



HAL
open science

Adaptation et résilience des communautés microbiennes benthiques aux substances pharmaceutiques

Hélène Rogue

► **To cite this version:**

Hélène Rogue. Adaptation et résilience des communautés microbiennes benthiques aux substances pharmaceutiques. *Ecotoxicologie*. 2022. hal-04372403

HAL Id: hal-04372403

<https://hal.inrae.fr/hal-04372403v1>

Submitted on 4 Jan 2024

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.



Distributed under a Creative Commons Attribution - NonCommercial - NoDerivatives 4.0 International License



**Mémoire de Master
Toxicologie et Écotoxicologie**

**Adaptation et résilience des
communautés microbiennes
benthiques aux substances
pharmaceutiques**

- Hélène Rogue

- UMR CARRTEL (Centre Alpin de Recherche sur les Réseaux Trophiques et les Écosystèmes Limniques), le Bourget-du-Lac
- UR RiverLy (Fonctionnement des hydrosystèmes), équipe Écotoxicologie Microbienne Aquatique, Villeurbanne

Sous la direction de :

Emilie Lyautey (CARRTEL) et Stéphane Pesce (RiverLy)

Remerciements

Je remercie l'Université Savoie Mont-Blanc ainsi que l'INRAE Lyon-Grenoble Auvergne-Rhône-Alpes pour leur accueil. Merci beaucoup à mes deux maîtres de stage : Émilie Lyautey et Stéphane Pesce, pour votre encadrement et l'opportunité que vous m'avez offerte de travailler sur ce sujet passionnant. Merci également aux équipes des laboratoires pour votre aide et ce j'ai pu découvrir à vos côtés : Nathalie Tissot, Chloé Bonnineau, Bernadette Volat, Nadine Curt-Grand-Gaudin, Bernard Motte, Christophe Rosy, Floriane Larras, Ayanleh Mahamoud Ahmed, et Laura Kergoat (merci pour tes conseils concernant la thèse !). C'était un peu le rush pour s'occuper des biofilms, alors merci beaucoup à vous Joséphine Véron et Landry Hughetto pour votre aide ! Merci à Marc Lacombe pour tes conseils et ton aide sur le terrain, c'était très apprécié.

Je tiens également à exprimer ma reconnaissance à l'équipe du LAMA pour les analyses de l'eau et des POCIS, ainsi que votre aide dans la compréhension des traitements réalisés : Corinne Brosse, Amandine Daval, Matthieu Masson et Cécile Miège. J'espère pouvoir bientôt travailler avec vous.

Je remercie vivement l'équipe pédagogique de mon master, et notamment Monsieur César Mattei, Madame Hélène Tricoire-Leignel et Madame Camille Savary, pour les cours passionnants et l'aide apportée dans mon parcours.

Un merci tout particulier aussi à Sylvain Billet, mon maître de stage en M1. Les travaux réalisés, et les échanges que nous avons eu m'ont vraiment donné envie de poursuivre en recherche.

Merci aussi à Alexy Rosa pour ton aide dans le traitement de mes données, et Ysé Pouyet ainsi qu'Elias Chetouane pour le boost de motivation et de bonne humeur que vous êtes au quotidien.

Enfin, je remercie ma famille pour votre soutien et la motivation que vous mettez à comprendre ce que je fais « en sciences ». Bisous à vous les littéraires, les artistes, les manuels... Et mon frère, tout aussi passionné que moi par les différentes disciplines scientifiques.

Liste des abréviations

Abrégé	Nom complet
AINS	Anti-inflammatoire non stéroïdien
C0	Concentration 0
CARRTEL	Centre Alpin de Recherche sur les Réseaux Trophiques et les Ecosystèmes Limniques
CE ₅₀	Concentration efficace médiane
chl α	Chlorophylle α
Conduct.	Conductivité
EDYTEM	Environnements, dynamiques et territoires de Montagne
EMA	Écotoxicologie microbienne aquatique
J _{xx}	Jour n ^o x
LAMA	Laboratoire de chimie des milieux aquatiques
LQ	Limite de quantification
MS-MS	Spectrométrie de masse en tandem
P	P-value
PCoA	Analyse des coordonnées principales
PICT	Pollution induced community tolerance
POCIS	Polar organic chemical integrative samplers
SMX	Sulfaméthoxazole
SMZ	Sulfaméthazine
Temp.	Température
UHPLC	Chromatographie en phase liquide
USMB	Université savoie mont blanc
ZABR	Zone atelier du bassin du Rhône

Table des matières

Remerciements

Liste des abréviations

Table des matières

1. Introduction	1
2. Matériel et méthodes	7
2.1 Site d'étude	7
2.2 Croissance et prélèvement des biofilms	9
2.3 Mesure des paramètres physico-chimiques de l'eau	9
2.4 Mesure des contaminations	11
2.5 Détermination de la tolérance aux pharmaceutiques par approche PICT	13
2.5.1 Préparation des suspensions	13
2.5.2 Mesure de l'activité β -glucosidase	13
2.5.3 Mesure de l'activité photosynthétique	13
2.5.4 Mesure de croissance des biofilms	15
2.6 Analyse des données	15
2.6.1 Ajustement des modèles dose-réponse	15
2.6.2 Analyse des coordonnées principales	17
3. Résultats	17
3.1 Données physico-chimiques	17
3.2 Mesure de la contamination de l'eau par les substances pharmaceutiques	17
3.3 Comparaison des tolérances acquises par les communautés des sites Amont et Aval après 28 jours de développement	19
3.4 Evolution de la tolérance des biofilms dans leur site d'origine et après translocation	19
3.5 Analyse en coordonnées principales	21
4. Discussion	21
5. Conclusion et perspectives	29
Références bibliographiques	
Annexes	
Résumé, mots-clés	

1. Introduction

Dans les milieux aquatiques, les microorganismes sont majoritairement associés sous forme d'assemblages adhérant à un substrat immergé (Flemming et al., 2016). Ils forment alors des biofilms qui sont des communautés microbiennes complexes avec une structure en trois dimensions. Sur des substrats inertes, tels que des roches ou des cailloux, on parle de biofilms épilithiques. Ceux-ci sont composés principalement de microalgues (en zone photique), de bactéries (dont des cyanobactéries), de virus, de champignons et de protozoaires. Les biofilms sécrètent une matrice majoritairement constituée de polysaccharides, d'enzymes et d'ADN qui les protège des agressions extérieures, permet l'adsorption de nutriments présents dans l'eau et favorise les échanges et les coopérations intercellulaires. Les biofilms jouent un rôle important dans les écosystèmes aquatiques, en participant notamment aux cycles biogéochimiques. Ils jouent également un rôle important dans la production de biomasse et peuvent constituer une base alimentaire pour les réseaux trophiques (Mora-Gomez et al., 2016).

La fixation des biofilms augmente leur temps de résidence sur un site donné où ils seront donc exposés aux variations de différents facteurs environnementaux, bien que protégés par leur matrice. Parmi ces facteurs, on relève notamment la concentration en nutriments et en carbone organique dissous, le pH, la température, mais aussi des polluants chimiques toxiques (Besemer, 2015). La majorité des connaissances actuelles concernant les effets toxiques des polluants chimiques sur les biofilms épilithiques porte sur les pesticides et le cuivre (Feckler et al., 2015). Récemment, une étude s'est penchée sur l'impact d'un mélange de nitrates, cuivre et pesticides sur des biofilms cultivés en laboratoire, et a montré que ces substances en mélange avaient un effet sur la structure des communautés microbiennes exposées, qui perdaient en biodiversité (Courcoul et al., 2022). Ces effets traduisent la disparition des espèces les plus sensibles aux contaminants, tandis que les espèces plus tolérantes peuvent survivre, voire se développer, engendrant ainsi une augmentation globale de la tolérance de la communauté, dans son ensemble, au(x) toxique(s) considéré(s). Cela est à la base de l'approche Pollution-Induced Community Tolerance (PICT), qui se base sur l'hypothèse que des communautés microbiennes exposées chroniquement à des polluants ont une augmentation de leur tolérance (Figure 1). Selon cette approche, les différences de tolérance développées par des communautés microbiennes naturelles, en fonction de leur niveau d'exposition chronique *in situ* à différents contaminants, sont mesurables sur la base de tests de toxicité aiguë, réalisés au laboratoire à l'échelle de la communauté dans son ensemble. L'approche PICT est donc proposée comme une méthode permettant d'appréhender spécifiquement les effets de certains types de substances sur les biofilms dans les milieux contaminés (Tlili et al., 2016), et d'aider à la détermination de l'état écologique des écosystèmes. Couplée à des expériences de translocation, visant à déplacer les communautés d'un site à un autre, l'approche PICT peut ainsi permettre de suivre l'acquisition ou la perte de tolérance, selon l'évolution de la pression toxique, en fonction du gradient de contamination des sites considérés. Ainsi, une autre étude a visé à mesurer les niveaux de tolérance de biofilms déplacés dans le bassin de la Seine, dont l'aval est contaminé par une accumulation de rejets urbains. Les résultats ont montré que les biofilms déplacés de la zone amont non contaminée vers la zone aval contaminée avaient acquis au bout de 30 jours une tolérance cinq fois plus grande au cuivre. Inversement, les communautés déplacées de l'aval vers l'amont avaient au bout de 30 jours une tolérance 8 fois moins grande qu'au départ (Fechner et al., 2012).

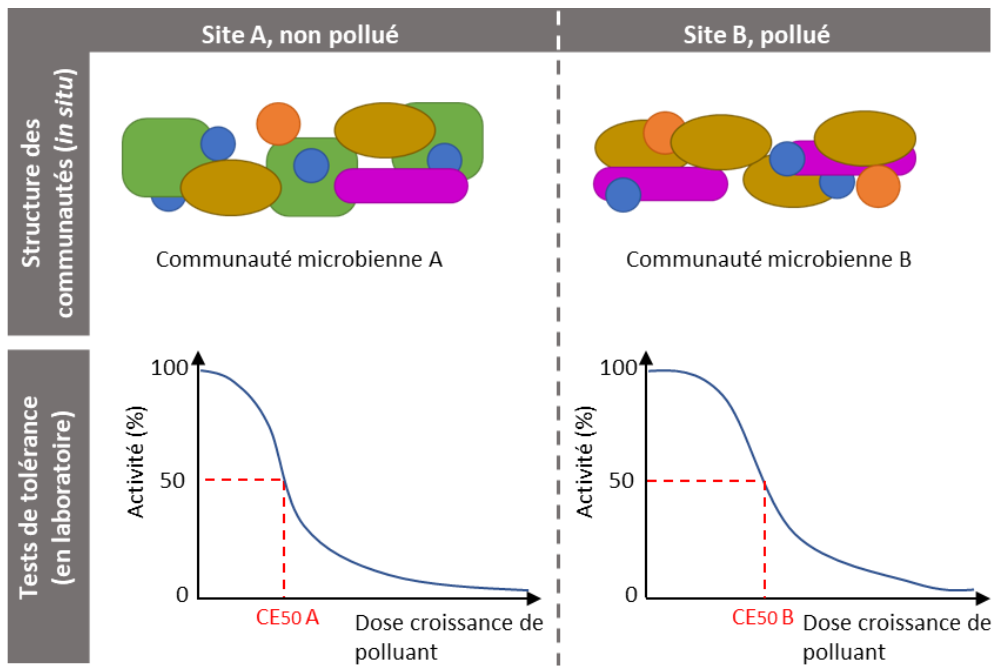


Figure 1 : Principe de l'approche PICT : la pollution d'un site entraîne sur le long terme la diminution des espèces sensibles dans les communautés microbiennes, et l'augmentation des espèces tolérantes. Les tests réalisés en toxicologie aiguë montrent une tolérance accrue des communautés microbiennes exposées. D'après Tlili (2016).

De la même manière, une exposition chronique des biofilms au diuron, un herbicide, peut induire une augmentation de leur tolérance, comme montré par Dorigo (2010). Dans cette étude, le déplacement des biofilms adhérant à des cailloux dans un petit cours d'eau situé en zone viticole, de l'amont peu contaminé vers l'aval contaminé par le diuron, a mis en évidence une acquisition progressive des communautés à cet herbicide. A l'inverse, une perte de tolérance, révélant une résilience, a été observée lors du déplacement de l'aval vers l'amont.

Cependant, les pesticides et le cuivre ne sont pas les seules substances toxiques présentes dans les écosystèmes aquatiques. Ainsi, la contamination de ces milieux par les substances pharmaceutiques, et ses effets écotoxicologiques, sont des questions de plus en plus soulevées. En effet, ce type de contamination a été mis en évidence dans les eaux de surface à l'échelle mondiale par Wilkinson et al. (2022), qui ont montré que celle-ci est généralisée et qu'elle concerne de nombreuses classes médicamenteuses : stimulants, hormones, antihistaminiques, β -bloquants, antidépresseurs... Le nombre et la fréquence des substances détectées, ainsi que les concentrations maximales mesurées sont variables selon les zones géographiques. En France, les concentrations cumulées maximales sont de l'ordre de quelques centaines de ng L^{-1} (Wilkinson et al., 2022). Ces valeurs sont comparables aux concentrations maximales relevées dans différents affluents de la mer Méditerranée (Desbiolles et al., 2018). Les sources de contamination par les substances pharmaceutiques sont variées (Figure 2). Les eaux usées urbaines et hospitalières contiennent les substances issues principalement des urines et excréments d'origine humaine et parfois des médicaments de personnes qui s'en débarrassent dans le réseau d'eau ou dans leurs déchets ménagers. Elles peuvent contaminer les cours d'eau *via* des rejets directs (débordements accidentels ou réseaux défectueux), ou les rejets des stations de traitement des eaux usées qui ne parviennent pas toujours à éliminer ce type de contamination (Chonova, Lecomte, et al., 2018; Kaplan, 2013). En milieu agricole, la contamination des eaux s'effectue principalement du fait de l'épandage sur les champs de boues contaminées issues des stations d'épuration, de lisier ou de fumier. Cela induit une contamination des sols par diverses substances pharmaceutiques (à usage médical ou vétérinaire) qui peuvent être transférées vers les milieux aquatiques par les précipitations. D'autres sources de contamination existent comme par exemple les rejets d'eaux usées des usines pharmaceutiques (Ortúzar et al., 2022) ou les rejets issus de l'aquaculture.

