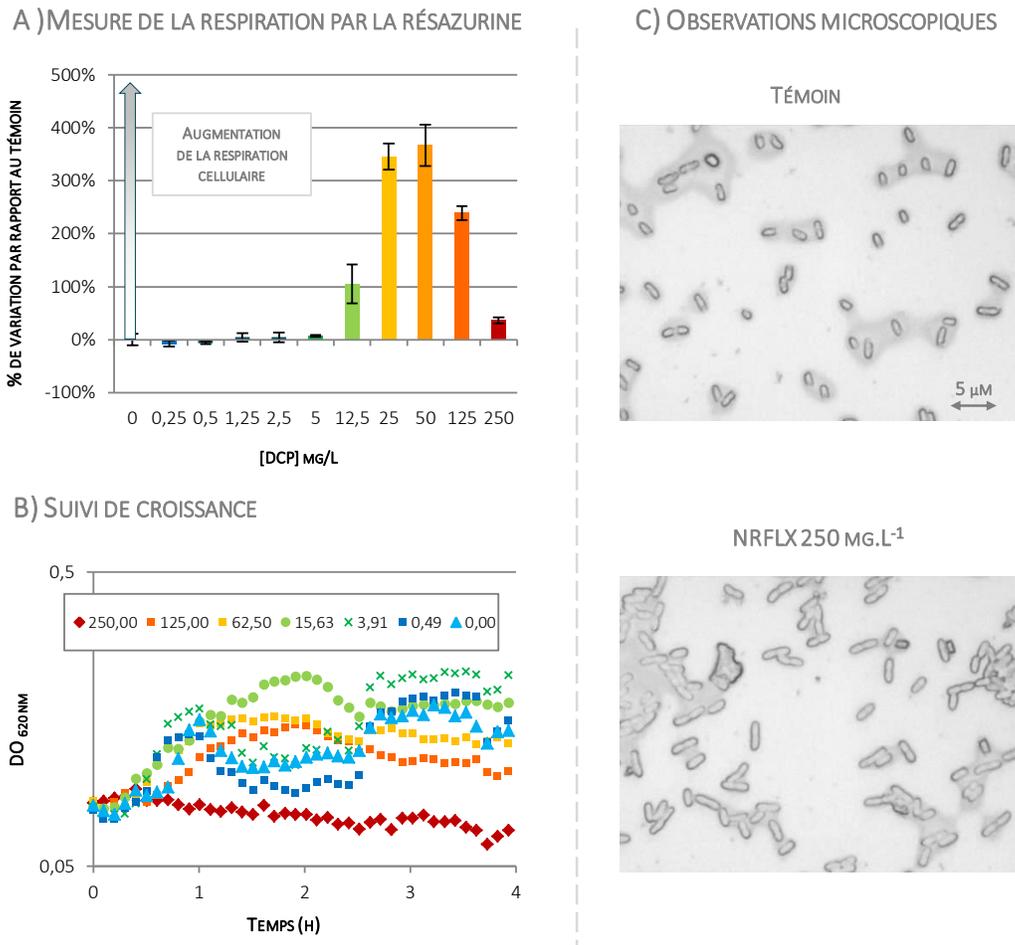


Figure 49 – Signature spectrale des effets du CuSO<sub>4</sub> sur les spectres d'*E. coli* NR698. A) Spectres moyens. Les bandes surlignées sont celles dont les variations sont significatives des effets du métal sur la bactérie. B) En vert les loading de l'IC la plus significative de chacun des réplisats. En noir la moyenne. En rouge les portions dont l'intensité est supérieure à l'écart-type. C) Analyse par ANOVA de la répartition des spectres selon la composante utilisée pour définir la signature spectrale des effets de la substance (p-value < 0,05).

### 2.1.3.3,5-DICHLOROPHENOL

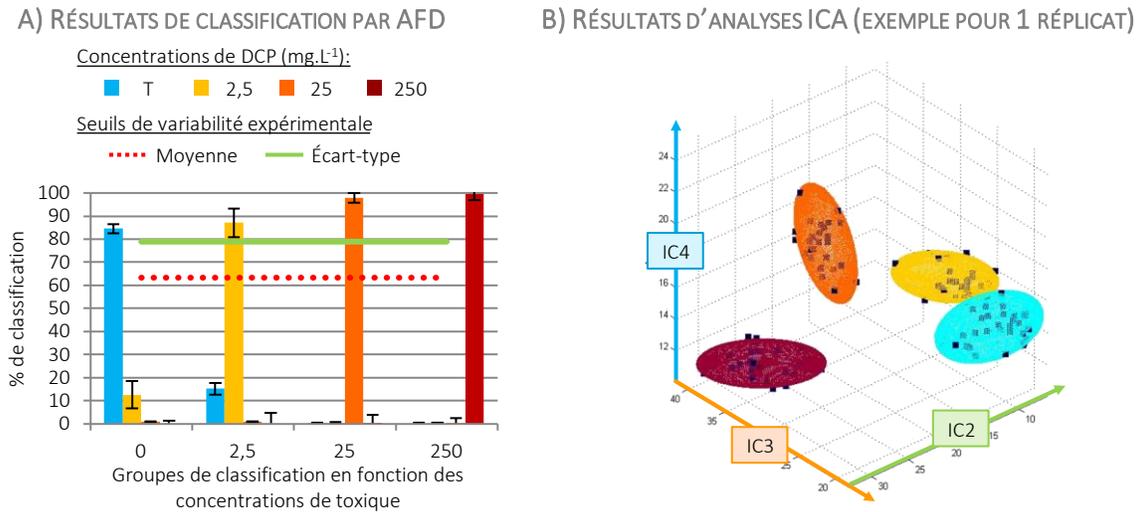
La démarche d'analyse est ensuite récurrente pour l'ensemble des autres toxiques testés. Concernant le 3,5-dichlorophénol, les résultats des tests de toxicité montrent les mêmes tendances que celles déjà observées sous l'effet de la norfloxacine. La respiration cellulaire semble augmenter à partir de 12,5 mg.L<sup>-1</sup> pour atteindre près de 350% d'augmentation par rapport au témoin pour une concentration de 50 mg.L<sup>-1</sup> (Figure 50 A). Le phénomène s'inverse ensuite. Les essais de suivi de croissance ainsi que les observations microscopiques complémentaires viennent confirmer ces résultats (Figure 50 B et C).



**Figure 50 – Résultats des tests de toxicité classiques du 3,5-dichlorophénol sur la bactérie *E. coli* NR698. Pour faciliter la comparaison les résultats obtenus pour des concentrations similaires sont représentés avec la même couleur pour la mesure de l'inhibition de la respiration et le suivi de croissance.**

Les résultats de classifications des spectres par AFD permettent ensuite d'obtenir une moyenne de classification correcte de 92,3±6,5% sur l'ensemble des trois réplicats et montrent qu'il est une fois de plus possible de différencier statistiquement les spectres en fonction des concentrations testées (Figure

51 A). On constate de plus que les erreurs de classement les plus importantes concernent le témoin et la concentration la plus faible de toxique (0,25 mg.L<sup>-1</sup>). Ces résultats sont cohérents avec les résultats de toxicité préalables attestant d'une faible toxicité de cette concentration par rapport au témoin. De faibles impacts sur les spectres Raman ne sont donc pas étonnants. A l'inverse les spectres correspondants à des concentrations plus toxiques, dès 25 mg.L<sup>-1</sup>, présentent des scores de classifications proches de 100%.



**Figure 51 – Analyse statistique des spectres de la bactérie *E. coli* NR698 exposée au 3,5-dichlorophénol.**

**A) Résultats moyens de classification des spectres par AFD. B) Exemple de représentation 3D de la répartition des spectres selon les trois composantes les plus significatives issues de l'ICA réalisée sur un des répliquats.**

Enfin, les analyses par ICA permettent de définir la signature spectrale des effets du 3,5-dichlorophénol sur les spectres de la bactérie. Par souci de légèreté, l'ensemble des jeux de données ne sont cette fois pas exposés. La démarche suivie est cependant la même que celle détaillée au cours des paragraphes précédents. Le résultat final est présentée Figure 52. On y constate d'importantes variations sur les bandes Raman situées entre 1300 et 1450 cm<sup>-1</sup> dont l'intensité diminue en fonction des concentrations croissantes de la substance. Ces bandes correspondent à des zones du spectre associées à la présence de protéines et de lipides. La signature spectrale obtenue suite à l'exposition de la bactérie au 3,5-dichlorophénol est donc encore une fois différente de celles mises en évidence pour les deux premiers toxiques étudiés. Enfin, l'analyse des spectres par ANOVA en fonction de la composante de l'ICA la plus significative de l'ICA (utilisée pour la définition de la signature spectrale) montre aussi que leur répartition est cohérente avec l'effet dose-réponse des concentrations croissantes étudiées.

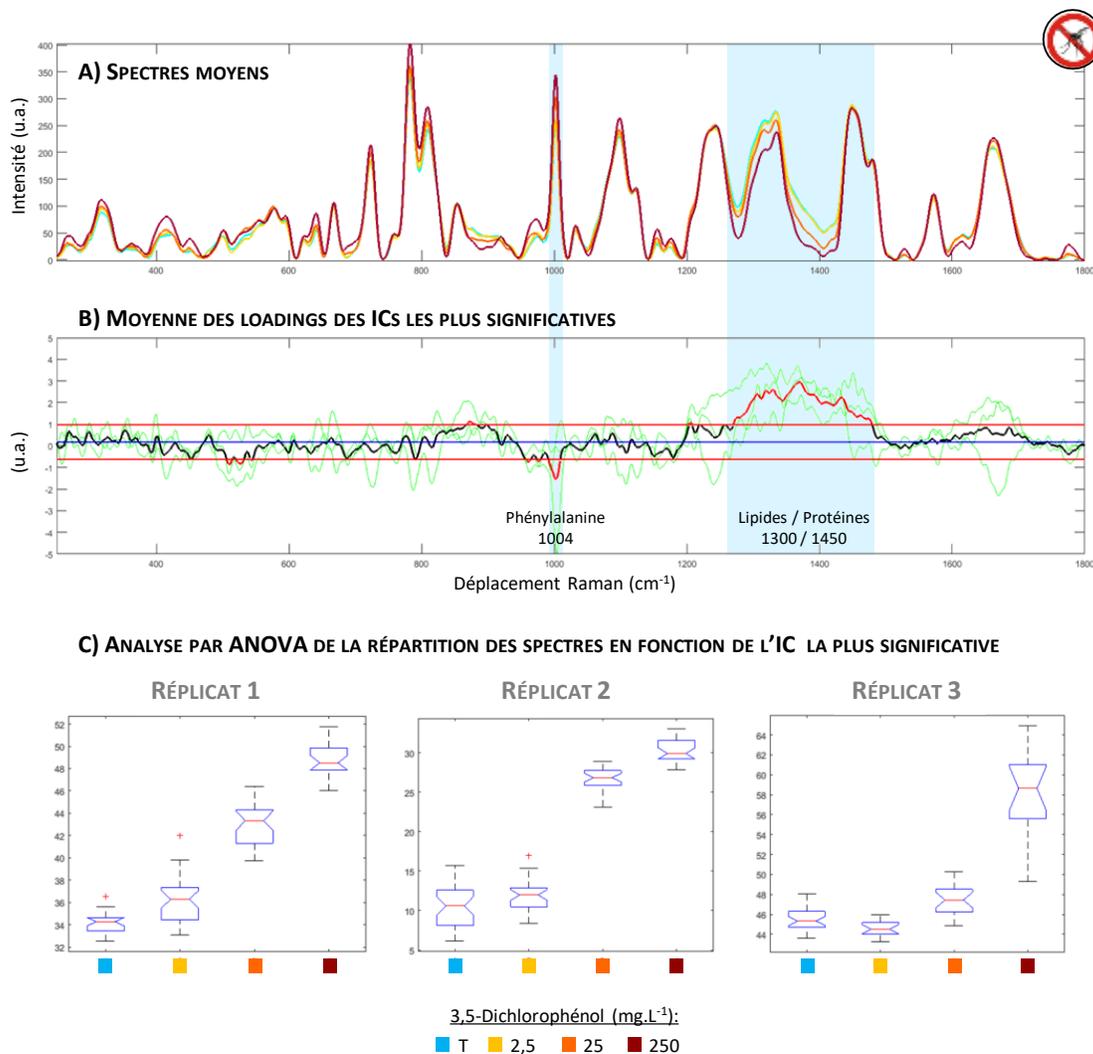


Figure 52 – Signature spectrale des effets du 3,5-dichlorophénol sur les spectres d'*E. coli* NR698.

A) Spectres moyens. B) En vert les loading de l'IC la plus significative de chacun des répliquats. En noir la moyenne. En rouge les portions dont l'intensité est supérieure à l'écart-type. C) Analyse par ANOVA de la répartition des spectres selon la composante la plus significative (p-value < 0,05).

### 2.1.4. LE DIURON

Lors des essais d'inhibition de la respiration, les effets du diuron sur *E. coli* NR698 apparaissent dès 1,25 mg.L<sup>-1</sup>, encore une fois sous la forme d'une apparente surexpression de la respiration (Figure 53 A). Celle-ci atteint une valeur de 150% d'augmentation par rapport au témoin pour une concentration maximale de 125 mg.L<sup>-1</sup>. Les concentrations testées ne sont toutefois pas suffisantes pour atteindre le seuil observé jusqu'à présent et correspondant à la dose pour laquelle la mortalité compense le phénomène (concentrations maximales limitées du fait de la solubilité). Ainsi, la toxicité aigüe des concentrations testées de diuron sur *E. coli* NR698 apparaît moins importante que celle des autres substances étudiées.

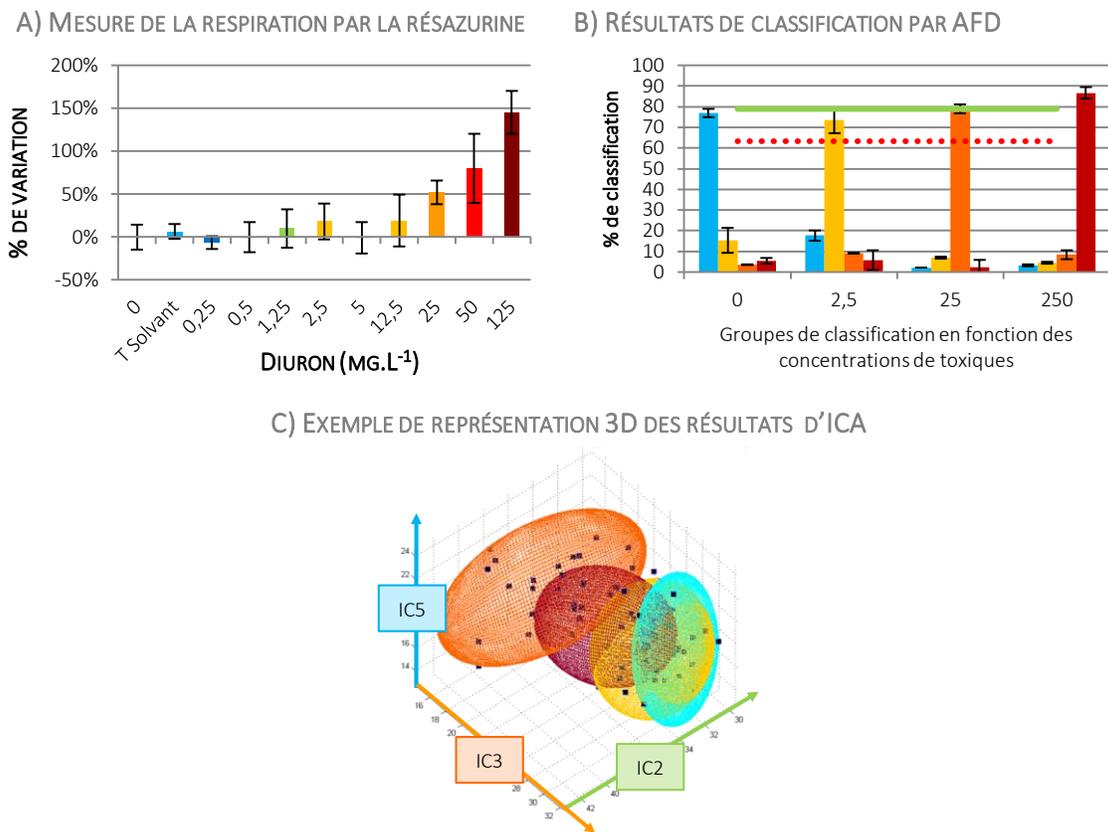


Figure 53 – Effet du diuron sur les spectres de la bactérie *E. coli* NR698.

A) Résultats des tests d'inhibition de la respiration. B) Résultats moyens de classification des spectres par AFD. C) Exemple pour un réplicat de la répartition des spectres selon les trois composantes les plus significatives issues des résultats de l'ICA. On observe le chevauchement des groupes.

L'analyse des spectres Raman correspondants est cohérente avec ces résultats. Les concentrations choisies pour les essais sont de 2,5, 25 et 250 mg.L<sup>-1</sup>. Avec un taux de classification correcte de seulement 79,0±3,8% sur l'ensemble des réplicats, les scores des AFD ne sont que faiblement supérieurs au seuil de variabilité expérimentale (Figure 53 B) et des erreurs d'identification se répartissent sur l'ensemble des

groupes. On constate toutefois que celles-ci restent d'autant plus importantes que les concentrations sont faibles et qu'elles sont majoritaires entre des concentrations voisines (notamment entre les spectres témoins et ceux correspondant à une concentration de 2,5 mg.L<sup>-1</sup> de diuron).

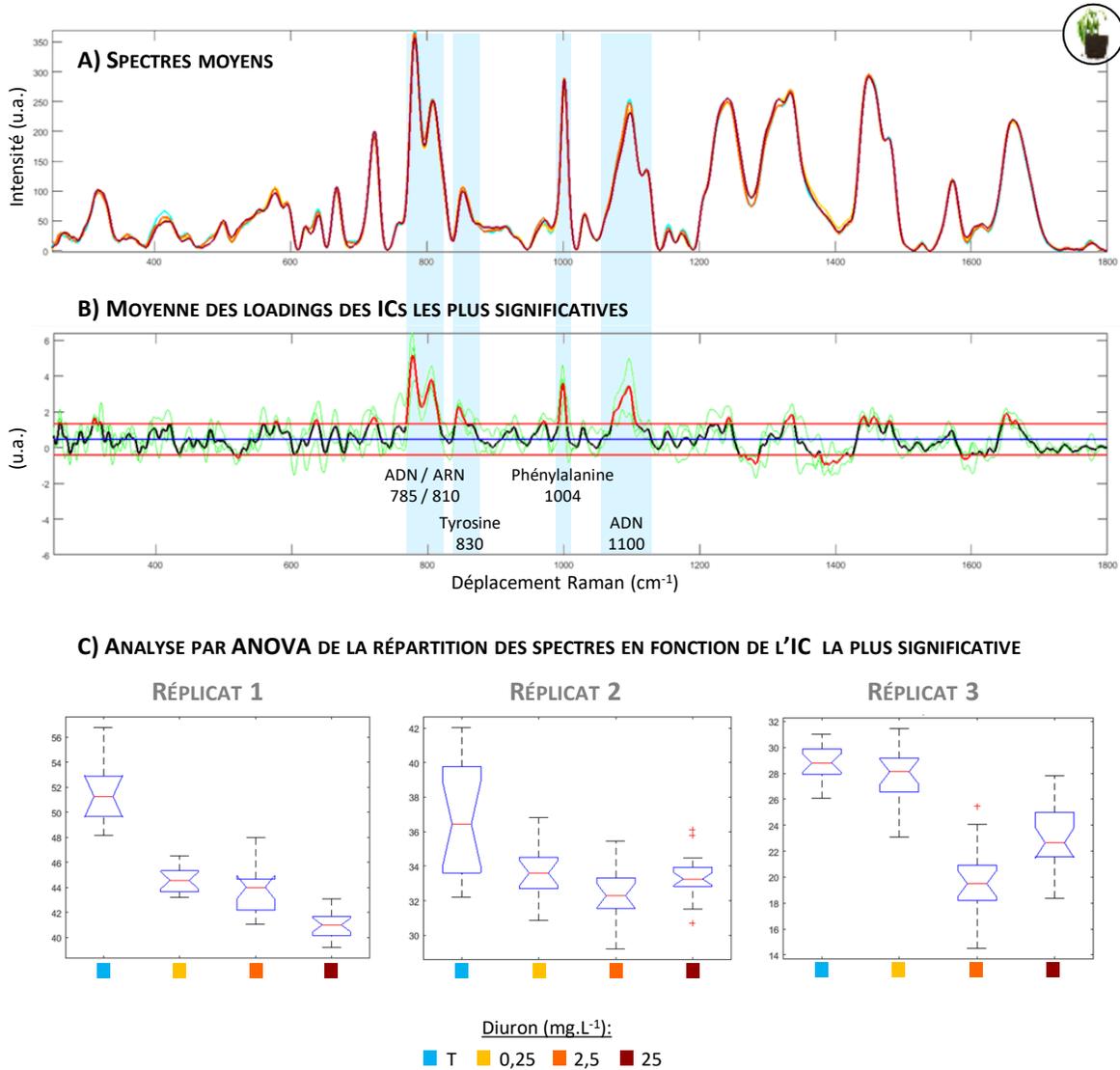


Figure 54 – Signature spectrale des effets du diuron sur les spectres d'*E. coli* NR698.

A) Spectres moyens. Les bandes surlignées sont celles dont les variations sont significatives des effets de l'herbicide sur la bactérie. B) En vert les loadings de l'IC la plus significative de chacun des réplicats. En noir la moyenne. En rouge les portions dont l'intensité est supérieure à l'écart-type. C) Analyse par ANOVA de la répartition des spectres selon la composante utilisée pour définir la signature spectrale des effets de la substance (p-value < 0,05).

Des résultats similaires ressortent des analyses par ICA qui ne parviennent pas non plus à faire ressortir des groupes de spectres bien distincts : cohérentes avec la toxicité relativement peu élevée sur *E. coli* NR698 des concentrations testées de diuron, les variations entre les spectres sont moins importantes que

celles ayant été causées par les autres substances. On constate néanmoins que, malgré la faible variabilité entre les groupes, les loadings des ICs les plus significatives sont encore une fois reproductibles d'un réplica à l'autre et que les spectres s'y répartissent selon un effet dose réponse par rapport aux concentrations croissances d'herbicide auxquelles les bactéries sont exposées (ANOVA). Une signature spectrale est donc déterminées comme précédemment à partir du loading de l'IC la plus significative. Elle permet de faire ressortir l'importante contribution des bandes ADN et ARN à 785, 810 et 1100  $\text{cm}^{-1}$  mais aussi la mise en évidence des bandes associées dans les spectres bactériens à la présence de tyrosine (830  $\text{cm}^{-1}$ ) et de phénylalanine (1004  $\text{cm}^{-1}$ ).

## 2.2. BILAN : LIENS ENTRE SIGNATURES SPECTRALES ET TOXICITE

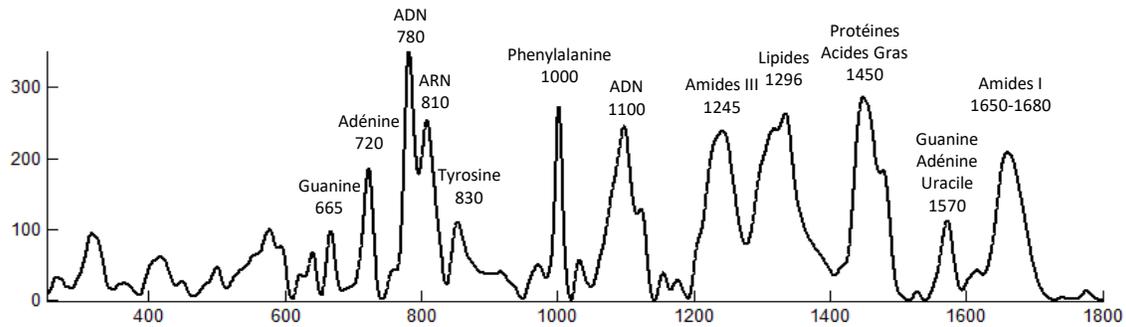
A l'issue de l'analyse des spectres de la bactérie *E. coli* NR698 on confirme dans un premier temps l'apparition de différences significatives entre les spectres suite à l'exposition aux substances testées. Pour une même substance, les outils statistiques utilisés parviennent à identifier les spectres en fonction des différentes concentrations. Les résultats des AFD varient de 92,3±6,5% de classifications correctes pour le 3,5-dichlorophénol à 79,0±3,8% pour le diuron et sont cohérents avec les essais de toxicité réalisés au préalable par mesure de la respiration ou de la croissance cellulaire. En effet, pour les concentrations testées, le 3,5-dichlorophénol est apparu comme étant la substance la plus toxique comparativement aux autres. A l'inverse, le diuron est le moins nocif. On constate par ailleurs qu'en cas d'erreurs d'identification celles-ci correspondent, dans la majorité des cas, à des confusions entre des spectres correspondant à des concentrations voisines. Enfin, les scores obtenus n'en restent pas moins supérieurs au seuil de significativité fixé à partir des effets de la variabilité expérimental ce qui permet de valider la significativité des variations spectrales provoquées par les substances.

Dans un deuxième temps, la démarche d'analyse élaborée à partir des résultats des ICA permet de mettre en évidence une empreinte spectrale caractéristique des effets de chacune des substances sur les spectres de la bactérie. Une fois les spectres décomposés en signaux sources ou composantes indépendantes (ICs), l'analyse des profils (loadings) de ces composantes permet d'identifier les bandes Raman ayant été significatives lors du processus de classification des spectres en fonction des concentrations. Or, on constate que pour une substance donnée, les ICs les plus significatives en termes de séparation des différents groupes de spectres ont toujours le même profil. Par contre, ces profils diffèrent d'une substance à l'autre. On met ainsi en évidence :

- 1) La reproductibilité des effets de chaque toxique sur les spectres de la bactérie *E. coli*
- 2) La spécificité des variations spectrales en fonction du toxique.

Sur la Figure 55 sont représentées l'ensemble des spectres moyens obtenus dans le cadre de l'exposition de la bactérie à la norfloxacine, au  $\text{CuSO}_4$ , au 3,5-dichlorophénol et au diuron. Dans chacun des cas, les bandes Raman les plus décisives lors des processus de classification des spectres sont surlignées. Identifiées à partir des résultats des analyses par ICA, elles définissent les « signatures spectrales » des effets de la toxicité sur la bactérie, différentes pour chacune des substances testées au cours de cette étude.

**A) SPECTRE BACTÉRIEN ET ATTRIBUTION DES BANDES RAMAN CARACTÉRISTIQUES**



**B) BILAN DES SIGNATURES SPECTRALES DE TOXICITÉ POUR LA BACTÉRIE *E. COLI* NR698**

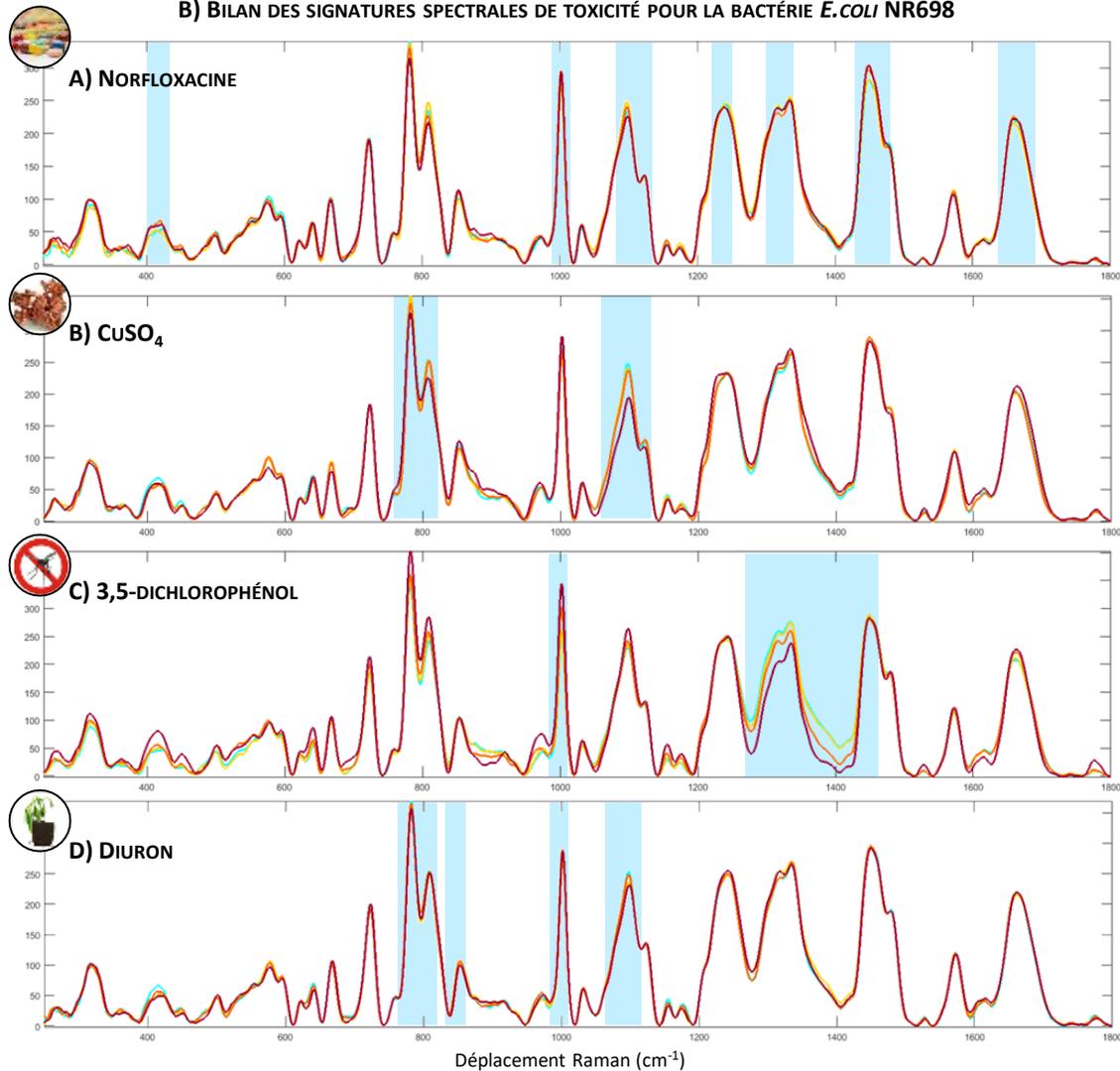


Figure 55 – Bilan des signatures de toxicités obtenues pour la norfloxacin, le CuSO<sub>4</sub>, le 3,5-Dichlorophénol et le diuron sur les spectres Raman d'*E. coli* NR698.

A) Attribution de certaines bandes caractéristiques du spectre bactérien (Extrait de la Figure 19, pour plus de détails se référer au Tableau 9). B) Spectres Raman moyens obtenus suite à l'exposition de la bactérie aux différentes concentrations de chaque toxique. Les bandes surlignées sont celles grâce auxquelles il est possible de classer les spectres en fonction de différentes concentrations de toxique. Elles sont identifiées à partir du profil de loading de l'ICA la plus significative des analyses par ICA correspondantes. Les spectres en bleu sont les spectres témoins. En jaune, orange, rouge, les concentrations croissantes de chacun des toxiques.

