



HAL
open science

Transfert et distribution des pesticides dans les biofilms en lien avec les effets toxiques associés

Betty Chaumet

► **To cite this version:**

Betty Chaumet. Transfert et distribution des pesticides dans les biofilms en lien avec les effets toxiques associés. Ecotoxicologie. Université de Bordeaux, 2018. Français. NNT : 2018BORD0223 . tel-02410777

HAL Id: tel-02410777

<https://theses.hal.science/tel-02410777>

Submitted on 14 Dec 2019

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

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

THÈSE PRÉSENTÉE
POUR OBTENIR LE GRADE DE
DOCTEUR DE
L'UNIVERSITÉ DE BORDEAUX

ÉCOLE DOCTORALE : « SCIENCES ET ENVIRONNEMENTS »

SPÉCIALITÉ : GÉOCHIMIE ET ÉCOTOXICOLOGIE

Par Betty CHAUMET

**Transfert et distribution des pesticides dans les
biofilms en lien avec les effets toxiques associés**

Sous la direction de Soizic Morin et Nicolas Mazzella

Irstea - Unité de Recherche Ecosystèmes Aquatiques et Changements Globaux

Soutenue le 16 novembre 2018

Membres du jury

Ahmed Tlili	Chargé de recherche, EAWAG – Dübendorf	Rapporteur
Damià Barceló	Professeur, ICRA – Girona	Rapporteur
Frédéric Garabétian	Professeur, Université de Bordeaux	Président du jury
Helena Guasch	Professeure, CEAB – Blanes	Examinatrice
Sandra Kim-Tiam	Chargée de recherche, MNHN – Paris	Examinatrice
Jérôme Labanowski	Chargé de recherche, Université de Poitiers	Examinateur
Soizic Morin	Chargée de recherche, Irstea – Bordeaux	Directrice de thèse
Nicolas Mazzella	Ingénieur de recherche, Irstea – Bordeaux	Directeur de thèse

Transfert et distribution des pesticides dans les biofilms en lien avec les effets toxiques associés

Résumé : En 2000, la Directive Cadre sur l'Eau a exigé le retour au bon état chimique et écologique des cours d'eau. Elle a notamment classé 45 substances comme étant prioritaires pour cette évaluation (directive 2013/39/UE), dont en grande partie des pesticides. En effet, en raison de leur utilisation massive, on retrouve aujourd'hui ces contaminants dans tous les compartiments de l'environnement. Par ailleurs, au vu de sa capacité à intégrer les contaminations, le biofilm est considéré comme un excellent bioindicateur pour l'évaluation de la qualité de l'eau. Celui-ci est à la base de la chaîne trophique dans les milieux aquatiques et se compose de microorganismes (microalgues, bactéries, champignons, etc...) enchâssés dans une matrice de substances polymériques extracellulaires (EPS).

Cette thèse porte sur l'étude des mécanismes de transfert et de distribution des pesticides dans les biofilms en lien avec les effets toxiques associés. Ces travaux ont été réalisés avec une approche toxicocinétique par laquelle la bioaccumulation du diuron (un herbicide inhibiteur de la photosynthèse) a été suivie dans les différents compartiments du biofilm. Ce suivi a été réalisé sous plusieurs conditions abiotiques (vitesses de courant, températures et photopériodes) pour différentes durées d'exposition. En parallèle des descripteurs fonctionnels et structuraux ont été mesurés comme des activités photosynthétique (pour les communautés autotrophes) et enzymatiques (pour les communautés hétérotrophes), ainsi que la biomasse totale, la production de protéines et de polysaccharides.

L'ensemble des expérimentations menées au cours de cette thèse a permis de décrire les mécanismes de sorption du diuron dans les biofilms, à savoir des processus d'absorption par les cellules et d'adsorption par la matrice EPS. Puis l'influence des différents paramètres environnementaux étudiés a pu être mise en avant. Ces travaux démontrent la pertinence de l'approche toxicocinétique-toxicodynamique pour l'étude de l'impact des pesticides sur les biofilms fluviaux.

Mots clés : Biofilms, Pesticides, Bioaccumulation, Eaux douces, Toxicocinétique-Toxicodynamique

Pesticides transfer and distribution in biofilms linked with the toxic effects associated

Abstract: In 2000, the Water Framework Directive required the return of rivers to good chemical and ecological status. In particular, it has classified 45 substances as priority for this assessment (Directive 2013/39/EU), including a large proportion of pesticides. Indeed, due to their massive use, these contaminants are now found in all compartments of the environment. In addition, given its ability to integrate contamination, biofilm is considered an excellent bioindicator for water quality assessment. It is at the base of the trophic chain in aquatic environments and is composed of microorganisms (microalgae, bacteria, fungi, etc...) embedded in a matrix of extracellular polymeric substances (EPS).

This thesis focused on the analysis of mechanisms of pesticide transfer and distribution in biofilms related to toxic impacts. This work was carried out using a toxicokinetic approach whereby the bioaccumulation of diuron (a photosynthesis inhibitor herbicide) was monitored in the different compartments of the biofilm. This assessment was carried out under several abiotic conditions (flow velocity, temperatures and photoperiods) under varying exposure durations. In parallel, functional and structural descriptors were measured as photosynthetic (for autotrophic communities) and enzymatic (for heterotrophic communities) activities, as well as biofilm biomass and protein and polysaccharide production.

All the experiments performed during this thesis made it possible to highlight the sorption mechanisms of diuron in biofilm, i.e. absorption processes by cells and adsorption phenomenon within the EPS matrix. Then the influence of the different environmental parameters studied was emphasized. This work demonstrates the relevance of the toxicokinetic-toxicodynamic approach to the study of the impact of pesticides on fluvial biofilms.

Keywords: Biofilms, Pesticides, Bioaccumulation, Freshwater, Toxicokinetic-Toxicodynamic

Unité de recherche

Ecosystèmes Aquatiques et changements globaux

(EABX)

Équipe Écologie des communautés végétales aquatiques et impact des pressions multiples

(ECOVEA)

Irstea,

50 avenue de Verdun,

33610 Cestas

France

Université de Bordeaux,

351 cours de la Libération,

33400 Talence

France

Remerciements

Je tiens à remercier en tout premier lieu Ahmed Tlili, Damià Barceló, Helena Guasch, Jérôme Labanowski, Sandra Kim-Tiam et Frédéric Garabétian d'avoir accepté d'évaluer mes travaux de thèse. Ensuite je souhaite remercier les membres de mon comité de suivi de thèse, Joan Artigas, Frédéric Garabétian, Agnès Feurtet-Mazel, Sara Rodriguez et Marie-Hélène Devier pour vos conseils avisés. Je souhaite remercier tout particulièrement Joan pour ton aide et tous tes précieux conseils prodigués lors du développement de la méthode d'extraction des EPS et au long de ma thèse. Je tiens à remercier le LabEx COTE pour le soutien financier apporté à ce projet (PhytoCOTE, ANR-10-LABX-45). Merci également à Frédéric Saudubray, Eric Rochard et Juliette Rosebery pour m'avoir permis d'effectuer ma thèse à l'Irstea au sein de l'équipe ECOVEA.

Je tiens à exprimer ma reconnaissance envers Frédéric Garabétian et Brigitte Bordes pour toute l'aide que vous nous avez apportée au cours de l'organisation de la journée des doctorants 2018, ainsi qu'envers tous les membres du comité d'organisation pour avoir eu la chance de partager cette expérience avec vous, et tous ces bons moments. Ensuite je souhaite remercier tous les membres du projet PhytoCOTE avec qui j'ai eu le plaisir d'aller sur le terrain, pour le bon déroulé de ce projet et tous les instants agréables passés les pieds dans l'eau.

Je tiens à exprimer toute ma gratitude envers Soizic et Nicolas, à qui je dois énormément et que j'ai eu la chance d'avoir à mes côtés pendant ma thèse. À vous deux un grand merci pour avoir été des directeurs de thèse en or, pour m'avoir guidé pendant ces trois années, pour votre aide, vos conseils, et votre gentillesse. À Soizic, merci pour ton soutien, ton optimisme, ta disponibilité et tes encouragements (et merci pour la photosynthèse !). À Nicolas pour ta patience, pour m'avoir transmis une partie de ton savoir sur la chimie analytique, pour ta pédagogie à l'aide de LA courbe.

Merci à toute l'équipe ECOVEA, à Juliette, Aurélie, Marion, Bertille, Julie, Caroline, Seb, Gwilherm, Sylvia, François, Mélissa, Léa, Hamidou, Mélissa, Brigitte, Kéwin, Océane, Vincent, Christophe, Christian, Jonathan, Floriane, Nathalie, Cristina, Julie, Marie, David, Aurélien et Thibault, pour avoir fait de l'Irstea un endroit chaleureux.

Un grand merci aux chimistes ! À Aurélie, pour tous ces bons moments passés avec toi, pour tous tes conseils techniques, et aussi merci de m'avoir motivée à aller patauger à la piscine jusqu'à la fin ! À Brigitte et Mélissa, un grand merci pour toutes les analyses de COT et de nutriments ! Enfin merci à vous trois, à Nicolas, Marion, Bertille, et tous ceux qui sont passés par là (Océane, Léa, Hamidou, Kéwin et Morgane) pour avoir fait du labo un endroit où il fait bon vivre, et où on peut prendre facilement 10kg par semaine avec vos bons gâteaux !

Je tiens à remercier Océane, pour le remarquable travail que tu as accompli au cours de ton stage, et en espérant t'avoir transmis le goût pour l'écotoxicologie. Je souhaite remercier en particulier Gwilherm pour ton aide sur toute la mise en place de mes expérimentations, François pour ces bons moments passés en ta compagnie sur la route de Marcillac. Merci à Thibault et Seb pour toute votre aide et vos précieux conseils sur R qui m'ont permis de ne pas jeter mon ordi par la fenêtre, et d'avoir essuyé autant de « saperlipopette » ! Merci à Grégory pour tous tes bons conseils, et pour m'avoir aidé à faire naître Herbert. Merci à Isabelle pour ton aide précieuse lors de l'organisation de la journée des doctorants. Merci à Paul d'avoir été mon acolyte de piscine et de panne de train, merci à Charles pour le soutien sans faille dans ma thèse. Merci aux poissons pour les apéros du vendredi à la débauche sur le chemin de la gare.

Puis un énorme merci à mes quatre biquettes/blondinettes sans qui ces trois années n'auraient jamais eu la même saveur ! À commencer par celle du Québec : merci Caro pour tous les cours de bio que tu m'as dispensé, et pour nous avoir accueillies au pays du caribou ! À notre pom-pom-girl en or, Julie, merci pour ton soutien à grands coups de « on est pas des kikis », et pour ta joie de vivre hyper communicative ! Ensuite à ma Bertillounette, ma petite licorne à paillettes ! Merci pour tous ces moments où on s'est bien marré, que ce soit au labo, en vacances, dans ma cuisine à faire du savon ou à la cave à René (et d'ailleurs merci pour toutes ces bières partagées avec toi ;) !). Et enfin, merci à ma collègue de bureau préférée ! Marion, je tiens à commencer ce paragraphe en te remerciant d'avoir égayé mes journées en mettant du Francky Vincent au labo, ou du France Gall au bureau, et merci d'avoir été mon google humain pendant ces trois ans !! Je suis heureuse d'avoir pu partager tous les moments d'une thèse avec toi, que ce soit les premiers congrès et copil, le rush des manips, la rédaction... et les pannes des machines ! Tu as été un soutien formidable et parce que tu me fais mourir de rire quand tu cours après les biquettes ! Merci à vous quatre pour tous nos

échanges sur nos thèses respectives qui ont permis de régler bien des questions ! Mais surtout, en plus d'avoir été des collègues au top, vous avez été des amies en or, sans qui je ne me serai pas tant amusée pendant ces trois ans !

Merci à mes copains, par ordre chronologique : la troupe de Rouziers et ses environs, à mes copains de licence et de master, avec le temps on s'est tous éparpillés aux quatre coins de la France, voire du monde ! Alors un énorme merci pour ces weekends, ou vacances de vadrouille avec/chez vous !! Tous vous avez été un soutien si solide, que ce soit en m'écoutant radoter sur ma vie de thésarde, ou justement en me sortant la tête de là, et pour ça toutes les techniques sont bonnes: les pèlerinages à la Bergerie, les bières allemandes, un concert d'Iggy Pop! Et enfin un merci tout particulier aux Bordelais, pour le soutien « rapproché » ! Merci pour tous ces bons moments passés avec vous, pour les quizz, pour m'avoir aidé à ressembler à « une vraie fille », pour les raclettes/miss France, et bien d'autres !

Merci à toute ma famille ! À mes mamies, l'une pour toujours s'être inquiétée de savoir si je mangeais bien, et l'autre pour tous les « animos » qui me redonnaient courage ! Merci à mes sœurs et mes beaux-frères, pour tous les weekends en Touraine et pour les rdv réguliers au Starbuck avec « je m'appelle Paupiette » sous toutes ses déclinaisons qui me font toujours autant rire ! Merci à mes parents à qui je dois tout ! Merci pour votre soutien inconditionnel ! Et enfin merci à tous mes p'tits poussins, parce qu'il n'y a rien de mieux que de jouer à la dinette et faire semblant de manger du gâteau pour ensoleiller une journée !

Merci à Herbert ! Et chose piochée, chose faite ! (et ce sans poudre de perlimpinpin)

Sommaire

Liste des figures	15
Liste des tableaux	23
Glossaire	25
Abréviations	25
Liste des constantes.....	27
Introduction générale.....	30
1. Chapitre 1 : Analyse bibliographique.....	34
1.1. Pesticides	34
1.1.1. Définition	34
1.1.2. De l'utilisation des pesticides au milieu aquatique	36
1.1.3. Le diuron.....	41
1.2. Les biofilms	44
1.2.1. Définition	44
1.2.2. La photosynthèse.....	46
1.2.3. Etapes de colonisation du biofilm	47
1.2.4. Ecologie du biofilm et son rôle dans les écosystèmes aquatiques.....	48
1.2.5. Composition « chimique » du biofilm	49
1.3. Interactions entre les pesticides et le biofilm.....	51
1.3.1. Biodisponibilité des pesticides pour le biofilm	51
1.3.2. Distribution et transport des contaminants dans le biofilm.....	52
1.3.3. Toxicocinétique et toxicodynamique des pesticides dans les biofilms	53
1.3.4. Mode d'action du diuron dans les biofilms.....	56
1.3.5. Facteurs influençant l'impact des herbicides.....	57
2. Chapitre 2 : Matériels et méthodes.....	60
2.1. Plan d'expérimentation	60

2.1.1.	Colonisation du biofilm.....	60
2.1.2.	Conditions d'exposition et suivi des conditions physicochimiques	60
2.1.3.	Conditions de contamination du biofilm	62
2.2.	Caractérisation du biofilm.....	64
2.2.1.	Extraction des EPS.....	64
2.2.2.	Caractérisation structurelle	66
2.2.3.	Caractérisation fonctionnelle	69
2.3.	Dosage des pesticides	73
2.3.1.	Extraction des pesticides	73
2.3.2.	Purification des échantillons	74
2.3.3.	Quantification des pesticides	75
2.4.	Analyse des données.....	78
2.4.1.	Cinétique chimique	78
2.4.2.	Coefficient de transfert de masse	80
2.4.3.	Modèles pour l'approche toxicocinétique.....	80
2.4.4.	Modèles pour l'approche toxicodynamique.....	83
2.4.5.	Tests et analyses statistiques.....	86
3.	Chapitre 3 : Mesure de l'influence de paramètres abiotiques sur la bioaccumulation et l'impact toxique des pesticides dans les biofilms	88
3.1.	Introduction générale.....	88
3.2.	Cinétique d'accumulation du diuron et de sa toxicité dans les biofilms.....	90
3.2.1.	Introduction.....	90
3.2.2.	Détermination de la cinétique d'accumulation et ses constantes avec l'effet toxique associé	91
3.2.3.	Bilan.....	95
3.3.	Effets du courant sur la cinétique d'accumulation et les impacts du diuron	98
3.3.1.	Introduction.....	98

3.3.2.	Influence du courant sur la toxicocinétique et toxicodynamique du diuron sur les biofilms d'eau douce	99
3.3.3.	Bilan.....	129
3.4.	Etude des effets de la modulation par les saisons	131
3.4.1.	Introduction.....	131
3.4.2.	Influence de la température et de la photopériode sur la bioaccumulation du diuron dans les biofilms et leur métabolisme	132
3.4.3.	Bilan.....	154
3.5.	Conclusion générale.....	156
4.	Chapitre 4 : Etude des mécanismes de sorption du diuron et de la réponse du biofilm	160
4.1.	Introduction générale.....	160
4.2.	Isothermes de sorption du diuron dans le biofilm	161
4.2.1.	Introduction.....	161
4.2.2.	Isothermes de sorption du diuron sur les biofilms d'eau douce	162
4.2.3.	Bilan.....	182
4.3.	Effets immédiats de l'exposition au diuron.....	184
4.3.1.	Introduction.....	184
4.3.2.	Modèle dose-temps de réponse pour évaluer l'inhibition de la photosynthèse induite par le diuron sur les biofilms d'eau douce.....	185
4.3.3.	Bilan.....	208
4.4.	Conclusion générale.....	210
5.	Chapitre 5 : Discussion générale et perspectives	212
5.1.	Développement de la méthodologie d'extraction des EPS.....	212
5.2.	Approche TK-TD	214
5.2.1.	Validité des modèles par rapport à une exposition à long terme.....	217
5.2.2.	Détermination du poids du facteur temps.....	219
5.2.3.	Confrontation du modèle à un contexte environnemental plus réaliste	221
5.2.4.	Validation du modèle de Langmuir simple.....	223

5.3.	Domaine de validité du modèle E_{max}	228
5.3.1.	Incidence de la CE_{50} sur le modèle E_{max}	228
5.3.2.	Influence de la forme d'exposition du biofilm	229
5.3.3.	Limites du modèles E_{max}	230
5.4.	Perspectives d'amélioration et d'application des modèles.....	232
5.4.1.	Effets mélanges	233
5.4.2.	Influence de l'historique de contamination du biofilm.....	235
5.4.3.	Détermination des constantes liées aux facteurs environnementaux	237
6.	Conclusion.....	240
7.	Bibliographie	244
8.	Annexes.....	262
8.1.	Annexe 1 : Préparation du milieu de culture Dauta.....	262
8.2.	Annexe 2 : Résultats complémentaires de l'étude préliminaire.....	263
8.3.	Annexe 3 : Validation de la méthode d'extraction des EPS.....	266
8.3.1.	Design expérimental	266
8.3.2.	Caractérisation du biofilm et choix de la méthodologie	267
8.3.3.	Calcul du pourcentage de désorption du diuron	271
8.3.4.	Quantification du diuron dans les D-EPS.....	272
8.3.5.	Caractérisation du biofilm au travers des saisons	273
8.4.	Annexe 4 : Protocole pour l'évaluation de la tolérance du biofilm en suspension .	275
8.5.	Annexe 5 : Etude de terrain sur la commune de Marcillac (projet PhytoCOTE)	276
9.	Valorisations scientifiques.....	282

Liste des figures

Figure 1: Pourcentage des différents types de pesticides vendus en 2014 pour chaque pays (¹ : données uniquement pour l'année 2013). Source : Eurostat (online data code: aei_fm_salpest09)	37
Figure 2: Pourcentage des différents types de pesticides retrouvés dans les cours d'eau en France en 2014 sur 700 composés analysés. Sources : agences de l'eau et offices de l'eau; BRGM, banque ADES; Inéris, BNVD, 2016. Traitements : SOeS, 2017	38
Figure 3: Représentation des différents modes de transport des pesticides dans l'environnement (schéma modifié à partir de Coquillé®, 2017)	39
Figure 4: Voies de dégradation aérobie et anaérobie du diuron. Source : Neuwoehner et al. (2010)	42
Figure 5: Représentation graphique de la composition du biofilm	45
Figure 6: Représentation du processus de photosynthèse	46
Figure 7: Représentation du processus de colonisation du biofilm	48
Figure 8: Représentation de la composition chimique du biofilm et des différentes interactions possibles	50
Figure 9: Principe de la toxicocinétique et de la toxicodynamique	55
Figure 10: Représentation du mode d'action du diuron sur les organismes autotrophes	56
Figure 11: Photographie de l'étang de Gazinet-Cestas à gauche, et de lames recouvertes de biofilm mature à droite	60
Figure 12: Schéma d'un canal en verre de 25 L avec sa nourrice	61
Figure 13: Schéma de la méthode d'extraction appuyé par des photographies (avant à gauche / après à droite)	64
Figure 14: Représentation schématique de la distribution des différents aliquotes selon les fractions du biofilm	65
Figure 15: Photographie d'échantillons préparés pour le dosage des protéines à gauche, et exemple de droite d'étalonnage pour le dosage des protéines à une longueur d'onde de 595 nm à droite (exemple issu de l'expérimentation présentée en partie 3.3)	67
Figure 16: Photographie d'échantillons préparés pour le dosage des polysaccharides à gauche, et droite d'étalonnage pour la quantification des polysaccharides à une longueur d'onde de 485 nm à droite (exemple issu de l'expérimentation présentée en partie 3.3)	69

Figure 17: Exemples de droites d'étalonnage pour la mesure des activités enzymatiques à une longueur d'onde d'excitation de 365 nm, et d'émission de 455 nm: pour la β -glucosaminidase à gauche et la β -glucosidase à droite (exemple issu de l'expérimentation présentée en partie 3.3).....	70
Figure 18: Principe de la mesure de l'activité photosynthétique	72
Figure 19: Photographies de l'appareil ASE à gauche, de vials de récupération contenant des échantillons au milieu, et le système d'évaporation sous flux d'azote des échantillons à droite.....	74
Figure 20: Schéma du principe de fonctionnement de l'UPLC-ToF	76
Figure 21: Représentation d'un modèle d'absorption simple à deux compartiments avec les constantes cinétiques associées.....	78
Figure 22: Représentation d'une cinétique d'absorption d'ordre 1	79
Figure 23: Représentation des différents modèles présentés dans les parties 2.4.3.1 à 2.4.3.4	81
Figure 24: Représentation d'une courbe dose-réponse et des paramètres écotoxicologiques CE_{50} et C_{max} (concentration en contaminant dans l'eau engendrant l'effet maximal, en $\mu\text{g.L}^{-1}$)	84
Figure 25: Concentration moyenne en polysaccharides dans le biofilm exprimée en μg d'équivalent glucose. cm^{-2} avec les erreurs standards associées en fonction du temps d'exposition. Les points blancs sont les résultats obtenus pour la condition témoin, les points bleus clairs et foncés représentent ceux pour le biofilm exposé à 5 et 50 $\mu\text{g.L}^{-1}$ de diuron, respectivement. Les lettres représentent « l'effet temps » pour chacune des conditions d'exposition (selon la couleur : noir/témoins, bleu clair/5D, bleu foncé/50D). Les étoiles représentent les différences significatives pour un même temps d'exposition entre les conditions, soit « l'effet concentration ». $P\text{-value} < 0,005$	92
Figure 26: Répartition de la communauté algale en pourcentage en fonction du temps d'exposition en canaux témoins. Les algues vertes sont représentées en vert, les cyanobactéries en bleu, et les algues brunes en marron	92
Figure 27: Moyenne des concentrations en diuron dans le biofilm en $\mu\text{g.g}^{-1}$ et les erreurs standards associées en fonction du temps d'exposition. Les points en bleu clair sont les résultats pour le biofilm exposé à 5 $\mu\text{g.L}^{-1}$ de diuron, et en bleu foncé, ceux pour l'exposition à 50 $\mu\text{g.L}^{-1}$. Les courbes sont la représentation de la cinétique d'ordre 1 associée. Les lettres représentent « l'effet temps » pour chacune des conditions d'exposition (selon la couleur : bleu clair/5D, bleu foncé/50D). Les étoiles représentent les différences significatives pour un même temps d'exposition entre les conditions, soit « l'effet concentration ». Les lettres représentent les différents groupes à l'intérieur d'une même condition d'exposition (selon la couleur de la lettre) soit l'effet temps d'exposition. $P\text{-value} < 0,005$	93

Figure 28: Moyenne de l'inhibition de la photosynthèse en pourcentage du témoin avec les erreurs standards associées en fonction du temps d'exposition. Les points en bleu clair sont les résultats pour la condition exposée à $5 \mu\text{g.L}^{-1}$, et en bleu foncé pour l'exposition à $50 \mu\text{g.L}^{-1}$. Les lettres représentent « l'effet temps » pour chacune des conditions d'exposition (selon la couleur : bleu clair/5D, bleu foncé/50D). Les étoiles représentent les différences significatives pour un même temps d'exposition entre les conditions, soit « l'effet concentration ». $P\text{-value} < 0,005$ 95

Figure 29: Diuron concentration in the biofilms ($\mu\text{g.g}^{-1}\text{.cm}^{-2}$) as a function of exposure time. Diamonds represent T-EPS-M, and circles total accumulation in raw biofilms; Ctrl values are all below quantification limits. The curves are the representation of the first order kinetic model fitted to the experimental data, and the regression coefficients associated, both with the associated colour: Total fraction = light and deep blue, pink and red / T-EPS-M fraction = light and deep green and orange. 118

Figure 30: Representation of pesticide toxic impact on biofilms, assessed as the % of photosynthesis inhibition (with respect to control values at the same time). The model curve is fitted a posteriori to the experimental data (represented by the circles). 121

Figure 31: Graphical representation of experimental design and abbreviations associated to each season 137

Figure 32: Mean photosynthetic quantum yield ($\pm \text{sd}$, $n=4$) in function of diuron bioaccumulation in the biofilm in $\mu\text{g.g}^{-1}$ (mean $\pm \text{sd}$), for biofilms exposed in channels during 1 and 3 days. The seasons are differentiated as follows: Season 1 in red, Season 2 in orange, Season 3 in green, and Season 4 in blue. The black line represents the linear regression performed on the whole dataset. The size of the points is proportional to the dose of exposure. 145

Figure 33: Polysaccharides and protein contents and β -glucosaminidase and β -glucosidase activities (mean $\pm \text{sd}$) in percentage of T_0 (grey line: 100 % of T_0 value for each season). The seasons are differentiated as follows: Season 1 in red, Season 2 in orange, Season 3 in green, and Season 4 in blue. 147

Figure 34: Linear discriminant analysis of the different Seasons after 3 days of exposure (left panel) based on polysaccharide and protein content, and extracellular enzymatic activities standardized by T_0 (right panel)..... 148

Figure 35: Diuron concentration in the biofilm in $\mu\text{g.g}^{-1}$ expressed as a function of diuron concentration in the water in $\mu\text{g.L}^{-1}$. The dots are the experimental data, and the curves correspond to the models tested. The black dotted line is the linear regression fitted to all data. The black full line is

the simple Langmuir established with the data from 1D to 500D. In grey is the simple Langmuir model established with data ranging from 1D to 50D (full-line), and its extrapolation for diuron concentrations above 50 $\mu\text{g.L}^{-1}$ in the water (dotted line)..... 173

Figure 36: Photosynthesis inhibition in percentage of control expressed as a function of diuron concentration in the water in $\mu\text{g.L}^{-1}$. The dots are the experimental data. The curves are the predicted dose-effect relationships modelled by the E_{max} model: based on diuron concentrations measured in the water (Equation 12, dotted-dash curve), based on diuron bioaccumulation in biofilm in accordance with Langmuir calculations (Equation 13) using a simple Langmuir isotherm model for all the data (black curve) or for the lowest concentrations of exposure only (up to 50D, grey curve). The dotted line represents the E_{max} model performed using diuron concentrations in the biofilm calculated with the linear regression. 175

Figure 37: Représentation de la superposition des différents mécanismes de sorption 182

Figure 38: Schematic representation of the time-response (here, Φ_{PSII}) relationship expected to occur following PSII inhibitor exposure (contamination on $t= 0$). Φ_{PSII} is anticipated to decrease after herbicide exposure, from its optimal value to a minimal achievable value (maximal inhibition). The latency is defined as the time the PSII inhibitor takes to cause a 50 % inhibition of the response. All the toxicological values are susceptible to change depending on the concentration of exposure..... 189

Figure 39: a) Time-response curves based on Φ_{PSII} decrease post diuron addition (Experiment 1): values are average of 3 replicates, except for the highest concentration (2 replicates available). A summary of the ecotoxicity parameters extracted from the curves are provided in Tableau 12. b) Variation of $t_{1/2}$ with diuron exposure concentration. Error bars indicate indicate $t_{1/2}$ confidence intervals (95 %) for the individual time-response models. 193

Figure 40: . a) Experimental Φ_{PSII} inhibition curves with increasing diuron concentrations, after different durations of exposure. b) Variation of EC_{50} values (\pm CI, 95 %) with duration of exposure, given by the models fitted in Fig. 3a. The black diamond shows the EC_{50} previously obtained with a 3-hour exposure for comparison (dose-response curve –DRC– presented in SI1). 196

Figure 41: Time-response curves based on Φ_{PSII} decrease for contrasted biofilms, after contamination at “high” concentration. Full symbols correspond to biofilms collected in August (Experiment 1, average of 3 replicates); empty symbols to biofilms sampled in December (Experiment 2, average of 4 replicates).Parameters extracted from curve modelling are shown in Tableau 12..... 198

Figure 42: Time-response curves based on Φ_{PSII} decrease for biofilms pre-exposed to 3-hour diuron pulses, after contamination at "high" concentration (Experiment 2). Values are average of 4 replicates. Pulse concentration: 0.3 $\mu\text{g.L}^{-1}$: green triangles, 19.1 $\mu\text{g.L}^{-1}$: orange triangles, 102.4 $\mu\text{g.L}^{-1}$: red triangles..... 200

Figure 43: Représentation de l'ensemble des données obtenues sur toutes les expérimentations. Les points noirs représentent les données issues de l'expérimentation sur les isothermes de sorption, les points bleus sur l'influence de la vitesse du courant, les carrés roses de l'étude préliminaire sur la bioaccumulation à long terme et les losanges rouges, pour l'influence des saisons. À gauche : Concentration en diuron dans le biofilm en $\mu\text{g.g}^{-1}\text{.cm}^2$ en fonction de la concentration en diuron dans l'eau en $\mu\text{g.L}^{-1}$. La courbe noire représente le modèle de Langmuir simple étendu, et la courbe grise le modèle de Langmuir simple court. À droite : Impact toxique en pourcentage d'inhibition de la photosynthèse en fonction de la concentration en diuron dans l'eau en $\mu\text{g.L}^{-1}$. La courbe noire représente le modèle E_{max} 217

Figure 44: Représentation des données obtenues lors de l'étude préliminaire (3.2). Les points noirs rappellent les données issues de l'étude sur les isothermes de sorption du diuron, les autres représentent les données obtenues lors de l'étude préliminaire sur les expositions à long termes. Le gradient de couleur sur les points représente la durée d'exposition : plus les points sont foncés, plus le biofilm a été exposé longtemps. À gauche : Concentration en diuron dans le biofilm en $\mu\text{g.g}^{-1}\text{.cm}^2$ en fonction de la concentration en diuron dans l'eau en $\mu\text{g.L}^{-1}$. La courbe noire représente le modèle de Langmuir simple étendu, et la courbe grise le modèle de Langmuir simple court. À droite : Impact toxique en pourcentage d'inhibition de la photosynthèse en fonction de la concentration en diuron dans l'eau en $\mu\text{g.L}^{-1}$. La courbe noire représente le modèle E_{max} 219

Figure 45: Représentation des données obtenues lors de l'étude sur l'influence du courant (3.3). Les points noirs rappellent les données issues de l'étude sur les isothermes de sorption du diuron, les autres représentent les données obtenues lors de l'étude sur l'influence de la vitesse du courant. Le gradient de couleur sur les points représente la durée d'exposition : plus les points sont foncés, plus le biofilm a été exposé longtemps. Les points bleus représentent la condition LowFlow, et les points roses la condition Flow. À gauche : Concentration en diuron dans le biofilm en $\mu\text{g.g}^{-1}\text{.cm}^2$ en fonction de la concentration en diuron dans l'eau en $\mu\text{g.L}^{-1}$. La courbe noire représente le modèle de Langmuir simple étendu, et la courbe grise le modèle de Langmuir simple court. À droite : Impact toxique en

pourcentage d'inhibition de la photosynthèse en fonction de la concentration en diuron dans l'eau en $\mu\text{g.L}^{-1}$. La courbe noire représente le modèle E_{max} 221

Figure 46: Représentation des données obtenues lors de l'étude sur l'influence de la température et de la photopériode (3.4). Les points noirs rappellent les données issues de l'étude sur les isothermes de sorption du diuron, les losanges représentent l'étude sur l'influence de la température et de la photopériode selon le code couleur suivant pour les échantillons exposés durant trois jours: rouge/saison 1, orange/saison2, vert/saison 3 et bleu/saison 4. Les échantillons exposés durant une journée sont représentés selon le même code couleur, une teinte plus basse. À gauche: Concentration en diuron dans le biofilm en $\mu\text{g.g}^{-1}.\text{cm}^{-2}$ en fonction de la concentration en diuron dans l'eau en $\mu\text{g.L}^{-1}$. La courbe noire représente le modèle de Langmuir simple étendu, et la courbe grise le modèle de Langmuir simple court. À droite : Impact toxique en pourcentage d'inhibition de la photosynthèse en fonction de la concentration diuron dans l'eau en $\mu\text{g.L}^{-1}$. La courbe noire représente le modèle E_{max} 222

Figure 47: Représentation des modèles de Langmuir simple étendus à gauche et courts à droite selon les différents jeux de données utilisés. La courbe en noire représente le modèle 1, en bleu foncé le modèle 2, en rouge le modèle 3, en vert le modèle 4 et en bleu clair le modèle 5 (cf. Tableau 14) 225

Figure 48: À gauche : Représentation de la toxicité en pourcentage d'inhibition de la photosynthèse en fonction de la concentration en diuron dans l'eau en $\mu\text{g.L}^{-1}$. Les points en noir sont les données expérimentales d'inhibition de la photosynthèse de l'étude sur les isothermes de sorption du diuron, et la courbe noire le modèle E_{max} associé. La courbe rouge est le modèle E_{max} réalisé avec une CE_{50} à 121 $\mu\text{g.L}^{-1}$, et en bleu avec une CE_{50} à 33.2 $\mu\text{g.L}^{-1}$. À droite : Représentation de la différence entre les deux nouveaux modèles E_{max} (avec les couleurs associées) et le modèle E_{max} initial, en pourcentage d'inhibition de la photosynthèse (delta) en fonction de la concentration en diuron dans l'eau en $\mu\text{g.L}^{-1}$ 229

Figure 49: Représentation de la toxicité en pourcentage d'inhibition de la photosynthèse en fonction de la concentration en diuron dans l'eau en $\mu\text{g.L}^{-1}$ pour l'expérimentation menée sur le biofilm en suspension. Les points représentent les données expérimentales et la courbe représente la prédiction de la toxicité à partir du modèle E_{max} . La courbe rouge représente la pente pour les données prédites, et la courbe verte pour les données expérimentales 231

Figure 50: Représentation de la concentration en diuron dans l'eau prédite en fonction de la concentration réelle en $\mu\text{g.L}^{-1}$ pour les données issues de l'étude sur les isothermes de sorption du diuron 232

Figure 51: Schéma de l'expérimentation sur l'étude de désorption du diuron dans les biofilms.....	236
Figure 52: Concentration moyenne en protéines dans le biofilm exprimée en μg d'équivalent BSA.cm ⁻² avec les erreurs standards associées en fonction du temps d'exposition. Les points blancs sont les résultats obtenus pour la condition témoin, les points bleus clairs et foncés représentent ceux pour le biofilm exposé à 5 et 50 $\mu\text{g.L}^{-1}$ de diuron, respectivement.....	263
Figure 53: Activité moyenne de la β -glucosidase dans le biofilm exprimée en μg d'équivalent MUF.cm ⁻² avec les erreurs standards associées en fonction du temps d'exposition. Les points blancs sont les résultats obtenus pour la condition témoin, les points bleus clairs et foncés représentent ceux pour le biofilm exposé à 5 et 50 $\mu\text{g.L}^{-1}$ de diuron, respectivement.....	264
Figure 54: Activité moyenne de la β -glucosaminidase dans le biofilm exprimée en μg d'équivalent MUF.cm ⁻² avec les erreurs standards associées en fonction du temps d'exposition. Les points blancs sont les résultats obtenus pour la condition témoin, les points bleus clairs et foncés représentent ceux pour le biofilm exposé à 5 et 50 $\mu\text{g.L}^{-1}$ de diuron, respectivement.....	264
Figure 55: Moyenne des poids secs exprimés en mg avec les erreurs standards associées en fonction du temps d'exposition. Les points blancs sont les résultats obtenus pour la condition témoin, les points bleus clairs et foncés représentent ceux pour le biofilm exposé à 5 et 50 $\mu\text{g.L}^{-1}$ de diuron, respectivement.....	265
Figure 56: Représentation graphique du design expérimental pour le développement méthodologique	267
Figure 57: Moyenne de la quantité de polysaccharides avec les erreurs standards associées en fonction des différentes étapes d'extraction. Les points en marron représentent les résultats de la fraction Total, les lames en bleu ceux du surnageant et les lames en vert ceux du culot.	268
Figure 58: Moyenne de l'activité de la β -glucosidase avec les erreurs standards associées selon les différentes étapes d'extraction. Les points en marron représentent les résultats de la fraction Total, les lames en bleu ceux du surnageant et les lames en vert ceux du culot.....	269
Figure 59: Moyenne de l'activité de la β -glucosaminidase avec les erreurs standards associées selon les différentes étapes d'extraction. Les points en marron représentent les résultats de la fraction Total, les lames en bleu ceux du surnageant et les lames en vert ceux du culot.....	270
Figure 60: Moyenne des pourcentages du diuron retrouvé dans la fraction D-EPS avec les erreurs standards associées, par rapport à la fraction Total en marron et à la fraction T-EPS-M en vert pour une exposition à 5 $\mu\text{g.L}^{-1}$ de diuron à gauche et à 50 $\mu\text{g.L}^{-1}$ de diuron à droite.	273

Figure 61: Carte géographique de la commune de Marcillac et localisation des sites étudiés..... 276

Figure 62: Concentration en pesticides retrouvés dans le biofilm en $\mu\text{g.g}^{-1}$ en fonction des différents sites étudiés pour la campagne N°1 277

Figure 63: Concentration en pesticides retrouvés dans le biofilm en $\mu\text{g.g}^{-1}$ en fonction des différents sites étudiés pour la campagne N°2 278

Figure 64: Concentration en pesticides retrouvés dans le biofilm en $\mu\text{g.g}^{-1}$ en fonction des différents sites étudiés pour la campagne N°3 278

Liste des tableaux

<i>Tableau 1: Classement des différents pesticides selon leur groupement chimique, leur mode d'action et leur famille.....</i>	35
<i>Tableau 2: Bilan des expérimentations effectuées et des différents paramètres contrôlés</i>	63
<i>Tableau 3: Paramètres analytiques des molécules étudiées et l'étalon interne associé.....</i>	77
<i>Tableau 4: Liste des tests et analyses statistiques réalisés.....</i>	86
<i>Tableau 5: Physicochemical conditions and diuron contamination (mean ± standard deviation (n)) in the channels during the experiment</i>	113
<i>Tableau 6: Main descriptors (mean ± standard deviation) for Raw biofilms and the T-EPS-M fraction under control and contaminated conditions at 5 and 50 µg.L⁻¹ of diuron (named respectively Ctrl, 5D and 50D). Significantly influent factors were determined with a linear mixed-effect model.</i>	115
<i>Tableau 7: Mean of bioaccumulation descriptors and toxic effect with standard deviation associated and number of sample for both contaminated conditions at 5 and 50 µg.L⁻¹ of diuron (named respectively 5D and 50D), t_{95 %}: time to reach the accumulation equilibrium, 1/ko: overall mass transfer resistance, BCF: Bioconcentration Factor. * represent significant differences between raw biofilms and T-EPS-M established with a Wilcoxon test; different letters in superscript (a, b and c) represent groups with significant differences between treatments and conditions based on a Kruskal-Wallis test</i>	117
<i>Tableau 8: Mean (± standard error) temperatures (n= 475) and light intensity (n= 8) during the experiments</i>	138
<i>Tableau 9: Mean (± sd) dry weight in µg.cm⁻² and photosynthetic yield in Ctrl biofilms.* represent significant differences within the seasonal condition</i>	144
<i>Tableau 10: Diuron concentration in the channels (µg.L⁻¹) and in the biofilm (µg.g⁻¹), and photosynthesis inhibition expressed in percentage of the control. All values are average ± standard deviation.....</i>	172
<i>Tableau 11: Constants from simple Langmuir isotherm models. C_{max}: maximal diuron concentration in the biofilm in µg.g⁻¹), K_L: Langmuir constant, and R²: determination coefficient</i>	174
<i>Tableau 12: Summary of the time-response curves results. Values are average ± standard deviation</i>	194

<i>Tableau 13: Bilan des valeurs d'exposition moyenne mesurées pour chaque expérimentation réalisée au cours de cette thèse</i>	<i>215</i>
<i>Tableau 14: Caractéristiques des modèles étudiés (données utilisées et constantes associées).....</i>	<i>224</i>
<i>Tableau 15: Moyenne en pourcentage des descripteurs analysés dans le culot par rapport au Total avec les erreurs standards associées pour chaque expérimentation à T_0, avec la période de colonisation correspondante</i>	<i>274</i>

Glossaire

Abréviations

5D	5 µg.L ⁻¹ de diuron	ANOVA	analysis of variance
50D	50 µg.L ⁻¹ de diuron	ASE	Accelerated Solvent Extraction
β-Glu	β-Glucosidase	D-EPS	Diffusible extracellular polymeric substances
ADN	acide désoxyribonucléique	DRC	Dose-Response Curve
AFNOR	Association française de normalisation	DW	dry weight
ANR	Agence Nationale de Recherche	ECHA	European Chemicals Agency
ATP	adénosine triphosphate	EPS	Extracellular Polymeric Substances
Chl a	chlorophylle a	Flow	Courant = 2 cm.s ⁻¹
COT	Carbone Organique Total	LDA	Linear Discriminant Analysis
Ctrl	Control (témoin)	LowFlow	Courant <<< 1 cm.s ⁻¹
DCE	Directive Cadre sur l'Eau	LQ	Limit of Quantification
DCA	3,4-dichloroaniline	nlme	non-linear mixed effects model
DCPMU	N-(3,4 dichlorophényl)-N-(méthyl)- urée	PAM	Pulse Amplitude Modulation
DCPU	N-(3,4 dichlorophényl)-urée	PICT	Pollution-Induced Community Tolerance
ECOVEA	Écologie des communautés végétales aquatiques et impact des pressions multiples	POCIS	Polar Organic Chemicals Integrative Sampler

ESI	électrospray ionisation	REACH	Registration, Evaluation, Autorisation and restriction of Chemicals
IBD	Indice Biologique Diatomées	SPE	Solid Phase Extraction
Irstea	Institut national de Recherche en Sciences et Technologie pour l'Agriculture et l'Environnement	T-EPS-M	Tightly bound extracellular polymeric substances plus microorganisms
Kow	coefficient de partage octanol-eau	ToF	Time of Flight
LabEx	Laboratoire d'Excellence	TRC	Time-Response Curve
MCPMU	3-(3-chlorophenyl)-1,1-diméthylurée	UPLC	Ultra-High Pressure Liquid Chromatography
NADP	nicotinamide adénine dinucléotide phosphate	WBL	Water Boundary Layer
NQE	Norme de Qualité Environnementale		
PSI	Photosystème I		
PSII	Photosystème II		
RPM	Rotations Par Minute		
T ₀	temps initial, avant l'exposition en canaux		
t _{1/2}	temps de demi vie		
TK-TD	Toxicocinétique-Toxicodynamique		

Liste des constantes

k_u	Constante cinétique d'accumulation	$L.g^{-1}.min^{-1}$
k_e	Constante cinétique d'élimination	min^{-1}
K_{BW}	Constante cinétique d'équilibre eau-biofilm	$g.L^{-1}$
k_0	Coefficient de transfert de masse	cm^{-1}
BCF	Facteur de bioconcentration	$g.L^{-1}$
$1/k_0$	Résistance aux transferts de masse	$cm.min^{-1}$
C_{max}	Concentration maximale de diuron accumulée dans le biofilm	$\mu g.g^{-1}$
K_L	Constante de Langmuir	$L.\mu g^{-1}$
K_P	Coefficient de partition de linéarité	$L.\mu g^{-1}$
E_{min}	Effet toxique minimum	%
E_{max}	Effet toxique maximum	%
EC_{50} / CE_{50}	Concentration efficace à 50%	$\mu g.L^{-1}$

Introduction générale

Introduction générale

À l'heure actuelle les pesticides sont massivement utilisés notamment pour optimiser le rendement des cultures agricoles. Ils sont très présents dans les milieux aquatiques qui constituent les réceptacles finaux de toutes contaminations, et ce via des processus tels que la lixiviation, le lessivage des sols ou encore le ruissellement (Ricart et al., 2009). Cette pollution étendue à bon nombre de cours d'eau dans l'Union Européenne a conduit à la mise en place de la directive cadre sur l'eau (DCE, 2000/60/EC). Ce cadre réglementaire impose le retour au bon état écologique et chimique des masses d'eau (eaux superficielles, souterraines et littorales), suivi via des réseaux de surveillance. Pour ce faire 45 substances ont été classées comme prioritaires pour l'évaluation de la qualité des eaux, dont 24 pesticides.

C'est dans ce contexte d'amélioration du plan de suivi des réseaux de surveillance, que se place le projet PhytoCOTE au sein du LabEx COTE (ANR-10-LABX-45) et par extension, ces travaux de thèse. En effet le projet PhytoCOTE vise en partie à étudier les relations entre l'usage des pesticides et leur présence dans l'environnement dans un premier temps. Puis dans un deuxième temps, l'objectif est de caractériser la part de ces pesticides accumulés dans le biote et ainsi en déterminer les risques encourus par ce type de contamination. Ce sujet de thèse s'inscrit plus particulièrement au niveau de l'évaluation de l'impact des transferts eau-biote.

Les biofilms sont généralement les premiers maillons de la chaîne trophique (Mora-Gómez et al., 2016) et sont sensibles à la contamination par les composés organiques, notamment aux herbicides (Paule et al., 2016). De par leur ubiquité dans les cours d'eau et leur capacité à réagir et à intégrer rapidement la contamination, les biofilms se présentent comme de bons bioindicateurs, et c'est pourquoi ils sont de plus en plus utilisés aujourd'hui pour évaluer la qualité de l'eau (Edwards & Kjellerup, 2013).

Les effets des herbicides sur les biofilms fluviaux sont plutôt bien renseignés dans la littérature (Kim Tiam et al., 2014; Pesce et al., 2011), et particulièrement au niveau de l'organisme. D'ailleurs, le postulat selon lequel lorsque qu'il y a un effet toxique visible, alors il y a eu internalisation du contaminant par la cellule a été admis (Campbell et al., 2002).

Cependant, à l'heure actuelle, la quantification des contaminants dans le milieu n'est pas un indicateur de risque car l'effet observé n'est pas nécessairement lié à la présence seule de polluants. Aujourd'hui un manque d'information persiste sur les processus allant de la présence de composés organiques dans le milieu et l'effet toxique observé. En effet très peu de données sont disponibles quant aux mécanismes d'accumulation de ces composés dans le biofilm (Headley et al., 1998; Lawrence et al., 2001). L'étude de ces mécanismes permettrait une meilleure connaissance du comportement des herbicides dans le biofilm, et donc de mieux appréhender leurs impacts.

Pour répondre à ces diverses problématiques, ce projet de thèse a été construit dans le but d'étudier les mécanismes de transfert et de distribution des pesticides dans les biofilms en lien avec les effets toxiques associés. Les objectifs de cette thèse ont été dans un premier temps de développer une méthodologie adaptée au dosage des pesticides dans les différents compartiments du biofilm. Puis le deuxième objectif a été de caractériser la cinétique d'accumulation du diuron pour ensuite étudier l'influence de différents facteurs environnementaux modulant ce processus d'équilibre eau-biofilm. Enfin le but a été de définir les mécanismes de bioaccumulation au regard de l'effet toxique ainsi engendré et avec une étude plus approfondie sur la réponse biologique du biofilm. Pour ce faire, un développement méthodologique permettant de caractériser la distribution des pesticides dans le biofilm, et cinq expérimentations ont été mis en place.

Ce manuscrit comprend cinq chapitres. Il débute par une analyse bibliographique du sujet, en se focalisant principalement sur les pesticides avec leurs modes d'action et leurs transferts vers les milieux aquatiques d'abord, puis sur le biofilm et son écologie et enfin sur leurs interactions. Il est suivi par un chapitre portant sur la méthodologie avec dans un premier temps la description de la mise en place de chaque expérimentation, puis la préparation des échantillons et des analyses réalisées, et enfin l'analyse des données obtenues. Les deux chapitres suivants sont consacrés à la présentation des résultats. Le chapitre 3 porte sur la mesure de l'influence de paramètres abiotiques sur la bioaccumulation du diuron dans les biofilms. Celui-ci se découpe en trois parties, la première présente une étude préliminaire destinée à caractériser la cinétique d'accumulation du diuron dans le biofilm à plus ou moins long terme. Les deux suivantes s'intéressent à l'influence de la vitesse du courant d'abord,

puis à l'effet de la température et de la photopériode sur la cinétique d'accumulation et les effets relatifs du diuron. C'est à la suite de quoi, le chapitre 4 est consacré à l'étude des mécanismes de sorption du diuron et au temps et à l'intensité de réponse des biofilms. Ce chapitre se découpe en deux parties avec une première abordant les isothermes de sorption du diuron pour mieux comprendre ses mécanismes d'action dans le biofilm, et une seconde sur les effets immédiats en réponse à une exposition. Puis le chapitre 5 concerne la discussion générale de la thèse. Ce chapitre a pour but de comparer l'ensemble des résultats complémentaires acquis au cours de cette thèse, pour en extraire une vue globale des différents apports scientifiques et souligner les améliorations à apporter. Enfin, cette thèse se termine par une conclusion générale et en annexe sont présentés les différents résultats supplémentaires relatifs au développement de la méthodologie (Chapitre 2), à l'étude préliminaire présentée dans le chapitre 3, et au terrain réalisé dans le cadre du projet PhytoCOTE.

Chapitre 1 :

Analyse bibliographique

1. Chapitre 1 : Analyse bibliographique

1.1. Pesticides

1.1.1. Définition

Les pesticides sont définis comme des substances utilisées afin d'éliminer les nuisibles de toute sorte. Ils peuvent être d'origine naturelle ou synthétique, organique ou minérale, dans chaque cas ils disposent d'une toxicité ciblée (Multigner, 2005). Le terme de pesticides englobe les produits phytosanitaires et les biocides. Les pesticides sont composés d'une ou plusieurs substances actives ainsi que d'un adjuvant qui améliore l'adhésion de la solution sur l'organisme ciblé. Au vu du nombre conséquent de formulations possibles, ici le terme de pesticide désignera la substance active. Les pesticides sont destinés à de nombreux usages notamment pour les pratiques agricoles, viticoles, vétérinaires ou encore à usage domestique. Il existe de nombreuses familles de pesticides qui peuvent être classées par cible biologique de la façon suivante (DeLorenzo et al., 2001) :

- Les herbicides sont utilisés pour lutter contre certains végétaux, comme par exemple le métolachlore contre les plantes adventices
- Les fongicides permettent d'éliminer les moisissures et les champignons, comme le cuivre utilisé pour lutter contre les maladies telles que le mildiou et l'oïdium
- Les insecticides sont appliqués contre les insectes en perturbant leur système nerveux, en restreignant leur reproduction ou en entraînant leur mort, avec par exemple le DDT utilisé contre la propagation du paludisme,
- Les acaricides comme le fipronil sont employés pour lutter contre les acariens et les puces,
- Les molluscicides sont utilisés contre les gastéropodes comme par exemple le métaldéhyde pour lutter contre les escargots,
- Les nématicides sont des pesticides dédiés à la lutte contre les nématodes, comme l'aldicarbe,
- Les rodenticides sont appliqués contre les rongeurs comme par exemple l'arsenic,

- Les corvicides tels que l'endosulfan permettent de lutter contre les oiseaux.

Les pesticides peuvent également être classés selon leurs groupements chimiques et leur mode d'action toxique comme représenté dans le *Tableau 1* suivant :

Tableau 1: Classement des différents pesticides selon leur groupement chimique, leur mode d'action et leur famille

Groupe chimique	Mode d'action toxique	Famille	Exemple
Organochlorés	Perturbation de l'activité des canaux sodiques	Insecticide	DDT
Organophosphorés	Inhibition de la cholinestérase	Insecticide	Parathion
Triazines	Inhibition de la photosynthèse	Herbicide	Atrazine
Carbamates	Inhibition de la cholinestérase, de l'oxydation du glucose, de la synthèse d'acides nucléiques et de la dégradation des acides gras	Fongicide, herbicide et insecticide	Carbaryl
Urées	Inhibition de la photosynthèse	Herbicide et biocide	Diuron
Chloroacétamides	Inhibition de la germination	Herbicide	Métolachlore
Sulfonylurées	Inhibition de la synthèse des acides aminés essentiels	Herbicide	Chlorsulfuron
Néonicotinoïdes	Blocage du système nerveux central	Insecticide	Imidaclopride
Strobilurine	Inhibition de la respiration	Fongicide	Azoxystrobine

Ces différents modes d'action sont liés aux propriétés physico-chimiques des substances actives qui diffèrent selon leur structure. De plus, selon les groupements chimiques qu'elles possèdent elles peuvent présenter des polarités et une solubilité dans l'eau très hétérogènes. Notamment, la polarité d'un composé est reliée à son coefficient de partage octanol-eau ($\log K_{ow}$) qui correspond au logarithme du ratio de la concentration de la substance dans l'octanol et dans l'eau. Ce coefficient renseigne quant à l'hydrophilie ($\log K_{ow} < 2$) ou l'hydrophobie ($\log K_{ow} > 2$) d'une substance. Ce paramètre joue un rôle majeur sur la capacité des composés à être transférés dans les différents compartiments de l'environnement puis à être accumulés dans le biote. Par exemple, un composé hydrophobe est plus facilement retenu par la matière organique dans les sols lors des processus de lessivage des sols après un épisode de pluie. Cependant, ce type de composé a plus de facilités de par sa nature lipophile à traverser les membranes lipidiques et ainsi être bioaccumulé.

Ces propriétés peuvent aussi moduler la persistance de ces molécules dans l'environnement ou leur dégradation. Par exemple certains pesticides comme le DDT, qui ne sont plus utilisés à l'heure actuelle peuvent être quantifiés des années après l'arrêt de leur utilisation (DDT interdit depuis 1971 en France). À l'inverse, certains peuvent être dégradés rapidement que ce soit par voie abiotique (hydrolyse, photodégradation) ou par voie biotique (biodégradation en condition aérobie ou anaérobie). Dans certains cas les produits de dégradation peuvent avoir un effet toxique accru par rapport à leurs composés parents (Sinclair & Boxall, 2003).

1.1.2. De l'utilisation des pesticides au milieu aquatique

1.1.2.1. Consommation des pesticides

L'un des enjeux majeurs du XX^{ème} siècle a été d'aboutir à une production satisfaisant les besoins alimentaires de tous. C'est d'ailleurs dans les années 40 qu'est apparu le premier pesticide synthétique générant une avancée remarquable dans la production agricole (Van Der Werf, 1996). À l'heure actuelle les pesticides sont massivement utilisés dans le monde entier principalement dans un souci de production et de rendement agricole. En effet, plusieurs milliers de tonnes sont vendus par an, par exemple en Europe, où en moyenne

377166 tonnes ont été vendues entre 2011 et 2014 (Eurostat, 2016) Selon les pays Européens, les fongicides-bactéricides et les herbicides sont les pesticides les plus vendus (Figure 1), ce qui correspond majoritairement à un usage agricole et viticole.

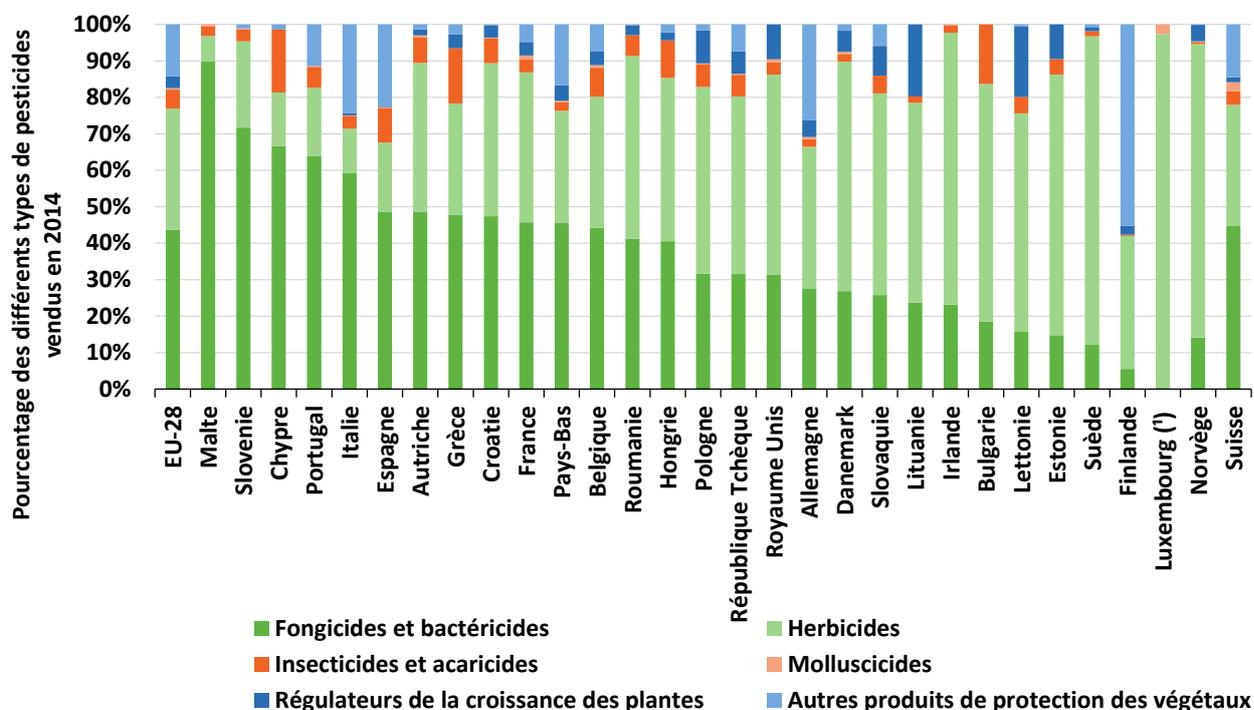


Figure 1: Pourcentage des différents types de pesticides vendus en 2014 pour chaque pays (1 : données uniquement pour l'année 2013). Source : Eurostat (online data code: aei_fm_salpest09)

1.1.2.2. Ubiquité dans l'environnement

De par leur forte utilisation, les pesticides sont fréquemment retrouvés dans le milieu aquatique qui est le réceptacle final de toute contamination. Ces produits sont surveillés depuis plusieurs années dans les cours d'eau et par exemple en France, où ce suivi est assuré par les agences de l'eau. Ainsi, 389 substances sur 700 analysées ont été retrouvées dans les cours d'eau français en 2014 : 26 % sont des herbicides, 16 % des insecticides, et enfin 12 % sont des fongicides (Figure 2).

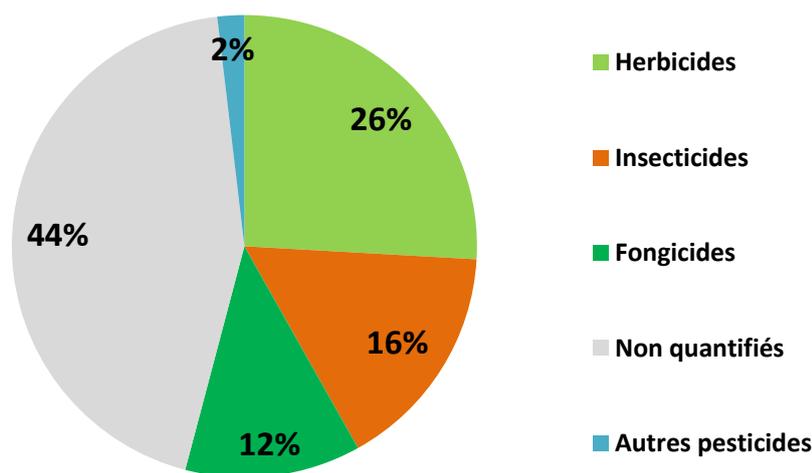


Figure 2: Pourcentage des différents types de pesticides retrouvés dans les cours d'eau en France en 2014 sur 700 composés analysés. Sources : agences de l'eau et offices de l'eau; BRGM, banque ADES; Inéris, BNVD, 2016. Traitements : SOeS, 2017

Ce suivi de la qualité des cours d'eau a pour raison le fait qu'une grande partie des pesticides sont transférés dans les trois compartiments (atmosphérique, terrestre et aquatique) via différentes voies. Dans un premier temps, lors de l'épandage des pesticides sur les cultures, une part de ces derniers n'atteignent pas leur cible et sont dérivés selon les conditions météorologiques. Notamment Ravier et al. (2005) ont montré une perte à la dérive au moment de la pulvérisation de 45 % d'atrazine. En effet, le premier compartiment contaminé dans ce cas est le compartiment atmosphérique par volatilisation des pesticides, après quoi ils peuvent être réintroduits sur les sols ou dans les masses d'eau par précipitation (Figure 3). Dans un deuxième temps, la contamination du compartiment terrestre par application des pesticides sur les cultures peut être transférée aux milieux aquatiques par des processus de lessivage des sols, de drainage et de ruissellement pour atteindre les différents écosystèmes d'eau douce tels que les rivières, les lacs ou encore les fleuves. Puis, le compartiment aquatique peut être touché de façon minoritaire, par la contamination aux pesticides par transfert direct de l'humain et l'animal en raison des usages domestiques ou en cas par exemple de baignade. D'autres voies de transfert liées aux usages domestiques existent comme par exemple les traitements vétérinaires (ex : anti-puces), les utilisations de bombes insecticides, et de désherbant pour le jardinage. Enfin, les

eaux de rivière ou les fleuves peuvent être polluées via des rejets liés aux activités industrielles.

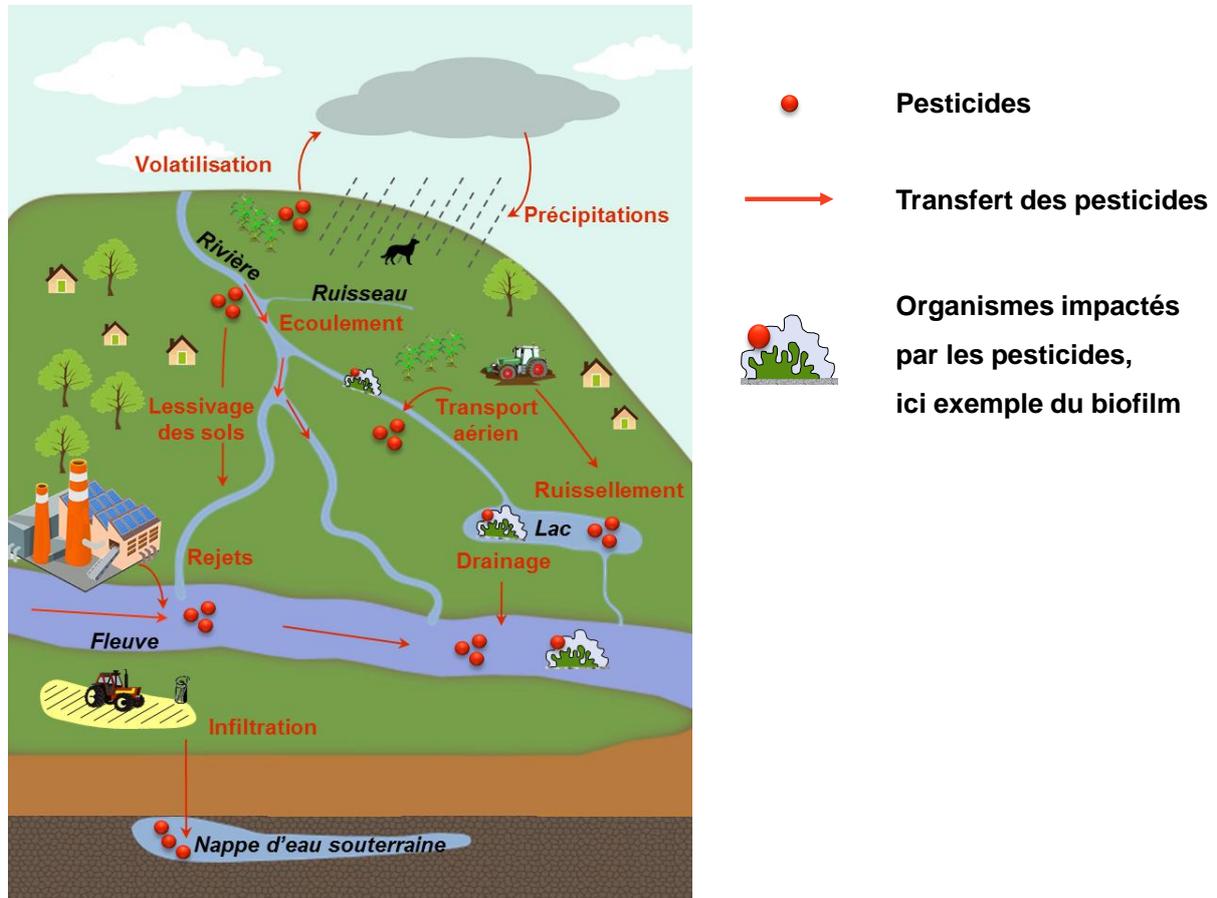


Figure 3: Représentation des différents modes de transport des pesticides dans l'environnement (schéma modifié à partir de Coquillé®, 2017)

1.1.2.3. Risques pour l'environnement et l'Homme

Ces pesticides ainsi introduits dans le milieu aquatique peuvent par la suite avoir des effets indésirables sur des organismes non-cibles. Ces organismes réagissent différemment à cette pression anthropique, certains y sont sensibles et sont amenés à disparaître, d'autres au contraire sont en mesure de s'adapter à ce changement dans le milieu (Tlili & Montuelle, 2011). Ces mécanismes d'adaptation mis en place au niveau de la communauté peuvent alors altérer la composition des écosystèmes, voire modifier leur fonctionnement. Parmi ces

organismes non-cibles, les biofilms se trouvant généralement à la base de la chaîne trophique dans les eaux douces (Mora-Gómez et al., 2016), sont le plus souvent les premiers impactés. D'un point de vue écologique, les biofilms peuvent voir leur structure endommagée. Les pesticides sont susceptibles d'être accumulés par ces premiers maillons, puis d'être bioconcentrés le long de la chaîne trophique et à nouveau induire des effets toxiques. À terme, ces contaminants peuvent atteindre des organismes supérieurs tels que les poissons ou les crustacés par exemple, dont certains peuvent être destinés à la consommation humaine.

Aussi, les phénomènes de lessivage des sols et de transport aérien peuvent induire une pollution des sols voisins (agricoles ou particuliers) pouvant aller jusqu'à une contamination des cultures et potagers par les sols. Ainsi l'Homme est exposé à une nouvelle voie de contamination directe.

Outre la contamination de l'Homme par les milieux aquatiques et terrestres, ils peuvent subir une exposition plus directe, notamment pour certains corps de métier comme par exemple, les agriculteurs qui sont généralement les plus atteints par les pesticides. En effet, bien que les précautions se soient renforcées au fil des années, le risque d'exposition demeure lors de la préparation des solutions et de l'épandage. Bien qu'un lien direct n'ait pas pu être établi, les pesticides peuvent être source de maladies neurodégénératives comme les maladies de Parkinson et d'Alzheimer (Thany et al., 2013).

1.1.2.4. Réglementation

Du fait de leur concentration, de leur fréquence de quantification dans les milieux aquatiques et de leur impact toxique potentiel, les pesticides sont attentivement suivis et réglementés au niveau de la production, des ventes et des usages.

D'une part, le règlement REACH (règlement n°1907/2006 : Registration, Evaluation, Autorisation and restriction of Chemicals) établi en 2007 vise à protéger l'environnement et la santé humaine dans l'ensemble de l'Union Européenne. Cette réglementation s'applique à toutes les substances chimiques, afin d'évaluer et gérer les risques potentiels et/ou avérés, avant mise sur le marché. Le règlement REACH est chargé de collecter les renseignements sur

les propriétés des substances chimiques et leur dangerosité. Toutes ces activités sont coordonnées par l'ECHA (European Chemicals Agency), qui s'emploie à enregistrer les substances pour la conformité législative des entreprises. Elle est en mesure de restreindre ou d'interdire l'utilisation de substances jugées dangereuses.

D'autre part, la Directive Cadre sur l'Eau (directive 2000/60, DCE) pose un cadre réglementaire au niveau Européen quant à la gestion et au suivi de la qualité des masses d'eau. Elle vise à la restauration des eaux douces, souterraines et côtières afin d'atteindre le bon état écologique et chimique des cours d'eau. Pour atteindre ces objectifs, la DCE a mis en place dans un premier temps le recensement de la contamination des bassins versants et de leurs effluents en Europe. Puis un plan de gestion et un programme de mesure ont été établis, enfin un programme de surveillance a été aménagé afin d'arriver à une gestion durable des masses d'eau.

Pour l'atteinte du bon état chimique, les Etats membres ont fixé des valeurs seuils pour un groupe de 45 substances classées comme prioritaires. Ces molécules sont considérées comme particulièrement dangereuses, toxiques et persistantes. Parmi elles, 24 pesticides figurent dans cette liste (Directive 2013/39/UE, UE, 2013). Le bon état chimique est dit atteint lorsque les molécules de cette liste sont retrouvées dans des concentrations inférieures aux normes de qualité environnementale (NQE).

1.1.3. Le diuron

1.1.3.1. Présentation du composé

Au cours de cette thèse, le diuron a été utilisé comme molécule modèle. Le diuron (3-(3,4-dichlorophényl)-1,1-diméthyl-urée) est un herbicide et un biocide inhibiteur de la photosynthèse qui agit dans les organismes en bloquant le transfert des électrons dans le photosystème II. Il fait partie de la famille des urées substituées et ne présente pas de source naturelle. Le diuron a un $\log K_{ow}$ de 2.6 (Giacomazzi & Cochet, 2004) ce qui lui confère des propriétés plutôt hydrophiles. Il est considéré comme un herbicide persistant dans l'environnement car son temps de demi-vie dans l'atmosphère est de 35 heures (dégradation par photo-oxydation), dans l'eau il est dégradé à hauteur de 45 % après 25 jours par

photolyse, et aucune dégradation après 28 jours par hydrolyse et enfin dans les sédiments de 67 à 99 % en dix semaines par dégradation aérobie (Tissier et al., 2005).

Suite à une dégradation par voie aérobie, le diuron présente trois produits de dégradation : le DCPMU, le DCPU et le DCA (Figure 4). En effet, la molécule mère de diuron se transforme en DCPMU (N-(3,4 dichlorophényl)-N-(méthyl)-urée) par perte d'un groupement méthyle, et en DCPU (N-(3,4 dichlorophényl)-urée) par la perte d'un second groupement méthyle, puis le DCA (3,4-dichloroaniline) émerge du DCPU par ablation d'un groupement amide (Neuwoehner et al., 2010). Enfin, le diuron se transforme en MCPDMU (3-(3-chlorophényl)-1,1-diméthylurée) à partir de la molécule mère via une dégradation anaérobie par perte d'un atome de chlore.

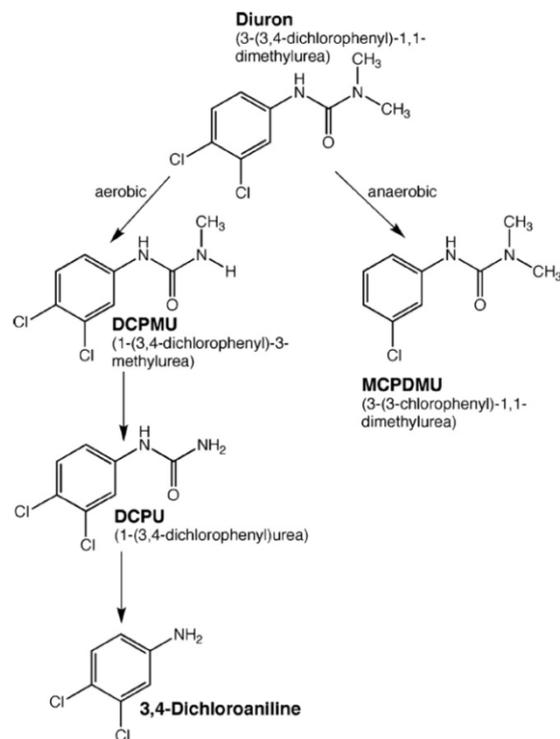


Figure 4: Voies de dégradation aérobie et anaérobie du diuron. Source : Neuwoehner et al. (2010)

1.1.3.2. Usages et présence dans l'environnement

Le diuron a été utilisé comme herbicide sur les cultures d'ananas, de bananier, canne à sucre et lentille comme molécule seule (Brignon & Gouzy, 2007). Il a été utilisé en mélange en tant qu'herbicide comme débroussaillant notamment pour les cultures de pommiers, et sur les vignes. Le diuron est également employé comme désherbant dans les pépinières, les espaces verts, les voies ferrées, les golfs et les terrains de sport. On retrouve aussi le diuron comme biocide dans les peintures antifouling dédiées à l'entretien des coques des bateaux et comme anti-mousse sur les toitures et les façades (Okamura, 2002; Yebra et al., 2004).

Bien que le diuron fasse parti des substances classées prioritaires par la DCE, il est toujours autorisé suite à la décision 2008/91/CE dans l'Union Européenne, mais interdit en France pour les usages agricoles depuis 2008 (Directive biocide 98/8/CE et arrêté du 21/08/2008). La valeur seuil du diuron a été fixée à $0,2 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ par la DCE.

Malgré son interdiction partielle et/ou son usage contrôlé selon les pays européens, le diuron est fréquemment retrouvé dans les cours d'eau (Ricart et al., 2010). En effet, une étude menée en 2008 par Loos et al. (2009) a montré qu'au travers toute l'Europe, le diuron était détecté dans 70 % des rivières. Plus récemment, les travaux de Bernard et al. (2019) ont révélé que sur 306 échantillons, le diuron a été quantifié dans plus d'un tiers des prélèvements sur le bassin Adour-Garonne (France) pour l'année 2016 (6 campagnes de terrain * 51 stations). Or cette molécule n'a pas de source naturelle, elle est introduite dans l'environnement suite à sa production et son utilisation.

De par son caractère persistant et sa fréquence de quantification dans l'environnement, le diuron présente un risque pour les organismes aquatiques non-cibles, et tout particulièrement les organismes autotrophes (Nebeker & Schuytéma, 1999). De plus, bien que son temps de demi vie soit étendu, comme il l'a été présenté précédemment, le diuron peut se dégrader via différents processus formant des métabolites parfois aussi toxiques que la molécule mère (Neuwoehner et al., 2010).

1.1.3.3. Toxicité du diuron

Du fait sa capacité à inhiber la photosynthèse, le diuron, une fois introduit dans les cours d'eau peut atteindre bon nombre des organismes aquatiques non-cibles, et notamment les microalgues qui se placent à la base de la chaîne trophique. La toxicité du diuron pour les organismes aquatiques est plutôt bien renseignée dans la littérature. Notamment en ce qui concerne le premier maillon de la chaîne trophique : les microalgues. Une étude de Neuwoehner et al. (2010) a montré une toxicité plus marquée du diuron par rapport à ses produits de dégradation sur les algues (*Pseudokirchneriella subcapitata*) au niveau de l'activité photosynthétique. De même Ma & Xu (2002) ont mis en avant l'effet du diuron sur la croissance des algues *Chlorella vulgaris* avec une CE_{50} de $4,3 \mu\text{g.L}^{-1}$. Au niveau du biofilm, Pesce et al. (2010) ont également révélé une toxicité accrue du diuron par rapport à ses métabolites ($CE_{50 \text{ diuron}} = 22,2$; $CE_{50 \text{ DCPMU}} = 91,6$ et $CE_{50 \text{ DCA}} = 8092,2 \mu\text{g.L}^{-1}$). En revanche, sur des organismes tels que les *Daphnia magna*, Neuwoehner et al. (2010) ont établi que les produits de dégradation du diuron comme le DCA et le DCPU présentaient une toxicité plus importante au niveau de l'immobilisation des individus que le diuron.

1.2. Les biofilms

1.2.1. Définition

Le biofilm peut coloniser sur plusieurs types de substrats organiques ou inorganiques comme des roches, des sédiments, ou différents couverts végétaux (macrophytes, litière). Il est composé d'agrégats multicellulaires (Branda et al., 2005) contenant des microorganismes tels que des microalgues (notamment des algues brunes et vertes), des bactéries (et des cyanobactéries), des champignons et des protozoaires (Figure 5). Tous ces microorganismes sont enchâssés dans une matrice polymérique extracellulaire (Extracellular Polymeric Substances, EPS) (Flemming & Wingender, 2010). Ces EPS sont principalement constituées de polysaccharides, de protéines, d'acides nucléiques, de glucides, d'ADN et de substances humiques (Lawrence & Neu, 2003; Romaní et al., 2008; Sutherland, 2001), entrecoupées d'un réseau de canaux et de pores (Davit et al., 2013) et sont produites par les bactéries (Jayatilake et al., 2017) et les cellules microbiennes (Sutherland, 2001). Les EPS confèrent la

stabilité mécanique du biofilm et permettent à celui-ci de s'organiser selon une architecture en 3D (Decho, 2000; Gerbersdorf et al., 2008).

