



HAL
open science

Adaptation et réponses fonctionnelles des communautés microbiennes aquatiques exposées aux fongicides naturels et de synthèse

Amandine Greil

► **To cite this version:**

Amandine Greil. Adaptation et réponses fonctionnelles des communautés microbiennes aquatiques exposées aux fongicides naturels et de synthèse. Biodiversité et Ecologie. 2024. hal-04690303

HAL Id: hal-04690303

<https://hal.inrae.fr/hal-04690303v1>

Submitted on 6 Sep 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.

*ADAPTATION ET RÉPONSES FONCTIONNELLES DES
COMMUNAUTÉS MICROBIENNES AQUATIQUES
EXPOSÉES AUX FONGICIDES NATURELS ET DE
SYNTHÈSE*

RAPPORT DE STAGE

Amandine GREIL

Directeur de recherche : Claude FORTIN

Co-directrices de recherche : Isabelle LAVOIE et

Soizic MORIN

Encadrant.es : Chloé BONNINEAU, Nicolas CREUSOT et

Mélissa EON



© A. Marquot

Remerciements

Tout d'abord, je tiens à remercier mes encadrant.es de l'INRAE ; **Chloé Bonneau**, **Nicolas Creusot** et **Mélissa Eon** pour m'avoir aidée tout au long de ce travail et pour avoir été là durant toute l'expérience et avoir ainsi permis que tout se déroule sans trop d'accroches. Merci à Chloé d'avoir pris le temps de répondre à toutes mes questions que ce soit sur les expériences ou sur les traitements de données. Merci à Nicolas et Mélissa d'avoir trouvé des solutions et particulièrement quand toutes les poudres refusaient de se dissoudre.

Je remercie toutes les personnes qui sont venues nous aider à gratter le périphyton le matin ; **Agnès Le Gal**, **Sylvia Moreira**, **Juliette Tison-Rosebery** et **Jacky Vedrenne**. Merci à Jacky qui nous a aidées à déménager toute la salle pour que tout puisse rentrer. Merci à Agnès de nous avoir aidées pendant ces longues journées d'analyse qui sans toi auraient été encore plus longues.

Ensuite, je voudrais remercier mon directeur de recherche **Claude Fortin** d'avoir toujours été là pour suivre mon travail alors même que nous n'étions pas sur le même continent.

Merci également à mes deux co-directrices **Isabelle Lavoie** et **Soizic Morin**.

Je tiens à remercier le laboratoire EPOC et spécialement **Cécile Boissy**, **Alexandra Coynel** et **Nicolas Layglon** pour avoir réalisé le dosage des métaux dans les échantillons.

Evidemment, je remercie mes collègues du stage **Agnès**, **Alidou** et **Emma**, sans qui je n'aurai pas passé autant de bons moments durant ce stage, tels que les parties de fléchettes, les pauses à la machine à café ou encore les débats interminables sur tout et n'importe quoi.

Finalement, je remercie ma famille, ma sœur, ma mère et mon père qui m'ont soutenu tout au long de ce parcours. Merci à Maxence également d'avoir toujours été là pour moi.

Résumé

En français :

Les pratiques agricoles changent de plus en plus pour évoluer vers une utilisation réduite des pesticides de synthèse au profit des pesticides d'origine naturelle. Le plan Écophyto 2030 mis en place en France en 2024 incite à la recherche d'alternatives aux pesticides de synthèse. Cette volonté de changement doit être accompagnée afin de s'assurer que les fongicides d'origine naturelle utilisés pour remplacer les pesticides de synthèse ne sont pas également problématiques pour l'environnement. Cette étude examine les différences de toxicité entre les fongicides de synthèse et les fongicides d'origine naturelle sur les communautés microbiennes du périphyton. Les effets de ces pesticides ont été caractérisés à l'aide de descripteurs biologiques, tels que les activités enzymatiques, le rendement photosynthétique, la biomasse, la chlorophylle totale ou encore l'acquisition de tolérance. Trois fongicides ont été utilisés pour cette expérience ; le boscalide (de synthèse), le sulfate de cuivre (d'origine naturelle) et la kasugamycine (d'origine naturelle, autorisée hors UE). Le périphyton a été mis pendant 26 jours dans des canaux en verre. Il y avait sept conditions différentes à trois répétitions ; contrôle, kasugamycine (1 mg/L et 100 mg/L), boscalide (0,1 µg/L et 100 µg/L) et sulfate de cuivre (30 µg/L et 100 µg/L). Cette expérience a permis de montrer que l'exposition aux contaminants étudiés entraînait un changement de composition dans les communautés phototrophes. De plus, la présence de sulfate de cuivre diminue l'activité de l'enzyme β -glucosidase et la kasugamycine diminue l'activité de l'enzyme estérase. Le cuivre diminue aussi le rendement photosynthétique des communautés phototrophes. Aucune acquisition de tolérance n'a pu être mise en évidence pour les contaminants organiques.

En anglais :

Farming practices are changing more and more, moving towards the reduced use of synthetic pesticides in favour of pesticides from natural origin. The Ecophyto 2030 plan implemented in France in 2024 encourages the search for alternatives to synthetic pesticides. This desire for change needs to be supported to ensure that the natural fungicides used to replace synthetic pesticides are not equally problematic for the environment. This study examines the differences in toxicity between synthetic and naturally occurring fungicides on periphyton microbial communities. The effects of these pesticides were characterised using biological descriptors such as enzymatic activities, photosynthetic yield, biomass, total chlorophyll abundance and tolerance acquisition. Three fungicides were used in the experiment: boscalid (synthetic), copper sulphate (natural) and kasugamycin (natural, authorised outside the EU). Mature periphyton was exposed in glass channels, for 26 days, to seven different conditions in three replicates: control, kasugamycin (1 mg/L and 100 mg/L), boscalid (0.1 µg/L and 100 µg/L) and copper sulphate (30 µg/L and 100 µg/L). This experiment showed that the presence of contaminants led to a change in phototrophic communities. In addition, the presence of copper sulphate reduces the activity of the β -glucosidase enzyme and kasugamycin reduces the activity of the esterase enzyme. Copper also reduces the photosynthetic yield of phototrophic communities. No evidence of tolerance was found for organic contaminants.