La signature spectrale des effets de la norfloxacine sur la bactérie *E. coli* NR698 met en évidence des zones du spectre caractéristiques de la contribution des lipides et des protéines, mais surtout en particulier des acides gras. Surlignées Figure 55 (A), ces bandes permettent la meilleure discrimination des spectres en fonction des différentes concentrations d'antibiotique. Elles ont été sélectionnées pour leur forte contribution au loading de l'IC systématiquement la plus significative du processus d'analyse des spectres (Cf. Chapitre I4 § 2.1.1) dont il est intéressant ici d'étudier de manière plus approfondie le profil (Figure 56). On constate en effet que la plupart des bandes qu'il met en évidence sont caractéristiques des spectres des acides gras. Notamment, la bande situées entre 1400 et 1500  $\text{cm}^{-1}$ , due à des déformations au niveau des groupements  $-\text{CH}_2$  et  $-\text{CH}_3$ , que l'on retrouve sur les spectres des acides gras linéaires saturés et insaturés mais aussi sur ceux des acides gras ramifiés<sup>81</sup>. Son intensité augmente avec les concentrations d'antibiotique. Aussi très bien mise en évidence par le loading on retrouve à 1650  $\text{cm}^{-1}$  une bande caractéristique des acides gras insaturés. Enfin, autour de 400  $\text{cm}^{-1}$  et entre 1070 et 1150  $\text{cm}^{-1}$  apparaissent les contributions de deux bandes présentes en particulier sur le spectre du glycérol. Ces observations sont intéressantes sachant que la norfloxacine est connue pour induire chez *E. coli* une augmentation de la production d'acides gras et une diminution de celle de glycérophospholipides<sup>145</sup>. Les acides gras sont notamment utilisés par la cellule comme matières premières de lipides plus complexes. Ainsi, les premiers pouvant être utilisés par la cellule pour la production des seconds, l'augmentation de la synthèse d'acide gras couplée à une diminution de celle de phospholipides correspondrait à un mécanisme de résistance de la cellule pour compenser une détérioration de sa membrane. Ces observations sont cohérentes avec les variations des bandes correspondantes sur le spectre de la bactérie. En effet, alors que les intensités des bandes situées à 1296 et 1450  $\text{cm}^{-1}$  augmentent, celles des bandes plus particulièrement retrouvées sur le spectre du glycérol (1070-1150  $\text{cm}^{-1}$ ) diminuent<sup>a</sup>. Par ailleurs, on note aussi sur les spectres de la bactérie exposée aux concentrations croissantes de norfloxacine une diminution de l'intensité des bandes correspondant à l'ADN et à l'ARN entre 785 et 850  $\text{cm}^{-1}$ . Bien que ce

---

<sup>a</sup> Cette bande large située entre 1050 et 1150  $\text{cm}^{-1}$  est aussi souvent associée à des variations au niveau de la structure de l'ADN de part la contribution de liaisons  $-\text{PO}_2^{-1}$  qui constituent son squelette. Cependant, comme évoquée lors de la synthèse bibliographique, dans le cas de l'analyse d'échantillons complexes tels que du matériel biologique il est fréquent que les bandes soient la résultante des contributions de plusieurs types de fonctions chimiques et donc de molécules. Dans le cas qui nous intéresse ici, cette bande est extraite du spectre sur la même composante que des bandes relatives aux lipides et aux protéines alors que d'autres composantes étaient au contraire plus impactées par des bandes associées aux acides nucléiques. C'est pourquoi il paraît plus judicieux ici d'interpréter ses variations comme relatives aux phospholipides plutôt qu'à l'ADN. Dans le cas de la signature spectrale du cuivre sur *E. coli* NR698 (voir plus loin), le scénario est inverse et la contribution de cette bande se trouve liées par les résultats des ICA à celles des bandes spécifiquement relatives aux acides nucléiques. Elles sont alors interprétées comme des variations intervenant plutôt sur ce type de molécules.

ne soit pas sur l'IC retenue pour dresser la signature spectrale des effets de la substance, ces bandes sont nettement mises en évidence lors des analyses par ICA (Cf. IC2 Figure 43) et les variations observées sont elles aussi intéressantes à mettre en lien avec les mécanismes connus du fonctionnement de cet antibiotique. De la famille des quinolones de seconde génération il agit en effet notamment par inhibition de l'ADN gyrase et des topoisomérases de type IV au niveau des étapes de segmentation de l'ADN. L'inhibition de ces enzymes perturbe les étapes de segmentation de l'ADN en empêchant le ré-appariement des brins. Les mécanismes de réplifications de l'ADN s'en trouvent interrompus, conduisant à l'inhibition de sa synthèse ce qui pourrait expliquer la diminution de l'intensité des bandes Raman correspondantes. Après une période de bactériostase, la mort cellulaire est associée à l'apparition de cassures double brin, provoquant la fragmentation des chromosomes<sup>146,147</sup>.

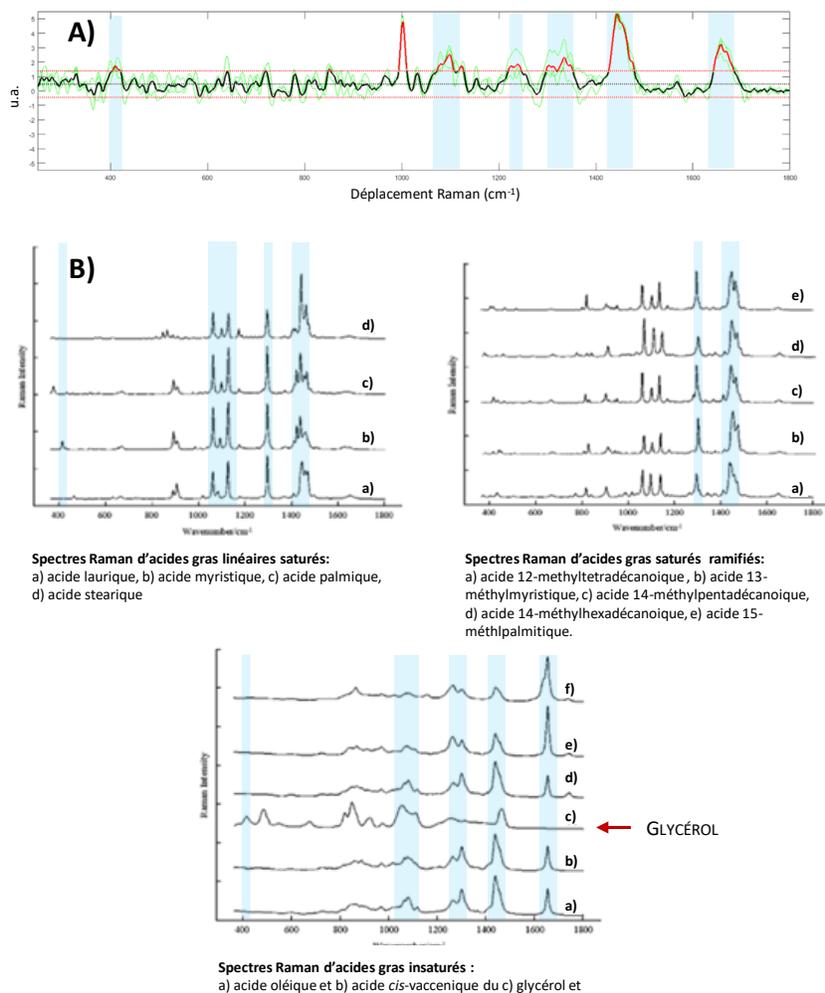
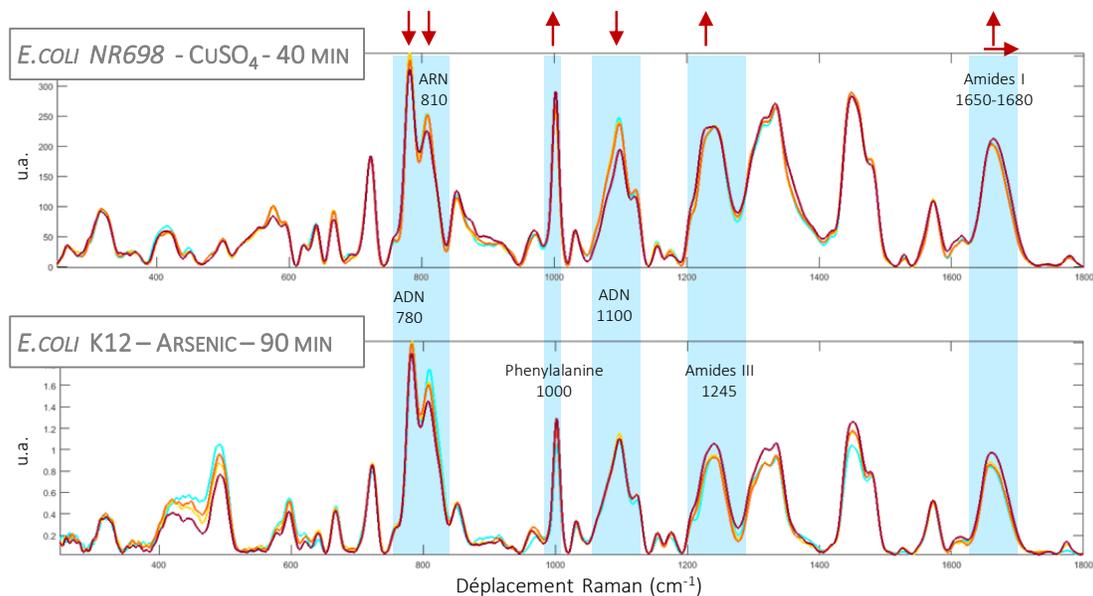


Figure 56 – A) Loading de l'IC la plus significative obtenue lors de l'analyse des effets de la norfloxacine sur les spectres d'*E. coli* NR698. B) Spectres Raman caractéristiques d'acides gras saturés et insaturés, issus de la base de données de De Gelder *et al.*<sup>81</sup>. Il est intéressant de constater que le profil du loading présente d'importantes similarités de bandes avec les spectres des acides gras.

Concernant les effets du cuivre sur les spectres d'*E. coli* NR698, les variations spectrales les plus significatives apparaissent au niveau des bandes ADN et ARN (785 et 810  $\text{cm}^{-1}$ ) dont l'intensité baisse avec l'augmentation des concentrations (Figure 55 B). Ces variations s'associent à celles de la bande située entre 1050 et 1150  $\text{cm}^{-1}$  associée aux groupements phosphates  $-\text{PO}_2^-$  de l'ADN et dont l'intensité diminue aussi. Mise en évidence par la composante la plus discriminante des résultats des ICA, ces bandes sont les plus significatives pour la caractérisation des effets du métal sur *E. coli* NR698. Il est intéressant de constater que ces résultats sont très similaires à ceux obtenus lors des analyses préliminaires sur les spectres de la bactérie *E. coli* K12-MG1655 exposée à l'arsenic (Cf. : Chapitre III). En effet, lors de ces essais, les mêmes analyses par ICA ont été réalisées et les résultats permettent d'observer sur le profil de l'IC la plus discriminante l'apparition des mêmes bandes Raman que celles identifiées sous les effets du cuivre (Cf. loading IC1 Figure 29). Les variations spectrales correspondantes pourraient résulter de phénomènes d'oxydation. En effet, le cuivre comme l'arsenic induisent l'apparition d'un nombre important de radicaux libres responsables de la dénaturation irréversible de l'ADN et de l'ARN <sup>131,148</sup>.



**Figure 57 - Comparaison des spectres obtenus suite A) à 40 min d'exposition de la bactérie *E. coli* NR698 au  $\text{CuSO}_4$ , B) à 90 min d'exposition de la bactérie *E. coli* K12 à l'arsenic.**

**Les flèches illustrent les variations relatives d'intensité des spectres en fonction de l'augmentation des concentrations en toxiques. Les spectres en bleu sont les spectres témoins. En jaune, orange, rouge, les concentrations croissantes de chacun des toxiques.**

Par ailleurs bien que moins significatives, d'autres variations apparaissent aussi de manière similaire par les deux métaux (Figure 57). Notamment, l'intensité des bandes situées entre 1200 et 1400  $\text{cm}^{-1}$  augmente. Associées aux amides III caractéristiques des protéines et aux lipides, leurs variations peuvent être attribuées à des phénomènes de dénaturation<sup>106</sup>. Des modifications spectrales similaires sont

observables au niveau de la bande correspondant à la phénylalanine ( $1000\text{ cm}^{-1}$ ) ainsi que sur celle correspondant aux amides I entre  $1650$  et  $1700\text{ cm}^{-1}$ . Dans les deux cas, on observe non seulement une augmentation de l'intensité de cette dernière bande avec l'augmentation des concentrations en toxique, mais aussi un léger shift de quelques  $\text{cm}^{-1}$  vers la droite. Or le cuivre comme l'arsenic agissent au niveau de la membrane notamment de part des mécanismes de chélation<sup>131,148</sup>. La dépolarisation qui en résulte peut expliquer le léger décalage observé sur les bandes Raman. Le cuivre et l'arsenic dont certains mécanismes de toxicité présentent des similitudes, semblent ainsi induire des variations équivalentes sur les spectres Raman de ces deux bactéries *E. coli*. Cependant, alors que la bactérie *E. coli* NR698 n'a été exposée au cuivre que pendant une durée de 40 min, les effets équivalents ne sont observés sur *E. coli* K12 qu'après 90 min d'exposition au toxique. Cette différence d'intensité de réponse est peut être imputable à la différence de structure existant entre ces deux microorganismes. Bien qu'il s'agisse de la même espèce, K12 est de type sauvage alors qu'NR698 est un spécimen muté dont la membrane est rendue perméable. Cette caractéristique rend NR698 plus sensible au toxique et pourrait provoquer l'apparition plus rapide des variations spectrales induites par le métal. Un autre élément d'explication réside dans le milieu utilisé pour chacun de ces essais. Les analyses sur le cuivre sont réalisées en milieu minimum synthétique dont la pauvreté favorise une plus grande sensibilité à la toxicité. Au contraire, celles effectuées sur l'arsenic ont été réalisées en milieu LB riche.

La signature du 3,5-dichlorophénol se retrouve quant à elle au niveau de la fenêtre spectrale situées entre  $1300$  et  $1500\text{ cm}^{-1}$ . On y trouve d'une part une bande spécifiquement associées aux lipides ( $1296\text{ cm}^{-1}$ ) et dont l'intensité diminue sous l'effet des concentrations croissantes de toxique mais aussi d'autre part une bande associée à la fois aux acides gras mais aussi à la présence de protéines en générale<sup>a</sup> ( $1450\text{ cm}^{-1}$ ). Bien que légèrement inférieure pour la plus forte concentration de toxique, on note que de manière générale son intensité ne varie pas. Or, les composés phénols sont des composés lipophiles dont l'impact toxique se retrouve principalement du fait de leur action au niveau de la membrane des microorganismes. Leur effet conduit à des variations du ratio lipides/protéines ainsi qu'à un dysfonctionnement de certaines protéines membranaires. Une étude réalisée par Keweloh *et al.* sur la croissance d'*E. coli* en présence et absence de phénols, montre en effet une diminution du ratio lipides/protéines sous l'effet du toxique, en particulier du fait d'une diminution de la quantité de phospholipides<sup>149</sup>. Ainsi, les variations relatives de ces deux bandes, identifiées de manière récurrente sur les loadings des ICs significatives tendent à

---

<sup>a</sup> Du fait des déformations  $\delta(\text{CH}_2)$  et  $\delta(\text{CH}_3)$  des acides aminés.

exprimer une diminution relative des bandes associées aux lipides par rapport à celles associées aux protéines. Par ailleurs, l'action des phénols provoquerait une augmentation de la perméabilité de la membrane, et l'augmentation de la quantité de protéines membranaires résulterait d'une adaptation visant à limiter la fuite de constituants cellulaires. Or des bandes Raman situées entre 400 et 500  $\text{cm}^{-1}$  voient aussi leur intensité varier pour les plus fortes concentrations du toxique. Bien que plus discrètes ces bandes notamment associées aux carbohydrates présents au niveau de la membrane plasmique.

Les effets du diuron n'ont pas conduits sur les spectres d'*E. coli* NR698 à des différences assez significatives pour permettre une distinction nette des groupes en fonction de chacune des concentrations testées. Des variations spectrales existent néanmoins et un effet dose réponse est mis en évidence d'une part par la nature des principales erreurs de classification des résultats des AFD, d'autre part par les analyses de la répartition des spectres par ANOVA en fonction des composantes les plus significatives issues des résultats des ICA. Ainsi, si toutes les concentrations ne se distinguent pas, des variations nettes apparaissent entre le témoin et la concentration la plus élevée. Enfin, malgré la faible intensité des variations spectrales observables sur les spectres moyens, les analyses par ICA identifient toujours les mêmes bandes Raman. La signature spectrale obtenue met ainsi en évidence les bandes relatives aux structures O-P-O (785 – 810  $\text{cm}^{-1}$ ) et aux liaisons  $\text{PO}_2^-$  (1100  $\text{cm}^{-1}$ ) de l'ADN et de l'ARN, ainsi que deux bandes associées aux contributions de la tyrosine (830  $\text{cm}^{-1}$ ) et de la phénylalanine (1004  $\text{cm}^{-1}$ ). On note cependant que mise à part sur la bande située à 1100  $\text{cm}^{-1}$  dont l'intensité diminue légèrement sous l'effet des concentrations croissantes de toxique, aucune variation n'est observable de manière nette sur les autres bandes identifiées. De la famille des herbicides le fonctionnement du diuron consiste à empêcher la photosynthèse en bloquant les systèmes de transfert d'électrons du photosystème II des microorganismes photosynthétiques et des plantes<sup>150</sup>. Aussi, n'en étant pas la cible directe, il est difficile d'interpréter les variations spectrales observées par rapport aux mécanismes d'action particuliers ayant causés un impact, même faible, sur cette bactérie.

### 3. VARIETES DES MODELES POUR UNE VARIETE DE SIGNATURES

Les résultats de l'analyse des spectres d'*E. coli* NR698 exposée à la norfloxacine, au cuivre, au 3,5-dichlorophénol ainsi qu'au diuron confirment l'existence de variations spectrales spécifiques sous l'effet d'une toxicité donnée. Cette spécificité se traduit par des variations de l'intensité de certaines bandes Raman caractéristiques, associées à la mise en évidence de combinaisons de signaux distinctifs sur les loadings des ICs résultants des analyses par ICA. Pour la norfloxacine, le  $\text{CuSO}_4$  et le 3,5-dichlorophénol ces signaux sont sans équivoque. Cependant le diuron, peu toxique pour *E. coli* NR698, n'engendre en conséquence que peu de variations sur les spectres de la bactérie. C'est pourquoi dans la deuxième partie de cette étude, le but a été de confronter les résultats déjà obtenus avec des analyses cette fois réalisées sur d'autres modèles cellulaires (*B. subtilis*, *S. cerevisiae*, *C. reinhardtii*). Déjà présentés plus en détail en introduction de ce chapitre ils sont choisis pour représenter différents modèles métaboliques. Cette partie s'attachera dans un premier temps à confirmer la pertinence et la spécificité des signaux Raman qu'ils permettent d'obtenir sous l'effet des différentes substances toxiques de l'étude.

#### 3.1. BACTERIE GRAM+ : BACILLUS SUBTILIS SUBTILIS

Comme avec NR698, l'analyse des effets des toxiques sur *B. subtilis* est décomposée en trois étapes,

- 1) à partir des essais d'inhibition de la respiration,
- 2) puis par observation des spectres Raman qui sont d'abord analysés par AFD afin d'évaluer la possibilité de les classer en fonction des différentes concentrations testées,
- 3) avant de déterminer par ICA les signatures spectrales de chaque substance.

Les résultats des tests de toxicité et des analyses par AFD sont synthétisés Figure 58. Par rapport à la toxicité observée sur *E. coli* NR698, *B. subtilis* est moins sensible à la norfloxacine. L'inhibition maximale de la respiration observée n'est que de  $31,6 \pm 8,1\%$  pour 40 min d'exposition à  $50 \text{ mg.L}^{-1}$  (Figure 58 A). Ces résultats sont cohérents en regard du spectre d'action limité de la norfloxacine vis-à-vis des bactéries de type gram<sup>+</sup><sup>151</sup>. Identiques à celles utilisées lors des essais sur *E. coli* les concentrations utilisées lors des tests Raman ont donc un effet subléthal. L'analyse des spectres obtenus par AFD corrobore ces résultats : le taux de classification correcte des spectres n'est que de  $64,5 \pm 6,12\%$  soit insuffisant pour sortir de la fenêtre de classification attribuable à la simple variabilité expérimentale (évaluée pour *B. subtilis* à  $67 \pm 15\%$  (Cf. Figure 35)).

ESSAIS D'INHIBITION DE LA RESPIRATION

RÉSULTATS DE CLASSIFICATION PAR AFD

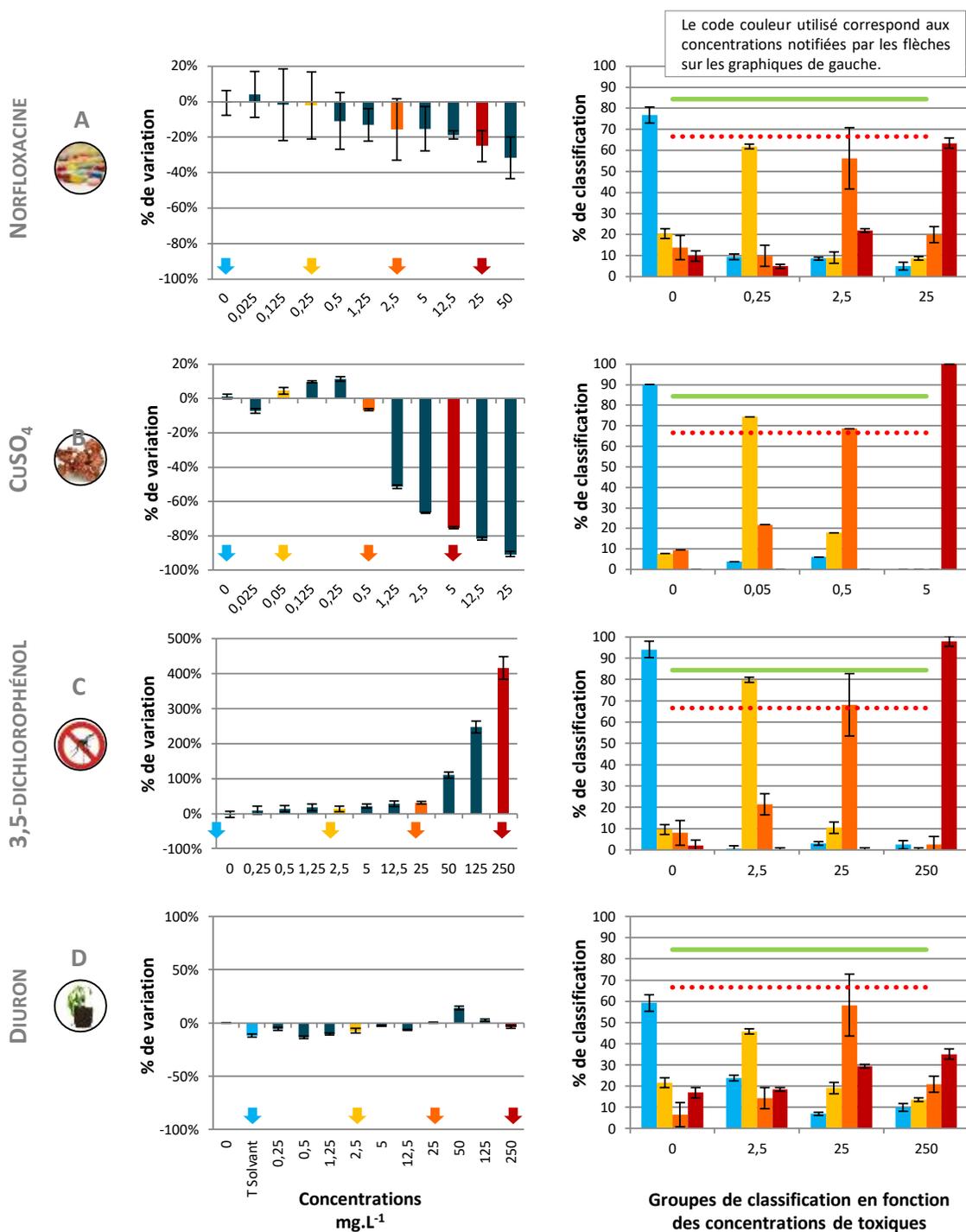
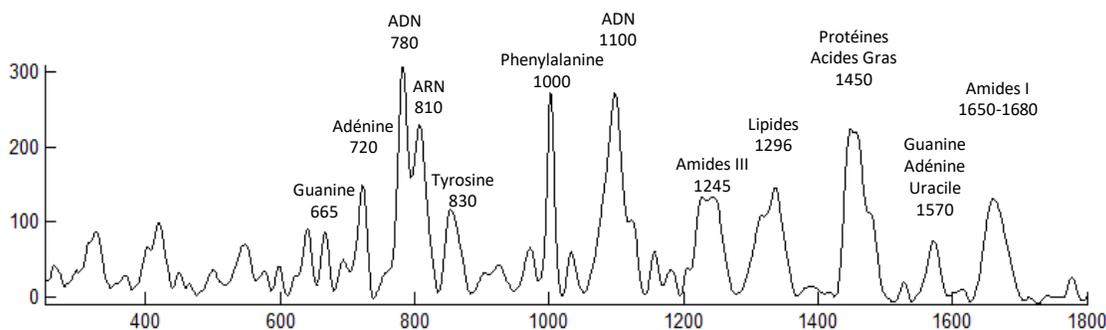


Figure 58 – Résultats des essais de toxicité sur *B. subtilis* et classification par AFD des spectres Raman obtenus suite à l'exposition de la bactérie à quatre concentrations de chacune des substances de l'étude. Les tests de toxicité sont exprimés en pourcentage de variation de la conversion de résazurine (respiration) par rapport au témoin. Sur les résultats de classification des spectres par AFD, la ligne pointillée en rouge (moyenne) et la ligne verte (écart-type) indiquent le seuil de significativité de la classification déterminé à partir de la variabilité expérimentale. Il est fixé à  $67 \pm 15\%$  pour *B. subtilis* (Cf. Figure 35)

La toxicité limitée des concentrations testées explique la faible amplitude des variations spectrales qui, de fait, ne permettent pas une classification fiable des spectres. Cependant, bien que les scores de classification soient faibles en moyenne, on observe ici encore une répartition des erreurs associée à l'apparition de variations spectrales progressives en fonction de l'augmentation des concentrations testées. Ce phénomène dose-réponse est encore plus flagrant sur les résultats de classification des spectres de la bactérie exposée au  $\text{CuSO}_4$  (Figure 58 B) et au 3,5-dichlorophénol (Figure 58 C). En effet, pour ces toxiques les scores de classification obtenus pour les deux plus faibles concentrations testées (0,05 et 0,5  $\text{mg.L}^{-1}$  pour le cuivre et 2,5 et 25  $\text{mg.L}^{-1}$  pour le dichlorophénol) sont inférieurs à ceux de la valeur seuil de significativité. Cependant, ces scores résultent de confusions non aléatoires cohérentes avec les résultats des tests d'inhibition de la respiration qui montrent un degré de toxicité équivalent des deux concentrations. A l'inverse, les spectres témoins et ceux associés aux concentrations les plus élevées conduisent à des scores de classification supérieurs à 90%. Enfin, les résultats des essais d'inhibition de la respiration ne témoignent d'aucune toxicité du diuron sur la bactérie *B. subtilis*. Les analyses par spectroscopie Raman sont néanmoins réalisées dans les mêmes conditions que pour les autres substances, après une exposition de 40 min à trois concentrations croissantes du toxique. Les résultats obtenus reflètent ceux des analyses de toxicité. En effet, les scores de classification des spectres par AFD ne sont que de  $49,6 \pm 9,1\%$  soit inférieur à la variabilité expérimentale.

Les signatures spectrales de chacune des substances sont ensuite déterminées par ICA (Figure 59). Comme dans le cas d'*E. coli* NR698, les bandes les plus significatives lors des processus de classification varient pour chacune des substances. On note cependant la récurrence de la mise en évidence des bandes associées aux liaisons O-P-O architecturales de l'ADN et de l'ARN entre 780 et 810  $\text{cm}^{-1}$ . Les variations les plus notables apparaissent par ailleurs sous l'effet de la plus forte concentration de  $\text{CuSO}_4$ , d'une part sur la bande situées à 1100  $\text{cm}^{-1}$  associée aux liaisons  $\text{PO}_2^-$  de l'ADN, d'autre part sur celles correspondant aux contributions des lipides et des protéines entre 1200 et 1400  $\text{cm}^{-1}$ . Dans le cas du diuron, les analyses statistiques n'isolent pas de signal reproductible permettant de distinguer les spectres en fonction des différentes concentrations du toxique. Ces résultats sont cohérents avec la faible toxicité de l'herbicide pour la bactérie et les mauvais scores de classification obtenus par AFD. Ainsi, aucune signature d'effet ne peut être définie suite à l'exposition de *B. subtilis* au diuron. Enfin, il est intéressant de constater que le cuivre et le 3,5-dichlorophénol provoquent des variations sur certaines bandes aussi mises en évidence sur les spectres d'*E. coli*. Afin de recouper les résultats obtenus, une analyse croisée de l'ensemble des signatures sera réalisée en discussion dans la suite du document.

SPECTRE BACTÉRIEN ET ATTRIBUTION DES BANDES RAMAN CARACTÉRISTIQUES



BILAN DES SIGNATURES SPECTRALES DE TOXICITÉ POUR LA BACTÉRIE *B. SUBTILIS*

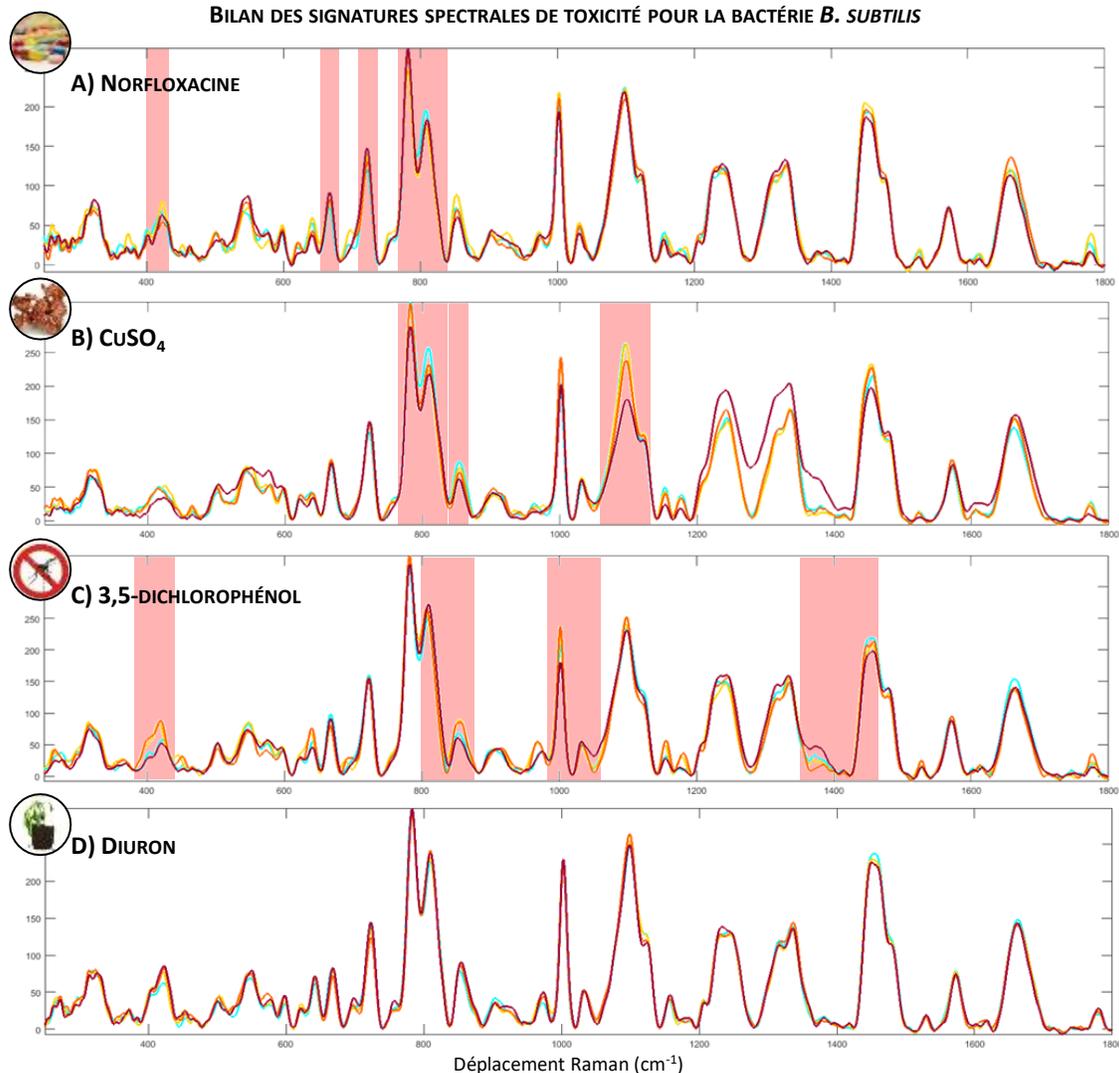


Figure 59 – Bilan des signatures de toxicités obtenues pour la norfloxacin, le  $\text{CuSO}_4$ , le 3,5-Dichlorophénol et le diuron sur les spectres Raman de *B. subtilis*.