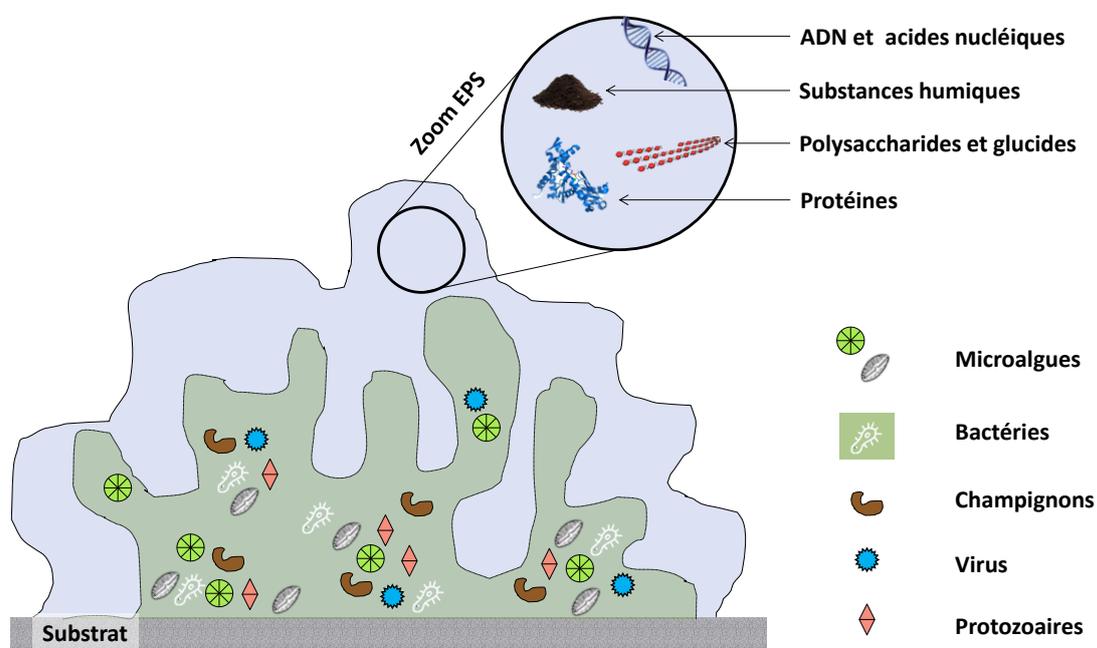


Figure 5: Représentation graphique de la composition du biofilm

La matrice EPS peut être découpée en deux fractions différentes : les EPS colloïdales et capsulaires (Aguilera et al., 2008). Parmi elles, les EPS colloïdales sont dites plutôt diffuses car elles sont de plus petit poids moléculaire et sont souvent plus solubles dans l'eau, alors que les EPS capsulaires sont quant à elles étroitement liées au frustule des diatomées (De Crignis, 2010; Métivier et al., 2013) qui sont fréquemment le groupe algal (algues brunes) dominant dans les biofilms (Morin et al., 2016; Sabater et al., 2007). Chacune de ces deux fractions renferme des molécules de haut et bas poids moléculaire. La proportion EPS et les microorganismes peut varier entre 70-98 % (EPS) / 30-2 % (microorganismes) (Lawrence et al., 1991; Wang et al., 2002). Au niveau de la constitution même des EPS, les polysaccharides et les glucides sont très majoritairement retrouvés (97 %), puis en quantités moindres les acides humiques (2 %), les protéines, et l'ADN chacun retrouvés à hauteur de 0,5-1 % (Aguilera et al., 2008). Des deux fractions qui constituent les EPS, les EPS colloïdales sont

majoritaires en représentant environ les trois quarts du biofilm (en poids sec), comparés aux EPS capsulaires qui elles ne représentent que 25 % (Aguilera et al., 2008).

1.2.2. La photosynthèse

Les biofilms sont constitués en partie de microorganismes photosynthétiques qui sont responsables de la production primaire grâce à leur capacité à transformer l'énergie lumineuse en énergie chimique, il s'agit du processus de photosynthèse.

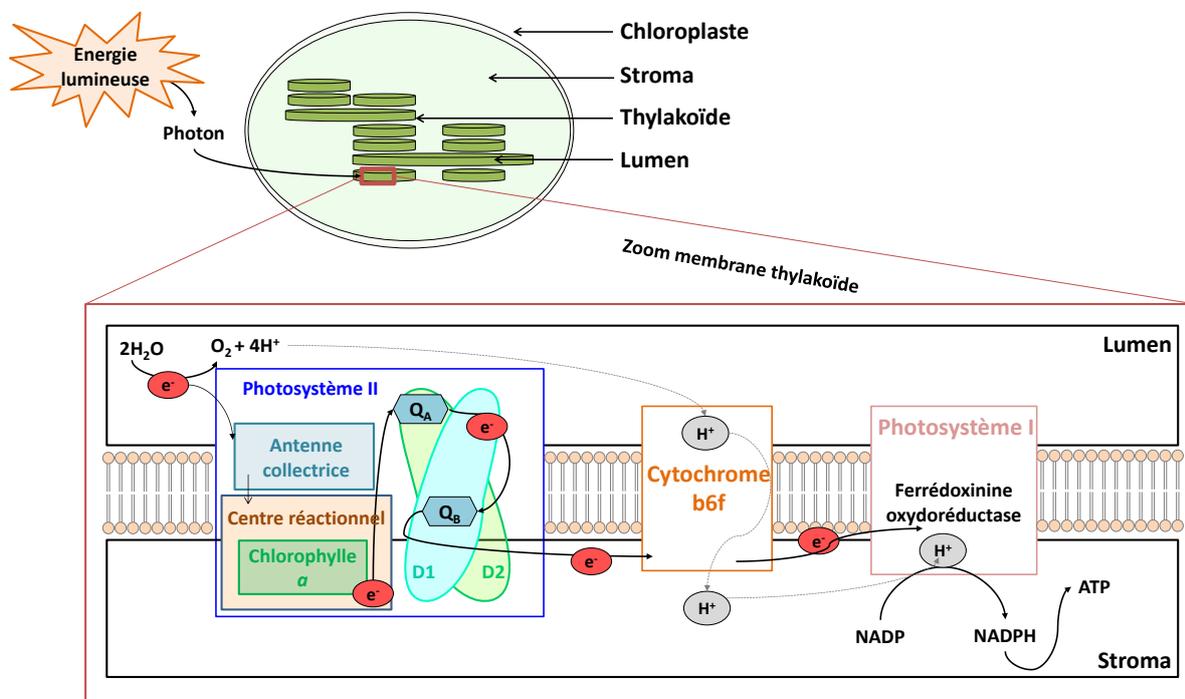


Figure 6: Représentation du processus de photosynthèse

Cette réaction a lieu dans la membrane des thylakoïdes qui se trouve dans les chloroplastes. La photosynthèse est un processus qui se réalise en deux phases : une phase claire qui consiste à transformer l'énergie reçue sous forme de photon (énergie lumineuse) en énergie chimique sous forme d'ATP, et une phase sombre qui correspond au cycle de Calvin soit la conversion d'ATP en dioxyde de carbone, en eau et en glucose.

La phase claire consiste pour la chlorophylle *a* à capter un photon dans l'antenne collectrice du photosystème II (PSII) qui passe à l'état excité. La chlorophylle *a* transmet ensuite un électron à la chaîne de transporteurs d'électrons, à commencer par la quinone Q_A située sur la protéine D2. La chlorophylle *a* retourne à son état fondamental après avoir récupéré un électron issu de la photolyse de l'eau (*Figure 6*). Puis la quinone Q_A transfère l'électron à la quinone Q_B qui est placée sur la protéine D1. Cet électron est transporté de proche en proche jusqu'au photosystème I (PSI) où débute alors la phase sombre et permet à l'enzyme ferrédoxinine oxydoréductase de réduire la NADP en NADPH induisant alors la production d'ATP nécessaire à la formation de glucose. Cette étape nécessite également un apport de protons issus de la photolyse de l'eau dans le lumen qui sont transportés vers le stroma grâce au cytochrome b6f créant ainsi un gradient de protons pour induire un potentiel d'oxydoréduction.

1.2.3. Etapes de colonisation du biofilm

Le biofilm est un constituant des écosystèmes aquatiques qui présente une grande stabilité mécanique conférée par son processus de colonisation. En effet, celle-ci a lieu en plusieurs étapes à savoir une phase d'adhésion, puis d'accumulation et enfin de détachement avec une dimension temporelle plus ou moins étendue (*Figure 7*) (Artigas et al., 2012). En premier lieu donc prend place la phase d'adhésion où des espèces pionnières comme des cellules bactériennes viennent se déposer à la surface du substrat de façon aléatoire (Jenkinson & Lappin-Scott, 2001). À la suite de quoi survient la phase d'accumulation qui consiste en une augmentation de la population de cellule par croissance et au recrutement de microorganismes issus de la colonne d'eau (Jackson et al., 2018). Au cours de cette période survient la synthèse par les microorganismes et l'inclusion de substances polymériques (EPS) via le milieu (Battin et al., 2003). La formation de cette matrice EPS apporte l'équilibre du biofilm par le maintien des cellules en agrégats (De Beer et al., 1994). Enfin, des agrégats cellulaires se détachent de la matrice de façon naturelle (Boulétreau et al., 2006) pour à leur tour aller former de nouveaux biofilms.

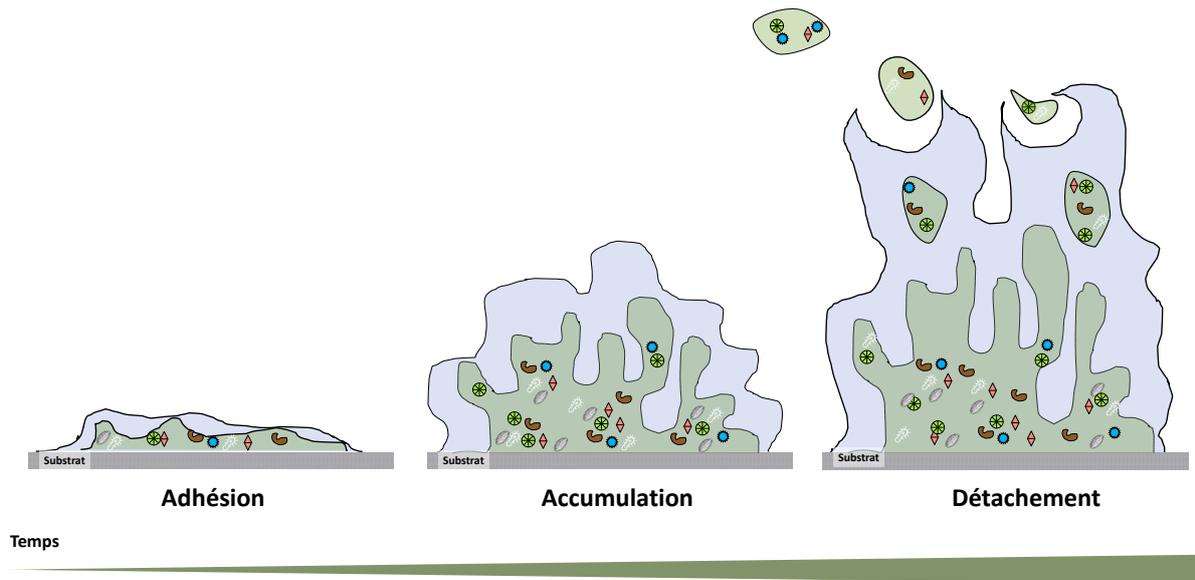


Figure 7: Représentation du processus de colonisation du biofilm

1.2.4. Ecologie du biofilm et son rôle dans les écosystèmes aquatiques

Le biofilm est omniprésent dans le milieu aquatique (Ikuma et al., 2015) et représente un environnement dynamique de par les microorganismes qui le composent (Sutherland, 2001). Il joue un rôle essentiel dans l'équilibre des écosystèmes aquatiques. En effet, il participe à la production primaire, au cycle de carbone (Davey & O'toole, 2000) et à la rétention des nutriments organiques (Pusch et al., 1998). De par sa position dans la chaîne trophique, le biofilm représente une source de nutriments pour les organismes supérieurs tels que les brouteurs.

Grâce à sa capacité à dégrader et transformer les polluants, le biofilm tient une place majeure dans la détoxification des milieux aquatiques (Sanchez-Pérez et al., 2013). En effet les bactéries présentes dans la matrice sont en mesure de biodégrader certains contaminants comme par exemple de diuron (Giacomazzi & Cochet, 2004).

L'habitat écologique du biofilm joue un rôle prépondérant dans sa composition. En effet, selon les conditions hydrologiques et/ou physicochimiques du milieu telles que la vitesse du courant, le pH, la teneur en matière organique, la biodisponibilité des nutriments, la

température et les prédateurs, le biofilm peut voir sa composition varier drastiquement (Mora-Gómez et al., 2016).

Au vu de son rôle écologique dans les écosystèmes aquatiques, le biofilm se pose comme un excellent indicateur de la qualité des eaux et comme un outil à envisager pour la remédiation des eaux (sorption des métaux lourds, biotransformation pour les composés organiques) (Camotti Bastos et al., 2018). De plus, par son caractère ubiquiste et sa capacité à intégrer et réagir rapidement aux diverses contaminations, le biofilm se présente comme un marqueur de la qualité écologique des milieux (Edwards & Kjellerup, 2013). Ce sont toutes ces qualités qui ont amené à l'utilisation des diatomées (composantes fondamentales du biofilm) comme indice biologique (IBD : Indice Biologique Diatomées, Coste et al., 2009) pour l'évaluation de la qualité des masses d'eau dans le cadre de la DCE (Kelly et al., 2012).

1.2.5. Composition « chimique » du biofilm

Du fait de sa composition hétérogène, le biofilm présente de nombreux sites de sorption avec pour chacun des propriétés physicochimiques très diversifiées. D'un point de vue physique, le biofilm comporte des canaux et des pores renfermant de l'eau ce qui lui confère une certaine élasticité (Boulêtreau et al., 2011). Peterson et al. (2015) présentent le biofilm comme un ensemble de couches avec des caractéristiques propres à leur place dans la structure du biofilm. Par exemple les couches les plus profondes se comportent comme un solide élastique alors que les couches supérieures présentent des propriétés similaires à un liquide viscoélastique. Une toute dernière couche existe à l'interface entre les EPS du biofilm et la colonne d'eau qui constitue la couche limite eau-biofilm. Elle présente des propriétés similaires aux deux interfaces qu'elle sépare et elle permet la régulation des substances introduites dans la matrice EPS.

D'un point de vue chimique le biofilm possède un ensemble varié de propriétés de par les diverses caractéristiques de ses composants. À commencer par les EPS qui présentent des régions chimiques distinctes (*Figure 8*). En effet, dans un premier temps les EPS sont riches en molécules de haut poids moléculaire telles que les polysaccharides et les protéines (Romaní et al., 2008). Les polysaccharides contiennent des groupements avec de forts potentiels de

liaisons hydrogène grâce aux groupements hydroxyles (OH) contenus dans les oses (Flemming, 1995). Les protéines quant à elles renferment des groupements plus diversifiés avec par exemple des zones cationiques dans les sucres aminés (NH^+) et des zones anioniques notamment avec des groupements COO^- (Wolfaardt et al., 1998).

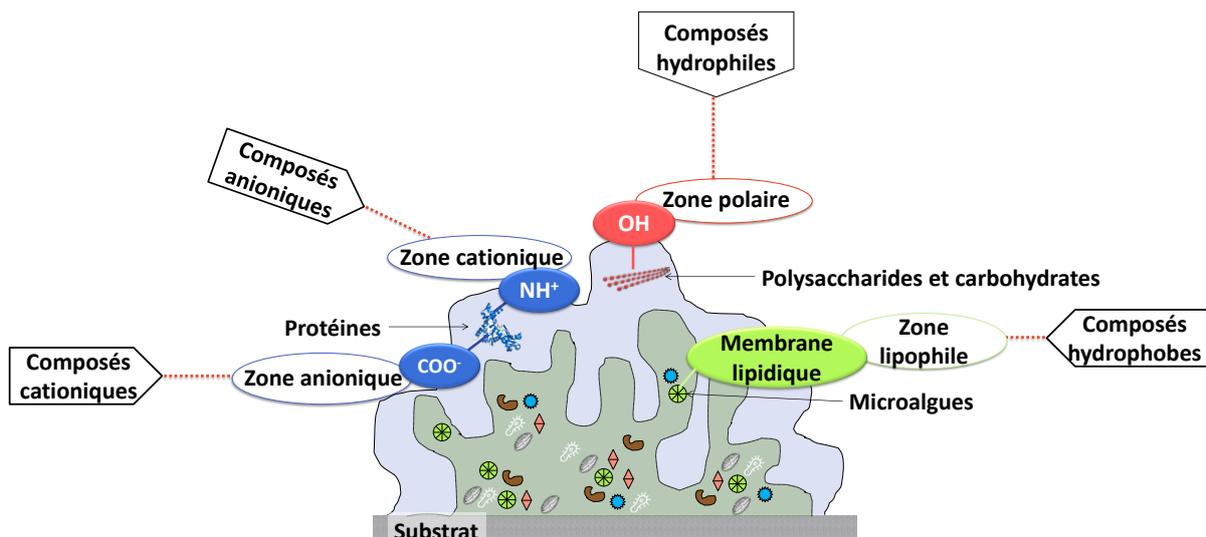


Figure 8: Représentation de la composition chimique du biofilm et des différentes interactions possibles

De façon plus précise maintenant, les EPS diffuses présentent une capacité d'échange protonique plus importante que les EPS fortement liées aux microorganismes (Comte et al., 2006a). Avec une capacité d'échange protonique plus élevée, les EPS faiblement liées sont en mesure de créer plus aisément des liaisons avec des groupements cationiques, elles présentent donc un plus grand nombre de sites de sorption. En effet, les EPS diffuses contiennent en termes de proportion plus de protéines que les EPS fortement liées ce qui leur confère une plus grande capacité à créer des liaisons et des échanges protoniques (Figure 8, Sheng et al., 2010).

Enfin, au niveau de la cellule, la membrane lipidique offre une région lipophile (vers l'extérieur de la cellule) où par exemple les composés lipophiles peuvent se fixer avec une grande facilité.

1.3. Interactions entre les pesticides et le biofilm

1.3.1. Biodisponibilité des pesticides pour le biofilm

Pour qu'un composé ait un impact toxique sur un organisme, celui-ci doit en général être absorbé (Fujita et al., 2010; Stadnicka et al., 2012), or tous les contaminants ne présentent pas une telle capacité selon leur nature et/ou leur environnement. Pour qu'un contaminant soit accumulé, celui-ci doit être biodisponible, cela signifie généralement qu'il doit se trouver dans la fraction dissoute dans les milieux aquatiques (MacKay & Fraser, 2000). Notamment, les contaminants sorbés à la matière organique particulaire sont plus difficilement assimilables par les microorganismes du biofilm.

La biodisponibilité des composés dépend de leur forme et de leurs propriétés (dissoute, ion libre, associés à la matière organique, coefficient de partage carbone organique/eau, coefficient de dissociation ; DeLorenzo et al., 2001) mais également de la composition du biofilm. En effet, il a précédemment été mis en avant le fait que le biofilm, et plus particulièrement les EPS possédaient des régions portant à la fois des charges positives et négatives, chacune jouant un rôle dans la sorption des contaminants (Wolfaardt et al., 1998). Les EPS peuvent contenir des composants tels que les amino-sucres et les protéines, qui grâce à leur groupement cationique peuvent créer des interactions avec des herbicides anioniques comme par exemple le dichlorprop (*Figure 8*).

Par ailleurs, les substances hydrophobes comme les pesticides organochlorés (ex : chlorpyrifos, $\log K_{ow} = 4,96$) présentent une grande affinité avec un autre composant des biofilms : les membranes lipidiques. Selon Flemming (1995), en moyenne les lipides représentent 10 % des cellules microbiennes (en poids sec), qui elles-mêmes peuvent constituer jusqu'à 20 % du biofilm. Par conséquent, les substances hydrophobes sont en mesure de se lier avec 2 % du biofilm (en poids sec), soit 0,2 % du biofilm, si celui-ci est composé à 90 % d'eau.

1.3.2. Distribution et transport des contaminants dans le biofilm

Jusque lors, peu d'études se sont intéressées au transport des molécules organiques au travers du biofilm. Cependant, certaines mettent en avant des capacités de sorption du biofilm variables selon la structure du contaminant. En effet, Lahjiouj et al. (2011) ont rapporté l'importance des propriétés hydrophobes des molécules dans leur capacité de sorption, et les travaux de Wolfaardt et al. (1998) confirment ce fait en soulignant que le dicloflop méthyle ($\log K_{ow} = 4,8$) est un herbicide qui s'accumule préférentiellement dans les zones hydrophobes des EPS. De surcroit, une toute autre sorte de composés organiques, les hydrocarbures aromatiques (benzène, toluène et m-xylène) sont retrouvés à hauteur de 60 % dans les EPS en dépit de leur nature lipophile de par leur caractéristique aromatique (Späth et al., 1998). Les travaux de Métivier et al. (2013) ont également souligné l'influence des propriétés physicochimiques des composés dans leur accumulation dans le biofilms. L'étude portant sur les interactions entre les EPS et deux composés pharmaceutiques (acétaminophène et érythromycine éthylsuccinate) a révélé d'une part que ces composés présentaient une grande affinité avec les protéines des EPS, et d'autre part que les EPS accumulaient préférentiellement des composés hydrophobes ($3,7 < \log K_{ow} < 4$).

Une étude portée par Munoz et al. (2018) a montré que le biofilm pouvait accumuler des composés perfluorés entre 4 et 33 ng.g^{-1} suite à une exposition de un mois dans la Seine. Bien que ces substances présentent un fort caractère lipophile de par leur composition riche en fluor, les auteurs ont émis l'hypothèse selon laquelle la présence de sucres, de protéines et d'ADN dans les EPS faciliterait l'accumulation dans cette fraction.

Plus largement, les transferts des contaminants de la colonne d'eau vers le biofilm peuvent également être conditionnés par les propriétés physicochimiques des contaminants. Par exemple, l'étude de Coogan et al. (2007) a porté sur le comportement du triclosan, du triclocarban, et du méthyl-triclosan, toutes trois des molécules lipophiles utilisées comme antimicrobien. Elle a révélé grâce au calcul du facteur de bioconcentration (BCF, ratio entre la concentration en contaminant dans l'organisme et dans l'eau) que plus le composé est lipophile, plus celui-ci rencontre une limitation au niveau de son transfert de la colonne d'eau vers l'organisme. En effet, de par sa nature lipophile, soit hydrophobe, le composé

présente une grande probabilité de se sorber dans un premier temps à la matière organique ou au sédiment.

De même, Huerta et al. (2015) ont démontré que le BCF n'était pas linéaire entre la concentration en contaminant dans le milieu et la concentration dans le biofilm, selon les composés. Ce phénomène a également été observé par Zhang et al. (2018) qui ont pu mettre en avant la non linéarité des mécanismes de sorption de l'ofloxacin (un antibiotique) dans les EPS. Cette étude a également rapporté des taux supérieurs de composés organiques accumulés dans les EPS par rapport aux microorganismes. Plus largement encore, au niveau du transfert dans les écosystèmes aquatiques, le chlordécone en raison de sa nature hydrophobe ($\log K_{ow} \approx 5$) est adsorbé à la matière organique particulaire, et peut ainsi être introduit et devenir une source de contamination des eaux de surface (Coat et al., 2011).

À l'heure actuelle, il existe plusieurs techniques d'extraction des EPS du biofilm entier pour sa caractérisation (Comte et al., 2006b) et l'analyse de la distribution des contaminants métalliques (Aguilera et al., 2008), mais celles-ci sont peu adaptées dans le cas d'un biofilm exposé à des composés organiques. Il s'agit principalement de méthodes d'extraction utilisant une résine échangeuse de cations, or bien qu'elle représente l'une des techniques d'extraction les plus efficaces (Sheng et al., 2010), celle-ci peut créer un phénomène de compétition avec les composés organiques accumulés dans le biofilm. Par conséquent, la quantification des pesticides par cette méthode peut être biaisée du fait de la perte des contaminants dans la résine.

1.3.3. Toxicocinétique et toxicodynamique des pesticides dans les biofilms

Le processus d'accumulation des contaminants dans le biofilm est un phénomène dynamique, et dépendant de la nature du composé (1.3.2). Cependant, l'atteinte d'un équilibre du contaminant entre la colonne d'eau et le biofilm est un mécanisme invariant, à la suite d'une phase d'accumulation et d'élimination, et ce quelles que soient les propriétés physicochimiques des contaminants considérés. Ces contaminants peuvent ensuite être internalisés par les cellules, et à la suite de quoi un effet toxique peut se manifester. La littérature relate ces différentes étapes séparément, avec d'une part les études portant sur les

mécanismes d'accumulation et leur vitesse (approches toxicocinétiques), et d'autre part celles détaillant les différents effets néfastes qui en découlent (approches toxicodynamiques). Il s'agit, pour l'approche toxicocinétique d'abord de considérer la vitesse d'accumulation des composés dans le biofilm et leur devenir, soit l'élimination, le stockage ou la métabolisation (Figure 9). Puis pour l'approche toxicodynamique, il est question d'analyser la vitesse nécessaire à un contaminant pour atteindre sa cible biologique et provoquer un effet indésirable sur l'organisme (Figure 9). Les travaux de Fujita et al. (2010) ont décrit l'importance de l'hydrophobicité d'une molécule sur son effet toxique par le biais une étude QSAR (Quantitative Structure Activity Relationship). Par exemple, ils ont noté que des composés polaires avec des groupements donneurs présentaient généralement une plus grande toxicité. Pour avoir une vue d'ensemble sur les mécanismes mis en place aux cours de ces deux phases et dans le but de déterminer l'accumulation du toxique qui peut engendrer un effet néfaste au cours du temps, des modèles toxicocinétiques-toxicodynamiques (TK-TD) ont ainsi été mis en place (Jager et al., 2011). Ces modèles ont été établis sur la base d'un échange entre deux compartiments : le milieu et l'organisme. Ce genre d'approche est particulièrement développé dans le milieu pharmaceutique pour décrire le temps nécessaire à un médicament pour atteindre sa cible, et son efficacité au cours du temps. Dans le domaine de l'écotoxicologie, et plus précisément pour l'étude de l'impact des contaminants organiques tels que les herbicides sur le biofilm, ces approches sont généralement abordées séparément.

L'une des recherches pionnières en termes d'exploration de la vitesse d'accumulation des contaminant dans les biofilms a été menée par Headley et al. (1998). Ces travaux se sont intéressés à la cinétique de sorption de six pesticides (p,p-DDT, dicloflop-méthyl, triallate, lindane, atrazine, parathion-méthyl) dans les biofilms. Il a alors été démontré que l'accumulation de ces contaminants suivait une cinétique d'ordre 1 et que ces pesticides pouvaient être relargués dans le milieu plus aisément avec une solubilité dans l'eau croissante. Plus récemment, une étude s'est intéressée à l'adsorption du p-chlorophénol sur le biofilm (Wang et al., 2002). Ces recherches ont mis en avant l'atteinte rapide de l'équilibre, entre une et trois heures selon le système d'adsorption considéré (particules en suspension recouvertes de biofilm, bactéries et EPS). Les effets toxiques des pesticides sur le biofilm sont bien renseignés, notamment l'impact du diuron, la molécule modèle utilisée dans cette thèse

(Kim Tiam et al., 2015; Pesce et al., 2010; Pesce et al., 2016; Proia et al., 2013; Tlili et al., 2008; Vercaene-Eairmal et al., 2010).

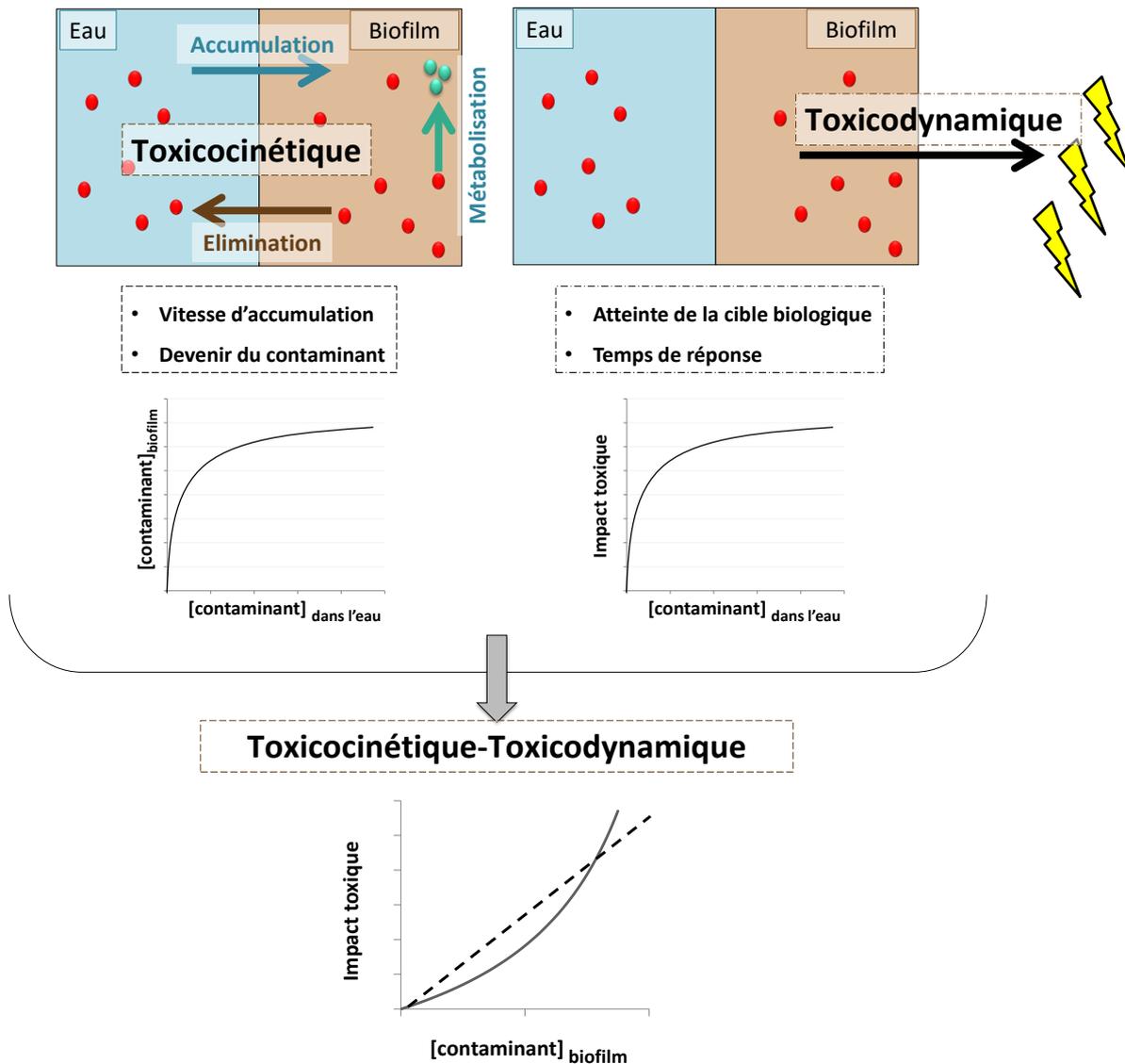


Figure 9: Principe de la toxicocinétique et de la toxicodynamique

Par exemple Ricart et al. (2009) ont démontré l'impact négatif du diuron sur l'activité photosynthétique des organismes autotrophes, et la diminution de la biomasse bactérienne. Tous ces effets ont conduit à une perturbation des relations entre les composants du biofilm. Par ailleurs, Tadonléké et al. (2009) ont mis en évidence l'effet négatif d'une contamination de 1 à 50 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ de diuron sur les communautés bactériennes. En effet, cet herbicide perturbe

le fonctionnement de ces écosystèmes de façon générale, et plus particulièrement diminué l'abondance et la viabilité de ces organismes.

1.3.4. Mode d'action du diuron dans les biofilms

De par son caractère hydrophile, le diuron peut traverser la matrice EPS sans encombre pour ensuite être absorbé par les cellules photosynthétiques via un transport actif jusqu'à atteindre la membrane des thylakoïdes dans les chloroplastes. Une fois introduit dans le photosystème II, celui-ci se lie à la quinone Q_B sur la protéine D1 (Allen et al., 1983). Par la suite ce phénomène bloque la chaîne de transfert d'électrons entre la quinone Q_A et le complexe cytochrome $b6f$ (Figure 10). Cette perturbation engendre un bouleversement du potentiel d'oxydoréduction au niveau de la chaîne de transfert d'électrons, ce qui interrompt la photosynthèse, et à terme endommage les protéines via la formation d' 1O_2 au lieu de 3O_2 (Rutherford & Krieger-Liszka, 2001).

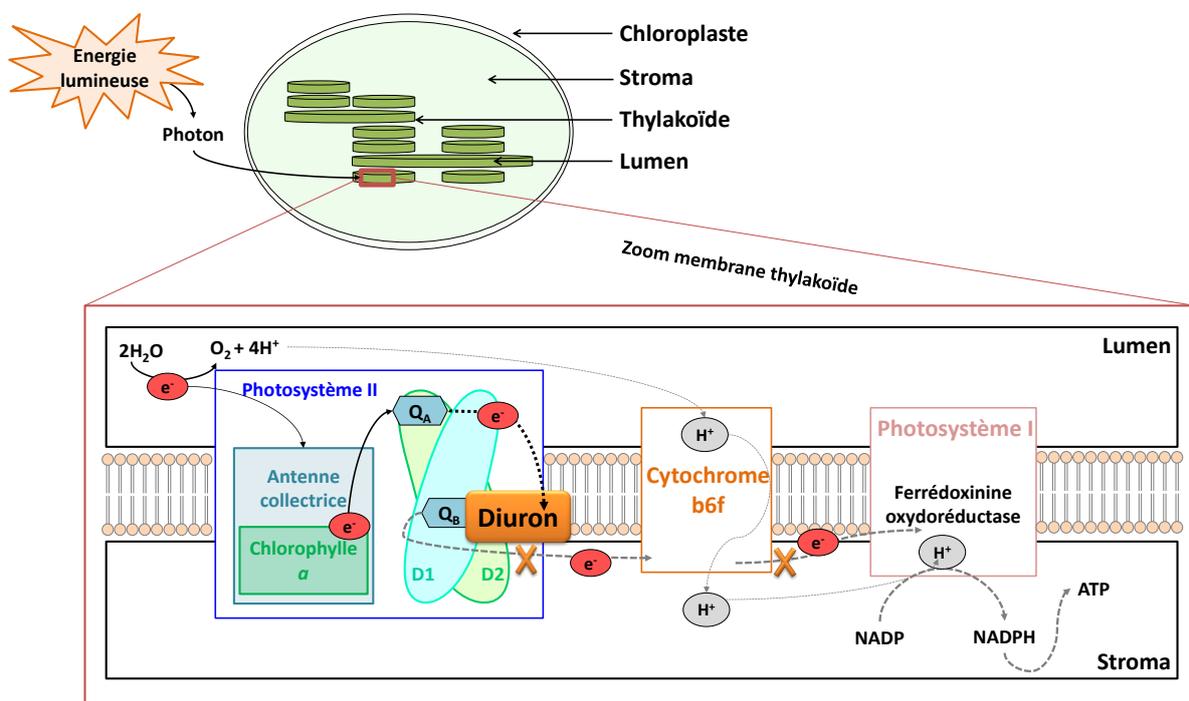


Figure 10: Représentation du mode d'action du diuron sur les organismes autotrophes

1.3.5. Facteurs influençant l'impact des herbicides

Dans le milieu naturel, les effets toxiques des herbicides peuvent être modulés par les facteurs environnementaux. En effet, les facteurs tels que la température, la luminosité, ou encore la vitesse du courant, peuvent eux aussi être sources de perturbations des écosystèmes aquatiques. Plus précisément, il a été rapporté dans l'étude de Larras et al. (2013), que la température à laquelle les biofilms étaient exposés avait un effet sur la fluidité des membranes lipidiques. Ces dernières peuvent se fluidifier à des températures de 28°C ou à l'inverse se rigidifier en cas de températures plus basses (18°C). Les cellules s'adaptent en modifiant la composition chimique de leur membrane (modification de la famille de lipide), cependant ce bouleversement physiologique peut les rendre plus sensibles à la contamination par les pesticides. De même, l'hydrodynamisme du milieu peut influencer sur la structure du biofilm ainsi que sur l'épaisseur de la couche limite qui module le transfert et l'accumulation de tous composés extérieurs à la matrice du biofilm (Zhang & Davison, 1995). Or dans les écosystèmes aquatiques, tous ces facteurs ont cours de façon simultanée et peuvent avoir des effets synergiques, antagonistes ou additifs. Des études ont présenté les effets combinés de ces paramètres, notamment en mettant en avant la sensibilité exacerbée du biofilm face à une contamination aux pesticides sous la contrainte de faibles températures (Gomes & Juneau, 2017). Une autre étude encore a mis en avant l'interdépendance de facteurs environnementaux tels que les variations de température et des apports anthropiques (contamination du biofilm par le diuron). En effet, Tasmin et al. (2014) ont rapporté que de faibles températures étaient propices à une diminution de l'activité photosynthétique.

Une étude préliminaire de Daryono et al. (2018) portant sur l'influence de la contamination aux pesticides (isoproturon) sur l'épaisseur et l'élasticité du biofilm a révélé que celui-ci semblait voir sa capacité d'extension et de compression diminuer de moitié. Une étude réalisée par Boulêtreau et al. (2011) a présenté l'impact de la vitesse du courant sur l'épaisseur du biofilm, et par conséquent sur la couche limite eau/biofilm, ce qui pourrait avoir des conséquences sur l'accumulation de tous types de composés (contaminants, nutriments, matière organique) dans le biofilm. D'ailleurs, Villeneuve et al. (2011) ont révélé l'existence d'interactions entre la vitesse du courant et l'effet toxique des pesticides tels que

le diuron (herbicide) et l'azoxystrobine (fongicide). Ces deux facteurs ont atteint le biofilm au niveau de sa dynamique de croissance et de sa production primaire, le rendant d'autant plus sensible à chacune des variations infligées (contamination, augmentation du débit).

Toutes ces études ont particulièrement bien défini les effets des herbicides sur le biofilm au cours du temps, mais peu se sont intéressées à ce jour à faire le lien entre la contamination du milieu et l'impact toxique en tenant compte de la toxicocinétique des contaminants.

Chapitre 2 :

Matériels et méthodes

2. Chapitre 2 : Matériels et méthodes

2.1. Plan d'expérimentation

2.1.1. Colonisation du biofilm

Pour toutes les expérimentations menées au cours de cette thèse, des lames de verre (L : 26 cm, l : 6 cm) ont été utilisées comme substrat artificiel pour la colonisation du biofilm. Elles ont été encagées (*Figure 11*) et déposées dans la zone euphotique (profondeur : 70-110 cm) de l'étang de Gazinet-Cestas, présentant un environnement hypereutrophe. En moyenne, l'intensité lumineuse au niveau des cagette a été de $96,1 \pm 25,1 \mu\text{mol photon.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$. La durée de colonisation des lames dans l'étang a été fixée à un mois, de façon à obtenir du biofilm mature (Ivorra et al., 2000).



Figure 11: Photographie de l'étang de Gazinet-Cestas à gauche, et de lames recouvertes de biofilm mature à droite

2.1.2. Conditions d'exposition et suivi des conditions physicochimiques

Au cours de cette thèse, cinq expérimentations ont été menées en rivières artificielles et en conditions contrôlées (*Tableau 2*) afin de caractériser les mécanismes de transfert et de distribution du diuron dans le biofilm dans des conditions environnementales contrastées. Les lames contenant du biofilm mature ont ensuite été placées aléatoirement dans des canaux en verre de 25 L (L : 50 cm ; l : 9,2 cm ; H : 5 cm *Figure 12*) dans une chambre thermo-régulée. Les canaux ont été approvisionnés en milieu Dauta (Dauta, 1982, annexe 8.1). Ils représentant une même condition d'exposition et sont alimentés depuis une nourrice

commune (8 L) par une pompe immergée pour toutes les expérimentations, plus une pompe péristaltique pour l'expérimentation décrite dans la partie 3.3. L'intensité lumineuse a été mesurée à l'aide d'un luxmètre (LI-COR Li-250, USA) à hauteur des lames et a atteint les $8,19 \mu\text{mol}\cdot\text{s}^{-1}\cdot\text{m}^{-2}$ (moyenne réalisée à partir de trois mesures). La température de l'air et de l'eau a été mesurée tout au long des expérimentations toutes les 10 minutes à l'aide d'enregistreurs de données (Tinytag, Radiospire, Royaume-Uni).

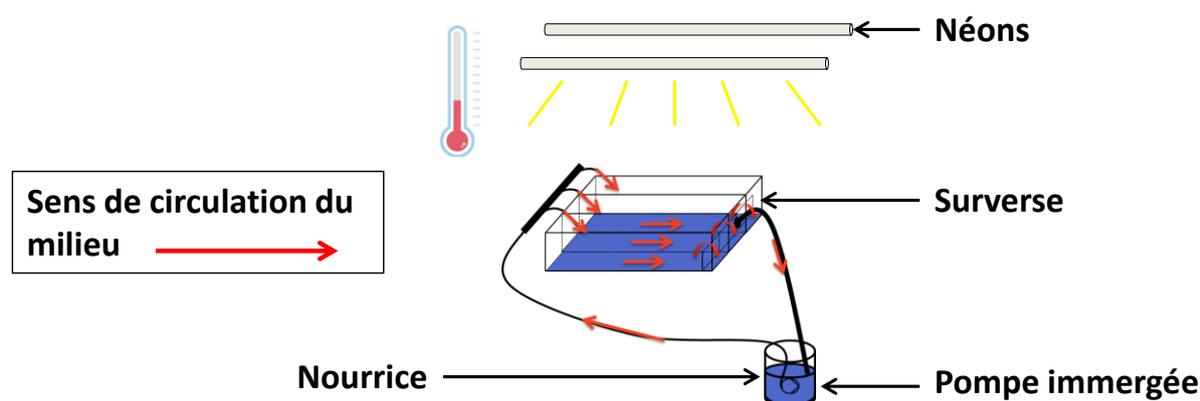


Figure 12: Schéma d'un canal en verre de 25 L avec sa nourriture

Les nutriments dissous (nitrates et phosphates) ont été analysés par le laboratoire de chimie (Mélissa Eon) par chromatographie ionique (COMPACT 881 IC Pro, Metrohm, Suisse) couplée à un détecteur de conductivité (Metrohm 850 IC, Suisse). Un prélèvement de 10 mL a été effectué lors de l'exposition au temps initial, et trois prélèvements supplémentaires chaque semaine pour l'étude préliminaire effectuée sur 21 jours en continu. Puis la mesure a été réalisée avec une colonne échangeuse d'anions Metrosep A sup 5 - 250/40 et un éluant préparé à partir d'une solution de Na_2CO_3 (3,2 mM) et de NaHCO_3 (1 mM). Les limites de quantification de l'appareil ont été définies à $0,01 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ pour le NO_3 et le PO_4 .

Le diuron a également été quantifié dans l'eau des canaux afin de suivre l'évolution de la concentration d'exposition. Un prélèvement de 3 mL a été effectué à chaque temps de prélèvement pour toutes les expérimentations puis filtré à l'aide d'un filtre seringue (pore : $0,45 \mu\text{m}$, membrane de cellulose régénérée hydrophile, Whatman). Les échantillons ont ensuite été analysés comme décrit dans la partie 2.3.3.

2.1.3. Conditions de contamination du biofilm

Au cours de chacune des expérimentations présentées dans cette thèse, le biofilm a été exposé à plusieurs concentrations en diuron dans l'eau. Une solution mère de diuron (Dr Ehrenstorfer GmbH, Allemagne) a été préparée dans de l'acétonitrile (Biosolve) à une concentration finale de 200 mg.L⁻¹. Le pourcentage maximum d'acétonitrile dans le milieu a été fixé à 0,25 % du volume final, soit une concentration 10 fois plus faible que la LOEC déterminée par Neury-Ormanni (données non publiées) pour l'activité photosynthétique du biofilm de l'étang de Gazinet-Cestas. Pour chacune des conditions d'exposition, la solution mère à 200 mg.L⁻¹ a donc été diluée dans de l'eau ultra-pure, puis dans le milieu Dauta (dans les canaux) afin de ne jamais dépasser ce pourcentage.

Dans ce manuscrit, les objectifs des diverses expérimentations réalisées sont présentés, ainsi que leurs conditions d'exposition spécifiques. Tous les facteurs ayant été contrôlés sont représentés dans le *Tableau 2*.

Tableau 2: Bilan des expérimentations effectuées et des différents paramètres contrôlés

	Paramètres étudiés	Traitement (diuron)	Température	Luminosité	Courant	Temps d'exposition	Analyses réalisées (décrites dans les parties suivantes)	Période de colonisation
Mesure de l'influence des paramètres abiotiques (Chapitre 3)	Durée d'exposition	Témoin 5 µg.L ⁻¹ 50 µg.L ⁻¹	20°C	Continue	2 cm.s ⁻¹	T ₀ *; 15, minutes; 6 heures; 10, 14, 21 jours	2.2.2.1 à 2.3	Septembre à novembre 2016
	Courant	Témoin 5 µg.L ⁻¹ 50 µg.L ⁻¹	20°C	Continue	<<<1 cm.s ⁻¹ et 2 cm.s ⁻¹	T ₀ *; 1, 2, 5, 15, 30, 120 minutes	2.2.2.1 à 2.3	Mars à avril 2017
	Température Photopériode	Témoin 5 µg.L ⁻¹ 50 µg.L ⁻¹	10°C et 26°C	Photopériode: 16/8 et 10/14	2 cm.s ⁻¹	T ₀ *; 1 et 3 jours	2.2.2.1 à 2.3	Janvier à février 2017
Etude des isothermes d'adsorption du diuron (Chapitre 4)	Concentration d'exposition	Témoin, 1, 5, 10, 25, 50, 75, 500 µg.L ⁻¹	20°C	Continue	2 cm.s ⁻¹	2 heures	2.2.2.1, 2.2.2.2, 2.2.3.2 et 2.3	Juillet 2017
	Temps de réponse	Témoin 5 µg.L ⁻¹ 50 µg.L ⁻¹	20°C	Continue	2 cm.s ⁻¹ Agitation radiale	1 et 3 heures	2.2.3.2 et 2.3	Juillet et novembre 2016

* T₀: temps initial, avant l'exposition en canaux

2.2. Caractérisation du biofilm

2.2.1. Extraction des EPS

Une fois le temps d'exposition écoulé, les lames de verre ont été retirées des canaux puis grattées avec une lame de rasoir pour déposer le biofilm dans un bécher contenant du milieu Dauta. De façon générale, une demi-lame est grattée pour 40 mL de milieu Dauta afin d'obtenir au minimum 1 g de poids sec de biofilm pour 50 mL pour un souci de limite de quantification analytique.

Le biofilm remis en suspension dans le bécher a été agité pendant 30 minutes à 150 RPM sur un agitateur magnétique à température ambiante. La suspension a ensuite été divisée en deux aliquotes, un de 25 mL consacré aux analyses sur la fraction totale du biofilm et découpé de la façon suivant : 10 mL dédiés aux mesures de l'activité photosynthétique (décrites dans la partie 2.2.3.2), 5 mL pour le dosage du carbone organique total (décrit dans la partie 2.2.2.2), 10 mL pour la mesure du poids sec, pour le dosage des protéines, des polysaccharides, des activités enzymatiques décrites dans les parties 2.2.2.1, 2.2.2.3, 2.2.2.4 et 2.2.3.1, et pour la quantification du diuron décrite en section 2.3.3). Le deuxième aliquote de 15 mL est réservé à la séparation des différentes fractions (Figure 13) et aux mesures biochimiques sur chaque fraction obtenue (Figure 14).

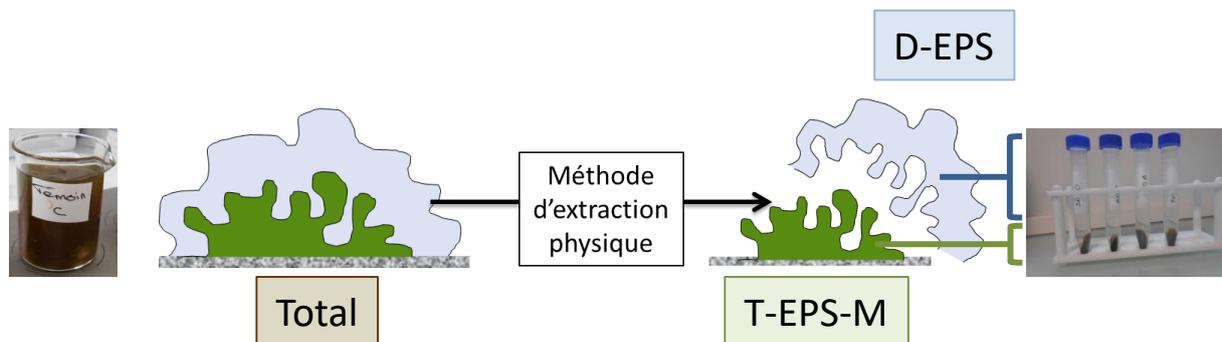


Figure 13: Schéma de la méthode d'extraction appuyé par des photographies (avant à gauche / après à droite)

Pour ce faire, une technique d'extraction physique des EPS a été développée afin de séparer les EPS faiblement liées aux microorganismes (D-EPS : diffusible EPS) d'une part, et d'autre part les EPS fortement liées et les microorganismes (T-EPS-M: tightly bound EPS plus microorganisms), en s'affranchissant des interactions résines/pesticides et/ou

solvants/pesticides (Figure 13). L'aliquote de suspension a été passé aux ultrasons (47 kHz, 335 W) pendant deux fois 10 secondes avec un temps de repos d'une minute entre, puis centrifugé durant 20 minutes à 5000 RPM (la mise au point méthodologique de ce protocole est décrite en Annexe 8.3). Enfin les D-EPS ont été collectées dans le surnageant, et le culot renfermant la fraction T-EPS-M a également été prélevé pour réaliser les analyses telles que décrites dans la Figure 14. Toutes les analyses décrites dans les parties 2.2.2.2 à 2.2.2.4, 2.2.3.1 et 2.3.3 peuvent être réalisées sur les fractions Total (biofilm brut), D-EPS et T-EPS-M du biofilm.

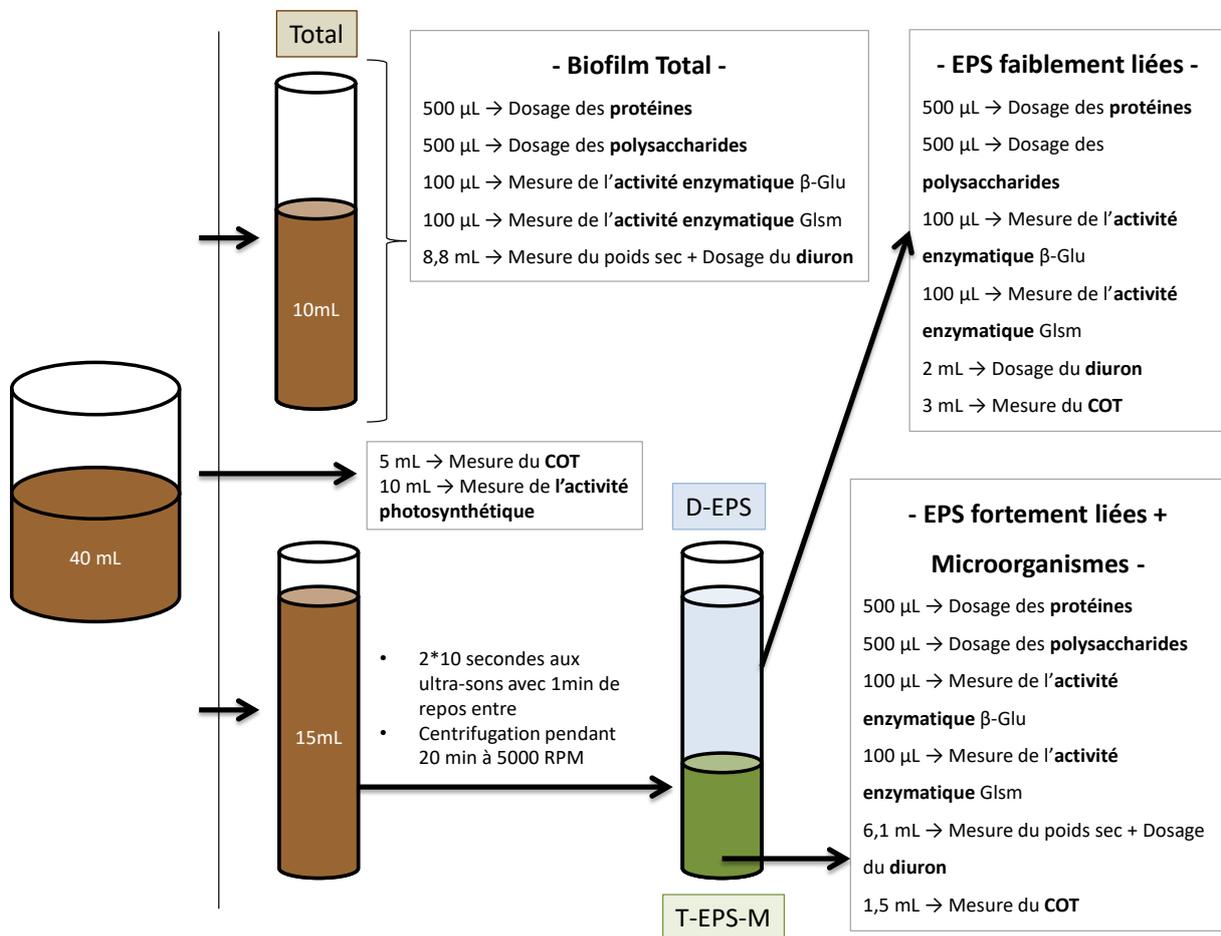


Figure 14: Représentation schématique de la distribution des différents aliquotes selon les fractions du biofilm

2.2.2. Caractérisation structurelle

2.2.2.1. Mesure du poids sec

Les échantillons de biofilm Total et le culot ont été filtrés sur Buchner avec des filtres GF/F (\varnothing 90 mm, diamètre de pores: 0,7 μm , Whatman) pesés au préalable puis lyophilisés (ALPHA 1-2 Dplus CHRIST, Allemagne) et de nouveau pesés afin d'obtenir le poids sec par soustraction des deux masses. Le poids sec du biofilm ainsi obtenu a été exprimé en $\text{mg}\cdot\text{cm}^{-2}$ grâce à la conversion du volume du biofilm en suspension (en mL) en équivalent de surface du substrat gratté (ici la lame de verre) en cm^2 .

2.2.2.2. Mesure du carbone organique total

Le carbone organique présent dans le biofilm renseigne quant à sa biomasse, il peut aussi constituer un facteur de modulation de l'accumulation des herbicides. En effet, certains composés peuvent s'y sorber et alors devenir non biodisponibles pour les cellules (puits), ou au contraire, devenir une source de contamination une fois ce carbone organique intégré à la matrice EPS.

Le carbone organique total (COT) a été mesuré par Brigitte Delest (laboratoire de chimie) sur les fractions Total, D-EPS et T-EPS-M, à l'aide d'un COT-mètre chimique (COT-VW, Shimadzu, Japon). Les échantillons ont été acidifiés avec une solution d'acide phosphorique (20 % d'acide phosphorique, 80 % d'eau ultra-pure), le carbone organique ainsi relargué a été oxydé pour former du CO_2 . Le CO_2 sous forme gazeuse a été quantifié à l'aide d'un détecteur infrarouge (Shimadzu, Japon). Les limites de quantification ont été déterminées à 0,5 $\text{mgCO}_2\cdot\text{L}^{-1}$ (30 $\mu\text{gC}\cdot\text{g}^{-1}$ de poids sec), et les concentrations en COT ont été calculées à partir d'une droite d'étalonnage effectuée avec six points de gamme de 0 à 25 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ de CO_2 (1,5 $\text{mgC}\cdot\text{g}^{-1}$ poids sec).

2.2.2.3. Dosage des protéines

Les protéines font partie intégrante de la structure du biofilm. Leur production découle d'une chaîne de réactions métaboliques initiées par la photosynthèse des organismes autotrophes. Le dosage des protéines a permis de décrire les impacts du diuron sur le métabolisme.

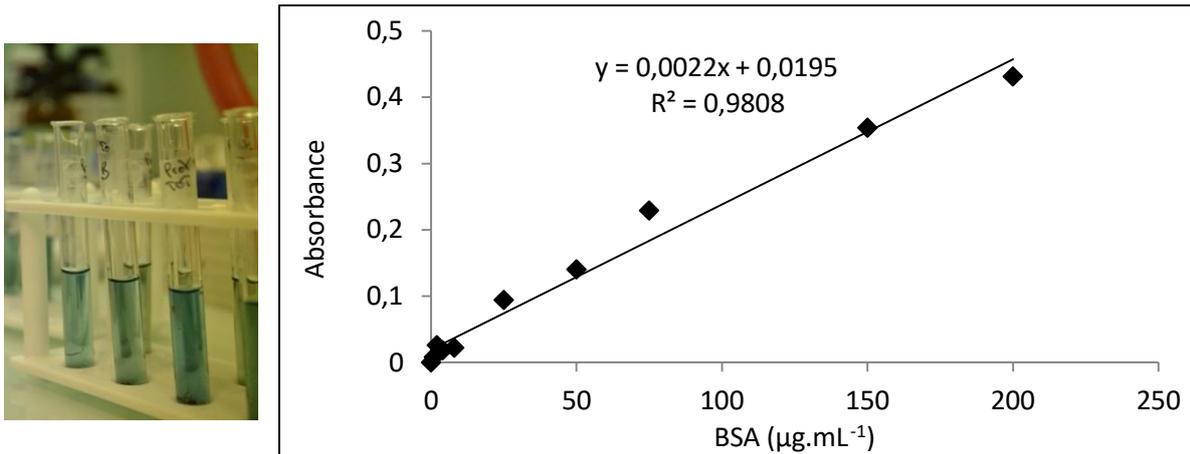


Figure 15: Photographie d'échantillons préparés pour le dosage des protéines à gauche, et exemple de droite d'étalonnage pour le dosage des protéines à une longueur d'onde de 595 nm à droite (exemple issu de l'expérimentation présentée en partie 3.3)

L'analyse des protéines a été réalisée par dosage colorimétrique à partir de la méthode de Bradford (1976) avec quelques modifications pour adapter la méthodologie aux faibles concentrations. Un aliquote de 500 µL de chaque fraction a été collecté suite à l'extraction des EPS, et 4,5 mL de méthanol ont été ajoutés dans le but de dégrader les protéines sous leur forme la plus simple (acides aminés élémentaires). Les échantillons ont été passés aux ultrasons pendant 20 minutes avant d'être évaporés à sec avec un évaporateur automatisé (SpeedVac, Thermo Fisher Scientific, France) et repris dans 500 µL d'eau ultra-pure. Cette étape a permis de remplacer le solvant dans lequel se trouve l'échantillon pour éviter toute interaction avec le réactif. Une fois les échantillons agités, 2,5 mL de réactif de Bradford (3,3 mg de bleu de Coomassie, Sigma; 33,3 mL de méthanol, Biosolve; 66,67 mL d'acide phosphorique, Chem-Lab; 900 mL d'eau ultra-pure) ont été ajoutés. La complexation entre le bleu de Coomassie et les acides aminés se manifeste par une coloration bleutée (Figure 15)

apparaissant au bout de 5 minutes. Puis 300 μL d'échantillons ont été placés en microplaque et l'absorbance a été mesurée avec un lecteur de microplaques à une longueur d'onde de 595 nm (SynergyTM HT, Biotek, USA). Plus l'échantillon a une couleur bleutée prononcée, plus il contient de protéines. Une droite d'étalonnage a été réalisée pour chaque expérimentation (exemple : *Figure 15*) avec de l'albumine de sérum bovin (BSA, Sigma) comme composé de référence, en comprenant 10 points de 0 à 200 $\mu\text{g.L}^{-1}$. L'absorbance obtenue a été convertie en mg d'équivalent BSA par cm^2 via l'équation de la droite de type : $y = ax+b$, avec y correspondant à l'absorbance, x à la concentration en BSA en $\mu\text{g.mL}^{-1}$, puis en normalisant ces données par la surface grattée. La droite d'étalonnage est acceptée pour un coefficient de régression compris entre 0,9 et 1.

2.2.2.4. Dosage des polysaccharides

Tout comme les protéines, les polysaccharides constituent en partie le biofilm, et leur production dépend également de l'activité métabolique des cellules. En effet, les polysaccharides sont un des paramètres structurels majeurs du biofilm, et leur dosage permet de caractériser l'architecture du biofilm.

Les concentrations en polysaccharides ont été mesurées selon la méthode de Dubois et al. (1956), qui consiste à quantifier les sucres présents dans l'échantillon par dosage colorimétrique. Pour ce faire, 12,5 μL de phénol à 56 g.L^{-1} (Scharlab) et 2,5 mL d'acide sulfurique (VWR, pureté 95 %) ont été ajoutés à chaque aliquote de 500 μL . Cette étape sert à déshydrater les sucres par réaction avec l'acide sulfurique, puis à condenser les produits formés avec le phénol afin de former un complexe coloré allant du jaune pour les échantillons pauvres en polysaccharides au marron foncé pour les plus concentrés (*Figure 16*).

Les échantillons ont ensuite été incubés pendant 10 minutes à température ambiante, puis pendant 20 minutes dans un bain-marie à 30°C. Une fois les échantillons refroidis, 300 μL ont été déposés en microplaque puis leur absorbance a été mesurée à une longueur d'onde de 485 nm à l'aide d'un lecteur de microplaques (SynergyTM HT, Biotek, USA).

Les concentrations en polysaccharides dans le biofilm en suspension ont été calculées grâce à une droite d'étalonnage (exemple : *Figure 16*) effectuée pour chaque expérimentation avec une

solution de D(+)-glucose anhydre (Scharlab) de 10 points allant de 0 à 750 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$, et les résultats ont été exprimés en μg d'équivalent glucose par cm^2 .

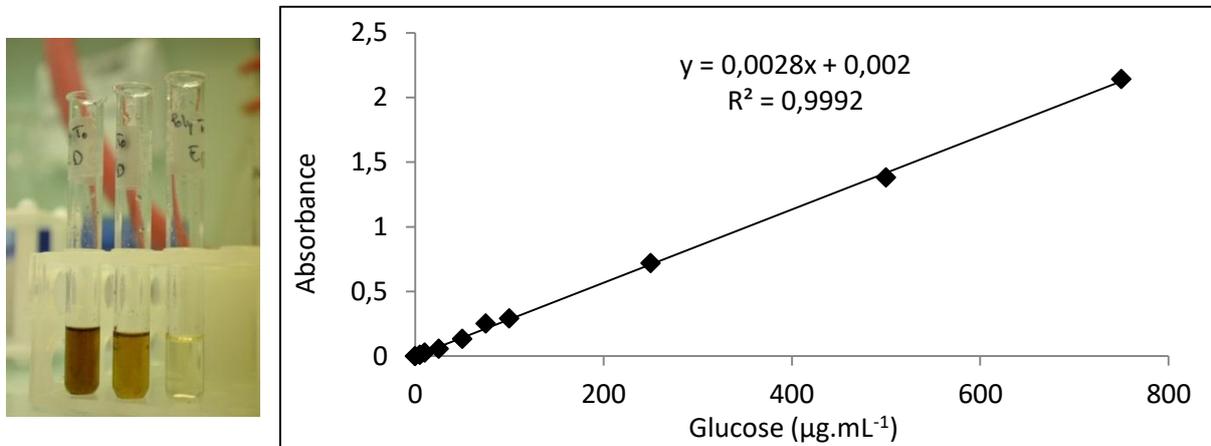


Figure 16: Photographie d'échantillons préparés pour le dosage des polysaccharides à gauche, et droite d'étalonnage pour la quantification des polysaccharides à une longueur d'onde de 485 nm à droite (exemple issu de l'expérimentation présentée en partie 3.3)

2.2.3. Caractérisation fonctionnelle

2.2.3.1. Dosage des activités enzymatiques

Les activités de la β -glucosaminidase (EC 3.2.1.30) et la β -glucosidase (EC 3.2.1.21), deux enzymes extracellulaires, ont été mesurées d'après un protocole adapté de Romaní et al. (2008). Ces deux enzymes sont impliquées dans le fonctionnement du biofilm, puisque la β -glucosaminidase joue un rôle dans la dégradation des peptidoglycanes (un composant de la paroi bactérienne) et de la chitine (un polysaccharide issu des parois fongiques), et la β -glucosidase est impliquée dans la dégradation des glucides. Leur dosage permet de renseigner quant à l'activité de la composante hétérotrophe du biofilm.

Le 4-méthylumbelliferyl N-acétyl- β -D-glucosaminide et le 4-méthylumbelliferyl- β -D-glucopyranoside ont respectivement été utilisés comme substrats fluorescents à 0,3 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ pour déterminer l'activité de ces enzymes. Chaque substrat de β -glucosaminidase ou β -glucosidase a été ajouté à hauteur de 100 μL dans les aliquotes de 100 μL d'échantillon et agité à 80 RPM dans l'obscurité complète durant une heure à 20°C. À la fin de l'incubation, la réaction a été stoppée avec 5 mL d'une solution tampon à pH 10,4 (NaOH à 8 $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$, Sigma-Aldrich; glycine à 75,04 $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$, GE-healthcare - Life sciences). Les échantillons ont été analysés

par fluorescence à l'aide d'un lecteur de microplaques (Synergy™ HT, Biotek, USA) aux longueurs d'onde d'excitation de 365 nm, et d'émission de 455 nm). Une droite d'étalonnage (exemple *Figure 17*) de 10 points a été réalisée pour chaque expérimentation avec de la 7-hydroxy-4-méthylcoumarine (MUF) avec des concentrations allant de 0 à 50000 $\mu\text{g.L}^{-1}$, permettant de convertir les résultats en mg MUF par $\text{cm}^2.\text{h}^{-1}$.

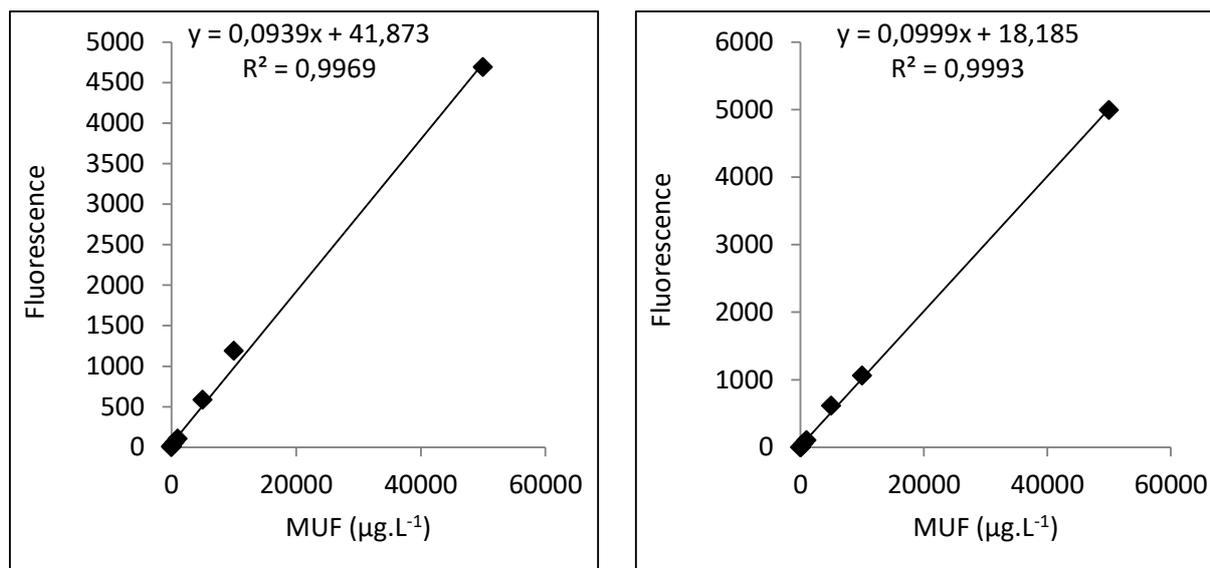


Figure 17: Exemples de droites d'étalonnage pour la mesure des activités enzymatiques à une longueur d'onde d'excitation de 365 nm, et d'émission de 455 nm: pour la β -glucosaminidase à gauche et la β -glucosidase à droite (exemple issu de l'expérimentation présentée en partie 3.3)

2.2.3.2. Mesure de l'activité photosynthétique

Dans le cas des microalgues, la production primaire peut être définie comme étant une chaîne de réactions menant à la synthèse d'oxygène et d'énergie chimique (ATP), plus communément connue sous le terme de photosynthèse. La mesure du rendement photosynthétique permet de renseigner quant à l'état physiologique des microalgues présentes dans le biofilm.

Plus précisément, lorsque les organismes photosynthétiques reçoivent une énergie lumineuse, les photons sont captés par les antennes collectrices des photosystèmes I et II (PSI et PSII) au niveau des membranes des thylakoïdes. L'énergie d'excitation y est transmise de proche en proche aux molécules de chlorophylle *a* qui se trouvent dans le centre réactionnel du photosystème, où elle est convertie en énergie chimique (voie photochimique). La

production d'oxygène découle de la transformation de molécules d'eau en oxygène et en protons, nécessaire au retour du PSII à un état stable. Un gradient de pH au niveau de la membrane, produit suite au transfert d'électrons du PSII vers le PSI, génère des conditions favorables à la production d'ATP à partir d'ADP par transport de protons au travers d'ATP-synthases transmembranaires. Les cellules végétales absorbent généralement plus d'énergie lumineuse que nécessaire à la photosynthèse, saturant ainsi les centres réactionnels. L'énergie lumineuse en excès, non utilisée par la voie photochimique (photosynthèse), est dissipée sous forme de chaleur et d'émission de fluorescence. Dans le cas d'une exposition au diuron, le transfert d'énergie vers le PSII est bloqué, résultant en une diminution de l'activité photosynthétique.

La mesure de l'activité photosynthétique (rendement quantique efficace du photosystème II, Φ_{PSII}) par fluorimètre PhytoPAM (Pulse Amplitude Modulation, Heinz Walz GmbH, Allemagne) se base sur l'existence de ces voies compétitives d'utilisation de l'énergie lumineuse : la mesure de l'une (ici la réémission de fluorescence) renseigne sur les deux autres, la dissipation thermique étant généralement négligeable sur des temps courts (de l'ordre des ms). En effet, le PhytoPAM permet de mesurer la fluorescence produite par un échantillon soumis à une lumière d'intensité contrôlée. Pour caractériser le nombre de PSII fonctionnels (proxy de l'état physiologique de l'échantillon), l'appareil effectue deux mesures de fluorescence de la chlorophylle *a*. Une première mesure est réalisée sur l'échantillon acclimaté à la lumière ambiante pour déterminer la fluorescence à l'état stable produite par les microorganismes (niveau de fluorescence de base, F_t), puis une seconde pour laquelle l'appareil envoie un pulse lumineux ($> 3000 \mu\text{mol}\cdot\text{s}^{-1}\cdot\text{m}^{-2}$ pendant 0,8 s) de façon à saturer l'activité du centre réactionnel, et ainsi déterminer le niveau de fluorescence maximale des organismes (F'_M , *Figure 18*). Enfin, le rendement photosynthétique effectif Φ_{PSII} a été calculé en faisant la différence entre les deux mesures selon l'*Equation 1* suivante :

Equation 1

$$\Phi_{\text{PSII}} = \frac{F'_M - F_t}{F'_M}$$

Avec Φ_{PSII} le rendement photosynthétique effectif, F'_M le niveau de fluorescence maximale et F_t le niveau de fluorescence de base de l'échantillon adapté à la lumière.

Pour chaque expérimentation, les mesures réalisées sur les échantillons témoins ont servi de base pour le calcul de l'activité photosynthétique de référence (Corcoll et al., 2012). Chaque mesure a été réalisée par Soizic Morin et Julie Neury-Ormanni, en quintuplicat et après une adaptation à la lumière ambiante (autour de $30 \mu\text{mol}\cdot\text{s}^{-1}\cdot\text{m}^{-2}$) de 15 minutes. Enfin les données obtenues ont été converties en pourcentage d'inhibition de la photosynthèse, par rapport aux échantillons témoins.

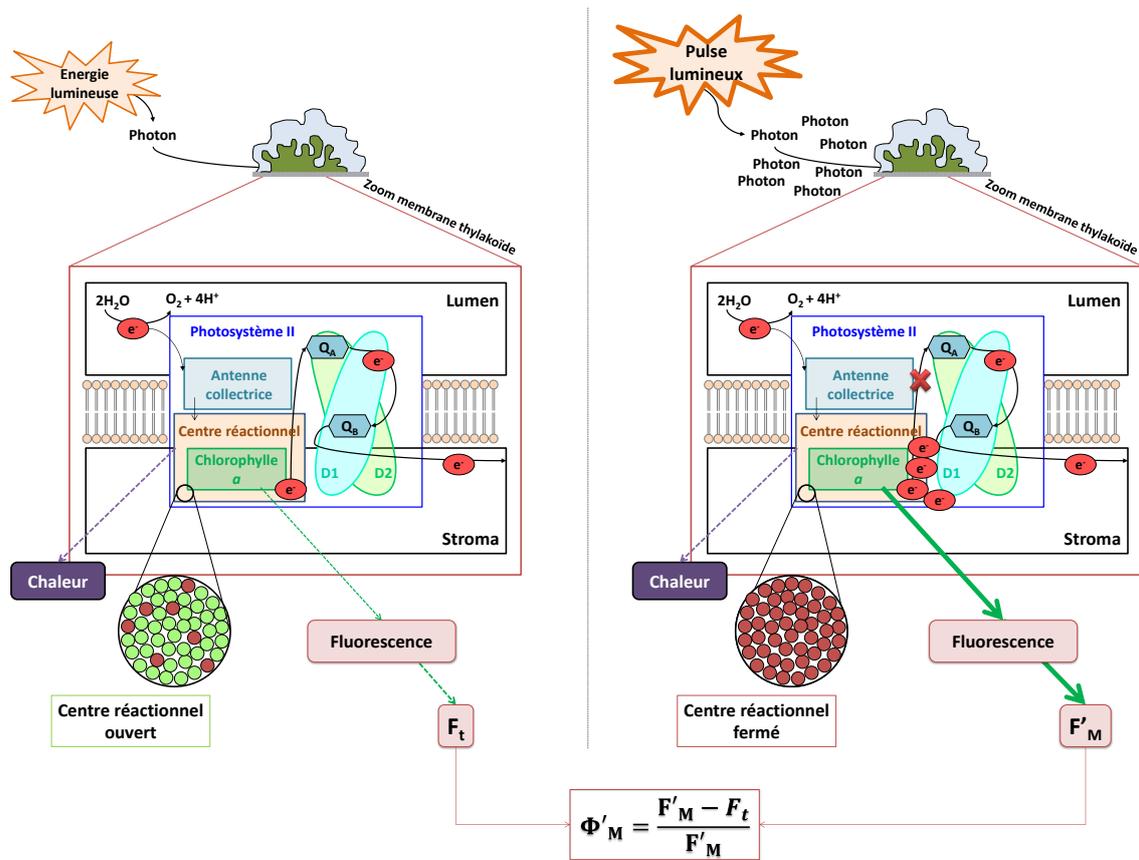


Figure 18: Principe de la mesure de l'activité photosynthétique

Les mesures au PhytoPAM permettent également de déterminer le ratio existant entre trois groupes algaux (algues vertes, brunes et cyanobactéries). En effet, ces différents groupes ont été déterminés par fluorescence grâce au signal détecté avec une longueur d'onde d'excitation précise. Par exemple, les algues vertes présentent un signal important à 470 nm, alors que pour les cyanobactéries ce signal sera marqué à 645 nm. Pour les algues brunes, le

signal sera conséquent à 470 et 520 nm. L'appareil découvre les signaux émis aux différentes longueurs d'onde pour les traduire en fluorescence associée à chaque groupe algal, proxy de la concentration en chlorophylle *a* associée.

2.3. Dosage des pesticides

Afin de quantifier la distribution du diuron entre les compartiments eau et biofilm (ainsi que de ses différentes fractions), le dosage des pesticides a été réalisé sur des matrices liquides (eau des canaux, filtrat Büchner, D-EPS) et solides (biofilm Total et T-EPS-M). Avant toute analyse (2.3.3), ces derniers ont subi une série de traitements afin de mettre en solution les pesticides à quantifier, et cette préparation d'échantillon passe par une extraction des pesticides de la matrice biofilm (2.3.1) puis par une purification de l'extrait obtenu (2.3.2). Les échantillons liquides (fraction D-EPS et filtrats), ont quant à eux uniquement été filtrés à l'aide de filtres-seringues.

