



HAL
open science

Détermination des constantes cinétiques et d'équilibre du diuron dans le biofilm

Marion Bernard

► **To cite this version:**

Marion Bernard. Détermination des constantes cinétiques et d'équilibre du diuron dans le biofilm. Sciences de l'environnement. 2015. hal-04353249

HAL Id: hal-04353249

<https://hal.inrae.fr/hal-04353249v1>

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.



DETERMINATION DES CONSTANTES CINETIQUES ET D'EQUILIBRE DU DIURON DANS LE BIOFILM

RAPPORT DE STAGE - MASTER 2 CHIMIE ANALYTIQUE ET QUALITE

Marion BERNARD

Stage effectué du 1 Avril au 30 Septembre 2015

Responsables de stage : Nicolas MAZZELLA et Soizic MORIN

Tuteur Universitaire : Yannick POUILLOUX



Pour mieux
affirmer
ses missions,
le Cemagref
devient Irstea

Irstea, Centre de BORDEAUX

Laboratoire de Chimie des eaux

Equipe CARMA - Unité EABX

50 avenue de Verdun – Gazinet

33612 - CESTAS

- REMERCIEMENTS -

Mes remerciements vont en premier lieu à Nicolas Mazzella et Soizic Morin pour m'avoir confié ce travail de stage, pour m'avoir fait confiance et pour m'avoir une nouvelle fois accueillie au sein de l'équipe CARMA. Merci Nicolas pour ton encadrement, pour le partage de ton savoir, pour ta patience et ton aide précieuse. Merci Soizic pour ta bonne humeur et ton optimisme, pour ton aide inestimable pour l'aspect biologique de ce sujet, et pour toutes les connaissances que tu as partagé avec moi. Merci pour ces moments passés avec vous où fous rires et connaissances se sont mélangés que ce soit en réunion ou pendant les analyses. En bref, vous formez à vous deux une superbe équipe d'encadrants, et vous m'avez permis de réaliser ce stage dans les meilleures conditions qui soient.

Je tiens à remercier Caroline Martin, ma chère « poulpy-collègue » de bureau, pour ses conseils avisés, sa bonne humeur contagieuse et son dynamisme. Mais aussi pour ses connaissances, pour la formation dispensée sur le « gros ToToF » (son bébé) et pour son soutien permanent.

Je remercie également Kewin Gery, Aurélie Moreira, Brigitte Delest et Mélissa Eon, « la belle équipe du laboratoire » avec qui j'ai partagé une nouvelle fois des moments riches en sourires, en bonne humeur et en connaissances. Merci pour leurs disponibilités et leurs conseils pertinents.

Je remercie mes deux « poulettes chéries », Lamis Yahia Cherif et Sirina Yark, pour les nombreux fous rires partagés, pour le soutien mutuel que l'on s'est apportée, pour cette belle amitié qui s'est créée au cours de ces six mois de stage.

Je remercie tous les autres stagiaires, qui sont pour moi de très belles rencontres (Manon, Jade, Evane, Louise, Maen, Claire, Vanille et Helene).

Je remercie également toutes les personnes qui de près ou de loin, ont contribué au bon déroulement de mon stage. Merci à toute l'équipe CARMA, pour l'accueil toujours aussi chaleureux et cette bonne ambiance générale.

Enfin, je remercie mon tuteur universitaire, Yannick Pouilloux, pour son soutien dans la réalisation de ce stage, pour l'intérêt qu'il a accordé à mon travail et pour s'être assuré du bon déroulement de mon stage depuis Poitiers.

Encore une fois MERCI à vous tous !

- SOMMAIRE -

REMERCIEMENTS	2
LISTE DES FIGURES	5
LISTE DES TABLEAUX	6
LISTE DES ABREVIATIONS.....	7
INTRODUCTION.....	8
I. PRESENTATION DU LABORATOIRE	10
II. GENERALITES	11
1) Les pesticides : définition, modes de contamination et réglementation	11
a) Définition	11
b) Modes de contamination et devenir dans l'environnement.....	11
c) Cadre réglementaire.....	12
d) Impacts des pesticides sur les écosystèmes aquatiques	12
2) Le biofilm	13
a) Définition	13
b) Dynamique de colonisation et rôle écologique	14
c) Le biofilm : bioindicateur de la qualité des eaux	14
3) Choix de la molécule étudiée : le DIURON.....	15
a) Usages, caractéristiques physico-chimiques et réglementation	15
b) Mode d'action du diuron.....	16
4) Théorie et Modèle d'accumulation d'un polluant organique	16
III. MATÉRIELS ET MÉTHODES.....	19
1) Matériels de l'étude.....	19
a) « Biofilm Annular Reactor »	19
b) Echantillonnage des communautés naturelles et mise en culture.....	20
2) Validation de la méthode d'analyse des pesticides dans le biofilm.....	21
a) La linéarité.....	21
b) La spécificité.....	21
3) Pré-manipulation : Détermination du temps d'homogénéisation et étude de la stabilité dans l'eau du bioreacteur	22
a) Mise en place du système	22
b) Traitement et analyse des échantillons d'eau	23
c) Méthode instrumentale : UPLC-ESI-ToF	24
4) Etude de la cinétique d'accumulation du diuron dans le biofilm	25
a) Déroulement de la manipulation	25
b) Mesure de l'activité photosynthétique et de la chlorophylle a.....	26
c) Traitement des échantillons d'eau	26
d) Traitement des échantillons de biofilm	26

IV. RÉSULTATS ET DISCUSSION.....	28
1) Validation de la méthode d'analyse des pesticides dans le biofilm.....	28
2) Pre-manipulation : détermination du temps d'homogénéisation et étude de stabilité dans l'eau du bioreacteur	29
3) Etudes des cinétiques d'accumulation du diuron et de ses métabolites dans le biofilm.....	30
a) <i>Retraitement des données : Concentration dans le milieu Dauta</i>	30
b) <i>Retraitement des données : Quantités accumulées dans le biofilm</i>	31
4) Etude de l'impact biologique.....	38
a) <i>Contrôle de l'état physiologique du biofilm avant exposition dans le bioréacteur</i>	38
b) <i>Mesures biologiques aux cours des deux manipulations d'exposition au diuron</i>	38
CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES.....	41
BIBLIOGRAPHIE	42
ANNEXES	44

- LISTE DES FIGURES -

Figure 1 : Sites Irstea en France (www.irstea.fr)	10
Figure 2 : Centre Irstea de Bordeaux – Cestas (www.irstea.fr).....	10
Figure 3 : Coupe schématique soulignant le caractère multi-échelle du biofilm (Davit et al. 2013).....	14
Figure 4 : Schématisation de la dynamique de colonisation d'un substrat par le biofilm.....	14
Figure 5 : Biodégradation du diuron (Cui et al. 2014).....	16
Figure 6 : Relation schématique entre la présence, la biodisponibilité d'un contaminant dans l'environnement, sa bioaccumulation et sa toxicité dans un organisme biologique (Gourlay-Francé et al. 2010).....	17
Figure 7 : Schématisation des échanges mis en jeu entre deux compartiments (eau / biofilm).....	18
Figure 8 : Représentation schématique du bioréacteur.....	20
Figure 9 : Cagette contenant les lames de verre pour la colonisation du biofilm.....	20
Figure 10 : Aquarium pour la colonisation des coupons	20
Figure 11 : Montage	23
Figure 12 : Schéma du système et conditions expérimentales appliquées.....	25
Figure 13 : Graphique représentant l'évolution de la concentration en diuron dans le bioréacteur et la chambre de mélange en fonction du temps.....	29
Figure 14 : Box Plot pour chaque point de prélèvement.....	30
Figure 15 : Représentation graphique de la variation du rapport de concentration en diuron, DCPU et DCPMU dans le biofilm ($C_{\text{biofilm}}/C_{\text{eau}}$) et dans l'eau en fonction du temps (valeurs moyennes) - Manipulation sur 7 jours.....	31
Figure 16 : Représentation graphique de la variation du rapport de concentration en diuron dans le biofilm et le milieu en fonction du temps - Moyennes pour les réplicats et barres d'erreurs associées (CV %) – Manipulation sur 7 jours.....	33
Figure 17 : Représentation graphique de la variation du rapport de concentration en diuron dans le biofilm et le milieu en fonction du temps – Deux manipulations regroupées.....	34
Figure 18 : Modélisation d'une cinétique d'ordre 1 avec les données acquises pour la molécule de diuron au cours des deux manipulations	34
Figure 19 : Modélisations cinétiques des données acquises pour le Diuron, le DCPU et le DCPMU sur 7 jours d'exposition	35
Figure 20 : Modélisations cinétiques des données acquises pour le diuron, le DCPU et le DCPMU sur 7 jour d'exposition - Zoom sur 10 h.....	35
Figure 21 : Comparaison des K_{BW} obtenus par le calcul de la moyenne lorsque $t > 2$ h, et par modélisation d'une cinétique d'ordre 1	36
Figure 22 : Représentation graphique de l'évolution du pourcentage d'inhibition photosynthétique (% du témoin) en fonction du temps - Moyenne des réplicats et écart-types associés – Durée d'exposition de 7 jours.....	39
Figure 23 : Inhibition de la photosynthèse (% du témoin) - Phase 1 : Effet toxique croissant	39
Figure 24 : Inhibition de la photosynthèse (% du témoin) pour plus d'une heure d'exposition en fonction de la biomasse lyophilisée.....	40
Figure 25 : Marché des pesticides en Europe en 2008 (en millions d'euros), Source : IUPP 2010.....	44
Figure 26 : Etang présent sur le site Irstea de Bordeaux (Cestas-Gazinet) utilisé comme site de colonisation pour les biofilms	44
Figure 27 : Seringue en verre de 5 mL et filtre Whatman Spartan 13	50
Figure 28 : Acquity UPLC couplée au spectromètre Xevo G2-S-ToF de Waters.....	51

Figure 29 : Lyophilisateur ALPHA 1-2 LDPlus CHRIST	51
Figure 30 : ASE 200 DIONEX.....	51
Figure 31 : Coupon de biofilm.....	51
Figure 32 : Logigramme regroupant les différentes étapes de préparation à suivre pour les échantillons de biofilm	52
Figure 33 : BoxPlots des concentrations moyennées dans le milieu pour chaque composé étudié	55
Figure 34 : Représentation graphique de la variation du rapport de concentration en DCPU dans le biofilm et dans le milieu en fonction du temps – Moyennes pour les réplicats et barres d'erreurs associées (CV %) - Manipulation sur 7 jours	55
Figure 35 : Représentation graphique de la variation du rapport de concentration en DCPMU dans le biofilm et dans le milieu en fonction du temps – Moyennes pour les réplicats et barres d'erreurs associées (CV %) - Manipulation sur 7 jours	55
Figure 36 : Modélisation d'une cinétique d'ordre 1 avec les données acquises pour la molécule de DCPU aux cours des deux manipulations.....	56
Figure 37 : Modélisation d'une cinétique d'ordre 1 avec les données acquises pour la molécule de DCPMU aux cours des deux manipulations	56
Figure 38 : Groupes algaux présents dans le biofilm ayant servis aux différentes manipulations	57
Figure 39 : Représentation graphique de la corrélation en la quantité de chlorophylle et la biomasse lyophilisée.....	57
Figure 40 : Rapport des concentrations en DCPU dans le biofilm et l'eau en fonction des rapports de concentrations prédits par rapport au modèle cinétique d'ordre 1	59
Figure 41 : Rapport des concentrations en DCPMU dans le biofilm et l'eau en fonction des rapports de concentrations prédits par rapport au modèle cinétique d'ordre 1	59

- LISTE DES TABLEAUX -

Tableau 1: Caractéristiques physico-chimiques du diuron.....	15
Tableau 2 : Récapitulatif des résultats obtenus pour la validation de méthode	28
Tableau 3 : Récapitulatif des résultats obtenus pour le test de Fisher	32
Tableau 4 : Constantes cinétiques obtenues après modélisation d'une cinétique d'ordre 1 sur les données acquises pour les deux manipulations	36
Tableau 5 : Comparaison des logarithmes des constantes d'équilibre eau-biofilm ($\log K_{BW}$) par rapport à la polarité des molécules étudiées ($\log K_{ow}$).....	37
Tableau 6 : Paramètres des différentes composantes du système.....	50

- LISTE DES ABREVIATIONS -

ATP	Adénosine TriPhosphate
CARMA	Contaminants Anthropiques et Réponses des Milieux Aquatiques
Cbiofilm	Concentration en contaminants dans le biofilm
CEMAGREF	Centre Machinisme Agricole Génie Rural Eaux Forêts
CNRS	Centre National de la Recherche Scientifique
CO ₂	Dioxyde de Carbone
CV	Coefficient de variation
C _w	Concentration en contaminants dans le milieu
DCE	Directive Cadre sur l'Eau
EABX	Ecosystèmes Aquatiques et changements globaux
EPS	Extracellular Polymeric Substances
ESI	Electrospray Ionisation
ETBX	Environnement, territoires et infrastructures
EUP	Eau Ultra Pure
INRA	Institut National de la Recherche Agronomique
IRSTEA	Institut national de Recherche en Sciences et Technologies pour l'Environnement et l'Agriculture
K _{ow}	Coefficient de partage octanol-eau
NQE	Norme de Qualité Environnementale
OMS	Organisation Mondiale de la Santé
TOF	Time Of Flight
UE	Union Européenne
UPLC	Ultra Performance Liquid Chromatography
UR-EABX	Unité de Recherche – Ecosystèmes Aquatiques et Changements Globaux
UR-MALY	Unité de Recherche - Milieux Aquatiques, Ecologie et Pollutions

- INTRODUCTION -

Contexte général

Compte tenu de l'efficacité des produits phytosanitaires face aux parasites animaux et végétaux, une augmentation croissante de l'utilisation de ces composés s'est fait ressentir à partir des années cinquante, dans le but d'améliorer les rendements agricoles. Cette utilisation massive entraîne alors, de manière non négligeable, une contamination des trois compartiments de l'environnement (eau, air, sol) avec des conséquences parfois dramatiques pour l'homme et son écosystème.

Ainsi, la pollution quasi généralisée des masses d'eau françaises et européennes a conduit l'UE à mettre en place un cadre réglementaire d'évaluation de la qualité et de gestions des eaux superficielles et souterraines (Directive Cadre sur l'Eau, DCE, 2000/60/EC). En France, un plan d'action rejoignant les objectifs de la DCE a également été mis en place lors du Grenelle de l'environnement de 2007 : le plan Ecophyto 2018 qui vise à réduire de 20% l'utilisation de ce type de produit d'ici 2020 et de 50 % d'ici 2025.

Toutefois, malgré l'évolution de ces normes environnementales, la France n'utilise pas moins de 59 300 tonnes de pesticides par an¹, et reste le plus grand consommateur en Europe (Annexe I - Figure 25) et le troisième au niveau mondial. De ce fait, après des études menées par le Ministère de l'Écologie, il est recensé la présence d'au moins un pesticide dans 93 % des points de prélèvements « cours d'eau » en 2011 (Dubois 2013). La surveillance des milieux aquatiques s'avère donc indispensable pour le suivi de la qualité des eaux et pour l'application de ces normes. C'est d'ailleurs ce que s'engage à faire des organismes tels qu'Irstea (Institut national de Recherche en Sciences et Technologies pour l'Environnement et l'Agriculture) par le développement de nouvelles méthodes visant à détecter et quantifier la présence, ainsi que les impacts sur les organismes aquatiques des produits phytosanitaires.

Problématique

Afin de mettre en évidence la contamination d'un milieu aquatique par le biais des espèces biologiques présentes dans le milieu, de nombreux chercheurs se sont intéressés depuis quelques années à une composante primaire de la chaîne trophique² : le biofilm.

De par son caractère ubiquiste, sa composition hétérogène, sa réactivité de réponse face à un stress (Sabater et al. 2007), le biofilm constitue un excellent indicateur biologique pour la mise en œuvre des objectifs de la DCE. En effet, cette matrice organique complexe, composée de microorganismes (bactéries, microalgues, champignons) enchâssés dans une matrice polysaccharidique, possède des propriétés qui font d'elle un compartiment capable de piéger les contaminants. De nombreuses recherches témoignent d'ailleurs de son importante capacité d'accumulation des métaux (Campbell et al. 2002, Morin 2006, Arini 2011).

Plus récemment, des chercheurs se sont intéressés aux potentiels de ce compartiment biologique pour le diagnostic des contaminations phytosanitaires. Des descripteurs d'effets biologiques ont été développés au sein des centres Irstea (Debenest 2007, Kim Tiam 2013). Malgré tout, il n'existe que très peu d'études s'intéressant aux capacités d'accumulation des contaminants organiques (Headley 1998, Lawrence et al. 2001). Les rares connaissances sur le sujet sont restreintes à des études

¹ <http://www.planetoscope.com/sols/47-consommation-de-pesticides-phytosanitaires-en-france.html>, en ligne, page consultée le 16/07/2015

² Trophique : Qui est relatif à la nutrition d'un individu, d'un tissu vivant. (www.larousse.fr/dictionnaire/francais) page consultée le 05/05/2015

cinétiques de très courts termes mettant en évidence une cinétique d'accumulation de premier ordre (Headley 1998), tandis que des données récentes acquises par l'équipe du centre (EABX/CARMA) suggéreraient une cinétique d'accumulation beaucoup plus complexe : *a priori* biphasique (Byers 2012).

Objectifs

Dans le cadre de ce stage, les objectifs sont de décrire et comprendre la cinétique d'accumulation d'un herbicide et de ses métabolites : le diuron, le DCPU et le DCPMU dans le biofilm. La problématique de ce stage étant :

Détermination des constantes cinétiques et d'équilibre du diuron dans le biofilm.

Pour cela un système conçu pour mimer les conditions environnementales d'un milieu lotique en laboratoire a été utilisé : le bioréacteur annulaire rotatif.

Cette étude consistait en la mesure de la concentration de nos composés dans la colonne d'eau et dans la matrice (biofilm), de manière à proposer des modèles cinétiques régissant les échanges entre ces herbicides et le biofilm. Pour cela, le protocole d'analyse développé par Harry Byers a été repris et adapté à l'étude (Byers 2012).

Dans ce rapport, vous sont détaillées dans une première partie les « généralités » indispensables à la compréhension du sujet. Par la suite, une partie « matériels et méthodes » vous détaille les différentes manipulations effectuées. Enfin, les résultats vous sont présentés et discutés pour clôturer cette étude.

I. PRESENTATION DU LABORATOIRE³

Depuis plus de 30 ans, Irstea « Institut national de Recherche en Sciences et Technologies pour l'Environnement et l'Agriculture », anciennement CEMAGREF, travaille sur les principaux enjeux en relation avec l'agriculture, l'aménagement durable des territoires, la gestion de l'eau, l'étude des écosystèmes et de la biodiversité.

Dans le cadre de ce stage, le centre Irstea intégré, parmi les neuf implantations en France (Figure 1), fut celui de Bordeaux – Cestas (Figure 2). Les activités de recherche de ce site reposent sur la gestion de l'eau et du fonctionnement des milieux aquatiques, ainsi que sur l'interface entre eau et gestion des territoires.

Pour les mener à bien, le centre de Bordeaux travaille en collaboration avec d'autres unités de recherche, notamment, celles des autres centres Irstea, et également des laboratoires publics français tels que le CNRS, l'INRA, l'Université de Bordeaux.

Au sein de ce centre, il existe deux unités de recherche :

- ETBX : Environnement, Territoires et Infrastructures,
- EABX : Ecosystèmes Aquatiques et Changements Globaux,

Dans le cadre de ce stage, l'unité de recherche intégrée fut **EABX**, et plus précisément l'équipe **CARMA** « Contaminants Anthropiques et Réponses des Milieux Aquatiques ». Cette équipe effectue des travaux de recherche visant à caractériser le fonctionnement et les réponses des communautés végétales aquatiques (macrophytes, diatomées...) sous l'influence de divers paramètres tels que les effets néfastes engendrés par la présence de micropolluants organiques dans les masses d'eau, par exemple.

Enfin, cette même équipe regroupe plusieurs agents, dont ceux membres du **laboratoire de chimie des eaux**, équipe dans laquelle le stage fut réalisé. Le laboratoire assure des analyses physico-chimiques en relation avec les travaux de recherche menés par les équipes de l'unité de recherche EABX (**activité paramètres majeurs**). Mais, il possède également ses propres activités de recherche liées à l'analyse des micropolluants organiques, ou encore à la mise au point et l'application de techniques d'échantillonnage passifs des milieux aquatiques (**activité micropolluants organiques**).



Figure 1 : Sites Irstea en France (www.irstea.fr)



Figure 2 : Centre Irstea de Bordeaux – Cestas (www.irstea.fr)

³ <http://www.irstea.fr/linstitut/nos-centres/bordeaux>, en ligne, page consultée le 28/04/2015

II. GENERALITES

1) LES PESTICIDES : DEFINITION, MODES DE CONTAMINATION ET REGLEMENTATION

a) Définition

Par définition, le mot « pesticide » est un terme générique qui caractérise une large étendue de substances ayant pour but de **prévenir, contrôler ou éliminer des organismes jugés comme nuisibles** (animaux, végétaux, bactéries, champignons...). Ces produits sont composés d'une ou plusieurs substances chimiques organiques ou minérales, d'origines naturelles ou synthétiques.

De manière générale, les pesticides sont majoritairement utilisés dans les milieux agricoles, mais aussi pour l'entretien des espaces verts urbains et les activités domestiques. Face à la profusion des matières actives développées au cours des années passées, les producteurs et les utilisateurs de pesticides les regroupent vis-à-vis de leurs actions sur les organismes ciblés, ou par rapport aux groupements fonctionnels qui les caractérisent.

On les distingue donc par rapport à leurs utilisations, avec les trois plus grandes classes suivantes :

- Les **herbicides** spécifiques à l'élimination des adventices (mauvaises herbes),
- Les **fongicides** pour lutter contre les champignons phytopathogènes,
- Les **insecticides** pour l'élimination des insectes.

Et aussi, par leurs groupements fonctionnels et propriétés chimiques, avec les organochlorés, les organophosphorés, les carbamates et les phénylurées par exemple.

Ainsi, depuis de nombreuses années, les pesticides, par le biais de leurs actions sur les milieux agricoles, représentent un progrès considérable dans la maîtrise des ressources alimentaires et dans l'amélioration de la santé publique. Cependant, l'utilisation de ce type de produit chimique ne présente pas que des avantages, mais un aspect bien moins attractif, avec l'apparition fréquente de ces substances actives dans les trois compartiments de l'environnement (eau, air, sol), par des phénomènes de propagation.

b) Modes de contamination et devenir dans l'environnement

Le plus souvent, l'apport de pesticides dans les compartiments environnementaux se fait de manière intentionnelle (application dans les champs, jardins, ou encore espaces urbains). Les substances actives des produits phytosanitaires, ainsi que les molécules issues de leur dégradation, appelées métabolites, sont donc susceptibles de se retrouver dans les trois compartiments de l'environnement alors que ceux-ci n'étaient pas ciblés au départ. Bien que le rôle principal de ce type de composé soit de protéger des organismes nuisibles, leurs migrations dans ces différents milieux représentent des dangers plus ou moins importants pour l'environnement et l'homme.

La propagation dans l'environnement de ces composés se fait par le biais de trois grands processus de dispersion, tels que la volatilisation, le ruissellement et l'infiltration. En plus de ces phénomènes de propagation, se produisent des mécanismes de dégradation des composés dans les compartiments contaminés. Trois grands processus peuvent être cités avec notamment : la biodégradation par les micro-organismes, la dégradation physico-chimique par réaction d'hydrolyse ou d'oxydo-réduction, puis la photo-dégradation par les rayonnements solaires.

Tous ces mécanismes vont dépendre des propriétés physico-chimiques intrinsèques du composé telles que, son coefficient de partage octanol-eau (K_{ow}), sa solubilité dans l'eau... Mais aussi du

compartiment dans lequel il se trouve (air, eau, sol) et des conditions climatiques qui y règnent telles que la température, l'humidité du sol, le vent...

c) Cadre réglementaire⁴

Compte tenu de la présence non négligeable de pesticides toxiques dans les masses d'eau françaises et européennes, des normes ont été mises en place. Ainsi, la **Directive Cadre sur l'Eau (DCE)**, créée depuis les années 2000 (2000/60/CE) par l'Union Européenne (UE), fixe des objectifs aux états membres afin de préserver et restaurer l'état des milieux aquatiques (eaux superficielles, souterraines, de transition, littorales) et impose par conséquent une surveillance stricte et régulière.

La DCE fixe des objectifs, avec tout d'abord l'étape de diagnostic établie avec la liste des substances polluantes prioritaires (**Annexe II** - dont 1/3 sont des pesticides) et les paramètres de base (pH, conductivité...), qui vont permettre de déterminer l'**état chimique** des masses d'eau. A chacune des substances mentionnées dans cette liste correspond une concentration seuil à ne pas dépasser lors d'un pic de pollution, soit la **Norme de Qualité Environnementale (NQE)**, fixées par une directive fille récente : 2013/39/UE. Ensuite, la DCE impose la restauration ou le maintien de la qualité des différentes masses d'eau via la bioindication qui permet de définir leurs **états biologiques**. Ces deux états regroupés vont caractériser l'**état écologique**, qui permettra une classification des masses d'eau suivant leurs niveaux de qualité.

