



HAL
open science

Effets interactifs du chlorure de benzalkonium et de la lumière nocturne sur les biofilms aquatiques

Romain Vrba

► **To cite this version:**

Romain Vrba. Effets interactifs du chlorure de benzalkonium et de la lumière nocturne sur les biofilms aquatiques. Sciences de l'environnement. 2021. hal-03318079

HAL Id: hal-03318079

<https://hal.inrae.fr/hal-03318079>

Submitted on 9 Aug 2021

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.

Rapport de Stage

*Effets interactifs du chlorure de
benzalkonium et de la lumière nocturne sur
les biofilms aquatiques.*

Responsable de stage : Soizic Morin

Enseignant référent : Agnès Feurtet-Mazel

Rapporteur : Claude Fortin

Romain Vrba

MASTER EXCE-PARCOURS MOBBIDIQ

Remerciements

J'aimerais tout d'abord remercier Soizic Morin pour son encadrement et son accompagnement exceptionnel le long de ces 6 mois de stage. Merci de toujours avoir pris le temps d'écouter et de répondre à mes questions, de m'avoir fait confiance, de m'avoir laissé la liberté de m'exprimer et de modeler ce sujet de stage et surtout de m'avoir poussé à aller jusqu'à pouvoir présenter mes résultats lors d'un colloque scientifique. C'était une expérience vraiment enrichissante que je ne pensais pas vivre pendant ce stage. Merci également pour m'avoir fait découvrir cet univers passionnant (et si complexe) que représente les biofilms et plus généralement l'univers de la recherche en écotoxicologie aquatique.

J'aimerais également remercier toute la « Team BAC 12 » du labo qui m'a accompagné le long de ce projet et pour toutes les analyses. Aurélie qui a eu la patience de m'accompagner et de m'aider au travers de tous ces calculs de dilutions, ces problèmes avec la LC et de tout le traitement des données de lipido. Mélissa pour son accompagnement et son aide précieuse pour toutes les extractions et dosages des pigments. Et un merci général à tous les autres pour tous ces bons moments et ces discussions enrichissantes.

J'aimerais également remercier Gwilherm pour m'avoir aidé avec le montage des canaux et pour avoir amené toute ton expertise et ton ingéniosité pour cette semaine de bricolage.

Enfin, merci à tout le groupe de stagiaires. Amélie, Anaïs, Lucas, Manon et ceux qui ont été de passage moins longtemps sans qui ce stage n'aurait pas été le même. Merci pour toutes ces discussions improbables, ces débats, ces rigolades et ces fous rires pendant les pauses de midi. Le fait est que qu'on va manquer aux Michels de l'étang !

Table des matières

LISTE DES FIGURES	3
LISTE DES TABLEAUX.....	3
I- INTRODUCTION	4
II- ANALYSE BIBLIOGRAPHIQUE.....	5
2.1- LES BIOCIDES	5
2.1.1- <i>Présentation et applications</i>	5
2.1.2- <i>Réglementation</i>	6
2.2- LE CHLORURE DE BENZALKONIUM.....	7
2.2.1- <i>Présentation et application</i>	7
2.2.2- <i>Situation environnementale actuelle</i>	8
2.2.3- <i>Toxicité</i>	10
2.3- ARTIFICIAL LIGHT AT NIGHT (ALAN)	12
I- MATERIELS ET METHODES	14
3.1- DEVELOPPEMENT ET MATURATION DU BIOFILM	14
3.2- EXPERIENCE PRELIMINAIRE	14
3.3- MONTAGE DES CANAUX ET SUIVI DES PARAMETRES	14
3.4.- ANALYSES DES ECHANTILLONS D'EAU	16
3.4.1.- <i>Mesures des nutriments et des ions majeurs</i>	16
3.4.2.- <i>Contamination et suivi de la concentration en BAC 12</i>	17
3.5- ANALYSES DU BIOFILM	18
3.5.1- <i>Mesures d'efficacité photosynthétique et de fluorescence de la chlorophylle a</i>	18
3.5.2- <i>Dénombrements en microscopie optique</i>	19
3.5.3- <i>Analyse des pigments photosynthétiques</i>	19
3.5.4- <i>Approche lipidomique</i>	19
3.6- ANALYSE STATISTIQUES	20
II- RESULTATS	21
4.1- EXPERIENCE PRELIMINAIRE	21
4.2- PARAMETRES MAJEURS ET CONTAMINANT	22
4.3- ALTERATIONS DIRECTES AU METABOLISME	23
4.3.1- <i>Effets sur l'efficacité photosynthétique</i>	23
4.3.2- <i>Effets sur la qualité des pigments photosynthétique</i>	24
4.4- EFFETS SUR LA COMMUNAUTE ALGALE DU BIOFILM	25
4.5- EFFETS SUR LES CLASSES LIPIDIQUES	27
III- DISCUSSION	28
5.1- CONDITIONS EXPERIMENTALES ET CONTAMINATION	28
5.2- EFFET DU BAC 12 SUR LES BIOFILMS	28
5.3- EFFET DE LA LUMIERE ARTIFICIELLE NOCTURNE	29
IV- CONCLUSION ET PERSPECTIVES	31
BIBLIOGRAPHIE	32
ANNEXES :	35
ANNEXE 1	35
ANNEXE 2	35
ANNEXE 3	36

Liste des figures

FIGURE 1: MARCHE DES BIOCIDES EN EUROPE, PAR APPLICATION, 2012-2022 (EN MILLIONS DE DOLLARS)	6
FIGURE 2: CHLORURE DE DODECYLBENZYLDMETHYLAMMONIUM	7
FIGURE 3: PART DES SUBSTANCES ACTIVES DANS LES DESINFECTANTS CONSEILLES PAR L'EPA CONTRE LE COVID (HORA ET AL. 2020) .	8
FIGURE 4: MECANISME DE DEGRADATION DU BAC PAR LA BACTERIE AEROMONAS HYDROPHILA (PATRAUCHAN AND ORIEL 2003) ...	9
FIGURE 5 : LE NORD-OUEST EUROPEEN DE NUIT, PHOTO PRISE A BORD DE L'ISS, NASA JOHNSON SPACE CENTER (HTTPS://EOL.JSC.NASA.GOV)	12
FIGURE 6: PHOTOS DU MONTAGE DE COLONISATION DU BIOFILM.....	14
FIGURE 7: SCHEMA RECAPITULATIF DU MONTAGE EXPERIMENTAL EN CANAUX ARTIFICIELS	15
FIGURE 8: PHOTOS DU MONTAGE EXPERIMENTAL EN CANAUX ARTIFICIELS	15
FIGURE 9 : SCHEMA EXPLICATIF DU SYSTEME HPLC-MS/MS « TRIPLE QUADRIPOLE »	17
FIGURE 10: COURBE DOSE-REONSE DU BAC 12 SUR L'ACTIVITE PHOTOSYNTHETIQUE PENDANT UNE PERIODE DE 4H.	21
FIGURE 11: EVOLUTION DE LA CONCENTRATION DE BAC 12 DANS LE MILIEU EN MG/L. PA = PHOTOPERIODE ALTERNEE ET PC = PHOTOPERIODE CONTINUE	22
FIGURE 12: EVOLUTION DE L'EFFICACITE PHOTOSYNTHETIQUE DANS LES CANAUX TEMOINS.	23
FIGURE 13: EVOLUTION DE L'EFFICACITE PHOTOSYNTHETIQUE DANS LES CANAUX CONTAMINES.	23
FIGURE 14: PHOTOGRAPHIE DES OBSERVATIONS MICROSCOPIQUES DES CHLOROPLASTES. A GAUCHE, UN ECHANTILLON NON CONTAMINE ET A DROITE UN ECHANTILLON CONTAMINE AU BAC 12.	24
FIGURE 15: EVOLUTION DES PIGMENTS CHLOROPHYLLIENS DANS LES CANAUX TEMOINS.	24
FIGURE 16: EVOLUTION DES PIGMENTS CHLOROPHYLLIENS DANS LES CANAUX CONTAMINES.	25
FIGURE 17: REPRESENTATION DE LA MORTALITE DES DIATOMEES EN POURCENTAGE DANS LES ECHANTILLONS UTILISES POUR LES ANALYSES PHOTOSYNTHETIQUES.	25
FIGURE 18: DISTRIBUTION TAXONOMIQUE EN POURCENTAGE DES DIFFERENTES ESPECES DANS LES ECHANTILLONS DE BIOFILM UTILISES POUR LES ANALYSES D'ACTIVITE PHOTOSYNTHETIQUE. EN HACHURE LES ECHANTILLONS AYANT ETE EXPOSES A UNE PHOTOPERIODE CONTINUE ET EN BARRES PLEINES CEUX AYANT ETE EXPOSES A UNE PHOTOPERIODE ALTERNEE.	26
FIGURE 19: DISTRIBUTION EN POURCENTAGE DES DIFFERENTES CLASSES DE PHOSPHOLIPIDES DANS LES ECHANTILLONS. PE : PHOSPHATIDYLETHANOLAMINE. PG : PHOSPHATIDYLGLYCEROL. PC : PHOSPHATIDYLCHOLINE	27

Liste des tableaux

TABEAU 1: REPARTITION ET IDENTIFICATION DES TYPES DE PRODUITS BIOCIDES	5
TABEAU 2: PROPRIETES PHYSICO-CHIMIQUES DU BAC 12 (ABBOTT ET AL. 2020); (DAULL ET AL. 2014)	7
TABEAU 3: EXEMPLE DE CONCENTRATIONS RETROUVEES EN STEP ET SORTIE DE STEP.	9
TABEAU 4: LIMITES DE QUANTIFICATIONS (LQ) DES DIFFERENTS IONS PAR CHROMATOGRAPHIE IONIQUE.....	16
TABEAU 5: GRADIENT UTILISE POUR L'ANALYSE DES PHOSPHOLIPIDES.	20
TABEAU 6: TABLEAU RECAPITULATIF DES MESURES D'IONS DANS LES DIFFERENTS CANAUX (MOYENNES ± ERREUR STANDARD). CTRL= CANAUX TEMOINS; CONT= CANAUX CONTAMINES; PN= PHOTOPERIODE ALTERNEE; PC = PHOTOPERIODE CONTINUE.....	22

I- Introduction

A l'heure actuelle, les biocides sont utilisés dans de très nombreux secteurs d'activités. On en retrouve par exemple en agriculture, dans l'agro-alimentaire, les soins personnels, les produits ménagers et les produits pharmaceutiques. Dans la plupart de ces domaines ces produits sont indispensables et difficilement remplaçables. Le marché européen des biocides est en pleine expansion, et devrait atteindre 11,9 milliards de dollars en 2022.

L'un des surfactants cationiques les plus manufacturés et utilisés dans les produits de désinfection, les produits de soins ou encore les détergents est le chlorure de benzalkonium (BAC) et plus précisément le chlorure de dodécylbenzyltriméthylammonium (Madsen et al. 2001), comportant une chaîne carbonée de 12 carbones (BAC 12).

Le mode d'action toxique du BAC 12 seul ou en mélange a fait l'objet de nombreuses études durant les deux dernières décennies (Beveridge et al. 1998, Pérez et al. 2009, Antunes et al. 2016, Sreevidya et al. 2018). Sa toxicité repose sur l'attaque des membranes lipidiques des cellules qui entraîne, en cas d'exposition trop forte, la lyse de la cellule. Avec la récente arrivée du SARS-CoV-2 dans notre quotidien, l'utilisation massive des désinfectants utilisant le BAC 12 comme agent actif pourrait entraîner une augmentation future de ce dernier dans les compartiments environnementaux, du fait d'un abattement incomplet en sortie de station d'épuration. De plus, certaines études ont pu démontrer que le BAC a un impact néfaste sur divers organismes non-cibles, par exemple la photosynthèse et la production de chlorophylle *a* chez les cellules végétales (Pérez et al. 2009). Il a également été prouvé que l'exposition à un stress lumineux pouvait augmenter ces effets néfastes (Pozo-Antonio et Sanmartín 2018).

Or, la lumière est l'un des stress anthropiques qui s'impose comme une source de perturbation pour les organismes périphytiques (Grubisic et al. 2017). En effet, les écosystèmes aquatiques côtiers sont fortement perturbés par la lumière artificielle de nuit (ALAN) (Maggi et Serôdio 2020), bousculant les cycles photosynthétiques des organismes et donc leur fonctionnement métabolique.

L'objectif du stage réalisé à INRAE au premier semestre 2021 est donc d'étudier les effets individuels et conjugués du BAC 12 et de l'illumination nocturne sur les biofilms de rivières. Dans un premier temps, la méthode de quantification par LC-MS/MS du BAC 12 a été développée. En parallèle, des biofilms, en suspension, ont été exposés à court terme à des concentrations croissantes de BAC, dans des conditions d'exposition lumineuse continue pour obtenir les courbes doses-réponses de notre biofilm au contaminant. Enfin, des biofilms naturels ont été exposés pendant 10 jours à un stress lumineux continu et/ou à une concentration de BAC 12 provoquant des effets (d'après les résultats des expériences dose-réponse précédemment obtenus), afin d'en caractériser les effets sur la photosynthèse, la composition taxonomique, la production de biomasse, et les profils lipidiques des biofilms, renseignant sur les possibles répercussions directes (synthèse des lipides) et indirectes (changements de composition dans les communautés de microorganismes) en lien avec leur qualité nutritive. Dans un second temps (séjour à venir à l'INRS-ETE), l'impact d'une telle co-exposition sur une chaîne alimentaire simplifiée (i.e. exposition de brouteurs à du biofilm pré-exposé) sera évalué afin de révéler un possible transfert de contaminant et une modification potentielle de la composition en acides gras des consommateurs. Dans l'ensemble ces travaux visent à identifier des biomarqueurs d'altération(s) spécifique(s) candidats pour la surveillance de l'impact de ces stress sur les communautés microbiennes aquatiques.

II- Analyse bibliographique

2.1- Les biocides

2.1.1- Présentation et applications

Les biocides englobent, par définition, toute substance ou mélange de substances dont l'action principale est de détruire, repousser ou limiter la prolifération d'organismes tels que les bactéries, algues, champignons, insectes ou encore oiseaux par une action chimique ou biologique. Ils peuvent à la fois être des produits de synthèse mais également provenir de source naturelle. C'est aujourd'hui l'objet de nombreuses recherches récentes qui pourraient permettre de trouver dans des molécules naturelles tel que les phéromones, une alternative aux biocides de synthèse (Heuskin et al. 2011).

On divise généralement les biocides en 4 groupes eux-mêmes divisés en 22 types de produits (TP).

Tableau 1: Répartition et identification des types de produits biocides

Groupe 1	Les désinfectants (TP 1 à 5)	<ul style="list-style-type: none">○ Produits d'hygiène humaine/vétérinaire○ Désinfectants de surface○ Désinfection d'eau potable
Groupe 2	Les produits de protection (TP 6 à 13)	<ul style="list-style-type: none">○ Matériaux de construction○ Revêtements anti-biofilm○ Fluides de travail du métal
Groupe 3	Les produits de lutte contre les nuisibles (TP 14 à 20)	<ul style="list-style-type: none">○ Rodenticides, avicides, fongicides, bactéricides, virucides etc...
Groupe 4	Autres produits biocides (TP 21-22)	<ul style="list-style-type: none">○ Produits anti salissure○ Fluides d'embaumement et de taxidermie

Le marché des biocides est très conséquent et connaît une croissance importante depuis le début des années 2010 (voir *Figure 1*). Les trois domaines majoritaires dans l'utilisation des biocides sont : le traitement de l'eau avec notamment l'utilisation de produits algicides pour l'entretien des piscines mais surtout pour leur utilisation dans les processus de traitement de l'eau potable, la préservation de nourriture et les produits de soins corporels.