2.3.1. Extraction des pesticides

Les pesticides ont été extraits du biofilm (Total et fraction T-EPS-M) par Accelerated Solvent Extraction (ASE 2000, Dionex, France), cette technique est basée sur le principe d'affinité des pesticides avec certains solvants.

Cette méthode d'extraction consiste à placer l'échantillon dans des conditions de très haute pression et température afin de rompre les parois des microorganismes présents dans le biofilm. Une fois que les pesticides ne bénéficient plus d'aucune protection (matrice), un solvant présentant une plus grande affinité avec les composés organiques que la matrice du biofilm est distribué à travers l'échantillon. Enfin le solvant et les pesticides sont collectés et ainsi débarrassés de la matrice solide. Cette technique présente de nombreux avantages notamment en termes de temps de préparation d'échantillon, seules 20 minutes sont nécessaires par échantillon, puis en termes de coût car cette méthode consomme peu de solvant.

Dans les faits, un filtre en cellulose (Thermo Scientific, USA) a été placé au fond d'une cellule ASE de 15 mL, puis le filtre GF/F contenant l'échantillon de biofilm lyophilisé a été introduit. Du sable de Fontainebleau a été ajouté et tassé pour combler le vide, ainsi que 10 μL d'une solution de surrogates (traceurs permettant de détecter un potentiel effet matriciel) à 1 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ (Monuron d6, Simazine d5, Prométryne d6; Dr. Ehrenstorfer GmbH).

Les cellules ASE ont ensuite été placées dans l'appareil (Figure 19) où elles ont subi une pression de 100 bars, une température de 70°C et 3 cycles de 5 mL d'acétone (Chem-Lab). À la fin des 20 minutes, les 15 mL d'acétone contenant les pesticides ont été collectés dans des vials de récupération (Figure 19), puis mis à évaporer sous flux d'azote (Figure 19) à l'aide d'un module Visidry®, pour permettre un changement de solvant. Enfin les échantillons ont été repris dans 10 mL d'eau ultra-pure.



Figure 19: Photographies de l'appareil ASE à gauche, de vials de récupération contenant des échantillons au milieu, et le système d'évaporation sous flux d'azote des échantillons à droite

2.3.2. Purification des échantillons

Les échantillons (extraits contenant les pesticides) ont ensuite été purifiés par Solid Phase Extraction (SPE). Cette technique peut être utilisée comme technique d'extraction d'un composé d'une matrice solide et / ou comme technique de purification. Pour chaque expérimentation effectuée au cours de cette thèse, cette technique a été appliquée dans le but de supprimer tout effet potentiel de la matrice du biofilm. Le principe de cette méthode réside également sur les différences d'affinités entre les pesticides, la matrice et les solvants. Cette méthode nécessite des cartouches contenant une phase HR-X Chromabond (Macherey-Nagel, Allemagne) qui présente une plus grande affinité avec les composés organiques que celle qui les maintient dans la matrice du biofilm.

Dans un premier temps les cartouches ont été conditionnées avec 5 mL de méthanol et 5 mL d'eau ultra-pure à l'aide d'un support Visidry®, puis les 10 mL d'échantillon ont été percolés dans ces mêmes cartouches. Lors de cette étape, les pesticides contenus dans l'échantillon ont été retenus dans la phase HR-X, alors que le reste de l'échantillon contenant les résidus de la matrice du biofilm a été évacué dans la cuve. Puis les cartouches ont été rincées avec une solution composée à 80 % d'eau ultra-pure, et 20 % de méthanol et séchées sous flux d'azote pendant 30 minutes.

Ensuite 5 mL d'acétonitrile (Biosolve) ont été percolés dans la cartouche, lors de cette étape, les pesticides piégés dans la phase HR-X ont été élués et collectés dans des tubes en verre. Une solution d'étalon interne deutéré a été préparée avec une concentration finale de 10 mg.L⁻¹ de Diuron d6 (Dr. Ehrenstorfer GmbH), et 10 µL ont été ajoutés dans chaque échantillon. Les échantillons ont été évaporés à sec à l'aide d'un évaporateur automatisé (SpeedVac, Thermo Fisher Scientific, France) puis repris dans 1 mL d'eau ultra-pure. Cette dernière étape a permis de concentrer l'échantillon d'un facteur 5 (d'un volume initial de 5 mL au volume final de 1 mL). Cette technique permet par la suite d'abaisser les limites de quantification analytiques.

2.3.3. Quantification des pesticides

Le diuron et ses métabolites (DCPMU et DCPU) ont été quantifiés par UPLC-ToF (Ultra-Performance Liquid Chromatography - Time of Flight Mass Spectrometry, Xevo G2-S ToF, Waters) (Figure 20).

Le but de cette technique analytique est dans un premier temps de séparer les diverses molécules de l'échantillon par différences d'affinité avec les solvants. La séparation chromatographique a été faite à l'aide d'une colonne C18 ACQUITY BEH (50 × 2,1 mm, 1,7 µm, Waters) à une température de 45°C. D'abord 20 µL d'échantillon ont été injectés dans la colonne à haute pression grâce à un gradient binaire d'eau ultra-pure (à pH= 5) et de méthanol (les deux solutions à 10 mM d'acétate d'ammonium, Biosolve). Ainsi les différentes molécules du mélange ont été séparées selon leur affinité avec les solvants dans la colonne. Par conséquent, chaque composé dispose d'un temps de rétention différent en sortie de

colonne (visible sur le chromatogramme, *Figure 20*) avant d'être envoyé dans la partie spectromètre de masse à temps de vol (ToF). Dans un deuxième temps les molécules sont ionisées grâce à une source électrospray en mode positif à 0,7 kV avec une tension du cône d'échantillonnage réglée à 30 V. Ces molécules sont fractionnées une première fois (ions parents), puis les ions formés vont subir de nouvelles fragmentations (ions fils). L'azote a été utilisé comme nébuliseur avec un débit de 50 L.h⁻¹ à 150°C.

Une différence de potentiel (ΔU) a été appliquée aux fragments obtenus (ions) afin de leur procurer une certaine vitesse dépendante à la fois de leur masse et de leur charge (m/z). Les données recueillies sont comprises entre 50 m/z pour les molécules les plus légères et 1200 m/z pour les plus lourdes. Enfin la quantification des molécules a été possible grâce à l'étalonnage interne.

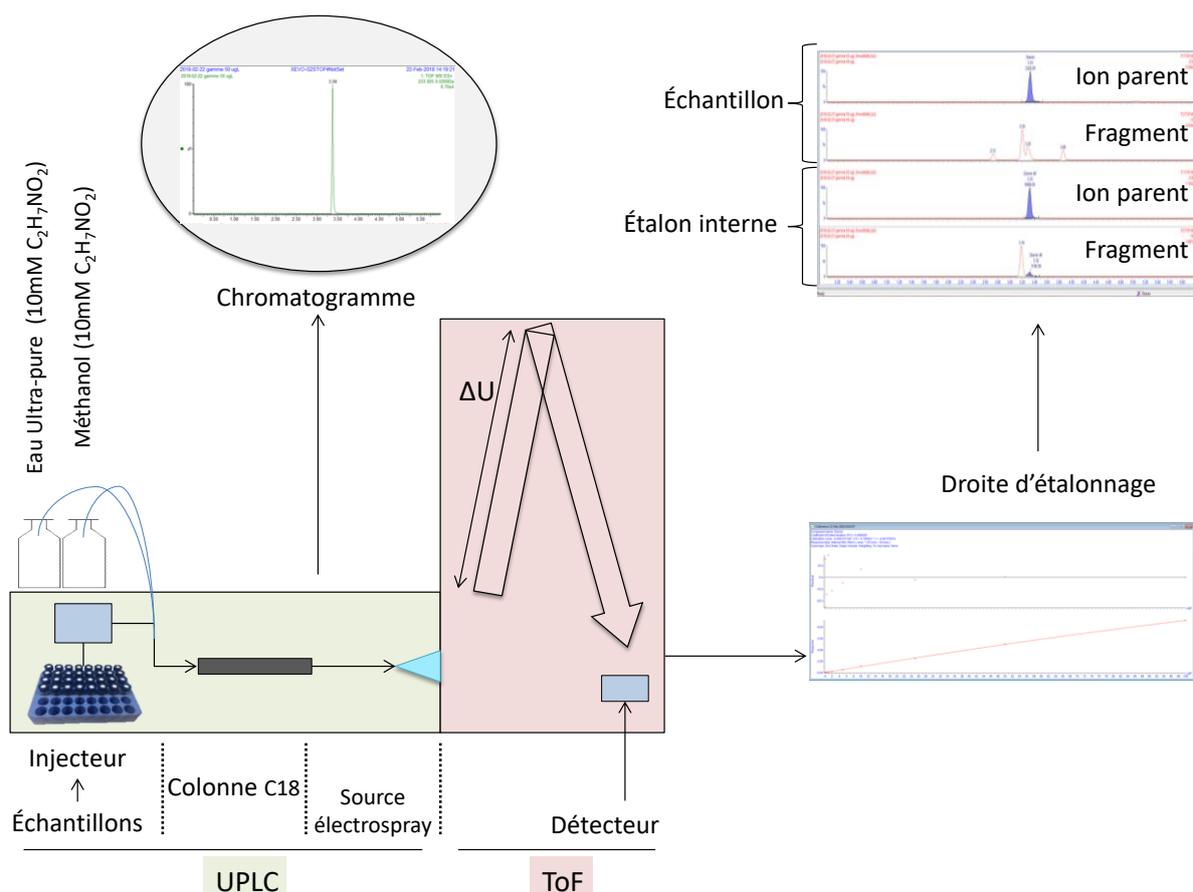


Figure 20: Schéma du principe de fonctionnement de l'UPLC-ToF

Cette méthode de quantification est basée sur la comparaison des temps de rétention des ions parents (et des fragments en découlant pour confirmation) de l'échantillon avec ceux de l'étalon interne (molécule deutérée marquée : diuron d6) associé. Cette molécule marquée présente dans la gamme d'étalonnage a subi le même processus que l'échantillon, à savoir la séparation chromatographique, la fragmentation du composé parent et la quantification. Les paramètres analytiques utilisés sont présentés dans le *Tableau 3*. Dix points de gamme ont été préparés allant de 0 à 100 $\mu\text{g.L}^{-1}$ afin d'établir la droite d'étalonnage, et 3 contrôles qualité ont été effectués tous les 10 échantillons avec trois points issus de la gamme à 0, 1 et 10 $\mu\text{g.L}^{-1}$, dans le but de vérifier la sensibilité de l'appareil tout le long de l'acquisition des données. Les données ont été retraitées grâce au logiciel MassLynx V4.1, et converties en $\mu\text{g.L}^{-1}$. Les résultats obtenus pour la quantification du diuron dans la matrice biofilm ont ensuite été normalisés par le poids sec de l'échantillon (pour chaque réplicat), et exprimés en $\mu\text{g.g}^{-1}$. Pour l'étude portant sur l'influence du courant (3.3), les valeurs ont en plus été normalisées par la surface de lame grattée (car différente selon le temps d'exposition) et finalement exprimées en $\mu\text{g.g}^{-1}.\text{cm}^{-2}$.

Cette technique analytique présente de nombreux avantages, notamment une séparation des molécules très rapide, avec une quantification sensible et précise.

Tableau 3: Paramètres analytiques des molécules étudiées et l'étalon interne associé

Molécule	Ion de quantification (m/z)	Ion de confirmation (m/z)	Temps de rétention (min)	Etalon interne	Limite de quantification	
					Eau	Biofilm
Diuron	233,025	72,045	3,45	Diuron d6	0,5 $\mu\text{g.L}^{-1}$	0,05 $\mu\text{g.mg}^{-1}$ ^a
DCPMU	219,009	161,988	3,01	Diuron d6	0,5 $\mu\text{g.L}^{-1}$	0,05 $\mu\text{g.mg}^{-1}$ ^a
DCPU	204,994	161,988	3,05	Diuron d6	0,5 $\mu\text{g.L}^{-1}$	0,05 $\mu\text{g.mg}^{-1}$ ^a
Diuron d6	239,062	78,085	3,45	na	na	na

^a estimation pour un échantillon de biofilm d'1mg

2.4. Analyse des données

2.4.1. Cinétique chimique

Dans cette thèse le but a été d'étudier entre autres les aspects toxicocinétiques de la bioaccumulation du diuron dans les biofilms. Pour ce faire, une cinétique d'absorption d'ordre 1 a été utilisée sur la base d'un modèle simple à deux compartiments : la colonne d'eau et le biofilm (Figure 21).

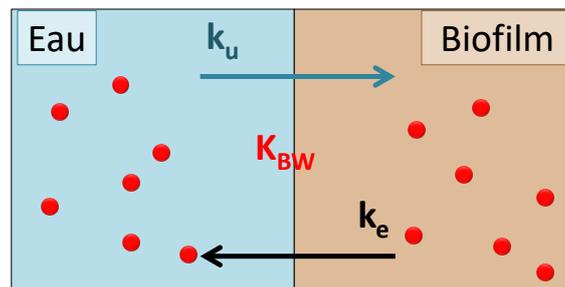


Figure 21: Représentation d'un modèle d'absorption simple à deux compartiments avec les constantes cinétiques associées

Dans un premier temps, il s'est agi de suivre la concentration en contaminant en fonction du temps dans ces deux compartiments afin de mieux comprendre les mécanismes d'absorption du diuron dans le biofilm dans sa globalité (fraction « Total »).

La cinétique d'ordre 1 est caractérisée par deux phases, une première phase d'accumulation (représentée en bleu sur la Figure 22) avec une constante cinétique d'accumulation k_u associée, qui correspond à une période durant laquelle les pesticides présents dans la colonne d'eau sont accumulés dans le biofilm (Figure 21). Puis une deuxième phase d'équilibre (représentée en rouge, Figure 22) qui survient lorsqu'un équilibre est atteint entre accumulation dans le biofilm des pesticides, et relargage des pesticides dans le milieu, selon une constante cinétique d'élimination k_e (Figure 21).

En d'autres termes l'équilibre correspond au moment où le ratio entre la constante cinétique d'accumulation (k_u , en $L.g^{-1}.min^{-1}$, correspondant à la pente *Figure 22*) et la constante cinétique d'élimination (k_e en min^{-1}) se stabilise pour déterminer la constante cinétique d'équilibre (K_{BW} en $g.L^{-1}$), selon l'Equation 2:

Equation 2

$$K_{BW} = \frac{k_u}{k_e}$$

Une fois ce plateau atteint, il est possible de déterminer la concentration en diuron dans le biofilm à l'équilibre. La *Figure 22* représente une cinétique d'ordre 1, dont l'équation est décrite par l'Equation 3 où t représente le temps en minutes, et où les concentrations en diuron dans le biofilm, à un temps t -ou à l'équilibre- sont exprimées en $\mu g.g^{-1}$ (ou en $\mu g.g^{-1}.cm^{-2}$ pour l'expérimentation sur l'influence du courant). Les données de bioaccumulation ont été modélisées de cette façon grâce au logiciel XLstat (version 2015.1.03.15828).

Equation 3

$$[diuron]_{biofilm} = [diuron]_{biofilm\ eq} * (1 - e^{-k_e*t})$$

La bioaccumulation du diuron a aussi été exprimée via le facteur de bioconcentration (BCF, $g.L^{-1}$, équivalent au K_{BW}) obtenue grâce à l'Equation 4.

Equation 4

$$BCF = \frac{[diuron]_{biofilm}}{[diuron]_{eau}}$$

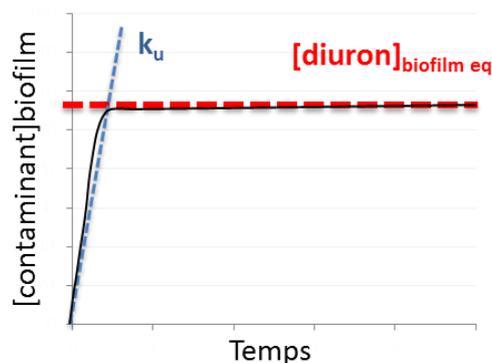


Figure 22: Représentation d'une cinétique d'absorption d'ordre 1

2.4.2. Coefficient de transfert de masse

Le coefficient de transfert de masse (k_0) correspond au temps nécessaire à un composé pour traverser une ou plusieurs couches, ici les différentes couches correspondent à la couche limite eau-biofilm et aux différentes fractions du biofilm (D-EPS et T-EPS-M). Dans ce cas-ci, il correspond au temps requis pour que le diuron atteigne les cellules du biofilm après avoir diffusé à travers la couche limite eau-biofilm et les EPS. Ce coefficient exprimé en cm^{-1} a été déterminé grâce à l'Equation 5, avec m le poids sec du biofilm en g, et A la surface d'échange en cm^2 .

Equation 5

$$k_0 = \frac{k_e * m}{A} * BCF$$

La résistance aux transferts de masse ($1/k_0$) exprimée en $\text{cm} \cdot \text{min}^{-1}$ représente la vitesse requise à un composé pour traverser les différentes couches rencontrées. La résistance aux transferts de masse du biofilm ($1/k_0$) a été calculée grâce à la somme des résistances individuelles de tous ses composants comme formulé dans l'Equation 6.

Equation 6

$$\frac{1}{k_0} = \frac{1}{k_{WBL}} + \frac{1}{k_{D-EPS}} + \frac{1}{k_{T-EPS-M}}$$

Avec $1/k_{WBL}$ la résistance aux transferts de masse de la couche limite eau-biofilm, $1/k_{D-EPS}$ celle des EPS faiblement liées et $1/k_{T-EPS-M}$ celle des EPS fortement liées et les microorganismes.

2.4.3. Modèles pour l'approche toxicocinétique

Un autre des objectifs de cette thèse a été de déterminer les isothermes de sorption du diuron dans le biofilm. Dans le but de définir les mécanismes mis en place lors de la bioaccumulation du diuron dans le biofilm, différents modèles de caractérisation de la sorption du diuron dans le biofilm ont été utilisés afin de représenter au mieux les données obtenues. Tous les modèles de cette section seront utilisés uniquement dans les chapitres 4 et 5.

2.4.3.1. Régression linéaire

Dans un premier temps, une régression linéaire a été appliquée aux données issues de la quantification du diuron dans le biofilm. Un tel modèle postule que la concentration en diuron accumulé dans le biofilm est directement proportionnelle à la concentration en diuron dans l'eau, comme présenté dans la Figure 23. Il suggère aussi que le biofilm ne présente pas de limitation au niveau de sa capacité à créer des interactions avec le diuron. Ce modèle a été testé en appliquant l'Equation 7 sur les données de bioaccumulation à l'aide du logiciel XLStat.

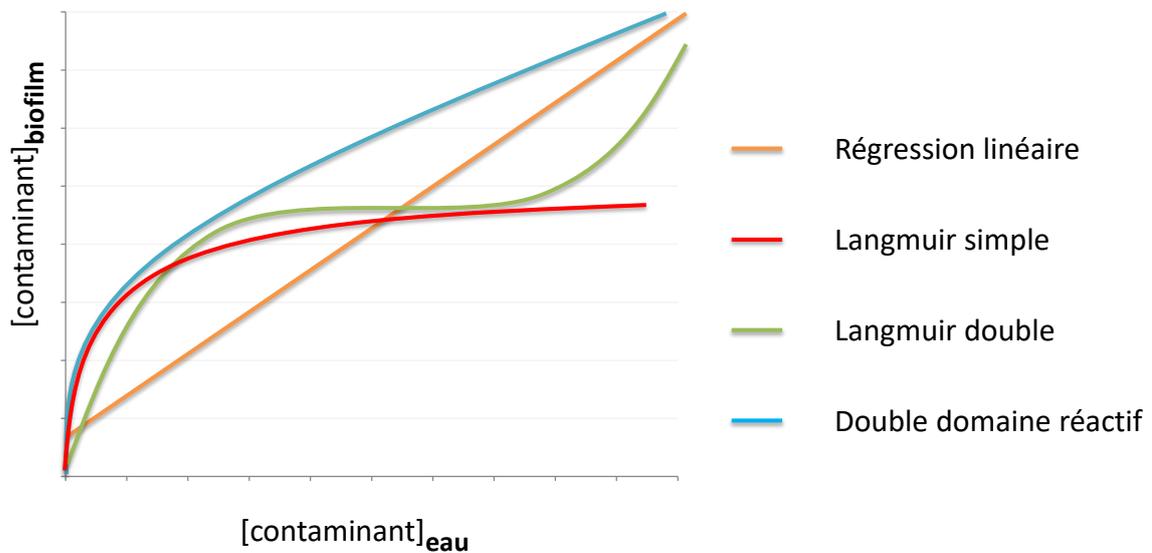


Figure 23: Représentation des différents modèles présentés dans les parties 2.4.3.1 à 2.4.3.4

Equation 7

$$[\text{diuron}]_{\text{biofilm}} = a * [\text{diuron}]_{\text{eau}} + b$$

Avec $[\text{diuron}]_{\text{biofilm}}$ la concentration en diuron dans le biofilm en $\mu\text{g.g}^{-1}$, $[\text{diuron}]_{\text{eau}}$ la concentration en diuron dans l'eau en $\mu\text{g.L}^{-1}$, et a et b : constantes.

2.4.3.2. Modèle de Langmuir simple

Les composés peuvent interagir de différentes façons avec un sorbant, par exemple en formant des liaisons hydrogène ou des interactions de van der Waals (liaisons faibles). Le modèle des isothermes de Langmuir simple permet de décrire les phénomènes d'adsorption d'un soluté sur un sorbant (ici le biofilm) en prenant en compte le fait qu'il existe une possible limitation des sites de sorption. Ce principe sous-entend une phase de saturation, comme représenté dans la *Figure 23*. Ce graphique schématise le modèle de Langmuir simple selon l'*Equation 8*.

Equation 8

$$[diuron]_{biofilm} = \frac{C_{max} * K_L * [diuron]_{eau}}{1 + K_L * [diuron]_{eau}}$$

Où C_{max} représente la concentration maximale de diuron accumulée dans le biofilm en $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ et K_L est la constante de Langmuir en $\text{L}\cdot\mu\text{g}^{-1}$. De cette façon, les résultats de bioaccumulation ont été modélisés à l'aide du logiciel R selon l'*Equation 8* avec le package *nlstools*, et K_L et C_{max} ont pu être déterminés.

2.4.3.3. Modèle de Langmuir double

Le modèle des isothermes de Langmuir double tout comme le modèle de Langmuir simple prend en compte la possibilité que le biofilm ait un nombre de sites de sorption limité. En revanche, le modèle de Langmuir double considère en plus le fait que le biofilm puisse présenter des sites de sorption de nature différente, ce qui est vraisemblable étant donnée la nature hétérogène du biofilm. Ce modèle a été testé sur les mêmes données de bioaccumulation que dans la partie 2.4.3.2 selon l'*Equation 9* suivante :

Equation 9

$$[diuron]_{biofilm} = \frac{C_{max1} * K_{L1} * [diuron]_{eau}}{1 + K_{L1} * [diuron]_{eau}} + \frac{C_{max2} * K_{L2} * [diuron]_{eau}}{1 + K_{L2} * [diuron]_{eau}}$$

Cette équation est constituée de la même façon que l'*Equation 8* (Langmuir simple), mais cette fois-ci en prenant en compte l'existence de deux sites de sorption, avec le calcul des mêmes paramètres (C_{max} et K_L), de façon distincte selon le site étudié (*Figure 23*). Ce modèle permet

de considérer des capacités de sorption différentes selon la nature du sorbant. Dans le cas de cette thèse, nous faisons l'hypothèse que le diuron peut être sorbé dans les différents compartiments, soit les D-EPS et/ou les T-EPS-M, qui elles-mêmes contiennent de nombreux sites de sorption en fonction des organismes présents. Comme présenté dans la partie 2.4.3.2, les données de bioaccumulation ont été modélisées sous R à l'aide du même package `nlstools`.

2.4.3.4. Modèle de double domaine réactif

Le modèle de double domaine réactif (DRDM) est également utilisé pour modéliser des mécanismes de sorption. Contrairement aux modèles présentés jusqu'à présent, il tient compte du fait que le sorbant peut contenir un nombre limité de sites de sorption (avec une phase de saturation, comme présenté pour le modèle de Langmuir simple), mais également d'autres sites moins actifs ne présentant pas de limitation, comme présenté pour le modèle de régression linéaire (*Figure 23*). Ce modèle a donc été appliqué sur les données de bioaccumulation selon l'Equation 10 suivante comme précédemment à l'aide du logiciel R et du même package :

Equation 10

$$[diuron]_{biofilm} = \frac{C_{max} * K_L * [diuron]_{eau}}{1 + K_L * [diuron]_{eau}} + K_p * [diuron]_{eau}$$

Où K_p est le coefficient de partition de linéarité en $L \cdot \mu g^{-1}$.

2.4.4. Modèles pour l'approche toxicodynamique

2.4.4.1. Courbes dose-réponse modélisées avec l'équation de Hill

Les relations entre la dose appliquée et l'impact sur l'organisme n'est généralement pas linéaire. C'est pourquoi en écotoxicologie les courbes dose-réponse sont généralement représentées sous la forme d'une courbe sigmoïde (*Figure 24*), à partir de laquelle il est possible de déterminer entre autres la CE_{50} (concentration efficace à 50 %, ou concentration produisant 50 % de l'impact toxique mesuré). Dans cette thèse, les courbes dose-réponse ont été tracées de façon à mettre en regard l'inhibition de la photosynthèse (en pourcentage des

témoins), avec la concentration en diuron mesurée dans l'eau. Les données obtenues relatives à l'effet toxique ont été ajustées au modèle de Hill (Equation 11) à l'aide de la macro REGTOX pour Excel (© Eric Vindimian, http://www.normalesup.org/~vindimian/fr_index.html).

Equation 11

$$E = E_{min} + \frac{E_{max} - E_{min}}{1 + 10^{(\text{Coefficient de Hill} * (\log_{10}[\text{diuron}]_{\text{eau}} - \log_{10} CE_{50}))}}$$

Avec E la valeur de l'effet observé à la concentration $[\text{diuron}]_{\text{eau}}$ en pourcentage d'inhibition de la photosynthèse par rapport au témoin, E_{min} la valeur de l'effet minimum observé (0 % d'inhibition de la photosynthèse), E_{max} la valeur de l'effet maximum observé (qui tend vers 100 % pour une exposition au diuron) et la CE_{50} la concentration inhibant à 50 % la photosynthèse (en $\mu\text{g.L}^{-1}$).

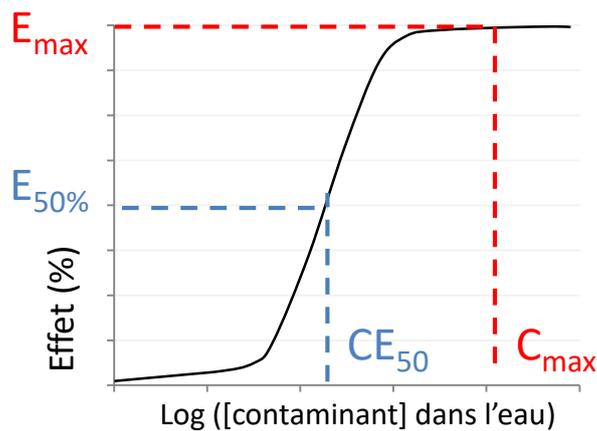


Figure 24: Représentation d'une courbe dose-réponse et des paramètres écotoxicologiques CE_{50} et C_{max} (concentration en contaminant dans l'eau engendrant l'effet maximal, en $\mu\text{g.L}^{-1}$)

2.4.4.2. Développement du modèle de prédiction E_{max}

Il est admis que lorsque qu'un effet toxique est notable (comme ici l'inhibition de la photosynthèse), alors il y a eu accumulation du contaminant par l'algue (Campbell et al. 2002). Selon l'hypothèse abordée précédemment (2.4.3.2) où la bioaccumulation des composés organiques ne se fait pas nécessairement de façon linéaire, tout comme le modèle de Hill, le modèle E_{max} représente la relation non-linéaire entre la dose et l'effet (*Figure 24*). Cependant, ce modèle présente un avantage supplémentaire, celui de prédire les effets toxicodynamiques en fonction de la concentration en toxique dans le milieu et inversement. En effet, la dynamique du diuron peut dépendre de sa cinétique sur les sites de sorption du biofilm. Ce modèle a été appliqué aux données sur l'inhibition de la photosynthèse selon l'Equation 12, à l'aide du logiciel Excel (version 2015.1.03.15828).

Equation 12

$$E = \frac{E_{max} * [diuron]_{eau}}{CE_{50} + [diuron]_{eau}}$$

Avec E qui représente l'effet toxique observé (ici l'inhibition de la photosynthèse en pourcentage du témoin, comme décrit dans la partie 2.2.3.2), et E_{max} l'effet maximal observé en pourcentage. Dans cette étude, la valeur d' E_{max} a été fixée à 100 % car dans la littérature il a été démontré que l'activité photosynthétique pouvait être complètement inhibée par le diuron (Copin & Chèvre, 2015).

2.4.5. Tests et analyses statistiques

Divers tests et analyses statistiques ont été réalisés sur différents jeux de données. Pour toutes les expérimentations menées au cours de cette thèse, les tests et analyses effectués sont recensés dans le tableau suivant (Tableau 4). Les résultats ont été considérés comme significatifs quand les p-values des tests étaient inférieures à 0,05.

Tableau 4: Liste des tests et analyses statistiques réalisés

Tests et analyses statistiques	Jeux de données	Objectif du test ou de l'analyse
Test de Shapiro-Wilk	Toutes les données obtenues*	Tester la normalité des échantillons
Test de Bartlett	Toutes les données obtenues*	Tester l'homoscédasticité des échantillons
Test de Kruskal-Wallis	Toutes les données obtenues*	Tester l'égalité des échantillons (pour échantillons indépendants)
Test de Wilcoxon-Mann-Whitney	Toutes les données obtenues*	Tester l'égalité des échantillons (pour échantillons appariés)
Analyse nlme (modèle linéaire mixte)	Quantités de protéines, de polysaccharides, de chlorophylle <i>a</i> , COT, poids sec, activités enzymatiques	Tester l'impact d'un paramètre environnemental seul ou en interaction
Analyse GLM (modèle linéaire généralisé)	Toutes les données obtenues* ^o	Déterminer le ou les paramètres environnementaux ayant la plus grande influence

*Les résultats ont été analysés pour chaque descripteur séparément

^o Les résultats ont été analysés tous descripteurs confondus

Chapitre 3 :

Mesure de l'influence de paramètres abiotiques sur la bioaccumulation des pesticides dans les biofilms

3. Chapitre 3 : Mesure de l'influence de paramètres abiotiques sur la bioaccumulation et l'impact toxique des pesticides dans les biofilms

3.1. Introduction générale

A l'heure actuelle les processus d'accumulation des herbicides dans les biofilms sont encore peu connus. Cependant, il est généralement admis que lorsque qu'un effet toxique est visible, alors il y a eu internalisation par les cellules (Campbell et al., 2002). Bien que les effets toxiques de ces composés soient bien documentés, il existe un manque d'information sur les processus mis en place au cours de la sorption des herbicides par le biofilm.

Or il est nécessaire de comprendre les mécanismes toxicocinétiques intervenant dans l'expression de la toxicité. Le biofilm étant un des premiers maillons de la chaîne trophique dans les milieux aquatiques, les conséquences de la contamination de celui-ci pourrait se répercuter sur des maillons supérieurs.

Compte tenu de la composition hétérogène du biofilm, des mécanismes divers et juxtaposés peuvent être attendus. En raison de l'absence d'information sur ces processus de sorption, un modèle d'absorption simple à deux compartiments (eau-biofilm) a été établi dans un premier temps afin d'aborder les aspects toxicocinétiques et toxicodynamiques. Ce modèle implique une accumulation de type cinétique d'ordre 1 avec deux phases distinctes : une accumulation et un équilibre (cf. partie 2.4.1 du chapitre précédent).

Une étude préliminaire (section 3.2) a été mise en place dans le but d'obtenir un premier aperçu quant à la toxicocinétique et à la toxicodynamique du diuron dans le biofilm à différents temps d'exposition (temps courts et temps longs). Cette étude visait notamment à définir les phases d'accumulation et d'équilibre, à déterminer à quelle vitesse l'équilibre eau-biofilm était atteint, et à estimer combien de temps après le début de l'accumulation les effets toxiques étaient visibles. La connaissance de ces délais était un préalable à l'étude plus fine de caractérisation des effets modulateurs de facteurs environnementaux déterminants, sur la bioaccumulation comme la toxicité du diuron.

Dans l'environnement de nombreux facteurs abiotiques peuvent avoir une influence sur la structure et/ou le fonctionnement du biofilm. En effet, la variation de courant d'une rivière à

l'autre n'engendre pas le même type de biofilm, avec une variabilité de structure due notamment aux différences de colonisation (Niederdorfer et al., 2016). De plus, la réduction de la couche limite entre les compartiments eau et biofilm, avec le courant, est susceptible d'engendrer un transfert et une accumulation accélérés du diuron dans les biofilms, soit une atteinte plus précoce de l'équilibre et/ou une élévation de la quantité maximale de contaminant accumulée.

Aussi la température et la luminosité sont deux paramètres indissociables du changement de saison et peuvent influencer l'activité photosynthétique et par conséquent le métabolisme des organismes autotrophes, mais également des organismes hétérotrophes (Pesce et al., 2018). En effet, les impacts sur le métabolisme des biofilms tel que son ralentissement, ont déjà été abordés dans la littérature (Brown et al., 2004). Cependant, le comportement des herbicides au niveau de la bioaccumulation reste à préciser car ces deux facteurs pourraient faire varier les capacités d'accumulation du biofilm et par conséquent sa sensibilité face à de multiples stress.

Ces différents facteurs sont sujets aux bouleversements liés au changement global. En effet, certaines des variations climatiques attendues pourraient engendrer une augmentation de la température et des périodes de sécheresse ou d'inondation plus marquées avec une modification du débit des cours d'eau. Dès lors ces paramètres sont à considérer dans la modulation potentielle des constantes cinétiques d'accumulation des contaminants organiques dans les biofilms.

Dans ces conditions, une modification plutôt mécanique de la structure du biofilm ainsi qu'une variation de la cinétique d'équilibre sont attendus lors d'épisodes de crue. En revanche, une altération de la sensibilité du biofilm est envisagée au cours par exemple, de variation de températures et de luminosité, relatifs aux différentes saisons.

C'est dans ce contexte que se place ce chapitre 3 ayant pour but de définir la cinétique d'accumulation du diuron dans les biofilms les constantes associées sous différentes conditions environnementales, et les effets toxiques en découlant.

3.2. Cinétique d'accumulation du diuron et de sa toxicité dans les biofilms

3.2.1. Introduction

L'objectif de cette étude préliminaire a été de caractériser les processus de transfert du diuron de la colonne d'eau au biofilm à l'aide d'un modèle d'absorption simple à deux compartiments. Pour ce faire plusieurs temps d'exposition ont été appliqués à savoir 15 min (temps court), 6 heures (intermédiaire), 10, 14 et 21 jours (long).

Les temps court et intermédiaire ont pour objectif de caractériser la vitesse d'accumulation et le délai d'atteinte de l'équilibre entre l'eau et le biofilm, ainsi que les constantes cinétiques associées. Les temps les plus longs ont pour but de révéler sous quelle forme se présente l'accumulation à long terme. À savoir sous la forme d'une cinétique d'ordre 1 ou biphasique comme suggéré par Byers (2012), et le cas échéant s'il existe un phénomène de désorption du diuron. En parallèle, pour l'approche toxicodynamique, la mesure simultanée de l'activité photosynthétique des biofilms visait à vérifier que le niveau d'inhibition de la photosynthèse était fonction de l'exposition, et à évaluer une éventuelle adaptation au diuron, avec les durées d'exposition longues (comme observé par Bernard, 2015).

Pour cela, du biofilm colonisé sur lames de verre pendant un mois a été placé dans des canaux, en laboratoire, en conditions contrôlées, soit à 20°C avec un courant de 2 cm.s⁻¹ et une lumière continue (2.1, *Tableau 2*). Il a été exposé à trois concentrations de diuron : 0, 5 et 50 µg.L⁻¹ (nommés Ctrl, 5D et 50D), pendant 15 minutes, 6 heures, 10, 14 et 21 jours. Pour l'aspect toxicocinétique, le diuron a été quantifié dans l'eau du canal et le biofilm. Pour l'étude toxicodynamique, à chaque temps d'échantillonnage, l'activité photosynthétique a été mesurée, ainsi que l'activité des enzymes β-glucosidase et β-glucosaminidase. Les protéines, les polysaccharides, et le carbone organique total ont également été dosés, et les différents groupes algaux ont été déterminés.

3.2.2. Détermination de la cinétique d'accumulation et ses constantes avec l'effet toxique associé

3.2.2.1. Caractérisation du biofilm

Les données relatives à la caractérisation du biofilm ont toutes montré les mêmes tendances quelle que soit l'analyse (dosage des protéines et polysaccharides, mesure des activités enzymatiques). Pour cette raison, dans cette partie, seuls les résultats du dosage des polysaccharides ont été présentés, les données des autres analyses sont contenues en annexe (8.2). Ces résultats ont révélé que le diuron n'avait pas d'impact sur la structure du biofilm, ni sur les descripteurs fonctionnels associées aux organismes hétérotrophes. Pour toutes les conditions (témoin et contaminées), et pour chaque temps d'exposition, les quantités de polysaccharides quantifiés sont similaires (*Figure 25*, Annexe 8.2). En effet, excepté pour le point de prélèvement à 336 heures (14 jours), le contenu en polysaccharides des biofilms était de l'ordre de 50 $\mu\text{g Eq Glucose.cm}^{-2}$ pour les temps les plus courts (15min et 6h), et entre 80 et 150 $\mu\text{g Eq Glucose.cm}^{-2}$ pour les temps les plus longs (10 et 21 jours). Cette augmentation peut être liée au développement du biofilm dans les canaux.

Au niveau de la composition algale (algues brunes, vertes et cyanobactéries), à T_0 , les échantillons sont principalement composés d'algues vertes (60 %) et de cyanobactéries (40 %), et la fluorescence associée aux algues brunes est inférieure à 1 % (*Figure 26*). Les taux d'algues brunes augmentent jusqu'à 20 % après 15 minutes d'exposition aux dépends des algues vertes qui sont réduites entre 30 et 40 %. Cette variation peut être liée au type de biofilm initial, pour les temps courts, car une modification de la composition de la communauté nécessite un temps supérieur à 15 minutes, comme ce qui peut être le cas aux temps d'exposition les plus longs, comme par exemple à partir de 10 jours. En effet, dans un souci pratique au niveau de la mise en place de l'expérimentation, les prélèvements de biofilm dans l'étang de Gazinet-Cestas n'ont pas été réalisés dans l'ordre chronologique. Les biofilms pour les temps T_0 et 21 jours d'exposition ont été prélevés le même jour, pour le temps d'exposition à 14 jours, les biofilms ont été collectés deux jours plus tard, pour 10 jours deux semaines après, et enfin pour 15 minutes et 6 heures, quatre jours plus tard. À partir de dix jours d'exposition, pour les témoins, le taux d'algues brunes et de cyanobactéries augmente de 10 à 20 % aux dépends des algues vertes.

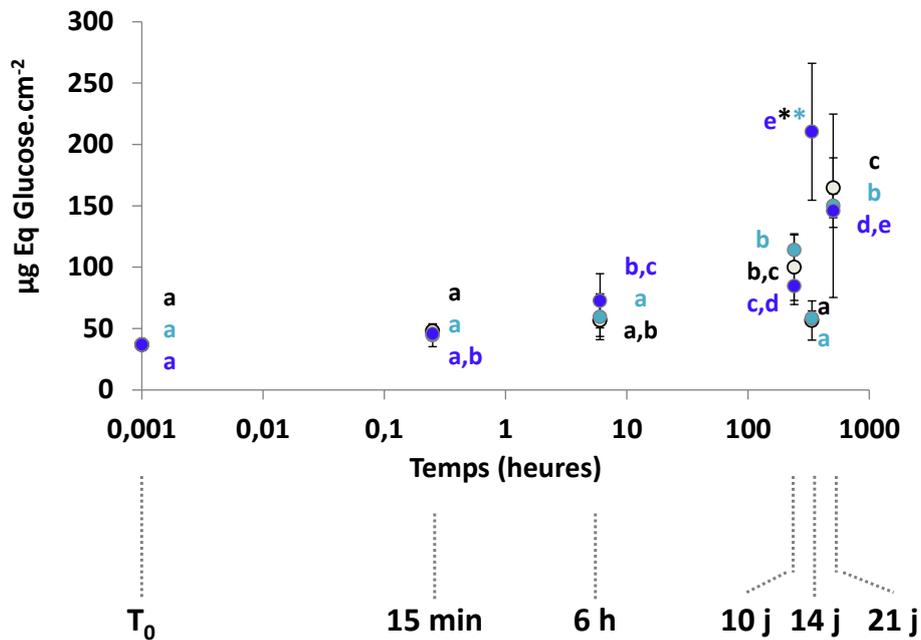


Figure 25: Concentration moyenne en polysaccharides dans le biofilm exprimée en μg d'équivalent glucose. cm^{-2} avec les erreurs standards associées en fonction du temps d'exposition. Les points blancs sont les résultats obtenus pour la condition témoin, les points bleus clairs et foncés représentent ceux pour le biofilm exposé à 5 et 50 $\mu\text{g.L}^{-1}$ de diuron, respectivement. Les lettres représentent « l'effet temps » pour chacune des conditions d'exposition (selon la couleur : noir/témoins, bleu clair/5D, bleu foncé/50D). Les étoiles représentent les différences significatives pour un même temps d'exposition entre les conditions, soit « l'effet concentration ». $P\text{-value} < 0,005$

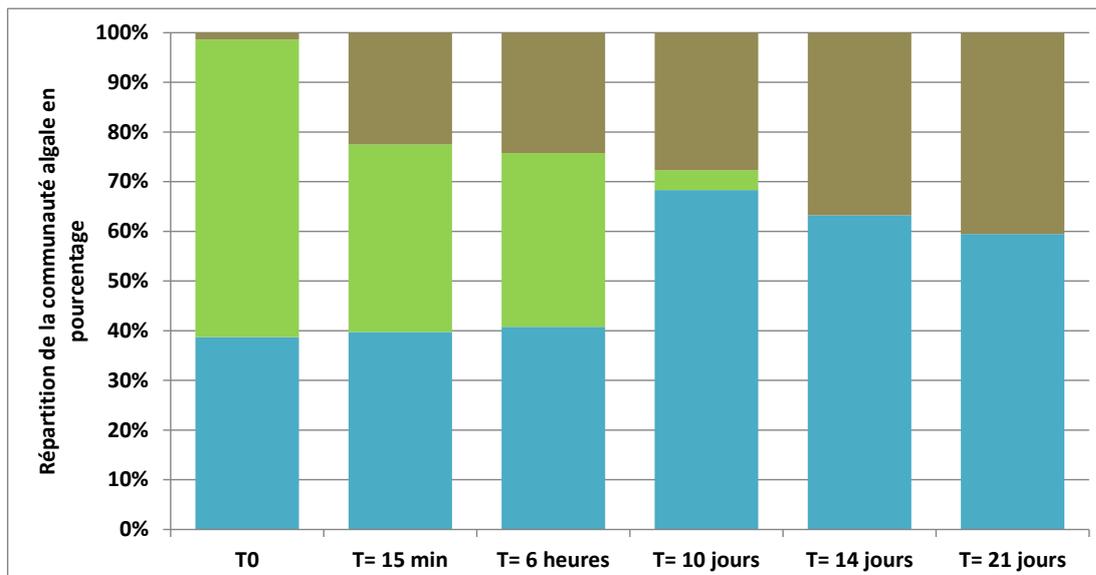


Figure 26: Répartition de la communauté algale en pourcentage en fonction du temps d'exposition en canaux témoins. Les algues vertes sont représentées en vert, les cyanobactéries en bleu, et les algues brunes en marron

3.2.2.2. Approche toxicocinétique

Les résultats issus de la quantification du diuron dans le biofilm ont confirmé la non contamination des biofilms témoins (concentrations retrouvées inférieures à la limite de quantification, n= 6) et ont montré que l'équilibre s'établissait rapidement car le plateau était atteint dans la première heure (Figure 27). Les résultats ont mis en avant des différences significatives (p -value < 0,0001) entre les témoins et les échantillons contaminés à 50 $\mu\text{g.L}^{-1}$. Cependant, les échantillons contaminés à 5 $\mu\text{g.L}^{-1}$ de diuron présentent des niveaux d'accumulation intermédiaires entre les témoins et les échantillons ayant subi une contamination plus importante (50D), sans en être statistiquement différents.

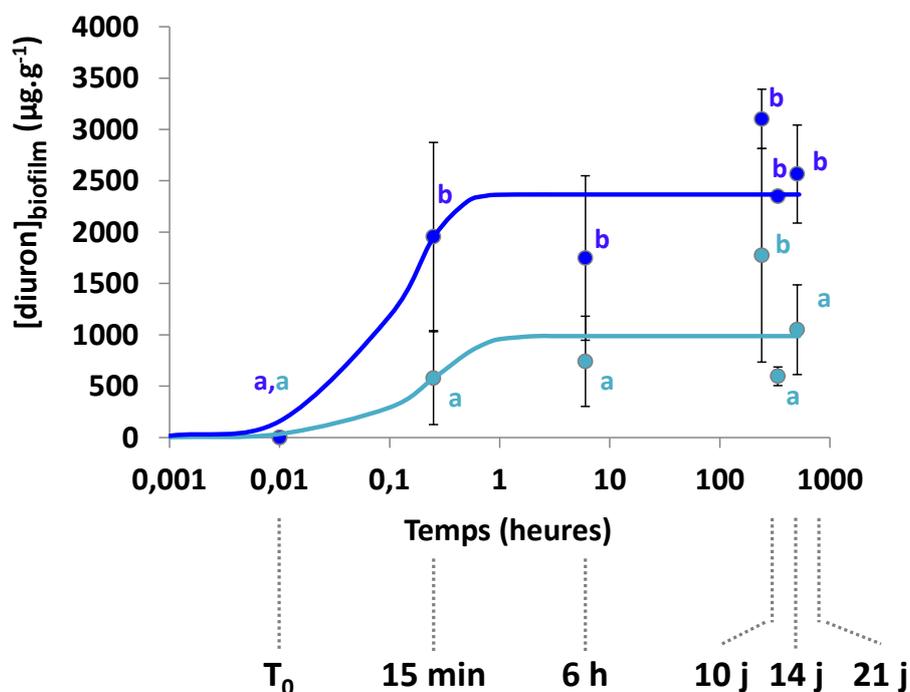


Figure 27: Moyenne des concentrations en diuron dans le biofilm en $\mu\text{g.g}^{-1}$ et les erreurs standards associées en fonction du temps d'exposition. Les points en bleu clair sont les résultats pour le biofilm exposé à 5 $\mu\text{g.L}^{-1}$ de diuron, et en bleu foncé, ceux pour l'exposition à 50 $\mu\text{g.L}^{-1}$. Les courbes sont la représentation de la cinétique d'ordre 1 associée. Les lettres représentent « l'effet temps » pour chacune des conditions d'exposition (selon la couleur : bleu clair/5D, bleu foncé/50D). Les étoiles représentent les différences significatives pour un même temps d'exposition entre les conditions, soit « l'effet concentration ». Les lettres représentent les différents groupes à l'intérieur d'une même condition d'exposition (selon la couleur de la lettre) soit l'effet temps d'exposition. P -value < 0,005

Les constantes d'équilibre eau-biofilm (K_{BW}) ont été déterminées à 987 ± 165 et 2366 ± 244 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ pour le biofilm contaminé à $5 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ et $50 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ respectivement. Les constantes d'élimination (k_e) calculées sont de $3,5 \pm 3,1$ et $6,9 \pm 4,0$ s^{-1} , selon le même ordre.

L'analyse des métabolites du diuron (DCPMU et DCPU) dans le biofilm a révélé des concentrations en dessous des limites de quantification même aux temps d'exposition les plus longs (21 jours). Ceci indique une faible métabolisation du diuron ou un rapide relargage de ces composés dans le milieu. De plus, les résultats de la quantifications des métabolites dans le milieu ont confirmé la première hypothèse car après 21 jours d'exposition, les concentrations pour ces deux métabolites étaient inférieures à la limite de quantification.

Les valeurs de BCF (ratio entre concentration en diuron dans le biofilm et dans le milieu) ont été déterminées à 251 ± 49 et 37 ± 4 $\text{L}\cdot\text{g}^{-1}$ pour les conditions contaminées à 5 et $50 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ de diuron. La dépendance des valeurs de BCF aux concentrations d'exposition a permis d'établir que la bioaccumulation du diuron était non-linéaire.

3.2.2.3. Approche toxicodynamique

En parallèle, les données sur l'inhibition de la photosynthèse (*Figure 28*) ont mis en avant le fait que le biofilm a été impacté par le diuron dès 15 min d'exposition, tandis que l'activité photosynthétique des biofilms témoins était stable dans le temps. En effet, sur toute la durée de l'expérimentation, la valeur moyenne du rendement photosynthétique est de $0,40 \pm 0,00$ avec une valeur de $0,42 \pm 0,01$ au temps initial et de $0,39 \pm 0,01$ au temps final. L'effet toxique observé suit la même tendance que la bioaccumulation du diuron, laissant entendre que l'impact sur le biofilm est immédiat. Après plusieurs heures d'exposition, une fois l'équilibre atteint, l'activité photosynthétique du biofilm exposé à 5 et $50 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ de diuron a été inhibée en moyenne de $8,5 \pm 2,8$ %, et de $18,7 \pm 2,9$ % respectivement. Pour les échantillons exposés à $50 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ de diuron, la différence est significative par rapport aux témoins à T_0 est visible dès 15 minutes d'exposition ($p\text{-value} < 0,0001$), alors que pour les échantillons exposés à $5 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$, la différence est notable statistiquement à partir de 14 jours d'exposition.

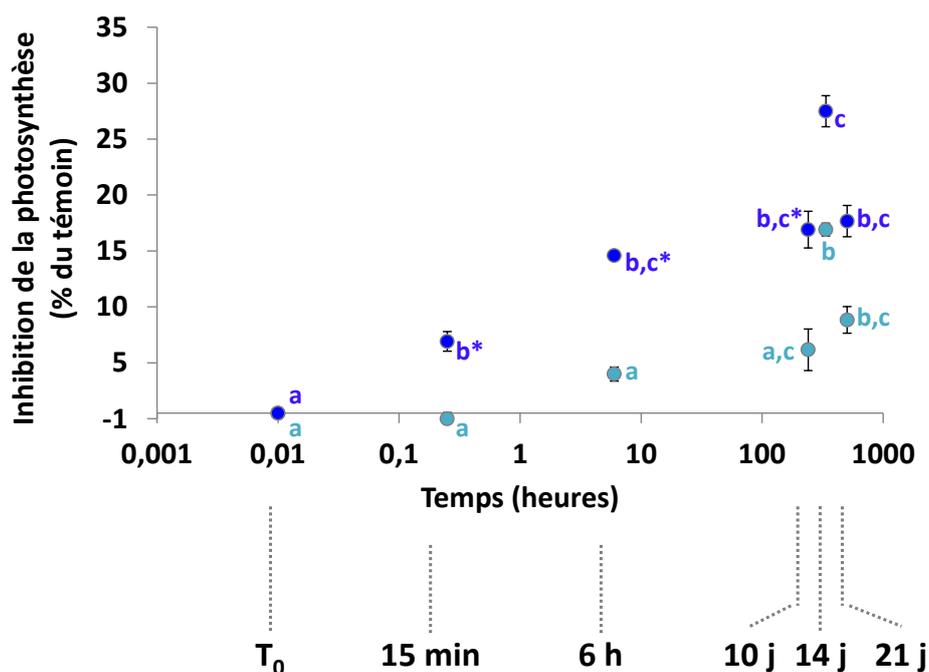


Figure 28: Moyenne de l'inhibition de la photosynthèse en pourcentage du témoin avec les erreurs standards associées en fonction du temps d'exposition. Les points en bleu clair sont les résultats pour la condition exposée à $5 \mu\text{g.L}^{-1}$, et en bleu foncé pour l'exposition à $50 \mu\text{g.L}^{-1}$. Les lettres représentent « l'effet temps » pour chacune des conditions d'exposition (selon la couleur : bleu clair/5D, bleu foncé/50D). Les étoiles représentent les différences significatives pour un même temps d'exposition entre les conditions, soit « l'effet concentration ». $P\text{-value} < 0,005$

3.2.3. Bilan

Cette première étude a mis en avant le fait que le diuron pouvait s'accumuler en quelques minutes dans le biofilm selon une cinétique d'ordre 1, et que l'équilibre eau-biofilm était atteint dans la première heure d'exposition. La constante cinétique d'équilibre a été fixée à 987 ± 165 et $2366 \pm 244 \mu\text{g.g}^{-1}$ pour une exposition à 5 et $50 \mu\text{g.L}^{-1}$ respectivement. Contrairement à Byers (2012), aucune diminution de la quantité de diuron accumulée dans le biofilm n'a été observée au cours du temps (14 jours pour Byers, 2012) en raison de l'ajout régulier de solution dopée dans le cas de cette étude sur 21 jours d'exposition.

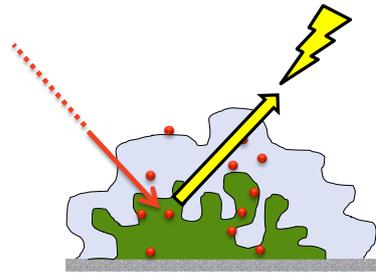
L'inhibition de l'activité photosynthétique semble se faire de façon simultanée avec la bioaccumulation dès 15 min d'exposition. Etant donné que la courbe de l'inhibition de la photosynthèse suit la même tendance que celle de la bioaccumulation au fil du temps, il semble possible d'en déduire que les effets sont globalement proportionnels à

l'accumulation, et que la composante autotrophe du biofilm montre peu de phénomène d'adaptation à l'exposition sur 21 jours. En revanche aucun effet du diuron n'est visible sur les caractéristiques structurelles (poids sec, carbone organique total, protéines et polysaccharides) et fonctionnelles hétérotrophes (activités enzymatiques) (cf. Annexe 8.2). Ceci pourrait s'expliquer par la régularité de l'énergie allouée au métabolisme non-cible du diuron.

Bien que la simultanéité des mécanismes d'absorption de d'impact ait pu être établie grâce au couplage des approches toxicocinétiques et toxicodynamiques, l'équilibre des concentrations eau-biofilm n'a pas pu être déterminé avec précision par manque de points de prélèvement aux premiers temps d'exposition, mais son atteinte rapide a été mise en évidence.

Pour cette raison, dans la suite de ces travaux, le nombre de points d'échantillonnage durant la première heure d'exposition a été augmenté (notamment pendant les 15 premières minutes auxquelles un impact était déjà notable), afin d'obtenir une meilleure caractérisation de la phase initiale d'accumulation. Le fait que l'effet toxique semble se produire en simultané avec l'accumulation dès 15 min pourrait être vérifié avec l'étude plus en détail de l'accumulation sur des temps courts d'exposition, afin d'avoir un meilleur aperçu sur le temps d'acheminement nécessaire au diuron pour atteindre les cellules.

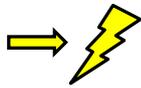
En résumé



Temps



• Accumulation: Atteinte de l'équilibre en quelques heures



• Impact toxique:

- Activité photosynthétique: effet simultané
- Caractéristiques fonctionnelles hétérotrophes et structurelles: pas d'effet

3.3. Effets du courant sur la cinétique d'accumulation et les impacts du diuron

3.3.1. Introduction

Le biofilm est composé de microorganismes enchâssés dans une matrice EPS. Cette matrice est en perpétuelle interaction avec la couche limite (WBL : water boundary layer), elle-même constamment en contact avec la colonne d'eau. Cette couche limite joue un rôle primordial dans le transfert des solutés (dans le cas présent le diuron) vers le biofilm. Selon son épaisseur elle peut faciliter ou entraver le passage du diuron. Or l'un des facteurs influençant l'épaisseur de cette couche limite est la vitesse du courant : un écoulement rapide de l'eau génère une réduction de la résistance au transfert du diuron au niveau de cette interface. Le courant peut également avoir un impact structurel sur le biofilm (par abrasion : Francoeur & Biggs, 2006 et par modification des cinétiques de colonisation : Niederdorfer et al., 2016) et ainsi jouer sur l'épaisseur de la matrice EPS faiblement liée et la distribution finale du diuron dans le biofilm.

Le courant est un facteur prépondérant dans le fonctionnement des systèmes aquatiques. Il existe notamment une variabilité importante des vitesses de courant au sein d'un même cours d'eau, au niveau spatial (radiers/mouilles) et temporel (hydrodynamique, météorologie). Ce facteur est également sujet à modifications liées au changement climatique, lors d'épisodes de crue ou de sécheresse par exemple.

Pour toutes ces raisons, l'objectif de cette étude a été de déterminer l'influence du courant sur la bioaccumulation et la toxicité du diuron dans le biofilm. Le biofilm a été exposé à deux courants différents : LowFlow ($\lll 1 \text{ cm.s}^{-1}$) représentant un milieu lentique, et Flow (2 cm.s^{-1}) correspondant à un milieu lotique, ainsi qu'à trois contaminations distinctes, soit 0, 5 et 50 $\mu\text{g.L}^{-1}$ de diuron (nommés Ctrl, 5D et 50D). Afin d'affiner les connaissances acquises précédemment (3.2) sur l'équilibre du diuron entre l'eau et le biofilm, des temps de prélèvement plus rapprochés ont été effectués au début de l'exposition, à savoir après 1, 2, 5, 15, 30 et 120 minutes d'immersion dans les canaux. La résistance au transfert du diuron associée à la couche limite et aux différentes fractions du biofilm, a été estimée dans les deux conditions de courant. Pour chaque temps d'exposition, le biofilm (Total) a été fractionné de façon à extraire les EPS faiblement liées (D-EPS) des EPS fortement liées et les

microorganismes (T-EPS-M) dans le but de suivre la distribution du diuron dans le biofilm au cours de la phase d'accumulation et d'équilibre. Les données d'accumulation globale dans le biofilm (Total), et précisément dans les T-EPS-M, ont été comparées aux résultats d'impact toxique afin d'établir le lien entre toxicité et localisation du diuron.

3.3.2. Influence du courant sur la toxicocinétique et toxicodynamique du diuron sur les biofilms d'eau douce

Article publié dans *Science of the Total Environment*, sous la référence " Chaumet, B., Morin, S., Hourtané, O., Artigas, J., Delest, B., Eon, M., & Mazzella, N. (2019). Flow conditions influence diuron toxicokinetics and toxicodynamics in freshwater biofilms. *Science of the Total Environment*, 652, 1242–1251. "

Flow conditions influence diuron toxicokinetics and toxicodynamics in freshwater biofilms

Betty Chaumet^{1*}, Soizic Morin¹, Océane Hourtané¹, Joan Artigas², Brigitte Delest¹, Mélissa Eon¹, Nicolas Mazzella¹

¹Unité de recherche EABX, Groupement Irstea de Bordeaux, 50 Avenue de Verdun, 33612 Cestas Cedex, France

²Université Clermont Auvergne, CNRS, Laboratoire Microorganismes: Génome et Environnement, 63000 Clermont-Ferrand, France

*corresponding author: betty.chaumet@irstea.fr

Keywords: Freshwater biofilms, pesticide, bioaccumulation, TK-TD, distribution, photosynthesis inhibition

Abstract

Biofilms are considered as good bioindicators of contamination by means of their capacity to react quickly to xenobiotics exposure, and their pivotal role in sustaining the aquatic trophic web. In the literature, kinetic transfer of organic contaminants from water column to biofilms is poorly described. The exchanges of dissolved substances between these two compartments can be modulated by flow velocity. This study deals with toxicokinetic (transfer mechanisms) and toxicodynamic (effects) modelling of pesticides under two contrasted flow conditions.

Diuron was used to run a 2-h kinetic study on mature biofilms in river channels. Two flow conditions were considered ($\lll 1 \text{ cm.s}^{-1}$ or 2 cm.s^{-1} corresponding respectively to lentic environments such as ponds and lakes, and lotic environments such as small watercourses). Three diuron concentrations were tested in order to estimate contamination levels in

biofilms: 0 (control), 5 (environmentally relevant concentration) and 50 (10 fold higher, to determine the concentration effect) $\mu\text{g.L}^{-1}$. In parallel, the effect of the above-mentioned factors was also assessed on biofilms photosynthesis inhibition. For successive sampling times between 0 and 2 h, the raw biofilms and EPS tightly bound to cells plus microorganisms, named T-EPS-M, were physically separated and analyzed for diuron accumulation and structural and functional microbial descriptors .

Diuron amounts accumulated in biofilm increased with increasing diuron exposure. Biofilms accumulated higher amounts of diuron at the lower flow velocity compared to high flow for raw biofilms, while diuron accumulation in the T-EPS-M fraction was similar between flow conditions. Consequently, both flow velocity and diuron exposure had an influence on diuron bioaccumulation and distribution. Photosynthesis inhibition was higher with increasing concentrations and exposure duration until reaching maximal effect when equilibrium was reached, while no interaction with flow velocity was observed: no differences were visible between the two flow conditions. Photosynthesis inhibition over time was directly linked to the concentration of diuron recorded in the T-EPS-M fraction.

These results suggest that flow causes a loss of organic matter in biofilms, decreasing the total accumulation of diuron, especially within diffusible EPS. As pesticide distribution in biofilm is a major factor in the onset of toxicity, the novel fractioning method presented here will improve further toxicokinetic and toxicodynamic studies dealing with biofilms exposed to organic toxicants.

3.3.2.1. Introduction

Because of their massive use, pesticides are widely spread into the environment reaching all compartments (water, soil, air). As aquatic environments are final receptacles of contamination, the EU Water Framework Directive (directive 2000/60/EC) seeks to reach a good ecological status of surface and groundwaters, including rivers (Kohusova et al., 2011). Forty-five compounds were therefore classified as priority substances, and this list includes 24 pesticides comprising diuron. These organic contaminants can disturb aquatic ecosystem

functioning, as they may affect non-target organisms such as autotrophic organisms in biofilms communities (DeLorenzo et al., 2001).

Owing to their ubiquitous presence in freshwaters, biofilms are broadly used as bioindicators for monitoring the ecological quality of rivers (Camotti Bastos et al., 2018; Edwards & Kjellerup, 2013). They are comprised of microorganisms like microalgae, fungi and bacteria embedded in a matrix of Extracellular Polymeric Substances (EPS), and generally constitute the basis of the trophic chain in autotrophic stream ecosystems (Flemming et al., 2007; Mora-Gómez et al., 2016). Biofilms are able to uptake and respond quickly to contaminations. For this reason, they are also a good biological model for ecotoxicology studies (Vercaere-Eairmal et al., 2010; Guasch et al., 2016).

Herbicide impacts on biofilms have been widely studied. Some of their effects are now well-known, like decrease in photosynthesis activity, growth inhibition and changes in biofilms community structure (Kim Tiam et al., 2016; Pesce et al., 2011). Diuron (photosynthesis inhibitor herbicide) effects on biofilms have been assessed because its toxic impact is already known (Kim Tiam et al., 2015) even at low doses (in the range of $\mu\text{g.L}^{-1}$) (Pesce et al., 2016). In fact, this molecule, which locks electron transfer into photosystem II, acts quickly on biofilms and is quite persistent (Neuwoehner et al., 2010).

Biofilms structure and pesticide uptake by biofilms can be affected by environmental factors such as temperature, light (Villeneuve et al., 2010), pH, nutrients, or flow velocity (Villeneuve et al., 2011). However, only a few papers have dealt with the influence of flow velocity on pesticide transfer and distribution in biofilms (Villeneuve et al., 2011).

The water boundary layer (WBL) plays a key role in the mass transfer of solutes into the biofilms matrix, and consequently into microbial cells. The thickness of the boundary layer is mainly affected by flow velocity (De Beer et al., 1994; Zhang & Davison, 1995), and it is well-known that flow velocity can also decrease biofilms biomass (Battin et al., 2003). Boundary layer thickness decrease could impact pollutant uptake by biofilms (Campbell et al., 2002), and also decrease resistance to solutes transfer, therefore favouring bioaccumulation.

The WBL is continually in interaction with the water column and the biofilms matrix. This matrix contains EPS, including polysaccharides and proteins (among other compounds) which are able to sorb organic compounds (Flemming & Wingender, 2010) such as

pesticides. The matrix can also retain organic matter. EPS in biofilms is comprised of a diffusible fraction and a cell-bound fraction (Zhang et al., 2014). For instance, some EPS loosely bound to microorganisms (Aguilera et al., 2008) are partially soluble in the water.

In order to obtain a better understanding of pesticide distribution in biofilms, each type of EPS fraction and the microorganisms must be analysed separately. Usually, the extraction of the EPS fractions can be performed with a cation exchange resin (Comte et al., 2006). Interactions between organic compounds and sorbents like resins were identified by Bäuerlein et al. (2012), while competition phenomenon between resin and biofilms for pesticides affinity (pesticides could stick to the resin) are poorly known. To date, no specific method has been developed to overcome this limitation, making the separate analysis of organic compounds in the biofilms fractions challenging.

The objective of this study was to couple two approaches in order to determine diuron transfer and distribution (toxicokinetics) in aquatic biofilms and the associated toxic impact (toxicodynamics). Specifically, we assessed the influence of flow velocity and diuron concentration on pesticide transfer and distribution in biofilms. To this aim, we first developed a physical extraction method to split the biofilms into diffusible and cell-bound EPS fractions allowing to assess diuron transfer in biofilms. Then we used a simple two-compartment (water-biofilm) model involving first-order kinetics, to characterize the mechanisms and kinetics of diuron in biofilms. From this model, the associated kinetic constants (accumulation, elimination and equilibrium) were calculated to determine the behaviour of diuron in the different biofilm fractions. In parallel, photosynthesis inhibition was assessed as a toxicity endpoint.

3.3.2.2. Materials and methods

Chemicals and solvents

Diuron (CAS: 330-54-1, purity: 99 %, Ehrenstorfer GmbH) stock solution was prepared in acetonitrile (CAS: 75-05-8, purity: 99.97 %, Biosolve) at a final concentration of 200 mg.L⁻¹. Phosphoric acid (CAS: 7664-38-2 – purity: 85 %) and acetone (CAS: 67-64-1, purity: 99.5 %) were issued by Chem-Lab. Phenol (CAS: 108-95-2, purity: 99 %) and D(+) – glucose

anhydrous solution (CAS: 50-99-7) were provided by Scharlab, methanol (CAS: 67-56-1, purity: 99.95 %) and acetonitrile (CAS: 75-05-8, purity: 99.97 %) by Biosolve, Bovine Serum Albumine (BSA, CAS: 9048-46-8), 4-methylumbelliferyl N-acetyl- β -D-glucosaminide (CAS: 37067-30-04) and 4-methylumbelliferyl- β -D-glucopyranoside (CAS: 18997-57-4) by Sigma, 7-Hydroxy-4-methylcoumarin (MUF, CAS: 90-33-5, purity: 97 %) by Acros Organics and sulphuric acid (CAS: 7664-93-9, purity: 95 %) by VWR. Bradford reagent was prepared with 3.3 mg of Brilliant blue G (CAS: 6104-58-1 – Sigma), 33.3 mL of methanol, 66.67 mL of phosphoric acid (CAS: 7664-38-2 – purity: 85 % - Chem-Lab), and 900 mL of ultra-pure water. An enzymatic activity reagent solution was prepared with 803.5 mL of NaOH solution at 8 g.L⁻¹ (CAS: 1310-73-2 - purity: 98 % - Sigma-Aldrich) and 196.5 mL of a glycine solution at 75.04 g.L⁻¹ (CAS: 17-1323-01 – purity: 99.7 % - GE-healthcare - Life sciences). Surrogates stock solution was made with Monuron d6 at a final concentration of 10 mg.L⁻¹ (CAS: 217488-65-8), Prometryn d6 at 1 mg.L⁻¹ (CAS: 1705649-52-0) and Simazine d5 at 20 mg.L⁻¹ (CAS: 220621-41-0), all provided by Dr. Ehrenstorfer GmbH. Two UPLC-ToF buffers were used for diuron quantification and contained ammonium acetate buffer which was made with 0.7708 g of ammonium acetate (CAS: 631-61-8), into 1 L of ultra-pure water UPLC (CAS: 7732-18-5) adjusted pH at 5, and methanol UPLC (CAS: 67-56-1, purity: 99.98 %), all solvents provided by Biosolve. Internal standards were prepared to reach the final concentration of 10 mg.L⁻¹ with: Diuron d6 (CAS: 1007536-67-5 – purity: 98 %), Atrazine desethyl d6 (1216649-31-8 – purity: 98 %), Atrazine d5 (CAS: 163165-75-1, purity: 98.5 %), Pirimicarb d6 (CAS: 1015854-66-6 – purity: 97.5 %), Carbofuran d3 (CAS: 1007459 – purity: 98 %), Metolachlor d6 (CAS: 1219803-97-0 – purity: 97.7 %), Tebuconazole d6 (CAS: 107534-96-3 – purity: 97 %) and Methomyl (CAS: 16752-77-5), all provided by Dr. Ehrenstorfer GmbH.

Experimental design

Glass slides were colonized by biofilms (L: 26 cm, l: 6 cm) during one month in March 2017, in Gazinet-Cestas pond (South West France, geographical coordinates: 44°46'30.1"N, 0°41'44.3"W), which was characterized as hypereutrophic. After one month of colonization in the field, slides covered by mature biofilms were collected and randomly placed horizontally at the bottom of laboratory channels.

The experimental system was composed of three independent artificial stream channels per treatment (L: 50 cm, l: 9.2 cm, H: 5 cm), each supplied with recirculating Dauta medium (see *Tableau SI 1*, Dauta, 1982) ($7.5 < \text{pH} < 8$). Two independent experiments were performed with this design, at two different flows: one quasi static ($\lll 1 \text{ cm.s}^{-1}$, flow rate: $1.67 \text{ cm}^3.\text{s}^{-1}$), corresponding to lentic conditions (called LowFlow) provided with peristaltic pumps, and one with flow (2 cm.s^{-1} , delivery rate: $9.10^{-5} \text{ m}^3.\text{s}^{-1}$, renewal rate: every hour), corresponding to lotic conditions (named Flow), provided with an immersed pump. Three diuron treatments were tested: one control with diuron concentrations $<$ limits of quantification ($\text{LQ} = 0.5 \text{ }\mu\text{g.L}^{-1}$), namely Ctrl, one contaminated with $5 \text{ }\mu\text{g.L}^{-1}$ (5D) and one with $50 \text{ }\mu\text{g.L}^{-1}$ of diuron (50D) (*Tableau 5*). Diuron was diluted with acetonitrile, however, the maximum acetonitrile concentration reached represented 0.25 % of the whole water volume in the channel, which was not expected to provoke toxic effects on biofilms (about ten times below the concentration causing a 0.1 % inhibition of photosynthesis: 2.3 % [CI, $\alpha=0.05:1.8-3.4$ %]: Neury-Ormanni, unpublished data). The experiments were carried out in a thermo-regulated room at $21.3 \pm 0.3 \text{ }^\circ\text{C}$ (measured every 10 minutes, $n = 800$), with a continuous light at a non-stressful incident light intensity of $8.19 \text{ }\mu\text{mol.s}^{-1}.\text{m}^{-2}$.

Biofilms sampling and preparation

For all treatments, biofilms were collected before immersion into the channel (T_0) and after 1, 2, 5, 15, 30 minutes and 2 hours of diuron exposure. While four replicates were sampled at initial (T_0) and final ($T = 2 \text{ h}$) times, the rest were performed in triplicate.

At each sampling date, the biofilms were scrapped carefully from the glass slides with a razor blade and suspended in beakers containing a standard volume of Dauta medium (on final average dry weight of 1.15 g per litre). Biofilms suspensions were agitated using a magnetic agitator for 30 minutes (150 rpm), at a $20 \text{ }^\circ\text{C}$ temperature in order to homogenize samples before analyses.

Biochemical and functional analyses (total organic carbon, polysaccharide and protein quantification, enzymatic and photosynthetic activity measurements, following sections) were performed using aliquots of biofilms suspensions. All analyses were performed on each

sampling time, except for polysaccharide content, protein content and enzymatic activities, that were determined only for initial (T_0) and final ($T= 2h$) times. Aliquots from the remaining suspension were directly filtered with previously-weighed ashed GF/F filters (\varnothing 90 mm, pore size: 0.7 μm , Whatman). The filters were then used to calculate biofilms dry weight and the total concentration of diuron accumulated in the biofilms matrix. Simultaneously, other aliquots were collected to characterize diuron distribution in the different biofilms fractions (EPS tightly bound to cells plus microorganisms obtained as described in the next section) (*Figure SI 1*).

Biofilms characterization

EPS extraction and fractioning

Diuron was quantified in raw biofilms, and in EPS tightly bound to cells plus microorganisms (T-EPS-M). Total diuron bioaccumulation was quantified on the raw biofilms using filters dedicated to dry weight analysis.

EPS fractioning of the biofilms suspension was obtained after sonicating twice in a bath (47 kHz, 335 W) for 10 seconds (with 1 minute of recovery between sonications), centrifugation at 5000 rpm during 20 minutes to separate D-EPS (supernatant fraction), and T-EPS-M (pellet fraction) (adapted from Artigas et al., 2017). The pellet fraction was re-suspended, and 1.5 mL were harvested for TOC measurements and diluted with 32 mL of ultrapure water added prior to analysis. The remaining sample was filtrated on a Buchner and the filters were lyophilized before analyses. Diuron quantification in the raw biofilms and in the T-EPS-M fraction was achieved following the protocol detailed in "*diuron quantification*" section.

Dry weight

Biofilms collected on pre-weighed GF/F filters was lyophilised (ALPHA 1-2 Dplus CHRIST, Germany) and re-weighed. Using the conversion factor between glass slide area and suspension volume, dry weight was expressed as $\text{mg}\cdot\text{cm}^{-2}$ of substratum.

Total organic carbon

Total organic carbon (TOC) was analysed in raw and T-EPS-M fractions with a wet chemical organic carbon analyser (TOC-VW, Shimadzu, France). The samples were treated with phosphoric acid, and the amount of CO₂ formed was determined by infrared detection, with a detection limit of 0.5 mgCO₂.L⁻¹ (30 µgC.g⁻¹ of dry weight). TOC concentrations were calculated by means of a standard curve performed with six points from 0 to 25 mg.L⁻¹ of CO₂ (1.5 mgC.g⁻¹ dry weight).

Polysaccharide content

The phenol-sulphuric acid assay (Dubois et al., 1956) was used to determine polysaccharide content of the raw biofilms and T-EPS-M. Briefly, phenol and sulphuric acid were added to 500 µL of suspended biofilms samples. Samples were incubated during 10 min at room temperature and 20 min in a water bath at 30°C. Then, the absorbance was measured with a microplate reader at 485 nm (Synergy™ HT, Biotek, USA). Polysaccharide concentrations were calculated based on a standard curve of D(+)-glucose anhydrous solution in the range 0 to 750 µg.L⁻¹. Polysaccharide concentrations in the samples were expressed as mg of glucose-equivalent per cm².

Protein content

Protein content was analysed using the Bradford method (1976) with slight modifications. After addition of 4.5 mL of methanol to 500 µL of biofilms suspension, samples were ultrasonicated for 20 minutes. Samples were evaporated with a SpeedVac (Thermo Fisher Scientific, France) and refilled with 500 µL of ultra-pure water in order to concentrate proteins in the samples. A 2.5 mL volume of Bradford reagent was added to the samples which were gently agitated. Then the absorbance was measured with a microplate reader at 595 nm (Synergy™ HT, Biotek, USA). Protein concentrations were obtained from a standard curve of Bovine Serum Albumine (from 0 to 250 µg.L⁻¹). Protein concentrations were expressed as mg of BSA-equivalent per cm².

Enzymatic activities

Two extracellular enzymatic activities, β -glucosaminidase (EC 3.2.1.30) and β -glucosidase (EC 3.2.1.21), were measured, following a protocol adapted from Romaní et al. (2008). The potential activities of β -glucosaminidase and β -glucosidase were determined using the fluorescent-linked substrate 4-methylumbelliferyl N-acetyl- β -D-glucosaminide and 4-methylumbelliferyl- β -D-glucopyranoside, respectively. Enzymatic activity assays were run at substrate saturating concentrations for epilithic biofilms, i.e. 0.3 mmol.L⁻¹. A 150 μ L volume of substrate was added to samples and agitated at 80 rpm during one hour, in the dark. After incubation, the reaction was stopped by addition of glycine buffer (pH = 10.4). Then, fluorescence of the samples was measured with a microplate reader (Synergy™ HT, Biotek, USA) at excitation-emission wavelengths of 365-455 nm, respectively. Enzymatic activities were expressed as mg MUF per cm² h⁻¹ after fluorescence value conversion thanks to a calibration curve elaborated with 7-Hydroxy-4-methylcoumarin (MUF) ranging from 0 to 50000 μ g MUF.L⁻¹.

Photosynthetic activity

Chlorophyll *a* fluorescence and photosynthetic activity (effective photosystem II quantum yield, Φ_{PSII}) measurements were determined by means of a Pulse Amplitude Modulated fluorimeter (PhytoPAM, Heinz Walz GmbH, Germany), based on the average of 5 values per replicate.