Ainsi, cette directive souhaite que les milieux aquatiques retrouvent un « bon état » écologique cette année (2015), avec des dérogations possibles pour 2021 et 2027 en fonction des substances.

De plus, le plan **Ecophyto2018** lancée lors du Grenelle de l'environnement de 2008, vise à réduire de 50 % l'usage des produits phytosanitaires aussi bien en zone agricole, urbaine que domestique d'ici 2025. Ce plan d'action rejoignant les objectifs de la DCE s'avère difficile à réaliser puisque malgré un mieux en 2012, l'utilisation de pesticides en France a augmenté de 9.2 % en 2013 selon les chiffres publiés par le ministère de l'Agriculture⁵. Ceci montre bien la difficulté d'inverser la dépendance de l'agriculture française pour l'utilisation des pesticides.

d) Impacts des pesticides sur les écosystèmes aquatiques

Lorsqu'un pesticide est rejeté dans l'environnement, celui-ci peut affecter négativement des organismes vivants qui n'étaient pas ciblés au départ, même s'il est partiellement dégradé et/ou dissocié des adjuvants présents dans les formulations commerciales (Poulier 2014). Ces organismes vont alors recevoir, selon les cas, la totalité ou une fraction de la dose appliquée. Ces effets vont ainsi concerner tout un écosystème, des microorganismes aux mammifères, quel que soit leur habitat (terrestre ou aquatique). De ce fait, la contamination des milieux aquatiques peut avoir des conséquences sur l'équilibre de la chaîne trophique, bien qu'elle soit généralement non intentionnelle. En effet, les organismes aquatiques sont constamment en interaction avec leur écosystème. Ils sont donc capables d'intégrer les évolutions environnementales sur le court ou long terme.

Ces effets sur les organismes qui composent l'écosystème aquatique peuvent être **directs** (absorption, ingestion, respiration) ou **indirects** (via un autre organisme contaminé par exemple).

⁴ <http://www.eaufrance.fr/comprendre/la-politique-publique-de-l-eau/la-directive-cadre-sur-l-eau>, en ligne, page consultée le 09/06/2015

⁵ <http://tempsreel.nouvelobs.com/planete/20141223.OBS8582/la-france-reste-la-patrie-des-pesticides.html>, en ligne, page consultée le 19/05/2015

Les pesticides les plus fréquemment détectés dans les cours d'eau sont des **herbicides**, du fait de leur usage prépondérant et de leurs propriétés physico-chimiques (solubilité et polarité). L'effet direct de cette présence se manifeste par la raréfaction des producteurs primaires photosynthétiques tels que le phytoplancton, les microalgues, le **biofilm** ou les macrophytes. Pour cause, beaucoup d'herbicides agissent par inhibition de la photosynthèse. En ce qui concerne les effets indirects, ceux-ci peuvent se traduire par un réarrangement des communautés, les espèces sensibles étant remplacées par des espèces plus tolérantes, mais potentiellement indésirables qui se mettent à proliférer (Paule 2012).

Ainsi, le biofilm constitue un compartiment privilégié pour la surveillance des cours d'eau. En effet, son immersion permanente dans le milieu, ses exigences spécifiques et ses tolérances variables en fonction de la qualité de l'eau font de lui un très bon indicateur de la qualité des eaux.

2) LE BIOFILM

a) Définition

Le terme biofilm désigne un ensemble complexe de microorganismes variés (microalgues, bactéries, champignons) se développant sur tout type de substrat immergé, qu'il soit vivant ou inerte. Le biofilm se découpe en deux fractions :

- Une fraction **autotrophe**, souvent phototrophe, composée majoritairement **d'algues vertes, de diatomées et de cyanobactéries**. Ces espèces sont capables de subvenir à leurs besoins en utilisant le dioxyde de carbone (CO₂) de l'air, les éléments minéraux du milieu comme source de matière ainsi que la lumière du soleil comme source d'énergie, c'est ce que l'on nomme la **photosynthèse**.
- Une fraction **hétérotrophe**, souvent chimiotrophe, composée majoritairement **de bactéries et de champignons**. Ces espèces utilisent des substances chimiques préexistantes par oxydo-réduction pour élaborer leurs propres constituants organiques, et ainsi produire leur propre énergie cellulaire, leur matière et assurer leur survie.

Ces deux fractions sont enrobées dans une matrice polysaccharidique, formée d'exopolymères sécrétés par les composantes algales et bactériennes du biofilm : **la matrice EPS** « Extracellular polymeric substances ». En général, cette matrice est composée de polysaccharides, de protéines, de lipides, d'acides nucléiques, d'enzymes extracellulaires et d'autres biopolymères. Elle assure la cohésion du biofilm, définit son architecture, apporte une stabilité à l'agrégat et favorise l'atténuation des stress environnementaux (Flemming et al. 2010). De plus, cet ensemble hétérogène est composé majoritairement d'eau (Sutherland 2001, Stewart 2003).

La Figure 3 suivante, montre que ces amas de cellules microbiennes enchâssées dans la matrice EPS sont entrecoupés par un certain nombre de pores, de vides et de canaux permettant la circulation de liquide à l'intérieur du biofilm (eau interstitielle). Ainsi, ces canaux internes et cette matrice hautement hydratée constituent d'importante zone de stockage pour les solutés présents dans le milieu (Battin et al. 2003).

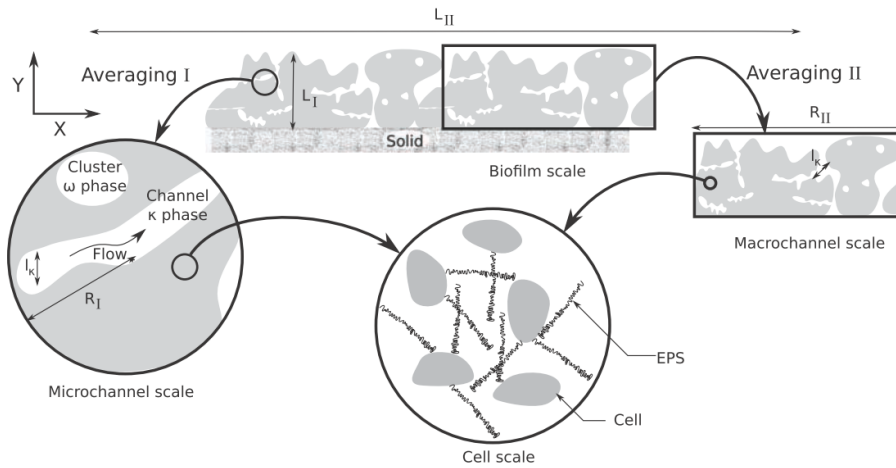


Figure 3 : Coupe schématique soulignant le caractère multi-échelle du biofilm (Davit et al. 2013)

b) Dynamique de colonisation et rôle écologique

La croissance du biofilm s'effectue en deux étapes distinctes (Figure 4):

- **Une phase d'accrétion** : qui est représentative de la colonisation d'un substrat vierge par dépôt d'une couche de matière organique et de bactéries primaires, facilitant ainsi l'adhésion de petites espèces de microalgues unicellulaires adhérentes et mobiles. Ce sont les espèces pionnières.
- **Une phase de croissance** : qui est caractérisée par le développement tridimensionnelle d'autres espèces de microalgues (filamenteuses, à court pédoncule...).

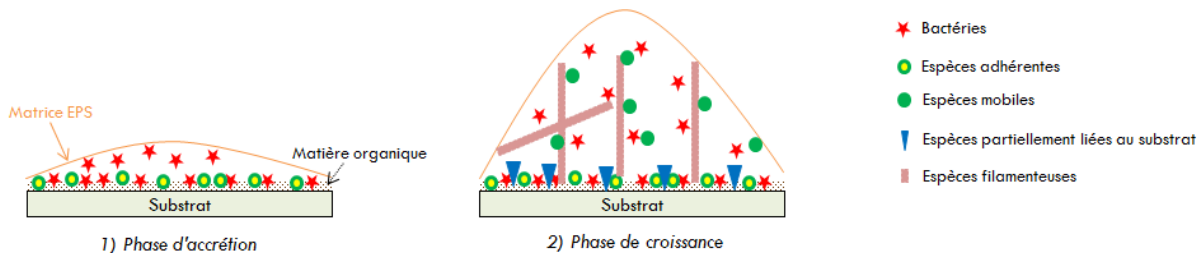


Figure 4 : Schématisation de la dynamique de colonisation d'un substrat par le biofilm

Ainsi, au fur et à mesure de la croissance du biofilm, son architecture tridimensionnelle se complexifie pour former à maturité un biofilm dont l'épaisseur varie en fonction de la variété d'espèces présentes dans le milieu, du type de substrat et des conditions environnementales telles que la lumière, l'hydrodynamisme du milieu, la présence de brouteurs... (Kim Tiam 2013). Cette architecture représente l'un des facteurs intervenant sur les transferts de masse entre la colonne d'eau et le biofilm lui-même.

En ce qui concerne son rôle écologique, le biofilm s'avère être un compartiment clef des milieux aquatiques, car il contribue au fonctionnement général et à la structure des écosystèmes. En effet, le biofilm intervient dans les cycles biogéochimiques majeurs, car il est le siège de processus auto et hétérotrophes. Ainsi, sa position à la base de la chaîne trophique fait de lui une source de nourriture pour les nombreux organismes brouteurs (gastéropodes, poissons...).

c) Le biofilm : bioindicateur de la qualité des eaux

Par définition, un **bioindicateur** désigne une espèce ou une population qui doit être facilement mesurable, être sensible à un stress, répondre à ce stress de façon prédictible et avoir une faible variabilité de réponse pour un même stress (Montuelle et al. 2010).

Un bioindicateur doit idéalement présenter les caractéristiques suivantes (Morin 2006) :

- Abondance dans le milieu,
- Présence en début de chaîne trophique,
- Cycle de vie simple et court,
- Identification morphologique facile,
- Échantillonnage simple et rapide.

Les biofilms, dont la structure tridimensionnelle complexe intègre les flux d'eau et d'éléments dissous, sont donc de très bons bioindicateurs car ils répondent à chacun des critères mentionnés précédemment.

Le biofilm est donc considéré comme un système d'alerte précoce dans la détection de contamination, qu'elles soient dues à la présence de métaux (Campbell et al. 2002, Morin 2006) ou de composés organiques (Kim Tiam 2013). Leur capacité pour révéler la présence de polluants mène les chercheurs à proposer une variété de méthodes pour détecter et évaluer les impacts des pesticides (Montuelle et al. 2010).

Il a d'ailleurs été montré que le biofilm joue un rôle dans le devenir des polluants organiques dans les cours d'eau, que ce soit par leur accumulation ou la transformation de molécules mères en métabolites (Lawrence et al. 2001). Mais jusqu'à présent, aucun chercheur ne s'est réellement intéressé à la cinétique qui régit ce phénomène d'accumulation.

Ainsi, avoir une meilleure notion des cinétiques mises en jeu aiderait à avoir une meilleure idée de l'impact des pesticides sur les communautés constituant le biofilm. Enfin, le diagnostic de l'état écologique des milieux aquatiques serait davantage renforcé.

3) CHOIX DE LA MOLECULE ETUDIEE : LE DIURON

a) Usages, caractéristiques physico-chimiques et réglementation ⁶

Afin de déterminer la constante cinétique et d'équilibre mise en jeu entre un pesticide particulier et le biofilm, une seule molécule a été sélectionnée : celle-ci étant le **diuron** (C₉H₁₀Cl₂N₂O - Figure 5).

Cette substance active est un herbicide de pré-émergence de la famille chimique des **urées substituées**, souvent utilisées pour traiter la plupart des mauvaises herbes annuelles et persistantes (vergers...). Les caractéristiques physico-chimiques de cette substance sont présentées dans le *Tableau 1* suivant :

Tableau 1: Caractéristiques physico-chimiques du diuron

Caractéristiques physico-chimiques	
Aspect	Solide cristallin incolore, inodore
Poids moléculaire	233,10 g.mol ⁻¹
Solubilité dans l'eau (à 25°C)	42 mg.L ⁻¹
LogKow	2,87
Constante de la loi de Henry (25°C)	5,10.10 ⁻¹⁰ atm.m ³ .mol ⁻¹

⁶ http://www.ineris.fr/rsde/fiches/fiche_diuron_v4.pdf, page consultée le 19/05/15

Ce genre d'herbicide est souvent qualifié des « plus critiques », car il est souvent utilisé sur des sols nus avant la germination des semences (Paule 2012). Il est donc particulièrement exposé aux processus de transport des matières organiques, du sol vers le milieu aquatique notamment lors de fortes précipitations. En ce qui concerne la législation, l'utilisation de la molécule seule de diuron est interdite en France depuis 2008 que soit pour un usage agricole, urbain ou domestique. Ce composé est toutefois encore utilisé dans les compositions des préparations, tel que dans l'antifouling par exemple. La concentration maximale admissible dans les eaux est de 1,8 µg.L⁻¹ selon la norme de qualité environnementale des eaux de surfaces⁷. Dans le cadre de la DCE, le diuron est classé comme « substance prioritaire » par la commission européenne (Annexe II).

Enfin, ce composé peut se métaboliser par biodégradation (Figure 5), et former deux métabolites principaux: le DCPU et le DCPMU qui seront également étudiés pendant ce stage.

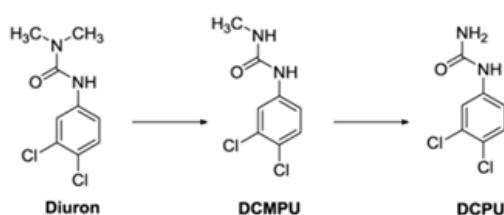


Figure 5 : Biodégradation du diuron (Cui et al. 2014)

b) Mode d'action du diuron

Le diuron est un herbicide qui est facilement assimilé par le système racinaire de la plante. Une fois l'assimilation faite, cette substance active va agir directement sur le mécanisme de la photosynthèse en **inhibant le transfert d'électron** ayant lieu dans le **photosystème II**.

Pour rappel, la photosynthèse est une réaction biochimique énergétique qui a pour but de créer de l'énergie chimique (glucide) à partir de l'énergie lumineuse (soleil) au niveau d'un organisme autotrophe. Il s'agit donc d'un processus permettant de synthétiser de la matière organique à partir de la lumière du soleil.

Le diuron agit directement sur ce mécanisme en inhibant l'une des protéines membranaires (protéine D1) responsable du transfert d'électrons générés au sein du photosystème II. Ceci va stopper le transfert d'électrons et par conséquent la production d'ATP. L'accumulation intracellulaire de protons qui en résulte va générer des radicaux super-oxydes dans la cellule. Ces radicaux vont altérer les molécules de chlorophylles a provoquant l'arrêt de la photosynthèse (Moreland 1967, Trebst et al. 1987) et par conséquent la mort de l'organisme photosynthétique, ou de la composante phototrophe : le biofilm dans notre cas.

4) THEORIE ET MODELE D'ACCUMULATION D'UN POLLUANT ORGANIQUE

De manière à évaluer correctement le risque écotoxicologique⁸ d'une substance polluante sur un organisme vivant il est important, voire indispensable, d'être capable de prédire, au-delà de la concentration en contaminant retrouvé dans le milieu, quelle sera la fraction contaminante susceptible d'exercer une action toxique sur l'organisme.

⁷http://www.eauseinenormandie.fr/fileadmin/mediatheque/Politique_de_leau/SDAGE_ADOPTE/SDAGE_2010_04/chapitres/ANN1_SDAGE-normes-qualités-environnement.pdf, page consultée le 19/05/15

⁸ Écotoxicologie : Etude de l'impact des polluants sur les écosystèmes, <http://www.ecotoxicologie.fr/>, page consultée le 23/07/15.

Dans l'écosystème aquatique, les contaminants peuvent rester inchangés ou prendre différentes formes par le biais des mécanismes physiques (diffusion, fixation sur particules), chimiques (dégradations) ou biologiques (accumulation, digestion...) intervenants. Ainsi, ces différences de formes entraînent une accessibilité plus ou moins importante du contaminant, et par conséquent une dangerosité variable pour les organismes.

La notion intervenant dans ce contexte n'est autre que la **biodisponibilité** du contaminant, c'est-à-dire sa capacité à entrer en contact et à exercer son effet xénobiotique⁹ sur les organismes cibles et non cibles. Cette notion se situe à l'interface entre le milieu et l'organisme, et va dépendre à la fois du polluant, de son devenir dans l'environnement et de la physiologie de l'organisme exposé.

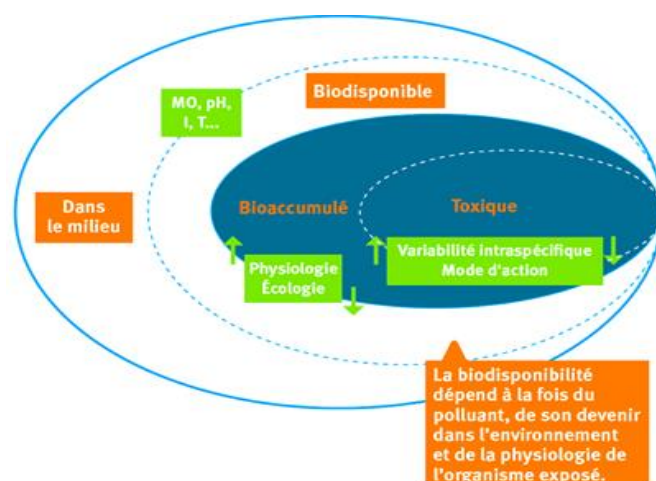


Figure 6 : Relation schématique entre la présence, la biodisponibilité d'un contaminant dans l'environnement, sa bioaccumulation et sa toxicité dans un organisme biologique (Gourlay-Francé et al. 2010)

Gourlay-Francé et al. (2010) citent les trois mesures complémentaires permettant d'estimer la biodisponibilité des contaminants, soient : la **mesure chimique dans le milieu** (concentration dans l'eau, les sédiments, etc...), la **mesure du contaminant accumulé** par les organismes (bioaccumulation), puis la **mesure biologique de la réponse** des organismes à l'exposition (mesure de la toxicité). La Figure 6 ci-dessus, montre les relations entre ces trois notions.

Dans le cadre de ce stage, ces trois mesures ont été réalisées. Un intérêt particulier a été porté à **l'étude de la cinétique** modélisant la capacité du biofilm à adsorber/absorber un pesticide, puisque les connaissances sur la bioaccumulation de ce type de contaminants sont presque inexistantes pour de tels organismes aquatiques.

Au contraire, de nombreuses études ont été intéressées à l'accumulation des métaux dans le biofilm (Campbell et al. 2002). Ces dernières ont montré que plusieurs voies pouvaient être envisageables, soient : par adsorption sur la matrice polysaccharidique, par adsorption sur la surface des différentes cellules le constituant et enfin par absorption dans les cellules (Serra et al. 2009). Ainsi, des mécanismes comparables pourraient avoir lieu lorsque la contamination est liée à un contaminant organique.

En théorie, la sorption de composés organiques présents dans une phase liquide (eau) par une phase solide (biofilm) peut être modélisée par un processus réversible avec établissement d'un équilibre entre les deux compartiments (Figure 7).

⁹ Xénobiotique : Se dit d'une molécule étrangère à un organisme vivant et considérée comme toxique, <http://www.larousse.fr/dictionnaires/francais/x%C3%A9nobiologique/186868>, page consultée le 23/07/15.

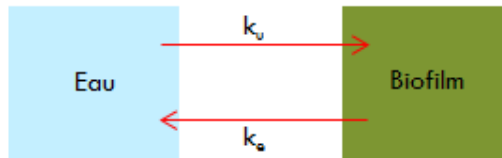


Figure 7 : Schématisation des échanges mis en jeu entre deux compartiments (eau / biofilm)

Ce phénomène peut être décrit par un processus réversible qui peut être régi par une cinétique de premier ordre (Srivastava et al. 2006) :

$$\frac{C_x(\text{biofilm})}{C_x(\text{biofilm})_{eq}} = 1 - e^{-\left[k_u \times \frac{m_{\text{biofilm}}}{V_{\text{eau}}} + \frac{k_e}{K_{BW}}\right] \times t} \quad \text{Equation 1}$$

$$k_e = \frac{k_u}{K_{BW}} \quad \text{Equation 2}$$

- Avec :
- $C_x(\text{biofilm})$: concentration en contaminant x dans le biofilm (ng.g^{-1})
 - $C_x(\text{eau})$: concentration en contaminant x dans l'eau (ng.mL^{-1})
 - m_{biofilm} : quantité de biofilm (g)
 - V_{eau} : volume d'eau total (contenant le contaminant dans lequel le biofilm est exposé)
 - k_u : constante cinétique d'accumulation ($\text{mL.g}^{-1}.\text{h}^{-1}$)
 - K_{BW} : constante d'équilibre eau-biofilm (mL.g^{-1})
 - k_e : constante cinétique d'élimination (h^{-1})
 - t : le temps d'exposition (h)

S'il est admis que le volume d'eau est infini au regard de la quantité de biofilm exposé dans un milieu naturel, alors l'équation 1 devient :

$$\frac{C_x(\text{biofilm})}{C_x(\text{eau})} = \frac{C_x(\text{biofilm})_{eq}}{C_x(\text{eau})} \times (1 - e^{-k_e t}) \quad \text{Equation 3}$$

D'où,

$$\frac{C_x(\text{biofilm})(t)}{C_x(\text{eau})} = K_{BW} (1 - e^{-k_e t}) \quad \text{Equation 4}$$

L'équilibre, une fois atteint, permet de simplifier l'équation 4, et ainsi de déterminer la constante d'équilibre eau-biofilm K_{BW} :

$$C_x(\text{biofilm})_{eq} = K_{BW} \cdot C_x^n(\text{eau}) \quad \text{Equation 5}$$

- Avec :
- n : facteur de non linéarité, généralement considéré comme proche de 1 lorsque l'on travaille dans un milieu très dilué, ce qui est le cas des concentrations environnementales (proches ou inférieures au $\mu\text{g.L}^{-1}$).

Une des rares publications ayant traité cette problématique (Headley 1998) décrit une cinétique de premier ordre (Equation 1), avec l'atteinte d'un équilibre en 2 h seulement (Equation 5).

De plus, au sein de l'équipe CARMA intégrée, une étude a été réalisée sur cette thématique (Byers 2012). Cette dernière, basée sur le protocole analytique mis en place par une équipe de l'UR MALY-Irstea Lyon (Lahjiouj et al. 2011), a mis en évidence au cours d'un suivi sur 14 jours, des mécanismes d'accumulation/transfert nettement plus complexes que ceux caractérisés par une cinétique d'ordre 1. En effet, au terme de cette étude une cinétique *a priori* **biphasique** avait été mise en évidence.

Ainsi, dans le cadre de ce stage, la cinétique d'accumulation des 3 composés ciblés (diuron, DCPU et DCPMU) dans le biofilm a été étudiée dans des conditions contrôlées. Le croisement de données obtenues a donc pour objectif de confirmer ou non les conclusions émises en 2012 par l'équipe.

Le but final de tout cela étant, d'avoir une meilleure connaissance de cette cinétique, ce qui permettrait d'avoir une meilleure approximation de la biodisponibilité des substances dans le biofilm et également de leurs effets toxiques sur cette matrice.

III. MATÉRIELS ET MÉTHODES

1) MATÉRIELS DE L'ÉTUDE

a) « Biofilm Annular Reactor »

Le problème des études *in situ*, malgré leur forte représentativité, réside dans la difficulté à différencier les variabilités naturelles de celles liées aux polluants. En raison de cette difficulté, de nombreux systèmes ont été développés de manière à mimer les conditions naturelles d'un milieu lotique (Paule 2012).

Pour répondre à la problématique de cette étude, le système utilisé est **un bioréacteur annulaire rotatif** (modèle BST 1320 de Biosurface Technologies Corporation) présenté en *Figure 8*. Cet équipement permet l'ajustement et le contrôle des conditions extérieures (lumière, température, vitesse du courant...), ainsi que la mise en place d'un échantillonnage simple permettant la récupération d'un biofilm non déstructuré.

Ce bioréacteur se compose d'un **cylindre interne mobile** grâce à son axe de transmission et son moteur, et d'un **cylindre externe fixe**. Ce cylindre interne est équipé d'encoches permettant de venir fixer les coupons (lames) recouverts de biofilm (20 maximum). Sa rotation provoque un mouvement circulaire qui permet de mimer la vitesse du courant d'un milieu lotique, et d'augmenter l'homogénéité dans l'espace de circulation.

