



HAL
open science

Etude du potentiel écotoxicologique des azurants optiques, du glyphosate et de son principal produit de dégradation sur les communautés microbiennes aquatiques : une approche multi-descripteurs

Antoine Turret

► To cite this version:

Antoine Turret. Etude du potentiel écotoxicologique des azurants optiques, du glyphosate et de son principal produit de dégradation sur les communautés microbiennes aquatiques : une approche multi-descripteurs. Sciences de l'environnement. 2023. hal-04353058

HAL Id: hal-04353058

<https://hal.inrae.fr/hal-04353058>

Submitted on 19 Dec 2023

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.



HAL
open science

Etude du potentiel écotoxicologique des azurants optiques, du glyphosate et de son principal produit de dégradation sur les communautés microbiennes aquatiques : une approche multi-descripteurs

Antoine Turret

► To cite this version:

Antoine Turret. Etude du potentiel écotoxicologique des azurants optiques, du glyphosate et de son principal produit de dégradation sur les communautés microbiennes aquatiques : une approche multi-descripteurs. INRAE - EABX. 2023, 61 p. hal-04216585

HAL Id: hal-04216585

<https://hal.inrae.fr/hal-04216585>

Submitted on 25 Sep 2023

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.

Études du potentiel écotoxicologique des azurants optiques, du glyphosate et de son principal produit de dégradation sur les communautés microbiennes aquatiques : une approche multi-descripteurs

Mémoire de stage de deuxième année de master

Présenté par

Antoine TOURRET

Etudiant en bidiplomation de master écotoxicologie et chimie de l'environnement parcours
MOBBIDIQ (Bordeaux) et en maîtrise en sciences de l'eau (Québec)

Responsable de stage : Chloé BONNINEAU

Directrice de maîtrise : Isabelle LAVOIE

Co-responsable de maîtrise : Philippe JUNEAU, Soizic MORIN

Rapporteur de stage : Anne CRÉMAZY

Date du stage : 4 janvier 2023 – 4 juillet 2023

Remerciements

Je tiens à remercier chaleureusement dans un premier temps mon encadrante de stage à l'INRAE, Chloé BONNINEAU. Merci pour m'avoir accompagné, pour m'avoir guidé et conseillé tout au long de ce stage. Ton organisation, ta façon d'aborder et de voir les choses m'ont beaucoup apporté. Je remercie également au passage ma co-directrice Soizic MORIN pour m'avoir aidé à différencier des algues vertes et des cyanobactéries (et des bactéries) au microscope optique. Je remercie ensuite Nicolas CREUSOT. Je te remercie d'avoir participé à une partie de mon encadrement. Ton expertise m'a également guidé au cours de l'élaboration de ce projet. Je remercie Nicolas Mazzella pour m'avoir aidé dans le traitement de données de la lipidomique dans la joie et la bonne humeur ! Je souhaite ensuite remercier Aurélie MOREIRA et Déborah MILLAN NAVARRO (team bebew biomar' ou pas ?) pour leur sympathie, leur bonne humeur et leur disponibilité en tout temps. Je remercie grandement Romaric LE BARH pour l'aide que tu nous as apporté lors des changements d'eau. Merci pour les « tips » que tu m'as donné, notamment sur les méthodes de siphonage manuelles. Je remercie également Mélissa EON pour m'avoir donné cette formation express mais efficace sur les méthodes d'extraction pour la lipidomique. Je remercie également Sylvia MOREIRA pour tes conseils et tes explications sur le développement des cultures d'algues. Je remercie le doctorant Arthur MEDINA pour avoir accepté de me prêter volontiers son waders, m'ayant ainsi permis d'aller nager dans l'étang plusieurs fois par semaine (même si pour la taille des pieds c'était limite). Je remercie la stagiaire Maëlle BAILLERGEAU, qui a travaillé sur le même design expérimental que moi. Merci pour cette bonne humeur quotidienne, malgré une charge de travail importante. Tu es de loin le meilleur binôme de stage que j'ai pu connaître Je remercie le directeur du projet dans lequel ma maîtrise de recherche s'insère, Martin LAVIALE. Nous avons bien avancé sur l'état des lieux de mes travaux de recherche depuis Québec. Enfin, je remercie ma famille, Marlène EXERTIER, Jean-Robert TOURET et Rodolphe ECHARD, pour le soutien qu'ils m'ont et m'apportent au quotidien dans les projets que j'entreprends.

Table des matières

| | | |
|-------|---|----|
| 1 | Introduction..... | 1 |
| 2 | Synthèse bibliographique..... | 2 |
| 2.1 | Rappel sur les azurants optiques..... | 2 |
| 2.1.1 | La découverte des azurants optiques et leur utilisation..... | 2 |
| 2.1.2 | L'occurrence environnementale des azurants optiques..... | 3 |
| 2.1.3 | L'écotoxicité des azurants optiques..... | 4 |
| 2.2 | La contamination ubiquiste des écosystèmes aquatiques par le glyphosate..... | 5 |
| 2.2.1 | La découverte du glyphosate et son utilisation..... | 5 |
| 2.2.2 | L'écotoxicité du glyphosate..... | 8 |
| 2.3 | L'évaluation de la toxicité des contaminants organiques au sein des écosystèmes aquatiques..... | 9 |
| 2.3.1 | Les tests standardisés OCDE : une approche simpliste..... | 9 |
| 2.3.2 | Les tests non standardisés : une approche plus complexe..... | 9 |
| 2.4 | Objectifs et hypothèses..... | 11 |
| 3 | Matériels et méthodes..... | 12 |
| 3.1 | Le choix des molécules et la préparation des solutions..... | 12 |
| 3.1.1 | Culture de <i>Scenedesmus costatus</i> | 13 |
| 3.1.2 | La colonisation du biofilm..... | 14 |
| 3.2 | Les tests de toxicité aiguë..... | 15 |
| 3.3 | Les tests de toxicité chronique..... | 15 |
| 3.4 | Chimie analytique..... | 17 |
| 3.4.1 | Mesures des paramètres physico-chimiques..... | 17 |
| 3.4.2 | Dosage des nutriments dans l'eau..... | 17 |
| 3.4.3 | Dosage du DAST dans l'eau..... | 17 |
| 3.4.4 | Dosage du glyphosate et de l'AMPA dans l'eau..... | 18 |
| 3.5 | Les descripteurs biologiques..... | 18 |
| 3.5.1 | La teneur en chlorophylle-a..... | 18 |
| 3.5.2 | Le poids net de cendres (AFDW)..... | 19 |
| 3.5.3 | Les groupes algaux..... | 19 |
| 3.5.4 | L'activité photosynthétique..... | 19 |
| 3.5.5 | Les activités enzymatiques hétérotrophes..... | 20 |
| 3.5.6 | La tolérance du biofilm au DAST (PICT)..... | 20 |
| 3.5.7 | La lipidomique..... | 21 |
| 3.5.8 | La dégradation de la matière organique..... | 22 |
| 3.6 | Les analyses statistiques..... | 22 |

| | | |
|-------------|--|----|
| 4 | Résultats | 22 |
| 4.1 | Les tests de toxicité aiguë..... | 22 |
| 4.2 | Les tests de toxicité chronique | 24 |
| 4.2.1 | Les mesures physico-chimiques..... | 24 |
| 4.2.2 | Les paramètres majeurs..... | 24 |
| 4.2.3 | Les concentrations en DAST..... | 25 |
| 4.2.4 | Caractérisation des cultures de biofilm..... | 25 |
| 4.2.4.1 | Evolution de la structure de biofilm..... | 25 |
| 4.2.4.1.1 | Teneur en chlorophylle-a | 25 |
| 4.2.4.1.2 | Le poids net de cendres (AFDW)..... | 26 |
| 4.2.4.1.3 | Les groupes algaux..... | 27 |
| 4.2.4.2 | Evolution de la fonctionnalité du biofilm | 28 |
| 4.2.4.2.1 | L'activité photosynthétique | 28 |
| 4.2.4.2.1.1 | Le rendement quantique maximal | 28 |
| 4.2.4.2.1.2 | Le quenching non photochimique maximal | 29 |
| 4.2.4.2.1.3 | Le transport d'électron relatif | 30 |
| 4.2.4.2.2 | Les activités enzymatiques | 31 |
| 4.2.4.2.3 | La tolérance du biofilm au DAST | 32 |
| 4.2.4.2.4 | La lipidomique..... | 33 |
| 5 | Discussion | 36 |
| 5.1 | Toxicité aiguë | 36 |
| 5.2 | Toxicité chronique | 36 |
| 5.2.1 | La croissance du biofilm..... | 36 |
| 5.2.2 | La composition des communautés microbiennes..... | 38 |
| 5.2.3 | Les fonctions des communautés microbiennes aquatiques | 39 |
| 5.2.4 | La stabilité des communautés microbiennes aquatiques en tant que ressource | 41 |
| 6 | Conclusion | 42 |
| 7 | Références..... | 44 |
| 8 | Annexes..... | 50 |

Liste des tableaux

| | |
|--|----|
| Tableau 1 Synthèse des différentes valeurs de concentrations environnementales maximales en azurants optiques recensées dans plusieurs pays. *données non-publiées issues des travaux de Marie-Noëlle PONS dans le cadre du projet PESTINTER. ----- | 4 |
| Tableau 2 Résumé des différentes conditions testées lors de l'exposition longue ----- | 17 |
| Tableau 3 Synthèse de tous les descripteurs étudiés lors de l'exposition chronique pour chaque pas de temps. La manière dont ces descripteurs ont été mesurés et analysés est décrite dans les sections sous-jacentes. Les lettres O et N signifient « Oui » et « Non ». ----- | 18 |
| Tableau 4 Récapitulatif des différentes valeurs de CE ₅₀ calculées (en gras) (ainsi que les intervalles de confiance à 95% indiqués en italique) pour <i>Scenedesmus costatus</i> et une culture de biofilm exposées à trois azurants optiques : le DAST, le FWA-393 et le FB-220. GLU = β -glucosidase, LEU = leucine-aminopeptidase, PHO = phosphatase. Les valeurs sont en mg L ⁻¹ . N.D = Non Déterminée. ----- | 23 |
| Tableau 5 Moyenne des conditions physico-chimiques issues de l'ensemble des mesures réalisées au cours des 28 jours d'exposition, n = 54. ----- | 24 |
| Tableau 6 Moyenne des concentrations en nutriments issues de l'ensemble des mesures réalisées au cours des 28 jours d'exposition, n = 120. ----- | 24 |
| Tableau 7 Moyenne des concentrations en DAST issues de l'ensemble des dosages réalisés au cours des 28 jours d'exposition dans les différents traitements (n = 24 pour chaque traitement). Les valeurs sont en $\mu\text{g L}^{-1}$. ----- | 25 |
| Tableau 8 Récapitulatif des différentes valeurs de CE ₅₀ (en gras) calculées sur l'activité de la β -glucosidase, ainsi que les intervalles de confiance 95% (en italique) des biofilms échantillonnés après 14 et 28 jours dans les canaux puis exposés pendant 4-h à une gamme de concentration en DAST croissante.----- | 32 |

Liste des figures

| | |
|---|----|
| Figure 1 Fluorescence d'azurants optiques contenus dans un bécher, exposés à des rayonnements ultra-violet (Source : Antoine TOURRET)..... | 3 |
| Figure 2 Evolution des quantités de glyphosate utilisées (en millions de kg) au cours des 40 dernières années aux Etats-Unis (Benbrook, 2016). | 6 |
| Figure 3 Concentrations maximales de glyphosate ($\mu\text{g L}^{-1}$) répertoriées au sein d'écosystèmes aquatiques d'eaux douces pour 21 pays. Les chiffres/nombres indiqués par les flèches noires correspondent aux concentrations maximales autorisées dans l'environnement pour chaque pays (Brovini et al., 2021). | 7 |
| Figure 4 Illustration des différents microorganismes présents au sein d'un biofilm (Source : Laura MALBEZIN). | 10 |
| Figure 5 Structures topologiques des trois azurants optiques commandés (de gauche à droite : FB-220, DAST, FWA-393). | 12 |
| Figure 6 Structures topologiques du glyphosate (à gauche) et de son principal produit de dégradation, l'AMPA (à droite)..... | 13 |
| Figure 7 Illustration des cultures de <i>Scenedesce mus costatus</i> et de la procédure de repiquage. | 14 |
| Figure 8 Photos des aquariums de colonisation du biofilm pour les tests de toxicité aiguë (à gauche) et chronique (à droite). | 15 |
| Figure 9 Schématisation d'un bloc. Un bloc était constitué de trois canaux, respectivement reliés à des aquariums dans lesquels se trouvaient des pompes (NewJet 600) qui assuraient la circulation de l'eau en circuit fermé. Des tubes en plastique rigide avaient été placés aux entrées et aux sorties des canaux afin de garantir la liaison entre les canaux et les aquariums. | 16 |
| Figure 10 Activité de la beta-glucosidase (GLU) (données relatives) d'une culture d'algue verte <i>Scenedesmus costatus</i> et d'une culture de biofilm exposées à des concentrations croissantes de DAST et de FWA-393 pendant 4-h. Les points correspondent aux valeurs expérimentales, les traits pleins aux modèles de dose-réponse ajustés aux valeurs expérimentales et les zones colorées à l'intervalle à 95 % de ces modèles. 1 = 100% de similarité avec le groupe contrôle. Pour toutes les conditions, n = 3. | 23 |
| Figure 11 Teneur en chlorophylle-a ($\mu\text{g cm}^{-2}$) au sein d'une culture de biofilm exposée pendant 1, 14 et 28 jours à différentes conditions de contamination. CT : Contrôle ; CTGA : Glyphosate ($1 \mu\text{g L}^{-1}$) + AMPA ($100 \mu\text{g L}^{-1}$) ; D- : $30 \mu\text{g L}^{-1}$; D+ : 30mg L^{-1} ; DGA : DAST (30mg L^{-1}) + Glyphosate ($1 \mu\text{g L}^{-1}$) + AMPA ($100 \mu\text{g L}^{-1}$). Pour toutes les conditions, n = 3. * indique une différence significative avec le CT (p-value<0,05, Tukey test). | 26 |

Figure 12 Poids sec vide de cendre exprimé en $\mu\text{g cm}^{-2}$ au sein d'une culture de biofilm exposée pendant 14 jours et 28 jours à différentes conditions de contamination. CT : Contrôle ; CTGA : Glyphosate ($1 \mu\text{g L}^{-1}$) + AMPA ($100 \mu\text{g L}^{-1}$) ; D- : $30 \mu\text{g L}^{-1}$; D+ : 30mg L^{-1} ; DGA : DAST (30mg L^{-1}) + Glyphosate ($1 \mu\text{g L}^{-1}$) + AMPA ($100 \mu\text{g L}^{-1}$). Pour toutes les conditions, $n = 3$. * indique une différence significative avec le CT ($p\text{-value} < 0,05$, Tukey test). 27

Figure 13 Variation de la densité cellulaire des différents groupes algaux exprimée en cellules cm^{-2} (à gauche) et en pourcentage (à droite) , au sein d'une culture de biofilm exposée pendant 28 jours à différentes conditions de contamination. CT : Contrôle ; CTGA : Glyphosate ($1 \mu\text{g L}^{-1}$) + AMPA ($100 \mu\text{g L}^{-1}$) ; D- : $30 \mu\text{g L}^{-1}$; D+ : 30mg L^{-1} ; DGA : DAST (30mg L^{-1}) + Glyphosate ($1 \mu\text{g L}^{-1}$) + AMPA ($100 \mu\text{g L}^{-1}$). Pour toutes les conditions, $n = 3$. * indique une différence significative avec le CT ($p\text{-value} < 0,05$, Tukey test). Les couleurs des astérisques sont attribuées aux groupes algaux. 27

Figure 14 Photos des différents blocs illustrant les différences visuelles des cultures de biofilm. CT : Contrôle ; CTGA : Glyphosate ($1 \mu\text{g L}^{-1}$) + AMPA ($100 \mu\text{g L}^{-1}$) ; D- : $30 \mu\text{g L}^{-1}$; D+ : 30mg L^{-1} ; DGA : DAST (30mg L^{-1}) + Glyphosate ($1 \mu\text{g L}^{-1}$) + AMPA ($100 \mu\text{g L}^{-1}$). Pour toutes les conditions, $n = 3$ 28

Figure 15 Valeurs issues du rendement quantique maximal (Yieldmax) d'une culture de biofilm exposée pendant 1, 14 et 28 jours à différentes conditions de contamination. CT : Contrôle ; CTGA : Glyphosate ($1 \mu\text{g L}^{-1}$) + AMPA ($100 \mu\text{g L}^{-1}$) ; D- : $30 \mu\text{g L}^{-1}$; D+ : 30mg L^{-1} ; DGA : DAST (30mg L^{-1}) + Glyphosate ($1 \mu\text{g L}^{-1}$) + AMPA ($100 \mu\text{g L}^{-1}$). Les moyennes des valeurs de rendement quantique maximal pour les groupes contrôle à 1, 14 et 28 jours d'exposition sont respectivement de $0,517 \pm 0,031$, $0,487 \pm 0,016$ et $0,450 \pm 0,02$. 1 = 100% de similarité avec le groupe contrôle. Pour toutes les conditions, $n = 3$. * indique une différence significative avec le CT ($p\text{-value} < 0,05$, Tukey test). 29

Figure 16 Valeurs issues du quenching non photochimique maximal (NPQmax) d'une culture de biofilm exposée pendant 4-h, 14 et 28 jours à différentes conditions de contamination. CT : Contrôle ; CTGA : Glyphosate ($1 \mu\text{g L}^{-1}$) + AMPA ($100 \mu\text{g L}^{-1}$) ; D- : $30 \mu\text{g L}^{-1}$; D+ : 30mg L^{-1} ; DGA : DAST (30mg L^{-1}) + Glyphosate ($1 \mu\text{g L}^{-1}$) + AMPA ($100 \mu\text{g L}^{-1}$). 1 = 100% de similarité avec le contrôle. Les moyennes des valeurs de quenching non photochimique maximal pour les groupes contrôle à 4-h, 14 et 28 jours d'exposition sont respectivement de $2,101 \pm 0,118$, $2,164 \pm 0,333$ et $1,611 \pm 0,047$. 1 = 100% de similarité avec le groupe contrôle. Pour toutes les conditions, $n = 3$. * indique une différence significative avec le CT ($p\text{-value} < 0,05$, Tukey test) 30

Figure 17 Evolution du taux de transport d'électrons relatif en fonction de l'intensité du rayonnement photosynthétiquement actif ($\mu\text{mol de photons m}^{-2} \text{s}^{-1}$), au sein d'une culture de biofilm exposée pendant 4-h, 14 et 28 jours à différentes conditions de contamination. CT : Contrôle ; CTGA : Glyphosate ($1 \mu\text{g L}^{-1}$) + AMPA ($100 \mu\text{g L}^{-1}$) ; D- : $30 \mu\text{g L}^{-1}$; D+ : 30mg L^{-1} ; DGA : DAST (30mg L^{-1}) + Glyphosate ($1 \mu\text{g L}^{-1}$) + AMPA ($100 \mu\text{g L}^{-1}$). Pour toutes les conditions, $n = 3$ 31

Figure 18 Evolution des activités de la β -glucosidase (GLU), de la leucine-aminopeptidase (LEU) et de la phosphatase (PHO) au sein d'une culture de biofilm exposée pendant 4-h, 14 et 28 jours à différentes conditions de contamination. CT : Contrôle ; CTGA : Glyphosate ($1 \mu\text{g L}^{-1}$) + AMPA ($100 \mu\text{g L}^{-1}$) ; D- : $30 \mu\text{g L}^{-1}$; D+ : 30mg L^{-1} ; DGA : DAST (30mg L^{-1}) + Glyphosate ($1 \mu\text{g L}^{-1}$) + AMPA ($100 \mu\text{g L}^{-1}$). Pour toutes les conditions, $n = 3$. * indique une différence significative avec le CT ($p\text{-value} < 0,05$, Tukey test). 32

Figure 19 Variation de la quantité de lipides polaires totaux exprimée en nmol cm^{-2} , au sein d'une culture de biofilm exposée pendant 28 jours à différentes conditions de contamination. CT : Contrôle ; CTGA : Glyphosate ($1 \mu\text{g L}^{-1}$) + AMPA ($100 \mu\text{g L}^{-1}$) ; D- : $30 \mu\text{g L}$; D+ : 30mg L^{-1} ; DGA : DAST (30mg L^{-1}) + Glyphosate ($1 \mu\text{g L}^{-1}$) + AMPA ($100 \mu\text{g L}^{-1}$). Pour toutes les conditions, $n = 3$. * indique une différence significative avec le CT ($p\text{-value} < 0,05$, Tukey test). 33

Figure 20 Quantité des six principales classes de lipides polaires totaux exprimée en nmol cm^{-2} , au sein d'une culture de biofilm exposée pendant 28 jours à différentes conditions de contamination. DGDG : digalactosyldiacylglycérol ; MGDG : monogalactosyldiacylglycérol ; SQDG : sulfoquinovosyldiacylglycérol ; PC : phosphatidylglycérol ; PE : phosphatidyléthanolamine ; PG : phosphatidylglycérol. CT : Contrôle ; CTGA : Glyphosate ($1 \mu\text{g L}^{-1}$) + AMPA ($100 \mu\text{g L}^{-1}$) ; D- : $30 \mu\text{g L}^{-1}$; D+ : 30mg L^{-1} ; DGA : DAST (30mg L^{-1}) + Glyphosate ($1 \mu\text{g L}^{-1}$) + AMPA ($100 \mu\text{g L}^{-1}$). Pour toutes les conditions, $n = 3$. * indique une différence significative avec le CT ($p\text{-value} < 0,05$, Tukey test). 34

Figure 21 Proportion des trois principales classes d'acides gras exprimée en pourcentage, au sein d'une culture de biofilm exposée pendant 28 jours à différentes conditions de contamination. SFA : acides gras saturés, MUFA : acides gras monoinsaturés et PUFA : acide gras polyinsaturés. CT : Contrôle ; CTGA : Glyphosate ($1 \mu\text{g L}^{-1}$) + AMPA ($100 \mu\text{g L}$) ; D- : $30 \mu\text{g L}^{-1}$; D+ : 30mg L^{-1} ; DGA : DAST (30mg L^{-1}) + Glyphosate ($1 \mu\text{g L}^{-1}$) + AMPA ($100 \mu\text{g L}^{-1}$). Pour toutes les conditions, $n = 3$. * indique une différence significative avec le CT ($p\text{-value} < 0,05$, Tukey test). 35

La directive-cadre européenne sur l'eau (DCE avait pour objectif d'atteindre un « bon état » écologique et chimique pour l'ensemble des masses d'eau superficielles et souterraines en Europe d'ici 2015 (Roche *et al.*, 2005), mais cela a été reporté à plusieurs reprises et repoussé à 2027. Les résultats actuels ne sont pas satisfaisants, 60 % des eaux de surface en Europe présentant un état écologique « mauvais » (CISE, 2022). En France, dans le bassin Rhin-Meuse, 35 % des cours d'eau sont affectés par une concentration excessive en pesticides, dépassant parfois les normes de qualité environnementale (NQE) (ADE, 2022). En plus d'entraîner des conséquences néfastes sur la santé des écosystèmes, l'utilisation de pesticides, comme le glyphosate, alimente des controverses scientifiques et sociétales (LeMonde, 2022; LeQuotidien, 2023). Le glyphosate est un herbicide ubiquiste retrouvé dans pratiquement toutes les eaux de surface à travers le monde (Brovini *et al.*, 2021). Détecté dans 63% des rivières françaises (Carles *et al.*, 2019), des pics de concentrations en glyphosate peuvent atteindre $164 \mu\text{g L}^{-1}$. Cependant, son utilisation n'a toujours pas été proscrite en France. Néanmoins, le glyphosate n'est pas le seul contaminant retrouvé dans les rivières, ces écosystèmes sont en effet le milieu récepteur de nombreux produits chimiques provenant notamment de station de traitement des eaux usées domestiques ou industrielles. La rivière Cleurie du massif vosgien français est un exemple de cette contamination complexe et chronique à de multiples produits chimiques, provenant notamment de rejets industriels de blanchisseries, travaillant avec des textiles traités au Pakistan et en Chine. Le traitement est très souvent réalisé avec des produits chimiques tels que le glyphosate ou des azurants optiques non déclarés, et dont les impacts environnementaux sont encore parfois peu étudiés (*e.g.* azurants optiques). En 2020, le projet PESTINTER réunit 10 partenaires franco-qubécois dans l'optique d'évaluer les effets environnementaux et sociétaux de la contamination des écosystèmes aquatiques sur un site pilote : la rivière Cleurie. Depuis 2022, mon master s'inscrit dans ce projet pour lequel j'ai été chargé d'évaluer, en laboratoire, les effets de plusieurs azurants optiques retrouvés dans la Cleurie, sur des organismes sentinelles témoins de la qualité de l'eau. La première partie de mes travaux de recherche a été réalisée à Québec (Université du Québec à Montréal). Ces premières expériences ont permis d'évaluer la toxicité aiguë de différents azurants optiques (DAST et FB-28) pour la photosynthèse de différentes cultures d'algues monospécifiques (*C. vulgaris* et *M. aeruginosa*). Ces résultats ont ensuite servi d'appui pour évaluer la toxicité chronique de ces mêmes azurants optiques pour une communauté microbienne complexe : le biofilm périphytique, exposé pendant 17 jours au laboratoire. Les résultats obtenus ont montré que, pour les concentrations choisies (DAST : 5, 15, 30 et 45 mg L^{-1} ; FB-20 : 100, 200, 400, 600 mg L^{-1}), les azurants optiques n'avaient pas provoqué d'effets significativement marqués sur la photosynthèse des communautés microbiennes étudiées (cf. présentation de mi-parcours).

Les objectifs des travaux de recherche qui ont ensuite été menés lors de mon stage en 2023 à l'Institut National de la Recherche pour l'Agriculture et l'Environnement (INRAE) s'insèrent dans la continuité des travaux réalisés à Québec. Pour compléter les connaissances acquises sur l'écotoxicité des azurants optiques, des tests de toxicité aiguë ont été réalisés sur une autre espèce d'algue (*Scenedesmus costatus*) et sur du biofilm. Ces derniers ont visé à déterminer et/ou affiner des seuils de toxicité pour trois azurants optiques (DAST, FB-220 et FWA-393) pour différents paramètres biologiques comme la photosynthèse mais aussi des activités bactériennes. Dans un second temps, l'évaluation de la toxicité chronique de l'azurant optique DAST a été réalisée en exposant pendant 28 jours du biofilm périphytique à différentes concentrations de DAST.

2 Synthèse bibliographique

Cette synthèse bibliographique fera dans un premier temps un nouveau point sur l'état de l'art des azurants optiques. Puis, seront abordés les questions de contamination des écosystèmes aquatiques par des contaminants ubiquistes tel que le glyphosate, ainsi que son principal produit de dégradation. En dernier lieu, les différences (avantages et inconvénients) entre les tests standardisés et non standardisés seront abordées afin de préciser les domaines d'application de ces différents tests en fonction des objectifs de recherche.

2.1 Rappel sur les azurants optiques

2.1.1 La découverte des azurants optiques et leur utilisation

En 1929, Paul Krais identifie une molécule naturelle, la coumarine, aux propriétés blanchissantes (**Mustalish, 2000**) ; l'esculine, β -D-glucoside de la 6,7-dihydroxycoumarine. C'est donc dans les années 1930 qu'une nouvelle classe de molécules émerge sur le marché : les azurants optiques (AO), autrement appelés agents de blanchiment fluorescents. Les AO ne sont, pour la plupart, pas des molécules naturelles. Ils sont issus de procédés de synthèse chimique à partir de dérivés contenant des cycles aromatiques. Ce sont des molécules ayant des propriétés fluorescentes (cf. **Figure 1**), capables d'absorber les rayonnements UVs (300-400 nm), et grâce à un changement électrophysique, de les réémettre dans l'extrémité bleu du spectre visible (450 nm) (**Mustalish, 2000; Saeed et al., 2014**). Les industries textiles ont commencé à utiliser de plus en plus d'AOs en raison de leur forte solubilité dans l'eau et de leur affinité pour la cellulose, résultant d'une polarité importante due à la présence de groupements sulfonates. Ces additifs étaient particulièrement utiles pour masquer le jaunissement naturel du coton.



Figure 1 Fluorescence d'azurants optiques contenus dans un bécher, exposés à des rayonnements ultra-violet (Source : Antoine TOURRET)

De plus, étant donné que les produits chlorés utilisés autrefois pouvaient endommager certains matériaux tels que les fibres de laine (**Mustalish, 2000**), les AOs ont rapidement remplacé ces produits. Cela a contribué à leur adoption rapide par les industries du textile. Au cours des années 1950, les AOs ont été adoptés par l'industrie du plastique, et par la suite, à partir des années 1960, par l'industrie papetière. De nos jours, ces additifs sont également utilisés dans certains produits d'hygiène corporelle, tels que les dentifrices. En outre, ils sont présents dans notre alimentation, notamment en Chine, où ils sont utilisés pour blanchir les nouilles et la farine de blé (**Guo et al., 2015**). Cependant, leur utilisation peut parfois être illégale, comme l'ont souligné des études telles que celle menée par (**Wu et al., 2018**).

2.1.2 L'occurrence environnementale des azurants optiques

Il existe une dizaine de familles d'AOs. Les familles les plus couramment commercialisées sont les coumarines, les thiophène, les diphenyl pyrazoline et les stilbènes. Pour donner un ordre de grandeur, 80% des AOs présents sur le marché sont issus de stilbènes (**Chen et al., 2022; Salas et al., 2019**). Leur classification est régie par leur structure et leurs propriétés physico-chimiques. De par leur caractère hydrophile et leur solubilité, ces molécules sont susceptibles de se retrouver en solution aqueuse (**Hayashi et al., 2002**). Ces molécules ubiquistes sont devenues très courantes et regroupent des centaines de composés (**Mustalish, 2000**). Elles sont souvent présentes dans les formules de détergents à des concentrations supérieures à 0,5% (**Salas et al., 2019**). Par conséquent, d'importantes quantités d'AOs se retrouvent dans les eaux usées et finissent par atteindre les écosystèmes comme l'ont confirmé (**Assaad et al., 2014**). Parmi toutes les eaux contaminées en azurants optiques, les plus chargées sont le plus souvent des eaux de blanchisseries (**Assaad et al., 2014**). En 2011, la *China Cleaning Industry Association* estimait que la consommation annuelle moyenne d'AOs à l'international, par personne, était de 11,9 kg (**Niloy et al., 2021**). Les quantités relarguées dans l'environnement restent néanmoins très imprécises. En effet, leur traçabilité est relativement peu fiable. Cela est dû au fait que la présence de ces molécules dans certains produits aux Etats-Unis (*e.g.*

détergents) n'est pas toujours déclarée comme l'affirme (**Niloy et al., 2021**).