Chlorophyll *a* fluorescence measurements in control samples were used as a proxy of chlorophyll *a* concentration (Corcoll et al., 2012). Measurements in the 5D and 50D were not considered due to the diuron-induced increase in fluorescence (Lichtenthaler et al., 1997).

The photosynthetic activity was measured on raw biofilms for each treatment and flow condition. Mean Φ_{PSII} values were measured after 15 minutes of light adaptation; they were then expressed as the inhibition of photosynthesis, in percentage of average control values measured at each sampling time.

*Exposure condition and diuron analysis**Physicochemical conditions in the channels*

Dissolved nutrients (nitrate and phosphate) in channels were analysed in triplicate by ion chromatography (COMPACT 881 IC Pro, Metrohm, Switzerland) coupled with a conductivity detector (Metrohm 850 IC, Switzerland). This measure was performed on 10-mL samples of water collected at initial sampling time, with a Metrosep A sup 5 – 250/4.0 anion exchange column and an eluent solution containing 3.2 mM Na₂CO₃ and 1 mM NaHCO₃. Limits of quantification were 0.01 mg.L⁻¹ for NO₃ and 0.01 mg.L⁻¹ for PO₄.

Air and water temperature were measured by means of data loggers (Tinytag, Radiospire), every ten minutes during the entire experiment. Light intensity was determined by a lightmeter (LI-COR Li-250, USA) and the values given here were an average of three measures carried out at slide height.

Exposure in channels

At each sampling time, 3 mL of water were collected from each channel for monitoring diuron concentration levels. Water samples were filtered on syringe-filters (pore: 0.45 µm, hydrophilic regenerated cellulose membrane, Whatman) and filtrated water sample were inserted into vials with 10 % of final volume of the solution of 8 internal standards before analysis.

Sample preparation

Pesticides were extracted from biofilms (raw biofilms and T-EPS-M fraction, at least 1 mg of dry weight biofilms) by Accelerated Solvent Extraction (ASE 2000, Dionex, France). ASE cells were filled with a cellulose filter (Thermo Scientific, USA) and the filter containing biofilms, Fontainebleau sand, and 10 µL of surrogates (Monuron d6, Prometryn d6 and Simazine d5) to control the percentage of recovery. ASE cells were introduced in the ASE device, at a pressure of 70 bars and a temperature of 100°C, using acetone as a solvent. Afterwards,

acetone was evaporated to dryness under nitrogen gas using a Visidry™ system (Supelco) and pesticides were redissolved in 10 mL of ultra-pure water.

Samples were purified using Solid Phase Extraction (SPE). HR-X Chromabond (Macherey-Nage, Germany) cartridges were used. Prior to extraction, the cartridges were conditioned with 5 mL of methanol and 5 mL of ultra-pure water. The samples were percolated through the cartridge, then rinsed with a solution containing 20 % of methanol and 80 % of ultra-pure water. Then, the cartridges were dried with nitrogen gas for 30 minutes and eluted with 5 mL of acetonitrile. After total evaporation of the solvent with a SpeedVac (Thermo Fisher Scientific, France), the sample extracts were dissolved in 1 mL of ultra-pure water. They were then processed as described in “*EPS extraction and fractioning*” section.

Diuron quantification

Twenty μL of samples were injected with a solvent gradient containing 98 % of ammonium acetate and 2 % of methanol UPLC. Internal standards were added to all samples prior to analysis, to a final volume of 10 %. Diuron was quantified with a UPLC-ToF (Ultra-Performance Liquid Chromatography – Time of Flight Mass Spectrometry, Xevo G2-S ToF, Waters). The electrospray source was operated in positive mode at 0.7 kV and the sample cone voltage set at 30 V. Nitrogen was used as a nebulizer (flow rate 50 L h^{-1} , 150°C) and desolvation gas (flow rate 1200 L h^{-1} , temperature 600°C). Data was acquired in the range from 50 to 1200 m/z and acquisition speed was set to 0.2 s. The resolving power full width at half maximum (FWHM) was 30,000 at m/z 556.2771 (leucine enkephalin used as lockmass compound). Data was acquired using MS^E in order to obtain both protonated molecular ions at low collision energy ($\text{CE} = 6 \text{ eV}$) and/or adducts and fragment ions with a collision energy ramp ($\text{CE} = 10\text{--}30 \text{ eV}$). Chromatographic separation was achieved on an ACQUITY BEH C18 column $50 \times 2.1 \text{ mm}$, $1.7 \mu\text{m}$ (Waters), with a column temperature of 45°C and using a binary gradient of ammonium acetate buffer (A) and methanol (B) both containing ammonium acetate (10 mM) at pH 5.0. A flow rate of 0.45 mL min^{-1} was used and the gradient ranged as follows: 98 % A (0–3.6 min), 2 % A (3.6–6 min). Data treatment was performed with

MassLynx V4.1. Ion extraction was performed with 10 mDa mass window at the expected retention time (± 0.2 min). One or two fragment ions were used for the confirmation.

Pesticide concentrations were determined with a ten-point calibration curve from 0 to 50 $\mu\text{g.L}^{-1}$. The results were analysed by MassLynx software V4.1. Three quality controls were performed every 10 samples with three points from the calibration curve: 0, 1 and 10 $\mu\text{g.L}^{-1}$.

Data modelling and analysis

A simple two-compartment water-biofilm absorption kinetic model was used to characterize the toxicodynamics of diuron in biofilms. A first-order absorption kinetic model was applied to diuron concentration data from biofilms experiments (*Equation 3*), where $[\text{diuron}]_{\text{biofilm eq}}$ represents diuron concentration in biofilms at equilibrium ($\mu\text{g.g}^{-1}\text{.cm}^{-2}$), t (min) the time and k_e the exchange kinetic constant (min^{-1}). The data modelling was carried out with XLstat software® (version 2015.1.03.15828).

Equation 3

$$[\text{diuron}]_{\text{biofilm}} = [\text{diuron}]_{\text{biofilm eq}} * (1 - e^{-k_e * t})$$

After determination of parameters from the first order kinetic, the time to reach 95 % ($t_{95\%}$) of the concentration of equilibrium was calculated from *Equation 3*. Diuron bioaccumulation was expressed as BCF (Bioconcentration Factor) and calculated using *Equation 4*.

Equation 4

$$BCF = \frac{[\text{diuron}]_{\text{biofilm eq}}}{[\text{diuron}]_{\text{water}}}$$

The global mass transfer coefficient (k_0) was determined in order to estimate the diffusion rate of diuron through biofilms. This coefficient was calculated according to *Equation 5* (Huckins et al., 2006) and expressed in min.cm^{-1} , with k_e and BCF values previously defined, and biofilms dry weight (m) and exchanging surface area (A) in g and cm^2 , respectively.

Equation 5

$$k_0 = \frac{k_e * m}{A} * BCF$$

The overall resistance to the mass transfer ($1/k_0$) was obtained from k_0 calculated using Equation 5, and corresponded to the sum of all the mass transfer resistances of biofilms components expressed in $\text{cm} \cdot \text{min}^{-1}$ ($1/k_{WBL}$: from the water boundary layer, $1/k_{D-EPS}$: from the D-EPS fraction and $1/k_{T-EPS-M}$: from the T-EPS-M fraction), as presented in Equation 6 (Huckins et al., 2006):

Equation 6

$$\frac{1}{k_0} = \frac{1}{k_{WBL}} + \frac{1}{k_{D-EPS}} + \frac{1}{k_{T-EPS-M}}$$

$1/k_0$ estimates provide information about the resistance encountered by the diuron to cross the different compartments, from the water column to the biofilms fractions.

The single and interactive effects of flow and diuron concentration on changes in biofilms characteristics (dry weight, TOC, protein, polysaccharides content, enzymatic activity, chlorophyll a) over the experiment were determined using R software (Version 1.0.153 – © - 2017 RStudio, Inc.) with a linear mixed-effect model, using the library *nlme* (package version: 3.1-113). The model had two fixed factors: flow (2 levels) and diuron concentration (3 levels), and assumed nested random effect structure for sampling time and replicates. Its formulation for response variables (*response*) took the form:

Response ~ *flow* * *concentration* | *time* / *replicate*.

In order to verify whether flow velocity and/or treatment had an influence on bioaccumulation, toxic impact and overall mass transfer resistance, statistical analyses were carried out with XLStat software. Non-parametric tests like Kruskal-Wallis or Wilcoxon were performed to highlight significant differences. A p-value of < 0.05 was considered significant.

3.3.2.3. Results

Physicochemical conditions

During the experiment, water physicochemical characteristics (nitrates, organophosphates, and water temperature) were similar between treatments and conditions, with the exception of diuron concentration (*Tableau 5*). In the controls, diuron concentrations were below quantification limits (*Tableau SI 2*), while concentrations averaged $3.95 \pm 0.29 \mu\text{g.L}^{-1}$ and $39.79 \pm 2.51 \mu\text{g.L}^{-1}$ in the diuron exposed channels (5D and 50D, respectively). Overall, diuron concentrations in channels were in the same range as nominal concentration values (*Tableau 5*).

Tableau 5: Physicochemical conditions and diuron contamination (mean \pm standard deviation (n)) in the channels during the experiment

Parameter	LowFlow	Flow
Nitrate ($\text{mgNO}_3\text{.L}^{-1}$)	13.5 ± 1.2 (6)	
Orthophosphate ($\text{mgPO}_4\text{.L}^{-1}$)	10.8 ± 0.5 (6)	
Water temperature ($^{\circ}\text{C}$)	19.3 ± 0.4 (6)	
$[\text{diuron}]_{\text{water}} \text{Ctrl}$ ($\mu\text{g.L}^{-1}$)	< 0.5 (4)	< 0.5 (3)
$[\text{diuron}]_{\text{water}} \text{5D}$ ($\mu\text{g.L}^{-1}$)	3.6 ± 0.4 (4)	4.4 ± 0.4 (3)
$[\text{diuron}]_{\text{water}} \text{50D}$ ($\mu\text{g.L}^{-1}$)	35.4 ± 2.5 (4)	45.6 ± 1.5 (3)

Biofilms characterization

At the start of the experiment (T_0), biofilms showed similar dry weight, total organic carbon content, protein content, and polysaccharide content (*Tableau 6*). Chlorophyll *a* and enzymatic activities, however, were slightly lower in the Flow condition comparing to the LowFlow condition already at T_0 .

The flow factor was significant for biofilms measured parameters most of the time, while the concentration of diuron exposure (treatment factor) was not meaningful. At the end of the experiment (T= 2h), TOC was 10 times lower in the Flow condition than under LowFlow (*Tableau 6*). As for TOC, protein contents were on average 2 times lower under Flow condition than under LowFlow condition. An interaction between flow and diuron concentration was found for chlorophyll *a*, probably because of initial differences that persisted during the experiment. Since the experiment lasted for 2 hours, changes in biofilms structure due to diuron exposure were very weak and rather caused by flow. Indeed, for example, the influence of flow velocity was marked on most structural descriptors, generally by a decrease.

Tableau 6: Main descriptors (mean \pm standard deviation) for Raw biofilms and the T-EPS-M fraction under control and contaminated conditions at 5 and 50 $\mu\text{g.L}^{-1}$ of diuron (named respectively Ctrl, 5D and 50D). Significantly influent factors were determined with a linear mixed-effect model.

Descriptor	Fraction used (average)	T0		T=2h						Influent factor	Effect ^a	p-value
		LowFlow	Flow	LowFlow			Flow					
		Ctrl	Ctrl	Ctrl	5D	50D	Ctrl	5D	50D			
Dry weight per substrate surface unit ($\mu\text{g.cm}^{-2}$)	Raw and T-EPS-M	736 \pm 181	776 \pm 163	439 \pm 113	514 \pm 136	477 \pm 150	399 \pm 113	377 \pm 96	503 \pm 160	Flow	LF>F	<0.0001
TOC (mg C.g ⁻¹ of dry weight)	Raw	10.6 \pm 3.1 ^b	10.4 \pm 3.1 ^b	23.2 \pm 6.8 ^b	23.7 \pm 6.9 ^b	23.3 \pm 6.8 ^b	3.6 \pm 1.1 ^b	2.6 \pm 0.8 ^b	2.1 \pm 0.6 ^b	Flow	LF>F	0.0180
Proteins ($\mu\text{g C.g}^{-1}$ of dry weight)	Raw and T-EPS-M	19 \pm 9	16 \pm 8	30 \pm 15	29 \pm 19	32 \pm 11	18 \pm 7	15 \pm 7	10 \pm 3	Flow	LF>F	0.0177
Polysaccharides ($\mu\text{g C.g}^{-1}$ of dry weight)	Raw and T-EPS-M	1573 \pm 428	1681 \pm 369	na	na	na	1720 \pm 373	1695 \pm 466	1477 \pm 425	na	na	na
β -glucosidase ($\mu\text{g Eq MUF.h}^{-1}$)	Raw and T-EPS-M	277 \pm 15	410 \pm 31	163 \pm 6	251 \pm 48	244 \pm 43	266 \pm 40	221 \pm 38	210 \pm 32	Flow	LF>F	<0.0001
β -glucosaminidase ($\mu\text{g Eq MUF.h}^{-1}$)	Raw and T-EPS-M	426 \pm 43	531 \pm 41	316 \pm 14	289 \pm 33	293 \pm 55	364 \pm 54	216 \pm 36	149 \pm 39	/	/	/
Chlorophyll a ($\mu\text{g.cm}^{-2}$)	Raw	75 \pm 6	60 \pm 6	58 \pm 9	82 \pm 12	129 \pm 36	48 \pm 7	53 \pm 11	66 \pm 14	Flow * Treatment	LF* 50D	0.0052

^a LF: LowFlow, F: Flow, ^b mean \pm analytical standard deviation because of lack of replicates

na: data non available

*Toxicokinetic approach**Pesticide accumulation in raw biofilms*

Thanks to the establishment of the first-order absorption kinetic model, the kinetic constants were established (Equation 1 to 4) and are presented in Table 3. In addition, the regression coefficients obtained using the graphical representations (Fig. 1) were generally acceptable (between 0.53 and 0.75). For all treatments and conditions, the equilibrium between water column and biofilms was quickly reached, within 3 to 39 min (*Tableau 7*). Flow and the highest diuron exposure (50D) had an interactive influence on total pesticide bioaccumulation in biofilms. Biofilms from LowFlow condition and 50D treatment accumulated twice more diuron ($62 \pm 17 \mu\text{g.g}^{-1}\text{.cm}^{-2}$) than in Flow condition ($30 \pm 11 \mu\text{g.L}^{-1}\text{.cm}^{-2}$). For 5D, no significant impact of flow was observed between the two flow conditions (LowFlow: 11 ± 1 and Flow: $8 \pm 3 \mu\text{g.L}^{-1}\text{.cm}^{-2}$, *Tableau 7*), while the curve of accumulation over time (*Figure 29*) showed a trend towards higher diuron uptake under LowFlow condition than under Flow condition.

BCF values were lower for 50D than for 5D irrespective of flow condition (e.g. for LowFlow, 50D: $1.79 \pm 0.50 \text{ L.g}^{-1}$, 5D: $3.14 \pm 0.41 \text{ L.g}^{-1}$, *Tableau 7*). At the 50D treatment, BCF values under LowFlow condition (1.79 L.g^{-1}) were significantly higher than under Flow condition (0.66 L.g^{-1}). This provides evidence that higher flow velocity and exposure concentration contribute to BCF. The values from 5D were higher than for the 50D treatment, meaning that the accumulated amount of diuron was not proportional to the diuron concentration in the water (*Equation 4*).

Flow condition had an effect on the overall mass transfer resistance ($1/k_0$) (*Tableau 7*), this coefficient being about 35 % higher under LowFlow than under Flow conditions, meaning that diuron transfer into biofilms was reduced with lower flow velocity. For a given Flow condition, $1/k_0$ values were similar between treatments (with 10-12 % of variability). Assuming that, at a given concentration of exposure, mass transfer resistance in raw biofilms ($1/k_{\text{D-EPS}} + 1/k_{\text{T-EPS-M}}$, *Equation 6*) is constant (*Equation 3 to Equation 5*), the decrease in $1/k_0$ in biofilms exposed to Flow compared to LowFlow are likely due to an impact on $1/k_{\text{WBL}}$. Therefore, the decrease in WBL thickness in the Flow condition significantly reduced the

contribution of the WBL in diuron mass transfer resistance. This implied that the thinner the water boundary layer of biofilms (flow velocity stress), the greater the diuron accumulation by microbial cells.

Tableau 7: Mean of bioaccumulation descriptors and toxic effect with standard deviation associated and number of sample for both contaminated conditions at 5 and 50 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ of diuron (named respectively 5D and 50D), $t_{95\%}$: time to reach the accumulation equilibrium, $1/k_0$: overall mass transfer resistance, BCF: Bioconcentration Factor. * represent significant differences between raw biofilms and T-EPS-M established with a Wilcoxon test; different letters in superscript (a, b and c) represent groups with significant differences between treatments and conditions based on a Kruskal-Wallis test

	Fraction used	LowFlow		Flow	
		5D	50D	5D	50D
[diuron] _{biofilm eq} ($\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}\cdot\text{cm}^{-2}$)	Raw	$11 \pm 1^{a,b}$	62 ± 17^c	8 ± 3^a	$30 \pm 11^{b,c}$
	T-EPS-M	$10 \pm 3^{a,b}$	39 ± 7^c	7 ± 2^a	$30 \pm 7^{b,c}$
$t_{95\%}$ (min)	Raw	39 ± 20	19 ± 6	14 ± 5	3 ± 1
	T-EPS-M	6 ± 4	19 ± 4	18 ± 4	3 ± 0.9
$1/k_0$ ($\text{cm}\cdot\text{min}^{-1}$)	Raw	49 ± 27^c	$43 \pm 21^{b,c}$	$31 \pm 17^{a,b}$	28 ± 17^a
	T-EPS-M	5 ± 4^a	54 ± 18^b	42 ± 25^b	$13 \pm 7^{c*}$
BCF ($\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$)	Raw	3.14 ± 0.41^a	1.79 ± 0.50^a	1.77 ± 0.59^a	0.66 ± 0.24^b
	T-EPS-M	2.83 ± 0.84^a	$1.12 \pm 0.19^{a,b}$	$1.59 \pm 0.47^{a,b}$	0.66 ± 0.15^b
Maximal toxic effect (% of control)	Raw	12 ± 1^a	40 ± 10^b	10 ± 4^a	40 ± 3^b

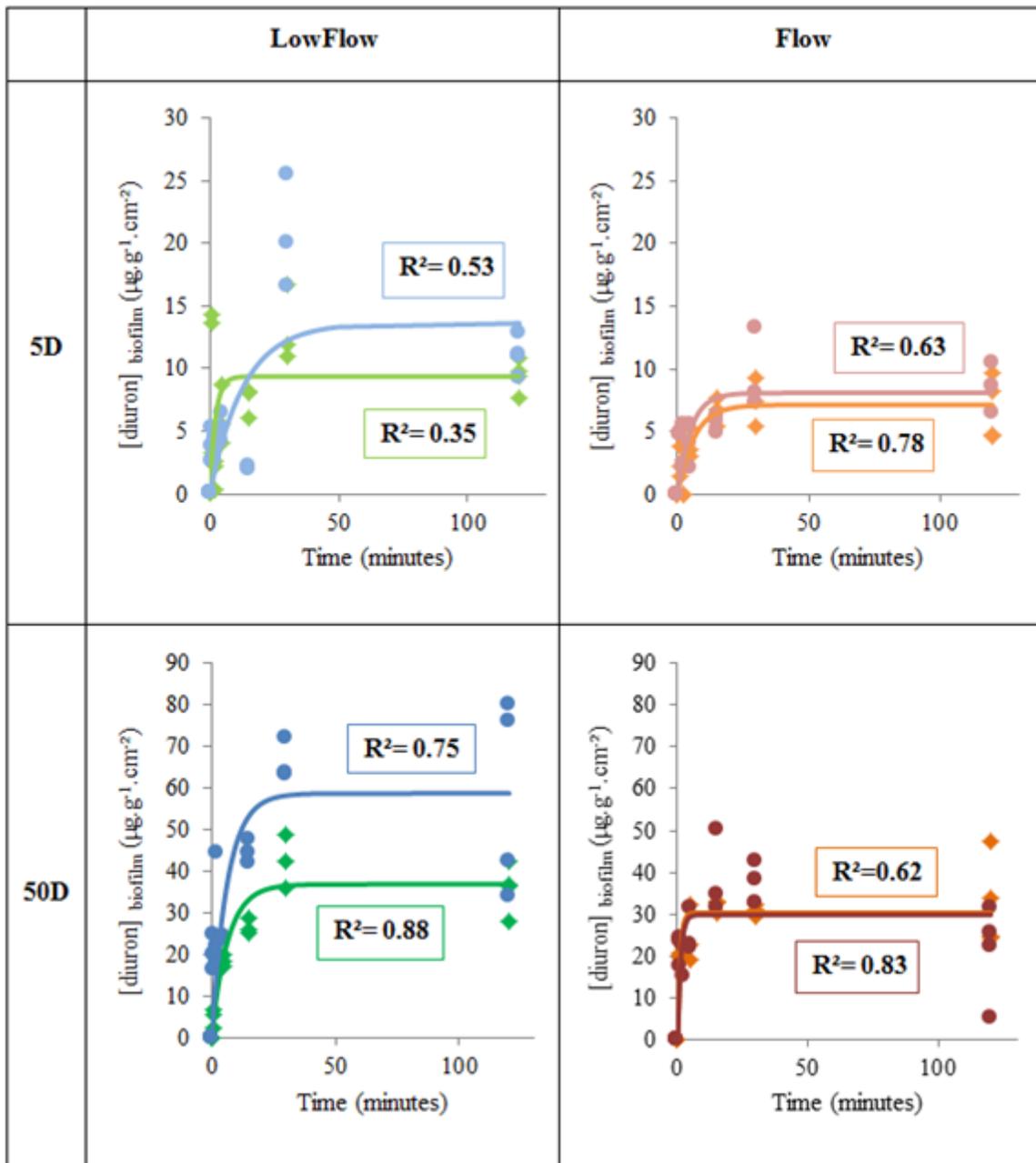


Figure 29: Diuron concentration in the biofilms ($\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}\cdot\text{cm}^{-2}$) as a function of exposure time. Diamonds represent T-EPS-M, and circles total accumulation in raw biofilms; Ctrl values are all below quantification limits. The curves are the representation of the first order kinetic model fitted to the experimental data, and the regression coefficients associated, both with the associated colour: Total fraction = light and deep blue, pink and red / T-EPS-M fraction = light and deep green and orange.

Pesticide distribution in biofilms

Following the physical extraction methodology developed in this study, diuron was quantified in different fractions: in the raw biofilms and in the cell-bound fraction. This improved the characterisation of diuron toxicokinetics in biofilms and their different compartments, including in the diffusible EPS (by deduction), which are continuously interacting with the water boundary layer. According to the constants obtained by first order kinetic model establishment, equilibria were quickly reached (between 3 and 19 minutes; *Tableau 7*) in the T-EPS-M fraction of the biofilms. This equilibrium was generally reached at the same velocity in raw biofilms and in the T-EPS-M fraction (excepted for 5D under LowFlow condition). Moreover, according to the associated regression coefficients, the first-order kinetics model corresponded well to the experimental data ($0.78 < R^2 < 0.88$), also except for 5D under the LowFlow condition ($R^2 = 0.35$) due to the higher variability in accumulation (*Figure 29*). Diuron concentration mostly influenced diuron accumulation in the T-EPS-M fraction: the higher the diuron concentration in water, the greater the accumulation in biofilms, as was the case for raw biofilms (e.g. for LowFlow condition, $[\text{diuron}]_{\text{T-EPS-M eq 5D}} = 10 \pm 3 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}\cdot\text{cm}^{-2}$ and $[\text{diuron}]_{\text{T-EPS-M eq 50D}} = 39 \pm 7 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}\cdot\text{cm}^{-2}$). Also, BCFs tended to be lower for 50D than 5D. The distribution of diuron in biofilms was significantly influenced by Flow: diuron accumulation in the D-EPS (obtained as the difference between concentrations in raw biofilms and in the T-EPS-M) represented 37 % for 50D treatment of the total amount of diuron accumulated under LowFlow, while it was negligible under shear stress.

Flow condition had an effect on the T-EPS-M mass transfer resistance, which was significantly, lower than $1/k_0$ for raw biofilms in LowFlow 5D and Flow 50D. Besides the contribution of the WBL to overall mass transfer resistance (fixed in “*pesticide accumulation in raw biofilm*” section), dependent only of Flow conditions, mass transfer constants associated to D-EPS and T-EPS-M fractions were studied here from Equation 1 to Equation 4. Under LowFlow condition, substantial amounts of diuron were accumulated in D-EPS (described above) and the higher resistance to solute transfer in raw biofilms compared to T-EPS-M fraction contaminated at $5 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ of diuron (*Tableau 7*) pointed out the contribution of D-EPS ($1/k_{\text{D-EPS}}$) to $1/k_0$ values. Differences between treatments (5D and 50D under LowFlow)

suggest some dependency of mass transfer resistance to diuron concentrations in biofilms components.

Photosynthesis inhibition

Effective photosynthetic activity (Φ_{PSII}) was similar among biofilms at the beginning of the experiment, and averaged 0.39 ± 0.01 . In control treatments, Φ_{PSII} increased during the time of the experiment, probably providing evidence of some adaptation of the biofilms to confinement in channels. Significant differences were observed between Flow ($\Phi_{\text{PSII}} = 0.42 \pm 0.01$, $n = 23$) and LowFlow ($\Phi_{\text{PSII}} = 0.45 \pm 0.01$, $n = 23$) conditions in the controls at $t = 2$ h. For both flow conditions, photosynthesis was inhibited by diuron, and maximal effect arose 50 minutes of exposure. A dose-dependent inhibition was highlighted, with an activity inhibition of 11 ± 3 % in 5D and 40 ± 6 % in 50D (*Figure 30*) (*Tableau 7*).

In contrast to control conditions, flow has no effect on photosynthesis inhibition. The maximal inhibition (from 50 min) of photosynthesis of biofilms reached with 50D in both flow conditions were not significantly different (ANOVA, $p = 0.051$).

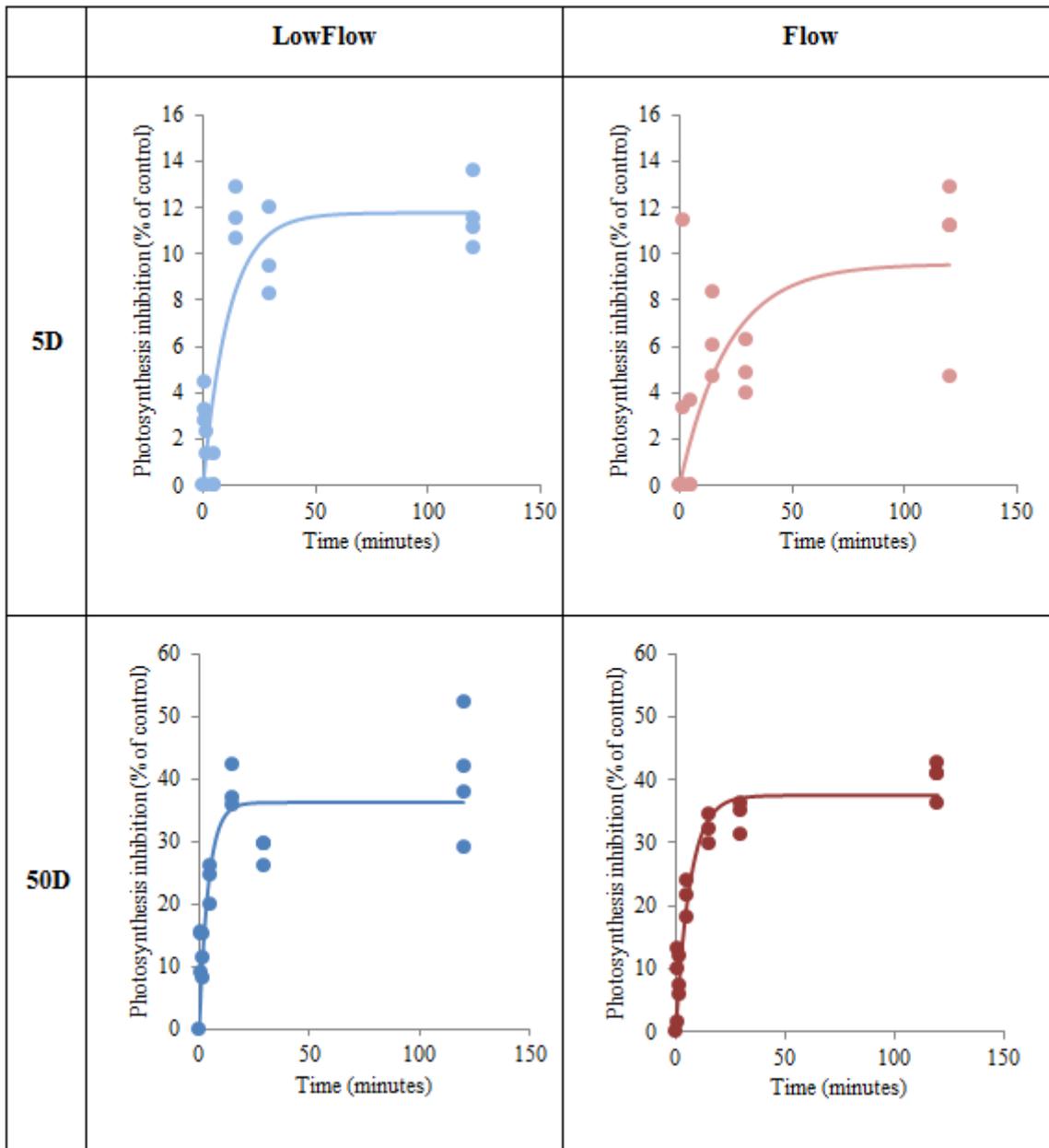


Figure 30: Representation of pesticide toxic impact on biofilms, assessed as the % of photosynthesis inhibition (with respect to control values at the same time). The model curve is fitted a posteriori to the experimental data (represented by the circles).

3.3.2.4. Discussion

Diuron uptake and distribution within biofilms

Diuron uptake and bioaccumulation in biofilms is dose-dependent

The establishment of the simple two-compartment absorption kinetic model (order 1) made it possible to calculate the various associated constants and to determine the behaviour of diuron in biofilm, i. e. rapid absorption in biofilms. Indeed, whatever the concentration of exposure, biofilms accumulated diuron quickly: equilibria ($t_{95\%}$) were reached between 3 and 39 minutes (*Tableau 7*). $t_{95\%}$ values were generally similar between raw biofilms and T-EPS-M fractions (excepted for 5D under LowFlow condition). This suggests that diuron was diffused and equilibrated quickly into the T-EPS-M fraction; this was also the case for the T-EPS-M fraction contained in the raw biofilms. In addition, although these models did not perfectly fit the experimental data in all cases (particularly for 5D under the LowFlow condition which had greater biological variability), the regression coefficients obtained are satisfactory, and have made it possible to consider first order kinetics as an acceptable model to represent the accumulation of diuron in biofilms. Diuron accumulation by biofilms was dose-dependent at equilibrium but BCF values from 5D treatment ($2.26 \pm 0.88 \text{ L.g}^{-1}.\text{cm}^{-2}$) were significantly higher than 50D treatment ($0.94 \pm 0.51 \text{ L.g}^{-1}.\text{cm}^{-2}$) in both raw biofilms and T-EPS-M. This could be due to a saturation phenomenon of sorption sites above a certain concentration of exposure (non linearity in accumulation, see (Chaumet et al., 2019)). Diuron accumulation in biofilms was therefore unlikely to be linear, as found by Zhang et al. (2018) with ofloxacin sorption on biofilms. Further characterization of diuron accumulation isotherms could provide information about the concentration above which biofilms diuron-binding sites may be saturated (like polysaccharides and/proteins).

Flow influence on bioaccumulation may be related to structural changes in biofilms

Under LowFlow conditions, raw biofilms accumulated more diuron than in the presence of flow (*Figure 29*), while diuron concentrations in the T-EPS-M fraction were similar between flow conditions. This suggested that part of the pesticide (between 0 and 40 %) was probably accumulated into the D-EPS fraction under LowFlow condition. Stewart et al. (2015) obtained

comparable percentages: 9 ± 3 % in EDTA-exchangeable EPS which were comparable to the diffusible EPS (EPS loosely bound to microorganisms), after Pb contamination ($20.6 \mu\text{M}$). The fact that diuron accumulation differed between raw vs. T-EPS-M under LowFlow conditions but not under Flow suggested that flow removed part of the loosely bound EPS containing some diuron. This was confirmed by the fact that, after 2 hours of experiment, biofilms structure was impacted by flow. Flow conditions decreased TOC (10 times), and protein content compared to LowFlow. This suggested an abrasion phenomenon by shear stress in our biofilms that mostly removed diffusible EPS, as observed in other studies (Tlili et al., 2008; Wellnitz & Rader, 2003). Indeed, part of the organic matter embedded in diffusible EPS, or a part of the boundary layer (Zhang and Davison 1995) may have been detached from biofilms under the constraint of flow velocity, partially explaining the biomass decrease under Flow condition. Using more contrasted flow velocity conditions, Francoeur and Biggs (2006) exposed fluvial biofilms grown at a 40 cm.s^{-1} velocity to elevated water flows (180 cm.s^{-1}). Consistent with our results, they also provided evidence that flow disturbance increased the loss of chlorophyll-*a* with a 40 % loss after 5 minutes exposure up to 50 % loss after 1 hour. Comparatively, the extremely low flow velocity in our experiment (2 cm.s^{-1}) already showed consistent decreases (e.g. for 50D treatment, chlorophyll a = $66 \pm 14 \mu\text{g.cm}^{-2}$, *Tableau 6*) in biofilms biomass when compared to the LowFlow condition (e.g for 50D, chlorophyll a = $129 \pm 36 \mu\text{g.cm}^{-2}$, *Tableau 6*) and meaning that biofilms were thinner under Flow condition. Our results are consistent with Battin et al. (2003), who found a thicker biofilms at low flow ($295 \pm 143 \mu\text{m}$ at 0.65 cm.s^{-1}) than at high flow ($123 \pm 97 \mu\text{m}$ at 23 cm.s^{-1}) velocity. Shear stress made biofilms thinner, likely reducing its capacity to accumulate pesticides compared to LowFlow condition. Also, Bottacin-Busolin et al. (2009) showed that biofilms could store more solutes when the biomass was more important. Villeneuve et al. (2011) also found an influence of current velocity on diuron ($1.64 \mu\text{g.L}^{-1}$) impact on biofilms from the Morcille River (France). They observed that, while biofilms biomass and composition was not modified by diuron exposure under a slow flow, biofilms characteristics at the fast flow site were impacted by both factors.

Contribution of D-EPS to biofilms resistance to diuron mass transfer

The thickness of the WBL, and subsequently bioaccumulation in biofilms may be impacted by flow velocity. As described in Equations 3 and 4, any change in the resistance to diuron transfer in the WBL can modify pesticide transfer in whole biofilms. Under LowFlow condition, TOC amount increased over time. Since the T-EPS-M did not change significantly, this suggests a thickening phenomenon of the D-EPS fraction. Huerta et al. (2015) demonstrated biofilms capacity to produce EPS quickly in order to improve organic matter and nutrient uptake in a medium where low flow constrained the transfer of nutrients. By doing so, exchanges between the water column and the biofilms were likely enhanced (Katagi, 2013). Indeed, greater mass transfer resistance ($1/k_0$) (i.e. higher overall biofilms resistance for pesticide transfer to cells) was found under LowFlow compared to Flow conditions, with a significant contribution of the D-EPS layer ($1/k_{D-EPS}$). Biofilms not exposed to flow stress were, therefore, the most resistant to this transfer. As discussed above, biofilms under LowFlow had thicker D-EPS (Tableau 6) that accumulated substantial amounts of diuron (Figure 29) which did not contribute to toxic impact. Despite the contribution of diffusible EPS to increasing resistance to mass transfer under LowFlow conditions, this accumulation in D-EPS did not decrease equilibrium concentrations in T-EPS-M, explaining the similarity in toxic impacts described in “*diuron toxicological impact and bioaccumulation in T-EPS-M*” section. This may be related to the 2-hour exposure duration, which is quite long compared to the rapid uptake of diuron by cells as shown by Nestler et al. (2012). This suggests that diffusion-driven accumulation of diuron in cells prevails, and that EPS may not reduce intracellular accumulation of micropollutants. In fact, if the adsorption on EPS phenomenon had been the most influent process on pesticide accumulation, we would have expected a lower toxic impact under LowFlow condition, which was not the case in our study. Consequently, our data dispute the hypothesis of a matrix protective effect towards organic contaminants (e.g. see Stewart et al., 2015, Comte et al., 2006) under our experimental conditions. It would seem that other mechanisms are implied in diuron uptake by cells, like continuous diffusion into the EPS matrix by pores and channels.

Diuron toxicological impact and bioaccumulation in T-EPS-M

ΦPSII inhibition was similar to previously published results of Pesce et al. (2010), who found that mature biofilms from the Morcille River (France), downstream of a vineyard treated with diuron, reached a 10 % inhibition of photosynthesis (Effective Concentration, EC₁₀) for diuron concentrations around 4.57 µg.L⁻¹. Higher sensitivities were found in biofilms from the Mulde River (Germany) by McClellan et al. (2008), who found EC₅₀ below 10 µg.L⁻¹, as well as Ricart et al. (2009) who observed a decrease of 60 % of biofilms photosynthesis inhibition with biofilms exposed to 0.001 to 10 µg.L⁻¹ of diuron in microcosms. These differences in the magnitude of photosynthesis inhibition may be due to the fact that biofilms origin and structure (biomass, algal composition) are important factors in determining community tolerance to contaminants.

The diuron accumulated by biofilms was mostly accumulated in the T-EPS-M fraction. Biofilms exposed to 5D accumulated 8.79 ± 2.97 µg.g.cm² in T-EPS-M, and 33.22 ± 7.87 µg.g.cm² after exposure to 50D (*Tableau 7*) providing evidence of a clear dose effect on the bioaccumulation of the molecule. Concerning the impact of diuron, maximal effect on photosynthesis inhibition was reached simultaneously as the equilibrium of diuron concentration in T-EPS-M was reached. Despite significant variations in biofilms content (dry weight, protein content and TOC) between the two flow conditions at the end of the experiment, toxic effect was similar between flow velocity conditions. The bioaccumulation curves (T-EPS-M, *Figure 29*) and toxicity (*Figure 30*) were rather similar between flow velocity treatments, with a plateau reached around 40 minutes after the start of exposure, suggesting a relationship between the kinetics of toxic impact and T-EPS-M accumulation. This confirms that the pesticide, once internalised by cells, instantaneously causes a toxic effect, in agreement with Nestler et al. (2012) who suggested rapid (within 1-2 minutes) uptake of diuron by microalgae cells. In contrast, diuron contained in the D-EPS under LowFlow had no additional toxic effects on photosynthesis, meaning that this fraction was rather linked to organic matter in the EPS and not in contact with cells. This consistency between photosynthesis inhibition and the diuron accumulated in the T-EPS-M as separated from the raw biofilms by our physical method validates the fractionation of biofilms into D-EPS and

cell-bound EPS (T-EPS-M) proposed in this paper. This new methodology contributes to avoiding matrices interaction when analysing pesticide distribution in biofilms.

Acknowledgments

We would like to thank Emilie Saulnier-Talbot for proofreading the English style and grammar. This study was carried out with financial support from the French National Research Agency (ANR) in the framework of the Investments for the future Programme, within the Cluster of Excellence COTE (ANR-10-LABX-45).

3.3.2.5. Supplementary material

Tableau SI 1: Composition of Dauta medium

Components	Concentration (g.L ⁻¹)	Volume needed for 1L of preparation (mL)
FeSO ₄ , 7H ₂ O	1	1
NaHCO ₃	50	1
Na ₂ CO ₃	5	1
MgSO ₄ , 7H ₂ O	25	1
CaCl ₂ , 2H ₂ O	25	1
Na ₂ SiO ₃ , 9H ₂ O	28.42	3.6
KNO ₃	200	1
K ₂ HPO ₄	25	1
Solution of micro-nutrients:		1
ZnSO ₄ , 7H ₂ O	0.02	
CuCl ₂ , 2H ₂ O	0.02	
MnCl ₂ , 4H ₂ O	0.4	
CoCl ₂ , 2H ₂ O	0.01	
H ₃ BO ₃	0.001	
Na ₂ MoO ₄	0.35	

Tableau SI 2: Analytical parameters for diuron and its associated internal standard (diuron d6)

Compound	Quantification ion (m/z)	Confirmation ion (m/z)	Internal standard	LQ ^a	
				Water	Biofilm ^a
Diuron	233.025	72.045	Diuron d6	0.5 µg.L ⁻¹	0.05 µg.mg ⁻¹ _b
Diuron d6	239.062	78.085	na	na	
Nitrate	/	/	na	10 µgNO ₃ .L ⁻¹	na
Orthophosphate	/	/	na	10 µgPO ₄ .L ⁻¹	na

^a Limits of quantification^b Estimated for a typical sampling of 1 mg

na: Non available data

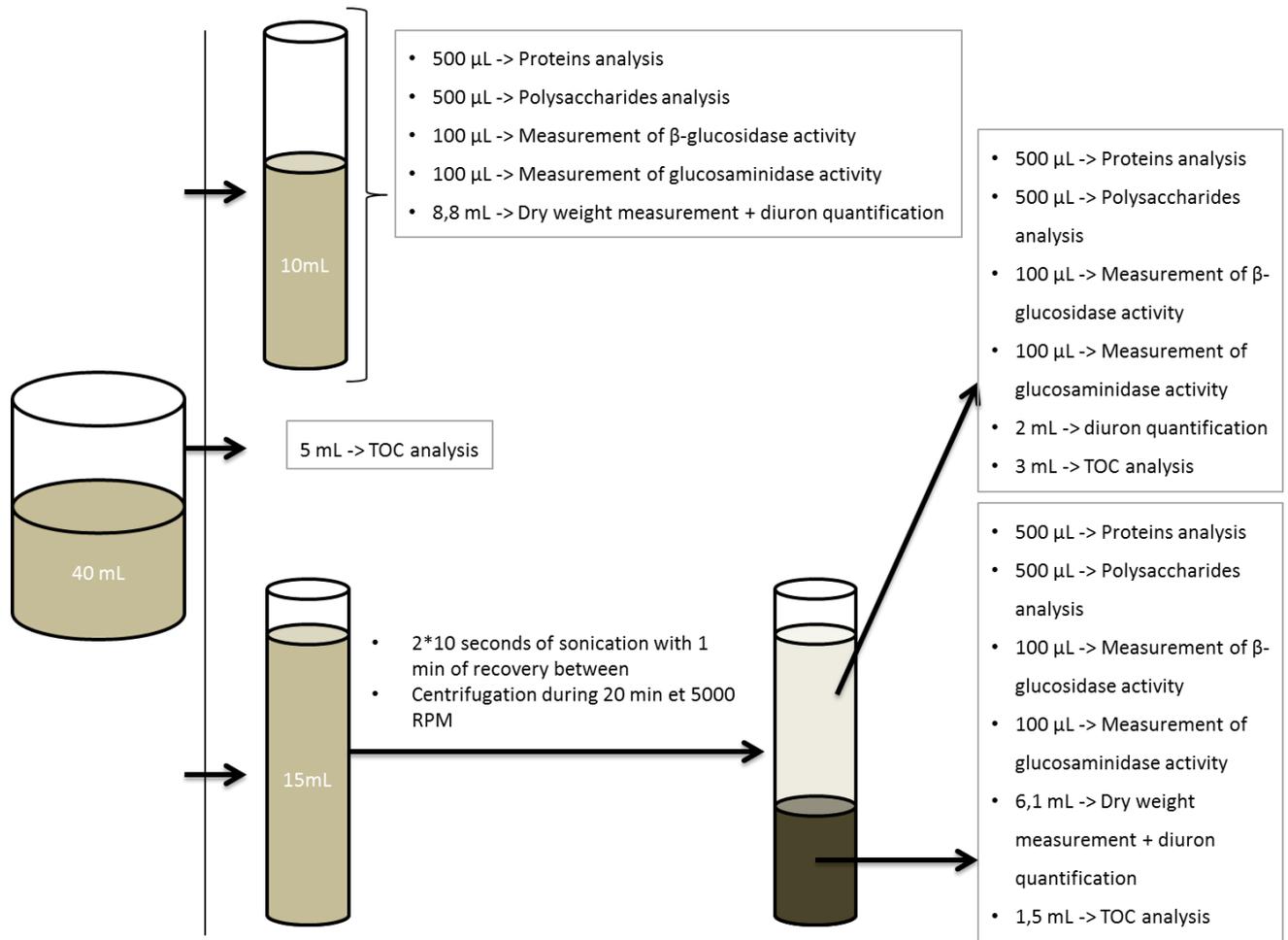


Figure SI 1: Schema of sample aliquots repartition for the different analysis

3.3.3. Bilan

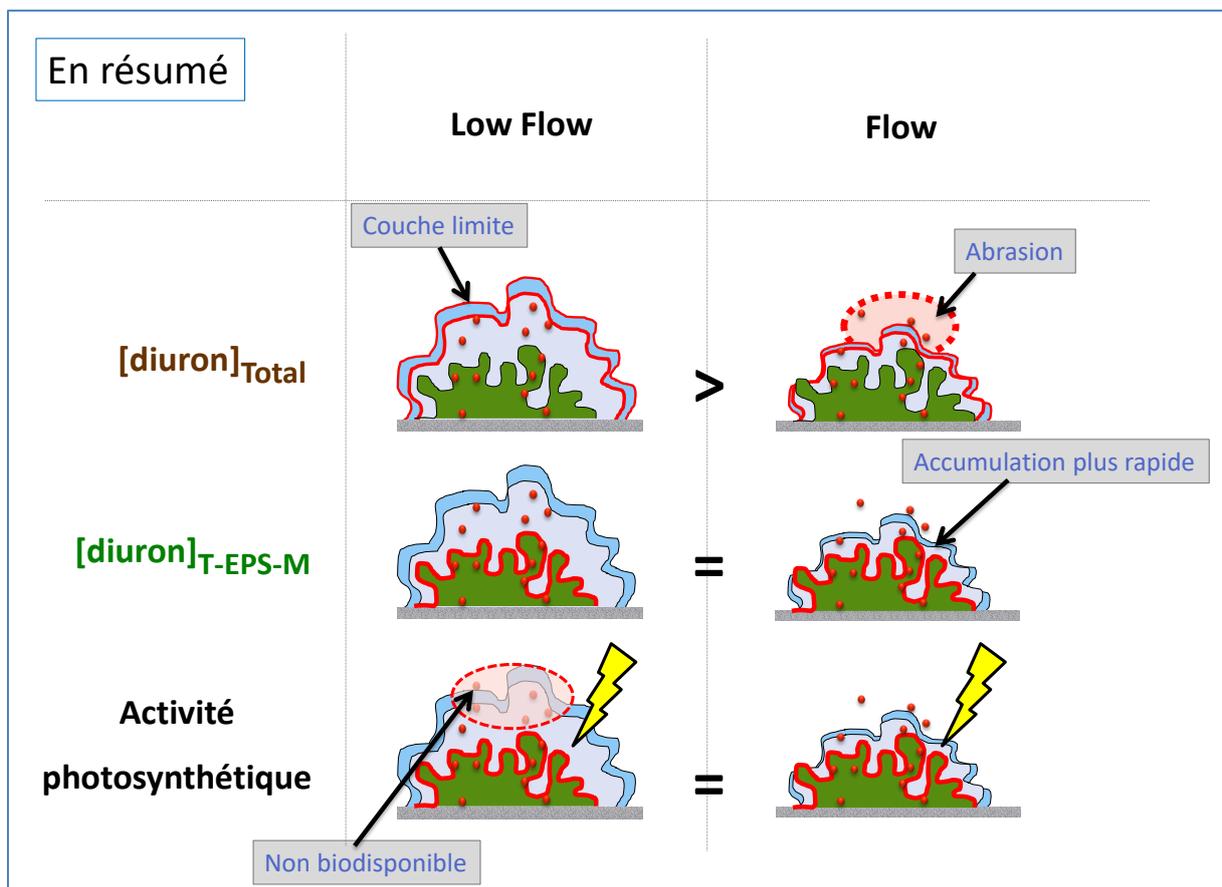
Les résultats obtenus ont pu apporter plus de précision quant à la cinétique d'accumulation du diuron dans le biofilm. En effet, ils ont permis de caractériser l'équilibre du diuron et confirmer qu'il s'établissait rapidement (en 40 min) quelles que soient les conditions de courant et les concentrations d'exposition (*Figure 29*) bien que sa biomasse s'est vu diminuée d'un tiers environ avec un courant à 2 cm.s^{-1} par rapport à la condition sans courant. La séparation des EPS fortement liées (T-EPS-M) du biofilm Total a révélé la distribution du diuron dans le biofilm en fonction du temps (*Figure 29*). Dans la condition sans courant (LowFlow), l'équilibre était atteint de façon simultanée dans les différentes fractions du biofilm mais avec un plateau plus bas pour les EPS fortement liées et les microorganismes (ex pour 50D : $39 \pm 7 \mu\text{g.g}^{-1}.\text{cm}^{-2}$, LowFlow) par rapport à la fraction Total (ex pour 50D : $62 \pm 17 \mu\text{g.g}^{-1}.\text{cm}^{-2}$, LowFlow), différence qui correspond à la fraction des EPS faiblement liées (D-EPS). L'influence du courant a ainsi été visible par la diminution de la biomasse du biofilm sous la contrainte du courant le plus important (Flow), liée à un phénomène d'abrasion des D-EPS. Dans ces conditions avec courant, la résistance aux transferts de masse s'est retrouvée moins importante via la diminution de la couche limite et de la quantité de D-EPS, et l'équilibre dans les T-EPS-M a été atteint plus rapidement (*Tableau 7*).

Comme pour l'étude préliminaire, la bioaccumulation du diuron dans le biofilm n'a pas montré de proportionnalité avec la concentration d'exposition (voir les BCF, *Tableau 7*). Etant donné qu'aucun abattement de la concentration dans l'eau n'a été observé, les résultats laissent à nouveau entendre qu'il existe un potentiel phénomène de saturation à partir d'une certaine concentration dans le milieu.

Le diuron accumulé dans la fraction T-EPS-M a été retrouvé dans des quantités similaires quel que soit le courant imposé, contrairement à l'accumulation dans le biofilm dans son entier (Total). Par ailleurs, les effets toxiques observés suite à l'exposition étaient comparables entre les deux conditions de courant testées, et ceci pour les deux concentrations d'exposition (*Figure 30*). Il est alors possible d'en déduire que la toxicité observée est principalement attribuable au diuron accumulé dans la fraction T-EPS-M. Ces résultats suggèrent également que le diuron accumulé dans les D-EPS en condition LowFlow

n'a pas été biodisponible pour les cellules du biofilm, autrement l'effet toxique aurait été plus marqué.

En bref, cette étude a démontré que l'augmentation du courant, même à faible vitesse en comparaison à des épisodes de crues intenses, entraînait une modification mécanique (phénomène d'abrasion) sur la structure du biofilm réduisant la biomasse de la matrice EPS et accentuant la vitesse de transfert vers les cellules à court terme. En d'autres termes, un biofilm se trouvant dans un secteur de rivière à plus fort débit sera plus vite mais pas plus impacté par des épisodes fugaces de contamination qu'un biofilm dans un environnement statique.



3.4. Etude des effets de la modulation par les saisons

3.4.1. Introduction

À présent que la cinétique d'accumulation du diuron a été déterminée, ainsi que sa distribution dans le biofilm, d'autres facteurs abiotiques primordiaux dans l'environnement restent à étudier. En effet, la température et la luminosité sont deux facteurs particulièrement variables avec les fluctuations saisonnières dans les régions tempérées, et bien connus pour leur influence sur le métabolisme du biofilm.

Cette modification de la température pourrait faire varier les capacités des cellules à absorber le diuron. De même l'augmentation du métabolisme pourrait engendrer une production plus importante de polysaccharides (Wolfstein & Stal, 2002) et moduler l'accumulation par effet de dilution. La variation de photopériode peut quant à elle influencer sur le rendement photosynthétique. En effet, il est connu qu'un contaminant a plus d'impact sur un organisme autotrophe lors des périodes de jour où les mécanismes photosynthétiques sont le plus sollicités (Millie et al., 1992; O'Neal & Lembi, 1983).

Dans le but de caractériser les conséquences des variations de température et de photopériode sur le biofilm, une expérimentation a été menée en recréant quatre combinaisons de deux températures (26 et 10°C) et deux photopériodes (cycle jour/nuit : 16/8 et 10/14), en plus d'une exposition à 0, 5 et 50 µg.L⁻¹ de diuron pendant un et trois jours.

Le biofilm a colonisé dans l'étang de Gazinet-Cestas pendant la période de février-mars 2017 avec des températures moyennes de $8,6 \pm 0,5^\circ\text{C}$ et une période de jour d'environ 10h, ce qui correspond le plus à la quatrième combinaison soit 10°C et une photopériode de 10/14 (Figure 31). C'est donc dans cette condition que le biofilm serait le moins stressé par le changement de milieu. Un des objectifs d'exposer le biofilm à quatre combinaisons de température et de photopériode est de déterminer si l'un de ces facteurs a une influence prépondérante sur l'autre.

Pour les aspects toxicocinétiques d'une part, le diuron a été quantifié dans le biofilm Total à chaque temps d'exposition, la partie 3.3 ayant permis de démontrer qu'en condition avec courant, la fraction D-EPS était négligeable. D'autre part, pour les aspects toxicodynamiques,

les protéines et polysaccharides ont été dosés, et les activités enzymatiques et photosynthétiques ont été mesurées. Le couplage de ces deux approches permet de faire le lien entre l'exposition, la bioaccumulation, et les changements d'allocation d'énergie liés au métabolisme.

3.4.2. Influence de la température et de la photopériode sur la bioaccumulation du diuron dans les biofilms et leur métabolisme

Article en préparation.

Light and temperature influence on diuron bioaccumulation and toxicity in biofilms

Betty Chaumet ^{1*}, Nicolas Mazzella ¹, Julie Neury-Ormanni ¹, Soizic Morin ¹

¹ Unité de recherche EABX, Groupement Irstea de Bordeaux, 50 Avenue de Verdun, 33612 Cestas Cedex, France

*corresponding author: betty.chaumet@irstea.fr

Key words: Freshwater biofilms, temperature, photoperiod, seasons, toxicokinetics-toxicodynamics, diuron

Abstract

Variations of temperature and photoperiod along different seasons can affect aquatic communities such as biofilms which are composed of microalgae, fungi and bacteria, all embedded in extracellular polymeric substances (EPS). Biofilms, generally present at the base of trophic chain in freshwaters, are also subject to organic contamination, and are especially affected by herbicides. Although many studies have investigated the effect of herbicides, temperature and light in interaction on the biological biofilm response (e.g metabolism), no information is available about their impact with a toxicokinetic and toxicodynamic point of view.

The objective of this study was to assess structural and functional changes in biofilms exposed to an herbicide, and make the link with contaminant accumulation, under the influence of seasonal variations in temperature and light. To that aim, mature biofilms were exposed to all possible combinations of three concentrations of a photosynthesis inhibitor herbicide, diuron (0, 5 and 50 $\mu\text{g.L}^{-1}$), two temperatures (26 and 10°C), and two light/dark photoperiods (16/8, 10/14), during 0, 1 and 3 days. For the toxicokinetic approach, diuron accumulation in biofilms was quantified. In parallel, for the toxicodynamic approach,

structural descriptors (protein and polysaccharides contents, dry weight) and functional endpoints (photosynthetic and enzymatic activities) were analysed.

The results obtained mainly highlighted the influence of temperature on diuron bioaccumulation and toxic impact associated on biofilms. Bioaccumulation in biofilms exposed during 3 days at 10°C, at the highest diuron concentration, was 1.3 and 1.5 times higher than bioaccumulation on biofilms exposed to 26°C, under a photoperiod of 16/8 and 10/14 respectively. Accordingly, photosynthetic yield was more inhibited at low than at high temperature. Also, the most impacting factor for metabolism regulation was the temperature; for example, polysaccharides production was boosted under 26°C after 3 days of exposure, for both photoperiods tested. This study enables to link a decrease of metabolic activity to the strong bioaccumulation of diuron at the lowest temperatures with the reduction of the associated photosynthetic yield.

3.4.2.1. Introduction

Nowadays, it is well known that temperature and incident light are two of the main environmental factors able to modulate primary production (Dodds et al., 1996; Gomes & Juneau, 2017; Staehr & Sand-Jensen, 2006). Both factors depend on the different seasons, and therefore primary production is also subject to seasonal variations. Temperature and light photoperiod influence organisms at the base of trophic chain in aquatic environments such as biofilms (Flemming et al., 2007) which are composed of microalgae, fungi and bacteria embedded in a EPS matrix (Aguilera et al., 2008; Flemming & Wingender, 2010). The EPS matrix contain polysaccharides, which represent around 97 % of the total constituents of EPS (Aguilera et al., 2008), proteins, humic acids and DNA. In addition that biofilm integrates and reacts quickly to contamination, all these characteristics place it as a good bioindicator (Edwards & Kjellerup, 2013).

All these microorganisms are increasingly constrained by these environmental stresses in addition to anthropogenic pressures, as organic pollutants (DeLorenzo et al., 2001; Guasch et al., 2016; Kim Tiam et al., 2016). In fact, watercourses are one of the final receptacles of pollution like pesticides contamination brought by runoff or leaching process (Kohusova et

al., 2011). Due to their massive use, pesticides are widely quantified into aquatic environments, and especially diuron, a photosynthesis inhibitor of photosystem II herbicide (Yebra et al., 2004), which is considered as a priority substance to European Water Framework Directive (directive 2000/06/EC).

Many studies have already tackled the biological impact of temperature, light and herbicide contamination on biofilm (e.g: Bérard et al., 1999; Larras et al., 2013; Villeneuve et al., 2010). The effects of these parameters on the growth and photosynthetic efficiency of autotrophic organisms are well documented. In fact, it has already been shown that an increase in temperature, or in the amplitude of the photoperiod could increase the biofilm's resistance dealing with contaminants (Staehr & Sand-Jensen, 2006; Herzig & Dubinsky, 1992).

Duong et al. (2010) and Villeneuve et al. (2011) showed that according to the seasons, biofilm could have a community composition modified. Also, Wolfstein & Stal (2002) highlighted a variation on EPS content among different temperatures and irradiance exposition. Then, Chalifour et al. (2014) has shown that temperature can affect the sensitivity of biofilms to herbicides. Diuron has been shown to drastically reduce photosynthetic activity (Kim Tiam et al., 2015; Pesce et al., 2011; Tlili et al., 2008).

According to the literature, a biofilm exposed to high temperatures and greater light (such as a summer biofilm) and herbicides could therefore be less sensitive to toxic effects than a winter biofilm.

Variations of temperature and light intensity target processes involved in photosynthesis and metabolism, in the manner of pesticides with herbicide mode of action (Chalifour et al., 2014). These combined effects may be synergistic, additional or antagonistic, that is why, it is now crucial to study the fate and effect of herbicides in biofilms, and the impact on it of the interaction of light and temperature, as they co-occur in natural environments.

To answer to this question, the aim of this study was to use a toxicokinetic-toxicodynamic approach for a better understanding of the different steps related to the effect of diuron under contrasting seasonal conditions: i) bioaccumulation by microorganisms in the biofilm, ii) subsequent modification of photosynthetic yield, and finally, iii) overall impact on

metabolism via the determination of biochemical contents, and the measurement of complementary heterotrophic enzymatic activities.

To that objective, an experimental design was set up such as a mature biofilm was exposed to a combination of two different temperatures (10 and 26°C) and photoperiods (light/dark: 16/8 and 10/14), for a total of 4 experiments, and to three diuron concentrations (0, 5 and 50 $\mu\text{g.L}^{-1}$).

3.4.2.2. Materials and methods

Experimental design

During the period of January-February 2017, bare glass slides (L: 26 cm, l: 6 cm) were deposited in the pond of Gazinet-Cestas (South West France, geographical coordinates: 44°46'30.1"N, 0°41'44.3"W), and were collected after four weeks of immersion, the time for biofilm to colonize the slides. During the colonization period, water temperature was of 8.6 ± 0.5 °C (n= 9), and the sunlight time per day was of $10\text{h}09 \pm 6\text{min}$ (n= 50).

The biofilm was immediately re-immersed on channels (L: 50 cm, l: 9.2 cm , H: 5 cm) containing recirculating water (Dauta medium; Dauta, 1982) at a pH of 7.5-8, with a flow velocity of 2 cm.s^{-1} , in a thermoregulated room. Two temperatures were tested, with room temperature set at 26°C and 10°C, and for each temperature, two light/dark photoperiods were applied: 16/8 and 10/14, to mimic four contrasting seasonal conditions (named "Seasons" 1 to 4) as presented in *Figure 31*. Each experiment was performed independently and the seasons tested were consecutive, starting from Season 1 (S1) on the 13th of February to Season 4 (S4), ending on the 9th of March, with one week of experiment per season. A diuron (CAS: 330-54-1, purity: 99 %, Dr Ehrenstorfer GmbH) stock solution was prepared in acetonitrile (CAS: 75-05-8, purity: 99.97 %, Biosolve) to reach a final concentration of 200 mg.L^{-1} . For each season, three nominal concentrations of diuron were selected: 0, 5 and 50 $\mu\text{g.L}^{-1}$ (respectively named Ctrl, 5D and 50D prepared from stock solution in ultrapure water), and the biofilms were exposed to these conditions during 1 and 3 days, to ensure that the equilibrium between diuron concentrations in water and in biofilms was reached (3.3). Moreover, the 3-day exposure was expected to be enough to highlight likely effects of

photoperiod (37 % greater of cumulated hours of illumination for 16/8 and 10/14 respectively).

		Photoperiod	
		16/8	10/14
Temperature	26°C	Season 1 (S1)	Season 2 (S2)
	10°C	Season 3 (S3)	Season 4 (S4)

Figure 31: Graphical representation of experimental design and abbreviations associated to each season

Biofilm preparation

At each collection time, four replicates were sampled and prepared as described below. Biofilms were scrapped with a razor blade and introduced in a beaker previously filled with 40 mL of Dauta medium. Biofilm directly collected after the colonisation in the pond (without exposure in channels) was also analysed like those after 1 and 3 days of exposure, and was named T₀. All samples were homogenized by agitation at room temperature for 30 minutes at 150 rpm (Variomag multi-station agitator, Thermo-Scientific). Several analyses were then performed on biofilms in suspension as determination of dry weight, polysaccharides and protein content, enzymatic and photosynthetic activities, and pesticide quantification (all described in the following sections).

Samples processing and physicochemical analyses

Experimental conditions

Three mL of water channels were collected at each sampling time for all conditions and filtered on syringe-filters (pore: 0.45 µm, hydrophilic regenerated cellulose membrane, Whatman), in order to quantify pesticides in the medium. A volume of 10 µL of internal standards was added to 990 µL of the filtrate prior to analysis. The solution of internal

standards contained: Diuron d6 - CAS: 1007536-67-5 – purity: 98 %; Atrazine desethyl d6 – 1216649-31-8 – purity: 98 %; Atrazine d5 – CAS: 163165-75-1, purity: 98.5 %; Pirimicarb d6 – CAS: 1015854-66-6 – purity: 97.5 %; Carbofuran d3 – CAS: 1007459 – purity: 98 %; Metolachlor d6 – CAS: 1219803-97-0 – purity: 97.7 %; Tebuconazole d6 – CAS: 107534-96-3 – purity: 97 %; Methomyl – CAS: 16752-77-5 (all provided by Dr. Ehrenstorfer GmbH) prepared at 10 mg.L⁻¹.

The temperature in the channels and in the thermoregulated room was measured by data loggers (Tinytag, Radiospare), every ten minutes, for each condition. A lightmeter (LI-COR Li-250, USA) was used to control incident light intensity reaching the slides. The data are listed in *Tableau 8*.

Tableau 8: Mean (\pm standard error) temperatures ($n= 475$) and light intensity ($n= 8$) during the experiments

Condition	Water temperature (°C)	Room temperature (°C)	Light intensity ($\mu\text{mol.s}^{-1}.\text{m}^{-2}$)
Season 1	na*	na*	7.47 \pm 0.42
Season 2	22.70 \pm 0.59	25.16 \pm 0.01	
Season 3	11.60 \pm 0.18	11.23 \pm 0.00	
Season 4	11.65 \pm 0.15	11.17 \pm 0.00	

na*: non available data. A technical problem has been encountered for the recording of season 1 temperature data, but the temperature settings of the thermoregulated room were identical between season 1 and season 2.

Dry weight

For dry weight measurement, 8.8 mL of the 40 mL of suspended biofilm were filtered on a Buchner with previously-weighed ashed GF/F filters (Ø 90 mm, pore size: 0.7 µm, Whatman). Then filters were frozen during 12 hours, lyophilised, and then re-weighed. Dry weight data were used to standardize bioaccumulation data as described in “*diuron quantification in water and biofilm*” section.

Biofilm sample preparation for diuron analysis

Diuron was extracted from biofilm matrix by Accelerated Solvent Extraction (ASE 2000, Dionex, France). A solution of surrogates was prepared with Monuron d6 (CAS: 217488-65-8) at a final concentration of 10 mg.L⁻¹, Prometryn d6 (CAS: 1705649-52-0) at 1 mg.L⁻¹ and Simazine d5 (CAS: 220621-41-0) at 20 mg.L⁻¹, all provided by Dr. Ehrenstorfer GmbH. The ASE cells were filled as follow: the GF/F filter containing the lyophilized biofilm, Fontainebleau sand, and 10 µL of surrogates (to control the percentage of recovery) and were introduced in the ASE device and the extraction was performed at 70 bars and 100°C, with acetone (CAS: 67-64-1, purity: 99.5 %, Chem-Lab) as solvent. Once the extraction complete, acetone samples were evaporated under nitrogen flux with a Visiprep™ (Supelco) and pesticides extracted were then dissolved in 10 mL of ultrapure water (Synergy UV, Millipore).

Samples were purified by Solid Phase Extraction (SPE) on HR-X Chromabond cartridges (Macherey-Nagel, Germany) previously conditioned with 5 mL of methanol (CAS: 67-56-1, purity: 99.95 %, Biosolve) and 5 mL of ultrapure water. Samples were percolated on the cartridge, and then the cartridge was rinsed with a 20 %-80 % methanol (CAS: 67-56-1, purity: 99.95 %) -ultrapure water buffer, and dried on vacuum with a Visiprep™ during 30 minutes. The cartridges were eluted with 5 mL of acetonitrile (CAS: 75-05-8, purity: 99.97 %), and 10 µL of internal standards were added to the eluate collected. The mixture was evaporated until dryness in a SpeedVac (Thermo Fisher Scientific, France), and diuron extracted was dissolved into 1 mL of ultrapure water before analysis.

Diuron quantification in water and biofilm

Diuron in biofilms and water samples was quantified by UPLC-ToF (Ultra-Performance Liquid Chromatography – Time of Flight Mass Spectrometry, Xevo G2-S ToF, Waters). An ACQUITY BEH C18 column 50 × 2.1 mm, 1.7 µm (Waters) was used for the chromatographic separation at 45°C with a binary gradient of ultrapure water (at pH= 5) and methanol (both solutions with ammonium acetate to a concentration of 10 mM, CAS: 631-61-8, ULC quality Biosolve), and 20 µL of samples were injected. The gradient was performed with the following range: 98 % of ultra-pure water solution (0–3.6 min), 2 % of methanol solution (3.6–6 min) at a flow rate of 0.45 mL.min⁻¹.

Data processing was done with MassLynx V4.1 software, and diuron concentrations were inferred thanks to a calibration curve from 0 to 100 µg.L⁻¹, comprising 10 points. Every 10 samples, 3 quality controls were carried out at 0, 1 and 10 µg.L⁻¹ from the calibration curve. For biofilms samples, data were normalized by dry weight and then expressed in µg.g⁻¹. Limit of quantification was established at 5 µg.L⁻¹ for water samples and at 0.05 µg.mg⁻¹ for biofilm samples.

*Biofilm characterization**Polysaccharides analysis*

Polysaccharides contents were analysed according to Dubois et al. (1956) method. Aliquots of 500 µL of samples were prepared by 12.5 µL of phenol (CAS: 108-95-2, purity: 99 %, Scharlab) and 2.5 mL of sulfuric acid (CAS: 7664-93-9, purity: 95 %, VWR) addition. Samples were incubated at room temperature during 10 minutes, and then 20 minutes in a water bath at 30°C. Absorbance was read with a microplate reader (Synergy™ HT, Biotek, USA) at 485 nm. Absorbance data were converted into µg glucose-equivalent per cm² thanks to a standard curve of D(+) – glucose anhydrous solution (CAS: 50-99-7, ACS Reagent Grade, Scharlab) from 0 to 750 µg.L⁻¹. Concentrations were expressed in percentage of T₀ values for each season, to account for variability of the inoculums used.

Protein dosage

A protocol adapted to low concentrations of proteins was developed from Bradford (1976) methodology. An aliquot of 500 μL of the suspended biofilm was collected and 4.5 mL of methanol were added, then the mixture was sonicated during 20 minutes. Then samples were evaporated close to dryness with a SpeedVac (Thermo Fisher Scientific, France) and filled again with 500 μL of ultrapure water and 2.5 mL of Bradford reagent, prepared using 3.3 mg of Brilliant blue G (CAS: 6104-58-1, Sigma), 33.3 mL of methanol, 66.67 mL of phosphoric acid (CAS: 7664-38-2, purity: 85 %, Chem-Lab) and 900 mL of ultra-pure water. Samples were gently agitated to homogenize the color thus formed. The absorbance was measured by a microplate reader (Synergy™ HT, Biotek, USA) at 595 nm. Protein content were determined thanks to a standard curve from 0 to 250 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ performed with Bovine Serum Albumine (BSA, CAS: 9048-46-8, Sigma). Data obtained in μg of BSA-equivalent per cm^2 were then expressed in percentage of T_0 values for each season.

Enzymatic activities measurement

Two extracellular enzymatic activities were measured, the β -glucosaminidase (EC 3.2.1.30) and the β -glucosidase (EC 3.2.1.21) activities, according to Romaní et al. (2008) methodology. The two substrates: 4-methylumbelliferyl N-acetyl- β -D-glucosaminide (CAS: 37067-30-04, Sigma) and 4-methylumbelliferyl- β -D-glucopyranoside (CAS: 18997-57-4, Sigma), respectively associated to β -glucosaminidase and β -glucosidase, were prepared at a final concentration of 0.3 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$. A 150 μL volume of substrate was added to a 150 μL of sample aliquot, away from the light. Samples were incubated under agitation (80 rpm, Orbitron, Infors HT) during one hour in the dark. The reaction was stopped thanks to 5 mL of glycine and NaOH buffer, made with 803.5 mL of NaOH (CAS: 1310-73-2, purity: 98 %, Sigma-Aldrich) solution at 8 $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ and 196.5 mL of a glycine (CAS: 17-1323-01, purity: 99.7 %, GE-healthcare - Life sciences) solution at 75.04 $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$. Fluorescence was measured with a microplate reader (Synergy™ HT, Biotek, USA) at excitation-emission wavelengths of 365-455 nm. A standard curve was performed with 7-Hydroxy-4-methylcoumarin (MUF, CAS:

90-33-5, purity: 97 %, Acros Organics) from 0 to 50000 $\mu\text{g MUF.L}^{-1}.\text{h}^{-1}$ and used to calculate the percentage of enzymatic activities in comparison with T_0 values for each season.

Photosynthetic activity measurement

Photosynthetic activity (effective photosystem II quantum yield, Φ_{PSII}) was assessed by chlorophyll *a* fluorescence measurement with a Pulse Amplitude Modulated fluorimeter (PhytoPAM, Heinz Walz GmbH, Germany), in quartz cuvettes (Emitter-Detector Unit PHYTO-ED). Five replicate measurements per sample were performed on biofilm suspensions after 15 minutes of light adaptation. Every sample was measured with a Photosynthetic Active Radiation of $164 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ in Actinic Light mode.

Data analysis

A Kruskal-Wallis test followed by a Tuckey test were performed on data from all the analyses (in percentage of T_0), and then each biological descriptor individually in order to highlight significant differences between treatments, times of exposure, temperatures and photoperiods tested. A p-value of 0.05 was considered as significant. A linear discriminant analysis was done on the same dataset, in the aim of individualise data into similarly-composed groups, with R software [Package *ade4* version 1.6-2].

3.4.2.3. Results

Seasonal effect on control samples

The dry weight measured on the biofilm samples immediately after collection from the pond (T_0) for each season showed high variations. Indeed, biomass regularly increased between S1 and S4, with values 6-fold higher at S4 than S1 ($DW_{S1} = 33 \pm 5 \mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-2}$ and $DW_{S4} = 203 \pm 27 \mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-2}$, *Tableau 9*) highlighting that biofilms colonisation depend on the period of the year (meteorological parameters). For seasonal comparison purposes, these biomass variations in the inoculums made necessary the standardization of all structural and functional descriptors by their associated T_0 ; their variation between dates and diuron exposure conditions were expressed as percentages of T_0 , to highlight only the effect of temperature, photoperiod and diuron. Biofilm dry weight generally increased over the 3 days of channel exposure, and the 3-day increase in biomass was little more pronounced at 26°C (2.5 times greater for S1 and 1.9 times greater for S2, *Tableau 9*) than at 10°C (1.4 times greater for S3, *Tableau 9*). Even, a slight decrease in dry weight was visible after three days of exposure for S4. On the other hand, in terms of photosynthetic yield of the control samples, there were no marked effects of temperature nor of photoperiod, whatever the time exposure.

Protein dosage and β -glucosaminidase activity measurement showed an increase in percentage at 3 days compared to T_0 (*Figure 33*). The same trend was visible for polysaccharides results and β -glucosidase activity measurements, but only for biofilms exposed at 26°C . For these descriptors, samples exposed to 10°C did not highlight any particular variation (around 100 % T_0).

For data collected after 3 days of exposure, the temperature effect was noticeable for all descriptors, while data were not statistically different; indeed, all showed an increase in percentage compared to T_0 for samples exposed to 26°C . About the photoperiod, they were almost no differences between seasons for β -glucosaminidase activity. On the contrary, β -glucosidase activity was slightly affected by the most extended daylight periods (increase of 685 and 72 % between S1 and S2 and between S3 and S4 respectively, *Figure 33*). The same trend was visible for polysaccharides percentage, but more moderately, also for protein

percentage but only between S3 and S4. For the two others seasons, the protein difference was highlighted according the opposite photoperiod effect.

Tableau 9: Mean (\pm sd) dry weight in $\mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-2}$ and photosynthetic yield in Ctrl biofilms.* represent significant differences within the seasonal condition

Season (temperature, photoperiod)	Exposure time (day)	Mean dry weight ($\mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-2}$)	Photosynthetic yield
Season 1 (26°C, 16/8)	0	33 \pm 5	0.41 \pm 0.02
	1	35 \pm 6	0.48 \pm 0.02
	3	83 \pm 10	0.49 \pm 0.02
Season 2 (26°C, 10/14)	0	57 \pm 10	0.44 \pm 0.02
	1	65 \pm 11	0.51 \pm 0.03
	3	106 \pm 18	0.51 \pm 0.01
Season 3 (10°C, 16/8)	0	79 \pm 10	0.50 \pm 0.01
	1	87 \pm 11	0.55 \pm 0.01*
	3	107 \pm 13	0.54 \pm 0.01*
Season 4 (10°C, 10/14)	0	203 \pm 27	0.53 \pm 0.01
	1	139 \pm 27	0.51 \pm 0.01
	3	175 \pm 34	0.51 \pm 0.01

From bioaccumulation to toxic impact

Diuron concentration in water channels was quantified at 5.1 ± 0.2 ($n=4$) and $43.9 \pm 0.4 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ ($n=4$) of diuron respectively for 5D and 50D treatments which is extremely close to nominal concentrations. The results from control water channel were below the limit of quantification. No statistical difference in diuron exposure for each treatment was found between seasons nor dates of sampling.