Afin de simuler réellement les conditions d'un milieu lotique, ce système est à flux continu. En effet, il est équipé de plusieurs entrées pouvant ainsi apporter simultanément, l'eau, les nutriments et les polluants dans l'espace de circulation où se trouvent les lames recouvertes de biofilm. Il dispose également d'un tuyau d'évacuation permettant un renouvellement du milieu au cours du temps. Enfin, le volume de l'espace de circulation est faible (environ 1L de milieu) par rapport à la grande surface d'exposition (350 cm²) du biofilm. Celui-ci est donc entièrement disponible pour les nutriments et les pesticides, fournissant ainsi des conditions favorables aux **échanges cinétiques eau-biofilm**.

La *Figure 8* ci-dessous, représente le bioréacteur de manière schématique.

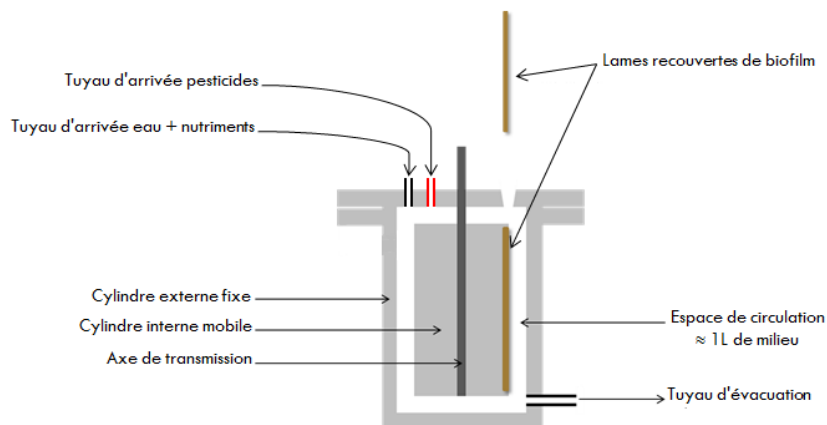


Figure 8 : Représentation schématique du bioréacteur

Toutes les expériences ayant lieu avec ce dispositif s'effectuent dans un laboratoire ayant des conditions de température et luminosité contrôlées, afin d'obtenir des conditions homogènes tout au long des expériences.

b) Echantillonnage des communautés naturelles et mise en culture

Pour répondre à la problématique de ce stage, il était nécessaire dans un premier temps de récupérer du biofilm. Pour ce faire, la technique d'échantillonnage utilisée a été la pose de substrats artificiels dans l'étang situé sur le site du centre Irstea intégré ([Annexe I – Figure 26](#)). Pour cela, le support de colonisation correspondait à des lames de verre qui ont été placées à l'intérieur de cagettes en plastique adaptées ([Figure 9](#)). Des substrats en verre, couramment utilisés autant en milieu naturel que pour des études de laboratoire, ont été choisis. Ces supports inertes permettent un échantillonnage simple par raclage, et réduisent la variabilité liée au prélèvement (Morin 2006).

Les cagettes ont été immergées pendant environ 1 mois dans l'étang. Les lames ont ensuite été récupérées puis grattées à l'aide d'une lame de cutter. Le biofilm récupéré a été directement introduit dans un aquarium contenant de l'eau et des nutriments (milieu Dauta, Dauta 1982), ainsi qu'une pompe immergée permettant son homogénéisation et son oxygénation ([Figure 10](#)). De plus, des néons ont été installés dans le but de diffuser une lumière continue. L'objectif de cette étape était de faire coloniser le biofilm sur un autre type de substrat artificiel, celui-ci correspondant aux coupons spécialement conçus pour être intégrés sur le cylindre interne du bioréacteur.



Figure 9 : Cagette contenant les lames de verre pour la colonisation du biofilm



Figure 10 : Aquarium pour la colonisation des coupons

Lorsque ces coupons ont été considérés comme suffisamment colonisés, ceux-ci ont été utilisés afin de réaliser la manipulation permettant de répondre à la problématique de ce stage.

Mais avant cela, la méthode d'analyse des pesticides (diuron, DCPU et DCPMU) développée par un ancien stagiaire de Master 2 : Harry Byers (Byers 2012), a dû être validée en interne sur l'appareil d'analyse utilisé : l'UPLC-ESI-ToF.

2) VALIDATION DE LA METHODE D'ANALYSE DES PESTICIDES DANS LE BIOFILM

Une méthode analytique doit être capable de quantifier le plus exactement possible chacune des quantités inconnues qu'un laboratoire aura à déterminer.

L'objectif majeur de la validation de méthode analytique est de donner aux laboratoires, les garanties que chaque mesure qui sera réalisée, une fois la procédure validée, sera suffisamment proche de la « vraie valeur » inconnue de l'échantillon ou du moins comprise dans une limite d'acceptabilité. Ainsi, cette validation consiste à évaluer les performances de la méthode analytique, en étudiant des caractéristiques telles que la linéarité, les limites de détection et de quantification, la spécificité, les rendements et d'autres critères tels que la répétabilité ou la reproductibilité interne.

Dans le cadre de ce stage, les études du modèle de régression (linéarité ou quadratique) utilisé pour la quantification et de la spécificité (effets matriciels) ont été réalisées sur la molécule de diuron et ses métabolites (DCPU – DCPMU). Pour ce faire, le référentiel utilisé correspond à la **norme française NF T90-210**¹⁰. Les résultats obtenus sont présentés dans la suite de ce rapport (IV.1).

a) La linéarité

La linéarité d'une procédure d'analyse vise à vérifier la capacité de cette méthode à fournir une réponse directement proportionnelle à la quantité d'analytes présente dans l'échantillon analysé, dans un intervalle choisi. Pour mettre en évidence un modèle non-linéaire, il est important de préparer au minimum 5 solutions étalons de concentrations connues, et d'effectuer au moins 5 répétitions pour chacun de ces étalons.

Afin de valider la linéarité de cette méthode d'analyse du diuron, du DCPU et du DCPMU, **huit niveaux de concentrations** ont été retenus : **0,1 – 0,2 – 0,5 – 2 – 5 – 10 – 25 – 50 µg.L⁻¹**, avec **5 réplicats** indépendants par niveau de concentration (Protocole – [Annexe III](#)). Ces réplicats indépendants vont permettre de refléter la variabilité réelle de l'étalonnage et non pas celle de l'appareil de mesure.

Un test d'adéquation est alors effectué dans le domaine linéaire défini. Celui-ci permet de calculer les variables de Fisher pour deux sources de variation, soit la « régression » et « l'erreur de modèle ». Ces dernières sont ensuite comparées aux valeurs critiques pour un risque de 1%. Ainsi, l'interprétation du test est menée en deux étapes pour vérifier la **validité du modèle de régression** et pour **valider le domaine d'étalonnage**. S'il y a une erreur de domaine, les résidus sont alors analysés pour valider un modèle quadratique, avec un Ecart Maximal Toléré (EMT) de 40 % pour les deux premiers points de gamme, puis de 20 % pour les suivants.

b) La spécificité

La spécificité d'une méthode analytique est sa capacité de garantir que le signal mesuré provient exclusivement de l'analyte recherché dans sa matrice. Cette caractéristique permet donc de mettre en évidence les effets de matrices.

¹⁰ Norme NF T 90-210, Mai 2009 : Qualité de l'eau – Protocole d'évaluation initiale des performances d'une méthode dans un laboratoire.

Cette propriété est déterminée après optimisation de la méthode d'extraction (Byers 2012), sur au moins 10 échantillons différents (Niveaux de dopage = 4 (n=2), 10 (n=3), 25 (n=3) et 50 $\mu\text{g.L}^{-1}$ (n=2)) et représentatifs du domaine de linéarité défini (0,1 et 50 $\mu\text{g.L}^{-1}$). Pour cela, il s'agit de retrouver de façon significative les grandeurs ajoutées sur chaque échantillon après réalisation d'ajouts dosés, de manière à obtenir une « droite de recouvrement ».

Le principe de la mesure de la spécificité consiste à étudier la droite de régression ($y = a \cdot x + b$) et vérifier que la pente a est équivalente à 1, et que l'ordonnée à l'origine b est équivalente à 0. De plus, une estimation des écart-types sur a et b (S_a et S_b) est réalisée. Il est possible de conclure qu'il n'y a pas d'interférences et que la spécificité est acceptable si la droite de recouvrement ($y = a \cdot x + b$) est équivalente à $y=x$.

Pour cela deux tests sont réalisés :

- Test de l'hypothèse que la pente a de la droite est équivalente à 1 ($a \pm tS_a$ comprend la valeur de 1),
- Test de l'hypothèse que l'ordonnée à l'origine est équivalente à 0 ($b \pm tS_b$ comprend la valeur de 0).

Ces deux hypothèses sont testées à l'aide d'un test de Student associé à un risque d'erreur de 1%. Si ces deux hypothèses sont vérifiées pour un niveau de confiance de 99%, alors la spécificité est considérée comme acceptable.

Le protocole mis en place pour valider ce critère est résumé en [Annexe IV](#).

3) PRE-MANIPULATION : DETERMINATION DU TEMPS D'HOMOGENEISATION ET ETUDE DE LA STABILITE DANS L'EAU DU BIOREACTEUR

Avant la mise en place de l'expérience permettant de répondre à la problématique posée, une pré-manipulation a été effectuée. Celle-ci avait pour objectifs de :

- Se familiariser avec l'utilisation du bioréacteur et des autres équipements nécessaires au bon déroulement de la manipulation,
- De déterminer le temps d'homogénéisation du système,
- D'évaluer la stabilité de la concentration en diuron dans le milieu.

Ainsi, au terme de cette étude, les conditions optimales d'utilisation du bioréacteur ont pu être déterminées (vitesse de rotation, débit des pompes, dopage...).

a) Mise en place du système

Cette pré-manipulation a consisté en la mise en place de toutes les composantes abiotiques (c'est-à-dire sans biofilm) permettant de mimer la contamination d'un milieu lotique en continu pendant 7 jours, à une concentration nominale en diuron de 5 $\mu\text{g.L}^{-1}$.

Pour ce faire, il était nécessaire dans un premier temps, de préparer différentes solutions, soit :

- Une solution contenant les nutriments présents dans un milieu lotique, nécessaire à la vie du biofilm,
- Une solution de diuron permettant la contamination de ce milieu.

Les protocoles de préparation de ces deux solutions sont présentés en [Annexe V](#).

En ce qui concerne le montage mis en place pour répondre à la problématique posée, celui-ci est présenté en *Figure 11* :

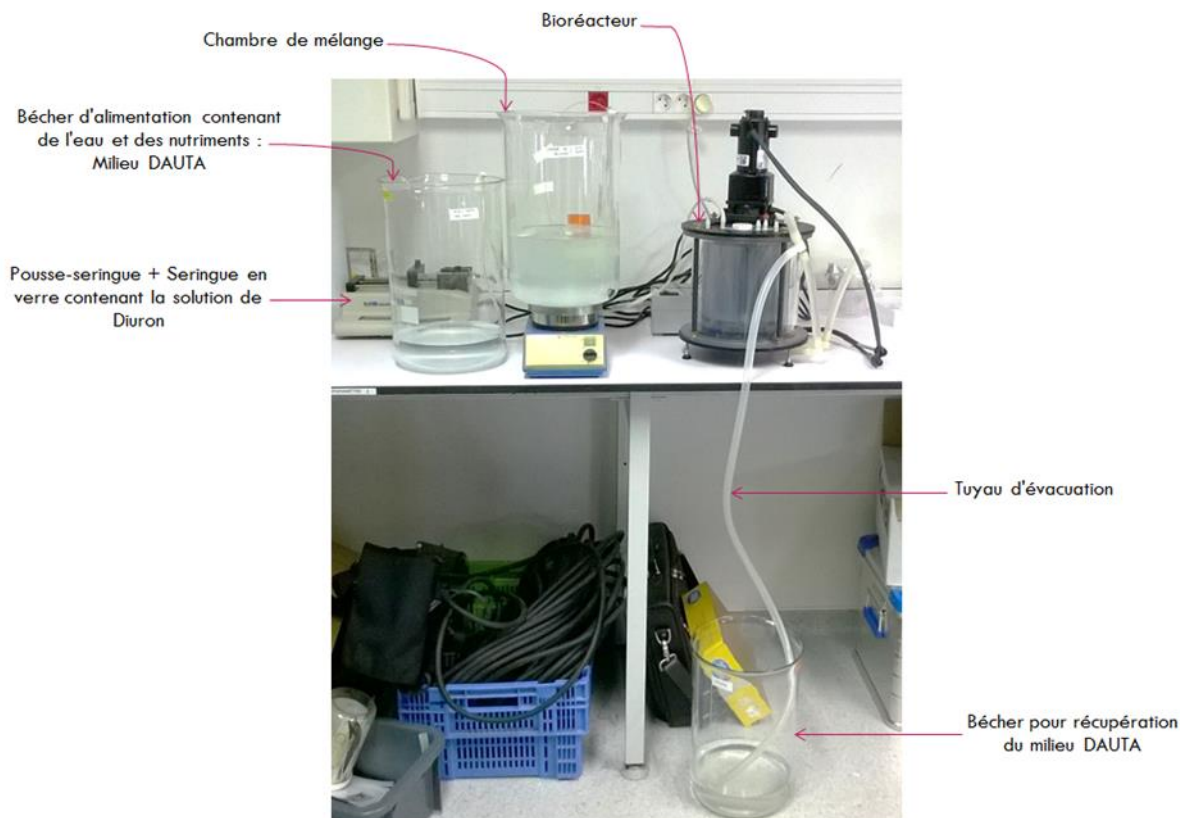


Figure 11 : Montage

Celui-ci se compose de plusieurs parties, avec notamment :

- Un bécher contenant un mélange d'eau et de nutriments (milieu Dauta) non contaminé,
- Un bécher servant de chambre de mélange, contenant le milieu Dauta dopé à $5 \mu\text{g.L}^{-1}$ en diuron,
- Un pousse-seringue réglé à un débit $1 \mu\text{L.min}^{-1}$ permettant de fournir un apport en diuron continu dans la chambre de mélange, et de maintenir la concentration en diuron à $5 \mu\text{g.L}^{-1}$,
- Une pompe péristaltique multicanaux, permettant d'un côté l'apport du milieu Dauta non contaminé dans la chambre de mélange, et simultanément l'apport du milieu Dauta contaminé (chambre de mélange) dans l'espace de circulation du bioréacteur. Cette pompe est réglée de manière à avoir un taux de renouvellement journalier de 100 % du volume du bioréacteur (débit = 1 mL.min^{-1}),
- Un bécher permettant la récupération du milieu Dauta contaminé à la sortie du bioréacteur.

Afin de maintenir une concentration en diuron constante dès le lancement du système, un premier dopage du volume contenu dans l'espace de circulation, et du volume présent dans la chambre de mélange a été réalisé avec la même solution que celle utilisée pour le dopage en continu.

Les paramètres propres à chacune des composantes de ce système, ont été regroupés dans le *Tableau 6* situé en [Annexe VI](#).

b) Traitement et analyse des échantillons d'eau

Des prélèvements de 5 mL du milieu Dauta contenu dans la chambre de mélange, et dans le bioréacteur en amont et en aval, ont été effectués tout au long de l'expérience, de manière à évaluer

le temps nécessaire à l'homogénéisation, puis à la stabilité du système. Ces échantillons ont été préparés suivant le protocole détaillé en [Annexe VI](#), puis analysés par UPLC-ESI-ToF selon une méthode validée en interne par l'application de la norme AFNOR NF T 90-210.

c) Méthode instrumentale : UPLC-ESI-ToF

L'UPLC « Ultra Performance Liquid Chromatography » est une technique de chromatographie liquide qui permet lors d'analyses multi-résidus, la séparation, l'identification et la quantification de nombreux composés.

Cette technique analytique fonctionne sur le même principe que l'HPLC « High Performance Liquid Chromatography » : les composés à analyser sont mis en solution dans un solvant, puis injectés et introduits dans une phase mobile liquide. Cette phase est ensuite poussée par un système de pompe à haute pression qui lui permet de parcourir tout le système chromatographique et ainsi de traverser la colonne (phase stationnaire). Les composés du mélange vont y être séparés suivant leurs affinités entre les deux phases et vont être retenus de manière sélective par la phase stationnaire. Les molécules, une fois séparées sont ensuite dirigées vers un détecteur.

La différence entre ces deux techniques de chromatographie liquide repose sur le diamètre des particules qui constituent la phase stationnaire. En effet en UPLC, la phase stationnaire est composée de particules d'un diamètre inférieur ou égal à 2 µm, contre 3 à 5 µm en HPLC. Cette diminution de la taille de particules permet d'utiliser des gammes de débit plus grandes tout en conservant une bonne efficacité. Il est alors possible d'augmenter les vitesses d'analyse sans altérer les performances chromatographique.

Dans le cadre de cette étude, les performances de l'UPLC sont combinées à une détection avec **un spectromètre de masse à temps de vol (ToF : « Time of Flight »)**. L'UPLC permet la séparation des molécules par le phénomène de rétention cité précédemment. Les molécules se présentent donc en sortie de colonne à des temps différents. Celles-ci sont dans un premier temps vaporisées et ionisées en utilisant la technique de **l'électrospray (ESI : « Electrospray Ionisation »)**. Les ions obtenus sont transférés via les séries de lentilles nommées « **Stepwave ion optics** ». Le but de cet élément est d'augmenter de façon significative le flux d'ions de manière à les transporter vers l'analyseur tout en éliminant les neutres et les interférents.

Par la suite, le flux d'ions passe dans l'analyseur de type ToF qui va permettre de mesurer les masses exactes des éléments présents dans le mélange injecté. Son principe réside sur le fait que les ions (en sortie du Stepwave) sont accélérés par une différence de potentiel (U) de valeur connue. Il résulte de cette accélération que les ions de même charge électrique acquièrent la même énergie cinétique, tandis que la vitesse de ces ions va dépendre du rapport masse/charge (m/z).

$$t = \frac{d}{\sqrt{2U}} \sqrt{\frac{m}{q}} \quad \text{Equation 6}$$

- Avec :
- t : temps de vol (s)
 - d : distance parcourue (m)
 - U : différence de potentiel (V)
 - m : masse de la particule (Da)
 - q : charge électrique de la particule (C)

Ainsi, le temps mis par une particule chargée pour atteindre un détecteur situé à une distance connue est mesuré. De manière générale, ce sont les particules les plus lourdes (m/z grand) qui acquièrent les vitesses les plus faibles. Le modèle d'UPLC-ESI-ToF utilisé est « Acquity UPLC couplé au spectromètre Wevo G2-S-ToF » de Waters (Figure 28 – Annexe VII). De plus, les paramètres et conditions analytiques sont présentés en Annexe XIV.

4) ETUDE DE LA CINÉTIQUE D'ACCUMULATION DU DIURON DANS LE BIOFILM

a) Déroulement de la manipulation

Dans le but de déterminer les constantes cinétiques et d'équilibre du diuron et de ses métabolites dans le biofilm, plusieurs étapes ont été réalisées avant l'exposition des coupons de biofilm.

➤ Première étape : Etude de la résistance du biofilm à la contrainte de rotation

L'objectif de cette première étape était de tester la résistance du biofilm face à la force de rotation appliquée dans le bioréacteur. En effet, il était important de vérifier que celui-ci ne se décrochait pas des coupons sous cette contrainte (Headley 1998).

Pour ce faire, **3 coupons** ont été introduits dans le bioréacteur et ont été soumis pendant 5 jours à une vitesse de rotation de **15 RPM** (Rotation Par Minute). De manière à évaluer uniquement l'impact de cette vitesse de rotation, les coupons de biofilm ont été exposés dans le système, mais sans dopage de manière à ce que les effets des molécules étudiées (diuron/DCPU/DCPMU) n'interagissent pas sur les observations.

Pour la suite de l'expérience, ces 3 coupons ont été utilisés comme **coupons de référence** (blancs), permettant de vérifier l'état chimique et biologique du biofilm avant exposition au diuron et à ses métabolites.

➤ Deuxième étape : Exposition du biofilm au diuron et ses métabolites (DCPU, DCPMU)

Au cours de la prémanipulation, il a été mis en évidence que le temps d'homogénéisation et de stabilisation du système s'élevait à **24 h** (cf. partie IV-1). Ainsi avant l'exposition des coupons de biofilm (Figure 31- Annexe VII), le système a été lancé pour stabilisation, dans les mêmes conditions que celles citées dans la partie III.3. La Figure 12 ci-dessous résume le montage mis en place :

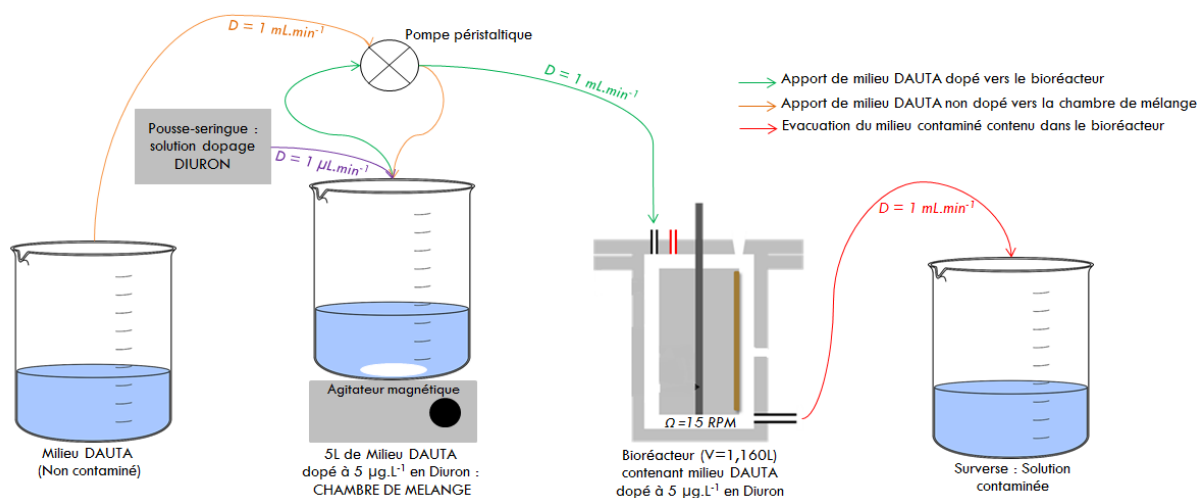


Figure 12 : Schéma du système et conditions expérimentales appliquées

Une fois le temps de stabilisation respecté, 20 coupons de biofilm ont été récupérés dans l'aquarium (*Figure 10*), puis ont été introduits dans les encoches situées sur le cylindre interne du bioréacteur.

Headley et al. (1998) rapportent que l'équilibre entre les composés adsorbés et désorbés dans le biofilm est atteint seulement au bout de 6 h. Ainsi, afin d'observer de manière satisfaisante la phase d'accumulation, il était essentiel d'effectuer plusieurs mesures le premier jour, puis d'espacer les prélèvements par la suite (durée maximale d'exposition d'une semaine) pour confirmer l'atteinte de l'équilibre.

Afin d'organiser rigoureusement l'échantillonnage des coupons, et du milieu Dauta présent dans l'espace de circulation du bioréacteur, un plan d'échantillonnage a été mis en place. Ainsi, à chaque prélèvement un triplicat de coupons a été récupéré. Seuls les prélèvements à 2 et 4 h comportaient 4 coupons.

b) Mesure de l'activité photosynthétique et de la chlorophylle a

De manière à évaluer l'impact du diuron et de ses métabolites sur le biofilm d'un point de vue biologique, des mesures de l'activité photosynthétique ont été réalisées sur chaque coupon exposé.

Dans cette étude, l'activité photosynthétique du biofilm a été mesurée à l'aide d'une technique de mesure de la fluorescence chlorophyllienne non destructive (Schreiber et al. 1986) avant le raclage des coupons de biofilm pour l'étape d'analyse de la bioaccumulation. Les mesures de fluorescence ont été réalisées à l'aide d'un fluorimètre en lumière modulée PhytoPAM (Heinz Walz GmbH, Allemagne) sur les coupons (plusieurs point de mesure par coupon), afin de quantifier la quantité de chlorophylle a présente, ainsi que l'activité photosynthétique efficace. Ces derniers résultats sont exprimés en pourcentage d'inhibition de la photosynthèse (comparée aux biofilms non exposés au diuron et ses métabolites).

c) Traitement des échantillons d'eau

De la même manière que pour la prémanipulation, des prélèvements de 5 mL du milieu Dauta contenu dans le bioréacteur en amont et en aval ont été effectués tout au long de l'expérience. Le but étant de mesurer la concentration en diuron, DCPU et DCPMU présente dans l'espace de circulation.

Ces échantillons ont été préparés comme cités en [Annexe VI](#), puis analysés par UPLC-ESI-ToF selon une méthode validée en interne par l'application de la norme AFNOR NF T 90-210.

d) Traitement des échantillons de biofilm

A chaque temps d'échantillonnage du biofilm, les coupons sont prélevés, grattés à l'aide d'une lame de cutter et dilués dans un volume standard d'EUP. Par la suite, plusieurs étapes de préparation d'échantillon sont suivies. Ces étapes ont été développées et validées lors d'un stage de Master 2, par Harry Byers (Byers 2012). Le mode opératoire a donc été repris, suivis et adapté.