La pollution par des substances pharmaceutiques très variées engendre un stress toxique qui peut impacter les biofilms à différents niveaux. Par exemple, une étude avec un anti-inflammatoire non-stéroïdien : l'ibuprofène, a montré une diminution de la respiration et de la production primaire chez des biofilms exposés à 0.5 mmol L^{-1} pendant 54 jours (McClean & Hunter, 2020). La caféine – un stimulant, la diphényldramine – un antihistaminique, ainsi que la ciprofloxacine – un antibiotique, ont réduit la croissance algale dans des tests *in situ* durant lesquels les biofilms étaient captés sur deux supports différents (verre et éponge en cellulose) dans des cours d'eau pour permettre leur développement pendant 18 jours, puis étaient exposés aux substances séparément ou en mixture grâce à des gels d'agar chargés entre $0,012$ et $0,015 \text{ mol L}^{-1}$ fixés à côté de ces supports pour diffuser les polluants sur les communautés pendant cette période (Rosi-Marshall et al., 2013).

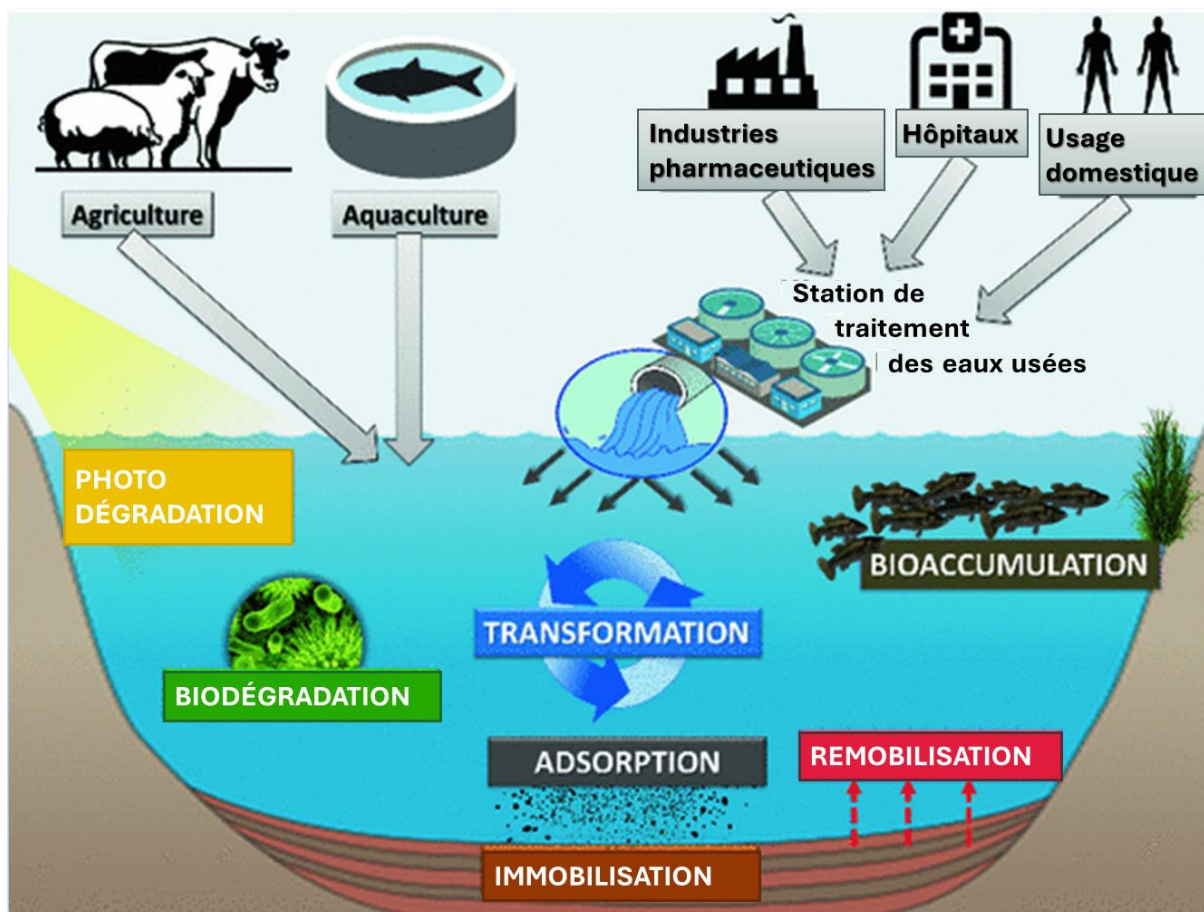


Figure 2 : Sources de contamination des milieux aquatiques par les substances pharmaceutiques (traduite d'après Klimaszuk & Rzymiski (2018).

Dans cette même étude, la caféine, la cimétidine – autre antihistaminique, la ciprofloxacine et la diphenhydramine ont également diminué la respiration des biofilms séparément et en mélange. Concernant la structure des communautés, Quinlan (2011) a mis en évidence la restructuration de biofilms exposés en mésocosmes à un antibiotique, la tétracycline, suite à des modifications de l'abondance de différents taxons au sein des communautés. Ces modifications étaient significatives dès 7 jours d'exposition à $0,5 \mu\text{g L}^{-1}$ de tétracycline. Par ailleurs, il a été montré que les antibiotiques favorisaient la sélection de gènes de résistance aux antibiotiques (Balcázar et al., 2015; Bonnineau et al., 2019; Chonova, Labanowski, et al., 2018). Ce type d'effets (restructuration et sélection de gènes de résistance) suggère une élimination des espèces les plus sensibles et une possible adaptation des communautés (*via* la sélection des espèces les plus résistantes) qui pourrait augmenter ainsi leurs capacités de tolérance.

Dans ce contexte, le projet PharmaTOX (2021-2023), financé par l'Agence de l'Eau RM&C et la zone atelier du bassin du Rhône (ZABR), vise à mieux caractériser la contamination de deux cours d'eau par les substances pharmaceutiques, et à évaluer ses conséquences sur les biofilms naturellement présents dans ces milieux. Ce projet est porté par l'équipe EMA (Écotoxicologie Microbienne Aquatique) de l'UR RiverLy du centre INRAE (Institut national de recherche pour l'agriculture, l'alimentation et l'environnement) Lyon-Grenoble Auvergne-Rhône-Alpes. Il implique une autre équipe de cet UR (LAMA, Laboratoire de chimie des milieux aquatiques), les UMR CARTEL (Centre Alpin de Recherche sur les Réseaux Trophiques et les Ecosystèmes Limniques) et EDYTEM (Environnements, DYnamiques et TERRitoires de Montagne) affiliées entre autres à l'Université Savoie Mont Blanc (USMB), ainsi que l'institut de recherche canadien, Agriculture and Agri-Food Canada. Les deux cours d'eau étudiés, l'Ardières et le Tillet, sont situés respectivement dans une zone agricole (zone viticole, Beaujolais) et urbaine (Aix-les-Bains). Deux suivis ont été réalisés en 2021 sur chacune des rivières. Ils ont permis de montrer dans ces cours d'eau, d'une part, une augmentation de la contamination par différentes substances pharmaceutiques d'amont en aval, comme cela avait été déjà observé en 2017 et 2018 (Pesce et al., 2019). D'autre part, une approche PICT a révélé une augmentation de la tolérance des communautés microbiennes présentes dans les eaux de surface (biofilms) et les sédiments à certaines de ces substances dans les zones les plus contaminées (Poulalion et al., 2021). Une des hypothèses pour expliquer cette augmentation de tolérance en présence de contamination concerne un changement de structure et de diversité des communautés, du fait du remplacement des espèces les plus sensibles par des espèces plus tolérantes. Afin de tester cette hypothèse, j'ai réalisé durant mon stage la préparation des échantillons prélevés en 2021 (conservés par congélation) pour étudier la diversité bactérienne par séquençage haut-débit et identifier les potentielles différences entre les rivières, et les stations, selon leur niveau de contamination. Les données issues du séquençage seront analysées courant juillet, après la remise de ce rapport. De ce fait, cet aspect traitant de l'analyse de la diversité ne sera pas détaillé dans celui-ci, même si elle figure dans l'Annexe 1 qui détaille l'enchaînement des travaux réalisés cette année.

Ce rapport développe les travaux réalisés pour étudier la dynamique spatio-temporelle des capacités de tolérance de communautés de biofilms exposés *in situ* à des produits pharmaceutiques dans la rivière Tillet, au niveau de la station amont, peu contaminée et servant de référence, et de la station aval, contaminée par des concentrations plus élevées. Afin de compléter les premiers résultats acquis en 2021, les travaux présentés

Tableau 1 : Résumé des tests et des substances d'exposition des biofilms

Test effectué	Exposition
Activité β -glucosidase	Ofloxacine
Activité photosynthétique	Aténolol
	Diclofénac
	Paracétamol
Croissance sur 72 heures	Érythromycine
	Sulfaméthoxazole
	Sulfaméthazine

avaient pour premier objectif de confirmer l'acquisition de tolérance des biofilms à certaines substances pharmaceutiques en aval du Tillet afin de valider la pertinence de l'approche PICT comme méthode permettant d'appréhender *in situ* les effets de ces substances sur les biofilms, en immergeant des biofilms pendant 4 semaines sur chacune des deux stations étudiées (amont et aval). Le deuxième objectif visait à appréhender si les niveaux de tolérance mesurés sur chacune des stations étaient stables dans le temps, en fonction notamment de la dynamique temporelle du niveau de contamination. Pour cela, l'immersion des biofilms a été prolongée pendant 6 semaines sur chacune des deux stations. Enfin, le dernier objectif visait à suivre la dynamique de la tolérance dans un contexte d'exposition croissante ou décroissante aux substances pharmaceutiques, en partant respectivement sur une hypothèse d'acquisition et de perte de tolérance dans ces deux situations. Afin de répondre à cet objectif, une étude de translocation a été réalisée, en déplaçant les biofilms d'une station à l'autre sur le Tillet après les 4 premières semaines d'immersion (i.e. de l'amont vers l'aval pour simuler une augmentation de la contamination et de l'aval vers l'amont pour simuler une baisse de la contamination).

Sur la base des protocoles développés récemment par l'équipe EMA, sept substances pharmaceutiques ont été choisies pour effectuer dans le cadre de l'approche PICT des tests sur trois activités des biofilms (Tableau 1). La première concerne l'activité de la β -glucosidase, une enzyme présente chez de très nombreux organismes et qui participe à la transformation de la cellulose en glucose (Yeoman et al., 2010). Dans la présente étude, l'activité de cette enzyme a été testée après exposition à une gamme d'ofloxacin, un antibiotique. Deuxièmement nous avons considéré l'activité photosynthétique, qui concerne notamment la composante algale et les cyanobactéries des biofilms. Cette activité a été mesurée en testant individuellement des gammes d'aténolol – un β -bloquant utilisé en traitement de l'hypertension artérielle, de diclofénac – un anti-inflammatoire non stéroïdien (AINS), et de paracétamol – un antalgique. Enfin, la croissance des biofilms a été mesurée pendant 72 heures après exposition à une gamme d'érythromycine, de sulfaméthoxazole (SMX), et de sulfaméthazine (SMZ) – des antibiotiques. Afin d'appréhender si les niveaux de tolérance mesurés sont représentatifs des niveaux d'exposition chronique dans la rivière, ils ont été confrontés aux concentrations moyennes de substances pharmaceutiques mesurées dans l'eau de surface grâce au déploiement d'échantillonneurs passifs de type POCIS (Polar Organic Chemical Integrative Samplers ; Morin et al., 2013).

2. Matériel et méthodes

2.1 Site d'étude

L'expérience de translocation a été menée sur la rivière du Tillet. Ce cours d'eau situé en Savoie a un bassin versant de 34 km² comprenant des zones agricoles et urbaines, pour un parcours de 13 km entre le pied du massif des Bauges et le lac du Bourget. En 2021, le Tillet avait un débit moyen de 0,513 m³ s⁻¹ (*Site hydrométrique - VI30 5210 : Le Tillet à Aix-les-Bains - Fiche d'identité | SCHAPI - HydroPortail*, s. d.). Deux stations ont été choisies dans le cadre de cette étude (Figure 3). La station « Amont » (45°36'56.5"N, 5°55'30.7"E) est située en zone agricole au début du parcours du Tillet sur la commune de Sonnaz (à 2,6 km de la source, le Tillet est parfois appelé dans cette zone Ruisseau d'Eau Blanche). La station « Aval » (45°41'35.6"N, 5°53'23.5"E) se trouve dans le Port du Tillet sur la commune d'Aix-les-Bains, qui représente l'embouchure avec le Lac du Bourget. Entre les stations Amont et Aval, le Tillet traverse la zone urbaine

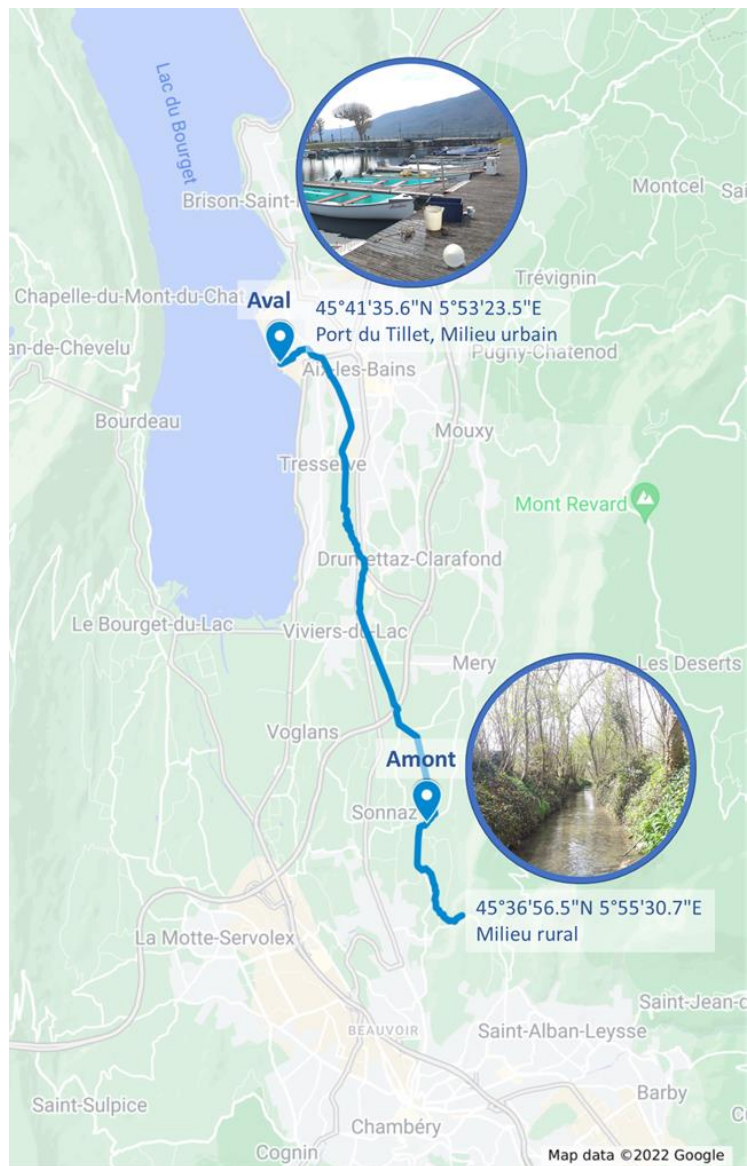


Figure 3 : Carte du cours d'eau étudié et stations de prélèvement : le Tillet (en bleu), sites Amont et Aval.