A small amount of diuron was quantified in biofilm samples from control condition (Mean = $88.4 \pm 19.9 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ of diuron) which could come from the environment during the colonisation. Total amount of diuron measured was globally higher, but not significantly, within biofilms exposed at 10°C than at 26°C , and more particularly for 50D treatments (Figure 32). For 50D, at a given temperature of exposure, bioaccumulation tended to be higher when light exposure time increased

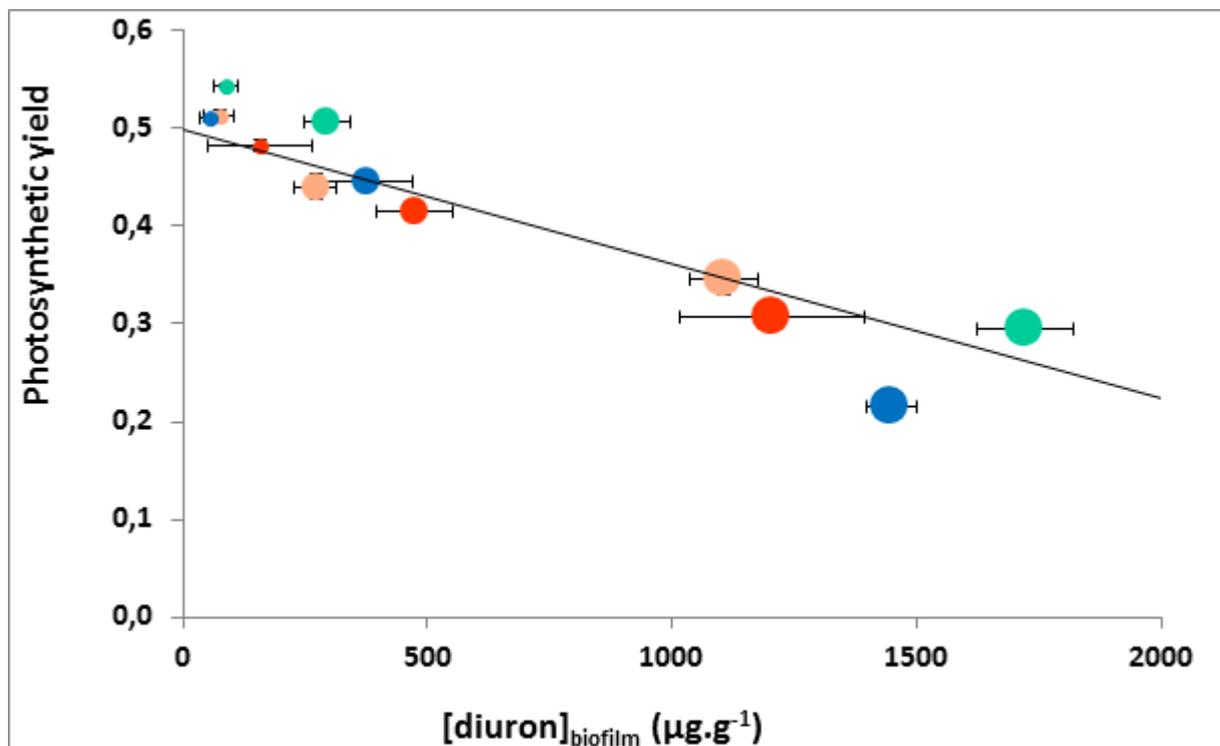


Figure 32: Mean photosynthetic quantum yield (\pm sd, $n=4$) in function of diuron bioaccumulation in the biofilm in $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ (mean \pm sd), for biofilms exposed in channels during 1 and 3 days. The seasons are differentiated as follows: Season 1 in red, Season 2 in orange, Season 3 in green, and Season 4 in blue. The black line represents the linear regression performed on the whole dataset. The size of the points is proportional to the dose of exposure.

The effects of the temperature on toxicity were not as clear as on bioaccumulation. Indeed, photosynthetic yield was lower at 10°C for 50D treatment and at 26°C for 5D treatment (*Figure 32*, also see Supplementary Material *Tableau SI 3*). However, at 10°C the photosynthetic yield tend to decreased with the luminosity amplitude ($S4 < S3$), and at 26°C, the contrary was remarkable, but the photosynthetic yields were quite close between S1 and S2. Photosynthetic activity was negatively correlated with diuron bioaccumulation in the biofilm ($R^2= 0.684$, p-value < 0.001; *Figure 32*), correlation coefficients calculated for each season separately increased as follow: S1 ($R^2= 0.48$, p-value < 0.001) < S2 ($R^2= 0.52$, p-value < 0.001) < S3 ($R^2= 0.87$, p-value < 0.001) < S4 ($R^2= 0.94$, p-value < 0.001).

Biofilm characterization

Temperature and photoperiod had an influence on structural biofilm parameters. For biofilms exposed to the highest temperature (26°C), polysaccharide content increased between day 1 and day 3 (*Figure 33*). This effect was considerably less marked for biofilms exposed at a temperature of 10°C. In general, the polysaccharides percentage from control, as the other descriptors like protein content and enzymatic activities, increased in the following order: $S4 < S3 < S2 < S1$. At equal temperature, polysaccharide concentrations were higher with a larger photoperiod ($S2 < S1$, $S4 < S3$).

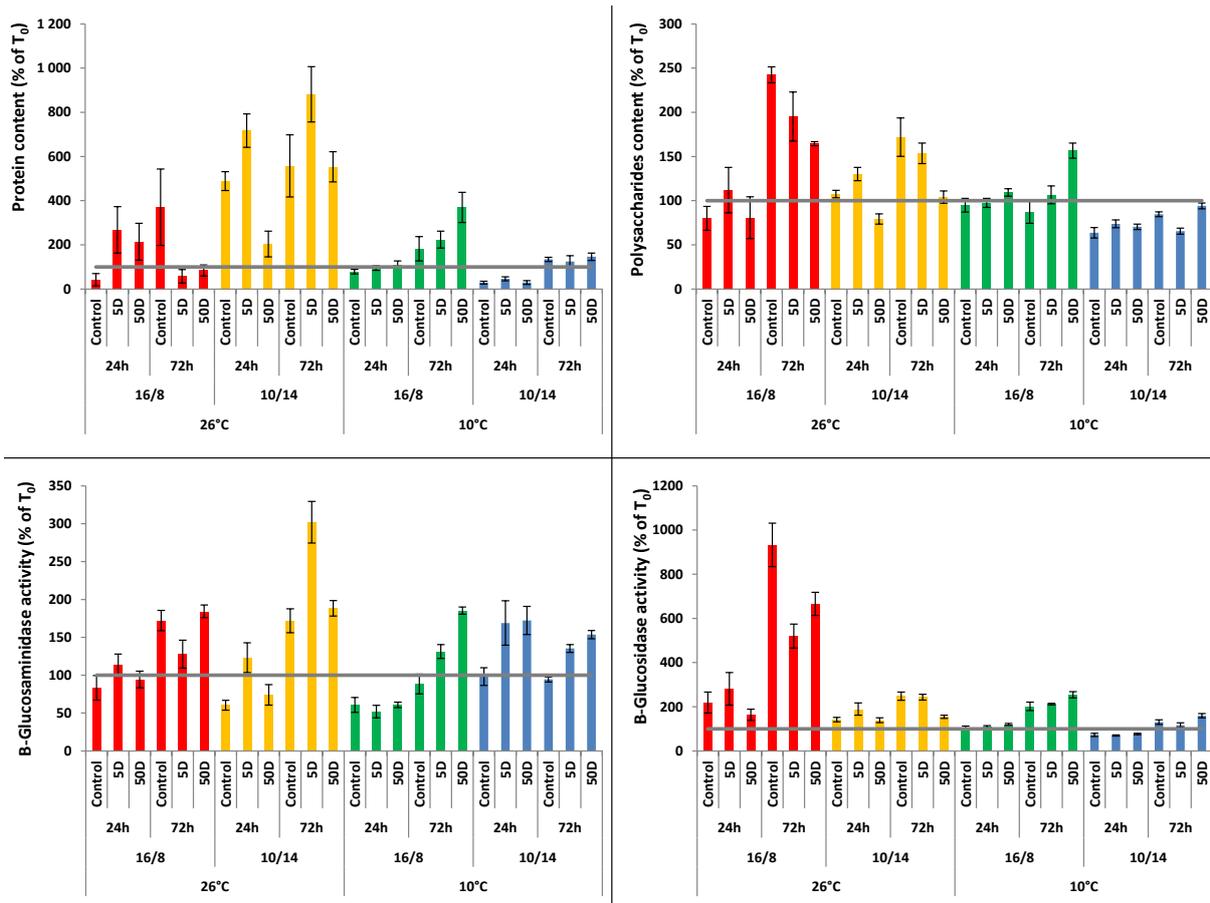


Figure 33: Polysaccharides and protein contents and β -glucosaminidase and β -glucosidase activities (mean \pm sd) in percentage of T₀ (grey line: 100 % of T₀ value for each season). The seasons are differentiated as follows: Season 1 in red, Season 2 in orange, Season 3 in green, and Season 4 in blue.

Seasonal variations on metabolism

The Tuckey test performed on data from all analyses did not show significant differences according to temperature, photoperiod or diuron effect. Then it was performed with data from each descriptor, and there were no significant trends with regard to seasonal parameters and contamination. The linear discriminant analysis carried out with structural descriptors (proteins, polysaccharides) and enzymatic activities, after 3 days of exposure, all treatment combined (as diuron had no effect on these descriptors), discriminated the different seasons.

The seasons 1 and 2 were separated along axis 1 (Figure 34), which was mostly explained by an increasing relative activity of β -glucosidase ("BetaGlu"; mean at 3 days for all treatments S1= 706 % and S2= 215 %). In fact, seasons were discriminated along this axis in relation with

the β -glucosidase activity as follows: S2 < S4 < S3 < S1. Thus axis 1 highlighted photoperiod influence on biological responses, mainly related to the amplitude of variation in β -glucosidase activity over 3 days. Season 2 was also characterized by a slight higher relative of protein content and β -glucosaminidase activity, and Season 1 by little higher polysaccharide content and β -glucosidase activity. In contrast with the conditions presenting higher temperature, Seasons 3 and 4 were anticorrelated with Seasons 1 and 2 along axis 2, due to their slightly low polysaccharide content. The axe 2 discriminated seasons according to temperature as follows: S2 < S1 < S3 < S4.

Moreover, the fact that seasons sharing a seasonal characteristic (equal temperature or photoperiod) were not fully identical, suggests an interaction between the influence of temperature and photoperiod. These results highlighted the influence of photoperiod and temperature on biofilm metabolism and illustrate the previous conclusions that these factors influenced the variation over 3 days in polysaccharide and protein content, as well as in β -glucosaminidase activity over three days.

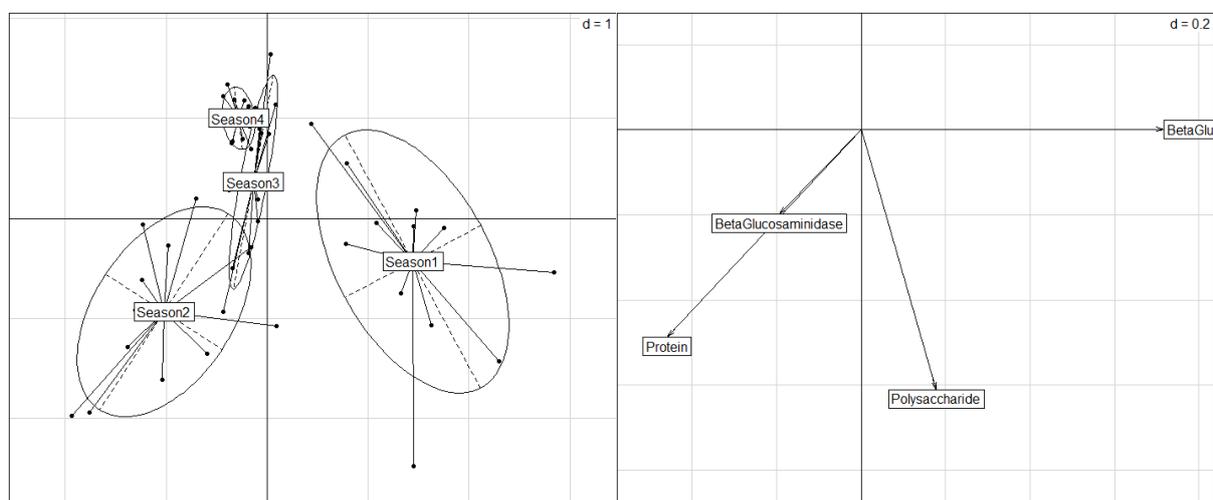


Figure 34: Linear discriminant analysis of the different Seasons after 3 days of exposure (left panel) based on polysaccharide and protein content, and extracellular enzymatic activities standardized by T_0 (right panel).

3.4.2.4. Discussion

Diuron impact on PSII

The results have shown that diuron bioaccumulation in biofilm was higher at 10°C than at 26°C (e.g. 27 % more at 10°C) excepted for S1 with 5D treatment, and consequently, the photosynthetic activity was more inhibited at 10°C for associated samples, at equal photoperiod (Figure 32). Toxic effects observed in this study are in accordance with many other researches carried out on similar microorganisms (green algae, diatoms) with pesticides. For example, Tasmin et al. (2014) found a 12-17 % increase of photosynthesis inhibition on microalgae with the decrease of temperature from 25 to 10°C for a contamination at 32 µg.L⁻¹ of diuron during 3 days. These observations are in accordance with our results: increase of 16 % of photosynthesis inhibition with the decrease of temperature. Moreover, Chalifour et al. (2014) measured a photosynthetic yield decrease from 57 to 98 % between 25 and 15°C in green algae exposed 2.5 µM of norflurazon (herbicide). Although the literature about combined herbicide and temperature impacts on photosynthetic yield is abundant, there is very little information on bioaccumulation aspects. This work complements the existing knowledge by showing that higher PSII inhibition at lower temperature is likely explained by higher amounts of diuron accumulated.

Metabolism variations with temperature and light

Seasonal effect

For heterotrophic organisms, linear discriminant analysis highlighted that β-glucosidase activity was boosted by longer periods of light, and the contrary for β-glucosaminidase activity, both at higher temperature. This means that metabolism of organisms such as bacteria and fungi were intensively activated at 26°C, indicating a favourable environment for them (Lurling et al., 2012).

For autotrophic organisms, photosynthetic activity is directly related to metabolism, itself dependent on temperature (Brown et al., 2004). In this study, polysaccharides quantities produced after 3 days of exposure were greater at 26°C than at 10°C, suggesting that the

biofilm was less productive at colder temperatures. These results are in accordance with those of Wolfstein and Stal (2002) who found a slight increase (around 1.25 – 1.3 times higher) in EPS content (which are composed of polysaccharides and proteins) after 3 and 9 day of exposure between biofilm exposed from 10°C to 25°C, with a photoperiod of 12/12.

Interaction of environmental factors effects with the impact of diuron

The effects of environmental factors interacting with diuron were not very visible on heterotrophic organisms as expected. Indeed, diuron is a photosynthetic inhibitor herbicide, so it does not target directly on bacteria and fungi over such short periods of exposure time. Because of the very short duration of biofilm exposure (3 days), the toxic effect of these factors may not yet have reached the whole community through cascading effects (Proia et al., 2012). The same phenomenon was found by Proia et al. (2011), who observed that after two days of exposure to diuron at 15 µg.L⁻¹, the bacteria showed no structural nor functional changes. However, following this exposure and during one week of recovery, they observed indirect effects such as a transient increase in bacterial mortality.

Although our results showed no significant differences between seasons, the effect of diuron on algae seemed to be modulated by temperature and light, to variable extent depending on the concentration of exposure. Nevertheless, the results showed that among all the descriptors analysed, the only part of the metabolism significantly impacted by diuron was photosynthetic activity. Contrastingly, polysaccharide and protein production and enzymatic activities were mainly affected by the interaction between temperature and photoperiod (Figure 33).

Overall, biofilm appeared to be less impacted and more productive at 26°C than at 10°C. This can be explained by the fact that the biofilm originated from conditions close to Season 4 (10°C, alternation day/night of 10/14). A priori the biofilms having experienced the highest degree of disturbance should be the one of the S1 season, with a drastic change in environmental conditions (+6h of light/day and +16°C). The fact that these exposure conditions are favourable to the activation of metabolism could explain the high polysaccharide and protein production at this season.

In the case of stressful conditions, organisms can slow their metabolism in order to reduce their energy needs (Brown et al., 2004). Chalifour et al. (2014) study supports this fact by showing that algae use their energy reserves to maintain a growth rate similar to controls in the presence of herbicide (2.5 μM norflurazon) and over 4 days, they observed a strong decrease in photosynthetic efficiency. Our results present the same kind of phenomenon for contaminated conditions, at 26°C polysaccharides production was boosted while at 10 °C, the production remained stable. Also, the photosynthetic efficiency was greater under 26°C exposure temperature. All this shows that biofilm exposed to low temperatures and a shorter photoperiod is forced to restrict the energy allocated for its growth, hence the lower metabolic activity of the biofilm from season 4 and its greater tendency of sensitivity to diuron.

All the variations observed in this study on biofilm show only trends and not significant differences, which opens the question on the fact that the major changes would take place over longer exposure times, and at the level of the community composition.

3.4.2.5. Conclusion

This study focused on the influence of interactions between diuron exposure, temperature and photoperiod on pesticide bioaccumulation and toxic impact on biofilm. Our results suggest some influence of temperature on bioaccumulation, and consequently on photosynthetic activity. They imply that Winter biofilms in temperate regions would be more sensitive to diuron exposure than Summer ones.

Our results are in agreement with the existing literature dealing with the joint influence of temperature and herbicides on biofilms vulnerability. However, this study also demonstrates the influence of photoperiod duration on several biofilm endpoints, not only related to the autotrophic component of the community. Moreover, this work goes further by coupling toxicokinetic and toxicodynamic aspects, allowing to link the bioaccumulation of pesticides in biofilms with their metabolism.

Acknowledgments

This document has been carried out with financial support from the French National Research Agency (ANR) in the frame of the Investments for the future Programme, within the Cluster of Excellence COTE (ANR-10-LABX-45).

3.4.2.6. Supplementary material

Tableau SI 3: Mean (\pm sd) diuron concentration in the channels in $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$, in the biofilm in $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$, and mean (\pm sd) photosynthetic inhibition calculated in percentage of their respective controls at the same time of exposure

Season (temperature, photoperiod)	Exposure time (day)	Treatment	[diuron] _{water} ($\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$)	BCF ($\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$)	% Photosynthesis inhibition
Season 1 (26°C, 16/8)	1	5D	4.64	90 \pm 46	13 \pm 2
		50D	43.61	28 \pm 8	33 \pm 3
	3	5D	6.45	91 \pm 12	15 \pm 3
		50D	42.54	28 \pm 17	40 \pm 4
Season 2 (26°C, 10/14)	1	5D	5.54	63 \pm 23	8 \pm 5
		50D	39.19	32 \pm 4	26 \pm 7
	3	5D	6.59	30 \pm 6	20 \pm 3
		50D	45.71	21 \pm 1	40 \pm 5
Season 3 (10°C, 16/8)	1	5D	4.01	85 \pm 46	6 \pm 1
		50D	43.05	45 \pm 2	41 \pm 7
	3	5D	5.28	48 \pm 36	8 \pm 2
		50D	44.95	31 \pm 3	50 \pm 5
Season 4 (10°C, 10/14)	1	5D	4.03	60 \pm 9	14 \pm 3
		50D	43.74	34 \pm 4	54 \pm 2
	3	5D	4.59	104 \pm 67	12 \pm 2
		50D	48.18	30 \pm 4	62 \pm 3

3.4.3. Bilan

Cette étude a permis de mettre en avant l'influence relative de la température et de la photopériode sur la chaîne d'impacts allant de la contamination dans le milieu aux modifications du métabolisme du biofilm. En effet, dans un premier temps les résultats ont montré que la bioaccumulation du diuron dans le biofilm était plus importante dans les biofilms exposés à 10°C qu'à 26°C. Par conséquent, le rendement photosynthétique a été plus impacté aux plus faibles températures. Cette fois encore la bioaccumulation du diuron dans le biofilm n'était pas proportionnelle aux concentrations d'exposition, indiquant de nouveau un phénomène de saturation.

Contrairement à ce qui a été rencontré dans la littérature, la période de jour plus étendue n'a pas accru l'inhibition de l'activité photosynthétique dans le biofilm dans les conditions expérimentales étudiées. Cependant, la luminosité imposée au biofilm dans notre expérimentation présentait des conditions très peu stressantes du fait de sa faible intensité ($7,47 \pm 0,42 \mu\text{mol}\cdot\text{s}^{-1}\cdot\text{m}^{-2}$) par rapport à celles des expérimentations concernées (par exemple de 50 à 230 $\mu\text{mol}\cdot\text{s}^{-1}\cdot\text{m}^{-2}$ pour Millie et al., 1992). Cette importante différence au niveau de l'irradiation et la courte durée expérimentale (3 cycles jour/nuit) pourraient expliquer le fait que nos résultats ne soient pas en parfait accord avec la littérature (Millie et al., 1992; O'Neal & Lembi, 1983).

Puis dans un deuxième temps, les résultats portant sur la production de polysaccharides ont confirmé l'impact de la température sur le rendement photosynthétique par une augmentation de la production de polysaccharides à 26°C alors que la production à 10°C restait stable jusqu'à 3 jours d'exposition. En effet, le biofilm peut produire en partie des polysaccharides pour se protéger par exemple contre la dessiccation et donc conserver un environnement hydraté (Flemming & Wingender, 2010).

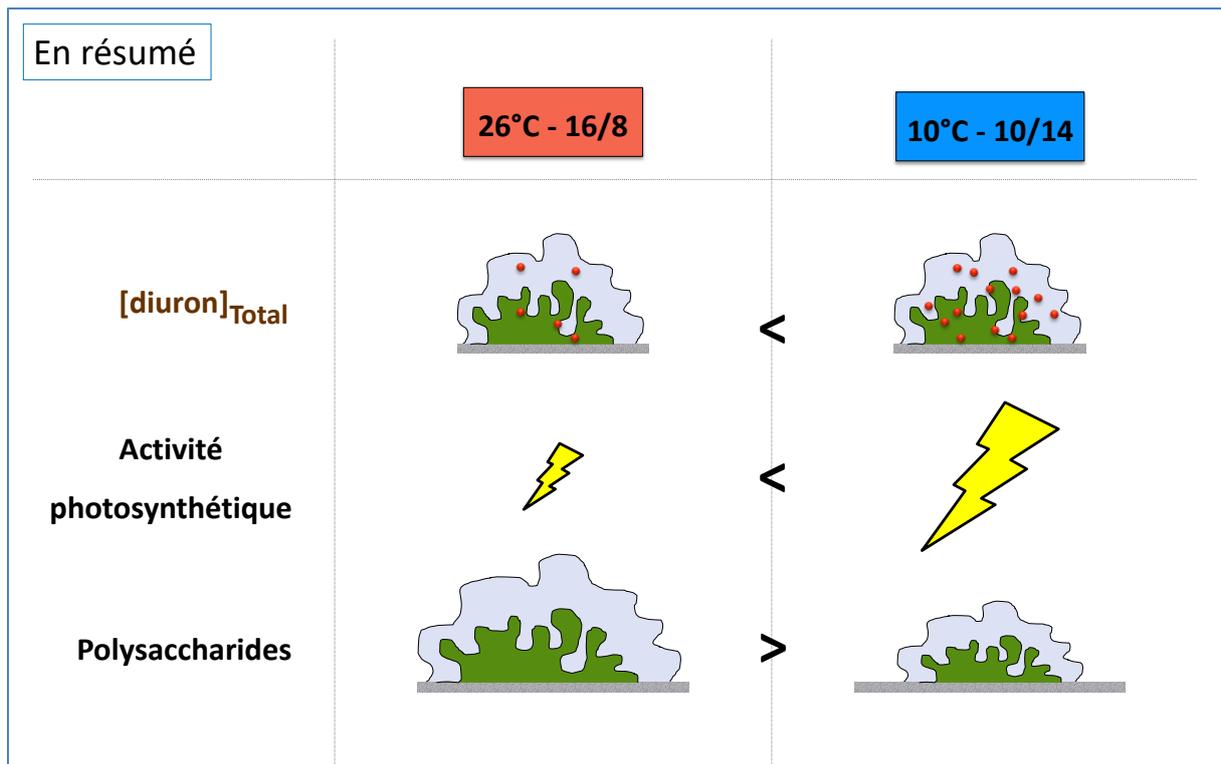
L'influence de la photopériode sur la structure du biofilm a été notable car à température égale, la production de polysaccharides a été exacerbée lorsque que la photopériode présentait une période de jour plus étendue. En effet, la quantité de photons absorbés par le biofilm joue un rôle primordial sur la production primaire, et par conséquent le métabolisme du biofilm. Par exemple, Wolfstein & Stal (2002) ont montré que sous l'influence d'une

irradiation plus importante ($100 \mu\text{mol}\cdot\text{s}^{-1}\cdot\text{m}^{-2}$) les EPS (et par extension les polysaccharides) tendaient à se développer de façon plus conséquente. Bien que pour cette étude la quantité de photons soit 13 à 33 fois plus élevée que dans notre expérimentation, la réaction engendrée est similaire.

L'ensemble de ces résultats permettent de mettre en avant l'influence des changements de température et de photopériode sur l'allocation d'énergie dans le biofilm. Lorsque la température est plus basse et la photopériode réduite (période hivernale), le biofilm présente un métabolisme basal inférieur à celui du biofilm d'été. En effet, dans ce dernier cas, en raison des conditions d'exposition, le métabolisme du biofilm est boosté en conditions « estivales », d'où sa productivité (protéine, polysaccharides, activités enzymatiques) plus conséquente.

En présence d'une contamination anthropique et avec la combinaison des deux facteurs saisonniers (basse température et faible amplitude lumineuse), le biofilm d'hiver est donc plus sensible sur la durée d'exposition.

Au contraire, le biofilm immergé dans un milieu aux conditions plutôt estivales, est moins impacté sur la base des descripteurs analysés dans cette étude. La bioaccumulation en diuron est moindre, et l'inhibition de la photosynthèse moins marquée. Ces conditions de température élevée et de photopériode étendue stimulent également le métabolisme.



3.5. Conclusion générale

Le but de ce chapitre a été de déterminer les mécanismes mis en jeu lors de la bioaccumulation du diuron dans les biofilms et aussi de montrer les effets toxiques associés.

Tout d'abord la cinétique d'accumulation a été définie comme étant particulièrement rapide puisque l'équilibre a été atteint dans les 40 min. Il a été montré que l'internalisation du diuron dans les cellules, visible via la diminution de l'activité photosynthétique, était simultanée avec sa bioaccumulation dans le biofilm et en particulier la fraction contenant les microorganismes. Ceci a permis de mettre en évidence la distribution du diuron dans le biofilm.

Puis l'influence des paramètres abiotiques majeurs dans l'environnement tels que la température, la luminosité et le courant a pu être soulignée. L'étude préliminaire n'a pas montré d'effet du diuron sur les paramètres structuraux et fonctionnels du biofilm (production de polysaccharides et de protéines, activités enzymatiques), et ce même à long terme (21 jours). Or grâce à l'étude portant sur l'influence de la température et de la photopériode, il a pu être établi que ces paramètres modifiaient le biofilm dans sa structure

et son métabolisme après 3 jours d'exposition. Ces constatations confirment le fait que les perturbations observées sont liées uniquement aux variations de température et de lumière. L'intensité du courant quant à elle a modifié de façon mécanique la structure du biofilm, en abrasant la fraction superficielle d'EPS faiblement liées du biofilm. Il a également été mis en avant dans la section 3.3 le fait que le diuron présent dans les D-EPS ne semblait pas être biodisponible pour les cellules. Ce point conteste ainsi plusieurs conclusions extraites de la littérature selon lesquelles les EPS auraient une fonction protectrice contre la diffusion de composés organiques type biocides (Comte et al., 2006a) et métalliques (Stewart et al., 2015). Or dans la section 3.4 il a été montré une augmentation de la quantité de polysaccharides possiblement en réponse à un risque de dessiccation. Ces deux phénomènes laissent penser que les EPS peuvent jouer un rôle de protection selon le stress subi.

Enfin, toutes les études présentées dans ce chapitre ont révélé un phénomène de saturation dans l'accumulation du diuron au sein du biofilm. En effet, pour toutes les expérimentations, les concentrations en diuron dans le biofilm n'étaient pas proportionnelles aux concentrations en diuron dans le milieu. De même, le temps d'exposition du biofilm au diuron semble engendrer des réponses différentes. L'activité photosynthétique du biofilm semble être moins impactée après 21 jours d'exposition (cf. 3.2, ex % d'inhibition pour une exposition à 50D : 17 %) par rapport aux temps d'exposition plus courts (cf. 3.3, ex % d'inhibition après 2h d'une exposition à 50D : 40 %).

Ces résultats soulèvent la question de la relation entre concentration d'exposition et concentration accumulée dans les biofilms. La connaissance du temps de réponse des organismes à une exposition aigue est également importante pour une meilleure interprétation des mécanismes de transfert et de distribution des pesticides dans le biofilm.

Chapitre 4 :

Etude des mécanismes de sorption du diuron et de réponse du biofilm

4. Chapitre 4 : Etude des mécanismes de sorption du diuron et de la réponse du biofilm

4.1. Introduction générale

Dans le chapitre précédent il a été mis en avant le fait que l'équilibre cinétique entre la colonne d'eau et le biofilm était rapidement atteint (partie 3.2 et 3.3). Aussi, les effets des facteurs environnementaux tels que la vitesse du courant, la température et la photopériode ont été évalués (3.3 et 3.4).

Pour chacune des expérimentations, il a été établi une non linéarité entre les concentrations d'exposition et la bioaccumulation dans le biofilm via l'augmentation du BCF entre l'exposition à $50 \mu\text{g.L}^{-1}$ et 5g.L^{-1} de diuron. Ces observations ont laissé entendre un phénomène de saturation des sites de sorption. Afin d'explicitier ce phénomène, il a été nécessaire d'étudier les isothermes de sorption du diuron dans le biofilm. Ceci a permis également d'affiner les connaissances déjà acquises dans le chapitre précédent sur les mécanismes de transfert et de distribution du diuron, ainsi que sur les doses maximales d'accumulation, et de clarifier la phase de saturation.

En plus de la définition de la toxicocinétique du diuron dans le biofilm, il a été souligné que son impact toxique était quasiment immédiat pour chaque traitement testé. Du fait de la réponse instantanée du biofilm (inhibition de l'activité photosynthétique), au cours du chapitre précédent, il n'a pas pu être établi avec précision la relation dose-réponse en raison du temps de réponse inférieur au temps d'échantillonnage ($< 1 \text{ min}$). Aussi, l'effet toxique de cet herbicide s'est révélé être constant même sur de longues périodes d'exposition continue (21 jours). Or les études précédentes n'ont pas permis de déterminer si une réversibilité de l'impact toxique était possible en cas de levée de la pression toxique. De nombreuses études se sont intéressées à la récupération du biofilm après des durées plus ou moins longues d'exposition (Copin et al., 2015; Laviale et al., 2011; Morin et al., 2010; Proia et al., 2011; Tlili et al., 2011), mais peu ont déjà abordé ce sujet sous un angle temporel au niveau de la réponse biologique. Étant donné que l'inhibition de la photosynthèse est simultanée à la bioaccumulation, l'hypothèse selon laquelle les mécanismes mis en place pour la

récupération du biofilm seraient aussi véloces que ceux impliqués dans l'accumulation, peut être posée.

L'objectif de ce chapitre 4 est donc d'aller plus loin dans l'étude des mécanismes de transfert et de distribution du diuron dans les biofilms, pour une large gamme de concentrations d'exposition. Il s'agira aussi de déterminer plus précisément la réponse biologique instantanée des organismes à l'exposition au diuron, et à la levée de pression toxique.

Afin de caractériser plus finement les rouages de la bioaccumulation du diuron et de son effet, il a été nécessaire de se détacher du réalisme environnemental. C'est pourquoi deux expérimentations ont été mises en place. Au cours de la première expérimentation, le but a été de déterminer les isothermes de sorption du diuron dans les biofilms, notamment en caractérisant le phénomène de saturation de l'accumulation suggéré par les études précédentes (Chapitre 3). Puis dans un deuxième temps de déterminer le temps de réponse des biofilms à différentes concentrations d'exposition, en parallèle du niveau d'impact toxique engendré.

4.2. Isothermes de sorption du diuron dans le biofilm

4.2.1. Introduction

Jusqu'alors peu d'études se sont concentrées sur les capacités d'accumulation des herbicides par les biofilms. Pour l'aspect toxicocinétique d'une part, il a été rapporté à plusieurs reprises dans le chapitre précédent que la bioaccumulation du diuron dans les biofilms ne semblait pas linéaire. Pour vérifier ces observations qui impliquent un phénomène de saturation, les isothermes de sorption du diuron dans les biofilms ont été étudiées. Pour ce faire, les biofilms ont été exposés en canaux à 7 concentrations croissantes de diuron (de 1 à 375 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$) pendant 2 heures, c'est-à-dire à l'équilibre au niveau des concentrations eau-biofilm. Puis pour chaque traitement, la bioaccumulation dans les biofilms a été analysée par UPLC-ToF. Différents modèles d'accumulation ont été testés (régression linéaire, cf. 2.4.3.1 ; modèles de Langmuir simple, cf. 2.4.3.2 et double, cf. 2.4.3.3 ; double domaine réactif, cf. 2.4.3.4). Un

modèle de Langmuir simple a pu être ajusté à partir des données obtenues. Ce modèle prend en compte la possible limitation des sites de sorption, d'où le phénomène de saturation.

D'autre part, pour l'approche toxicodynamique, l'inhibition de la photosynthèse a été mesurée après deux heures d'exposition pour chaque concentration testée. Les résultats obtenus ont ensuite été modélisés selon l'équation de Hill afin d'obtenir la CE_{50} . Les courbes dose-réponse issues de l'équation de Hill sont fréquemment utilisées en écotoxicologie pour étudier les effets des contaminants sur les biofilms, car elles peuvent rendre compte de la non-linéarité de la réponse biologique le cas échéant. Le modèle E_{max} a également été utilisé car en plus de considérer la non-linéarité de l'impact toxique, il permet d'apporter une approche prédictive à l'étude, c'est-à-dire de permettre de déterminer l'impact toxique du diuron à partir de la concentration en contaminant dans l'eau. De plus, ce modèle prenant en compte l'effet toxique en fonction de la concentration d'exposition permet de représenter par extrapolation (selon le postulat de Campbell et al., 2002), l'absorption du diuron par les cellules.

Le couplage des approches toxicocinétiques et toxicodynamiques vise à établir quels sont les mécanismes de sorption mis en place lors de la bioaccumulation du diuron dans les biofilms.

4.2.2. Isothermes de sorption du diuron sur les biofilms d'eau douce

Article publié dans *Science of the Total Environment*, sous la référence " Chaumet, B., S. Morin, S. Boutry and N. Mazzella. 2019. Diuron sorption isotherms in freshwater biofilms. *Science of the Total Environment* 651: 1219-25."

Diuron sorption isotherms in freshwater biofilms

Betty Chaumet ^{1*}, Soizic Morin ¹, Sébastien Boutry ¹, Nicolas Mazzella ¹

¹ Unité de recherche EABX, Groupement Irstea de Bordeaux, 50 Avenue de Verdun, 33612 Cestas Cedex, France

*corresponding author: betty.chaumet@irstea.fr

Key words: TK-TD, pesticides, bioaccumulation, adsorption isotherms, photosynthesis inhibition

Abstract

Biofilms are excellent bioindicators for water quality assessment because of their ability to integrate contamination, and their position at the base of the trophic chain in aquatic environments. Pesticides are ubiquitous in aquatic environments and can constantly interact with aquatic organisms, including those that make up biofilms, at fluctuating concentrations.

The aim of this study was to describe pesticide behaviour in biofilms. Previous research highlighted that contaminant sorption was not always linear, but no study considered organic bioaccumulation isotherms and toxic impacts to biofilms concurrently. In order to characterize pesticide sorption isotherms in biofilms and the mechanisms involved in the uptake process, we simultaneously assessed bioaccumulation and toxic impact of diuron (a photosynthesis inhibiting herbicide) at the water-biofilm concentrations equilibrium.

Mature biofilms grown on glass slides during one month were subsequently exposed in channels to 7 increasing concentrations of diuron from 1 to 500 $\mu\text{g.L}^{-1}$, plus a control condition, for two hours with a flow velocity of 2 cm.s^{-1} . Then, a Langmuir isotherm equation was fitted to the bioaccumulation data, and an E_{max} model to toxic impact results.

This study established that diuron bioaccumulation in biofilm is nonlinear, and allowed to calculate the Langmuir constant and maximal concentration of diuron potentially accumulated in biofilm (up to 17771 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$). In turn, we found that photosynthetic inhibition followed classical dose-response patterns with diuron concentrations in the water, and that EC_{50} could be established at 75 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$. A continuous diffusion phenomenon was thus demonstrated but it was not linearly correlated to bioaccumulation, highlighting complex uptake mechanisms operating within the matrix. The coupling of toxicokinetic and toxicodynamic approaches provided original information about pesticide behaviour and impact in periphytic microorganisms.

4.2.2.1. Introduction

Nowadays, pesticides are widely and abundantly used. They are present in all environmental compartments and more particularly in aquatic environments that are the end-point receptacles of pollution as a result of runoff and leaching processes (Vercaene-Eairmal et al., 2010). They can disturb aquatic ecosystems, especially biofilms which often constitute the first link in the trophic chain (DeLorenzo et al., 2001; Flemming et al., 2007). Biofilms are considered good bioindicators (Edwards & Kjellerup, 2013), as they can integrate and react quickly to contamination. For example, a study carried out by Morin et al. (2018) described rapid toxic effects of diuron on the photosynthetic activity of freshwater biofilms (within minutes).

Biofilms are increasingly used for water quality assessment and their responses to the toxicity of some organic pollutants has been well studied (Schriever & Liess, 2007; Morin et al., 2012; Kim Tiam et al., 2015; Guasch et al., 2016). Considering herbicides in particular, the acute and chronic toxicity to biofilm photosynthetic activity has been reviewed in e.g. Debenest et al. (2009); Pesce et al. (2011); Kim Tiam et al. (2016). Dose-response curves are used to determine the EC_{50} (half maximal effective concentration). They are generally nonlinear (sigmoidal) and are modelled classically using the Hill equation. In toxicodynamic approaches (Derendorf & Meibohm, 1999), nonlinear relationships between dose and effects can be represented using the E_{max} model, assuming that the toxic impact is directly related to

absorption processes. In ecotoxicology, the use of dose-response curves is usually sufficient to study the toxic effects of contaminants. However, the E_{max} model was developed for the field of toxicology. Here, this model could be used to provide a predictive aspect of the diuron toxicodynamic on biofilms.

Moreover, biofilms are comprised of microorganisms like microalgae, fungi and bacteria embedded in a matrix of Extracellular Polymeric Substances (EPS) (Romaní et al., 2008). This EPS matrix contains polysaccharides, proteins, DNA and humic acids (Lawrence & Neu, 2003; Sutherland, 2001). Consequently, they present several sorption sites, which implicitly suggests different uptake mechanisms. In fact, Bäuerlein et al. (2012) demonstrated that organic compounds (such as herbicides) can interact with a sorbent in several different ways, determined by the functional groups present. Thus, the heterogeneity of biofilm composition, the availability of diverse sorption sites and their likely saturation, may contribute to multiple kinetics of bioaccumulation, being consecutive or staking. This was suggested by Zhang et al. (2018) for the sorption of the organic compound ofloxacin (antibiotic) on biofilms. They highlighted a nonlinear bioaccumulation of contaminants and modelled the sorption process using Langmuir isotherm models, among others. Langmuir isotherm models are frequently used to account for the possible limitation of sorption sites on the sorbent (single Langmuir), or for different accumulation mechanisms, such as sorption, on different sites (double Langmuir).

While the toxicity of herbicides to biofilms is well documented, little is known about organic compound bioaccumulation into biofilms, and even less about pesticide uptake coupled with toxic impact. Hence, no model exists to predict both herbicide concentration in biofilms and toxic impact from contaminant concentration in the water (toxicokinetic-toxicodynamic models), or at least only for toxic effect assessment (Copin et al., 2016). To tackle this scientific bottleneck, a better understanding of herbicide behaviour within biofilms is crucial.

In this work, the sorption isotherms and associated toxic effects of diuron, a photosynthesis inhibiting herbicide considered as one of the priority substances by the EU Water Framework Directive (directive 2000/06/EC), are studied. The objective here is to determine the 2-hour (at the water-biofilm equilibrium) diuron bioaccumulation capacity in biofilms under increasing concentrations of exposure (from 0 to 500 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$). At the same time,

photosynthesis inhibition is assessed in order to compare toxicity with diuron uptake in biofilms. Moreover, the experimental data obtained are included in a toxicokinetic-toxicodynamic (TK-TD) framework, with the aim of predicting the toxic effect from pesticide bioaccumulation levels.

4.2.2.2. Materials and methods

Chemicals and solvents

A stock solution of diuron (purity: 99 %, Dr. Ehrenstorfer GmbH) was prepared in acetonitrile (purity: 99.97 %, Biosolve) to obtain a final concentration of 200 mg.L⁻¹. Surrogates stock solution contained Monuron d6 at a final concentration of 10 mg.L⁻¹, Prometryn d6 at 1 mg.L⁻¹ and Simazine d5 at 20 mg.L⁻¹, all supplied by Dr. Ehrenstorfer GmbH. Acetone (purity: 99.5 %) was provided by Chem-Lab, and methanol (purity: 99.95 %) by Biosolve. Two buffers were used as eluents for pesticide quantification, one in ultra-pure water UPLC (pH adjusted to 5, Biosolve), and another one in methanol UPLC (purity: 99.98 %, Biosolve), both prepared at 1 mM of ammonium acetate. Internal standard solution was prepared with diuron d6 (purity: 98 %, Dr. Ehrenstorfer GmbH) in order to obtain the final concentration of 10 mg.L⁻¹

Experimental design

Sixteen glass slides (L: 26 cm, W: 6 cm) were immersed in the photic zone of Gazinet-Cestas pond (South West France, geographical coordinates: 44°46'30.1"N, 0°41'44.3"W) during four weeks in July 2017. After that time, slides colonized by mature biofilms (dry weight = 22.2 ± 8.2 mg, n= 16) were collected and introduced sequentially into three independent channels (one for each condition, L: 50 cm, W: 9.2 cm, H: 5 cm), from the lowest concentrations of exposure to the highest. Concentrations were tested one at a time at a rate of four per day (one exposure concentration every hour). The channels were located in a thermo-regulated room at 24.2 ± 0.4°C (n= 51). They were fed with recirculating water containing Dauta medium (Dauta, 1982) with average concentrations of nitrates and orthophosphates of 16.3 ±

0.2 mgNO₃.L⁻¹ and 14.0 ± 0.3mgPO₄.L⁻¹ (n= 3), respectively. Water flow velocity was 2 cm.s⁻¹ and continuous channel illumination was ensured by neon tubes, with a photon flux density of 8.19 μmol.s⁻¹.m⁻². Biofilms were exposed to diuron for two hours, which is long enough for the equilibrium between biofilm accumulation and dissolved concentration in the medium to be reached (Chaumet, unpublished data). Eight increasing diuron concentrations were used: 0, 1, 5, 10, 25, 50, 75 and 500 μg.L⁻¹ of diuron (named Ctrl, 1D, 5D, 10D, 25D, 50D, 75D, and 500D), each performed in quadruplicate (half a slide for one replicate).

Sample preparation

Biofilm sampling

After two hours of exposure, slides were removed from the channels and the biofilms scrapped using a razor blade and placed in beakers containing 40 mL of Dauta medium. The suspensions obtained were gently homogenized by agitation at 150 rpm for 20 minutes, before dividing the suspension into two fractions. A first aliquot of 10 mL was dedicated to total diuron quantification in the biofilms and prepared as described in “*samples processing and physicochemical analyses*” section. Three mL of the rest of the suspension (30 mL) were used for assessing toxic impact, measured as photosynthesis inhibition.

Pesticide extraction from the biofilm matrix and purification

Suspended biofilm samples were filtered on a Buchner using previously-weighed ashed GF/F filters (Ø 90 mm, pore size: 0.7 μm, Whatman) and then lyophilized (ALPHA 1-2 Dplus CHRIST, Germany). The dry weight was measured from lyophilized biofilm, and expressed in mg.

Pesticides were extracted from lyophilized biofilms by Accelerated Solvent Extraction (ASE 2000, Dionex). To that aim, a cellulose filter (Thermo Scientific) was introduced into an ASE-cell. Next, the GF/F filter containing the sample was loaded and the cell was fully filled with Fontainebleau sand and 10 μL of surrogates. Pesticides were separated from the biofilm matrix at 100 bars and 70 °C with acetone. The acetone extracts were evaporated under

nitrogen gas by means of a Visidry™ system (Supelco) close to dryness and re-suspended into 10 mL of ultra-pure water.

After the pesticide extraction step, the samples were purified to reduce matrix effects. A solid phase extraction (SPE) method was used by means of HR-X Chromabond cartridges (Macherey-Nagel, Germany). The cartridges were first conditioned with 5 mL of methanol and 5 mL of ultra-pure water, and secondly, filled with the sample. After percolation of the entire sample onto the cartridge, 5 mL of a solution containing 20 % of methanol and 80 % of ultra-pure water were added. The cartridges were dried during 30 minutes under vacuum and then eluted with 5 mL of acetonitrile. The eluate was collected and 10 µL of internal standards were added before evaporation close to dryness. The samples were re-suspended in 1 mL of ultrapure water and inserted into vials for subsequent pesticide analysis.

Diuron analysis of liquid samples

A volume of 1 mL of channel water was collected at the same time as biofilm samples for each condition and then filtered with a syringe-filter. Prior to the analysis, 10 % of internal standards of the whole final sample volume were added to channel water samples. Diuron and its main metabolites (DCPMU and DCPU) were quantified in both water samples and prepared biofilm samples by UPLC-ToF (Ultra-Performance Liquid Chromatography – Time of Flight Mass Spectrometry, Xevo G2-S ToF, Waters). The chromatography was performed using a 50 × 2.1 mm, 1.7 µm column (ACQUITY BEH C18, Waters) at a temperature of 45 °C. The separation was achieved with a gradient of two buffers of ultra-pure water (98 %) and methanol (2 %), both at 10 mM of ammonium acetate at pH 5 with a flow rate of 0.45 mL.min⁻¹ during 6 min, and 20 µL of sample were injected. The positive mode and the cone voltage were respectively activated at 0.7 kV and 30 V for the electrospray source. The nebulizer gas was delivered at a flow rate of 50 L.h⁻¹ at 150 °C and the desolvation gases (both nitrogen) at 1200 L.h⁻¹ at 600°C. Acquisition was performed between 50 and 1200 m/z at 0.2 s with MS^E to measure the protonated molecular ions at low collision energy (CE= 6 eV) and the fragment ions at 10-30 eV. The resolving power, full width at half maximum (FWHM) was 30,000 at *m/z* 556.2771 (leucine encephalin used as lockmass compound). A

mass accuracy window was applied at 10 mDa at the appropriate retention time (± 0.2 min) for ion extraction, and one fragment ion was also analysed for confirmation on MassLynx V4.1 software (Waters). By means of a ten point standard curve (from 0 to 50 $\mu\text{g.L}^{-1}$), the concentrations of diuron and its main metabolites were determined, and analysis quality was checked every ten samples with three quality controls from standard points at concentrations of 0, 1 and 10 $\mu\text{g.L}^{-1}$. The quantification limit of this device was established at a diuron concentration (including its metabolites) of 0.5 $\mu\text{g.L}^{-1}$ in the water. Results were expressed in $\mu\text{g.L}^{-1}$, and for biofilm samples, data were standardized by dry weight and finally expressed in $\mu\text{g.g}^{-1}$.

Photosynthesis activity

The biofilm suspension used for photosynthesis analysis was put in a quartz cuvette and agitated. Effective photosystem II quantum yield (Φ_{PSII}) was measured on biofilm suspensions after 15 minutes of light adaptation by means of a Pulse Amplitude Modulated fluorimeter (PhytoPAM, Heinz Walz GmbH, Germany) with 5 values per replicate. The Φ_{PSII} values for each treatment were then converted into photosynthesis inhibition expressed as percentages of average control values.

Data analysis and modelling

In order to describe diuron sorption isotherms, different models were tested on bioaccumulation data. The first step was to verify if uptake in biofilms was linear by applying a linear regression (*Equation 7*) to bioaccumulation data and fitting constants a , which correspond to the bioconcentration factor (BCF), and b to background diuron concentrations in biofilms.

Equation 7

$$[\text{diuron}]_{\text{biofilm}} = a * [\text{diuron}]_{\text{water}} + b$$

Then, to test the hypothesis postulating that by their heterogeneous composition, biofilms present different sorption sites, and consequently different kinetics of accumulation depending on site properties and coverage, a model accounting for the possible limitation of sorption sites on the sorbent was used: the Langmuir isotherm model. This model implies nonlinear bioaccumulation and a possible saturation phenomenon.

The bioaccumulation results were modelled according to Langmuir equations (Praus & Turicová, 2007). Simple and double Langmuir isotherm models (respectively *Equation 8* and *Equation 9*) were tested. In both cases, they were fitted to the data using the *nls* command (nlstools package) with R software.

Equation 8

$$[diuron]_{biofilm} = \frac{C_{max} * K_L * [diuron]_{water}}{1 + K_L * [diuron]_{water}}$$

Where: C_{max} is the maximal concentration of diuron accumulated in the biofilm in $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$, and K_L is the Langmuir constant. After the model was established, a Bartlett test was performed to verify homoscedasticity of standardized residues, and a Shapiro-Wilk test was applied to check their distribution. A p-value of 0.05 was considered as significant.

The simple Langmuir isotherm model was applied to two datasets. The first, to values ranging from 1 to 500 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ of diuron in the water (the whole dataset), and the second, to values ranging from 1 to 50 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ of diuron in the water, in order to obtain a better overview of pesticide behaviour at concentrations closer to environmental exposure.

In the case where the sorbent, here the biofilm, presents several sorption sites, such as chemical groups on polysaccharides (hydroxyl) and proteins (carboxyl and amid), for example, the double Langmuir isotherm equation (Bäuerlein et al., 2012) (*Equation 9*) may be more appropriated to gain precision regarding the sorption capacity of each site (e.g: C_{max}). The double Langmuir isotherm model was applied to data ranging from 1 to 500 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ of diuron in the water (the entire dataset). C_{max} and K_L are the same constants as for *Equation 8*, the 1 and 2 in subscript mark the differentiation between the two sorption sites.

Equation 9

$$[diuron]_{biofilm} = \frac{C_{max1} * K_{L1} * [diuron]_{water}}{1 + K_{L1} * [diuron]_{water}} + \frac{C_{max2} * K_{L2} * [diuron]_{water}}{1 + K_{L2} * [diuron]_{water}}$$

Photosynthetic activity data were fitted with RegTox macro (version 7.07, E. Vindimian, <http://eric.vindimian.9online.fr/>) to a Hill model, in order to obtain the concentration leading to a 50 % inhibition of photosynthesis (EC₅₀).

It was assumed that toxic impact was related to bioaccumulation in microalgae (Campbell et al., 2002). As the hypothesis was that pesticide uptake by biofilms was not linear, the E_{max} model, which represents the non-linear relationships between doses and effects, was applied to photosynthesis inhibition data to support this hypothesis. The E_{max} model was applied to toxic impact data using Equation 12 (Derendorf & Meibohm, 1999). In Equation 12, E represents the diuron effect, which is the photosynthesis inhibition in percentage of control, and E_{max} is the maximal toxic impact, which is the maximal inhibition of photosynthesis in percentage. In the literature, it was demonstrated that diuron can completely inhibit photosynthesis activity (Copin & Chèvre, 2015), thus maximal effect (E_{max} value) was fixed at 100 % inhibition.

Equation 12

$$E = \frac{E_{max} * [diuron]_{water}}{EC_{50} + [diuron]_{water}}$$

In order to couple pesticide bioaccumulation in biofilms and the related toxic impact (Equation 13) Equation 4 was re-used. This time, instead of using the calculation of the diuron toxic impact from diuron concentration in the water, we used the diuron concentration in the biofilm calculated from the simple Langmuir isotherm model (Equation 8) and from linear regression (Equation 7). Here, the aim was to test if the data from the simple Langmuir isotherm model and linear regression could be used in the E_{max} model to predict toxic impact. Regression coefficients were determined using Excel software.

Equation 13

$$E = \frac{E_{max} * [diuron]_{biofilm \text{ calculated from bioaccumulation model}}}{EC_{50} + [diuron]_{biofilm \text{ calculated from bioaccumulation model}}}$$

4.2.2.3. Results

Diuron bioaccumulation and modelling

Tableau 10: Diuron concentration in the channels ($\mu\text{g.L}^{-1}$) and in the biofilm ($\mu\text{g.g}^{-1}$), and photosynthesis inhibition expressed in percentage of the control. All values are average \pm standard deviation.

Treatment	[diuron] _{water} ($\mu\text{g.L}^{-1}$)	[diuron] _{biofilm} ($\mu\text{g.g}^{-1}$)	Photosynthesis inhibition (%)
Ctrl	< QL*	60 \pm 71	0 \pm 0
1D	1.01	380 \pm 56	2 \pm 1
5D	3.72	1518 \pm 230	11 \pm 2
10D	6.57	1307 \pm 207	17 \pm 1
25D	23.31	1849 \pm 296	25 \pm 1
50D	44.36	1965 \pm 302	36 \pm 4
75D	70.60	3234 \pm 169	51 \pm 2
500D	375.45	10061 \pm 395	87 \pm 4

* Quantification limit

Diuron concentrations measured in the channels were in the same range as the nominal concentrations (Tableau 10). No diuron metabolites were quantified in the water channels after two hours of exposure (below quantification limits, data not shown). A small amount of diuron was quantified in the biofilm from the control condition (60 \pm 71 $\mu\text{g.L}^{-1}$), while diuron concentration in the water channel samples was below the quantification limits. The surprising amount of diuron quantified in control biofilms and its high standard deviation are explained by one replicate that may have been contaminated during the colonization period in the environment. However, it is worth noting that diuron concentration in control biofilms was still 6-fold lower in average than in the lowest exposure condition (1D).

The total amount of diuron accumulated in the biofilms at the moment of sampling, assumed to be at equilibrium, increased following the gradient of exposure in the water channels (Figure 35), up to $1518 \pm 230 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ for a water concentration from 0 to $3.72 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ (Tableau 10, Figure 35). Then, diuron bioaccumulation reached a plateau (for 5D to 50D) and increased again from $44.36 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ of diuron in the water, up to $10061 \pm 395 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ in the biofilm at the highest concentration of exposure (Tableau 10, Figure 35).

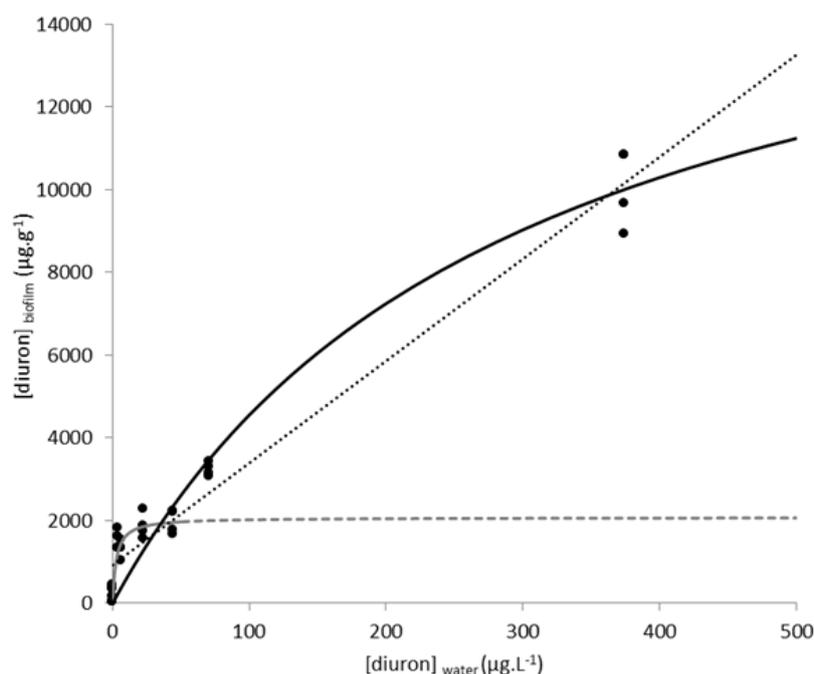


Figure 35: Diuron concentration in the biofilm in $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ expressed as a function of diuron concentration in the water in $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$. The dots are the experimental data, and the curves correspond to the models tested. The black dotted line is the linear regression fitted to all data. The black full line is the simple Langmuir established with the data from 1D to 500D. In grey is the simple Langmuir model established with data ranging from 1D to 50D (full-line), and its extrapolation for diuron concentrations above $50 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ in the water (dotted line).

The linear regression satisfactorily fitted the overall trend of the dataset ($R^2= 0.96$, $p < 0.001$; $a= 24.67$, $b= 927.96$). However, the experimental data were underestimated at low concentrations of exposure and the regression was mostly driven by the 500D data (Figure 35).

The simple Langmuir isotherm model performed using the data from 1D to 500D had a very good fit with the experimental data ($R^2= 0.97$, Figure 35), with a homogenous and normal

distribution of the residues (Bartlett test: p-value < 0.001, Shapiro-Wilk test: p-value = 0.96). This model allowed to establish the maximal concentration of diuron uptake by biofilm (C_{\max}) at 17771 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ (Tableau 11). Nevertheless, as was the case with linear regression, this model underestimated the experimental data for the lowest concentrations of exposure (Figure 35).

The simple Langmuir isotherm model created from data ranging from 1D to 50D in the water (Figure 35) was better adapted to low concentrations and highlighted that a plateau was reached from 3.72 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$. The constants associated with this model were highly different from the simple Langmuir isotherm model performed with the data from 1D to 500D. For example, the C_{\max} was calculated at 2074 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ (Tableau 11) which is almost 9 times lower, i.e. indicating a lower sorption capacity: at high concentrations of exposure, the bioaccumulation was underestimated.

The double Langmuir isotherms model (Equation 9) failed to satisfactorily fit the experimental data, with some modelled constants below zero.

Tableau 11: Constants from simple Langmuir isotherm models. C_{\max} : maximal diuron concentration in the biofilm in $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$, K_L : Langmuir constant, and R^2 : determination coefficient

Experimental data used	C_{\max} ($\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$)	K_L	R^2
Data from 1D to 500D	17771	0.003	0.97
Data from 1D to 50D	2074	0.378	0.49

Toxic impact

Photosynthesis inhibition increased continuously with diuron concentration in the water (Figure 36), and followed a Hill equation. At the highest dose of diuron (375 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$), maximal percentage of inhibition was 87 ± 4 %. According to RegTox modelling, the EC_{50} was 75 ± 10 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ of diuron.

The E_{\max} model performed according to Equation 4 had a good fit with the experimental values ($R^2= 0.99$, Figure 36). Calculated effects from diuron concentrations in biofilm obtained by a simple Langmuir isotherm model with data ranging from 1D to 500D (Figure 36)

followed the same trend as the E_{max} model. The curve was similar to the experimental data ($R^2= 0.98$), except for the highest concentration where the toxic impact was slightly underestimated. In contrast, the E_{max} model predicted from the simple Langmuir isotherm model and performed only with data ranging from 1D to 50D was unable to fit the experimental data ($R^2= 0.68$) and reached a plateau of 50 % photosynthetic inhibition. Similarly, the toxic effect predicted using the E_{max} model and diuron accumulation calculated with the linear regression ($R^2= 0.76$) showed the same kind of curve but with a maximal effect of about 100 %, achieved for water concentrations well below the EC_{50} .

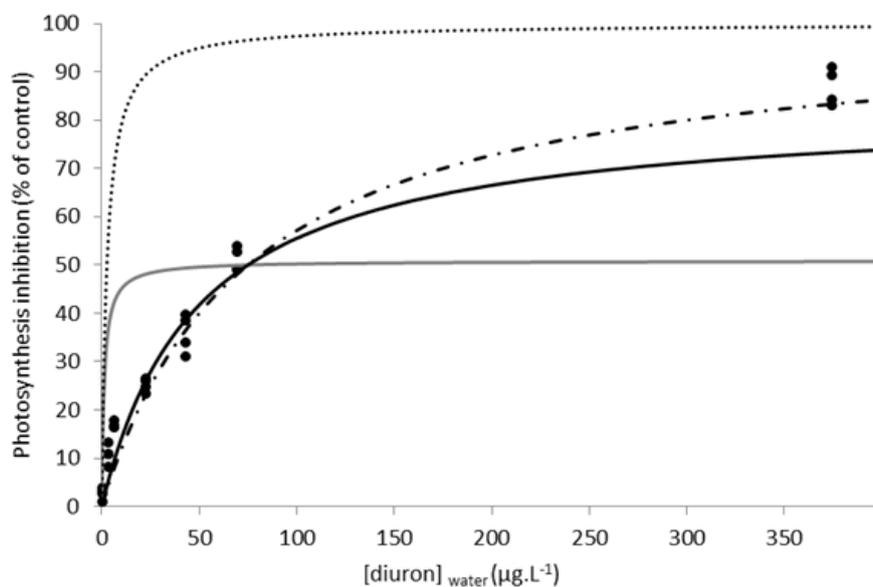


Figure 36: Photosynthesis inhibition in percentage of control expressed as a function of diuron concentration in the water in $\mu\text{g.L}^{-1}$. The dots are the experimental data. The curves are the predicted dose-effect relationships modelled by the E_{max} model: based on diuron concentrations measured in the water (Equation 12, dotted-dash curve), based on diuron bioaccumulation in biofilm in accordance with Langmuir calculations (Equation 13) using a simple Langmuir isotherm model for all the data (black curve) or for the lowest concentrations of exposure only (up to 50D, grey curve). The dotted line represents the E_{max} model performed using diuron concentrations in the biofilm calculated with the linear regression.

4.2.2.4. Discussion

Sorption isotherms of diuron in biofilms

Our bioaccumulation data did not fully support the hypothesis that diuron accumulation by biofilms is not linear. A more unequivocal conclusion was reached by Wang et al. (2002), who obtained nonlinear curve trends similar to those presented in *Figure 35*, with p-chlorophenol adsorption on bacterial EPS, and also by Zhang et al. (2018), with ofloxacin uptake in freshwater biofilms.

The simple Langmuir isotherm model fitted to the entire dataset was satisfactory. However, higher numbers of experimental data between 75D and 500D would have been valuable to refine bioaccumulation trends at higher doses and improve our understanding of diuron behaviour in biofilms. Besides, the model did not fit the experimental values perfectly for the lowest concentrations of exposure (*Figure 35*). For low exposure concentrations, the simple Langmuir isotherm model performed with data ranging from 1D to 50D contributed to a better description of diuron accumulation at low doses. From 5D to 50D, the plateau in bioaccumulation values suggests a saturation phenomenon, which could be due to a quick saturation of adsorption sites on EPS. However, the saturation phenomenon identified between 5D and 50D also suggests accumulation in the other microorganisms that compose the biofilms and do not show a measurable response with the inhibition of photosynthesis such as bacteria and fungi. It appears that above 50D, bioaccumulation increased again with increasing diuron concentrations and had a good fit with the simple Langmuir model based on all the data. Maximal diuron concentration in the biofilm calculated from a simple Langmuir isotherm model shows that biofilms have a high capacity to accumulate organic compounds, which is in accordance with the conclusions reached by Zhang et al. (2018), who found C_{\max} values between 1500 and 6000 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$.

However, at the lowest diuron concentrations (from 1D to 25D), both linear regression and a simple Langmuir isotherm model considering all exposure concentrations seemed to be poorly adapted, in comparison with the simple Langmuir isotherm model created with the data ranging from 1D to 50D. Using only this initial range of exposure, concentrations resulted in successful modelling and with standardized residues following homogenous (p-

value: 0.0848) and normal (p-value: 0.66) distributions. The experimental data (Figure 35) and the constants obtained highlighted two different curve trends in accordance with exposure levels, and consequently, two different accumulation processes.

The complementarity of both models for successive ranges of exposure concentrations supports the hypothesis that bioaccumulation followed two different sorption processes, implying two cumulative transfer mechanisms that were unfortunately not possible to model using a double Langmuir isotherm equation. The very complex nature of biofilm did not allow for both models (a very simple model: linear regression type, and a more complex model: double Langmuir type) to fully describe diuron sorption mechanisms, since biofilm obviously presents many more than two sorption sites with distinct properties (due to the presence of several sorption mechanisms). In model development, it is necessary to start with very simple basics, and then gradually complexify. According to the R^2 , both the simple Langmuir isotherms model (performed with data ranging from 1D to 500D), and the linear regression model well described diuron sorption mechanisms. However, for equivalent robustness, the simple Langmuir model contributed to a better overview of how pesticides roughly behave in biofilms. Indeed, because of its ability to take into account the possible limitation of sorption sites, it more closely reflects the reality of biofilm and its heterogeneous composition. Moreover, it seems unlikely that a living organism can accumulate infinite amounts of contaminants.

Dose-dependent toxic impact and E_{max} model

Photosynthesis results showed a dose-dependent toxic impact, highlighting a continuous diffusion phenomenon into the biofilm and absorption by the cells. Ricart et al. (2009) also highlighted a continuous diuron impact on photosynthetic activity over diuron concentration in the water.

The EC_{50} established based on our results is higher than other recent studies dealing with biofilms from the Morcille River (France) exposed to diuron (e.g. Foulquier et al., 2014: EC_{50} in the range of 9-13 $\mu\text{g.L}^{-1}$, or Pesce et al., 2010: EC_{50} around 22 $\mu\text{g.L}^{-1}$). This higher tolerance can be due to biological differences (origin and composition of the biofilm, pre-exposure

history) as well as to differences in test exposure conditions (de-structured biofilm suspended in water for Foulquier et al., 2014 and Pesce et al., 2010, versus intact biofilms during exposure in this study; photosynthesis measurements after a 30-min “recovery” - section 2.3.1. - in fresh Dauta medium here).

The choice of the E_{max} model for diuron sorption on biofilms was relevant with the experimental data and described the non-linear response of organisms to contamination well. The assumption that as soon as a toxic effect is visible, then there is internalization in organisms was accepted.

Consequently, the diffusion phenomenon highlighted by the E_{max} model also demonstrates that diuron was continuously diffused in the EPS matrix. Furthermore, this fact emphasized the quick and uninterrupted diuron absorption by microalgae.

Linking bioaccumulation and toxicity

Experimental data overview

Put together, the bioaccumulation and toxicity results highlight different mechanisms involved in diuron transfer into biofilms. Bioaccumulation results showed a rapid increase in diuron uptake by cells (until 5D), and simultaneous increase in toxic impact, indicating that an absorption mechanism was setup. Above 5D, photosynthesis inhibition kept on increasing (*Figure 36*), while a plateau was reached for bioaccumulation until concentrations reached $44.36 \mu\text{g.L}^{-1}$ of diuron in the water. Assuming that a toxic effect is observable when the contaminant is internalized by cells (Campbell et al., 2002), there was no saturation phenomenon for diuron uptake by photosynthetic organisms based on the dose-response curve (photosynthesis inhibition still increasing).

This desynchronization between bioaccumulation and toxic impact between 5D and 50D highlights that, although the amount of diuron accumulated in the biofilm was saturated, diuron from the water medium was constantly in contact with the cells, perhaps due to pesticide transfer by diffusion into the pores and channels of the EPS matrix. Moreover, as the bioaccumulation was not directly correlated to the toxic impact, this implies that

mechanisms other than the absorption process were at work on the EPS matrix, such as adsorption mechanisms.

Similar mechanisms were reviewed by Ikuma et al. (2015) for nanoparticles-biofilm interactions, that were described as a three-step process: a diffusion of pollutants in the biofilm surroundings, followed by adsorption on the EPS matrix, and lastly a migration inside the biofilm. While less documented, the mechanisms involved in the sorption of organic contaminants are likely to be similar, as described by Ding et al. (2015) for endocrine disruptor exposure of biofilms and sediments: they observed contaminant sorption at the surface, followed by a diffusion phenomenon into organic matter and pores.

Interrelationship of toxicokinetic and toxicodynamic approaches

The effects predicted from the diuron concentrations in the biofilm calculated with the simple Langmuir isotherm model (using all data, *Figure 36*), were very similar to the classical E_{\max} model based on diuron concentration in the water (cf. *Equation 12*). This is consistent with the assumptions of absorption mechanisms of E_{\max} and simple Langmuir isotherm models performed with the entire dataset. Interestingly, the striking overestimation of effects at low concentrations predicted from the use of the E_{\max} model with outputs of the simple Langmuir isotherm model using data ranging from 1D to 50D (*Figure 36*) was peculiar, as the model did well in modelling bioaccumulation (also for low diuron concentrations). This implies that part of the bioaccumulated diuron in this range of exposure concentrations was either not bioavailable to the cells, or accumulated in microorganisms other than microalgae (e.g. bacteria, fungi) (Katagi, 2013). The hypothesis that this part of diuron was biodegraded by biofilm microorganisms was discarded by measurements of diuron metabolites in the biofilm.

For bioaccumulation data, the linear regression model seemed to be a good candidate to characterize diuron sorption mechanisms. However, the E_{\max} model established with these data was not able to represent the real toxic impact. As this model was very far from reality, our data suggest that accumulation in biofilm did not take place in a linear way. This

confirms that the most suitable model so far to represent the various mechanisms involved in the accumulation of contaminants in biofilm was the simple Langmuir model.

Using the E_{\max} model implemented with the entire bioaccumulation data calculated with the simple Langmuir isotherm model, the prediction of the toxic effect of diuron matched the experimental data perfectly. Consequently, this approach allows (within the range of exposure concentrations considered) to predict toxic impacts based on the diuron concentrations found in the biofilm.

4.2.2.5. Conclusion

In this study, we proved that diuron bioaccumulation in biofilms is most likely not linear. Diuron behaviour in biofilm was determined by means of the coupling of the toxicokinetics (simple Langmuir isotherm modelling for selected diuron concentrations of exposure) and toxicodynamics (E_{\max} modelling of photosynthesis inhibition). As was demonstrated, the simple Langmuir isotherm models established were efficient for low and high diuron concentrations in the water (depending on exposure concentrations), given that appropriate constants were accounted for (2 sets of constants for low and high concentrations of exposure, respectively). This approach provided a means by which diuron mechanisms of accumulation in biofilms were uncovered. It was demonstrated that a diffusion phenomenon exists through the EPS matrix, accompanied by an absorption mechanism into the cells. At a concentration of $17660 \pm 358 \mu\text{g.g}^{-1}$ of diuron in the biofilm, a saturation phenomenon of the EPS was observed while continuous sorption in photosynthetic cells still occurred (continuous increase in photosynthesis inhibition). However, an analysis of sorption mechanisms beyond the maximum concentration tested here would be necessary to verify the value at which a saturation phenomenon takes place (C_{\max}). The data showed that the diuron concentration found in the biofilm (non-linear) did not fully explain the toxic (continuous) effect. Although the E_{\max} model determined that the simple Langmuir model was the most suitable for describing sorption phenomena in biofilm, it is nevertheless relevant to consider the diuron concentration in the medium for toxicological impact

assessment. With this study, we highlight that for biofilm toxicity studies, combining accumulation and effect measurements may be the best way forward of identifying risk.

The adjusted E_{\max} model hereby combining toxicokinetics and toxicodynamics approaches (*Equation 13*) could present a real benefit for field studies. In fact, it enables us to predict real diuron exposure and the associated toxic impact from diuron concentration measurements in the biofilm, thus assessing potential impairment of the first components of the aquatic trophic chain. However, the model must be extended to other molecules with different physicochemical properties to account for the likely co-occurrence of contaminants in aquatic environments, and the competitive effects of substances in mixtures on aquatic organisms)

Acknowledgments

We would like to thank Mélissa Eon (Irstea) for analysing the nutrients in the water channels, Léa Gauthier (Irstea) for discussions and comments on the manuscript, and Emilie Saulnier-Talbot for proofreading the English style and grammar.

This document has been carried out with financial support from the French National Research Agency (ANR) in the frame of the Investments for the future Programme, within the Cluster of Excellence COTE (ANR-10-LABX-45).

4.2.3. Bilan

Cette étude a confirmé que la bioaccumulation du diuron dans les biofilms n'était pas linéaire (Figure 35) ce qui atteste l'implication de différents mécanismes de sorption. Au niveau de la bioaccumulation, un plateau d'accumulation a été visible entre 5 et 50 $\mu\text{g.L}^{-1}$ de diuron, concordant avec un phénomène de saturation. À des concentrations d'exposition plus élevées, une reprise de l'accumulation a été observée.

Concernant l'inhibition de photosynthèse résultant de l'exposition au diuron, les biofilms ont subi les effets toxiques du diuron croissants avec les concentrations d'exposition. La divergence entre les approches toxicocinétiques et toxicodynamiques du diuron dans les biofilms suggère un phénomène de diffusion, puis de saturation dans la matrice ainsi que d'absorption en continu par les cellules (Figure 37).

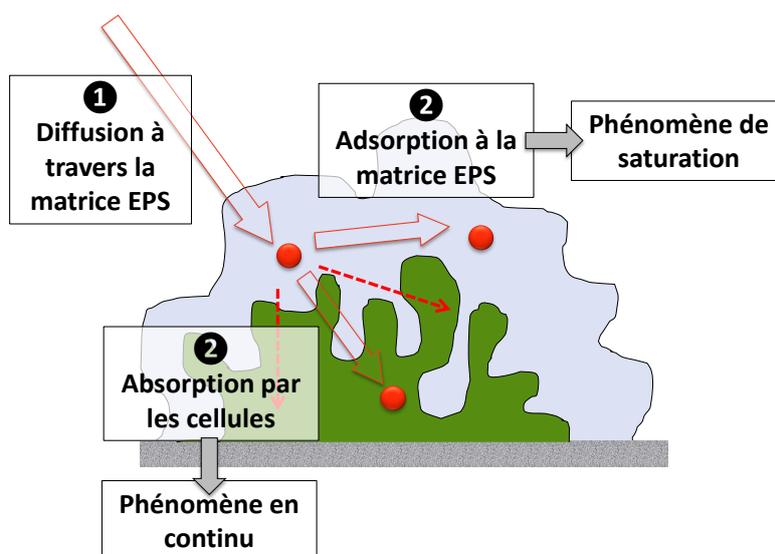
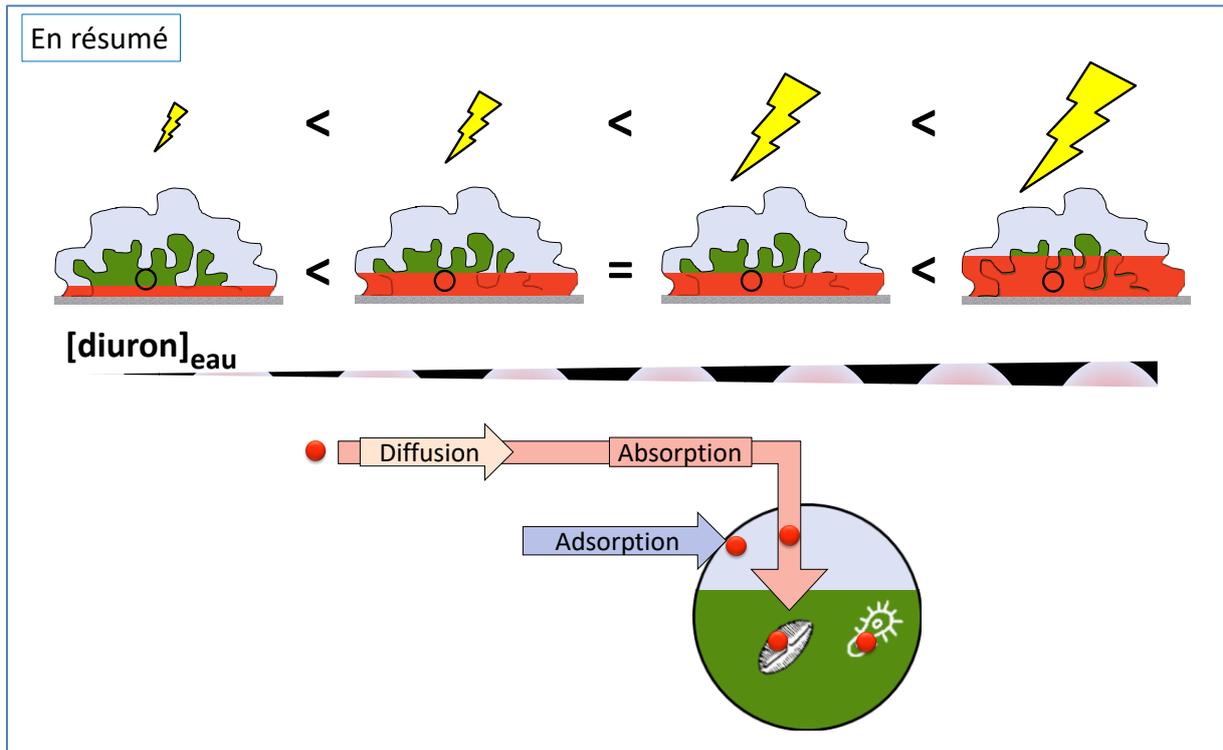


Figure 37: Représentation de la superposition des différents mécanismes de sorption

Grâce à la combinaison des équations de Langmuir et du modèle E_{\max} , un premier modèle de prédiction de la concentration en diuron dans le milieu et de l'effet toxique associé a pu être établi, à partir de la concentration en diuron dans le biofilm. Cependant, celui-ci reste encore élémentaire et pourrait être amélioré pour être plus proche de la réalité environnementale en prenant en compte par exemple les effets de compétition entre les divers contaminants

présents dans le milieu. Ce modèle présente également une limitation car il a été établi une fois l'équilibre entre la colonne d'eau et les biofilms atteint, avec une exposition constante durant 2h, alors que dans l'environnement l'exposition n'est généralement pas stable en fonction des conditions hydrologiques.



4.3. Effets immédiats de l'exposition au diuron

4.3.1. Introduction

L'utilisation de courbes dose-réponse classiques présente certaines limites notamment la non prise en compte de la variabilité potentielle des effets en fonction de la durée d'exposition.

C'est pourquoi cette étude a porté sur le niveau (pourcentage d'inhibition de la photosynthèse) et le temps de réponse (délai pour inhiber de 50 % l'activité photosynthétique) des biofilms en fonction de la concentration d'exposition, sur les premières minutes de contact diuron/microorganismes. En effet, les résultats précédents (partie 4.2) suggèrent une expression de la toxicité du diuron simultanée à l'accumulation, dans des temps très courts.