Au cours des dernières années, de nouvelles méthodes analytiques ont été élaborées pour mesurer des quantités de contaminants à des seuils et des limites de détection extrêmement faibles, de l'ordre du ng L⁻¹ et pg L⁻¹ respectivement. Les AOs, étant faiblement biodégradables, sont susceptibles de persister dans l'environnement (**Hayashi et al., 2002**). Il existe très peu de littérature concernant leur présence dans l'environnement. Néanmoins, l'ensemble des études s'accordent à dire que les concentrations environnementales en AO sont de l'ordre de la dizaine de µg L⁻¹ (pour la grande majorité). Le **Tableau 1** ci-dessous recense les différentes valeurs de concentrations environnementales (maximales) retrouvées dans la littérature ces dernières années.

Tableau 1 Synthèse des différentes valeurs de concentrations environnementales maximales en azurants optiques recensées dans plusieurs pays. *données non-publiées issues des travaux de Marie-Noëlle PONS dans le cadre du projet PESTINTER.

| Pays | Coordonnées | Concentrations (µg.L-1) | Azurants optiques ou équivalents | Références |
|------------|--------------------------|-------------------------|---|--------------------------------------|
| Etats-Unis | 38°5'45''N 76°9'34''O | 78 600 | Inconnu | (Muller & Muller, 2022) |
| France | 48°3'24''N 6°49'40''E | 30 000 | Équivalent diaminostilbène | LIEC* |
| Japon | 35°51'35''N 138°51'10''E | 21,9 | 4,4'-Bis-(2-sulfostyryl)-biphenyl | (Hayashi et al., 2002) |
| Bengladesh | 23°52'49''N 90°15'54''E | 10.42 | 4,4'-Bis-(2-sulfostyryl)-biphenyl disodium salt | (Niloy et al., 2021) |
| Chine | 38°51'52''N 116°0'34''E | 6.77 | Fluorescent Brightener 135 | (Wu et al., 2021) |
| Suisse | 46°12'0''N 6°9'60''E | 0.11 | 4,4'-Bis-(2-sulfostyryl)-biphenyl | (Stoll, 1997) |

La faible documentation sur la contamination des écosystèmes aquatiques par les AOs reflète une absence totale d'intérêt pour ces contaminants. Il n'existe à ce jour que très peu de techniques de chimie analytique permettant de détecter et de quantifier ces composés dans les matrices environnementales. De plus, ces composés sont minoritaires dans les formules de détergent. Pourtant, les AOs sont faiblement biodégradables, ce qui en fait des molécules potentiellement persistantes dans l'environnement (**Assaad et al., 2014**). En revanche, les AOs sont photosensibles, et plus particulièrement aux rayonnements UVs solaires (**Assaad et al., 2014**). Pour la plupart des AOs, la nature et la toxicité de leurs produits de dégradation sont méconnus.

2.1.3 L'écotoxicité des azurants optiques

La toxicité des AOs sur les microorganismes autotrophes et sur le biofilm est à ce jour peu documentée. Des tests standardisés OCDE réalisés en 1996 et en 1997 sur *Daphnia magna* et l'algue verte *Selenastrum capricortunum* pour un AO (le FB-113) avaient donné des valeurs de CE₅₀ supérieure à 100 mg L⁻¹ (48h) et supérieure à 22 mg L⁻¹ (24-h) respectivement (**SIAM20, 2005**). Il n'existe, à ce jour, pas d'autres tests standardisés récents sur d'autres modèles d'exposition ou d'autres AOs.

Des études menées sur d'autres AOs (FB-119 et FB-220) de type stilbène ont démontrées que ces

derniers pouvaient induire une inhibition significative du diamètre des thalles de quatre champignons microscopiques filamenteux (*Trichophyton rubrum*, *Trichophyton mentagrophyte*, *Microsporum canis* et *Epidermophyton floccosum*). L'exposition avait duré 12 jours, et les effets étaient significatifs à partir de 880,8 mg L⁻¹ pour le FB-220, et 58,25 mg L⁻¹ pour le FB-119 (**Brasch et al., 2003**). Les thalles constituent l'appareil végétatif des plantes inférieures sans feuilles, tiges ni racines (algues, champignons, lichens). En interférant avec les processus de formation de fibres de chitine essentielles pour la croissance des hyphes (filament constitutif du mycélium des champignons), les AOs ont indirectement dégradé les parois cellulaires des champignons. La synthèse ainsi que les structures cristallines de la cellulose chez certaines bactéries (*Gluconacetobacter xylinus*) peuvent également se retrouver altérées par certains AOs (FB-28, 229 mg L⁻¹), lors d'une exposition aiguë (24-h) (**Weng, 2013**).

Une autre étude (**Martínez et al., 2009**) montrait les effets d'un AO (Tinopal CBS, DSBP) sur différentes espèces de plantes monocotylédones (*Zea mays*, *Solanum lycopersicum*, *Hordeum vulgare*) et dicotylédones (*Vicia faba*, *Brassica oleracea*) lors d'une exposition de 29 jours. Les effets reportés valent pour une concentration en Tinopal CBS, DSBP de 5% soit 50 000 mg L⁻¹. La croissance des plantes monocotylédones a été significativement inhibée, tandis que la réflectance des feuilles a augmenté de manière significative chez les plantes mono et dicotylédones. Cela pourrait engendrer des effets sur la photosynthèse des plantes. Les auteurs ont remarqué que la présence de Tinopal CBS, DSBP à 0,1%, soit 1 000 mg L⁻¹, réduisait fortement le recrutement des insectes (*Apis mellifera*) vers les fleurs et interféraient avec leur capacité à manipuler les inflorescences (**Goulson et al., 2000**).

D'après les études écotoxicologiques disponibles, il semble donc que les AOs présentent un risque de toxicité pour les organismes photosynthétiques, ainsi que pour les interactions entre la faune et la flore. Ces observations soulèvent la possibilité de conséquences préjudiciables à grande échelle pour les écosystèmes.

2.2 La contamination ubiquiste des écosystèmes aquatiques par le glyphosate

2.2.1 La découverte du glyphosate et son utilisation

Le N-(phosphométhyl)glycine, plus communément appelé glyphosate, est un herbicide total foliaire systémique. Il est principalement utilisé pour se débarrasser des « mauvaises herbes » en agriculture (grande échelle), ou bien celles présentes dans nos jardins (petite échelle, variable en fonction de la réglementation de chaque pays). Cet herbicide inhibe l'activité de certaines enzymes chez les végétaux (e.g. 5-enolpyruvylshiquime-3-phosphate synthase), affectant de ce fait la synthèse de composés aromatique, protéique, et de composés secondaires cruciaux pour leur survie (**Wang et al., 2016**). Initialement découvert en 1950, c'est en 1974 que l'entreprise Monsanto commercialise

cet ingrédient. La **Figure 2** reflète l'utilisation massive de cet herbicide au cours de ces quarante dernières années, aux Etats-Unis. Depuis les années 1970, les tonnages utilisés en agriculture ont augmenté de 31 250%. Le glyphosate est aujourd'hui le premier herbicide présent sur le marché des pesticides (**Brovini et al., 2021**). En France, le glyphosate était la substance active la plus utilisée entre 2011 et 2015.

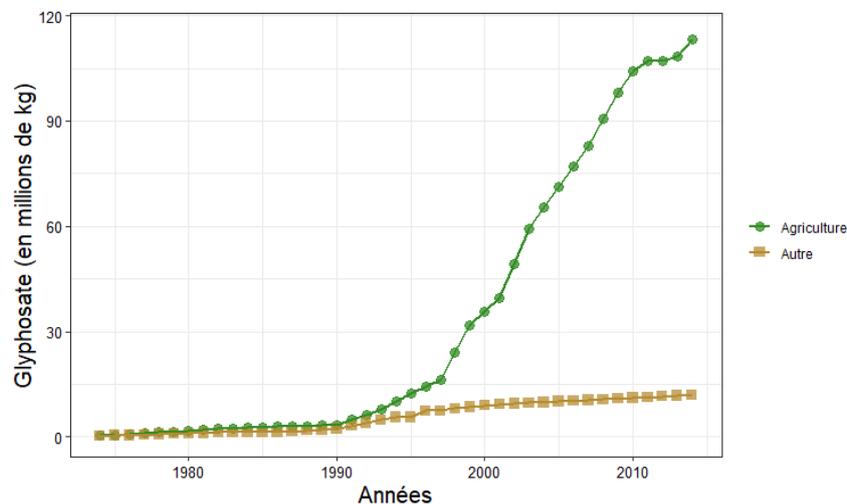


Figure 2 Evolution des quantités de glyphosate utilisées (en millions de kg) au cours des 40 dernières années aux Etats-Unis (**Benbrook, 2016**).

La propagation répandue du glyphosate dans les écosystèmes aquatiques est devenue un sujet brûlant, suscitant des débats et des inquiétudes à travers le monde. La question de poursuivre ou de restreindre l'utilisation de cette substance est au cœur des discussions, tant dans les médias que sur la scène politique internationale (**Carles et al., 2019**). Aujourd'hui, certains pays proscrirent l'utilisation de cet herbicide, comme le Canada, l'Espagne, le Portugal, ou encore les Pays-Bas. D'autres pays Européens tels que l'Italie, l'Allemagne et la France, sont toujours en cours de « discussion », pour prendre une décision quant au bannissement de cet herbicide (**Brovini et al., 2021**). En effet, la controverse des effets du glyphosate sur l'environnement et la santé humaine est toujours d'actualité.

Le premier article scientifique rapportant des concentrations environnementales en glyphosate a été publié en 1998 selon (**Brovini et al., 2021**). Aujourd'hui, le glyphosate se retrouve dans l'ensemble des eaux de surface, mais également dans les eaux souterraines en percolant les sols lors d'épisodes de fortes pluies (**Van Bruggen et al., 2018**). La **Figure 3** présentée par (**Brovini et al., 2021**) illustre les concentrations maximales de glyphosate retrouvées dans les écosystèmes aquatiques d'eaux douces dans différents pays. L'Argentine est le pays où la plus grande concentration environnementale a été recensée ; 105 mg L⁻¹. Les Etats-Unis, le Canada et l'Iran sont les 3 pays les plus tolérants vis-à-vis des concentrations maximales autorisées dans l'environnement. Les Etats-Unis, la Colombie et l'Argentine sont les pays où les concentrations maximales en glyphosate sont les plus élevées. Ces pays détiennent les plus grandes cultures génétiquement modifiées tolérantes

aux herbicides. Par conséquent, les quantités de glyphosate appliquées sur ces dernières sont importantes, comme par exemple, les cultures de Soja (> 4,08 kg de glyphosate par hectare).

En France les concentrations en glyphosate retrouvées dans l'environnement sont largement inférieures aux valeurs de concentrations détectées en Argentine. La plus haute valeur de concentration en glyphosate quantifiée, en France (rivière), est de 164 $\mu\text{g L}^{-1}$ (Carles *et al.*, 2019). Le principal produit de dégradation de glyphosate est l'acide aminométhylphosphonique (AMPA). L'AMPA peut également provenir de la dégradation d'amino-polyphosphonates présents dans les détergents ainsi que dans les retardateurs de flamme (Carles *et al.*, 2019). L'AMPA a une durée de demi-vie pouvant aller jusqu'à 331 jours, comparé au glyphosate, qui possède une durée de demi-vie de 9,9 jours (Brovini *et al.*, 2021; PPDB, 2022). La concentration la plus haute détectée en France en AMPA est de 558 $\mu\text{g L}^{-1}$ (Carles *et al.*, 2019). La Cleurie est contaminée au glyphosate provenant du traitement du textile traité par les blanchisseurs en amont. Des épisodes de contamination ont eu lieu ces dernières années, où des pics de concentration en glyphosate et en AMPA avaient atteint des valeurs de 51 et 980 $\mu\text{g L}^{-1}$ respectivement (Fleck, 2016).

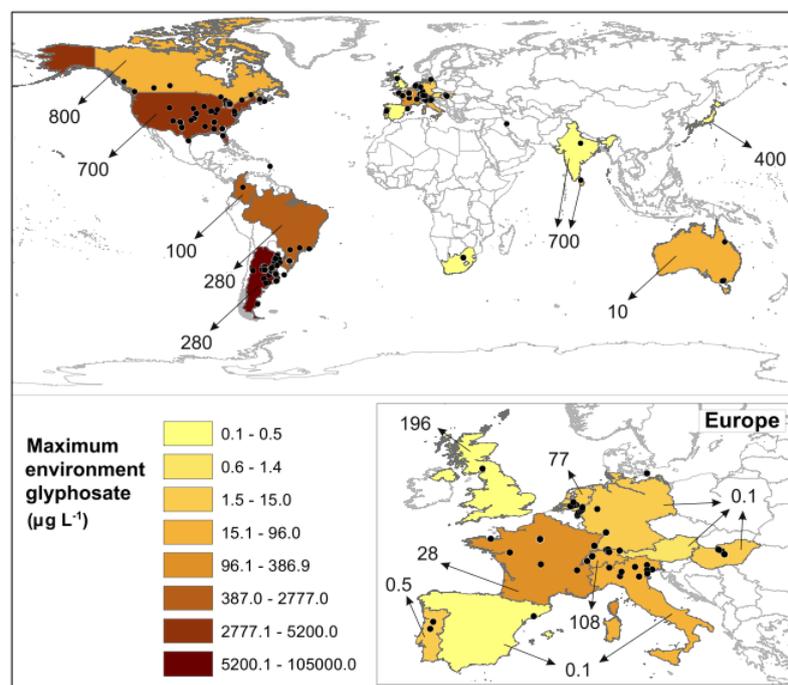


Figure 3 Concentrations maximales de glyphosate ($\mu\text{g L}^{-1}$) répertoriées au sein d'écosystèmes aquatiques d'eaux douces pour 21 pays. Les chiffres/nombres indiqués par les flèches noires correspondent aux concentrations maximales autorisées dans l'environnement pour chaque pays (Brovini *et al.*, 2021).

2.2.2 L'écotoxicité du glyphosate

Le nombre d'études réalisées sur le glyphosate a considérablement augmenté durant les 40 dernières années (**Brovini et al., 2021**). Les études ayant pour objectif de déterminer la toxicité aiguë de ce composé sur une espèce de microorganisme phototrophe (*Raphidocelis subcapitata*) ont révélé des valeurs de CE₅₀ allant de 5,6 à 129 mg L⁻¹ (**Brovini et al., 2021**). Ces données proviennent du fichier d'informations supplémentaires de (**Brovini et al., 2021**). Aucune information sur les durées d'exposition n'a été communiquée. Ces valeurs de CE₅₀ restent élevées par rapport aux concentrations environnementales détectées dans l'environnement mais certaines sont néanmoins inférieures aux concentrations retrouvées dans les systèmes aquatiques argentins. Une autre étude avait estimé une valeur de CE₅₀ de 2,27 mg L⁻¹ pour la diatomée *Skeletonema costatum* et de 24,7 mg L⁻¹ pour l'algue verte *Raphidocelis subcapitata*, exposées au glyphosate pendant 96h. Les bornes des intervalles de confiance ne se recoupent pas, suggérant ainsi une différence de sensibilité inter-taxonomique. A certaines concentrations (1,2-7,8 mg L⁻¹), une exposition au glyphosate allant de 72 à 96h sur des microorganismes aquatiques (espèce(s) non précisée(s)) peut déclencher une inhibition de la synthèse de composés aromatiques secondaires, de la production de chlorophylle, de la photosynthèse, ainsi que de la respiration (**Mensink, 1994; Van Bruggen et al., 2018**).

A l'échelle d'un écosystème, la présence de glyphosate dans l'eau peut avoir un impact considérable sur l'assemblage structurel des communautés de microorganismes. En effet, certaines communautés algales sont capables d'utiliser le phosphore du glyphosate comme source d'énergie, et ainsi proliférer au profit du déclin d'autres communautés algales (**Hébert et al., 2019**). C'est le cas pour les pycocyanobactéries qui prolifèrent rapidement en présence de glyphosate, et donc de phosphore (**Brovini et al., 2021**). Lorsque le glyphosate est utilisé en tant qu'ingrédient actif dans les formules d'herbicide, il se trouve en présence d'autres molécules chimiques, notamment des surfactants. Ces molécules peuvent être plus écotoxiques que l'ingrédient actif. C'est le cas du polyoxyéthylène amine (POEA). Par exemple, lors d'une exposition de 40h sur un microorganisme cilié (*Tetrahymena pyriformis*), les valeurs de CE₅₀ estimées pour le glyphosate et le POEA étaient de 648 et 4,96 mg L⁻¹ respectivement (**Tsui & Chu, 2003**). Les surfactants sont ajoutées dans les formules chimiques pour exacerber les effets de l'ingrédient actif. En présence de POEA, l'absorption et le transport du glyphosate au sein des tissus végétaux (**Van Bruggen et al., 2018**).

Dans les rivières, le biofilm dégrade le glyphosate en AMPA. Le glyphosate peut inhiber la croissance de certaines communautés microbiennes à de faibles concentrations sur une exposition longue (10 µg L⁻¹ sur 3 semaines) (**Bricheux et al., 2013**). Une autre étude montrait qu'une exposition prolongée de 14 jours en microcosme à 10 µg L⁻¹ avait provoqué une modification de la composition de la communauté algale (**Pesce et al., 2009**). Ces effets n'ont été observés que pour la saison estivale

et pas au printemps (**Pesce et al., 2009**). Par conséquent, à des concentrations environnementales, le glyphosate est susceptible d'induire un changement structurel du biofilm concernant les proportions de diatomées, d'algues vertes et de cyanobactéries. Ces changements structuraux seraient susceptibles de conduire à une baisse de la qualité nutritionnelle du biofilm en tant que ressource (**Fadhlaoui et al., 2020**). Lorsque le glyphosate se retrouve dans les milieux aquatiques, il représente une source de phosphore. La qualité nutritionnelle du biofilm se mesure à sa composition lipidique. Les lipides sont constitués de longues chaînes carbonées appelées acide gras (AG). Ces AGs peuvent être insaturés (absence de double liaison), monoinsaturés (une double liaison) ou polyinsaturés (plusieurs double liaisons). Sur le plan de la qualité nutritionnelle d'un biofilm, une majorité d'AG polyinsaturés témoignent d'une bonne qualité. En effet, le plupart des animaux ont une capacité limitée à synthétiser des AG polyinsaturés et doivent donc les obtenir à partir de leur alimentation (**Hill et al., 2011**). Les profils d'AGs du périphyton sont très sensibles à la teneur en phosphore. Lorsque cette dernière augmente, la proportion d'AGs insaturés et monoinsaturés diminue, tandis que les AGs polyinsaturés augmentent (**Hill et al., 2011**). Il en résulte une modification de la qualité nutritionnelle entraînant une modification des flux de production secondaire nette, ces effets peuvent entraîner des répercussions sur l'écosystème entier.

2.3 L'évaluation de la toxicité des contaminants organiques au sein des écosystèmes aquatiques

2.3.1 Les tests standardisés OCDE : une approche simpliste

Il existe de nombreux tests standardisés, permettant d'évaluer la toxicité d'un seul composé à la fois sur un organisme sentinelle. Par exemple, le test OCDE 201 concerne l'étude de l'inhibition de croissance d'algues d'eau douce et de cyanobactéries exposées à un contaminant pendant 72-h. Le milieu de culture, le pH, la concentration initiale de biomasse, la préparation des solutions expérimentales, les mesures analytiques réalisées sont des paramètres normalisés, respectant des consignes bien précises (**OCDE, 2023**). Ces tests normalisés monospécifiques servent notamment à étudier le mode d'action d'un contaminant en adoptant une approche mécanistique et en analysant séparément chaque variable susceptible d'influer sur le stress subi par un organisme donné. Néanmoins, ils ne sont pas toujours représentatifs de la réalité. En effet, ces derniers ne prennent en compte qu'un seul contaminant à la fois sur un organisme donné. Or dans l'environnement, les rivières contiennent une multitude de contaminants, et le biote ne se résume pas à un seul organisme.

2.3.2 Les tests non standardisés : une approche plus complexe

Dans la section précédente, le test OCDE 201 concerne l'étude de l'inhibition du taux de croissance d'espèces algales monospécifiques dans des conditions bien contrôlées. La répétabilité de ces tests en fait un très bon outil pour obtenir des données reproductibles. Cependant, comme

mentionné dans la section précédente, il est important de souligner que ces tests ne reflètent pas fidèlement la réalité et ne sont donc pas représentatifs de ce qui se produit dans des conditions environnementales. C'est pourquoi il est intéressant d'adopter une nouvelle approche qui implique des expositions prolongées et des modèles d'expositions plus complexes. En contrepartie, l'implémentation de ces nouveaux tests plus sophistiqués nécessite un investissement en termes de temps, d'efforts et d'analyses plus approfondi.

Si l'on souhaite étudier les effets de diverses variables (*e.g.* pesticides, température, salinité) sur un écosystème aquatique, le biofilm ou periphyton constitue un modèle d'étude pertinent. La **Figure 4** schématise la structure d'un biofilm.

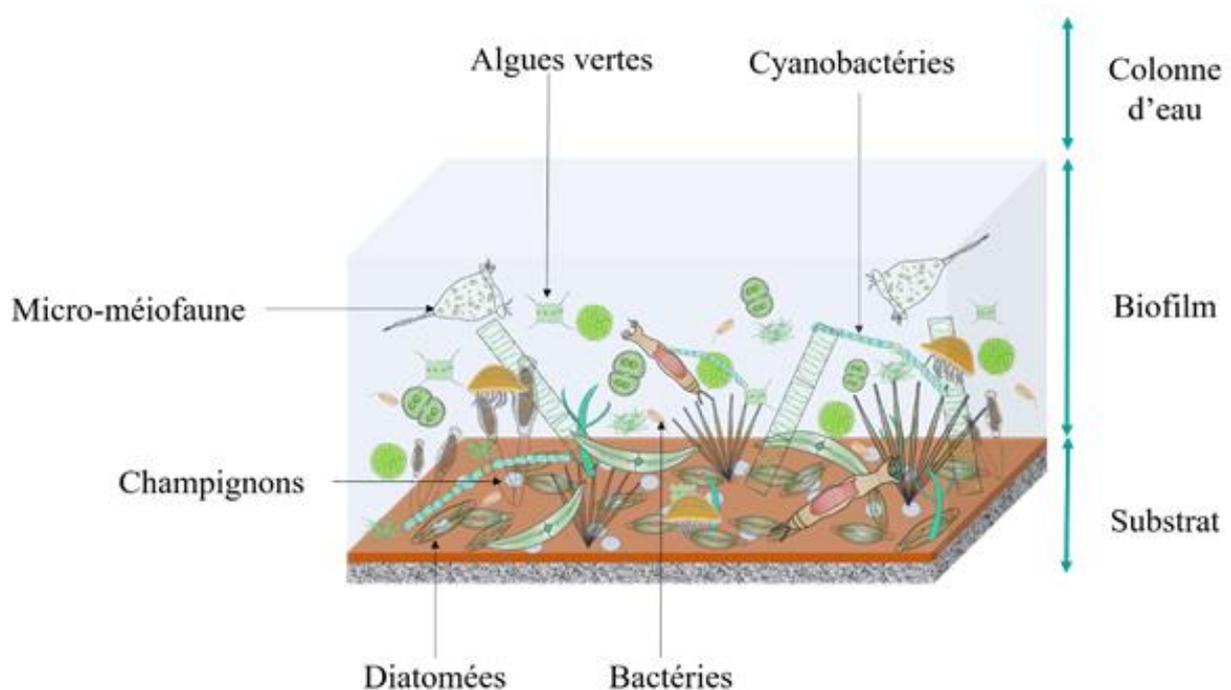


Figure 4 Illustration des différents microorganismes présents au sein d'un biofilm (Source : Laura MALBEZIN).

Au sein des écosystèmes aquatiques d'eau douce, le biofilm est un assemblage de communautés microbiennes colonisant des substrats inorganiques (sédiments, rochers), ou organiques (plantes) (Bonnineau *et al.*, 2021). Ces assemblages sont composés d'organismes eucaryotes (algues vertes, diatomées, champignons, protozoaires), et d'organismes procaryotes (bactéries, cyanobactéries) (Bonnineau *et al.*, 2021). L'arrangement structurel de ces agrégats de biomasse est régi par la nature du substrat sur lequel ils sont adsorbés (Balaguer, 2016). La composition de ces agrégats, également appelés « building blocks », varie dans le temps. En effet, de nombreux facteurs abiotiques, tels que la température, l'intensité lumineuse, la conductivité, le débit d'une rivière vont jouer un rôle dans la nature du biofilm. La fluctuation de ces facteurs est, en outre, régi par la saisonnalité. Le biofilm assure des fonctions essentielles au sein des écosystèmes aquatiques, en contribuant aux cycles biogéochimiques, à la production d'oxygène et la production

primaire à l'échelle de l'écosystème (**Balaguer, 2016; Battin et al., 2016**). Les microorganismes du biofilm jouent un rôle majeur dans la dégradation de la matière organique, et donc contribuent fortement aux flux de nutriments. De même, ces microorganismes sont impliqués dans des processus de dénitrification, et prennent part au cycle de l'azote (**Battin et al., 2016**). Le biofilm se trouve à la base des systèmes trophiques. De fait, un impact sur ces communautés pourrait donc avoir d'importantes répercussions sur le bon fonctionnement d'un écosystème.

2.4 Objectifs et hypothèses

La problématique générale de mon projet de recherche est de comprendre les effets des azurants optiques sur les communautés microbiennes aquatiques.

La première hypothèse testée était que ces composés étaient susceptibles d'entraver les processus photosynthétiques et d'avoir un impact sur la croissance cellulaire algale. Pour vérifier cela, plusieurs expériences ont été menées à Québec. D'une part, des populations d'algues monospécifiques ont été exposées à des concentrations croissantes de plusieurs azurants optiques (le DAST et le FB-28) pendant 72-h (exposition aiguë) permettant de générer des valeurs de CE_{50} pour deux descripteurs : la croissance algale et la photosynthèse. Sur la base de ces résultats, des cultures de biofilm périphytique acclimatées en laboratoire ont été exposées de manière chronique à différentes concentrations d'azurants afin de déterminer la sensibilité de la photosynthèse et de la croissance aux azurants optiques chez des modèles d'études plus complexes. Ces premières expériences ont mis en évidence des sensibilités différentes en termes de photosynthèse et croissance entre algues vertes et cyanobactéries exposées aux azurants optiques mais peu d'effets des azurants optiques testés sur la photosynthèse et la croissance de communautés complexes telles que le biofilm.

Suite à ces premières expériences, les hypothèses suivantes ont été formulées :

1. Les azurants optiques, dont le DAST, sont susceptibles d'affecter les paramètres photosynthétiques des algues vertes, ainsi que les fonctions microbiennes hétérotrophes de communautés complexes.
2. Les différents groupes algaux (cyanobactéries, algues vertes, diatomées) semblent avoir une sensibilité différente aux azurants optiques et notamment au DAST, l'exposition de biofilm au DAST est donc susceptible d'entraîner un changement de composition de ces communautés.
3. Enfin, en présence d'autres contaminants ubiquistes, il était possible que les effets du DAST se retrouvent amplifiés (synergie).

Pour vérifier l'hypothèse 1, des expositions courtes ont été réalisées sur une autre espèce d'algue et sur un autre biofilm périphytique. Les objectifs de ces nouvelles expositions étaient de déterminer ou d'affiner les seuils de toxicité de différents azurants optiques (DAST, FB-220, FWA-393), et de travailler sur une plus large gamme de descripteurs biologiques que ceux testés au Québec (paramètres photosynthétiques et fonctions microbiennes hétérotrophes).

Pour vérifier les hypothèses 2 et 3, une exposition longue a été réalisée sur des cultures de biofilm périphytique afin d'évaluer les réponses structurelle et fonctionnelles des communautés microbiennes aquatiques en réponse à une contamination en azurant optique (le DAST) seul ou en présence d'autres contaminants retrouvés dans la Cleurie (glyphosate et AMPA).

3 Matériels et méthodes

3.1 Le choix des molécules et la préparation des solutions

Toutes les molécules utilisées dans les tests de toxicité aiguë et chronique ont été commandées chez Merck (Saint-Quentin-Fallavier, France). Trois azurants optiques ont été testés (**Figure 5**). Le premier, l'acide 4,4'-diamino-2,2'-stilbène sulfonique (DAST, CAS-No : 81-11-8), est un azurant retrouvé dans de nombreuses formules de lessives et de détergents. Le second, le Fluorescent Brightener 220 (FB-220, CAS-No : 16470-24-9), est un azurant de type stilbène, classiquement retrouvé dans blanchisseries, c'est un des azurants les plus étudiés dans la littérature scientifique. Enfin, le 4,4'-Bis(2-benzoxazolyl)stilbène (FWA-393 CAS-No : 1533-45-5), est un azurant de type stilbène benzoxazolé, principalement retrouvé dans les formules de plastique. Le DAST a été choisi car les premières expériences réalisées à l'Université du Québec à Montréal sous la direction de Philippe JUNEAU, ont montré sa toxicité pour des cultures d'algues (Tourret, 2022, rapport de M1).