Figure 4 : Photographie d'une cagette issue de la station Aval contenant 4 lames couvertes de biofilm (prélèvement le 28 mars, J56)

d'Aix-les-Bains, principalement sous la forme d'une canalisation souterraine. Celle-ci reçoit directement une partie des effluents urbains non traités, du fait d'un réseau défectueux. Ces deux stations ont été choisies afin de considérer respectivement une station peu (Amont) et fortement (Aval) contaminée par des substances pharmaceutiques, comme précédemment observé (ex. en novembre 2017 et 2018 ; Pesce et al., 2019).

2.2 Croissance et prélèvement des biofilms

La croissance des biofilms *in situ* s'est déroulée du 31 janvier au 11 avril 2022 et les biofilms se sont développés sur des substrats artificiels. Pour cela, des lames de verre de 9×27 cm ont été fixées à l'intérieur de cagettes (12 cagettes contenant chacune 9 lames de verre) (Figure 4). La première phase de l'expérimentation a permis le développement initial des biofilms sur les lames de verres : à J0 (31 janvier 2022), 6 cagettes par station ont été immergées pour une durée de 4 semaines. La deuxième phase de l'expérimentation s'est déroulée à J28 (28 février), lorsque la moitié des biofilms ont subi une translocation (i.e. déplacement d'une station à l'autre) : ainsi 3 cagettes de la station Amont ont été prélevées puis transportées dans des bacs contenant l'eau de cette station jusqu'à l'Aval où elles ont à nouveau été immergées et 3 cagettes de la station Aval ont été prélevées puis transportées dans l'eau de cette station jusqu'à l'Amont où elles ont été immergées. La seconde moitié des biofilms n'a pas été déplacée : le reste des cagettes (3 par station) est resté sur sa station de développement initial. La troisième phase de l'expérimentation s'est déroulée de J28 à J70 (11 avril 2022), après la translocation. Elle visait à suivre l'évolution de la tolérance des biofilms au cours de l'expérimentation pour les biofilms issus des 4 conditions différentes : Amont, Ex-Amont (croissance initiale en Amont et translocation vers l'Aval), Aval et Ex-Aval (croissance initiale en Aval et translocation vers l'Amont), chacune en 3 réplicas biologiques (3 cagettes par condition). Le suivi temporel des tolérances des biofilms a été réalisé à J28, J42, J56 et J70. Pour cela, une à quatre lames (selon les analyses prévues) colonisées par les biofilms ont été prélevées et mises dans des bacs contenant l'eau de la station où elles se trouvaient au moment du prélèvement pour être transportées jusqu'au laboratoire. L'ensemble a été conservé à température ambiante avec un bulleur pendant la nuit. Le descriptif de l'expérience de translocation est représenté sur la Figure 5.

2.3 Mesure des paramètres physico-chimiques de l'eau

Des prélèvements d'eau ainsi que la mesure ponctuelle de paramètres physico-chimiques ont été effectués aux jours 0, 28, 42, 56 et 70. Les mesures de pH, de conductivité et de concentration en oxygène dissous ont été réalisées respectivement avec un pH-mètre (WTWTM pH 3210, sonde SenTixTM 41), un conductimètre (WTWTM cond 3210TM, sonde TetraConTM 325) et un oxymètre optique (sonde et boîtier YSITM ProODO). Les échantillons d'eau ont été rapportés au laboratoire où ils ont été conservés à 4°C, après filtration à $0,45 \mu\text{m}$. A J0, J28, J42, J56 et J70, la teneur en Cl^- , NO_2^- , NO_3^- , PO_4^{3-} , SO_4^{2-} , Na^+ , K^+ , Mg^{2+} , Ca^{2+} , NH_4^+ a été analysée par chromatographie ionique. En complément à ces mesures ponctuelles, la température de l'eau a été mesurée en continu (enregistrement à fréquence horaire à l'aide d'un capteur (HOBO[®] Pendant Temperature/Light, Prosensor) par stationfixé dans l'une de cagettes).

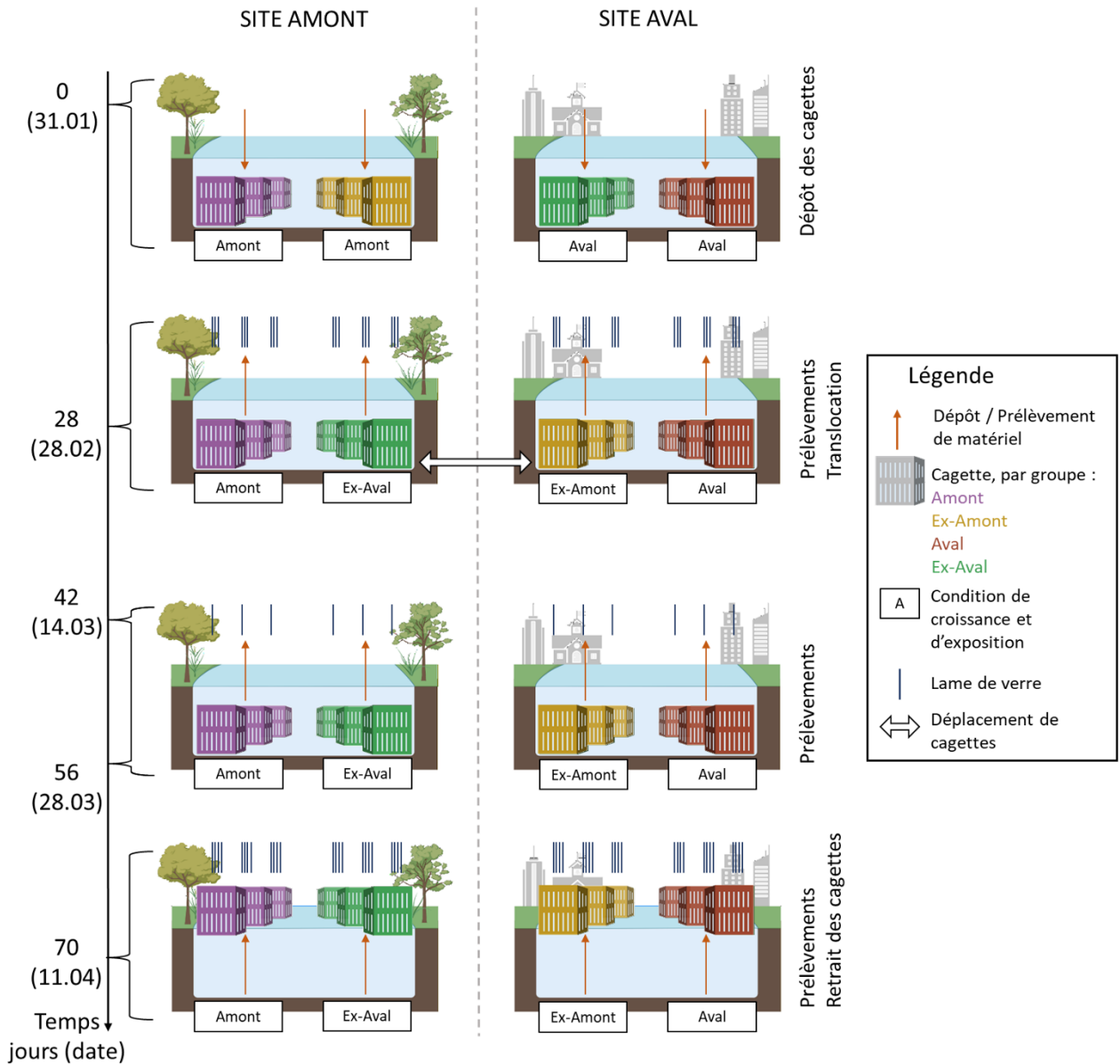


Figure 5 : Schéma illustrant les étapes de l'expérience de translocation et les prélèvements de biofilms sur la rivière du Tillet.

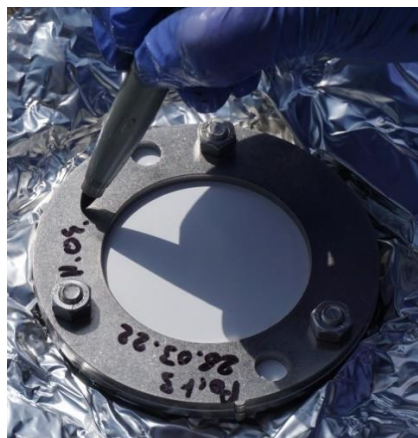


Figure 6 : Photographie d'un échantillonneur de type POCIS

2.4 Mesure des contaminations

L'analyse des 42 produits pharmaceutiques (Annexe 2) présents dans l'eau de surface dans chacune des deux stations a été réalisée à partir d'échantillonneurs intégratifs passifs de type POCIS (Polar Organic Chemical Integrative Samplers, Figure 6) (Morin et al., 2013). Ils sont constitués d'un cadre rond de métal fixant deux membranes entre lesquelles un adsorbant poreux permet de piéger les contaminants organiques hydrophiles, incluant notamment la plupart des substances médicamenteuses (mais aussi des pesticides). Les POCIS ont été exposés 14 jours. L'accumulation des contaminants dans les POCIS suit une cinétique en trois phases : une phase intégrative linéaire, une phase curvilinéaire, avant d'atteindre finalement un équilibre de partage des substances entre le POCIS et l'eau. Si les POCIS sont utilisés pour un échantillonnage dans une limite de temps inférieure ou égale à 14 jours – ce qui est notre cas – nous sommes dans la phase intégrative linéaire et la quantité des substances analysée dans l'échantillonneur peut être convertie en concentration de la substance dans l'eau moyennée dans le temps (en ng L^{-1}) d'après la quantité retrouvée dans le POCIS. Brièvement, les substances pharmaceutiques testées ont des taux d'échantillonnage R_s différents qui leur sont propres, qui ont été calculés par plusieurs études pour de nombreuses substances (Belles, 2012; Belles et al., 2014; Bonnaud et al., 2022; Capdeville, 2011; Li et al., 2010; MacLeod et al., 2007; Mazzella et al., 2007; N. Morin et al., 2013; Togola & Budzinski, 2007). Dans le cas des substances testées dont le R_s n'est pas défini par la littérature, on utilise une moyenne du R_s utilisé sur les autres substances pharmaceutiques. Les concentrations en substances (en ng g^{-1}) dans la phase du POCIS sont mesurées en laboratoire puis sont multipliées par la masse de phase (en g), et divisées par le nombre de jours d'exposition et le taux d'échantillonnage R_s .

Dans le cadre de ce travail, 5 jeux de 6 POCIS (3 par station) ont été utilisés (J0 à J14, J14 à J28, J28 à J42, J42 à 56 et J56 à J70). Pour chaque période de 14 jours, 3 POCIS sur la station Amont et 3 POCIS sur la station aval ont ainsi été fixés individuellement dans les caquettes et immergés. Les POCIS relevés après 14 jours d'exposition ont été transportés dans une glacière jusqu'au laboratoire où ils ont été conservés à -80°C jusqu'à analyse. A J42, l'un des POCIS prévus pour la pose dans la station Aval étant percé, seuls deux POCIS ont été déposés sur cette station. Les contaminants ont été extraits des POCIS en rinçant les membranes à l'eau sur un manifold : un dispositif contenant plusieurs feuilles sur lesquelles les substances viennent s'adsorber. Les différentes phases ont été éluées successivement avec du méthanol, un mélange 50/50 de méthanol et de dichlorométhane, et du dichlorométhane seul. Les éluats ont été évaporés et repris dans un mélange d'eau et de méthanol. L'analyse des substances pharmaceutiques récupérées a été réalisée par chromatographie en phase liquide (UHPLC) couplée à la spectrométrie de masse en tandem (MS-MS), sur une colonne en gel de silice greffé de chaînes C18. Des traceurs deutérés ainsi qu'un échantillon d'eau dopé ont permis de vérifier la fiabilité de l'extraction et de la détection, et des blancs ont été effectués à chaque série d'analyse pour s'assurer de l'absence de contamination de la colonne.

2.5 Détermination de la tolérance aux pharmaceutiques par approche PICT

2.5.1 Préparation des suspensions

Le lendemain des jours de prélèvement (J28, J43, J56 et J70), des suspensions de biofilms ont été préparées au laboratoire pour réaliser plusieurs tests de toxicité dans le cadre de l'approche PICT. Les lames des différentes cagettes ont été traitées séparément pour garder 3 répliques biologiques pour chacune des 4 conditions ; les lames prélevées dans une même cagette ont été traitées ensemble. Les biofilms ont été décollés à l'aide de lames de rasoir et remis en suspension dans 40 mL d'eau du site par lame de verre. Les suspensions ainsi constituées ont été mises sous agitation à température ambiante en attendant la réalisation des expérimentations PICT dans les 4 heures. Pour chaque station, 100 mL d'eau a été filtrée à 0,2 μm pour servir de blanc dans les approches PICT.

En complément des analyses PICT, 3 \times 2 mL de chacune des suspensions ont été prélevés, centrifugés à 10 000 \times g, et le culot conservé à -80°C pour des analyses moléculaires qui seront réalisées *a posteriori*. À J28 et J70, des lames supplémentaires ont été prélevées, et le biofilm remis en suspension a été conservé pour d'éventuelles analyses ultérieures de chimie.