A) Attribution de certaines bandes caractéristiques du spectre bactérien (Extrait de la Figure 19, pour plus de détails se référer au Tableau 9). B) Spectres Raman moyens obtenus suite à l'exposition de la bactérie aux différentes concentrations de chaque toxique. Les bandes surlignées sont celles grâce auxquelles il est possible de classer les spectres en fonction des différentes concentrations de toxique. Elles sont identifiées à partir du profil du loading de l'IC la plus significative des analyses par ICA correspondantes. Les spectres en bleu sont les spectres témoins. En jaune, orange, rouge, les concentrations croissantes de chacun des toxiques.

### 3.2. LEVURE : SACCHAROMYCES CEREVISIAE

Comme pour les bactéries, la toxicité des quatre substances de l'étude est évaluée. Les mesures réalisées après 40 min d'exposition montrent une inhibition croissante de la respiration de *S. cerevisiae* sous l'effet des concentrations croissantes de norfloxacin, de 3,5-dichlorophénol et de diuron (Figure 61 A,C,D). La norfloxacin provoque une inhibition maximale de  $30,5 \pm 6,8\%$  par rapport au témoin ce qui correspond à une valeur similaire à celle observée pour *B. subtilis*. Concernant le 3,5-dichlorophénol, l'inhibition la plus importante est de  $60,6 \pm 1,7\%$  pour une concentration de  $125 \text{ mg.L}^{-1}$ . Par contre, contrairement aux résultats obtenus chez les bactéries, aucun phénomène d'exaltation apparente de la respiration cellulaire n'est mesuré. Le diuron provoque quant à lui une inhibition de  $82,9 \pm 4,5\%$  pour une concentration de  $250 \text{ mg.L}^{-1}$  et apparait ainsi beaucoup plus toxique pour la levure que pour *E. coli* et *B. subtilis*. Enfin, les résultats obtenus pour le cuivre par mesure de la respiration cellulaire présentent des écarts-types importants et une réponse peu cohérente avec l'augmentation des concentrations en métal (Figure 61 B). Un essai complémentaire par suivi de croissance permet cependant d'observer une diminution du développement cellulaire à partir de  $12,50 \text{ mg.L}^{-1}$  et son interruption totale à partir de  $100 \text{ mg.L}^{-1}$  (Figure 60). Ces résultats expliquent en partie les résultats peu marqués des essais d'inhibition de la respiration au cours desquels la concentration maximale testée n'est que de  $25 \text{ mg.L}^{-1}$ . Le cuivre apparait ainsi comme notoirement moins toxique sur la levure que sur les souches bactériennes pour lesquelles les premiers effets étaient mesurés pour des concentrations dix fois moins élevées.

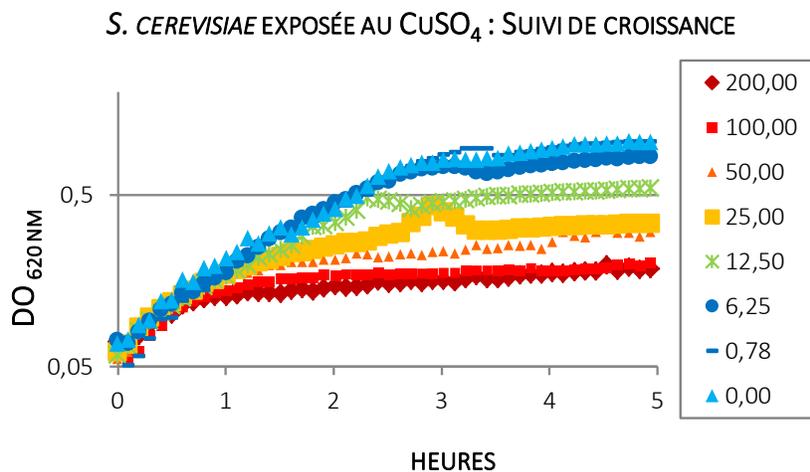


Figure 60 – Résultats des analyses de toxicité du  $\text{CuSO}_4$  sur *S. cerevisiae* par suivi de croissance.

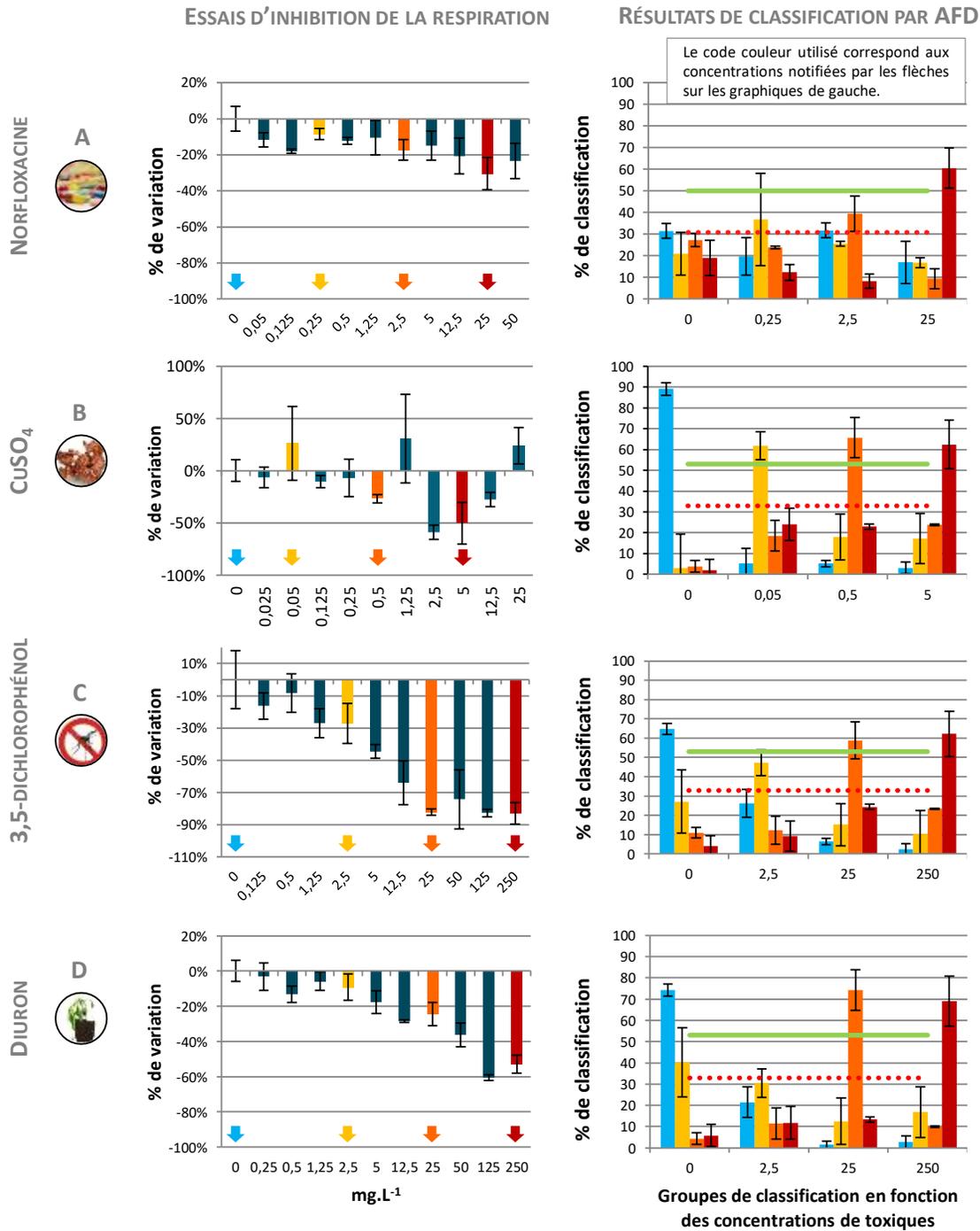


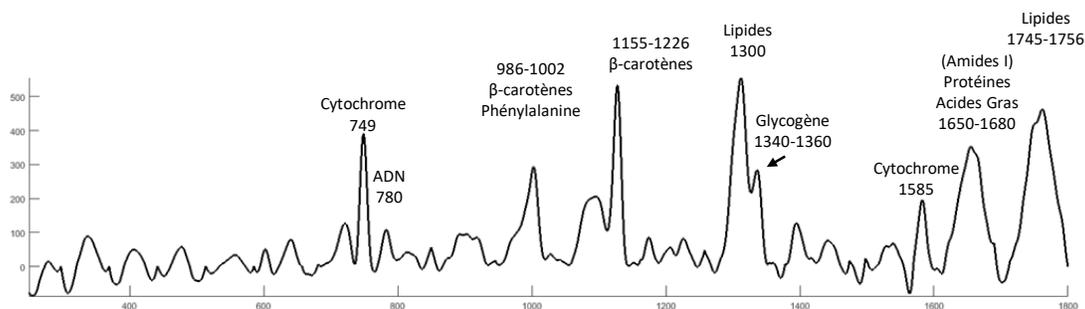
Figure 61 – Résultat des essais de toxicité de la norfloxacine, du CuSO<sub>4</sub>, du 3,5-dichlorophénol et du diuron sur *S. cerevisiae* et résultats de classification par AFD des spectres Raman obtenus suite à l'exposition de la levure à quatre concentrations de chacune des substances.

Sur les résultats de classification par AFD, la ligne pointillée en rouge (moyenne) et la ligne verte (écart-type) indiquent le seuil de significativité de la classification déterminé à partir de la variabilité expérimentale. Il est fixé 28±12% pour *S. cerevisiae* (Cf. Figure 35)

Les spectres Raman obtenus suite à l'exposition de *S. cerevisiae* à trois concentrations de chacune des substances sont ensuite analysés. Les résultats de classification par AFD sont exposés Figure 61 associés aux résultats d'inhibition de la respiration. Cohérents avec le faible degré de toxicité mesuré, les effets de la norfloxacine sur la levure ne sont pas suffisants pour permettre une bonne identification de ses spectres Raman en fonction des concentrations auxquelles elle est exposée. Les scores de classification obtenus par AFD sont inférieurs au seuil de variabilité expérimentale (fixé d'après les analyses préliminaires à  $28 \pm 12\%$  (Cf. Figure 35)). A l'inverse, l'ensemble des autres substances présente non seulement des scores de classification supérieurs au seuil de variabilité expérimentale, mais aussi des erreurs d'identification des spectres dont la répartition est cohérente avec les concentrations croissantes de toxique. Sous l'effet du cuivre près de 90 % des spectres témoins sont correctement identifiés par les AFD (Figure 61 B). Réciproquement, lorsque la levure est exposée au métal ses spectres ne sont que très peu confondus avec les spectres témoins. Par contre entre les trois concentrations testées les confusions sont non seulement nombreuses mais aussi uniformément réparties. La seule présence du cuivre semble avoir un effet sur les spectres Raman de *S. cerevisiae*, indépendamment de l'augmentation de la dose d'exposition. Or d'après les essais préliminaires de toxicité les concentrations testées n'ont pas d'effet significatif en termes d'inhibition de la croissance. Il est donc possible que les résultats obtenus via les spectres Raman correspondent à l'observation d'un mécanisme d'adaptation des cellules au stress causé par le métal. Pour le 3,5-dichlorophénol et le diuron, la plupart des erreurs de classification sont encore une fois corrélées avec des degrés similaires d'inhibition de la respiration, notamment entre les spectres témoins et ceux associés à la plus faible concentration testées de chacune des substances, ou entre les deux concentrations les plus élevées.

Enfin, les variations spectrales causées par les toxiques sont étudiées plus en détails. Les spectres moyens obtenus pour les différentes concentrations de chacune des substances sont représentées Figure 62 et les bandes Raman caractéristiques des signatures spectrales surlignées. Sur les spectres de la levure exposée à la norfloxacine, peu de variations sont observables et aucune bande Raman n'est identifiée de manière reproductible par les signaux issus des analyses par ICA. Comme dans le cas de *B. subtilis* exposé au diuron, aucune signature spectrale n'est donc définie pour caractériser les effets de l'antibiotique sur *S. cerevisiae*. Ces résultats sont cohérents avec la faible toxicité de l'antibiotique pour la levure. Sous l'effet des autres substances auxquelles elle est plus sensible, les variations sont plus nombreuses. Cependant, lors des analyses par ICA destinées à identifier les bandes Raman les plus significatives, les loadings des ICs les plus discriminantes isolent de manière systématique les signaux correspondant aux bandes Raman les plus intenses des spectres de la levure. En conséquence, il est plus difficile d'isoler des signatures spectra-

SPECTRE DE LEVURE ET TENTATIVES D'ATTRIBUTION DES BANDES RAMAN CARACTÉRISTIQUES



BILAN DES SIGNATURES SPECTRALES DE TOXICITÉ POUR LA LEVURE *S.CEREVISIAE*

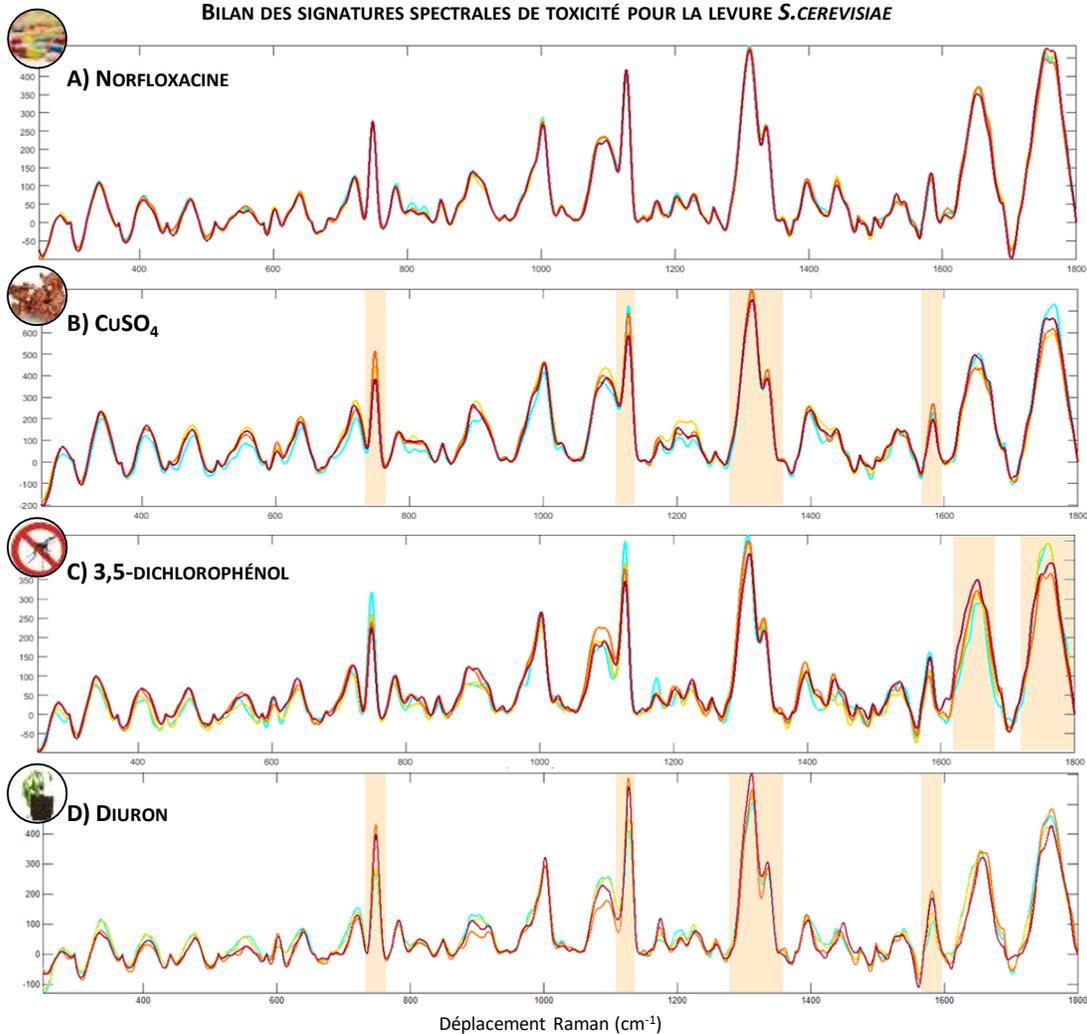
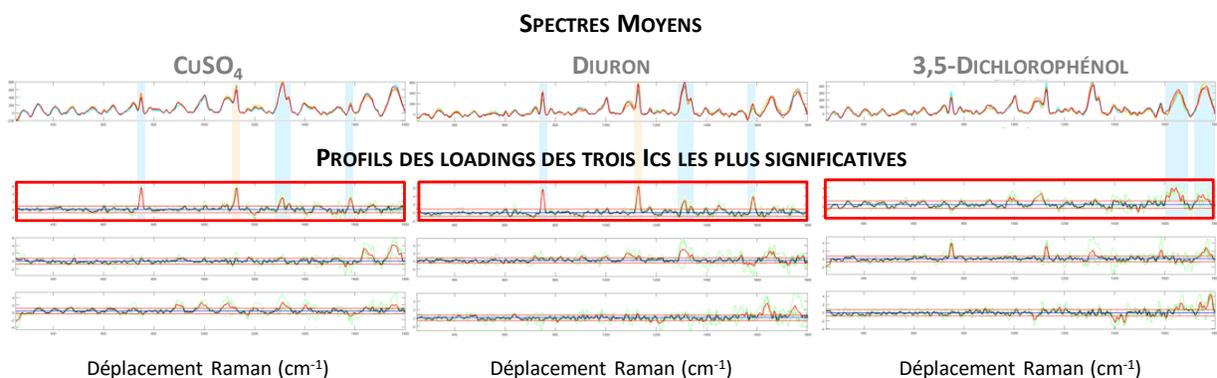


Figure 62 – Bilan des signatures de toxicités obtenues pour la norfloxacin, le  $\text{CuSO}_4$ , le 3,5-Dichlorophénol et le diuron sur les spectres Raman de *S. cerevisiae*.

A) Attribution de certaines bandes caractéristiques d'un spectre de levure (Extrait de la Figure 19, pour plus de détails se référer au Tableau 9). B) Spectres Raman moyens obtenus suite à l'exposition de la levure aux toxiques. Les bandes surlignées sont celles grâce auxquelles il est possible de classer les spectres en fonction des différentes concentrations. Elles sont identifiées à partir du profil du loading de l'IC la plus significative des analyses par ICA correspondantes. Les spectres en bleu sont les spectres témoins. En jaune, orange, rouge, les concentrations croissantes de chacun des toxiques.

-les spécifiques de chacun des toxiques. Cela est notamment dû au nombre comparativement moins important de bandes significatives sur les spectres de la levure par rapport aux spectres bactériens. Sans que son analyse détaillée ne soit nécessaire, la Figure 63 illustre ce phénomène. On y constate que pour le cuivre, le diuron et le 3,5-dichlorophénol, les loadings des trois ICs les plus significatives ont des profils quasiment identiques d'une substance à l'autre. La somme des trois, met en évidence la totalité des bandes les plus intenses du spectre caractéristique des levures. Ils sont néanmoins classés du plus significatif au moins significatif et, comme lors de l'étude des spectres bactériens, le choix est fait de ne considérer que les bandes mises en évidence par le premier des trois (encadré en rouge sur la figure) pour représenter la signature spectrale des effets de chacun des toxiques.



**Figure 63 – Représentation des loadings des trois ICs les plus significatives obtenues suite à l'analyse par ICA des spectres de *S. cerevisiae* exposée au CuSO<sub>4</sub>, au diuron et au 3,5-dichlorophénol. Seules les bandes mises en évidence par l'IC la plus significative (encadrée en rouge), sont retenues pour définir la signature spectrale des effets de chaque toxique sur la levure. Pour une représentation plus lisible des spectres se référer à la Figure 62.**

Les bandes caractéristiques de la signature du cuivre sont situées à 749 et 1585 cm<sup>-1</sup>. Elles sont associées au sein des spectres de levures à la contribution des bandes les plus intenses des spectres Raman des cytochromes<sup>152</sup>. A 1160 cm<sup>-1</sup> une des bandes caractéristiques du β-carotène est aussi mise en évidence. Leur intensité tend à diminuer, notamment sous l'effet de la concentration la plus élevée du métal (Figure 63 B). Un phénomène exactement inverse est observable dans le cas du diuron, sous l'effet duquel l'intensité de ces mêmes bandes tend au contraire à augmenter (Figure 63 D). Enfin, la signature des effets du 3,5-dichlorophénol est caractérisée par l'augmentation de l'intensité de la bande située 1650 cm<sup>-1</sup>, associée à la diminution de celle de sa voisine située à 1750 cm<sup>-1</sup>. Ces bandes sont associées aux spectres Raman des protéines notamment du fait de la contribution des amides I (Figure 63 C).

### 3.3. MICRO-ALGUE : CHLAMYDOMONAS REINHARDTII

Les essais de toxicité sur *C. reinhardtii* sont effectués par mesure de la densité optique à 750 nm sur une période de 48h d'exposition. Les premiers effets du  $\text{CuSO}_4$ , sont observés à partir d'une concentration de  $0,2 \text{ mg.L}^{-1}$  provoquant une inhibition de croissance par rapport au témoin de 10% (Figure 64 B). La concentration maximale testée ( $20 \text{ mg.L}^{-1}$ ) induit une inhibition de 48%. Identiques à celles utilisées pour les autres microorganismes, les concentrations des analyses par spectroscopie Raman sont de 0,05, 0,5 et  $5 \text{ mg.L}^{-1}$  et restent donc inférieures à la concentration maximale des essais de toxicité. Néanmoins, les analyses par AFD montrent un score moyen d'identification des spectres de  $60,7 \pm 9,6\%$ , largement supérieur au seuil de  $33,83 \pm 10\%$  correspondant pour *C. reinhardtii* à la variabilité expérimentale. De plus, comme déjà observé à plusieurs reprises lors des analyses précédentes, la majorité des erreurs de classement interviennent entre des concentrations voisines et sont proportionnelles avec l'augmentation de la toxicité associée aux doses croissantes d'exposition. Les variations spectrales les plus significatives correspondent à une augmentation de l'intensité de la bande située à  $1000 \text{ cm}^{-1}$  associée à la présence de phénylalanine et de  $\beta$ -carotène (Figure 65 B). Au contraire, une bande intense située à  $1525 \text{ cm}^{-1}$  et correspondant elle aussi à la présence de  $\beta$ -carotène voit son intensité diminuer. Enfin, des variations sont aussi observables sur la bande associée à la chlorophylle A à  $745 \text{ cm}^{-1}$ .

Des résultats très similaires sont obtenus lors des essais réalisés avec la norfloxacine (Figure 64 A). Les résultats d'identification des spectres par AFD conduisent à un score moyen de  $56,6 \pm 15,3\%$  encore une fois supérieur au seuil de significativité. Les erreurs de classement correspondent majoritairement à des confusions entre le témoin et la plus faible concentration. Pour les deux concentrations les plus élevées, les scores d'identifications correctes sont supérieurs à 70%. Par ailleurs, les variations observées sur les spectres ainsi que les profils des loadings mis en évidence par les ICs les plus discriminantes (non montrés) sont quasiment identiques à ceux obtenus lors de l'observation des effets du  $\text{CuSO}_4$  (Figure 65 A). Ces observations conduisent à souligner le fait que comme ceux de la levure, les spectres de *C. reinhardtii* sont moins riches que les spectres bactériens. En effet, les spectres de l'algue sont majoritairement constitués de bandes très intenses provoquées par les contributions de la chlorophylle ( $746, 914$  et  $1324 \text{ cm}^{-1}$ ) et des caroténoïdes ( $936-1002, 1155-1226, 1525 \text{ cm}^{-1}$ ). Leur intensité élevée leur confère un impact important lors des analyses statistiques et leur contribution constitue la majorité des signaux extraits par les ICA. Masqués par l'intensité de ceux de la chlorophylle et des caroténoïdes, il est ainsi possible que les signaux des autres molécules passent inaperçus.

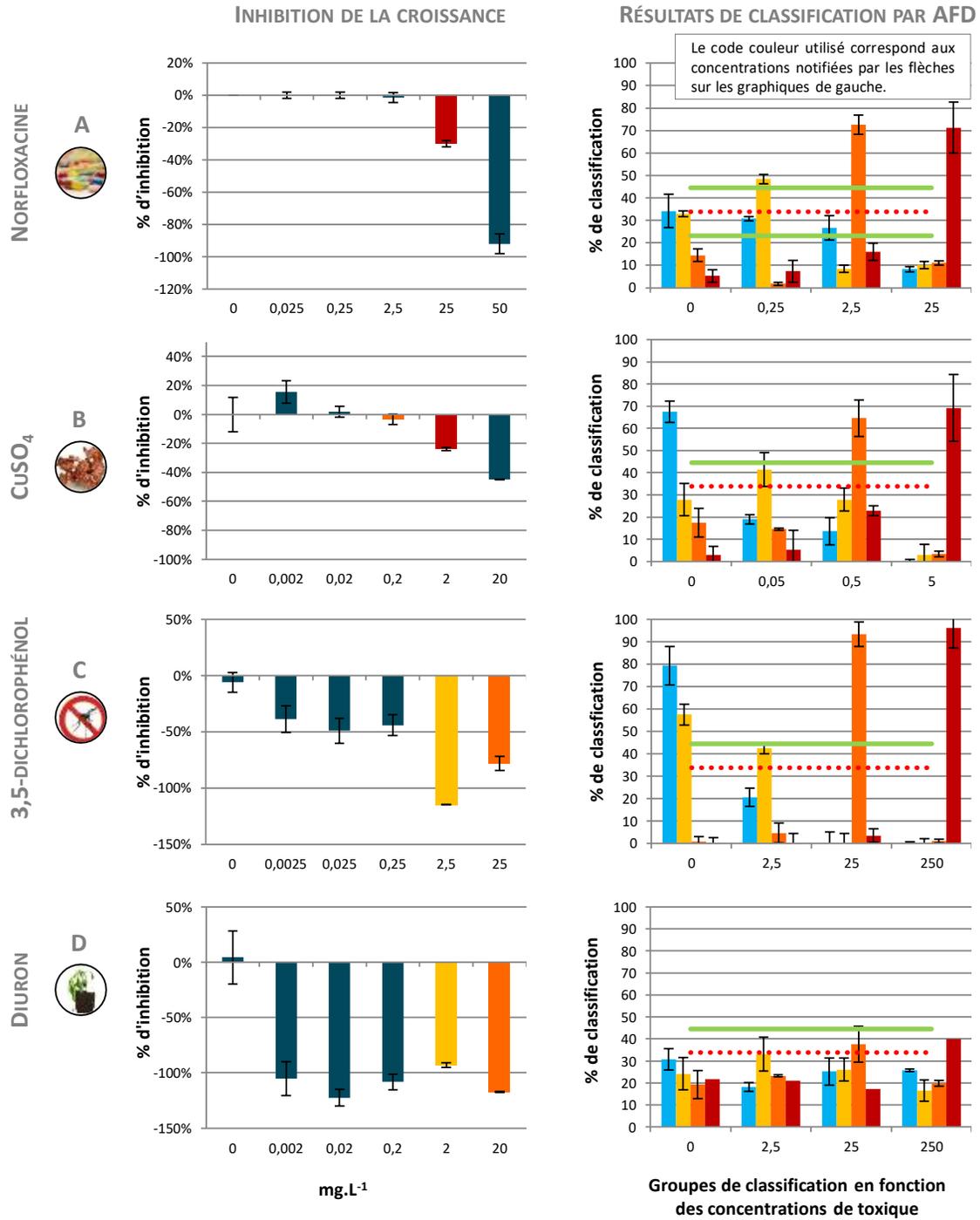
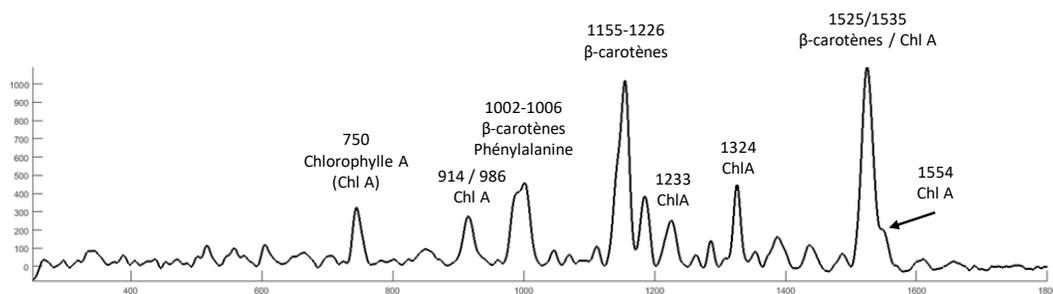


Figure 64 – Résultat des essais de toxicité de la norfloxacin, du CuSO<sub>4</sub>, du 3,5-dichlorophénol et du diuron sur *C. reinhardtii* et résultats de classification par AFD des spectres Raman obtenus suite à l'exposition de l'algue à quatre concentrations de chacune des substances.