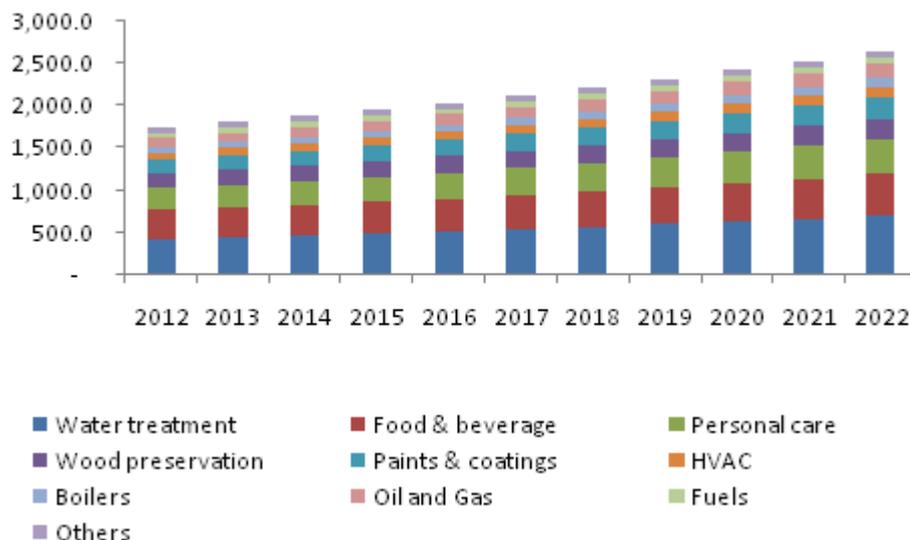


Figure 1: Marché des biocides en Europe, par application, 2012-2022 (en millions de dollars)
(Radiant Insight, 2015)

2.1.2- Réglementation

Actuellement, la réglementation mondiale sur les biocides est hétérogène. En Europe, les produits biocides sont tous régulés par l'Agence Européenne des produits chimiques (ECHA) sous la « Réglementation des Produits Biocides » (RPB) qui a été instauré en 2012. Alors que pour les USA par exemple, la régulation des biocides est partagée entre différents organismes suivant leurs utilisations. Les désinfectants et produits d'hygiène destinés à l'usage humain ou vétérinaire sont gérés par l'US Food and Drug Administration (USFDA) alors que les produits désinfectants, fongicides ou algicides pour surfaces inertes sont contrôlés par la Federal Insecticide, Fungicide and Rodenticide Act (FIFRA).

Dans les deux cas, les agences gouvernementales exigent un rapport détaillé comportant l'efficacité du produit biocide, sa toxicité sur l'Homme et l'environnement avec notamment une estimation du risque environnemental défini par le rapport entre la concentration environnementale prédite (PEC) et la concentration pour laquelle l'on n'observe aucun effet sur les organismes (PNEC) et enfin la persistance et l'accumulation du composé dans les différents compartiments environnementaux (DeLeo et al. 2020).

Cependant, les agences demandent que ces informations soient fournies par l'entité qui demande l'autorisation de mise sur le marché et donc la majorité des données, réalisées soit par les entreprises elles-mêmes soit par des laboratoires indépendants, ne sont pas publiées, très incomplètes ou ne répondent qu'aux exigences de la réglementation ce qui peut mener à des idées erronées sur le réel potentiel toxique de certains biocides.

Il y a également possibilité pour les entreprises aux USA de demander des reports sur la mise en place de certaines réglementations. C'est ce qu'il s'est passé pour la régulation des chlorures de benzalkonium aux Etats-Unis entre 2015 et 2020 qui a finalement été repoussée avec, pour argument, un manque de preuve scientifique quant à leur toxicité (Pereira et Tagkopoulos 2019). Pourtant, la littérature scientifique est très explicite sur la dangerosité des BAC pour l'Homme et l'environnement (voir section 2.2.3-Toxicité).

2.2- Le chlorure de benzalkonium

2.2.1- Présentation et application

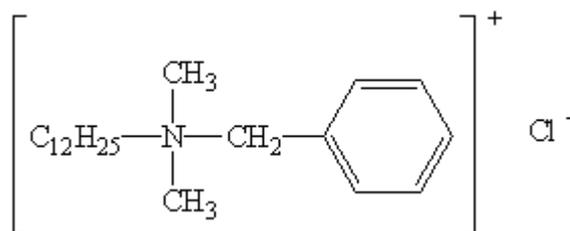


Figure 2: Chlorure de dodécylbenzyltriméthylammonium

Le chlorure de dodécylbenzyltriméthylammonium (BAC 12) est un composé faisant partie de la famille des chlorures de benzalkonium. Ces composés, appartenant à la famille des ammoniums quaternaires, sont caractérisés par la longueur de la chaîne carbonée, qui peut varier de 8 à 18 carbones et qui conditionne leurs propriétés physico-chimiques.

Tableau 2: Propriétés physico-chimiques du BAC 12 (Abbott et al. 2020); (Daull et al. 2013)

Point de fusion	42-44°C (pour le solide pur)
Poids moléculaire	339 g/mol
pH	6 à 8
Solubilité dans l'eau	1230 mg/L
Log(Kow)	2,93
Persistance	T1/2= 38 j dans l'eau Plusieurs années dans les sédiments
Sorption : Log(Koc)	5,43

Comme la plupart des ammoniums quaternaires, le BAC 12 est utilisé principalement en tant qu'agent actif dans les produits de désinfection médicaux ou ménagers ainsi que dans les détergents. Mais avec la restriction progressive d'autres agents désinfectants tels que le triclosan (Sreevidya et al. 2018), ses domaines d'utilisation se sont diversifiés et amplifiés. Il est maintenant utilisé en tant que fongicide en agriculture et dans les lessives, en prévention du parasitage dans les aquacultures (Waller et al. 1996). Il est important de noter que dans la majorité de ses applications il se présente sous forme de mélange avec d'autres chlorures de benzalkonium. Cependant le BAC 12 est généralement le composé majoritaire de ces mélanges comme on peut le voir sur les sites des fournisseurs de produits chimiques (Merck France). Enfin, l'utilisation du composé avait déjà connu un essor lors de la crise épidémique liée au SARS-CoV-1 au début des années 2000 (Rabenau et al. 2005). Aujourd'hui, compte tenu de la nouvelle crise épidémique, l'utilisation des chlorures de benzalkonium connaît de nouveau un essor important. La plupart des produits virucides actuellement conseillés par l'US EPA pour lutter contre l'épidémie de SARS-CoV-2 utilisent le chlorure de benzalkonium en tant qu'agent actif (voir Figure 3). Un article du journal d'économie Bloomberg rapporte que la production de désinfectants pour le mois de mai 2020 équivalait à la production de l'année 2019 entière (T. Buckley, 2020).

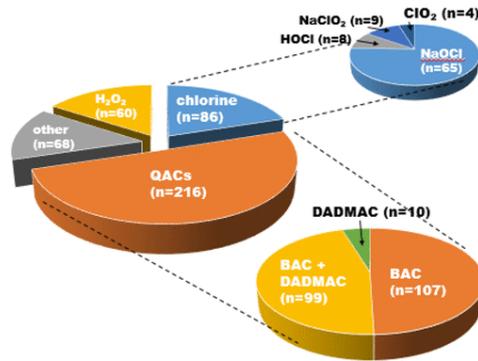


Figure 3: Part des substances actives dans les désinfectants conseillés par l'EPA contre le Covid (Hora et al. 2020)

Cette expansion soudaine questionne sur l'état actuel de sa présence dans les différents compartiments environnementaux et sur les risques réels que présente ce composé sur les organismes et plus généralement sur les écosystèmes.

2.2.2-Situation environnementale actuelle

Le BAC 12, par ses utilisations nombreuses et variées, s'invite bien plus dans notre quotidien que ce que l'on pourrait penser. En plus des expositions évidentes lors de l'utilisation de produits ménagers, de produits de soins corporels ou encore du plus commun des antiseptiques (la Biseptine®), il existe d'autres formes d'exposition, par exemple pour la conservation des aliments à 0,5 mg/kg (Pereira et Tagkopoulos 2019). Bien que la Commission Européenne ait limité cette utilisation du chlorure de benzalkonium, l'European Food Safety Authority (EFSA) a trouvé des valeurs atteignant 14,4 mg/kg (EFSA, 2013d). A noter qu'en contraste de la réglementation qui se raffermi en Europe, dans d'autres pays tels que les Etats-Unis, la réglementation reste beaucoup plus laxiste.

Dans la majorité de ces utilisations du BAC 12, on estime qu'environ 75% de la substance brute est en surplus lors de l'utilisation et est rejetée dans les eaux usées. Il existe d'autres cheminements tels que la lixiviation des composés utilisés pour l'agriculture ou pour nettoyer les sols qui peut entraîner une contamination directe des eaux de surface. Mais la plus grande partie des rejets de BAC 12 finissent en station d'épuration (STEP) à des concentrations variables. Les concentrations sont particulièrement élevées dans les STEP qui reçoivent les eaux usées d'hôpitaux, de laveries ou de piscines qui sont des lieux où la consommation de BAC 12 est très importante, pouvant atteindre des concentrations de 6 mg/L dans certaines de ces STEP (Kümmerer et al. 1997).

Dans ces stations, les effluents sont généralement traités par boues activées dans lesquelles le BAC 12 est biodégradé par certaines souches de bactéries telles que *Aeromonas hydrophila* qui est capable de le dégrader et d'utiliser les produits de dégradation comme source d'énergie (Patrauchan and Oriol 2003). Le mécanisme de biodégradation n'est pas encore totalement décrit mais un mécanisme général a été établi pour la dégradation du BAC par cette bactérie (Voir Figure 4). Cependant ce processus de biodégradation connaît une inhibition pour des concentrations supérieures à 10 mg/L (Kreuzinger et al. 2007).

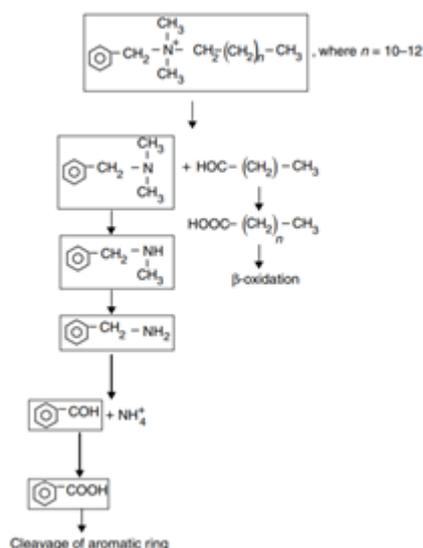


Figure 4: Mécanisme de dégradation du BAC par la bactérie *Aeromonas hydrophila* (Patrauchan and Oriol 2003)

Ces traitements épuratoires présentent généralement une efficacité supérieure à 90%. Cependant, vu la quantité considérable consommée, les concentrations en sortie de STEP pourraient devenir alarmantes (voir *Tableau 3*). En général, les études décrivent que la concentration environnementale prévisible dans l'environnement (PEC) est très difficile à estimer pour le BAC 12 à cause du manque de données. Il en est de même pour la PNEC (concentration sans risque pour l'environnement) pour laquelle les données manquent également, notamment sur la toxicité à une exposition chronique (Kreuzinger et al. 2007). Bien que l'ECHA propose 415 ng/L en accord à la NOEC la plus basse donnée par la littérature sur l'invertébré *Daphnia magna*, d'autres études proposent 215 ng/L en utilisant un facteur d'incertitude « α » de 1000 (Elserk et al. 2018) qui rend compte du manque de données pour établir le danger réel de la molécule. Ces valeurs sont bien en-dessous de certaines concentrations retrouvées en sortie de STEP (voir *Tableau 3*) et donc certaines études estiment donc que le rapport PEC/PNEC pourrait varier et dépasser la limite de 1, synonyme de risque pour les écosystèmes dans certains effluents de STEP où les concentrations sont élevées (Grillitsch et al. 2006). Il est important de souligner la forte probabilité que les concentrations augmentent durant les prochains mois ce qui devrait accentuer notre vigilance vis-à-vis de ce contaminant.

Tableau 3: Exemple de concentrations retrouvées en STEP et sortie de STEP.

		Concentration en BAC 12 ($\mu\text{g/L}$)	Sources
STEP milieu urbain	Moyenne	55	(Clara et al. 2007); (Martínez-Carballo et al. 2007)
	Maximum	170	
	Moyenne après traitement	0 à 1	(Kreuzinger et al. 2007) ; (Hora et al. 2020)
	Maximum après traitement	60	
STEP hôpital/laverie	Moyenne	1000 à 3000	(Kreuzinger et al. 2007) ;
	Maximum	6000	(Martínez-Carballo et al. 2007) ; (Kümmerer et al. 1997)

2.2.3-Toxicité

La toxicité du BAC 12 repose sur le fait que la tête polaire, le groupement amine quaternaire, peut se fixer sur la surface de la membrane tandis que la chaîne alkyl lipophile altère la double couche phospholipidique. Cette altération peut rapidement mener à une ouverture de la membrane et à une lyse progressive de la cellule (Eich et al. 2000).

Il existe un certain nombre d'articles sur la toxicité du BAC 12 et des différents mélanges de chlorure de benzalkonium. Les différentes concentrations efficaces à 50% d'effet (CE_{50}) qui ont été déterminées dans la littérature sont compilées dans l'ANNEXE 1. Cette compilation nous montre que les organismes répondent très différemment en fonction de l'espèce considérée, ce qui nous donne un facteur d'amplitude de 10 000 entre la CE_{50} la plus faible donnée par l'US EPA pour l'invertébré aquatique *Daphnia magna* qui est de 5,8 $\mu\text{g/L}$ et une bactérie qui présente une résistance au BAC 12 pour laquelle on a une CE_{50} de 6 mg/L (Sütterlin et al. 2008). Ce tableau permet également d'identifier que l'invertébré *Daphnia magna* est l'organisme aquatique le plus vulnérable au BAC 12 avec des CE_{50} variant de 0,0058 à 0,041 mg/L suivant la nature du mélange et notamment le pourcentage de BAC 12 dans ce mélange. De plus, il est intéressant de relever que certaines espèces de microalgues sont plus sensibles que d'autres face au BAC 12. On a une CE_{50} de 0,049 mg/L pour l'espèce *Pseudokirchneriella subcapitata* alors que l'espèce *Chlorella vulgaris* semble plus résistante avec une CE_{50} de 0,203 mg/L.

Or, dans cette étude nous nous intéressons aux biofilms qui sont, par définition, des structures complexes abritant des espèces de microalgues autotrophes (cyanobactéries, diatomées, algues vertes), des bactéries, champignons et autres organismes hétérotrophes. Cet ensemble vit sur un équilibre maintenu par la composition et la répartition des groupes autotrophes et hétérotrophes. L'exposition au BAC 12 pourrait éliminer une grande partie des bactéries et certaines espèces de microalgues plus sensibles, et de ce fait modifier la composition taxonomique du biofilm. Ces modifications taxonomiques pourraient entraîner une perte de la valeur nutritive des biofilms et donc limiter les apports d'énergie aux consommateurs primaires.