2.5.2 Mesure de l'activité β -glucosidase

La tolérance des biofilms à l'ofloxacine a été évaluée à partir de tests de toxicité sur l'activité enzymatique β -glucosidase. Une préparation de substrat de la β -glucosidase a été réalisée avec du Muf-Glu (4 Methylumbelliféryl B D Glucopyranoside, Sigma-Aldrich®, CAS 18997-57-4) et de l'eau déminéralisée pour obtenir une solution à 1875 μM de Muf-Glu, conservée à l'abri de la lumière avant usage. Des microplaques ont été utilisées pour déposer en 3 répliques techniques les 3 répliques biologiques des 4 conditions et les exposer à une concentration nominale croissante d'ofloxacine en solution (6 à 370 mg L^{-1}) (Figure 7). Pour faire le blanc les mêmes expositions ont été faites sans réplique technique sur l'eau filtrée des stations. Pour chaque puit, 150 μL de suspension de biofilm ont été déposés, avec 50 μL d'ofloxacine (selon la gamme de concentrations testée) et 70 μL de la solution de Muf-Glu. Les plaques ont été incubées sous agitation à 15°C avec un éclairage. Après 4 h d'incubation, les réactions ont été arrêtées avec 30 μL de tampon pH 10,4. La fluorescence a été lue au fluorimètre en excitant la préparation à 360 nm et en effectuant la lecture de l'émission à 460 nm. La fluorescence a été corrigée par rapport aux blancs et moyennée par rapport aux valeurs à concentration 0 (C0).

2.5.3 Mesure de l'activité photosynthétique

La tolérance des biofilms au diclofénac, à l'aténolol et au paracétamol, testés individuellement, a été évaluée à partir de tests de toxicité sur l'activité photosynthétique. Ainsi chaque réplique biologique de chaque condition a été exposé en deux répliques techniques à une gamme de concentration de diclofénac (78 à 5000 mg L^{-1}), d'aténolol (104 à 6667 mg L^{-1}) et de paracétamol (104 à 6667 mg L^{-1}). Pour chaque suspension, un volume de 10 mL a été préparé en ajustant la concentration en chlorophylle des suspensions autour de 5000 $\mu\text{g L}^{-1}$ de chlorophylle α (chl α , estimée par fluorescence à l'aide d'un Phyto-PAM), en diluant les suspensions de biofilm dans l'eau filtrée de la station correspondante. Des microplaques noires ont été utilisées pour éviter le bruit

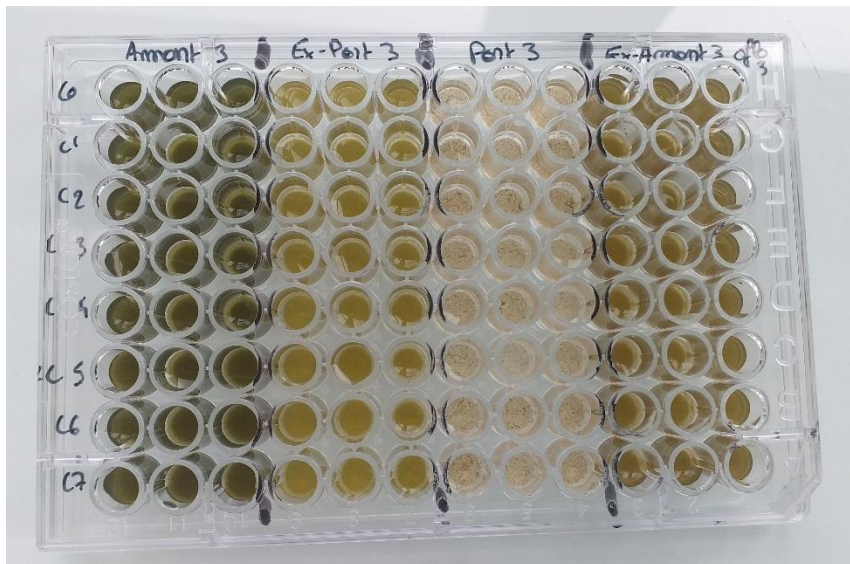


Figure 7 : Exemple de plaque : réplique technique n°3 de l'exposition des biofilms en suspension à l'ofloxacine

dans les mesures de photosynthèse. Dans chaque puit, 100 μL de la suspension ajustée de biofilm ou d'eau filtrée des stations et 200 μL de la substance active (selon la gamme de concentration testée) ont été déposés. Les plaques ont été laissées à incuber sous agitation dans un incubateur à 15°C et en éclairant les plaques. Après 4 h d'incubation, l'efficacité photosynthétique (rendement quantique) a été lue à l'Imaging PAM en effectuant plusieurs pulses de lumière à 660 nm car cette longueur d'onde est fortement absorbée par la chlorophylle, et en mesurant l'absorbance à chaque pulse. Le gain a été sélectionné manuellement pour chaque plaque afin d'obtenir une bonne détection et l'absence de saturation. Les résultats ont été convertis en pourcentages par rapport à C0.

2.5.4 Mesure de croissance des biofilms

La tolérance des biofilms à l'érythromycine, au sulfaméthoxazole et à la sulfaméthazine, testés individuellement, a été évaluée à partir de tests de toxicité sur la croissance des biofilms. Les suspensions de biofilms ont été ajustées à une concentration de chl α (estimée à l'aide d'un Phyto-PAM) autour de 700 à 900 $\mu\text{g L}^{-1}$ et exposées en deux répliques techniques à une gamme de concentration de produits pharmaceutiques en solution aqueuse. Les gammes de concentrations testées étaient, pour l'érythromycine : de 0,08 à 20 mg L^{-1} , pour le sulfaméthoxazole (SMX) : de 0,015 à 100 mg L^{-1} , et pour la sulfaméthazine (SMZ) : de 0,04 à 267 mg L^{-1} . Dans les puits de microplaques transparentes, 175 μL de suspensions ajustées ont été déposées, puis 100 μL de la substance active (selon la gamme de concentration testée) et 25 μL de nutriments en solution ($\text{Na}_2\text{SiO}_3 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ VWR®, CAS 10213-79-3, K_2HPO_4 Sigma®, CAS 7758-11-4, NaNO_3 Carlo Erba®, CAS 7631-99-4). Les puits extérieurs des plaques ont été réservés pour mettre 300 μL d'eau déminéralisée afin de limiter l'évaporation des puits de croissance. L'expérimentation a été conduite pendant 72 heures pour chaque produit pharmaceutique. Plusieurs fois par jour la fluorescence a été lue au lecteur de microplaques TECAN (longueur d'onde d'excitation : 430 nm, longueur d'onde d'émission : 680 nm) pour évaluer la croissance des biofilms. Le gain a été choisi manuellement lors de la première mesure et a été gardé pour tous les temps de mesures et toutes les plaques d'une expérimentation donnée. Entre les lectures, les plaques ont été conservées à l'incubateur à 15°C sous éclairage et agitation. Les plaques de croissance à J56 n'ont pas fourni de résultat exploitable et ont été retirées du traitement. Le taux de croissance a été calculé par régression linéaire en fonction du temps.

2.6 Analyse des données

2.6.1 Ajustement des modèles dose-réponse

Les traitements ont été effectués sous R avec les packages `gdata`, `plyr`, `dplyr`, `svDialogs`, `reshape2`, `tidyr`, `readxl`, `drc`, `ggplot2`, `ggrepel`. Les données issues des tests de toxicité ont été utilisées pour l'ajustement de cinq modèles log-logistiques afin de décrire l'effet des produits pharmaceutiques sur les activités considérées. Ils sont classiquement utilisés pour décrire des effets en écotoxicologie, et leurs paramètres permettent une plus ou moins grande souplesse pour l'ajustement aux données (Ritz et al., 2015). La sélection du meilleur modèle pour chaque lot de données est importante puisque selon les modèles les intervalles de confiance et l'estimation de certaines valeurs peut varier (Scholze et al., 2001). Les concentrations efficaces médianes (CE_{50}) ont été comparées par la technique

Tableau 2 : moyenne \pm écart-type (n = 5) des mesures ponctuelles de pH, conductivité (Conduct.), oxygène dissous (concentration et saturation) et des mesures en continu de la température (Temp.) sur les deux sites et pendant toute la durée de l'expérimentation.

Station	pH	Conduct. ($\mu\text{S cm}^{-1}$)	O ₂ (mg L ⁻¹)	O ₂ (%)	Temp. (°C)	NO ₂ ⁻ (mg L ⁻¹)	NO ₃ ⁻ (mg L ⁻¹)	NH ₄ ⁺ (mg L ⁻¹)	PO ₄ ³⁻ (mg L ⁻¹)
Amont	8,2 \pm 0,1	541,3 \pm 8,7	12,7 \pm 0,7	107,8 \pm 5,3	8,7 \pm 2,1	<0,05	9,6 \pm 1,3	0,03 \pm 0,01	<0,1
Aval	8,3 \pm 0,1	583,2 \pm 24,1	12,2 \pm 1,2	117,5 \pm 8,3	13,1 \pm 1,6	<0,05	5,5 \pm 0,7	0,06 \pm 0,02	0,12 \pm 0,01

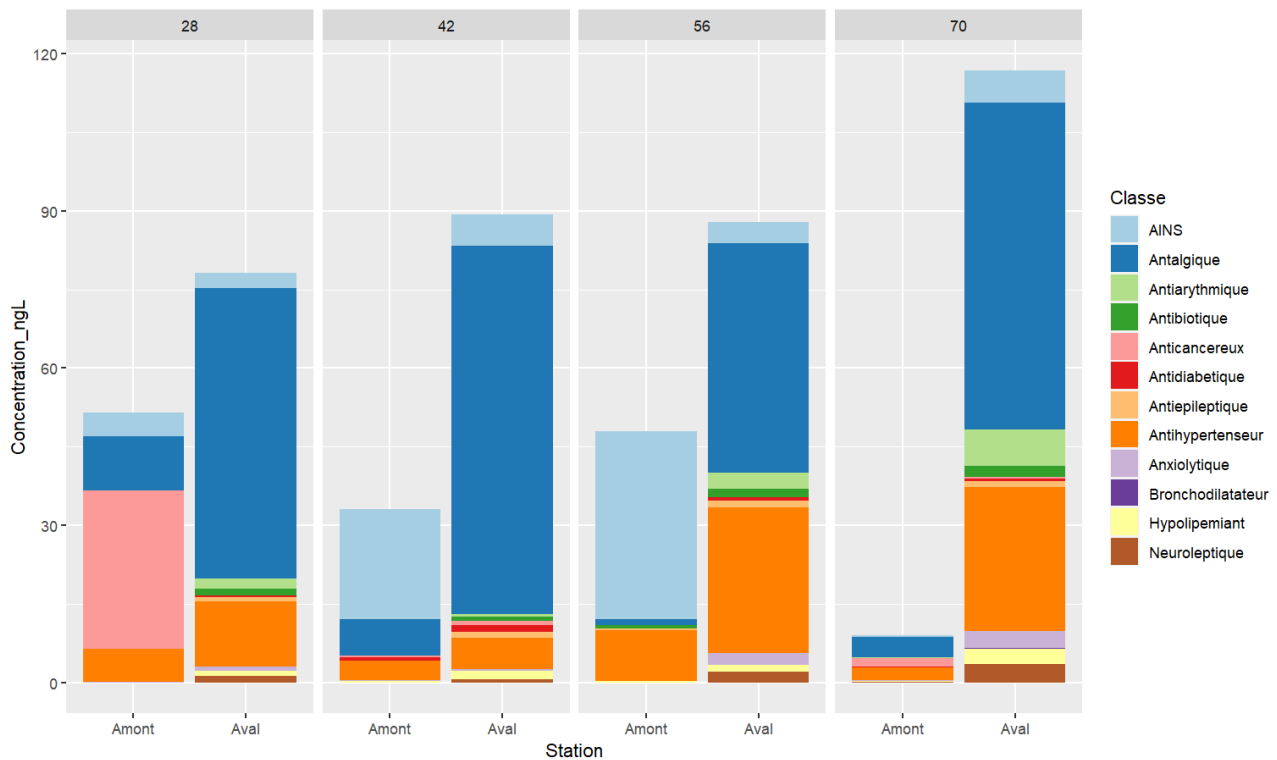


Figure 8 : Concentration moyenne cumulée (ng L⁻¹) de produits pharmaceutiques échantillonnés par POCIS par station, estimée par jour, à partir des données acquises sur 2 fois 14 jours (J28) ou 14 jours (J42, J56 et J70) d'exposition. AINS : anti-inflammatoire non stéroïdiens

du chevauchement des intervalles de confiance (IC) (O'Brien & Yi, 2016). Si deux IC ne se chevauchent pas, on peut conclure que les CE50 concernées sont significativement différentes ($P < 0,05$).

2.6.2 Corrélation entre les paramètres environnementaux et la contamination et la réponse biologique des communautés.

Les analyses de données ont été réalisées sous R avec le package *vegan* (Oksanen et al., 2022). La distance euclidienne entre les échantillons a été calculée à partir de l'ensemble des CE₅₀ obtenues. Sur la base de ces distances, une ordination des échantillons a été réalisée à l'aide d'une analyse des coordonnées principales (PCoA), et les échantillons ont été projetés sur deux dimensions : plus les échantillons sont éloignés sur le plan, plus leurs réponses biologiques sont différentes, tandis que des biofilms ayant des réponses biologiques similaires seront proches sur la représentation graphique générée. Les vecteurs des variables environnementales et de la contamination chimique ont été ajustés sur la représentation graphique précédente en utilisant la fonction « *envfit* » du package *Vegan*. Cette fonction calcule la qualité de l'ajustement (goodness-of-fit) des vecteurs sur la représentation graphique de la PCoA et la significativité des corrélations testées sur la base de 999 permutations aléatoires.

3. Résultats

3.1 Données physico-chimiques

La caractérisation physico-chimique de l'eau du Tillet a été réalisée par des enregistrements horaires (température) et des mesures ponctuelles *in situ* aux dates de prélèvement, complétés par des analyses au laboratoire de l'eau prélevée (Tableau 2). L'ensemble des paramètres suivis ne diffère pas entre le site Amont et Aval (pH, conductivité et oxygène dissous), à l'exception de la température moyenne, plus élevée à la station Aval ($13,1 \pm 1,6^\circ\text{C}$) qu'Amont ($8,7 \pm 2,1^\circ\text{C}$). Les concentrations en ammonium, nitrite et orthophosphates ne diffèrent pas entre les deux sites, au contraire des concentrations en nitrate plus importantes en Amont ($9,6 \text{ mg L}^{-1}$) qu'en Aval ($5,5 \text{ mg L}^{-1}$).