Sur les résultats de classification par AFD, la ligne pointillée en rouge (moyenne) et la ligne verte (écart-type) indiquent le seuil de significativité de la classification déterminé à partir de la variabilité expérimentale. Il est fixé 34±11% pour *C. reinhardtii* (Cf. Figure 35)

SPECTRE DE *C. REINHARDTII* ET ATTRIBUTION DES BANDES RAMAN CARACTÉRISTIQUES



BILAN DES SIGNATURES SPECTRALES DE TOXICITÉ POUR L'ALGUE *C. REINHARDTII*

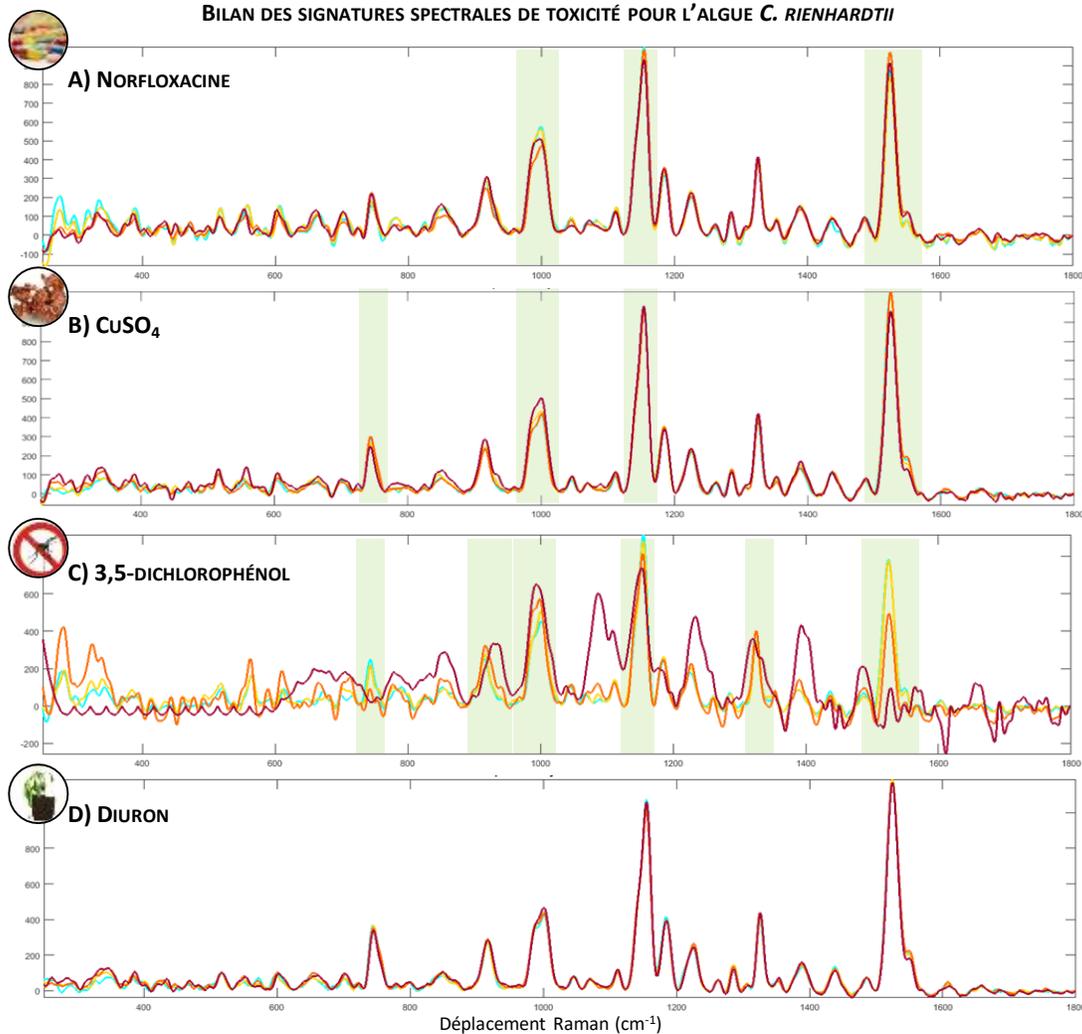


Figure 65 – Bilan des signatures de toxicités obtenues pour la norfloxacine, le  $\text{CuSO}_4$ , le 3,5-Dichlorophénol et le diuron sur les spectres Raman de *C. reinhardtii*.

A) Attribution de certaines bandes caractéristiques du spectre de l'algue (Extrait de la Figure 19, pour plus de détails se référer au Tableau 9). B) Spectres Raman moyens obtenus suite à l'exposition de la bactérie aux différentes concentrations de chaque toxique. Les bandes surlignées sont celles grâce auxquelles il est possible de classer les spectres en fonction des différentes concentrations de toxique. Elles sont identifiées à partir du profil du loading de l'IC la plus significative des analyses par ICA correspondantes. Les spectres en bleu sont les spectres témoins. En jaune, orange, rouge, les concentrations croissantes de chacun des toxiques.

Ces résultats conduisent à penser qu'en dehors d'une toxicité impactant ces bandes, il sera difficile d'identifier d'autres signatures spectrales spécifiques. Cela pourrait expliquer les résultats surprenants obtenus pour le diuron. Alors qu'il provoque un arrêt total de la croissance dès  $0,002 \text{ mg.L}^{-1}$  (ce qui le rend près de 1000 fois plus toxique pour l'algue que pour les bactéries et la levure étudiées jusqu'à présent (Figure 64 D)), ses effets ne se traduisent par aucune variation spectrale sur les spectres de *C. reinhardtii* (Figure 65 D). Les scores moyens de classification par AFD sont de  $35,4 \pm 3,4\%$  soit à peine supérieurs au seuil de variabilité expérimentale et les erreurs de classification aléatoires quelles que soient les concentrations (Figure 64 D). La toxicité du diuron vient de son action sur le photosystème II qui empêche les transferts d'électrons de la photosynthèse. En conséquence, un des premiers symptômes de son action réside dans la destruction des pigments photosynthétiques que sont la chlorophylle et les caroténoïdes. LA contribution de ces molécules étant particulièrement visible sur les spectres des algues, l'absence de signaux caractéristiques et d'autant plus étonnante. On note toutefois que si l'inhibition des photosystèmes apparait quasi-immédiate, la diminution des concentrations intra membranaire de chlorophylle semble n'apparaître qu'au bout de plusieurs heures (entre 4 et 6 heures)<sup>153,154</sup>. Les analyses Raman ayant été réalisées après seulement 4 heures d'exposition au toxique il est possible que cela explique l'absence de variation observée.

Enfin, les spectres Raman de l'algue sont au contraire très altérés par les effets du 3,5-dichlorophénol permettant une identification moyenne des spectres par AFD de  $80,7 \pm 16,1\%$ . Cette molécule induit une inhibition de la croissance de *C. reinhardtii* de 39% par rapport au témoin dès  $0,0025 \text{ mg.L}^{-1}$  pour atteindre une inhibition totale de la croissance à partir de  $2,5 \text{ mg.L}^{-1}$  (Figure 64 C). Les concentrations de 2,5, 25 et  $250 \text{ mg.L}^{-1}$  utilisées dans le cadre des analyses Raman sont donc largement toxiques et leur impact se traduit par d'importantes variations spectrales. A partir de  $25 \text{ mg.L}^{-1}$  le profil des spectres est complètement modifié avec en particulier disparition quasiment totale de la bande du  $\beta$ -carotène à  $1525 \text{ cm}^{-1}$  (Figure 65 C).

### 3.4. CONCLUSION

De manière générale, l'analyse de *B. subtilis*, *S. cerevisiae* et *C. reinhardtii* suite à leur exposition à la norfloxacine, au cuivre, au 3,5-dichlorophénol et au diuron, confirme la possibilité d'observer les impacts que de la toxicité sur les spectres Raman. Dans la majorité des conditions testées, les analyses par AFD montrent des degrés de classification correcte des spectres cohérents avec les niveaux de toxicité mesurés parallèlement. On obtient alors des taux de classification supérieurs aux seuils de variabilité

expérimentale et les erreurs de classement apparaissent principalement entre des groupes de spectres correspondant à des concentrations dont les intensités d'effets sont proches. Mise à part dans le cas particulier de *C. reinhardtii* exposée au diuron, une toxicité élevée conduit à d'excellents taux de classification (ex. : Effets du cuivre sur *B. subtilis*, du diuron sur *S. cerevisiae*, ou du 3,5-dichlorophénol sur *C. reinhardtii*). A l'inverse, lorsque la toxicité mesurée parallèlement est faible, aucune variation spectrale significative n'apparaît et les spectres ne peuvent être différenciés les uns des autres (ex. : effets du diuron sur *B. subtilis* ou de la norfloxacine sur *S. cerevisiae*). Par ailleurs, comme lors de l'analyse des spectres d'*E. coli* NR698, on identifie sur les spectres de *B. subtilis*, *S. cerevisiae*, et *C. reinhardtii*, des variations spectrales différentes en fonction des substances auxquelles les microorganismes sont exposés. Ainsi, lorsque l'exposition à une substance provoque l'apparition de variations assez significatives pour différencier les spectres des microorganismes exposés par rapport aux spectres témoins, l'étude des bandes Raman les plus impactées, associée à la connaissance des macromolécules biologiques auxquelles elles correspondent peut permettre de les relier aux impacts physiologiques de la toxicité. Cette interprétation croisée de l'ensemble des signatures spectrales obtenues est réalisée dans la partie suivante.

#### 4. COMPLEMENTARITE DES SIGNATURES POUR UN CRIBLAGE DES EFFETS TOXIQUES

Les résultats illustrés dans les parties précédentes permettent de confirmer la première hypothèse posée au début de ce travail de thèse, selon laquelle les spectres Raman d'un microorganisme donné sont impactés de manière spécifique en fonction des substances auxquelles il est exposé. En élargissant l'étude réalisée sur *E. coli* à l'analyse des spectres de *B. subtilis*, *S. cerevisiae* et *C. reinhardtii*, on constate de plus que pour un même toxique, les signatures obtenues sur les différents microorganismes ne mettent pas en évidence les mêmes bandes Raman. Aussi, il s'agit maintenant de coupler l'ensemble des résultats afin d'évaluer le gain d'information apporté par la multiplication des bioéléments.

Dans un premier temps, la prise en compte cumulée de l'ensemble des signatures, permet une amélioration de la spécificité de signature obtenue pour chacune des substances. Celles-ci sont mises en évidence sous forme de « codes-barres » Figure 66 C. A cet égard, les bandes caractéristiques des spectres de chacun des microorganismes permettent l'identification de constituants cellulaires différents et illustrent ce faisant la complémentarité des mesures. Grâce à eux, quatre grandes catégories de phénomènes physiologiques semblent observables selon qu'ils provoquent des variations au niveau des acides nucléiques, de la composition des membranes plasmiques, de la chaîne respiratoire ou témoignent d'un stress oxydant (Figure 66 D). La complémentarité des empreintes spectrales permet alors de dresser une vue plus large des impacts de la toxicité. Au cours de cette partie nous mettrons en évidence le lien entre les observations réalisées sur les spectres Raman et les mécanismes et cibles décrits de la toxicité de chacune des substances.

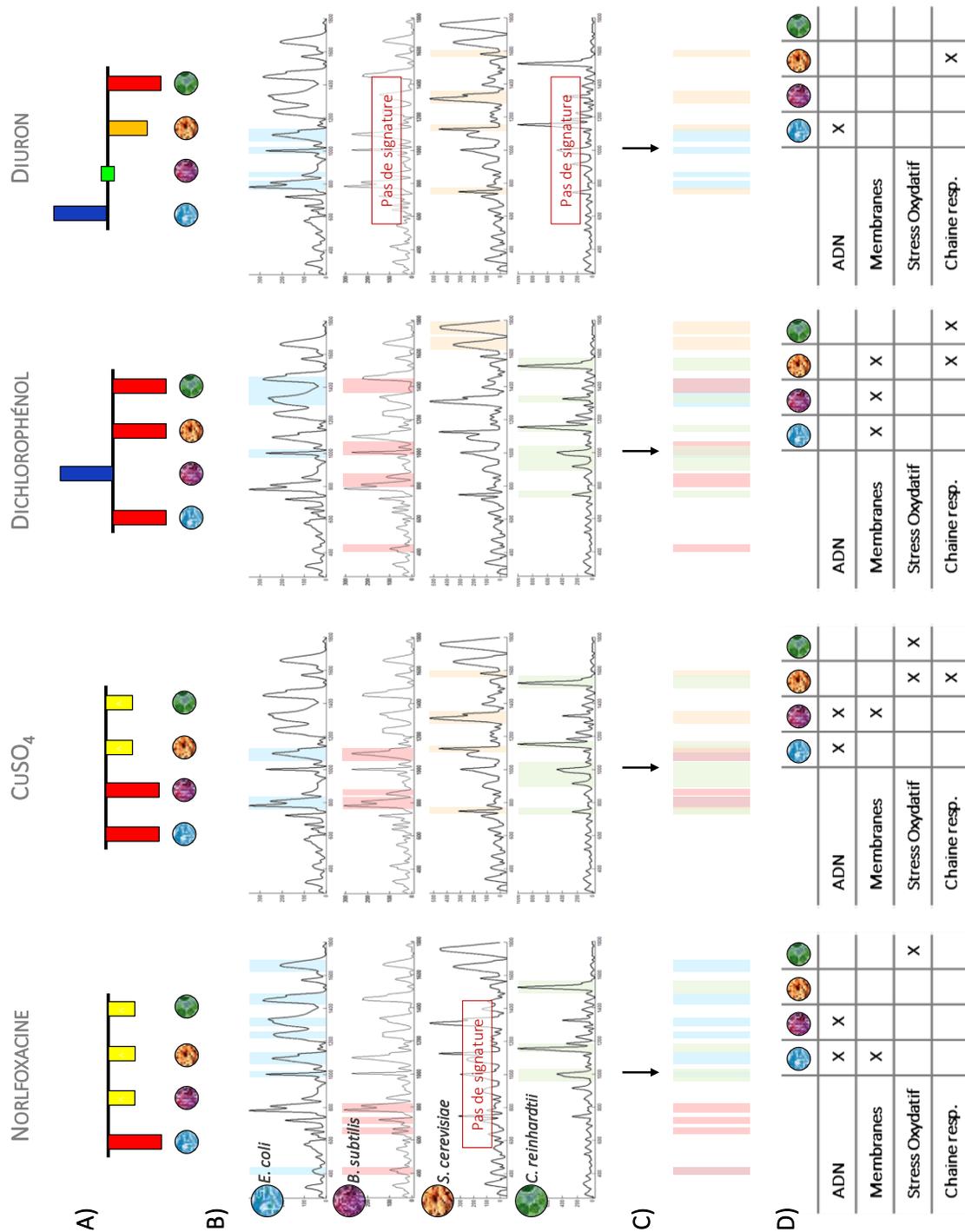


Figure 66 – Bilan des signatures obtenues grâce à l'ensemble de la base de données.

A) Représentation simplifiée des résultats d'inhibition de la respiration. Ici pour la plus forte concentration testée par spectroscopie Raman (Résultats en pourcentages de variation par rapport au témoin : Vert : -25/25 ; Jaune : -25/-50 ; Orange : -50/-75 ; Rouge : -75/-100 ; Bleu : +25). B) Spectres Raman types de chacun des microorganismes sur lesquels sont surlignées les bandes correspondant aux signatures spectrales des toxiques étudiés. C) Signature « globale » correspondant à la somme des signatures de chacun des microorganismes. D) Catégories d'effets biologiques potentiellement mis en évidence par la complémentarité des spectres de chaque microorganisme.

#### 4.1. 785, 810 ET 1100 $\text{cm}^{-1}$ : TROIS BANDES CARACTERISTIQUE DES SPECTRES BACTERIENS POUR LA MISE EN EVIDENCE D'UN IMPACT SUR LES ACIDES NUCLEIQUES

La première catégorie de phénomènes physiologiques mise en évidence à travers les spectres correspond à des impacts significatifs au niveau de l'ADN et de l'ARN (Figure 68). Ils se traduisent par les variations observées sur les bandes caractéristiques des spectres bactériens situées à 785, 810 (structure O-P-O) et 1100  $\text{cm}^{-1}$  (liaisons  $\text{PO}_2$ ). Ces bandes sont en effet significatives sur les signatures des effets de la norfloxacine et du cuivre sur *E. coli* NR698 et *B. subtilis* ainsi que sur celle des effets de l'arsenic sur *E. coli* MG1655. Le cuivre comme l'arsenic sont connus pour induire l'apparition d'un nombre important de radicaux libres responsables de la dénaturation irréversible de l'ADN et de l'ARN<sup>131,148</sup>. Or, les mêmes signatures spectrales sont obtenues non seulement lors de l'exposition d'*E. coli* NR698 au cuivre, mais aussi lors de celle d'*E. coli* MG1655 à l'arsenic (Chapitre IV § 2.2 Figure 57).

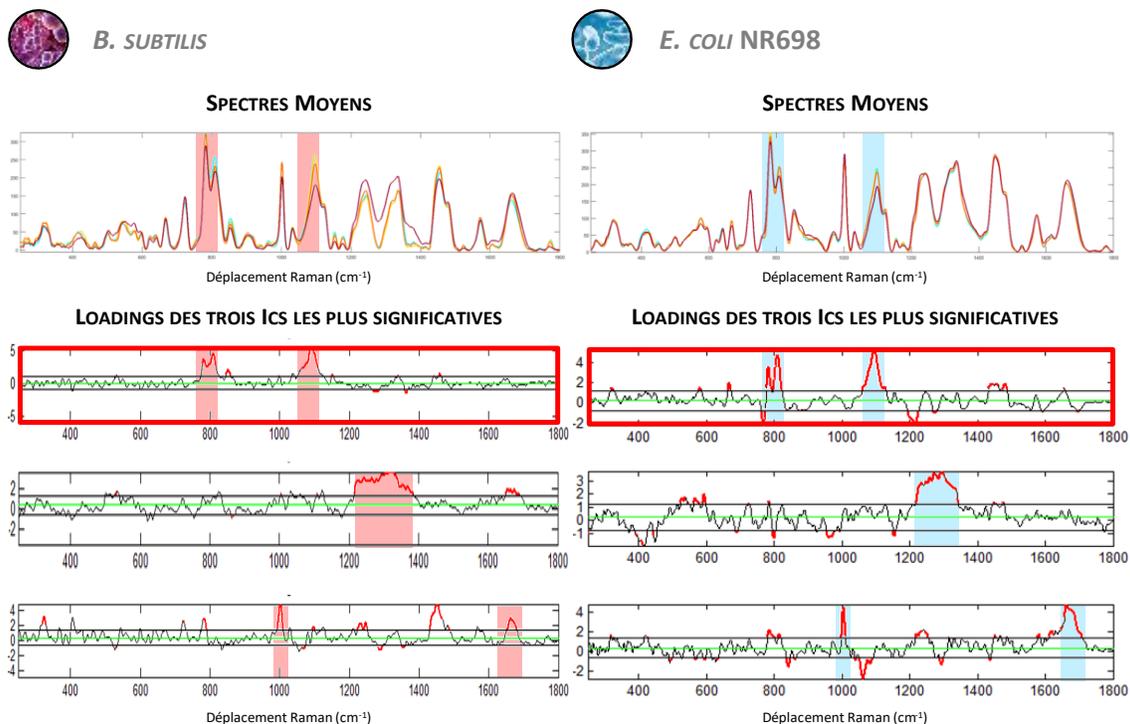
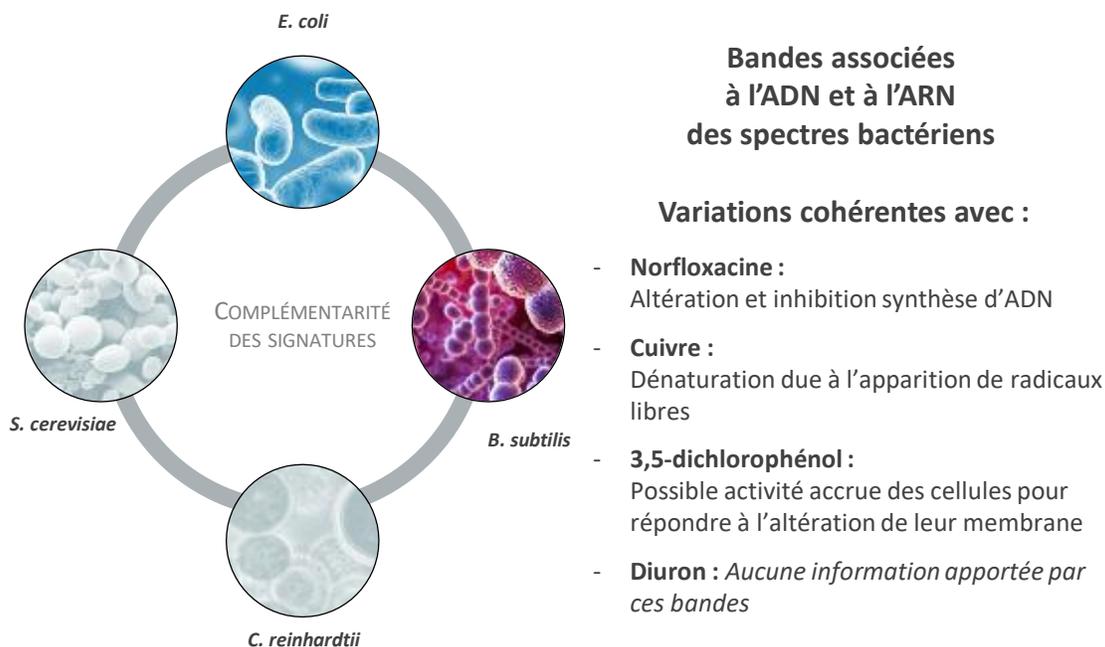


Figure 67 – Comparaison des signatures spectrales obtenues suite à l'exposition de *B. subtilis* (à gauche) et d'*E. coli* NR698 (à droite) au  $\text{CuSO}_4$ .

Encadré en rouge pour chaque bactérie le loading de l'IC la plus discriminante. Sur les spectres moyens, en bleu les spectres témoins ; En jaune, orange, rouge, les concentrations croissantes du métal.

Par ailleurs la signature spectrale obtenue sous l'effet du cuivre sur *B. subtilis* est également la même que celle observée pour *E. coli* (Figure 67). Des diminutions significatives des intensités des bandes relatives à

l'ADN et à l'ARN (785, 810 et 100  $\text{cm}^{-1}$ ) apparaissent à nouveau et tendent à confirmer l'observation par spectroscopie Raman de l'impact du métal sur ces molécules.



**Figure 68 – Liens entre variations spectrales et toxicité décrite des substances sur les acides nucléiques.**

La norfloxacine quant à elle est un antibiotique de type quinolone de seconde génération. Identique pour les bactéries gram+ et gram-, son mécanisme d'action provoque l'inhibition des topoisomérases telles que l'ADN gyrase et la topoisomérases IV. En altérant leur fonction régulatrice de la structure de l'ADN il conduit à terme à une inhibition de sa synthèse et à l'apparition de cassures doubles brins. Or, les principaux signaux isolés par les analyses statistiques sur les spectres de *B. subtilis* exposées à la norfloxacine mettent justement en évidence les contributions des bandes correspondant aux liaisons architecturales O-P-O de l'ADN (780  $\text{cm}^{-1}$ ) et de l'ARN (810  $\text{cm}^{-1}$ ), dont l'intensité diminue légèrement sous l'effet de la substance (Figure 55 A). Inversement, les intensités de deux autres bandes situées à 665 et 720  $\text{cm}^{-1}$  augmentent de manière significative. Elles correspondent respectivement à des bandes très intenses des spectres isolés de l'adénine et de la guanine<sup>81</sup>. Ces variations spectrales pourraient être cohérentes avec les mécanismes d'action de l'antibiotique qui en causant des lésions au niveau de l'ADN provoquerait la mise en place de mécanismes de réparation conduisant notamment une augmentation de la synthèse de bases azotées. Une autre hypothèse réside dans les changements structuraux des acides

nucléiques causés par l'antibiotique qui pourraient provoquer des modifications de l'exposition des bases et donc engendrer des variations sur les spectres. Il est de plus intéressant de constater que les effets de la norfloxacin sur les spectres d'*E. coli* NR698 se traduisent également par une diminution de l'intensité des bandes relatives aux acides nucléiques avec l'augmentation des concentrations.

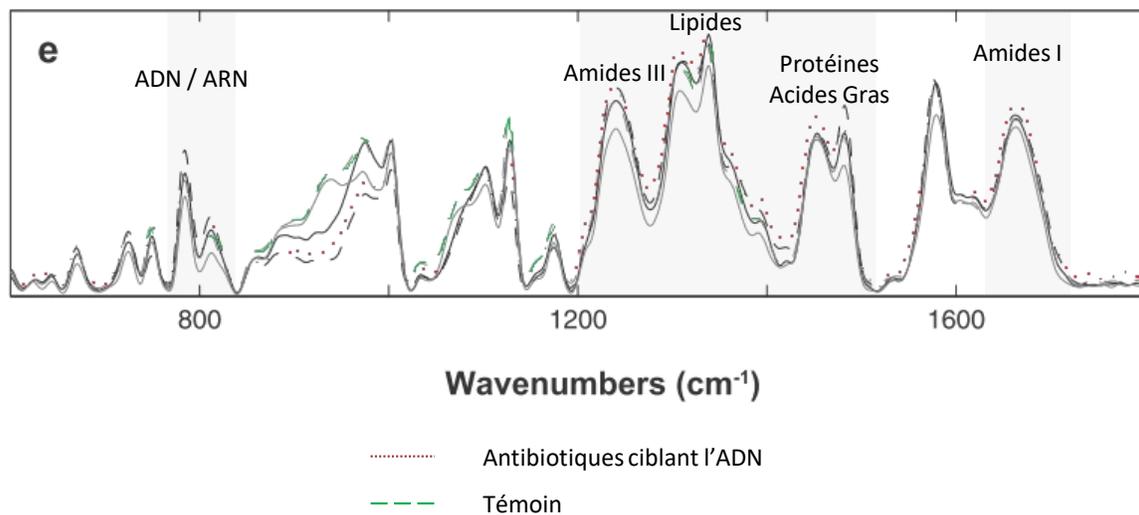
Enfin, on constate sur les spectres des deux bactéries que l'exposition au 3,5-dichlorophénol provoque une augmentation de l'intensité des bandes correspondant à l'ADN et à l'ARN entre 780 et 810  $\text{cm}^{-1}$ . Cependant, il est intéressant de remarquer que le 3,5-dichlorophénol est le seul toxique testé pour lequel de telles variations des bandes relatives aux acides nucléiques apparaissent. En effet, l'inactivation des cellules sous l'effet d'un stress est habituellement plutôt liée à une diminution de leur intensité<sup>106</sup>. A l'inverse leur augmentation est associée à un haut degré de réplication, notamment au moment de la phase exponentielle de croissance<sup>100</sup> et pourrait être corrélé avec une activité accrue des cellules pour lutter contre les effets de la substance (Cf. Chapitre IV § 4.2). En accord avec cette hypothèse, on note que lors des essais de toxicité préalables les résultats obtenus avec le 3,5-dichlorophénol montrent chez les deux bactéries une augmentation de la respiration par rapport au témoin. Si des résultats similaires sont observés aussi avec les autres substances pour *E. coli* NR698, il est le seul à provoquer l'apparition de ce phénomène chez *B. subtilis*.

## 4.2. BANDES LIPIDIQUES ET PROTEIQUES : TEMOINS D'UNE TOXICITE IMPACTANT LES MEMBRANES

Les membranes participent de manière importante aux spectres globaux des bactéries, notamment de par la contribution des protéines et des lipides qui les constituent. En conséquence toute variation de leur composition se retranscrit sur les bandes Raman correspondantes et permettent de mettre en évidence une deuxième catégorie de phénomènes physiologiques provoqués par la toxicité.

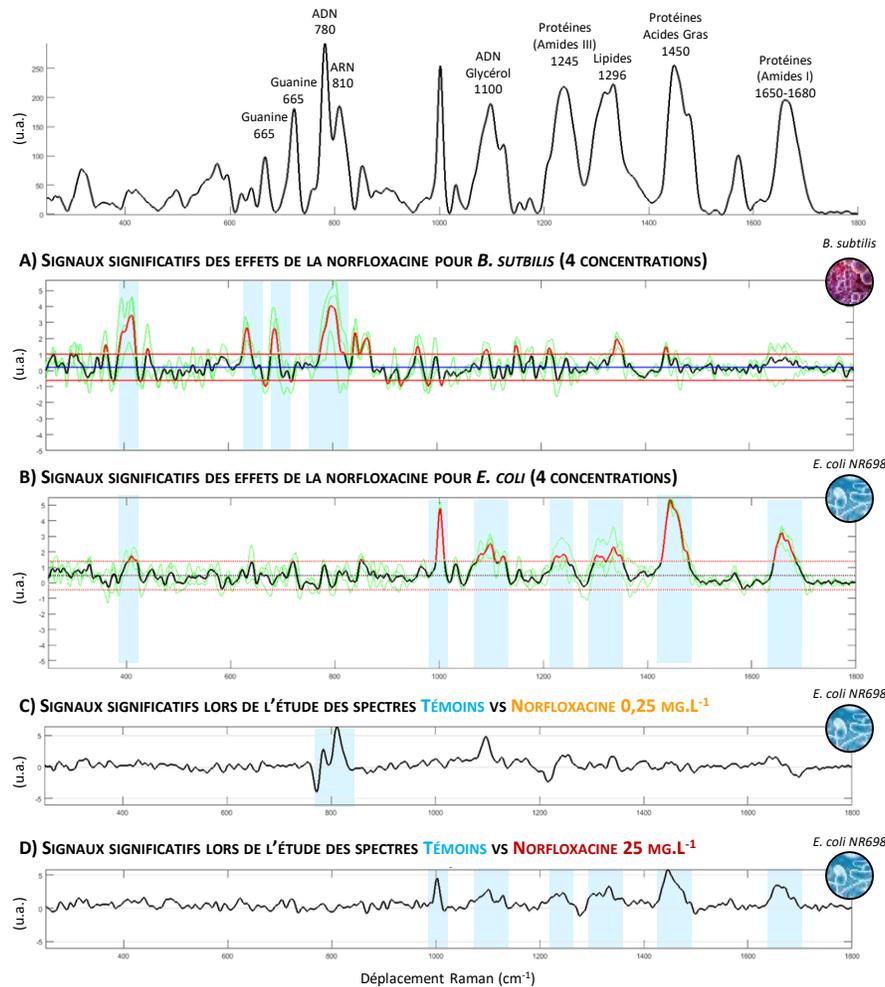
Un premier exemple est apporté par les effets de la norfloxacin sur les spectres d'*E. coli* NR698. On constate en effet que bien que mises en évidence lors des analyses statistiques, les bandes relatives à l'ADN ne sont pas les plus significatives de la signature des effets de l'antibiotique sur la bactérie (Figure 43). Au contraire, ce sont les signaux relatifs à la contribution des protéines, des lipides et plus particulièrement des acides gras qui permettent la discrimination la plus efficaces des spectres en fonction des quatre concentrations testées. Ces variations spectrales sont cohérentes avec les effets de la substance qui conduiraient à la mise en place par la cellule de mécanismes de résistance et des modifications de la composition lipidique des membranes<sup>145</sup>. Ces résultats sont en accord avec ceux des travaux réalisés par Athamneh *et al.* (2014) qui analysent les spectres Raman issus de l'observation d'*E.*

*coli* exposée à 15 antibiotiques différents<sup>105</sup>. Les antibiotiques étudiés sont classés en quatre catégories en fonction de leur cible principale, à savoir l'inhibition de la synthèse protéique, de la membrane cellulaire, de la synthèse d'ADN ou enfin d'ARN. Parmi eux, la ciproflaxine est un antibiotique de type quinolone de seconde génération ayant un mécanisme d'action similaire à celui de la norfloxacine. En analysant leurs résultats, on observe sur les spectres Raman qu'ils obtiennent des variations similaires à celles observées ici chez *E. coli* NR698: plus que des variations de l'intensité des bandes relatives aux acides nucléiques, c'est une augmentation de celles des bandes associées aux lipides entre 1300 et 1500  $\text{cm}^{-1}$  qui apparaît (Figure 69).