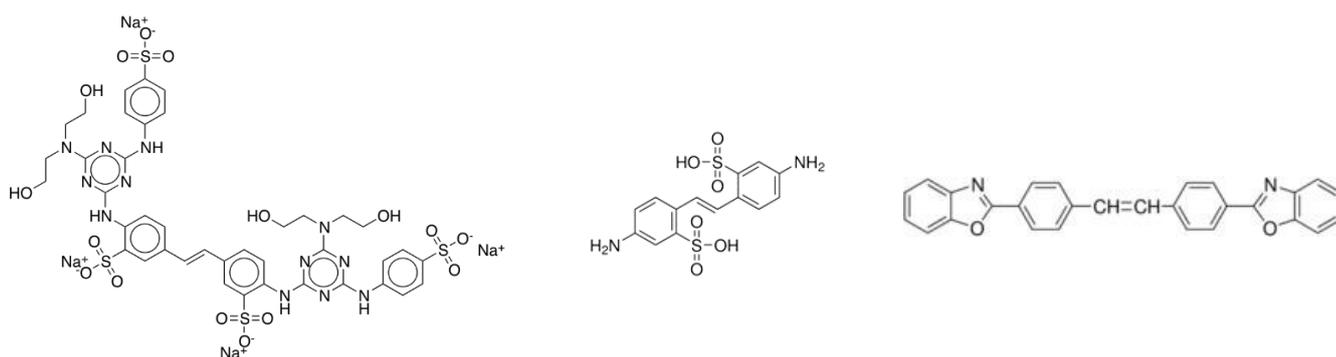


Figure 5 Structures topologiques des trois azurants optiques commandés (de gauche à droite : FB-220, DAST, FWA-393).

Les solutions de DAST et de FB-220 ont été préparées dans de l'eau milli-Q puis conservées à température ambiante sous agitation, à l'obscurité, jusqu'à utilisation. Le FWA-393 a été préparé dans un mélange eau-acétonitrile (1:1, v/v), dû à une mauvaise solubilité dans la phase aqueuse. La solution a également été conservée à température ambiante, à l'obscurité, jusqu'à utilisation.

Lors de l'exposition chronique, la toxicité de 2 autres contaminants a également été testées : le N-(Phosphonométhyl)glycine (glyphosate, CAS-No : 1071-83-6, pureté 96%, **Figure 6**) ainsi que son principal produit de dégradation, l'acide (Aminométhyl)phosphonique (AMPA, CAS-No : 1066-51-9, pureté 99%, **Figure 6**). Les solutions de glyphosate et d'AMPA ont été préparées dans de l'eau déminéralisée. Des aliquots de 12 mL ont ensuite été préparés, puis congelés à -20°C.

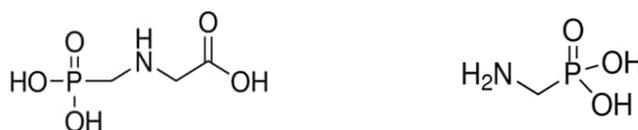


Figure 6 Structures topologiques du glyphosate (à gauche) et de son principal produit de dégradation, l'AMPA (à droite).

3.1.1 Culture de *Scenedesmus costatus*

Afin de compléter les connaissances sur l'écotoxicité des AOs pour les organismes photosynthétiques, des tests de toxicité aiguë ont été réalisés sur une algue verte phytoplanctonique : la souche TCC-744, *Scenedesmus costatus*, obtenue à partir de la Thonon Culture Collection. Cette souche a été cultivée dans des erlenmeyers en verre de 250 mL, dans des conditions stériles. Placée dans une chambre de culture, la température était de 20°C, le cycle jour-nuit de 12:12h, et l'intensité lumineuse fixée à 63 μmol de photons/ m^2/s (LEDS JBL Solar Nature). Le milieu de culture utilisé pour cette espèce était du BG-11 (1 g/L $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 50 g/L NaHCO_3 , 5 g/L Na_2CO_3 , 25 g/L $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 25g/L $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 28,42 g/L $\text{Na}_2\text{SiO}_3 \cdot 9\text{H}_2\text{O}$, 200 g/L KNO_3 , 25 g/L K_2HPO_4 , 20 mg/L $\text{CuCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 20 mg/L $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 12 mg/L $\text{ZnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$, 10 mg/L $\text{CoCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 14 mg/L $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, 400 mg/L $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$, 35 mg/L $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 1 mg/L H_3BO_3). Le pH du milieu de culture était ajusté à 7,5. Les solutions de nutriments ont été filtrées à l'aide de seringues LUER SLIP (Fisherband) et de filtres de diamètre 28 mm et de seuil de filtration de 0,2 μm (Sartorius). La **Figure 7** montre les erlenmeyers placés dans la chambre de croissance, ainsi que la manière dont étaient repiquées les cultures d'algues.

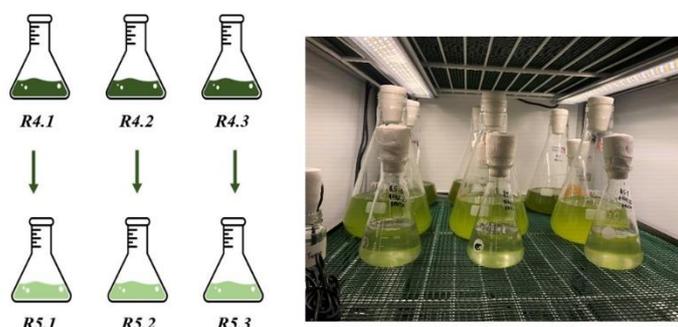


Figure 7 Illustration des cultures de *Scenedesce mus costatus* et de la procédure de repiquage.

Afin de maintenir les cultures en phase de croissance exponentielle, celles-ci étaient repiquées chaque semaine avec les dilutions suivantes : 1/3 de culture algale, 2/3 de milieu de culture frais.

3.1.2 La colonisation du biofilm

Pour toutes les expériences réalisées, la colonisation du biofilm a débuté dans l'étang Gazinet-Cestas (44°46'30"N, 0°41'44,3"O) et s'est ensuite poursuivi dans un aquarium. Pour les expériences de toxicité aiguë, la colonisation du biofilm a débuté au sein de l'étang (01/12/2022 – 04/01/2023) sur 20 lames de microscope en verre (l = 7,6 cm ; L = 2,6 cm), qui avaient été placées dans des cagettes, elles-mêmes positionnées dans la colonne d'eau. Après un mois de colonisation dans l'étang, ces lames ont été grattées à l'aide d'un scalpel afin de former un inoculum. Ce dernier a été transvasé dans un petit aquarium (38 cm x 29 cm x 24 cm, **Figure 8**) dans lequel se trouvaient 147 lames de microscope en verre reposant sur des portoirs en inox. La température était de 15°C, le cycle jour-nuit de 12:12h, et l'intensité lumineuse fixée à 230 μmol de photons/m²/s (LEDS JBL Solar Nature). Pendant toute la période de colonisation (04/01/2023 – 23/02/2023), l'eau de l'aquarium était changée chaque semaine par de l'eau de l'étang fraîchement filtrée à l'aide de tamis (500, 215, 100 et 63 μm). Ces filtrations avaient pour but de retirer les macrodéchets, ainsi que la méiofaune, susceptible de consommer le biofilm colonisé (e.g. daphnies).

Pour les expériences de toxicité chronique, la colonisation du biofilm a également débuté au sein de l'étang (14/12/2022 – 09/02/2023) sur 31 lames en verre (l = 25 cm ; L = 9 cm), placées dans des cagettes et immergées dans la colonne d'eau. Après 1 mois 1/2 de colonisation, ces lames ont été grattées à l'aide de brosses à dent, afin de former un inoculum, qui lui-même a été transvasé dans un grand aquarium (100 cm x 40 cm x 50 cm, **Figure 8**). Celui-ci contenait 735 lames de microscopes en verre (l = 7,6 cm ; L = 2,6 cm), se trouvant sur des portoirs en inox ou sur des réglettes en plastique (étendoir, **Figure 8**). La température était de 18°C, le cycle jour-nuit de 12:12h, et l'intensité lumineuse fixée à 70 μmol de photons/m²/s (LEDS JBL Solar Nature). L'eau de l'aquarium était constituée de 50% d'eau du robinet déchlorée (en laissant reposer l'eau pendant au moins 24-h) et 50% d'eau de l'étang filtrée à l'aide de tamis (500, 215, 100 et 63 μm). Pendant toute la période de colonisation (09/02/2023 – 11/04/2023, l'eau de l'aquarium était changée une fois par semaine. Des solutions de nutriments (K₂HPO₄, KNO₃ et Na₂SiO₃, 5H₂O) étaient ajoutées dans l'aquarium à chaque changement d'eau, dans le but d'obtenir des concentrations en phosphates de 0,23 mg L⁻¹, en nitrates de 2,40 mg L⁻¹, et en silice de 3,00 mg L⁻¹.

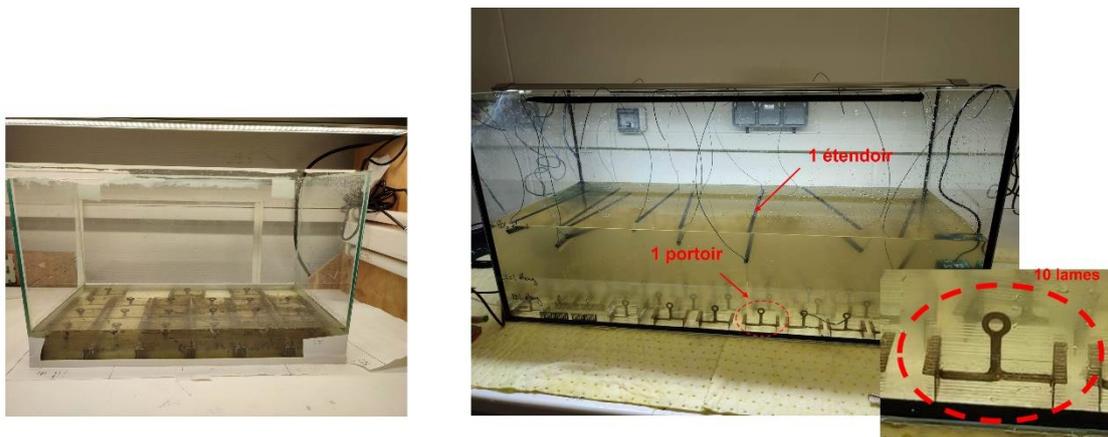


Figure 8 Photos des aquariums de colonisation du biofilm pour les tests de toxicité aiguë (à gauche) et chronique (à droite).

3.2 Les tests de toxicité aiguë

Ces tests avaient pour objectif de déterminer et d'affiner les seuils de toxicité de trois azurants optiques pour l'activité photosynthétique et 3 activités enzymatiques microbiennes de *Scenedesmus costatus* et de biofilm. Ces tests ont été réalisés en microplaques 96 puits avec un temps d'exposition de 24-h pour l'activité photosynthétique et de 4-h pour les activités enzymatiques microbiennes. Pour les mesures d'activité photosynthétique, chaque puit contenait 150 μL de suspension de biofilm ou d'algue verte et 150 μL d'un des AOs en concentration croissante. Pour les activités photosynthétiques, chaque puit contenait 100 μL de suspension de biofilm ou d'algue verte, 100 μL d'un des AOs en concentration croissante, 70 μL de substrat d'activité enzymatique (complexe substrat-fluorochrome). A terme des 4 h d'incubation, afin d'arrêter la réaction et d'optimiser la fluorescence, 20 μL de tampon glycine ont été ajoutés (Glycine 0,05M+ NH_4^+ +OH⁻ 0,2M; pH 10,4). Les concentrations en AOs testés étaient pour le DAST : 20, 40, 50, 60, 70, 80 et 100 mg L^{-1} ; pour le FB-220 : 30, 60, 90, 300, 600, 900 et 1200 mg L^{-1} ; et pour le FWA-393 : 0,5, 1, 2, 3, 4 et 5 mg L^{-1} . La manière dont les mesures ont été réalisées est décrite dans la section « Les descripteurs ».

3.3 Les tests de toxicité chronique

Sur la base des résultats obtenus pour les tests de toxicité aiguë, des cultures de biofilm en canaux (**Figure 9**) ont été exposées pendant 28 jours à différentes conditions de contamination. L'objectif de ces expériences était de reproduire les conditions environnementales de la Cleurie. Parmi les trois azurants initialement testés pour évaluer leur toxicité aiguë, seul l'un d'entre eux a été retenu pour cette exposition chronique : le DAST. Les concentrations choisies se sont basées sur ce qui est cité dans littérature ainsi que sur les résultats des tests de toxicité aiguë. Pour le DAST, la faible concentration (30 $\mu\text{g L}^{-1}$) correspond à une concentration environnementale moyenne. La forte concentration (30 mg L^{-1}) correspond à un pic de contamination tel qu'observé dans la Cleurie. L'AMPA est abondamment présent dans la Cleurie par rapport au glyphosate. Un facteur 100 a donc

été appliqué entre le glyphosate ($1 \mu\text{g L}^{-1}$) et l'AMPA ($100 \mu\text{g L}^{-1}$) pour atteindre des concentrations proches de celles observées dans la Cleurie. Lors de cette expérience, les canaux contrôle et exposés au glyphosate + AMPA étaient mutualisés avec une autre expérience ayant pour objectif d'étudier les réponses du biofilm à un insecticide, le fénoxycarbe (FNX). Les solutions de FNX étant préparées dans 100% d'acétonitrile (ACN), les canaux contenaient au final $\sim 0.01\%$ d'acétonitrile. Pour permettre la comparaison des conditions entre elles, tous les canaux de cette expérience, y compris les références et ceux exposés au DAST, contenaient également 0.01% d'acétonitrile.

Au début de l'expérience, 735 lames de microscope en verre ($l = 7,6 \text{ cm}$; $L = 2,6 \text{ cm}$) sur 64 portoirs en inox ont été colonisées en aquarium. Puis, 30 lames ont été déposées dans chaque canal sur 5 portoirs. Le nombre de lames prélevées à chaque pas de temps est précisé dans la section « Les descripteurs ». Un canal constituait un réplikat biologique. Le volume d'eau dans les canaux et les aquariums était de 5 et 10 L respectivement, la circulation continue de l'eau en circuit fermé dans chaque canal était assurée par des pompes NewJet600. La température de la pièce était régulée à 19°C , le cycle jour-nuit de 12:12h, et l'intensité lumineuse fixée à $30 \mu\text{mol}$ de photons/ m^2/s (LEDS JBL Solar Nature). L'eau des canaux était constituée de 50% d'eau du robinet déchlorée (en la laissant reposer pendant au moins 24-h) et 50% d'eau de l'étang filtrée à l'aide de tamis ($500, 215, 100$ et $63 \mu\text{m}$). Des changements d'eau étaient opérés deux fois par semaine. A chaque renouvellement d'eau, la teneur en nutriments (phosphates $0,23 \text{ mg L}^{-1}$, nitrates $2,40 \text{ mg L}^{-1}$, silice $3,00 \text{ mg L}^{-1}$), ainsi que la contamination (DAST, glyphosate, AMPA) étaient renouvelés.

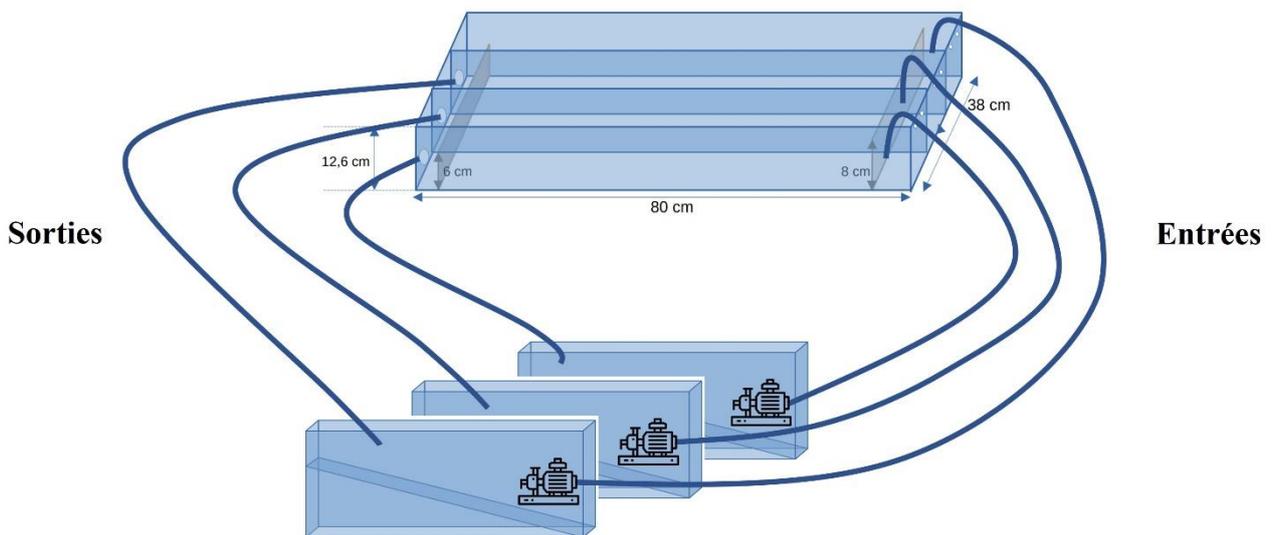


Figure 9 Schématisation d'un bloc. Un bloc était constitué de trois canaux, respectivement reliés à des aquariums dans lesquels se trouvaient des pompes (NewJet 600) qui assuraient la circulation de l'eau en circuit fermé. Des tubes en plastique rigide avaient été placés aux entrées et aux sorties des canaux afin de garantir la liaison entre les canaux et les aquariums.

Tableau 2 Résumé des différentes conditions testées lors de l'exposition longue

| Acronymes | Conditions testées |
|-----------|--|
| CT | Contrôle |
| CTGA | Glyphosate ($1 \mu\text{g.L}^{-1}$) + AMPA ($100 \mu\text{g.L}^{-1}$) |
| D- | DAST - ($30 \mu\text{g.L}^{-1}$) |
| D+ | DAST + (30mg.L^{-1}) |
| DGA | DAST + (30mg.L^{-1}) + Glyphosate ($1 \mu\text{g.L}^{-1}$) + AMPA ($100 \mu\text{g.L}^{-1}$) |

3.4 Chimie analytique

3.4.1 Mesures des paramètres physico-chimiques

Ces mesures ont été réalisées une fois par semaine avant et après un changement d'eau. Le pH (sonde WTW3110), la conductivité (sonde WTW3110), la concentration en oxygène (sonde WTW3205) ainsi que la température ont été mesurés à l'aide de sondes de terrain.

3.4.2 Dosage des nutriments dans l'eau

Ces dosages ont été effectués une fois par semaine, au sein de chaque canal 1h après un changement d'eau, à l'aide de seringue LUER LOCK TIP (Terumo) et de filtres en polytétrafluoroéthylène (PTFE) avec un seuil de filtration de $1,0 \mu\text{m}$ pour un diamètre de 25 mm (Whatman). Les échantillons d'eau ont été conservés dans des pots en plastique à 4°C jusqu'à analyse. Les nutriments ont ensuite été dosés par chromatographie ionique (881 Compact IC pro, Metrohm). Les informations relatives aux modalités d'analyses se trouvent en **Annexe 1**.

3.4.3 Dosage du DAST dans l'eau

Ces dosages ont été effectués deux fois par semaine. Des prélèvements d'eau au sein de chaque canal (pour les blocs contrôle et glyphosate + AMPA, uniquement pour les deux derniers dosages) ont été réalisés avant et 1h après un changement d'eau, à l'aide d'une seringue en verre FORTUNA OPTIMA et de filtres en cellulose régénérée (seuil de filtration : $0,45 \mu\text{m}$, diamètre : 28 mm ;Phenomenex). Les échantillons d'eau ont été conservés dans des viales ambrés de 2 mL à 4°C à l'obscurité. Le DAST a ensuite été dosé par chromatographie liquide (Ultimate 3000) en mode HILIC couplée à un spectromètre de masse en tandem (API 2000, Sciex, France). Les informations relatives aux modalités d'analyses se trouvent en **Annexe 2**.

3.4.4 Dosage du glyphosate et de l'AMPA dans l'eau

Une fois par semaine, des prélèvements d'eau au sein de chaque canal ont été réalisés 1h après un changement d'eau, à l'aide d'une seringue LUER LOCK TIP (Terumo) et de filtresen cellulose régénérée (seuil de filtration : 0,45 µm, diamètre : 28 mm ; Phenomenex). Les échantillons d'eau ont été conservés dans des tubes falcon (SARSTEDT) à -20°C. Les dosages seront effectués ultérieurement. Les résultats de ces dosages ne sont pas présentés dans ce rapport.

3.5 Les descripteurs biologiques

Pour chaque pas de temps et chaque canal, un certain nombre de lame était prélevé et minutieusement gratté à l'aide de scalpels dans un volume prédéfini d'eau du canal. La suspension microbienne était ensuite transférée dans un bécher et maintenue à température ambiante sous agitation jusqu'à analyse ou conservation des échantillons dans les 12h. Le nombre de lames grattées à chaque prélèvement a été déterminé afin de garantir une quantité de biomasse suffisante pour évaluer tous les descripteurs prévus à chaque prélèvement (**Tableau 3**), le ratio surface grattée / volume était de 15,8 cm² mL⁻¹.

Tableau 3 Synthèse de tous les descripteurs étudiés lors de l'exposition chronique pour chaque pas de temps. La manière dont ces descripteurs ont été mesurés et analysés est décrite dans les sections sous-jacentes. Les lettres O et N signifient « Oui » et « Non ».

| Les descripteurs | T _{0h} | T _{4h} | T _{24h} | T _{72h} | T _{2sem} | T _{4sem} |
|-------------------------------------|-----------------|-----------------|------------------|------------------|-------------------|-------------------|
| Chlorophylle-a | O | O | O | O | O | O |
| Groupes algaux | O | N | N | N | O | O |
| ADN | O | N | N | N | O | O |
| AFDW | O | N | N | N | O | O |
| Activités enzymatiques | O | O | N | N | O | O |
| Activités photosynthétiques | O | O | N | N | O | O |
| PICT | N | N | N | N | O | O |
| Lipidomique | O | N | N | N | O | O |
| Dégradation de la matière organique | N | N | N | N | N | O |

3.5.1 La teneur en chlorophylle-a

La chlorophylle est le principal pigment responsable de la capture de l'énergie lumineuse chez les organismes photosynthétiques. La teneur en chlorophylle totale du biofilm a été estimée avec un Phyto-PAM (WALZ, Allemagne), pour chaque canal. Pour cela, 3 mL de suspension microbienne ont été ajoutées dans une cuve en quartz, puis l'absorbance de pigments algaux a été mesurée à différentes

longueurs d'onde (470 nm, 520 nm, 645 nm et 665 nm), ensuite la teneur en chlorophylle totale est obtenue à partir d'une courbe de calibration interne.

3.5.2 Le poids net de cendres (AFDW)

Le principe de l'AFDW repose sur la mesure du poids de cendre obtenu après incinération d'un échantillon de biofilm. Pour obtenir le poids sec du biofilm, des échantillons de 5 mL de suspensions de biofilm ont été prélevés pour chaque canal et transféré dans des petites coupelles en céramique préalablement pesées à vide. Puis, ces coupelles ont été séchées à l'étude (Memmert) à 50°C pendant 48h, avant d'être incinérées au four (Nabertherm) à 500°C pendant 1h. Le poids du biofilm a été mesuré après passage à l'étuve et après passage au four pour chaque canal afin d'en déduire le poids net de cendres.

3.5.3 Les groupes algaux

Après le prélèvement des 1,5 mL de suspension de biofilm dans des tubes eppendorf (2,5 mL) pour chaque canal, 120 µL de Lugol ont été ajoutés, puis ces derniers ont été conservés à 4°C à l'obscurité. La structure du biofilm (% de diatomées, % de cyanobactéries, % d'algues vertes) a été observée avec un microscope optique (Olympus) et une cellule de nageotte composée de 20 champs. L'ensemble des échantillons observés ont été dilués d'un facteur 100. Le nombre de champs comptés sur la cellule de nageotte était de 10. Les comptages ont été réalisés manuellement.

3.5.4 L'activité photosynthétique

Le principe de la mesure de l'activité photosynthétique d'une culture microbienne phototrophe repose sur la fluorescence chlorophyllienne. L'énergie lumineuse absorbée par la chlorophylle peut suivre trois voies. Elle peut être utilisée pour la photosynthèse, soit la synthèse d'énergie (ATP, NADPH) (voie photochimique), elle peut être réémise sous forme de chaleur lorsqu'elle est en excès (voie non photochimique), et elle peut également être réémise sous forme de fluorescence (voie non photochimique). La quantité et l'intensité de fluorescence peuvent être influencées par divers facteurs, comme la présence de contaminants. Les mesures de fluorescence chlorophylliennes ont été réalisées avec un Imaging-PAM (WALZ, Allemagne) version MAXI (lumière modulée bleu 450 nm), en ajoutant 300 µL de suspension de biofilm de chaque canal dans les puits d'une microplaque noire de 96 puits noirs. Avant chaque mesure, les cultures microbiennes ont été acclimatées à l'obscurité pendant 15 minutes, afin de permettre l'oxydation complète de l'ensemble des centres réactionnels du photosystème II (PSII). Les mesures du rendement quantique maximal (F_v/F_m) et du quenching non photochimique maximal (NPQ_{max}), ont été effectuées sous la forme d'une succession de SAT-PULSE, générés toutes les 90 secondes à des valeurs de rayonnement photosynthétiquement actif (PAR) croissants au cours du temps : 1 ; 21 ; 56 ; 111 ; 186 ; 281 ; 336 ; 396 ; 461 ; 531 ; 611 ; 701 ; 801 ; 926 ; 1076 et 1251 µmol de photons.m⁻².s⁻¹.

3.5.5 Les activités enzymatiques hétérotrophes

Trois activités enzymatiques bactériennes ont été mesurées : la bêta-glucosidase, la phosphatase et la leucine amino-peptidase. Le principe de la mesure de ces activités enzymatiques repose sur l'utilisation d'un complexe fluorochrome et substrat analogue au substrat de l'enzyme étudiée. Lorsque l'enzyme hydrolyse ce complexe, la liaison entre fluorochrome et substrat est rompue, ce qui entraîne la libération du fluorochrome, qui devient fluorescent. L'augmentation de fluorescence est directement liée aux activités enzymatiques, une molécule de fluorochrome correspondant à une molécule de substrat libérée. Les ensembles substrat-fluorochrome utilisées pour les trois activités enzymatiques étudiées sont les suivants : le 4-méthylumbelliféryl- β -D-glucopyranoside pour la β -glucosidase (MUF-GLU, Cas-No : 18997-57-4), la 4-méthylumbelliféryl-phosphatase pour la phosphatase (MUF-PHO, Cas-No : 33-68-04-5), et la L-Leucine-7-amino-4-méthylcoumarin hydrochloride pour la leucine-aminopeptidase (MCA-LEU, Cas-No : 62480-44-8). Les fluorochromes libérés lors de l'hydrolyse enzymatique sont : le 4-méthylumbelliférol (MUF, Cas-No : 90-33-5) pour la β -glucosidase et la phosphatase, et le 7-amino-4-méthylcoumarin (MCA, Cas-No : 26093-31-2) pour la leucine-aminopeptidase. En parallèle de cela, des gammes de standards ont été préparées pour établir une relation entre l'UF mesurée et la quantité de MUF ou MCA en μmol consommée par cm^2 par heure. Ces gammes de standards ont été réalisées en microplaques, chaque puits contenant du 150 μL de biofilm et 70 μL de fluorochrome à 7 concentrations différentes de MUF et MCA, allant de 0 à 200 μM .

Les mesures de fluorescence ont été réalisées avec un spectrofluorimètre lecteur de microplaque (Biotek Synergy HTX Multimode Reader) (longueur d'onde d'excitation : 360 +/- 40 nm ; longueur d'onde d'émission : 460 +/- 40 nm).

3.5.6 La tolérance du biofilm au DAST (PICT)

Afin d'estimer une potentielle acquisition de tolérance au DAST chez les communautés microbiennes chroniquement exposées à cet AO (principe du PICT, *i.e.* Pollution Induced Community Tolerance), des tests de toxicité aiguë au DAST ont été réalisés pour chaque canal. Pour cela, l'activité de la β -glucosidase (GLU) (Corcoll *et al.*, 2014) des communautés microbiennes de chaque canal a été mesurée après 4-h d'exposition à un gradient de concentration en DAST dans des microplaques 96 puits. Pour chaque canal, 100 μL de biofilm, 100 μL de DAST en concentrations croissantes (concentrations dans les puits : 1,0 ; 3,0 ; 9,1 ; 27,4 ; 82,3 ; 246,9 et 740,7 mg L^{-1}) et 70 μL de substrat (MUF-GLU) ont été incubés dans une microplaque 96 puits pendant 4-h. L'incubation s'est faite à T° et lumière ambiante, et l'agitation était fixée à 100 rpm (plaque agitatrice). Après ces 4-h d'incubation, afin d'arrêter la réaction et d'optimiser la fluorescence, 20 μL de tampon glycine ont été ajoutés (Glycine 0,05M+ NH_4^+ +OH 0,2M; pH 10,4). Puis, les mesures de fluorescence ont été

réalisées avec un spectrofluorimètre lecteur de microplaque (Biotek Synergy HTX Multimode Reader) (longueur d'onde d'excitation : 360 +/- 40 nm ; longueur d'onde d'émission : 460 +/- 40 nm).

3.5.7 La lipidomique

La lipidomique consiste à quantifier diverses classes de lipides au sein d'une matrice. Dans notre cas, cette matrice est une culture de biofilm. Les classes de lipides analysées sont les phospholipides et les glycolipides. Pour cela, des lames de biofilm ont été prélevées dans chaque canal et directement plongées dans de l'azote liquide afin de stopper toute réaction biologique. Puis les échantillons ont été lyophilisés (Benchtop Ro 8LZL BTF) pendant 24-72-h, avant d'être conservés à -80°C dans de l'aluminium. Ensuite une extraction biphasique (extraction solide-liquide, puis liquide-liquide) a été réalisée sur chaque échantillon afin d'obtenir une phase hydrophile et une phase lipophile qui contient les lipides d'intérêt. Pour cela, 8 à 12 mg de biofilm (balance de précision Mettler Toledo NS204S) ont été ajoutés à 150 mg de microbilles de 0,5 mm de diamètre, préalablement pesées dans des microtubes de 2 mL. La première extraction a été réalisée en ajoutant 1 mL de solvant MTBE:MeOH (3:1, v/v) (méthyl tert-butyl éther:méthanol) et 650 µL de solvant H₂O:MeOH (3:1, v/v). Les échantillons ont ensuite été homogénéisés avec un dispositif FastPrep-24-5-G (MP Biomedicals) par deux cycles successifs de 15 secondes. Durant cette homogénéisation, les microbilles vont lyser les cellules et ainsi, libérer les analytes. Puis, les échantillons ont été soumis à une centrifugation (Eppendorf 5430R) à 12 000 rpm à 4°C pendant 5 minutes afin de séparer et récupérer 600 µL de la phase lipophile. La seconde extraction a été réalisée en ajoutant 700 µL de solvant MTBE:MeOH (3:1, v/v) et 455 µL de solvant H₂O:MeOH (3:1, v/v) dans les mêmes microtubes de 2 mL. Les mêmes étapes d'homogénéisation et de centrifugation ont été réalisées. De nouveau, après centrifugation, 600 µL de la phase lipophile ont été prélevés et ajoutés à la phase lipophile prélevée lors de la première extraction. Le protocole d'extraction s'est réalisé sur glace, afin d'éviter toute altération de l'extrait lipidique. En plus des échantillons, des blancs d'extraction ont été réalisés en l'absence de biofilm et en l'absence d'étalons internes. Les phases lipophiles ont ensuite été conservées à -80°C.