3.2 Mesure de la contamination de l'eau par les substances pharmaceutiques

La contamination de l'eau aux stations Amont et Aval par une large gamme de substances pharmaceutiques ($n=42$, voir Annexe 2) a été déterminée grâce aux POCIS immergés sur des périodes de 14 jours. Les résultats présentés (Figure 8) sont donc la moyenne des concentrations depuis le précédent prélèvement de biofilms jusqu'au nouveau. Pour le prélèvement à J28, on présente la contamination moyenne dans l'eau (ng L^{-1}) depuis la pose initiale des cagettes (soit la moyenne des POCIS immergés respectivement pendant la première puis la deuxième période de 14 jours). Sur toute la durée de l'expérience, la contamination de la station Aval, sur la base des substances analysées, est plus élevée qu'en Amont (de 1,5 fois à J28 à 13 fois à J70). Parmi les 42 substances pharmaceutiques analysées, 23 ont été retrouvées au-dessus de la limite de quantification au cours de l'étude. Les substances pharmaceutiques principalement retrouvées sont de la classe des antalgiques (on retrouve du paracétamol) et des antihypertenseurs (en particulier l'aténolol et l'irbesartan). Concernant les substances utilisées dans l'approche PICT, les quantités détectées sont présentées

Tableau 3 : Concentration moyenne (ng L⁻¹) de produits pharmaceutiques filtrés sur les POCIS par jour entre les prélèvements et par station. Les limites de quantification (LQ) sont indiquées entre parenthèses.

Substance	Station	J0-J28	J29-J42	J42-J56	J56-J70
Ofloxacine (antibiotique)	Amont	<LQ (0,31-1,14)	<LQ (0,3-0,36)	<LQ (0,34-0,39)	<LQ (0,31-0,33)
	Aval	<LQ (0,3-0,61)	<LQ (0,38-0,4)	<LQ (0,34-0,6)	<LQ (0,31-0,33)
Diclofénac (AINS)	Amont	0,3 ± 0,2 (0,07-0,15)	0,1 ± 0,03 (0,05-0,25)	0,1 ± 0,09 (0,11-0,16)	0,2 ± 0,26 (0,09-0,13)
	Aval	1,7 ± 0,3 (0,07-0,33)	1,8 ± 0,2 (0,18-0,36)	3,2 ± 1,4 (0,07-1,18)	5 ± 0,3 (0,08-0,08)
Aténolol (β-bloquant)	Amont	4,1 ± 7,5 (0,16-0,56)	2,3 ± 1,9 (0,16-0,19)	8,5 ± 11,1 (0,18-0,22)	1,6 ± 1 (0,16-0,18)
	Aval	1,6 ± 1,2 (0,15-0,3)	1,9 ± 0,2 (0,19-0,23)	19,9 ± 25,2 (0,17-0,32)	4,9 ± 1,2 (0,17-0,18)
Paracétamol (antalgique)	Amont	10,2 ± 4,8 (0,77-2,9)	6,9 ± 0,7 (0,76-0,87)	1,2 ± 0,2 (0,79-0,97)	3,9 ± 0,2 (0,76-0,8)
	Aval	55,3 ± 7,3 (0,73-1,62)	70,2 ± 6,4 (0,87-0,96)	43,7 ± 15,2 (0,88-1,21)	62,3 ± 5,6 (0,8-0,81)
Erythromycine (antibiotique)	Amont	<LQ (1,01-3,74)	<LQ (0,99-1,18)	<LQ (1,12-1,29)	<LQ (1,02-1,09)
	Aval	<LQ (0,98-2)	<LQ (1,24-1,31)	<LQ (1,1-1,97)	<LQ (1,03-1,09)
Sulfaméthoxazole (antibiotique)	Amont	<LQ (0,1-0,39)	<LQ (0,11-0,13)	<LQ (0,11-0,13)	<LQ (0,12-0,13)
	Aval	0,4 ± 0 (0,1-0,19)	0,5 ± 0,1 (0,12-0,12)	0,5 ± 0,3 (0,13-0,14)	0,5 ± 0,1 (0,12-0,14)
Sulfaméthazine (antibiotique)	Amont	<LQ (0,16-0,66)	<LQ (0,17-0,21)	<LQ (0,19-0,22)	<LQ (0,18-0,2)
	Aval	<LQ (0,16-0,32)	<LQ (0,21-0,26)	<LQ (0,19-0,56)	<LQ (0,18-0,19)

dans le Tableau 3. L'érythromycine, la sulfaméthazine et l'ofloxacine étaient en dessous de la limite de quantification au niveau des deux stations étudiées pendant toute la durée de l'expérience. La contamination Aval était toujours plus forte pour le sulfaméthoxazole (0,5 ng L⁻¹ en Aval et <LQ Amont) et le diclofénac (2,9 et 0,2 ng L⁻¹ en Aval et Amont, respectivement). Mais pour l'aténolol à J28 et J42 c'est l'Amont qui était davantage contaminé (1,8 et 3,2 ng L⁻¹ pour Aval et Amont), puis la tendance s'est inversée (12,4 et 5 ng L⁻¹, respectivement).

3.3 Comparaison des tolérances acquises par les communautés des sites Amont et Aval après 28 jours de développement

Les concentrations efficaces médianes (CE₅₀) et leurs intervalles de confiance pour les différentes substances testées sur 3 activités sont présentées dans le Tableau 4: ces données ont été modélisées avec les données des tests de toxicité réalisés sur les communautés des biofilms épilithiques échantillonnés après 28 jours de colonisation aux sites Amont ou Aval. Pour l'activité β -glucosidase associée à une exposition à l'ofloxacine, les CE₅₀ obtenues pour les communautés Aval (152 mg L⁻¹) sont significativement plus importantes que pour les communautés Amont (93 mg L⁻¹). Concernant l'activité photosynthétique, des tolérances plus importantes au diclofénac et à l'aténolol sont observées à l'Aval (901 et 4032 mg L⁻¹, respectivement) qu'à l'Amont (419 et 1343 mg L⁻¹). L'exposition au paracétamol ne permet pas d'observer de différence de CE₅₀ pour l'activité photosynthétique entre les communautés Amont et Aval. Enfin, pour la croissance des communautés exposées à l'érythromycine, au sulfaméthoxazole ou à la sulfaméthazine, la seule différence significative observée concernait le sulfaméthoxazole avec une CE₅₀ plus importante en Amont (51 mg L⁻¹) qu'en Aval (20 mg L⁻¹).

3.4 Evolution de la tolérance des biofilms dans leur site d'origine et après translocation

L'évolution de la tolérance au cours du temps est présentée pour les couples activité/substance pour lesquels une différence significative dans la réponse des biofilms a été observée entre les stations à J28, et pour lesquelles des résultats pour tous les temps de prélèvement (J28, J42, J56 et J70) ont été obtenus. Ces résultats concernent le test de l'ofloxacine sur l'activité β -glucosidase, et les tests de l'aténolol et du diclofénac sur l'activité photosynthétique. Les résultats sont présentés dans la Figure 9.

La tolérance des biofilms à l'ofloxacine, mesurée à partir de tests de toxicité sur l'activité β -glucosidase, évolue fortement au cours du temps en Amont comme en Aval au sein des communautés non déplacées, avec des évolutions variables suivant les temps et la station concernée. En fin de suivi (J70), les CE₅₀ mesurées ne permettent pas de distinguer une différence de tolérance entre ces conditions au dernier prélèvement. De la même façon, la tolérance des communautés déplacées d'Amont vers l'Aval, et *vice-versa*, varie au cours du temps sans suivre une tendance régulière ni la cinétique des communautés non déplacées.

Les biofilms maintenus en Amont ont une tolérance au diclofénac relativement stable dans le temps avec une CE₅₀ moyenne, mesurée à partir de tests sur l'activité photosynthétique, comprise entre 419 et 572 mg L⁻¹. La tolérance des biofilms maintenus en Aval augmente à partir de J56, et est 2 fois plus élevée à J70 qu'à J28 (1966 et 901 mg L⁻¹, respectivement) et elle est significativement plus élevée qu'à l'Amont durant

Tableau 4 : Concentrations efficaces médianes (CE50) et intervalles de confiance associés (IC – valeurs entre parenthèses) pour les biofilms provenant des sites Amont et Aval, collectés à J28, après 4 semaines de développement sur site, pour les 3 activités considérées (β -glucosidase, photosynthèse et croissance) et les substances correspondantes auxquelles les communautés ont été exposées au cours du test PICT.

Activité	Substance d'exposition	Amont(mg L⁻¹)	Aval(mg L⁻¹)
β -glucosidase	Ofloxacine	93,2 (84,1 - 102,4)	152,0 (121,6 - 182,5)
Photosynthèse	Diclofénac	419,0 (339,4 - 498,5)	901,2 (676,2 - 1126,2)
	Aténolol	1343,1 (1258,4 - 1427,7)	4031,8 (3283,4 - 4780,2)
	Paracétamol	6270,7 (5511,4 – 7030,0)	9989,4 (5315,3 - 14663,4)
Croissance	Erythromycine	1,55 (1,26 - 1,84)	1,03 (0,76 - 1,30)
	Sulfaméthoxazole (SMX)	51,3 (40,6 - 61,9)	19,8 (11,9 - 27,7)
	Sulfaméthazine (SMZ)	47,7 (33,4 – 62,0)	48,1 (33,1 – 63,0)

tout le suivi. Le groupe déplacé d'Aval en Amont (Ex-Aval) perd progressivement en tolérance au cours du temps, et la CE_{50} moyenne mesurée à J70 est deux fois moins élevée qu'à J28 (462 et 901 mg L⁻¹, respectivement). Elle est ainsi similaire à celle trouvée pour les biofilms Amont à J56 et J70. A l'inverse, les biofilms Ex-Amont (déplacés vers l'Aval) gagnent progressivement en tolérance vis-à-vis du diclofénac, et les CE_{50} moyennes mesurées à J70 sont environ deux fois plus élevées que celles mesurées à J28 (956 et 419 mg L⁻¹, respectivement). A J70, elles sont alors significativement plus élevées que celles mesurées avec les biofilms Amont mais restent significativement plus basses que celles des biofilms Aval.

Les CE_{50} mesurées pour l'aténolol à partir de tests sur la photosynthèse montrent une tolérance des biofilms Aval plus importante que celle des biofilms Amont tout au long du suivi. La tolérance mesurée dans les biofilms Amont augmente légèrement et de manière progressive entre J28 (CE_{50} moyenne : 1343 mg L⁻¹) et J70 (2090 mg L⁻¹), tandis que celle mesurée dans les biofilms Aval diminue fortement entre J28 (4032 mg L⁻¹) et J42 (2569 mg L⁻¹) avant de se stabiliser à J56 et J70. Après la translocation, les biofilms Ex-Amont et Aval ont des tolérances similaires dès J42 et celles-ci sont significativement supérieures à celles mesurées avec les biofilms Amont. La tolérance Ex-Aval à J42 est plus basse que celle de l'Aval et plus grande que celle de l'Amont, avant de devenir similaire à la tolérance Amont pour les temps suivants.

3.5 Relations entre les paramètres environnementaux et la contamination chimique, et la réponse des communautés

La projection en PCoA des distances euclidiennes entre les échantillons, calculées à partir des CE_{50} obtenues aux différents tests PICT permet de distinguer clairement les échantillons provenant des biofilms Amont et Aval (Figure 10). Les biofilms Amont restent similaires au cours du temps et forment un cluster plus regroupé que les biofilms Aval qui présentent une plus grande variabilité temporelle. Les échantillons ayant subi une translocation montrent une évolution temporelle de leur réponse biologique ; de J42 à J70, les coordonnées des échantillons de biofilms ayant été déplacés de l'aval vers l'amont (Ex-Aval) sont initialement plus proches des échantillons Aval puis tendent à se déplacer vers le cluster d'échantillons Amont. Les échantillons de biofilms Ex-Amont ont une dynamique opposée : ils sont d'abord proches du cluster Amont pour se rapprocher des échantillons Aval au cours du temps.

L'analyse « envfit » permet de mettre en évidence des corrélations significatives entre l'ordination des échantillons et les concentrations en nitrates ($P < 0,01$), antibiotiques ($P < 0,01$), antalgiques ($P < 0,01$), hypolipémiants ($P < 0,05$), Mg^{2+} ($P < 0,05$) et la température ($P < 0,05$) (Figure 10).

4. Discussion

La contamination des cours d'eau par les substances pharmaceutiques est une problématique grandissante qui concerne l'ensemble des continents (Wilkinson et al., 2022). Ce type de pollution d'origine anthropique est susceptible d'induire des effets écotoxicologiques et d'affecter la qualité écologique de ces écosystèmes. Les biofilms épilithiques, qui jouent un rôle important dans les cours d'eau en participant notamment à la production de biomasse à la base des réseaux trophiques et au recyclage de la matière organique, sont particulièrement exposés aux substances pharmaceutiques présentes dans les eaux de surface.