➤ La filtration sur Büchner

Chaque réplicat est soigneusement homogénéisé, puis filtré à l'aide des filtres Whatman GF/F 4,7 cm (préalablement tarés) et d'un dispositif de filtration de type Büchner. Une fois filtrés, les échantillons de biofilm sont stockés au congélateur (-20°C) pendant minimum 24h jusqu'à l'étape suivante : la lyophilisation.

➤ La lyophilisation

La lyophilisation est une étape cruciale dans la préparation des échantillons de biofilm. En effet, cette étape va permettre de déterminer le poids sec (soit la biomasse) présente sur chaque coupon, et d'exprimer ensuite la teneur en diuron par g de biofilm sec.

Cette opération est un procédé très doux pour déshydrater des produits chimiques et biologiques sans les dénaturer. Celle-ci consiste en la déshydratation d'un produit préalablement surgelé, par sublimation à très basse pression. Son principe se résume en deux phases majeures :

- La *congélation* des échantillons à -20°C , avant passage dans le lyophilisateur, afin de transformer l'eau contenue en glace,
- La *dessiccation sous vide*, qui consiste à chauffer les échantillons congelés de manière à ce que l'eau (sous forme de glace interstitielle) se sublime (passage direct de l'état solide à l'état gazeux). La vapeur d'eau obtenue va ensuite être piégée par congélation à l'aide d'un condenseur.

Cette technique permet d'obtenir des échantillons de biofilm qui ne contiennent plus que 1 à 5% d'eau et dont l'aspect et les propriétés sont entièrement conservés.

Le lyophilisateur utilisé est un modèle « ALPHA 1-2 LDPlus CHRIST » (Figure 29 - Annexe VII).

Après cette étape de lyophilisation, les échantillons de biofilms peuvent ensuite être extraits par la technique de l'extraction accélérée par solvant (ASE).

➤ L'extraction accélérée par solvant (ASE)

L'ASE est une technique d'extraction rapide utilisant une quantité de solvant réduite en comparaison avec d'autres techniques (Soxhlet...). Celle-ci repose sur la mise en contact du solide à extraire (ici biofilm) avec un ou plusieurs solvants dans des conditions de températures et de pression élevées. Ces deux conditions associées vont permettre une meilleure solubilisation et diffusion des analytes (ici diuron, DCPU et DCPMU) sans vaporisation des solvants.

Son principe est le suivant :

Le solvant est mis sous pression à l'aide d'une pompe, puis va ensuite percoler dans la cellule d'extraction en inox (contenant le biofilm lyophilisé et du sable de fontainebleau) placée dans un four. L'ajout de solvant se fait en mode statique, c'est-à-dire, qu'il y a une même quantité de solvant pendant toute la durée du cycle d'extraction. En fin de cycle, la cellule est purgée par balayage d'un gaz inerte, le diazote, et le solvant contenant l'extrait est récupéré dans un flacon.

L'ASE utilisé est un modèle « ASE 200 DIONEX » (Figure 30 - Annexe VII).

➤ Extraction en phase solide (SPE)

Après cette étape, les extraits obtenus sont purifiés grâce à la technique de l'extraction en phase solide (SPE).

Cette étape va permettre la récupération des composés d'intérêt (diuron, DCPU et DCPMU) et l'élimination des interférents, par absorption en phase solide en fonction de leurs propriétés physico-chimique. Des cartouches Chromabond® HR-X (3 mL, 60 mg, copolymère polystyrène-divinylbenzène, Macherey-Nagel) ont été utilisées. Cette technique d'extraction se décompose en quatre étapes successives :

- Le conditionnement (ou solvatation) qui consiste à faire percoler un volume donné de solvant ou de plusieurs solvants afin d'activer le support en mouillant la phase.
- Le dépôt de l'échantillon, qui nécessite de bien s'assurer que la compatibilité de l'échantillon avec la phase utilisée pour l'adsorption des composés à doser ait lieu,
- Le lavage qui se fait par le biais d'un solvant judicieusement choisi dans la mesure où il doit permettre l'élimination des composés indésirables tout en maintenant les composés à doser sur la phase.
- L'élution des composés qui permet la récupération des composés d'intérêt avec le solvant approprié.

Enfin les échantillons sont ensuite mis en vials et analysés par UPLC-ESI-ToF.

Le logigramme joint en [Annexe VIII - Figure 32](#) regroupe toutes les étapes de préparation des échantillons de biofilm.

IV. RÉSULTATS ET DISCUSSION

1) VALIDATION DE LA METHODE D'ANALYSE DES PESTICIDES DANS LE BIOFILM

Le protocole d'analyse des pesticides dans le biofilm par UPLC-ESI-ToF a fait l'objet de l'étude de deux critères de validation, soient : l'étude de la linéarité et de la spécificité selon les préconisations de la norme NF T90-210.

Dans le *Tableau 2* ci-dessous, sont synthétisés les résultats obtenus :

Tableau 2 : Récapitulatif des résultats obtenus pour la validation de méthode

	Régression linéaire								Spécificité		
	Source des variations	Gamme de linéarité ($\mu\text{g.L}^{-1}$)	Degré de liberté	Variance estimée	F	Valeur F tabulée	Modèle de régression	Domaine	pen- te (s.a)	origine (s.b)	Validation
Diuron	Régression	0,1 - 50	1	192,938	6611,560	7,823	✓	✓	1,201 (0,067)	3,393 (1,786)	✓
	Erreur de modèle		6	0,050	1,702	3,667					
	Erreur expérimentale		24	0,029	-	-					
	Totale		30	-	-	-					
DCPU	Régression	0,5 - 50	1	7,238	2187,653	7,823	✓	✓	1,096 (0,079)	3,965 (2,130)	✓
	Erreur de modèle		6	0,010	3,042	3,667					
	Erreur expérimentale		24	0,003	-	-					
	Totale		30	-	-	-					
DCPMU	Régression	0,5 - 50	1	27,170	3975,355	7,823	✓	✓	1,265 (0,171)	8,900 (4,578)	✓
	Erreur de modèle		6	0,010	1,428	3,667					
	Erreur expérimentale		24	0,007	-	-					
	Totale		30	-	-	-					

Les deux critères ont donc été validés pour les trois composés étudiés. Cette étape est indispensable à la réalisation de l'étude puisqu'elle prouve la validité des données enregistrées par le biais de cette méthode d'analyse.

2) PRE-MANIPULATION : DETERMINATION DU TEMPS D'HOMOGENEISATION ET ETUDE DE STABILITE DANS L'EAU DU BIOREACTEUR

Au terme de cette prémanipulation, il a été mis en évidence que le temps nécessaire à l'homogénéisation et à la stabilité du système s'élève à **24 h environ** (Figure 13).

Lorsque l'équilibre s'installe, la concentration atteinte est légèrement inférieure à la valeur nominale de $5 \mu\text{g.L}^{-1}$. En effet, comme le montre la Figure 13, dans le cas du diuron, la concentration à l'équilibre avoisine les $3 \mu\text{g.L}^{-1}$.

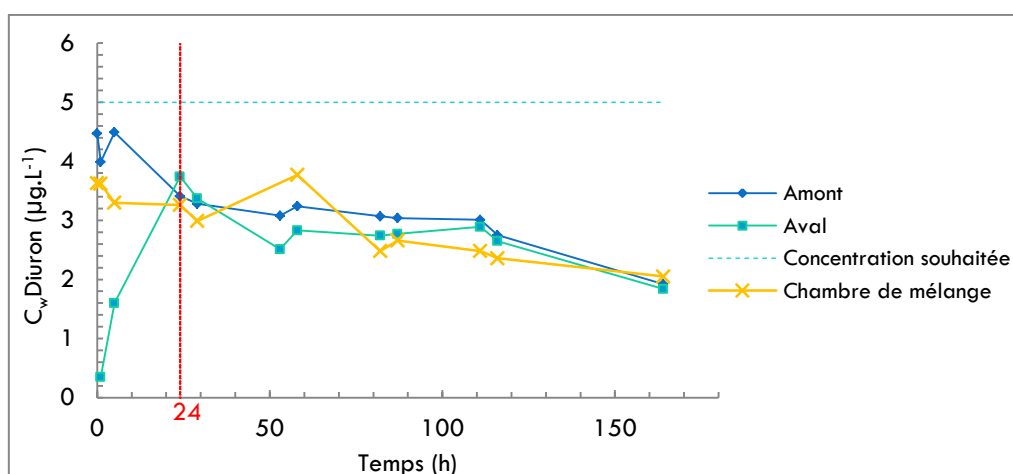


Figure 13 : Graphique représentant l'évolution de la concentration en diuron dans le bioréacteur et la chambre de mélange en fonction du temps

Dans le but de vérifier ces conclusions, des études statistiques (Annexe IX) ont été réalisées sur les données acquises pour la molécule de diuron. La première consistait à mettre en évidence la présence de valeurs aberrantes. Pour cela, un test de Grubbs a été réalisé. Au terme de ce test, aucune valeur n'a été jugée comme extrême. De ce fait, les études statistiques ont été réalisées sur l'intégralité des données acquises.

Ensuite, les coefficients de variation ont été calculés pour les séries de valeurs enregistrées à chaque point de prélèvement. Ceux-ci sont tous inférieurs à 40 % ce qui témoigne d'une faible dispersion des valeurs autour de chaque moyenne calculée. Des Box Plot ont également été tracés afin de représenter schématiquement la distribution des concentrations mesurées pour chaque point de prélèvement.

Sur la Figure 14 ci-dessous sont regroupés les BoxPlot obtenus pour chaque point de prélèvement. D'après ces trois tracés il est possible de conclure que :

- Pour le bioréacteur en amont et en aval, la dispersion des valeurs que ce soit entre elles (Intervalle interquartiles < 1) ou autour de la moyenne n'est pas trop importante. Ainsi, la stabilité est considérée comme satisfaisante dans le bioréacteur,
- Pour la chambre de mélange, la dispersion dans les deux cas est faible, ce qui permet de considérer que la stabilité est correcte.

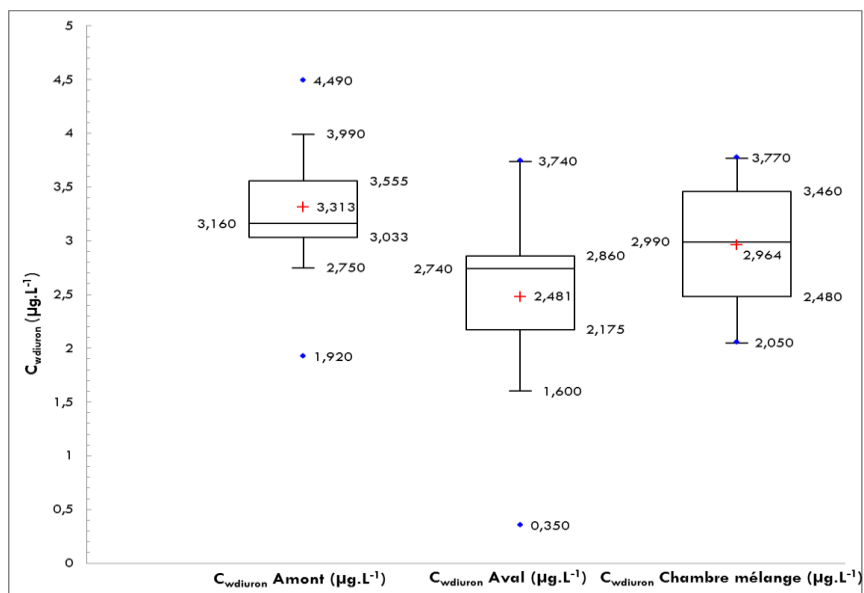


Figure 14 : Box Plot pour chaque point de prélèvement

Enfin, les limites de confiance de la moyenne pour chaque série de valeurs ont été calculées (Annexe X).

Le montage mis en place a permis de déterminer un temps de mise à l'équilibre d'au moins **24h** et d'obtenir une concentration stable à environ **3 $\mu\text{g.L}^{-1}$** . Les concentrations moyennes suivantes sont exprimées avec les limites de confiance associées à la moyenne : $C_{w\text{Amont}} = 3,31 \pm 0,46 \mu\text{g.L}^{-1}$; $C_{w\text{Aval}} = 2,48 \pm 0,62 \mu\text{g.L}^{-1}$; $C_{w\text{Chambre}} = 2,96 \pm 0,40 \mu\text{g.L}^{-1}$. Ces concentrations restent voisines des 5 $\mu\text{g.L}^{-1}$ souhaités, ce qui est satisfaisant pour la suite des expérimentations. En effet celles-ci correspondent toujours des concentrations réalistes (d'un point de vue environnemental) et facilement dosables (car de l'ordre du $\mu\text{g.L}^{-1}$).

Cette différence par rapport à la valeur nominale attendue peut éventuellement s'expliquer par des pertes de matière par absorption sur les parois du système (bêcher en verre, tuyaux...), par une incertitude sur les solutions mères utilisées pour préparer la solution de dopage, ou encore par les incertitudes liées à la préparation des échantillons et à l'analyse en UPLC-ESI-ToF.

3) ETUDES DES CINETIQUES D'ACCUMULATION DU DIURON ET DE SES METABOLITES DANS LE BIOFILM

Au cours de cette manipulation, deux types de concentrations en contaminants ont été mesurées, soit : la concentration du composé analysé dans l'espace de circulation du bioréacteur (milieu Dauta), et dans le biofilm (cf. III.3 et III.4). Afin d'obtenir les résultats les plus cohérents possibles, il a été nécessaire de retraiter les données acquises par l'UPLC-ESI-ToF (par étalonnage interne), d'un point de vue analytique mais aussi statistique.

a) Retraitement des données : Concentration dans le milieu Dauta

La première étape de ce retraitement de données, a consisté en l'étude des résultats obtenus pour les échantillons de milieu (Amont et Aval du bioréacteur) prélevés. Aux termes de ce retraitement, une diminution progressive des concentrations en diuron, DCPU et DCPMU au cours du temps a été mise en évidence, malgré l'apport en continu des contaminants dans l'espace de circulation.

Afin d'évaluer la stabilité de cette concentration, des BoxPlot ont été tracés pour la série de données enregistrées, de manière à schématiser la distribution de la variable C_w pour chaque composé

étudié. Sur la *Figure 33* jointe en [Annexe XI](#) ont été représentées les BoxPlot des concentrations mesurées dans le milieu en fonction du temps pour nos trois composés.

Globalement, il en découle que la distribution est symétrique pour chacun des composés étudiés, ce qui témoigne donc d'une faible dispersion des valeurs et donc d'une stabilité satisfaisante au cours du temps.

Pour le retraitement des données correspondant aux échantillons de biofilm, les concentrations moyennes pondérées (sur la durée d'exposition des coupons) de chaque contaminant ont été calculées. Ces dernières montrent que la diminution observée n'est pas significative, puisque celles-ci tendent à se maintenir aux alentours de $3 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$, comme pour la pré-manipulation.

b) Retraitement des données : Quantités accumulées dans le biofilm

La seconde étape de ce retraitement de données, a consisté en l'étude des concentrations mesurées dans le biofilm récupéré sur les coupons exposés au cours de la manipulation de 7 jours. Pour cela, les données enregistrées par l'UPLC-ESI-ToF (en $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$) ont été exprimées en $\text{ng}\cdot\text{g}^{-1}$ de biofilm. Par la suite, les rapports représentant la concentration du contaminant mesurée dans le biofilm et dans l'eau au cours du temps ont été calculés.

Lors de la réalisation de cette manipulation, des réplicats de coupons ont été récupérés à chaque temps (t), de manière à obtenir une meilleure estimation des constantes cinétiques (K_{BW} , k_u et k_e). Seulement, aux vues des quantités de biofilm récupérées sur les coupons ($1 \text{ mg} < m < 4,5 \text{ mg}$), les premiers réplicats préparés ont été réunis de manière à obtenir une quantité suffisante de biofilm pour observer l'accumulation des molécules étudiées et la quantifier. Avec cette première série d'échantillons, il a toutefois été observé qu'il était possible de quantifier les molécules étudiées avec seulement 1 mg de biofilm. Par conséquent, pour la seconde série d'échantillon, aucun rassemblement des échantillons n'a été réalisé, ce qui a permis de déterminer des écart-types pour des échantillons prélevés au même moment (et même durée d'exposition), et donc d'estimer la répétabilité.

La *Figure 15* ci-dessous, regroupe les données enregistrées pour chaque contaminant au cours des 7 jours de manipulation.

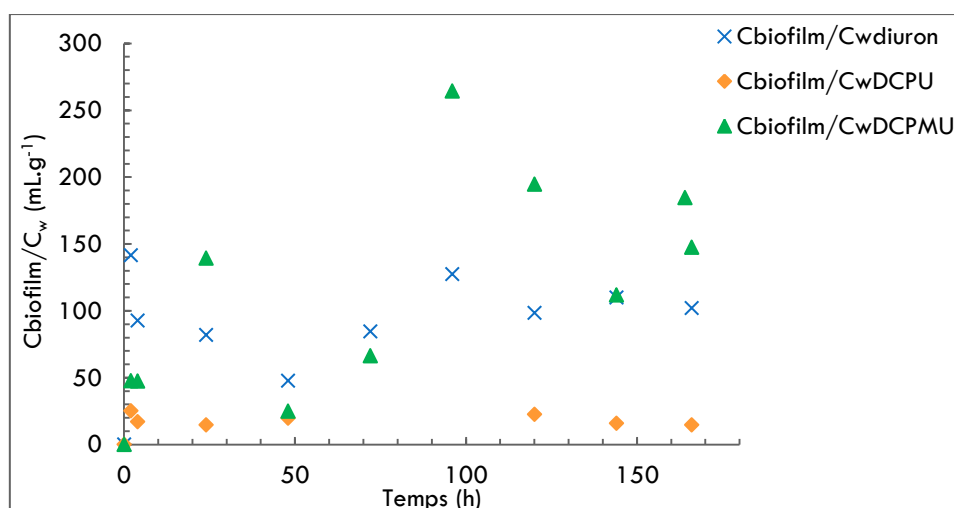


Figure 15 : Représentation graphique de la variation du rapport de concentration en diuron, DCPU et DCPMU dans le biofilm ($C_{\text{biofilm}}/C_{\text{eau}}$) et dans l'eau en fonction du temps (valeurs moyennes) - Manipulation sur 7 jours

Cette représentation graphique montre une variation des données en fonction du composé pour un même temps (t). Il en découle donc que les constantes cinétiques associées aux composés vont être différentes. De plus, il semblerait que l'équilibre soit atteint au bout de 2h seulement, malgré la

dispersion des valeurs observées pour un même contaminant. Ainsi, la constante K_{BW} peut être déterminée en faisant la moyenne des données acquises après 2 h.

Afin de confirmer cela et d'étudier plus en détails cette partie de la cinétique d'accumulation, des tests sur la valeur moyenne obtenue (K_{BW}) sont réalisés. Tout d'abord ces données ont ensuite été soumises à un **test de Grubbs** (Annexe IX) de manière à révéler la présence de valeurs extrêmes qui pourraient par la suite donner une constante K_{BW} erronée. Au terme de ce test, pour chacune des molécules étudiées, il a été détecté la présence de plusieurs valeurs aberrantes. Celles-ci ont donc été éliminées pour la suite du retraitement.

De plus, pour étudier la dispersion des données, des études statistiques (Annexe IX) ont été réalisées. Celles-ci avaient pour objectif de comparer les variances des réplicats entre elles (à un temps t) et les variances des valeurs moyennes pour chaque temps afin de vérifier que l'erreur analytique (répétabilité) n'est pas significativement différente de l'erreur associée à l'évolution de la concentration en diuron dans le biofilm au cours du temps (reproductibilité).

Les deux premières consistaient à montrer que les variances des réplicats étaient homogènes entre elles. Pour cela, un **test de Cochran** a été effectué uniquement sur les réplicats. Ce test avait pour objectif de détecter la présence de variances, associées à la répétabilité puisque les coupons ont été exposés sur la même durée, anormalement plus élevées ou plus faibles.

Au terme de ce test, la variance du réplicat à 164 h pour l'analyse du diuron a été détectée comme anormalement faible. Ceci s'explique du fait que le réplicat ne comprenait que 2 valeurs. Ainsi, bien que les données n'aient pas été considérées comme aberrantes au cours du test de Grubbs (qui ne testait que les moyennes), la variance, elle, a été détectée, du fait qu'elle soit très inférieure aux autres variances calculées. L'erreur associée à ce réplicat n'a donc pas été prise en compte. Un second test de Cochran a été réalisé afin de confirmer que les variances étaient bien homogènes pour le diuron. En ce qui concerne le DCPU et le DCPMU, aucune variance n'a été sujette à la même conclusion, après réalisation du premier test de Cochran. Les données de chaque réplicat ont donc été toutes conservées.

Un second test a été effectué : le **Test de Levene**. Ce dernier a permis de comparer les variances de nos réplicats entre elles. Finalement, le résultat de ce test mène à la même conclusion, soit, que les réplicats analysés ne sont pas significativement différents entre eux pour un même composé.

Pour clôturer cette étude de dispersion, un dernier test statistique a été réalisé, celui-ci ayant pour objectifs de contrôler que la dispersion totale (qui comprend une composante temporelle) n'a pas d'influence sur la variabilité des données obtenues. Pour ce faire, un **test de Fisher** a été mis en place, afin de comparer les deux types de variance soit : l'homogénéité des échantillons à un temps t , par rapport à, la reproductibilité dans le temps.

Ce test de Fisher, a permis de conclure qu'il n'y avait pas de différences significatives entre la variance du réplicat et la série de données que ce soit pour le diuron, le DCPU et le DCPMU (Tableau 3).

Tableau 3 : Récapitulatif des résultats obtenus pour le test de Fisher

	Moyenne (mL.g ⁻¹)	Variance totale	Variance réplicat (166h)	t _{student}	F _{calculé}	F _{Critique}	Conclusions
Diuron	97,4	669,0	1421,3	2,3	2,12	3,86	F _{calculé} < F _{Critique} : Pas de différence significative
DCPU	18,5	17,1	3,7	2,4	4,61	19,33	
DCPMU	109,0	7446,2	4621,5	2,2	1,61	8,79	

La représentation graphique ci-dessous (Figure 16) permet de visualiser l'ensemble des données enregistrées pour le diuron (moyenne pour les réplicats et barres d'erreurs associées au coefficient de variation %) ainsi que l'intervalle de confiance (autour des données) calculé d'après l'équation ci-dessous :

$$LC = \bar{x} \pm t * s \quad \text{Equation 7.}$$

- Avec :
- \bar{x} : la moyenne des données (mL.g^{-1}),
 - s : l'écart type calculé (mL.g^{-1}),
 - t : la valeur des tables de student pour un niveau de confiance de 95 %

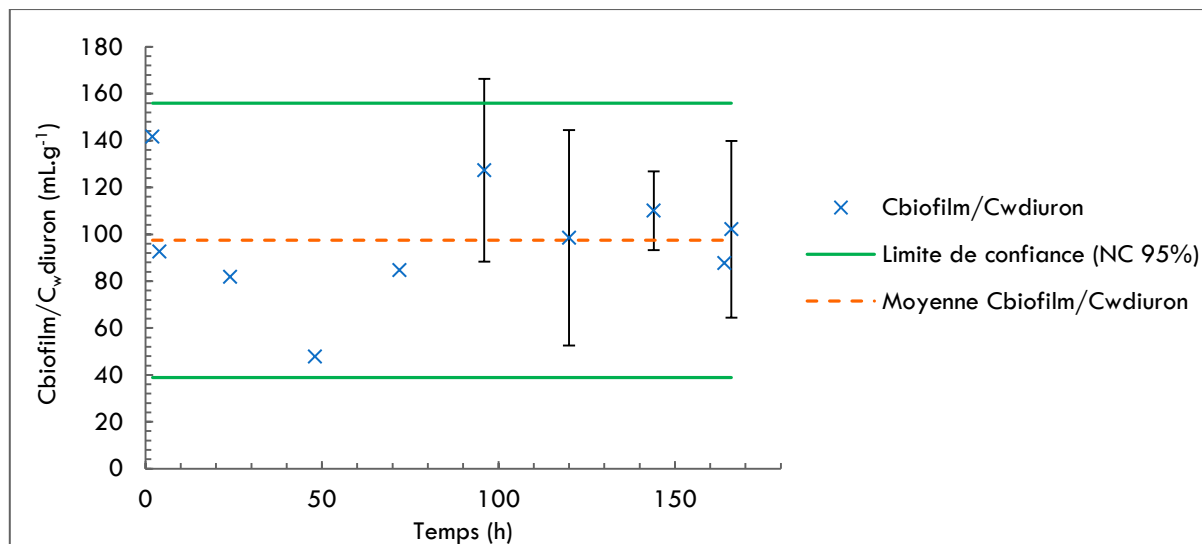


Figure 16 : Représentation graphique de la variation du rapport de concentration en diuron dans le biofilm et le milieu en fonction du temps - Moyennes pour les réplicats et barres d'erreurs associées (CV %) – Manipulation sur 7 jours

Cette représentation graphique montre que les barres d'erreurs associées à chaque réplicat sont sensiblement identiques entre elles, et par rapport à l'intervalle de confiance défini autour des données. Cette conclusion est aussi applicable pour le DCPU et le DCPMU (Annexe XI - Figure 34 et Figure 35). Ainsi, grâce à la réalisation de ces tests, il est possible de confirmer que l'erreur analytique (répétabilité pour un même temps) n'est pas significativement différente de l'erreur associée à l'évolution de la concentration en diuron dans le biofilm au cours du temps (reproductibilité). Enfin, l'application de toute cette démarche était indispensable pour la détermination des constantes cinétiques des trois composés, car il était important de montrer que l'équilibre était bien atteint.