Pour déterminer le temps nécessaire au diuron pour atteindre sa cible biologique, deux expérimentations à deux périodes différentes (août et décembre) ont été réalisées, avec des biofilms matures, et de structure (biomasse et composition algale) différente.

Pour la première (août), l'évolution de l'activité photosynthétique de biofilms en suspension a été suivie pendant 1h (avec une fréquence de mesure de 5 à 10 secondes), immédiatement après exposition à quatre concentrations croissantes en diuron (une concentration faible correspondant à la $CE_{25} = 5,2 \mu\text{g.L}^{-1}$, la $CE_{50} = 17,4 \mu\text{g.L}^{-1}$, et deux concentrations élevées provoquant une inhibition totale de la photosynthèse : 166,6 et 332 $\mu\text{g.L}^{-1}$ de diuron), et comparée à celle de témoins non exposés, sur la même durée.

La seconde expérimentation (décembre) a été réalisée avec des biofilms préalablement exposés à trois concentrations (très faible : 0,3; intermédiaire correspondant à la $CE_{50} : 19,1$ et élevée engendrant une inhibition de la photosynthèse quasi-totale : 102,4 $\mu\text{g.L}^{-1}$) de diuron pendant 3h. Ils ont ensuite été exposés en suspension à un pic de contamination de 166,6 $\mu\text{g.L}^{-1}$ de diuron et l'évolution instantanée de l'activité photosynthétique a été suivie de façon identique à la première expérimentation. Dans chaque cas, le suivi du rendement photosynthétique au cours du temps a permis d'établir des courbes dose-effet-temps de réponse (*Figure 39*).

4.3.2. Modèle dose-temps de réponse pour évaluer l'inhibition de la photosynthèse induite par le diuron sur les biofilms d'eau douce

Article publié dans *Frontiers in Environmental Science*, sous la référence " Morin, S., Chaumet, B., & Mazzella, N. (2018). A time-dose response model to assess diuron-induced photosynthesis inhibition in freshwater biofilms. *Frontiers in Environmental Science.* »

A time-dose response model to assess diuron-induced photosynthesis inhibition in freshwater biofilms

Soizic Morin^{1*}, Betty Chaumet¹, Nicolas Mazzella¹

¹Irstea, UR EABX. 50 avenue de Verdun, 33612 Cestas cedex, France

*corresponding author: soizic.morin@irstea.fr

Keywords: Bioassay, Herbicide, Microbial ecotoxicology, Periphyton, Photosynthesis, Pulse, TRC

Abstract

Contamination by herbicides is reported in most freshwater environments. These biologically active compounds may impact the non-target biota such as benthic biofilms, at the base of the trophic chain. In agricultural watersheds, herbicides occur as pulses in the system, and traditional dose-response analysis performed at a given duration of exposure (hours to days) may not predict accurately the risk of adverse impacts at shorter temporal scales (minutes to hours) corresponding to pulse exposures.

To assess the time-response relationship in biofilms exposed to herbicides, we used diuron, an inhibitor of photosynthesis, to perform bioassays (time-response curves) with the aim of characterizing the initial steps of photosynthesis decrease after exposure to the herbicide (from seconds to hours), for different concentrations of exposure. Diuron-induced inhibition of photosynthesis reflects blockage of electron transfer in PSII, therefore we defined the time lag to reach the threshold of 50 % photosynthesis inhibition ($t_{1/2}$) as the time for diuron to reach its target site (adsorption, distribution).

We found a rapid decrease in photosynthetic efficiency: $t_{1/2}$ values were dose-dependent and ranged from < 30 seconds (highest concentration of exposure) to 7'20'' (lowest concentration).

While dose-response curves are influenced by the initial biomass or nature of biofilms, time-response curves yielded similar $t_{1/2}$ for contrasted biofilms, making this parameter a unique response to be valuably incorporated into an ecotoxicology framework. We also assessed the variability of the response as a function of previous short-term (3 hours) exposure to diuron. The $t_{1/2}$ values obtained were consistent with those obtained on non-exposed biofilms, but repeated pulses of diuron exacerbated the decrease in photosynthetic yields.

This time-response approach highlighted that diuron reaches its cellular target almost instantaneously (< 1 minute), independently of biological parameters (chlorophyll *a* concentration, adaptation related to exposure history). Reversibility of toxic impacts a few hours after diuron removal was not fully demonstrated, suggesting that the kinetics of diuron release from cells to uncontaminated medium are much slower than binding rates. Our results confirm that repeated exposure is very likely to impair freshwater biofilms, in particular if pulses occur at high frequency.

4.3.2.1. Introduction

Contamination of European waterbodies by pesticides is generalized: in France, pesticides were detected in 92 % of the water samples collected within the 2013 surveillance program, with a clear dominance of herbicide substances (> 80 % of detections, SOeS, 2015). In agricultural watersheds, these substances typically reach the aquatic ecosystems as pulses (Rabiet et al., 2010) following runoff events. As herbicides may impact the non-target biota (i.e. algae), the risk associated with these substances has to be quantified. To this aim, several ecotoxicity tests have been developed based on microalgae (including standardized tests such as OECD, 1984, AFNOR, 2012). Ecotoxicity assessment based on periphytic microbial communities (biofilms) is also increasing (Ghiglione et al., 2014), given their sensitive, specific, and early responses to toxic pollution (Guasch et al., 2016; Sabater et al., 2007). Traditional dose-response analysis predicts the risk of adverse impacts of herbicides towards biofilms or microalgae for a given duration of exposure, based on endpoints such as the inhibition of growth or of photosynthesis (see review in Pesce et al., 2011). Toxic effects at environmentally relevant concentrations are generally demonstrated, but the tests are

performed at temporal scales on the order of days to weeks of exposure that are disconnected from real field exposure, of much shorter time spans (minutes to hours). Therefore, the duration of standard tests may be inappropriate to predict the hazard associated to pulse exposures.

It has been demonstrated that pulse exposure has functional and structural impacts (e.g. (Tlili et al., 2008)). In turn, changes in community structure will have consequences for higher trophic levels and ultimately, for ecosystem functioning. As herbicide exposure in the aquatic environment is fluctuating, and the manifestation of toxic symptoms is a time (and substance)-dependent process, it is thus desirable to take the temporal factor into account to improve pesticide risk assessment. Among the herbicides of topical concern, diuron (N-(3, 4-dichlorophenyl)-N, N-dimethylurea) is considered a Priority Hazardous Substance by the European Commission (Water Framework Directive, 2000/60/EC). This chemical substance acts as a photosystem II (PSII) inhibitor and is contained in many phytopharmaceutical products aiming to fight against undesirable weeds in crop protection or in road/railway maintenance, as well as for antifouling purposes, and is frequently reported in freshwater environments (Murray et al., 2010; Okamura et al., 2003). In plant cells, diuron binds to a specific niche on the D1 protein of PSII, replacing the plastoquinone Q_b. This substitution decreases the electron flow within PSII (Rutherford & Krieger-Liszkay, 2001), and consequently inhibits photosynthetic efficiency (Φ_{PSII}). The diuron-EC₅₀ (Effective Concentration causing a 50 % inhibition) for microalgal growth inhibition, over the 72-hr test period recommended by ISO and OECD guidelines (OECD, 1984, AFNOR, 2012), ranges from 7 to 36 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ for freshwater algae (<http://www.pesticideinfo.org>). For ecotoxicity assessments based on the PSII inhibition of periphytic microalgae, the EC₅₀ is generally assessed after 1 to 4-hour exposures of biofilm suspensions to increasing herbicide concentrations. These non-standard durations have generally been established following preliminary developments; however the toxicity values always fall within the same range, i.e. between 5-25 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ for pristine biofilms (with a min-max range 2-486 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$: McClellan et al., 2008; Pesce et al., 2010). In fact, Francoeur et al. (2007) demonstrated that 5 to 10 minutes of exposure to high diuron concentrations are enough to ensure that photosynthesis inhibition is complete. This quick onset of inhibition may be due to the fact that diuron reaches its binding site within minutes (Nestler et al., 2012; Schreiber et al., 2007).

Pharmaceutical studies aiming to assess the efficiency of healthcare products (e.g. antimicrobial drugs, VanMeter & Hubert, 2016) provide time-response based concepts that may be fruitfully implemented to assess the temporal features of diuron inhibitory impact on PSII in an ecotoxicology framework. As shown in *Figure 38*, we can expect a rapid decrease in photosynthetic efficiency from the time of diuron exposure. The onset of time response, $t_{1/2}$, is defined as the time lag to reach the threshold of 50 % inhibition based on the difference between optimal and minimum achievable Φ_{PSII} values.

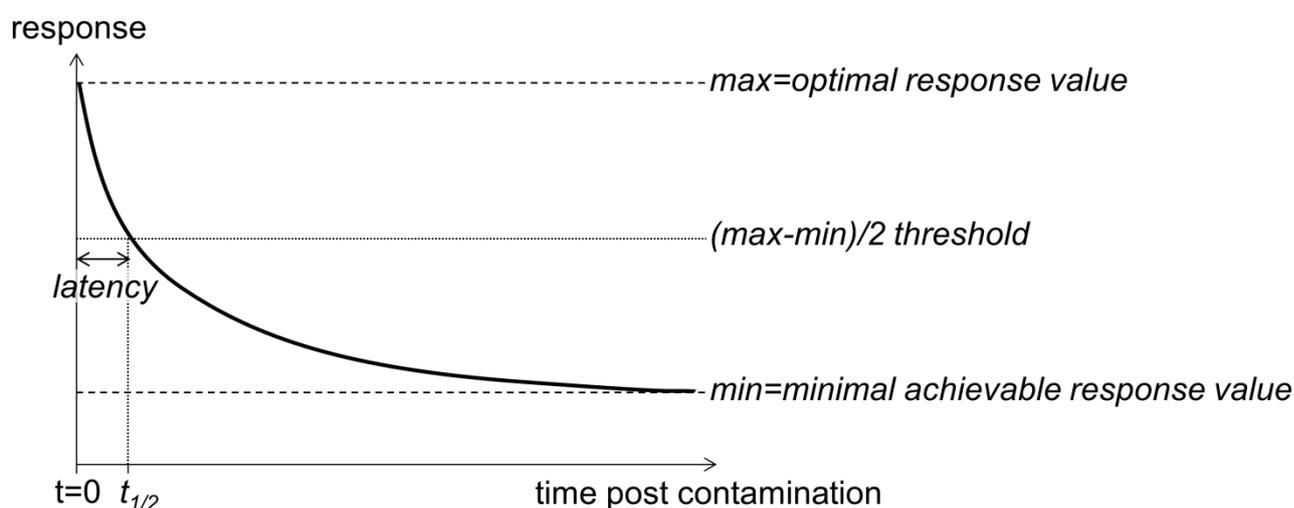


Figure 38: Schematic representation of the time-response (here, Φ_{PSII}) relationship expected to occur following PSII inhibitor exposure (contamination on $t=0$). Φ_{PSII} is anticipated to decrease after herbicide exposure, from its optimal value to a minimal achievable value (maximal inhibition). The latency is defined as the time the PSII inhibitor takes to cause a 50 % inhibition of the response. All the toxicological values are susceptible to change depending on the concentration of exposure.

In this context, we performed bioassays (called time-response curves) using suspensions of mature freshwater biofilms, to characterize the initial steps of photosynthesis decrease after exposure to diuron. Specifically our objectives were to:

- i) quantify exposure time to diuron needed to reach significant photosynthesis inhibition,
- ii) determine if exposure time depends on exposure test concentration, and
- iii) assess the variability of the response as a function of biofilm composition and previous pulse exposure to diuron.

4.3.2.2. Materials and methods

Mature biofilm collection

Glass slides (156 cm²) were used as artificial substrates for biofilm growth. Plastic racks equipped with glass slides were installed in the photic zone of Gazinet-Cestas pond (geographical coordinates: 44°46'30.1"N, 0°41'44.3"W), near Bordeaux, SW France. The pond is free of pesticides, in particular diuron concentrations are below the detection limit of 0.2 µg.L⁻¹ (n= 10 measurements in winter 2016-2017).

One-month old biofilms, settled on the glass slides, were collected in August and December 2016. Before performing the assays, the slides were scraped carefully and separated into two aliquots before being suspended in 40 mL of Dauta (1982) medium.

Diuron

Diuron (CAS reg. 330-54-1, purity= 98 %) was purchased from Dr. Ehrenstorfer GmbH (Augsburg). Stock solutions were prepared in acetonitrile, at a concentration of 200 mg.L⁻¹. They were analyzed by UPLC-ToF (Ultra-Performance Liquid Chromatography – Time of Flight Mass Spectrometry, Xevo G2-S ToF, Waters) and the different exposure concentrations were calculated. Diuron analyses in the water samples (pond, laboratory mesocosms) were performed with the same method after filtration of the samples through 0.45 µm Whatman filters. Briefly, 990-µL samples were spiked with eight internal standards (10 µL, i.e. 10 % final volume). Of these, 20 µL were injected with a solvent gradient (98 % ammonium acetate, 2 % methanol). Chromatographic separation was achieved by passing through a 5-cm C18 column (Waters). Pesticide concentrations were calculated from calibration curves (10 points, from 0 to 50 µg.L⁻¹) realized during the same period. Detection and quantification limits were of 0.1 µg.L⁻¹ and 0.2 µg.L⁻¹, respectively.

Time-response curves

We used a Phyto-PAM (Heinz Walz GmbH, Germany) and measurements were performed in quartz cuvettes fed with 3mL of agitated biofilm suspension.

We determined the chlorophyll *a* concentration in the biofilm suspensions and the proportion of algal groups present to roughly characterize the biofilms.

Time-response assessment of diuron acute toxicity was performed following the response of the effective quantum yield of PSII (Φ_{PSII}) over time following the addition of a drop of diuron (expressed as time post contamination). Experiment 1 was performed with biofilms collected in summer and Experiment 2 with biofilms collected in winter. In each time-response curve, the diuron concentration was kept constant and the response was assessed as a function of exposure time. Φ_{PSII} was measured every 5 seconds after diuron addition, then measurements were spaced out and performed every 10 seconds until Φ_{PSII} values stabilized.

Experimental setup

Experiment 1: time-response curves of pristine biofilms exposed to increasing diuron concentrations (August, 2016)

Triplicate slides collected on August 4th, 2016 were used to perform time-response curves on biofilm suspensions.

Dose-response curves established using these biofilms prior to the experiment (Supplementary Information, SI1) allowed the selection of five increasing diuron concentrations to be used for the time-response curves. The following nominal concentrations were used: no diuron (0 $\mu\text{g.L}^{-1}$; no inhibition), “low” (5.2 $\mu\text{g.L}^{-1}$; corresponding to EC_{25}), “intermediate” (17.4 $\mu\text{g.L}^{-1}$; slightly above EC_{50}), “high” (166.6 $\mu\text{g.L}^{-1}$; higher than the concentration leading to maximal achievable inhibition) and “max” (332 $\mu\text{g.L}^{-1}$; i.e. double the “high” concentration).

Time-dependent photosynthetic inhibition was assessed over a ~1-hour exposure, and $t_{1/2}$ were extracted from the three time-response curves established for each diuron exposure concentration (except for the highest concentration: only two replicates available).

Experiment 2: time-response curves of biofilms pulsed with contrasted diuron concentrations (December, 2016)

On December 6th, 2016, 16 mature biofilms were sampled. Four slides were immediately used to perform time-response curves of “non-pulsed” biofilms, under “high” diuron exposure.

The remaining slides were exposed in laboratory mesocosms to three levels of diuron pulses (0.3, 19.1 and 102.4 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ measured concentrations), each in quadruplicate. Pulse duration was 3 hours of exposure, such as in Tlili et al. (2008). The slides were collected and prepared as described above. The suspensions were allowed to recover from pulse exposure in uncontaminated Dauta medium for 4 to 8 hours before performing the time-response curves, assessed using a “high” diuron exposure. The duration of the recovery period was based on the results of Laviale et al. (2011). More details on the protocol are provided in Supplementary Information (SI2).

Statistical analyses

To model dose-response-curves (DRC), the Φ_{PSII} values measured at specific times were plotted against nominal exposure concentrations and fitted to a Hill model using RegTox macro for Microsoft ExcelTM (version 7.0.7, © Eric Vindimian, 2001). DRC were performed for each replicate biofilm suspension, then the optimized parameters of the model (500 bootstrap simulations), in particular EC_{50} , were averaged and standard deviations were calculated.

To draw time-response curves (TRC), the decrease over time in Φ_{PSII} was modeled (each replicate individually) with RegTox, using a classical Hill equation, where the optimal response value measured before the addition of the diuron drop was set as upper limit. The optimal parameters derived from the individual TRC models after 500 bootstrap simulations are given as mean \pm standard deviation (*Tableau 12*).

One-way ANOVA was used to highlight significant differences in biological responses. Linear regressions (after transformation of the data to achieve normality, when necessary) were calculated to assess correlations between biological responses (EC_{50} , Φ_{PSII}), time and concentration of exposure. In both cases, the α -level was set at 0.01.

4.3.2.3. Results and discussion

Dose dependency of the time-response relationship

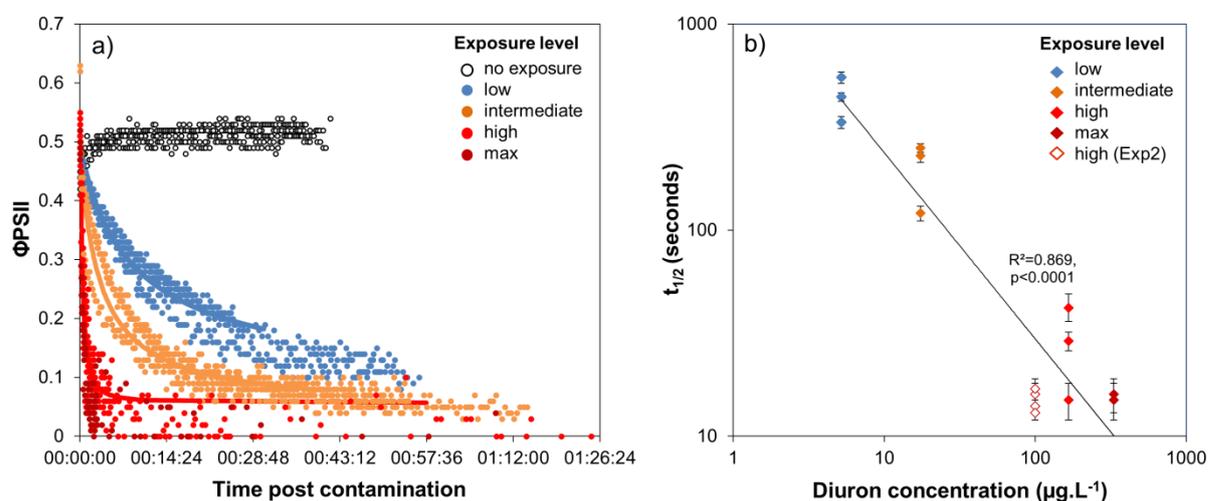


Figure 39: a) Time-response curves based on Φ_{PSII} decrease post diuron addition (Experiment 1): values are average of 3 replicates, except for the highest concentration (2 replicates available). A summary of the ecotoxicity parameters extracted from the curves are provided in Tableau 12. b) Variation of $t_{1/2}$ with diuron exposure concentration. Error bars indicate $t_{1/2}$ confidence intervals (95 %) for the individual time-response models.

When no diuron drop was added, biofilm suspensions from Experiment 1 displayed Φ_{PSII} of 0.51 ± 0.02 ($n=367$), with a slight increase over time (Figure 39a). With diuron addition, time-response curves for the four concentrations tested here highlighted that the efficiency of diuron increased gradually with increasing exposure concentrations. At the “low” exposure level, photosynthesis was inhibited down to 26.7 ± 12.5 % of the optimal value, while the

highest concentrations led to a complete inhibition of photosynthesis. Total inhibition of photosynthesis at diuron concentrations higher than $100 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ is consistent with the findings of McClellan et al. (2008) for freshwater biofilms and Magnusson et al. (2010) for microalgal species.

Tableau 12: Summary of the time-response curves results. Values are average \pm standard deviation

Diuron pulse	Diuron exposure level for TRC	Parameters extracted from the model		
		Optimal Φ_{PSII}	$t_{1/2}$	Minimal response achieved (% of optimal Φ_{PSII} value)
Experiment 1				
No pulse	Low	0.49 ± 0.01	$7'20'' \pm 1'49''$	$26.7 \pm 12.5 \%$
No pulse	Intermediate	0.50 ± 0.02	$3'28'' \pm 1'15'$	$7.9 \pm 1.8 \%$
No pulse	High	0.51 ± 0.01	$0'29'' \pm 0'13''$	$8.9 \pm 4.5 \%$
No pulse	Max	0.49 ± 0.00	$0'16'' \pm 0'01'$	0 %
Experiment 2				
No pulse	High	0.42 ± 0.01	$0'15'' \pm 0'02''$	$30.6 \pm 1.6 \%$
$0.3 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$, 3h	High	0.26 ± 0.02	$0'15'' \pm 0'04''$	$44.5 \pm 11.9 \%$
$19.1 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$, 3h	High	0.27 ± 0.02	$0'11'' \pm 0'01''$	$23.6 \pm 3.6 \%$
$102.4 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$, 3h	High	0.12 ± 0.05	$0'15'' \pm 0'03''$	$40.2 \pm 10.9 \%$

Diuron-induced inhibition of photosynthesis reflects herbicide binding to the electron acceptor of Qb within the thylakoid membrane and subsequent blockage of electron transfer in PSII. We defined latency as the time diuron took to cause a 50 % photosynthesis inhibition on biofilm suspensions (Figure 38), postulating that $t_{1/2}$ values expressed the time for diuron to reach its target site (adsorption, distribution). Our results (Figure 39a, Tableau 12) show that inhibitory effects are very rapid: $t_{1/2}$ ranged between less than 30 seconds (for the highest concentrations of exposure) to 7'20" (exposure to "low" concentration). Using diatom cultures, Magnusson et al. (2010) also showed that maximal inhibition of photosynthesis (ca. 50 %), in response to a single dose of $2.4 \mu\text{g.L}^{-1}$ diuron, was reached within minutes. Such rapid action confirms the high affinity of diuron for microalgal binding sites and almost instantaneous intracellular uptake, in agreement with Nestler et al. (2012). As for maximal inhibition, the time-lag to reach a 50 % inhibition ($t_{1/2}$) was also dose-dependent; the lower the exposure concentration, the higher the $t_{1/2}$. Figure 39b evidences that the estimated $t_{1/2}$ decreased with increasing diuron concentrations ($R^2= 0.869$, $F= 87.56$, $p < 0.0001$). However, for the "high" and "max" concentrations of exposure, the overlap between the 95 % confidence intervals suggests that binding sites were saturated above $100 \mu\text{g.L}^{-1}$.

Surprisingly, the maximal inhibition achieved for the "low" and "intermediate" concentrations tested was higher than expected, based on the dose-response curves performed with the same biofilm (SI1). Indeed, after this 3-hour exposure to increasing diuron concentrations, Φ_{PSII} was inhibited by 25 = % and 60 % at concentrations of $5.2 \mu\text{g.L}^{-1}$ ("low") and $17.4 \mu\text{g.L}^{-1}$ ("intermediate"), respectively (*versus* in TRC: by 73.3 ± 12.5 % and 92.1 ± 1.8 %). Two complementary hypotheses may explain these differences, as discussed below: the influence of the duration of diuron exposure and/or of microalgal concentrations in the suspensions tested.

Time dependency of ecotoxicity parameters

Using the data from the time-response curves shown in Figure 39a, we extracted the Φ_{PSII} values measured at several durations post exposure, from 15 seconds to 20 minutes. Dose response curves were fitted to the data (Figure 40a) and their respective EC_{50} estimated, together with 95 % confidence intervals (Figure 40b). Figure 40b corresponds to a time-to-event analysis of the data (Newman & McCloskey, 1996). The relationship between EC_{50} and time post contamination was significant ($R^2= 0.997$, $F= 1762.42$, $p < 0.0001$), and from 5-10 minutes of exposure the EC_{50} was on the order of magnitude of environmental peaks of diuron (Rabiet et al., 2010).

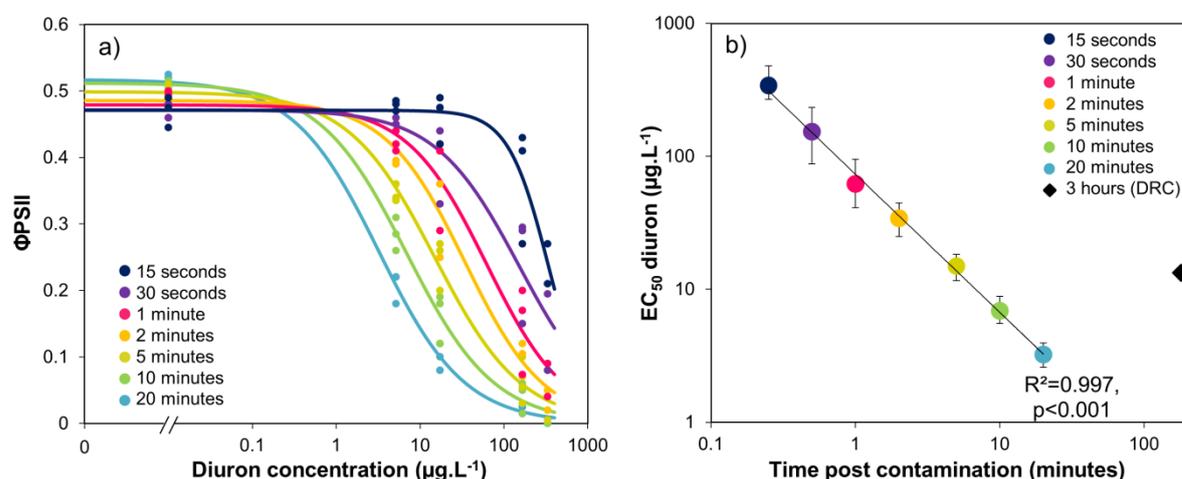


Figure 40: . a) Experimental Φ_{PSII} inhibition curves with increasing diuron concentrations, after different durations of exposure. b) Variation of EC_{50} values (\pm CI, 95 %) with duration of exposure, given by the models fitted in Fig. 3a. The black diamond shows the EC_{50} previously obtained with a 3-hour exposure for comparison (dose-response curve –DRC– presented in SI1).

We plotted in Figure 40b the EC_{50} -diuron obtained initially for a longer exposure (3 hours, dose-response curve illustrated in Figure SI 2). This value, though obtained with the same biofilm, was higher than those calculated for 10 and 20 minutes of exposure. This is in line with the findings of Nestler et al. (2012) who also observed a 40 % increase in EC_{50} value between 2 and 6 hours of diuron exposure (from 17.9 .L^{-1} to 25.6 .L^{-1}). The difference can be attributable to slight differences in suspended biomass (“dilution effect”, as discussed in

“Consistency in $t_{1/2}$ values from biofilm of contrasted composition” section), to decreasing blockage of Qb binding sites, and/or to the initiation of physiological processes on the 3-hour scale. In fact, the partial recovery (see also SI2) could correspond to physiological adaptation (acclimation), cellular detoxification processes, and/or biodegradation of diuron as the result of cytochrome P450-mediated N-demethylation. Cytochrome P450 is produced by a wide range of microorganisms, and degradation can be fast (e.g. biodegradation up to 20 % after the 3 first hours of incubation with 250 ppm diuron in Sharma et al., 2010).

This marginal increase in tolerance that we observed after 3 hours highlights that diuron exposure is non-lethal, and that complete recovery can be expected under non-contaminated conditions. This is confirmed by the study of Vallotton et al. (2008), who demonstrated the rapid reversibility of toxic effects of PSII inhibitors after herbicide removal, through rapid recovery of Φ_{PSII} (within 4 hours) and of algal growth, using cultures of *Scenedesmus vacuolatus*. Even if one pulse is unlikely to induce long-lasting effects, impacts on biofilms are highly plausible under fluctuating herbicide exposures, i.e. repeated pulses. Indeed, diuron binding to PSII interferes in the essential turnover and repair mechanisms of damaged D1 proteins (Draber et al., 1991), and repeated pulse exposure may lead to delayed irreversible damages of the photosystem. For example, Tlili et al. (2008) found that two consecutive pulses (3 hours each) of $7 \mu\text{g.L}^{-1}$ of diuron impacted biofilm growth (dry weight, chlorophyll *a* concentration) much more than one single pulse, on the long term. Copin et al. (2015) experimentally assessed and modelled the cumulative effects of isoproturon pulses on the growth of *S. vacuolatus*. Testing five scenarios, with different magnitudes (from EC_{10} to EC_{80}) and durations (4 to 24 hours) of exposure, they found in all cases an overall inhibition of growth, from 15 to 44 % compared to control cell densities.

The time-dose-response model proposed in this study to analyze short-term photosynthesis inhibition induced by diuron provides input data (EC_{50} as a function of time) that could be incorporated into models predicting the impacts of repeated exposure to herbicide pulses (e.g. Copin et al., 2015).

Consistency in $t_{1/2}$ values from biofilm of contrasted composition

We compared the time-response relationships after a “high” diuron exposure for biofilms collected in August (Experiment 1) and December (Experiment 2). Microalgal biomass differed between biofilms, with chlorophyll *a* concentrations of $6.8 \pm 3.4 \mu\text{g.L}^{-1}$ in the biofilm suspensions tested in August, *versus* $80.5 \pm 12.54 \mu\text{g.L}^{-1}$ in December. The proportions of algal groups also varied between seasons. Indeed, the PhytoPAM signal revealed that summer (August) biofilms were dominated by chlorophytes ($59 \pm 6 \%$), followed by similar proportions of cyanophytes ($21 \pm 1 \%$) and diatoms ($20 \pm 4 \%$). Contrastingly, biofilms collected in December had more diatoms ($41 \pm 3 \%$) than chlorophytes ($31 \pm 2 \%$) and cyanophytes ($27 \pm 1 \%$).

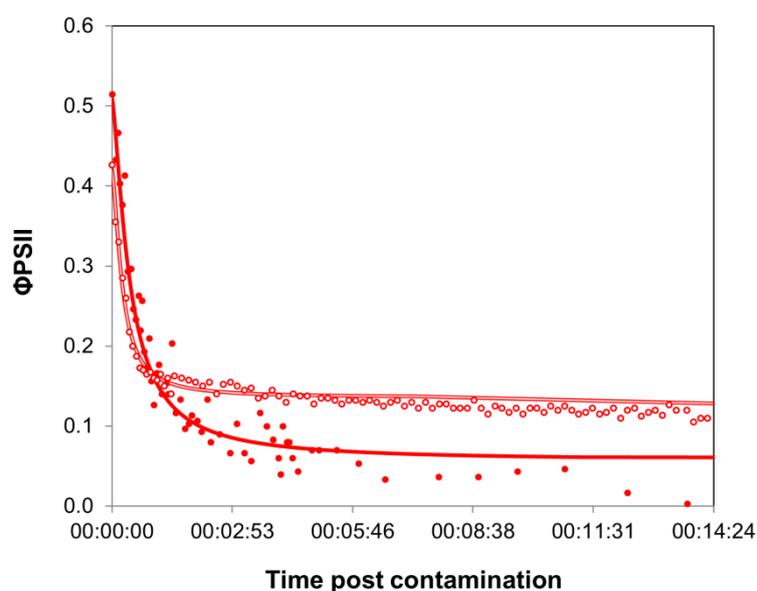


Figure 41: Time-response curves based on Φ_{PSII} decrease for contrasted biofilms, after contamination at “high” concentration. Full symbols correspond to biofilms collected in August (Experiment 1, average of 3 replicates); empty symbols to biofilms sampled in December (Experiment 2, average of 4 replicates). Parameters extracted from curve modelling are shown in Tableau 12.

The time-response curves obtained for both biofilms (Figure 41) yielded comparable $t_{1/2}$ values (Tableau 12), confirming the rapid binding kinetics of diuron. This result suggests that the transport of diuron into periphytic cells was not particularly hindered by higher biomass (no

apparent boundary layer effect). This result partly contradicts the assumption that the periphytic matrix exerts a protective role against toxic chemicals (Sabater et al., 2007); however it has to be noted that we did not use intact biofilms, but a suspension of biofilm which was, therefore, destructured.

The maximal inhibition achieved was more pronounced in summer biofilms. As the maximal effect is determined by the rate of internalization of diuron within microalgal cells, we can hypothesize that these differences resulted from the differences in biofilm biomass. Diuron uptake experiments performed with different microalgal species showed that the rate of binding depends on chlorophyll *a* concentration (Allen et al., 1983; Laasch et al., 1981). Yet, biofilm binding capacities were certainly exceeded here: though the amount of chlorophyll *a* was about 12-fold higher in winter biofilms than in summer ones, in both cases the ‘high’ concentration provided far higher diuron amounts than those estimated to saturate the binding sites (in green microalgae about 3 nmol of diuron per mg of chlorophyll *a*, Laasch et al., 1981). Besides biomass, seasonal differences in the proportions of algal groups also probably accounted for the differences in direct PSII inhibition reflected by the minimal Φ_{PSII} values. The presence of substantial amounts of chlorophytes in summer biofilms might have contributed to the higher impact observed: chlorophytes have been shown to be more sensitive to PSII inhibitors (Lockert et al., 2006; Tang et al., 1997) than cyanophytes or diatoms (but see Schreiber et al., 2007). Diatoms, which were dominant in winter, contain carotenoids and xanthophylls that are involved in managing oxidative stress (Pinto et al., 2003); therefore diatoms can be expected to have enhanced tolerance to diuron-induced oxidative damages. Moreover, the relatively greater abundance of cyanophytes in winter biofilms can also be involved in the residual PSII yield. Indeed, a signal attributed to cyanobacterial fluorescence of photosystem I, independent of PSII, was also observed under biofilm exposure to diuron by Francoeur et al. (2007).

To sum up, our results lead to the same conclusion reached by Lambert et al. (2015) that there is a considerable influence of biofilm biomass in the outputs of ecotoxicity tests with biofilms, which complicates between-sample comparisons. However, both time-response curves, for very different biofilms, yielded comparable $t_{1/2}$ values, making the latency parameter a unique response favoring between-date comparisons. These results support

further potential use of time-response curves in ecotoxicology studies, as time responses were more dose-dependent than biofilm-dependent.

Influence of pulse exposure history on TRC

Initial Φ_{PSII} values of the pulsed biofilms were significantly lower than in non-pulsed ones (Tableau 12; ANOVA: $F= 588.3$, $p < 0.0001$), irrespective of the concentration of exposure. This decrease suggests physiological stress induced by diuron pulses, even at low dose ($0.3 \mu\text{g.L}^{-1}$), as shown for longer exposures by Ricart et al. (2009). This effect could have been exacerbated by the “translocation” to laboratory conditions. After the highest concentration pulse ($\sim 100 \mu\text{g.L}^{-1}$), the biofilms were in poor physiological state. Their Φ_{PSII} was 0.12 ± 0.05 , matching strongly with the minimal Φ_{PSII} values obtained for non-pulsed biofilms from 5 minutes after addition of the diuron drop: 0.12 ± 0.00 ($n= 215$). No differences in optimal Φ_{PSII} were found for the biofilms pre-exposed to the lowest pulse concentrations tested (0.3 and $19.1 \mu\text{g.L}^{-1}$) at this time point.

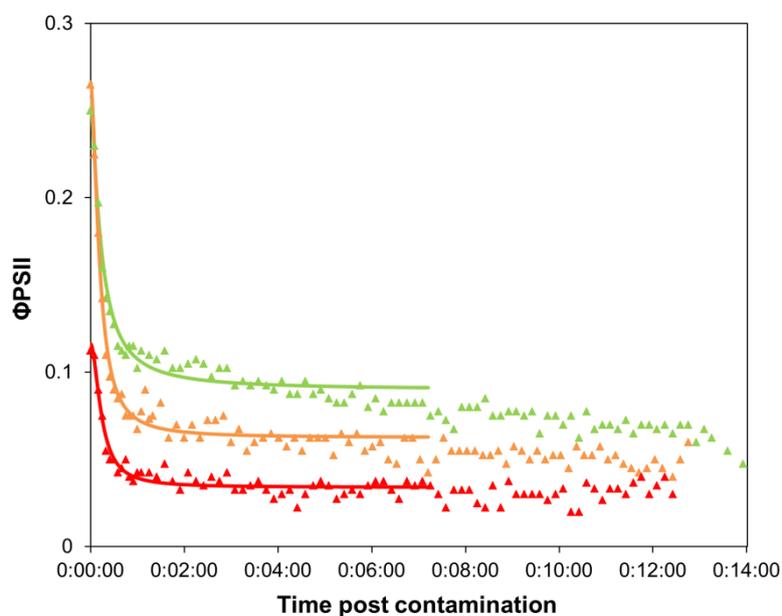


Figure 42: Time-response curves based on Φ_{PSII} decrease for biofilms pre-exposed to 3-hour diuron pulses, after contamination at “high” concentration (Experiment 2). Values are average of 4 replicates. Pulse concentration: $0.3 \mu\text{g.L}^{-1}$: green triangles, $19.1 \mu\text{g.L}^{-1}$: orange triangles, $102.4 \mu\text{g.L}^{-1}$: red triangles.

The shape of the time-response curves (*Figure 41*) obtained for the pulsed biofilms suggest a trend in Φ_{PSII} decline post diuron drop, as a function of the pulse intensity. It is worth noting that the TRC of the biofilms pulsed with the highest concentration were hardly comparable with the other data, due to their very low initial Φ_{PSII} resulting from a poor recovery (see below). Differences in the maximal inhibition achieved cannot be considered significant, because the percentages were calculated based on variations from very small absolute values of initial Φ_{PSII} . Besides, no significant differences in $t_{1/2}$ values were highlighted between pulsed conditions (*Tableau 12*). These $t_{1/2}$ fell into the same range of latency values found for pristine biofilms collected in summer or in winter without preexposure (*Tableau 12, Figure 41*). We can conclude from this result that, whatever the pulse intensity, the diuron binding sites were probably not saturated when the TRC were performed. A possible explanation lies in the fact that part of the diuron bond to the cells may have been released during the recovery period in uncontaminated medium. This was checked by modelling recovery curves, i.e. Φ_{PSII} increase over the period subsequent to diuron exposure (SI2). We assumed that Φ_{PSII} recovery only depends on the reversibility of diuron binding and dilution in the uncontaminated water used for recovery. Previous studies pointed out a progressive recovery in Φ_{PSII} as time post herbicide removal increased (Laviale et al., 2011; Nestler et al., 2012; Vallotton et al., 2008). Our data show, as observed with Φ_{PSII} inhibition post contamination, that diuron release kinetics are dependent on the concentration of preexposure. The biofilms exposed to the lowest pulses (0.3 and 19.1 $\mu\text{g.L}^{-1}$) recovered faster: Φ_{PSII} returned within 5 hours to half the optimal value of the non-pulsed biofilms (0.42 ± 0.01 : *Tableau 12*). In contrast, the biofilms exposed to the higher pulses recovered poorly (no more than 35 % of the optimal values after more than 8 hours post diuron removal). This is not surprising; exposure to such extreme concentrations for 3 hours probably induced irreversible cellular damage in periphytic organisms.

On the 3-hour scale of pulse duration, we would expect that adaptation and detoxification mechanisms likely occurred as described in 3.2, rather than species selection. With this study, we show that biofilm adaptation to a 3-hour pulse, even at low dose, has a cost for the community. The time taken to (incompletely) recover photosynthetic efficiency reflects that the individuals were weakened. Interestingly, Pollution-Induced Community Tolerance (PICT, Blanck et al., 1988) was not observed when exposing our biofilms for 3 days to 5 $\mu\text{g.L}^{-1}$

of diuron (unpublished data). EC_{50} were similar between control and exposed biofilms (respectively, $EC_{50} = 12.7 \pm 2.0$ and $13.6 \pm 1.7 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$) but some effect was visible on the photosynthetic efficiency ($\Phi_{\text{PSII}} = 0.51 \pm 0.02$ versus 0.43 ± 0.01) confirming that diuron had some effect. Therefore, the fact that PICT is often observed in diuron-contaminated streams (McClellan et al., 2008; Pesce, et al., 2010; Tlili et al., 2010) suggests that repeated, and *a fortiori* high frequency, pulses are likely to have dramatic observable impacts on riverine primary production. Indeed, the cumulative effects of pulses likely decrease the fitness of the individuals and, on longer time scales, eliminate the most sensitive organisms from the initial community. PICT acquisition would thus result from this selection of tolerant organisms after repeated pulses (even for low concentrations, Ricart et al., 2009), rather than from physiological adaptation.

4.3.2.4. Conclusions and perspectives

This time-response curve approach allowed to estimate two important parameters for assessing the risk associated to fluctuating exposure to herbicides: the maximal achievable inhibition (= maximal impact of a particular concentration of exposure) and the latency parameter $t_{1/2}$, reflecting the time to reach 50 % of the maximal effect. $t_{1/2}$ was dose-dependent but apparently not influenced by the biofilms we tested, nor by prior short-term (pulse) exposure. This result highlights that diuron reaches its cellular target almost instantaneously (< 1 minute), independently from biological parameters (chlorophyll *a* concentration, adaptation related to exposure history). Characterizing diuron accumulation kinetics within biofilms, considering their microbial composition, would allow confirming this immediate internalization.

Reversibility of the impacts of pulses a few hours after diuron removal was not fully demonstrated; the kinetics of diuron release from cells to uncontaminated medium appeared to be much slower than binding rates and the assessment of diuron desorption over time would be worth studying in the future. Therefore, repeated exposure is very likely to impair freshwater biofilms, in particular if pulses occur at a high frequency.

Because photosynthesis is directly associated with growth and primary production, it is necessary to better understand the consequences of short-term exposure to herbicide in real-world conditions, as well as the recovery mechanisms after toxic pressure is removed. This refinement can play a significant role in herbicide risk assessment, such as prediction of the duration, intensity and frequency of exposure leading to non-negligible effects on the primary production in aquatic ecosystems. Future research should also consider the simultaneous accumulation kinetics of different organic compounds, as contaminants rarely occur alone in the field

Conflict of Interest

The authors declare that the research was conducted in the absence of any commercial or financial relationships that could be construed as a potential conflict of interest.

Funding

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

Acknowledgments

The authors warmly acknowledge Gwilherm Jan (Irstea) for his technical help in field implementation and channels setup, Mélissa Eon and Brigitte Delest (Irstea) for complementary water analyses. They also thank Emilie Saulnier-Talbot for correcting English spelling and grammar of the manuscript.

4.3.2.5. Supplementary material

SI1.1 Methods

Triplicate slides colonized by biofilms were collected on August 1st, 2016. Biofilms were scraped and suspended in 40 mL of culture medium (Dauta, 1982). Nine increasing diuron concentrations (0 $\mu\text{g.L}^{-1}$ and 8 semi-exponentially increasing concentrations from 1.1 $\mu\text{g.L}^{-1}$ to 3500 $\mu\text{g.L}^{-1}$ final concentration) were used to establish dose-response curves based on Φ_{PSII} values (5 measurements per concentration and replicate). Exposure lasted 3 hours, the suspensions were kept exposed to light ($67 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$) at 20 °C.

We used a Phyto-PAM (Heinz Walz GmbH, Germany) and measurements were performed in quartz cuvettes fed with 3 mL of agitated biofilm suspension. We determined the chlorophyll a concentration in the biofilm suspensions, as well as their Φ_{PSII} values to draw dose-response curves for each replicate using RegTox, as described in the manuscript. The parameters extracted from the individual models were averaged and toxicity data are provided as mean \pm standard deviation.

SI1.2 Ecotoxicity results from dose-response curves

The concentration of chlorophyll a in the biofilm suspensions was $16.7 \pm 1.0 \mu\text{g.L}^{-1}$. A clear dose-response relationship between Φ_{PSII} and diuron exposure was obtained (*Figure SI 2*). Dose-response modelling provided ecotoxicity data in agreement with the available information in the literature. Optimal Φ_{PSII} was 0.52 ± 0.00 . EC_{50} was $13.4 \pm 0.3 \mu\text{g.L}^{-1}$, corresponding with previously established EC_{50} for various biofilms (e.g. Magnusson et al. (2012) found a 55 % inhibition of periphyton photosynthesis exposed to $13.4 \mu\text{g.L}^{-1}$). EC_{25} value was $5.1 \pm 0.2 \mu\text{g.L}^{-1}$. Photosynthesis was totally inhibited from $111 \mu\text{g.L}^{-1}$ of diuron, as also found by McClellan et al. (2008) and Magnusson et al. (2010).

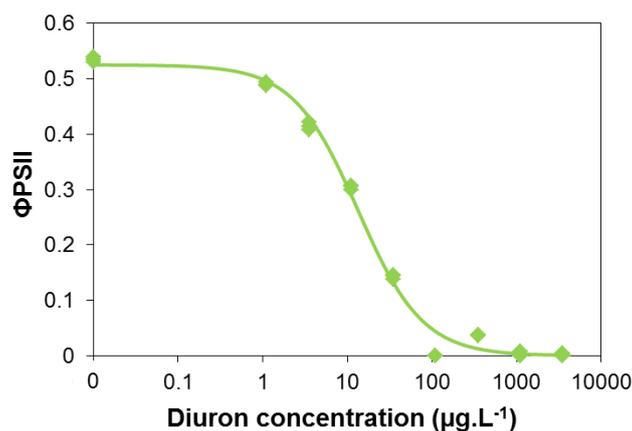


Figure SI 2: Dose-response curve modelled based on Φ_{PSII} inhibition induced by a 3-hour exposure to increasing diuron concentrations (three replicate biofilm suspensions)

We therefore selected the 5 following diuron concentrations for the time-response curves performed in Experiment 1: no diuron (0 $\mu\text{g.L}^{-1}$; no inhibition), “low” (5.2 $\mu\text{g.L}^{-1}$; corresponding to EC_{25}), “intermediate” (17.4 $\mu\text{g.L}^{-1}$; EC_{60}), “high” (166.6 $\mu\text{g.L}^{-1}$; higher than the concentration leading to maximal achievable inhibition) and “max” (332 $\mu\text{g.L}^{-1}$; double the “high” concentration).

SI2 Time-to-recovery after diuron pulses

SI2.1 Methods

Sixteen glass slides colonized by biofilms were collected on December 6th, 2016. Four slides were scraped immediately, suspended in Dauta medium (Dauta, 1982), and their Φ_{PSII} was measured with the Phyto-PAM (T_0).

The remaining twelve slides were exposed in quadruplicate to pulses of diuron, with three concentration levels: 0.3, 19.1 and 102.4 $\mu\text{g.L}^{-1}$ (measured concentrations). They were then scraped, suspended in uncontaminated Dauta medium, and maintained to recover for 4 to 8 hours. Given the time to perform TRC, and the number of replicates, the duration of the recovery period varied among and between treatments. Laviale et al. (2011) showed that Φ_{PSII} values returned to control values within 1 to 12 hours, after a 3-hour exposure to two PSII inhibitors: atrazine and diuron. They also demonstrated that the biofilms exposed to lower

doses recovered faster. With this background, we started TRC from the lowest exposure, followed by increasing exposures. Specifically, biofilms exposed to $0.3 \mu\text{g.L}^{-1}$ were processed in 4 to 5 hours, the biofilms exposed to the $19.1 \mu\text{g.L}^{-1}$ pulse in 6 to 7 hours and those exposed to the $102.4 \mu\text{g.L}^{-1}$ pulse in 7 hours, 45 minutes to 8 hours and 15 minutes. During these time frames, the Φ_{PSII} values of the samples were recorded as described in “*time-response curves*” section.

To model recovery curves (Φ_{PSII} increased over time after diuron removal), we extrapolated theoretical values of “post pulse” Φ_{PSII} based on:

- the model from the DRC established immediately after 3 hours of exposure (SI1), that estimates Φ_{PSII} of 99.2 %, 39.0 % and 8.8 % of the “optimal-to-minimal” value,
- the lower Φ_{PSII} values measured in winter biofilms (maximal inhibition reached: 30.6 % of the optimal value in the non-pulsed biofilms $-T_0$).

Then, we plotted Φ_{PSII} values (extrapolated and measured) against time after diuron removal. For all pulse intensities, an exponential function best fitted the data (*Figure SI 3*).

SI2.2 Results

At the time the measurements were performed the recovery of Φ_{PSII} (expected to reach the values measured for T_0 biofilms, i.e. 0.42 ± 0.01) was incomplete (*Figure SI 3*).

If Φ_{PSII} recovery only depends on the release of the diuron bond intracellularly, our data show that release kinetics are dependent on the concentration of preexposure and much slower than binding rates. Specifically, the recovery trajectories for the lowest intensity pulses were similar, so a single model was chosen ($R^2= 0.72$, $F= 1733.75$, $p < 0.001$). For the $0.3 \mu\text{g.L}^{-1}$ pulse, recovery after 5 hours was ~ 55 %. For the $19.1 \mu\text{g.L}^{-1}$ pulse, recovery after 7 hours was ~ 70 %. Based on the equation fitted to the data, the delay to recover 50 % of optimal Φ_{PSII} was 05:03:00. In contrast, after 8 hours 15 min of decontamination, the Φ_{PSII} of the biofilms exposed to the highest pulse ($102.4 \mu\text{g.L}^{-1}$) hardly reached 35 % of the expected values. This may be due to severe damages to the organisms, as well as incomplete

decontamination due to a limited capacity of the uncontaminated medium volumes to dilute the high amounts accumulated during pulse exposure.

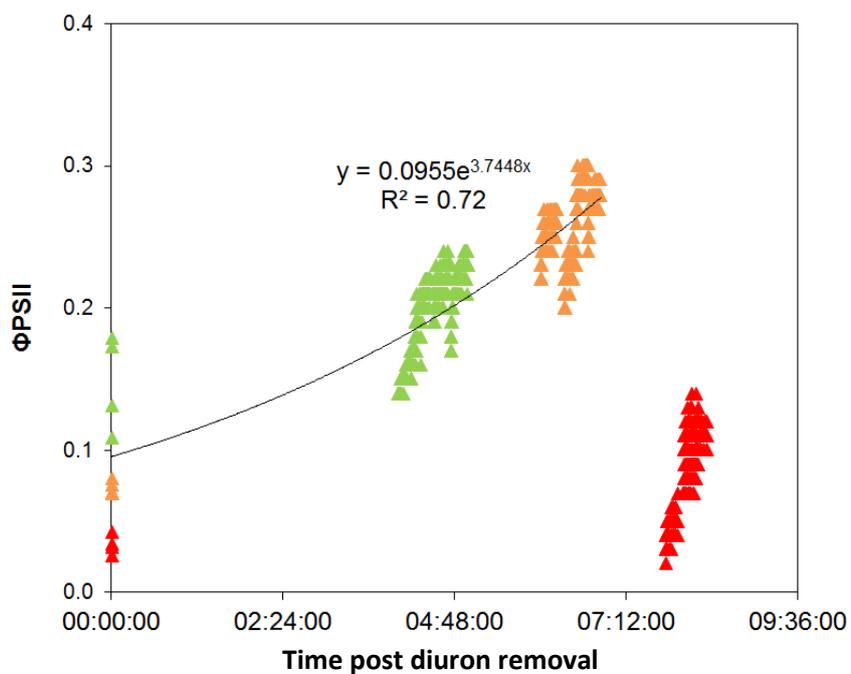


Figure SI 3: Modelled time-response curve based on Φ_{PSII} recovery after diuron removal for biofilms pre-exposed to 3-hour diuron pulses (Experiment 2). Pulse concentration: 0.3 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$: green triangles, 19.1 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$: orange triangles, 102.4 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$: red triangles.

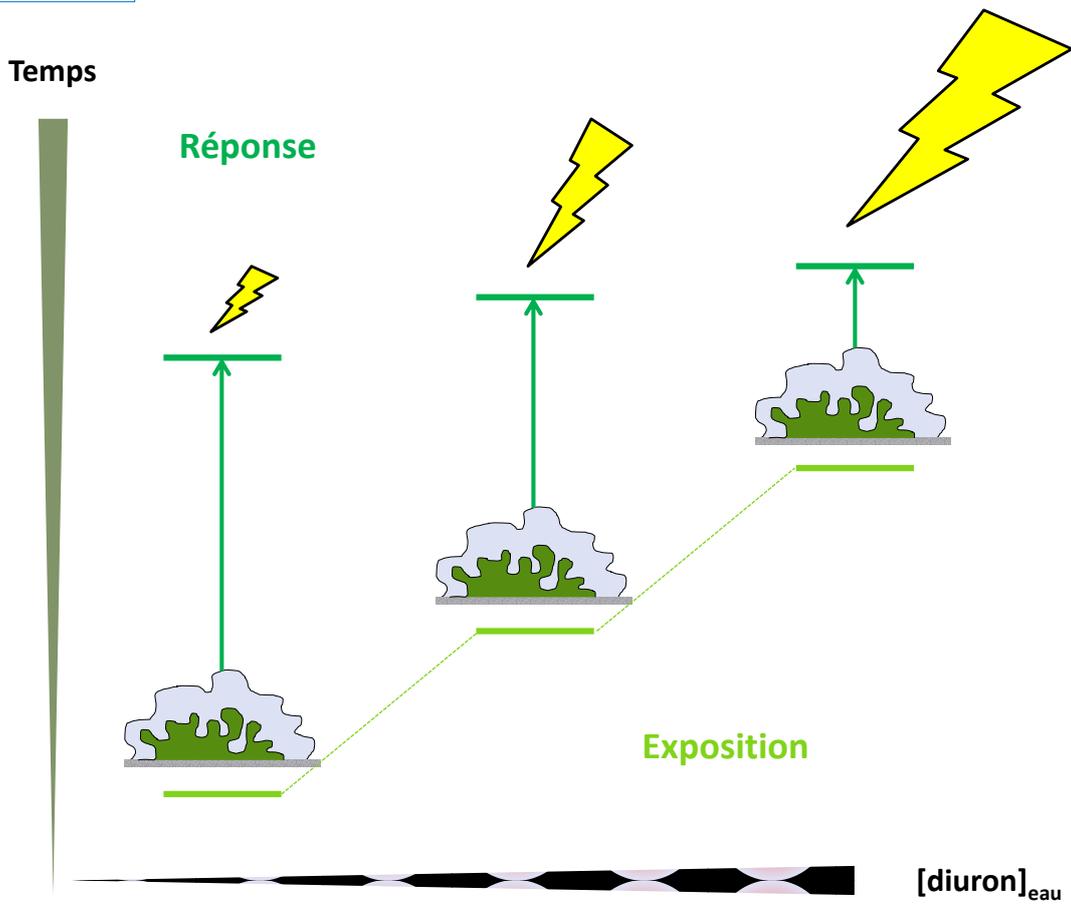
4.3.3. Bilan

Cette étude a permis de définir le temps de latence du diuron nécessaire pour obtenir 50 % d'inhibition de la photosynthèse. Elle a ainsi montré que le temps nécessaire au diuron pour atteindre sa cible (temps de latence) était dépendant de la concentration d'exposition, mais dans tous les cas extrêmement rapide (*Figure 39*). En effet, pour atteindre la moitié de l'effet maximum, il faut au diuron moins de 30 secondes après exposition pour des concentrations au-delà de 100 $\mu\text{g.L}^{-1}$, et autour de 7 min pour une exposition faible (5,2 $\mu\text{g.L}^{-1}$). Ces délais particulièrement courts, quelle que soit la concentration d'exposition, signifient que le diuron présente une grande affinité avec les sites de liaison des microalgues, et révèlent aussi que l'accumulation intracellulaire est presque instantanée.

Les résultats d'inhibition de la photosynthèse pour les différentes concentrations d'exposition et pour les deux types de biofilms (estival et hivernal) ont indiqué que la vitesse d'atteinte des cibles cellulaires du diuron n'était pas influencée par la biomasse (*Figure 41*). Cette comparaison de biofilms différents a démontré que le temps de latence était un paramètre tout désigné pour évaluer la réponse biologique des biofilms indépendamment de leur biomasse et de leur composition. Par contre, les biofilms estivaux contenant plus de chlorophytes et moins de cyanobactéries, et par conséquent plus de chlorophylle *a*, présentaient potentiellement un plus grand nombre de sites de liaison pouvant expliquer l'effet toxique maximal plus marqué à cette période.

Enfin, l'établissement de ces courbes dose-temps de réponse a mis en avant la sensibilité accrue des biofilms pré-exposés au diuron, confirmant l'augmentation de vulnérabilité des microalgues face à des pics de contamination à répétition (Copin et al., 2015; Tlili et al., 2011).

En résumé



4.4. Conclusion générale

Les résultats issus de l'étude sur les isothermes de sorption du diuron dans les biofilms et ceux issus de l'étude portant sur les relations entre dose d'exposition et temps de réponse ont montré que le diuron atteignait très rapidement sa cible biologique, et par conséquent l'équilibre, avec une atteinte de l'équilibre inférieure à deux heures peu importe la concentration d'exposition. Ceci a permis une modélisation fiable des isothermes de sorption. En effet, des mécanismes de diffusion à travers la matrice EPS, puis d'absorption par les cellules se sont faits en quelques minutes voire secondes selon la concentration d'exposition.

Dans ce chapitre, il a été mis en évidence que selon la concentration en diuron dans le milieu, le biofilm ne réagissait pas de façon identique. Différents phénomènes sont observables le long d'un gradient de concentration allant du moins vers le plus concentré. D'une part, le biofilm a vu son activité photosynthétique diminuer de façon continue le long du gradient de concentration. D'autre part, de nouveaux mécanismes de sorption ont été mis en place (adsorption sur les EPS) en plus du phénomène constant d'absorption dans les cellules. Enfin, le temps de latence lui a été raccourci avec la concentration d'exposition, indiquant la grande capacité de sorption du biofilm lorsque les quantités de diuron dans le milieu augmentent. Toutes ces observations mises en commun indiquent que plus la concentration en diuron dans la colonne d'eau est élevée, plus celui-ci a de risques d'atteindre sa cible biologique, ce qui explique que le temps de réponse soit dose-dépendant.

Chapitre 5 :

Discussion générale et perspectives

5. Chapitre 5 : Discussion générale et perspectives

5.1. Développement de la méthodologie d'extraction des EPS

L'ensemble des travaux de cette thèse a permis de caractériser les mécanismes de sorption du diuron dans le biofilm et les effets toxiques en découlant grâce au couplage des approches toxicocinétiques et toxicodynamiques.

Tout d'abord, ces travaux ont permis l'établissement d'une méthodologie d'extraction physique des EPS faiblement liées (D-EPS), dites diffuses, du reste du biofilm. Cette avancée technique a permis de passer outre la question de l'interaction entre les pesticides et les résines échangeuses de cations (technique la plus fréquemment utilisée pour le fractionnement du biofilm). En effet, ce protocole a permis de séparer en grande partie les D-EPS des EPS fortement liées et les microorganismes (T-EPS-M), sachant qu'il n'existe aucune méthode pour complètement séparer les EPS des microorganismes (Sheng et al., 2010). Par la suite de quantifier le diuron dans chacune des fractions pour le suivi du transfert et de la distribution du diuron dans le biofilm. Malgré tout, certains biais ont pu être identifiés et l'erreur associée a pu être calculée. Les résultats présentés dans l'annexe 8.3.3 ont montré qu'une partie du diuron pouvait être désorbée au cours de l'extraction, mais à de faibles pourcentages (2,8 à 17 % de perte). Pour aller plus loin dans l'étude de la distribution des pesticides dans le biofilm il serait intéressant par la suite d'amener la technique de fractionnement à un niveau plus fin, c'est-à-dire à la séparation entre les EPS fortement liées des microorganismes. Cependant, à ce jour peu de méthodes existent pour séparer distinctement ces différentes fractions et d'autant plus en tenant compte de l'exposition à des contaminants aussi bien métalliques qu'organiques (Aguilera et al., 2008; Métivier et al., 2013). Par ailleurs, au niveau des microorganismes entre eux (bactéries, champignons et microalgues) pour pouvoir déterminer dans quel compartiment les pesticides s'accumulent préférentiellement, mais de nouvelles contraintes techniques se posent alors. Afin de compléter le développement de cette méthodologie, il serait nécessaire d'effectuer le même protocole mais cette fois avec des molécules organiques présentant des propriétés physicochimiques différentes telles qu'une hydrophobie plus importante car il se peut que celles-ci soient plus enclines à se désorber.

Au cours de cette thèse il a aussi pu être mis en avant l'intérêt du couplage des approches toxicocinétiques et toxicodynamiques. En effet, jusqu'alors, dans la littérature les études ont été abordées avec l'un ou l'autre des points de vue, mais rarement de façon concomitante. Les travaux présentés dans ce manuscrit ont permis de mettre en avant les différents mécanismes prenant part à la bioaccumulation du diuron dans le biofilm. Par exemple, il a été montré que le diuron présent dans les D-EPS n'était pas nécessairement biodisponible pour les cellules et que l'effet toxique était simultané à l'accumulation. Ce point conteste l'effet protecteur des EPS énoncé à plusieurs reprises dans la littérature (Comte et al., 2006a; Stewart et al., 2015). Néanmoins, dans l'optique de fractionner de façon plus spécifique les microorganismes entre eux, il serait judicieux d'utiliser un descripteur d'effet toxique sur les organismes hétérotrophes qui soit modulé plus rapidement que les activités enzymatiques extracellulaires, pour faire le lien avec l'accumulation rapide du diuron. Par exemple il est possible d'utiliser la mesure de l'activité de l'enzyme cellobiohydrolase (enzyme impliquée dans l'élimination de la cellobiose au cours de la dégradation de la cellulose), comme descripteur d'effet toxique sur les bactéries et champignons (Guasch et al., 2016).

Puis, les effets toxicodynamiques et toxicocinétiques liés à la variation des facteurs environnementaux tels que la température, la photopériode et la vitesse du courant ont pu être décrits le long de la chaîne de processus débutant par une contamination du milieu, en passant par la bioaccumulation de ces contaminants jusqu'à l'impact sur le métabolisme des organismes. Il a également été mis en avant qu'un biofilm exposé à un fort courant, que ce soit en période de crue ou dans une section de rivière plus agitée, sera impacté plus vite mais pas nécessairement plus qu'un autre, car le courant influence fortement la biomasse de la couche limite eau-biofilm. De même, ces travaux ont souligné le fait qu'un biofilm d'été aura tendance à être moins sensible à la contamination qu'un biofilm d'hiver. Ces conclusions divergent de celles apportées dans l'étude de Morin et al. (2017) qui présentent une tolérance du biofilm exposé au cuivre diminuée avec l'augmentation de la température et du temps d'exposition. Dans la mesure où tous ces facteurs ont cours de façon simultanée dans l'environnement, il serait donc cohérent de calquer les différentes études réalisées au cours de cette thèse sur une étude de terrain, avec un suivi régulier de la qualité de l'eau, des conditions environnementales et de l'état de santé du biofilm.

Enfin, un modèle portant sur la bioaccumulation du diuron dans le biofilm a pu être développé ainsi qu'un modèle sur les effets toxiques mis en place en parallèle. Ces deux modèles, encore à améliorer, ont pour but de prédire les concentrations en contaminants dans le milieu et l'effet toxique associé à partir des concentrations en contaminants dans le biofilm, ce qui représenterait un réel atout pour les études réalisées en milieu naturel.

5.2. Approche TK-TD

Dans le but de mieux appréhender les mécanismes de transfert et de distribution des pesticides dans le biofilm en lien avec les effets toxiques associés, plusieurs expérimentations ont été menées.

Comme il a été mentionné précédemment, une méthodologie d'extraction des EPS faiblement liées des EPS fortement liées aux microorganismes a pu être développée. Cette méthodologie a pu être validée selon plusieurs critères. Tout d'abord, la caractérisation des différentes fractions (D-EPS et T-EPS-M) a montré que le biofilm est similaire à T_0 quelle que soit la période de colonisation et donc le type de biofilm pour la plupart des descripteurs (protéines, polysaccharides et activité de la β -glucosaminidase, *Tableau 15* annexe 8.2). Les résultats montrent une modification de la répartition de l'activité de la β -glucosidase au cours des saisons. En effet, une baisse de 18 à 50 % de l'activité dans la fraction T-EPS-M au profit de la fraction D-EPS est notable entre le passage de l'hiver au printemps. Ceci pourrait être lié à la disponibilité et à la qualité des polysaccharides présents dans la fraction D-EPS pour la dégradation en glucose, au printemps. Au vu de l'ensemble de ces résultats (*Tableau 15*, annexe 8.2), il est donc possible de comparer les expérimentations entre elles, puisque la nature du biofilm utilisé reste la même.

Ces résultats montrent que les polysaccharides sont considérablement présents dans le culot, qui est associé à la fraction T-EPS-M. Selon Wolfaardt et al. (1998), ces composés présentent des zones polaires propices aux liaisons hydrophiles avec des composés tels que le diuron.

Pour rappel, quatre expérimentations couplant les approches toxicocinétiques et toxicodynamiques ont été présentées au cours de cette thèse. Les facteurs étudiés et les conditions d'exposition sont rappelés dans le *Tableau 13* :

Tableau 13: Bilan des valeurs d'exposition moyenne mesurées pour chaque expérimentation réalisée au cours de cette thèse

	Paramètres étudiés	Traitement (diuron)	Température de la pièce	Luminosité	Courant	Temps d'exposition
Mesure de l'influence des paramètres abiotiques (Chapitre 3)	Durée d'exposition	<0,5 µg.L ⁻¹ 4,4 ± 0,3 µg.L ⁻¹ 63,7 ± 1,1 µg.L ⁻¹			<<<1 cm.s ⁻¹ 2 cm.s ⁻¹	T ₀ *; 15, minutes; 6 heures; 10, 14, 21 jours
	Courant	LowFlow : <0,5 µg.L ⁻¹ 3,6 ± 0,4 µg.L ⁻¹ 35,4 ± 2,5 µg.L ⁻¹ Flow : <0,5 µg.L ⁻¹ 4,4 ± 0,4 µg.L ⁻¹ 45,6 ± 1,5 µg.L ⁻¹	21,3 ± 0,3 °C	8,19 µmol.s ⁻¹ .m ⁻²	2 cm.s ⁻¹	T ₀ *; 1, 2, 5, 15, 30, 120 minutes
	Température Photopériode	<0,5 µg.L ⁻¹ 5,1 ± 0,2 µg.L ⁻¹ 43,9 ± 0,4 µg.L ⁻¹	Saison 1 : nd Saison 2 : 25,2 ± 0,0 °C Saison 3 : 11,2 ± 0,0 °C Saison 4 : 11,2 ± 0,0 °C	Photopériode: 16/8 et 10/14	2 cm.s ⁻¹	T ₀ *; 1 et 3 jours
Etude des isothermes d'adsorption du diuron (Chapitre 4)	Concentration d'exposition	<0,5 - 1,01- 3,72 - 6,57 - 23,31 - 44,36 - 70,60 - 375,45 µg.L ⁻¹	24,2 ± 0,4 °C	8,19 µmol.s ⁻¹ .m ⁻²	2 cm.s ⁻¹	2 heures

* T₀: temps initial, avant l'exposition en canaux

nd : non disponible en raison d'une panne des enregistreurs. L'expérimentation ayant été réalisée dans la même salle thermorégulée que la S2, on peut estimer que la température d'exposition était identique (cf. stabilité des valeurs entre S3 et S4).

Ces expérimentations menées au cours de cette thèse ont permis de déterminer les mécanismes de transfert et de distribution du diuron dans le biofilm en lien avec les effets toxiques associés. Toutes ces études complémentaires entre elles sont en accord avec les hypothèses initiales. Grâce à l'étude portant sur les isothermes de sorption du diuron dans les biofilms (cf. Partie 4.2) deux modèles de prédictions ont pu être établis (modèle de Langmuir simple et modèle E_{\max}). Plus précisément, le modèle de Langmuir établi à partir des données de bioaccumulation du diuron dans le biofilm, et le modèle E_{\max} grâce aux valeurs de l'inhibition de la photosynthèse, tous deux en fonction de la concentration d'exposition. Grâce à la constitution de ces deux modèles en parallèle, il est à présent possible de calculer la concentration en diuron dans le milieu et l'effet toxique qui lui est relatif à partir de la concentration en diuron dans le biofilm.

L'étude portant sur les isothermes de sorption du diuron sur les biofilms a démontré que les modèles de Langmuir simple et E_{\max} représentaient correctement les données acquises à l'équilibre eau-biofilm (i.e. sur 2 heures), dans des conditions de courant de 2 cm.s^{-1} et de température de 20°C .

L'objectif de ce chapitre de discussion générale est d'obtenir une vue globale sur la totalité des travaux menés au cours de cette thèse. Pour ce faire, le modèle de Langmuir a été appliqué sur les données issues de chaque expérimentation et est discuté dans ce chapitre. Dans un premier temps, le modèle de Langmuir simple établi avec les données allant de 1 à $375 \mu\text{g.L}^{-1}$ de diuron dans l'eau (nommé étendu) et de 1 à $44 \mu\text{g.L}^{-1}$ de diuron (nommé court) et le modèle E_{\max} ont été comparés avec l'ensemble des données pour définir leur gamme d'applicabilité. Cette mise en relation entre les différents modèles créés et les données obtenues par les études sur l'influence des différents facteurs environnementaux ou sur des temps d'exposition variés a pour objectif de valider ces modèles et de mettre en avant leurs limites.

Pour comparer toute les données entre elles, les résultats issus de la quantification des pesticides dans les biofilms ont tous été convertis en $\mu\text{g.g}^{-1}\text{.cm}^{-2}$, et ceux pour la toxicité en pourcentage d'inhibition de la photosynthèse.

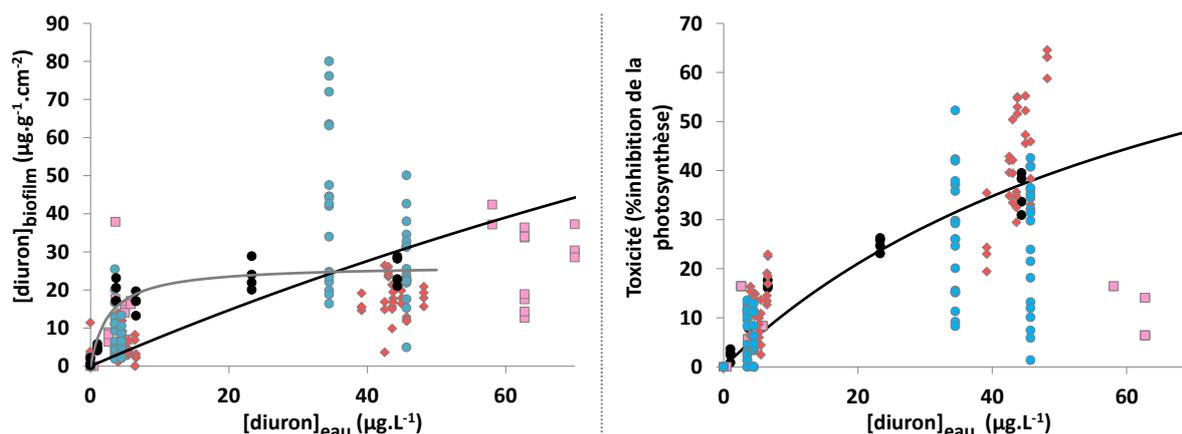


Figure 43: Représentation de l'ensemble des données obtenues sur toutes les expérimentations. Les points noirs représentent les données issues de l'expérimentation sur les isothermes de sorption, les points bleus sur l'influence de la vitesse du courant, les carrés roses de l'étude préliminaire sur la bioaccumulation à long terme et les losanges rouges, pour l'influence des saisons. À gauche : Concentration en diuron dans le biofilm en $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}\cdot\text{cm}^{-2}$ en fonction de la concentration en diuron dans l'eau en $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$. La courbe noire représente le modèle de Langmuir simple étendu, et la courbe grise le modèle de Langmuir simple court. À droite : Impact toxique en pourcentage d'inhibition de la photosynthèse en fonction de la concentration en diuron dans l'eau en $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$. La courbe noire représente le modèle E_{max} .

La représentation de l'ensemble des données a montré une grande variabilité aussi bien pour les résultats issus de l'analyse de la bioaccumulation (Figure 43, à gauche) que pour ceux liés à l'évaluation de l'impact toxique (Figure 43, à droite) du diuron. Cette variabilité semble être liée aux différents facteurs testés (temps d'exposition, vitesse du courant, température et photopériode). C'est pourquoi il est nécessaire de définir la nature de l'influence des facteurs environnementaux afin de déterminer les limites de ces modèles et de concevoir des améliorations pour une meilleure viabilité.

5.2.1. Validité des modèles par rapport à une exposition à long terme

L'étude préliminaire présentée dans la partie 3.2 a montré une accumulation très rapide du diuron (dès 15 minutes) et un effet toxique simultané. Par exemple, pour une exposition à 7 et $44 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ de diuron, la toxicité moyenne une fois l'équilibre atteint était respectivement à hauteur de $8,5 \pm 2,8$ et de $18,7 \pm 29$ %.

Les résultats de la bioaccumulation mis au regard des modèles de Langmuir simple (court et étendu) semblent suivre la même tendance (Figure 44). En revanche, pour ce qui est du

modèle E_{max} , le biofilm exposé aux plus hautes concentrations en diuron, et pour tous les temps d'exposition, présente des altérations bien inférieures à celles attendues (deux à quatre fois plus faibles) (*Figure 44*). Pour les échantillons exposés pendant 15 minutes dans les canaux, une toxicité plus basse peut s'expliquer du fait que l'équilibre n'a pas encore été atteint (Chaumet et al., *Accepté avec révisions majeures ; 3.3*), ce qui serait cohérent avec les données de bioaccumulation, inférieures à celles prédites par le modèle de Langmuir. Pour les temps les plus longs et les biofilms les plus contaminés, le pourcentage d'inhibition de la photosynthèse mesuré correspond selon le modèle E_{max} à des concentrations d'exposition entre 2 à 4 fois inférieures à celles mesurées. Pour la même concentration d'exposition, le point de prélèvement réalisé après 6 heures d'exposition a présenté un effet toxique du même ordre que ceux prélevés aux temps d'exposition plus longs. Ceci pourrait être lié à une différence de sensibilité de la communauté relative à sa composition. En effet, le biofilm n'ayant pas eu le temps de s'acclimater à son nouvel environnement, il est possible d'en déduire que les groupes algaux le composant (différents de ceux après 10, 14 et 21 jours d'exposition cf. *Figure 26*) représentent une communauté moins sensible à l'exposition au diuron. La mise en relation des données toxicocinétiques et toxicodynamiques a mis en évidence le fait que la bioaccumulation du diuron dans les biofilms était telle qu'attendue, or la toxicité bien plus faible à la concentration d'exposition la plus élevée, indique peut-être un effet d'acclimatation du biofilm sur des expositions à long terme. Une diminution de la sensibilité au diuron a également été observée par Magnusson et al. (2012) pour des concentrations d'exposition de l'ordre de $13 \mu\text{g.L}^{-1}$ avec des temps d'exposition jusqu'à 28 jours.

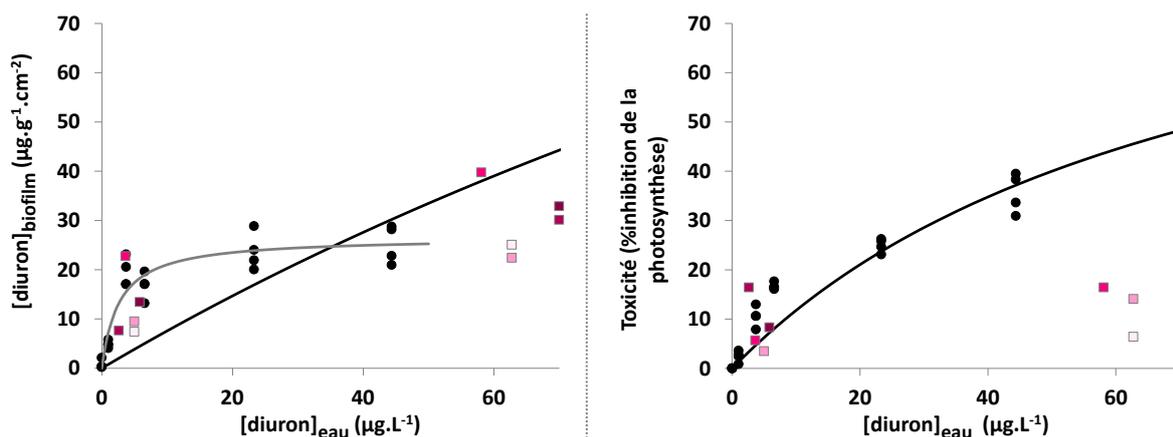


Figure 44: Représentation des données obtenues lors de l'étude préliminaire (3.2). Les points noirs rappellent les données issues de l'étude sur les isothermes de sorption du diuron, les autres représentent les données obtenues lors de l'étude préliminaire sur les expositions à long termes. Le gradient de couleur sur les points représente la durée d'exposition : plus les points sont foncés, plus le biofilm a été exposé longtemps. À gauche : Concentration en diuron dans le biofilm en $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}\cdot\text{cm}^{-2}$ en fonction de la concentration en diuron dans l'eau en $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$. La courbe noire représente le modèle de Langmuir simple étendu, et la courbe grise le modèle de Langmuir simple court. À droite : Impact toxique en pourcentage d'inhibition de la photosynthèse en fonction de la concentration en diuron dans l'eau en $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$. La courbe noire représente le modèle E_{max}

5.2.2. Détermination du poids du facteur temps

Lors de l'étude de l'influence du courant sur la bioaccumulation et l'impact toxique du diuron dans les biofilms, il a été montré que le courant réduisait les quantités de pesticides dans le biofilm Total mais pas dans la fraction T-EPS-M (Chaumet et al., Accepté avec révisions majeures ; 3.3). En parallèle, le suivi de l'impact toxique n'a pas montré de différence selon le courant imposé.