**Figure 69 – Figure adaptée de Athamneh *et al.* Illustrant les effets d'antibiotiques ayant pour cibles les acides nucléiques sur les spectres Raman d'*E. coli*.**

De plus, lorsqu'ils tentent de classer statistiquement les spectres de la bactérie en fonction de la classe d'antibiotique à laquelle elle a été exposée, ils constatent que les spectres correspondant à une exposition à la ciproflaxine sont très souvent confondus avec ceux associés notamment aux effets de l'ampicilline, un inhibiteur de la synthèse de la membrane plasmique. Il apparaît ainsi que bien que le mécanisme d'action de la norfloxacine et de la ciproflaxine cible en premier lieu l'ADN, ce sont les conséquences physiologiques secondaires qu'ils engendrent chez les bactéries sensibles qui conduisent aux variations spectrales les plus significatives. A l'inverse, chez *B. subtilis*, moins sensible à la substance, les impacts physiologiques sur les autres compartiments cellulaires sont moins importants. C'est pourquoi les bandes Raman les plus significatives restent celles correspondant aux liaisons structurelles de l'ADN et de l'ARN et qu'aucun impact significatif sur les bandes associées aux protéines et aux lipides n'est observé.



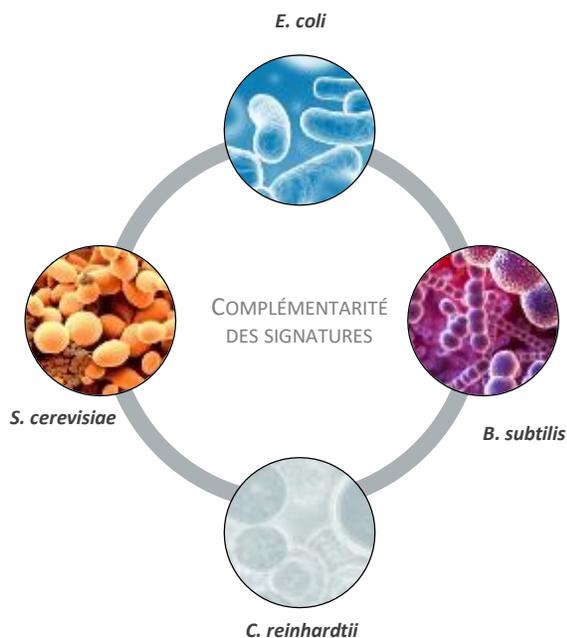
**Figure 70 – Comparaison des signaux significatifs pour la discrimination des spectres des bactéries exposées à la norfloxacin.**  
**A)** Loadings significatifs lors de l'analyse des spectres de *B. subtilis* (Jeu de données total) - **B)** Loadings significatifs lors de l'analyse des spectres de *E. coli* NR698 (Jeu de données total) - **C)** Loading significatifs lors de la comparaison des spectres témoins de *E. coli* NR698 et ceux correspondant à une exposition à **C)** 0,25 mg.L<sup>-1</sup> et **D)** 25 mg.L<sup>-1</sup> d'antibiotique. On constate que les signaux obtenus pour la plus faible concentration mettent en évidence les mêmes bandes que lors de l'analyse des spectres de *B. subtilis*. A l'inverse, la plus haute concentration donne lieu à la même signature spectrale que lors de l'analyse du jeu de données total.

Des analyses supplémentaires réalisées sur les spectres d'*E. coli* NR698 exposée à la norfloxacin viennent confirmer ces résultats. Au lieu de prendre en compte l'ensemble du jeu de données, les spectres correspondant à la plus faible concentration d'antibiotique (0,25 mg.L<sup>-1</sup>) et ceux associés à la concentration la plus élevée (25 mg.L<sup>-1</sup>) peuvent être analysés séparément. Une nouvelle signature spectrale est alors élaborée dans chacun des deux cas, en fonction des bandes Raman permettant la meilleure discrimination des groupes entre eux. Ces résultats sont présentés Figure 70. Dans le cas de la comparaison des spectres témoins par rapport à ceux de la bactérie exposée à la plus forte concentration d'antibiotique (Figure 70 D), les bandes Raman mises en évidence par le loading le plus significatif des

analyses par ICA sont identiques à celles déjà observées lors de l'élaboration de la signature spectrale générale des effets de la norfloxacine sur *E. coli* NR698 (Figure 70 B). Par contre, dans le cas de la concentration la plus faible, peu toxique, on observe que les bandes les plus significatives ne sont plus les mêmes. Elles correspondent cette fois aux signaux caractéristiques des structures de l'ADN et de l'ARN et la signature obtenue est similaire à celle observée pour *B. subtilis* (Figure 70 A). Ces résultats tendent ainsi à confirmer la cohérence des variations spectrales identifiées sur les spectres par rapport à la réalité des phénomènes physiologiques ayant lieu au sein des cellules sous l'effet de la toxicité.

Par ailleurs, le lien existant entre les variations des bandes relatives aux protéines et aux lipides et l'impact de la toxicité sur la composition des membranes des microorganismes s'illustre aussi à travers les signatures spectrales obtenues sous l'effet du cuivre et du 3,5-dichlorophénol. En effet, en plus de l'altération de l'ADN du fait de phénomènes d'oxydation, plusieurs études indiquent qu'une des causes principales de la toxicité du cuivre viendrait également d'une dénaturation des membranes cellulaires et d'une modification des voies métaboliques des protéines et les lipides<sup>155,156</sup>. Or, sous l'effet de la concentration la plus élevée du métal (5 mg.L<sup>-1</sup>) les intensités des bandes correspondantes (1200-1400 cm<sup>-1</sup>) des spectres de *B. subtilis* augmentent de manière importante (Figure 67). Ce phénomène n'est pas observé sur les spectres d'*E. coli* NR698, ce qui serait cohérent avec une plus grande sensibilité au métal des bactéries gram+ par rapport aux bactéries gram-<sup>157,158</sup>. Par contre, sous l'effet du 3,5-dichlorophénol, les mêmes bandes Raman varient cette fois sur les spectres des deux bactéries. Leur intensité diminue sous l'effet des deux plus faibles concentrations testées du toxique (2,5 et 25 mg.L<sup>-1</sup>) de manière cohérente avec l'impact connu des composés phénolés sur la composition lipidique des membranes notamment du fait de leur caractères liposoluble (Cf. Chapitre IV § 2.2)<sup>159</sup>. En revanche, sous l'effet de la concentration la plus élevée, leur intensité augmente sur les spectres de *B. subtilis*. Or les mêmes variations sont observées sous les effets de la plus haute concentration de cuivre. Cela confirmerait le lien sur les spectres de *B. subtilis* entre l'augmentation de l'intensité de ces bandes et l'observation d'une toxicité létale engendrant une forte dégradation de la membrane. Enfin, cohérente avec les variations observées sur les spectres bactériens, la signature spectrale des effets du 3,5-dichlorophénol sur *S. cerevisiae* se concentre sur les bandes situées autour de 1650 et 1750 cm<sup>-1</sup> attribuées elles aussi de manière générale à la présence de protéines et de lipides (Figure 62 C). Ces observations tendent à confirmer encore une fois l'observation sur les spectres de l'impact du 3,5-dichlorophénol sur les composés lipidiques membranaires via les spectres Raman.

Ainsi, la norfloxacine, le cuivre et le 3,5-dichlorophénol sont tous connus d'après la littérature pour avoir des impacts significatifs sur la composition des membranes cellulaires (Figure 71). Or, en fonction de leur degré de toxicité, des variations significatives sont observées sur les bandes correspondantes des spectres bactériens ainsi que sur ceux de la levure. Il est par ailleurs intéressant de noter ici que la complémentarité des réponses obtenues via les spectres d'*E. coli* NR698 d'une part et de *B. subtilis* d'autre part, ont permis une observation globale des conséquences primaires sur l'ADN et secondaires sur les membranes de la norfloxacine. Par ailleurs, les variations différentes observées sur les spectres des deux bactéries sous l'effet du cuivre et du 3,5-dichlorophénol permettent une mise en évidence plus fine des effets de la substance en fonction de l'appartenance des microorganismes aux familles gram+ d'une part et gram- d'autre part.



### Bandes associées aux lipides et aux protéines.

#### Variations cohérentes avec :

- **Norfloxacine :**  
Mécanismes de résistances d'*E. coli* provoquant des modification de la composition lipidique des membranes
- **Cuivre :**  
Dénaturation des membranes cellulaires et modification des voies métaboliques des protéines et des lipides
- **3,5-dichlorophénol :**  
Impacts sur les membranes de part les propriétés liposolubles de la substance
- **Diuron :**  
*Aucune information apportée par ces bandes*

Figure 71 – Liens entre variations spectrales et toxicité décrite des substances sur les membranes plasmiques.

### 4.3. OBSERVATION DES CYTOCHROMES : UN COMPLÉMENT D'INFORMATION APPORTE PAR LES SPECTRES DE *S. CEREVISIAE*

Si les spectres bactériens sont fortement impactés par les contributions des signaux issus des molécules d'acides nucléiques ainsi que de ceux associés à la composition protéique et lipidique des membranes, les spectres de la levure *S. cerevisiae* permettent l'observation de composés cellulaires encore différents. En effet, outre les bandes intenses relatives encore une fois aux protéines et aux lipides (1000, 1300, 1650-1680, 1745-1756  $\text{cm}^{-1}$ ), d'autres bandes significatives sont quant à elles associées à la contribution des cytochromes b et c (749 et 1585  $\text{cm}^{-1}$ ). Les variations de leur intensité, notamment observées sur les spectres de la levure exposée au cuivre, au 3,5-dichlorophénol et au diuron, apparaissent cohérentes avec les informations retrouvées dans la littérature quant aux impacts de ces substances sur ces éléments indispensables au bon fonctionnement de la chaîne respiratoire (Figure 72).

- Bandes associées aux cytochromes des spectres de *S. cerevisiae*.**
- Variations cohérentes avec :**
- **Norfloxacine :**  
*Aucune information apportée par ces bandes.*
  - **Cuivre :**  
Mécanisme de détoxification et dénaturation des cytochromes sous l'effet du métal
  - **3,5-dichlorophénol :**  
Lien avec les propriétés de découplant de la phosphorylation oxydative de la substance
  - **Diuron :**  
Hyper-réduction des cytochromes de part l'interruption du transfert d'électron de la chaîne respiratoire

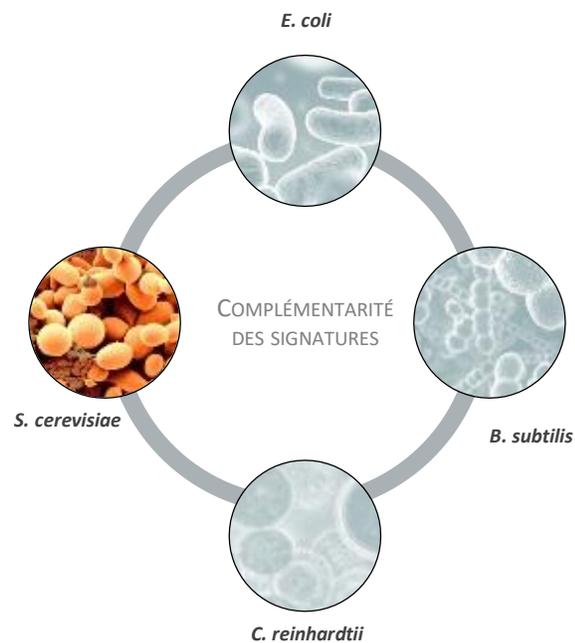


Figure 72 - Liens entre variations spectrales et toxicité décrite des substances sur les cytochromes et la chaîne respiratoire.

Par exemple, sur les spectres Raman de *S. cerevisiae* exposée au cuivre, l'intensité des bandes situées à 749 et 1585  $\text{cm}^{-1}$  tend à augmenter pour les deux premières concentrations du métal, puis à diminuer pour la concentration la plus élevée. Or, les cytochromes sont impliqués dans les mécanismes de régulation des concentrations de cuivre intramembranaire<sup>160</sup>. L'augmentation de l'intensité des bandes

correspondantes pourraient alors être associée à des mécanismes de résistances mis en place par les levures. En effet, elles augmenteraient notamment la synthèse de molécules impliquées dans les processus de détoxification visant à limiter l'excès de métal dans la cellule<sup>161</sup>. Par ailleurs une étude réalisée en 2015 par Durand *et al.* montre que les effets du cuivre sont également liés à une interruption de la biosynthèse des cytochromes. Celle-ci serait cohérente avec la diminution de l'intensité des bandes Raman correspondantes sous l'effet de la concentration la plus élevée du métal<sup>156</sup>. Il est par ailleurs intéressant de constater que des variations similaires observées sur les spectres de *C. reinhardtii* pourraient également corroborer ces résultats. En effet bien qu'elle soit généralement attribuée à la chlorophylle sur les spectres algaux, on note que la bande située  $750\text{ cm}^{-1}$  pourrait également se confondre avec celle associée aux cytochromes chez les levures. Or, Jamer *et al.* (2006) en étudiant également les effets du cuivre sur *C. reinhardtii*, observent après 24h d'exposition une activation des gènes jouant un rôle dans la production des éléments nécessaires aux chaînes mitochondriales de transferts d'électrons dont font parties les cytochromes. Ce phénomène pourrait correspondre à un mécanisme de résistance face à la dégradation de ces molécules par le métal. Cette dégradation serait cohérente avec la diminution de l'intensité de la bande correspondante sur les spectres de l'algue.

Par ailleurs, outre l'effet déjà mentionné sur les membranes cellulaires, les spectres de la levure semblent également mettre en évidence un autre aspect de la toxicité du 3,5-dichlorophénol. En plus de son impact sur la composition des membranes plasmiques, le 3,5-dichlorophénol est aussi connu pour intervenir de manière spécifique comme découplant de la phosphorylation oxydative. En agissant en tant que transporteurs de protons à travers la membrane, il supprime le gradient nécessaire au bon fonctionnement de la chaîne respiratoire<sup>162,163</sup>. Or, l'intensité des bandes relatives aux cytochromes diminue également sous l'effet des concentrations croissantes de la substance (Figure 62 C). Faisant partie intégrante de la chaîne respiratoire, les variations d'intensités des bandes Raman correspondantes pourraient alors être les témoins de cette facette de la toxicité.

Enfin, les spectres de *S. cerevisiae* sont également les seuls pour lesquels une signature spectrale nette des effets du diuron est obtenue. En effet, moins toxique pour les bactéries que pour la levure, aucun effet de l'herbicide n'a été mesuré par inhibition de la respiration cellulaire sur *B. subtilis* (Figure 58 D). Ces résultats sont parfaitement corrélés avec ceux obtenus par spectroscopie Raman qui montrent que l'exposition au toxique ne conduit à aucune variation significative sur les spectres de la bactérie. De même, il ne provoque que peu de variations sur les spectres d'*E. coli* NR698 pour lesquels les scores de classification obtenus suite aux analyses statistiques restent inférieurs au seuil de significativité fixé

(Figure 53). La bande spectrale la plus significative est associée aux liaisons  $PO_2^-$  de l'ADN (Figure 54). Son intensité diminue légèrement sous l'effet des concentrations croissantes ce qui pourrait être révélateur du stress cellulaire provoqué par le toxique<sup>106</sup>. Cependant, à travers ces résultats les spectres des bactéries ne participent que peu à la signature globale du diuron et à la mise en évidence de ses mécanismes de toxicité. C'est pourquoi l'importance de son impact sur *S. cerevisiae* se traduisant par des variations significatives de ses spectres est particulièrement intéressante. En effet, on observe à nouveau une nette variation des bandes relatives aux cytochromes dont l'intensité augmente sous l'effet de l'herbicide. Chez les levures le diuron est connu pour provoquer une inhibition de la chaîne respiratoire en bloquant le transfert d'électrons entre les cytochromes b et c. Il en résulte une hyper-réduction des cytochromes b<sup>164,165</sup>. Or, dans une étude réalisée en 2014, Okotrub *et al.* démontrent sur les spectres de *S. cerevisiae* qu'une augmentation du taux d'oxydation des cytochromes conduit à une diminution de l'intensité des bandes Raman correspondantes<sup>152</sup>. Ainsi, l'augmentation observée sous l'effet de l'exposition des levures au diuron serait en contraste cohérente avec l'hyper-réduction qu'il provoque.

#### 4.4. BANDES SPECTRALES ASSOCIEES AUX PIGMENTS, EVENTUELS SIGNAUX D'UN STRESS OXYDANT

Enfin, les spectres algaux sont les principaux témoins du quatrième phénomène physiologique provoqué par la toxicité et mis en évidence au cours de cette étude. En effet, les principales variations spectrales mises en évidence concernent les bandes caractéristiques des pigments que sont les caroténoïdes. Aussi observables sur les spectres de la levure, ils pourraient être les premiers témoins d'un stress oxydant (Figure 73).

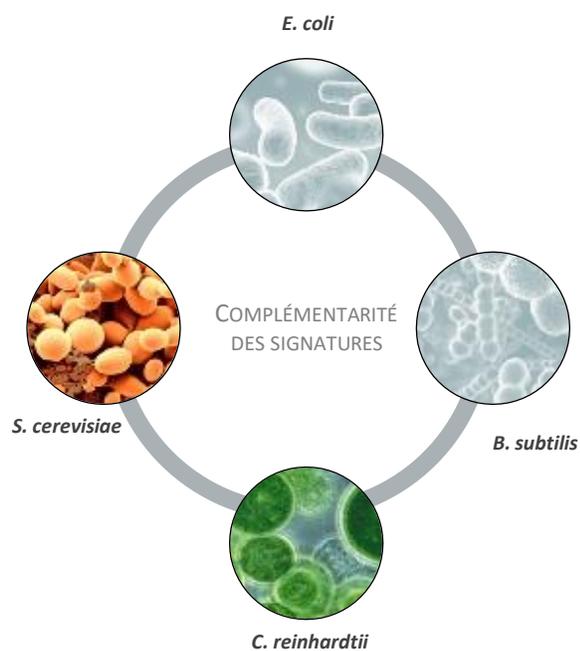
Un premier exemple est apporté par les effets de la norfloxacine sur les spectres de *C. reinhardtii*. Les essais réalisés par suivi de croissance montrent qu'elle y est également sensible (Figure 64 A). Ces résultats sont en accord avec la littérature qui confirme l'impact de ce type d'antibiotique sur les cellules algales, desquelles elles inhibent également les topoisomérases<sup>166,167</sup>. Cependant contrairement à ceux des bactéries sur les spectres algaux aucune bande Raman spécifiquement attribuable à la contribution de molécules d'ADN ou d'ARN n'est observable dans nos conditions expérimentales (Figure 19). D'éventuels effets sur les acides nucléiques ne peuvent donc pas être directement mis en évidence par spectroscopie Raman. Néanmoins, les analyses statistiques effectuées, montrent que des variations spectrales significatives apparaissent en fonction des concentrations croissantes de norfloxacine à laquelle *C. reinhardtii* est exposée. Les résultats de classification des spectres par AFD mettent en effet en évidence

un effet dose-réponse de la substance (Figure 64 A). Les variations spectrales les plus significatives correspondent à une diminution de l'intensité de la bande située entre 986 et 1226  $\text{cm}^{-1}$  associée chez les algues aux contributions cumulées de molécules de phénylalanine et de  $\beta$ -carotène (Figure 65). Les autres bandes correspondant aux  $\beta$ -carotènes à 1155 et 1525  $\text{cm}^{-1}$  font aussi partie des signaux identifiés comme significatifs. Ces résultats pourraient être liés à d'autres conséquences de l'effet de l'antibiotique dont l'action génèrerait également un stress oxydant<sup>167,168</sup>. En effet, puissants antioxydants, les  $\beta$ -carotènes apparaissent comme largement impliqués dans les mécanismes de réponse des algues à ce type de stress<sup>169</sup>.

### Bandes associées aux pigments (caroténoïdes et chlorophylles)

#### Variations cohérentes avec :

- **Norfloxacine :**  
Stress oxydant de l'antibiotique conduisant à une implication des  $\beta$ -carotènes en tant qu'agents antioxydant
- **Cuivre :**  
Dégâts oxydants sur la chlorophylle et les membranes provoquant une augmentation de la production de  $\beta$ -carotènes pour lutter contre le stress oxydatif
- **3,5-dichlorophénol :**  
Effets cumulés de l'altération des membranes et des propriétés découplantes de la substance ?
- **Diuron :**  
*Aucune information apportée par ces bandes*



**Figure 73 – Liens entre variations spectrales des bandes relatives aux pigments photosynthétiques et toxicité décrite des substances.**

Des observations similaires sont réalisées avec le cuivre. Le stress oxydant dont il est responsable a déjà été évoqué à travers les lésions qu'il provoque au niveau de l'ADN et de la membrane des bactéries. Chez la levure, il induit aussi d'importantes variations au niveau des bandes relatives aux cytochromes. Cependant, on observe également sur les spectres de *S. cerevisiae*, une diminution significative de la bande située à 1155  $\text{cm}^{-1}$  sous l'effet des concentrations croissantes du métal. Or, comme chez *C. reinhardtii* celle-ci est associée à la contribution des  $\beta$ -carotènes. Sur les spectres de l'algue son intensité augmente. Les mêmes variations sont de plus observées sur la bande situées à 1000  $\text{cm}^{-1}$ , elle aussi

associée aux caroténoïdes. Ces résultats apparaissent cohérents avec des observations réalisées par Rushdy *et al.* sur *Chlorella vulgaris*<sup>a</sup> chez qui les concentrations de  $\beta$ -carotènes augmentent lorsqu'elle est exposée au cuivre<sup>170</sup>. De plus, toujours en accord avec les résultats observés sur *C. vulgaris*, l'intensité des bandes correspondant à la chlorophylle A (750, 1535 et 1554  $\text{cm}^{-1}$ ) diminue légèrement sous l'effet de la plus haute concentration de cuivre. Ceci est cohérent avec l'observation de dégâts oxydants sur la chlorophylle et la membrane photosynthétique que la surproduction de  $\beta$ -carotènes servirait justement à atténuer.

Enfin, les spectres algaux sont complètement altérés par l'exposition au 3,5-dichlorophénol. On constate en effet une très importante modification du profil général des spectres de l'algue notamment due à de fortes variations de l'intensité de l'ensemble des bandes correspondants aux caroténoïdes (Figure 65 C). La bande située à 1525  $\text{cm}^{-1}$  disparaît quasiment complètement à partir d'une concentration de 25  $\text{mg.L}^{-1}$ . L'intensité de celle située à 1155  $\text{cm}^{-1}$  diminue également tandis qu'au contraire la bande située à 1002-1006  $\text{cm}^{-1}$  augmente. Les bandes associées à la chlorophylle varient également de manière significative. Alors que celle située à 750  $\text{cm}^{-1}$  disparaît, on observe une importante augmentation de celles situées à 986, 1233 et 1324  $\text{cm}^{-1}$ . Connaissant non seulement son impact en tant qu'agent découplant mais aussi ses effets sur la composition lipidique des membranes, il n'apparaît pas étonnant que l'exposition au 3,5-dichlorophénol conduise à d'importantes variations du spectre général de l'algue, et ce notamment au niveau des molécules impliquées dans les chaînes de transport d'électrons associés à la photosynthèse. En effet, bien que la chlorophylle ne soit pas un caroténoïde, ce sont tous deux des pigments photosynthétiques.

#### 4.5. DISCUSSION, UN POTENTIEL INFORMATIF EN TROIS DIMENSIONS

Grâce à l'analyse de l'ensemble du jeu de données, la prise en compte cumulée des résultats obtenus à partir des quatre microorganismes étudiés permet d'établir une signature distincte pour chacune des substances (Figure 66 C). Ce gain d'information obtenu grâce à la multiplication des bioéléments apparaît d'autant plus pertinent lors de l'interprétation des liens existant entre variations spectrales et réalité biologique. Le traitement statistique des spectres montre une corrélation entre le degré de toxicité et l'amplitude des variations spectrales observées. Surtout, les bandes Raman mises en évidence correspondent bien à des molécules dont l'atteinte est reconnue dans les mécanismes et conséquences

---

<sup>a</sup> *Chlorella vulgaris* est, comme *C. reinhardtii*, une algue unicellulaire d'eau douce.

des effets toxiques des substances étudiées. Les informations apportées par chaque microorganisme s'articulent alors comme des briques permettant une vue large des cibles et des conséquences de la toxicité des substances auxquelles ils sont exposés. Evidemment, l'ensemble des liens établis entre les variations spectrales observées et leur signification physiologique pourraient être approfondis par des mesures complémentaires, qui permettraient par exemple d'attester plus directement l'implication de voies métaboliques ou les changements effectifs au niveau moléculaire. Dans tous les cas, les signatures spectrales établies dans le présent travail sont en forte adéquation avec les effets décrits dans la littérature.

Ce travail d'interprétation et de vérification de la cohérence des variations spectrales par rapport à des bases établies était indispensable pour renforcer l'utilisation de la spectroscopie Raman comme outil d'analyse de la toxicité. Il serait cependant vain d'essayer de relier chaque modification des spectres avec l'élément ou le mécanisme moléculaire exactement impacté par la substance. Bien qu'intéressant, ce travail de recherche fondamentale n'est pas ici l'objet de la méthode dont l'utilisation proposée réside plutôt dans ses capacités de screening. Les résultats présentés dans cette étude montrent qu'à partir du moment où le microorganisme y est sensible, les variations spectrales obtenues sous l'effet de chaque substance sont significatives, reproductibles et en lien avec des phénomènes physiologiques. Certaines variations apparaissent bien entendu sans qu'il ne soit possible d'en définir expressément la cause. Cependant l'intérêt de la spectroscopie ne se cantonne pas à l'interprétation exhaustive des modifications apparaissant sur chaque bande Raman : le présent travail démontre la capacité à établir des signatures représentatives de substances ou familles de composés à partir des effets qu'elles provoquent. Comme les résultats obtenus ici le laissent entrevoir il apparaît ainsi possible d'identifier des variations spectrales caractéristiques de la toxicité des métaux tels que le cuivre ou l'arsenic, ou d'autres associables à différentes familles d'antibiotiques. En permettant un premier criblage des effets d'un échantillon, les analyses Raman apportent ainsi une troisième dimension à l'évaluation de la toxicité.



## 5. PERSPECTIVES : VERS L'ANALYSE D'ÉCHANTILLONS REELS

La spectroscopie Raman pourrait apporter de réels bénéfices dans le cadre de procédures d'évaluation de la qualité de l'eau telles que celles proposées par Tronico VigiCell. En tant que spécialistes de l'utilisation de vivant, l'entreprise s'efforce de promouvoir l'utilisation d'analyses biologiques pour la mesure de l'impact de la pollution. Son offre se décline en panels de bio-essais permettant l'évaluation :

- 1) De la toxicité générale sur différents types de microorganismes (bactéries, algues, champignons, levures, cellules humaines),
- 2) De la génotoxicité grâce à des tests réalisés à la fois sur cellules eucaryotes et procaryotes,
- 3) De la perturbation endocrinienne œstrogène, androgène et thyroïdienne,
- 4) D'indicateurs de stress cellulaires variés (atteintes à la membrane, stress oxydants, etc...).

L'ensemble des protocoles disponibles permettent de prendre en compte les trois dimensions d'analyse de la toxicité avec la mesure d'une intensité de toxicité générale (1<sup>ère</sup> dimension) déclinée sur différents types de microorganismes (2<sup>ème</sup> dimension), et complétée par l'observation de différents types de paramètres physiologiques permettant d'identifier les modalités de la toxicité (3<sup>ème</sup> dimension). Les échantillons peuvent ainsi être évalués à travers la réalisation de plus d'une trentaine de tests différents. Tous ne sont pas utilisés systématiquement et leur choix est fait en fonction des besoins spécifiques de chaque étude. Cependant, leur multiplication est inévitablement consommatrice à la fois de temps et de ressources. C'est pourquoi, en permettant à travers une mesure unique l'identification immédiate d'un profil de toxicité, la spectroscopie Raman pourrait être un outil de screening de choix pour l'entreprise.

Dans une première tentative de confrontation de la méthode à l'analyse d'eaux réelles, les protocoles utilisés jusqu'à présent pour l'analyse de substances connues en conditions contrôlées sont cette fois appliqués à l'analyse de deux échantillons environnementaux. Ceux-ci ont préalablement été analysés par Tronico-VigiCell à l'aide d'une partie du panel de tests précédemment décrit : La toxicité générale, la génotoxicité et la perturbation endocrinienne ont été évaluées par l'entreprise à travers la réalisation de 17 bio-essais. Parmi eux, des essais de suivi de croissance sur *E. coli* NR698 (« bactérie sensible »), *S. cerevisiae* (« levure sauvage ») et *C. reinhardtii* (« algue sauvage ») qui sont les mêmes souches que celles utilisées au cours de l'ensemble du présent travail. Les résultats de ces tests sont représentés selon un diagramme de couleurs conçu par Tronico VigiCell (Figure 74). Son élaboration repose sur l'expertise acquise par l'entreprise, notamment au travers de seuil de réponse calculés individuellement pour chaque test et d'un recul étendu sur les variabilités inter- et intra-essais. Concomitamment, des Raman d'*E. coli*

NR698, *S. cerevisiae* et *C. reinhardtii* sont collectés après 40 min d'exposition des microorganismes à chacun des deux échantillons et comparés à des spectres témoins réalisés en parallèle. Dans une optique d'allègement du protocole en vue d'une application plus concrète de la méthode seuls 15 spectres sont acquis pour chaque condition. L'expérience est répétée deux fois de manière distincte. Les parties suivantes s'attachent à exposer les résultats obtenus.

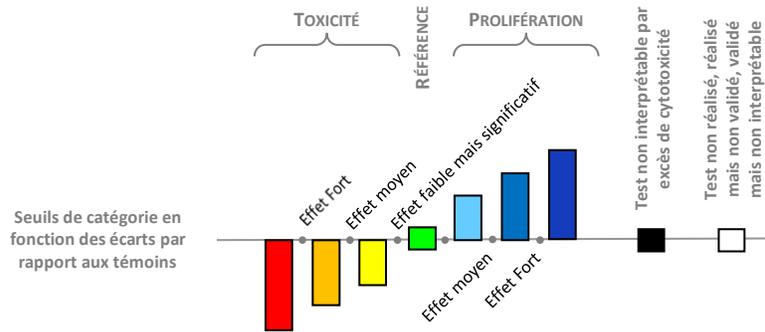


Figure 74 – Diagramme de lecture des résultats de toxicité réalisés par l'entreprise Tronico VigiCell.