Ces changements pourraient également bousculer l'équilibre structurel du biofilm et indirectement nuire à tous les organismes du biofilm, même les plus résistants. Cette hypothèse a été appuyée par une étude qui a montré que les assemblages naturels phytoplanctoniques étaient plus sensibles à une exposition au BAC que des cultures monoalgales (Pérez et al. 2009). En plus d'une sélection par espèce dans les assemblages, ils montrent qu'il peut y avoir une sensibilité par rapport à la taille. Ils ont relevé une diminution des diatomées dont la taille était inférieure à 10 μm à la faveur de diatomées de plus grande taille (supérieures à 20 μm).

Cependant, du fait de son utilisation massive et, de la même façon que pour la résistance antibiotique, on a pu observer le développement d'un mécanisme de résistance chez certains organismes bactériens par une pression de sélection. En réponse, on a pu observer une multiplication des cas d'infections microbiennes provenant de désinfectants contaminés (Weber et al. 2007). Les souches les plus résistantes telles que *Pseudomonas aeruginosa* présentent des profils en acides gras et en phospholipides différents des souches sensibles (Sakagami et al. 1989). Certaines souches bactériennes sont capables de s'adapter à l'exposition au BAC 12 par un changement dans la composition de la

membrane cellulaire. En effet, une augmentation de synthèse de polyamine peut permettre de stabiliser la charge au niveau de la membrane et par ce fait limiter l'action nocive du BAC 12 (Kim et al. 2018). Cette étude montre également que l'induction du gène de résistance *PmrB* pourrait servir de biomarqueur pour les souches résistantes au BAC. Cette résistance pourrait être exacerbée par l'utilisation actuelle des BAC dans les produits désinfectants contre le SARS-CoV-2.

De plus, certaines souches bactériennes devenues résistantes au BAC ont révélé une résistance croisée avec les antibiotiques. C'est notamment le cas pour certaines souches pathogènes de *Staphylococcus aureus* et d'*Escherichia coli*, ce qui se révèle être un réel problème sanitaire dans les hôpitaux où les concentrations en désinfectants doivent être augmentées pour éviter toute contamination.

Enfin, il a été démontré que la lumière artificielle augmente l'effet biocide du BAC sur les biofilms qui se forment sur les murs de bâtiments (Pozo-Antonio et Sanmartín 2018). Les traitements de produits concentrés à 3% volumique causent une diminution de la chlorophylle a et de l'efficacité de la photosynthèse significative. L'application de BAC combinée aux UVA et UVC a encore plus d'impact car ces derniers dégradent les premières couches des biofilms et permettent une attaque plus en profondeur dans le biofilm.

En zone urbaine, les milieux aquatiques sont soumis à une illumination artificielle nocturne et reçoivent des effluents de STEP dont les concentrations en BAC pourraient augmenter prochainement. Ce constat nous mène à nous interroger sur le possible effet synergique de la pollution lumineuse dans l'effet toxique du BAC 12 vis-à-vis des communautés périphytiques naturelles.

2.3- Artificial Light at Night (ALAN)

Aujourd'hui, avec un développement urbain toujours en essor, la lumière artificielle de nuit est devenue une véritable pollution globale. En 2001, environ deux tiers de la population vivait sous un ciel où la pollution lumineuse de nuit dépassait les valeurs d'éclairement naturel (Cinzano et al. 2001).

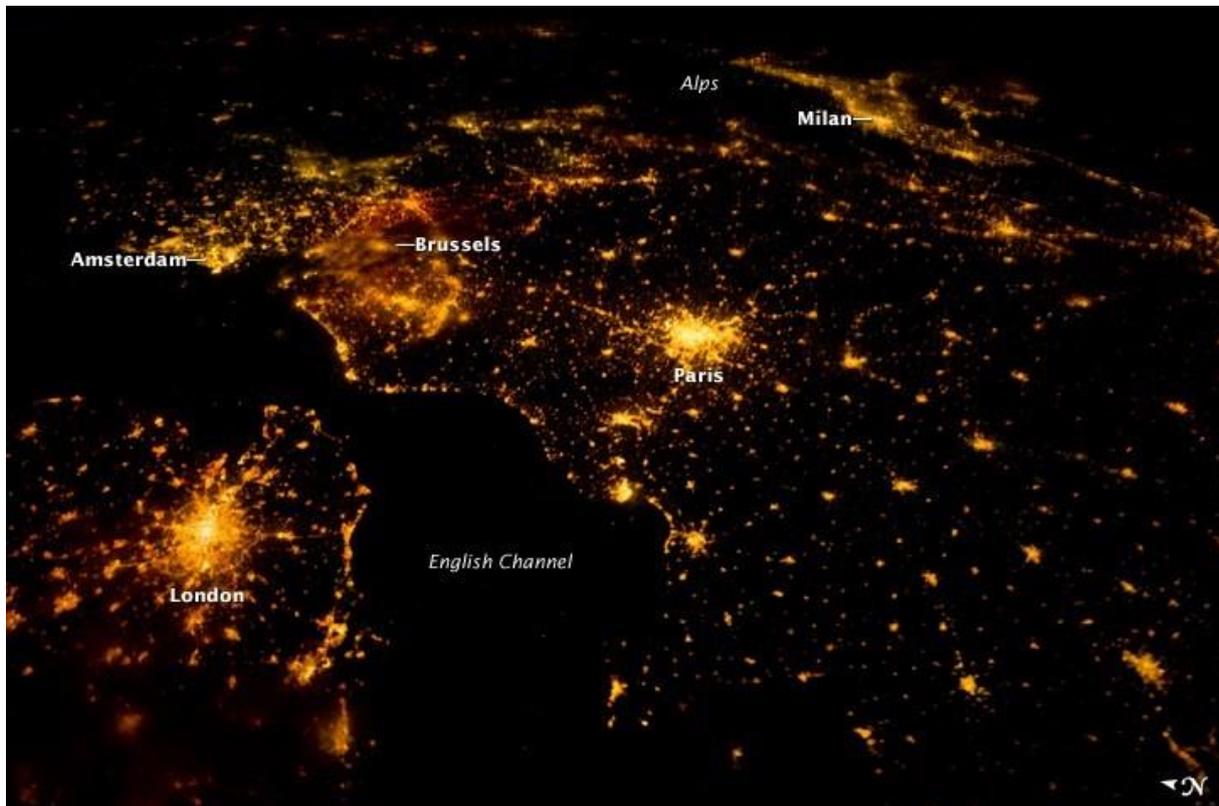


Figure 5 : Le Nord-Ouest Européen de nuit, photo prise à bord de l'ISS, NASA Johnson Space Center (<https://eol.jsc.nasa.gov>).

Cette pollution, plus communément abrégée ALAN (Artificial Light At Night), a été reconnue néfaste pour l'homme avec notamment des perturbations du cycle circadien qui ont pour conséquences de nombreux effets physiologiques indésirables (Stevens et Zhu 2015). Mais elle est aussi considérée comme néfaste pour les écosystèmes qui y sont exposés (Longcore et Rich 2004).

L'intérêt des effets de l'ALAN a été porté dans un premier temps sur les écosystèmes terrestres alors que le questionnement des impacts pour les écosystèmes aquatiques n'est apparu que récemment (Perkin et al. 2011). En effet, la présence humaine s'est beaucoup développée le long des rivières, fleuves ou sur les côtes et donc les écosystèmes aquatiques sont largement impactés par la pollution lumineuse. Cet axe de recherche s'est donc développé durant la dernière décennie pour mieux comprendre et appréhender l'impact de ce stress au niveau, non seulement, des individus mais également des communautés.

Parmi les effets de l'ALAN sur ces écosystèmes, l'influence sur les producteurs primaires semble être la plus importante à explorer. Étant à la base du réseau trophique, le stress subi par ces organismes photosynthétiques (dépendants de l'énergie lumineuse) se répercute sur le reste de la chaîne trophique et impacte donc tout l'écosystème. Il a été démontré que

l'ALAN pouvait apporter des perturbations dans les cycles photosynthèse-respiration des biofilms et notamment en induisant une variabilité dans le maximum d'efficacité de la photosynthèse (Maggi et Serôdio 2020). Cette variabilité pourrait alors entraîner un phénomène de sélection dans les compositions taxonomiques et avantager certaines espèces autotrophes devant d'autres. Par exemple, les diatomées peuvent être affectées par un éclairage nocturne et on peut voir leur proportion diminuer dans la biomasse totale du biofilm (Grubisic et al. 2017). Or, comparées aux autres groupes algaux, les diatomées sont considérées comme une nourriture de choix pour les brouteurs par leur composition plus riche en acides gras polyinsaturés essentiels, notamment oméga-3 (Brett et Müller-Navarra 1997). Un éclairage continu peut également stimuler une photosynthèse sans interruption. Or, la photosynthèse est un mécanisme physiologique qui consomme de l'énergie et donc sans interruption, cela peut mener à un ralentissement de la croissance des biofilms. C'est pourquoi il est intéressant d'approfondir les recherches sur ce sujet pour mieux comprendre l'impact de la lumière artificielle sur les biofilms. D'essayer de comprendre si ce stress, en impactant négativement leur métabolisme et leur qualité nutritive, peut avoir un impact négatif sur le transfert énergétique le long de la chaîne trophique aquatique.

Dans ce contexte, l'objectif général de mon projet de maîtrise MOBBIDIQ est de pouvoir identifier des biomarqueurs d'altération qui pourrait permettre d'évaluer et de surveiller l'impact de ces 2 stress sur les milieux aquatiques urbains. Les objectifs spécifiques à mon stage réalisé dans l'unité EABX à INRAE (janvier-juin 2021) sont d'identifier et comprendre les mécanismes d'altération du contaminant et de la lumière artificielle nocturne sur les biofilms et plus précisément sur leur métabolisme. Pour atteindre ces objectifs, nous avons tout d'abord réalisé une expérience de contamination graduelle qui nous a permis d'obtenir les courbes doses-réponses de notre biofilm face au contaminant. Puis nous avons réalisé une expérience en canaux artificiels à une concentration de contaminant et un éclairage fixés pour pouvoir quantifier les altérations potentielles.

I- Matériels et méthodes

3.1- Développement et maturation du biofilm

Le biofilm utilisé lors de l'expérimentation provient de lames de verres (deux modèles : 26,5 cm×6cm et 27,5 cm×8cm) colonisées suite à leur immersion dans l'étang de Cestas (Lat : 44,774601 | Long : -0,696077). 56 lames ont été encagées et installées à une profondeur correspondant à la zone euphotique (50-70 cm de profondeur) en décembre 2020 et ont été prélevées le 19/04/2021 soit après 5 mois de colonisation. L'étang de Cestas est considéré comme un plan d'eau hypereutrophe (Chaumet 2018).

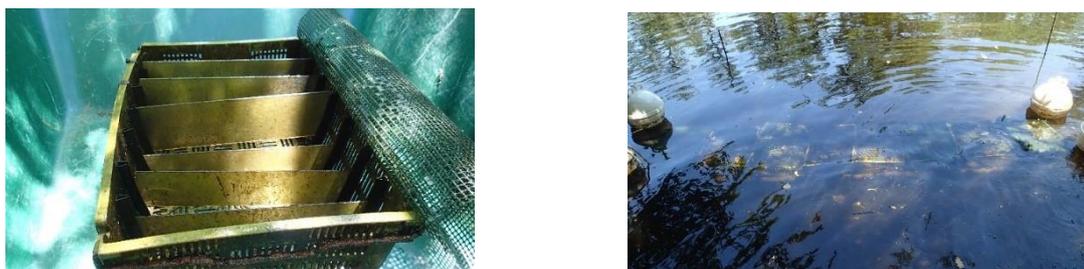


Figure 6: Photos du montage de colonisation du biofilm

3.2- Expérience préliminaire

La littérature n'est que très peu fournie en données écotoxicologiques pour les impacts du BAC 12 sur le biofilm. C'est pourquoi nous avons mis en œuvre une expérience préliminaire pour déterminer la toxicité spécifique de ce contaminant sur notre biofilm dans l'objectif de fixer, par la suite, une concentration non-létale utilisée lors de notre expérience en canaux artificiels.

Pour ce faire, une solution de biofilm en suspension a été préparée en grattant une lame de superficie 26,5 cm×6 cm mis en solution dans 500 mL d'eau venant du milieu naturel filtrée à 0,45 μm . Ensuite, neuf vials de 3 mL ont été préparés en introduisant 1,5 mL de cette solution de biofilm et le volume de solution de BAC 12 et d'eau filtrée nécessaire à obtenir neuf concentrations croissantes selon une gamme semi-exponentielle allant de 17,5 $\mu\text{g/L}$ à 175 mg/L (concentrations mesurées). Une première série d'échantillons a été laissée à la lumière artificielle pendant 4H (intensité moyenne de 16,86 $\mu\text{mol/s/m}^2$) tandis qu'une deuxième a été mise à l'obscurité. L'efficacité photosynthétique a été mesurée au bout de 4H d'expérience à l'aide d'un fluorimètre Phyto-PAM (voir fonctionnement à la section 3.5.1- Mesures d'efficacité photosynthétique et de fluorescence de la chlorophylle a)

3.3- Montage des canaux et suivi des paramètres

Chaque série de canaux représente un système fermé d'environ 30 L d'eau du milieu naturel filtrée à 20 μm (canaux de 20 L et une nourrice de 10 L) dans lequel nous avons un léger débit. L'éclairage a été ajusté pour s'approcher de 20 $\mu\text{mol/m}^2/\text{s}$ à l'aide de néons LED JBL SOLAR NATUR. Une cartographie exacte a été effectuée pour évaluer les différences entre l'amont et l'aval des canaux et également entre canaux (ANNEXE 2). La photopériode a été ajustée à l'aide de programmeurs électroniques de telle sorte que deux des séries de canaux

aient une période de nuit allant de 22h à 8h du matin (soit 10h d'obscurité ; notées Photopériode alternée) tandis que les deux autres séries de canaux sont exposés à une lumière continue (notées Photopériode continue). Un système de confinement lumineux a été mis en place à l'aide de couvertures de survie et de panneaux en bois pour éviter une contamination lumineuse entre les deux conditions. La température de la pièce a été maintenue constante à $20,5 \pm 0,1^\circ\text{C}$ par thermorégulation. La température de l'eau a par conséquent été maintenue à $18,7 \pm 0,2^\circ\text{C}$ tout au long de l'expérience. Les canaux ont été contaminés avant l'introduction des biofilms à l'aide d'une solution mère pour atteindre la concentration nominale de 30 mg/L. Nous avons laissé le système s'homogénéiser pendant trente minutes avant d'introduire les biofilms pour avoir une contamination homogène sur l'ensemble des lames et non un pulse de contaminant sur les lames proches de l'arrivée d'eau.