Pour rester dans le domaine d'utilisation du modèle de Langmuir, seuls les résultats relatifs à la fraction Total ont été utilisés. Ces données comparées au modèle de Langmuir et E_{max} montrent l'importance du temps d'exposition dans l'évaluation des modèles. Pour l'approche toxicocinétique, les données suivent la courbe représentant le modèle de Langmuir simple étendu. De façon générale, plus le temps d'exposition est proche de 2h, en d'autres termes de l'équilibre, plus la bioaccumulation est importante (Figure 45), ce qui correspond tout à fait avec l'accumulation de type cinétique d'ordre 1 établie dans la partie 3.2 du chapitre 3. Les résultats de la bioaccumulation pour le biofilm exposé au courant et une fois l'équilibre atteint, sont plus proches du modèle de Langmuir que pour le biofilm

exposé sans courant. Ceci démontre la répétabilité des résultats puisque le modèle a été établi à partir de biofilms exposés avec un courant continu de $2 \text{ cm}\cdot\text{s}^{-1}$.

Cependant, ces résultats démontrent également que le modèle de Langmuir n'est pas applicable pour prédire la concentration en diuron dans le biofilm à partir de la concentration d'exposition et vice versa dans le cas des biofilms situés dans les milieux lentiques. En effet, les résultats de bioaccumulation pour le biofilm non exposé au courant sont entre deux et trois fois supérieurs à ceux proposés par les modèles de Langmuir (*Figure 45*). Si le biofilm est considéré de façon générale comme un matériel biologique à deux compartiments : les microorganismes (fraction T-EPS-M) et les EPS (fraction D-EPS), alors selon la section 3.3 du chapitre 3, un biofilm issu d'un milieu lentique devrait être pris en compte comme un matériel à trois compartiments : T-EPS-M, D-EPS, et la couche limite eau-biofilm. D'après ce principe et de façon très simplifiée, un biofilm présent dans un milieu lotique remplit les critères d'utilisation du modèle de Langmuir simple. En effet, celui-ci peut être envisagé comme deux compartiments, soit composé de deux sites de sorption distincts.

Partant de ce fait, ceci indique que les modèles permettraient de prédire l'accumulation du diuron dans la fraction T-EPS-M seulement. Par conséquent il serait nécessaire d'établir ces mêmes modèles sans contrainte de courant pour alors déterminer un facteur relatif à la vitesse du courant, ceci ayant pour but une application plus large et notamment aux biofilms présents en milieux statiques tels que les lacs, les étangs et les zones humides. Néanmoins, dans la partie 3.3 du chapitre 3, il a été souligné que le diuron présent dans les D-EPS n'était pas nécessairement biodisponible pour les cellules, et donc sans impact sur l'activité photosynthétique. C'est d'ailleurs pour cette raison que pour l'approche toxicodynamique, les données d'inhibition de la photosynthèse pour les temps d'exposition les plus longs concordent avec le modèle E_{\max} (*Figure 45*), ce qui n'est pas le cas pour les données collectées avant que l'équilibre soit établi (avant 40 minutes). En effet, les cinétiques d'accumulation et d'effet sont nettement dessinées (*Figure 45*) ce qui demande de considérer le temps d'exposition, et notamment de savoir si l'équilibre est atteint dans l'utilisation de ces modèles. En effet, au vu des données obtenues grâce à cette expérimentation, il est possible d'en déduire que l'effet est simultané à l'accumulation. Ce fait est d'ailleurs appuyé par le postulat selon lequel lorsqu'un effet est visible, c'est qu'il y a eu accumulation par les cellules

(Campbell et al., 2002). Ici le paramètre « temps d'exposition » présente un facteur non négligeable à prendre en compte dans l'amélioration du modèle, (bien que pas forcément limitant pour des études sur le terrain généralement réalisées sur de plus longues durées) tout comme la vitesse du courant.

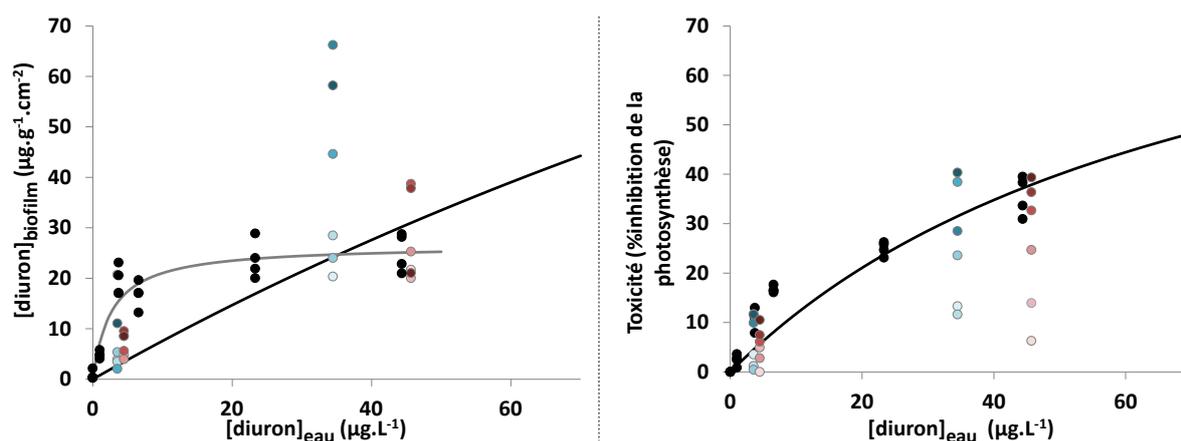


Figure 45: Représentation des données obtenues lors de l'étude sur l'influence du courant (3.3). Les points noirs rappellent les données issues de l'étude sur les isothermes de sorption du diuron, les autres représentent les données obtenues lors de l'étude sur l'influence de la vitesse du courant. Le gradient de couleur sur les points représente la durée d'exposition : plus les points sont foncés, plus le biofilm a été exposé longtemps. Les points bleus représentent la condition LowFlow, et les points roses la condition Flow. À gauche : Concentration en diuron dans le biofilm en $\mu\text{g.g}^{-1}.\text{cm}^{-2}$ en fonction de la concentration en diuron dans l'eau en $\mu\text{g.L}^{-1}$. La courbe noire représente le modèle de Langmuir simple étendu, et la courbe grise le modèle de Langmuir simple court. À droite : Impact toxique en pourcentage d'inhibition de la photosynthèse en fonction de la concentration en diuron dans l'eau en $\mu\text{g.L}^{-1}$. La courbe noire représente le modèle E_{\max}

5.2.3. Confrontation du modèle à un contexte environnemental plus réaliste

L'expérimentation portant sur l'influence de la température et de la photopériode sur la toxicocinétique et la toxicodynamique du diuron dans les biofilms a principalement mis en avant l'effet de la température sur ces deux paramètres. En effet, aux plus faibles températures avec une vitesse de courant de 2 cm.s^{-1} le biofilm a accumulé plus de diuron sur un et trois jours, que celui exposé aux températures plus élevées, et par conséquent la toxicité a été plus importante dans ce premier cas.

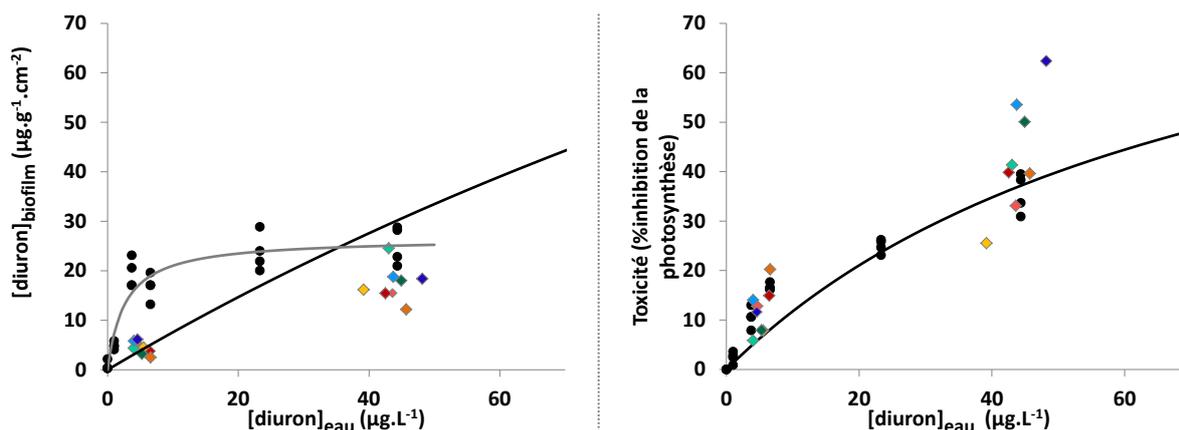


Figure 46: Représentation des données obtenues lors de l'étude sur l'influence de la température et de la photopériode (3.4). Les points noirs rappellent les données issues de l'étude sur les isothermes de sorption du diuron, les losanges représentent l'étude sur l'influence de la température et de la photopériode selon le code couleur suivant pour les échantillons exposés durant trois jours: rouge/saison 1, orange/saison 2, vert/saison 3 et bleu/saison 4. Les échantillons exposés durant une journée sont représentés selon le même code couleur, une teinte plus basse. À gauche: Concentration en diuron dans le biofilm en $\mu\text{g.g}^{-1}\text{.cm}^{-2}$ en fonction de la concentration en diuron dans l'eau en $\mu\text{g.L}^{-1}$. La courbe noire représente le modèle de Langmuir simple étendu, et la courbe grise le modèle de Langmuir simple court. À droite : Impact toxique en pourcentage d'inhibition de la photosynthèse en fonction de la concentration diuron dans l'eau en $\mu\text{g.L}^{-1}$. La courbe noire représente le modèle E_{max}

La confrontation des données issues de la bioaccumulation de cette expérimentation avec le modèle de Langmuir simple a montré que dans l'ensemble les données correspondaient au modèle de Langmuir simple étendu (Figure 46). Cependant, les données pour le biofilm exposé à $50 \mu\text{g.L}^{-1}$ de diuron sont légèrement surestimées (mais du même ordre de grandeur) par le modèle et ce principalement pour le biofilm exposé aux températures les plus chaudes.

Pour l'inhibition de la photosynthèse, les données sont similaires aux données obtenues lors de l'étude sur les isothermes de sorption du diuron dans les biofilms (Partie 4.2), excepté pour le biofilm exposé à $50 \mu\text{g.L}^{-1}$ de diuron aux températures les plus froides (toxicité plus marquée).

Ces observations démontrent bien l'impact de la température sur le métabolisme du biofilm. En effet, comparé aux modèles, pour une même accumulation, l'impact toxique aurait dû être moindre. Tout ceci traduit la sensibilité du biofilm face aux facteurs environnementaux et met en avant l'impact de ces facteurs sur la validité du modèle.

De plus, au regard des données issues de l'étude préliminaire (chapitre 3, partie 3.2), et plus particulièrement en comparaison avec les résultats des biofilms exposés à 26°C, il est notable que dans les deux cas la bioaccumulation suit globalement le modèle de Langmuir simple. En revanche, pour ce qui est de l'impact toxique, dans le cas de l'étude portant sur l'influence des variations saisonnières celui-ci est semblable au modèle E_{max} , ce qui n'est pas le cas pour les résultats issus de l'étude préliminaire. En effet, un biofilm exposé de façon continue à la lumière et à une température de 20°C semble être moins sensible au diuron. Bien que ce dernier ait été exposé sur une durée plus longue, l'une des raisons de la diminution de sa sensibilité pourrait être liée à son exposition à une lumière continue qui aurait maintenu son métabolisme à un niveau élevé sur le long terme.

5.2.4. Validation du modèle de Langmuir simple

Les modèles de Langmuir simple (court et étendu) et les constantes associées ont été déterminés grâce à l'étude sur les isothermes de sorption du diuron dans le biofilm (Chaumet et al., 2019). Afin de mesurer la validité de ces modèles, l'équation de Langmuir simple a été appliquée à l'ensemble du jeu de données que représentent toutes les expérimentations. Pour l'établissement de ces modèles, seuls les résultats pour les échantillons à T_0 ont été pris en compte (et non tous les résultats pour les échantillons témoin) pour ne pas fausser le calcul du coefficient de régression (R^2). Ce même jeu de données a ensuite été découpé comme présenté dans le *Tableau 14* de façon à déterminer la variation des constantes sur le modèle de Langmuir simple liée au temps d'exposition des biofilms.

Tableau 14: Caractéristiques des modèles étudiés (données utilisées et constantes associées)

Nom	Études considérées	Jeux de données	Modèle de Langmuir simple court			Modèle de Langmuir simple étendu			Régression linéaire
			R ²	C _{max} ($\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}\cdot\text{cm}^{-2}$)	K _L (L.g ⁻¹)	R ²	C _{max} ($\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}\cdot\text{cm}^{-2}$)	K _L (L.g ⁻¹)	R ²
Modèle 1 (initial)	4.1	Toutes les données	0,53	26,58	0,378	0,96	277,82	0,003	0,96
Modèle 2	3.1, 3.2, 3.3 et 4.1	Toutes les données pour chaque expérimentation	0,39	33,47	0,078	0,71	260,06	0,003	0,71
Modèle 3	3.1, 3.2 et 4.1	Données pour un temps d'exposition $\geq 2\text{h}$, et un courant de 2 cm.s ⁻¹	0,35	24,98	0,294	0,92	283,51	0,002	0,92
Modèle 4	3.1, 3.2, 3.3 et 4.1	Données pour un temps d'exposition $\geq 2\text{h}$	0,35	25,46	0,122	0,80	324,24	0,002	0,89
Modèle 5	3.1, 3.2, 3.3 et 4.1	Données pour un temps d'exposition $\leq 30\text{ min}$	0,63	50,74	0,044	0,56	44,60	0,055	0,56

Dans un premier temps, pour le modèle de Langmuir simple étendu, le modèle initial (modèle 1) est celui qui présente le plus grand R^2 ($R^2 = 0,96$, *Tableau 14*) par rapport à tous les autres modèles établis. Cependant, la différence avec les modèles 2, 3 et 4 est moindre, les coefficients de régression sont tout à fait acceptables ($R^2 = 0,71$; $0,92$ et $0,80$ respectivement, *Tableau 14*). Cette légère diminution signifie une perte de précision mais un gain considérable en robustesse au vu du nombre plus conséquent de données utilisées, et tout particulièrement pour le modèle 2 qui représente l'ensemble des expérimentations dans lesquelles les pesticides ont été quantifiés dans le biofilm. Le modèle 5 présente un plateau à partir de $50 \mu\text{g.L}^{-1}$ (*Figure 47*) et une C_{max} très en-dessous des quatre autres (en moyenne 6,5 fois inférieur). Ceci peut s'expliquer du fait que les données utilisées pour ce modèle comprenaient toutes les valeurs de bioaccumulation pour des biofilms ayant subi une exposition inférieure ou égale à 30 minutes, soit généralement avant l'atteinte de l'équilibre. Il est donc compréhensible que ce modèle ne puisse pas prédire les valeurs maximales de diuron accumulé dans le biofilm.

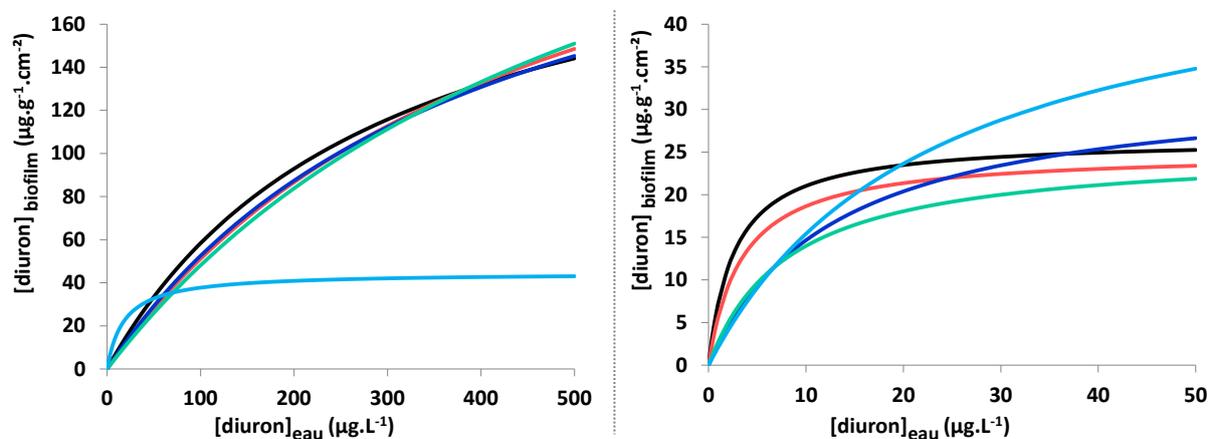


Figure 47: Représentation des modèles de Langmuir simple étendus à gauche et courts à droite selon les différents jeux de données utilisés. La courbe en noire représente le modèle 1, en bleu foncé le modèle 2, en rouge le modèle 3, en vert le modèle 4 et en bleu clair le modèle 5 (cf. *Tableau 14*)

Dans un deuxième temps, pour le modèle de Langmuir simple court, le modèle 1 (modèle initial) et le modèle 3 présentent des tendances similaires (*Figure 47*), mais des coefficients de régressions éloignés ($R^2_{\text{modèle 1}} = 0,53$, $R^2_{\text{modèle 3}} = 0,35$, *Tableau 14*). Le modèle 3 a été établi à partir des données collectées dans les mêmes conditions que pour le modèle 1, à savoir avec

une exposition supérieure ou égale à 2h, avec un courant de 2 cm.s^{-1} , à 20°C et avec une exposition lumineuse continue. Ceci démontre la répétabilité de la toxicocinétique du diuron dans les biofilms et indique la robustesse du modèle de Langmuir, pour des données collectées dans des conditions d'exposition identiques. Cependant le modèle 3 présente un R^2 1,5 fois inférieur au modèle 1, ce qui peut être lié à la plus grande variabilité des données intrinsèque à la nature du biofilm et sa capacité d'accumulation.

La représentation des modèles 2, 4 et 5, pour le modèle de Langmuir court montre une pente moins importante que pour les modèles 1 et 3 (*Figure 47*). En effet ces trois modèles englobent un plus grand nombre de données, et donc offrent une meilleure représentativité de la capacité globale d'accumulation du diuron dans les biofilms.

Les résultats ont montré que pour les deux modèles de Langmuir simple (court et étendu), le modèle le plus représentatif des mécanismes de sorption du diuron dans le biofilm est celui effectué sur l'ensemble des données issues de la bioaccumulation (modèle 2). En effet, pour le modèle étendu, le modèle 2 est quasiment identique à celui réalisé lors de l'étude sur les isothermes de sorption du diuron dans les biofilms, au niveau des constantes C_{max} et K_L . En somme d'après toutes ces observations, le modèle de Langmuir simple établi dans le chapitre 4 semble viable, et il a cependant pu être amélioré en prenant en compte l'ensemble des résultats (modèle 2) ce qui le rend d'autant plus robuste. Cet élément permet aussi d'envisager une utilisation plus large, puisque le modèle de Langmuir a montré son efficacité sur l'ensemble des données acquises au cours de cette thèse. En effet, celui-ci pourrait par la suite être développé avec des substances autres que le diuron.

Deux autres modèles portant sur les isothermes de sorption ont été testés (Langmuir double cf. : 2.4.3.3 et DRDM cf. : 2.4.3.4) sur les différents jeux de données (équivalents aux modèle 1 et modèle 2) dans le but de trouver la meilleure représentation possible des mécanismes de sorption du diuron dans les biofilms. Le modèle DRDM (modèle à double domaine réactif) tient compte du fait que le biofilm peut contenir un nombre limité de sites de sorption (avec une phase de saturation, comme présenté pour le modèle de Langmuir simple), mais aussi d'autres sites moins actifs et sans limitation, comme présenté pour le modèle de régression linéaire. Tout comme le modèle de Langmuir double, certaines constantes alors calculées (C_{max}) étaient négatives ce qui est lié à la courbure trop prononcée obtenue avec ces

représentations. Bien qu'en théorie ces modèles soient plus adaptés à la nature du biofilm il est toutefois difficile d'établir un modèle précis à partir d'un matériel biologique aussi complexe. En effet, chacun de ces modèles considère la présence de sites de sorption de deux natures différentes, or le biofilm est composé d'une multitude de sites présentant des natures distinctes. C'est pourquoi au vu du manque de précision des données acquises (biofilm Total) et du nombre important de sites de sorption du biofilm, un modèle plus grossier est finalement plus adapté qu'un modèle plus sophistiqué comme les modèles DRDM ou de Langmuir double. En effet, ces derniers apportent à la fois plus d'information en considérant plusieurs sites de sorption mais également trop peu de précisions en ne tenant compte que de deux types de sites différents. C'est pourquoi il est préférable dans un premier temps d'utiliser un modèle plus rudimentaire mais plus juste tel que le modèle de Langmuir simple.

La régression linéaire (*Equation 7*) a été appliquée sur les 5 modèles présentés dans le *Tableau 14*. Les coefficients de régression obtenus sont très proches voire égaux à ceux obtenus à partir du modèle de Langmuir étendu. En tenant compte uniquement de l'aspect toxicocinétique, une régression linéaire pourrait être appliquée au même titre que le modèle de Langmuir simple étendu pour caractériser la bioaccumulation du diuron dans le biofilm. Cependant, la régression linéaire reste un modèle non compatible avec l'approche toxicodynamique et le modèle E_{\max} en particulier (Chaumet et al., 2019). De plus, la régression linéaire ne permet pas de refléter la réalité des mécanismes de sorption du diuron dans le biofilm du fait que celle-ci considère une capacité illimitée de sorption dans le biofilm.

5.3. Domaine de validité du modèle E_{\max}

5.3.1. Incidence de la CE_{50} sur le modèle E_{\max}

Grâce à l'étude sur les isothermes de sorption du diuron dans les biofilms, le modèle E_{\max} a été appliqué sur le jeu de données correspondant et il a été mis en avant le fait que ce modèle était adapté pour décrire la non-linéarité de la réponse biologique à un contaminant et prédire l'effet d'un contaminant par rapport à la concentration d'exposition. Or selon l'équation du modèle (*Equation 12*), celui-ci dépend de la CE_{50} , qui elle-même est liée à l'historique de contamination du biofilm (4.3) et aux conditions de réalisation du test (Lambert et al., 2015; Larras et al., 2013).

Dans le but d'obtenir une meilleure représentativité de l'effet toxique du diuron sur le biofilm, et donc un modèle E_{\max} mieux adapté à l'ensemble des expérimentations, une nouvelle CE_{50} a été calculée avec le jeu de données complet. Cette CE_{50} a été déterminée à $121 \pm 29 \mu\text{g.L}^{-1}$ de diuron ce qui est 1,6 fois plus élevé que celle obtenue dans la partie 4.2 ($75 \pm 10 \mu\text{g.L}^{-1}$ de diuron). En effet, dans les parties 5.2.1 et 5.2.2, il a été démontré l'influence du temps d'exposition sur l'effet inhibiteur de la photosynthèse du diuron. Dans les deux cas, pour les temps d'exposition très courts (avant l'atteinte de l'équilibre) ou très longs (plusieurs jours, après acclimatation du biofilm), l'impact toxique était moins prononcé que celui attendu par le modèle E_{\max} établi à 2h d'exposition.

En revanche, cette variation au niveau de la CE_{50} n'engendre pas de changements drastiques sur le modèle E_{\max} . En effet, les deux modèles (réalisés avec $CE_{50}= 75 \mu\text{g.L}^{-1}$ et $CE_{50}= 121 \mu\text{g.L}^{-1}$) présentent la même tendance (*Figure 48*), et la différence entre les deux modèles (delta) ne dépasse pas les 12 % d'inhibition de la photosynthèse, soit une différence entre 55,2 % d'inhibition pour le modèle initial, et 43,3 % pour celui établi à partir d'une CE_{50} à $121 \mu\text{g.L}^{-1}$ (*Figure 48*). Ces résultats mettent de nouveau en avant le faible poids de la CE_{50} , et par extension l'historique de contamination du biofilm, sur le modèle E_{\max} .

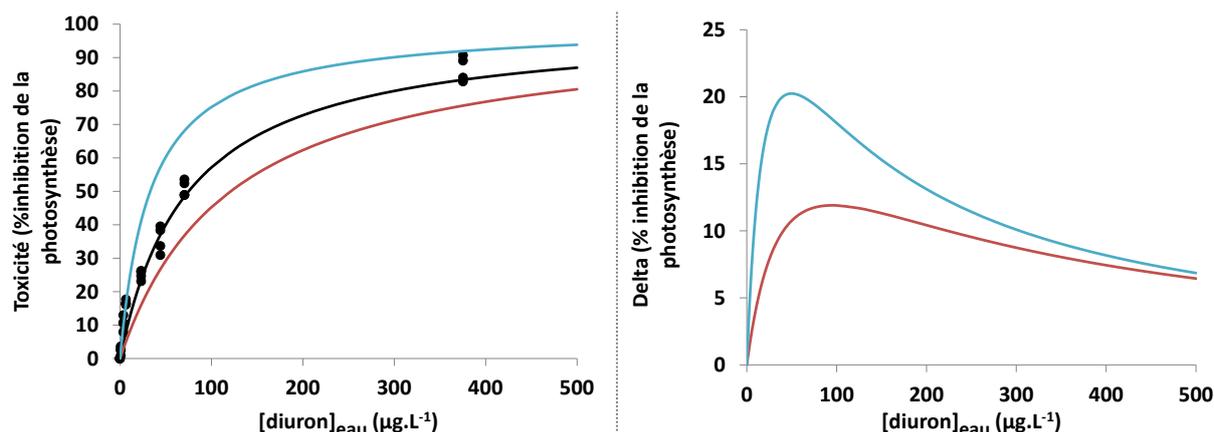


Figure 48: À gauche : Représentation de la toxicité en pourcentage d'inhibition de la photosynthèse en fonction de la concentration en diuron dans l'eau en $\mu\text{g.L}^{-1}$. Les points en noir sont les données expérimentales d'inhibition de la photosynthèse de l'étude sur les isothermes de sorption du diuron, et la courbe noire le modèle E_{max} associé. La courbe rouge est le modèle E_{max} réalisé avec une CE_{50} à $121 \mu\text{g.L}^{-1}$, et en bleu avec une CE_{50} à $33.2 \mu\text{g.L}^{-1}$. À droite : Représentation de la différence entre les deux nouveaux modèles E_{max} (avec les couleurs associées) et le modèle E_{max} initial, en pourcentage d'inhibition de la photosynthèse (delta) en fonction de la concentration en diuron dans l'eau en $\mu\text{g.L}^{-1}$

5.3.2. Influence de la forme d'exposition du biofilm

En plus des expérimentations présentées dans cette thèse, une étude sur la tolérance du biofilm a été menée afin de déterminer l'influence de la forme d'exposition du biofilm (en suspension) face à une exposition à neuf concentrations croissantes de diuron. Brièvement, pour l'exposition du biofilm en suspension, des lames colonisées pendant un mois ont été grattées puis deux mL de biofilm ont été exposés en triplicat à 0 ; 0,1 ; 3,5 ; 11 ; 35 ; 11 ; 350 ; 1107 ; et $3500 \mu\text{g.L}^{-1}$ de diuron. Les suspensions ont été contaminées pendant quatre heures, puis l'inhibition de la photosynthèse a été mesurée à l'aide du PhytoPAM sur le biofilm en suspension (les détails du protocole expérimental se trouvent en annexe 8.4).

La CE_{50} a été calculée à $33,2 \mu\text{g.L}^{-1}$ de diuron pour le biofilm en suspension. Le biofilm présente une sensibilité apparente environ deux fois supérieure à celle du biofilm intact exposé sous sa forme benthique (sur lames) et analysé après mise en suspension (partie 4.2).

En accord avec les résultats de Larras et al. (2013), ces résultats montrent que la forme d'exposition et d'analyse du biofilm joue un rôle sur la mesure de la toxicité du diuron. Le biofilm exposé en suspension semble être plus facilement impacté que le biofilm exposé sur lame. En effet, le biofilm en suspension présente une plus grande surface de contact avec le

milieu, et par conséquent avec le contaminant. En effet, dans leur étude, Larras et al. (2013) ont révélé que la nature des contaminants jouait un rôle prépondérant sur leur accumulation dans les diatomées, et par conséquent sur leur impact toxique. Plus précisément, ils ont décrit le comportement des herbicides hydrophobes, et rapporté que ceux-ci présentaient une plus grande affinité avec la matrice EPS, et donc étaient préférentiellement accumulés dans les diatomées sous forme de biofilm. Et inversement, les composés plus hydrophiles comme le diuron par exemple, présenteraient un plus grand risque de contamination pour les organismes exposés sous forme planctonique. Ces conclusions témoignent de l'importance de considérer les propriétés physicochimiques des contaminants dans le milieu.

Cette nouvelle CE_{50} ainsi déterminée a été injectée dans le modèle E_{max} , et la différence de pourcentage d'inhibition de la photosynthèse a été calculé entre ce nouveau modèle, et celui établi suite à l'étude sur les isothermes de sorption du diuron. Les résultats ont montré qu'au maximum ces deux modèles présentent une différence d'inhibition de la photosynthèse de 20 % (Figure 48) (39,8 vs 59,9 % d'inhibition pour le biofilm ayant une CE_{50} à 75 et 121 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ respectivement).

5.3.3. Limites du modèles E_{max}

Afin d'évaluer les divers avantages et limitations du modèle E_{max} , les données de l'expérimentation réalisée avec du biofilm en suspension pour déterminer la tolérance de ce dernier, ont été confrontées au modèle établi à partir d'une CE_{50} à 33,2 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$.

L'effet prédit par le modèle E_{max} à partir des concentrations dans l'eau semble similaire à l'effet réel pour les valeurs les plus extrêmes (de 0,1 à 3,5 et de 350 à 3500 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ de diuron, Figure 49). Pour ce qui est des valeurs proches de la CE_{50} , l'écart entre les données réelles et les données prédites peut atteindre jusqu'à 26 % d'inhibition de différence. En effet les pentes de chaque jeu de données ne présentent pas la même tendance (données expérimentales : droite verte, données prédites : droite rouge, Figure 49). Par ailleurs, avec cette même équation (modèle E_{max}), la prédiction de la concentration en diuron dans l'eau en fonction de l'effet toxique observé n'a pas été concluante. Les données calculées étaient entre deux à dix fois

supérieures aux valeurs réelles. Ce phénomène pourrait être lié au trop grand écart au niveau des pentes entre données expérimentales et données prédites.

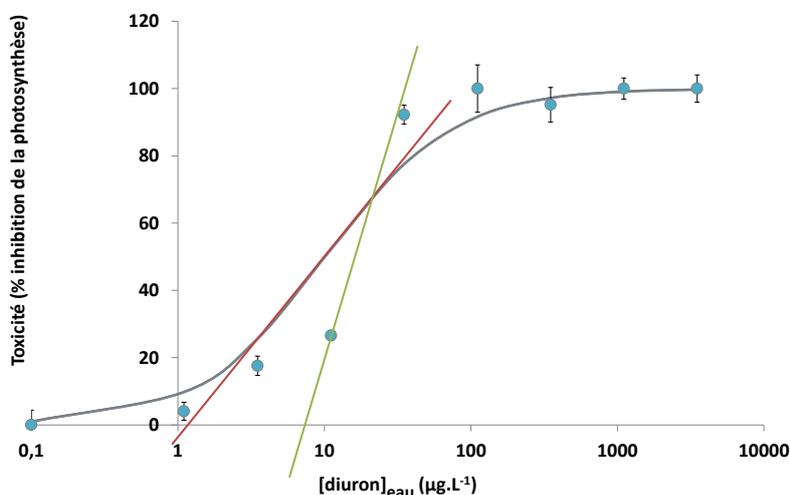


Figure 49: Représentation de la toxicité en pourcentage d'inhibition de la photosynthèse en fonction de la concentration en diuron dans l'eau en $\mu\text{g.L}^{-1}$ pour l'expérimentation menée sur le biofilm en suspension. Les points représentent les données expérimentales et la courbe représente la prédiction de la toxicité à partir du modèle E_{max} . La courbe rouge représente la pente pour les données prédites, et la courbe verte pour les données expérimentales

Or les données obtenues au cours de l'expérimentation sur les isothermes de sorption du diuron dans le biofilm, présentées dans la partie 4.2, ont elles aussi été comparées avec les données prédites de la concentration dans le milieu à partir de l'effet toxique observé. Dans ce cas-ci la confrontation des deux jeux de données (expérimental vs prédit) a révélé une très bonne concordance du modèle par rapport aux données expérimentales ($R^2= 0,90$; Figure 50).

Il semble que selon la CE_{50} utilisée (influencée notamment par la forme d'exposition du biofilm), le modèle présente une certaine limitation pour la prédiction de la concentration dans le milieu à partir de l'effet toxique mesuré. Cependant, pour une éventuelle application de cette méthodologie dans le milieu naturel, à savoir un dépôt de lames de verre dans les cours d'eau pour une récupération après quelques semaines, le biofilm alors colonisé se présentera sous la même forme que celle utilisée pour les expérimentations présentées dans cette thèse. Le biofilm colonisé dans l'étang de Gazinet-Cestas sur des lames de verre est plus proche de la réalité environnementale et technique que le biofilm en suspension. C'est

pourquoi bien que le modèle E_{\max} soit à encore à valider en fonction de la diversité des conditions environnementales, celui-ci semble adapté au choix de la composante biologique biofilm.

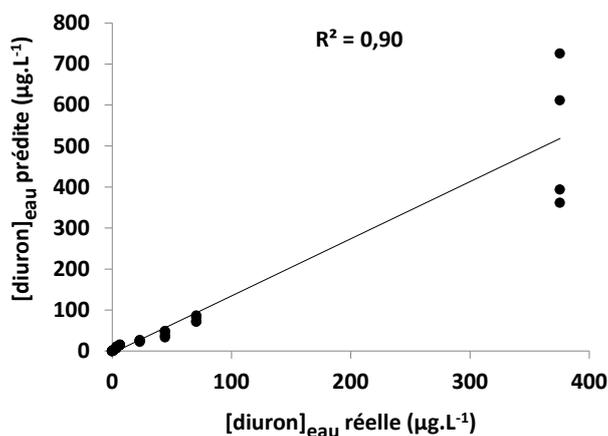


Figure 50: Représentation de la concentration en diuron dans l'eau prédite en fonction de la concentration réelle en $\mu\text{g.L}^{-1}$ pour les données issues de l'étude sur les isothermes de sorption du diuron

5.4. Perspectives d'amélioration et d'application des modèles

Dans ce chapitre, il a été montré que le modèle de Langmuir simple et le modèle E_{\max} étaient satisfaisants pour représenter la bioaccumulation du diuron dans les biofilms et prédire les effets toxiques associés. Le couplage de ces deux approches a permis d'établir une équation incluant le modèle de Langmuir simple dans le modèle E_{\max} . Cette nouvelle équation rend possible la détermination de la concentration en diuron dans le milieu, le biofilm se comportant comme un échantillonneur intégratif biologique, et l'effet toxique engendré par cette contamination à partir de la concentration en diuron dans le biofilm. Cette nouvelle équation peut présenter un avantage pour les études sur le terrain puisqu'elle permet d'acquérir facilement la concentration d'exposition et l'impact du diuron. Cependant, comme il a été montré dans les parties 5.2.2, 5.2.3 et 5.3.3, certains ajustements sont à réaliser afin d'améliorer ces modèles.

5.4.1. Effets mélanges

Il est envisageable d'appliquer ces modèles sur des données issues de prélèvements dans le milieu naturel, sous condition d'inclure de nouveaux paramètres dans les équations associées. Dans l'environnement, le plus souvent les molécules sont retrouvées en mélange, alors que leurs toxicités respectives sont principalement évaluées individuellement (Kim Tiam et al., 2014).

La littérature contient de nombreuses données sur les effets des contaminants en mélange sur la réponse biologique des organismes aquatiques (Carder & Hoagland, 1998; Chèvre et al., 2006; Hartgers et al., 1998; Pesce et al., 2011; Sura et al., 2012, Dupraz et al., 2016) mais assez peu concernant les aspects bioaccumulation. Or, des études ont montré que bien des composés organiques peuvent être accumulés dans les biofilms (Aubertheau et al., 2017; Huerta et al., 2015; Le Guet et al., 2018).

Au cours de cette thèse et par le biais du projet PhytoCOTE, une étude de terrain a été réalisée sur la commune de Marcillac (Nouvelle-Aquitaine) présentant une forte pression viticole dans les ruisseaux des Souches et de la Livenne (sites étudiés présentés en annexe 8.5). Quatre campagnes ont été réalisées sur différentes périodes durant l'année 2017 (février/mars, mai/juin, juillet/août et novembre/décembre). Selon la période de l'année considérée, plus ou moins de pesticides ont pu être quantifiés dans le biofilm (résultats en annexe 8.5). Bien que les données sur la concentration en pesticides dans l'eau ne soient pas encore disponibles à cette date, les données issues de la bioaccumulation ont montré la capacité du biofilm à accumuler différents pesticides présentant des propriétés physico-chimiques diverses. De plus, les résultats ont souligné la concordance entre les pesticides accumulés par le biofilm avec leur usage saisonnier tout au long de ces quatre campagnes de terrain. Ces données confirment également que le protocole de préparation et l'analyse des échantillons permettent de quantifier divers types de pesticides dans le biofilm.

D'un point de vue toxicodynamique, les effets associés à la toxicité de multiples molécules peuvent varier en fonction des caractéristiques et concentrations relatives des contaminants. Par conséquent, il est possible d'observer différents effets qui peuvent être additifs, antagonistes ou synergiques, modulant ainsi la toxicité pour le biofilm (Spurgeon et al., 2010;

Ferreira et al., 2008; Hernández et al., 2017). Aussi, divers phénomènes peuvent se produire lors de l'accumulation en condition « mélange », notamment des phénomènes de compétition pour les sites de sorption, lorsqu'on approche la phase de saturation (Hernández et al., 2017).

Une étude réalisée par El Azzi et al. (2018) sur les phénomènes de compétition entre deux pesticides (aclonifen et alachlore) et deux métaux (cadmium et cuivre) pour l'adsorption sur la matière en suspension a montré que le comportement de ces contaminants variait selon s'ils étaient présent seuls ou en mélange. Les résultats ont révélé qu'en mélange ces derniers pouvaient former des complexes altérant leur solubilité. Les différents phénomènes de compétition présentés sont relatifs aux propriétés physicochimiques des composés considérés. En effet, certaines molécules peuvent présenter une affinité plus marquée que d'autres (Bäuerlein et al., 2012), entraînant un possible déplacement des constantes cinétiques ou d'équilibre, par rapport aux composés considérés individuellement. Selon cette hypothèse, en fonction de leur polarité ou de leur structure, les molécules pourraient alors être accumulées de différentes façons dans la matrice EPS, dans les cellules, puis produire des effets biologiques variables à leur tour.

C'est pourquoi les modèles de Langmuir simple et E_{\max} pourraient être améliorés en étudiant par exemple les effets de mélange de molécules ayant une structure différente et/ou appartenant à une autre famille de molécules que le diuron (ex : isoproturon et atrazine) comme proposé par Knauert et al. (2008).

Une solution par exemple serait d'utiliser des extraits de POCIS (Polar Organic Chemical Integrative Samplers) comme l'ont fait Foulquier et al. (2014) et Morin et al. (2012) pour une meilleure représentativité de la contamination environnementale. En effet, le POCIS est un outil qui permet d'intégrer la contamination sur une durée relativement longue (14 jours) dans le milieu naturel. Son extrait, après une exposition sur le terrain apporterait une vue réaliste de la contamination dans l'environnement. Il contribue à la précision et à la vraisemblance d'une exposition dans le milieu naturel de par le type de composés, leurs concentrations, mais surtout pour l'effet cocktail de pesticides (plusieurs molécules à des proportions différentes).

Un autre point important à prendre en considération est la dégradation du diuron en DCPMU et DCPU. Lors de l'étude préliminaire menée sur 21 jours d'exposition, aucun métabolite n'avait été quantifié. Cependant, ceux-ci peuvent être métabolisés par les bactéries dans les sédiments sur des durées plus longues et en conditions naturelles, et à leur tour induire une toxicité sur les biofilms. Des effets additifs du DCPMU et du diuron ont été mis en avant par Pesce et al. (2010) grâce à une approche PICT sur quatre heures d'exposition (Pollution-Induced Community Tolerance, Blanck et al., 1988)

5.4.2. Influence de l'historique de contamination du biofilm

Dans ce chapitre ainsi que dans la partie 3 du chapitre 4, il a été mis en avant le fait que l'historique du biofilm pouvait influencer sa réponse biologique. En effet, bien que la CE_{50} ne soit pas un des paramètres majeurs dans la tendance du modèle E_{max} , elle représente tout de même l'influence du temps d'exposition. De plus, l'étude portant sur la relation dose-temps de réponse a montré que le biofilm pouvait récupérer après un faible pic de contamination ($5 \mu\text{g.L}^{-1}$) de courte durée (Morin et al., 2018), mais pas entièrement pour des concentrations plus conséquentes ($50 \mu\text{g.L}^{-1}$). Tlili et al. (2011) ont montré dans une étude sur l'effet des pics de contamination au diuron et au tébuconazole (20 et $10 \mu\text{g.L}^{-1}$ respectivement) que la tolérance du biofilm était influencée par son historique de contamination et le pic de pollution subi (trois pics d'une durée de six heures, avec une semaine de récupération).

L'étude diachronique de l'exposition du biofilm est donc à considérer en amont de prélèvements dans le milieu naturel. Dans le cas d'une investigation sur le terrain, il serait difficile de déterminer une constante relative à l'historique de contamination à appliquer au modèle E_{max} dans la mesure où les temps d'exposition se font généralement sur des durées plus longues qu'un pic de contamination. Une des possibilités cependant, serait d'échantillonner de façon régulière du cours d'eau (type préleveur automatique) tout le long de l'exposition afin de caractériser les différents événements que pourrait rencontrer le biofilm. Néanmoins cette solution est assez peu viable car elle nécessite un nombre d'échantillons et d'analyses colossal.

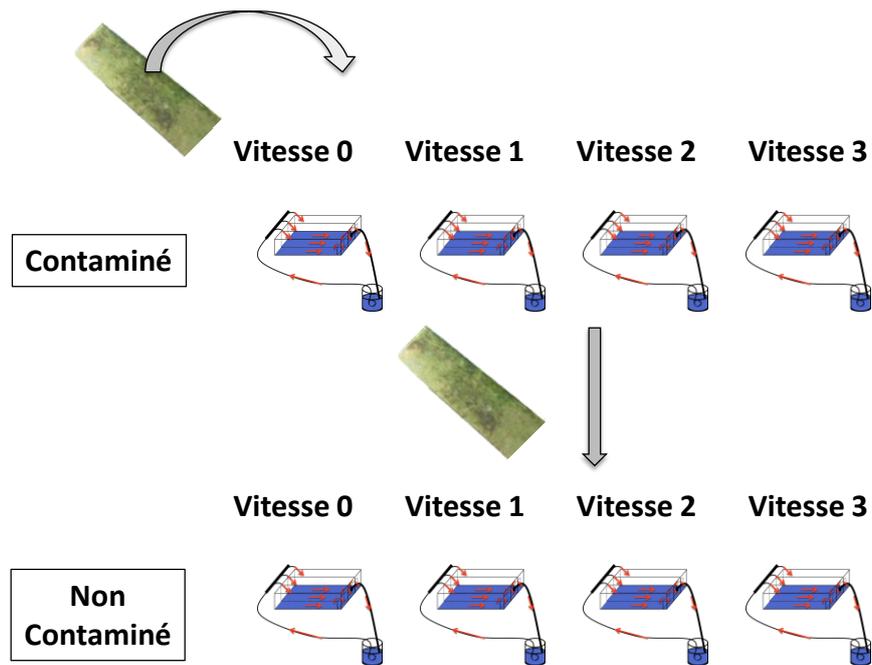


Figure 51: Schéma de l'expérimentation sur l'étude de désorption du diuron dans les biofilms

Une autre question se pose aussi, il s'agit de la désorption possible des pesticides des biofilms. En effet, après un pic de contamination et selon les propriétés des pesticides, ils peuvent séjourner plus ou moins longtemps dans le biofilm. Ceci peut avoir une influence sur la sensibilité du biofilm face à un nouvel épisode de contamination, chronique ou aiguë. La vitesse de désorption des contaminants dans le biofilm pourrait être déterminée par une expérimentation mise en place de la façon suivante (Figure 51).

Le biofilm est exposé au diuron et à plusieurs vitesses de courant différentes pendant un certain temps, puis il est placé dans un nouvel environnement non contaminé. Le diuron est quantifié dans l'eau et le biofilm à différents temps pendant la phase d'accumulation et au moment de l'équilibre. Puis une fois placé dans le milieu non contaminé, les échantillons sont prélevés à des temps réguliers. À chaque temps d'échantillonnage, l'inhibition de la photosynthèse est mesurée en parallèle afin de déterminer l'influence de la vitesse de désorption sur la réponse biologique. Dans le cas du diuron, étant donné que l'accumulation puis l'atteinte de l'équilibre est très rapide, il peut être envisagé que le temps de désorption sera du même ordre de grandeur voire légèrement plus long. Une nouvelle constante

d'élimination pourrait alors être établie et être prise en compte comme un facteur de correction dans l'équation de la cinétique d'ordre 1.

5.4.3. Détermination des constantes liées aux facteurs environnementaux

Dans la partie 5.2 il a été souligné l'influence des facteurs environnementaux sur la justesse des modèles de Langmuir simple et E_{\max} par rapport aux données expérimentales, à savoir la température, la photopériode et la vitesse du courant. Tout comme décrit dans la partie précédente (5.4.2), il serait envisageable de mettre au point une expérimentation pour chaque facteur, avec une mise en place semblable à celle présentée dans l'étude sur les isothermes de sorption du diuron, ayant pour but de déterminer une constante associée à chacun d'entre eux. Tout ceci permettrait une utilisation du biofilm comme outil d'évaluation de la qualité de l'eau et des risques associés pour les organismes, utilisable en de nombreuses conditions.

La mise en place de ces essais permettrait de donner aux modèles une plus grande précision, mais nécessiterait un important travail en laboratoire, d'analyse et de modélisation. Cependant, les modèles établis et corrigés par l'ensemble des données au cours de cette thèse apportent une bonne représentativité des mécanismes globaux de la bioaccumulation du diuron dans les biofilm, et des effets toxiques associés.

Enfin, l'étude du transfert des contaminants de la phase particulaire vers le biofilm permettrait de compléter ces travaux. L'influence de la présence de matière organique a déjà été montrée par Coquillé et al. (2018) sur les cultures de microalgues *Chaetoceros calcitrans* et *Tetraselmis suecica*. Il serait intéressant d'étendre aujourd'hui ces connaissances à l'échelle du biofilm.

Conclusion

6. Conclusion

L'objectif de cette thèse a été de caractériser les mécanismes de transfert et de distribution des pesticides dans les biofilms fluviaux, en lien avec les effets toxiques associés. Le but étant alors d'obtenir une meilleure compréhension du comportement des pesticides dans le biofilm, et du temps et de l'amplitude de la réponse biologique relative.

Dans un premier temps, il a été nécessaire de mettre au point une nouvelle méthodologie afin de séparer les différents compartiments du biofilm pour suivre la distribution des pesticides au cours du temps. Les EPS faiblement liées ont pu être extraites des EPS fortement liées et des microorganismes. Chaque fraction a pu être caractérisée en termes de quantité de protéines et de polysaccharides présents, ainsi que des activités enzymatiques extracellulaires hétérotrophes. Au cours de ces travaux de thèse, en plus du développement méthodologique, cinq autres expérimentations ont été réalisées, chacune ayant un but précis afin de répondre pleinement aux objectifs de cette thèse. Pour trois d'entre elles, les différentes fractions ont été définies, et ont montré la composition du biofilm était généralement constante quelle que soit la période de colonisation considérée.

Par la suite, pour l'approche toxicocinétique, le diuron, la molécule modèle utilisée tout au long de cette thèse, a pu être quantifié dans le biofilm ainsi que dans chacune des fractions au cours du temps, ce qui a permis de mettre en avant une bioaccumulation très rapide, selon une cinétique d'ordre 1. Ces travaux ont montré que l'équilibre eau-biofilm pouvait être atteint en l'espace d'une heure.

Grâce l'approche toxicodynamique à présent, il a été montré que l'effet toxique, et en particulier l'inhibition de la photosynthèse, avait cours de façon simultanée avec l'accumulation. Cependant, il a également pu être souligné que la réponse biologique en termes d'intensité et de temps de réponse, était dépendante de la durée et de la concentration d'exposition.

Puis une étude portant plus précisément sur les isothermes de sorption du diuron dans les biofilms a révélé que la bioaccumulation du diuron selon un gradient de concentrations n'était pas linéaire. Ce fait a pu être établi grâce au couplage des approches toxicocinétiques et toxicodynamiques (TK-TD). En effet, l'association de ces deux dimensions a permis

d'établir que des mécanismes de natures différentes prenaient cours lors de l'accumulation, à savoir une absorption continue par les cellules et une adsorption à la matrice EPS. De plus, l'approche TK-TD a permis d'élaborer un modèle de prédiction qui relie la concentration en diuron dans le milieu à l'effet toxique associé à partir de la concentration en diuron dans le biofilm. Bien que ce modèle présente plusieurs points d'amélioration, il s'est montré cohérent et opérationnel sur l'ensemble des données acquises au cours de ces travaux de thèse.

Enfin, ces travaux ont souligné l'influence de paramètres environnementaux tels que la vitesse du courant et la température, et la photopériode. En effet, il a été démontré d'une part que le courant influait sur l'épaisseur de la couche limite et par conséquent sur la résistance au transfert de masse. D'autre part, ces travaux ont mis en avant la modulation des descripteurs fonctionnels et structuraux ainsi que la variation au niveau de la bioaccumulation liée aux variations saisonnières.

Pour conclure, l'ensemble des expérimentations présentées dans cette thèse ont permis caractériser les mécanismes de transfert et de distribution du diuron dans les biofilms et leurs impacts sur la réponse biologique des organismes grâce au couplage des approches toxicocinétiques et toxicodynamiques. Cette thèse a pu apporter des connaissances nouvelles et utiles à l'évaluation de l'impact des pesticides sur les biofilms fluviaux.

Bibliographie

7. Bibliographie

- AFNOR. (2012). *Water quality. Fresh water algal growth inhibition test with unicellular green algae - European standard NF EN ISO 8692*.
- Aguilera, A., Souza-Egipsy, V., Martín-Úriz, P. S., & Amils, R. (2008). Extraction of extracellular polymeric substances from extreme acidic microbial biofilms. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 78(6), 1079–1088. <https://doi.org/10.1007/s00253-008-1390-9>
- Aguilera, A., Souza-Egipsy, V., San Martín-Úriz, P., & Amils, R. (2008). Extracellular matrix assembly in extreme acidic eukaryotic biofilms and their possible implications in heavy metal adsorption. *Aquatic Toxicology*, 88(4), 257–266. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2008.04.014>
- Allen, M. M., Turnburke, A., Lagace, E., & Steinback, K. (1983). Effects of Photosystem II Herbicides on the Photosynthetic Membranes of the *Cyanobacterium Aphanocapsa 6308*. *Plant Physiology*, 71(2), 388–392. <https://doi.org/10.1104/pp.71.2.388>
- Artigas, J., Fund, K., Kirchen, S., Morin, S., Obst, U., Romani, A. M., Sabater, S., & Schwartz, T. (2012). Patterns of biofilm formation in two streams from different bioclimatic regions: Analysis of microbial community structure and metabolism. *Hydrobiologia*, 695(1), 83–96. <https://doi.org/10.1007/s10750-012-1111-3>
- Artigas, J., Rossi, F., Gerphagnon, M., & Mallet, C. (2017). Sensitivity of laccase activity to the fungicide tebuconazole in decomposing litter. *Science of the Total Environment*, 584–585, 1084–1092. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2017.01.167>
- Aubertheau, E., Stalder, T., Mondamert, L., Ploy, M. C., Dagot, C., & Labanowski, J. (2017). Impact of wastewater treatment plant discharge on the contamination of river biofilms by pharmaceuticals and antibiotic resistance. *Science of the Total Environment*, 579(February 2018), 1387–1398. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2016.11.136>
- Battin, T. J., Kaplan, L. A., Newbold, J. D., Cheng, X., & Hansen, C. (2003). Effects of Current Velocity on the Nascent Architecture of Stream Microbial Biofilms. *Applied and Environmental Microbiology*, 69(9), 5443–5452. <https://doi.org/10.1128/AEM.69.9.5443>
- Battin, T. J., Kaplan, L. A., Newbold, J. D., & Hansen, C. M. E. (2003). Contributions of microbial biofilms to ecosystem processes in stream mesocosms. *Nature*, 426(6965), 439–442. <https://doi.org/10.1038/nature02152>
- Bäuerlein, P. S., Mansell, J. E., ter Laak, T. L., & de Voogt, P. (2012). Sorption behavior of charged and neutral polar organic compounds on SPE materials - Which functional group governs sorption? *Environmental Science and Technology*, 46(2), 954–961.
- Bérard, A., Leboulanger, C., & Pelte, T. (1999). Tolerance of *Oscillatoria limnetica* Lemmermann to atrazine in natural phytoplankton populations and in pure culture: Influence of

- season and temperature. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, 37(4), 472–479. <https://doi.org/10.1007/s002449900541>
- Bernard, M. (2015). *Détermination des constantes cinétiques d'équilibre du diuron (Mémoire de master 2)*. Université de Poitiers.
- Bernard, M., Boutry, S., Lissalde, S., Guibaud, G., Saüt, M., Rebillard, J.-P., & Mazzella, N. (2019). Combination of passive and grab sampling strategies improves the assessment of pesticide occurrence and contamination levels in a large-scale watershed. *Science of The Total Environment*, 651, 684–695. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2018.09.202>
- Blanck, H., Wängberg, S.-A., & Molander, S. (1988). Pollution-Induced Community Tolerance - A New Ecotoxicological Tool. In P. J. R. Cairns J. Jr (Ed.), *Functional Testing of Aquatic Biota for estimating Hazards of Chemicals* (pp. 219–230). Philadelphia.
- Bottacin-Busolin, A., Singer, G., Zaramella, M., Battin, T. J., & Marion, A. (2009). Effects of streambed morphology and biofilm growth on the transient storage of solutes. *Environmental Science and Technology*, 43(19), 7337–7342.
- Boulêtreau, S., Charcosset, J. Y., Gamby, J., Lyautey, E., Mastrorillo, S., Azémar, F., Moulin, F., Tribollet, B., & Garabétian, F. (2011). Rotating disk electrodes to assess river biofilm thickness and elasticity. *Water Research*, 45(3), 1347–1357. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2010.10.016>
- Boulêtreau, S., Garabétian, F., Sauvage, S., & Sánchez-Pérez, J. M. (2006). Assessing the importance of a self-generated detachment process in river biofilm models. *Freshwater Biology*, 51(5), 901–912. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2427.2006.01541.x>
- Bradford, M. (1976). A Rapid and Sensitive Method for the Quantitation of Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein-Dye Binding. *Analytical Biochemistry*, 72, 248–254. [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(76\)90527-3](https://doi.org/10.1016/0003-2697(76)90527-3)
- Branda, S. S., Vik, Å., Friedman, L., & Kolter, R. (2005). Biofilms: The matrix revisited. *Trends in Microbiology*, 13(1), 20–26. <https://doi.org/10.1016/j.tim.2004.11.006>
- Brignon, J.-M., & Gouzy, A. (2007). Diuron. *Ineris - Données Technico-Économiques Sur Les Substances Chimiques En France*, 1–35.
- Brown, J. H., Gillooly, J. F., Allen, A. P., Savage, V. M., & West, G. B. (2004). Toward a metabolic theory of ecology. *Ecology*, 85(7), 1771–1789. <https://doi.org/10.2106/JBJS.J.01311>
- Byers, H. (2012). *Etude de la bioaccumulation des pesticides dans les biofilms de rivière et comparaison avec les cinétiques d'échange dans l'échantillonneur passif POCIS (Mémoire de master 2)*. Université de Bordeaux.
- Camotti Bastos, M., Rheinheimer dos Santos, D., Monteiro de Castro Lima, J. A., le Guet, T., Santanna dos Santos, M. A., Zanella, R., Aubertreau, E., Mondamert, L., Caner, L., & Labanowski, J. (2018). Presence of Anthropogenic Markers in Water: A Case Study of the Guaporé River Watershed, Brazil. *Clean - Soil, Air, Water*, 46(3). <https://doi.org/10.1002/clen.201700019>

- Campbell, P. G. C., Errécalde, O., Fortin, C., Hiriart-Baer, V. P., & Vigneault, B. (2002). Metal bioavailability to phytoplankton-applicability of the biotic ligand model. *Comparative Biochemistry and Physiology. Toxicology & Pharmacology: CBP*, 133(1–2), 189–206. [https://doi.org/10.1016/S1532-0456\(02\)00104-7](https://doi.org/10.1016/S1532-0456(02)00104-7)
- Carder, J. P., & Hoagland, K. D. (1998). Combined effects of alachlor and atrazine on benthic algal communities in artificial streams. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 17(7), 1415–1420. <https://doi.org/10.1002/etc.5620170727>
- Chalifour, A., Arts, M. T., Kainz, M. J., & Juneau, P. (2014). Combined effect of temperature and bleaching herbicides on photosynthesis, pigment and fatty acid composition of *Chlamydomonas reinhardtii*. *European Journal of Phycology*, 49(4), 508–515. <https://doi.org/10.1080/09670262.2014.977962>
- Chaumet, B., Morin, S., Boutry, S., & Mazzella, N. (2019). Diuron sorption isotherms in freshwater biofilms. *Science of The Total Environment*, 651, 1219–1225. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2018.09.286>
- Chèvre, N., Loepfe, C., Singer, H., Stamm, C., Fenner, K., & Escher, B. I. (2006). Including mixtures in the determination of water quality criteria for herbicides in surface water. *Environmental Science and Technology*, 40(2), 426–435. <https://doi.org/10.1021/es050239l>
- Coat, S., Monti, D., Legendre, P., Bouchon, C., Massat, F., & Lepoint, G. (2011). Organochlorine pollution in tropical rivers (Guadeloupe): Role of ecological factors in food web bioaccumulation. *Environmental Pollution*, 159(6), 1692–1701. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2011.02.036>
- Comte, S., Guibaud, G., & Baudu, M. (2006a). Biosorption properties of extracellular polymeric substances (EPS) resulting from activated sludge according to their type: Soluble or bound. *Process Biochemistry*, 41(4), 815–823. <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2005.10.014>
- Comte, S., Guibaud, G., & Baudu, M. (2006b). Relations between extraction protocols for activated sludge extracellular polymeric substances (EPS) and EPS complexation properties: Part I. Comparison of the efficiency of eight EPS extraction methods. *Enzyme and Microbial Technology*, 38(1–2), 237–245. <https://doi.org/10.1016/j.enzmictec.2005.06.016>
- Coogan, M. A., Edziyie, R. E., La Point, T. W., & Venables, B. J. (2007). Algal bioaccumulation of triclocarban, triclosan, and methyl-triclosan in a North Texas wastewater treatment plant receiving stream. *Chemosphere*, 67(10), 1911–1918. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2006.12.027>
- Copin, P. J., & Chèvre, N. (2015). Modelling the effects of pulse exposure of several PSII inhibitors on two algae. *Chemosphere*, 137, 70–77. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2015.05.035>
- Copin, P. J., Coutu, S., & Chèvre, N. (2015). Modelling the effect of fluctuating herbicide concentrations on algae growth. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 113, 214–222. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2014.12.010>

- Copin, P. J., Perronet, L., & Chèvre, N. (2016). Modelling the effect of exposing algae to pulses of S-metolachlor: How to include a delay to the onset of the effect and in the recovery. *Science of the Total Environment*, 541, 257–267. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2015.08.154>
- Coquillé, N., Ménard, D., Rouxel, J., Dupraz, V., Éon, M., Pardon, P., Budzinski, H., Morin, S., Parlanti, É., & Stachowski-Haberkorn, S. (2018). The influence of natural dissolved organic matter on herbicide toxicity to marine microalgae is species-dependent. *Aquatic Toxicology*, 198(November 2017), 103–117. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2018.02.019>
- Corcoll, N., Ricart, M., Franz, S., Sans-Piché, F., Schmitt-Jansen, M., & Guasch, H. (2012). The use of photosynthetic fluorescence parameters from autotrophic biofilms for monitoring the effect of chemicals in river ecosystems. In *Handbook of Environmental Chemistry* (Vol. 19). Springer. <https://doi.org/10.1007/978-3-642-25722-3>
- Coste, M., Boutry, S., Tison-Rosebery, J., & Delmas, F. (2009). Improvements of the Biological Diatom Index (BDI): Description and efficiency of the new version (BDI-2006). *Ecological Indicators*, 9(4), 621–650. <https://doi.org/10.1016/j.ecolind.2008.06.003>
- Daryono, R. N. H., Feurtet-Mazel, A., Bouletreau, S., & Garabetian, F. (2018). Using an electrochemical assay to determine the biofilm elasticity change as a response to toxicant exposure. *IOP Conference Series: Earth and Environmental Science*, 156(1). <https://doi.org/10.1088/1755-1315/156/1/012005>
- Dauta, A. (1982). Conditions de développement du phytoplancton. Etude comparative du comportement de huit espèces en culture. II. Rôle des nutriments: assimilation et stockage intracellulaire. *Annales de Limnologie*, 18(3), 263–292. <https://doi.org/10.1051/limn/1982014>
- Davey, M. E., & O'toole, G. A. (2000). Microbial Biofilms: from Ecology to Molecular Genetics. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 64(4), 847–867. <https://doi.org/10.1128/MMBR.64.4.847-867.2000>
- Davit, Y., Byrne, H., Osborne, J., Pitt-Francis, J., Gavaghan, D., & Quintard, M. (2013). Hydrodynamic dispersion within porous biofilms. *Physical Review E - Statistical, Nonlinear, and Soft Matter Physics*, 87(1), 1–16. <https://doi.org/10.1103/PhysRevE.87.012718>
- De Beer, D., Stoodley, P., Roe, F., & Lewandowski, Z. (1994). Effects of biofilm structures on oxygen distribution and mass transport. *Biotechnology and Bioengineering*, 43(11), 1131–1138. <https://doi.org/10.1002/bit.260431118>
- De Crignis, M. (2010). *Déterminisme de la production bactérienne dans les vasières intertidales du Bassin de Marennes-Oléron : rôle des exopolysaccharides (Thèse de doctorat)*. Université de La Rochelle.
- Debenest, T., Pinelli, E., Coste, M., Silvestre, J., Mazzella, N., Madigou, C., & Delmas, F. (2009). Sensitivity of freshwater periphytic diatoms to agricultural herbicides. *Aquatic Toxicology*, 93(1), 11–17. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2009.02.014>

- Decho, A. W. (2000). Microbial biofilms in intertidal systems: An overview. *Continental Shelf Research*, 20(10–11), 1257–1273. [https://doi.org/10.1016/S0278-4343\(00\)00022-4](https://doi.org/10.1016/S0278-4343(00)00022-4)
- DeLorenzo, M. E., Scott, G. I., & Ross, P. E. (2001). Toxicity of pesticides to aquatic microorganisms: a review. *Environmental Toxicology and Chemistry / SETAC*, 20(1), 84–98. <https://doi.org/10.1002/etc.5620200108>
- Derendorf, H., & Meibohm, B. (1999). Modeling of pharmacokinetic/Pharmacodynamic (PK/PD) Relationships: Concepts and Perspectives. *Pharmaceutical Research*, 16(2), 176–185.
- Ding, H., Li, Y., Hou, J., Wang, Q., & Wu, Y. (2015). Sorption behavior and modeling of endocrine-disrupting chemicals on natural sediments: role of biofilm covered on surface. *Environmental Science and Pollution Research*, 22(2), 1380–1388. <https://doi.org/10.1007/s11356-014-3449-8>
- Dodds, W. K., Hutson, R. E., Eiche, A. C., Evans, M. A., Gudder, D. A., Fritz, K. M., & Gray, L. (1996). The relationship of floods, drying, flow and light to primary production and producer biomass in a prairie stream. *Hydrobiologia*, 333(3), 151–159. <https://doi.org/10.1007/BF00013429>
- Draber, W., Tietjen, K., Kluth, J. F., & Trebst, A. (1991). Herbicides in Photosynthesis Research. *Angewandte Chemie International Edition in English*, 30(12), 1621–1633. <https://doi.org/10.1002/anie.199116211>
- Dubois, M., Gilles, K. A., Hamilton, J. K., Rebers, P. A., & Smith, F. (1956). Colorimetric Method for Determination of Sugars and Related Substances. *Analytical Chemistry*, 28(3), 350–356. <https://doi.org/10.1021/ac60111a017>
- Duong, T. T., Morin, S., Coste, M., Herlory, O., Feurtet-Mazel, A., & Boudou, A. (2010). Experimental toxicity and bioaccumulation of cadmium in freshwater periphytic diatoms in relation with biofilm maturity. *Science of the Total Environment*, 408(3), 552–562. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2009.10.015>
- Dupraz, V., Coquillé, N., Ménard, D., Sussarellu, R., Haugarreau, L., & Stachowski-Haberkorn, S. (2016). Microalgal sensitivity varies between a diuron-resistant strain and two wild strains when exposed to diuron and irgarol, alone and in mixtures. *Chemosphere*, 151, 241–252. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2016.02.073>
- Edwards, S. J., & Kjellerup, B. V. (2013). Applications of biofilms in bioremediation and biotransformation of persistent organic pollutants, pharmaceuticals/personal care products, and heavy metals. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 97(23), 9909–9921. <https://doi.org/10.1007/s00253-013-5216-z>
- El Azzi, D., Laurent, F., Roussiez, V., Chou, L., Guiresse, M., & Probst, J.-L. (2018). Adsorption of Aclonifen, Alachlor, Cd and Cu onto Natural River Suspended Matter in the Context of Multi-Pollutions: Influence of Contaminant Co-Presence and Order of Input into the Aqueous Solution. *Water*, 10(9), 1222. <https://doi.org/10.3390/w10091222>
- Ferreira, A. L. G., Loureiro, S., & Soares, A. M. V. M. (2008). Toxicity prediction of binary

- combinations of cadmium, carbendazim and low dissolved oxygen on *Daphnia magna*. *Aquatic Toxicology*, 89, 28–39. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2008.05.012>
- Flemming, H.-C. (1995). Sorption sites in biofilms. *Water Science and Technology*, 32(8), 27–33. [https://doi.org/10.1016/0273-1223\(96\)00004-2](https://doi.org/10.1016/0273-1223(96)00004-2)
- Flemming, H.-C., Neu, T. R., & Wozniak, D. J. (2007). The EPS matrix: The “House of Biofilm Cells.” *Journal of Bacteriology*, 189(22), 7945–7947. <https://doi.org/10.1128/JB.00858-07>
- Flemming, H.-C., & Wingender, J. (2010). The biofilm matrix. *Nature Reviews Microbiology*, 8(9), 623–633. <https://doi.org/10.1038/nrmicro2415>
- Foulquier, A., Morin, S., Dabrin, A., Margoum, C., Mazzella, N., & Pesce, S. (2014). Effects of mixtures of dissolved and particulate contaminants on phototrophic biofilms: new insights from a PICT approach combining toxicity tests with passive samplers and model substances. *Environmental Science and Pollution Research*, 4025–4036. <https://doi.org/10.1007/s11356-014-3289-6>
- Francoeur, S. N., & Biggs, B. J. F. (2006). Short-term effects of elevated velocity and sediment abrasion on benthic algal communities. *Hydrobiologia*, 59–69. <https://doi.org/10.1007/s10750-005-1604-4>
- Francoeur, S. N., Johnson, A. C., Kuehn, K. A., & Neely, R. K. (2007). Evaluation of the efficacy of the photosystem II inhibitor DCMU in periphyton and its effects on nontarget microorganisms and extracellular enzymatic reactions. *Journal of the North American Benthological Society*, 26(4), 633–641. <https://doi.org/10.1899/06-051.1>
- Fujita, T., Nishimura, K., Takayama, C., Yoshida, M., & Uchida, M. (2010). *Hydrophobicity as a Key Physicochemical Parameter of Environmental Toxicology of Pesticides*. *Hayes' Handbook of Pesticide Toxicology* (Third Edit, Vol. Volume 2). Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-374367-1.00058-6>
- Gerbersdorf, S. U., Manz, W., & Paterson, D. M. (2008). The engineering potential of natural benthic bacterial assemblages in terms of the erosion resistance of sediments. *FEMS Microbiology Ecology*, 66(2), 282–294. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6941.2008.00586.x>
- Ghiglione, J. F., Martin-Laurent, F., Stachowski-Haberkorn, S., Pesce, S., & Vuilleumier, S. (2014). The coming of age of microbial ecotoxicology: report on the first two meetings in France. *Environmental Science and Pollution Research International*, 21(24), 14241–14245. <https://doi.org/10.1007/s11356-014-3390-x>
- Giacomazzi, S., & Cochet, N. (2004). Environmental impact of diuron transformation: A review. *Chemosphere*, 56(11), 1021–1032. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2004.04.061>
- Gomes, M. P., & Juneau, P. (2017). Temperature and Light Modulation of Herbicide Toxicity on Algal and Cyanobacterial Physiology. *Frontiers in Environmental Science*, 5(August), 1–17. <https://doi.org/10.3389/fenvs.2017.00050>
- Guasch, H., Artigas, J., Bonet, B., Bonnineau, C., Canals, O., Corcoll, N., Foulquier, A., López-Doval, J., Kim-Tiam, S., Morin, S., Navarro, E., Pesce, S., Proia, L., Salvadó, H., & Serra,

- A. (2016). The use of biofilms to assess the effects of chemicals on freshwater ecosystems. In A. M. Romani, H. Guasch, & D. Balaguer (Eds.), *Aquatic biofilms: Ecology, Water Quality and Wastewater Treatment* (Vol. 53, p. 160). Caister Academic Press. <https://doi.org/10.1017/CBO9781107415324.004>
- Hartgers, E. M., Aalderink, G. H., Van Den Brink, P. J., Gylstra, R., Wiegman, J. W. F., & Brock, T. C. M. (1998). Ecotoxicological threshold levels of a mixture of herbicides (atrazine, diuron and metolachlor) in freshwater microcosms. *Aquatic Ecology*, 32(2), 135–152. <https://doi.org/10.1023/A:1009968112009>
- Headley, J. V., Gandrass, J., Kuballa, J., Peru, K. M., & Gong, Y. (1998). Rates of sorption and partitioning of contaminants in river biofilm. *Environmental Science and Technology*, 32(24), 3968–3973. <https://doi.org/10.1021/es9804991>
- Hernández, A. F., Gil, F., & Lacasaña, M. (2017). Toxicological interactions of pesticide mixtures: an update. *Archives of Toxicology*, 91(10), 3211–3223. <https://doi.org/10.1007/s00204-017-2043-5>
- Herzig, R., & Dubinsky, Z. (1992). Photoacclimation, photosynthesis, and growth in phytoplankton. *Israel Journal of Botany*, 41(4–6), 199–212. <https://doi.org/10.1080/0021213X.1992.10677227>
- Huckins, J. N., Petty, J. D., & Booij, K. (2006). *Monitors of organic chemicals in the environment: Semipermeable membrane devices*. <https://doi.org/10.1007/0-387-35414-X>
- Huerta, B., Rodriguez-Mozaz, S., Nannou, C., Nakis, L., Ruhi, A., Acuna, V., Sabater, S., & Barcelo, D. (2015). Determination of a broad spectrum of pharmaceuticals and endocrine disruptors in biofilm from a waste water treatment plant-impacted river. *Science of the Total Environment*, 540, 241–249. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2015.05.049>
- Ikuma, K., Decho, A. W., & Lau, B. L. T. (2015). When nanoparticles meet biofilms - Interactions guiding the environmental fate and accumulation of nanoparticles. *Frontiers in Microbiology*, 6, 1–6. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2015.00591>
- Ivorra, N., Bremer, S., Guasch, H., Kraak, M. H. S., & Admiraal, W. (2000). Differences in the sensitivity of benthic microalgae to Zn and Cd regarding biofilm development and exposure history. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 19(5), 1332–1339. <https://doi.org/10.1002/etc.5620190516>
- Jackson, C. R., Churchill, P. F., & Roden, E. E. (2018). Successional changes in bacterial assemblage structure during epilithic biofilm development. *Ecology*, 82(2), 555–566.
- Jager, T., Albert, C., Preuss, T. G., & Ashauer, R. (2011). General unified threshold model of survival - A toxicokinetic-toxicodynamic framework for ecotoxicology. *Environmental Science and Technology*, 45(7), 2529–2540. <https://doi.org/10.1021/es103092a>
- Jayathilake, P. G., Jana, S., Rushton, S., Swailes, D., Bridgens, B., Curtis, T., & Chen, J. (2017). Extracellular polymeric substance production and aggregated bacteria colonization influence the competition of microbes in biofilms. *Frontiers in Microbiology*, 8(SEP). <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.01865>

- Jenkinson, H. F., & Lappin-Scott, H. M. (2001). Biofilms adhere to stay. *Trends in Microbiology*, 9(1), 9–10. [https://doi.org/10.1016/S0966-842X\(00\)01891-6](https://doi.org/10.1016/S0966-842X(00)01891-6)
- Katagi, T. (2013). Aerobic microbial transformation of pesticides in surface water. *Journal of Pesticide Science*, 38(1), 10–26. <https://doi.org/10.1584/jpestics.D12-053>
- Kelly, M. G., Gómez-Rodríguez, C., Kahlert, M., Almeida, S. F. P., Bennett, C., Bottin, M., Delmas, F., Descy, J. P., Dörflinger, G., Kennedy, B., Marvan, P., Opatrilova, L., Pardo, I., Pfister, P., Rosebery, J., Schneider, S., & Vilbaste, S. (2012). Establishing expectations for pan-European diatom based ecological status assessments. *Ecological Indicators*, 20, 177–186. <https://doi.org/10.1016/j.ecolind.2012.02.020>
- Kim Tiam, S., Fauvelle, V., Morin, S., & Mazzella, N. (2016). Improving toxicity assessment of pesticide mixtures: The use of polar passive sampling devices extracts in microalgae toxicity tests. *Frontiers in Microbiology*, 7, 1388. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.01388>
- Kim Tiam, S., Laviale, M., Feurtet-Mazel, A., Jan, G., Gonzalez, P., Mazzella, N., & Morin, S. (2015). Herbicide toxicity on river biofilms assessed by pulse amplitude modulated (PAM) fluorometry. *Aquatic Toxicology*, 165, 160–171. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2015.05.001>
- Kim Tiam, S., Libert, X., Morin, S., Gonzalez, P., Feurtet-Mazel, A., & Mazzella, N. (2014). Single and mixture effects of pesticides and a degradation product on fluvial biofilms. *Environmental Monitoring and Assessment*, 186(6), 3931–3939. <https://doi.org/10.1007/s10661-014-3669-x>
- Kim Tiam, S., Morin, S., Pesce, S., Feurtet-Mazel, A., Moreira, A., Gonzalez, P., & Mazzella, N. (2014). Environmental effects of realistic pesticide mixtures on natural biofilm communities with different exposure histories. *Science of the Total Environment*, 473–474, 496–506. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2013.12.060>
- Knauert, S., Escher, B., Singer, H., Hollender, J., & Knauer, K. (2008). Mixture toxicity of three photosystem II inhibitors (atrazine, isoproturon, and diuron) toward photosynthesis of freshwater phytoplankton studied in outdoor mesocosms. *Environmental Science and Technology*, 42(17), 6424–6430. <https://doi.org/10.1021/es072037q>
- Kohusova, K., Havel, L., Vlasak, P., & Tonika, J. (2011). A long-term survey of heavy metals and specific organic compounds in biofilms, sediments, and surface water in a heavily affected river in the Czech Republic. *Environmental Monitoring and Assessment*, 174(1–4), 555–572. <https://doi.org/10.1007/s10661-010-1478-4>
- Laasch, H., Pfister, K., & Urbach, W. (1981). Comparative binding of photosystem 2-herbicides to isolated thylakoid membranes and intact green algae. *Z.Naturforsch.*, 36C, 1041–1049.
- Lahjiouj, F., Margoum, C., Tlili, A., Montuelle, B., & Coquery, M. (2011). Développement d'une méthode de dosage des pesticides dans le biofilm et étude des cinétiques d'adsorption. XXXXIème Congrès Du Groupe Français Des Pesticides 25/05/2011 27/05/2011, Orléans Développement.