Concernant la préparation des échantillons pour l'injection en chromatographie liquide, 125 µL de phase lipophile ont été prélevés et 50 µL d'étalons internes (phosphatidylcholine, phosphatidylglycérol et phosphatidyléthylamine) de concentrations à 33 ng.µL⁻¹ y ont été ajoutés. Puis, le solvant a été évaporé avec un flux d'azote et 250 µL d'isopropanol ont été ajoutés. Enfin, l'échantillon a été injecté en chromatographie liquide (Ultimate 3000) en mode HILIC couplée à spectromètre de masse en tandem (API 2000, Sciex, France). Les informations relatives aux modalités d'analyses se trouvent en [Annexe 3](#).

3.5.8 La dégradation de la matière organique

Des bandes de coton ont été immergées individuellement dans chaque canal pendant une période de trois semaines. Au terme des trois semaines d'immersion, les bandes de coton ont été soigneusement prélevées. Elles ont ensuite été rincées à l'eau afin d'éliminer les résidus adsorbés et séchées à 80°C pendant 48h *a minima*. Ces bandes seront soumises à un test de résistance à l'étirement, afin de renseigner sur l'état de leur décomposition. Les résultats obtenus nous indiqueront si les différentes conditions de contamination ont un impact sur le potentiel de dégradation de la matière organique par les microorganismes du biofilm.

3.6 Les analyses statistiques

Pour identifier les différences entre traitements pour les différents descripteurs biologiques, une ANOVA à 1 facteur a été réalisée, suivi du post-hoc de Tukey afin de mettre en évidence les différences entre traitements (CT, CTGA, D-, D+, DGA). La normalité des résidus de l'ANOVA a été vérifiée à l'aide du test de Shapiro-Wilk. L'homoscédasticité des variances a été vérifiée à l'aide du test de Fligner-Killeen. L'ajustement des courbes dose-réponse aux données (toxicité aiguë et PICT) s'est réalisée en sélectionnant le modèle qui correspondait le mieux aux données représentées parmi plusieurs modèles classiques de dose-réponse (Weibull, log-logistique, Brain-Cousens ; package drc (**Ritz C, 2015**)). Le choix de ce modèle s'est basé sur le test *lack of fit*. Tous les tests ont été réalisés pour un risque α fixé à 5% (p-value < 0,05). Toutes les statistiques ainsi que la réalisation des figures (package ggplot2 (**Wickham, 2016**)) ont été réalisées avec le logiciel RStudio version 4.2.2 (R core team 2021 (<https://R-project.org/>)).

4 Résultats

4.1 Les tests de toxicité aiguë

Les premiers résultats ci-dessous montrent l'évolution de l'activité de la β -glucosidase (GLU) d'une culture de *Scenedesmus costatus* et de biofilm, en réponse à une exposition à deux azurants optiques (AOs) (**Figure 10**).

Que ce soit pour la culture de *Scenedesmus costatus* ou la culture de biofilm, l'activité de la GLU est inhibée en présence de DAST. Cette inhibition débute dès le premier point de concentration, à savoir 20 mg L⁻¹. L'inhibition totale de l'activité de la GLU n'est pas atteinte à 100%, que ce soit pour l'algue verte, ou bien le biofilm. Le DAST a également inhibé l'activité de la LEU et de la PHO (résultats en **Annexe 4**). Pour le FWA-393, aucun effet n'a été observé sur les trois enzymes.

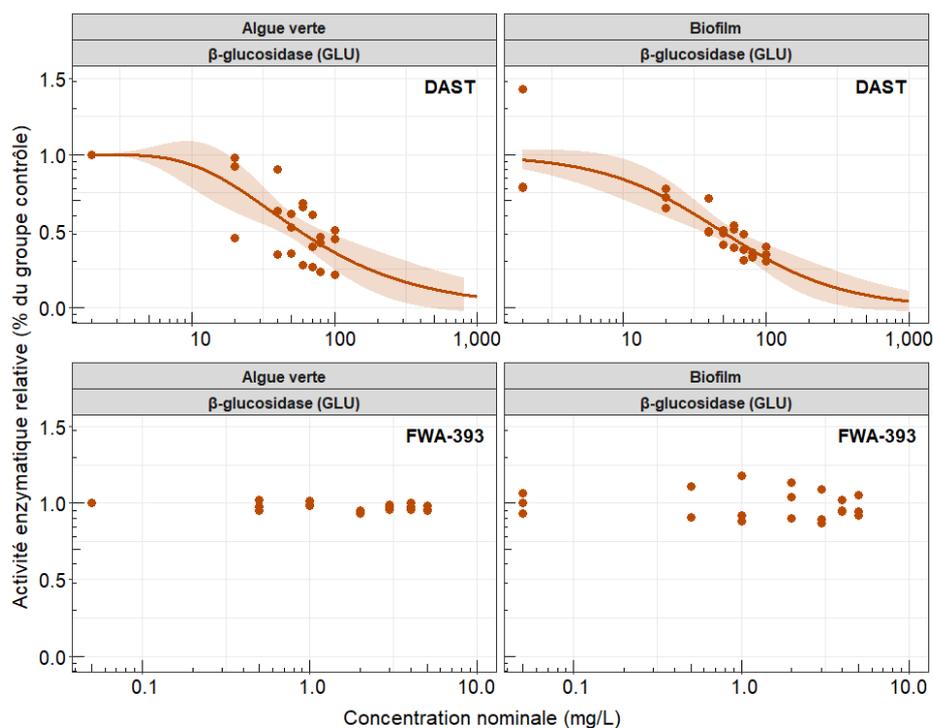


Figure 10 Activité de la beta-glucosidase (GLU) (données relatives) d’une culture d’algue verte *Scenedesmus costatus* et d’une culture de biofilm exposées à des concentrations croissantes de DAST et de FWA-393 pendant 4-h. Les points correspondent aux valeurs expérimentales, les traits pleins aux modèles de dose-réponse ajustés aux valeurs expérimentales et les zones colorées à l’intervalle à 95 % de ces modèles. 1 = 100% de similarité avec le groupe contrôle. Pour toutes les conditions, n = 3.

Pour le FB-220, les résultats ont été invalidés car ce dernier émettait une fluorescence lorsqu’il était soumis à la longueur d’onde d’excitation utilisée pour détecter le fluorochrome dans les mesures d’activités enzymatiques. Par conséquent, sa fluorescence interférait avec celle du fluorochrome et il n’était pas possible de différencier ces deux signaux de fluorescence.

Concernant les résultats obtenus sur la photosynthèse, aucun effet n’a été observé sur le rendement quantique maximal (Yieldmax), ni sur le quenching non photochimique maximal (NPQmax). Les figures illustrant ces données se trouvent en **Annexe 4**. Les valeurs de CE₅₀ calculées en fonction des modèles sur les différents descripteurs étudiés sont répertoriées dans le **Tableau 4**.

Tableau 4 Récapitulatif des différentes valeurs de CE₅₀ calculées (en gras) (ainsi que les intervalles de confiance à 95% indiqués en italique) pour *Scenedesmus costatus* et une culture de biofilm exposées à trois azurants optiques : le DAST, le FWA-393 et le FB-220. GLU = β -glucosidase, LEU = leucine-aminopeptidase, PHO = phosphatase. Les valeurs sont en mg L⁻¹. N.D = Non Déterminée.

| Descripteurs | DAST | | | FWA-393 | | FB-220 | |
|--------------|-------------|------------|-----|-------------|---------|-------------|---------|
| | Algue verte | Biofilm | | Algue verte | Biofilm | Algue verte | Biofilm |
| GLU | 40 57 74 | 37 49 61 | > 5 | > 5 | N.D | N.D | |
| LEU | 55 106 88 | 72 106 140 | > 5 | > 5 | N.D | N.D | |
| PHO | 56 72 88 | 59 68 77 | > 5 | > 5 | N.D | N.D | |
| Yieldmax | > 100 | > 100 | > 5 | > 5 | N.D | N.D | |
| NPQmax | > 100 | > 100 | > 5 | > 5 | N.D | N.D | |

4.2 Les tests de toxicité chronique

4.2.1 Les mesures physico-chimiques

Le **Tableau 5** recense les paramètres physico-chimiques mesurés (moyenne \pm l'écart-type).

Tableau 5 Moyenne des conditions physico-chimiques issues de l'ensemble des mesures réalisées au cours des 28 jours d'exposition, n = 54.

| | |
|--|-----------------|
| pH | 8,38 \pm 0,07 |
| Température (°C) | 20 \pm 1 |
| Conductivité ($\mu\text{S}\cdot\text{cm}^{-1}$) | 380 \pm 14 |
| Concentration en oxygène ($\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$) | 9,13 \pm 0,16 |
| Saturation en oxygène (%) | 102 \pm 1 |

Pour tous les paramètres physico-chimiques, les valeurs sont restées constantes tout au long de l'exposition et étaient similaires entre toutes les conditions.

4.2.2 Les paramètres majeurs

Le **Tableau 6** récapitule les concentrations en nutriments mesurées (moyenne \pm l'écart-type).

L'**Annexe 5** comporte l'ensemble des valeurs issues des différentes mesures effectuées.

Tableau 6 Moyenne des concentrations en nutriments issues de l'ensemble des mesures réalisées au cours des 28 jours d'exposition, n = 120.

| | Silice | Phosphates | Nitrates | Nitrites | Sulfates | Chlore |
|--|--------|-------------------|-------------------|-------------------|--------------------|--------------------|
| Concentration nominale ($\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$) | 3 | 0,23 | 2,4 | / | / | / |
| Concentration réelle ($\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$) | / | 0,064 \pm 0,082 | 2,087 \pm 0,328 | 0,149 \pm 0,125 | 27,876 \pm 1,529 | 24,548 \pm 0,730 |

Les concentrations en nitrates sont conformes aux objectifs visés, tandis que celles des phosphates ne le sont pas, peut-être dû à une consommation rapide de cet élément par le biofilm (entre l'ajout et la mesure 1h après). Les concentrations en silice n'ont pas été mesurées.

4.2.3 Les concentrations en DAST

Le **Tableau 7** récapitule les concentrations en DAST mesurées pour les différentes conditions (moyenne \pm l'écart-type). L'**Annexe 6** comporte l'ensemble des valeurs issues des différents dosages effectués.

Tableau 7 Moyenne des concentrations en DAST issues de l'ensemble des dosages réalisés au cours des 28 jours d'exposition dans les différents traitements (n = 24 pour chaque traitement). Les valeurs sont en $\mu\text{g L}^{-1}$.

| | D- | D+ | DGA |
|---|-------------|--------------------|--------------------|
| Concentration nominale ($\mu\text{g L}^{-1}$) | 30 | 30 000 | 30 000 |
| Concentration mesurée avant changement d'eau ($\mu\text{g L}^{-1}$) | 16 \pm 10 | 22 687 \pm 6 530 | 26 444 \pm 3 429 |
| Concentration mesurée après changement d'eau ($\mu\text{g L}^{-1}$) | 24 \pm 6 | 24 223 \pm 3 260 | 27 040 \pm 2 874 |
| Moyenne concentration mesurée ($\mu\text{g L}^{-1}$) | 20 \pm 8 | 23 455 \pm 4 895 | 26 742 \pm 3 152 |

Concernant les conditions contaminées D-, D+ et DGA, les concentrations mesurées en DAST sont relativement proches des concentrations nominales juste après le changement d'eau. Les concentrations baissent au cours du temps comme en témoignent les concentrations plus faibles observées avant le changement d'eau, notamment pour D-. Les écart-types sont néanmoins relativement élevés. Le DAST n'a jamais été détecté dans les conditions CT et CTGA.

4.2.4 Caractérisation des cultures de biofilm

4.2.4.1 Evolution de la structure de biofilm

4.2.4.1.1 Teneur en chlorophylle-a

La **Figure 11** illustre les concentrations en chlorophylle-a (chl-a) mesurées à 1, 14 et 28 jours d'exposition. Les valeurs brutes sont exprimées en $\mu\text{g cm}^{-2}$. Les résultats à 4 et 72-h d'exposition ne sont pas présentés, car ils sont similaires à ceux observés à 24-h. Les trois pas de temps sélectionnés pour la représentation de ce descripteur permettent de constater la croissance du biofilm au sein du groupe CT (croissance de +101% après 14 jours et de +150% après 28 jours par rapport au jour 1). Aucune différence significative n'est observée au bout d'un jour d'exposition entre les conditions contaminées et le CT. A 14 jours d'exposition, les conditions contaminées au DAST présentent une teneur en chl-a significativement plus faible que CT (une réduction de l'ordre de -29%, -33% et -28%

par rapport au CT pour les conditions D-, D+ et DGA respectivement). Enfin, à 28 jours d'exposition, aucune des conditions contaminées ne présentent de différence notable avec le groupe CT.

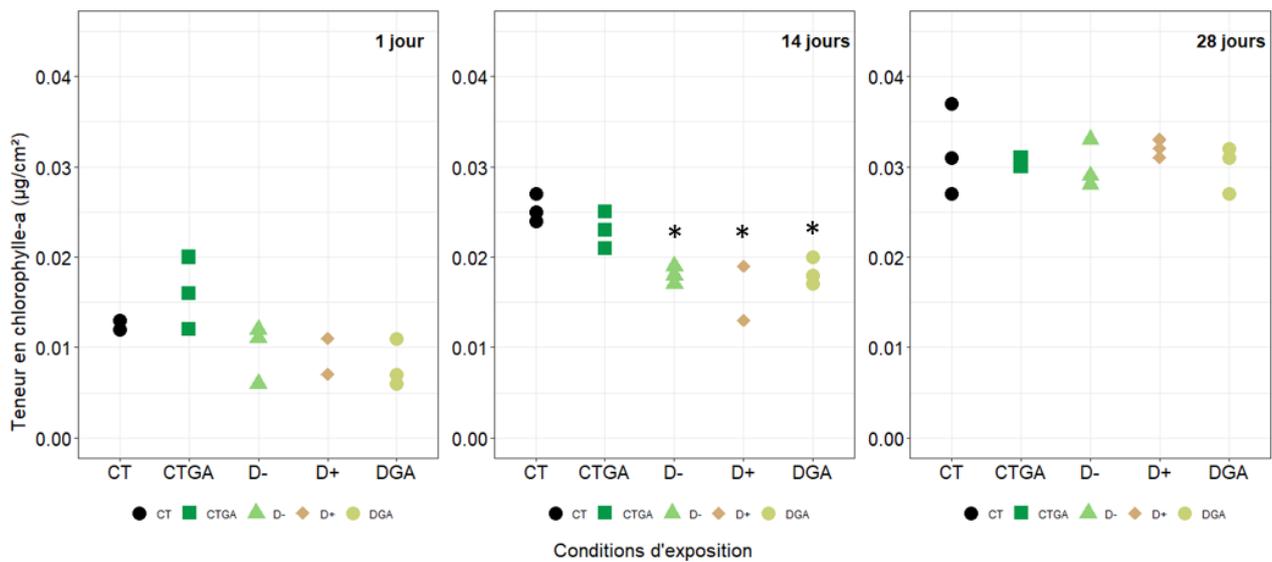


Figure 11 Teneur en chlorophylle-a ($\mu\text{g cm}^{-2}$) au sein d'une culture de biofilm exposée pendant 1, 14 et 28 jours à différentes conditions de contamination. CT : Contrôle ; CTGA : Glyphosate ($1 \mu\text{g L}^{-1}$) + AMPA ($100 \mu\text{g L}^{-1}$) ; D- : $30 \mu\text{g L}^{-1}$; D+ : 30mg L^{-1} ; DGA : DAST (30mg L^{-1}) + Glyphosate ($1 \mu\text{g L}^{-1}$) + AMPA ($100 \mu\text{g L}^{-1}$). Pour toutes les conditions, $n = 3$. * indique une différence significative avec le CT ($p\text{-value} < 0,05$, Tukey test).

4.2.4.1.2 Le poids net de cendres (AFDW)

La **Figure 12** illustre le poids sec vide de cendre (*i.e* Ash Free Dry Weight) du biofilm mesuré à 14 et 28 jours d'exposition en fonction des différentes conditions. Quelle que soit la condition, le poids sec du biofilm a augmenté avec la durée de l'exposition. A 14 jours d'exposition, aucune différence significative n'est observable entre les conditions contaminées et le CT. A 28 jours d'exposition, seul le poids sec de la condition contaminée DGA est significativement plus faible que celui du CT (diminution de l'ordre de -54% par rapport au CT).

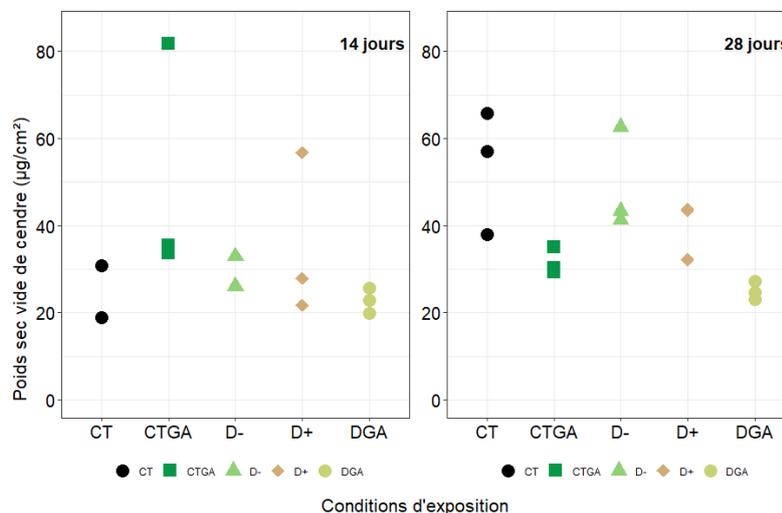


Figure 12 Poids sec vide de cendre exprimé en $\mu\text{g cm}^{-2}$ au sein d'une culture* de biofilm exposée pendant 14 jours et 28 jours à différentes conditions de contamination. CT : Contrôle ; CTGA : Glyphosate ($1 \mu\text{g L}^{-1}$) + AMPA ($100 \mu\text{g L}^{-1}$) ; D- : $30 \mu\text{g L}^{-1}$; D+ : 30mg L^{-1} ; DGA : DAST (30mg L^{-1}) + Glyphosate ($1 \mu\text{g L}^{-1}$) + AMPA ($100 \mu\text{g L}^{-1}$). Pour toutes les conditions, $n = 3$. * indique une différence significative avec le CT ($p\text{-value} < 0,05$, Tukey test).

4.2.4.1.3 Les groupes algaux

La **Figure 13** présente la densité cellulaire des différents groupes taxonomiques (diatomées, algues vertes, cyanobactéries) au sein du biofilm exposé pendant 28 jours en fonction des différentes conditions.

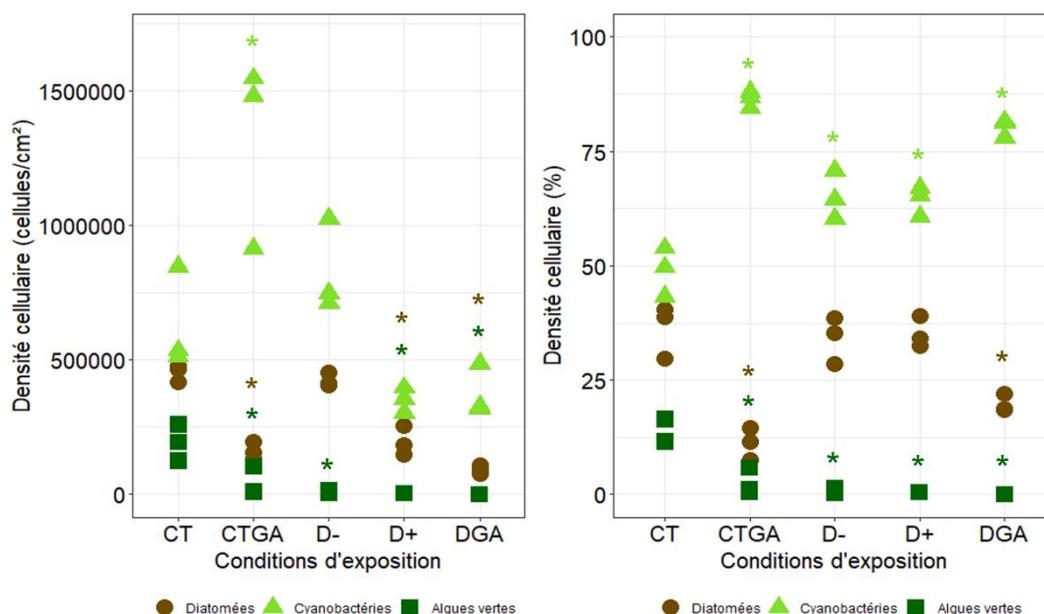


Figure 13 Variation de la densité cellulaire des différents groupes algaux exprimée en cellules cm^{-2} (à gauche) et en pourcentage (à droite), au sein d'une culture de biofilm exposée pendant 28 jours à différentes conditions de contamination. CT : Contrôle ; CTGA : Glyphosate ($1 \mu\text{g L}^{-1}$) + AMPA ($100 \mu\text{g L}^{-1}$) ; D- : $30 \mu\text{g L}^{-1}$; D+ : 30mg L^{-1} ; DGA : DAST (30mg L^{-1}) + Glyphosate ($1 \mu\text{g L}^{-1}$) + AMPA ($100 \mu\text{g L}^{-1}$). Pour toutes les conditions, $n = 3$. * indique une différence significative avec le CT ($p\text{-value} < 0,05$, Tukey test). Les couleurs des astérisques sont attribuées aux groupes algaux.

L'exposition au glyphosate et à l'AMPA a entraîné une diminution de -64% de la densité cellulaire des diatomées par rapport au groupe témoin (CT). Les conditions contaminées D- et D+ ont réduit la densité cellulaire des diatomées de -7% et -57% respectivement par rapport au CT. Le cocktail DGA a considérablement réduit la densité cellulaire des diatomées de -80%. Toutes les conditions contaminées (CTGA, D-, D+ et DGA) ont significativement réduit la densité cellulaire des algues vertes de -79%, -95%, -99% et -100% respectivement par rapport au CT. La densité cellulaire des cyanobactéries a augmenté de +108% et +31% dans les conditions contaminées CTGA et D- par

rapport au CT. En revanche, le nombre de cyanobactéries a diminué de -44% et -40% dans les conditions contaminées D+ et DGA.

Les proportions relatives des 3 groupes algaux ont également été significativement modifiées par rapport au CT (**Figure 13**). L'exposition au DAST (D- et D+) a entraîné une augmentation significative de la proportion de cyanobactéries d'environ +32% par rapport au CT. Cette augmentation se retrouve également au sein des conditions contaminées CTGA et DGA (+77% et +64% respectivement). Les proportions de diatomées au sein de CTGA et DGA ont significativement diminué par rapport au CT (-70% et -46% respectivement). Toutes les conditions contaminées (CTGA, D-, D+ et GA) ont montré une réduction significative des algues vertes de plus de -80%.

La **Figure 14** illustre les différences visuelles (couleurs) des cultures de biofilm en fonction des conditions d'exposition à 28 jours. Les conditions CT et D- présentent un tapis microbien marron foncé. Ce marron est un peu moins accentué dans les conditions contaminées CTGA et D+. Dans la condition contaminée DGA, le tapis microbien n'est presque pas développé.

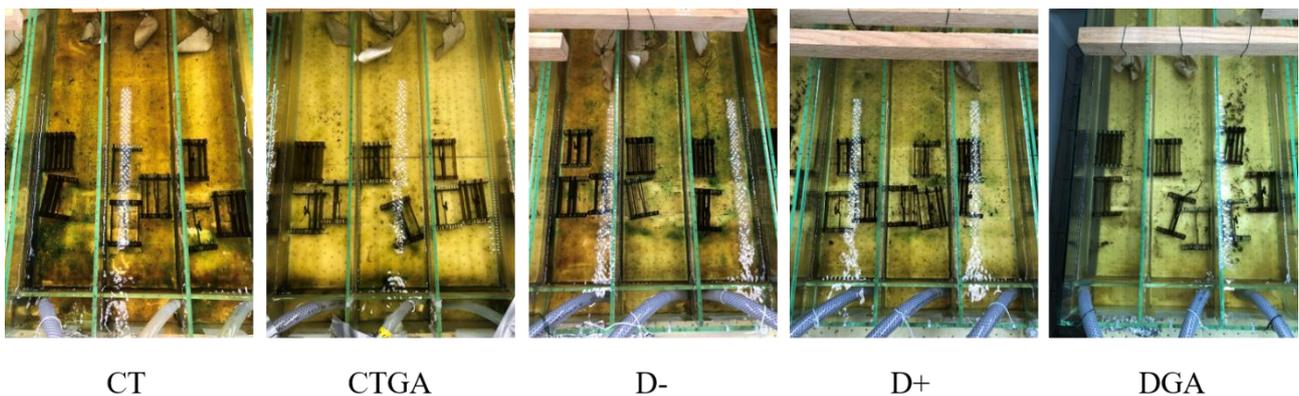


Figure 14 Photos des différents blocs illustrant les différences visuelles des cultures de biofilm. CT : Contrôle ; CTGA : Glyphosate ($1 \mu\text{g L}^{-1}$) + AMPA ($100 \mu\text{g L}^{-1}$) ; D- : $30 \mu\text{g L}^{-1}$; D+ : 30mg L^{-1} ; DGA : DAST (30mg L^{-1}) + Glyphosate ($1 \mu\text{g L}^{-1}$) + AMPA ($100 \mu\text{g L}^{-1}$). Pour toutes les conditions, $n = 3$.

4.2.4.2 Evolution de la fonctionnalité du biofilm

4.2.4.2.1 L'activité photosynthétique

4.2.4.2.1.1 Le rendement quantique maximal

La **Figure 15** illustre le rendement quantique maximal du biofilm exposé pendant 1, 14 et 28 jours à différentes conditions. Les résultats à 4 et 72-h d'exposition ne sont pas présentés, car ils ne montraient pas de différence significative entre les conditions contaminées et le CT. Le rendement quantique maximal du biofilm exposé au DAST (D-, D+ et DGA) était toujours similaire au CT pour

les trois pas de temps. Le rendement quantique maximal du biofilm exposé au glyphosate + AMPA était légèrement plus faible que celui du CT (-11% et -24%) à 14 et 28 jours d'exposition.

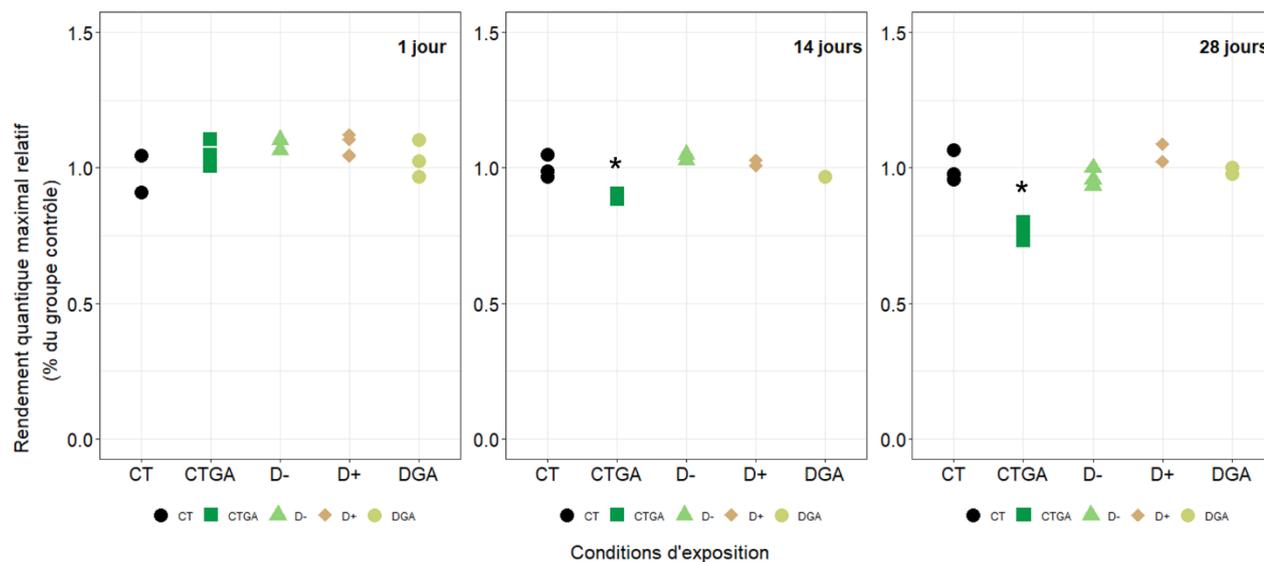


Figure 15 Valeurs issues du rendement quantique maximal (Yieldmax) d'une culture de biofilm exposée pendant 1, 14 et 28 jours à différentes conditions de contamination. CT : Contrôle ; CTGA : Glyphosate ($1 \mu\text{g L}^{-1}$) + AMPA ($100 \mu\text{g L}^{-1}$) ; D- : $30 \mu\text{g L}^{-1}$; D+ : 30mg L^{-1} ; DGA : DAST (30mg L^{-1}) + Glyphosate ($1 \mu\text{g L}^{-1}$) + AMPA ($100 \mu\text{g L}^{-1}$). Les moyennes des valeurs de rendement quantique maximal pour les groupes contrôle à 1, 14 et 28 jours d'exposition sont respectivement de $0,517 \pm 0,031$, $0,487 \pm 0,016$ et $0,450 \pm 0,02$. 1 = 100% de similarité avec le groupe contrôle. Pour toutes les conditions, $n = 3$. * indique une différence significative avec le CT ($p\text{-value} < 0,05$, Tukey test).