Table des matières

Remerciements	2
Résumé.....	3
Liste des abréviations	7
Liste des figures.....	8
Liste des tableaux	11
1 Introduction.....	12
2 État de l’art.....	13
2.1 Les fongicides	13
2.1.1 Le boscalide	15
2.1.2 La kasugamycine.....	16
2.1.3 Le cuivre.....	16
2.2 Le périphyton	17
2.2.1 Définition et composition du périphyton.....	17
2.2.2 Formation du périphyton dans le milieu aquatique.....	19
2.2.3 Fonctions du périphyton dans l’environnement.....	19
2.2.4 Interactions entre le périphyton et les contaminants.....	20
2.3 Approche PICT	21
2.4 Objectif & hypothèses	22
3 Matériels & méthodes.....	23
3.1 Colonisation du périphyton.....	23
3.2 Tests de toxicité aiguë	23
3.3 Tests de toxicité chronique	24
3.3.1 Design expérimental.....	24
3.3.2 Préparation des solutions de contaminants.....	25
3.3.3 Conditions d’exposition chronique	25
3.3.4 Prélèvements.....	26
3.4 Chimie analytique.....	26
3.4.1 Paramètres physico-chimiques	26
3.4.2 Analyse des anions majeurs	27
3.4.3 Dosage du carbone Organique total (COT)	27
3.4.4 Dosage des contaminants dans l’eau	27
3.5 Descripteurs biologiques.....	29
3.5.1 Prélèvements.....	29
3.5.2 Ash-Free Dry Weight (AFDW).....	29

3.5.3	Chlorophylle totale, groupes d'organismes phototrophes et rendement photosynthétique	29
3.5.4	Activités enzymatiques hétérotrophes	30
3.5.5	Tests de toxicité aiguë – approche PICT	31
3.6	Analyses statistiques	31
4	Résultats	32
4.1	Tests de toxicité aiguë	32
4.1.1	Les fongicides de synthèse : Azoxystrobin, boscalide et tébuconazole	33
4.1.2	Les fongicides utilisés en agriculture biologique : sulfate de cuivre et laminarin.....	33
4.1.3	Les fongicides non autorisés dans l'UE : fengycine, kasugamycine et surfactine	33
4.2	Tests de toxicité chronique	34
4.2.1	Les conditions d'expérimentations	34
4.2.2	Évolution temporelle des communautés microbiennes contrôle.....	35
4.2.3	Effets des fongicides sur la biomasse microbienne.....	35
4.2.4	Effets des fongicides sur la structure autotrophe du périphyton	37
4.2.5	Pas d'effet des fongicides sur les activités autotrophes du périphyton	40
4.2.6	Effets des fongicides sur les activités hétérotrophes du périphyton	40
4.3	Tests de toxicité aiguë – Approche PICT	42
4.3.1	Approche PICT – Estérase et kasugamycine.....	42
4.3.2	Approche PICT – β -glucosidase et cuivre	46
4.3.3	Approche PICT – Rendement photosynthétique et cuivre.....	48
5	Discussion	49
5.1	Tests de toxicité aiguë	49
5.2	Tests de toxicité chronique	49
5.2.1	Contamination au cuivre dans le contrôle	49
5.2.2	Toxicité du boscalide	50
5.2.3	Toxicité de la kasugamycine	50
5.2.4	Toxicité du sulfate de cuivre.....	50
5.2.5	Acquisition de tolérance du périphyton.....	51
6	Conclusion	52
7	Liste des références bibliographiques.....	53
8	Annexes :	60
8.1	Annexe 1 : Gammes des tests de toxicité aiguë.....	60
8.2	Annexe 2 : Tests de toxicité aiguë	64
8.3	Gradients utilisés pour analyser les contaminants organiques.....	67
8.4	Annexe 3 : Approche PICT – Tests de toxicité aiguë	68

8.4.1	Approche PICT – Estérase et kasugamycine.....	68
8.4.2	Approche PICT – β -glucosidase et cuivre	69
8.4.3	Approche PICT – Rendement photosynthétique et cuivre.....	72

Liste des abréviations

ADN: Acide Désoxyribonucléique

BNV-d: Banque National des Ventes des distributeurs

CE10 : Concentration Efficace 50%

CE50 : Concentration Efficace 50%

CFDA, AM: diacétate de 5-carboxyfluorescéine, ester acétoxyméthylrique

CMR : Cancérogène Mutagène Reprotoxiques

COT : Carbone Organique Total

DGGE: Denaturing Gradient Gel Electrophoresis (*électrophorèse sur gel en gradient dénaturant*)

ECHA: European Chemicals Agency (*Agence Européenne des produits chimiques*)

EPS: Extracellular Polymeric Substance (*Substances Polymériques Extracellulaires*)

IC : Intervalle de Confiance

ICP-MS : Inductively Coupled Plasma – Mass Spectrometry (*spectrométrie de masse à plasma à couplage inductif*)

IFT : Indicateur de Fréquence de Traitement

IPTC : Intensité des Pressions Toxiques Cumulées

MCA-Leu : L-leucine-7-amido-4-methylcoumarin hydrochloride

MO: Matière Organique

MUF-Glu : 4-Methylumbelliféryl β -D Glucopyranoside

MUF-Pho : 4-methylumbelliféryl phosphatase

NADPH : Nicotinamide Adénine Dinucléotide Phosphate

NODU: Nombre de Dose Unité

PCR: Polymerase Chain Reaction (*Réaction en chaînes par polymérase*)

Phyto-PAM: Phyto Pulse Amplitude Modulated

PICT : Pollution-Induced Community Tolerance (*Tolérance communautaire induite par une pollution*)

SDHI : Inhibiteurs de la Succinate Déshydrogénase

ToF : Time of Flight (*Temps de vol*)

UE: Union Européenne

UF : Unité de Fluorescence

UPLC : Ultra Performance Liquid Chromatography (*Chromatographie Liquide Ultra Performance*)

WHO : World Health Organization (*Organisation Mondiale de la santé*)