### 5.1. ECHANTILLON 1 : EAU BRUTE DOMESTIQUE

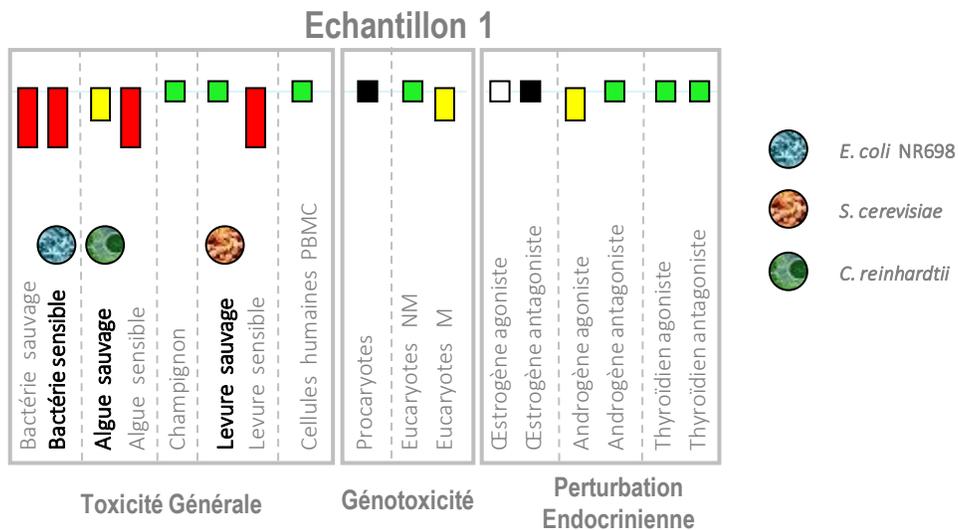
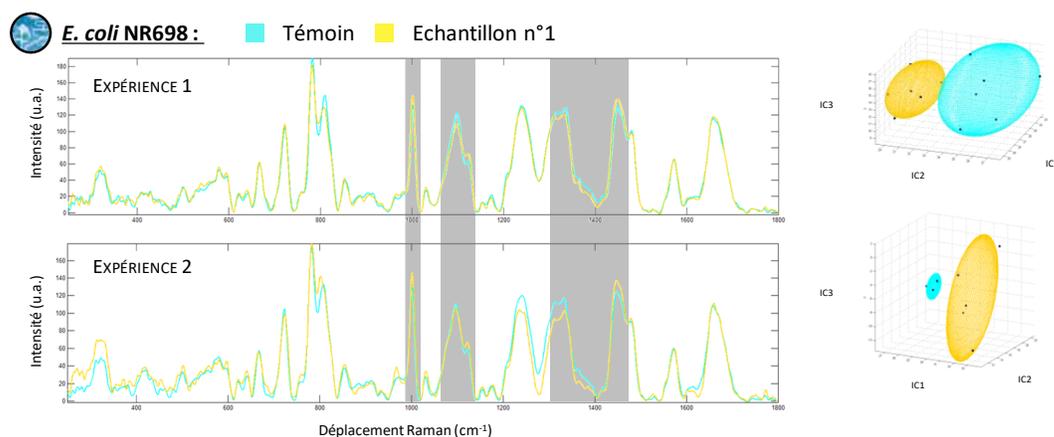


Figure 75 – Synthèse des résultats d'analyse obtenus par Tronico VigiCell sur le premier échantillon environnemental étudié. Le degré de toxicité est représenté selon un diagramme de couleurs définis par rapport à des standards internes à l'entreprise (Figure 74).

Le premier échantillon analysé correspond à une eau usée non traitée issue d'un quartier résidentiel de la ville de Paris. D'aspect jaune translucide son pH est de 7,8 et sa conductance de 1,01. Afin de garantir des

tests en aveugle aucune autre propriété physico-chimique n'est communiquée à Tronico-VigiCell par leurs clients.

Les essais biologiques réalisés par Tronico VigiCell montrent que l'échantillon provoque une importante inhibition de la croissance d'*E. coli* NR698. Sur les algues<sup>a</sup>, les résultats témoignent d'une forte toxicité sur la souche dite sensible. Sur *C. reinhardtii* les effets observés sont moins importants mais reste néanmoins significatifs. De même, la toxicité est forte sur la souche de levure sensible tandis qu'aucun impact n'est mesuré sur la croissance de *S. cerevisiae*. Enfin, des effets faibles mais significatifs sont également mesurés en termes de génotoxicité (molécules métabolisables) et d'androgénicité agoniste. Le bilan de toxicité dressé par l'entreprise atteste ainsi d'impacts significatifs de l'échantillon à différents niveaux du panel utilisé.



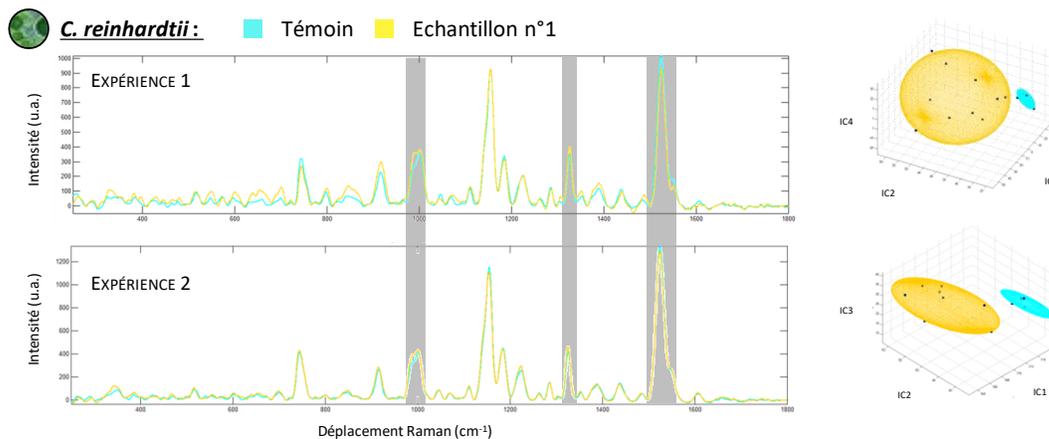
**Figure 76 – Résultats des analyses Raman obtenus pour *E. coli* NR698 exposée au 1<sup>er</sup> échantillon environnemental. Représentation des spectres moyens obtenus pour chaque expérience. Les bandes variant de manière identique au cours des deux expériences sont surlignées en gris.**

Les résultats obtenus par spectroscopie Raman sur *E. coli* NR698 au cours de deux expériences distinctes sont présentés Figure 76. Les analyses par ICA montrent que les spectres de la bactérie exposée se distinguent des spectres témoins. Ces résultats sont cohérents avec l'importante toxicité de l'échantillon mesurée par Tronico VigiCell. Les bandes situées à 1000, 1100, et entre 1320 et 1460  $\text{cm}^{-1}$  sont identifiées comme significatives au cours des deux expériences. Relatives aux protéines et aux lipides elles

<sup>a</sup> L'algue « sensible » est aussi une souche *C. reinhardtii*. Il s'agit cependant d'une souche particulière dont les membranes sont altérées du fait de mutations naturelles. De même la « levure sensible » est une souche *S. cerevisiae* mutée. Par soucis de simplification, elles continueront à être désignées dans le texte en temps qu'« algue sensible » et « levure sensible » par opposition à « *C. reinhardtii* » et « *S. cerevisiae* » qui correspondent aux souches sauvages utilisées au cours de l'ensemble des analyses Raman de ce travail de thèse.

correspondent à celles mises en évidence précédemment en cas d'altération de la membrane et ressemblent aux variations observées sous l'effet de la norfloxacine. Plus précisément, il convient de souligner qu'il s'agit d'une similarité d'impact qui n'est pas nécessairement imputable à la présence d'antibiotique. Par ailleurs, des variations apparaissent également au niveau de la bande associée à l'ARN à  $810\text{ cm}^{-1}$ . On constate que son intensité augmente au cours de l'expérience 1, alors qu'elle diminue au contraire au cours de l'expérience 2. Par contre dans les deux cas un léger décalage vers la gauche est observable. Le même phénomène, cette fois vers la droite, est notable sur la bande correspondant à l'adénine située à  $720\text{ cm}^{-1}$ . Ces variations pourraient être relatives à un stress général associé à l'importante toxicité de l'échantillon et se manifestant au niveau des acides nucléiques.

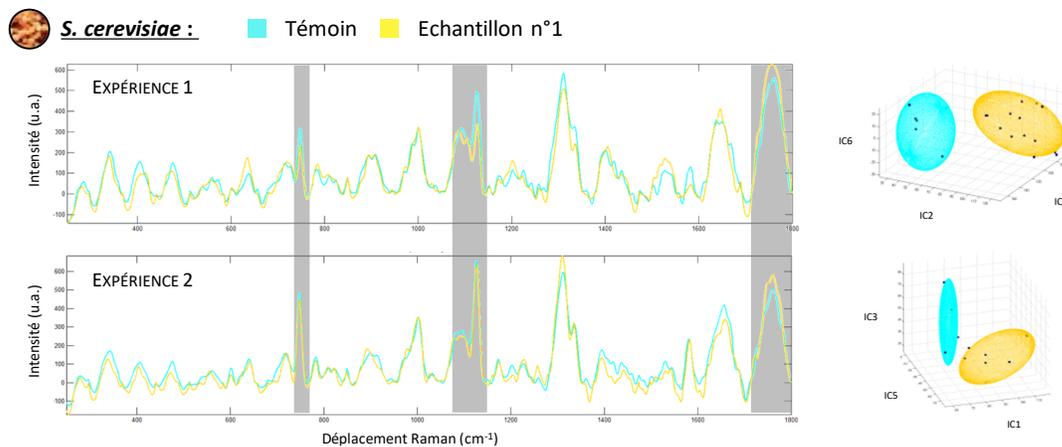
Concernant *C. reinhardtii*, des variations apparaissent également sur les spectres sous l'effet du premier échantillon (Figure 77). On observe notamment une augmentation de la bande associée au  $\beta$ -carotène et à la phénylalanine située autour de  $1000\text{ cm}^{-1}$ , ainsi que de celle associée à la chlorophylle A à  $1324\text{ cm}^{-1}$ . L'intensité de la bande située à  $1525\text{ cm}^{-1}$ , également associée au  $\beta$ -carotène, diminue au contraire par rapport au témoin. Ces variations sont significatives et constantes d'une expérience à l'autre. Elles permettent d'expliquer la séparation des groupes obtenus suite aux analyses par ICA et sont cohérentes avec la toxicité mesurée par Tronico VigiCell. Similaires aux variations spectrales correspondant à la signature obtenue sous l'effet du cuivre elles pourraient être liées à un stress oxydant.



**Figure 77 – Résultats des analyses Raman obtenus *C. reinhardtii* exposée au 1<sup>er</sup> échantillon environnemental. Représentation des spectres moyens obtenus pour chaque expérience. Les bandes variant de manière identique au cours des deux expériences sont surlignées en gris.**

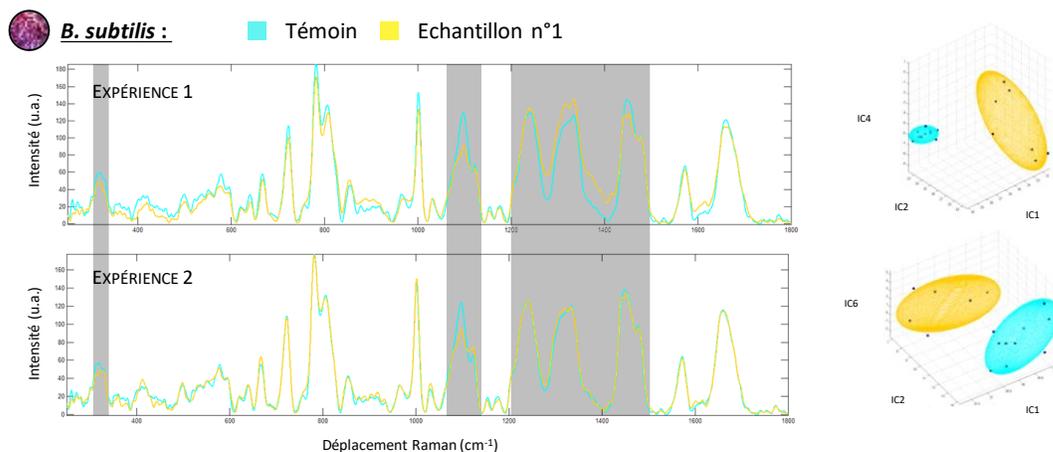
Des variations apparaissent également sur les spectres de *S. cerevisiae* (Figure 78). Une diminution de l'intensité des bandes correspondant au cytochrome ( $749\text{ et }1585\text{ cm}^{-1}$ ) ainsi que d'une autre associée au  $\beta$ -carotène ( $1155\text{ cm}^{-1}$ ) sont observables. A l'inverse l'intensité de la bande située à  $1745\text{ cm}^{-1}$  et

correspondant aux lipides augmente. Bien que ces différences spectrales soient reproductibles entre les deux expériences, on note également que d'autres bandes varient de manière opposées d'une expérience à l'autre. Il est intéressant d'observer que d'après les résultats de l'entreprise, la croissance de la levure n'a pas été affectée par l'exposition à cet échantillon. On note toutefois que celui-ci apparaît au contraire très toxique sur les résultats du test dit « levure sensible » qui est une souche dont l'ensemble des mécanismes de défense sont inactivés (Souche AD1-9<sup>171</sup>). L'absence de sensibilité de la souche sauvage ne correspondrait donc pas une absence d'effet de l'échantillon, mais plutôt à la capacité du microorganisme à s'adapter à sa toxicité. Les variations spectrales observées correspondent donc vraisemblablement à la mise en place de mécanismes de défense.



**Figure 78 – Résultats des analyses Raman obtenus *S. cerevisiae* exposée au 1<sup>er</sup> échantillon environnemental. Représentation des spectres moyens obtenus pour chaque expérience. Les bandes variant de manière identique au cours des deux expériences sont surlignées en gris.**

Enfin, bien que *B. subtilis* ne figure pas dans les panels de bioessais de Tronico VigiCell, les analyses par spectroscopie Raman sont néanmoins réalisées (Figure 79). Les résultats obtenus montrent d'importantes variations sur les spectres, en particulier au niveau de la bande situées à 1100 cm<sup>-1</sup> dont l'intensité diminue de manière significative sous l'effet de l'échantillon. De même, dans la fenêtre spectrale correspondant aux protéines et aux lipides on observe une augmentation de l'intensité des bandes situées entre 1245 et 1300 cm<sup>-1</sup> alors que celle de la bande situées à 1450 cm<sup>-1</sup> diminue. L'ensemble de ces variations sont intéressantes de par leur similitude avec la signature obtenue précédemment sous l'effet du CuSO<sub>4</sub>. On note que d'autres apparaissent également mais ne sont pas reproductibles d'une expérience à l'autre (ex : diminution des bandes associées à l'ADN et à l'ARN sur les résultats de la première expérience).



**Figure 79 – Résultats des analyses Raman obtenus *B. subtilis* exposée au 1<sup>er</sup> échantillon environnemental. Représentation des spectres moyens obtenus pour chaque expérience. Les bandes variant de manière identique au cours des deux expériences sont surlignées en gris.**

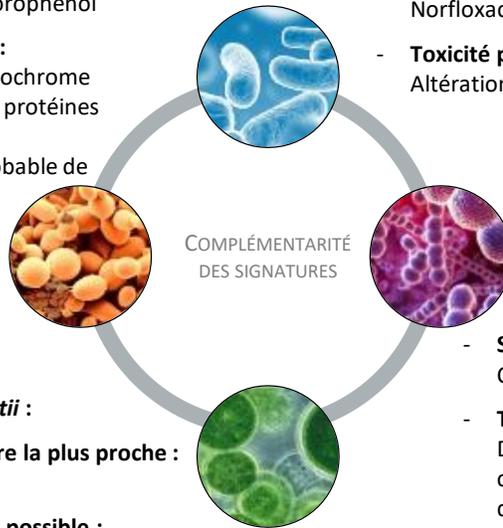
Sans surprise, les résultats obtenus à partir des échantillons d’eaux réelles montrent une plus grande variabilité que ceux obtenus à partir des essais sur substances seules. La complexité intrinsèque des matrices environnementales par rapport à la composition maîtrisée d’échantillons de laboratoire est un facteur bien connu à cet égard. Cependant, l’ensemble des résultats obtenus ici sont cohérents avec la toxicité mesurée par ailleurs grâce aux bioessais réalisés par Tronico VigiCell. De plus, les spectres des microorganismes varient de manière comparable à certaines des signatures obtenues précédemment, notamment en ce qui concerne les effets du cuivre sur *C. reinhardtii*, *B. subtilis* et *S. cerevisiae*. Sur *E. coli* NR698 les variations obtenues sont plutôt proches de la signature correspondant aux effets de la norfloxacine. La Figure 80 dresse un bilan de l’information cumulée que pourraient alors apporter les spectres Raman récoltés.

**S. Cerevisiae :**

- **Signature la plus proche :**  
CuSO<sub>4</sub> / 3,5-dichlorophénol
- **Toxicité possible :**  
Altération des cytochrome  
et impacts sur les protéines  
et lipides  
Mise en place probable de  
mécanismes de  
résistance

**E. coli NR698 :**

- **Signature la plus proche :**  
Norfloxacin
- **Toxicité possible :**  
Altération de la membrane cellulaire



**B. Subtilis :**

- **Signature la plus proche :**  
CuSO<sub>4</sub>
- **Toxicité possible :**  
Dénaturation des membranes  
cellulaires. Possible modification  
des voies métaboliques des  
protéines et des lipides.

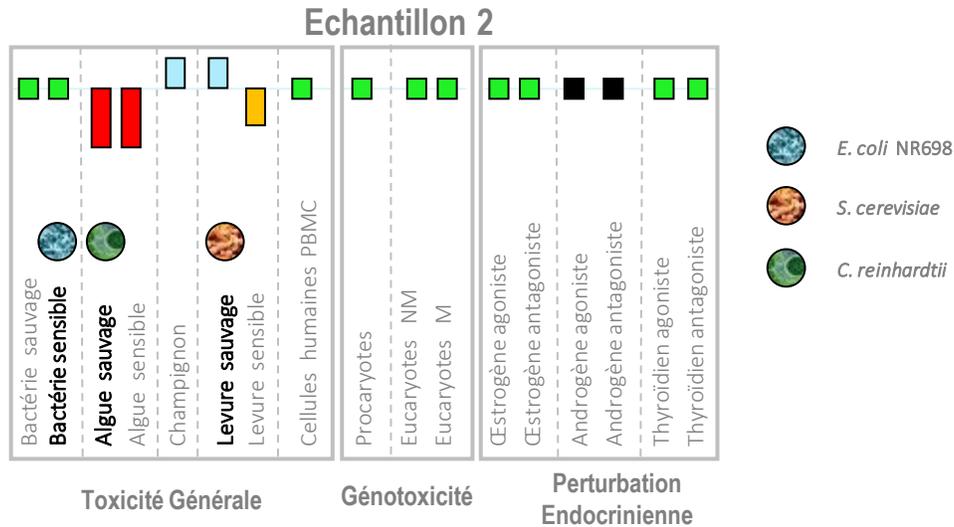
**C. reinhardtii :**

- **Signature la plus proche :**  
CuSO<sub>4</sub>
- **Toxicité possible :**  
Stress oxydant

Figure 80 – Bilan de l'information obtenue par spectroscopie Raman suite à l'analyse du 1<sup>er</sup> échantillon environnemental.

## 5.2. ECHANTILLON 2 : EAU DE SEINE

Le deuxième échantillon étudié correspond à un prélèvement réalisé directement dans la Seine au niveau de la ville d'Ablon (94480) en amont de l'agglomération parisienne. Les seuls paramètres physico-chimiques connus sont le pH (6,4) et la conductance (0,46). Visuellement, l'eau est translucide mais présente des matières en suspension. Celles-ci sont filtrées avant les analyses.



**Figure 81 – Synthèse des résultats d'analyse obtenus par Tronico VigiCell sur le deuxième échantillon environnemental étudié. Le degré de toxicité est représenté selon le diagramme Figure 74.**

Les résultats des bioessais réalisés par Tronico VigiCell ne témoignent d'aucun impact de l'échantillon sur la croissance des bactéries. La toxicité mesurée est à l'inverse très forte aussi bien sur l'algue sauvage (*C. reinhardtii*) que sur la souche sensible. Une inhibition moyenne est mise en évidence sur la croissance de la levure sensible tandis qu'au contraire *S. cerevisiae* prolifère par rapport au témoin. Par ailleurs, aucune génotoxicité n'est mise en évidence. Enfin, alors qu'aucun effet œstrogène ou thyroïdien n'est mesuré, les effets androgènes n'ont pu être évalués du fait d'une trop forte cytotoxicité.

Concernant les analyses Raman, la variabilité observée d'une expérience à l'autre est plus importante que celle obtenue lors de l'étude du 1<sup>er</sup> échantillon. Lors de la première expérience, les ICA montrent que les spectres correspondant à la bactérie *E. coli* NR698 exposée se distinguent nettement des spectres témoins (Figure 82). Au contraire, au cours de la seconde ils se confondent. Pour les deux expériences réalisées, l'analyse graphique montre que les bandes correspondant aux acides nucléiques (780 et 810  $\text{cm}^{-1}$ ) diminuent par rapport au témoin tandis que celles aux protéines ou aux acides gras (1450  $\text{cm}^{-1}$ ). Encore une fois ces variations sont similaires à celles correspondant à la signature spectrale de la norfloxacine sur

*E. coli*. Elles pourraient ainsi témoigner d'un effet sur les acides nucléiques ainsi que sur la composition des membranes. Cependant, d'autres variations spectrales diffèrent d'un cas à l'autre. Les analyses réalisées par Tronico VigiCell n'indiquent pas de toxicité de cet échantillon ni sur *E. coli* NR698 ni sur la bactérie sensible et sont ici cohérents avec les résultats obtenus au cours de la deuxième expérience. A l'inverse ceux correspondant à la première contrastent avec ces observations.

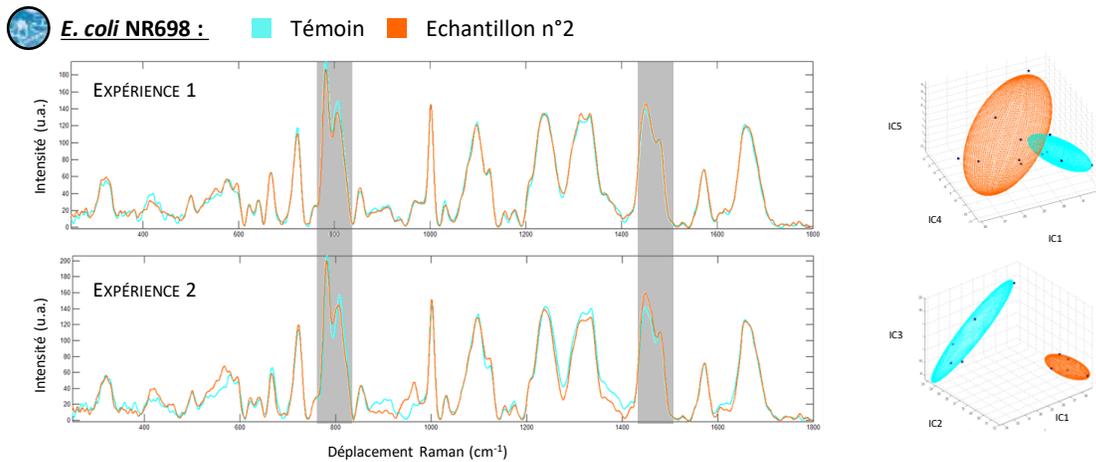


Figure 82 – Résultats des analyses Raman obtenus pour *E. coli* NR698 exposée au 2<sup>ème</sup> échantillon environnemental. Représentation des spectres moyens obtenus pour chaque expérience. Les bandes variant de manière identique au cours des deux expériences sont surlignées en gris.

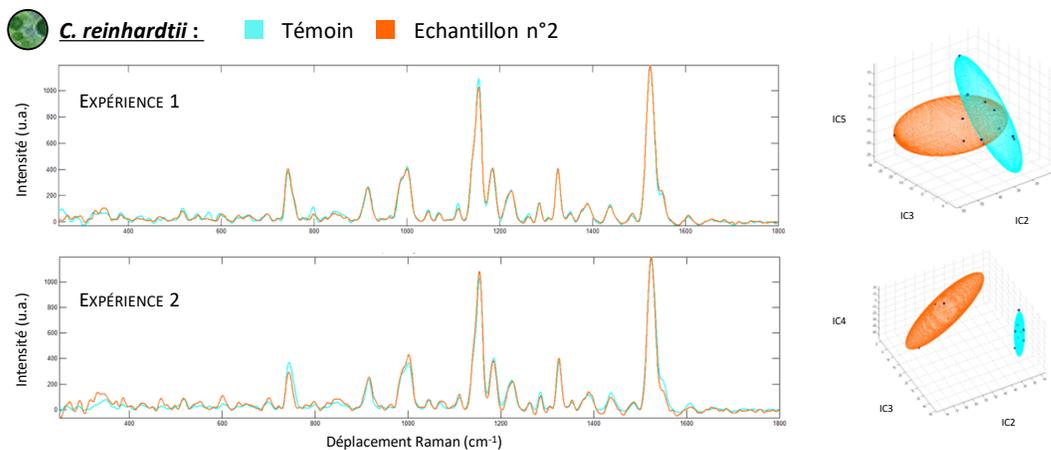
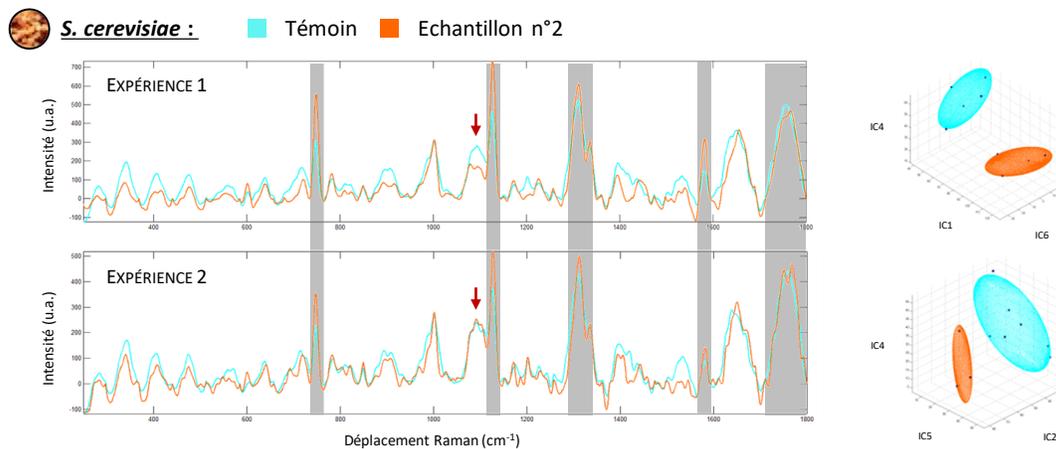


Figure 83 – Résultats des analyses Raman obtenus pour *C. reinhardtii* exposée au 2<sup>ème</sup> échantillon environnemental. Représentation des spectres moyens obtenus pour chaque expérience. Les bandes variant de manière identique au cours des deux expériences sont surlignées en gris.

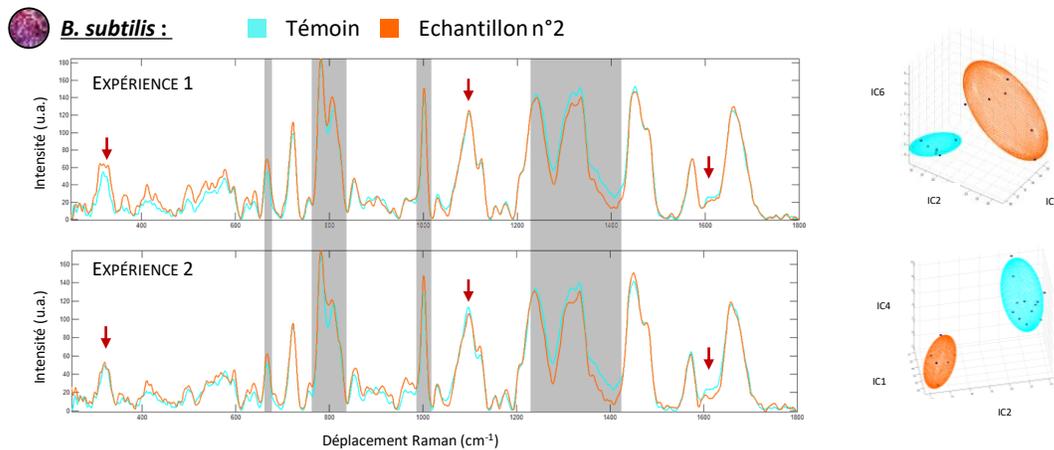
Comme pour *E. coli* NR698, les résultats obtenus sur les spectres de *C. reinhardtii* sous l'effet du deuxième échantillon sont moins reproductibles (Figure 83). En effet, l'ensemble des variations observées sur les bandes Raman diffère d'une expérience à l'autre. De plus, alors que les résultats de la première expérience montrent que les groupes de spectres correspondant à l'algue exposée et au témoin se chevauchent, ils sont au contraire bien distincts sur ceux de la deuxième.

L'exposition de la levure au deuxième échantillon conduit à d'importantes modifications de ses spectres Raman (Figure 84). A l'inverse de ce qui est observé pour le 1<sup>er</sup> échantillon sous l'effet duquel elles diminuaient on note une augmentation significative des deux bandes relatives aux cytochromes (749 et 1585 cm<sup>-1</sup>) ainsi que de celles correspondant au  $\beta$ -carotène (1155 cm<sup>-1</sup>) et aux lipides (1300 cm<sup>-1</sup>).



**Figure 84 – Résultats des analyses Raman obtenus pour *S. cerevisiae* exposée au 2<sup>ème</sup> échantillon environnemental. Représentation des spectres moyens obtenus pour chaque expérience. Les bandes variant de manière identique au cours des deux expériences sont surlignées en gris. Les flèches rouges signalent des différences de variation ou des décalages des bandes par rapport au témoin.**

Enfin, les résultats obtenus sur *B. subtilis* montrent encore une fois un impact important de l'échantillon sur ses spectres Raman. On observe en particulier une augmentation de l'intensité des bandes associées à l'ADN et à l'ARN (780 -810 cm<sup>-1</sup>) ainsi que de celle correspondant à la guanine à 665 cm<sup>-1</sup>. Ces variations d'intensité sont inverses à celles observées sur les spectres d'*E. coli* NR698. Par ailleurs, les bandes situées entre 1250 et 1400 cm<sup>-1</sup> diminuent chez *B. subtilis*. Le même phénomène est observé sur *E. coli* NR698 mais uniquement au cours d'une des deux itérations de l'expérience. On observe de manière générale qu'aucune des signatures obtenues précédemment à partir des effets des substances seules ne donne lieu à des combinaisons de variations similaires à celles observées ici.



**Figure 85 –Résultats des analyses Raman obtenus *B. subtilis* exposée au 1<sup>er</sup> échantillon environnemental.**  
 Représentation des spectres moyens obtenus pour chaque expérience. Les bandes variant de manière identique au cours des deux expériences sont surlignées en gris. Les flèches rouges signalent des différences de variation ou des décalages des bandes par rapport au témoin.

De manière générale, les résultats des analyses Raman avec le deuxième échantillon présentent une importante variabilité. Ces observations peuvent toutefois en partie résulter d'un phénomène de précipitation observé au cours de la période d'incubation. Etant incontrôlé, il est possible qu'il soit la cause de variations des résultats. En particulier sur les spectres d'*E. coli* NR698 et *C. reinhardtii*, les variations non reproductibles d'une expérience à l'autre pourraient ainsi être attribuées à une différence de réponse due au phénomène de précipitation. Néanmoins, les spectres de *B. subtilis* et *S. cerevisiae* sont identiques au cours des deux expériences. L'amplitude et la reproductibilité des variations observées tendraient cette fois à les attribuer à un véritable impact de l'échantillon. Enfin, il est intéressant de constater que la combinaison de signaux obtenus sur *S. cerevisiae* et *C. reinhardtii*<sup>a</sup> ressemble à la somme des signatures obtenues lors des tests réalisés à partir du diuron. Il est donc possible que le type de toxicité mesurée soit similaire. Elle pourrait par exemple, comme le diuron, provoquer des perturbations dans les fonctions des systèmes reposant sur les cytochromes, sans pour autant que les durées d'incubation des tests réalisés ici ne laissent le temps à d'autres phénomènes physiologiques d'apparaître de manière visible par le biais des spectres Raman.