Afin d'avoir davantage d'informations concernant la première partie de la cinétique, nous avons décidé qu'une seconde manipulation devait être réalisée dans des conditions identiques (cf. III.4) mais sur un pas de temps plus faible, soit, **2h**, avec des prélèvements toutes les 5 minutes.

Les données obtenues ont été retraitées de la même manière que précédemment et la Figure 17 ci-dessous regroupe les données acquises pour le diuron au cours des deux manipulations (7 jours et 2 h).

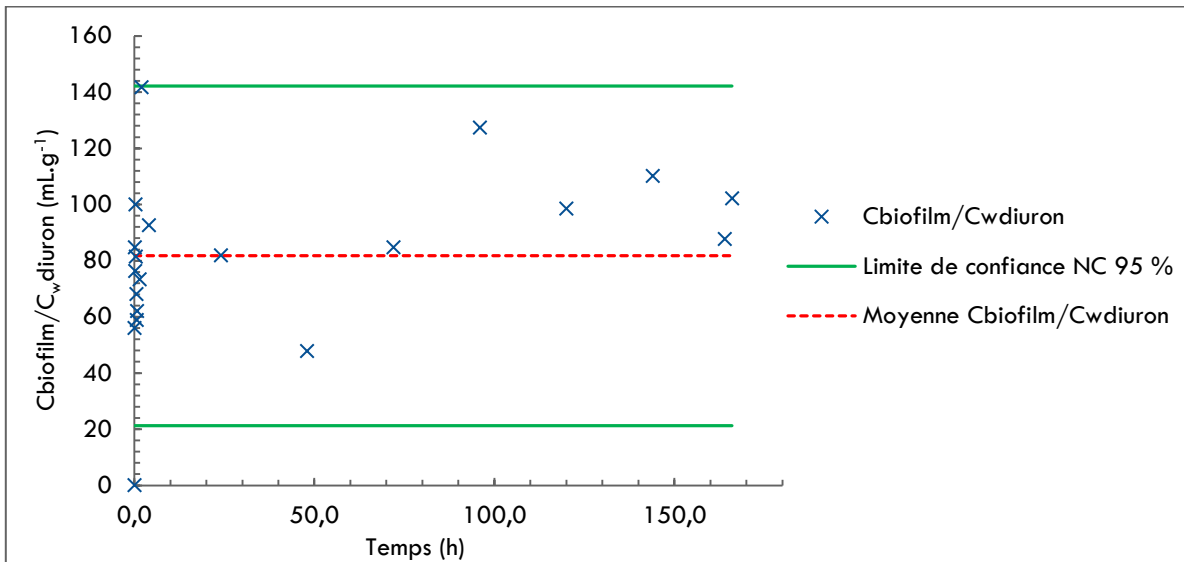


Figure 17 : Représentation graphique de la variation du rapport de concentration en diuron dans le biofilm et le milieu en fonction du temps – Deux manipulations regroupées

D'après cette représentation graphique, il est remarqué que le rapport de concentration augmente rapidement dès les 5 premières minutes. L'équilibre semble être d'ailleurs atteint juste après.

Afin de visualiser le modèle cinétique, une des fonctionnalités de Xlstat® a été utilisée, soit la « modélisation d'une régression non linéaire ». Celle-ci a permis la modélisation d'une cinétique d'ordre 1 (Equation 4 – II.4) via les données acquises et ainsi d'obtenir l'équation de ce modèle. La Figure 18 ci-dessous présente le tracé obtenu pour la molécule de diuron :

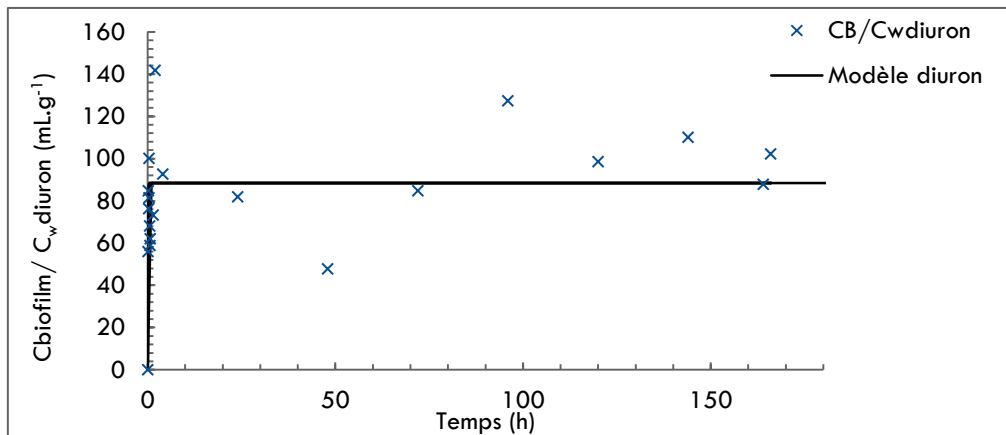


Figure 18 : Modélisation d'une cinétique d'ordre 1 avec les données acquises pour la molécule de diuron au cours des deux manipulations

La modélisation des cinétiques du DCPU et du DCPMU sont disponibles en Annexe XII – Figure 36 et Figure 37.

La Figure 19 regroupe les modélisations cinétiques des trois molécules étudiées :

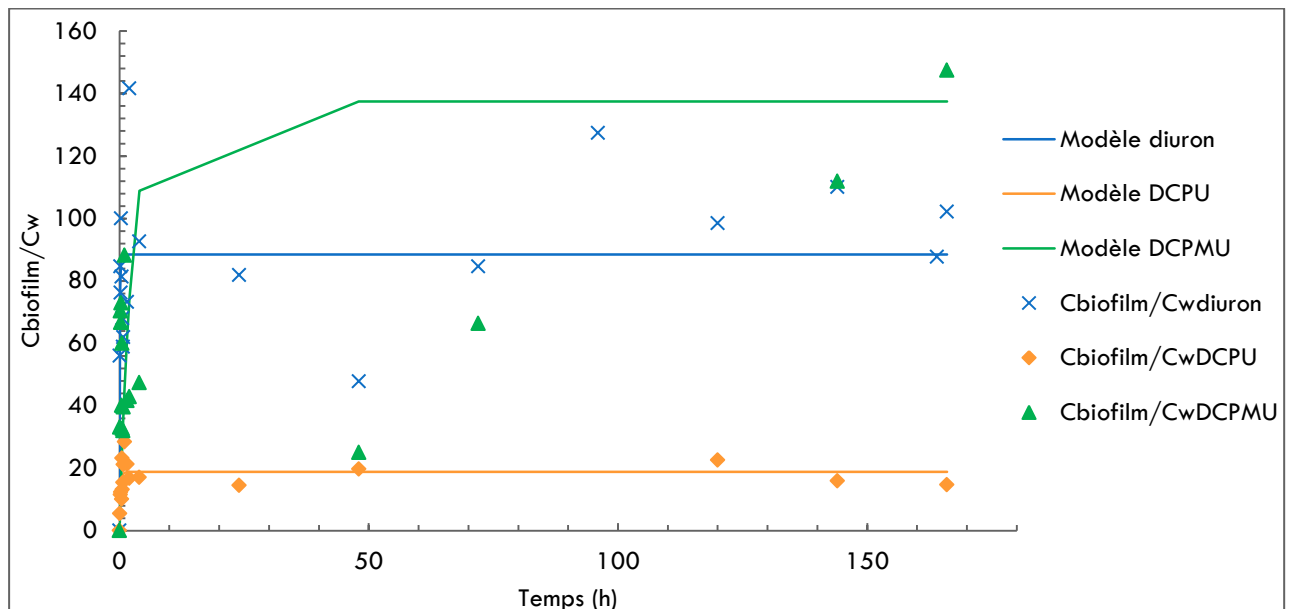


Figure 19 : Modélisations cinétiques des données acquises pour le Diuron, le DCPU et le DCPMU sur 7 jours d'exposition

Au vu de l'allure générale de ces trois représentations graphiques, il en découle que la cinétique mise en jeu semble bien être d'ordre 1. Aussi, il est possible de constater que le temps d'atteinte de l'équilibre et la constante K_{BW} associée sont différents d'un composé à l'autre. De plus, l'équilibre semble être atteint très rapidement dans les 3 cas.

Afin de mieux visualiser ce dernier point, l'échelle de temps de la Figure 19 a été réduite (Figure 20).

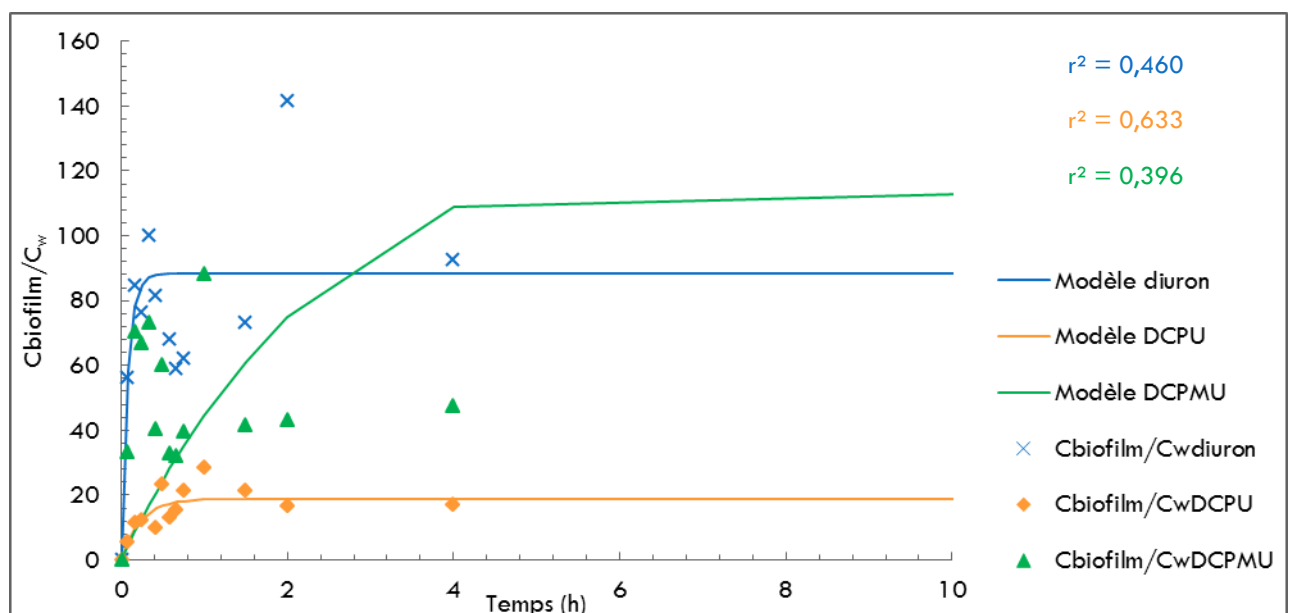


Figure 20 : Modélisations cinétiques des données acquises pour le diuron, le DCPU et le DCPMU sur 7 jour d'exposition - Zoom sur 10 h

Cette figure permet de confirmer l'atteinte d'un équilibre très rapide pour les 3 composés étudiés, avec dans l'ordre croissant : le diuron, le DCPU et le DCPMU. Les r^2 obtenus permettent d'avoir une idée de la qualité de l'ajustement au modèle cinétique d'ordre 1. Pour le diuron et le DCPU ce modèle semble envisageable. En revanche, pour le DCPMU, des précautions sont à prendre au vu du r^2 faible, mais surtout de la dispersion des valeurs autour du modèle prédit (Annexe XV- Figure 41). En effet par comparaison avec la Figure 40 (Annexe XV) obtenue pour le DCPU, il est remarqué que la

dispersion des valeurs autour de la régression du modèle est beaucoup plus faible que pour le DCPMU (meilleur alignement des points sur la droite pour le DCPU). De ce fait, il n'est pas réellement possible de confirmer que ce modèle est adapté à la molécule de DCPMU.

Afin de déterminer les constantes cinétiques de ces modèles, la fonctionnalité « régression non linéaire » du logiciel permet également l'obtention de l'équation modélisée.

- Diuron :

$$\frac{C_{biofilm}}{C_{w\text{diuron}}} = 88,4 \times (1 - e^{-13,0 \times t}) \quad r^2 = 0,460$$

- DCPU :

$$\frac{C_{biofilm}}{C_{w\text{DCPU}}} = 18,8 \times (1 - e^{-4,4 \times t}) \quad r^2 = 0,633$$

- DCPMU :

$$\frac{C_{biofilm}}{C_{w\text{DCPMU}}} = 137,5 \times (1 - e^{-0,4 \times t}) \quad r^2 = 0,396$$

Ces équations permettent de déterminer directement les constantes cinétiques K_{BW} et k_e propres à chaque composé (Equation 5 - partie II.4). Pour les constantes k_u , celles-ci sont déterminées par calcul via l'équation 2 (II-4). Dans le Tableau 4 suivant sont exprimées les constantes cinétiques et leurs écarts types associés (calculés par rapport au modèle).

Tableau 4 : Constantes cinétiques obtenues après modélisation d'une cinétique d'ordre 1 sur les données acquises pour les deux manipulations

	$K_{BW} \pm s(K_{BW})$ en mL.g^{-1} (CV %)	$k_e \pm s(k_e)$ en h^{-1} (CV %)	$k_u \pm s(k_u)$ en $\text{mL.g}^{-1}.\text{h}^{-1}$ (CV %)	$t_{1/2}^a$
Diuron	$88,4 \pm 5,7$ (6 %)	$13,0 \pm 7,7$ (60 %)	$1149,2 \pm 689,5$ (60 %)	3,2 min
DCPU	$18,8 \pm 1,3$ (7 %)	$4,4 \pm 1,6$ (36 %)	$82,7 \pm 30,6$ (37 %)	9,4 min
DCPMU	$137,5 \pm 21,0$ (15 %)	$0,4 \pm 0,2$ (50 %)	$55,0 \pm 28,6$ (52 %)	1,8 h

^a : temps de demi atteinte de l'équilibre ($t_{1/2} = \text{Ln}2/k_e$)

Les constantes K_{BW} obtenues par la modélisation d'une cinétique d'ordre 1 peuvent être comparées aux constantes déterminées au cours de la première partie de l'étude (Moyenne pour $t > 2\text{h}$) ou il a été prouvé que l'équilibre était bien atteint.

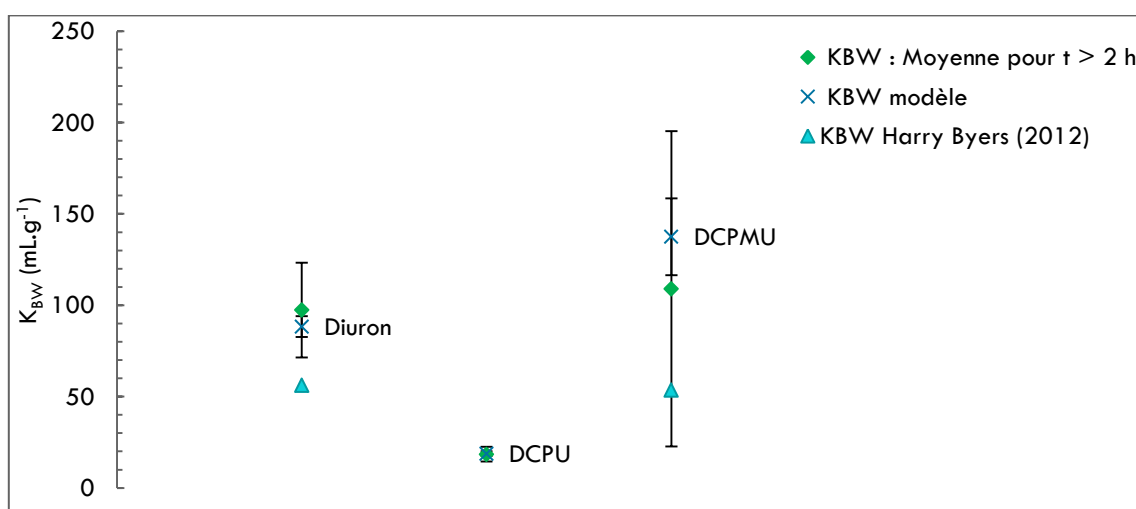


Figure 21 : Comparaison des K_{BW} obtenus par le calcul de la moyenne lorsque $t > 2\text{h}$, et par modélisation d'une cinétique d'ordre 1

Les constantes K_{BW} obtenus par ces deux méthodes sont relativement voisines ce qui montre que l'estimation des constantes par rapport au modèle est plutôt cohérente. De plus, comme mentionné précédemment, les constantes obtenues pour le DCPMU montrent une grande dispersion. Cela confirme donc que ces constantes sont à prendre avec précautions. Pour compléter cela, ces constantes ont été comparées avec les constantes obtenues lors de l'étude d'Harry Byers en 2012 (Byers 2012), et il est aussi remarquer que celles-ci sont relativement proches.

De plus, les données de ce tableau confirment l'atteinte rapide de l'équilibre (< 2 h). Cette remarque laisse envisager l'hypothèse que le phénomène observé ne correspond pas à l'absorption des contaminants dans les cellules du biofilm.

En effet, d'après Battin et al. (2003) avant l'absorption d'un soluté présent dans la colonne d'eau par le biofilm, il faut que celui-ci s'adsorbe à sa surface (transfert de masse externe) et ensuite qu'il traverse la matrice EPS pour aller dans les cellules (transfert de masse interne). En considérant le fait que le biofilm est constitué en grande majorité d'eau (97 % selon Sutherland 2001) située dans des canaux (pores), il semble donc que cette accumulation très rapide correspondent d'avantage à la diffusion des contaminants dans ces canaux (eau interstitielle) et à une éventuelle adsorption sur les parois du biofilm (Figure 3).

Ceci semble être confirmé, dans la mesure où les constantes K_{BW} des trois composés sont différentes. En effet, si seul le phénomène de diffusion dans l'eau contenue dans les pores était observé, alors les K_{BW} devraient être identiques, ce qui n'est pas le cas. De ce fait, il est possible de supposer qu'un autre phénomène est mis en jeu, soit l'adsorption sur la matrice EPS et/ou l'absorption dans les cellules constituant le biofilm.

De plus, graphiquement (Figure 19) et numériquement (Tableau 4), il est à noter que les écarts-types associés aux constantes k_e et k_v calculées par rapport au modèle sont relativement élevés (CV > 35 %). Pour la constante K_{BW} , ces écarts-types sont moins élevés (3 % < CV < 15 %).

Ces dispersions pourraient être expliquées par l'erreur analytique. En effet, lors de la préparation des échantillons de biofilm, une étape de filtration nécessite la récupération du biofilm exposé dans un volume d'eau ultra pure. Si en effet, les contaminants ont subi un phénomène de diffusion dans les pores du biofilm, alors il est tout à fait possible que le rinçage avant filtration entraîne une désorption de ces contaminants. Cette hypothèse expliquerait ainsi la forte dispersion des valeurs autour du modèle, et pourrait être facilement expliquée par une amélioration de protocole de préparation d'échantillon.

De plus, elles pourraient également être liées à l'hétérogénéité du matériel biologique puisque les densités et les compositions de chaque coupons de biofilms étaient variables (cf. IV.4).

Enfin les $\log K_{BW}$ et $\log K_{OW}$ des 3 composés étudiés ont été comparés. Il en ressort une certaine cohérence puisque ceux du diuron et du DCPMU sont relativement proches, tandis que pour le DCPU qui est plus polaire le $\log K_{BW}$ diffère.

Tableau 5 : Comparaison des logarithmes des constantes d'équilibre eau-biofilm ($\log K_{BW}$) par rapport à la polarité des molécules étudiées ($\log K_{OW}$)

	$\log K_{BW}$	$\log K_{OW}$
Diuron	1,99	2,87
DCPU	1,27	2,35
DCPMU	2,04	2,73

Au stade de cette étude, il est difficile de confirmer ces hypothèses, et ces conclusions sont à prendre avec parcimonie surtout pour le DCPMU dont l'ajustement des données au modèle cinétique d'ordre 1 n'est pas forcément optimal.

4) ETUDE DE L'IMPACT BIOLOGIQUE

a) Contrôle de l'état physiologique du biofilm avant exposition dans le bioréacteur

Au lancement de la première manipulation, des coupons de biofilm ont été exposés dans le bioréacteur sans dopage du milieu (cf. III.4.a) afin de vérifier sa résistance face à la contrainte de rotation. Au terme de cette courte exposition (3 jours), il s'est avéré que le biofilm a supporté cette contrainte puisqu'aucun signe de décrochement n'a été observé.

De plus, ces coupons dont les activités photosynthétiques¹¹ ont été mesurées, ont permis d'obtenir des valeurs de référence (témoins à $t=0$) dans les conditions de l'expérience (milieu Dauta, vitesse de rotation « courant », luminosité). Ces valeurs de référence ont été par la suite, nécessaires pour le contrôle de l'état physiologique du biofilm avant introduction dans le bioréacteur.

Ainsi, pour les deux manipulations réalisées (7 jours et 2 h), des mesures d'activité photosynthétique ont été faites sur quelques coupons prélevés au hasard dans l'aquarium de colonisation. Ces premières mesures, ont démontré que l'état physiologique des coupons étaient semblables avant et après l'insertion dans le bioréacteur (Aquarium = $0,50 \pm 0,07$; Bioréacteur = $0,49 \pm 0,03$). Ceci indique que les conditions d'expérimentation (hors contamination au diuron) ne constituaient pas un facteur de stress significatif.

b) Mesures biologiques aux cours des deux manipulations d'exposition au diuron

Au cours des deux manipulations, trois à cinq mesures par coupons ont été réalisées afin de s'affranchir de la variabilité spatiale de la colonisation. Trois types de données ont été enregistrés : **l'activité photosynthétique** pour laquelle une réaction assez rapide après exposition était attendue, **la fluorescence chlorophyllienne** qui permettait d'avoir des informations sur la biomasse, et enfin **la contribution relative (en %) des différentes classes de microalgues** (algues vertes, cyanobactéries et diatomées).

Pour l'exploitation des résultats, les moyennes de ces différents points de mesures ont été utilisées, et les données obtenues pour les deux manipulations ont été regroupées.

Afin de comprendre d'avantage les mécanismes d'accumulation des contaminants étudiés par le biofilm et leurs effets toxiques sur ce dernier, il a été nécessaire de déterminer la structure du biofilm, soit, les groupes algaux (indicateurs structurels) et la biomasse. Les *Figure 38* et *Figure 39* jointes en [Annexe XIII](#) ont permis de faire une comparaison de la quantité de chlorophylle a et de la distribution des classes algales. Il en ressort tout d'abord qu'il y a une corrélation entre la quantité de chlorophylle a et la masse de biofilm lyophilisé ($r^2 = 0,678$). De plus, la *Figure 38* montre que la biomasse de la manipulation sur 2h est plus faible sur certains coupons. Cette remarque peut s'expliquer par le fait que les coupons utilisés pour cette manipulation n'étaient pas suffisamment colonisés, puisqu'ils avaient été introduits dans l'aquarium peu de temps avant la manipulation. Enfin, une évolution de la composition du biofilm dans l'aquarium de colonisation est relevée, avec une tendance à la disparition des algues vertes.

¹¹ *Activité photosynthétique efficace* : Rendement d'utilisation de la lumière incidente par les algues pour faire la photosynthèse). Utilisée ici comme un indicateur de l'état physiologique du biofilm (indicateur fonctionnel). Valeur comprise entre 0 et 1.

Par la suite, les pourcentages d'inhibition moyens (pour chaque temps) ont été représentés graphiquement de manière à voir l'évolution en fonction du temps d'exposition. Les écarts types associés à ces moyennes ont également été ajoutés (Figure 22).