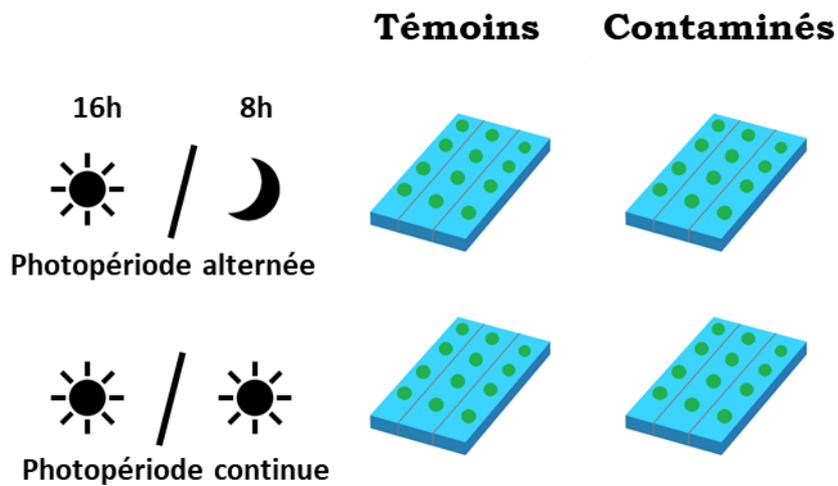


Figure 7: Schéma récapitulatif du montage expérimental en canaux artificiels

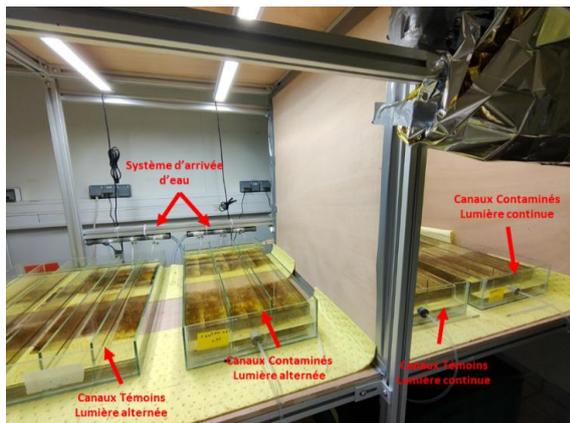


Figure 8: Photos du montage expérimental en canaux artificiels

3.4.- Analyses des échantillons d'eau

Les prélèvements d'eau pour les analyses ont eu lieu à T0, T1, T2 et T10. Les échantillons destinés à la mesure des ions et des paramètres majeurs ont été filtrés à 0,45 µm puis stockés au réfrigérateur dans l'attente des analyses. Pour les mesures du contaminant, les échantillons d'eau ont eux aussi été filtrés à 0,45µm puis stockés au congélateur à -20°C dans l'attente des analyses.

3.4.1.- Mesures des nutriments et des ions majeurs

La mesure des différents ions majeurs et nutriments a été réalisée par chromatographie échangeuse d'ions ou chromatographie ionique (CI). Cette technique permet d'isoler une substance chargée électriquement d'un mélange de molécules chargées. Pour le mélange passe sur une phase stationnaire (colonne) chargée avec des ions connus et on remplace ces ions par les ions/molécules chargées que l'on cherche à isoler. Les ions sont ensuite détectés par conductimétrie.

Ici, la mesure a été effectuée à l'aide d'un chromatographe ionique *881 Compact IC pro 1*. Les échantillons ont été au préalable filtré à 0,45 µm pour éviter les interférences qui pourraient être liées au rejet de matière organique des biofilms dans l'eau des canaux. L'analyse des anions et des cations a été réalisée séparément. Les conditions de ces mesures sont résumées dans le *Tableau 5* et les limites de quantifications pour chaque ion analysé sont données dans le *Tableau 5*.

Tableau 4: Conditions d'analyse des ions cations et anions par chromatographie ionique

	Cations	Anions
Pré-colonne	Metrosep C6 - 250/4,0	Metrosep A supp5 - 50/4,0
Colonne	C4 Guard /4,0	Supp 4/5 Guard/4,0
Eluants	2,5mM HNO ₃ + 1,7mM acide 2,4-Pyridinedicarboxylique	3,2 mM Na ₂ CO ₃ + 1 mM NaHCO ₃
Solution de rinçage	5mM H ₂ SO ₄	5mM NaOH

Tableau 5: Limites de quantifications (LQ) des différents ions par chromatographie ionique

	NO ₂ (mg/l)	NO ₃ (mg/l)	PO ₄ (mg/l)	SO ₄ (mg/l)	Cl(mg/l)
LQ	0,005	0,01	0,01	0,005	0,01
	NH ₄ (mg/l)	Na (mg/l)	K (mg/l)	Ca (mg/l)	Mg (mg/l)
LQ	0,005	0,01	0,0025	0,15	0,15

3.4.2.- Contamination et suivi de la concentration en BAC 12

Une solution-mère de BAC 12 à 4,9 g/L a été préparée à partir de chlorure de dodécylbenzyltriméthylammonium en poudre (Sigma-Aldrich, CAS : 139-07-01, pureté : $\geq 99\%$). A partir de cette solution, nous avons contaminé deux séries de canaux en versant 100 mL de cette solution-mère directement dans la nourrice d'alimentation des canaux pour arriver à une concentration de 30 mg/L.

Les concentrations des solutions-mères et des eaux des canaux, aux différents temps de prélèvement, ont été déterminées par couplage HPLC-MS/MS (chromatographie liquide avec spectrométrie de masse en tandem).

L'HPLC (chromatographie liquide haute performance), ici un chromatographe *Ultimate 3000* (Dionex), est une technique de séparation qui repose sur les différentes interactions des composés à analyser (solutés) le long d'une phase stationnaire (colonne chromatographique), au travers d'une phase mobile liquide (éluant). Les solutés se répartissent suivant leur affinité avec ces deux phases et vont donc être plus ou moins retenus, donnant des temps de rétention différents et propres à chaque composé.

Une fois séparés, les composés sont identifiés et quantifiés par le spectromètre de masse API 2000. Pour cela, ils sont d'abord ionisés par une source électrospray « ESI » (ElectroSpray Ionisation). L'API 2000 (AB Sciex) utilise un analyseur de type « triple quadripôle », l'identification des composés se fait donc en trois temps. Le premier quadripôle (Q1) sélectionne des ions dits « parents » par rapport à leur rapport m/z (masse sur charge). Dans un second temps, les ions « parents » ciblés sont fragmentés en ions « fils » à l'aide d'une cellule de collision (Q2). Enfin, dans le dernier quadripôle (Q3), ces ions « fils » sont à leur tour filtrés en fonction de leur rapport m/z avant d'être captés par le détecteur, qui permettra ensuite une quantification des composés. La combinaison entre l'ion parent et l'ion fils est appelé transition $Q1 > Q3$, elle est spécifique à la structure du composé et offre donc un degré élevé de sélectivité.

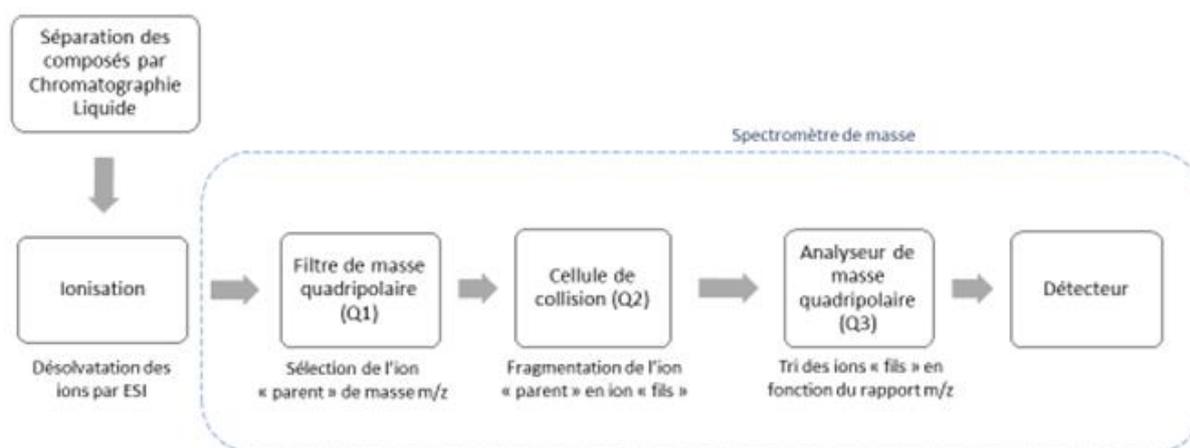


Figure 9 : Schéma explicatif du système HPLC-MS/MS « triple quadripôle »

Pour nos analyses, nous avons utilisé comme phase stationnaire une colonne *Gemini® NX-C18* (Phenomenex ; granulométrie = 3 μm ; Taille des pores = 110 Å ; chauffée à 40 °C) qui est une phase en gel de silice greffée avec des chaînes carbonées de 18 carbones, ce qui lui confère une faible polarité. Elle est donc hydrophobe et est dite à phase inverse.

La phase mobile est un mélange [90/10] d'eau ultra-pure (EUP) + acétate d'ammonium 5 mM/acétonitrile (v/v). Sa composition n'est pas modifiée au cours du temps, on dit que l'élution se réalise en mode isocratique. Le débit est fixé à 0,600 mL/min et le volume d'injection est de 20 µL. La détermination des transitions de quantification a été faite en amont de la manipulation et est résumée dans le tableau ci-dessous :

Tableau 6 : Paramètres de séparation et de détection des composés par LC-MS/MS

Composé	Temps de rétention (min)	Energie de collision (V)	Première transition (Quantification)	Deuxième transition (Confirmation)
BAC 12	5,7	45	304 > 91	304 > 212
BAC 12 D5 (Etalon Interne)	5,7	41	309 > 96	309 > 212

3.5- Analyses du biofilm

Les prélèvements de lames de biofilms pour les analyses ont eu lieu à T0, T1, T2 et T10. Cinq lames ont été prélevées à T0, pour tous les autres temps de prélèvements, 12 lames ont été récupérées (3 réplicats par condition). Chaque lame a été enveloppée de papier aluminium puis plongée dans l'azote liquide pendant 30 secondes. Ensuite, les lames ont été lyophilisées pendant 24h. Une fois lyophilisée, chaque lame a été raclée à l'aide d'une lame de rasoir et le biofilm récupéré a été pesé puis stocké dans des coupelles d'aluminium puis stocké au congélateur à -80°C.

Pour ce qui est des analyses d'efficacité photosynthétique et de chlorophylle *a*, les prélèvements ont eu lieu à T0, T2, T4, T7 et T10. Pour chacune des 12 lames analysées, un rectangle de biofilm d'environ 3 cm de longueur et 1 cm de largeur a été raclé à l'aide d'une lame de rasoir, immédiatement après retrait du canal. Chaque échantillon de biofilm récupéré a ensuite été mis en suspension dans des vials en verre remplis avec 3 mL de l'eau du milieu d'où il a été prélevé. Une fois les mesures de chlorophylle *a* et d'activité photosynthétique terminées, les échantillons ont été préservés à l'aide de Lugol et stockés à l'obscurité dans l'attente de l'observation microscopique.

3.5.1- Mesures d'efficacité photosynthétique et de fluorescence de la chlorophylle *a*

Les mesures de ces paramètres ont été faites avec un fluorimètre Phyto-PAM (Pulse Amplitude Modulation, Heinz Walz GmbH). Cet appareil permet de mesurer la fluorescence émise par les centres réactionnels lors de la photosynthèse. Cette fluorescence ré-émise correspond à l'excès d'énergie lumineuse nécessaire à la photosynthèse.

L'appareil effectue 2 mesures : une première qui est la fluorescence de base (F_t) et une deuxième à la suite d'un pulse lumineux qui sature les centres réactionnels et nous donne la fluorescence maximale atteinte par l'organisme (F_m). On obtient le rendement photosynthétique Φ_{II} par l'équation suivante :

$$\Phi_{II} = \frac{F_m - F_t}{F_m}$$

L'appareil Phyto-PAM permet également d'estimer la teneur en chlorophylle *a* de l'échantillon (à partir de sa fluorescence) et les contributions à cette valeur des 3 trois principaux groupes algaux (algues vertes, algues bleues et algues brunes) sur la base de leurs signatures spectrales.

3.5.2- Dénombrements en microscopie optique

Pour l'observation microscopique, la suspension de biofilm a été homogénéisée avant prélèvement de 125 µL, qui ont été déposés sur une lame de comptage de Nageotte. L'observation c'est fait à l'aide d'un microscope optique (Olympus BX51) au grossissement x400 de 5 à 10 champs (selon la concentration en cellules de l'échantillon) répartis homogènement sur la lame. Nous avons ensuite réalisé le dénombrement des diatomées vivantes et mortes (Morin et al. 2010), des chlorophycées, des cyanobactéries et de la microméiofaune.

Compte tenu de la variabilité de concentration des échantillons (liée à l'hétérogénéité du biofilm et à la faible superficie prélevée), les résultats ne sont pas donnés en nombre de cellules par cm² mais en distribution des groupes (en fonction du nombre de cellules pour les algues et d'individus pour la microméiofaune) dénombrés. La mortalité des diatomées a été calculée suivant l'équation :

$$\text{Mortalité} = \frac{\text{Diatomées mortes}}{(\text{Diatomées vivantes} + \text{Diatomées mortes})} \times 100$$

3.5.3- Analyse des pigments photosynthétiques

En parallèle, nous avons analysé les concentrations en pigments de certains échantillons des temps de prélèvements T0, T1, T2 et T10, pour lesquels la biomasse récoltée était supérieure à 10 mg. Pour ce faire nous avons suivi la norme AFNOR NF T 90-117 pour le dosage de la chlorophylle *a* et des phéopigments suivant la méthode de Lorenzen (1967). Exactement 10 mg de biofilm ont été plongés dans 10 mL d'acétone, après 20 min de mélange aux ultrasons et 10 min de repos, nous avons filtré sur Buchner pour éliminer la phase solide du biofilm. Pour chaque échantillon, nous avons passé la phase liquide une première fois au spectrophotomètre aux longueurs d'ondes 630 nm, 647 nm, 664 nm, 665 nm et 750 nm, puis une deuxième fois aux mêmes longueurs d'onde après acidification.

3.5.4- Approche lipidomique

Nous avons tout d'abord effectué une extraction solide-liquide suivie d'une extraction liquide-liquide qui nous permet de séparer les métabolites hydrophiles et lipophiles (voir ANNEXE 3 Pour chaque échantillon, un standard de phospholipides, ici 5 µL de phosphatidylcholine (PC 17:0) à 10 mg/L, a été ajouté et jouera non seulement le rôle de traceur lors de l'extraction mais également d'étalon interne qui nous permettra de quantifier les lipides lors de l'analyse.

L'analyse des lipides est réalisée par HPLC-MS-MS (cf. section 3.4.2.- *Contamination et suivi de la concentration en BAC 12*). Nous avons prélevé et évaporé 50 µL d'échantillon, auxquels nous avons ajouté 4 µL d'un mix d'étalons internes (EI) composé de

phosphatidyléthanolamine (PE 17:0) à 400 µg/L et phosphatidylglycérol (PG 17:0) 200 µg/L. Le tout a été remis en solution dans 500 µL d’isopropanol. Les EI nous permettent de quantifier les phospholipides présents dans nos échantillons, par le biais d’un étalonnage interne réalisé en parallèle.