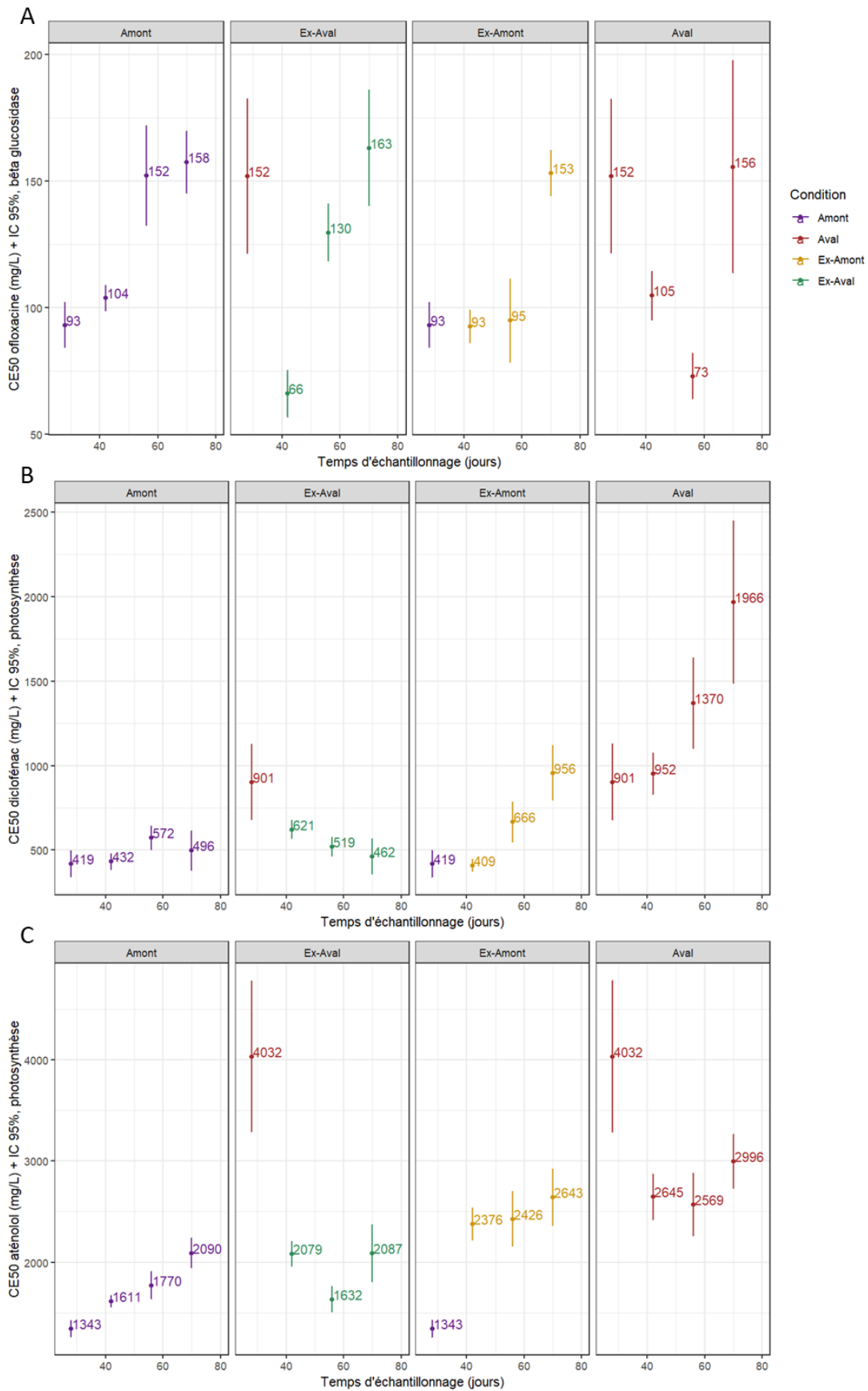


Figure 9 : Evolution temporelle des concentrations efficaces médianes (CE50 et intervalles de confiance - IC) obtenues pour l'activité et les substances testées (A) β-glucosidase et ofloxacin, (B) photosynthèse et diclofénac, (C) photosynthèse et aténolol) pour les 4 conditions de notre expérimentation : Amont, Ex-Aval, Ex-Amont et Aval

Ce type d'exposition chronique peut entraîner une sélection d'espèces tolérantes au sein de ces communautés microbiennes et engendrer une acquisition de tolérance de la communauté, conformément au concept PICT (Corcoll et al., 2014).

Dans ce contexte, la présente étude s'est penchée sur la contamination des eaux de surface du Tillet, cours d'eau situé en Savoie, par différentes substances pharmaceutiques et les effets qui en découlent sur des biofilms épilithiques naturellement présents dans cette rivière. Pour ce faire, nous avons évalué l'évolution spatio-temporelle de la tolérance des communautés microbiennes formant ces biofilms au niveau de deux stations situées en Amont et en Aval du cours d'eau en utilisant une approche PICT, appliquée en considérant différentes substances modèles (ofloxacine, aténolol, diclofénac, paracétamol, érythromycine, sulfaméthoxazole, sulfaméthazine) dont nous avons mesuré la toxicité sur l'une des trois activités microbiennes suivantes (activités photosynthétiques, croissance algale et activité enzymatique beta-glucosidase). Le choix des stations d'étude a été déterminé sur la base de connaissances antérieures des niveaux de contamination, mesurés lors de précédents suivis sur le Tillet (réalisés en 2017 et 2018), qui ont permis de mettre en évidence l'existence d'un gradient croissant de concentrations de différentes substances pharmaceutiques de l'Amont vers l'Aval, principalement du fait de rejets urbains non traités au niveau de la ville d'Aix-les-Bains (Pesce et al., 2019). Les deux stations étudiées présentent donc des niveaux de contamination par ces substances très contrastés, permettant ainsi de considérer des biofilms soumis à des niveaux d'exposition différents, relativement faibles en amont et élevés en aval. S'appuyant sur ce gradient spatial et en réalisant un suivi pendant 12 semaines, notre premier objectif était de vérifier si les biofilms issus de la station fortement contaminée par des substances pharmaceutiques (aval) avaient une tolérance plus élevée à certaines de ces substances que ceux issus de la station moins contaminée (amont). Deuxièmement, nous avons étudié si cette tolérance était stable dans le temps, et si son évolution temporelle, selon la substance prise en considération, était corrélée à l'évolution des concentrations mesurées dans les eaux de surface (à l'aide d'échantillonneurs passifs de type POCIS). Enfin, nous nous sommes demandé si un changement marqué du niveau d'exposition des biofilms épilithiques aux substances pharmaceutiques (ex. lors d'un épisode de pollution ou au contraire suite à la restauration chimique d'un cours d'eau) pouvait induire un changement rapide dans la tolérance des communautés épilithiques aux substances pharmaceutiques. Pour ce faire, nous avons alors réalisé une expérience de translocation, en déplaçant les biofilms entre les deux stations, de l'Amont vers l'Aval pour mimer une pollution (en faisant l'hypothèse d'une augmentation de tolérance) et de l'Aval vers l'Amont pour mimer une restauration (en faisant l'hypothèse d'une perte de tolérance).

Le suivi de la contamination des eaux de surface par les substances pharmaceutiques a été effectué pour 42 substances dont 26 ont été détectées au moins une fois dans les POCIS déployés sur l'une et/ou l'autre des deux stations. Sur la base de la somme de ces substances, une contamination de l'eau plus forte sur la station Aval que sur la station Amont a été relevée durant toute la durée du suivi. Ces résultats sont cohérents avec les suivis réalisés par Pesce et al. (2019) en novembre 2017 et 2018, qui mettaient en évidence une contamination cumulée (sur la base de 23 substances pharmaceutiques analysées) plus forte en Aval qu'en Amont. Cela confirme donc une contamination du cours d'eau dans sa partie située en aval de la ville d'Aix-les-Bains. Il est cependant intéressant de souligner que des substances pharmaceutiques sont également

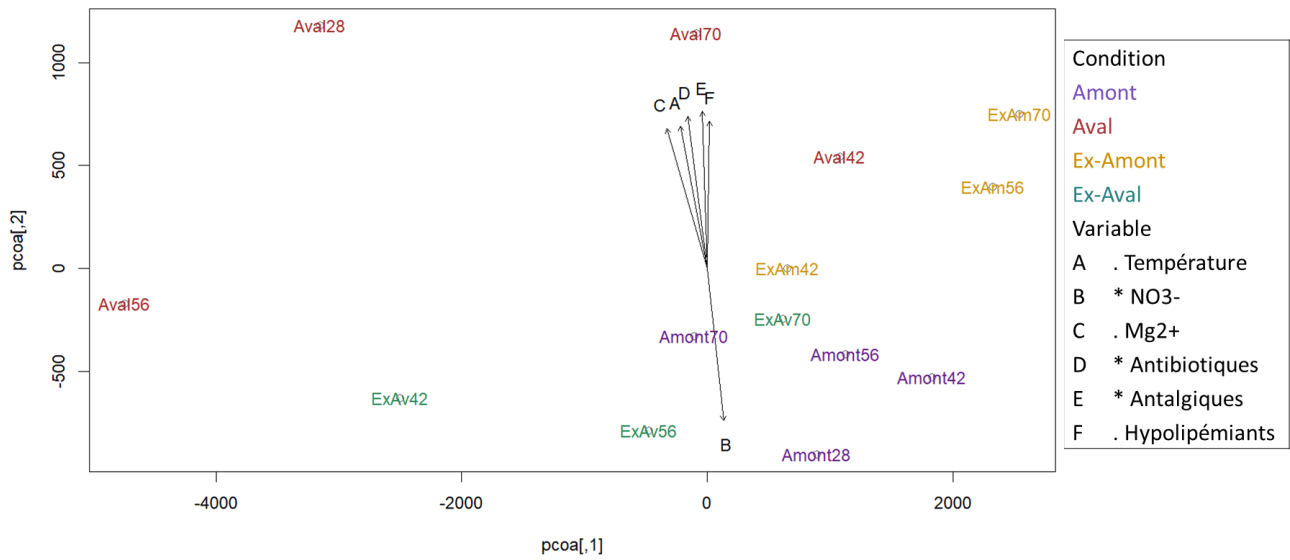


Figure 10 : Représentation en deux dimensions de l'analyse en coordonnées principales (PCoA) des distances euclidiennes calculées sur les CE₅₀ obtenues lors des tests PICT. Les flèches noires représentent les variables environnementales et décrivant la contamination pharmaceutique présentant des corrélations significatives avec la projection des échantillons. (• : P < 0,05 ; * : P < 0,01).

détectées au niveau de la station Amont mais les concentrations cumulées mesurées sont 1,5 à 13 fois moins élevées que celles mesurées en aval. La contamination sur les deux sites varie dans le temps, tant au niveau de la concentration cumulée mesurée que du nombre de substances détectées. Ces variations peuvent être en partie expliquées par une consommation variables de médicaments par les habitants présents dans les différentes zones traversées par le Tillet (notamment variation jour/nuit, semaine/weekend). Cela est en particulier le cas au niveau d'Aix-les-Bains. En passant dans cette zone l'eau peut alors se charger en contaminants pharmaceutiques qui s'accumulent dans le port situé au niveau de la station Aval. Différents paramètres environnementaux peuvent également expliquer ces variations, notamment les niveaux de précipitations, qui influencent fortement le transfert des substances vers le cours d'eau et leur niveau de dilution, selon le débit.

Les essais de toxicité réalisés en laboratoire avec 7 substances pharmaceutiques et l'une des trois activités biologiques ont permis d'observer dans certains cas une différence de tolérance entre les biofilms issus des stations Amont et Aval. La tolérance à l'ofloxacine, mesurée grâce au test de l'activité β -glucosidase, montre une différence de tolérance entre les deux stations à J28. Cependant, cette tolérance n'était pas stable dans le temps avec des variations observées en amont comme en aval. La différence de tolérance à J28 entre les deux stations et ces variations au cours du temps ne sont pas expliquées par les concentrations en ofloxacine dans l'eau car celles-ci sont restées sous la limite de quantification ($<0.42 \text{ ng L}^{-1}$) au niveau des deux stations durant toute la durée du suivi. Cela illustre que la tolérance des communautés naturelles à une substance peut être conditionnée par différents facteurs, comme la présence d'autres substances chimiques (phénomène de cotoxalité) ou les propriétés intrinsèques des biofilms qui sont elles-mêmes variables selon les conditions environnementales (température, débit, etc.).

Les tolérances au diclofénac et à l'aténolol, mesurées par un test d'activité photosynthétique, montrent une tolérance des biofilms issus de l'Aval plus grande que pour les biofilms issus de l'Amont. Comme pour l'ofloxacine, les différences de tolérance à l'aténolol entre l'amont et l'aval ne reflètent pas les différences de concentrations mesurées dans l'eau (à partir de l'échantillonnage intégratif par les POCIS), parfois supérieures en Amont et parfois supérieures en Aval, selon les périodes d'échantillonnage. L'hypothèse d'une cotoxalité entre l'aténolol et l'une des substances plus concentrées en aval pourrait être une explication qu'il serait intéressant de tester dans des expériences de laboratoire. Pour mieux comprendre les liens entre la tolérance mesurée à l'aténolol et l'exposition réelle des communautés microbiennes à cette substance, il serait également pertinent de mesurer les concentrations bioaccumulées dans les biofilms. Ce type de mesure sera effectuée ultérieurement pour les biofilms prélevés à J28 et à J70 (il n'était pas possible de prévoir cela à tous les temps de prélèvements du fait du nombre limité de lames dans les cassettes). A l'inverse, la contamination des sites par le diclofénac était significativement plus forte en Aval pour tous les temps, et les résultats obtenus dans ce travail confirment ceux précédemment obtenus également sur des biofilms du Tillet en 2021 (Poulalion et al., 2021). À noter que le suivi précédent ne permettait pas de mettre en évidence un site plus contaminé que l'autre. D'autres travaux sur des biofilms issus de deux stations en rivière (Corcoll et al., 2014) ont montré une tolérance plus grande pour l'activité photosynthétique des biofilms issus de la station exposée au diclofénac et à l'ibuprofène en mélange. Dans ce cadre, les communautés microbiennes des biofilms exposés

chroniquement aux substances pharmaceutiques avaient une structure différente et une biodiversité moins importante que celles de la station moins contaminée.

Dans notre étude, la tolérance des biofilms au SMX mesurée par un test de croissance algale était également différente entre les deux sites, elle était plus élevée pour les biofilms Amont qu'Aval. Les capteurs passifs ont mis en évidence une contamination au SMX en Aval pour tous les temps, tandis qu'en Amont, les concentrations en SMX sont restées sous la limite de quantification. Le test couplant une exposition au SMX et la mesure de la croissance des biofilms n'est donc pas satisfaisant pour l'approche PICT dans le cadre de notre étude. Des travaux précédents (Kergoat et al., 2021) montraient que l'exposition de biofilms au SMX entraînait des réponses différentes selon les activités testées : la β -glucosidase et la croissance des diatomées ne différaient pas pour les biofilms exposés, alors que les activités phosphatase et leucine aminopeptidase avaient augmenté significativement. Ces résultats suggéraient de tester d'autres activités, susceptibles de présenter un intérêt dans le cadre d'une approche PICT, comme par exemple la croissance de la communauté algale. Les travaux de Kergoat et al. (2021) indiquant une diminution de la diversité bactérienne lors d'une exposition au SMX en faveur de la sélection d'espèces plus tolérantes, les développements futurs pourraient alors porter sur d'autres activités bactériennes.

Quant aux tests PICT couplant le paracétamol à l'activité photosynthétique, et l'érythromycine ou le SMZ à la croissance, ils n'ont pas permis de mettre en évidence des différences dans la tolérance des biofilms issus des deux stations. La confrontation des mesures par échantillonnage passif à ces niveaux de tolérance met en évidence deux cas de figures. Dans le premier cas, malgré des concentrations plus importantes de paracétamol en aval, la tolérance mesurée à partir de l'activité photosynthétique des biofilms n'a pas montré de réponse significative. Dans une étude précédente, (Proia et al., 2013) ont mis en évidence une diminution de l'activité photosynthétique liée à la concentration de paracétamol, après avoir transféré pendant 16 jours des biofilms cultivés dans une eau non contaminée, dans une eau prélevée *in situ* sur trois stations d'une rivière montrant un gradient de contamination à cause d'effluents industriels et urbains. L'analyse multivariée conduite parallèlement sur les substances présentes dans l'eau avait montré une corrélation de la pollution en paracétamol avec les effets induits sur les espèces autotrophes des biofilms, mais aussi avec une diminution de la part d'algues et de cyanobactéries dans les communautés, ce qui pourrait également laisser supposer une sélection d'espèces tolérantes. Cependant, les taux de paracétamol relevés *in situ* dans cette étude antérieure étaient compris entre 10,9 et 824,3 ng L⁻¹, tandis que les concentrations relevées sur le Tillet dans la présente étude sont comprises entre 1,2 et 70,2 ng L⁻¹. On peut alors se demander si le test en approche PICT effectué en couplant une exposition au paracétamol et l'activité photosynthétique pourrait permettre de distinguer des communautés épilithiques issues de sites davantage contaminés. Dans le deuxième cas, aucune contamination au SMZ ou à l'érythromycine n'a pu être détectée sur les deux stations observées : l'absence d'exposition pendant la période de développement des biofilms *in situ* n'aurait alors pas permis de sélectionner des espèces plus tolérantes à ces deux substances sur les stations considérées.