<sup>a</sup> A savoir : *C. reinhardtii* : Pas de signature spectrale caractéristique malgré une importante toxicité mesurée par ailleurs ; *S. cerevisiae* : Forte augmentation des bandes relatives aux cytochromes et au  $\beta$ -carotène.

***S. cerevisiae***

- **Signature la plus proche :**  
Diuron
- **Toxicité possible :**  
Hyper réduction des cytochrome  
→ Inhibition de la chaîne respiratoire

***E. coli* NR698 :**

- **Signature la plus proche :**  
Norfloxacin
- **Toxicité possible :**  
Effets sur l'ADN et la membrane

***C. reinhardtii* :**

- **Signature la plus proche :**  
*Pas de variation spectrale permettant l'élaboration d'une signature.*
- **Toxicité possible :**  
*Pas d'indication.*

***B. Subtilis* :**

- **Signature la plus proche :**  
*Signature différente de toutes celles obtenues sur substance seule.*
- **Toxicité possible :**  
Effets sur l'ADN et la membrane

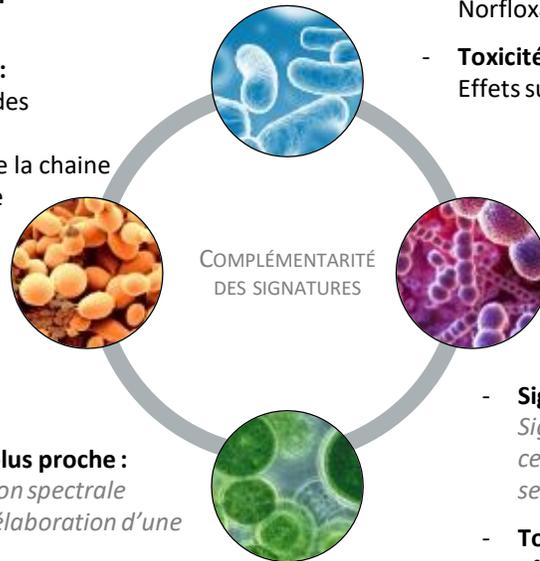


Figure 86 – Bilan de l'information obtenue par spectroscopie Raman suite à l'analyse du 2<sup>ème</sup> échantillon environnemental.

### 5.3. DISCUSSION ET PISTES GÉNÉRALE D'AMÉLIORATION

Ces analyses sur échantillons réels permettent une première appréciation des contraintes inévitablement posées par le transfert de la méthode à l'analyse de matrices environnementales complexes. Malgré la plus grande variabilité observée, les résultats obtenus permettent d'asseoir le complément d'information que peut apporter la spectroscopie Raman aux bioessais conventionnels. Cependant l'analyse systématique des résultats fait encore partie intégrante des défis à relever pour une interprétation utile des informations récoltées. Dans ce but, des méthodes d'analyses chimiométriques encore affinées seront nécessaires. L'élaboration d'un modèle permettant la prise en compte simultanée des signatures obtenues pour l'ensemble des microorganismes permettra d'exploiter de manière automatique le gain d'informations apporté par les différents composants cellulaires observables à travers la combinaison de leurs spectres Raman. Ce travail nécessite la collaboration transversale des spécialités que sont la biologie et la chimiométrie. Par ailleurs le développement de solutions permettant une procédure d'acquisition des spectres plus efficace et robuste est également nécessaire. L'expérience acquise au cours de ces travaux montre par exemple que l'acquisition des spectres à partir de dépôts n'est pas optimale et représente encore une source de variabilité. De plus, aujourd'hui non automatisée elle requiert la

mobilisation d'un opérateur qualifié et représente une contrainte quant au développement de l'outil. Enfin, en vue d'une utilisation future de la méthode dans le cadre d'essais de routine les différentes étapes du protocole pourraient encore être allégées. Plusieurs pistes sont envisagées, telles que l'utilisation d'inoculas standardisés lyophilisés, ou le passage à des dispositifs Raman fibrés permettant une analyse directe des microorganismes en solution. Ces améliorations faciliteront la mise en œuvre d'essais supplémentaires nécessaires à la poursuite de la collecte d'une base de données de « signatures spectrales », enrichie non pas en termes de substances mais en termes d'impacts toxiques. La spectroscopie Raman pourra ainsi être utilisée dans une fonction de screening permettant à travers une mesure unique un premier aperçu des effets d'un échantillon ou d'une substance.

Les travaux réalisés au cours de cette thèse s'inscrivent ainsi au cœur des perspectives de développement de l'entreprise Tronico VigiCell pour l'amélioration des techniques de surveillance de pollution environnementale. D'un point de vue industriel, le travail entrepris a permis un véritable avancement en termes de maturation technologique pour l'exploitation des performances de la spectroscopie Raman couplée à l'approche bio essais. Les « Technology Readiness Level » (TRL) évaluent par une échelle à 9 barreaux le niveau de maturité d'une technologie depuis ses étapes conceptuelles jusqu'à son intégration dans un système complet et son industrialisation (Figure 87). A partir de la preuve de concept expérimentale (TRL 3/4) basée en particulier sur l'analyse des effets de l'arsenic sur *E. coli*, la méthode a d'abord été élargie par la multiplication des espèces observées. En parallèle, les fonctions clés du concept ont été validées à travers la confirmation de l'existence d'empreintes spectrales spécifiques et représentatives en fonction d'une toxicité donnée (TRL 5). Enfin, les premiers essais sur échantillons réels marquent le passage du TRL5 à un TRL6. Le passage des TRL4 à TRL7 est décisif dans l'aboutissement d'un concept en un produit. Pourtant, il constitue généralement pour diverses raisons structurelles ou conjoncturelles - allant de défis technologiques, contraintes de financements ou maturité des marchés, à toutes les spécificités inhérentes à la valorisation de la recherche dans un contexte donné - un véritable goulet d'étranglement qui lui vaut d'être communément appelé « vallée de la mort ». Franchir cette étape cruciale implique nécessairement la mise en place de partenariats innovants publics-privés (les dispositifs CIFRE et structures Labcom ANR en sont des exemples emblématiques) justement illustrés par les travaux réalisés dans le cadre de cette thèse.

A l'avenir la poursuite du projet avec Tronico VigiCell consistera à relever les défis de l'élaboration d'une solution industrialisable. Les dispositifs envisagés permettront la prise en compte de paramètres de toxicité globale, mais aussi l'acquisition simultanée des spectres Raman de multiples microorganismes,

l'ensemble permettant un véritable screening des modalités de toxicité des échantillons testés. Ambitieux, l'objectif à terme est de fournir des solutions biologiques rapides de monitoring permettant la concrétisation de cette démarche d'analyse de la toxicité selon les trois dimensions décrites au cours de ce travail. En répondant à une demande grandissante d'organismes de gestion de l'eau et d'industriels qui se préoccupent de plus en plus de leur impact environnemental, ces outils permettront une amélioration de la gestion des ressources en eau, répondant aux enjeux environnementaux de demain. De plus, les perspectives d'utilisation de la méthode s'élargissent à des domaines aussi variés que le contrôle de la qualité de l'air (pollution, allergènes), ou les effets de substances cosmétiques et pharmaceutiques.

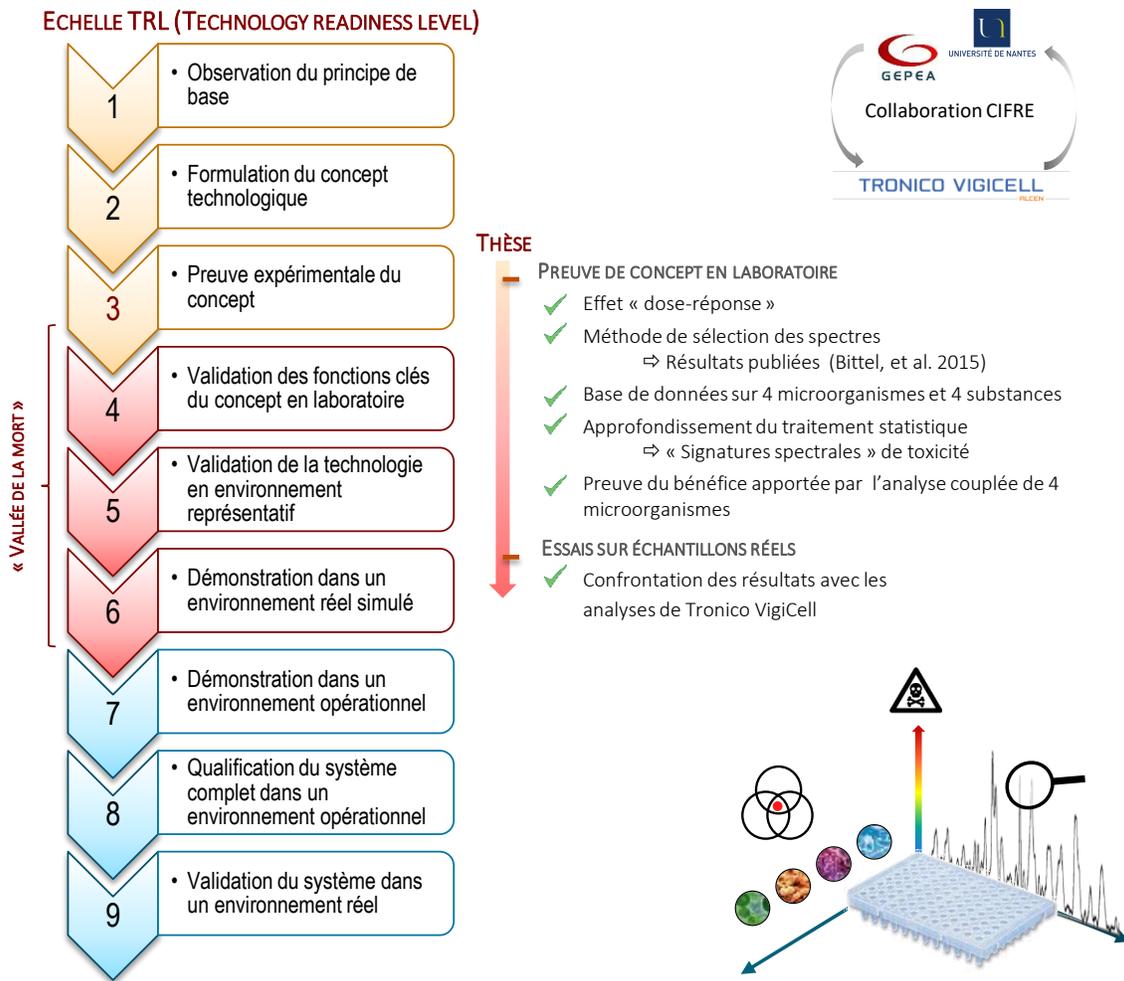


Figure 87 – Positionnement des travaux réalisés au cours de la thèse au sein de l'échelle TRL définie par le CEA<sup>172</sup>.

## CONCLUSION GENERALE

Au cours des dernières années, les termes « nuages de pollution » ou « neige industrielle » sont apparus de plus en plus fréquemment en titre des alertes et mesures destinées à préserver la qualité de l'air. Soudain devenu facteur de risque pour la santé l'air ne s'achète pourtant (heureusement) pas en bouteille et il n'existe que peu (pas) de possibilité de contrôle quant à la qualité de ce que nous respirons. Cela explique peut-être l'inquiétude manifestée régulièrement en filigrane des journaux télévisés face aux dangers que représente une atmosphère polluée et fait de sa qualité un élément de responsabilité collective. Au moins aussi essentielle que l'air respiré, l'eau que nous buvons n'est pourtant pas l'objet des mêmes inquiétudes. Achetée en bouteilles ou directement au robinet, dans la majorité des pays développés la responsabilité de la bonne qualité de l'eau est laissée entière à ses différents fournisseurs. Pourtant, face aux dizaines de milliers de substances chimiques quotidiennement utilisées à quel point le caractère inoffensif de l'eau de consommation est-il garanti ? Tandis que les actuels étalons réglementaires que sont les analyses physico-chimiques reviennent, y compris pour de nombreux experts du domaine, à chercher une aiguille dans une botte de foin, l'utilisation systématique de méthodes biologiques de contrôle n'en est qu'aux balbutiements. Face aux termes « polluants émergents », « perturbation endocrinienne », « médicaments dans l'eau » de plus en plus présents dans le vocabulaire quotidien, elles sont pourtant les seules à pouvoir garantir l'absence d'impacts sur le vivant. En mettant de côté les considérations réglementaires et leur complexité, techniquement, le principal frein à l'intégration des bioessais dans les procédures de contrôle de routine vient de la nécessité de multiplier les essais afin d'obtenir une mesure à la fois représentative de la diversité environnementale et de la variété des types d'effets rencontrés. Leur mise en œuvre s'en trouve alors jugée couteuse et chronophage. C'est dans ce contexte que s'inscrivent les travaux de recherche menés au cours de cette thèse, qui visent à terme à la mise sur le marché d'une solution novatrice dans le domaine stratégique de la qualité de l'eau, à la hauteur de ses contraintes et des attentes des parties prenantes. Se positionnant sur la seconde moitié de l'échelle de maturité technologique correspondant à la phase critique du passage des réalisations en laboratoire aux étapes de l'industrialisation, ce projet reste naturellement encore inachevé. Il peut néanmoins d'ores et déjà faire valoir d'accomplissements remarquables.

En premier lieu, une méthode nouvelle dans le domaine du traitement des signatures d'effet en spectroscopie Raman a été développée. Elle permet, au-delà des composantes purement mathématiques, de classer les spectres tirés de diverses cibles cellulaires (ici des microorganismes procaryotes et

eucaryotes) sur la base d'une réelle prise en compte des signaux biologiques. De surcroît, cette méthode constitue un contrôle qualité intrinsèque permettant d'évaluer la représentativité des acquisitions, éclaircissant certaines zones d'ombre rarement abordées dans la littérature et surtout répondant à une condition *sine qua non* dans la perspective de l'utilisation finale. En second lieu, l'approche choisie se positionne en tête de file de tendances récentes de la mesure biologique. Dans les domaines de la qualité de l'eau ces dernières encouragent l'utilisation de nouveaux tests ou panels multiparamétriques contrastant avec les habitudes historiques de ne réaliser que des tests limités et sporadiques sur des organismes à la représentativité perfectible. Ici, non seulement la stratégie permet de multiplier les cibles cellulaires et donc la pertinence environnementale des observations biologiques, mais surtout les spectres Raman constituent en eux-mêmes, intrinsèquement, une somme de données riche et étendue, loin des méthodes monoparamétriques habituelles. Au-delà des multiples observations permises par le lien établi entre signaux denses et identification des modalités de toxicité, c'est ainsi toute la démarche elle-même qui trouve sa place en pointe de l'état de l'art.

L'établissement des diverses preuves et observations de ce travail a nécessité des étapes d'élaboration de culture cellulaire classique, difficilement transposables aux développements à venir. Cependant la collaboration fructueuse entre la recherche publique et privée dans laquelle s'inscrit cette étude, permet déjà d'envisager les solutions de demain. Parmi elles, des substrats cellulaires préparés selon des conditionnements prêts à l'emploi sont actuellement conçus dans le cadre de la mise sur le marché de toximètres biologiques novateurs et pourront participer à faire passer ces travaux à un niveau encore supérieur. Enfin, ceci conduit à évoquer la vision du remplacement d'un appareillage Raman puissant et spécialisé mais lourd et onéreux à un dispositif Raman fibre optique idéalement adapté à la problématique. Couplé aux sondes biologiques standardisées mentionnées précédemment, il pourrait alors fournir une solution de détection qui n'aurait pas d'équivalent sur le marché.

Ainsi ce travail représente le véritable pivot d'un projet qui doit maintenant s'élancer des paillasses de laboratoire vers une concrétisation industrielle, et aspire au travers de ses forces et réalisations à constituer un exemple réussi du franchissement de la « vallée de la mort de la valorisation », qui voit échouer nombre de projets pourtant prometteurs ne parvenant pas à aboutir à un développement et donc à un marché. Seul le futur pourra dire si ces innovations verront fructifier toutes les attentes qu'elles suscitent, mais dans tous les cas les conditions sont présentement réunies pour que la poursuite d'une collaboration fructueuse permette de considérer cet aboutissement avec espoir et confiance.

Marine Bittel

La Roche-sur-Yon

Avril 2017

*Un dernier mot enfin pour le Sidekick qui aura participé à éclairer  
d'une lumière aux multiples nuances mon chemin bien au-delà de ces seuls travaux.*



## RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- (1) L. Ohlsson. Water conflicts and social resource scarcity. *Phys. Chem. Earth (B)* **1999**, 25 (3), 213–220.
- (2) Frank R., R. Water scarcity: Fact of fiction. *Agric. Water Manag.* **2006**, 80 (1-3), 5–22.
- (3) Dussud, F. X.; Joassard, I.; Wong, F.; Duvernoy, J.; Morel, R. *Chiffres clés du climat - France et Monde*; Observatoire national sur les effets du réchauffement climatique - Institute for Climate Economics - Medde, 2016.
- (4) Luo, Y.; Guo, W.; Ngo, H. H.; Nghiem, L. D.; Hai, F. I.; Zhang, J.; Liang, S.; Wang, X. C. A review on the occurrence of micropollutants in the aquatic environment and their fate and removal during wastewater treatment. *Sci. Total Environ.* **2014**, 473–474, 619–641.
- (5) Lapworth, D. J.; Baran, N.; Stuart, M. E.; Ward, R. S. Emerging organic contaminants in groundwater: A review of sources, fate and occurrence. *Environ. Pollut.* **2012**, 163, 287–303.
- (6) *Bilan de présence des micropolluants dans les milieux aquatiques continentaux - Période 2007-2009*; Ministère de l'écologie du développement durable des transports et du logement.
- (7) Loos, R.; Carvalho, R.; António, D. C.; Comero, S.; Locoro, G.; Tavazzi, S.; Paracchini, B.; Ghiani, M.; Lettieri, T.; Blaha, L.; et al. EU-wide monitoring survey on emerging polar organic contaminants in wastewater treatment plant effluents. *Water Res.* **2013**, 47 (17), 6475–6487.
- (8) Meffe, R.; de Bustamante, I. Emerging organic contaminants in surface water and groundwater: A first overview of the situation in Italy. *Sci. Total Environ.* **2014**, 481, 280–295.
- (9) Fent, K.; Weston, A. A.; Caminada, D. Ecotoxicology of human pharmaceuticals. *Aquat. Toxicol.* **2006**, 76 (2), 122–159.
- (10) Li, W. C. Occurrence, sources, and fate of pharmaceuticals in aquatic environment and soil. *Environ. Pollut.* **2014**, 187, 193–201.
- (11) Santos, L. H. M. L. M.; Araújo, A. N.; Fachini, A.; Pena, A.; Delerue-Matos, C.; Montenegro, M. C. B. S. M. Ecotoxicological aspects related to the presence of pharmaceuticals in the aquatic environment. *J. Hazard. Mater.* **2010**, 175 (1–3), 45–95.

- (12) Pal, A.; Gin, K. Y.-H.; Lin, A. Y.-C.; Reinhard, M. Impacts of emerging organic contaminants on freshwater resources: Review of recent occurrences, sources, fate and effects. *Sci. Total Environ.* **2010**, *408* (24), 6062–6069.
- (13) Ferrari, B.; Paxéus, N.; Giudice, R. L.; Pollio, A.; Garric, J. Ecotoxicological impact of pharmaceuticals found in treated wastewaters: study of carbamazepine, clofibric acid, and diclofenac. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* **2003**, *55* (3), 359–370.
- (14) Stuart, M.; Lapworth, D.; Crane, E.; Hart, A. Review of risk from potential emerging contaminants in UK groundwater. *Sci. Total Environ.* **2012**, *416*, 1–21.
- (15) United Nations, W. W. A. P. *Water for People - Water for Life : The United Nations World Water Development Report*; 2003.
- (16) *Directive 76/464/CEE du conseil, concernant la pollution causée par certaines substances dangereuses déversées dans le milieu aquatique de la Communauté*; 1976.
- (17) *Directive 2000/60/CE du Parlement Européen et du conseil du 23 octobre 2000 établissant un cadre pour une politique communautaire dans le domaine de l'eau*; 2000.
- (18) *Directive 2013/39/UE du Parlement Européen et du Conseil en ce qui concerne les substances prioritaires pour la politique dans le domaine de l'eau*; 2013.
- (19) *Directive 91/414/CEE concernant la mise sur le marché des produits phytopharmaceutiques*; 1991.
- (20) *Directive 98/8/CE du parlement européen et du conseil du 16 février 1998 concernant la mise sur le marché des produits biocides*; 1998.
- (21) INERIS. Portail Substance Chimiques - Normes de Qualité Environnementale et Valeurs Guides Environnementales.
- (22) *Directive 2008/56/CE du parlement européen et du conseil établissant un cadre d'action communautaire dans le domaine de la politique pour le milieu marin*; 2008.
- (23) *Animals as Sentinels of Environmental Health Hazards*; National Academies Press: Washington, D.C., 1991.
- (24) François Brillet. Nouvelles stratégies d'évaluation de la biodégradation de substances organiques dans le cadre de la directive européenne REACH, Université de Nantes, 2015.

- (25) Parvez, S.; Venkataraman, C.; Mukherji, S. Nature and prevalence of non-additive toxic effects in industrially relevant mixtures of organic chemicals. *Chemosphere* **2009**, *75* (11), 1429–1439.
- (26) Leusch, F. D. L.; Khan, S. J.; Laingam, S.; Prochazka, E.; Frosio, S.; Trinh, T.; Chapman, H. F.; Humpage, A. Assessment of the application of bioanalytical tools as surrogate measure of chemical contaminants in recycled water. *Water Res.* **2014**, *49*, 300–315.
- (27) European Communities. Guidance Document No.19: Guidance on surface water chemical monitoring under the water framework directive. *Common Implement. Strategy Water Framew. Dir. 200060EC* **2009**.
- (28) Brack, W.; Dulio, V.; Slobodnik, J. The NORMAN Network and its activities on emerging environmental substances with a focus on effect-directed analysis of complex environmental contamination. *Environ. Sci. Eur.* **2012**, *24* (1), 29.
- (29) Brack, W.; Altenburger, R.; Schüürmann, G.; Krauss, M.; López Herráez, D.; van Gils, J.; Slobodnik, J.; Munthe, J.; Gawlik, B. M.; van Wezel, A.; et al. The SOLUTIONS project: challenges and responses for present and future emerging pollutants in land and water resources management. *Sci. Total Environ.* **2015**, *503-504*, 22–31.
- (30) ECHA. *REACH*; 2006.
- (31) Kokkali, V.; van Delft, W. Overview of commercially available bioassays for assessing chemical toxicity in aqueous samples. *Trends Anal. Chem.* **2014**, *61*, 133–155.
- (32) Tothill, I. E. Biosensors developments and potential applications in the agricultural diagnosis sector. *Comput. Electron. Agric.* **2001**, *30* (1-3), 205–218.
- (33) Rodriguez-Mozaz, S.; Marco, M.-P.; de Alda, M. J. L.; Barceló, D. Biosensors for environmental applications: Future development trends. *Pure Appl. Chem.* **2004**, *76* (4).
- (34) Su, L.; Jia, W.; Hou, C.; Lei, Y. Microbial biosensors: A review. *Biosens. Bioelectron.* **2011**, *26* (5), 1788–1799.
- (35) Luong, J. H. T.; Male, K. B.; Glennon, J. D. Biosensor technology: Technology push versus market pull. *Biotechnol. Adv.* **2008**, *26* (5), 492–500.
- (36) Thouand, G. Microorganisms for analysis. *Anal. Bioanal. Chem.* **2011**, *400* (4), 893–894.
- (37) I.E. Tothill; A.P.F. Turner. Developments in bioassay methods for toxicity testing in water treatment. *Trends Anal. Chem.* **1996**, *15* (5), 178–188.

- (38) De Zwart, D.; Slooff, W. The Microtox as an alternative assay in the acute toxicity assessment of water pollutants. *Aquat. Toxicol.* **1983**, *4* (2), 129–138.
- (39) Modern Water - Home <http://www.modernwater.com/> (accessed Sep 15, 2016).
- (40) Belkin, S. Microbial whole-cell sensing systems of environmental pollutants. *Curr. Opin. Microbiol.* **2003**, *6* (3), 206–212.
- (41) Baldwin, T. O.; Berends, T.; Bunch, T. A.; Holzman, T. F.; Rausch, S. K.; Shamansky, L.; Treat, M. L.; Ziegler, M. M. Cloning of the luciferase structural genes from *Vibrio harveyi* and expression of bioluminescence in *Escherichia coli*. *Biochemistry (Mosc.)* **1984**, *23* (16), 3663–3667.
- (42) Daunert, S.; Barrett, G.; Feliciano, J. S.; Shetty, R. S.; Shrestha, S.; Smith-Spencer, W. Genetically Engineered Whole-Cell Sensing Systems: Coupling Biological Recognition with Reporter Genes. *Chem. Rev.* **2000**, *100* (7), 2705–2738.
- (43) Corbisier, P.; van der Lelie, D.; Borremans, B.; Provoost, A.; de Lorenzo, V.; Brown, N. L.; Lloyd, J. R.; Hobman, J. L.; Csöregi, E.; Johansson, G.; et al. Whole cell- and protein-based biosensors for the detection of bioavailable heavy metals in environmental samples. *Anal. Chim. Acta* **1999**, *387* (3), 235–244.
- (44) Applegate BM , et al. A chromosomally based tod-luxCDABE whole-cell reporter for benzene, toluene, ethylbenzene, and xylene (BTEX) sensing. - PubMed - NCBI <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9647859> (accessed Jul 25, 2016).
- (45) Heitzer, A.; Webb, O. F.; Thonnard, J. E.; Saylor, G. S. Specific and Quantitative Assessment of Naphthalene and Salicylate Bioavailability by Using a Bioluminescent Catabolic Reporter Bacterium. *Appl. Environ. Microbiol.* **1992**, *58* (6), 1839–1846.
- (46) Siegfried, K.; Endes, C.; Bhuiyan, A. F. M. K.; Kuppardt, A.; Mattusch, J.; van der Meer, J. R.; Chatzinotas, A.; Harms, H. Field Testing of Arsenic in Groundwater Samples of Bangladesh Using a Test Kit Based on Lyophilized Bioreporter Bacteria. *Environ. Sci. Technol.* **2012**, *46* (6), 3281–3287.
- (47) Jouanneau, S.; Durand, M.-J.; Courcoux, P.; Blusseau, T.; Thouand, G. Improvement of the Identification of Four Heavy Metals in Environmental Samples by Using Predictive Decision Tree Models Coupled with a Set of Five Bioluminescent Bacteria. *Environ. Sci. Technol.* **2011**, *45* (7), 2925–2931.

- (48) Sohoni, P. Several environmental oestrogens are also anti-androgens. *J. Endocrinol.* **1998**, *158* (3), 327–339.
- (49) Belkin, S.; Smulski, D. R.; Vollmer, A. C.; Dyk, T. K. V.; LaRossa, R. A. Oxidative stress detection with *Escherichia coli* harboring a *katG*::*lux* fusion. *Appl. Environ. Microbiol.* **1996**, *62* (7), 2252–2256.
- (50) Vollmer, A. C.; Belkin, S.; Smulski, D. R.; Dyk, T. K. V.; LaRossa, R. A. Detection of DNA damage by use of *Escherichia coli* carrying *recA*::*lux*, *uvrA*::*lux*, or *alkA*::*lux* reporter plasmids. *Appl. Environ. Microbiol.* **1997**, *63* (7), 2566–2571.
- (51) Hwang, E. T.; Ahn, J.-M.; Kim, B. C.; Gu, M. B. Construction of a *nrdA*::*luxCDABE* Fusion and Its Use in *Escherichia coli* as a DNA Damage Biosensor. *Sensors* **2008**, *8* (2), 1297–1307.
- (52) Belkin, S.; Smulski, D. R.; Dadon, S.; Vollmer, A. C.; Van Dyk, T. K.; Larossa, R. A. A panel of stress-responsive luminous bacteria for the detection of selected classes of toxicants. *Water Res.* **1997**, *31* (12), 3009–3016.
- (53) Routledge, E. J.; Sumpter, J. P. Estrogenic Activity of Surfactants and some of their Degradation Products Assessed Using a Recombinant Yeast Screen. *Environ. Toxicol. Chem.* **1996**, *15* (3), 241.
- (54) Elad, T.; Benovich, E.; Magrisso, S.; Belkin, S. Toxicant Identification by a Luminescent Bacterial Bioreporter Panel: Application of Pattern Classification Algorithms. *Environ. Sci. Technol.* **2008**, *42* (22), 8486–8491.
- (55) Woutersen, M.; Belkin, S.; Brouwer, B.; van Wezel, A. P.; Heringa, M. B. Are luminescent bacteria suitable for online detection and monitoring of toxic compounds in drinking water and its sources? *Anal. Bioanal. Chem.* **2011**, *400* (4), 915–929.
- (56) Connon, R. E.; Geist, J.; Werner, I. Effect-Based Tools for Monitoring and Predicting the Ecotoxicological Effects of Chemicals in the Aquatic Environment. *Sensors* **2012**, *12* (12), 12741–12771.
- (57) Tang, J. Y. M.; Escher, B. I. Realistic environmental mixtures of micropollutants in surface, drinking, and recycled water: Herbicides dominate the mixture toxicity toward algae: Herbicides dominate algal toxicity in realistic mixtures. *Environ. Toxicol. Chem.* **2014**, *33* (6), 1427–1436.
- (58) Ortiz de García, S. A.; Pinto Pinto, G.; García-Encina, P. A.; Irusta-Mata, R. Ecotoxicity and environmental risk assessment of pharmaceuticals and personal care products in aquatic environments and wastewater treatment plants. *Ecotoxicology* **2014**, *23* (8), 1517–1533.

- (59) Escher, B. I.; Allinson, M.; Altenburger, R.; Bain, P. A.; Balaguer, P.; Busch, W.; Crago, J.; Denslow, N. D.; Dopp, E.; Hilscherova, K.; et al. Benchmarking Organic Micropollutants in Wastewater, Recycled Water and Drinking Water with In Vitro Bioassays. *Environ. Sci. Technol.* **2014**, *48* (3), 1940–1956.
- (60) Ivask, A.; Rõlova, T.; Kahru, A. A suite of recombinant luminescent bacterial strains for the quantification of bioavailable heavy metals and toxicity testing. *BMC Biotechnol.* **2009**, *9*, 41.
- (61) Jouanneau, S.; Durand, M. J.; Thouand, G. Online Detection of Metals in Environmental Samples: Comparing Two Concepts of Bioluminescent Bacterial Biosensors. *Environ. Sci. Technol.* **2012**, *46* (21), 11979–11987.
- (62) Ben-Israel, O.; Ben-Israel, H.; Ulitzur, S. Identification and Quantification of Toxic Chemicals by Use of Escherichia coli Carrying lux Genes Fused to Stress Promoters. *Appl. Environ. Microbiol.* **1998**, *64* (11), 4346–4352.
- (63) Elad, T.; Belkin, S. Broad spectrum detection and “barcoding” of water pollutants by a genome-wide bacterial sensor array. *Water Res.* **2013**, *47*, 3782–3790.
- (64) Zaslaver, A.; Bren, A.; Ronen, M.; Itzkovitz, S.; Kikoin, I.; Shavit, S.; Liebermeister, W.; Surette, M. G.; Alon, U. A comprehensive library of fluorescent transcriptional reporters for Escherichia coli. *Nat. Methods* **2006**, *3* (8), 623–628.
- (65) Wood, K. V.; Gruber, M. G. Transduction in microbial biosensors using multiplexed bioluminescence. *Biosens. Bioelectron.* **1996**, *11* (3), 207–214.
- (66) Branchini, B. R.; Southworth, T. L.; Khattak, N. F.; Michelini, E.; Roda, A. Red- and green-emitting firefly luciferase mutants for bioluminescent reporter applications. *Anal. Biochem.* **2005**, *345* (1), 140–148.
- (67) Michelini, E.; Cevenini, L.; Mezzanotte, L.; Ablamsky, D.; Southworth, T.; Branchini, B. R.; Roda, A. Combining intracellular and secreted bioluminescent reporter proteins for multicolor cell-based assays. *Photochem. Photobiol. Sci.* **2008**, *7* (2), 212–217.
- (68) Raman, C. V.; Krishnan, K. S. A New Type of Secondary Radiation. *Nature* **1928**, *121* (3048), 501–502.
- (69) James J. Bohning; T. N. Misra; M. Choudhury. *C.V. Raman & The Raman Effect - An International Historic Chemical Landmark*; American Chemical Society: Chemistry for Life., 1998.