Liste des figures

Figure 1: Représentation schématique du périphyton et des organismes qui le compose (© L. MALBEZIN).....	18
Figure 2: Étapes de la formation du biofilm (modifié de la Fig.1 ; (Sauer et al. 2022))	19
Figure 3: Représentation schématique des interactions entre le périphyton et les contaminants (modifié de la Fig.3 ; (Bonnineau et al. 2020))	20
Figure 4: Principe de l'approche PICT décrite en plusieurs étapes en prenant pour exemple le périphyton et le boscalide.....	22
Figure 5: Schéma des conditions d'exposition avec leur concentration respective pour chaque triplicat	24
Figure 6: Schéma de trois canaux et de leurs aquariums utilisés pour l'exposition chronique	26
Figure 7: Schéma des étapes suivies afin d'obtenir un facteur de concentration de 10 pour l'analyse des contaminants organiques.....	28
Figure 8 : Exemples des résultats des tests de toxicité aiguë. Le graphe a) montre un exemple de contaminant qui n'a pas d'effet sur le descripteur biologique. Le graphe b) montre un exemple de contaminant dont l'exposition à la concentration max testée réduit de plus de 50% l'activité du descripteur biologique testé	33
Figure 9: AFDW ($\mu\text{g}/\text{cm}^2$) de chaque condition d'exposition comparée au contrôle en fonction du temps. Les points représentent les valeurs d'AFDW par répétition. Les lignes passent par la moyenne de chaque répétition à chaque temps. T1 = 5 jours ; T2 = 12 jours ; T3 = 19 jours ; T4 = 26 jours.....	35
Figure 10: Matière Organique (%) de chaque condition comparée au contrôle en fonction du temps. (* représente une différence significative avec le contrôle pour chaque temps pour une p-value < 0,05, test ANOVA et n = 3). Les points représentent les valeurs de la MO par réplication. Les lignes passent par la moyenne de chaque réplication à chaque temps. T1 = 5 jours ; T2 = 12 jours ; T3 = 19 jours ; T4 = 26 jours.....	36
Figure 11 : Chlorophylle totale ($\mu\text{g}/\text{L}$) de chaque condition comparée au contrôle en fonction du temps. Les points représentent les valeurs de chlorophylle totale par réplication. Les lignes passent par la moyenne de chaque réplication à chaque temps	37
Figure 12 : Composition des organismes phototrophes (%) de chaque condition d'exposition en fonction des temps de prélèvement	39
Figure 13 : Rendement photosynthétique en fonction du temps pour chaque condition	40
Figure 14 : Activité de l'enzyme Glu ($\mu\text{mol}/\text{h}/\text{cm}^2$) de chaque condition comparée au contrôle en fonction du temps. Les points représentent les valeurs d'activités enzymatiques de la Glu par réplication. Les lignes passent par la moyenne de chaque réplication à chaque temps (* représente une différence significative avec le contrôle pour une p-value < 0,05, test Dunnett et n = 3).....	41
Figure 15 : Activité de l'enzyme Pho ($\mu\text{mol}/\text{h}/\text{cm}^2$) de chaque condition comparée au contrôle en fonction du temps. Les points représentent les valeurs d'activités enzymatiques de la Pho par réplication. Les lignes passent par la moyenne de chaque réplication à chaque temps.....	41
Figure 16 : Activité de l'enzyme Leu ($\mu\text{mol}/\text{h}/\text{cm}^2$) de chaque condition comparée au contrôle en fonction du temps. Les points représentent les valeurs d'activités enzymatiques de la Leu par réplication. Les lignes passent par la moyenne de chaque réplication à chaque temps. (* représente une différence significative avec le contrôle pour une p-value > 0,05, test Dunnett et n = 3).....	42
Figure 17 : CE10 de kasugamycine pour l'activité de l'enzyme estérase des périphytons contrôle et exposés à deux concentrations en kasugamycine (C1 = 1 mg/L, C2 = 100 mg/L) après 5 (T1), 12 (T2) et	

26 jours (T4) d'exposition. Le point indique la valeur de la CE10 modélisée et les barres d'erreur correspondent à l'intervalle de confiance à 95%. * indique une différence significative entre les échantillons exposés et le contrôle.....	43
Figure 18 : CE10 de kasugamycine pour l'activité de l'enzyme estérase des périphytons contrôle et exposés à deux concentrations en boscalide (C1 = 0,1 µg/L, C2 = 100 µg/L) après 5 (T1), 12 (T2) et 26 jours (T4) d'exposition. Le point indique la valeur de la CE10 modélisée et les barres d'erreur correspondent à l'intervalle de confiance à 95%. * indique une différence significative entre exposés et contrôle.....	44
Figure 19 : CE10 de kasugamycine pour l'activité de l'enzyme estérase des périphytons contrôle et exposés à deux concentrations en cuivre (C1 = 30 µg/L, C2 = 100 µg/L) après 5 (T1), 12 (T2) et 26 jours (T4) d'exposition. Le point indique la valeur de la CE10 modélisée et les barres d'erreur correspondent à l'intervalle de confiance à 95%. * indique une différence significative entre les échantillons exposés et le contrôle.....	45
Figure 20 : CE50 de cuivre pour l'activité de l'enzyme estérase des périphytons contrôle et exposés à deux concentrations en kasugamycine (C1 = 1 mg/L, C2 = 100 mg/L) après 24 h, 5 (T1), 12 (T2), 19 (T3) et 26 jours (T4) d'exposition. Le point indique la valeur de la CE50 modélisée et les barres d'erreur correspondent à l'intervalle de confiance à 95%. * indique une différence significative entre exposés et contrôle.....	46
Figure 21 : CE50 de cuivre pour l'activité de l'enzyme estérase des périphytons contrôle et exposés à deux concentrations en boscalide (C1 = 0,1 µg/L, C2 = 100 µg/L) après 24 h, 5 (T1), 12 (T2), 19 (T3) et 26 jours (T4) d'exposition. Le point indique la valeur de la CE50 modélisée et les barres d'erreur correspondent à l'intervalle de confiance à 95%. * indique une différence significative entre les échantillons exposés et le contrôle.....	47
Figure 22 : CE50 de cuivre pour l'activité de l'enzyme estérase des périphytons contrôle et exposés à deux concentrations en cuivre (C1 = 30 µg/L, C2 = 100 µg/L) après 24 h, 5 (T1), 12 (T2), 19 (T3) et 26 jours (T4) d'exposition. Le point indique la valeur de la CE50 modélisée et les barres d'erreur correspondent à l'intervalle de confiance à 95%. * indique une différence significative entre les échantillons exposés et le contrôle.....	47
Figure 23 : CE50 de cuivre pour le rendement photosynthétique des périphytons contrôle et exposés à deux concentrations en cuivre (C1 = 1 mg/L, C2 = 100 mg/L) après 26 jours d'exposition. Le point indique la valeur de la CE50 modélisée et les barres d'erreur correspondent à l'intervalle de confiance à 95%. * indique une différence significative entre les échantillons exposés et le contrôle.....	48
Figure 24: Tests de toxicité aiguë réalisée sur les fongicides de synthèse ; boscalide, azoxystrobin et tébuconazole. Les points représentent les valeurs mesurées, les courbes sont tracées à partir des modèles et les zones ombragées représentent les intervalles de confiance à 95%. La droite en pointillée rouge représente la valeur de CE50.....	64
Figure 25 : Tests de toxicité aiguë réalisée sur les fongicides (non autorisée dans l'UE); fengycine, kasugamycine et surfactine. Les points représentent les valeurs mesurées, les courbes sont tracées à partir des modèles et les zones ombragées représentent les intervalles de confiance à 95%. La droite en pointillée rouge représente la valeur de CE50.....	65
Figure 26 : Tests de toxicité aiguë réalisée sur les biofongicides; sulfate de cuivre et laminarin. Les points représentent les valeurs mesurées, les courbes sont tracées à partir des modèles et les zones ombragées représentent les intervalles de confiance à 95%. La droite en pointillée rouge représente la valeur de CE50.....	66
Figure 27: Gradient utilisé pour doser le boscalide dans les échantillons. Le composé A est une solution aqueuse contenant 0,1 % (v/v) d'acide formique (H ₂ CO ₂). Le composé B est une solution d'acétonitrile avec 0,1 % (v/v) d'acide formique (H ₂ CO ₂).....	67