Compte tenu de toutes ces informations, dans notre contexte d'expérimentation *in situ*, les approches PICT couplant des expositions au diclofénac et à l'aténolol à la mesure de l'activité photosynthétique semblent pertinentes dans le cadre de l'évaluation de la tolérance des biofilms exposés de façon chronique. Des

validations supplémentaires dans des contextes de contamination plus contrastée pourraient permettre de mieux évaluer la pertinence d'approches PICT combinant des expositions à la sulfaméthazine et à l'érythromycine et l'activité de croissance algales.

L'expérimentation de translocation a permis d'observer un effet significatif sur les tolérances de l'activité photosynthétique au diclofénac et à l'aténolol. D'une part, les communautés tolérantes de l'aval placées dans une situation de restauration perdent progressivement leur tolérance au cours du temps. D'autre part, les communautés peu tolérantes de l'amont, placées dans une situation de pollution, acquièrent progressivement de la tolérance au cours du temps. La variation de la pression de contamination à ces deux substances pharmaceutiques dans l'eau affecte donc (positivement ou négativement selon le contexte) les niveaux de tolérance des biofilms résidents. Lors d'une augmentation de la pression de contamination, les communautés microbiennes de ces biofilms peuvent acquérir une tolérance plus grande au cours du temps, alors que la diminution des taux de contaminants dans l'eau entraîne un effet de résilience chez les biofilms. Ces changements de tolérance sont probablement liés à une sélection d'espèces tolérantes (dans le cas d'une pression de contamination), ou à la re-colonisation par des espèces sensibles (dans le cas d'une situation de remédiation) comme montré expérimentalement avec le cuivre par Lambert et al. (2012). Des travaux ont par exemple montré lors d'une translocation d'une zone peu polluée à une zone davantage contaminée dans le cours d'eau d'une région viticole, une diminution de la biomasse et de la diversité d'espèces des diatomées dans les biofilms déplacés (S. Morin et al., 2010) alors que les biofilms déplacés de la station polluée vers la station moins polluée ont gagné en diversité après 4 semaines. Cet impact des conditions environnementales sur la structure des biofilms avait déjà été démontré par Paule et al. (2009). Dans cette étude, des substrats colonisés par des biofilms dans deux stations – situées en zone agricole et forestière respectivement – avaient été échangés entre les stations. Les résultats acquis dans le cadre de notre expérience de translocation démontrent que l'approche PICT peut être un outil pertinent pour diagnostiquer *in situ* une évolution de la pression toxique subie par les communautés microbiennes naturelles.

5. Conclusion et perspectives

Ce travail a permis de mieux comprendre les relations existantes entre la contamination d'un cours d'eau par des substances pharmaceutiques et la tolérance des biofilms résidents à certaines de ces substances. Dans le cadre de l'évaluation de l'impact de ce type de contamination sur les milieux aquatiques, les biofilms, qui restent dans le milieu et y sont abondants, constituent donc des bioindicateurs pertinents. Ils réagissent rapidement à des variations spatio-temporelles des niveaux de contamination, et sont suffisamment résistants pour permettre la réalisation de tests écotoxicologiques permettant de tester en laboratoire leur niveau de tolérance à la toxicité aiguë de différentes substances. Ainsi, certains des tests que nous avons réalisés ont révélé une tolérance plus grande et relativement stable des biofilms prélevés sur la station la plus contaminée Aval, par rapport à ceux issus de l'Amont. De nombreux exemples dans la littérature mettent en évidence l'impact des contaminations anthropiques sur ces communautés microbiennes, en termes d'activité et de tolérance, en lien avec des modifications de la structure et de la diversité des espèces constituant les biofilms (Corcoll et al., 2014; Dorigo, Berard, et al., 2010; Dorigo, Bérard, et al., 2010). Dans ce contexte, les tests en approche PICT

peuvent permettre une évaluation rapide de l'état biologique des communautés microbiennes. Les travaux réalisés montrent que dans le cas des biofilms épilithiques, la mesure de l'activité photosynthétique après exposition au diclofénac ou à l'aténolol sont des méthodes prometteuses. En outre, nous avons pu réaliser une expérience de translocation mimant l'augmentation ou la diminution de la contamination d'un milieu afin d'étudier la réaction des biofilms en termes de tolérance. Nos résultats ont montré que les communautés déplacées dans la station plus polluée acquéraient une tolérance au cours du temps, tandis que les biofilms déplacés vers la station moins polluée pouvaient grâce à un effet de résilience, revenir vers des tolérances similaires à celles des biofilms non ou peu exposés aux contaminants pendant toute la durée de leur développement.

Ces résultats sont encourageants dans une optique de restauration de la qualité chimique et écologique des cours d'eau contaminés, puisqu'ils montrent que les biofilms épilithiques, qui constituent une part importante de la production primaire dans les milieux aquatiques et jouent un rôle primordial dans les cycles biogéochimiques, présentent un fort potentiel de récupération suite à une diminution de la pression chimique. Cette variation de la tolérance est probablement liée à la modification de la structure des communautés lorsque la pression de contamination est différente ou varie dans le temps. L'étude de la structure des communautés issues de nos échantillons pourrait permettre de vérifier si nous avons une corrélation entre les taux de contamination dans l'eau, les variations de tolérance, et la structure des communautés de nos biofilms. Les activités les plus impactées par des concentrations croissantes de contaminants étant liées à la composante algale des biofilms, l'étude de la diversité des communautés chlorophylliennes par séquençage massif sera réalisée à la suite de ce travail.

Concernant l'approche PICT, l'analyse de la contamination des eaux de surface au niveau des deux stations étudiée a également permis de relever des différences de concentrations Amont-Aval des anti-inflammatoires non-stéroïdiens (AINS ; kétoprofène, acide niflumique) et des β -bloquants (propranolol, sotalol, acébutolol, céliprolol). Des essais couplant ces substances pharmaceutiques aux activités photosynthétiques et beta-glucosidase (sur la base des travaux préliminaires de Poulalion et al. 2021) pourraient ainsi permettre le développement de nouveaux tests PICT pour l'évaluation de l'état des écosystèmes aquatiques. Par ailleurs, nous compléterons l'analyse des liens entre les niveaux de tolérance mesurés et les niveaux d'exposition des biofilms à travers la réalisation de dosages des concentrations accumulées dans les biofilms prélevés à J28 et J70. L'ensemble de ces résultats permettra de contribuer à mieux appréhender le potentiel de l'approche PICT pour évaluer *in situ* l'impact écotoxicologique des substances pharmaceutiques dans les milieux aquatiques contaminés.

Références bibliographiques

1. Balcázar, J. L., Subirats, J., & Borrego, C. M. (2015). The role of biofilms as environmental reservoirs of antibiotic resistance. *Frontiers in Microbiology*, 6, 1216. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2015.01216>
2. Belles, A. (2012). *Développement et applications environnementales des échantillonneurs passifs pour la surveillance des écosystèmes aquatiques* [These de doctorat, Bordeaux 1]. <http://www.theses.fr/2012BOR14723>
3. Belles, A., Tapie, N., Pardon, P., & Budzinski, H. (2014). Development of the performance reference compound approach for the calibration of « polar organic chemical integrative sampler » (POCIS). *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 406(4), 1131-1140. <https://doi.org/10.1007/s00216-013-7297-z>
4. Besemer, K. (2015). Biodiversity, community structure and function of biofilms in stream ecosystems. *Research in Microbiology*, 166(10), 774-781. <https://doi.org/10.1016/j.resmic.2015.05.006>
5. Bonnaud, B., Miège, C., Daval, A., Fauvelle, V., & Mazzella, N. (2022). Determination of diffusion coefficients in agarose and polyacrylamide gels for 112 organic chemicals for passive sampling by organic Diffusive Gradients in Thin films (o-DGT). *Environmental Science and Pollution Research International*, 29(17), 25799-25809. <https://doi.org/10.1007/s11356-021-17563-7>
6. Bonnineau, C., Bouchez, A., Charton, A., Dagot, C., Devers, M., Labanowski, J., Lyautey, E., Pesce, S., Martin-Laurent, F., & Mondamert, L. (2019). *Antibiotools : Des outils pour caractériser et suivre les antibiotiques et antibiorésistances dans les écosystèmes aquatiques*. 1. <https://hal.inrae.fr/hal-02609885>
7. Capdeville, M.-J. (2011). *Études des cycles biogéochimiques des contaminants organiques dits « émergents » dans les systèmes aquatiques* [These de doctorat, Bordeaux 1]. <http://www.theses.fr/2011BOR14304>
8. Chonova, T., Labanowski, J., Cournoyer, B., Chardon, C., Keck, F., Laurent, É., Mondamert, L., Vasselon, V., Wiest, L., & Bouchez, A. (2018). River biofilm community changes related to pharmaceutical loads emitted by a wastewater treatment plant. *Environmental Science and Pollution Research International*, 25(10), 9254-9264. <https://doi.org/10.1007/s11356-017-0024-0>
9. Chonova, T., Lecomte, V., Bertrand-Krajewski, J.-L., Bouchez, A., Labanowski, J., Dagot, C., Lévi, Y., Perrodin, Y., Wiest, L., Gonzalez-Ospina, A., Cournoyer, B., & Sebastian, C. (2018). The SIPIBEL project : Treatment of hospital and urban wastewater in a conventional urban wastewater treatment plant. *Environmental Science and Pollution Research*, 25(10), 9197-9206. <https://doi.org/10.1007/s11356-017-9302-0>
10. Corcoll, N., Acuña, V., Barceló, D., Casellas, M., Guasch, H., Huerta, B., Petrovic, M., Ponsatí, L., Rodríguez-Mozaz, S., & Sabater, S. (2014). Pollution-induced community tolerance to non-steroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs) in fluvial biofilm communities affected by WWTP effluents. *Chemosphere*, 112, 185-193. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2014.03.128>
11. Courcoul, C., Leflaive, J., Ferriol, J., & Boulêtreau, S. (2022). The sensitivity of aquatic microbial communities to a complex agricultural contaminant depends on previous drought conditions. *Water Research*, 217, 118396. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2022.118396>

12. Desbiolles, F., Malleret, L., Tiliacos, C., Wong-Wah-Chung, P., & Laffont-Schwob, I. (2018). Occurrence and ecotoxicological assessment of pharmaceuticals : Is there a risk for the Mediterranean aquatic environment? *Science of The Total Environment*, 639, 1334-1348.
<https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2018.04.351>
13. Dorigo, U., Bérard, A., Bouchez, A., Rimet, F., & Montuelle, B. (2010). Transplantation of Microbenthic Algal Assemblages to Assess Structural and Functional Recovery After Diuron Exposure. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, 59(4), 555-563.
<https://doi.org/10.1007/s00244-010-9511-8>
14. Dorigo, U., Berard, A., Rimet, F., Bouchez, A., & Montuelle, B. (2010). In situ assessment of periphyton recovery in a river contaminated by pesticides. *Aquatic Toxicology*, 98(4), 396-406.
<https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2010.03.011>
15. Fechner, L. C., Versace, F., Gourlay-Francé, C., & Tusseau-Vuillemin, M.-H. (2012). Adaptation of copper community tolerance levels after biofilm transplantation in an urban river. *Aquatic Toxicology*, 106-107, 32-41. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2011.09.019>
16. Feckler, A., Kahlert, M., & Bundschuh, M. (2015). Impacts of Contaminants on the Ecological Role of Lotic Biofilms. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, 95(4), 421-427.
<https://doi.org/10.1007/s00128-015-1642-1>
17. Flemming, H.-C., Wingender, J., Szewzyk, U., Steinberg, P., Rice, S. A., & Kjelleberg, S. (2016). Biofilms : An emergent form of bacterial life. *Nature Reviews Microbiology*, 14(9), 563-575.
<https://doi.org/10.1038/nrmicro.2016.94>
18. Kaplan, S. (2013). Review : Pharmacological Pollution in Water. *Critical Reviews in Environmental Science and Technology*, 43(10), 1074-1116. <https://doi.org/10.1080/10934529.2011.627036>
19. Kergoat, L., Besse-Hoggan, P., Lereboure, M., Beguet, J., Devers, M., Martin-Laurent, F., Masson, M., Morin, S., Roinat, A., Pesce, S., & Bonnineau, C. (2021). Environmental Concentrations of Sulfonamides Can Alter Bacterial Structure and Induce Diatom Deformities in Freshwater Biofilm Communities. *Frontiers in Microbiology*, 12, 643719. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2021.643719>
20. Klimaszuk, P., & Rzymiski, P. (2018). Water and aquatic fauna on drugs : What are the impacts of pharmaceutical pollution? *Water Management and the Environment: Case Studies*, 255-278.
21. Lambert, A.-S., Morin, S., Artigas, J., Volat, B., Coquery, M., Neyra, M., & Pesce, S. (2012). Structural and functional recovery of microbial biofilms after a decrease in copper exposure : Influence of the presence of pristine communities. *Aquatic Toxicology*, 109, 118-126.
<https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2011.12.006>
22. Li, H., Helm, P. A., & Metcalfe, C. D. (2010). Sampling in the Great Lakes for pharmaceuticals, personal care products, and endocrine-disrupting substances using the passive polar organic chemical integrative sampler. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 29(4), 751-762.
<https://doi.org/10.1002/etc.104>