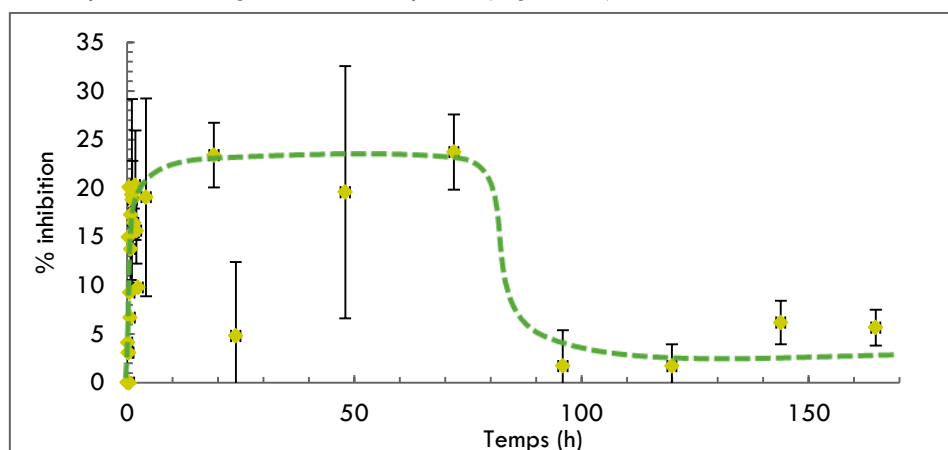


Figure 22 : Représentation graphique de l'évolution du pourcentage d'inhibition photosynthétique (% du témoin) en fonction du temps - Moyenne des réplicats et écart-types associés – Durée d'exposition de 7 jours

Malgré une forte variabilité des valeurs, inhérente aux mesures biologiques, cette représentation graphique peut être découpée en trois phases :

- La première phase correspond à une augmentation initiale rapide du pourcentage d'inhibition de la photosynthèse,
- La seconde montre une phase de stabilisation à un pourcentage d'inhibition s'élevant à environ 25 %,
- La troisième montre une diminution brutale du pourcentage d'inhibition (5 % à partir de 96h). Cela correspond vraisemblablement à l'adaptation des microorganismes aux conditions de contaminations qui s'avèrent stressante mais pas mortelle.

La Figure 23 ci-dessous s'intéresse plus en détail à la première phase.

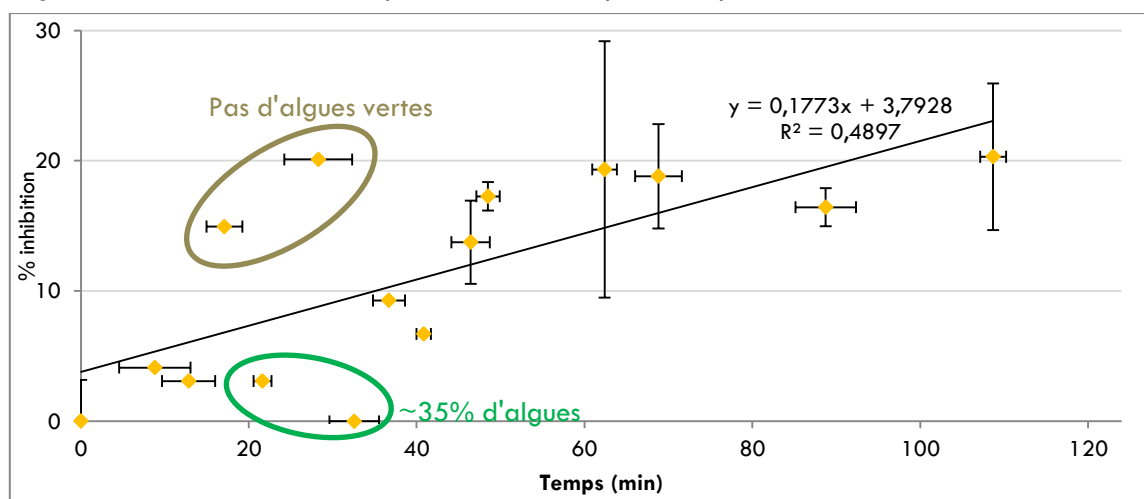


Figure 23 : Inhibition de la photosynthèse (% du témoin) - Phase 1 : Effet toxique croissant

Cette figure montre que l'effet inhibiteur s'observe au cours de la première heure d'exposition des coupons, plus ou moins précocement selon la composition du biofilm. De plus, les effets inhibiteurs les plus importants sont observés pour les biofilms dépourvus d'algues vertes. Ceci confirme donc les données bibliographiques, qui suggèrent que les algues vertes sont moins sensibles au diuron que les diatomées ou les cyanobactéries (Ricart et al. 2010, Tlili et al. 2010).

L'impact rapide occasionné par l'exposition des coupons de biofilm au mélange de contaminants, dans une échelle de temps comparable aux mesures d'accumulation, semble impliquer qu'une certaine quantité a été internalisée dans les cellules. Le protocole d'analyse des pesticides dans le biofilm ne permettant pas de discriminer la fraction internalisée de l'accumulation totale, l'étude des effets biologiques permet de mettre en évidence une absorption probable des molécules dans les cellules, engendrant l'effet observé.

De plus, une tendance est observée entre la biomasse lyophilisée et l'effet inhibiteur ($r^2=0,3104$). En effet, les données (Figure 24) montrent qu'une épaisseur de biofilm importante entraîne une diminution de l'effet inhibiteur des molécules. Il semblerait donc que l'épaisseur du biofilm limite partiellement la pénétration des pesticides dans ce dernier.

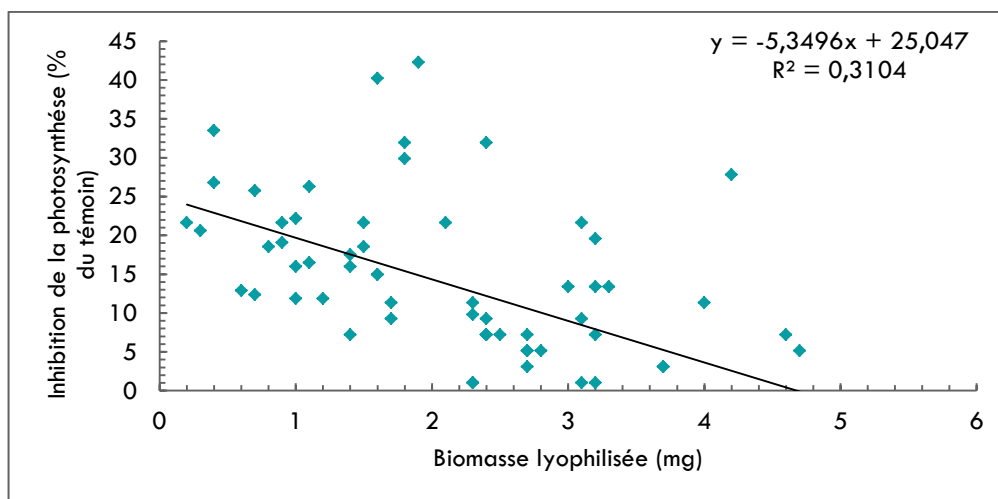


Figure 24 : Inhibition de la photosynthèse (% du témoin) pour plus d'une heure d'exposition en fonction de la biomasse lyophilisée

En conclusion, la croissance du biofilm semblerait affecter les transferts de masse externe et interne de la colonne d'eau vers le biofilm. Ce facteur serait visiblement à prendre en compte dans le modèle cinétique d'ordre 1 afin d'être le plus représentatif des effets observés.

- CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES -

Les objectifs de ce stage étaient de **déterminer les constantes cinétiques et d'équilibre du diuron, du DCPU et du DCPMU dans le biofilm**. Pour répondre à cette problématique, un système conçu pour mimer les conditions environnementales d'un milieu lotique en laboratoire a été utilisé : le bioréacteur annulaire rotatif.

Avant de répondre à ces objectifs, une **prémanipulation ayant pour but d'évaluer la stabilité et l'homogénéité du système** sur une durée de 7 jours. Pour cela, le montage permettant de répondre à la problématique a été mis en place, mais sans biofilm. Au terme de cette étude, les caractéristiques optimales des composants du montage ont été déterminées (débit pompe...), et une concentration stable en contaminants s'élevant à $3 \mu\text{g.L}^{-1}$ a été atteinte au bout de 24h.

Ensuite, deux manipulations avec exposition de biofilm ont été réalisées. La première sur une durée de **7 jours**, mettait seulement en évidence (par le tracé de $C_{\text{biofilm}}/C_w=f(\text{temps})$) l'atteinte d'un équilibre dès les deux premières heures d'exposition. La seconde sur une durée de **2h** permettait d'affiner la partie correspondant à l'augmentation des concentrations dans le biofilm. La mutualisation des données obtenues, ainsi que leurs modélisations suivant une cinétique d'ordre 1, ont permis d'estimer les constantes cinétiques propres aux trois composés étudiés.

Finalement, il a été observé l'atteinte rapide d'un équilibre entre les deux compartiments (eau/biofilm). Ces équilibres atteints très rapidement, cela semblerait majoritairement correspondre à la diffusion des contaminants dans les pores du biofilm et/ou à l'adsorption sur la matrice EPS, plutôt qu'à de l'internalisation dans les cellules. Pourtant, les mesures biologiques réalisées sur les échantillons de biofilm, en complément des données analytiques, montrent rapidement des effets non négligeables des contaminants et témoignent ainsi de leur présence partielle dans les cellules. De plus, ces mesures ont permis de montrer une corrélation négative entre effets toxiques et épaisseur du biofilm.

Par conséquent, il semblerait que le modèle cinétique associé à l'accumulation des pesticides dans le biofilm soit plus complexe qu'un simple modèle monophasique (cinétique d'ordre 1) traduisant les échanges entre deux compartiments. En effet, il semble essentiel de s'intéresser à l'architecture du biofilm, car les processus mis en jeu tels que les phénomènes d'accumulation, désorption dans les différents compartiments et couches autour du biofilm (eau interstitielle, matrice polysaccharidique, cellules...), sembleraient en être impactés.

Cependant les conclusions émises au cours de cette étude sont à considérer avec vigilance compte tenu de la durée expérimentale relativement courte. En effet, pour établir un modèle réellement représentatif du phénomène d'accumulation, il faudrait réaliser cette manipulation sur une durée d'exposition prolongée afin de mieux appréhender l'ensemble du domaine et l'allure de la courbe. De plus, il serait intéressant d'aller plus loin dans le traitement des échantillons de biofilm en séparant les différents constituants de manière à visualiser plus en détail les transferts de masse régissant ce phénomène. Toutefois, cette étude novatrice couplant bioaccumulation et effets des substances organiques sur le biofilm semble bien débuter, et permet d'envisager un grand nombre de problématiques à approfondir.

- BIBLIOGRAPHIE -

Arini, A. (2011). Décontamination métallique et capacités de récupération de deux composantes biologiques d'un hydrosystème naturel (biofilms diatomiques et bivalves filtreurs) après remédiation d'un site industriel, Bordeaux 1.

Battin, T. J., et al. (2003). "Contributions of microbial biofilms to ecosystem processes in stream mesocosms." Nature **426**(6965): 439-442.

Byers, H. (2012). "Etude de la bioaccumulation des pesticides dans les biofilms de rivière et comparaison avec les cinétiques d'échange dans l'échantillonneur passif POCIS."

Campbell, P. G., et al. (2002). "Metal bioavailability to phytoplankton—applicability of the biotic ligand model." Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology **133**(1): 189-206.

Cui, Y. T., et al. (2014). "Searching for "Environmentally-Benign" Antifouling Biocides." International journal of molecular sciences **15**(6): 9255-9284.

Dauta, A. (1982). Conditions de développement du phytoplancton. Etude comparative du comportement de huit espèces en culture. I. Détermination des paramètres de croissance en fonction de la lumière et de la température. Annales de limnologie, Cambridge Univ Press.

Davit, Y., et al. (2013). "Hydrodynamic dispersion within porous biofilms." Physical Review E **87**(1): 012718.

Debenest, T. (2007). Caractérisation de l'impact des pollutions agricoles sur les diatomées benthiques, Bordeaux 1.

Dubois, A. (2013). "Contamination des cours d'eau par les pesticides en 2011." Commissariat général au développement durable - n°436 Juillet 2013.

Flemming, H.-C. and J. Wingender (2010). "The biofilm matrix." Nature Reviews Microbiology **8**(9): 623-633.

Gourlay-Francé, C., et al. (2010). "Que sait-on de la biodisponibilité des contaminants dissous dans le milieu aquatique? ." Sciences Eaux et Territoires n°1.

Headley, J. V. (1998). "Rates of Sorption and Partitioning of contaminants in river biofilm."

Kim Tiam, S. (2013). Effets de mélanges de pesticides sur les biofilms périphtiques d'eau douce, Université Sciences et Technologies-Bordeaux I.

Lahjiouj, F., et al. (2011). Développement d'une méthode de dosage des pesticides dans le biofilm et étude des cinétiques d'adsorption. XXXIème Congrès du Groupe Français des Pesticides, 25/05/2011 - 27/05/2011, Orléans, FRA.

Lawrence, J. R., et al. (2001). "Sorption and metabolism of selected herbicides in river biofilm communities." Canadian Journal of Microbiology **47**(7): 634-641.

Montuelle, B., et al. (2010). "The periphyton as a multimetric bioindicator for assessing the impact of land use on rivers: an overview of the Ardières-Morcille experimental watershed (France)." Hydrobiologia **657**(1): 123-141.

Moreland, D. E. (1967). "Mechanisms of action of herbicides." Annual Review of Plant Physiology **18**(1): 365-386.

Morin, S. (2006). Bioindication des effets des pollutions métalliques sur les communautés de diatomées benthiques - Approches in situ et expérimentales: 302.

Paule, A. (2012). Dynamique des communautés microbiennes des biofilms phototrophes à différents niveaux d'intégration biologique: des successions écologiques aux réponses à l'exposition à un herbicide, Université Paul Sabatier-Toulouse III.

Poulier, G. (2014). Etude de l'échantillonnage intégratif passif pour l'évaluation réglementaire de la qualité des milieux aquatiques: application à la contamination en pesticides et en éléments trace métalliques des bassins versants du Trec et de l'Auvézère, Université de Limoges.

Ricart, M., et al. (2010). "Primary and complex stressors in polluted Mediterranean rivers: pesticide effects on biological communities." Journal of Hydrology **383**(1): 52-61.

Sabater, S., et al. (2007). "Monitoring the effect of chemicals on biological communities. The biofilm as an interface." Analytical and bioanalytical chemistry **387**(4): 1425-1434.

Schreiber, U., et al. (1986). "Continuous recording of photochemical and non-photochemical chlorophyll fluorescence quenching with a new type of modulation fluorometer." Photosynthesis research **10**(1-2): 51-62.

Serra, A., et al. (2009). "Copper accumulation and toxicity in fluvial periphyton: the influence of exposure history." Chemosphere **74**(5): 633-641.

Srivastava, V. C., et al. (2006). "Adsorptive removal of phenol by bagasse fly ash and activated carbon: equilibrium, kinetics and thermodynamics." Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects **272**(1): 89-104.

Stewart, P. S. (2003). "Diffusion in biofilms." Journal of Bacteriology **185**(5): 1485-1491.

Sutherland, I. W. (2001). "The biofilm matrix—an immobilized but dynamic microbial environment." Trends in microbiology **9**(5): 222-227.

Tlili, A., et al. (2010). "PO 4 3- dependence of the tolerance of autotrophic and heterotrophic biofilm communities to copper and diuron." Aquatic Toxicology **98**(2): 165-177.

Trebst, A. and W. Draber (1987). Inhibitors of photosystem II and the topology of the herbicide and QB binding polypeptide in the thylakoid membrane. Excitation Energy and Electron Transfer in Photosynthesis, Springer: 235-246.

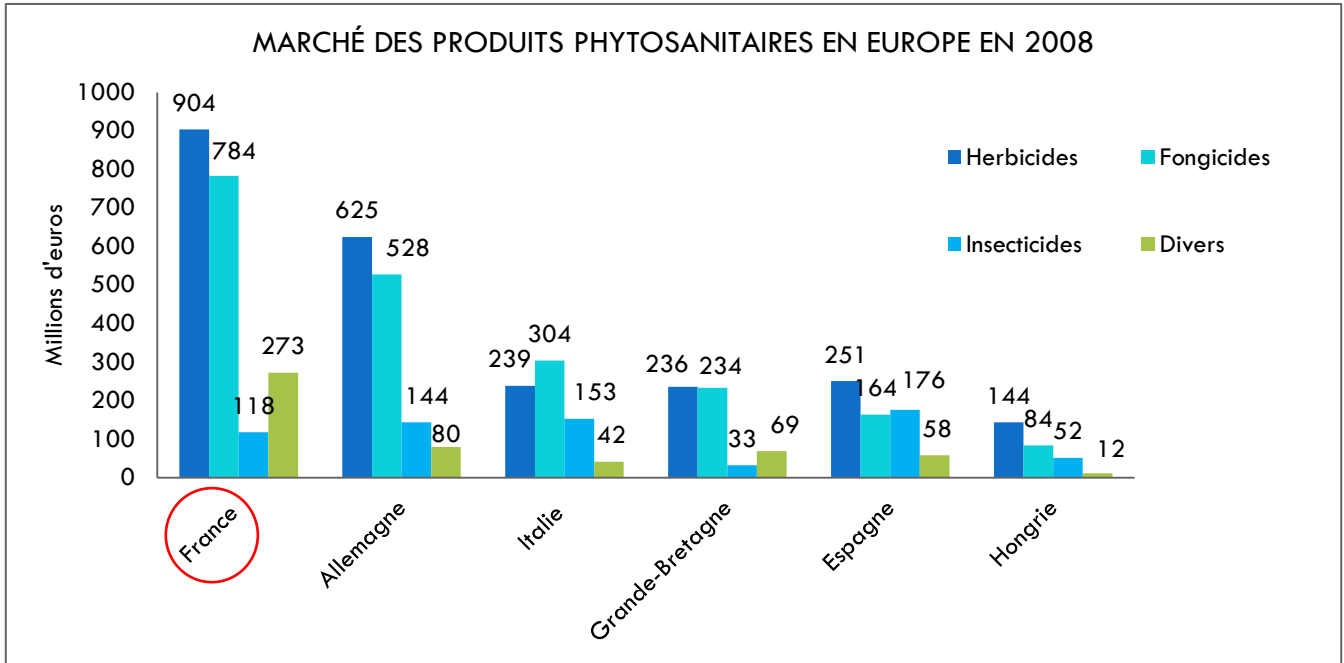


Figure 25 : Marché des pesticides en Europe en 2008 (en millions d'euros), Source : IUPP 2010



Figure 26 : Etang présent sur le site Irstea de Bordeaux (Cestas-Gazinet) utilisé comme site de colonisation pour les biofilms

ANNEXE II¹²

LISTE DES SUBSTANCES PRIORITAIRES DANS LE DOMAINE DE L'EAU

Número	Número CAS (1)	Número UE (2)	Nom de la substance prioritaire (3)	Identifiée comme substance dangereuse prioritaire
(1)	15972-60-8	240-110-8	Alachlore	
(2)	120-12-7	204-371-1	Anthracène	X
(3)	1912-24-9	217-617-8	Atrazine	
(4)	71-43-2	200-753-7	Benzène	
(5)	sans objet	sans objet	Diphényléthers bromés	X (4)
(6)	7440-43-9	231-152-8	Cadmium et ses composés	X
(7)	85535-84-8	287-476-5	Chloroalcanes, C ₁₀₋₁₃	X
(8)	470-90-6	207-432-0	Chlorfenvinphos	
(9)	2921-88-2	220-864-4	Chlorpyrifos (éthylchlorpyrifos)	
(10)	107-06-2	203-458-1	1,2-dichloroéthane	
(11)	75-09-2	200-838-9	Dichlorométhane	
(12)	117-81-7	204-211-0	Di(2-ethylhexyle)phthalate (DEHP)	X
(13)	330-54-1	206-354-4	Diuron	
(14)	115-29-7	204-079-4	Endosulfan	X
(15)	206-44-0	205-912-4	Fluoranthène	
(16)	118-74-1	204-273-9	Hexachlorobenzène	X
(17)	87-68-3	201-765-5	Hexachlorobutadiène	X
(18)	608-73-1	210-168-9	Hexachlorocyclohexane	X
(19)	34123-59-6	251-835-4	Isoproturon	
(20)	7439-92-1	231-100-4	Plomb et ses composés	
(21)	7439-97-6	231-106-7	Mercure et ses composés	X
(22)	91-20-3	202-049-5	Naphtalène	
(23)	7440-02-0	231-111-4	Nickel et ses composés	
(24)	sans objet	sans objet	Nonylphénols	X (5)
(25)	sans objet	sans objet	Octylphénols (6)	
(26)	608-93-5	210-172-0	Pentachlorobenzène	X
(27)	87-86-5	201-778-6	Pentachlorophénol	
(28)	sans objet	sans objet	Hydrocarbures aromatiques polycycliques (HAP) (7)	X
(29)	122-34-9	204-535-2	Simazine	
(30)	sans objet	sans objet	Composés du tributylétain	X (8)

¹² <http://eurlex.europa.eu/LexUriServ/LexUriServ.do?uri=OJ:L:2013:226:0001:0017:FR:PDF>, en ligne, page consultée le 07/05/2014

Numéro	Numéro CAS ⁽¹⁾	Numéro UE ⁽²⁾	Nom de la substance prioritaire ⁽³⁾	Identifiée comme substance dangereuse prioritaire
(31)	12002-48-1	234-413-4	Trichlorobenzène	
(32)	67-66-3	200-663-8	Trichlorométhane (chloroforme)	
(33)	1582-09-8	216-428-8	Trifluraline	X
(34)	115-32-2	204-082-0	Dicofol	X
(35)	1763-23-1	217-179-8	Acide perfluorooctanesulfonique et ses dérivés (perfluoro-octanesulfonate PFOS)	X
(36)	124495-18-7	sans objet	Quinoxifène	X
(37)	sans objet	sans objet	Dioxines et composés de type dioxine	X ⁽⁹⁾
(38)	74070-46-5	277-704-1	Aclonifène	
(39)	42576-02-3	255-894-7	Bifénox	
(40)	28159-98-0	248-872-3	Cybutryne	
(41)	52315-07-8	257-842-9	Cyperméthrine ⁽¹⁰⁾	
(42)	62-73-7	200-547-7	Dichlorvos	
(43)	sans objet	sans objet	Hexabromocyclododécane (HBCDD)	X ⁽¹¹⁾
(44)	76-44-8/1024-57-3	200-962-3/ 213-831-0	Heptachlore et époxyde d'heptachlore	X
(45)	886-50-0	212-950-5	Terbutryne	

⁽¹⁾ CAS: Chemical Abstracts Service.

⁽²⁾ Numéro UE: Inventaire européen des produits chimiques commercialisés (EINECS) ou Liste européenne des substances chimiques notifiées (ELINCS).

⁽³⁾ Lorsque des groupes de substances ont été sélectionnés, sauf indication expresse, des représentants typiques de ce groupe sont définis aux fins de l'établissement des normes de qualité environnementale.

⁽⁴⁾ Uniquement le tétrabromodiphényléther (n° CAS 40088-47-9), le pentabromodiphényléther (n° CAS 32534-81-9), l'hexabromodiphényléther (n° CAS 36483-60-0) et l'heptabromodiphényléther (n° CAS: 68928-80-3).

⁽⁵⁾ Nonylphénol (n° CAS 25154-52-3; n° UE 246-672-0), y compris les isomères 4-nonylphénol (n° CAS 104-40-5; n° UE 203-199-4) et 4-nonylphénol (ramifié) (n° CAS 84852-15-3; n° UE 284-325-5).

⁽⁶⁾ Octylphénol (n° CAS 1806-26-4; n° UE 217-302-5), y compris l'isomère 4-(1,1',3,3'- tétraméthylbutyl)-phénol (n° CAS 140-66-9; n° UE 205-426-2).

⁽⁷⁾ Y compris le benzo(a)pyrène (n° CAS 50-32-8; n° UE 200-028-5), le benzo(b)fluoranthène (n° CAS 205-99-2; n° UE 205-911-9), le benzo(g,h,i)perylène (n° CAS 191-24-2; n° UE 205-883-8), le benzo(k)fluoranthène (n° CAS 207-08-9; n° UE 205-916-6) et l'indéno(1,2,3-cd)pyrène (n° CAS 193-39-5; n° UE 205-893-2), mais à l'exception de l'anthracène, du fluoranthène et du naphthalène, qui sont énumérés séparément.

⁽⁸⁾ Y compris le tributylétain-cation (n° CAS: 36643-28-4).