Figure 28: Gradient utilisé pour doser la kasugamycine dans les échantillons. Le composé A est une solution aqueuse de formate d'ammonium (NH_4HCO_2 à 20 mM) et de 0,3 % (v/v) d'acide formique (H_2CO_2). Le composé B est une solution d'acétonitrile.	67
Figure 29: Tests de toxicité aiguë de la kasugamycine réalisés sur l'activité de l'enzyme estérase après 5 jours d'exposition. Les points représentent les valeurs mesurées, les courbes sont tracées à partir des modèles et les zones ombragées représentent les intervalles de confiance à 95%. La droite en pointillée rouge représente la valeur de CE10.	68
Figure 30: Tests de toxicité aiguë de la kasugamycine réalisés sur l'activité de l'enzyme estérase après 12 jours d'exposition. Les points représentent les valeurs mesurées, les courbes sont tracées à partir des modèles et les zones ombragées représentent les intervalles de confiance à 95%. La droite en pointillée rouge représente la valeur de CE10.	68
Figure 31: Tests de toxicité aiguë de la kasugamycine réalisés sur l'activité de l'enzyme estérase après 26 jours d'exposition. Les points représentent les valeurs mesurées, les courbes sont tracées à partir des modèles et les zones ombragées représentent les intervalles de confiance à 95%. La droite en pointillée rouge représente la valeur de CE10.	69
Figure 32: Tests de toxicité aiguë du cuivre réalisés sur l'activité de l'enzyme β -glucosidase après 24h d'exposition. Les points représentent les valeurs mesurées, les courbes sont tracées à partir des modèles et les zones ombragées représentent les intervalles de confiance à 95%. La droite en pointillée rouge représente la valeur de CE50.	69
Figure 33: Tests de toxicité aiguë du cuivre réalisés sur l'activité de l'enzyme β -glucosidase après 5 jours d'exposition. Les points représentent les valeurs mesurées, les courbes sont tracées à partir des modèles et les zones ombragées représentent les intervalles de confiance à 95%. La droite en pointillée rouge représente la valeur de CE50.	70
Figure 34: Tests de toxicité aiguë du cuivre réalisés sur l'activité de l'enzyme β -glucosidase après 12 jours d'exposition. Les points représentent les valeurs mesurées, les courbes sont tracées à partir des modèles et les zones ombragées représentent les intervalles de confiance à 95%. La droite en pointillée rouge représente la valeur de CE50.	70
Figure 35: Tests de toxicité aiguë du cuivre réalisés sur l'activité de l'enzyme β -glucosidase après 19 jours d'exposition. Les points représentent les valeurs mesurées, les courbes sont tracées à partir des modèles et les zones ombragées représentent les intervalles de confiance à 95%. La droite en pointillée rouge représente la valeur de CE50.	71
Figure 36: Tests de toxicité aiguë du cuivre réalisés sur l'activité de l'enzyme β -glucosidase après 26 jours d'exposition. Les points représentent les valeurs mesurées, les courbes sont tracées à partir des modèles et les zones ombragées représentent les intervalles de confiance à 95%. La droite en pointillée rouge représente la valeur de CE50.	71
Figure 37: Tests de toxicité aiguë du cuivre réalisés sur le rendement photosynthétique après 26 jours d'exposition. Les points représentent les valeurs mesurées, les courbes sont tracées à partir des modèles et les zones ombragées représentent les intervalles de confiance à 95%. La droite en pointillée rouge représente la valeur de CE50.	72

Liste des tableaux

Tableau 1: Liste des fongicides testés pour les tests de toxicité aiguë	14
Tableau 2: Caractéristiques des solutions mères utilisées pour la contamination des canaux.....	25
Tableau 3: Les types de descripteurs biologiques analysés à chaque temps (N : NON; analyse non réalisée, O : OUI; analyse réalisée).....	29
Tableau 4: Gamme de contaminants utilisée pour les tests PICT	31
Tableau 5: Résultats des tests de toxicité aiguë des différents contaminants réalisés sur les descripteurs biologiques. Les cases rouges signifient que la concentration max testés du contaminant a entraîné une inhibition d'au moins 50 % de la valeur du descripteur biologique du contrôle. Les C _{max} représentent les concentrations maximales testées par descripteur et par contaminant. Glu : β-Glucosidase, Leu : Leucine-aminopeptidase, Pho : Phosphatase.....	32
Tableau 7: Moyennes et écart-types des paramètres physico-chimiques et des concentrations en fongicides de chaque condition d'exposition. Les valeurs de pH, température, conductivité et oxygène ont été mesurés dans chaque canal avant et après chaque changement d'eau. Le débit a été mesuré trois fois dans chaque canal, les valeurs d'illumination ont été mesurées deux fois par canal. Les concentrations en fongicide ont été mesurées une fois par semaine dans chaque canal après et avant changement d'eau.....	34
Tableau 8: Moyennes et écart-types des anions et du COT prélevées dans la cuve de préparation de l'eau des canaux	35
Tableau 9: Gamme de concentrations du boscalide (mg/L) utilisée pour les tests de toxicité aiguë...	60
Tableau 10: Gamme de concentrations de la fengycine (mg/L) utilisée pour les tests de toxicité aiguë	60
Tableau 11: Gamme de concentrations de l'azoxystrobin (mg/L) utilisée pour les tests de toxicité aiguë	61
Tableau 12: Gamme de concentrations de la surfactine (mg/L) utilisée pour les tests de toxicité aiguë	61
Tableau 13: Gamme de concentrations du sulfate de cuivre (mg/L de Cu) utilisée pour les tests de toxicité aiguë	62
Tableau 14: Gamme de concentrations de laminarin (mg/L) utilisée pour les tests de toxicité aiguë.	62
Tableau 15: Gamme de concentrations de kasugamycine (mg/L) utilisée pour les tests de toxicité aiguë	63
Tableau 16: Gamme de concentrations de tébuconazole (mg/L) utilisée pour les tests de toxicité aiguë	63