4.2.4.2.1.2 Le quenching non photochimique maximal

La **Figure 16** illustre le quenching non photochimique maximal du biofilm exposé pendant 28 jours à différentes conditions. Le quenching non photochimique maximal des conditions contaminées CTGA, D- et D+ était toujours similaire au CT pour les trois pas de temps. En revanche, pour la condition contaminée DGA, le quenching non photochimique maximal était significativement plus faible que le CT (-32%) à 14 jours d'exposition.

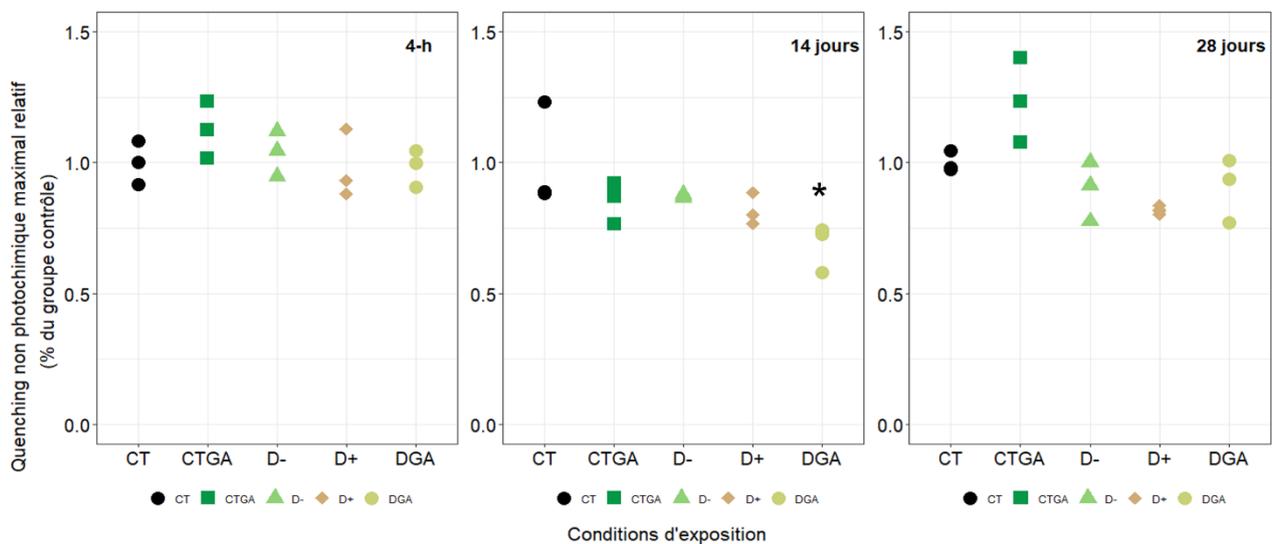


Figure 16 Valeurs issues du quenching non photochimique maximal (NPQmax) d'une culture de biofilm exposée pendant 4-h, 14 et 28 jours à différentes conditions de contamination. CT : Contrôle ; CTGA : Glyphosate ($1 \mu\text{g L}^{-1}$) + AMPA ($100 \mu\text{g L}^{-1}$) ; D- : $30 \mu\text{g L}^{-1}$; D+ : 30mg L^{-1} ; DGA : DAST (30mg L^{-1}) + Glyphosate ($1 \mu\text{g L}^{-1}$) + AMPA ($100 \mu\text{g L}^{-1}$). 1 = 100% de similarité avec le contrôle. Les moyennes des valeurs de quenching non photochimique maximal pour les groupes contrôle à 4-h, 14 et 28 jours d'exposition sont respectivement de $2,101 \pm 0,118$, $2,164 \pm 0,333$ et $1,611 \pm 0,047$. 1 = 100% de similarité avec le groupe contrôle. Pour toutes les conditions, $n = 3$. * indique une différence significative avec le CT ($p\text{-value} < 0,05$, Tukey test)

4.2.4.2.1.3 Le transport d'électron relatif

La **Figure 17** illustre le taux relatif de transport d'électrons (rETR) entre le photosystème II et le photosystème I, au sein du biofilm exposé pendant 4-h, 14 et 28 jours, en fonction de l'intensité du rayonnement photosynthétique actif. Aucun modèle n'ayant été ajusté à ces données, il n'est pas possible pour le moment d'estimer le taux maximal de transport d'électrons. Ces données sont présentées dans le but d'illustrer les différences visuelles du rETR. Le rETR semble similaire entre toutes les conditions au bout de 4-h d'exposition. A 14 jours d'exposition, le rETR de la condition contaminée CTGA semble décroître aux fortes intensités lumineuses. Au bout de 28 jours d'exposition, la condition contaminée CTGA présente un rETR nettement inférieur à celui du CT. Pour les conditions contaminées D-, D+ et CTGA, le rETR semble être plus important que celui du CT, en dépit de la variabilité de la condition contaminée DGA.

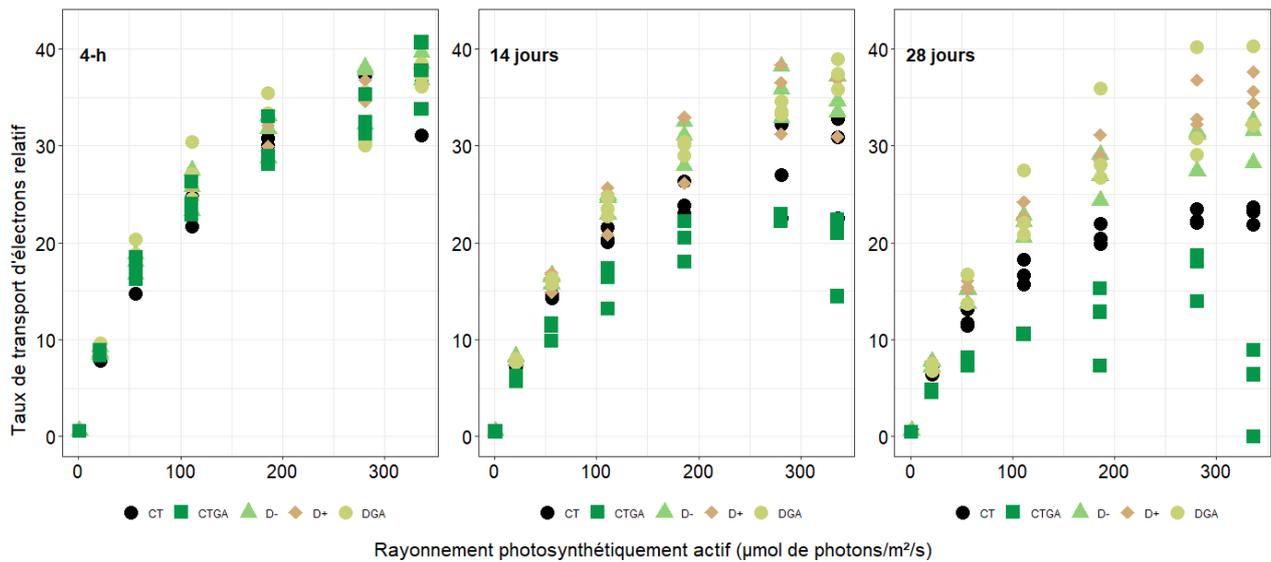


Figure 17 Evolution du taux de transport d'électrons relatif en fonction de l'intensité du rayonnement photosynthétiquement actif ($\mu\text{mol de photons m}^{-2} \text{s}^{-1}$), au sein d'une culture de biofilm exposée pendant 4-h, 14 et 28 jours à différentes conditions de contamination. CT : Contrôle ; CTGA : Glyphosate ($1 \mu\text{g L}^{-1}$) + AMPA ($100 \mu\text{g L}^{-1}$) ; D- : $30 \mu\text{g L}^{-1}$; D+ : 30mg L^{-1} ; DGA : DAST (30mg L^{-1}) + Glyphosate ($1 \mu\text{g L}^{-1}$) + AMPA ($100 \mu\text{g L}^{-1}$). Pour toutes les conditions, $n = 3$

4.2.4.2.2 Les activités enzymatiques

La **Figure 18** illustre les activités enzymatiques de la β -glucosidase (GLU), de la leucine-aminopeptidase (LEU) et de la phosphatase (PHO) au sein du biofilm exposé pendant 4-h, 14 et 28 jours à différentes conditions de contamination. Ces activités enzymatiques ne présentent aucune différence significative entre l'ensemble des conditions contaminées et le CT pour les trois pas de temps. Néanmoins, l'activité de la GLU et de la PHO à 4-h d'exposition montre une légère diminution pour la condition contaminée D+ (-45% et -37% respectivement). Dans l'ensemble, la variabilité des données est relativement importante pour chaque enzyme, aux trois pas de temps.

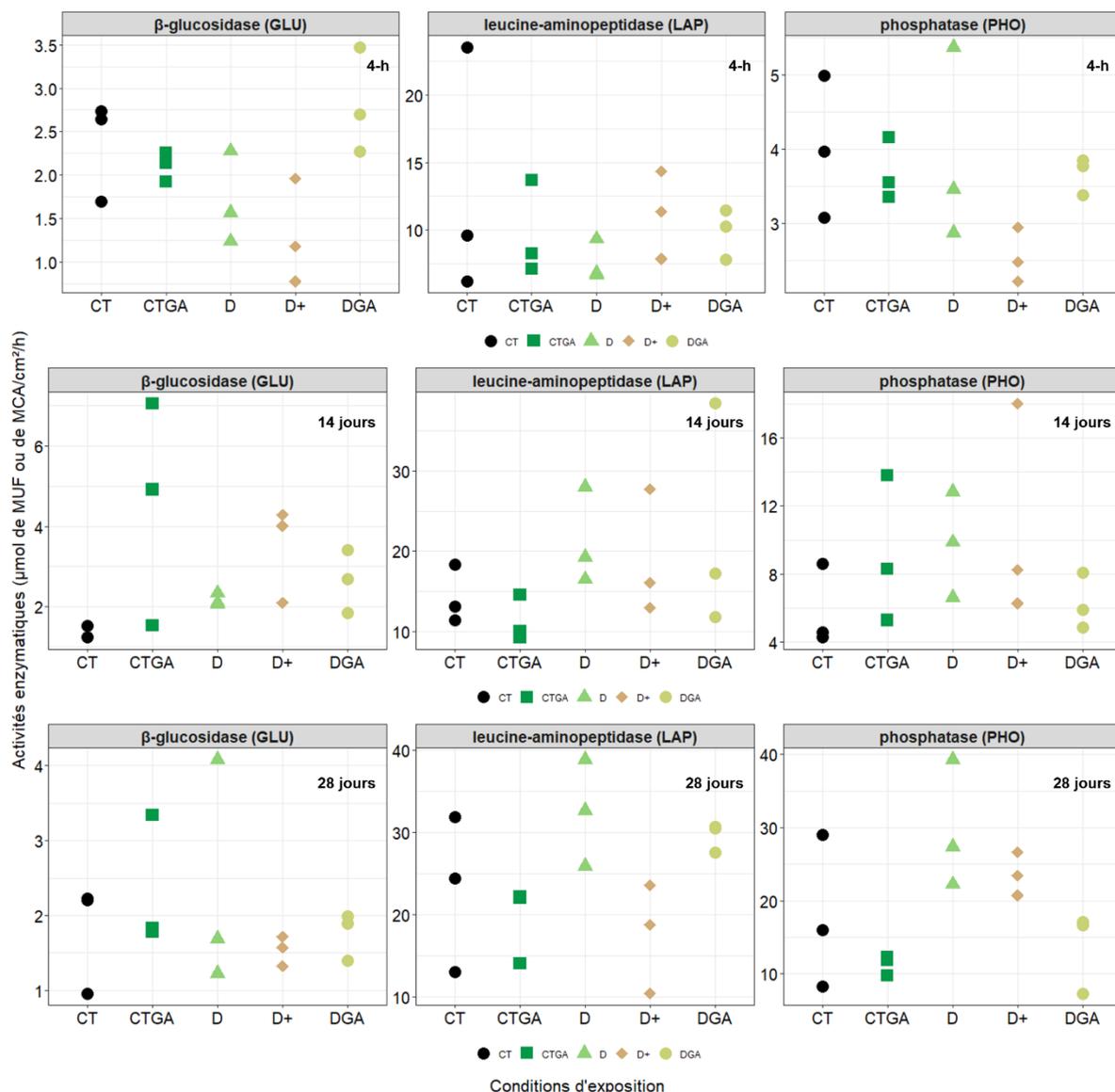


Figure 18 Evolution des activités de la β -glucosidase (GLU), de la leucine-aminopeptidase (LEU) et de la phosphatase (PHO) au sein d'une culture de biofilm exposée pendant 4-h, 14 et 28 jours à différentes conditions de contamination. CT : Contrôle ; CTGA : Glyphosate ($1 \mu\text{g L}^{-1}$) + AMPA ($100 \mu\text{g L}^{-1}$) ; D- : $30 \mu\text{g L}^{-1}$; D+ : 30mg L^{-1} ; DGA : DAST (30mg L^{-1}) + Glyphosate ($1 \mu\text{g L}^{-1}$) + AMPA ($100 \mu\text{g L}^{-1}$). Pour toutes les conditions, $n = 3$. * indique une différence significative avec le CT ($p\text{-value} < 0,05$, Tukey test).

4.2.4.2.3 La tolérance du biofilm au DAST

Tableau 8 Récapitulatif des différentes valeurs de CE_{50} (en gras) calculées sur l'activité de la β -glucosidase, ainsi que les intervalles de confiance 95% (en italique) des biofilms échantillonnés après 14 et 28 jours dans les canaux puis exposés pendant 4-h à une gamme de concentration en DAST croissante.

| Conditions | 14 jours | | | 28 jours | | |
|------------|----------|-----|-----|----------|-----|-----|
| CT | 95 | 115 | 136 | 45 | 367 | 689 |
| CTGA | 97 | 107 | 117 | 278 | 378 | 479 |
| D- | 88 | 102 | 114 | 222 | 304 | 387 |
| D+ | 82 | 106 | 128 | 287 | 354 | 421 |
| DGA | 95 | 108 | 122 | 269 | 310 | 352 |

Les intervalles de confiance à 95% des valeurs de CE_{50} calculées sur l'ensemble des courbes doses-réponse en fonction de la condition d'exposition se recoupent tous entre eux, indiquant une tolérance au DAST similaire entre les biofilms contaminés chroniquement au DAST et/ou au glyphosate et AMPA et les biofilms CT. Ces résultats sont observés à 14 et 28 jours d'exposition. Les données des courbes dose-réponses se trouvent en [Annexe 7](#).

4.2.4.2.4 La lipidomique

La [Figure 19](#) illustre les quantités de lipides polaires totaux du biofilm exposé pendant 28 jours à différentes conditions de contamination.

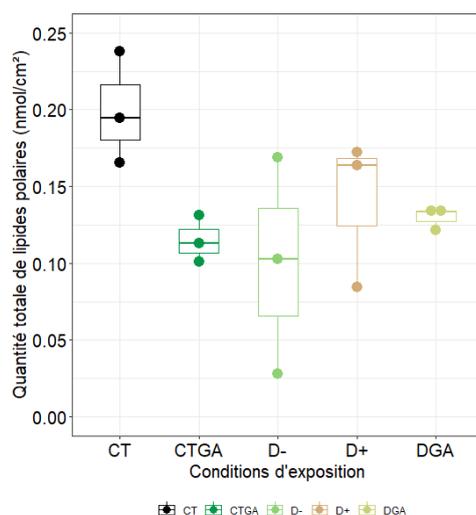


Figure 19 Variation de la quantité de lipides polaires totaux exprimée en nmol cm^{-2} , au sein d'une culture de biofilm exposée pendant 28 jours à différentes conditions de contamination. CT : Contrôle ; CTGA : Glyphosate ($1 \mu\text{g L}^{-1}$) + AMPA ($100 \mu\text{g L}^{-1}$) ; D- : $30 \mu\text{g L}^{-1}$; D+ : 30mg L^{-1} ; DGA : DAST (30mg L^{-1}) + Glyphosate ($1 \mu\text{g L}^{-1}$) + AMPA ($100 \mu\text{g L}^{-1}$). Pour toutes les conditions, $n = 3$. * indique une différence significative avec le CT ($p\text{-value} < 0,05$, Tukey test).

La quantité totale de lipides polaires semble faiblement affectée par l'exposition au DAST et/ou au glyphosate + AMPA (pas de différence significative par rapport au CT), néanmoins les valeurs moyennes des lipides polaires sont plus faibles d'environ -42%, -50%, -30% et -35% au sein des conditions contaminées CTGA, D-, D+ et DGA respectivement. Les conditions contaminées

CTGA et DGA présentent une faible variabilité entre réplicats alors qu'une plus forte variabilité est observée pour D- et D+.

La **Figure 20** illustre les quantités des six classes de lipides au sein du biofilm exposé pendant 28 jours à différentes conditions de contamination.

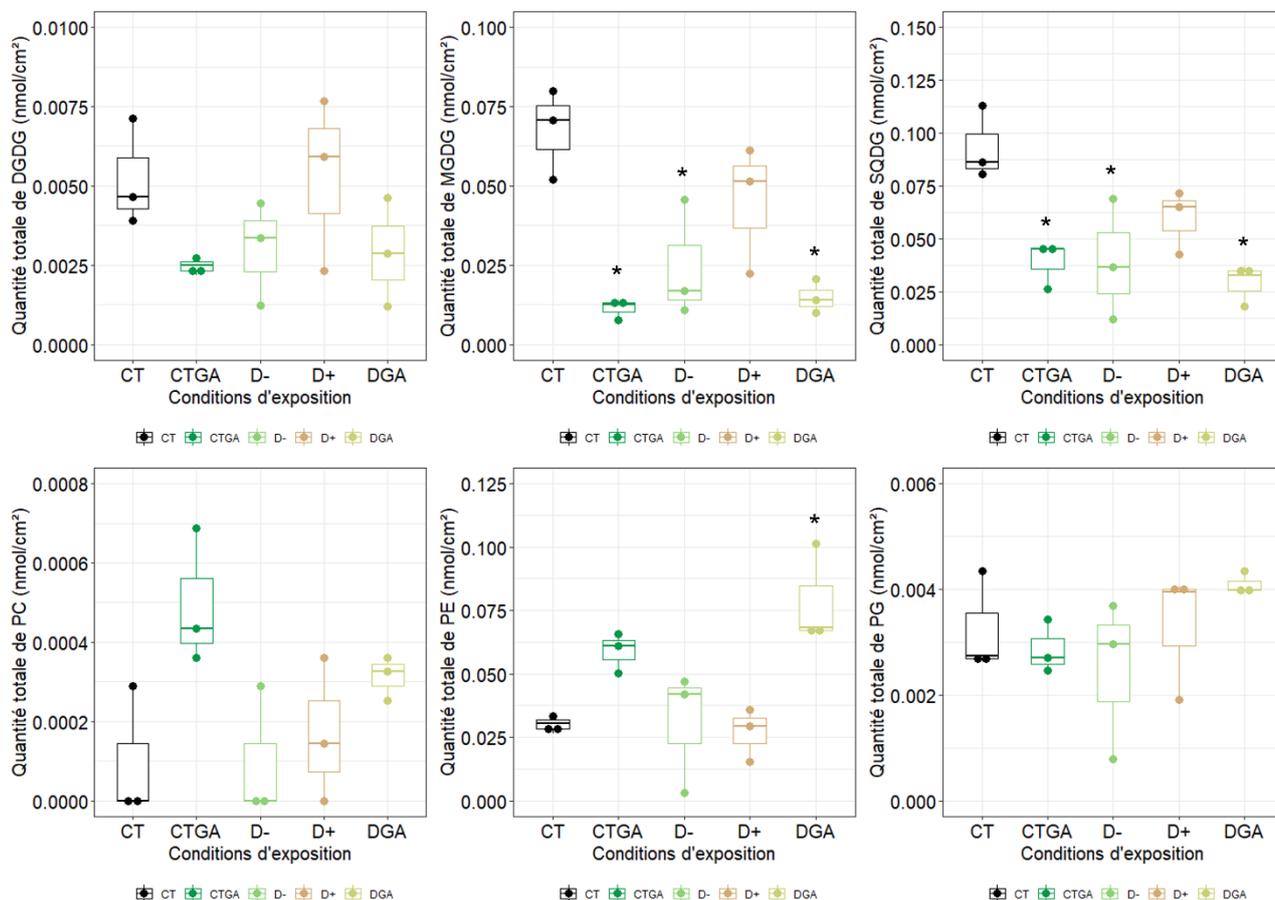


Figure 20 Quantité des six principales classes de lipides polaires totaux exprimée en nmol cm⁻², au sein d'une culture de biofilm exposée pendant 28 jours à différentes conditions de contamination. DGDG : digalactosyldiacylglycérol ; MGDG : monogalactosyldiacylglycérol ; SQDG : sulfoquinovosyldiacylglycérol ; PC : phosphatidylglycérol ; PE : phosphatidyléthanolamine ; PG : phosphatidylglycérol. CT : Contrôle ; CTGA : Glyphosate (1 µg L⁻¹) + AMPA (100 µg L⁻¹) ; D- : 30 µg L⁻¹; D+ : 30 mg L⁻¹ ; DGA : DAST (30 mg L⁻¹) + Glyphosate (1 µg L⁻¹) + AMPA (100 µg L⁻¹). Pour toutes les conditions, n = 3. * indique une différence significative avec le CT (p-value < 0,05, Tukey test).

Les quantités totales en glycolipides sont modulées par l'exposition suivant des tendances similaires pour les 3 classes (DGDG, MGDG et SQDG). Les SQDG sont les glycolipides les plus abondants, l'exposition au glyphosate + AMPA, D- ou DGA a entraîné une réduction de ces glycolipides de -58%, -58% et -69% respectivement par rapport au CT. Une tendance à la baisse des SQDG d'environ -36% par rapport au contrôle a également été observée chez les biofilms exposés à

D+ mais cette différence n'est pas significative. Les mêmes tendances sont observées pour les MGDG ou DGDG. Néanmoins, ces tendances ne sont pas significatives pour les DGDG.

Concernant les phospholipides, les PE sont les plus abondants. L'exposition au glyphosate + AMPA provoque une augmentation (+96%) des PE par rapport au CT. Néanmoins, cette différence n'est pas significative, tout comme pour les conditions contaminées D- et D+. En revanche, la condition contaminée DGA montre une augmentation significative des PE (+161%) par rapport au CT. Les quantités de PG et de PC dans les conditions contaminées ne montrent aucune différence significative par rapport au CT.

La **Figure 21** ci-dessous illustre les variations de proportions des trois classes d'acides gras au sein du biofilm exposé pendant 28 jours à différentes conditions de contamination.

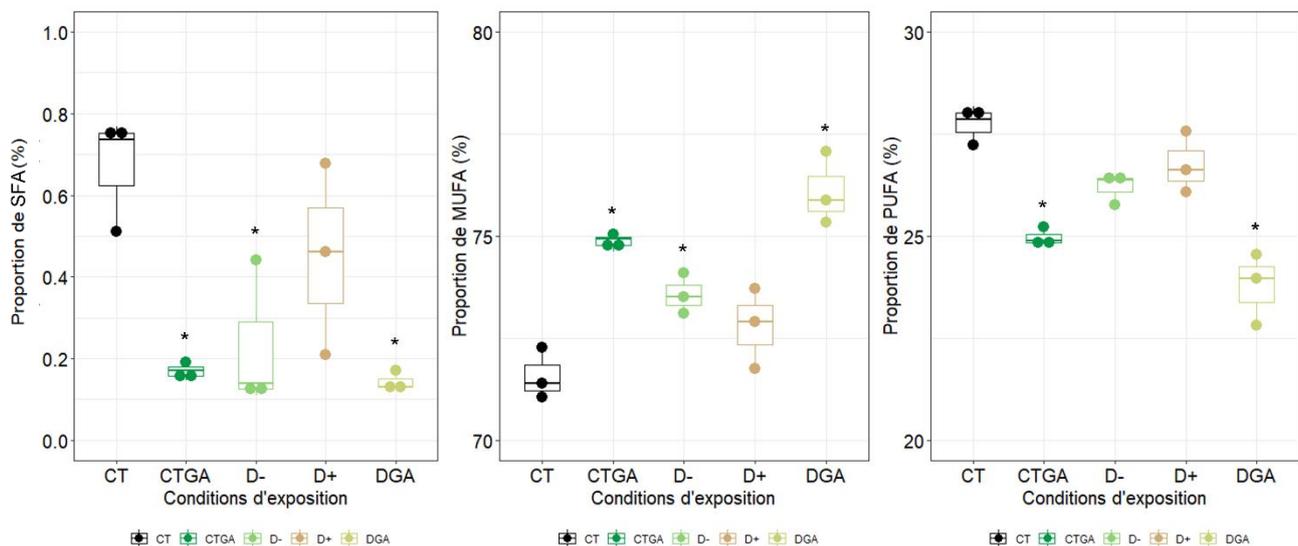


Figure 21 Proportion des trois principales classes d'acides gras exprimée en pourcentage, au sein d'une culture de biofilm exposée pendant 28 jours à différentes conditions de contamination. SFA : acides gras saturés, MUFA : acides gras monoinsaturés et PUFA : acide gras polyinsaturés. CT : Contrôle ; CTGA : Glyphosate ($1 \mu\text{g L}^{-1}$) + AMPA ($100 \mu\text{g L}^{-1}$) ; D- : $30 \mu\text{g L}^{-1}$; D+ : 30mg L^{-1} ; DGA : DAST (30mg L^{-1}) + Glyphosate ($1 \mu\text{g L}^{-1}$) + AMPA ($100 \mu\text{g L}^{-1}$). Pour toutes les conditions, $n = 3$. * indique une différence significative avec le CT ($p\text{-value} < 0,05$, Tukey test).

La composition en acides gras des biofilms était influencée par la contamination après 28 jours d'exposition avec des différences significatives marquées entre CT et CTGA d'une part, D- et DGA d'autre part. La composition en acides gras des biofilms exposés à D+ était plus proche de celle du CT que les autres biofilms contaminés (pas de différence significative). La condition CTGA a résulté en une diminution de SFA et de PUFA (-75% et -10% respectivement) et une augmentation significative de MUFA (+5%) par rapport au CT. La condition contaminée D- a provoqué une diminution de SFA (-66%) et une augmentation significative de MUFA (+3%) par rapport au CT.

Enfin la condition contaminée DGA a entraîné une diminution de SFA et de PUFA (-79% et -16% respectivement) et une augmentation significative de MUFA (+6%) par rapport au CT.

5 Discussion

5.1 Toxicité aiguë

Les activités de la β -glucosidase, de la leucine-aminopeptidase et de la phosphatase des cultures de *Scenedesmus costatus* et de biofilm ont été inhibées en présence de DAST. Cette inhibition a débuté dès le premier point de gamme (*i.e.* 20 mg L⁻¹). Cette concentration correspond aux pics de contamination saisonniers aux azurants optiques (AOs) de la Cleurie. Ces trois enzymes jouent un rôle clé dans les cycles du carbone, de l'azote et du phosphore, notamment au sein des communautés microbiennes aquatiques (**Battin *et al.*, 2016**). Une exposition au DAST pourrait donc affecter les cycles biogéochimiques de ces trois éléments au sein des écosystèmes aquatiques.

D'autres descripteurs fonctionnels telle que la photosynthèse n'ont pas été affectés par cet AO. En effet, les voies photochimiques (rendement quantique maximal) et non photochimiques (quenching non photochimique) des cultures de *Scenedesmus costatus* et de biofilm n'ont pas été affectées par le DAST au bout de 4-h d'exposition. Ces descripteurs avaient déjà été étudiés sur d'autres espèces d'algues monospécifiques (*e.g.* *Chlorella vulgaris* et *Microcystis aeruginosa*). A l'inverse, le rendement quantique maximal de ces espèces avait été inhibé (exposition de 72-h), et le quenching non photochimique affecté lorsque les concentrations de DAST étaient élevées (**Touret, 2022, rapport de M1**). Dans les deux cas, les concentrations de DAST utilisées étaient similaires. Pour certains composés organiques tels que l'atrazine, il existe de nombreuses différences de sensibilité interspécifique (**Chalifour *et al.*, 2016**). Il est possible que ces phénomènes se produisent également avec le DAST. Ces phénomènes avaient déjà été constatés par (**Martínez *et al.*, 2009**), lorsque pour une exposition à un même azurant, les effets observés sur les espèces monocotylédones différaient des espèces dicotylédones. Cette différence de sensibilité interspécifique pourrait causer des changements de structure au sein des communautés microbiennes aquatiques à moyen et long terme.