Pour les analyses, nous avons utilisé comme phase stationnaire une colonne *LUNA® NH₂* (Phenomenex ; granulométrie = 3 µm ; Taille des pores = 100 Å ; chauffée à 35 °C) qui est une phase en gel de silice greffée avec des groupements polaires NH₂ utilisée en mode « HILIC » (Hydrophilic Interaction Liquid Chromatography).

La phase mobile est un mélange EUP + acétate d’ammonium à 40 mM, pH 10/acétonitrile (v/v). Le volume d’injection est de 20 µL. Le gradient suivi le long de l’analyse de chaque échantillon est présenté ci-dessous :

Tableau 6: Gradient utilisé pour l’analyse des phospholipides.

Temps de rétention (min)	Débit (mL/min)	% EUP + acétate d’ammonium 40 mM à pH10	% Acétonitrile
0	0,4	95	5
2	0,4	95	5
7	0,4	70	30
10	0,4	70	30
11	0,4	95	5
14	0,4	95	5

3.6- Analyse statistiques

Les courbes dose-réponse et les CE₅₀ obtenues lors de l’expérience préliminaire ont été calculées et modélisées grâce à la macro EXCEL REGTOX (http://www.normalesup.org/~vindimian/fr_download.html).

Les données d’efficacité photosynthétique obtenues lors de la manipulation en canaux artificiels ont été traitées à l’aide du logiciel R. Pour vérifier s’il existe un effet de la lumière et du contaminant sur l’efficacité photosynthétique, ou une interaction entre les deux stress, une ANOVA à 2 facteurs a été appliquée aux données (après vérification des critères d’applications) et dans le cas où il existe des différences, un test post-hoc de Tukey a été appliqué. Lorsque les critères de l’ANOVA ne sont pas respectés, un test non paramétrique de Scheirer-Ray-Hare suivi d’un test post-hoc de Dunn ont été appliqués.

II- Résultats

4.1- Expérience préliminaire

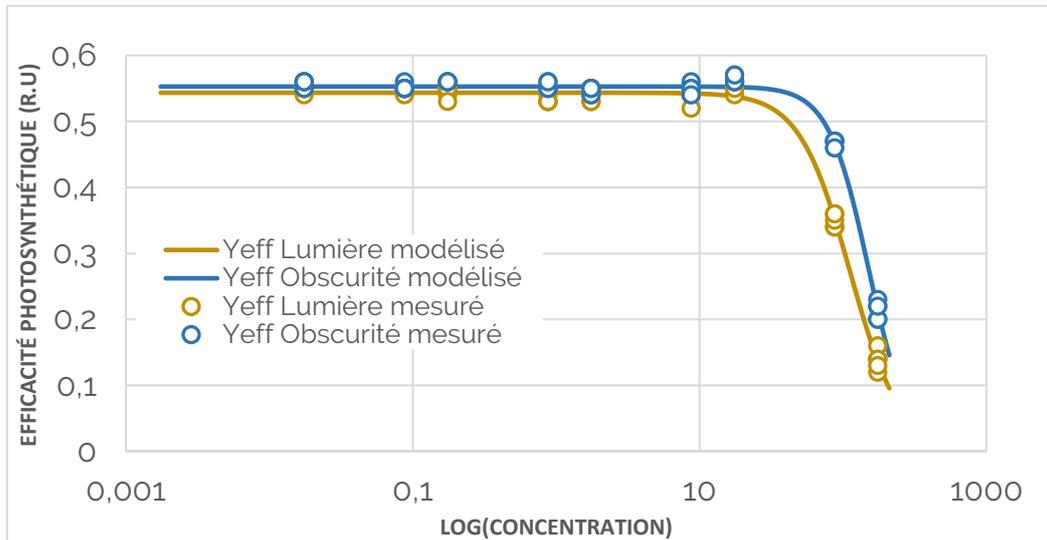


Figure 10: Courbe dose-réponse du BAC 12 sur l'activité photosynthétique pendant une période de 4H.

Les résultats des mesures d'activité photosynthétique nous montrent des différences de sensibilités entre la condition de lumière et d'obscurité. En effet, dans la condition de lumière la CE_5 est atteinte à partir d'une concentration de 34 ± 4 mg/L alors que dans la condition d'obscurité cette même CE_5 n'est atteinte que pour une concentration de 58 ± 3 mg/L. Cette différence se voit également sur les CE_{50} calculées qui sont de 112 ± 3 mg/L dans la condition de lumière et de 151 ± 3 mg/L dans la condition d'obscurité. L'objectif de cette expérience étant de définir une concentration non-létale pour l'expérience en canaux artificiels, nous avons donc pris la CE_5 la plus faible qui est de 34 mg/L.

4.2- Paramètres majeurs et contaminant

Tableau 7: Tableau récapitulatif des mesures d'ions dans les différents canaux (moyennes \pm erreur standard). CTRL= canaux témoins ; CONT= canaux contaminés ; PN= photopériode alternée ; PC = photopériode continue

		CTRL-PA	CTRL-PC	CONT-PA	CONT-PC
		Concentration (mg/L)	Concentration (mg/L)	Concentration (mg/L)	Concentration (mg/L)
ANIONS	NO ₂	0,04 \pm 0,06	0,03 \pm 0,01	0,02 \pm 0,01	0,03 \pm 0,01
	NO ₃	1,54 \pm 0,62	1,51 \pm 0,52	0,79 \pm 0,38	0,82 \pm 0,22
	PO ₄	0,03 \pm 0,04	0,01 \pm 0,005	0,03 \pm 0,04	0,03 \pm 0,05
	SO ₄	20 \pm 4,09	17 \pm 0,68	18 \pm 1,83	18 \pm 0,68
	Cl	35 \pm 6,02	30 \pm 0,79	35 \pm 3,12	33 \pm 1,40
CATIONS	NH ₄	0,10 \pm 0,12	0,11 \pm 0,14	0,12 \pm 0,12	0,12 \pm 0,13
	Na	21 \pm 4,41	18 \pm 0,74	19 \pm 2,03	19 \pm 0,89
	K	5 \pm 0,95	4 \pm 0,14	4 \pm 0,45	4 \pm 0,25
	Ca	55 \pm 11,51	48 \pm 1,45	50 \pm 5,66	49 \pm 2,59
	Mg	5 \pm 0,95	4 \pm 0,14	4 \pm 0,45	4 \pm 0,20

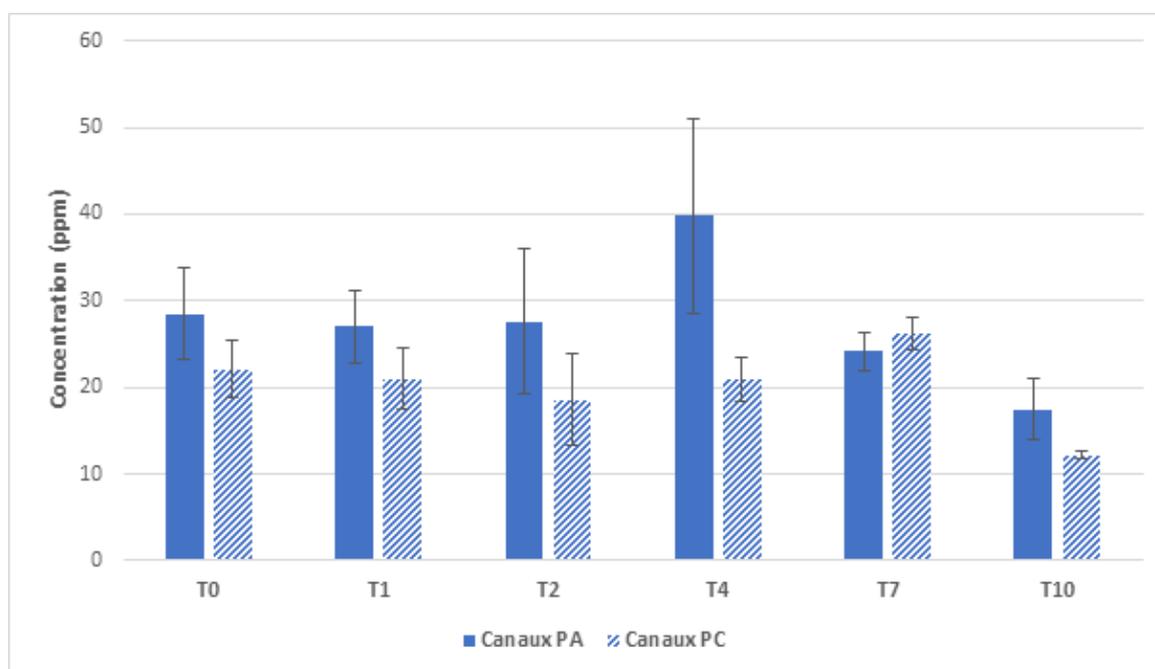


Figure 11: Evolution de la concentration de BAC 12 dans le milieu en mg/L. PA = Photopériode alternée et PC = Photopériode continue

Les concentrations mesurées dans les canaux correspondent à la concentration visée pour la contamination des canaux, qui était de 30 mg/L. On peut noter que la concentration en contaminant entre les deux conditions était significativement plus faible (ANOVA, $p=0.003$) dans le canal exposé à la lumière continue.

4.3- Altérations directes au métabolisme

4.3.1- Effets sur l'efficacité photosynthétique

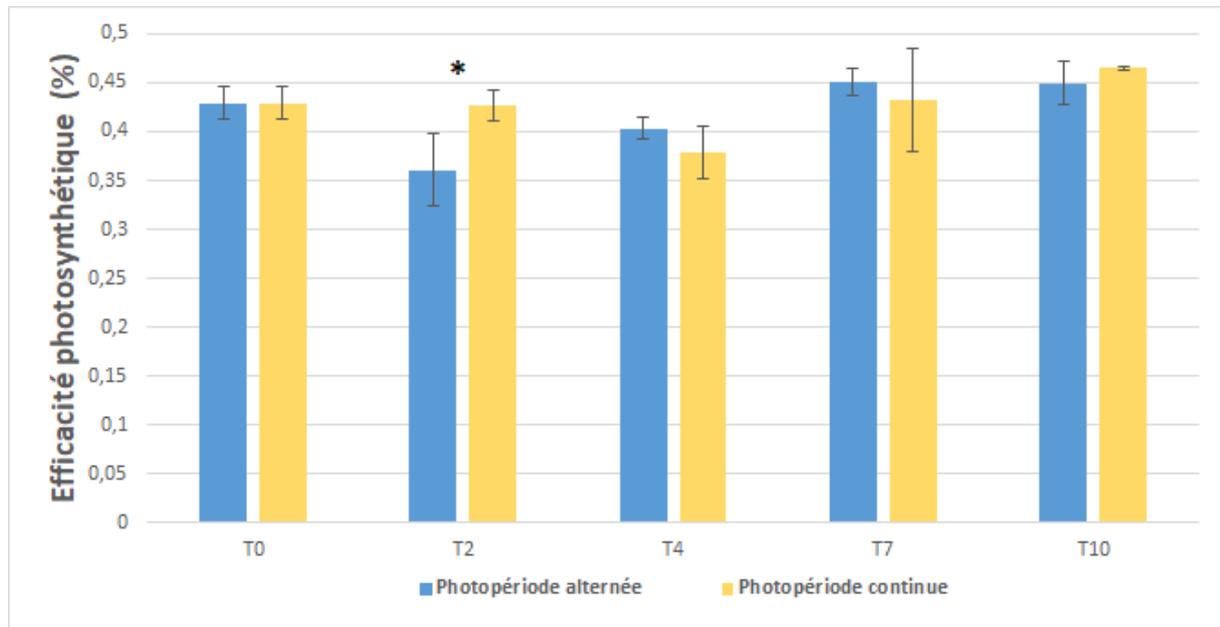


Figure 12: Evolution de l'efficacité photosynthétique dans les canaux témoins.

Dans les canaux témoins, l'activité photosynthétique était stable sur la durée de l'expérience, avec des valeurs moyennes de $0,42 \pm 0,01$. Les mesures d'activité photosynthétique entre les deux conditions lumineuses ne présentent pas de différence entre les deux conditions de photopériode, excepté pour le au temps de prélèvement T2 (ANOVA deux facteurs suivie d'un test de Tukey, $p = 0,005$).

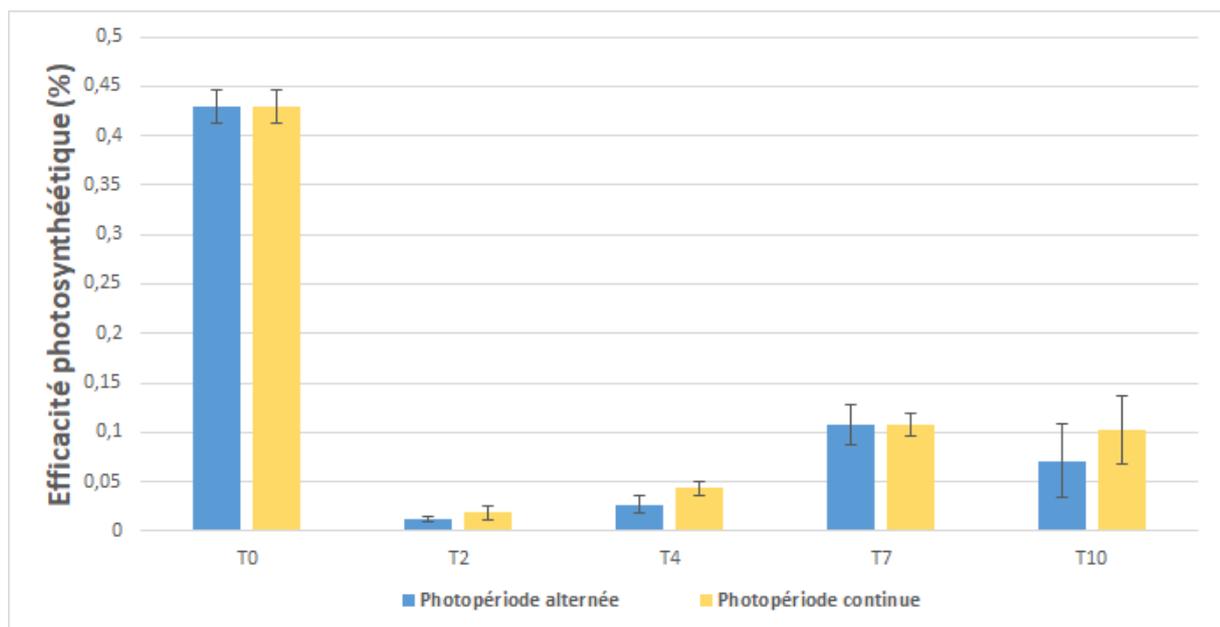


Figure 13: Evolution de l'efficacité photosynthétique dans les canaux contaminés.

Pour les biofilms exposés au BAC 12, une inhibition quasi-totale (97% pour la condition de photopériode alternée et 95% pour la condition de photopériode continue) de la photosynthèse était observée dès le début de l'expérience (T2) et tout le long de la première semaine d'exposition au contaminant. A partir du 7^{ème} jour d'exposition s'observe un regain de l'activité photosynthétique qui repasse au-dessus de 0,01.

Pour ce qui de l'exposition conjuguée de la contamination au BAC 12 et de la photopériode continue, nous n'observons aucune différence significative entre les deux séries de canaux (test de Scheirer-Ray-Hare, $p = 0,39$).