⁽⁹⁾ Se rapporte aux composés suivants:

sept dibenzo-p-dioxines polychlorées (PCDD): 2,3,7,8-T4CDD (n° CAS 1746-01-6), 1,2,3,7,8-P5CDD (n° CAS 40321-76-4), 1,2,3,4,7,8-H6CDD (n° CAS 39227-28-6), 1,2,3,6,7,8-H6CDD (n° CAS 57653-85-7), 1,2,3,7,8,9-H6CDD (n° CAS 19408-74-3), 1,2,3,4,6,7,8-H7CDD (n° CAS 35822-46-9), 1,2,3,4,6,7,8,9-O8CDD (n° CAS 3268-87-9);

ANNEXE III

- *Protocole mis en place pour l'étude de la linéarité*

Préparer 5 gammes à 8 niveaux de concentration différents :

0.1 - 0.2 – 0.5 – 2 – 5 – 10 – 25 – 50 µg.L⁻¹

Solutions utilisées :

Solution standards	Solution mère 41 pesticides neutres + DIA d5 1 mg.L ⁻¹
Solution Etalon Interne (EI)	Solution 8 EI LC neutres 10 mg.L ⁻¹

Bien agiter/ vortexer les solutions mères avant utilisation.

Dilution de la solution 41 pesticides neutres à 100 µg.L⁻¹ :

A l'aide d'une pipette pasteur, prélever un peu de la solution mère brute et la transvaser dans un vial neuf. Prélever 100 µL de la solution à 1 mg.L⁻¹, évaporer sous flux d'azote et reprendre dans 1000 µL de MeOH ULC.

Vortexer soigneusement la solution, l'annoter, la stocker.

Dilution de la solution 8 Etalons Internes (EI) LC neutres à 1 mg.L⁻¹ :

Prélever 100 µL de la solution mère à 10 mg.L⁻¹, évaporer sous flux d'azote et reprendre dans 1000 µL de MeOH ULC.

Vortexer soigneusement la solution, l'annoter, la stocker.

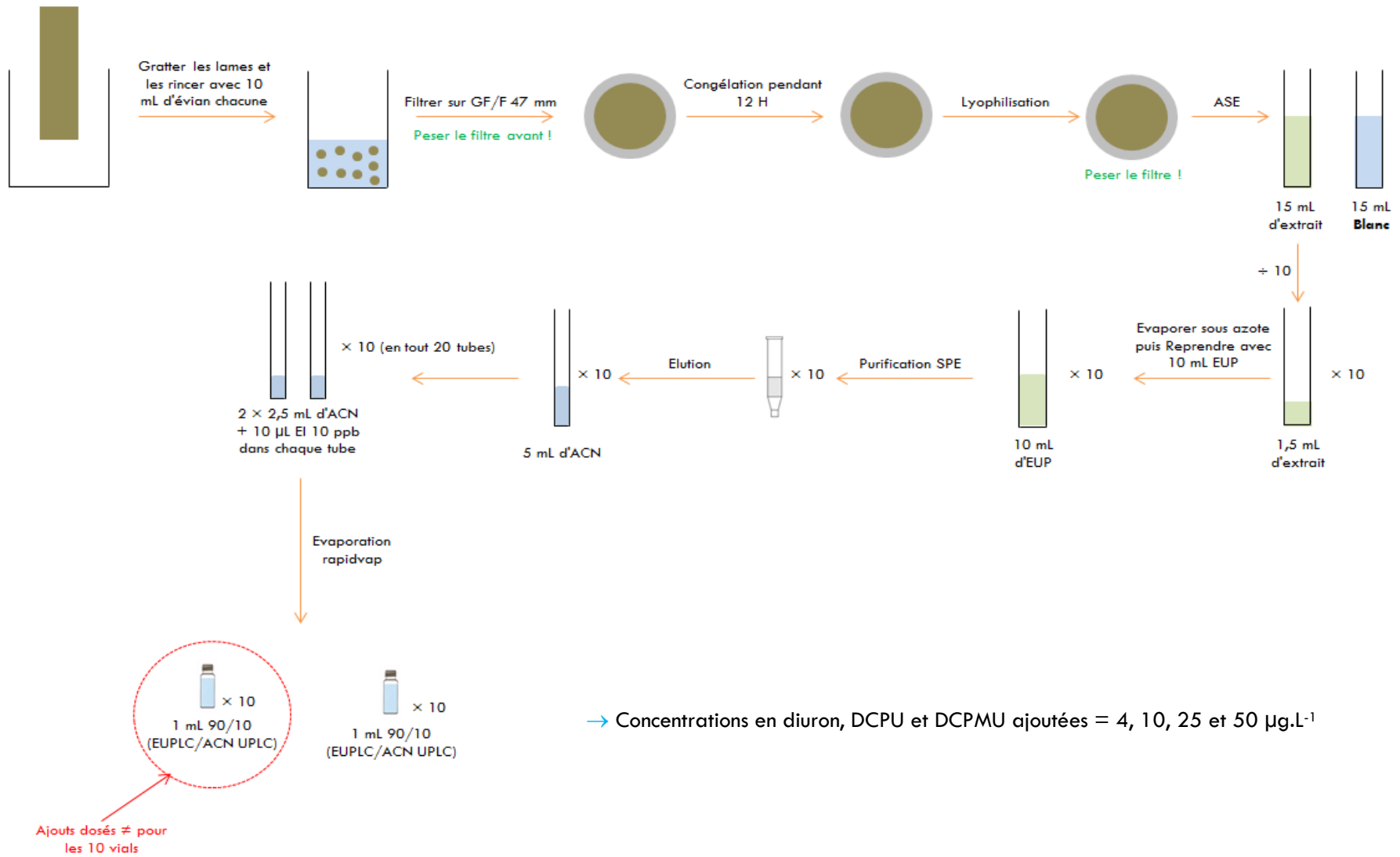
Préparation de la gamme :

Concentration finale	Volume de solution 41 pesticides diluée à 100 µg.L ⁻¹	Volume de solution 41 pesticides brutes à 1 mg.L ⁻¹	Evaporation sous flux d'azote	Volume de solution 8 EI LC neutres à 1 mg.L ⁻¹	Volume EULC à rajouter
0 µg.L ⁻¹	-	-	-	10 µL	990 µL
0,1 µg.L ⁻¹	1 µL	-	-	10 µL	989 µL
0,2 µg.L ⁻¹	2 µL	-	-	10 µL	988 µL
0,5 µg.L ⁻¹	5 µL	-	-	10 µL	985 µL
2 µg.L ⁻¹	-	2 µL	-	10 µL	988 µL
5 µg.L ⁻¹	-	5 µL	-	10 µL	985 µL
10 µg.L ⁻¹	-	10 µL	Oui	10 µL	990 µL
25 µg.L ⁻¹	-	25 µL	Oui	10 µL	990 µL
50 µg.L ⁻¹	-	50 µL	Oui	10 µL	990 µL

Vortexer soigneusement puis conserver au congélateur jusqu'à injection en UPLC-ESI-ToF.

ANNEXE IV

- Schéma récapitulatif du protocole mis en place pour l'étude de la spécificité



ANNEXE V

- *Préparation d'un litre de milieu Dauta*

- 1 mL de $\text{FeSO}_4, 7\text{H}_2\text{O}$ à 1 g.L^{-1}
- 1 mL de NaHCO_3 à 50 g.L^{-1}
- 1 mL de Na_2CO_3 à 5 g.L^{-1}
- 1 mL de $\text{MgSO}_4, 7\text{H}_2\text{O}$ à 25 g.L^{-1}
- 1 mL de $\text{CaCl}_2, 2\text{H}_2\text{O}$ à 25 g.L^{-1}
- 3,6 mL de $\text{Na}_2\text{SiO}_3, 9\text{H}_2\text{O}$ à 28.42 g.L^{-1}
- 1 mL de KNO_3 à 200 g.L^{-1}
- 1 mL de K_2HPO_4 à 25 g.L^{-1}
- 1 mL de solution d'oligoéléments contenant :
 - $\text{ZnSO}_4, 7\text{H}_2\text{O}$ à 20 mg.L^{-1}
 - $\text{CuCl}_2, 2\text{H}_2\text{O}$ à 20 mg.L^{-1}
 - $\text{MnCl}_2, 4\text{H}_2\text{O}$ à 400 mg.L^{-1}
 - $\text{CoCl}_2, 2\text{H}_2\text{O}$ à 10 mg.L^{-1}
 - H_3BO_3 à 1 mg.L^{-1}
 - $\text{Na}_2\text{MoO}_4, 7\text{H}_2\text{O}$ à 35 mg.L^{-1}

La bouteille est ensuite complétée à 1 L avec de l'eau distillée, et le pH est ajusté à 7,5 – 8 avec une solution d'acide chlorhydrique.

Dans le cadre de ce stage, les bouteilles de milieu Dauta ont été souvent préparées à une concentration 12 fois supérieure afin d'obtenir 12 L de milieu à la fin.

- *Préparation de la solution de dopage : diuron, DCPU et DCPMU à $5000 \mu\text{g.L}^{-1}$*

A partir des solutions de diuron, DCPU et DCPMU déjà prêtes à 200 mg.L^{-1} :

Prélever 1.25 mL de chacun et les introduire dans une fiole jaugée de 50 mL, puis compléter cette dernière jusqu'au trait de jauge avec du MeOH.

ANNEXE VI

Tableau 6 : Paramètres des différentes composantes du système

Durée de la manipulation = 7 jours		Durée de la seringue
C_{seringue}	$5 \text{ ng} \cdot \mu\text{L}^{-1}$	7 jours
Débit pousse-seringue	$1 \mu\text{L} \cdot \text{min}^{-1}$	
V_{seringue}	10 mL	
Débit pompe péristaltique	$1 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$	$1,44 \text{ L} \cdot \text{j}^{-1}$
Volume de milieu Dauta nécessaire	12 L	
Volume du bioréacteur	1,160 L	
Dopage initiale	- 1,160 mL de la solution de dopage à $5 \text{ ng} \cdot \mu\text{L}^{-1}$ dans les 1,160 L de l'espace de circulation ; - 5 mL de la solution de dopage à $5 \text{ ng} \cdot \mu\text{L}^{-1}$ dans les 5 L de la chambre de mélange	
Concentration instantanée dopage	$5 \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$	
Vitesse de rotation	15 RPM	$\approx 10 \text{ cm/s}$

- *Préparation des échantillons d'eau*

- Introduire 5 mL de milieu prélevé dans une seringue en verre de ce volume,
- Mettre un filtre Whatman Spartan 13 ($0,45 \mu\text{m}$ RC) sur l'extrémité de la seringue et filtrer (pour éliminer les MES, impureté) dans un tube à élution de 6 mL.
- Dans un vial introduite 1 mL de cette solution filtrée, puis 10 μL des 8 étalons internes diluée (1 ppm).

Remarque : Les vials ainsi préparés peuvent être conservés au congélateur ($-20 \text{ }^\circ\text{C}$) jusqu'à analyse en UPLC-ESI-Tof.



Figure 27 : Seringue en verre de 5 mL et filtre Whatman Spartan 13

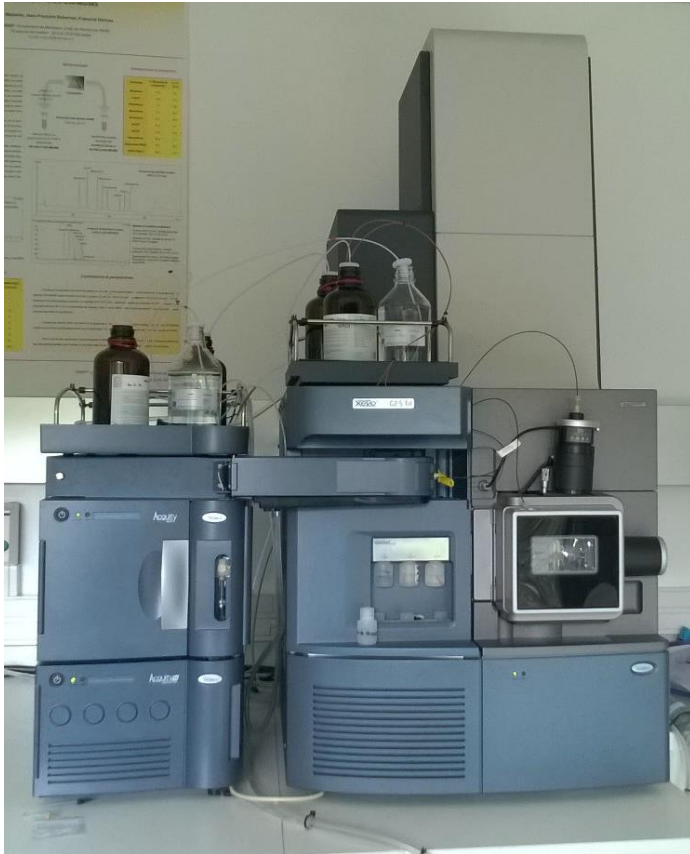


Figure 28 : Acquity UPLC couplée au spectromètre Xevo G2-S-ToF de Waters



Figure 29 : Lyophilisateur ALPHA 1-2 LDPlus CHRIST

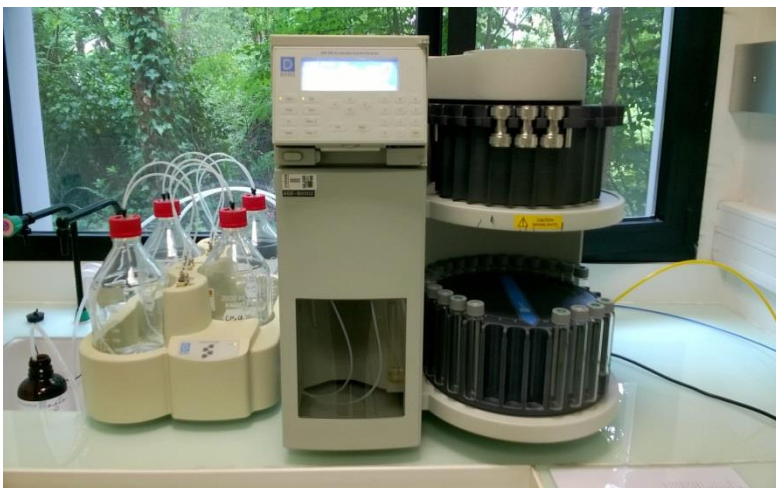


Figure 30 : ASE 200 DIONEX



Figure 31 : Coupon de biofilm

ANNEXE VIII

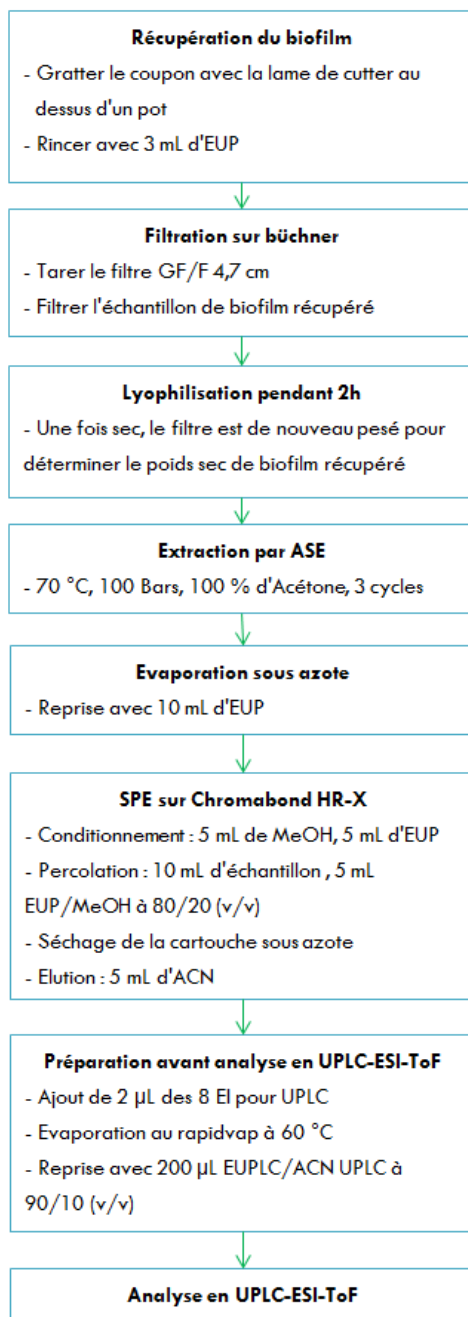


Figure 32 : Logigramme regroupant les différentes étapes de préparation à suivre pour les échantillons de biofilm

Tous les tests statistiques ont été réalisés à l'aide du logiciel XLSTAT® à un niveau de signification de 5%.

- Test de Grubbs

But : Mettre en évidence la présence de valeurs extrêmes.

Calcul de G_a et G_b :

Avec : - x_p : valeur la plus grande
- x_l : valeur la plus petite
- s : écart-type
- \bar{x} : moyenne

$$G_a = \frac{x_p - \bar{x}}{s} \text{ et } G_b = \frac{\bar{x} - x_l}{s}$$

Si le plus grand des deux rapports est supérieur :

- à la valeur lue dans la table au risque d'erreur de 1%, la donnée correspondante est considérée comme aberrante,
- à la valeur lue dans la table au risque d'erreur de 5%, la donnée correspondante est considérée comme suspecte.

- Test de Cochran

But : Mettre en évidence la présence d'une variance anormalement élevée. Test bilatéral à un niveau de signification de 5 %.

Les hypothèses nulles et alternatives associées au test Cochran sont alors soit,

- H_0 : les k distributions sont marginalement homogènes.
- H_a : les k distributions sont marginalement inhomogènes.

- Test de Levene

But : Vérifier l'homogénéité des variances.

C'est un test bilatéral qui fait intervenir les écarts absolus à la moyenne ou à la médiane. La statistique de Levene suit une loi de Fisher à $k-1$ et n_1+n_2-2 degrés de liberté.

Les hypothèses nulle et alternative de ce test sont :

- H_0 : $s_1^2 = s_2^2 = \dots = s_k^2$
- H_a : il existe au moins un couple (i,j) tel que $s_i^2 \neq s_j^2$

- Test d'égalité de la variance – Loi de Fisher-Snedecor

But : Vérifier que la variance du premier ensemble de données est significativement différente de celle du second ensemble.

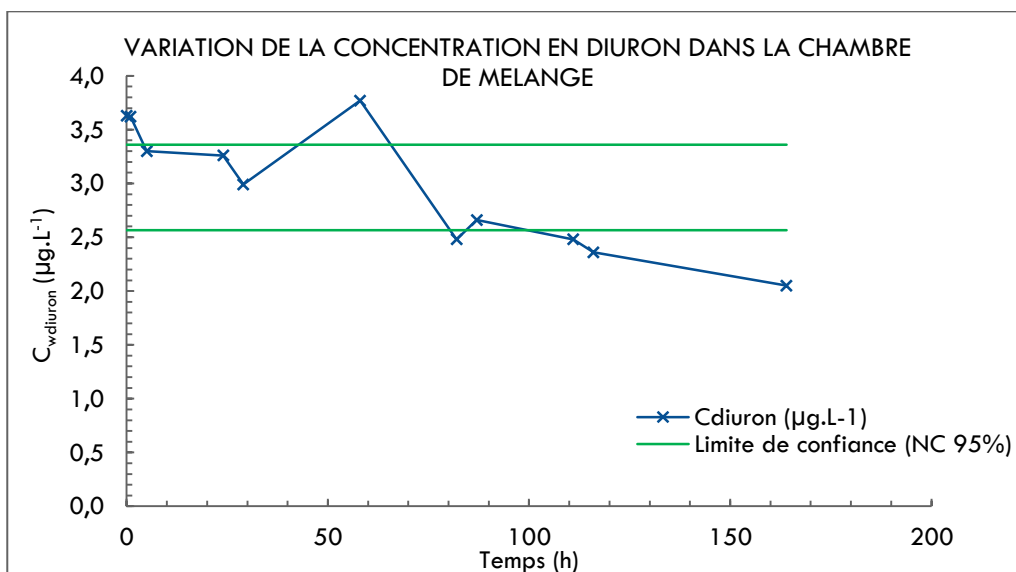
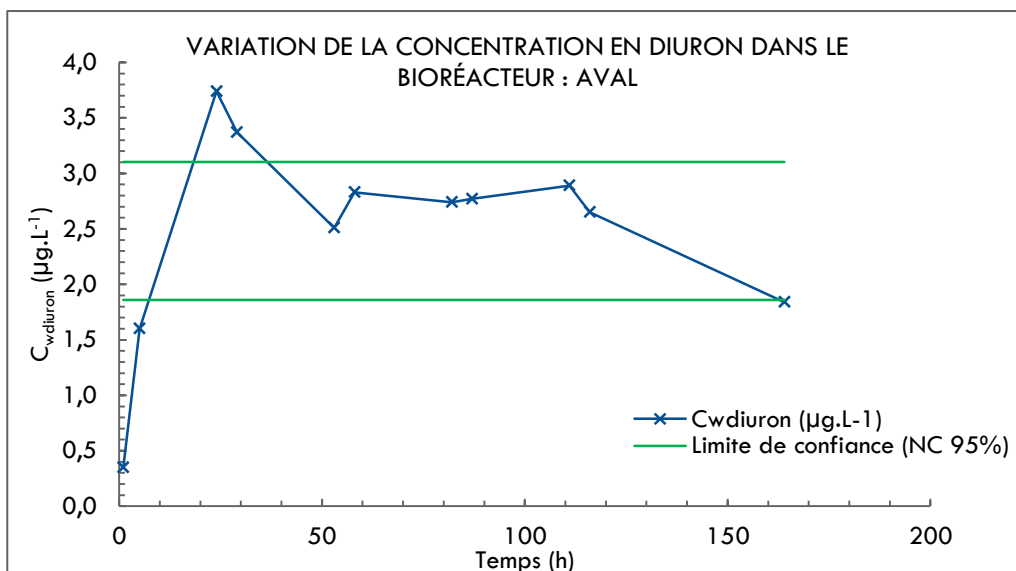
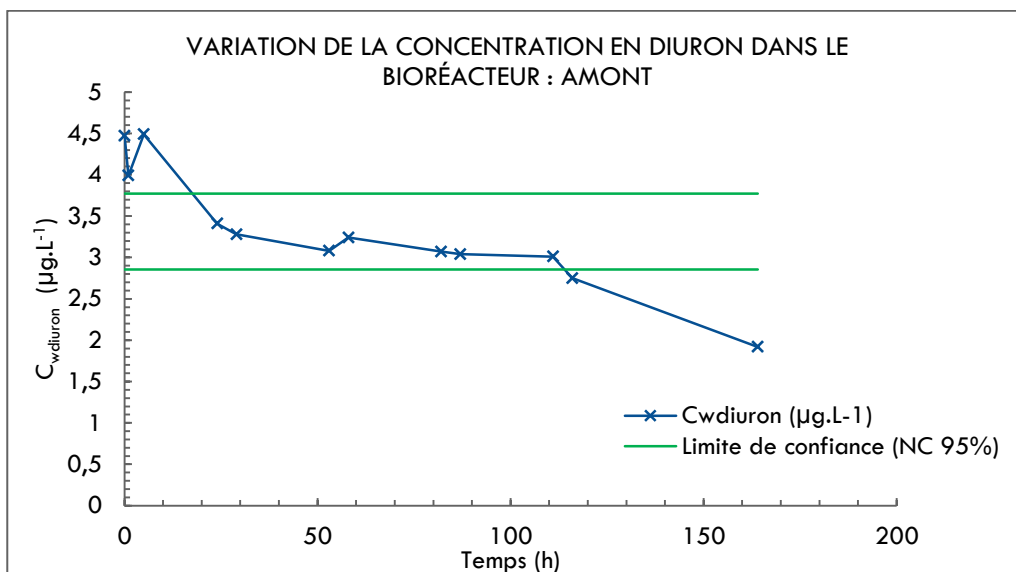
Pour cela, il faut calculer le rapport F en plaçant la plus grande variance au numérateur afin que $F > 1$.

Si,

$$F_{\text{calculée}} = \frac{s_1^2}{s_2^2} > F_{\text{critique}}$$

Alors les variances sont considérées comme significativement différentes.