5.2 Toxicité chronique

5.2.1 La croissance du biofilm

La contamination au DAST avec ou sans glyphosate et AMPA a eu des effets faibles et transitoires sur la croissance du biofilm que ce soit pour l'ensemble du biofilm (AFDW) ou plus spécifiquement pour les autotrophes (chlorophylle a). D'une part le poids net de cendres (AFDW) n'a pas été affecté de manière significative chez les biofilms exposés au DAST avec/sans glyphosate et AMPA par rapport au CT, excepté une légère baisse chez les biofilms exposés uniquement à

glyphosate + AMPA (CTGA) après 28 jours. Ces effets sont vraisemblablement dus au mélange glyphosate + AMPA, puisque les travaux de (**Vera & Trinelli, 2021**) menés sur une culture de biofilm exposée pendant 21 jours à 400 $\mu\text{g L}^{-1}$ de glyphosate n'avaient pas montré de baisse significative de l'AFDW par rapport au CT. Concernant le DAST, il n'existe, à notre connaissance, aucune étude menée sur la toxicité chronique des azurants optiques sur les communautés microbiennes aquatiques. D'autre part, la teneur en chlorophylle-a (chl-a) a été transitoirement réduite par l'exposition au DAST et/ou glyphosate + AMPA au bout de 14 jours mais l'équilibre s'est ensuite rétabli au bout de 28 jours d'exposition. Ces résultats peuvent s'expliquer par un phénomène d'adaptation des communautés microbiennes aquatiques à l'exposition aux contaminant. Ces phénomènes d'adaptation peuvent s'expliquer par la disparition des espèces sensibles et la prolifération des espèces résistantes mais également par des changements physiologiques. En particulier, une exposition au glyphosate peut induire une augmentation de la sécrétion de la matrice extracellulaire du biofilm (EPS), permettant d'atténuer les effets du glyphosate sur les communautés y résidant (**Klátyik et al., 2017**). En effet, la matrice EPS procure aux microorganismes du biofilm une stabilité mécanique, permettant ainsi l'adsorption des communautés microbiennes à un substrat. Elle relie ces communautés entre elles, facilitant de fait la communication cellulaire. Elle fournit également un moyen de protection contre la prédation, mais également certaines substances chimiques (**Balaguer, 2016**). Dans le traitement DAST + glyphosate et AMPA (DGA), cette augmentation de l'EPS induite par la présence de glyphosate pourrait également protéger les communautés microbiennes des effets du DAST. Pour le vérifier, il serait intéressant de quantifier les EPS, mesurer les contaminants au sein de cette matrice, ou même de quantifier la bioaccumulation des contaminants au sein des cellules.

Après 28 jours d'exposition au DGA, la diminution de l'AFDW par rapport au CT associée à une teneur en chl-a similaire au CT pourrait être indicatrice d'un changement de ratio entre les communautés autotrophes et hétérotrophes. C'est la raison pour laquelle il est utile de s'intéresser à la composition des lipides au sein de ces communautés. En effet, les glycolipides se retrouvent principalement dans les membranes des thylakoïdes des microorganismes phototrophes (**Guschina & Harwood, 2009**). Notre étude montre une diminution des glycolipides (MGDG et SQDG) en présence de glyphosate + AMPA. Cependant, nous n'observons (dans le cadre de notre exposition chronique) pas de lien direct entre la teneur en chlorophylle-a et la quantité de glycolipides.

Les phospholipides sont communs aux communautés autotrophes et hétérotrophes. Il est donc compliqué de discriminer ces deux communautés sur la base de cette classe de lipide. Pour ce faire, il faudrait analyser les proportions des différentes espèces moléculaires étant propres aux algues vertes (C16:4 ou C18:4), aux diatomées (C20:5), aux cyanobactéries (C16:3 et C18:3) et aux bactéries dans chacune des classes de lipides (**Guschina & Harwood, 2009**). A terme, une baisse de la

proportion des communautés autotrophes au sein des communautés microbiennes pourrait entraîner une baisse de la productivité primaire nette (**Balaguer, 2016**). Cela pourrait également conduire à une compétition pour les nutriments entre les communautés autotrophes et hétérotrophes (**Hulot et al., 2001**). Finalement, cela pourrait entraîner des conséquences néfastes à l'échelle des écosystèmes aquatiques, mettant en confrontation directe la productivité primaire nette et la respiration.

5.2.2 La composition des communautés microbiennes

Si la biomasse a été peu affectée par l'exposition aux contaminants testés, la composition taxonomique du biofilm a été modifiée par ces expositions. En particulier, l'exposition au glyphosate + AMPA a fortement modifié la composition du biofilm avec une réduction de la densité cellulaire des algues vertes et des diatomées et une prolifération des cyanobactéries. Ces résultats sont en accord avec des travaux précédents ayant montré les effets du glyphosate sur la composition algale du biofilm. Par exemple, les travaux de (**Stachowski-Haberkorn et al., 2008**) ont montré des effets significatifs sur des changements de composition bactérienne sur un biofilm exposé à du Roundup® ($1 \mu\text{g L}^{-1}$) durant 7 jours. Les effets de l'AMPA sur la composition algale et notamment sur la prolifération des cyanobactéries sont probablement plus indirects et liés à son rôle dans l'eutrophisation des systèmes. De par sa composition riche en phosphore, l'AMPA est susceptible d'entraîner des processus d'eutrophisation des écosystèmes aquatiques (**Carles et al., 2019; Correll, 1998**). Il peut alors en résulter des efflorescences de cyanobactéries, entraînant une baisse de luminosité dans la colonne d'eau, et la production de substances allélochimiques nuisibles dans certains cas, conduisant à la diminution du nombre d'espèces et à une détérioration écologique des milieux (**Li et al., 2020**). De plus le phosphore peut s'accumuler au sein de la matrice extracellulaire du biofilm et provoquer une modification de la distribution taxonomique et de l'abondance de certaines espèces bactériennes (**Li et al., 2020**). Néanmoins (**Pesce et al., 2009**) suggérait que les changements structuraux observés lors de ses expositions de biofilm au glyphosate sont régis par un effet temporel (saisonnalité) plutôt que le glyphosate. C'est un aspect qui n'a pas été pris en compte dans nos expériences. Des conditions environnementales changeantes (température, luminosité, etc) peuvent jouer un rôle crucial quant aux réponses observées lors d'une exposition au glyphosate sur un biofilm (**Abdelhak et al., 2023**). Dans un contexte de changement global, il serait intéressant de réaliser de nouveau ces expériences en conditions contrôlées, mais en ajoutant des facteurs fluctuants, comme la luminosité, les nutriments ou encore la température.

Notre étude est la première à montrer les effets d'un azurant optique à des concentrations environnementales sur des communautés microbiennes aquatiques. L'exposition au DAST a eu des effets marqués sur les algues vertes et un peu moins forts sur les diatomées mais n'a pas affecté la densité cellulaire des cyanobactéries. L'exposition au mélange DAST + glyphosate et AMPA (DGA),

entraîne des effets similaires à l'exposition à la plus forte concentration au DAST en réduisant la densité cellulaire des diatomées et des algues vertes en revanche l'effet stimulant du glyphosate et de l'AMPA sur la prolifération des cyanobactéries est limité en présence du DAST. Ces différentes modifications de répartition et de densité cellulaire pourraient entraîner de nouveau des répercussions sur la productivité primaire nette des écosystèmes aquatiques. Il serait intéressant d'approfondir les analyses des communautés bactériennes en réalisant par exemple du séquençage ADN, afin d'obtenir plus d'informations sur les effets des contaminants sur la partie hétérotrophe du biofilm. Cette perspective nous permettrait d'approfondir l'identification des taxons et obtenir des informations à l'échelle de l'espèce au sein des communautés phototrophes.

5.2.3 Les fonctions des communautés microbiennes aquatiques

Les communautés autotrophes au sein du biofilm assurent la production primaire nette par le biais de la photosynthèse, tandis que les communautés hétérotrophes vont jouer un rôle dans les cycles biogéochimiques du carbone, de l'azote et du phosphore. Dans notre étude, les effets les plus marqués ont été observés sur les fonctions autotrophes (rendement quantique) alors que les fonctions hétérotrophes mesurées (bêta-glucosidase, phosphatase, leucine-aminopeptidase) étaient très variables et peu affectées par les contaminants testés.

Le glyphosate et l'AMPA sont susceptibles d'altérer les processus photosynthétiques des biofilms ou de plantes comme démontrés par plusieurs auteurs. Ainsi, (**Bonnineau et al., 2012**) ont montré que le glyphosate pouvait induire une inhibition significative du rendement quantique d'une culture de biofilm exposée pendant 6-h. Néanmoins, ces effets ont été observés à de très fortes concentrations ($CE_{50} = 6,1 \text{ mg L}^{-1}$). Ces concentrations ne sont pas communes dans l'environnement, mais peuvent se retrouver dans certains pays qui utilisent massivement du glyphosate (**Brovini et al., 2021**). Néanmoins ces concentrations n'ont encore jamais été détectées dans les cours d'eau français (**Carles et al., 2019**). D'autres expositions sur des plantes avaient montré que des concentrations de $0,28 \text{ kg ha}^{-1}$ d'AMPA et $1,4 \text{ kg ha}^{-1}$ de glyphosate avaient provoqué une baisse significative sur rendement quantique après 12-h d'exposition (**Gomes et al., 2016**). Certaines régions de France possèdent de grandes surfaces agricoles utiles, où les quantités d'herbicides appliquées peuvent être de l'ordre de $2,52 \text{ kg ha}^{-1}$ (**NotreEnvironnement, 2019**). Très peu d'études ont reporté des effets sur le rendement quantique de culture de biofilm exposées à des concentrations environnementales de glyphosate et d'AMPA à long terme. Dans notre étude, le glyphosate et l'AMPA ont provoqué une inhibition significative du rendement quantique du biofilm à partir de 14 jours d'exposition. Ces effets se sont accentués à 28 jours d'exposition. Ces résultats sont cohérents avec l'inhibition du taux de transport d'électrons relatif (rETR) chez les biofilms exposés au glyphosate + AMPA par rapport au CT. (**Gomes et al., 2016**) justifiait une inhibition du rETR par une dégradation des pigments

photosynthétiques (chl-a), cependant nos résultats n'indiquent pas de baisse significative de la chl-a à 28 jours d'exposition. Il est donc possible que le mélange glyphosate + AMPA ne provoque pas d'effets directs sur le photosystème II (PSII), mais altèrent d'autres composants pouvant jouer un rôle dans la viabilité du photosystème I (PSI) ou le cycle de Calvin (**Gomes et al., 2016**).

Contrairement à ce que nous avons pu observer pour l'exposition au glyphosate + AMPA, l'exposition au DAST n'a provoqué aucun effet sur le rendement quantique dans notre étude. Il semble néanmoins qu'à forte concentration (30 mg L⁻¹), le DAST stimule le rETR sans pour autant observer d'augmentation du rendement quantique. Cette stimulation pourrait à terme conduire à une accumulation d'électrons transitant entre le PSII et le PSI et créer un embouteillage électronique provoquant ensuite l'apparition de radicaux superoxyde (**Gollan et al., 2017**). Ces radicaux pourraient induire des dommages oxydatifs aux centre Fe-S du PSI (**Gollan et al., 2017; Kazuhito Inoue, 1986**). De plus, d'anciens travaux ont mis en évidence que le DAST pouvait inhiber des transporteurs anioniques (cellules animales) comme ceux des sulfates (**McConnell & Aronson, 1994**). Les sulfates sont impliqués dans des processus de détoxification cellulaire (e.g. glutathion-S-transférase, glutathion réductase, glutathion peroxydase) (**Pawlik-Skowrońska et al., 2004**). Une carence en cet élément pourrait avoir de fortes répercussion du les mécanismes de défense cellulaire du biofilm. Afin d'explorer les potentielles interactions entre exposition au DAST et stress oxydatif, il serait intéressant d'étudier l'activité des enzymes antioxydantes telles que la superoxyde dismutase (SOD) ou la glutathion-S-transférase au sein du biofilm en réponse à une exposition au DAST. Lorsque le glyphosate + AMPA était en mélange avec du DAST, l'inhibition du rETR disparaissait, et le rETR était même plus important que le CT à 28 jours d'exposition. Ces observations sont cohérentes avec les résultats obtenus avec le DAST seul. Le DAST joue potentiellement un rôle antagoniste en présence de glyphosate et d'AMPA. C'est ce que (**Juan, 2022**) avait observé sur une souche de cyanobactérie exposée à deux herbicides.

Les travaux de (**Gomes et al., 2016**) ont également mis en avant une inhibition du quenching non photochimique (NPQ) en plus des effets observés sur le rendement quantique. Le NPQ possède un rôle protecteur du PSII en dissipant l'excès d'énergie lumineuse reçu par les communautés phototrophes. Une inhibition de ce paramètre pourrait causé davantage de dommage au PSII des microorganismes et donc indirectement, impacter leur rendement quantique (**Gomes et al., 2016**). L'activation du NPQ va déclencher des changements structuraux concernant les pigments photosynthétiques des communautés phototrophes ; c'est le cycle xanthophylle (**Latowski et al., 2004**). Dans le cadre de nos expériences, le NPQ n'est pas un paramètre qui a été significativement impacté par les conditions de contamination. Si tel avait été le cas, il aurait été intéressant de réaliser

des analyses pigmentaires par HPLC-MS, notamment en s'intéressant au dosage des caroténoïdes, précurseurs du cycle xanthophylle (**Boussiba, 2000**).

Concernant les activités enzymatiques, aucune différence significative n'a été observée entre les conditions contaminées et le CT après 1, 14 et 28 jours d'expérience. A notre connaissance, la réponse des activités microbiennes du biofilm exposé au DAST n'avait jamais été étudiée mais plusieurs auteurs se sont intéressés à la réponse de ces activités en présence de glyphosate et/ou d'AMPA. En particulier, (**Carles et al., 2019**) avait mené une expérience en microcosme où des cultures de biofilms ont été exposées pendant 27 jours à différentes conditions de contamination en glyphosate. Leurs travaux ont montré qu'en présence de glyphosate mais d'une faible concentration en phosphore total, la phosphatase était stimulée. En revanche, la phosphatase n'était pas stimulée lorsque le phosphore total était abondant, en plus du glyphosate. La teneur en phosphore dans la colonne d'eau est donc l'une des variables qui conditionnent la dégradation du glyphosate par les communautés bactériennes, et donc indirectement, l'accumulation d'AMPA dans la colonne d'eau. Dans le cadre de nos expériences, des nutriments ont été ajoutés dans l'ensemble des conditions à chaque changement d'eau. De fait, le phosphore n'était pas un élément limitant. Cela peut être l'une des raisons pour laquelle la phosphatase n'a pas été stimulée dans les conditions contaminées contenant du glyphosate et de l'AMPA. D'autres travaux ont montré une stimulation la β -glucosidase (GLU) d'une communauté microbienne issue d'un sol, après une exposition au glyphosate (7 L ha^{-1}) (**Thi Hong Tho et al., 2023**). Ces tendances n'ont pas été observées lors de nos expériences.

Dans le cadre de nos expériences d'exposition chronique, les tendances à la baisse par rapport au CT des activités bêta-glucosidase et phosphatase ont été observées après 4-h d'exposition au DAST à 30 mg L^{-1} . Ces tendances restent cohérentes avec les résultats de toxicité aiguë (4-h d'exposition) qui indiquaient que ces deux enzymes ($CE_{50} = 57$ et 72 mg L^{-1} respectivement) étaient les plus sensibles au DAST par rapport à la leucine-aminopeptidase. Néanmoins, ces tendances ont disparu à 14 et 28 jours d'exposition, indiquant une récupération fonctionnelle de ces communautés.

5.2.4 La stabilité des communautés microbiennes aquatiques en tant que ressource

La qualité nutritionnelle du biofilm est régie par la proportion de carbone, d'azote et de phosphore, mais également par la composition lipidique de ce dernier, et notamment les profils en acides gras. Certains acides gras étant synthétisés uniquement par les micro-algues, la nature des acides gras est en partie conditionnée par la composition du biofilm et la proportion relative de bactéries et de micro-algues (diatomées, algues vertes, cyanobactéries) (**Fernandes da Silva et al., 2008; Hill et al., 2011**). D'autres facteurs peuvent également modifier la composition lipidique des communautés microbiennes aquatiques tels que la température ou la saisonnalité (**Torres-Ruiz et al., 2007**). Dans le cadre de notre expérience, certains contaminants testés ont entraîné des modifications

de la composition en acides gras. En particulier la proportion en acides gras polyinsaturés, ainsi que dans une moindre mesure celle des acides gras insaturés a diminué au profit d'une augmentation de la quantité d'acides gras monoinsaturés dans les biofilms exposés au glyphosate et à l'AMPA avec et sans DAST. Les acides gras polyinsaturés sont abondamment présents dans certaines communautés microbiennes telles que les diatomées mais ne sont généralement pas synthétisés par les animaux (**Hill et al., 2011**). Ce sont donc des acides gras essentiels et nécessaires au bon fonctionnement de ces organismes. Cette diminution des acides gras polyinsaturés chez les biofilms exposés au glyphosate + AMPA avec ou sans DAST témoigne d'une dégradation de la qualité nutritionnelle du biofilm et pourrait donc avoir des répercussions néfastes sur les consommateurs secondaires.

Pour poursuivre la caractérisation des effets du glyphosate et de l'AMPA et/ou du DAST sur le lipidome du biofilm, il serait intéressant d'étudier les espèces moléculaires de chaque lipide. Ces données pourraient d'une part renseigner plus précisément sur la qualité nutritionnelle du biofilm (e.g. teneur en acide gras omega-3) et d'autre part apporter des précisions sur les proportions des groupes algaux. En effet, certains acides gras polyinsaturés sont produits uniquement par certains groupes de micro-algues comme l'acide gras polyinsaturé C20:5 caractéristique des diatomées. Il serait alors possible de connaître si un enrichissement en cyanobactéries au sein des conditions contenant du glyphosate et de l'AMPA correspond à une diminution de cet acide gras en question. De plus, la temporalité n'a pas été prise en compte dans les analyses statistiques de la lipidomique. Mais nous pourrions comparer les profils d'acides gras à 14 et 28 jours d'exposition au travers d'analyses multivariées, afin de déterminer si la composante temporelle joue également un rôle dans les modifications des profils d'acides gras.

6 Conclusion

Notre étude a montré que les effets des azurants optiques à court terme (4-h) sur les communautés microbiennes aquatiques sont fonction de la nature des azurants. Le DAST a provoqué une inhibition des activités enzymatiques sur *Scenedesmus costatus* et une culture de biofilm, tandis que le FWA-393 n'a pas eu d'effet. Les effets sont également fonction de la nature des descripteurs biologiques observés. Aucun des trois azurants optiques testés n'a eu d'effet sur l'activité photosynthétique des communautés autotrophes.

Les différentes conditions de contamination sélectionnées pour l'exposition chronique se sont basées sur les conditions environnementales de la Cleurie. Notre étude a montré que le DAST, seul ou en mélange avec du glyphosate + AMPA pouvait provoquer des modifications structurelles (répartition et densité des groupes algaux à 28 jours d'exposition) au sein des communautés microbiennes aquatiques. Concernant les réponses fonctionnelles, seul le taux de transport d'électrons

relatif (rETR) a montré une différence (non significative) avec le CT. Le mélange glyphosate + AMPA a également provoqué des modifications structurelles (répartition et densité des groupes algaux à 28 jours d'exposition). Il a également entraîné une légère diminution du rendement quantique, ainsi qu'une diminution du rETR. Les activités enzymatiques n'ont pas été significativement affectées par l'ensemble des conditions contaminées. Le mélange glyphosate + AMPA a également provoqué une modification des profils en acides gras et en lipides polaires à 28 jours d'exposition. Le DAST a également eu des effets sur le lipidome des communautés microbiennes aquatiques, plus ou moins discutables en fonction de la variabilité observée.

Dans l'ensemble, les résultats obtenus suggèrent que les conditions environnementales de la Cleurie sont susceptibles d'induire des modifications structurelles au sein des communautés microbiennes aquatiques. Ces conditions peuvent également provoquer des modifications du lipidome et donc altérer la qualité nutritionnelle de ces communautés en tant que ressource. Cela pourrait donc avoir des impacts sur les flux de production secondaire au sein des écosystèmes, et donc leur bon fonctionnement.

- Abdelhak, S., Menard, Y., & Artigas, J. (2023). Effects of global change on the ability of stream biofilm to dissipate the herbicide glyphosate. *Environ Pollut*, 324, 121406. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2023.121406>
- ADE. (2022). *L'Etat des eaux, le point*. <https://www.eau-rhin-meuse.fr/la-qualite-de-leau-et-des-milieux-aquatiques/etat-des-eaux-le-point>
- Assaad, A., Pontvianne, S., & Pons, M.-N. (2014). Photodegradation-based detection of fluorescent whitening agents in a mountain river. *Chemosphere*, 100, 27-33. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2013.12.095>
- Balaguer, A. M. R. H. G. M. D. (2016). *Aquatic Biofilms: Ecology, Water Quality and Wastewater Treatment* (H. G. a. M. D. B. Anna M. Romani & U. o. G. Campus de Montilivi, Spain, Eds.). Caister Academic Press. <https://doi.org/10.21775/9781910190173>
- Battin, T. J., Besemer, K., Bengtsson, M. M., Romani, A. M., & Packmann, A. I. (2016). The ecology and biogeochemistry of stream biofilms. *Nat Rev Microbiol*, 14(4), 251-263. <https://doi.org/10.1038/nrmicro.2016.15>
- Benbrook, C. M. (2016). Trends in glyphosate herbicide use in the United States and globally. *Environ Sci Eur*, 28(1), 3. <https://doi.org/10.1186/s12302-016-0070-0>
- Bonnineau, C., Artigas, J., Chaumet, B., Dabrin, A., Fabure, J., Ferrari, B. J. D., Lebrun, J. D., Margoum, C., Mazzella, N., Miege, C., Morin, S., Uher, E., Babut, M., & Pesce, S. (2021). Role of Biofilms in Contaminant Bioaccumulation and Trophic Transfer in Aquatic Ecosystems: Current State of Knowledge and Future Challenges. *Rev Environ Contam Toxicol*, 253, 115-153. https://doi.org/10.1007/398_2019_39
- Bonnineau, C., Sague, I. G., Urrea, G., & Guasch, H. (2012). Light history modulates antioxidant and photosynthetic responses of biofilms to both natural (light) and chemical (herbicides) stressors. *Ecotoxicology*, 21(4), 1208-1224. <https://doi.org/10.1007/s10646-012-0876-5>
- Boussiba, S. (2000). Carotenogenesis in the green alga *Haematococcus pluvialis*: Cellular physiology and stress response. *Physiologia Plantarum*, 108(2), 111-117. <https://doi.org/10.1034/j.1399-3054.2000.108002111.x>
- Brasch, J., Kreislermaier, I., & Christophers, E. (2003). Inhibition of dermatophytes by optical brighteners. *Mycoses*, 46(3-4), 120-125. <https://doi.org/10.1046/j.1439-0507.2003.00857.x>
- Bricheux, G., Le Moal, G., Hennequin, C., Coffe, G., Donnadiou, F., Portelli, C., Bohatier, J., & Forestier, C. (2013). Characterization and evolution of natural aquatic biofilm communities exposed in vitro to herbicides. *Ecotoxicol Environ Saf*, 88, 126-134. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2012.11.003>

- Brovini, E. M., Cardoso, S. J., Quadra, G. R., Vilas-Boas, J. A., Paranaíba, J. R., Pereira, R. O., & Mendonça, R. F. (2021). Glyphosate concentrations in global freshwaters: are aquatic organisms at risk? *Environ Sci Pollut Res Int*, 28(43), 60635-60648. <https://doi.org/10.1007/s11356-021-14609-8>
- Carles, L., Gardon, H., Joseph, L., Sanchis, J., Farre, M., & Artigas, J. (2019). Meta-analysis of glyphosate contamination in surface waters and dissipation by biofilms. *Environ Int*, 124, 284-293. <https://doi.org/10.1016/j.envint.2018.12.064>
- Chalifour, A., LeBlanc, A., Sleno, L., & Juneau, P. (2016). Sensitivity of *Scenedesmus obliquus* and *Microcystis aeruginosa* to atrazine: effects of acclimation and mixed cultures, and their removal ability. *Ecotoxicology*, 25(10), 1822-1831. <https://doi.org/10.1007/s10646-016-1728-5>
- Chen, H., Han, X., Zhu, C., Du, B., Tan, L., He, R., Shen, M., Liu, L. Y., & Zeng, L. (2022). Identification of Fluorescent Brighteners as Another Emerging Class of Abundant, Ubiquitous Pollutants in the Indoor Environment. *Environ Sci Technol*, 56(14), 10131-10140. <https://doi.org/10.1021/acs.est.2c03082>
- CISE. (2022). *Le centre d'information sur l'eau : l'état de l'eau en Europe*. <https://www.cieau.com/connaitre-leau/les-ressources-en-france-et-dans-le-monde/quel-est-letat-de-leau-en-europe/>
- Correll, D. L. (1998). The Role of Phosphorus in the Eutrophication of Receiving Waters: A Review. *Journal of Environmental Quality*, 27(2), 261-266. <https://doi.org/10.2134/jeq1998.00472425002700020004x>
- Fadhlaoui, M., Laderrière, V., Lavoie, I., & Fortin, C. (2020). Influence of Temperature and Nickel on Algal Biofilm Fatty Acid Composition. *Environ Toxicol Chem*, 39(8), 1566-1577. <https://doi.org/10.1002/etc.4741>
- Fernandes da Silva, C., Ballester, E., Monserrat, J., Geracitano, L., Wasielesky Jr, W., & Abreu, P. C. (2008). Contribution of microorganisms to the biofilm nutritional quality: protein and lipid contents. *Aquaculture Nutrition*, 14(6), 507-514. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2095.2007.00556.x>
- Fleck, J.-F. (2016). Rapport d'analyses 3DLG001_GLP_R1. 2.
- Gollan, P. J., Lima-Melo, Y., Tiwari, A., Tikkanen, M., & Aro, E. M. (2017). Interaction between photosynthetic electron transport and chloroplast sinks triggers protection and signalling important for plant productivity. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*, 372(1730). <https://doi.org/10.1098/rstb.2016.0390>
- Gomes, M. P., Le Manac'h, S. G., Maccario, S., Labrecque, M., Lucotte, M., & Juneau, P. (2016). Differential effects of glyphosate and aminomethylphosphonic acid (AMPA) on

- photosynthesis and chlorophyll metabolism in willow plants. *Pestic Biochem Physiol*, 130, 65-70. <https://doi.org/10.1016/j.pestbp.2015.11.010>
- Goulson, D., Martínez, A.-M., Hughes, W. O. H., & Williams, T. (2000). Effects of Optical Brighteners Used in Biopesticide Formulations on the Behavior of Pollinators. *Biological Control*, 19(3), 232-236. <https://doi.org/10.1006/bcon.2000.0861>
- Guo, X.-X., Hu, W., Liu, Y., Gu, D.-C., Sun, S.-Q., Xu, C.-H., & Wang, X.-C. (2015). Rapid analysis and quantification of fluorescent brighteners in wheat flour by Tri-step infrared spectroscopy and computer vision technology. *Journal of Molecular Structure*, 1099, 393-398.
- Guschina, I. A., & Harwood, J. L. (2009). Algal lipids and effect of the environment on their biochemistry. In M. Kainz, M. T. Brett, & M. T. Arts (Eds.), *Lipids in Aquatic Ecosystems* (pp. 1-24). Springer New York. https://doi.org/10.1007/978-0-387-89366-2_1
- Hayashi, Y., Managaki, S., & Takada, H. (2002). Fluorescent whitening agents in Tokyo Bay and adjacent rivers: Their application as anthropogenic molecular markers in coastal environments. *Environmental science & technology*, 36(16), 3556-3563.
- Hébert, M.-P., Fugère, V., & Gonzalez, A. (2019). The overlooked impact of rising glyphosate use on phosphorus loading in agricultural watersheds. *Frontiers in Ecology and the Environment*, 17(1), 48-56. <https://doi.org/10.1002/fee.1985>
- Hill, W. R., Rinchar, J., & Czesny, S. (2011). Light, nutrients and the fatty acid composition of stream periphyton. *Freshwater Biology*, 56(9), 1825-1836. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2427.2011.02622.x>
- Hulot, F. D., Morin, P. J., & Loreau, M. (2001). Interactions between algae and the microbial loop in experimental microcosms. *Oikos*, 95(2), 231-238. <https://doi.org/10.1034/j.1600-0706.2001.950205.x>
- Juan, D. (2022). *LES RÉPONSES DES MICROALGUES ARCTIQUES ET TEMPÉRÉES AUX PESTICIDES ET À LA LUMIÈRE DIFFÉRENT PAR LEURS CARACTÉRISTIQUES ÉCOPHYSIOLOGIQUES* Université du québec à Montréal]. Montréal (Québec, Canada). <https://archipel.uqam.ca/16290/>
- Kazuhito Inoue, H. S., Tetsuo Hiyama. (1986). Photoinactivation Sites of Photosystem I in Isolated Chloroplasts. *Plant and Cell Physiology*. <https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.pcp.a077213>
- Klátyik, S., Takács, E., Mörtl, M., Földi, A., Trábert, Z., Ács, É., Darvas, B., & Székács, A. (2017). Dissipation of the herbicide active ingredient glyphosate in natural water samples in the presence of biofilms. *International Journal of Environmental Analytical Chemistry*, 97(10), 901-921. <https://doi.org/10.1080/03067319.2017.1373770>

- Latowski, D., Grzyb, J., & Strzałka, K. (2004). The xanthophyll cycle - molecular mechanism and physiological significance. *Acta Physiologiae Plantarum*, 26(2), 197-212. <https://doi.org/10.1007/s11738-004-0009-8>
- LeMonde. (2022). *Glyphosate : l'expertise européenne nécessaire à la réautorisation reportée en 2023*. https://www.lemonde.fr/planete/article/2022/05/10/glyphosate-une-etude-attendue-par-l-ue-pour-prolonger-ou-non-son-usage-reportee-d-un-an_6125529_3244.html
- LeQuotidien. (2023). *L'UE tolère le glyphosate jusqu'à fin 2023*.
- Li, Q., Gu, P., Luo, X., Zhang, H., Huang, S., Zhang, J., & Zheng, Z. (2020). Pilot-scale study on the effects of cyanobacterial blooms on *Vallisneria natans* and biofilms at different phosphorus concentrations. *Environ Pollut*, 265(Pt A), 114996. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2020.114996>
- Martínez, A. M., Velasco, S., Méndez, A., Figueroa, J. I., España, M. L., Cárdenas-Navarro, R., & Pineda, S. (2009). Effects of optical brighteners used in biopesticide formulations on crops: reflectance, stomatal conductance, photosynthesis, and growth. *Commun Agric Appl Biol Sci*, 74(1), 117-123.
- McConnell, K. R., & Aronson, P. S. (1994). Effects of inhibitors on anion exchangers in rabbit renal brush border membrane vesicles. *Journal of Biological Chemistry*, 269(34), 21489-21494. [https://doi.org/10.1016/s0021-9258\(17\)31830-6](https://doi.org/10.1016/s0021-9258(17)31830-6)
- Mensink, H., Janssen, P. (1994). *Glyphosate*. <https://www.inchem.org/documents/ehc/ehc/ehc159.htm#SubSectionNumber:9.1.1>
- Mustalish, R. A. (2000). Optical brighteners: History and technology. *Studies in Conservation*, 45(sup1), 133-136.
- Niloy, N. M., Haque, M. M., & Tareq, S. M. (2021). Fluorescent whitening agents in commercial detergent: A potential marker of emerging anthropogenic pollution in freshwater of Bangladesh. *Environmental Nanotechnology, Monitoring & Management*, 15, 100419. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.enmm.2020.100419>
- NotreEnvironnement. (2019). *Les quantités de glyphosate vendues en France*. <https://www.notre-environnement.gouv.fr/themes/sante/les-produits-chimiques-ressources/article/les-quantites-de-glyphosate-vendues-en-france>
- OCDE. (2023). <https://www.oecd.org/fr/>
- Pawlik-Skowrońska, B., Pirszel, J., Kalinowska, R., & Skowroński, T. (2004). Arsenic availability, toxicity and direct role of GSH and phytochelatins in As detoxification in the green alga *Stichococcus bacillaris*. *Aquatic Toxicology*, 70(3), 201-212. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2004.09.003>