- (70) Hendra, P. J.; Stratton, P. M. Laser-Raman spectroscopy. *Chem. Rev.* **1969**, *69* (3), 325–344.
- (71) Huang, W. E.; Li, M.; Jarvis, R. M.; Goodacre, R.; Banwart, S. A. Chapter 5 - Shining Light on the Microbial World: The Application of Raman Microspectroscopy. In *Advances in Applied Microbiology*; Allen I. Laskin; Sima Sariaslani; Geoffrey M. Gadd, Ed.; Academic Press, 2010; Vol. Volume 70, pp 153–186.
- (72) Barbillat, J.; Daniel Bougeard; Guy Buntinx; Michel Delhayé; Paul Dhamelincourt; François Fillaux. Spectrométrie Raman. *Tech. Ing.* **1999**, No. P2865 V2.
- (73) Das, R. S.; Agrawal, Y. K. Raman spectroscopy: Recent advancements, techniques and applications. *Vib. Spectrosc.* **2011**, *57* (2), 163–176.
- (74) Rae, A.; Stosch, R.; Klapetek, P.; Hight Walker, A. R.; Roy, D. State of the art Raman techniques for biological applications. *Methods* **2014**, *68* (2), 338–347.
- (75) Tu, Q.; Chang, C. Diagnostic applications of Raman spectroscopy. *Nanomedicine Nanotechnol. Biol. Med.* **2012**, *8* (5), 545–558.
- (76) Tfyali, A.; Gobinet, C.; Vrabie, V.; Huez, R.; Manfait, M.; Piot, O. Digital Dewaxing of Raman Signals: Discrimination Between Nevi and Melanoma Spectra Obtained from Paraffin-Embedded Skin Biopsies. *Appl. Spectrosc.* **2009**, *63* (5), 564–570.
- (77) Lu, X.; Al-Qadiri, H. M.; Lin, M.; Rasco, B. A. Application of Mid-infrared and Raman Spectroscopy to the Study of Bacteria. *Food Bioprocess Technol.* **2011**, *4* (6), 919–935.
- (78) Assaf, A.; Cordella, C. B. Y.; Thouand, G. Raman spectroscopy applied to the horizontal methods ISO 6579:2002 to identify *Salmonella* spp. in the food industry. *Anal. Bioanal. Chem.* **2014**, *406* (20), 4899–4910.
- (79) Movasaghi, Z.; Rehman, S.; Rehman, D. I. U. Raman Spectroscopy of Biological Tissues. *Appl. Spectrosc. Rev.* **2007**.
- (80) Czamara, K.; Majzner, K.; Pacia, M. Z.; Kochan, K.; Kaczor, A.; Baranska, M. Raman spectroscopy of lipids: a review. *J. Raman Spectrosc.* **2015**, *46* (1), 4–20.
- (81) De Gelder, J.; De Gussem, K.; Vandenabeele, P.; Moens, L. Reference database of Raman spectra of biological molecules. *J. Raman Spectrosc.* **2007**, *38* (9), 1133–1147.
- (82) Peticolas, W. L. Applications of Raman spectroscopy to biological macromolecules. *Biochimie* **1975**, *57* (4), 417–428.

- (83) Maquelin, K.; Kirschner, C.; Choo-Smith, L.-P.; van den Braak, N.; Endtz, H. P.; Naumann, D.; Puppels, G. . Identification of medically relevant microorganisms by vibrational spectroscopy. *J. Microbiol. Methods* **2002**, *51* (3), 255–271.
- (84) Naumann, D.; Keller, S.; Helm, D.; Schultz, C.; Schrader, B. FT-IR spectroscopy and FT-Raman spectroscopy are powerful analytical tools for the non-invasive characterization of intact microbial cells. *J. Mol. Struct.* **1995**, *347*, 399–405.
- (85) Schuster, K. C.; Urlaub, E.; Gapes, J. R. Single-cell analysis of bacteria by Raman microscopy: spectral information on the chemical composition of cells and on the heterogeneity in a culture. *J. Microbiol. Methods* **2000**, *42* (1), 29–38.
- (86) Olson, M. L.; Johnson, J.; Carswell, W. F.; Reyes, L. H.; Senger, R. S.; Kao, K. C. Characterization of an evolved carotenoids hyper-producer of *Saccharomyces cerevisiae* through bioreactor parameter optimization and Raman spectroscopy. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* **2016**, *43* (10), 1355–1363.
- (87) Jehlika, J.; Edwards, H. G. M.; Oren, A. Raman Spectroscopy of Microbial Pigments. *Appl. Environ. Microbiol.* **2014**, *80* (11), 3286–3295.
- (88) Koyama, Y.; Umemoto, Y.; Akamatsu, A.; Uehara, K.; Tanaka, M. Raman spectra of chlorophyll forms. *J. Mol. Struct.* **1986**, *146*, 273–287.
- (89) Tian, H.; Zhuang, G.; Ma, A.; Jing, C. Arsenic interception by cell wall of bacteria observed with surface-enhanced Raman scattering. *J. Microbiol. Methods* **2012**, *89* (3), 153–158.
- (90) Ngo-Thi, N. .; Kirschner, C.; Naumann, D. Characterization and identification of microorganisms by FT-IR microspectrometry. *J. Mol. Struct.* **2003**, *661–662*, 371–380.
- (91) Liu, T.-T.; Lin, Y.-H.; Hung, C.-S.; Liu, T.-J.; Chen, Y.; Huang, Y.-C.; Tsai, T.-H.; Wang, H.-H.; Wang, D.-W.; Wang, J.-K.; et al. A High Speed Detection Platform Based on Surface-Enhanced Raman Scattering for Monitoring Antibiotic-Induced Chemical Changes in Bacteria Cell Wall. *PLoS ONE* **2009**, *4* (5).
- (92) Rösch, P.; Schmitt, M.; Kiefer, W.; Popp, J. The identification of microorganisms by micro-Raman spectroscopy. *J. Mol. Struct.* **2003**, *661–662*, 363–369.
- (93) Jarvis, R. M.; Goodacre, R. Discrimination of Bacteria Using Surface-Enhanced Raman Spectroscopy. *Anal. Chem.* **2004**, *76* (1), 40–47.

- (94) Grow, A. E.; Wood, L. L.; Claycomb, J. L.; Thompson, P. A. New biochip technology for label-free detection of pathogens and their toxins. *J. Microbiol. Methods* **2003**, *53* (2), 221–233.
- (95) Maquelin, K.; Choo-Smith, L.-P.; Endtz, H. P.; Bruining, H. A.; Puppels, G. J. Rapid Identification of *Candida* Species by Confocal Raman Microspectroscopy. *J. Clin. Microbiol.* **2002**, *40* (2), 594–600.
- (96) Xie, C.; Mace, J.; Dinno, M. A.; Li, Y. Q.; Tang, W.; Newton, R. J.; Gemperline, P. J. Identification of Single Bacterial Cells in Aqueous Solution Using Confocal Laser Tweezers Raman Spectroscopy. *Anal. Chem.* **2005**, *77* (14), 4390–4397.
- (97) Buijtelts, P. C. a. M.; Willemse-Erix, H. F. M.; Petit, P. L. C.; Endtz, H. P.; Puppels, G. J.; Verbrugh, H. A.; Belkum, A. van; Soelingen, D. van; Maquelin, K. Rapid Identification of Mycobacteria by Raman Spectroscopy. *J. Clin. Microbiol.* **2008**, *46* (3), 961–965.
- (98) Huang, W. E.; Griffiths, R. I.; Thompson, I. P.; Bailey, M. J.; Whiteley, A. S. Raman Microscopic Analysis of Single Microbial Cells. *Anal. Chem.* **2004**, *76* (15), 4452–4458.
- (99) Choo-Smith, L.-P.; Maquelin, K.; van Vreeswijk, T.; Bruining, H. A.; Puppels, G. J.; Thi, N. A. N.; Kirschner, C.; Naumann, D.; Ami, D.; Villa, A. M.; et al. Investigating Microbial (Micro)colony Heterogeneity by Vibrational Spectroscopy. *Appl. Environ. Microbiol.* **2001**, *67* (4), 1461–1469.
- (100) Escoriza, M. F.; Vanbriesen, J. M.; Stewart, S.; Maier, J. Studying bacterial metabolic states using Raman spectroscopy. *Appl. Spectrosc.* **2006**, *60* (9), 971–976.
- (101) Chan, J. W.; Winhold, H.; Corzett, M. H.; Ulloa, J. M.; Cosman, M.; Balhorn, R.; Huser, T. Monitoring dynamic protein expression in living *E. coli*. Bacterial cells by laser tweezers Raman spectroscopy. *Cytometry A* **2007**, *71A* (7), 468–474.
- (102) Moritz, T. J.; Polage, C. R.; Taylor, D. S.; Krol, D. M.; Lane, S. M.; Chan, J. W. Evaluation of *Escherichia coli* Cell Response to Antibiotic Treatment by Use of Raman Spectroscopy with Laser Tweezers. *J. Clin. Microbiol.* **2010**, *48* (11), 4287–4290.
- (103) Moritz, T. J.; Taylor, D. S.; Polage, C. R.; Krol, D. M.; Lane, S. M.; Chan, J. W. Effect of Cefazolin Treatment on the Nonresonant Raman Signatures of the Metabolic State of Individual *Escherichia coli* Cells. *Anal. Chem.* **2010**, *82* (7), 2703–2710.
- (104) López-Díez, E. C.; Winder, C. L.; Ashton, L.; Currie, F.; Goodacre, R. Monitoring the Mode of Action of Antibiotics Using Raman Spectroscopy: Investigating Subinhibitory Effects of Amikacin on *Pseudomonas aeruginosa*. *Anal. Chem.* **2005**, *77* (9), 2901–2906.

- (105) Athamneh, A. I. M.; Alajlouni, R. A.; Wallace, R. S.; Seleem, M. N.; Senger, R. S. Phenotypic Profiling of Antibiotic Response Signatures in *Escherichia coli* Using Raman Spectroscopy. *Antimicrob. Agents Chemother.* **2014**, *58* (3), 1302–1314.
- (106) Escoriza, M. F.; VanBriesen, J. M.; Stewart, S.; Maier, J. Raman spectroscopic discrimination of cell response to chemical and physical inactivation. *Appl. Spectrosc.* **2007**, *61* (8), 812–823.
- (107) Notingher, I. Raman Spectroscopy Cell-based Biosensors. *Sensors* **2007**, *7* (8), 1343–1358.
- (108) Singer, A. C.; Huang, W. E.; Helm, J.; Thompson, I. P. Insight into pollutant bioavailability and toxicity using Raman confocal microscopy. *J. Microbiol. Methods* **2005**, *60* (3), 417–422.
- (109) Li, B.; Sirimuthu, N. M. S.; Ray, B. H.; Ryder, A. G. Using surface-enhanced Raman scattering (SERS) and fluorescence spectroscopy for screening yeast extracts, a complex component of cell culture media. *J. Raman Spectrosc.* **2012**, *43* (8), 1074–1082.
- (110) Marotta, N. E.; Bottomley, L. A. Surface-Enhanced Raman Scattering of Bacterial Cell Culture Growth Media. *Appl. Spectrosc.* **2010**, *64* (6), 601–606.
- (111) Premasiri, W. R.; Gebregziabher, Y.; Ziegler, L. D. On the Difference Between Surface-Enhanced Raman Scattering (SERS) Spectra of Cell Growth Media and Whole Bacterial Cells. *Appl. Spectrosc.* **2011**, *65* (5), 493–499.
- (112) Monakhova, Y. B.; Rolf Godelmann; Hermann, A.; Kuballa, T.; Cannet, C.; Schäfer, M.; Rutledge, D. N. Synergistic effect of the simultaneous chemometric analysis of <sup>1</sup>H NMR spectroscopic and stable isotope (SNIF-NMR, <sup>18</sup>O, <sup>13</sup>C) data: Application to wine analysis. *Anal. Chim. Acta* **2014**, *833*, 29–39.
- (113) Jarvis, R. M.; Goodacre, R. Genetic algorithm optimization for pre-processing and variable selection of spectroscopic data. *Bioinformatics* **2005**, *21* (7), 860–868.
- (114) Lasch, P. Spectral pre-processing for biomedical vibrational spectroscopy and microspectroscopic imaging. *Chemom. Intell. Lab. Syst.* **2012**, *117*, 100–114.
- (115) Martens, H.; Stark, E. Extended multiplicative signal correction and spectral interference subtraction: New preprocessing methods for near infrared spectroscopy. *J. Pharm. Biomed. Anal.* **1991**, *9* (8), 625–635.

- (116) Bittel, M.; Cordella, C. B. Y.; Assaf, A.; Jouanneau, S.; Durand, M. J.; Thouand, G. Potential of Raman Spectroscopy To Monitor Arsenic Toxicity on Bacteria: Insights toward Multiparametric Bioassays. *Environ. Sci. Technol.* **2015**, *49* (20), 12324–12332.
- (117) Ruiz, N.; Falcone, B.; Kahne, D.; Silhavy, T. J. Chemical conditionality: a genetic strategy to probe organelle assembly. *Cell* **2005**, *121* (2), 307–317.
- (118) Bujaldon, S. *Développement de tests in vitro d'évaluation de la qualité de l'eau utilisant le modèle cellulaire Chlamydomonas reinhardtii*; Vigicell, 2011.
- (119) Cordella, C. B. Y.; Bertrand, D. SAISIR: A new general chemometric toolbox. *TrAC Trends Anal. Chem.* **2014**, *54*, 75–82.
- (120) Rutledge, D. N.; Jouan-Rimbaud Bouveresse, D. Independent Components Analysis with the JADE algorithm. *TrAC Trends Anal. Chem.* **2013**, *50*, 22–32.
- (121) Amanda Hummon. Toward Integrative Omics. *Anal. Sci.* **2016**, No. 41, 27–33.
- (122) Zaidan, L. E. M. C.; Guimarães, G.; Santos, L. B.; Brandão, Y. B.; Barbosa, C. M. B. M.; Benachour, M.; Silva, V. L. Validation of an Analytical Method Using HPLC for Identification and Quantification of Aliphatic Acids Present in Effluents. *Int. J. Environ. Res.* **2014**, *8* (1), 149–156.
- (123) Ryan, M. D.; Bowden, E. F.; Chambers, J. Q. Dynamic Electrochemistry: Methodology and Application. *Anal. Chem.* **1994**, *66* (12), 360R – 427R.
- (124) Butler, O. T.; Cairns, W. R. L.; Cook, J. M.; Davidson, C. M. 2013 Atomic spectrometry update—A review of advances in environmental analysis. *J. Anal. At. Spectrom.* **2013**, *29* (1), 17–50.
- (125) Barreca, S.; Orecchio, S.; Pace, A. Photochemical sample treatment: A greener approach to chlorobenzene determination in sediments. *Talanta* **2014**, *129*, 263–269.
- (126) Kabessa, Y.; Korouma, V.; Ilan, H.; Yagur-Kroll, S.; Belkin, S.; Agranat, A. J. Simultaneous quantification of the fluorescent responses of an ensemble of bacterial sensors. *Biosens. Bioelectron.* **2013**, *49*, 394–398.
- (127) Neugebauer, U.; Schmid, U.; Baumann, K.; Holzgrave, U.; Ziebuhr, W.; Kozitskaya, S.; Kiefer, W.; Schmitt, M.; Popp, J. Characterization of bacterial growth and the influence of antibiotics by means of UV resonance Raman spectroscopy. *Biopolymers* **2006**, *82* (4), 306–311.
- (128) Vindimian, E. REGTOX : macro Excel pour dose réponse [http://www.normalesup.org/~vindimian/fr\\_index.html](http://www.normalesup.org/~vindimian/fr_index.html) (accessed Dec 16, 2014).

- (129) JADE <http://perso.telecom-paristech.fr/~cardoso/Algo/Jade/jadeR.m> (accessed Dec 16, 2014).
- (130) Hughes, M. F. Arsenic toxicity and potential mechanisms of action. *Toxicol. Lett.* **2002**, *133* (1), 1–16.
- (131) Mandal, B. K.; Suzuki, K. T. Arsenic round the world: a review. *Talanta* **2002**, *58* (1), 201–235.
- (132) Kamnev, A. A.; Tugarova, A. V.; Antonyuk, L. P.; Tarantilis, P. A.; Polissiou, M. G.; Gardiner, P. H. E. Effects of heavy metals on plant-associated rhizobacteria: Comparison of endophytic and non-endophytic strains of *Azospirillum brasilense*. *J. Trace Elem. Med. Biol.* **2005**, *19* (1), 91–95.
- (133) Chen, J.; Wang, X. Z. A New Approach to Near-Infrared Spectral Data Analysis Using Independent Component Analysis. *J. Chem. Inf. Comput. Sci.* **2001**, *41*, 992–1001.
- (134) Sano, T.; Matsuzaki, S.; Wada, Y. Independent Component Analysis of Multi-channel Near-Infrared Spectroscopic Signals by Time-Delayed Decorrelation. In *Artificial Neural Networks – ICANN 2010*; Diamantaras, K., Duch, W., Iliadis, L. S., Eds.; Lecture Notes in Computer Science; Springer Berlin Heidelberg, 2010; pp 511–520.
- (135) Ammari, F.; Jouan-Rimbaud-Bouveresse, D.; Boughanmi, N.; Rutledge, D. N. Study of the heat stability of sunflower oil enriched in natural antioxidants by different analytical techniques and front-face fluorescence spectroscopy combined with Independent Components Analysis. *Talanta* **2012**, *99*, 323–329.
- (136) Coetsier, C. Approche intégrée de la gestion environnementale Des produits pharmaceutiques dans des rejets de Stations d'épuration urbaines et leur milieu récepteur : occurrence, impact et traitements tertiaires d'élimination. phdthesis, Université Montpellier II - Sciences et Techniques du Languedoc, 2009.
- (137) Bisson, M.; Bureau, J.; Dujardin, R.; Lacroix, G.; Lefevre, J. P.; Oberson-Geneste, D.; Strub, M. P.; Tissot, S. *INERIS - Fiche de données toxicologiques et environnementales des substances chimiques - 2,4-Dichlorophénol*; INERIS - DRC-01-25590-00DF297.doc; 2005.
- (138) Bisson, M.; Houeix, N.; Gay, G.; Lacroix, G.; Lefevre, J. P.; Magaud, H.; Migne, V.; Morin, A.; Tissot, S. *INERIS - Fiche de données toxicologiques et environnementales des substances chimiques - Cuivre et ses dérivés*; INERIS - DRC - 02 - 25590-02DF54.doc; 2005.
- (139) Rudnitskaya, A.; Legin, A. Sensor systems, electronic tongues and electronic noses, for the monitoring of biotechnological processes. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* **2008**, *35* (5), 443–451.

- (140) TRONICO VIGICELL <http://www.vigicell.fr/index.html> (accessed Aug 31, 2016).
- (141) James, D.; Scott, S. M.; Ali, Z.; O'Hare, W. T. Chemical Sensors for Electronic Nose Systems. *Microchim. Acta* **2005**, *149* (1-2), 1–17.
- (142) Assaf, A. Détection des microorganismes pathogène par spectroscopie Raman appliquée en agroalimentaire, Université de Nantes, 2012.
- (143) Hsu, Y.-Y.; Chen, M.-C.; Lim, K.-E.; Chang, C. Reproducibility of Hippocampal Single-Voxel Proton MR Spectroscopy and Chemical Shift Imaging. *Am. J. Roentgenol.* **2001**, *176* (2), 529–536.
- (144) Rösch, P.; Harz, M.; Peschke, K.-D.; Ronneberger, O.; Burkhardt, H.; Popp, J. Identification of single eukaryotic cells with micro-Raman spectroscopy. *Biopolymers* **2006**, *82* (4), 312–316.
- (145) Schenk, E. R.; Nau, F.; Thompson, C. J.; Tse-Dinh, Y.-C.; Fernandez-Lima, F. Changes in lipid distribution in *E. coli* strains in response to norfloxacin. *J. Mass Spectrom.* **2015**, *50* (1), 88–94.
- (146) Drlica, K.; Hiasa, H.; Kerns, R.; Malik, M.; Mustaev, A.; Zhao, X. Quinolones: Action and Resistance Updated. *Curr. Top. Med. Chem.* **2009**, *9* (11), 981–998.
- (147) Drlica, K.; Zhao, X. DNA gyrase, topoisomerase IV, and the 4-quinolones. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **1997**, *61* (3), 377–392.
- (148) Macomber, L.; Imlay, J. A. The iron-sulfur clusters of dehydratases are primary intracellular targets of copper toxicity. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **2009**, *106* (20), 8344–8349.
- (149) Keweloh, H.; Weyrauch, G.; Rehm, H.-J. Phenol-induced membrane changes in free and immobilized *Escherichia coli*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **33** (1), 66–71.
- (150) Bonnet, J.-L.; Bonnemoy, F.; Dusser, M.; Bohatier, J. Assessment of the potential toxicity of herbicides and their degradation products to nontarget cells using two microorganisms, the bacteria *Vibrio fischeri* and the ciliate *Tetrahymena pyriformis*. *Environ. Toxicol.* **2007**, *22* (1), 78–91.
- (151) Oliphant, C. M.; Green, G. M. Quinolones: A Comprehensive Review. *Am. Fam. Physician* **2002**, *65* (3), 455–465.
- (152) Okotrub, K. A.; Surovtsev, N. V. Photobleaching of the resonance Raman lines of cytochromes in living yeast cells. *J. Photochem. Photobiol. B* **2014**, *141*, 269–274.

- (153) Ridley, S. M. Interaction of chloroplasts with inhibitors: induction of chlorosis by diuron during prolonged illumination in vitro. *Plant Physiol.* **1977**, *59* (4), 724–732.
- (154) Nestler, H.; Groh, K. J.; Schönenberger, R.; Behra, R.; Schirmer, K.; Eggen, R. I. L.; Suter, M. J.-F. Multiple-endpoint assay provides a detailed mechanistic view of responses to herbicide exposure in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Aquat. Toxicol.* **2012**, *110–111*, 214–224.
- (155) Hong, R.; Kang, T. Y.; Michels, C. A.; Gadura, N. Membrane Lipid Peroxidation in Copper Alloy-Mediated Contact Killing of *Escherichia coli*. *Appl. Environ. Microbiol.* **2012**, *78* (6), 1776–1784.
- (156) Durand, A.; Azzouzi, A.; Bourbon, M.-L.; Steunou, A.-S.; Liotenberg, S.; Maeshima, A.; Astier, C.; Argentini, M.; Saito, S.; Ouchane, S. cType Cytochrome Assembly Is a Key Target of Copper Toxicity within the Bacterial Periplasm. *mBio* **2015**, *6* (5), e01007–e01015.
- (157) Warnes, S. L.; Caves, V.; Keevil, C. W. Mechanism of copper surface toxicity in *Escherichia coli* O157:H7 and *Salmonella* involves immediate membrane depolarization followed by slower rate of DNA destruction which differs from that observed for Gram-positive bacteria. *Environ. Microbiol.* **2012**, *14* (7), 1730–1743.
- (158) Chillappagari, S.; Seubert, A.; Trip, H.; Kuipers, O. P.; Marahiel, M. A.; Miethke, M. Copper Stress Affects Iron Homeostasis by Destabilizing Iron-Sulfur Cluster Formation in *Bacillus subtilis*. *J. Bacteriol.* **2010**, *192* (10), 2512–2524.
- (159) Sikkema, J.; Bont, J. A. de; Poolman, B. Mechanisms of membrane toxicity of hydrocarbons. *Microbiol. Rev.* **1995**, *59* (2), 201–222.
- (160) Horn, D.; Barrientos, A. Mitochondrial Copper Metabolism and Delivery to Cytochrome c Oxidase. *IUBMB Life* **2008**, *60* (7), 421–429.
- (161) Daisuke Yasokawa; Satomi Murata; Emiko Kitagawa; Yumiko Iwahashi; Ryoji Nakagawa; Tazusa Hashido; Hitoshi Iwahashi. Mechanisms of Copper Toxicity in *Saccharomyces cerevisiae* Determined by Microarray Analysis. *Environ. Toxicol.* **2008**.
- (162) Reteuna Christine. Comparaison de trois tests de toxicité sur bactéries (Bioluminescence - Respiration - Minéralisation du glucose), Metz, 1988.
- (163) Choi, S. H.; Gu, M. B. Phenolic toxicity—detection and classification through the use of a recombinant bioluminescent *Escherichia coli*. *Environ. Toxicol. Chem.* **2001**, *20* (2), 248–255.

- (164) Briquet, M.; Convent, B. Diuron and other inhibitors of mitochondrial cytochrome b oxidation in *Saccharomyces cerevisiae*. *Arch. Int. Physiol. Biochim.* **1977**, *85* (5), 955–957.
- (165) Convent, B.; Briquet, M. Properties of 3-(3,4-Dichlorophenyl)-1,1-dimethylurea and Other Inhibitors of the Cytochrome bc<sub>1</sub> Segment of the Mitochondrial Respiratory Chain in *Saccharomyces cerevisiae*. *Eur. J. Biochem.* **1978**, *82* (2), 473–481.
- (166) Thompson, R. J.; Mosig, G. An ATP-dependent supercoiling topoisomerase of *Chlamydomonas reinhardtii* affects accumulation of specific chloroplast transcripts. *Nucleic Acids Res.* **1985**, *13* (3), 873–891.
- (167) Nie, X.; Gu, J.; Lu, J.; Pan, W.; Yang, Y. Effects of norfloxacin and butylated hydroxyanisole on the freshwater microalga *Scenedesmus obliquus*. *Ecotoxicology* **2009**, *18* (6), 677–684.
- (168) Arriaga-Alba, M.; Rivera-Sánchez, R.; Parra-Cervantes, G.; Barro-Moreno, F.; Flores-Paz, R.; García-Jiménez, E. Antimutagenesis of  $\beta$ -Carotene to Mutations Induced by Quinolone on *Salmonella typhimurium*. *Arch. Med. Res.* **2000**, *31* (2), 156–161.
- (169) Adriana M Carvalho; Ana MP Neto; Angela P Tonon; Ernani Pinto; Karina HM Cardozo; Maisa RPL Brigagao; Marcelo P Barros; Moacir Aluisio Torres; Paula Magalhaes; Sara CG Campos; et al. Circadian protection against oxidative stress in marine algae. *Hypnos* **2004**, *1*, 142–157.
- (170) Rushdy, L. H.; Noujaim, K. O. M.; Abaza, E.; Beshara, L. Effect of copper on growth, bioactive metabolites, antioxidant enzymes and photosynthesis-related gene transcription in *Chlorella vulgaris*. *Afr. J. DNA Cell Biol.* **2016**, *3* (1), 157–165.
- (171) Rogers, B.; Decottignies, A.; Kolaczowski, M.; Carvajal, E.; Balzi, E.; Goffeau, A. The pleiotropic drug ABC transporters from *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Mol. Microbiol. Biotechnol.* **2001**, *3* (2), 207–214.
- (172) Commissariat à l'énergie atomique et aux énergies alternatives. L'échelle TRL - Défis du CEA <http://www.cea.fr/multimedia/Documents/infographies/Defis-du-CEA-infographie-echelle-trl.pdf> (accessed Apr 12, 2017).





# Thèse de Doctorat

Marine BITTEL

## Détection de polluants chimiques par biocapteurs bactériens couplés à la spectroscopie Raman

### Chemical pollutants detection by bacterial biosensors coupled with Raman spectroscopy

#### RESUME

Majoritairement monoparamétriques les biocapteurs actuels sont limités en termes de sensibilité et de spécificité. Pour une analyse complète de la toxicité, ils doivent être associés afin d'en recouper les résultats. Dans ce contexte, la spectroscopie Raman offre de nouvelles perspectives. Véritables empreintes moléculaires, les spectres Raman offrent une vision multiparamétrique globale de la physiologie des échantillons biologiques observés. Basée sur l'hypothèse selon laquelle les variations moléculaires engendrées par une substance sur un microorganisme en impactent l'empreinte spectrale, cette thèse explore le potentiel de la spectroscopie Raman pour la mise en évidence de signatures spectrales d'effets toxiques donnés.

Devant la richesse du signal, les étapes d'analyses sont des enjeux majeurs. Dans une première partie une méthode statistique permettant une meilleure mise en évidence des différences spectrales a été élaborée. Ces travaux ont conduit à une 1<sup>ère</sup> preuve de concept à partir de l'observation des effets de l'arsenic sur la bactérie *E. coli*. Pour confirmer l'aspect spécifique des signatures spectrales engendrées, l'étude est ensuite élargie à l'observation de quatre microorganismes exposés à différents types de substances (herbicide, métal...). En effet, l'analyse des spectres conduit à l'identification des macromolécules impactées par la toxicité permettant une vue d'ensemble de ses effets. Enfin, des eaux environnementales fournies par l'entreprise Tronico Vigicell (partenaire CIFRE de la thèse) sont analysées. Ces travaux s'inscrivent ainsi dans la recherche de solutions pour l'amélioration des techniques de surveillance de pollutions environnementales.

#### Mots clés

Biocapteurs, Spectroscopie Raman, Toxicité, Chimométrie, Pollution, Environnement

#### ABSTRACT

In the field of toxicological bioassays, the current biosensors are mostly monoparametric and limited in terms of sensitivity and specificity. A more complete toxicity analysis thus calls for combinations to cross-check the results. In this context, the latest progress in Raman spectroscopy opens new research perspectives on a fast method of observing metabolic responses against toxic agents. Indeed, Raman spectra constitute molecular fingerprints of the observed biological samples, offering a global multiparametric view of their physiology. Based on the premise that the molecular variations triggered by a substance on a microorganism affect its spectral fingerprint, this thesis explores the Raman spectroscopy potential of identifying spectral signatures of targeted toxic effects.

That said, proper physiological spectral fingerprints analysis requires complex chemometric methods. In the first part of this work, a particular attention has been given to the elaboration of a statistical strategy to highlight the effects of arsenic on the *E. coli* bacteria. To confirm the specific aspects of the generated spectral signatures, the study has then been extended to the observation of four microorganisms exposed to different kinds of toxic substances (antibiotic, metal, pesticides, phenol compounds). Spectral analyses lead to the identification of the most impacted macromolecules, allowing evidencing of specific toxic effects. Finally, in partnership with the company Tronico Vigicell (CIFRE partner of the thesis) this approach has also been tested on environmental water samples, making this work an integral part of the search for better environmental pollution monitoring solutions.

#### Key Words

Microbial Biosensors, Raman Spectroscopy, Toxicity, Chemometrics, Pollution, Environment.