1 Introduction

Selon la Commission européenne (Commission 2022), un pesticide est une substance « qui prévient, détruit, contrôle les organismes nuisibles ('pest') ou les maladies, ou qui protège les plantes durant la production, le stockage ou le transport ». Les pesticides peuvent être classés de différentes façons notamment en fonction de leur cible (herbicide, insecticide, fongicide, etc.) ou en fonction de leur utilisation ; en agriculture biologique ou conventionnelle (pesticides naturels ou de synthèse).

La réduction de l'utilisation des pesticides et particulièrement des produits phytosanitaires de synthèse (pesticides de synthèse) est un sujet émergent et qui commence doucement à prendre de l'importance. Une réglementation au niveau de l'Union Européenne avait pour ambition de diminuer de 50 % l'usage des produits phytosanitaires d'ici à 2030, par rapport aux moyennes des années 2015, 2016 et 2017 (Olivier 2024). Bien que cette réglementation ait finalement été abandonnée, elle met en exergue une volonté globale de transition vers une agriculture plus durable. En France, la réglementation suit cette tendance de changement. Bien que certains objectifs précédents n'ont pas été respectés tels que la sortie du glyphosate d'ici 2020 (plan *Écophyto II+* ; Ministère de l'Agriculture et de la Souveraineté alimentaire 2022). En mai 2024, le ministère de l'Agriculture et de la Souveraineté alimentaire a publié une nouvelle stratégie concernant les pesticides : *Écophyto 2030* (Ministère de l'Agriculture et de la Souveraineté alimentaire 2024). Parmi les axes de travail proposés par ce nouveau plan, le premier axe incite à la recherche d'alternatives aux méthodes chimiques (notamment les pesticides de synthèse) au bénéfice des méthodes de biocontrôles (telles que les substances d'origine naturelle). Ces prémices de changement ont déjà été observées avant le déploiement de ce plan. Selon les chiffres de la BNV-d (Banque National des Ventes des distributeurs), une augmentation de l'utilisation de produits de biocontrôle ainsi que de produits utilisables en agriculture biologique avait été observée entre 2009 et 2021. Entre 2020 et 2021, les ventes de ces substances ont progressé de 13 % (Ministère de la Transition Ecologique et de la Cohésion des Territoires 2022). Certaines études, telles que celle d'Ayilara et al. (2023) ou celle de Brown, Brown, et Nepomuceno (2016), présentent les pesticides d'origine naturelle appelés aussi biopesticides comme des alternatives prometteuses aux pesticides synthétiques.

Dans le cadre de ces changements de pratique, il est important de connaître les effets que peuvent avoir les biopesticides sur l'environnement. Des études ont déjà montré que certains biopesticides avaient des effets néfastes sur les organismes non ciblés (Pino-Otín et al. 2019). De plus, dans les produits utilisés en agriculture biologique, certains ont des toxicités connues depuis longtemps comme par exemple le cuivre, employé comme biofongicide malgré sa toxicité sur les organismes non ciblés (Nor 1987).

Dans le but d'étudier les différences entre les biofongicides et les fongicides de synthèse, le projet MEMENTO (**M**etabolomic approach to **d**ecipher **i**nduced tolerance to (bio)fungicides in aquatic **b**iofilms) a vu le jour. En 2020 en France, les fongicides et bactéricides représentaient plus d'un quart du Nombre de Dose Unité (NODU : représente le nombre de traitement moyen sur une année en France) utilisé en agriculture (Ministère de l'Agriculture et de la Souveraineté alimentaire 2020). Le projet MEMENTO a pour objectif global de mieux comprendre les phénomènes d'acquisition de tolérance aux fongicides de synthèse et aux biofongicides chez les communautés microbiennes aquatiques. Pour ce projet, les communautés microbiennes du périphyton ont été choisies comme sujet d'étude car le périphyton regroupe différents groupes taxonomiques (algues, cyanobactéries, bactéries, etc.), ce qui lui permet d'assurer différents services écosystémiques. De plus, le périphyton est présent dans tous les écosystèmes aquatiques, même les plus perturbés (Guasch et al. 2017; Bonnineau et al. 2020; Morin et Artigas 2023).

L'expérimentation présentée dans ce rapport a pour ambition de comparer l'effet de trois fongicides sur les communautés microbiennes du périphyton. Les trois substances étudiées sont le boscalide (un fongicide de synthèse), le sulfate de cuivre (un biopesticide) et la kasugamycine (un

fongicide d'origine naturelle non autorisé en Union Européenne (UE) mais utilisé dans d'autres pays). Le but étant de vérifier si le périphyton développe une tolérance à ces fongicides et de caractériser les réponses moléculaires, structurelles et fonctionnelles des communautés au travers de différents descripteurs biologiques et ainsi de mieux comprendre la façon dont les communautés microbiennes peuvent devenir plus tolérantes à des pesticides.