- Pesce, S., Batisson, I., Bardot, C., Fajon, C., Portelli, C., Montuelle, B., & Bohatier, J. (2009). Response of spring and summer riverine microbial communities following glyphosate exposure. *Ecotoxicol Environ Saf*, 72(7), 1905-1912. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2009.07.004>
- PPDB. (2022). *Aminomethylphosphonic acid*. <https://sitem.herts.ac.uk/aeru/ppdb/en/Reports/842.htm>
- Ritz C, B. F., Streibig JC, Gerhard D. (2015). *Dose-Response Analysis Using R*. <http://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0146021>.
- Roche, P.-A., Billen, G., Bravard, J.-P., Décamps, H., Pennequin, D., Vindimian, E., & Wasson, J.-G. (2005). Les enjeux de recherche liés à la directive-cadre européenne sur l'eau. *Comptes Rendus Geoscience*, 337(1-2), 243-267.
- Saeed, A., Shabir, G., & Batool, I. (2014). Novel stilbene-triazine symmetrical optical brighteners: Synthesis and applications. *Journal of fluorescence*, 24(4), 1119-1127.
- Salas, H., Gutiérrez-Bouzán, C., López-Grimau, V., & Vilaseca, M. (2019). Respirometric study of optical brighteners in textile wastewater. *Materials*, 12(5), 785.
- SIAM20. (2005). *SIDS Initial Assessment Report*.
- Stachowski-Haberkorn, S., Becker, B., Marie, D., Haberkorn, H., Coroller, L., & de la Broise, D. (2008). Impact of Roundup on the marine microbial community, as shown by an in situ microcosm experiment. *Aquat Toxicol*, 89(4), 232-241. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2008.07.004>
- Thi Hong Tho, N., Agustian, A., & Hermansah, H. (2023). Investigating the Effect of Using Glyphosate on Microbial Soil in Sweet Corn Cultivation. *AJARCADE (Asian Journal of Applied Research for Community Development and Empowerment)*, 7(2), 45-50. <https://doi.org/10.29165/ajarcde.v7i2.270>
- Torres-Ruiz, M., Wehr, J. D., & Perrone, A. A. (2007). Trophic relations in a stream food web: importance of fatty acids for macroinvertebrate consumers. *Journal of the North American Benthological Society*, 26(3), 509-522. <https://doi.org/10.1899/06-070.1>
- Tsui, M. T., & Chu, L. M. (2003). Aquatic toxicity of glyphosate-based formulations: comparison between different organisms and the effects of environmental factors. *Chemosphere*, 52(7), 1189-1197. [https://doi.org/10.1016/S0045-6535\(03\)00306-0](https://doi.org/10.1016/S0045-6535(03)00306-0)
- Van Bruggen, A. H. C., He, M. M., Shin, K., Mai, V., Jeong, K. C., Finckh, M. R., & Morris, J. G., Jr. (2018). Environmental and health effects of the herbicide glyphosate. *Sci Total Environ*, 616-617, 255-268. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2017.10.309>
- Vera, M. S., & Trinelli, M. A. (2021). First evaluation of the periphyton recovery after glyphosate exposure. *Environ Pollut*, 290, 117998. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2021.117998>

- Wang, C., Lin, X., Li, L., & Lin, S. (2016). Differential Growth Responses of Marine Phytoplankton to Herbicide Glyphosate. *PLoS One*, *11*(3), e0151633. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0151633>
- Weng, Y. (2013). Impact of brilliant yellow on the synthesis and structure change of *Gluconacetobacter xylinus* cellulose. *American Society of Agricultural and Biological Engineers*. <https://doi.org/10.13031/aim.20131621202>
- Wickham. (2016). *ggplot2: Elegant Graphics for Data Analysis*. <https://ggplot2.tidyverse.org>.
- Wu, Y., Xian, Y., Guo, X., Chen, L., Zhao, X., Wang, B., & Wang, L. (2018). Development and validation of a screening and quantification method for simultaneous determination of seven fluorescent whitening agents in commercial flour using UPLC–MS/MS. *Food chemistry*, *243*, 162-167.

Annexe 1 : Méthode de dosage des nutriments

- Colonne Metrosep A Supp5 – 250/4.0 et pré-colonne Supp 4/5 Guard/4.0
- Phase mobile : Na_2CO_3 à 3.2 mM et de NaHCO_3 à 1 mM
- Solution de rinçage est du NaOH à 5mM
- L'analyse des anions nécessite une suppression chimique pour atténuer le bruit de fond qui est faite par le module Metrohm Suppressor et qui est régénérée avec du H_2SO_4 à 100 mM et de l'eau ultra pure (EUP)
- Un filtre RP2 est utilisé pour protéger la colonne contre les traces d'oxydes de fer et les bactéries
- Cette méthode permet de doser à l'aide d'une gamme d'étalonnage les ions Cl^- , NO_2^- , NO_3^- , PO_4^{3-} et SO_4^{2-}
- Les données sont retraitées sur le logiciel Magic Net

Annexe 2 : Méthode de dosage des azurants optiques

- Chromatographie liquide haute performance (HPLC) Ultimate 3000 (Dionex) EC125/2 NUCLEODUR HILIC, 3 μm , 125x2,0 mm
- Couplage à un spectromètre de masse API 2000 (AB Sciex), triple quadripôle
- Méthode d'ionisation de type ESI (ElectroSpray Ionisation)
- Phase mobile : mélange (50:50) eau ultra-pure (EUP) – acétate d'ammonium 200 mM + acétonitrile (v:v)
- Mode isocratique
- Débit 400 $\mu\text{L}/\text{min}$
- Volume d'injection : 50 μL
- T° colonne : 40°C

Annexe 3 : Méthode de dosage lipides polaires

- Chromatographie liquide haute performance (HPLC) Ultimate 3000 (Dionex) Luna 3 μm NH₂ 100A 100x2,0 mm
- Couplage à un spectromètre de masse API 2000 (AB Sciex), triple quadripôle
- Méthode d'ionisation de type ESI (ElectroSpray Ionisation)
- Phase mobile : mélange (95:5) acétonitrile – eau ultra-pure (EUP) + acétate d'ammonium 40 mM (v:v)
- Mode gradient
- Débit 400 $\mu\text{L}/\text{min}$
- Volume d'injection : 50 μL
- T° colonne : 35°C

Annexe 4 : Résultats exposition aiguë

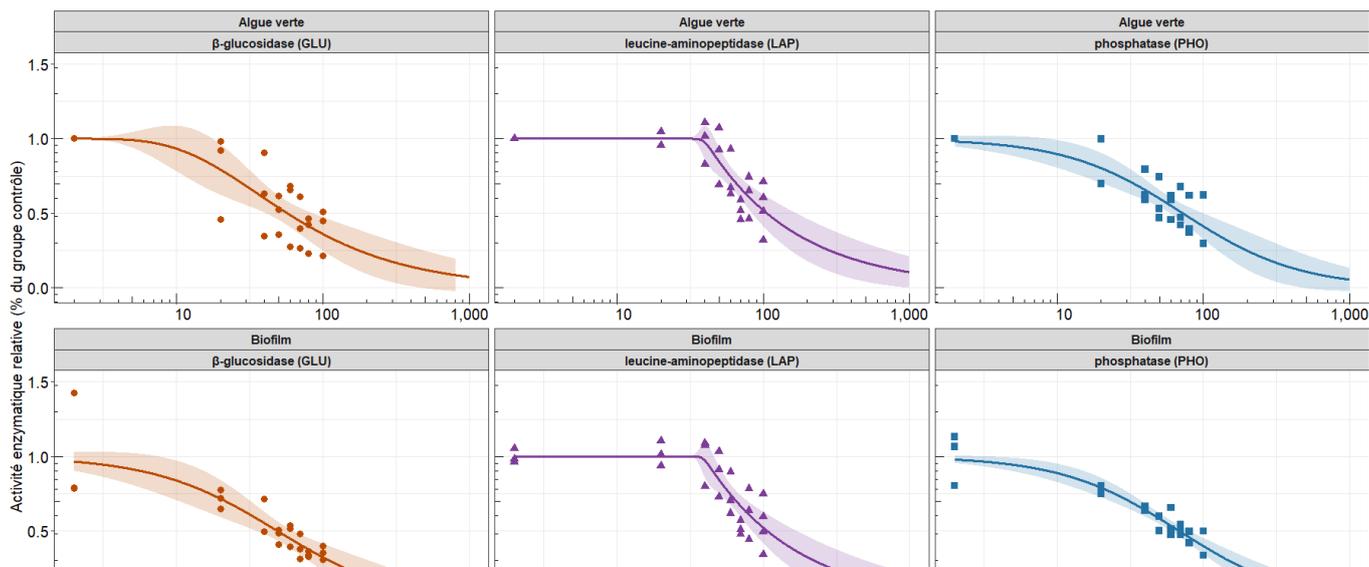


Figure Activité de la bêta-glucosidase (GLU), de la leucine-aminopeptidase (LEU) et de la phosphatase (PHO) (données relatives) d'une culture d'algue verte *Scenedesmus costatus* et d'une culture de biofilm exposées à des concentrations croissantes de FWA-393 pendant 4-h. Les points correspondent aux valeurs expérimentales, les traits pleins aux modèles de dose-réponse ajustés aux valeurs expérimentales et les zones colorées à l'intervalle à 95 % de ces modèles. 1 = 100% de similarité avec le groupe contrôle. Pour toutes les conditions, n = 3.

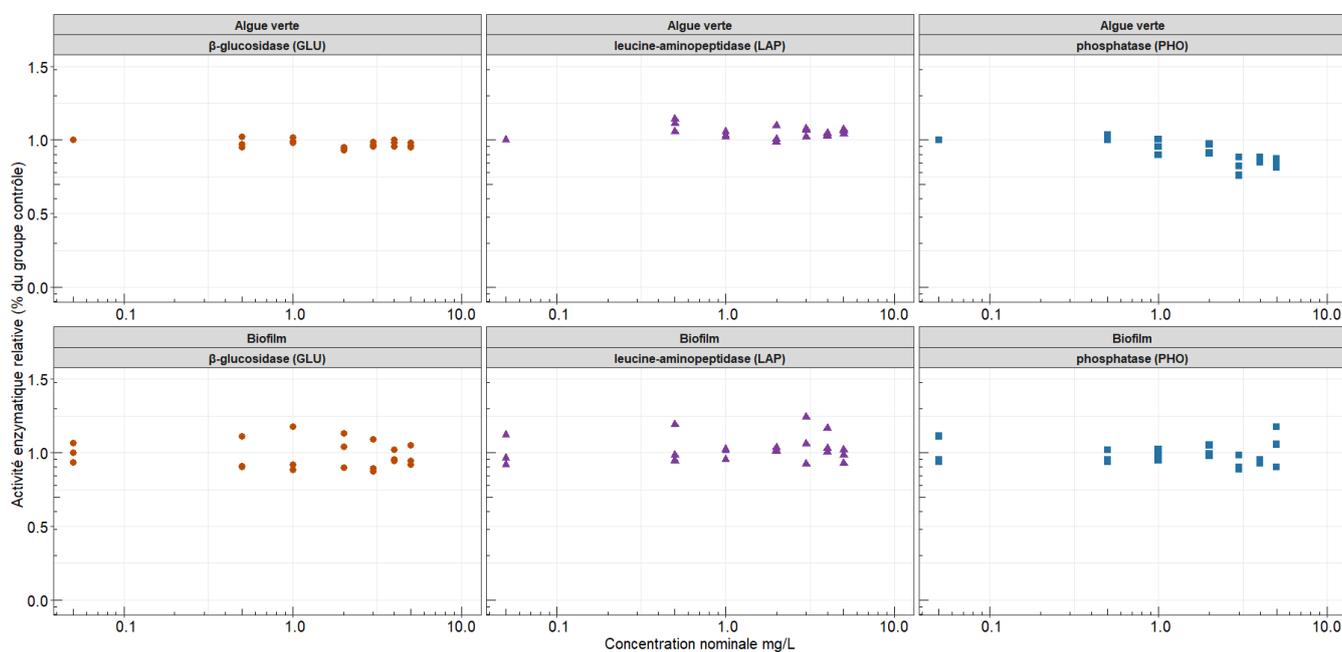


Figure Activité de la bêta-glucosidase (GLU), de la leucine-aminopeptidase (LEU) et de la phosphatase (PHO) (données relatives) d'une culture d'algue verte *Scenedesmus costatus* et d'une culture de biofilm exposées à des concentrations croissantes de DAST pendant 4-h. Les points correspondent aux valeurs expérimentales, les traits pleins aux modèles de dose-réponse ajustés aux valeurs expérimentales et les zones colorées à l'intervalle à 95 % de ces modèles. 1 = 100% de similarité avec le groupe contrôle. Pour toutes les conditions, n = 3.

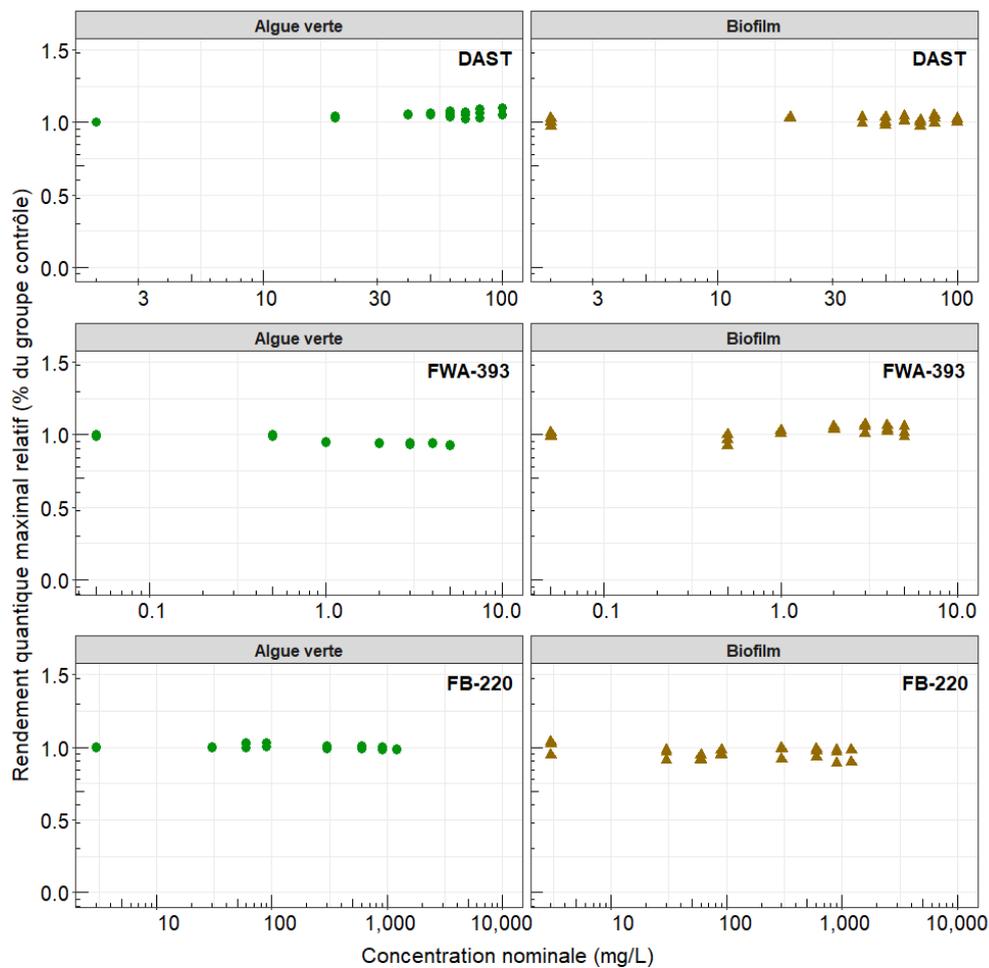


Figure Valeurs issues du rendement quantique maximal (Yieldmax) (données relatives) d'une culture d'algue verte *Scenedesmus costatus* et d'une culture de biofilm exposées à des concentrations croissantes de DAST, FWA-393 et FB-220 pendant 4-h. Les points correspondent aux valeurs expérimentales. 1 = 100% de similarité avec le groupe contrôle. Pour toutes les conditions, n = 3.

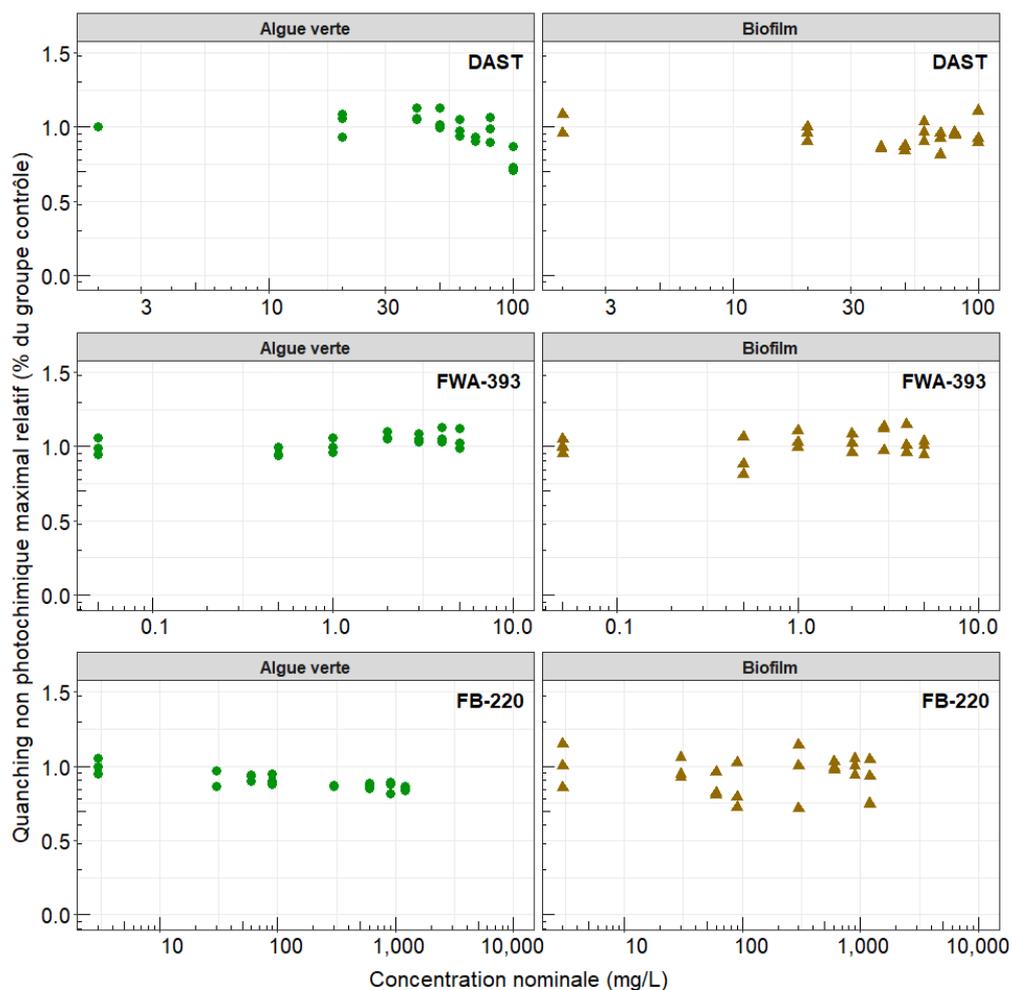


Figure Valeurs issues du quenching non photochimique maximal (NPQmax) (données relatives) d'une culture d'algue verte *Scenedesmus costatus* et d'une culture de biofilm exposées à des concentrations croissantes de DAST, FFWA-393 et FB-220 pendant 4-h. Les points correspondent aux valeurs expérimentales. 1 = 100% de similarité avec le groupe contrôle. Pour toutes les