4.3.2- Effets sur la qualité des pigments photosynthétique



Figure 14: Photographie des observations microscopiques des chloroplastes. A gauche, un échantillon non contaminé et à droite un échantillon contaminé au BAC 12.

On observe sur les photos ci-dessus une différence visible entre les chloroplastes sains des échantillons contrôles qui ne présentent aucune anomalie et celles des échantillons contaminés qui perdent leur pigmentation verte et prennent un aspect granuleux que l'on ne retrouve pas sur les chloroplastes contrôles.

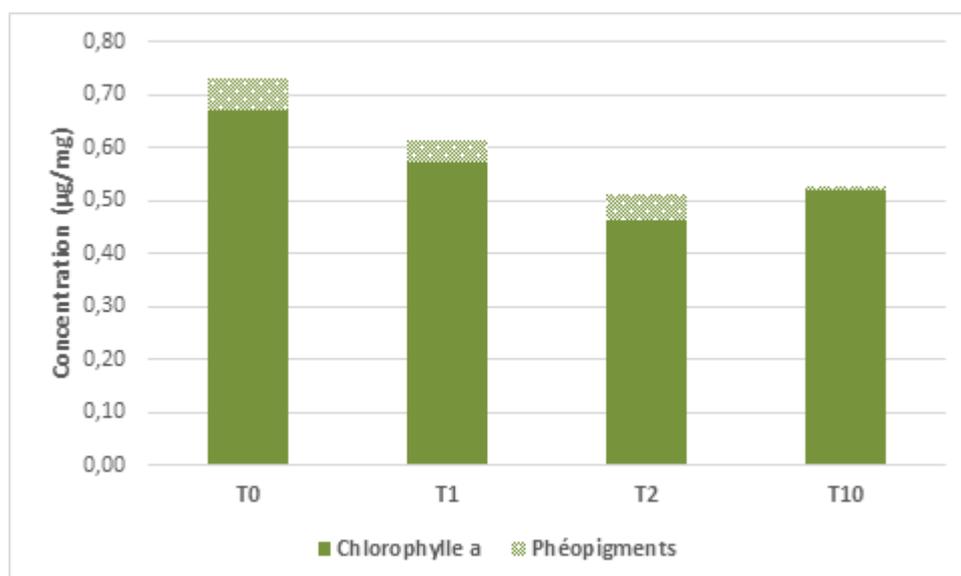


Figure 15: Evolution des pigments chlorophylliens dans les canaux témoins.

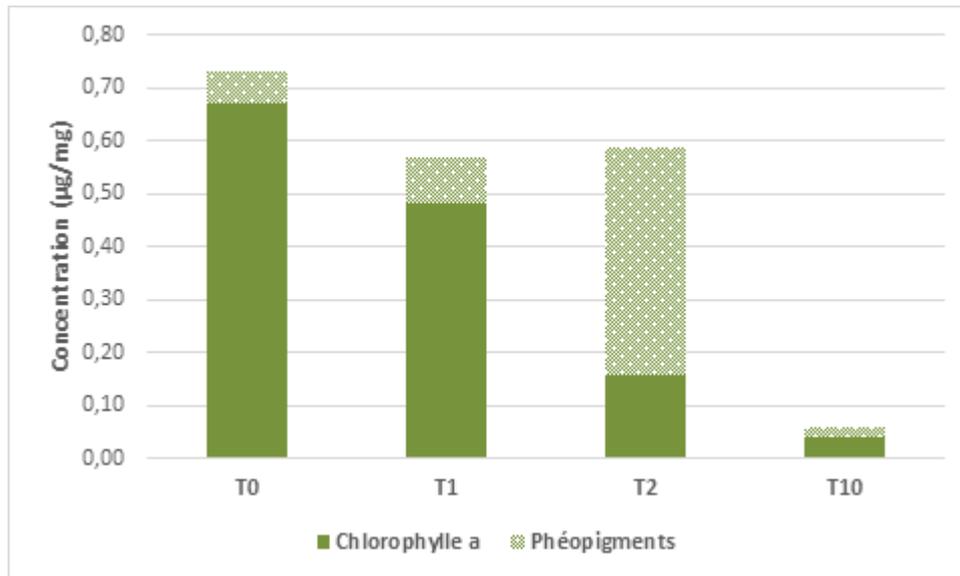


Figure 16: Evolution des pigments chlorophylliens dans les canaux contaminés.

Les dosages des pigments chlorophylliens et des phéopigments nous montre que, dans un premier temps l'exposition au BAC 12 entraîne la dégradation de la chlorophylle en phéopigments. On voit cette tendance s'accroître au temps de prélèvement T2 où plus de 70% des pigments mesurés sont dégradés. L'exposition au BAC 12 semble également, à plus long terme, diminuer fortement la quantité de pigments chlorophylliens dans les biofilms. Cette dégradation de la qualité et de la quantité des pigments est confirmée par l'observation microscopique sur laquelle on voit une dégradation visuelle des chloroplastes dans les échantillons contaminés.

4.4- Effets sur la communauté algale du biofilm

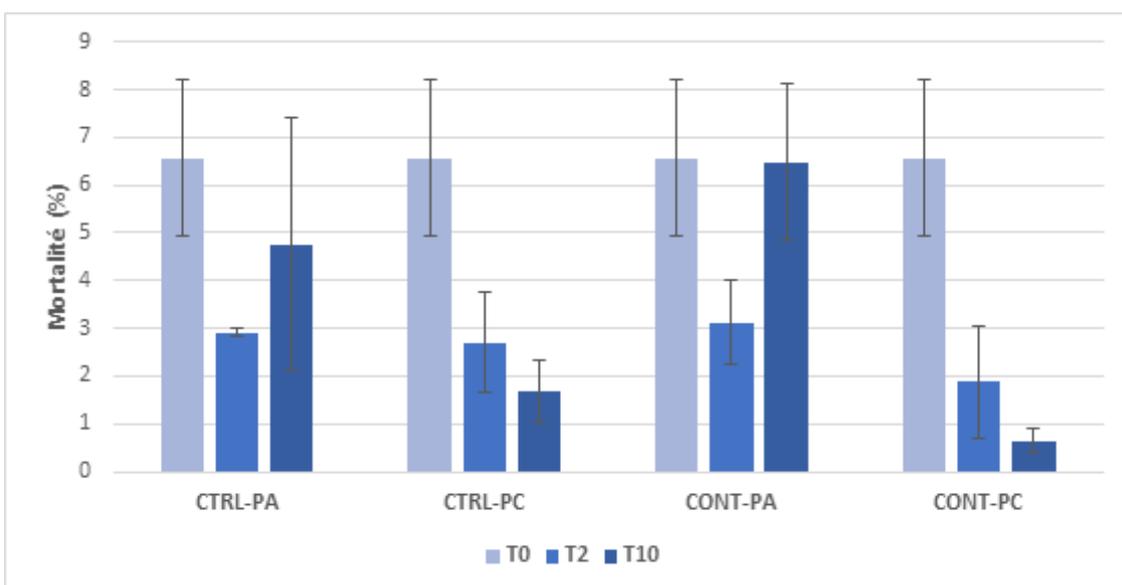


Figure 17: Représentation de la mortalité des diatomées en pourcentage dans les échantillons utilisés pour les analyses photosynthétiques.

La mortalité chez les diatomées reste très faible tout au long de l'expérience. Aucune condition ne semble influencer sur la mortalité (Figure 17).

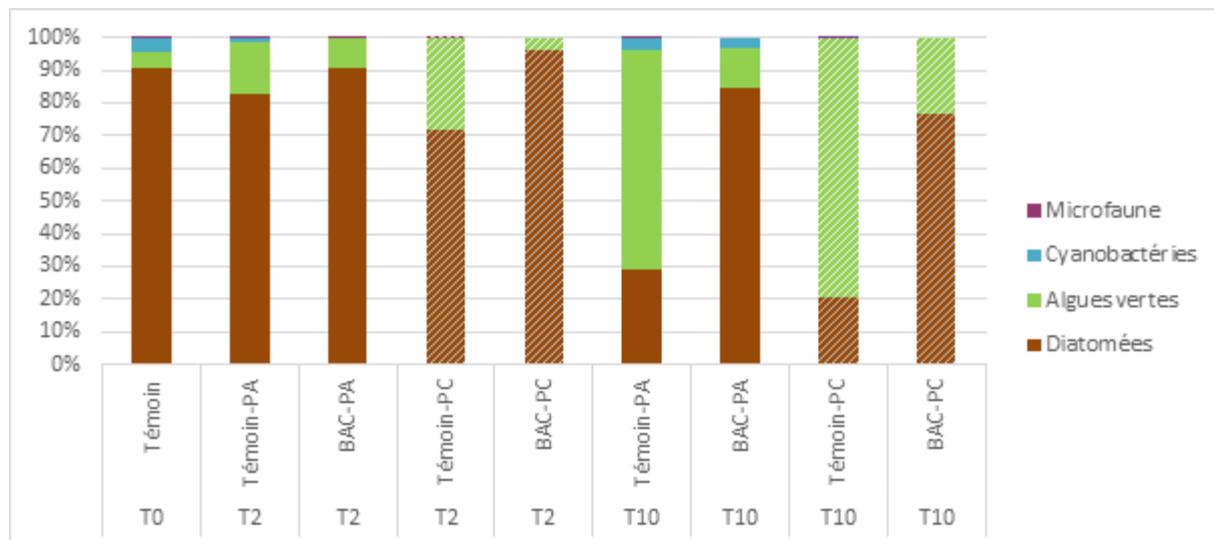


Figure 18: Distribution taxonomique en pourcentage des différentes espèces dans les échantillons de biofilm utilisés pour les analyses d'activité photosynthétique. En hachuré les échantillons ayant été exposés à une photopériode continue et en barres pleines ceux ayant été exposés à une photopériode alternée.

Sur la Figure 18 on peut voir qu'initialement notre biofilm naturel est majoritairement composé de diatomées (90%) et on relève également la présence en faible proportion d'algues vertes, de cyanobactéries et de microfaune. Dans les canaux témoins exposés à une photopériode alternée, on observe un développement important des algues vertes qui finissent par devenir le groupe majoritaire à T10 avec 67% de la densité taxonomique du biofilm. La première observation qu'on peut faire c'est que le BAC 12 semble ralentir la croissance des algues vertes. En effet pour T2 on voit que les proportions en algues vertes augmentent par rapport à T0 mais ce développement des algues vertes est plus important dans les canaux non contaminés. Pour T10, on voit que pour les canaux témoins exposés à une photopériode continue, de la même façon que les canaux témoins PA, les algues vertes sont même devenues le groupe taxonomique majoritaire (79%).

Le second point important à relever sur ce graphique est que pour chaque point de prélèvement (ici T2 et T10). La condition de photopériode continue (en hachurée) présente une densité taxonomique en algues vertes plus importante que la condition de photopériode alternée et cela se vérifie aussi bien dans les canaux contaminés que dans les canaux témoins.

4.5- Effets sur les classes lipidiques

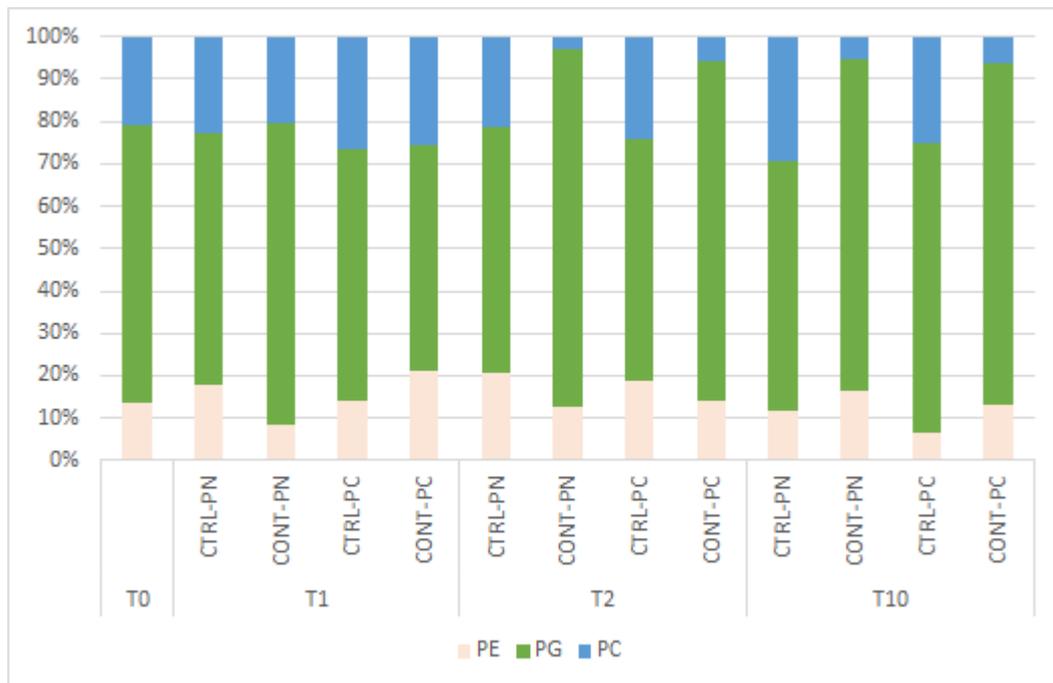


Figure 19: Distribution en pourcentage des différentes classes de phospholipides dans les échantillons.
 PE : Phosphatidyléthanoline. PG : Phosphatidylglycérol. PC : Phosphatidylcholine

Sur la Figure 19, on peut voir qu'au temps de prélèvement initial, on a une dominance de PG dans nos échantillons avec 66% de la proportion en phospholipides. Pour ce qui est de la condition témoin combinée à une photopériode alternée, on n'observe que très peu de changements sur le long de l'expérience. Dans les échantillons contaminés, on observe à partir du temps de prélèvement T2 une chute importante des PC qui passent à une proportion de 3% pour les échantillons sous photopériode alternée et de 6% pour ceux exposés à une photopériode continue. Cette tendance se confirme en fin d'expérience où les proportions en PC restent en dessous des 5%. On note également qu'à T2 et T10 on a une proportion nettement plus élevée en PG dans les échantillons contaminés que dans les échantillons témoins. A T2, pour les échantillons contaminés exposés à une photopériode alternée et continue on a, respectivement, une proportion de 84% et 80% en PG alors que pour les échantillons témoins on a une proportion de 58% et 57%. A T10, cette différence reste du même ordre. Enfin, au temps de prélèvement T10, on observe que les proportions en PE sont supérieures dans les échantillons contaminés.