2 État de l'art

2.1 Les fongicides

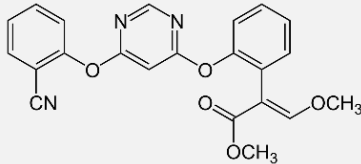
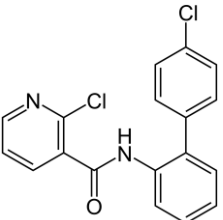
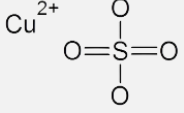
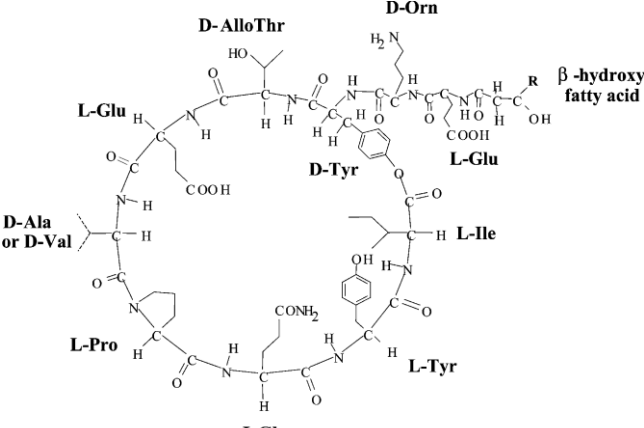
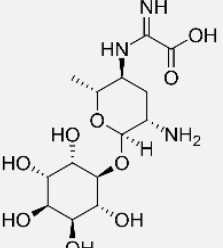
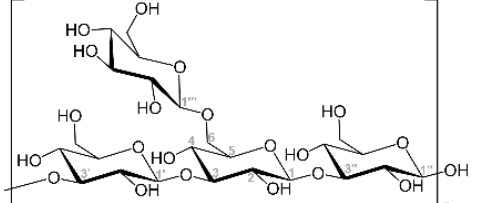
Pour les pesticides organiques en France, la réglementation fixe le seuil maximal pour l'eau du robinet à 0,1 µg/L par substance chimique, de plus, la somme des concentrations de ces composés ne doit pas excéder 0,5 µg/L. Pour les eaux brutes sans traitement, chaque substance ne doit pas excéder 2 µg/L et la somme des concentrations de ces substances doit rester inférieure à 5 µg/L (notre-environnement 2024).

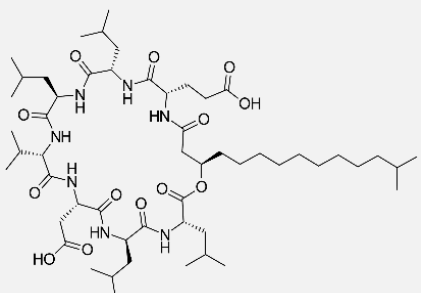
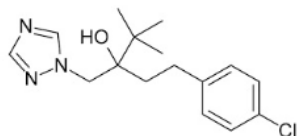
L'indice IPTC (Intensité des Pressions Toxiques Cumulées) permet de rendre compte du potentiel risque que les pesticides pourraient avoir sur la vie des organismes aquatiques. Lorsqu'il est supérieur à 1, cela signifie qu'il y a une forte pression toxique dans au moins un échantillon d'une station. Cet indice ne tient compte que de 64 pesticides, néanmoins il permet de donner une idée globale des pressions que ces substances peuvent exercer sur les cours d'eau (notre-environnement 2023). Entre 2008 et 2020, en France métropolitaine, une station sur deux présentait un IPTC supérieur à 1, ce qui représente un risque notable pour la faune et la flore aquatique. Au cours de ce suivi sur plus de 10 ans, il a été remarqué que la situation semble s'améliorer (en 2020 il y avait une baisse de 10 % des stations présentant un IPTC > 1 en comparaison avec 2008).

La Nouvelle-Aquitaine n'est pas exempte de cette pression chimique exercée sur les écosystèmes aquatiques. Il s'agit de la deuxième région en France ayant le plus de surface viticole. Afin de protéger les récoltes, les fongicides sont souvent utilisés pour lutter contre certains champignons, notamment le mildiou (*Plasmopara viticola*) et l'oïdium de la vigne (*Uncinula necator*). Dans cette région, en 2016, 80 % de l'IFT total (Indicateur de Fréquence de Traitement) était consacré à la lutte contre les champignons (Direction Régionale 2019).

Parmi les fongicides, les composés cuivrés (comme le sulfate de cuivre) font partie des produits utilisés, notamment en agriculture biologique par l'Union Européenne. La laminarin est aussi un fongicide d'origine naturelle utilisé en agriculture biologique (Union 2022). Bien que la tendance soit aux changements de pratiques, les pesticides de synthèse boscalide, azoxystrobin et tébuconazole sont toujours employés en Europe dans la lutte contre les champignons en agriculture. De plus, de nouveaux composés issus de sources naturelles sont également autorisés hors UE tels que la kasugamycine (Gouvernement du Canada 2012; Ministère Japonais), ou encore à l'étude tels que la fengycine et la surfactine (Desmyttere et al. 2019). Lors de ce stage, la toxicité aiguë de tous les composés cités précédemment a été évaluée. Les informations générales sur ces substances sont répertoriées dans le tableau ci-dessous ([Tableau 1](#)). La toxicité chronique du sulfate de cuivre, du boscalide et de la kasugamycine a également été évaluée. Pour ces substances des informations plus détaillées sont données dans les paragraphes suivants.

Tableau 1: Liste des fongicides testés pour les tests de toxicité aiguë

Fongicides testés	Utilisation en Union Européenne	Formule chimique	Molécule chimique
Azoxystrobin	Autorisé (mais pas en agriculture biologique)	$C_{22}H_{17}N_3O_5$	
Boscalide	Autorisé (mais pas en agriculture biologique)	$C_{18}H_{12}Cl_2N_2O$	
Sulfate de cuivre	Autorisé en agriculture biologique	$CuSO_4$	
Fengycine	Non autorisé (manque de données)	$C_{72}H_{110}N_{12}O_{20}$	
Kasugamycine	Non autorisé (manque de données)	$C_{14}H_{25}N_3O_9$	
Laminarin	Autorisé en agriculture biologique	$(C_{24}H_{41}O_{21})_n$	

Fongicides testés	Utilisation en Union Européenne	Formule chimique	Molécule chimique
Surfactine	Non autorisé (manque de données)	$C_{53}H_{93}N_7O_{13}$	
Tébuconazole	Autorisé (mais pas en agriculture biologique)	$C_{16}H_{22}ClN_3O$	

2.1.1 Le boscalide

Le boscalide est un fongicide utilisé en agriculture conventionnelle. Il fait partie de la famille des *Succinate Dehydrogenase Inhibitors* (inhibiteurs de la succinate déshydrogénase ; SDHI). Cette famille regroupe 11 fongicides. En France, en 2020, le boscalide était le 3^{ème} composé de la famille des SDHI le plus vendu. Le boscalide est autorisé dans l'Union Européenne depuis 2008. Même si ce composé a vu sa consommation chuter depuis 2008, passant de plus de 500 tonnes vendues en France à 75 tonnes vendues en 2020, il reste un composé encore important sur le marché des fongicides (Anses 2020). Aux États-Unis, une équipe de recherche a échantillonné différents points d'eau douce dans des zones où des fongicides sont utilisés, afin de détecter leur présence et leur concentration. Le boscalide avait une concentration maximale détectée de 0,109 µg/L (Reilly et al. 2012).