23. Lyautey, E., Jackson, C. R., Cayrou, J., Rols, J.-L., & Garabétian, F. (2005). Bacterial Community Succession in Natural River Biofilm Assemblages. *Microbial Ecology*, *50*(4), 589-601.
<https://doi.org/10.1007/s00248-005-5032-9>
24. MacLeod, S. L., McClure, E. L., & Wong, C. S. (2007). Laboratory calibration and field deployment of the polar organic chemical integrative sampler for pharmaceuticals and personal care products in wastewater and surface water. *Environmental Toxicology and Chemistry*, *26*(12), 2517-2529.
<https://doi.org/10.1897/07-238.1>
25. Mazzella, N., Dubernet, J.-F., & Delmas, F. (2007). Determination of kinetic and equilibrium regimes in the operation of polar organic chemical integrative samplers. Application to the passive sampling of the polar herbicides in aquatic environments. *Journal of Chromatography. A*, *1154*(1-2), 42-51.
<https://doi.org/10.1016/j.chroma.2007.03.087>
26. McClean, P., & Hunter, W. R. (2020). 17 α -ethynylestradiol (EE2) limits the impact of ibuprofen upon respiration by streambed biofilms in a sub-urban stream. *Environmental Science and Pollution Research International*, *27*(29), 37149-37154. <https://doi.org/10.1007/s11356-020-10096-5>
27. Mora-Gomez, J., Freixa, A., Perujo, N., & Barral-Fraga, L. (2016). Limits of the Biofilm Concept and Types of Aquatic Biofilms. In *Aquatic Biofilms : Ecology, Water Quality and Wastewater Treatment* (p. 3-28). Caister.
28. Morin, N., Camilleri, J., Cren-Olivé, C., Coquery, M., & Miège, C. (2013). Determination of uptake kinetics and sampling rates for 56 organic micropollutants using “pharmaceutical” POCIS. *Talanta*, *109*, 61-73. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2013.01.058>
29. Morin, S., Pesce, S., Tlili, A., Coste, M., & Montuelle, B. (2010). Recovery potential of periphytic communities in a river impacted by a vineyard watershed. *Ecological Indicators*, *10*(2), 419-426.
<https://doi.org/10.1016/j.ecolind.2009.07.008>
30. O’Brien, S. F., & Yi, Q. L. (2016). How do I interpret a confidence interval? *Transfusion*, *56*(7), 1680-1683. <https://doi.org/10.1111/trf.13635>
31. Oksanen, J., Simpson, G. L., Blanchet, F. G., Kindt, R., Legendre, P., Minchin, P. R., O’Hara, R. B., Solymos, P., Stevens, M. H. H., Szoecs, E., Wagner, H., Barbour, M., Bedward, M., Bolker, B., Borcard, D., Carvalho, G., Chirico, M., Caceres, M. D., Durand, S., ... Weedon, J. (2022). *vegan : Community Ecology Package (2.6-2)* [Computer software]. <https://CRAN.R-project.org/package=vegan>
32. Ortúzar, M., Esterhuizen, M., Olicón-Hernández, D. R., González-López, J., & Aranda, E. (2022). Pharmaceutical Pollution in Aquatic Environments : A Concise Review of Environmental Impacts and Bioremediation Systems. *Frontiers in Microbiology*, *13*, 869332.
<https://doi.org/10.3389/fmicb.2022.869332>
33. Paule, A., Lyautey, É., Garabetian, F., & Rols, J.-L. (2009). Autogenic versus environmental control during development of river biofilm. *Annales de Limnologie - International Journal of Limnology*, *45*, 1-10. <https://doi.org/10.1051/limn/09007>
34. Pesce, S., Lyautey, E., Naffrechoux, E., Ferrari, B., Dabrin, A., Margoum, C., Miège, C., Masson, M., Vivien, R., & Bonninaeu, C. (2019). *Pression chimique et impacts écologiques : Distribution des*

contaminants et réponse des communautés de microorganismes et d'invertébrés dans les sédiments de l'Ardières et du Tillet (CommuSED).

<https://www.dora.lib4ri.ch/eawag/islandora/object/eawag%3A20644/>

35. Poulalion, S., Bonnineau, C., & Pesce, S. (2021). *Impact des substances pharmaceutiques sur les communautés microbiennes benthiques en cours d'eau agricole et urbain*. INRAE - UR RiverLy - Lyon Grenoble Auvergne Rhône-Alpes.
36. Proia, L., Osorio, V., Soley, S., Köck-Schulmeyer, M., Pérez, S., Barceló, D., Romaní, A. M., & Sabater, S. (2013). Effects of pesticides and pharmaceuticals on biofilms in a highly impacted river. *Environmental Pollution*, 178, 220-228. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2013.02.022>
37. Quinlan, E. L., Nietch, C. T., Blocksom, K., Lazorchak, J. M., Batt, A. L., Griffiths, R., & Klemm, D. J. (2011). Temporal dynamics of periphyton exposed to tetracycline in stream mesocosms. *Environmental Science & Technology*, 45(24), 10684-10690. <https://doi.org/10.1021/es202004k>
38. Ritz, C., Baty, F., Streibig, J. C., & Gerhard, D. (2015). Dose-Response Analysis Using R. *PloS One*, 10(12), e0146021. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0146021>
39. Rosi-Marshall, E. J., Kincaid, D. W., Bechtold, H. A., Royer, T. V., Rojas, M., & Kelly, J. J. (2013). Pharmaceuticals suppress algal growth and microbial respiration and alter bacterial communities in stream biofilms. *Ecological Applications*, 23(3), 583-593. <https://doi.org/10.1890/12-0491.1>
40. Scholze, M., Boedeker, W., Faust, M., Backhaus, T., Altenburger, R., & Grimme, L. H. (2001). A general best-fit method for concentration-response curves and the estimation of low-effect concentrations. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 20(2), 448-457.
41. *Site hydrométrique—V130 5210 : Le Tillet à Aix-les-Bains—Fiche d'identité | SCHAPI - HydroPortail*. (s. d.). DREAL Auvergne-Rhône-Alpes - Unité Hydrométrie Rhône-Alpes. Consulté 11 mai 2022, à l'adresse <https://www.hydro.eaufrance.fr/sitehydro/V1305210/fiche>
42. Tlili, A., Berard, A., Blanck, H., Bouchez, A., Cássio, F., Eriksson, K. M., Morin, S., Montuelle, B., Navarro, E., Pascoal, C., Pesce, S., Schmitt-Jansen, M., & Behra, R. (2016). Pollution-induced community tolerance (PICT) : Towards an ecologically relevant risk assessment of chemicals in aquatic systems. *Freshwater Biology*, 61(12), 2141-2151. <https://doi.org/10.1111/fwb.12558>
43. Togola, A., & Budzinski, H. (2007). Development of polar organic integrative samplers for analysis of pharmaceuticals in aquatic systems. *Analytical Chemistry*, 79(17), 6734-6741. <https://doi.org/10.1021/ac070559i>
44. Wilkinson, J. L., Boxall, A. B. A., Kolpin, D. W., Leung, K. M. Y., Lai, R. W. S., Galbán-Malagón, C., Adell, A. D., Mondon, J., Metian, M., Marchant, R. A., Bouzas-Monroy, A., Cuni-Sanchez, A., Coors, A., Carriquiriborde, P., Rojo, M., Gordon, C., Cara, M., Moermond, M., Luarte, T., ... Teta, C. (2022). Pharmaceutical pollution of the world's rivers. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 119(8), e2113947119. <https://doi.org/10.1073/pnas.2113947119>
45. Yeoman, C. J., Han, Y., Dodd, D., Schroeder, C. M., Mackie, R. I., & Cann, I. K. O. (2010). Chapter 1—Thermostable Enzymes as Biocatalysts in the Biofuel Industry. In *Advances in Applied Microbiology* (Vol. 70, p. 1-55). Academic Press. [https://doi.org/10.1016/S0065-2164\(10\)70001-0](https://doi.org/10.1016/S0065-2164(10)70001-0)

Mois	Janvier		Février			Mars			Avril			Mai			Juin			Juillet												
	24-28	31-d	7-11	14-18	21-25	28-4	7-11	14-18	21-25	28-1	4-8	11-15	18-22	25-29	2-6	9-13	16-20	23-27	30-3	6-10	13-17	20-24	27-1	4-8	11-15	18-22	25-29			
Expérience in situ																														
Pose des cages																														
Translocation																														
Pose et/ou retrait de POCIS																														
Prélèvement de biofilms																														
Tests en approche P/CT																														
Traitement / analyse données tests																														
Traitement Analyse données physico-chimiques et contaminations																														
Extraction et Quantification Qubit des échantillons pour un futur séquençage des organismes chlorophylliens																														
Traitement d'échantillons de suivis antérieurs																														
Extraction d'ADN d'échantillons bruts																														
Réception d'ADN extrait d'un autre suivi																														
Quantification des échantillons reçus																														
Dilution et nouvelle quantification des échantillons extraits																														
PCR des échantillons puis électrophorèse des amplicats																														
Quantification des amplicats au Qubit																														
PCR d'échantillons contaminés puis électrophorèse des amplicats et quantification Qubit																														
Constitution d'un pool des amplicats à quantité d'ADN égale																														
Purification et quantification du pool																														
Envoi du pool à un sous-traitant pour la réalisation d'un séquençage massif des bactéries																														
Traitement des données du séquençage massif																														
Approfondissement des connaissances et rapport de stage																														
Seminaire PharmaQUA																														
Rédaction du rapport et bibliographie																														
Préparation de la soutenance																														
Soutenance orale																														

Annexe 1 : Résumé des tâches effectuées durant le stage (rouge : début et fin du stage).

	Antalgiques	Anti-inflammatoires non stéroïdiens	Antiarythmiques	Antibiotiques	Anticancéreux	Antidépresseurs	Antidiabétiques
>LQ	Paracetamol	Naproxene Diclofenac Ketoprofene Acidenflumique	Flecainide	Metronidazole Sulfamethoxazole Acetylsulfamethoxazole Clindamicyne	Cyclophosphamide		Metformine
<LQ				Ciprofloxacine Clarithromycine Erythromycine Norfloxacine Ofloxacine Sulfaméthazine Triméthoprim			Amtriptiline Fluoxetine Venlafaxine
	Antiépileptiques	Antihypertenseurs	Anxiolytiques	Bronchodilatateurs	Hypolipémiants	Neuroleptiques	
	Carbamazepine Lamotrigine	Atenolol Acebutolol Celiprolol Irbesartan Propranolol Metoprolol Sotalol	Ozaxepam	Salbutamol	Acidefenofibrrique Bezafibrate	Amisulpride	
>LQ							
<LQ	Furosemide	Alprazolam Diazepam Nordiazepam			Fenofibrate Gemfibrozil		

Annexe 2 : Tableau des substances pharmaceutiques analysées, avec les substances détectées (>LQ) et non détectées (<LQ) pendant toute la durée de l'expérience *in situ*. LQ : limite de quantification.

Résumé

La pollution par les substances pharmaceutiques génère dans les milieux aquatiques la présence de substances actives variées issues de nombreuses sources de contamination (urbaines, agricoles, hospitalières...). Cela peut affecter les biofilms épilithiques : des communautés fixées à des substrats immergés (ex. rochers). Elles abritent différents microorganismes (micro-algues, cyanobactéries, bactéries, champignons...) et participent à des fonctions essentielles dans les écosystèmes comme la régulation des cycles biogéochimiques. Un suivi *in situ* a été réalisé dans un petit cours d'eau (Tillet, Savoie) pour mieux comprendre l'impact de ce type de contamination sur les biofilms épilithiques. En utilisant l'approche PICT (Pollution Induced Community Tolerance), nous avons suivi la contamination de l'eau (à l'aide d'échantillonneurs passifs) et la tolérance de biofilms sur une station située en zone amont, peu contaminée, et une située en aval, où s'accumulent des substances pharmaceutiques. La tolérance a été évaluée à partir de tests de toxicité aigüe réalisés sur des biofilms prélevés toutes les 2 semaines en testant individuellement 7 substances pharmaceutiques (ofloxacine, aténolol, diclofénac, paracétamol, érythromycine, sulfaméthoxazole, sulfaméthazine) sur l'une des 3 activités biologiques suivantes : β -glucosidase, photosynthèse, croissance. Il s'agissait de vérifier si la contamination observée en zone aval engendre une acquisition de tolérance aux substances testées, et d'étudier la dynamique d'acquisition ou de perte de tolérance à partir d'une approche de translocation (déplacement des biofilms de l'amont vers l'aval et vice-versa). Le suivi de la contamination a confirmé la contamination en aval., où les communautés phototrophes ont présenté une tolérance accrue et stable au diclofénac et à l'aténolol. Pour ces deux substances, la translocation a permis d'observer progressivement une acquisition, ou au contraire une résilience, chez les biofilms déplacés respectivement vers l'aval et vers l'amont. Ces travaux démontrent que l'approche PICT est pertinente pour diagnostiquer *in situ* l'impact des substances pharmaceutiques sur les communautés microbiennes naturelles.

Mots-clés : Biofilms ; écotoxicologie microbienne ; PICT (tolérance des communautés induite par la pollution) ; POCIS (échantillonneur intégratif des substances chimiques organiques polaires) ; rivières

Abstract

Pharmaceutical substances pollution generates the presence of various active substances from many contamination sources (urban, agricultural, hospital...) in aquatic environments. This can affect epilithic biofilms: communities attached to submerged substrates (e.g. rocks). They shelter different microorganisms (microalgae, cyanobacteria, bacteria, fungi...) and participate in essential functions in ecosystems such as the regulation of biogeochemical cycles. A monitoring was carried out *in situ* in a small river (Tillet, Savoie) to better understand the impact of this type of contamination on epilithic biofilms. Using the PICT approach (Pollution Induced Community Tolerance), we monitored water contamination (using passive samplers) and biofilm tolerance on a station located in the upstream zone, with little contamination, and one located downstream, where pharmaceutical substances accumulate. Tolerance was evaluated by acute toxicity tests performed on biofilms sampled every 2 weeks by individually testing 7 pharmaceutical substances (ofloxacin, atenolol, diclofenac, paracetamol, erythromycin, sulfamethoxazole, sulfamethazine) on one of the 3 following biological activities: β -glucosidase, photosynthesis, growth. The aim was to verify if the contamination

observed in the downstream zone generates an acquisition of tolerance to the tested substances, and to study the dynamics of acquisition or loss of tolerance using a translocation approach (movement of biofilms from upstream to downstream and vice versa). The contamination monitoring confirmed the downstream contamination, where phototrophic communities showed an increased and stable tolerance to diclofenac and atenolol. For these two substances, translocation allowed us to progressively observe an acquisition or on the contrary a resilience, in the biofilms moved respectively downstream and upstream. This work demonstrates that the PICT approach is relevant for diagnosing *in situ* the impact of pharmaceutical substances on natural microbial communities.

Keywords: Biofilms; microbial ecotoxicology; PICT (pollution-induced community tolerance); POCIS (polar organic chemical integrative sampler); rivers