III- Discussion

5.1- Conditions expérimentales et contamination

Les résultats des différents paramètres majeurs et nutriments dans les différentes conditions nous permettent de dire que ces derniers sont comparables malgré les quelques différences qui sont indépendantes des conditions d'expérimentation mais plutôt à la variabilité naturelle dû au comportement et aux apports des biofilms. Les concentrations en BAC 12 dans les conditions contaminées correspondent aux concentrations nominales. Cependant pour ce qui est de la concentration en BAC 12, on observe une différence significative d'abattement entre les deux conditions lumineuses (ANOVA, $p=0.003$). L'abattement du BAC 12 est plus important dans les canaux exposés à la lumière artificielle continue. Cette différence pourrait être due à une accumulation du contaminant dans la biofilm plus importante dans les conditions de photopériode continue. Les analyses de métabolomique et notamment le dosage du BAC 12 accumulé dans le biofilm nous permettra d'éclaircir ce point et pourrait confirmer ou non le fait que l'accumulation du contaminant, à masse de biofilm égale, pourrait être favorisé par un éclairage continu. Cela pourrait confirmer les travaux de Pozo-Antonio et Sanmartín (2018) qui ont avancé qu'un éclairage artificiel pouvait dégrader les premières couches de protection des biofilms, ce qui pourrait donc augmenter la pénétration du contaminant au sein du biofilm et donc augmenter son accumulation. Une seconde hypothèse pourrait être expliquée par une photodégradation du contaminant mais la littérature manque de données concrètes concernant ce sujet. Certaines études avancent que les biocides peuvent être indirectement photodégradés par des espèces réactives de l'oxygène (Kahrilas et al. 2015). Or, les acides humiques et fulviques, qu'on peut supposer présents dans l'eau du milieu malgré l'absence de mesures directes car l'eau vient d'un étang hypereutrophe et donc connu pour être riche en matière organique dissoute (données du laboratoire, non publiées). Ces acides peuvent être des précurseurs des espèces réactives de l'oxygène tel que le radical hydroxyle ($\text{OH}\cdot$) ou l'ion superoxyde ($\text{O}_2\cdot^-$). On peut donc supposer une production d'espèces réactives supérieure dans les conditions de photopériode continue et donc une photodégradation indirecte du BAC 12 plus élevée dans ces canaux. Cela ne reste qu'une hypothèse et mérite de plus amples travaux pour être confirmé.

5.2- Effet du BAC 12 sur les biofilms

L'influence du BAC 12 sur l'efficacité photosynthétique des microalgues présentes dans le biofilm se fait ressentir dès le premier temps de prélèvement. Les échantillons contaminés, après 48h, présentent une efficacité photosynthétique inférieure à 5% ce qui s'apparente à une absence quasi-totale de photosynthèse. A première vue, nous pourrions expliquer cette absence de photosynthèse par la mort des organismes en effet cette hypothèse avait déjà été avancée par Pérez et al. (2009) qui avaient observé une mortalité de 100% au bout de 7 jours d'exposition pour une culture de diatomées à une concentration de BAC de 10 mg/L. Or, l'observation microscopique que nous avons réalisée ne nous indique qu'une faible mortalité dans ces échantillons, si l'on considère vivants les individus présentant un contenu cellulaire chlorophyllien (Morin et al. 2010). Cette résistance accrue et cette faible mortalité face au contaminant pourraient être expliquées par la présence des couches EPS du biofilm qui agissent comme une protection vis-à-vis du contaminant. En effet, les composés hydrophobes ont tendance à avoir plus de mal à traverser cette matrice de protection riche en

polysaccharides et protéines (Métivier et al. 2013). Pour rappel, notre contaminant est un composé hydrophobe ($\text{LogKow} = 2,93$) et qui a une tendance forte à la sorption ($\text{LogKoc} = 5,43$). De plus amples travaux sont nécessaires pour comprendre la distribution du BAC 12 au sein du biofilm et pouvoir avoir une idée de la fraction de contaminant pouvant atteindre les cellules.

On observe donc une réponse de la partie autotrophe du biofilm avec cette réduction de l'activité photosynthétique. Cette baisse pourrait également être expliquée par l'impact du BAC 12 sur les pigments chlorophylliens, en effet le BAC 12 dégrade fortement ces pigments comme on le voit dans les *Figure 14* et *Figure 16*. Ces résultats suggèrent ainsi une dégradation de l'équipement photosynthétique (chloroplastes) des organismes. Cette dégradation pourrait venir du fait que le BAC 12, en étant capable de pénétrer dans la cellule (Severina et al. 2001), pourrait perturber l'homéostasie interne en interagissant avec les composés anioniques de la cellule et donc interférer indirectement dans le transfert d'électrons nécessaire au mécanisme de la photosynthèse. Une autre hypothèse pourrait être que les organismes diminuent leur activité de photosynthèse dans un objectif de conservation d'énergie pour faire face à ce stress. Cela pourrait expliquer le regain d'activité photosynthétique observée sur la fin de l'expérience et nous laisse nous poser la question de l'existence possible d'une acclimatation et d'un regain de l'activité photosynthétique complet à long terme.

Enfin, les différents groupes algaux ne présentent pas forcément la même sensibilité, d'un côté nous avons les diatomées qui semblent peu affectées d'un point de vue de la croissance et de la mortalité alors que pour les autres groupes algaux, on observe que la croissance est limitée et que certains groupes semblent plus sensible comme les cyanobactéries qui disparaissent totalement du biofilm (voir *Figure 12*). On peut donc parler d'une sélection envers les diatomées. Cependant, Pérez et al. (2009) avaient observé une sensibilité plus prononcée des diatomées de petites tailles ($<10 \mu\text{m}$) ce qui n'a pas été le cas dans notre expérience ou aucune différence majeure de taille n'a été relevé lors de l'observation microscopique. Le BAC 12 a également un impact sur la microfaune (e.g rotifères, tardigrades etc..) qu'il abrite. On voit que cette microfaune disparaît des échantillons dès le temps de prélèvement à 48H.

Le BAC 12 semble également avoir pour effet de modifier les proportions dans les classes lipidiques présentes dans le biofilm (*Figure 19*). Au bout de 10 jours d'expérience on observe une forte diminution de la proportion en PC qui est compensée par une augmentation chez les PE et PG alors que les échantillons témoins ne présentent pas de variations notables dans leur proportion entre phospholipides. Bien que ce comportement des classes lipidiques puisse être une réponse du biofilm face à une attaque membranaire du BAC 12, un travail d'analyse approfondi sur ces résultats et une analyse complémentaire des glycolipides (à venir) sont nécessaires pour avoir une vision globale des changements induits par le BAC 12 et pour pouvoir identifier plus finement quels compartiments du biofilm sont réellement impactés et de quelle manière ils sont impactés.

5.3- Effet de la lumière artificielle nocturne

Dans un premier temps, la condition de photopériode continue ne présente pas d'effets significatifs sur l'activité photosynthétique des organismes autotrophes présents dans notre biofilm. Cependant comme l'ont montré Maggi et al. (2020), la lumière artificielle

nocturne n'impacte pas forcément directement l'efficacité photosynthétique des organismes autotrophes mais peut également créer une variabilité temporelle dans les cycles photosynthétiques. La photosynthèse n'étant pas un mécanisme qui se déroule à 100% de son efficacité sur l'ensemble de la journée, chaque espèce autotrophe possède un profil temporel d'activité photosynthétique qui lui est propre avec des périodes d'activités plus importantes que d'autres. Il est alors possible qu'ici, dans notre expérience ces profils ont pu être modifiés. Malheureusement nos mesures ne permettent pas de mettre cela en évidence et des travaux supplémentaires seraient nécessaires pour comprendre si cette variabilité a pu avoir lieu dans ce type d'exposition et dans quelles mesures cela peut avantager ou nuire à certaines espèces autotrophes.

Cependant, la figure 12 montre que la condition de photopériode continue favorise la croissance et le développement des algues vertes. En effet, on voit que la densité de ce groupe algal augmente dans les échantillons exposés à une lumière nocturne, qu'il soit contaminé ou non. Or, comme l'ont démontré Brett et Müller-Navarra (1997), les algues vertes présentent un apport plus faible en acides gras polyinsaturés tel que les oméga-3 ou oméga-6. Donc ce changement de composition algale implique donc un changement dans la qualité nutritive du biofilm. Il serait intéressant d'approfondir les travaux concernant ces changements et il pourrait être important d'identifier les espèces algales qui sont favorisées par cette condition de lumière continue. En effet, si des espèces de microalgues invasives sont favorisées par cette exposition lumineuse cela pourrait mener à des effets néfastes indirects de compétition et de sélection dans les communautés algales qui se développent dans des milieux exposés à la lumière artificielle nocturne.

A première vue des résultats présentés dans la *Figure 19*, la lumière artificielle nocturne ne semble pas apporter de modifications sur les proportions de phospholipides dans notre biofilm.

5.3- Effet conjugués du BAC 12 et de l'ALAN

Les deux stress, à première vue, ne semblent pas présenter d'effets synergiques sur les différents paramètres observés. Bien qu'il soit possible que la lumière artificielle nocturne favorise l'accumulation et la distribution du BAC 12 dans le biofilm en dégradant les couches de protection comme suggéré un peu plus tôt dans la discussion (voir section 5.1- *Conditions expérimentales et contamination*) mais les résultats des analyses métabolomiques à venir seront nécessaires pour pouvoir affirmer ou infirmer cette hypothèse.

Il semblerait plutôt qu'il existe un effet antagoniste comme on le voit dans la figure 14 avec d'un côté le BAC 12 qui semble limiter la croissance et la prolifération des algues vertes, et de l'autre la lumière artificielle nocturne, quant à elle, semble avoir l'effet inverse et favorise le développement et la croissance de ces mêmes algues vertes.

IV- Conclusion et perspectives

Pour conclure, nous avons pu voir au travers de ces expériences que le BAC 12 a un effet néfaste pour le métabolisme des biofilms naturels. Tout d'abord sur le fonctionnement direct de ces derniers avec une atteinte à la qualité et à la quantité des pigments photosynthétiques. Ce qui va, par conséquent, impliquer des effets importants sur l'efficacité photosynthétique des cellules végétales dans le biofilm. Mais également sur la structure même du biofilm avec des changements dans la composition de ce dernier. En effet le BAC 12 a une tendance à sélectionner les diatomées et à limiter le développement des autres groupes algaux et de la microfaune peuplant le biofilm. La lumière artificielle nocturne de son côté n'a d'impact uniquement que sur la structure du biofilm et plus particulièrement la composition algale du biofilm. Le développement des algues vertes semble favorisé sous photopériode continue et donc présentent une tendance à la prolifération et à prendre le dessus sur les diatomées pour devenir le groupe algal majoritaire dans le biofilm. Ce changement peut mener à une modification de la composition en lipides du biofilm et donc aux apports nutritifs du biofilm. Les deux stress semblent présenter un effet antagoniste sur l'évolution de la composition algale du biofilm : le BAC 12 semble favoriser le développement des algues vertes alors que le BAC 12 tend à le limiter.

Les perspectives pour le projet seront tout d'abord d'achever les différentes analyses lipidomiques et métabolomiques qui viendront compléter les résultats déjà obtenus et de confirmer ou non certaines des hypothèses qui ont pu être émises lors de la discussion. Ces analyses complémentaires nous permettront non seulement de pouvoir identifier de potentiels modifications dans les compositions en lipides et la réponse des organismes face au stress que représente le BAC 12 mais également d'étudier la bioaccumulation en BAC 12 dans le biofilm qui pourrait mettre en évidence un potentiel effet synergique des deux stress. La suite du projet sera d'étudier, au travers d'une expérience de transfert trophique qui sera réalisée à l'INRS, s'il existe un transfert du contaminant le long de la chaîne trophique et s'il existe une modification de la composition en acides gras (en particulier essentiels) chez les brouteurs exposés à du biofilm contaminé.

Bibliographie

- Abbott, T.; Kor-Bicakci, G.; Islam, M.S.; Eskicioglu, C. 2020. A Review on the Fate of Legacy and Alternative Antimicrobials and Their Metabolites during Wastewater and Sludge Treatment. *International Journal of Molecular Sciences* 21: 9241.
- Antunes, S.C.; Nunes, B.; Rodrigues, S.; Nunes, R.; Fernandes, J.; Correia, A.T. 2016. Effects of chronic exposure to benzalkonium chloride in *Oncorhynchus mykiss*: cholinergic neurotoxicity, oxidative stress, peroxidative damage and genotoxicity. *Environmental Toxicology and Pharmacology* 45: 115–122.
- Beveridge, C.M.; Parr, A.C.S.; Smith, M.J.; Kerr, A.; Cowling, M.J.; Hodgkiess, T. 1998. The effect of benzalkonium chloride concentration on nine species of marine diatom. *Environmental Pollution* 103: 31–36.
- Brett, M.; Müller-Navarra, D. 1997. The role of highly unsaturated fatty acids in aquatic foodweb processes. *Freshwater Biology* 38: 483–499.
- Chaumet, B. 2018. *Transfert et distribution des pesticides dans les biofilms en lien avec les effets toxiques associés*. phdthesis, Université de Bordeaux, 284p, (<https://tel.archives-ouvertes.fr/tel-02410777>).
- Cinzano, P.; Falchi, F.; Elvidge, C.D. 2001. The first World Atlas of the artificial night sky brightness. *Monthly Notices of the Royal Astronomical Society* 328: 689–707.
- Clara, M.; Scharf, S.; Scheffknecht, C.; Gans, O. 2007. Occurrence of selected surfactants in untreated and treated sewage. *Water Research* 41: 4339–4348.
- Daull, P.; Lallemand, F.; Garrigue, J.-S. 2013. Benefits of cetalkonium chloride cationic oilinwater nanoemulsions for topical ophthalmic drug delivery. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*: 11.
- DeLeo, P.C.; Huynh, C.; Pattanayek, M.; Schmid, K.C.; Pechacek, N. 2020. Assessment of ecological hazards and environmental fate of disinfectant quaternary ammonium compounds. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 206: 111116.
- Eich, J.; Dürholt, H.; Steger-Hartmann, T.; Wagner, E. 2000. Specific Detection of Membrane-Toxic Substances with a Conductivity Assay. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 45: 228–235.
- Elersek, T.; Ženko, M.; Filipič, M. 2018. Ecotoxicity of disinfectant benzalkonium chloride and its mixture with antineoplastic drug 5-fluorouracil towards alga *Pseudokirchneriella subcapitata*. *PeerJ* 6: e4986.
- Grillitsch, B.; Gans, O.; Kreuzinger, N.; Scharf, S.; Uhl, M.; Fuerhacker, M. 2006. Environmental risk assessment for quaternary ammonium compounds: a case study from Austria. *Water Science and Technology* 54: 111–118.
- Grubisic, M.; Singer, G.; Bruno, M.C.; Grunsven, R.H.A. van; Manfrin, A.; Monaghan, M.T.; et al. 2017. Artificial light at night decreases biomass and alters community composition of benthic primary producers in a sub-alpine stream. *Limnology and Oceanography* 62: 2799–2810.
- Heuskin, S.; Verheggen, F.; Haubruge, E.; Wathelet, J.-P.; Lognay, G. 2011. The use of semiochemical slow-release devices in integrated pest management strategies. *Biotechnologie Agronomie Société Environnement* 15: 459–470
- Hora, P.I.; Pati, S.G.; McNamara, P.J.; Arnold, W.A. 2020. Increased Use of Quaternary Ammonium Compounds during the SARS-CoV-2 Pandemic and Beyond: Consideration of Environmental Implications. *Environmental Science & Technology Letters* 7: 622–631.
- Kahrilas, G.A.; Blotevogel, J.; Stewart, P.S.; Borch, T. 2015. Biocides in Hydraulic Fracturing Fluids: A Critical Review of Their Usage, Mobility, Degradation, and Toxicity. *Environmental Science & Technology* 49: 16–32.