Pour limiter ou empêcher le développement des organismes fongiques, le boscalide inhibe l'activité de l'enzyme succinate déshydrogénase (Anses 2020). Cette enzyme est présente dans un grand nombre d'êtres vivants y compris chez les bactéries. Chez les eucaryotes, elle se situe dans la membrane mitochondriale. La succinate déshydrogénase intervient dans le cycle de Krebs. Ce dernier a un rôle important dans le vivant ; par exemple, il intervient dans la synthèse de NADPH (Nicotinamide Adénine Dinucléotide Phosphate) et de glutathion, dans la production de chaleur mitochondriale et il participe à la respiration (Oyedotun et Lemire 2004; Bénit et al. 2018). Le boscalide est donc susceptible d'affecter de nombreux organismes vivants. L'European Chemicals Agency (Agence Européenne des produits chimiques ; ECHA) a classé le boscalide comme substance susceptible de provoquer des effets Cancérogènes Mutagènes, ou Reprotoxiques (CMR) (ECHA). Ce fongicide présente également un danger pour la vie aquatique. Il est « toxique pour les organismes aquatiques et entraîne des effets néfastes à long terme » (mention H411, règlement Commission Européenne).

Parmi les organismes aquatiques, Aksakal (2020) a montré la nocivité du boscalide pour les daphnies. Après 48h d'exposition, les daphnies exposées à des concentrations de boscalide de 5 à 10 mg/L présentaient une réduction significative des activités des enzymes antioxydantes : superoxyde dismutase et glutathione-s-transferase ainsi qu'une augmentation de la malondialdéhyde et de l'activité catalase par rapport au contrôle. Sur le long terme (21 jours d'exposition), les daphnies contaminées à ce fongicide présentaient une diminution de la fréquence de mue et une altération de la reproduction (diminution du nombre de nouveau-nés et du nombre d'embryons par femelle pour les concentrations 5 et 10 mg/L). Comme le boscalide intervient dans le cycle de Krebs, il entraînerait une diminution de la quantité d'énergie chez les daphnies, et donc ces organismes auraient moins d'énergie à allouer à la reproduction.

Toujours concernant les organismes aquatiques, Qian et al. (2018) ont mis en évidence une diminution significative de la densité cellulaire de l'algue verte (*Chlorella vulgaris*) en comparaison avec le contrôle dès 48 h d'exposition et jusqu'à 96 h d'exposition à des concentrations allant de 1,68 mg/L à 3,48 mg/L. De plus la quantité de chlorophylle a et de chlorophylle b a également diminué significativement, en comparaison au contrôle, pour les algues vertes exposées à 1,6 mg/L, 2,4 mg/L et 3,2 mg/L de boscalide après 96 h d'exposition.

Le boscalide a également des effets sur les activités enzymatiques des communautés microbiennes. Dans un sol exposé à 200 mg/kg de boscalide, l'activité phosphatase et l'activité β -D-glucosidase étaient significativement plus basses que dans le sol contrôle dès 7 jours d'exposition pour la phosphatase et à partir de 21 jour pour la β -D-glucosidase, cette baisse a duré toute l'expérience (jusqu'à 60 jours) (Xiong et al. 2014).

2.1.2 La kasugamycine

La kasugamycine n'est pas autorisée au sein de l'Union Européenne. Néanmoins, certains pays l'utilisent déjà comme le Canada (autorisation depuis 2012 ; (Gouvernement du Canada 2012) ou le Japon (Ministère Japonais). Ce composé est utilisé en tant que bactéricide et fongicide. La kasugamycine a été découverte en 1961 par le groupe du Dr Sumiki. Elle est utilisée depuis 1962 au Japon pour lutter contre la contamination du champignon blast (*Piricularia oryzae*) dans les cultures de riz (Ishiyama et al. 1965). Cette molécule est produite par la bactérie *Streptomyces kasagiensis* et fait partie de la famille des aminoglycosides. La kasugamycine inhibe la synthèse des protéines en intervenant au niveau du ribosome (Gouvernement du Canada 2012). Cette substance n'a pas été classée comme CMR selon la réglementation de l'Union Européenne.

Comme la kasugamycine est utilisée comme bactéricide, certaines études ont montré des effets sur la structure et les fonctions des communautés bactériennes présentes dans l'eau, les sédiments et le sol telle que l'étude de Huang et al. (2010). Pour évaluer l'effet de la kasugamycine sur les communautés microbiennes, des sédiments ont été échantillonnés dans la rivière Fazih (à Taiwan), puis répartis dans des microcosmes contrôles (sans contaminant) ou contaminés à la kasugamycine (168,4 mg/L ou 1462,9 mg/L). Après 30 jours d'exposition, la présence de kasugamycine a entraîné un changement dans la composition bactérienne de l'eau de surface et des sédiments (mis en évidence par analyse DGGE), impliquant une sélection d'espèces tolérantes. Cela a permis de montrer que la kasugamycine peut entraîner un changement dans la composition des communautés bactériennes.

Wang et al. (2021) a mis en évidence une variation des activités enzymatiques et de la composition des communautés microbiennes du sol après un traitement à la kasugamycine. Pour ce faire, le sol a été traité à la kasugamycine (12,5 kg/ha), puis 14 jours après le traitement des concombres ont été plantés (ils ont été enlevés 110 jours après le traitement). La présence de kasugamycine dans le sol a entraîné une augmentation de la présence de la bactérie Gemmatimonadetes par rapport au sol non-traité, après 14, 55 et 110 jours. Après 14 jours d'exposition, la kasugamycine a également augmenté l'activité de l'enzyme catalase en comparaison au contrôle. Après 55 jours d'exposition, l'activité de l'enzyme sucrase était significativement plus faible que celle du contrôle alors que celle de l'urease était significativement plus importante. A notre connaissance, aucun article mesurant la concentration en kasugamycine dans les eaux de surface n'a été publié.