ANNEXE X



ANNEXE XI

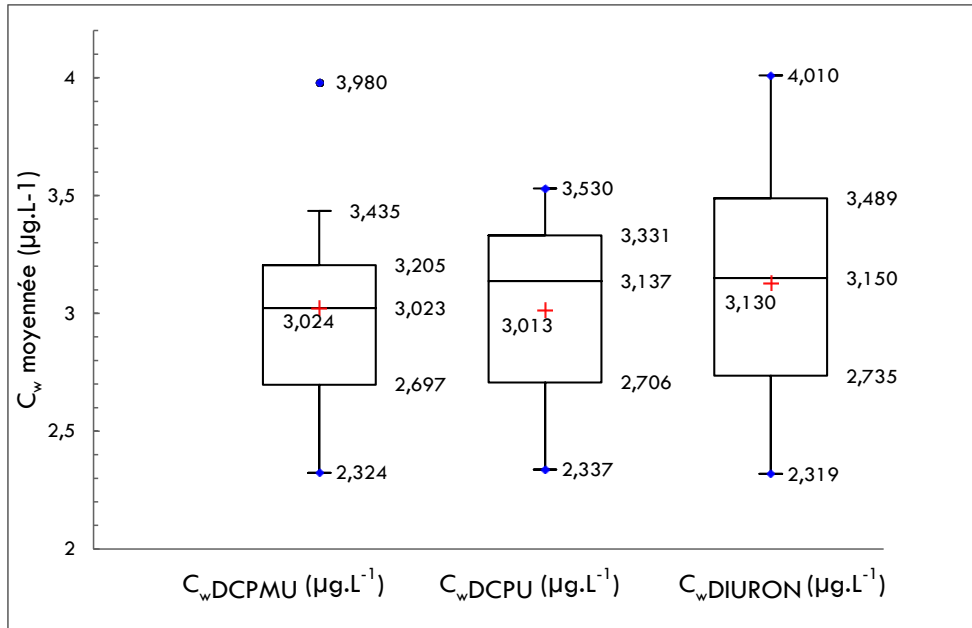


Figure 33 : BoxPlots des concentrations moyennées dans le milieu pour chaque composé étudié

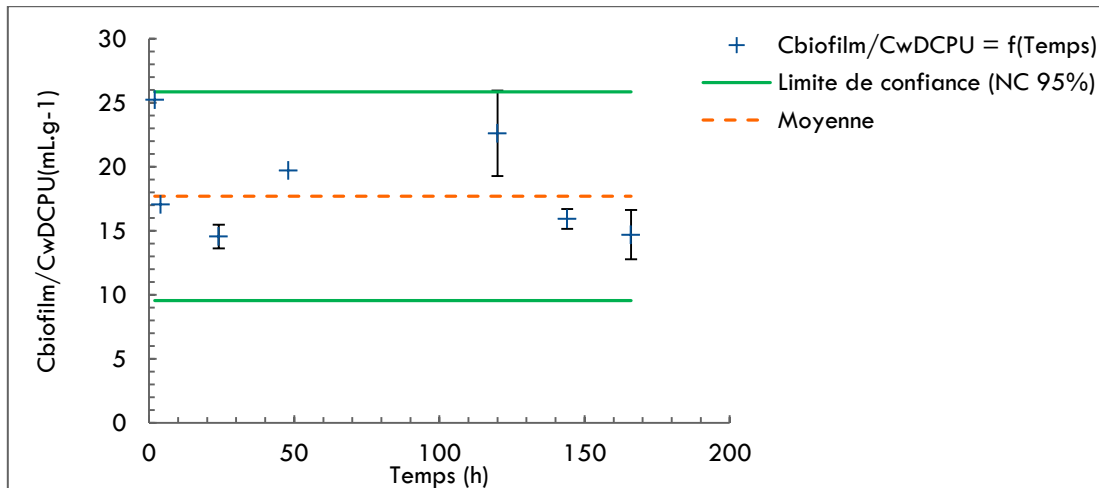


Figure 34 : Représentation graphique de la variation du rapport de concentration en DCPU dans le biofilm et dans le milieu en fonction du temps – Moyennes pour les réplicats et barres d'erreurs associées (CV %) - Manipulation sur 7 jours

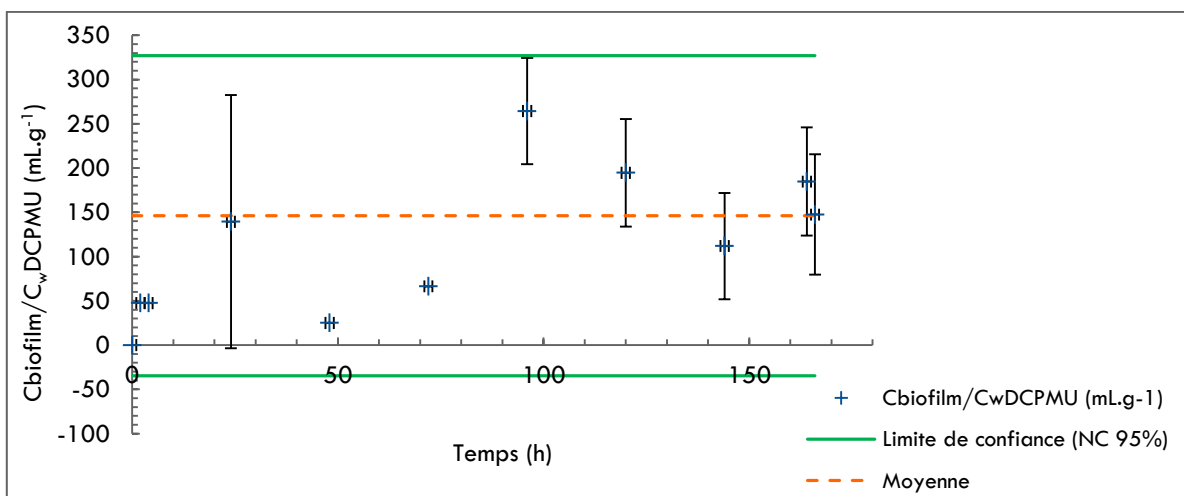


Figure 35 : Représentation graphique de la variation du rapport de concentration en DCPMU dans le biofilm et dans le milieu en fonction du temps – Moyennes pour les réplicats et barres d'erreurs associées (CV %) - Manipulation sur 7 jours

ANNEXE XII

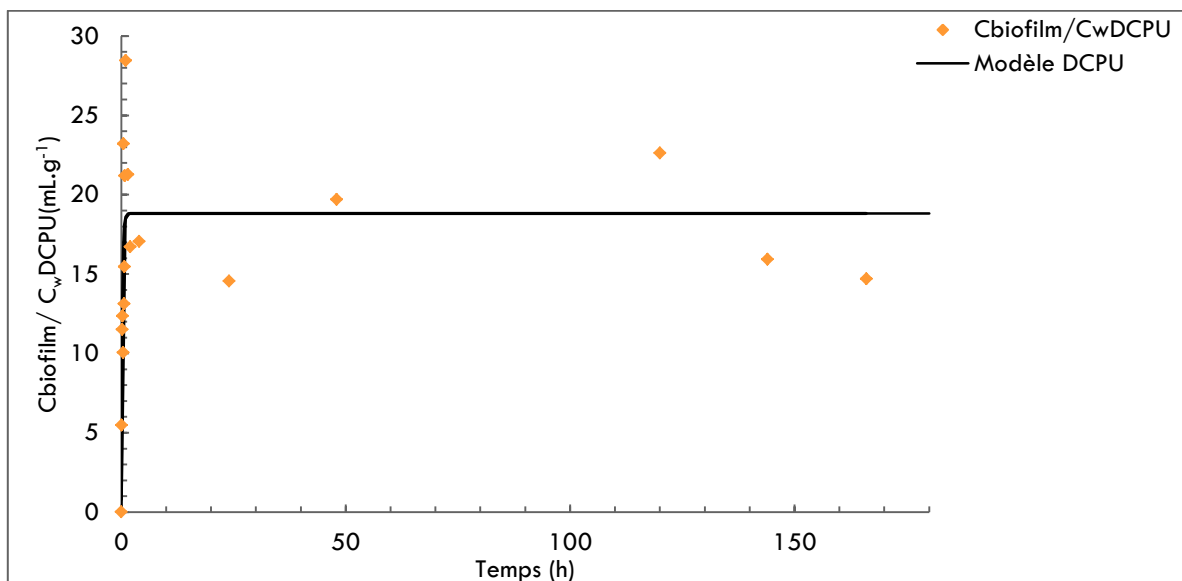


Figure 36 : Modélisation d'une cinétique d'ordre 1 avec les données acquises pour la molécule de DCPU aux cours des deux manipulations

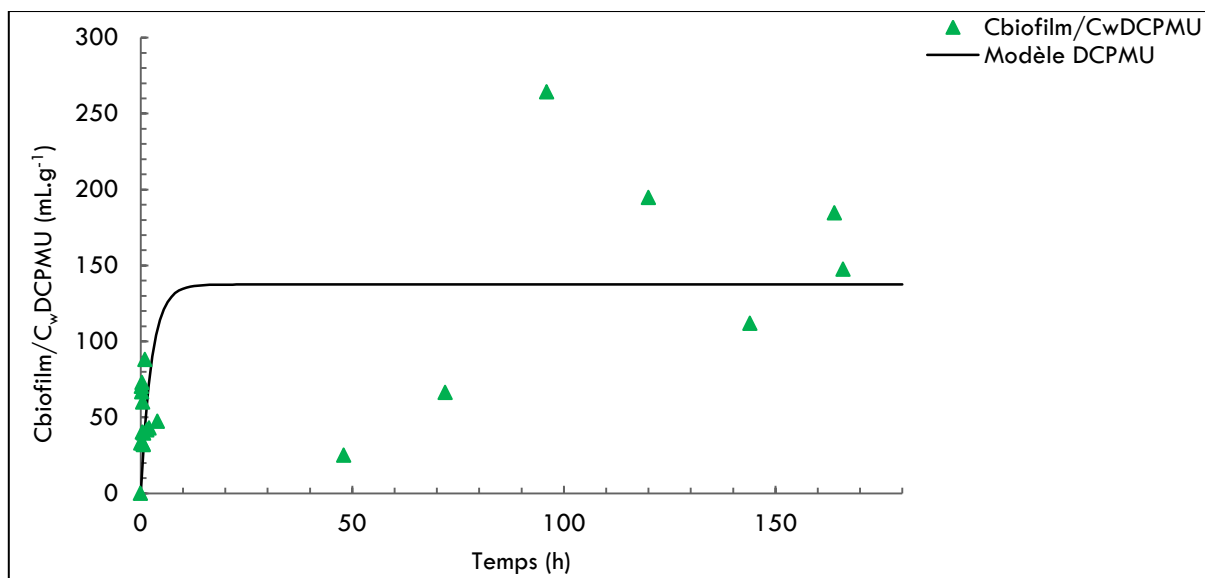


Figure 37 : Modélisation d'une cinétique d'ordre 1 avec les données acquises pour la molécule de DCPMU aux cours des deux manipulations

ANNEXE XIII

• Résultats des mesures biologiques

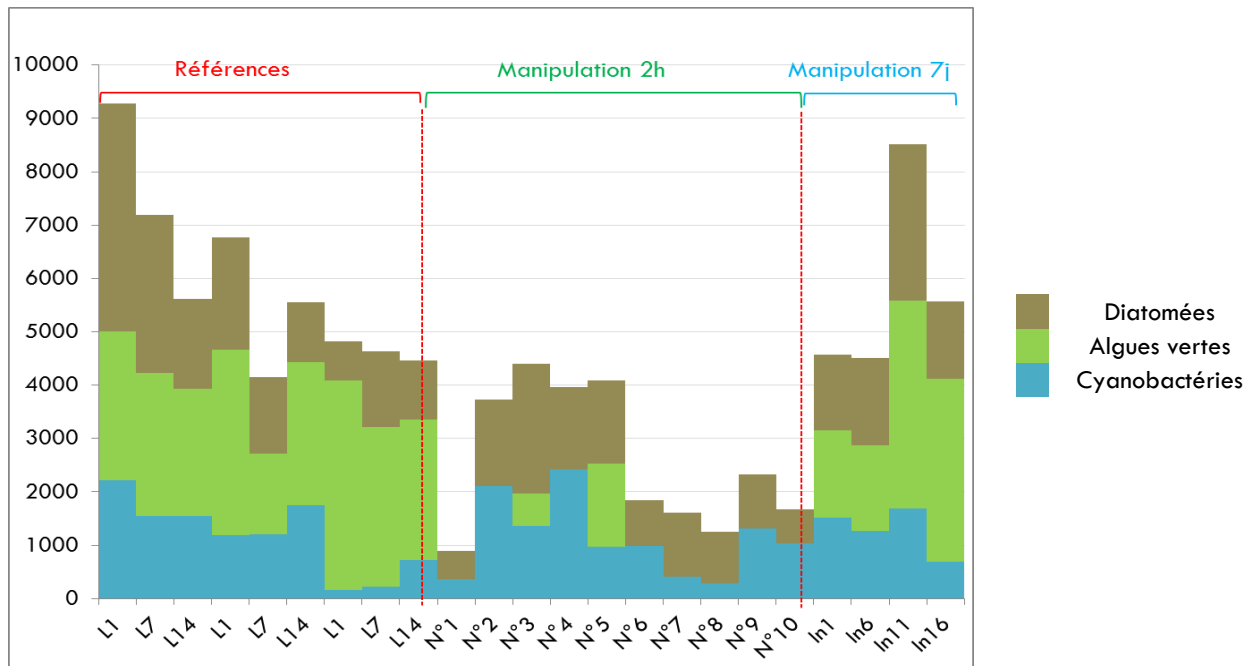


Figure 38 : Groupes algaux présents dans le biofilm ayant servis aux différentes manipulations

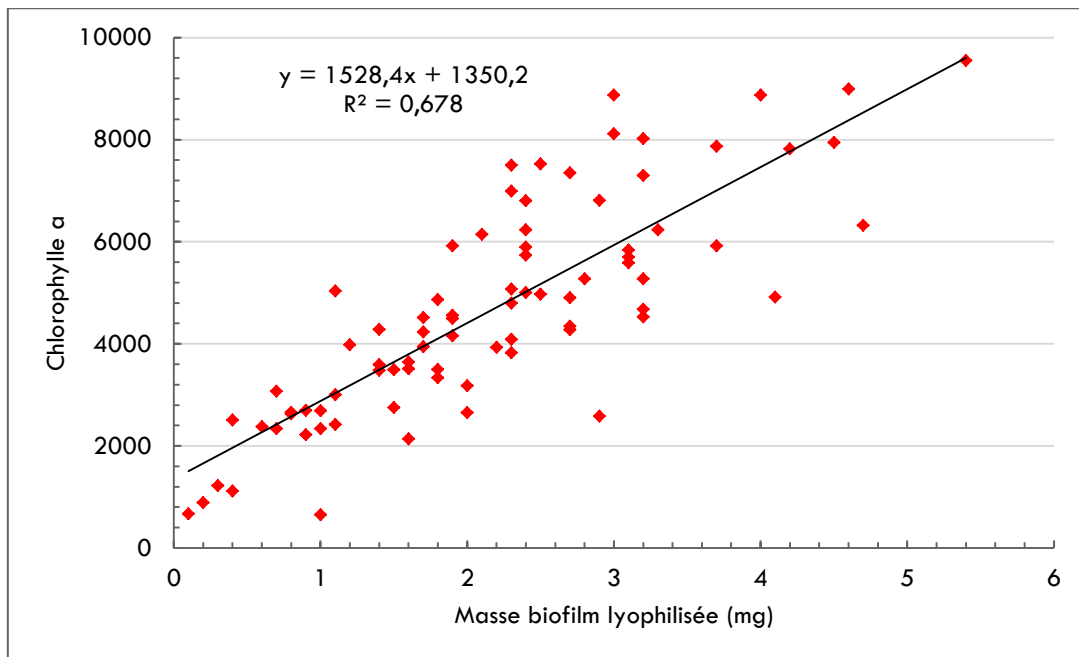


Figure 39 : Représentation graphique de la corrélation en la quantité de chlorophylle et la biomasse lyophilisée

ANNEXE XIV

• Analyse UPLC-ESI-ToF

Les analyses sont réalisées par UPLC-ESI-ToF. Le modèle utilisé est le suivant : « *Acquity UPLC couplée au spectromètre Wevo G2-S-ToF de WATERS* ».

▪ UPLC :

La phase stationnaire utilisée est une colonne « *Acquity UPLC BEH C18 1.7 μ m, 2,1 * 50 mm* ». L'éluant utilisé en mode gradient est un mélange binaire de solvants de grade UPLC :

- une solution tampon composée d'EUPLC et de 10 mM d'acétate d'ammonium (ajusté à pH 5),
- du méthanol UPLC.

Dans le tableau suivant est décrite la composition de l'éluant en fonction du temps :

Temps (min)	% de solution tampon	% MeOH UPLC	Débit (mL.min ⁻¹)
0	98	2	0,5
0,1	98	2	
3,6	1	99	
3,8	1	99	
5	98	2	

Lors de l'analyse, 20 μ L d'échantillons (maintenus à 5°C dans le passeur) sont injectés dans la colonne thermostatée à 40°C.

▪ ToF :

L'analyse est réalisée en mode MSE. Un lockspray (leucine) est utilisée comme référence pour les corrections de masse.

- Débit lockspray = 25 μ L.min⁻¹
- Masse lockspray = 556,2771 Da
- Résolution \approx 30000
- Intensité \approx 1.10⁵

Dans le tableau suivant sont répertoriés les ions pseudo-moléculaires [M+H⁺] et leurs fragments caractéristiques utilisés lors de l'analyse des 3 composés étudiés. L'ion pseudo-moléculaire permet de la quantification, le fragment permet la confirmation :

Molécules	Étalon interne associé	[M+H ⁺] : Quantification (Da)	Fragment : Confirmation (Da)
Diuron	Diuron D6	159,9721	72,0449
DCPU		161,9880	127,0000
DCPMU		161,9880	127,0000

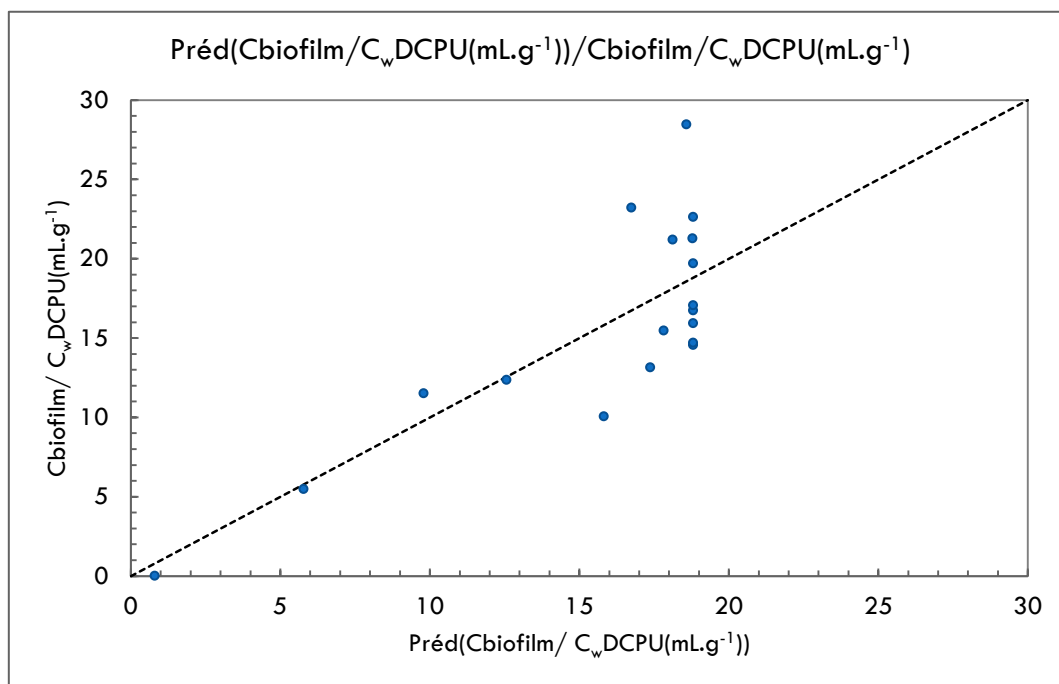


Figure 40 : Rapport des concentrations en DCPU dans le biofilm et l'eau en fonction des rapports de concentrations prédits par rapport au modèle cinétique d'ordre 1

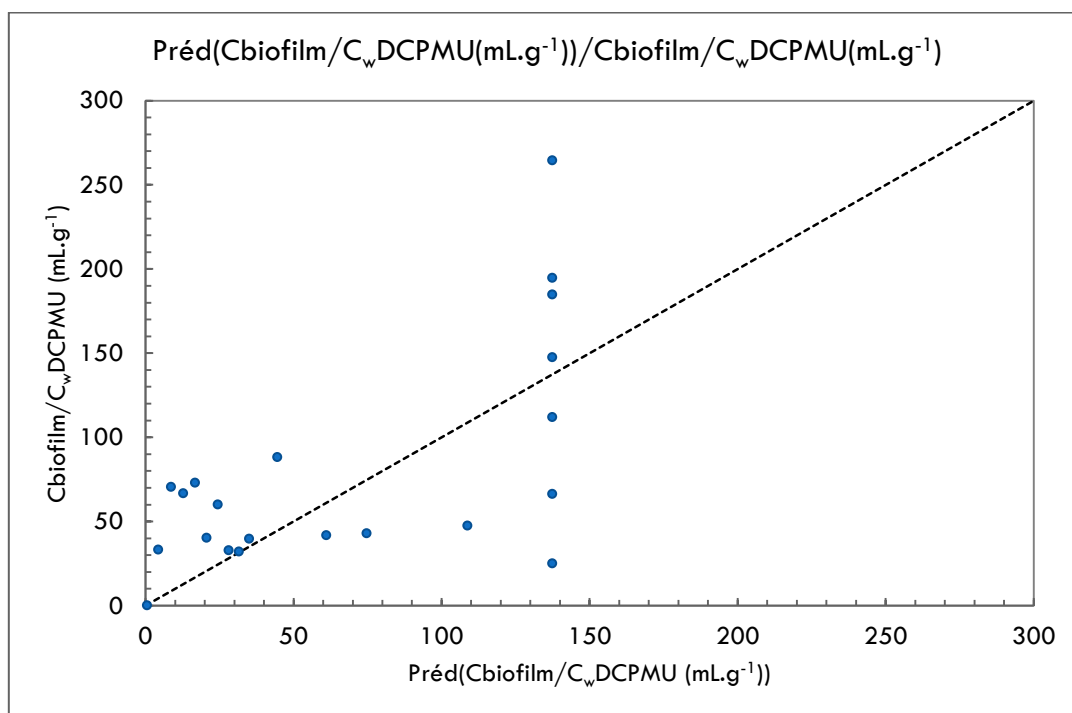


Figure 41 : Rapport des concentrations en DCPMU dans le biofilm et l'eau en fonction des rapports de concentrations prédits par rapport au modèle cinétique d'ordre 1

- RESUME -

De nos jours, les pesticides, par leur amélioration des performances agricoles, représentent un progrès considérable dans la maîtrise des ressources alimentaires et dans l'amélioration de la santé publique. Cependant, ces composés se retrouvent souvent dans les compartiments de l'environnement et tout particulièrement dans l'eau.

Afin d'améliorer les méthodes actuelles d'évaluation de l'état écologique des rivières, pour une meilleure prise en compte des impacts de polluants toxiques, de nombreux chercheurs se sont intéressés depuis quelques années à une composante primaire de la chaîne trophique : le biofilm. En effet, sa composition hétérogène, sa régénération rapide et sa sensibilité aux altérations anthropiques font de lui un excellent indicateur biologique pour la mise en œuvre de la DCE.

Dans cette étude, les objectifs sont d'élucider les cinétiques d'accumulation d'un herbicide et de ses métabolites principaux : diuron, DCPU, DCPMU. Pour ce faire, des lames recouvertes de biofilm ont été exposées à ces contaminants pendant une durée de 7 jours dans un bioréacteur annulaire rotatif. Les concentrations en contaminants ont été déterminées par UPLC-ESI-ToF dans les deux compartiments mis en jeu, soit l'eau et le biofilm. En parallèle, l'étude des effets toxiques par mesures biologiques de l'activité photosynthétique au cours de l'exposition, a été menée afin d'évaluer les stades où les contaminants sont potentiellement « biodisponibles ».

Finalement, cette étude a permis l'estimation des constantes cinétiques et d'équilibre des 3 composés. Cependant, au vu de l'atteinte rapide des équilibres, il semblerait que cette première étude sur 7 jours indique majoritairement le phénomène de diffusion des contaminants dans les pores constituant le biofilm et/ou l'adsorption sur la paroi, plutôt que de l'accumulation dans les cellules.

Mots clés : pesticides, biofilms, accumulation, cinétique.

- ABSTRACT -

Nowadays, pesticides, through their actions in agricultural field, represent considerable progress in food resources management and public health improvement. However, these compounds are often found in the environment and particularly in aquatic system.

To improve the current assessment methods of the ecological state of rivers, for a better consideration of the impacts of toxic pollutants, numerous researchers focused since a few years on a primary component of the food chain: the biofilm. Indeed, its heterogeneous composition, its fast regeneration and its sensibility to anthropological changes makes it an excellent biological indicator for the achievement of the objectives of the Water Framework Directive.

In this study, the objectives are to elucidate the accumulation kinetics of an herbicide and its main metabolites: diuron, DCPU, and DCPMU. To do it, biofilms colonized slides were exposed to these contaminants during 7 days in a biofilm annular reactor. The concentrations of contaminants were determined by UPLC-ESI-ToF in both compartments: water and biofilm. In the same time, the toxic effects were assessed through biological measurements of the photosynthetic activity. The aim was to estimate the stages where contaminants are potentially "bioavailable".

Finally, this study allowed the estimation of the kinetic constants of the 3 compounds targeted. However, in view of the fast achievement of the equilibrium, it seems that this first study on 7 days characterizes mainly the phenomenon of distribution of contaminants in the pores of biofilm and/or the adsorption on cell walls, rather than the intracellular internalization.

Keywords: pesticides, biofilms, accumulation, kinetics