- Lambert, A. S., Pesce, S., Foulquier, A., Gahou, J., Coquery, M., & Dabrin, A. (2015). Improved short-term toxicity test protocol to assess metal tolerance in phototrophic periphyton: toward standardization of PICT approaches. *Environmental Science and Pollution Research*, 22(6), 4037–4045. <https://doi.org/10.1007/s11356-014-3505-4>
- Larras, F., Lambert, A., Pesce, S., Rimet, F., Bouchez, A., & Montuelle, B. (2013). The effect of temperature and a herbicide mixture on freshwater periphytic algae. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 98, 162–170. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2013.09.007>
- Larras, F., Montuelle, B., & Bouchez, A. (2013). Assessment of toxicity thresholds in aquatic environments: Does benthic growth of diatoms affect their exposure and sensitivity to herbicides? *Science of the Total Environment*, 463–464, 469–477. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2013.06.063>
- Laviale, M., Morin, S., & Créach, A. (2011). Short term recovery of periphyton photosynthesis after pulse exposition to the photosystem II inhibitors atrazine and isoproturon. *Chemosphere*, 84(5), 731–734. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2011.03.035>
- Lawrence, J. R., Kopf, G., Headley, J. V., & Neu, T. R. (2001). Sorption and metabolism of selected herbicides in river biofilm communities. *Canadian Journal of Microbiology*, 47(7), 634–641. <https://doi.org/10.1139/cjm-47-7-634>
- Lawrence, J. R., Korber, D. R., Hoyle, B. D., Costerton, J. W., & Caldwell, D. E. (1991). Optical sectioning of microbial biofilms. *Journal of Bacteriol.*, 173(20), 6558–6567. Retrieved from <http://jb.asm.org/cgi/content/long/173/20/6558>
- Lawrence, J. R., & Neu, T. R. (2003). Microscale analyses of the formation and nature of microbial biofilm communities in river systems. *Reviews in Environmental Science and Biotechnology*, 2(2–4), 85–97. <https://doi.org/10.1023/B:RESB.0000040472.53337.57>
- Le Guet, T., Hsini, I., Labanowski, J., & Mondamert, L. (2018). Sorption of selected pharmaceuticals by a river sediment: role and mechanisms of sediment or Aldrich humic substances. *Environmental Science and Pollution Research*, 25(15), 14532–14543. <https://doi.org/10.1007/s11356-018-1684-0>
- Lichtenthaler, H. K., Lang, M., Sowinska, M., Summ, P., Heisel, F., & Miede, J. A. (1997). Uptake of the herbicide diuron as visualised by the fluorescence imaging technique. *Botanica Acta*, 110(2), 158–163. <https://doi.org/10.1111/j.1438-8677.1997.tb00623.x>
- Lockert, C. K., Hoagland, K. D., & Siegfried, B. D. (2006). Comparative sensitivity of freshwater algae to atrazine. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, 76(1), 73–79. <https://doi.org/10.1007/s00128-005-0891-9>
- Loos, R., Gawlik, B. M., Locoro, G., Rimaviciute, E., Contini, S., & Bidoglio, G. (2009). EU-wide survey of polar organic persistent pollutants in European river waters. *Environmental Pollution*, 157(2), 561–568. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2008.09.020>
- López, A., Rico, M., Rivero, A., & Tangil, M. S. De. (2011). The effects of solvents on the phenolic contents and antioxidant activity of *Stypocaulon scoparium* algae extracts. *Food Chemistry*, 125, 1104–1109. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2010.09.101>

- Lurling, M., Eshetu, F., Faassen, E., Kosten, S., & Huszar, V. (2012). Comparison of cyanobacterial and green algal growth rates at different temperatures. *Freshwater Biology*. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2427.2012.02866.x>
- Ma, J., & Xu, L. (2002). A quick, simple, and accurate method of screening herbicide activity using green algae cell suspension cultures. *Weed Science*, 50(5), 555–559.
- MacKay, D., & Fraser, A. (2000). Bioaccumulation of persistent organic chemicals: Mechanisms and models. *Environmental Pollution*, 110(3), 375–391. [https://doi.org/10.1016/S0269-7491\(00\)00162-7](https://doi.org/10.1016/S0269-7491(00)00162-7)
- Magnusson, M., Heimann, K., Quayle, P., & Negri, A. P. (2010). Additive toxicity of herbicide mixtures and comparative sensitivity of tropical benthic microalgae. *Marine Pollution Bulletin*, 60(11), 1978–1987. <https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2010.07.031>
- Magnusson, M., Heimann, K., Ridd, M., & Negri, A. P. (2012). Chronic herbicide exposures affect the sensitivity and community structure of tropical benthic microalgae. *Marine Pollution Bulletin*, 65(4–9), 363–372. <https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2011.09.029>
- McClellan, K., Altenburger, R., & Schmitt-Jansen, M. (2008). Pollution-induced community tolerance as a measure of species interaction in toxicity assessment. *Journal of Applied Ecology*, 45, 1514–1522. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2664.2007.0>
- Métivier, R., Bourven, I., Labanowski, J., & Guibaud, G. (2013). Interaction of erythromycin ethylsuccinate and acetaminophen with protein fraction of extracellular polymeric substances (EPS) from various bacterial aggregates. *Environmental Science and Pollution Research*, 20(10), 7275–7285. <https://doi.org/10.1007/s11356-013-1738-2>
- Millie, D. F., Hersh, C. M., & Dionigi, C. P. (1992). Simazine-Induced Inhibition in Photoacclimated Populations of *Anabaena Circinalis* (Cyanophyta). *Journal of Phycology*. <https://doi.org/10.1111/j.0022-3646.1992.00019.x>
- Mora-Gómez, J., Freixa, A., Perujo, N., & Barral-Fraga, L. (2016). Limits of the Biofilm Concept and Types of Aquatic Biofilms. In H. G. and M. D. B. Anna M. Romani (Ed.), *Aquatic Biofilms* (pp. 3–28). Caister Academic Press. <https://doi.org/https://doi.org/10.21775/9781910190173.01>
- Morin, S., Gomez, N., Tornes, E., Licursi, M. (2016). Benthic Diatom Monitoring and Assessment of Freshwater Environments: Standard methods and Future Challenges. In *Aquatic Biofilms* (pp. 111–124).
- Morin, S., Chaumet, B., & Mazzella, N. (2018). A time-dose response model to assess diuron-induced photosynthesis inhibition in freshwater biofilms. *Frontiers in Environmental Science*.
- Morin, S., Lambert, A. S., Rodriguez, E. P., Dabrin, A., Coquery, M., & Pesce, S. (2017). Changes in copper toxicity towards diatom communities with experimental warming. *Journal of Hazardous Materials*, 334, 223–232. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2017.04.016>
- Morin, S., Pesce, S., Kim-Tiam, S., Liber, X., Coquery, M., & Mazzella, N. (2012). Use of polar organic chemical integrative samplers to assess the effects of chronic pesticide exposure

- on biofilms. *Ecotoxicology*, 21(5), 1570–1580. <https://doi.org/10.1007/s10646-012-0910-7>
- Morin, S., Pesce, S., Tlili, A., Coste, M., & Montuelle, B. (2010). Recovery potential of periphytic communities in a river impacted by a vineyard watershed. *Ecological Indicators*, 10(2), 419–426. <https://doi.org/10.1016/j.ecolind.2009.07.008>
- Multigner, L. (2005). Effets retardés des pesticides sur la santé humaine. *Environnement, Risques & Santé*, 4, 187–194.
- Munoz, G., Fechner, L. C., Geneste, E., Pardon, P., Budzinski, H., & Labadie, P. (2018). Spatio-temporal dynamics of per and polyfluoroalkyl substances (PFASs) and transfer to periphytic biofilm in an urban river: case-study on the River Seine. *Environmental Science and Pollution Research*, 25(24), 23574–23582. <https://doi.org/10.1007/s11356-016-8051-9>
- Murray, K. E., Thomas, S. M., & Bodour, A. A. (2010). Prioritizing research for trace pollutants and emerging contaminants in the freshwater environment. *Environmental Pollution*, 158(12), 3462–3471. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2010.08.009>
- Nebeker, A. V., & Schuytema, G. S. (1999). Chronic toxicity of ammonia to New Zealand freshwater invertebrates: A mesocosm study. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, 37(3), 338–351. <https://doi.org/10.1007/s002449900523>
- Nestler, H., Groh, K. J., Schönenberger, R., Behra, R., Schirmer, K., Eggen, R. I. L., & Suter, M. J. (2012). Multiple-endpoint assay provides a detailed mechanistic view of responses to herbicide exposure in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Aquatic Toxicology*, 110–111, 214–224. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2012.01.014>
- Neuwoehner, J., Zilberman, T., Fenner, K., & Escher, B. I. (2010). QSAR-analysis and mixture toxicity as diagnostic tools: Influence of degradation on the toxicity and mode of action of diuron in algae and daphnids. *Aquatic Toxicology*, 97(1), 58–67. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2009.12.005>
- Newman, M. C., & McCloskey, J. T. (1996). Time-to-event analysis of ecotoxicity data. *Ecotoxicology*, 5, 187–196.
- Niederdorfer, R., Peter, H., & Battin, T. J. (2016). Attached biofilms and suspended aggregates are distinct microbial lifestyles emanating from differing hydraulics. *Nature Microbiology*, 1. <https://doi.org/10.1038/nmicrobiol.2016.178>
- O’Neal, S. W., & Lembi, C. A. (1983). Effect of simazine on photosynthesis and growth of filamentous algae. *Weed Science*, 31(6), 899–903. <https://doi.org/10.1614/WS-09-059>
- OECD. (1984). *Alga, growth inhibition test*. <https://doi.org/10.1787/9789264069923-en>
- Okamura, H. (2002). Photodegradation of the antifouling compounds Irgarol 1051 and Diuron released from a commercial antifouling paint. *Chemosphere*, 48(1), 43–50. [https://doi.org/10.1016/S0045-6535\(02\)00025-5](https://doi.org/10.1016/S0045-6535(02)00025-5)
- Okamura, H., Aoyama, I., Ono, Y., & Nishida, T. (2003). Antifouling herbicides in the coastal waters of western Japan. *Marine Pollution Bulletin*, 47(1–6), 59–67.

[https://doi.org/10.1016/S0025-326X\(02\)00418-6](https://doi.org/10.1016/S0025-326X(02)00418-6)

- Paule, A., Roubeix, V., Swerhone, G. D. W., Roy, J., Lauga, B., & Duran, R. (2016). Comparative responses of river biofilms at the community level to common organic solvent and herbicide exposure. *Environmental Science and Pollution Research*, 4282–4293. <https://doi.org/10.1007/s11356-015-5141-z>
- Pesce, S., Bouchez, A., & Montuelle, B. (2011). Effects of Organic Herbicides on Phototrophic Microbial Communities in Freshwater Ecosystems. *Reviews of Environmental Contamination and Toxicology*, 214, 87–124. <https://doi.org/10.1007/978-1-4614-0668-6>
- Pesce, S., Lambert, A. S., Morin, S., Foulquier, A., Coquery, M., & Dabrin, A. (2018). Experimental warming differentially influences the vulnerability of phototrophic and heterotrophic periphytic communities to copper toxicity. *Frontiers in Microbiology*, 9, 1–14. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.01424>
- Pesce, S., Lissalde, S., Lavieille, D., Margoum, C., Mazzella, N., Roubeix, V., & Montuelle, B. (2010). Evaluation of single and joint toxic effects of diuron and its main metabolites on natural phototrophic biofilms using a pollution-induced community tolerance (PICT) approach. *Aquatic Toxicology*, 99, 492–499. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2010.06.006>
- Pesce, S., Margoum, C., & Foulquier, A. (2016). Pollution-induced community tolerance for in situ assessment of recovery in river microbial communities following the ban of the herbicide diuron. *Agriculture, Ecosystems and Environment*, 221, 79–86. <https://doi.org/10.1016/j.agee.2016.01.009>
- Peterson, B. W., He, Y., Ren, Y., Zerdoum, A., Libera, M. R., Sharma, P. K., van Winkelhoff, A. J., Neut, D., Stoodley, P., van der Mei, H. C., & Busscher, H. J. (2015). Viscoelasticity of biofilms and their recalcitrance to mechanical and chemical challenges. *FEMS Microbiology Reviews*, 39(2), 234–245. <https://doi.org/10.1093/femsre/fuu008>
- Pinto, E., Sigaud- Kutner, T. C. S., Leitao, M. A. S., Okamoto, O. K., Morse, D., & Calepicolo, P. (2003). Review - Heavy metal-induced oxidatives stress in algae. *Journal of Phycology*, 39, 1008–1018. <https://doi.org/10.1111/j.0022-3646.2003.02-193.x>
- Praus, P., & Turicová, M. (2007). A Physico-Chemical Study of the Cationic Surfactants Adsorption on Montmorillonite. *Journal of the Brazilian Chemical Society*, 18(2), 378–383.
- Proia, L., Cassió, F., Pascoal, C., Tlili, A., & Romani, A. M. (2012). The Use of Attached Microbial Communities to Assess Ecological Risks of Pollutants in River Ecosystems: The Role of Heterotrophs. *The Handbook of Environmental Chemistry*, 19, 55–83.
- Proia, L., Morin, S., Peipoch, M., Romani, A. M., & Sabater, S. (2011). Resistance and recovery of river biofilms receiving short pulses of Triclosan and Diuron. *Science of the Total Environment*, 409(17), 3129–3137. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2011.05.013>
- Proia, L., Osorio, V., Soley, S., Kock-Schulmeyer, M., Perez, S., Barcelo, D., Romani, A. M., & Sabater, S. (2013). Effects of pesticides and pharmaceuticals on biofilms in a highly impacted river. *Environmental Pollution*, 178, 220–228. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2013.02.022>

- Pusch, M., Fiebig, I., Brettar, H., Eisenmann, H., Ellis, B. K., Kaplan, L. A., Lock, M. A., Naegeli, M. W., & Traunspurger, W. (1998). The role of micro-organisms in the ecological connectivity of running waters. *Freshwater Biology*, 40(3), 453–495. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2427.1998.00372.x>
- Rabiet, M., Margoum, C., Gouy, V., Carlier, N., & Coquery, M. (2010). Assessing pesticide concentrations and fluxes in the stream of a small vineyard catchment - Effect of sampling frequency. *Environmental Pollution*, 158(3), 737–748. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2009.10.014>
- Ravier, I., Haouisee, E., Clément, M., Seux, R., & Briand, O. (2005). Field experiments for the evaluation of pesticide spray-drift on arable crops. *Pest Management Science*, 61(8), 728–736. <https://doi.org/10.1002/ps.1049>
- Ricart, M., Barcelo, D., Geiszinger, A., Guasch, H., Alda, M. L. de, Romani, A. M., Vidal, G., Villagrasa, M., & Sabater, S. (2009). Effects of low concentrations of the phenylurea herbicide diuron on biofilm algae and bacteria. *Chemosphere*, 76(10), 1392–1401. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2009.06.017>
- Ricart, M., Guasch, H., Barcelo, D., Brix, R., Conceição, M. H., Geiszinger, A., Alda, M. J. L. de, Lopez-Doval, J. C., Munoz, I., Postigo, C., Romani, A. M., Villagrasa, M., & Sabater, S. (2010). Primary and complex stressors in polluted mediterranean rivers: Pesticide effects on biological communities. *Journal of Hydrology*, 383(1–2), 52–61. <https://doi.org/10.1016/j.jhydrol.2009.08.014>
- Romaní, A. M., Fund, K., Artigas, J., Schwartz, T., Sabater, S., & Obst, U. (2008). Relevance of polymeric matrix enzymes during biofilm formation. *Microbial Ecology*, 56(3), 427–436. <https://doi.org/10.1007/s00248-007-9361-8>
- Rutherford, A. W., & Krieger-Liszka, A. (2001). Herbicide-induced oxidative stress in photosystem II. *Trends in Biochemical Sciences*, 26(11), 648–653. [https://doi.org/10.1016/S0968-0004\(01\)01953-3](https://doi.org/10.1016/S0968-0004(01)01953-3)
- Sabater, S., Guasch, H., Ricart, M., Romaní, A., Vidal, G., Klünder, C., & Schmitt-Jansen, M. (2007). Monitoring the effect of chemicals on biological communities. the biofilm as an interface. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 387(4), 1425–1434. <https://doi.org/10.1007/s00216-006-1051-8>
- Sanchez-Pérez, J., Montuelle, B., Mouchet, F., Gauthier, L., Julien, F., Sauvage, S., Teissier, S., Dedieu, K., Destrieux, D., Vervier, P., & Gerino, M. (2013). Role of the hyporheic heterotrophic biofilm on transformation and toxicity of pesticides. *Annales de Limnologie - International Journal of Limnology*, 49(02), 87–95. <https://doi.org/10.1051/limn/2013041>
- Schreiber, U., Quayle, P., Schmidt, S., Escher, B. I., & Mueller, J. F. (2007). Methodology and evaluation of a highly sensitive algae toxicity test based on multiwell chlorophyll fluorescence imaging. *Biosensors and Bioelectronics*, 22(11), 2554–2563. <https://doi.org/10.1016/j.bios.2006.10.018>
- Schriever, C. A., & Liess, M. (2007). Mapping ecological risk of agricultural pesticide runoff. *Science of the Total Environment*, 384(1–3), 264–279.

- <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2007.06.019>
- Sharma, P., Chopra, A., Cameotra, S. S., & Suri, C. R. (2010). Efficient biotransformation of herbicide diuron by bacterial strain *Micrococcus sp. PS-1*. *Biodegradation*, 21(6), 979–987. <https://doi.org/10.1007/s10532-010-9357-9>
- Sheng, G. P., Yu, H. Q., & Li, X. Y. (2010). Extracellular polymeric substances (EPS) of microbial aggregates in biological wastewater treatment systems: A review. *Biotechnology Advances*, 28(6), 882–894. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2010.08.001>
- Sinclair, C. J., & Boxall, A. B. A. (2003). Assessing the ecotoxicity of pesticide transformation products. *Environmental Science and Technology*, 37(20), 4617–4625. <https://doi.org/10.1021/es030038m>
- SOeS. (2015). *Les pesticides dans les cours d'eau français en 2013. Chiffres et statistiques* (Vol. 697). Retrieved from www.statistiques.developpement-durable.gouv.fr
- Späth, R., Flamming, H. C., & Wuertz, S. (1998). Sorption properties of biofilms. *Water Science and Technology*, 37(4–5), 207–210. [https://doi.org/10.1016/S0273-1223\(98\)00107-3](https://doi.org/10.1016/S0273-1223(98)00107-3)
- Spurgeon, D. J., Jones, O. A. H., Dorne, J. C. M., Svendsen, C., Swain, S., & Stürzenbaum, S. R. (2010). Systems toxicology approaches for understanding the joint effects of environmental chemical mixtures. *Science of the Total Environment*, 408(18), 3725–3734. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2010.02.038>
- Stadnicka, J., Schirmer, K., & Ashauer, R. (2012). Predicting concentrations of organic chemicals in fish by using toxicokinetic models. *Environmental Science and Technology*, 46(6), 3273–3280. <https://doi.org/10.1021/es2043728>
- Staeher, P., & Sand-Jensen, K. (2006). Seasonal changes in temperature and nutrient control of photosynthesis, respiration and growth of natural phytoplankton communities. *Freshwater Biology*, 51(2), 249–262. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2427.2005.01490.x>
- Stewart, T. J., Behra, R., & Sigg, L. (2015). Impact of chronic lead exposure on metal distribution and biological effects to periphyton. *Environmental Science & Technology*. <https://doi.org/10.1021/es505289b>
- Sura, S., Waiser, M., Tumber, V., & Farenhorst, A. (2012). Effects of herbicide mixture on microbial communities in prairie wetland ecosystems: A whole wetland approach. *Science of the Total Environment*, 435–436, 34–43. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2012.07.003>
- Sutherland, I. (2001). Biofilm exopolysaccharides: A strong and sticky framework. *Microbiology*, 147(1), 3–9. <https://doi.org/10.1099/00221287-147-1-3>
- Sutherland, I. W. (2001). The biofilm matrix - An immobilized but dynamic microbial environment. *Trends in Microbiology*, 9(5), 222–227. [https://doi.org/10.1016/S0966-842X\(01\)02012-1](https://doi.org/10.1016/S0966-842X(01)02012-1)
- Tadonlécé, R. D., LeBerre, B., Perreau, F., & Humbert, J. F. (2009). Responses of lake bacterioplankton activities and composition to the herbicide diuron. *Aquatic Toxicology*,

- 94(2), 103–113. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2009.06.005>
- Tang, J. X., Hoagland, K. D., & Siegfried, B. D. (1997). Differential toxicity of atrazine to selected freshwater algae. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, 59(4), 631–637. <https://doi.org/10.1007/s001289900526>
- Tasmin, R., Shimasaki, Y., Tsuyama, M., Qiu, X., Khalil, F., Okino, N., Yamada, N., Fukuda, S., Kang, I. J., & Oshima, Y. (2014). Elevated water temperature reduces the acute toxicity of the widely used herbicide diuron to a green alga, *Pseudokirchneriella subcapitata*. *Environmental Science and Pollution Research*, 21(2), 1064–1070. <https://doi.org/10.1007/s11356-013-1989-y>
- Thany, S. H., Reynier, P., & Lenaers, G. (2013). Neurotoxicity of pesticides: its relationship with neurodegenerative diseases. *Médecine Sciences: M/S*, 29(3), 273–278. <https://doi.org/10.1051/medsci/2013293013>
- Tissier, C., Morvan, C., Bocquené, G., & James, A. (2005). *Les substances prioritaires de la directive cadre sur l'eau (DCE)*. Institut Ifremer.
- Tlili, A., Bérard, A., Roulier, J. L., Volat, B., & Montuelle, B. (2010). PO43-dependence of the tolerance of autotrophic and heterotrophic biofilm communities to copper and diuron. *Aquatic Toxicology*, 98(2), 165–177. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2010.02.008>
- Tlili, A., Dorigo, U., Montuelle, B., Margoum, C., Carluer, N., Gouy, V., Bouchez, A., & Bérard, A. (2008). Responses of chronically contaminated biofilms to short pulses of diuron. An experimental study simulating flooding events in a small river. *Aquatic Toxicology*, 87(4), 252–263. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2008.02.004>
- Tlili, A., & Montuelle, B. (2011). Microbial Pollution-Induced Community Tolerance. In *Tolerance to Environmental Contaminants* (pp. 85–108).
- Tlili, A., Montuelle, B., Bérard, A., & Bouchez, A. (2011). Impact of chronic and acute pesticide exposures on periphyton communities. *Science of the Total Environment*, 409(11), 2102–2113. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2011.01.056>
- UE. (2013). *Directive 2013/39/UE du Parlement européen et du Conseil du 12 août 2013 modifiant les directives 2000/60/CE et 2008/105/CE en ce qui concerne les substances prioritaires pour la politique dans le domaine de l'eau*. *Journal officiel des Communautés européennes* du 24.8.2013 (JO L 226/1). (Vol. 2013). Retrieved from <http://eur-lex.europa.eu/LexUriServ/LexUriServ.do?uri=OJ:L:2013:226:0001:0017:FR:PDF>
- Vallotton, N., Eggen, R. I. L., Escher, B. I., Krayenbühl, J., & Chèvre, N. (2008). Effect of pulse herbicidal exposure on *Scenedesmus vacuolatus*: A comparison of two photosystem II inhibitors. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 27(6), 1399–1407. <https://doi.org/10.1897/07-197.1>
- Van Der Werf, H. M. G. (1996). Assessing the impact of pesticides on the environment. *Agriculture, Ecosystems and Environment*, 60(2–3), 81–96. [https://doi.org/10.1016/S0167-8809\(96\)01096-1](https://doi.org/10.1016/S0167-8809(96)01096-1)
- VanMeter, K. C., & Hubert, R. J. (2016). Chapter 10: Pharmacology. In *Microbiology for the*

- Healthcare Professional, 2nd Edition* (pp. 200–213). St. Louis, Missouri: Elsevier.
- Vercaene-Eairmal, M., Lauga, B., Saint Laurent, S., Mazzella, N., Boutry, S., Simon, M., Karama, S., Delmas, F., & Duran, R. (2010). Diuron biotransformation and its effects on biofilm bacterial community structure. *Chemosphere*, 81(7), 837–843. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2010.08.014>
- Villeneuve, A., Bouchez, A., & Montuelle, B. (2011). In situ interactions between the effects of season, current velocity and pollution on a river biofilm. *Freshwater Biology*, 2245–2259. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2427.2011.02649.x>
- Villeneuve, A., Montuelle, B., & Bouchez, A. (2010). Influence of slight differences in environmental conditions (light , hydrodynamics) on the structure and function of periphyton. *Aquatic Sciences*, 33–44. <https://doi.org/10.1007/s00027-009-0108-0>
- Villeneuve, A., Montuelle, B., & Bouchez, A. (2011). Effects of flow regime and pesticides on periphytic communities : Evolution and role of biodiversity. *Aquatic Toxicology Journal*, 102, 123–133. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2011.01.004>
- Wang, W., Wang, W., Zhang, X., & Wang, D. (2002). Adsorption of p-chlorophenol by biofilm components. *Water Research*, 36(3), 551–560. [https://doi.org/10.1016/S0043-1354\(01\)00267-6](https://doi.org/10.1016/S0043-1354(01)00267-6)
- Wellnitz, T., & Rader, R. B. (2003). Mechanisms influencing community composition and succession in mountain stream periphyton : interactions between scouring history , grazing , and irradiance. *Journal of the North American Benthology*, 22(4), 528–541.
- Wolfaardt, G. M., Lawrence, J. R., Robarts, R. D., & Caldwell, D. E. (1998). In situ Characterization of Biofilm Exopolymers Involved in the Accumulation of Chlorinated Organics. *Microbial Ecology*, 35(3), 213–223. Retrieved from <http://www.jstor.org/stable/4251561>
- Wolfstein, K., & Stal, L. J. (2002). Production of extracellular polymeric substances (EPS) by benthic diatoms: Effect of irradiance and temperature. *Marine Ecology Progress Series*, 236, 13–22. <https://doi.org/10.3354/meps236013>
- Yebra, D. M., Kiil, S., & Dam-Johansen, K. (2004). Antifouling technology - Past, present and future steps towards efficient and environmentally friendly antifouling coatings. *Progress in Organic Coatings*, 50(2), 75–104. <https://doi.org/10.1016/j.porgcoat.2003.06.001>
- Zhang, H., & Davison, W. (1995). Performance Characteristics of Diffusion Gradients in Thin Films for the in Situ Measurement of Trace Metals in Aqueous Solution. *Analytical Chemistry*, 67(19), 3391–3400. <https://doi.org/10.1021/ac00115a005>
- Zhang, L., Dong, D., Hua, X., & Guo, Z. (2018). Inhibitory effects of extracellular polymeric substances on ofloxacin sorption by natural biofilms. *Science of the Total Environment*, 625, 178–184. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2017.12.271>
- Zhang, P., Fang, F., Chen, Y.-P., Shen, Y., Zhang, W., Yang, J.-X., Li, C., Guo, J.-S., Liu, S.-Y., Huang, Y., Li, S., Gao, X., & Yan, P. (2014). Composition of EPS fractions from suspended sludge and biofilm and their roles in microbial cell aggregation. *Chemosphere*,

117(1), 59–65. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2014.05.070>

Annexes

8. Annexes

8.1. Annexe 1 : Préparation du milieu de culture Dauta

Pour 1L de milieu Dauta :

- 1mL de $\text{FeSO}_4, 7\text{H}_2\text{O}$ à 1g.L^{-1}
- 1mL de NaHCO_3 à 50g.L^{-1}
- 1mL de Na_2CO_3 à 5g.L^{-1}
- 1mL de $\text{MgSO}_4, 7\text{H}_2\text{O}$ à 25g.L^{-1}
- 1mL de $\text{CaCl}_2, 2\text{H}_2\text{O}$ à 25g.L^{-1}
- 3,6mL de $\text{Na}_2\text{SiO}_3, 9\text{H}_2\text{O}$ à $28,42\text{g.L}^{-1}$
- 1mL de KNO_3 à 200g.L^{-1}
- 1mL de K_2HPO_4 à 25g.L^{-1}
- 1mL d'une solution contenant les oligo-éléments suivants :
 - o $\text{ZnSO}_4, 7\text{H}_2\text{O}$ à 20mg.L^{-1}
 - o $\text{CuCl}_2, 2\text{H}_2\text{O}$ à 20mg.L^{-1}
 - o $\text{MnCl}_2, 4\text{H}_2\text{O}$ à 400mg.L^{-1}
 - o $\text{CoCl}_2, 2\text{H}_2\text{O}$ à 10mg.L^{-1}
 - o H_3BO_3 à 1mg.L^{-1}
 - o Na_2MoO_4 à 35mg.L^{-1}
- Compléter à 1L avec de l'eau distillée
- Ajuster le pH à 7,5-8 avec HCl

8.2. Annexe 2 : Résultats complémentaires de l'étude préliminaire

Dans le chapitre 3, lors de la présentation de l'étude préliminaire sur la cinétique d'accumulation du diuron dans le biofilm à long terme, tous les résultats n'ont pas été représentés car ils révélaient tous la même tendance. En effet, les résultats liés à la détermination du poids sec, au dosage des protéines, et à l'analyse des activités enzymatiques montrent tous une augmentation au cours du temps liée à la croissance du biofilm, mais aucun impact du diuron n'est observé (Figure 52, Figure 53, Figure 54, et Figure 55).

Dosage des protéines

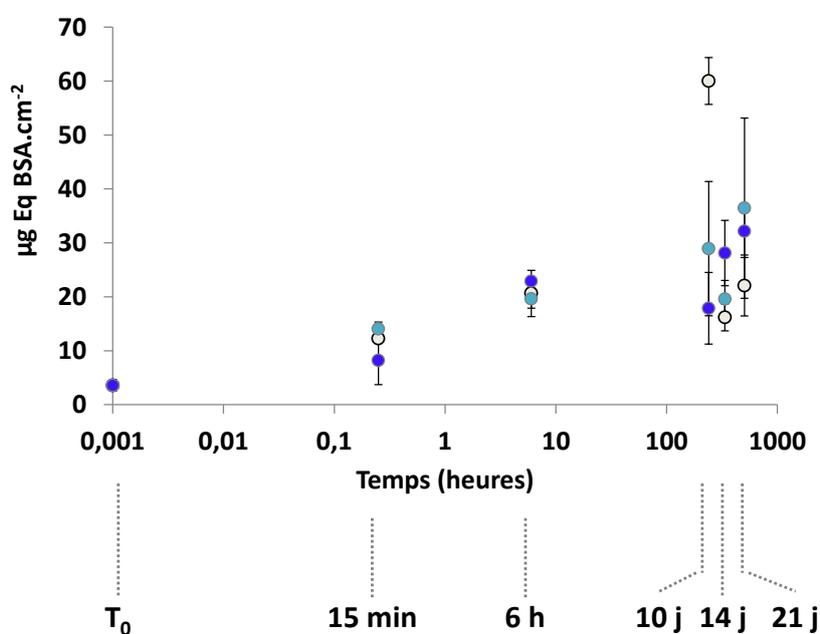


Figure 52: Concentration moyenne en protéines dans le biofilm exprimée en μg d'équivalent BSA. cm^{-2} avec les erreurs standards associées en fonction du temps d'exposition. Les points blancs sont les résultats obtenus pour la condition témoin, les points bleus clairs et foncés représentent ceux pour le biofilm exposé à 5 et 50 $\mu\text{g.L}^{-1}$ de diuron, respectivement.

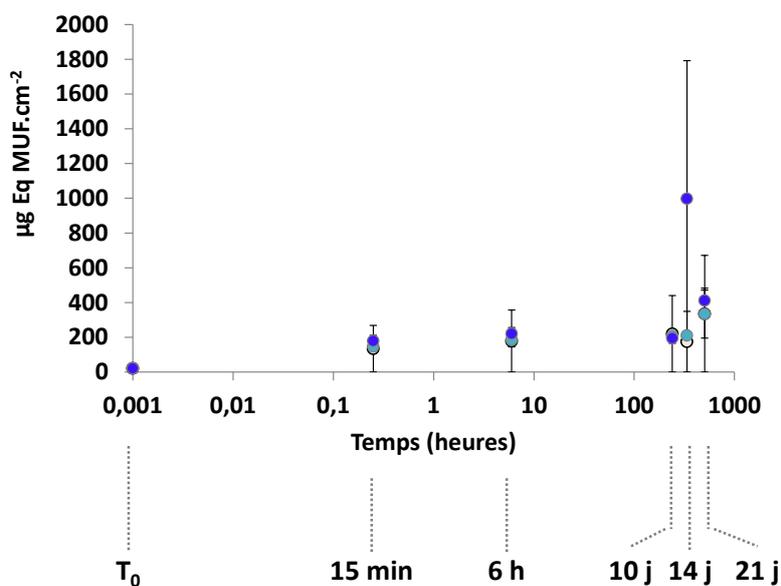
Mesure de l'activité de la β -glucosidase

Figure 53: Activité moyenne de la β -glucosidase dans le biofilm exprimée en μg d'équivalent MUF.cm⁻² avec les erreurs standards associées en fonction du temps d'exposition. Les points blancs sont les résultats obtenus pour la condition témoin, les points bleus clairs et foncés représentent ceux pour le biofilm exposé à 5 et 50 $\mu\text{g.L}^{-1}$ de diuron, respectivement.

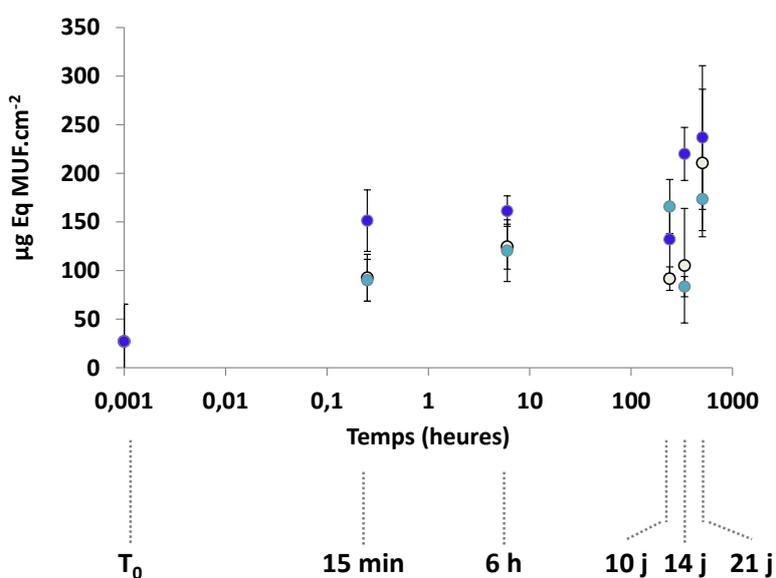
Mesure de l'activité de la β -glucosaminidase

Figure 54: Activité moyenne de la β -glucosaminidase dans le biofilm exprimée en μg d'équivalent MUF.cm⁻² avec les erreurs standards associées en fonction du temps d'exposition. Les points blancs sont les résultats obtenus pour la condition témoin, les points bleus clairs et foncés représentent ceux pour le biofilm exposé à 5 et 50 $\mu\text{g.L}^{-1}$ de diuron, respectivement.

Mesure du poids sec

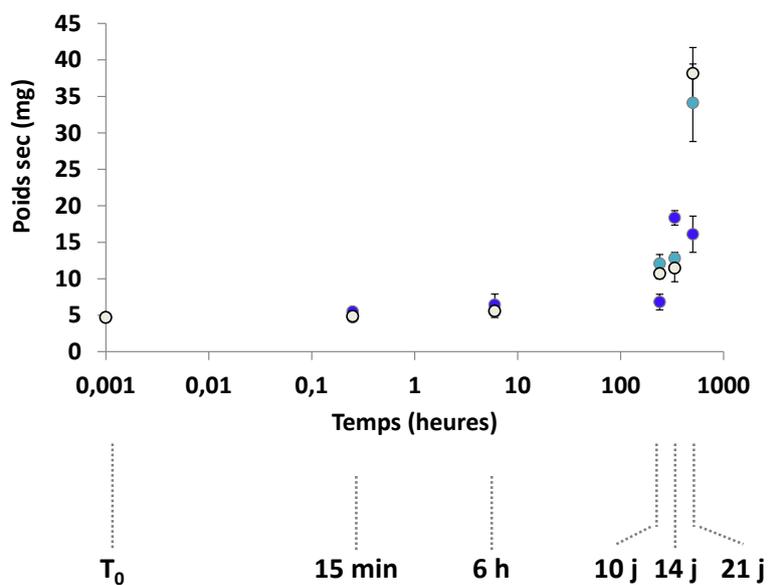


Figure 55: Moyenne des poids secs exprimés en mg avec les erreurs standards associées en fonction du temps d'exposition. Les points blancs sont les résultats obtenus pour la condition témoin, les points bleus clairs et foncés représentent ceux pour le biofilm exposé à 5 et 50 $\mu\text{g.L}^{-1}$ de diuron, respectivement.

8.3. Annexe 3 : Validation de la méthode d'extraction des EPS

8.3.1. Design expérimental

Afin de mieux comprendre les mécanismes de distribution et de transfert du diuron dans le biofilm, un protocole de séparation des différentes fractions du biofilm a été mis au point. Comme il a été vu dans le chapitre 1, le biofilm est composé d'une matrice EPS dont certaines de ces EPS sont faiblement liées aux microorganismes, et d'autres plus fortement liées. L'objectif de ce développement méthodologique a été de séparer physiquement les EPS faiblement liées et plus diffuses dans le milieu (D-EPS) des microorganismes auxquels sont attachées les EPS fortement liées (T-EPS-M).

Dans ce but, les développements ont été menés à partir d'un biofilm différencié selon le culot et le surnageant, chacun respectivement associé aux fractions T-EPS-M et D-EPS. Pour déterminer la validité de cette méthode, plusieurs descripteurs ont été mesurés (protéines, polysaccharides et activités enzymatiques hétérotrophes) sur ces deux fractions ainsi que sur le biofilm Total pour alors calculer le taux de recouvrement. L'objectif de la quantification des protéines et des polysaccharides est de déterminer la productivité générale du métabolisme du biofilm. La détermination des activités enzymatiques a pour but de vérifier la dégradation potentielle des enzymes et de mesurer la proportion de celles-ci transférées des D-EPS vers les T-EPS-M au cours du temps.

Pour ce faire, des lames de verre ont été mises à coloniser pendant un mois dans l'étang de Gazinet-Cestas. Puis 582 mg de biofilm ont été grattés dans 300 mL de milieu Dauta. Ces 300 mL ont ensuite été divisés de façon égale dans trois béchers pour obtenir trois répliqués. Les biofilms ont été mis à agiter à 150 RPM et des aliquotes ont été collectés à différents temps, soit après 30 min, une et trois heures d'agitation (*Figure 56*). Chacun de ces trois prélèvements a à nouveau été divisé en trois pour pouvoir être passés aux ultra-sons avec différents temps de sonication : sans sonication, deux fois dix secondes avec une minute de repos entre, et deux fois trente secondes avec une minute de repos entre. Enfin chacun de ces aliquotes ont été divisés en deux pour subir différentes vitesses de centrifugation (5000 et 12000 RPM) pendant 20 minutes.

À la suite de ces différentes étapes, le surnageant et le culot ont été collectés séparément. En parallèle, des aliquotes de biofilm ont été prélevés après l'étape d'agitation afin de servir de référence pour le calcul du taux de recouvrement (fraction Total). Pour chacun des échantillons obtenus (surnageant, culot et biofilm Total), les polysaccharides et les protéines ont été dosés, et l'activité de la β -glucosidase et de la β -glucosaminidase a été mesurée selon le protocole décrit dans le chapitre 2.

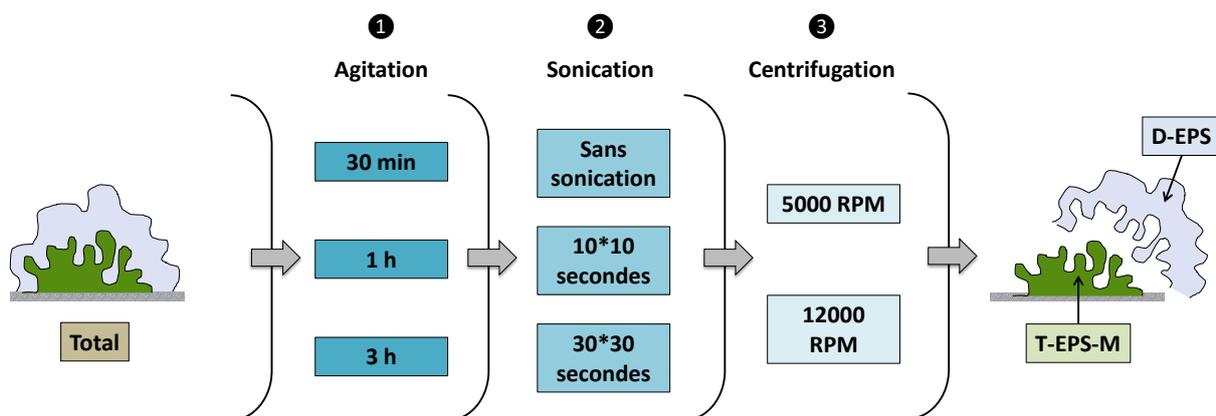


Figure 56: Représentation graphique du design expérimental pour le développement méthodologique

8.3.2. Caractérisation du biofilm et choix de la méthodologie

Pour chacun des analyses effectuées, les résultats associés aux échantillons de culot et de surnageant ont été confrontés à ceux issus de la fraction Total. Le taux de recouvrement, exprimé en pourcentage de la fraction total, a été calculé selon l'Equation 14

suivante :

Equation 14

$$\text{Taux de recouvrement} = \frac{(\text{Résultat}_{\text{culot}} + \text{Résultat}_{\text{surnageant}}) * 100}{\text{Résultat}_{\text{Total}}}$$

Le but de cette expérimentation étant de déterminer la méthodologie d'extraction des EPS la plus efficace, il a été décidé de considérer le protocole présentant le taux de recouvrement le

plus proche de 100 % comme étant le plus approprié. Dans le cas où ce taux dépasserait les 100 % par rapport à la fraction Total, il a été jugé plus pertinent de considérer en priorité ce taux par rapport à ceux étant inférieurs 100 %, les valeurs inférieures à 100 % indiquant une extraction incomplète. En effet, cette décision a été basée sur le principe de l'efficacité d'extraction.

Dosage des polysaccharides

Les résultats ont montré que le surnageant était très peu chargé en polysaccharides contrairement au culot (en moyenne $96,9 \pm 0,3$ % vs $3,1$ % pour le surnageant, sur le total calculé avec les deux fractions). Les données n'ont pas présenté de différences selon le temps de sonication ni la vitesse de centrifugation. Le taux de recouvrement a donc été calculé selon le temps d'agitation. Ici le taux le plus élevé est pour une agitation de 30 minutes (Figure 57).

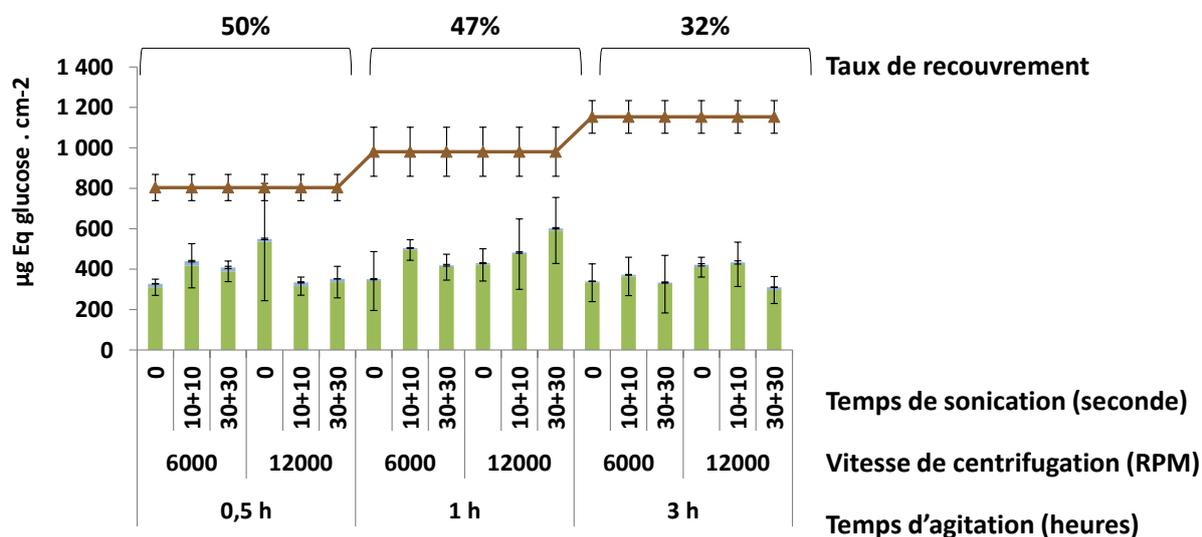


Figure 57: Moyenne de la quantité de polysaccharides avec les erreurs standards associées en fonction des différentes étapes d'extraction. Les points en marron représentent les résultats de la fraction Total, les lames en bleu ceux du surnageant et les lames en vert ceux du culot.

Mesure de l'activité de la β -glucosidase

Les données issues de la mesure de l'activité de la β -glucosidase ont rapporté une activité plus importante dans le surnageant que dans le culot ($59,2 \pm 1,1$ vs $40,8$ %). Comme pour le dosage des polysaccharides, les différents temps de sonication, et les différentes vitesses testés n'ont pas engendré de modulation sur les résultats, c'est pourquoi le calcul du taux de recouvrement a été basé sur le temps d'agitation. Pour cette analyse, les taux de recouvrement présentent d'importantes différences entre eux, jusqu'à 100 % (Figure 58). Dans le cas de l'activité de la β -glucosidase, le taux de recouvrement jugé comme étant le plus approprié a été celui associé à une agitation de 30 minutes.

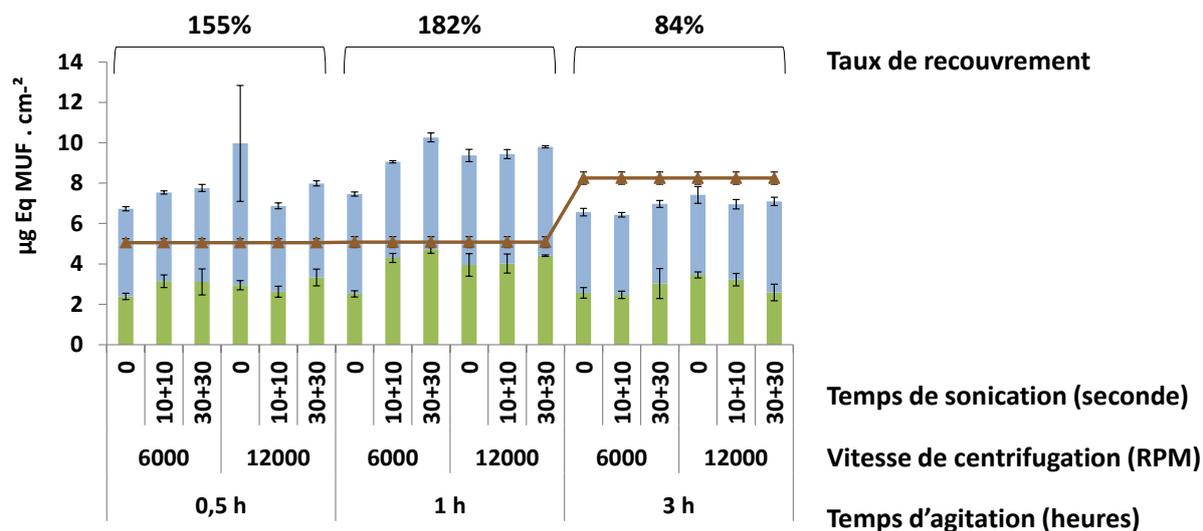


Figure 58: Moyenne de l'activité de la β -glucosidase avec les erreurs standards associées selon les différentes étapes d'extraction. Les points en marron représentent les résultats de la fraction Total, les lames en bleu ceux du surnageant et les lames en vert ceux du culot.

Mesure de la β -glucosaminidase

Les résultats obtenus suite à la mesure de l'activité de la β -glucosaminidase présentent des tendances semblables à celles de la β -glucosidase. En effet le surnageant représente en moyenne $57,1 \pm 1,2$ % contre 42,9 % pour le culot. Pour cette analyse, le taux recouvrement présentant la méthodologie la plus adaptée est lié à une agitation de 30 minutes (Figure 59).

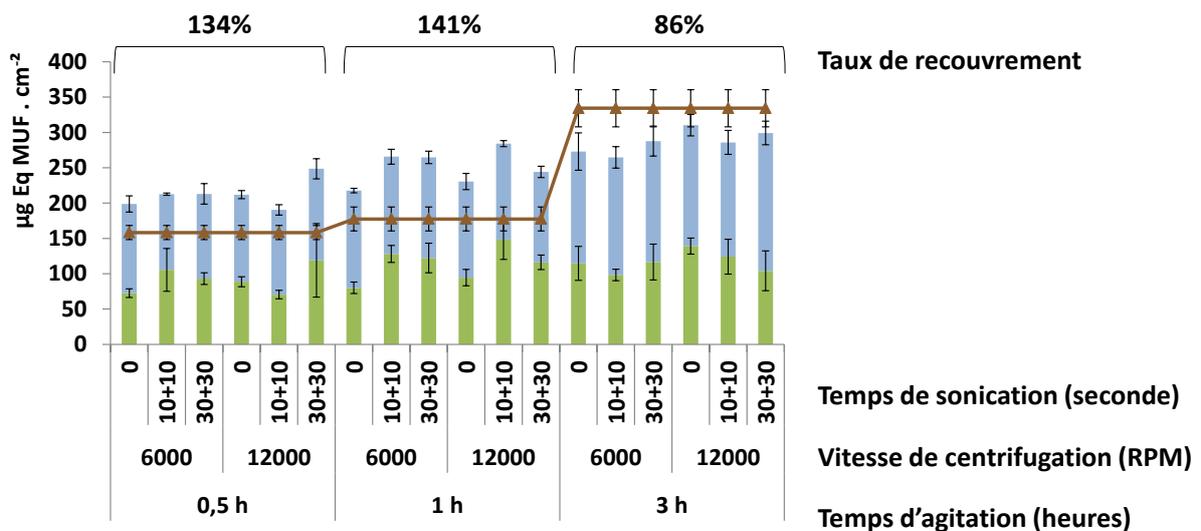


Figure 59: Moyenne de l'activité de la β -glucosaminidase avec les erreurs standards associées selon les différentes étapes d'extraction. Les points en marron représentent les résultats de la fraction Total, les barres en vert ceux du culot et les barres en bleu ceux du surnageant.

Suite à ces résultats, il a été établi que le temps de sonication et la vitesse de centrifugation n'avaient pas d'impact particulier sur la qualité de l'extraction des EPS. Cependant, de légères différences ont pu être notées par rapport au temps d'agitation. En effet, bien que pour cette étape d'extraction, une agitation de 30 minutes présente un taux de recouvrement supérieur à 100 % pour le dosage des activités enzymatiques extracellulaires, il démontre néanmoins une extraction plus complète. C'est pourquoi le protocole adopté grâce à ce développement méthodologique est le suivant : une agitation de 30 minutes, suivie de deux fois dix secondes de sonication avec une minute de repos entre et enfin une centrifugation pendant 20 minutes à 5000 RPM. Le temps de sonication et la vitesse de centrifugation ont été choisis dans un souci pratique compte tenu du matériel disponible. De plus, un temps

d'agitation de 30 min au lieu de 3 heures limite la désorption potentielle des pesticides du biofilm vers le milieu.

8.3.3. Calcul du pourcentage de désorption du diuron

Le développement de la méthodologie d'extraction des EPS a été réalisé sans contamination par les pesticides. Un des potentiels biais de cette méthode est la perte de contaminant dans le biofilm par désorption lors des étapes de sonication et de centrifugation. Pour vérifier l'ampleur de ce biais méthodologique et dans le but de considérer la perte potentielle de diuron au cours de ces étapes de fractionnement, les concentrations en diuron dans les échantillons de filtrats ont été comparés entre la fraction T-EPS-M (soit le culot) et la fraction Total. Pour rappel, le filtrat est collecté à la suite de la filtration sur Buchner des échantillons de biofilm destinés ensuite à la lyophilisation (2.2.1).

Dans un premier temps, ce phénomène a été vérifié lors de l'étude préliminaire sur la cinétique d'accumulation du diuron dans le biofilm à long terme (3.2). Pour ce faire, les concentrations en diuron retrouvées dans le filtrat ont été moyennées selon le temps et la concentration d'exposition et la fraction analysée. Puis le pourcentage entre ces moyennes pour chaque condition a été calculé, et à nouveau une moyenne a été réalisée sur l'ensemble de ces résultats. Au final, une différence entre les échantillons de culot (ayant subi les étapes de sonication et de centrifugation) et les échantillons de la fraction Total a été déterminée à hauteur de $17,0 \pm 9,8$ %. Ce taux est tout à fait acceptable car une erreur liée à la préparation inférieure à 20 % est tolérée, car elle est considérée comme non relative à la désorption (Huckins et al., 2006).

Dans un deuxième temps ce même calcul a été réalisé à partir des résultats obtenus au cours de l'étude portant sur les isothermes de sorption du diuron dans le biofilm (4.2). Le but cette fois a été de confirmer que cette désorption était négligeable quelle que soit la concentration d'exposition. La différence calculée a été de $2,8 \pm 1,8$ %, ce qui est tout à fait correct. Au vu de ces résultats, il est donc possible de négliger ce biais lié à la méthodologie.

8.3.4. Quantification du diuron dans les D-EPS

Lors de l'étude portant sur l'influence de la vitesse du courant sur la bioaccumulation du diuron dans le biofilm, il a été mis en évidence une différence d'accumulation entre les fractions T-EPS-M et Total sans la contrainte du courant, et c'est pourquoi, le diuron a été quantifié dans les D-EPS. Afin de comparer les données issues de la quantification du diuron dans le biofilm dans la fraction Total et T-EPS-M (exprimés en μg de diuron par g de poids sec par surface grattée) avec la fraction D-EPS (exprimés en μg de diuron par L d'échantillon), une conversion a dû être effectuée. En effet, les données relatives au biofilm et aux D-EPS ont été transformées en μg de diuron par échantillon. Ensuite le pourcentage de quantité de diuron dans les D-EPS par rapport aux quantités retrouvées dans la fraction Total et T-EPS-M a pu être déterminé. Au cours du temps, la proportion de diuron dans les D-EPS diminue quelle que soit la concentration d'exposition ou la fraction comparée (*Figure 60*). La tendance de cette diminution suit même l'allure d'une cinétique d'ordre 1, ce qui correspondrait aux résultats présentés dans la section 3.3. Aussi, une fois l'équilibre atteint, après deux heures d'exposition, pour toutes les concentrations d'exposition confondues, le pourcentage moyen de diuron dans les D-EPS par rapport à la fraction Total est de $7,5 \pm 3,6$ %. La différence calculée entre la concentration en diuron retrouvée dans la fraction Total et la fraction T-EPS-M était de $73,5 \pm 5,5$ %. Bien que le bilan de masse ne soit pas pleinement bouclé, l'addition du pourcentage retrouvé dans les fractions T-EPS-M et D-EPS s'élève à 81 % par rapport à la fraction Total.

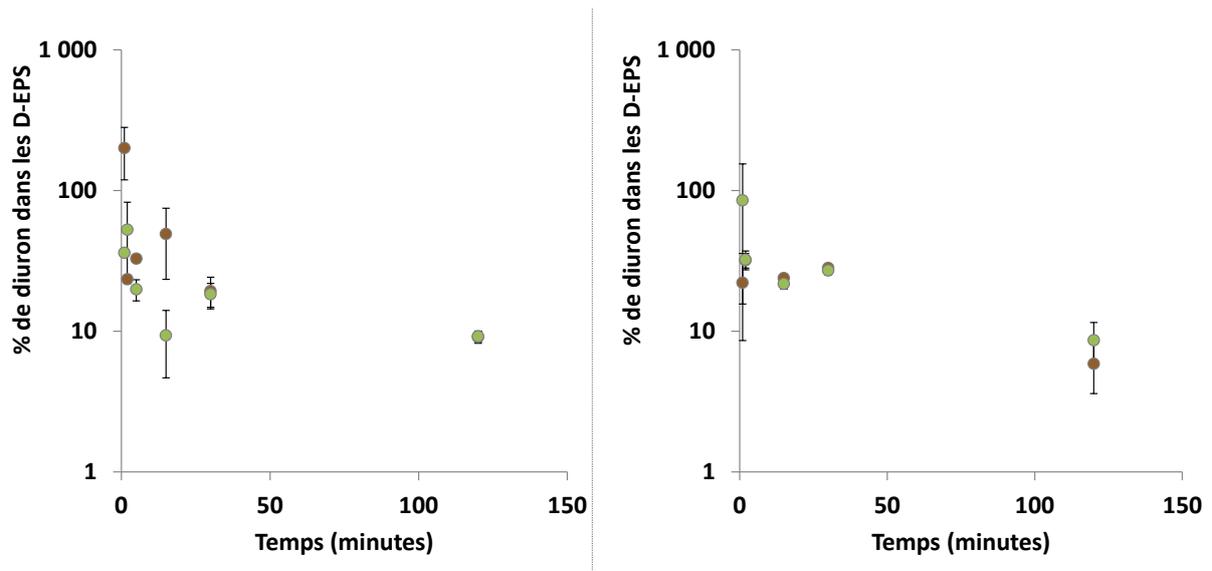


Figure 60: Moyenne des pourcentages du diuron retrouvé dans la fraction D-EPS avec les erreurs standards associées, par rapport à la fraction Total en marron et à la fraction T-EPS-M en vert pour une exposition à 5 $\mu\text{g.L}^{-1}$ de diuron à gauche et à 50 $\mu\text{g.L}^{-1}$ de diuron à droite.

8.3.5. Caractérisation du biofilm au travers des saisons

Au long de cette thèse, du biofilm a été mis à coloniser au cours de différentes saisons. Pour chaque expérimentation, le biofilm a été caractérisé sur plusieurs temps : un à la sortie de l'étang correspondant au T_0 , et de nombreux autres après différents temps d'exposition en canaux. Pour chaque temps, les proportions entre le surnageant (assimilé aux D-EPS) et le culot (assimilé au T-EPS-M) ont été calculées. Ces données ont été résumées dans le tableau ci-dessous (pour le culot) pour chaque échantillon à T_0 . Ces valeurs montrent que dans l'ensemble, le biofilm colonisé dans l'étang de Gazinet-Cestas présente toujours les mêmes proportions de protéines et de polysaccharides quelle que soit la période de l'année (Tableau 15). Dans ce compartiment, l'activité de la β -glucosaminidase reste constante au cours des saisons, en revanche, l'activité de la β -glucosidase dans la fraction T-EPS-M semble décroître entre l'automne et le printemps, au profit des D-EPS.

Tableau 15: Moyenne en pourcentage des descripteurs analysés dans le culot par rapport au Total avec les erreurs standards associées pour chaque expérimentation à T₀, avec la période de colonisation correspondante

Partie	Protéines (%)	Polysaccharides (%)	β-glucosaminidase (%)	β-glucosidase (%)	Période de colonisation
Cinétique (3.1)	100 ± 0,0	85,7 ± 0,5	93,1 ± 6,9	83,6 ± 15,3	12 Septembre – 17 Octobre 2016
Saison 1 (3.3)	100 ± 0,0	100 ± 0,0	94,9 ± 5,1	100 ± 0,0	16 Janvier – 13 Février 2017
Saison 2 (3.3)	100 ± 0,0	98,2 ± 1,1	92,8 ± 2,6	87,3 ± 2,6	23 Janvier – 20 Février 2017
Saison 3 (3.3)	100 ± 0,0	96,1 ± 0,6	91,2 ± 0,6	85,1 ± 1,0	30 Janvier – 27 Février 2017
Saison 4 (3.3)	99,8 ± 0,2	96,1 ± 0,2	96,1 ± 0,4	82,8 ± 1,2	6 Février – 6 Mars 2017
Flow (3.2)	79,1 ± 3,7	91,8 ± 0,8	98,4 ± 0,5	50,3 ± 3,0	21 Mars – 18 Avril 2017
LowFlow (3.2)	97,1 ± 2,1	91,4 ± 0,6	98,0 ± 0,3	65,0 ± 2,6	27 Mars – 24 Avril 2017

8.4. Annexe 4 : Protocole pour l'évaluation de la tolérance du biofilm en suspension

Dans le but de déterminer la tolérance du biofilm en suspension face au diuron, une expérimentation a été réalisée et dans laquelle le biofilm a été exposé à neuf concentrations croissantes de diuron.

Dans un premier temps, des lames de verre ont été déposées dans l'étang pendant un mois pour colonisation. Puis celles-ci ont été collectées puis grattées dans 300 mL de milieu Dauta, ce qui représente 14,51 cm² de biofilm gratté pour un mL. Une fois le biofilm remis en suspension, des aliquotes d'1 mL ont été collectés puis ont été exposés en triplicat à 1 mL de milieu Dauta contaminé, pour atteindre une concentration finale de : 0 – 1,1 – 3,5 – 11 – 35 – 111 – 350 – 1107 – 3500 µg.L⁻¹ de diuron. La suspension de biofilm a été exposée durant quatre heures à 20°C avec une lumière en continue. Enfin, l'activité photosynthétique a été mesurée au PhytoPAM comme décrit dans la section 2.2.3.2 pour chaque condition, ce qui a permis d'établir la CE₅₀.

8.5. Annexe 5 : Etude de terrain sur la commune de Marcillac (projet PhytoCOTE)

Contexte et méthodologie utilisée

Durant l'année 2017, quatre campagnes de terrain ont été réalisées sur la commune de Marcillac afin d'étudier les transferts des pesticides vers les milieux aquatiques. Le but étant de comprendre le lien entre les différents usages des pesticides sur une zone présentant une forte pression anthropique, et leur accumulation dans le premier maillon de la chaîne trophique : le biofilm. Pour ce faire, plusieurs sites ont été sélectionnés sur le bassin versant du Blayais, sur deux différents cours d'eau, les Souches, et la Livenne. Pour cette étude, cinq sites ont été étudiés en amont et en aval du ruisseau des Souches (Figure 61) au cours de quatre campagnes :

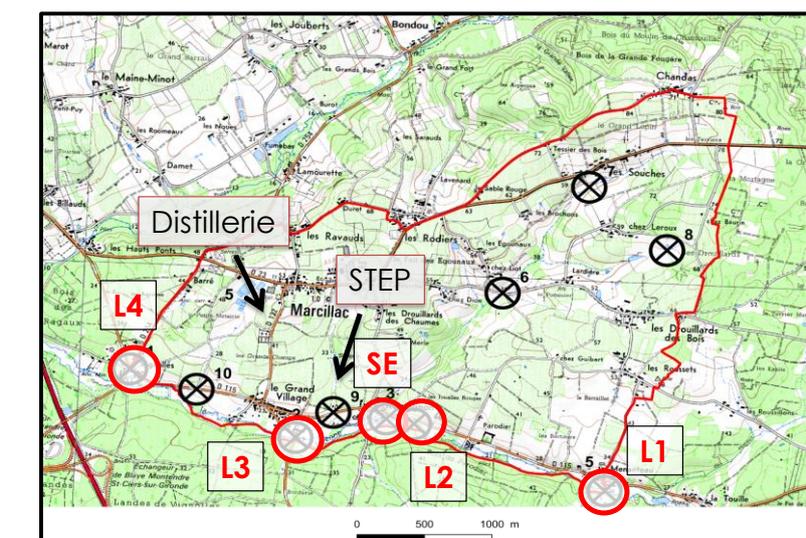
N°1 20 février – 20 mars

N°2 23 mai – 22 juin

N°3 28 juillet – 29 août

N°4 20 novembre – 19 décembre

- L1: Livenne à Menanteau
- L2: Livenne avant Reguignon
- L3: Livenne à Grand Village
- L4: Livenne à Vignolles
- SE: Souches à Reguignon



Aval ← Amont

Figure 61: Carte géographique de la commune de Marcillac et localisation des sites étudiés

Pour chacune des campagnes, des lames de verres vierges encagées ont été déposées pendant un mois pour la colonisation du biofilm. Après chaque période de colonisation, le biofilm a été gratté *in situ* puis les échantillons ont été préparés comme présenté dans la partie 2.3. Enfin les pesticides ont été quantifiés par HPLC (Thermo Fisher Scientific ultimate 3000)-MS/MS (Api2000 AB Sciex), et les données ont été retraitées grâce au logiciel Analyst. Les résultats ont ensuite été normalisés par le poids sec des biofilms et exprimés en $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$.

Résultats obtenus

Campagne N°1 : 20 février – 20 mars

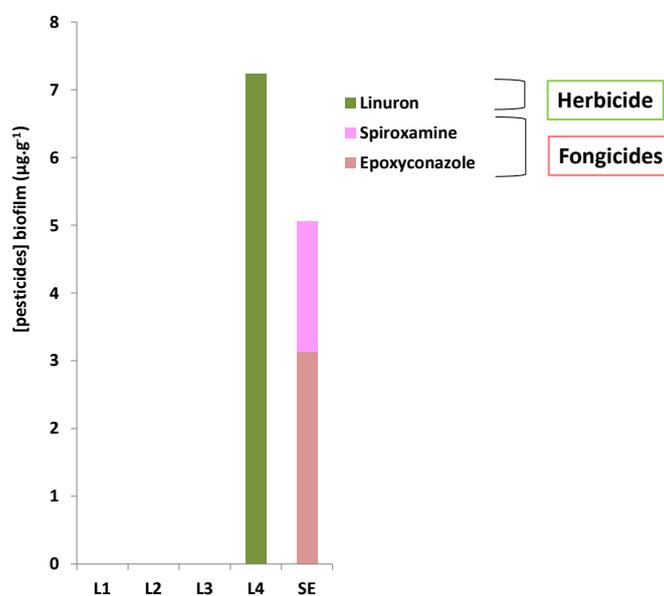


Figure 62: Concentration en pesticides retrouvés dans le biofilm en $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ en fonction des différents sites étudiés pour la campagne N°1

Campagne N°2 : 23 mai – 22 juin

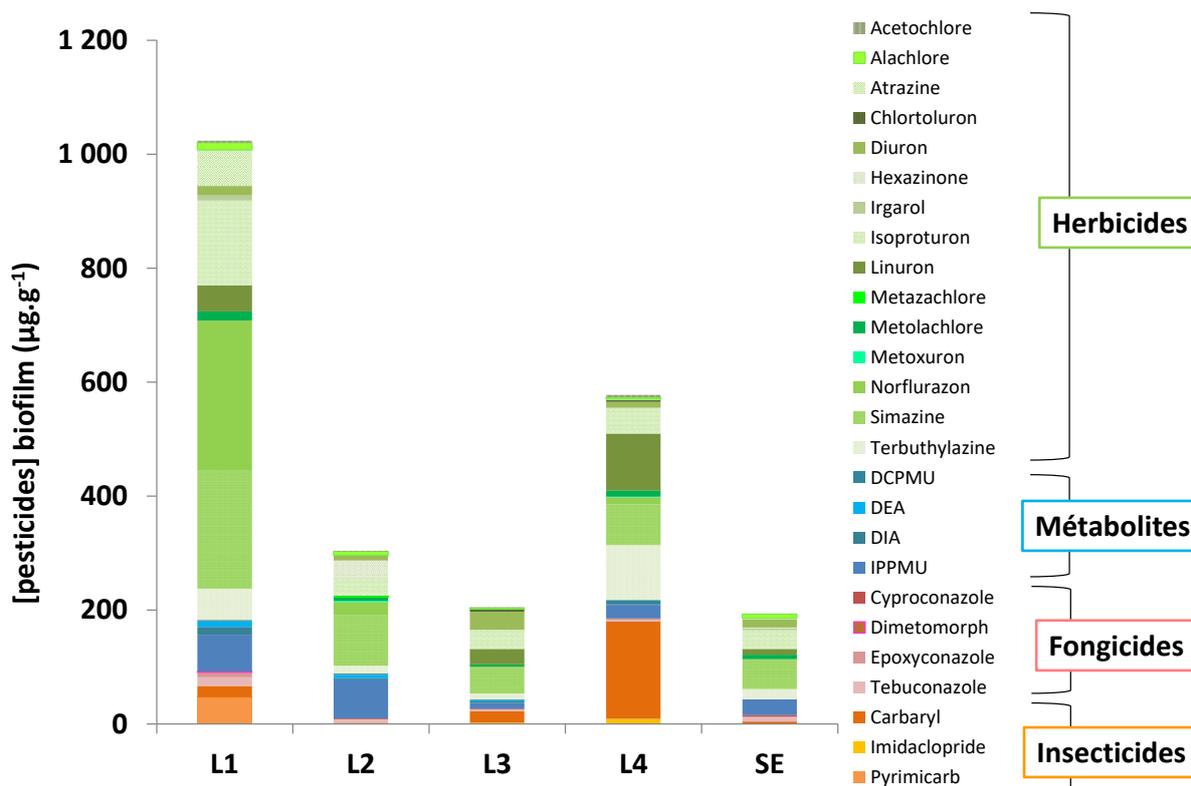


Figure 63: Concentration en pesticides retrouvés dans le biofilm en $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ en fonction des différents sites étudiés pour la campagne N°2

Campagne N°3 : 28 juillet – 29 août

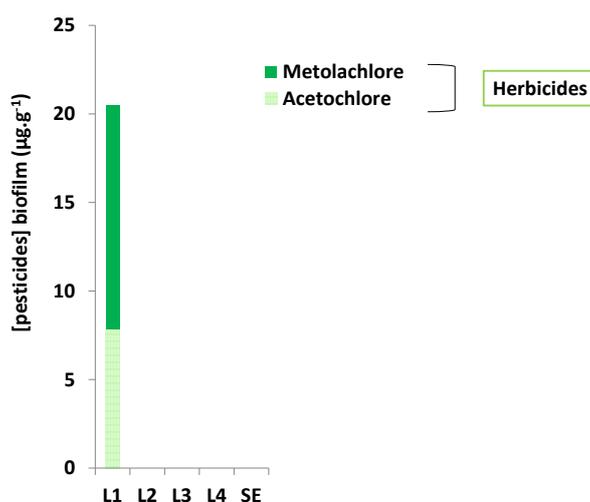


Figure 64: Concentration en pesticides retrouvés dans le biofilm en $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ en fonction des différents sites étudiés pour la campagne N°3

Campagne N°4 : 20 novembre – 19 décembre

Sur cette période, aucun pesticide n'a été quantifié.

Bilan des résultats de terrain

Sur cette étude de terrain, les résultats ont montré que les pesticides ne sont pas toujours quantifiés selon la saison considérée. Au cours de la première campagne terrain (du 20 février au 20 mars 2017), seuls trois pesticides ont été quantifiés (de l'ordre du $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$) dont deux fongicides et un herbicide (*Figure 62*). Lors de la seconde (du 23 mai au 22 juin 2017), 26 pesticides ont été retrouvés dans les biofilms à hauteur du $\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$. Parmi eux ont été quantifié en majorité des herbicides (entre 62 et 82 %), alors que les fongicides représentent entre 1 et 6 % des composés détectés (*Figure 63*). Pour la troisième campagne (du 28 juillet au 29 août 2017), seulement deux herbicides ont été quantifiés à hauteur au total de $20 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ (*Figure 64*). En revanche, aucun pesticide n'a été détecté lors de la dernière campagne terrain du 20 novembre au 19 décembre 2017. Ces résultats de bioaccumulation dans les biofilms sont cohérents avec les périodes d'utilisation de ces composés. En revanche, très peu de fongicides ont été détectés au cours de cette année, alors que l'usage majoritaire des pesticides sur les vignes est relatif aux fongicides pour le traitement des maladies telles que le mildiou et l'oïdium.

Valorisations scientifiques

9. Valorisations scientifiques

Article publié

- Betty Chaumet, Soizic Morin, Sebastien Boutry, Nicolas Mazzella, Diuron sorption isotherms in freshwater biofilms (*Science of the Total Environment*, 2019)

Articles acceptés

- Betty Chaumet, Soizic Morin, Océane Hourtané, Joan Artigas, Brigitte Delest, Mélissa Eon, Nicolas Mazzella, Flow conditions influence diuron toxicokinetics and toxicodynamics in freshwater biofilms (*Science of the Total Environment*, accepté avec révisions)
- Soizic Morin, Betty Chaumet, Nicolas Mazzella, A time-dose-response model to assess diuron-induced photosynthesis inhibition in freshwater biofilms (*Frontiers in Environmental Sciences*, accepté)

Articles en preparation

- Betty Chaumet, Nicolas Mazzella, Julie Neury-Ormanni, Soizic Morin, Light and temperature influence on diuron bioaccumulation on biofilms and its metabolism
- Chloé Bonnineau, Joan Artigas, Betty Chaumet, Aymeric Dabrin, Juliette Faburé, Benoît Ferrari, Jérémie Lebrun, Christelle Margoum, Nicolas Mazzella, Cécile Miege, Soizic Morin, Stéphane Pesce, Emmanuelle Uher, Marc Babut, Role of biofilms in pollutant bioaccumulation and trophic transfer in aquatic ecosystems: current state of knowledge and challenges

Communications orales

- Betty Chaumet, Nicolas Mazzella, Marion Bernard, Soizic Morin, « Etude de la bioaccumulation des pesticides dans les biofilms de rivière : Terrain PhytoCOTE », au LabEx Day (20 septembre 2018) à Bordeaux (France)
- Julie Neury-Ormanni, Caroline Doose, Floriane Demailly, Betty Chaumet, Nicolas Mazzella, Nabil Majdi, Jacky Vedrenne, Walter Traunspurger, Soizic Morin, « Des diatomées au menu ! Préférences gastronomiques de larves de chironomes, et impact d'une contamination toxique » au 37^{ème} Colloque de l'Association des Diatomistes de Langue Française (ADLaF), (11-13 septembre 2018) à Meise (Belgique)
- Betty Chaumet, Soizic Morin, Sébastien Boutry, Nicolas Mazzella, "Diuron sorption isotherms in freshwater biofilms" au 28^{ème} meeting annuel de la société de toxicologie et chimie environnementale (SETAC), (13-17 mai 2018) à Rome (Italie) (Poster highlight)
- Julie Neury-Ormanni, Caroline Doose, Betty Chaumet, Nicolas Mazzella, Nabil Majdi, Jacky Vedrenne, Soizic Morin, Walter Traunspurger, "Selective grazing behaviour of chironomids between three microalgal species under pesticide pressure" au 28^{ème} meeting annuel de la société de toxicologie et chimie environnementale (SETAC), (13-17 mai 2018) à Rome (Italie)
- Betty Chaumet, Nicolas Mazzella, Soizic Morin, « Distribution et transfert des pesticides dans les biofilms en lien avec les effets toxiques associés », au 1^{er} colloque de la journée des doctorants de l'école doctorale Sciences et Environnements, à Bordeaux (France)
- Betty Chaumet, Nicolas Mazzella, Marion Bernard, Soizic Morin, « Etude de la bioaccumulation des pesticides dans les biofilms de rivière : Terrain PhytoCOTE », à l'assemblée générale sur le projet PhytoCOTE du LabExCOTE (4 avril 2018) à Bordeaux (France)
- Betty Chaumet, Soizic Morin, Océane Hourtané, Joan Artigas, Sebastien Boutry, Mélissa Eon, Nicolas Mazzella, "Transfer and distribution of diuron in biofilm and joint toxic effects" à la 1^{ère} conférence internationale d'écotoxicologie microbienne (21-24 novembre 2017) à Lyon (France)
- Julie Neury-Ormanni, Jacky Vedrenne, Gwilherm Jan, Betty Chaumet, Mélissa Eon, Soizic Morin, "Changes in periphytic community induced by environmental exposure to diuron and/or imidacloprid depends on seasonal variations", à la 1^{ère} conférence

internationale d'écotoxicologie microbienne (EcotoxicoMic) (21-24 novembre 2017) à Lyon (France)

- Betty Chaumet, Marion Bernard, Aurélie Moreira, Soizic Morin, Nicolas Mazzella, "Diuron uptake by microbial biofilms" à la 9^{ème} conférence européenne sur les pesticides et les micropolluants organiques persistants dans l'environnement, et au 15^{ème} Symposium sur la chimie et le devenir des pesticides contemporains (4-7 octobre 2016) à Saint Jacques de Compostelle (Espagne)
- Betty Chaumet, Marion Bernard, Aurélie Moreira, Nicolas Mazzella, Soizic Morin, "Transfert du diuron dans les biofilms fluviaux : constantes d'accumulation et de distribution dans la matrice, puis impacts toxiques associés" au congrès de la société française d'écotoxicologie fondamentale et appliquée (SEFA) (29-30 juin 2016) à Reims (France)
- Betty Chaumet, Marion Bernard, Aurélie Moreira, Nicolas Mazzella, Soizic Morin, "Transfert du diuron dans les biofilms fluviaux : constantes d'accumulation et de distribution dans la matrice, puis impacts toxiques associés", au congrès de la société française des pesticides (GFP) (17-19 mai 2016) à Bordeaux (France)

Communications affichées

- Soizic Morin, Betty Chaumet, Nicolas Mazzella, "Assessing diuron short-term effects on biofilms using time-response curves", à la 1^{ère} conférence internationale d'écotoxicologie microbienne (EcotoxicoMic) (21-24 novembre 2017) à Lyon (France)
- Betty Chaumet, Nicolas Mazzella, Marion Bernard, Aurélie Moreira, Soizic Morin, "Diuron uptake by microbial biofilms" au 27^{ème} meeting annuel de la société de toxicologie et chimie environnementale (SETAC) (6-11 mai 2017) à Bruxelles (Belgique)