- Kim, M.; Hatt, J.K.; Weigand, M.R.; Krishnan, R.; Pavlostathis, S.G.; Konstantinidis, K.T. 2018. Genomic and Transcriptomic Insights into How Bacteria Withstand High Concentrations of Benzalkonium Chloride Biocides. *Applied and Environmental Microbiology* 84.
- Kreuzinger, N.; Fuerhacker, M.; Grillitsch, B.; Scharf, S.; Uhl, M.; Gans, O. 2007. Methodological approach towards the environmental significance of uncharacterized substances — quaternary ammonium compounds as an example. *Desalination* 215: 209–222.
- Kümmerer, K.; Eitel, A.; Braun, U.; Hubner, P.; Daschner, F.; Mascart, G.; et al. 1997. Analysis of benzalkonium chloride in the effluent from European hospitals by solid-phase extraction and high-performance liquid chromatography with post-column ion-pairing and fluorescence detection. *Journal of Chromatography A* 774: 281–286.
- Leal, J.; Gonzalez, J.J.; Kaiser, K.L.E; Palabrica, V.S.; Comelles, F.; Garcia, M.T 1994. On the toxicity and biodegradation of cationic surfactants. *Acta hydrochim. hydrobiol* 22: 13-18.
- Longcore, T.; Rich, C. 2004. Ecological light pollution. *Frontiers in Ecology and the Environment* 2: 191–198.
- Lorenzen, C.J. 1967. Determination of Chlorophyll and Pheo-Pigments: Spectrophotometric Equations¹. *Limnology and Oceanography* 12: 343–346.
- Madsen, T.; Boyd, H.; Nylén, D.; Pedersen, A.; Petersen, G.; Simonsen, F. 2001. Environmental and Health Assessment of Substances in Household Detergents and Cosmetic Detergent Products. *Dan. Environ. Protect. Agency Rep.* 615.
- Maggi, E.; Serôdio, J. 2020. Artificial Light at Night: A New Challenge in Microphytobenthos Research. *Frontiers in Marine Science* 7. 329
- Maggi, E.; Bertocci, I.; Benedetti-Cecchi, L. 2020. Light pollution enhances temporal variability of photosynthetic activity in mature and developing biofilm. *Hydrobiologia* 847: 1793–1802.
- Martínez-Carballo, E.; Sitka, A.; González-Barreiro, C.; Kreuzinger, N.; Fürhacker, M.; Scharf, S.; et al. 2007. Determination of selected quaternary ammonium compounds by liquid chromatography with mass spectrometry. Part I. Application to surface, waste and indirect discharge water samples in Austria. *Environmental Pollution* 145: 489–496.
- Merchel Piovesan Pereira, B.; Tagkopoulos, I. a. Benzalkonium Chlorides: Uses, Regulatory Status, and Microbial Resistance. *Applied and Environmental Microbiology* 85: e00377-19.
- Merchel Piovesan Pereira, B.; Tagkopoulos, I. b. Benzalkonium Chlorides: Uses, Regulatory Status, and Microbial Resistance. *Applied and Environmental Microbiology* 85: e00377-19.
- 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: 7275–7285.
- Morin, S.; Proia, L.; Ricart, M.; Bonnineau, C.; Geislinger, A.; Ricciardi, F.; et al. 2010. Effects of a bactericide on the structure and survival of benthic diatom communities. *Vie et Milieu / Life & Environment* 60: 109.
- Patrauchan, M.A.; Oriel, P.J. 2003. Degradation of benzyldimethylalkylammonium chloride by *Aeromonas hydrophila* sp. K. *Journal of Applied Microbiology* 94: 266–272.
- Pérez, P.; Fernández, E.; Beiras, R. 2009. Toxicity of Benzalkonium Chloride on Monoalgal Cultures and Natural Assemblages of Marine Phytoplankton. *Water, Air, and Soil Pollution* 201: 319–330.
- Perkin, E.K.; Hölker, F.; Richardson, J.S.; Sadler, J.P.; Wolter, C.; Tockner, K. 2011. The influence of artificial light on stream and riparian ecosystems: questions, challenges, and perspectives. *Ecosphere* 2: art122.

- Pozo-Antonio, J.S.; Sanmartín, P. 2018. Exposure to artificial daylight or UV irradiation (A, B or C) prior to chemical cleaning: an effective combination for removing phototrophs from granite. *Biofouling* 34: 851–869.
- Rabenau, H.F.; Kampf, G.; Cinatl, J.; Doerr, H.W. 2005. Efficacy of various disinfectants against SARS coronavirus. *Journal of Hospital Infection* 61: 107–111.
- Sakagami, Y.; Yokoyama, H.; Nishimura, H.; Ose, Y.; Tashima, T. 1989. Mechanism of resistance to benzalkonium chloride by *Pseudomonas aeruginosa*. *Applied and Environmental Microbiology* 55: 2036–2040.
- Severina, I.I.; Muntyan, M.S.; Lewis, K.; Skulachev, V.P. 2001. Transfer of Cationic Antibacterial Agents Berberine, Palmatine, and Benzalkonium Through Bimolecular Planar Phospholipid Film and *Staphylococcus aureus* Membrane. *IUBMB Life* 52: 321–324.
- Sreevidya, V.S.; Lenz, K.A.; Svoboda, K.R.; Ma, H. 2018. Benzalkonium chloride, benzethonium chloride, and chloroxylenol - Three replacement antimicrobials are more toxic than triclosan and triclocarban in two model organisms. *Environmental Pollution* 235: 814–824.
- Stevens, R.G.; Zhu, Y. 2015. Electric light, particularly at night, disrupts human circadian rhythmicity: is that a problem? *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences* 370: 20140120.
- Sütterlin, H.; Alexy, R.; Kümmerer, K. 2008. The toxicity of the quaternary ammonium compound benzalkonium chloride alone and in mixtures with other anionic compounds to bacteria in test systems with *Vibrio fischeri* and *Pseudomonas putida*. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 71: 498–505.
- Waller, D.L.; Fisher, S.W.; Dabrowska, H. 1996. Prevention of Zebra Mussel Infestation and Dispersal during Aquaculture Operations. *The Progressive Fish-Culturist* 58: 77–84.
- Zhu, X.; Wang, Z.; Sun, Y.; Gu, L.; Wang, J.; Huang, Y.; Yang, Z. 2020. Surfactants at environmentally relevant concentrations interfere the inducible defense of *Scenedesmus obliquus* and the implications for ecological risk assesment. *Environmental Pollution* 261:114131
- Radiant Insights. 2015. *Biocides Market Analysis, Size, Share, Industry Report 2022*. (<https://www.radiantinsights.com/research/biocides-market>). Accessed on 12 Feb. 2021.
- Merck | France. (<https://www.sigmaaldrich.com/FR/en>). Accessed on 20 Jun. 2021.
- Buckley, T. 2020. *Lysol Sales Are Surging*. BloombergQuint. (<https://www.bloombergquint.com/markets/lysol-maker-reckitt-benckiser-raises-outlook-after-sales-surge>). Accessed on 19 Feb. 2021.
- United States Environmental Protection Agency 2006. *Reregistration eligibility decision for alkyl dimethyl benzyl ammonium chloride*. (<https://nepis.epa.gov>). Accessed on 17 Feb. 2021.
- European Chemical Agency 2015. *Directive 98/8/EC concerning the placing biocidal products on the market*. (<https://echa.europa.eu>). Accessed on 20 Feb. 2021.
- European Food Safety Authority 2013. *Evaluation of monitoring data on residues of DDAC and BACs in food*. <https://www.efsa.europa.eu/en/supporting/pub/en-483>). Accessed on 17 Feb. 2021
- NASA/JSC. 2011 *Northwestern Europe at Night*. (<https://eol.jsc.nasa.gov/Collections/EarthObservatory/articles/NorthwesternEuropeAtNight.htm>). Accessed on 25 Feb. 2021.
- REGTOX. (http://www.normalesup.org/~vindimian/fr_download.html). Accessed on 27 Jun. 2021.

Annexes :

ANNEXE 1

Tableau des CE₅₀ recensées dans la littérature pour des organismes aquatiques, triées par ordre croissant de sensibilité des taxons

	Organismes	Espèce	CE50 (mg/L)	Durée d'expo (h)	Descripteur	Référence
1	Invertébrés	<i>Daphnia magna</i>	0,0058	48	NA	(US EPA 2006)
2	Invertébrés	<i>Daphnia magna</i>	0,016	48	Immobilisation	(Kreuzinger et al. 2007)
3	Invertébrés	<i>Daphnia magna</i>	0,024	48	Reproduction	(Kreuzinger et al. 2007)Leal et al 1994
4	Invertébrés	<i>Daphnia magna</i>	0,038	48	Immobilisation	(ECHA 2015)
5	Invertébrés	<i>Daphnia magna</i>	0,041	48	Immobilisation	(ECHA 2015)
6	Microalgues	<i>Pseudokirchnerellia subcapitata</i>	0,041	72	Croissance	(US EPA 2006)
7	Microalgues	<i>Pseudokirchnerellia subcapitata</i>	0,049	72	NA	(Zhu et al 2010)
8	Diatomée	<i>Skeletonema costatum</i>	0,058	96	Biomasse	(Kreuzinger et al. 2007)
9	Microalgues	<i>Isochrysis galbana</i>	0,075	72	Fluorescence	(ECHA 2015)
10	Microalgues	<i>Euglena gracilis</i>	0,106	72	Fluorescence	(Pérez et al. 2009)
11	Invertébrés	<i>Daphnia magna</i>	0,11	NA	NA	(Pérez et al. 2009)
12	Microalgues	<i>Isochrysis galbana</i>	0,111	48	Fluorescence	(Pérez et al. 2009)
13	Rotifères	<i>Brachionus calcyflorus</i>	0,125	48	Croissance	(Kreuzinger et al. 2007)
14	Microalgues	<i>Chlorella pyrenoidosa</i>	0,18	NA	NA	(Kreuzinger et al. 2007)
15	Microalgues	<i>Chlorella vulgaris</i>	0,203	96	Croissance	(Sütterlin et al. 2008)
16	Invertébrés	<i>Ceriodaphnia dubia</i>	0,404	24	Mortalité	(Sütterlin et al. 2008)
17	Bactéries	<i>Aliivibrio fischeri</i>	0,5	0,5	Luminescence	(Leal et al 1994)
18	Protozoaires	<i>Tetrahymena thermophila</i>	2,941	24	Croissance	(US EPA 2006)
19	Bactéries	<i>Pseudomonas putida</i>	6	16	Croissance	(Kreuzinger et al. 2007)

ANNEXE 2

Cartographie des intensités lumineuses mesurées dans les canaux (µmol/m²/s).

	CONTRÔLE LN			CONTAMINE LN			CONTRÔLE LC			CONTAMINE LC		
	Canal gauche	Canal milieu	Canal droit	Canal gauche	Canal milieu	Canal droit	Canal gauche	Canal milieu	Canal droit	Canal gauche	Canal milieu	Canal droit
Haut	24,25	26,03	26,56	27,6	27,51	24,84	22,53	24,53	25,22	26,04	24,38	22,98
Milieu	23,94	28,95	30,56	31,17	27,35	28,06	22,76	21,95	26,06	25,78	25,23	23,2
Bas	21,46	22,05	29,13	29,98	29,98	26,36	20,3	20,22	23,08	24,1	23,68	21,21

ANNEXE 3

Protocole d'extraction pour les analyses lipidomiques.

Principe :

Le but de cette manipulation est de pouvoir extraire d'un échantillon les métabolites lipophiles d'une part et les métabolites hydrophiles d'autre part. Pour se faire nous allons procéder à une première séparation liquide-solide suivi d'une deuxième séparation liquide-liquide. Nous allons utiliser deux solvants d'extraction : Un mélange méthyl ter-butyl éther (MTBE)-méthanol (MeOH) (3 : 1) qui aura une affinité avec les métabolites lipophiles et un mélange Eau Ultra Pure (EUP)-MeOH (3 : 1) qui aura, lui, une affinité avec les métabolites hydrophiles. Les étalons internes (EI) utilisés seront du BAC 12 deutéré qui nous permettra de quantifier le BAC 12 bioaccumulé dans le biofilm et du phosphatidylcholine (PC 17 :0) qui nous servira d'EI pour les analyses des lipides

Matériel :

Verrerie (tubes, vials, béciers préalablement désinfecté/nettoyer) – micropipettes – FastPrep – centrifugeuse – support à échantillons – balance de précision congélateur -80°C – glace -solvants - étalons internes-microbilles

Manipulation :

- *Prévoir de mettre des supports à échantillons au congélateur et de préparer des bacs de glaçons et pour garder les solutions au frais. Toujours manipuler les échantillons dans ces bacs.*
- *Bien identifier tous les tubes et vials.*
- *Si nécessaire, passer les étalons internes au bain à ultrason pour bien les homogénéiser.*

Préparation des solvants et échantillons :

- Préparer au préalable les 2 solvants MTBE-MeOH (3 : 1) et EUP-MeOH (3 : 1) (en volume).
- Ajouter et peser 150±10mg de microbilles dans chaque tube. Ajouter et peser également, pour chaque tube, la masse d'échantillon prévue (20 mg) (sauf pour le tube blank qui ne contient que des billes et le tube blind qui ne contient que les billes et les étalons internes)
- Peser préalablement les vials vides (et avec bouchons) pour pouvoir effectuer le suivi gravimétrique.

1^{ère} séparation :

- *Commencer dans un premier temps par lancer le « Fast Temp » (refroidissement) de la centrifugeuse*
- Ajouter les étalons internes.
- Ajouter 1mL du solvant EUP-MeOH dans chaque échantillon. Passer ensuite sur un premier cycle du FastPrep puis mettre les échantillons à refroidir au congélateur pendant 3 min.
- Repasser les échantillons à un second cycle de FastPrep puis remettre les échantillons à refroidir au congélateur à -80°C pendant 3 min.
- Ajouter dans chaque tube 650µL du solvant MTBE-MeOH
- Effectuer un dernier cycle de FastPrep.
- Sans attendre, mettre les échantillons dans la centrifugeuse et lancer le cycle. Bien équilibrer les échantillons dans la centrifugeuse.

Prélèvement des phases :

Après la première séparation on obtient des échantillons qui présente deux phases distinctes : la phase lipophile au-dessus, la phase hydrophile en dessous et le culot sur le fond du tube.

- On récupère 500 µL de la phase lipophile qu'on vient verser dans les vials prévus à cet effet.

- Enfin, on récupère 600 μL de la phase hydrophile qu'on vient également reverser dans les vials correspondant.

2^{ème} séparation :

Suivre le même protocole que la 1^{ère} séparation avec cette fois ci 700 μL du solvant EUP-MeOH puis, après les 2 cycles de FastPrep, ajouter 450 μL du solvant MTBE-MeOH.

Prélèvement des phases :

- Récupérer 600 μL de la phase lipophile et rajouter ce volume dans les vials utilisés précédemment pour la phase lipophile.
- Récupérer 700 μL de la phase hydrophile qu'on rajoutera dans les vials utilisés précédemment pour la partie hydrophile.

Pour finir, peser à la balance de précisions l'ensemble des vials pour pouvoir effectuer le suivi gravimétrique puis conserver les microtubes avec le culot pour dosage éventuel des protéines totales et vials avec les extraits au congélateur à -80°C . dans des boites correctement identifiées.