Annexe 5 : Résultats exposition chronique – Dosage des nutriments

| Date de l'analyse | Ident | NO2 (mg/L) | NO3 (mg/L) | PO4 (mg/L) | SO4 (mg/L) | Cl (mg/L) |
|---------------------------|----------------------------|------------|------------|------------|------------|-----------|
| 2023-04-11 13:07:49 UTC+2 | CT+ACN R1 11/04 J1 | 0,469 | 0,022 | <1Q | 32,1 | 26,336 |
| 2023-04-11 13:43:53 UTC+2 | CT+ACN R2 11/04 J1 | 0,482 | 0,004 | <1Q | 31,427 | 26,671 |
| 2023-04-11 14:19:54 UTC+2 | CT+ACN R3 11/04 J1 | 0,024 | 0,026 | <1Q | 28,422 | 27,405 |
| 2023-04-11 14:55:54 UTC+2 | CT GLY AMPA R1 11/04 J1 | 0,106 | 2,407 | 0,033 | 28,858 | 25,094 |
| 2023-04-11 15:31:55 UTC+2 | CT GLY AMPA R2 11/04 J1 | 0,106 | 2,338 | 0,028 | 26,111 | 25,174 |
| 2023-04-11 16:07:56 UTC+2 | CT GLY AMPA R3 11/04 J1 | 0,104 | 2,436 | 0,048 | 27,544 | 26,094 |
| 2023-04-11 16:43:59 UTC+2 | DAST 30mg/l R1 11/04 J1 | 0,106 | 2,418 | 0,27 | 29,747 | 25,038 |
| 2023-04-11 17:20:21 UTC+2 | DAST 30mg/l R2 11/04 J1 | 0,105 | 2,261 | 0,018 | 27,166 | 25,405 |
| 2023-04-11 17:57:02 UTC+2 | DAST 30mg/l R3 11/04 J1 | 0,101 | 2,345 | 0,018 | 25,69 | 25,631 |
| 2023-04-11 18:33:36 UTC+2 | DAST 30mg/l R1 11/04 J1 | 0,103 | 2,407 | 0,024 | 30,068 | 25,754 |
| 2023-04-11 19:10:05 UTC+2 | DAST 30mg/l R2 11/04 J1 | 0,138 | 2,506 | 0,021 | 32,913 | 24,483 |
| 2023-04-11 19:46:39 UTC+2 | DAST 30mg/l R3 11/04 J1 | 0,148 | 2,352 | 0,018 | 30,865 | 24,899 |
| 2023-04-11 20:23:08 UTC+2 | DAST GLY AMPA R1 11/04 J1 | 0,104 | 2,341 | 0,02 | 26,396 | 26,437 |
| 2023-04-11 20:59:45 UTC+2 | DAST GLY AMPA R2 11/04 J1 | 0,115 | 2,391 | 0,017 | 28,84 | 25,412 |
| 2023-04-11 21:36:14 UTC+2 | DAST GLY AMPA R3 11/04 J1 | 0,126 | 2,435 | 0,018 | 30,724 | 24,847 |
| 2023-04-11 22:12:45 UTC+2 | FNX 50ug/l R1 11/04 J1 | 0,118 | 2,412 | 0,023 | 29,972 | 25,015 |
| 2023-04-11 22:49:19 UTC+2 | FNX 50ug/l R2 11/04 J1 | 0,107 | 2,225 | 0,023 | 27,474 | 25,299 |
| 2023-04-11 23:25:52 UTC+2 | FNX 50ug/l R3 11/04 J1 | 0,111 | 2,407 | 0,02 | 28,796 | 25,397 |
| 2023-04-12 00:02:16 UTC+2 | FNX 1mg/l R1 11/04 J1 | 0,106 | 2,183 | 0,028 | 26,328 | 25,321 |
| 2023-04-12 00:38:50 UTC+2 | FNX1mg/l R2 11/04 J1 | 0,108 | 2,353 | <1Q | 27,562 | 24,993 |
| 2023-04-12 01:15:21 UTC+2 | FNX 1mg/l R3 11/04 J1 | 0,115 | 2,534 | 0,017 | 31,112 | 24,813 |
| 2023-04-12 01:51:44 UTC+2 | FNX GLY AMPA R1 11/04 J1 | 0,109 | 2,658 | <1Q | 28,512 | 24,924 |
| 2023-04-12 02:28:16 UTC+2 | FNX GLY AMPA R2 11/04 J1 | 0,1 | 2,324 | 0,016 | 26,035 | 25,192 |
| 2023-04-12 03:04:43 UTC+2 | FNX GLY AMPA R3 11/04 J1 | 0,102 | 2,366 | 0,017 | 28,115 | 25,1 |
| 2023-04-19 10:29:43 UTC+2 | CT+ACN R1 18/04 J7 | <1Q | 1,705 | 0,078 | 30,271 | 24,397 |
| 2023-04-19 11:06:29 UTC+2 | CT+ACN R2 18/04 J7 | 0,07 | 1,735 | 0,074 | 29,761 | 24,399 |
| 2023-04-19 11:43:31 UTC+2 | CT+ACN R3 18/04 J7 | 0,5 | 1,766 | 0,08 | 27,204 | 24,872 |
| 2023-04-19 12:20:20 UTC+2 | CT GLY AMPA R1 18/04 J7 | 0,49 | 1,721 | 0,059 | 28,309 | 24,25 |
| 2023-04-19 12:57:05 UTC+2 | CT GLY AMPA R2 18/04 J7 | 0,496 | 1,76 | 0,05 | 25,981 | 24,46 |
| 2023-04-19 13:33:43 UTC+2 | CT GLY AMPA R3 18/04 J7 | 0,493 | 1,724 | 0,044 | 27,22 | 24,451 |
| 2023-04-19 14:10:39 UTC+2 | DAST 30ug/l R1 18/04 J7 | 0,097 | 1,824 | 0,088 | 30,22 | 24,797 |
| 2023-04-19 14:47:22 UTC+2 | DAST 30ug/l R2 18/04 J7 | 0,486 | 1,727 | 0,057 | 27,983 | 24,466 |
| 2023-04-19 15:24:24 UTC+2 | DAST 30ug/l R3 18/04 J7 | 0,497 | 1,75 | 0,063 | 26,639 | 24,724 |
| 2023-04-19 16:01:18 UTC+2 | DAST 30mg/l R1 18/04 J7 | 0,465 | 1,728 | 0,066 | 28,728 | 24,547 |
| 2023-04-19 16:38:20 UTC+2 | DAST 30mg/l R2 18/04 J7 | 0,435 | 1,745 | 0,052 | 32,746 | 23,988 |
| 2023-04-19 17:15:10 UTC+2 | DAST 30mg/l R3 18/04 J7 | 0,436 | 1,754 | 0,03 | 30,391 | 23,891 |
| 2023-04-19 17:51:59 UTC+2 | DAST GLY AMPA R1 18/04 J7 | 0,056 | 1,739 | 0,049 | 27,466 | 25,353 |
| 2023-04-19 18:28:48 UTC+2 | DAST GLY AMPA R2 18/04 J7 | 0,057 | 1,764 | 0,042 | 28,477 | 24,737 |
| 2023-04-19 19:06:42 UTC+2 | DAST GLY AMPA R3 18/04 J7 | 0,452 | 1,825 | 0,056 | 29,392 | 24,381 |
| 2023-04-19 19:43:32 UTC+2 | FNX 50ug/l R1 18/04 J7 | 0,102 | 1,753 | 0,059 | 27,801 | 24,627 |
| 2023-04-19 20:20:13 UTC+2 | FNX 50ug/l R2 18/04 J7 | <1Q | 1,742 | 0,056 | 27,424 | 24,638 |
| 2023-04-19 20:56:51 UTC+2 | FNX 50ug/l R3 18/04 J7 | 0,054 | 1,699 | 0,062 | 26,491 | 24,538 |
| 2023-04-19 21:33:35 UTC+2 | FNX 1mg/l R1 18/04 J7 | 0,104 | 1,769 | 0,062 | 27,612 | 24,534 |
| 2023-04-19 22:10:17 UTC+2 | FNX1mg/l R2 18/04 J7 | 0,101 | 1,637 | 0,044 | 27,194 | 24,665 |
| 2023-04-19 22:47:02 UTC+2 | FNX 1mg/l R3 18/04 J7 | 0,107 | 1,738 | 0,069 | 30,448 | 24,186 |
| 2023-04-19 23:23:41 UTC+2 | FNX GLY AMPA R1 18/04 J7 | 0,105 | 1,758 | 0,027 | 28,853 | 24,333 |
| 2023-04-20 00:00:26 UTC+2 | FNX GLY AMPA R2 18/04 J7 | 0,099 | 1,779 | 0,049 | 27,055 | 24,293 |
| 2023-04-20 00:37:07 UTC+2 | FNX GLY AMPA R3 18/04 J7 | 0,101 | 1,804 | 0,07 | 27,201 | 24,212 |
| 2023-04-26 12:26:16 UTC+2 | CT+ACN R1 25/04 J14 | 0 | 1,826 | 0,065 | 28,658 | 24,099 |
| 2023-04-26 13:02:59 UTC+2 | CT+ACN R2 25/04 J14 | 0,08 | 1,833 | 0,061 | 28,648 | 24,087 |
| 2023-04-26 13:39:44 UTC+2 | CT+ACN R3 25/04 J14 | 0,493 | 1,791 | 0,082 | 25,619 | 24,429 |
| 2023-04-26 14:16:38 UTC+2 | CT GLY AMPA R1 25/04 J14 | 0,097 | 3,183 | 0,023 | 27,917 | 24,706 |
| 2023-04-26 14:53:26 UTC+2 | CT GLY AMPA R2 25/04 J14 | 0,098 | 2,382 | 0,017 | 26,052 | 24,268 |
| 2023-04-26 15:30:26 UTC+2 | CT GLY AMPA R3 26/04 J14 | 0 | 2,383 | 0 | 26,906 | 24,184 |
| 2023-04-26 16:07:13 UTC+2 | DAST 30ug/l R1 26/04 J14 | 0,059 | 1,788 | 0 | 26,757 | 24,403 |
| 2023-04-26 16:43:50 UTC+2 | DAST 30ug/l R2 26/04 J14 | 0,056 | 1,806 | 0 | 27,736 | 24,564 |
| 2023-04-26 17:20:28 UTC+2 | DAST 30ug/l R3 26/04 J14 | 0,056 | 1,927 | 0 | 27,431 | 24,556 |
| 2023-04-26 17:57:06 UTC+2 | DAST 30mg/l R1 26/04 J14 | 0,49 | 1,789 | 0,017 | 27,403 | 24,658 |
| 2023-04-26 18:35:22 UTC+2 | DAST 30mg/l R2 26/04 J14 | 0 | 1,847 | 1,502 | 32,232 | 24,162 |
| 2023-04-26 19:12:04 UTC+2 | DAST 30mg/l R3 26/04 J14 | 0,059 | 1,929 | 1,501 | 29,754 | 24,159 |
| 2023-04-26 19:48:57 UTC+2 | DAST GLY AMPA R1 25/04 J14 | 0,114 | 2,372 | 0,015 | 27,95 | 24,814 |
| 2023-04-26 20:26:03 UTC+2 | DAST GLY AMPA R2 25/04 J14 | 0,117 | 2,336 | 0,02 | 28,582 | 24,356 |
| 2023-04-26 21:03:52 UTC+2 | DAST GLY AMPA R3 25/04 J14 | 0,119 | 2,372 | 0,02 | 29,332 | 23,978 |
| 2023-04-26 21:39:36 UTC+2 | FNX 50ug/l R1 26/04 J14 | 0,017 | 1,584 | 0 | 24,198 | 25,267 |
| 2023-04-26 22:16:25 UTC+2 | FNX 50ug/l R2 26/04 J14 | 0,051 | 1,764 | 0 | 27,758 | 24,61 |
| 2023-04-26 22:53:05 UTC+2 | FNX 50ug/l R3 26/04 J14 | 0,483 | 1,683 | 0 | 27,029 | 24,554 |
| 2023-04-26 23:29:50 UTC+2 | FNX 1mg/l R1 25/04 J14 | 0,059 | 1,728 | 0,037 | 27,95 | 24,37 |
| 2023-04-27 00:06:52 UTC+2 | FNX1mg/l R2 25/04 J14 | 0,076 | 1,741 | 0 | 27,838 | 24,198 |
| 2023-04-27 00:43:40 UTC+2 | FNX 1mg/l R3 25/04 J14 | 0,099 | 2,186 | 0,021 | 29,824 | 24,14 |
| 2023-04-27 01:20:23 UTC+2 | FNX GLY AMPA R1 25/04 J14 | 0,111 | 2,348 | 0 | 28,455 | 24,136 |
| 2023-04-27 01:57:14 UTC+2 | FNX GLY AMPA R2 25/04 J14 | 0 | 2,363 | 0 | 27,275 | 24,473 |
| 2023-04-27 02:33:53 UTC+2 | FNX GLY AMPA R3 25/04 J14 | 0 | 2,406 | 0 | 27,245 | 24,236 |
| 2023-05-12 10:18:55 UTC+2 | CT+ACN R3 03/05 J21 | 0 | 2,318 | 0,027 | 24,281 | 24,074 |
| 2023-05-12 10:54:33 UTC+2 | CT+ACN R1 03/05 J21 | 0 | 2,295 | 1,5 | 27,826 | 23,807 |
| 2023-05-12 11:30:11 UTC+2 | CT+ACN R2 03/05 J21 | 0,081 | 2,307 | 0 | 27,124 | 23,874 |
| 2023-05-12 12:05:49 UTC+2 | CT GLY AMPA R1 03/05 J21 | 0 | 2,347 | 0,018 | 29,304 | 23,352 |
| 2023-05-12 12:41:26 UTC+2 | CT GLY AMPA R2 03/05 J21 | 0 | 2,317 | 0 | 24,245 | 23,971 |
| 2023-05-12 13:17:05 UTC+2 | CT GLY AMPA R3 03/05 J21 | 0 | 2,107 | 0 | 26,776 | 25,548 |
| 2023-05-12 13:52:43 UTC+2 | DAST 30ug/l R1 03/05 J21 | 0,102 | 2,414 | 0,014 | 28,58 | 23,75 |
| 2023-05-12 14:28:27 UTC+2 | DAST 30ug/l R2 03/05 J21 | 0,06 | 2,328 | 0 | 26,565 | 23,941 |
| 2023-05-12 15:04:01 UTC+2 | DAST 30ug/l R3 03/05 J21 | 0,061 | 2,467 | 0 | 23,273 | 24,383 |
| 2023-05-12 15:39:42 UTC+2 | DAST 30mg/l R1 03/05 J21 | 0,057 | 2,335 | 0,018 | 26,234 | 23,655 |
| 2023-05-12 16:15:22 UTC+2 | DAST 30mg/l R2 03/05 J21 | 0,06 | 2,44 | 0,028 | 30,711 | 23,33 |
| 2023-05-12 16:51:02 UTC+2 | DAST 30mg/l R3 03/05 J21 | 0,107 | 2,38 | 0,19 | 28,392 | 23,331 |
| 2023-05-12 17:26:42 UTC+2 | DAST GLY AMPA R1 03/05 J21 | 0 | 2,282 | 0,018 | 26,118 | 23,931 |
| 2023-05-12 18:02:24 UTC+2 | DAST GLY AMPA R2 03/05 J21 | 0 | 2,204 | 0,017 | 26,602 | 23,7 |
| 2023-05-12 18:38:05 UTC+2 | DAST GLY AMPA R3 03/05 J21 | 0 | 2,3 | 0,018 | 27,588 | 23,33 |
| 2023-05-12 19:13:46 UTC+2 | FNX 50ug/l R1 03/05 J21 | 0 | 2,207 | 0 | 25,741 | 23,779 |
| 2023-05-12 19:49:27 UTC+2 | FNX 50ug/l R2 03/05 J21 | 0,056 | 2,222 | 0 | 25,002 | 24,117 |
| 2023-05-12 20:25:08 UTC+2 | FNX 50ug/l R3 03/05 J21 | 0,468 | 2,15 | 0 | 26,207 | 23,923 |
| 2023-05-12 21:00:50 UTC+2 | FNX 1mg/l R1 03/05 J21 | 0,12 | 2,287 | 0 | 26,468 | 23,911 |
| 2023-05-12 21:36:34 UTC+2 | FNX1mg/l R2 03/05 J21 | 0 | 2,258 | 0 | 24,922 | 23,726 |
| 2023-05-12 22:12:16 UTC+2 | FNX 1mg/l R3 03/05 J21 | 0 | 2,348 | 0 | 28,741 | 23,321 |
| 2023-05-12 22:47:59 UTC+2 | FNX GLY AMPA R1 03/05 J21 | 0 | 2,364 | 0 | 25,719 | 23,606 |
| 2023-05-12 23:23:42 UTC+2 | FNX GLY AMPA R2 03/05 J21 | 0,426 | 2,379 | 0 | 25,276 | 23,531 |
| 2023-05-12 23:59:25 UTC+2 | FNX GLY AMPA R3 03/05 J21 | 0,388 | 2,394 | 0 | 25,403 | 23,576 |
| 2023-05-16 00:21:44 UTC+2 | FNX GLY AMPA R3 09/05 J28 | 0,256 | 1,881 | 0 | 26,366 | 25,195 |
| 2023-05-15 23:46:00 UTC+2 | FNX GLY AMPA R2 09/05 J28 | 0,451 | 2,151 | 0 | 26,441 | 25,347 |
| 2023-05-15 23:18:14 UTC+2 | FNX GLY AMPA R1 09/05 J28 | 0,221 | 2,208 | 0 | 26,896 | 25,414 |
| 2023-05-15 22:34:33 UTC+2 | FNX 1mg/l R3 09/05 J28 | 0,113 | 2,323 | 0 | 29,645 | 17,774 |
| 2023-05-15 21:58:51 UTC+2 | FNX1mg/l R2 09/05 J28 | 0,113 | 2,211 | 0 | 25,875 | 25,495 |
| 2023-05-15 21:23:09 UTC+2 | FNX 1mg/l R1 09/05 J28 | 0,101 | 2,181 | 0 | 27,142 | 25,415 |
| 2023-05-15 20:47:28 UTC+2 | FNX 50ug/l R3 09/05 J28 | 0,501 | 1,693 | 0 | 27,122 | 17,296 |
| 2023-05-15 20:11:47 UTC+2 | FNX 50ug/l R2 09/05 J28 | 0 | 1,82 | 0 | 26,003 | 25,963 |
| 2023-05-15 19:36:05 UTC+2 | FNX 50ug/l R1 09/05 J28 | 0,489 | 1,997 | 0 | 26,557 | 25,399 |
| 2023-05-15 19:00:24 UTC+2 | DAST GLY AMPA R3 09/05 J28 | 0,003 | 2,142 | 0,02 | 27,531 | 23,719 |
| 2023-05-15 18:24:42 UTC+2 | DAST GLY AMPA R2 09/05 J28 | 0,106 | 2,142 | 0,013 | 27,142 | 24,039 |
| 2023-05-15 17:49:01 UTC+2 | DAST GLY AMPA R1 09/05 J28 | 0,445 | 2,231 | 0,016 | 28,293 | 26,454 |
| 2023-05-15 17:13:21 UTC+2 | DAST 30mg/l R3 09/05 J28 | 0,106 | 2,529 | 0,019 | 29,554 | 24,188 |
| 2023-05-15 16:37:39 UTC+2 | DAST 30mg/l R2 09/05 J28 | 0 | 2,685 | 0,021 | 32,073 | 24,831 |
| 2023-05-15 16:02:00 UTC+2 | DAST 30mg/l R1 09/05 J28 | 0,103 | 2,57 | 0,019 | 27,573 | 25,656 |
| 2023-05-15 15:26:20 UTC+2 | DAST 30ug/l R3 09/05 J28 | 0,103 | 2,586 | 0 | 23,798 | 26,119 |
| 2023-05-15 14:50:41 UTC+2 | DAST 30ug/l R2 09/05 J28 | 0,072 | 2,668 | 0,019 | 32,033 | 25,122 |
| 2023-05-15 14:15:02 UTC+2 | DAST 30ug/l R1 09/05 J28 | 0,099 | 2,483 | 0 | 29,562 | 25,341 |
| 2023-05-15 13:39:23 UTC+2 | CT GLY AMPA R3 09/05 J28 | 0,083 | 2,094 | 0,015 | 25,981 | 25,716 |
| 2023-05-15 13:03:14 UTC+2 | CT GLY AMPA R2 09/05 J28 | 0,086 | 2,131 | 0 | 26,759 | 26,502 |
| 2023-05-15 12:28:06 UTC+2 | CT GLY AMPA R1 09/05 J28 | 0,104 | 2,247 | 0,014 | 30,438 | 25,383 |
| 2023-05-15 11:52:28 UTC+2 | CT+ACN R3 09/05 J28 | 0 | 2,155 | 0 | 25,07 | 25,846 |
| 2023-05-15 11:16:51 UTC+2 | CT+ACN R2 09/05 J28 | 0 | 2,254 | 0 | 28,094</ | |

Figure Valeurs des concentrations en nutriments mesurés au cours des 28 jours d'exposition. CT : Contrôle ; CTGA : Glyphosate ($1 \mu\text{g L}^{-1}$) + AMPA ($100 \mu\text{g L}^{-1}$) ; DAST 30 ppb : $30 \mu\text{g L}$; DAST 30 ppm : 30 mg L^{-1} ; DGA 30 ppm : DAST (30 mg L^{-1}) + Glyphosate ($1 \mu\text{g L}^{-1}$) + AMPA ($100 \mu\text{g L}^{-1}$). Les conditions relatives au FNX n'appartiennent pas à mes données.

Annexe 6 : Résultats exposition chronique – Concentrations en DAST

| Time | Sample Name | Calculated Concentration (µg/L) | Calculated Concentration without dilution factor (µg/L) |
|------------|--------------------------------|---------------------------------|---|
| 14_04_2023 | DAST 30PPM R1 F 14/04 | 14,7 | 441 |
| 14_04_2023 | DAST 30PPM R2 F 14/04 | 751 | 22530 |
| 14_04_2023 | DAST 30PPM R3 F 14/04 | 1330 | 39900 |
| 14_04_2023 | DAST 30PPB R1 F 14/04 | 23,8 | 47,6 |
| 14_04_2023 | DAST 30PPB R2 F 14/04 | 10,6 | 21,2 |
| 14_04_2023 | DAST 30PPB R3 F 14/04 | 8,41 | 16,82 |
| 14_04_2023 | D/G/A 30PPM R1 F 14/04 | 882 | 26460 |
| 14_04_2023 | D/G/A 30PPM R2 F14/04 | 860 | 25800 |
| 14_04_2023 | D/G/A 30PPM R3 F14/04 | 867 | 26010 |
| 14_04_2023 | DAST 30PPB R1 F 14/04 APRES | 13,7 | 27,4 |
| 14_04_2023 | DAST 30PPB R2 F 14/04 APRES | 11,1 | 22,2 |
| 14_04_2023 | DAST 30PPB R3 F 14/04 APRES | 13,2 | 26,4 |
| 18_04_2023 | DAST 30PPM R1 F 18/04 | 466 | 13980 |
| 18_04_2023 | DAST 30PPM R2 F 18/04 | 688 | 20640 |
| 18_04_2023 | DAST 30PPM R3 F 18/04 | 1010 | 30300 |
| 18_04_2023 | DAST 30PPB R1 F 18/04 | 19,5 | 39 |
| 18_04_2023 | DAST 30PPB R2 F 18/04 | 19,9 | 39,8 |
| 18_04_2023 | DAST 30PPB R3 F 18/04 | 18,7 | 37,4 |
| 18_04_2023 | D/G/A 30PPM R1 F 18/04 | 788 | 23640 |
| 18_04_2023 | D/G/A 30PPM R2 F 18/04 | 848 | 25440 |
| 18_04_2023 | D/G/A 30PPM R3 F 18/04 | 829 | 24870 |
| 18_04_2023 | DAST 30PPB R1 F 18/04APRES | 19,9 | 39,8 |
| 18_04_2023 | DAST 30PPB R2 F 18/04APRES | 17,8 | 35,6 |
| 18_04_2023 | DAST 30PPB R3 F 18/04APRES | 17,5 | 35 |
| 18_04_2023 | D/G/A 30PPM R1 F 18/04APRES | 799 | 23970 |
| 18_04_2023 | D/G/A 30PPM R2 F 18/04APRES | 835 | 25050 |
| 18_04_2023 | D/G/A 30PPM R3 F 18/04APRES | 868 | 26040 |
| 18_04_2023 | DAST 30PPM R1 F 18/04APRES BIS | 948 | 28440 |
| 18_04_2023 | DAST 30PPM R2 F 18/04APRES BIS | 800 | 24000 |
| 18_04_2023 | DAST 30PPM R3 F 18/04APRES BIS | 693 | 20790 |
| 20_04_2023 | DAST 30PPM R1 F 20/04 | 657 | 19710 |
| 20_04_2023 | DAST 30PPM R2 F 20/04 | 919 | 27570 |
| 20_04_2023 | DAST 30PPM R3 F 20/04 | 1020 | 30600 |
| 20_04_2023 | DAST 30PPB R1 F 20/04 | 5,89 | 11,78 |
| 20_04_2023 | DAST 30PPB R2 F 20/04 | 6,55 | 13,1 |
| 20_04_2023 | DAST 30PPB R3 F 20/04 | 7,56 | 15,12 |
| 20_04_2023 | D/G/A 30PPM R1 F 20/04 | 1010 | 30300 |
| 20_04_2023 | D/G/A 30PPM R2 F 20/04 | 982 | 29460 |
| 20_04_2023 | D/G/A 30PPM R3 F 20/04 | 977 | 29310 |
| 21_04_2023 | DAST 30PPM R1 F 21/04 | 764 | 22920 |
| 21_04_2023 | DAST 30PPM R2 F 21/04 | 1020 | 30600 |
| 21_04_2023 | DAST 30PPM R3 F 21/04 | 1240 | 37200 |
| 21_04_2023 | DAST 30PPB R1 F 21/04 | 4,17 | 8,34 |
| 21_04_2023 | DAST 30PPB R2 F 21/04 | 4,3 | 8,6 |
| 21_04_2023 | DAST 30PPB R3 F 21/04 | 5,39 | 10,78 |
| 21_04_2023 | D/G/A 30PPM R1 F 21/04 * | 1090 | 32700 |
| 21_04_2023 | D/G/A 30PPM R2 F 21/04 | 1070 | 32100 |
| 21_04_2023 | D/G/A 30PPM R3 F 21/04 | 949 | 28470 |
| 21_04_2023 | DAST 30PPM R1 F 21/04 APRES | 860 | 25800 |
| 21_04_2023 | DAST 30PPM R2 F 21/04 APRES | 1040 | 31200 |
| 21_04_2023 | DAST 30PPM R3 F 21/04 APRES | 1060 | 31800 |
| 21_04_2023 | DAST 30PPB R1 F 21/04 APRES | 14,9 | 29,8 |
| 21_04_2023 | DAST 30PPB R2 F 21/04 APRES | 12,1 | 24,2 |
| 21_04_2023 | DAST 30PPB R3 F 21/04 APRES | 13,3 | 26,6 |
| 21_04_2023 | D/G/A 30PPM R1 F 21/04 APRES | 946 | 28380 |
| 21_04_2023 | D/G/A 30PPM R2 F 21/04 APRES | 1040 | 31200 |
| 21_04_2023 | D/G/A 30PPM R3 F 21/04 APRES | 1030 | 30900 |
| 25_04_2023 | DAST 30PPM R1 F 25/04 | 591 | 17730 |
| 25_04_2023 | DAST 30PPM R2 F 25/04 | 947 | 28410 |
| 25_04_2023 | DAST 30PPM R3 F 25/04 | 1080 | 32400 |
| 25_04_2023 | DAST 30PPB R1 F 25/04 | 1,95 | 3,9 |
| 25_04_2023 | DAST 30PPB R2 F 25/04 | 4,33 | 8,66 |
| 25_04_2023 | DAST 30PPB R3 F 25/04 | 2,99 | 5,98 |
| 25_04_2023 | D/G/A 30PPM R1 F 25/04 * | 990 | 29700 |
| 25_04_2023 | D/G/A 30PPM R2 F 25/04 | 1020 | 30600 |
| 25_04_2023 | D/G/A 30PPM R3 F 25/04 | 1030 | 30900 |
| 25_04_2023 | DAST 30PPM R1 F 25/04 APRES | 714 | 21420 |
| 25_04_2023 | DAST 30PPM R2 F 25/04 APRES | 788 | 23640 |
| 25_04_2023 | DAST 30PPM R3 F 25/04 APRES | 895 | 26850 |
| 25_04_2023 | DAST 30PPB R1 F 25/04 APRES | 10,1 | 20,2 |
| 25_04_2023 | DAST 30PPB R2 F 25/04 APRES | 11,6 | 23,2 |
| 25_04_2023 | DAST 30PPB R3 F 25/04 APRES | 9,01 | 18,02 |
| 25_04_2023 | D/G/A 30PPM R1 F 25/04 APRES | 1030 | 30900 |
| 25_04_2023 | D/G/A 30PPM R2 F 25/04 APRES | 1010 | 30300 |
| 25_04_2023 | D/G/A 30PPM R3 F 25/04 APRES | 1090 | 32700 |
| 28_04_2023 | DAST 30PPM R1 F 28/04 | 719 | 21570 |
| 28_04_2023 | DAST 30PPM R2 F 28/04 | 765 | 22950 |
| 28_04_2023 | DAST 30PPM R3 F 28/04 | 806 | 24180 |
| 28_04_2023 | DAST 30PPB R1 F 28/04 | 3,95 | 7,9 |
| 28_04_2023 | DAST 30PPB R2 F 28/04 | 6,12 | 12,24 |
| 28_04_2023 | DAST 30PPB R3 F 28/04 | 4,63 | 9,26 |
| 28_04_2023 | D/G/A 30PPM R1 F 28/04 | 804 | 24120 |
| 28_04_2023 | D/G/A 30PPM R2 F 28/04 | 776 | 23280 |
| 28_04_2023 | D/G/A 30PPM R3 F 28/04 | 846 | 25380 |

| | | | |
|------------|------------------------------|---------|---------|
| 28_04_2023 | DAST 30PPM R1 F 28/04 APRES | 718 | 21540 |
| 28_04_2023 | DAST 30PPM R2 F 28/04 APRES | 762 | 22860 |
| 28_04_2023 | DAST 30PPM R3 F 28/04 APRES | 747 | 22410 |
| 28_04_2023 | DAST 30PPB R1 F 28/04 APRES | 11,2 | 22,4 |
| 28_04_2023 | DAST 30PPB R2 F 28/04 APRES | 7,62 | 15,24 |
| 28_04_2023 | DAST 30PPB R3 F 28/04 APRES | 6,27 | 12,54 |
| 28_04_2023 | D/G/A 30PPM R1 F 28/04 APRES | 757 | 22710 |
| 28_04_2023 | D/G/A 30PPM R2 F 28/04 APRES | 761 | 22830 |
| 28_04_2023 | D/G/A 30PPM R3 F 28/04 APRES | 821 | 24630 |
| 03_05_2023 | DAST 30PPM R1 F 03/05 | 738 | 22140 |
| 03_05_2023 | DAST 30PPM R2 F 03/05 | 699 | 20970 |
| 03_05_2023 | DAST 30PPM R3 F 03/05 | 786 | 23580 |
| 03_05_2023 | DAST 30PPB R1 F 03/05 | 4,29 | 8,58 |
| 03_05_2023 | DAST 30PPB R2 F 03/05 | 3,35 | 6,7 |
| 03_05_2023 | DAST 30PPB R3 F 03/05 | 3,88 | 7,76 |
| 03_05_2023 | D/G/A 30PPM R1 F 03/05 | 779 | 23370 |
| 03_05_2023 | D/G/A 30PPM R2 F 03/05 | 739 | 22170 |
| 03_05_2023 | D/G/A 30PPM R3 F 03/05 | 792 | 23760 |
| 03_05_2023 | DAST 30PPM R1 F 03/05APRES | 756 | 22680 |
| 03_05_2023 | DAST 30PPM R2 F 03/05APRES | 817 | 24510 |
| 03_05_2023 | DAST 30PPM R3 F 03/05APRES | 772 | 23160 |
| 03_05_2023 | DAST 30PPB R1 F 03/05APRES | 9,26 | 18,52 |
| 03_05_2023 | DAST 30PPB R2 F 03/05APRES | 7,62 | 15,24 |
| 03_05_2023 | DAST 30PPB R3 F 03/05APRES | 10,2 | 20,4 |
| 03_05_2023 | D/G/A 30PPM R1 F 03/05APRES | 760 | 22800 |
| 03_05_2023 | D/G/A 30PPM R2 F 03/05APRES | 739 | 22170 |
| 03_05_2023 | D/G/A 30PPM R3 F 03/05APRES | 736 | 22080 |
| 09_05_2023 | CT1 09/05 | No Peak | No Peak |
| 09_05_2023 | CT2 09/05 | No Peak | No Peak |
| 09_05_2023 | CT3 09/05 | No Peak | No Peak |
| 09_05_2023 | CTG A1 09/05 | No Peak | No Peak |
| 09_05_2023 | CTG A2 09/05 | No Peak | No Peak |
| 09_05_2023 | CTG A3 09/05 | No Peak | No Peak |
| 09_05_2023 | DAST 30PPM R1 F 09/05 | 388 | 11640 |
| 09_05_2023 | DAST 30PPM R2 F 09/05 | 373 | 11190 |
| 09_05_2023 | DAST 30PPM R3 F 09/05 | 378 | 11340 |
| 09_05_2023 | DAST 30PPB R1 F 09/05 | No Peak | No Peak |
| 09_05_2023 | DAST 30PPB R2 F 09/05 | No Peak | No Peak |
| 09_05_2023 | DAST 30PPB R3 F 09/05 | No Peak | No Peak |
| 09_05_2023 | D/G/A 30PPM R1 F 09/05 | 394 | 11820 |
| 09_05_2023 | D/G/A 30PPM R2 F 09/05 | 374 | 11220 |
| 09_05_2023 | D/G/A 30PPM R3 F 09/05 | 414 | 12420 |

Figure Valeurs des concentrations en DAST mesurés au cours des 28 jours d'exposition. CT : Contrôle ; CTGA : Glyphosate ($1 \mu\text{g L}^{-1}$) + AMPA ($100 \mu\text{g L}^{-1}$) ; DAST 30 ppb : $30 \mu\text{g L}$; DAST 30 ppm : 30mg L^{-1} ; DGA 30 ppm : DAST (30mg L^{-1}) + Glyphosate ($1 \mu\text{g L}^{-1}$) + AMPA ($100 \mu\text{g L}^{-1}$). Avant/Après signifient que le dosage a été effectué avant ou après un changement d'eau.

Annexe 7 : Résultats exposition chronique - PICT

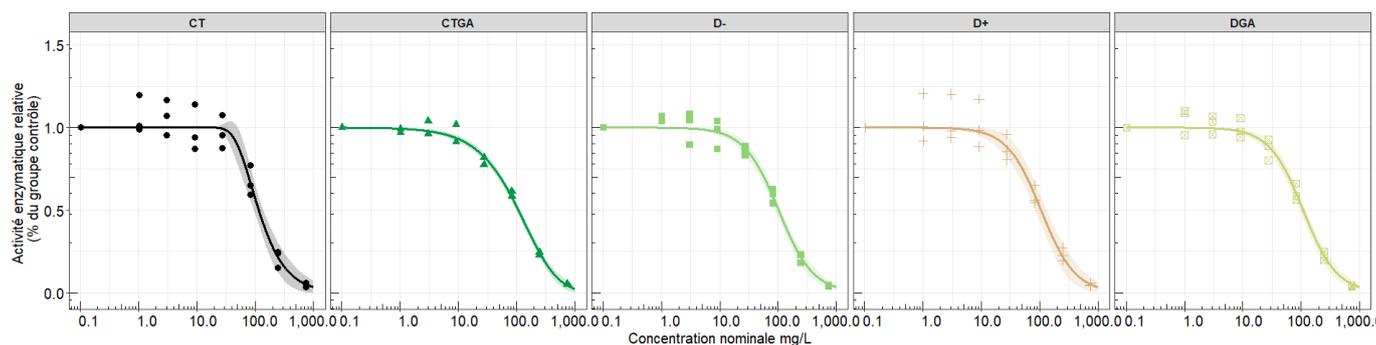


Figure Courbes dose-réponse et valeurs issues de l'activité de la beta-glucosidase (GLU) (données relatives) d'une culture de biofilm exposée pendant 14 jours à différentes conditions de contamination. CT : Contrôle ; CTGA : Glyphosate ($1 \mu\text{g L}^{-1}$) + AMPA ($100 \mu\text{g L}^{-1}$) ; D- : $30 \mu\text{g L}^{-1}$; D+ : 30mg L^{-1} ; DGA : DAST (30mg L^{-1}) + Glyphosate ($1 \mu\text{g L}^{-1}$) + AMPA ($100 \mu\text{g L}^{-1}$). Les points correspondent aux valeurs expérimentales, les traits pleins aux modèles de dose-réponse ajustés aux valeurs expérimentales et les zones colorées à l'intervalle à 95 % de ces modèles 1 = 100% de similarité avec le groupe contrôle. Pour toutes les conditions, $n = 3$.

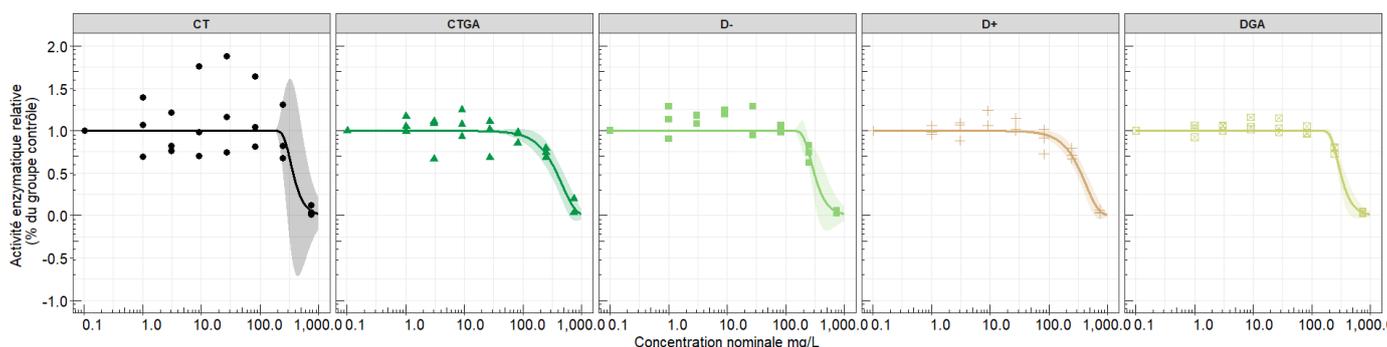


Figure Courbes dose-réponse et valeurs issues de l'activité de la beta-glucosidase (GLU) (données relatives) d'une culture de biofilm exposée pendant 28 jours à différentes conditions de contamination. CT : Contrôle ; CTGA : Glyphosate ($1 \mu\text{g L}^{-1}$) + AMPA ($100 \mu\text{g L}^{-1}$) ; D- : $30 \mu\text{g L}^{-1}$; D+ : 30mg L^{-1} ; DGA : DAST (30mg L^{-1}) + Glyphosate ($1 \mu\text{g L}^{-1}$) + AMPA ($100 \mu\text{g L}^{-1}$). Les points correspondent aux valeurs expérimentales, les traits pleins aux modèles de dose-réponse ajustés aux valeurs expérimentales et les zones colorées à l'intervalle à 95 % de ces modèles 1 = 100% de similarité avec le groupe contrôle. Pour toutes les conditions, $n = 3$.