2.1.3 Le cuivre

Le cuivre est utilisé pour prévenir et lutter contre les maladies fongiques et bactériennes. Il est autorisé en agriculture biologique mais également employé en agriculture conventionnelle (Ministère, s. d.). Le cuivre peut être utilisé sous différentes formes telles que l'hydroxyde de cuivre $\text{Cu}(\text{OH})_2$, l'oxyde de cuivre CuO ou bien le sulfate de cuivre CuSO_4 . Ce dernier est le composé présent dans la bouillie bordelaise (Commission Européenne 2021). Selon la BNV-d, le sulfate de cuivre était la forme la plus vendue en France entre 2010 et 2019 avec un total des ventes par année relativement stable

sur cette période (Anses 2022). Dans un bassin viticole méditerranéen, les concentrations dissoutes en cuivre dans les eaux de rivières pouvaient atteindre jusqu'à 8 µg/L (El Azzi et al. 2013). Une autre étude menée sur la rivière Morcille dans le Beaujolais (en France) a relevé des concentrations en cuivre de plus de 16 µg/L ; il s'agit également d'une zone viticole (Montuelle et al. 2010).

Le cuivre est un élément retrouvé naturellement dans l'environnement. C'est un nutriment minéral essentiel au développement des organismes. Par exemple, chez les végétaux, il est impliqué dans le transport d'électrons photosynthétiques au niveau des chloroplastes (Puig et al. 2007). Lorsqu'il est absent, la croissance des végétaux peut être ralentie (Yruela 2009). Néanmoins, à des concentrations plus importantes, le cuivre devient toxique pour les organismes vivants. La World Health Organization (Organisation Mondiale de la santé ; WHO) recommande une concentration en cuivre de 2 mg/L pour l'eau destinée à la consommation humaine (Thompson et World Health Organization 2007). Sous forme de poudre de sulfate de cuivre, il est notamment vendu avec plusieurs mentions de danger (règlement de la Commission Européenne) et notamment celle concernant le risque pour la vie aquatique « Très toxique pour les organismes aquatiques, entraîne des effets néfastes à long terme (H410) ».

De nombreux articles relatent des effets négatifs du cuivre sur la faune et la flore. Ce métal peut réduire la croissance des végétaux et de leurs racines, altérer la photosynthèse et entraîner la mort du végétal (Marques et al. 2019 (exposition de *Peltophorum dubium* pendant 150 jours à 100 à 400 mg/kg dans le sol); Brunetto et al. 2019 (exposition de *Vitis labrusca* pendant 90 jours à 60 mg/kg dans le sol); Trentin et al. 2019 (exposition de *Vitis vinifera* pendant 1 an à 122 mg/kg dans le sol); Djeukam et al. 2016 (exposition de *Betula papyfera* pendant 8 jours à 9 à 3900 mg/kg dans le sol)). La toxicité du cuivre pourrait également provenir du stress oxydatif. Les ions cuivreux Cu^+ et les ions cuivriques Cu^{2+} participeraient à la formation du radical hydroxyle HO^* (Gaetke et Chow 2003). Ce dernier a la capacité d'interagir avec beaucoup de biomolécules, générant du stress oxydatif (Buettner 1993).

Ces fongicides à base de cuivre peuvent être un danger pour les organismes. Ils proviennent essentiellement des zones agricoles. Cependant avec les précipitations, ces contaminants peuvent être lessivés et se retrouver dans d'autres compartiments. Ils sont par exemple retrouvés dans les milieux aquatiques, tels que les eaux souterraines, les lacs ou bien encore les cours d'eau (EauFrance et INERIS 2022). En se retrouvant dans les points d'eau, ces pesticides peuvent affecter des organismes non ciblés. Les fongicides destinés aux champignons pourraient alors altérer le fonctionnement d'autres organismes, faune ou flore. Le périphyton, un consortium d'organismes, peut alors être utilisé pour rendre compte de l'impact de ces substances chimiques sur divers micro-organismes.

2.2 Le périphyton

2.2.1 Définition et composition du périphyton

Les termes « biofilm » et « périphyton » sont souvent utilisés comme des synonymes. Ils représentent tous les deux des communautés de microorganismes qui se développent sur un substrat. Cependant, ils présentent des différences au niveau de leur composition. L'appellation « biofilm » est retrouvée dans différents secteurs comme la santé et dans les processus industriels. En effet, le biofilm est utilisé pour désigner la plaque dentaire, les microorganismes dans les cathéters et les implants (responsables d'infections) ainsi que les microorganismes recouvrant les coques de navires, les tuyauteries (Battin et al. 2016), les systèmes de traitement d'eau potable, mais il est aussi retrouvé dans l'environnement dans les milieux aquatiques.

En fonction du type de biofilm, ce ne sont pas les mêmes organismes qui le composent. Par exemple, le biofilm dentaire est essentiellement composé de bactéries, alors que le biofilm retrouvé dans les milieux aquatiques peut être composé d'une plus grande diversité de communautés (algues, fongiques, bactériennes, protozoaires, ainsi que des microinvertébrés) (Battin et al. 2016; Guasch et

al. 2016) (Figure 1). Wetzel définit le périphyton comme « une communauté complexe de microbiotes (algues, bactéries, champignons, animaux, débris organiques ou inorganiques) qui est attachée à un substrat ». Il complète en expliquant que le substrat peut être de différente nature : organique inorganique, ou vivant, mort (Wetzel 1983). Pour ce rapport le terme « périphyton » sera privilégié. Les communautés retrouvées dans le périphyton dépendent de la nature du substrat, et des conditions environnementales, notamment de l'intensité lumineuse, de la disponibilité en nutriments organiques et inorganiques dissous (Sabater et al. 2006; Ylla et al. 2009).

Le périphyton est majoritairement composé d'une matrice de substances extracellulaires, qui représentent entre 50 à 90 % de la matière organique totale (Saikia 2011). Cette matrice est constituée d'un ensemble de biopolymères appelés EPS (Extracellular Polymeric Substance ; Substances Polymériques Extracellulaires). Ces molécules sont, en partie, produites par des bactéries, mais aussi par des microalgues et par certains champignons (par exemple ; *Candida*) (Flemming et Wingender 2010). Cette matrice comprend de nombreux polymères tels que les polysaccharides, les acides nucléiques et les protéines. De plus, dans cette matrice, il y a aussi des lipides et des substances humiques. L'ADN présent dans la matrice du périphyton provient des cellules lysées. La proportion d'EPS ainsi que sa composition varient en fonction des microorganismes présents dans le périphyton, et en fonction des conditions environnementales (les forces de cisaillement, la température, la disponibilité en nutriments, etc.) (Flemming et Wingender 2010).

La matrice d'EPS est responsable de la structure tridimensionnelle du périphyton. Cette structure, ainsi que sa composition particulière, permettent à la matrice d'assurer de nombreuses fonctions. C'est la matrice qui est responsable de l'adhésion du périphyton au substrat et de la cohésion du périphyton. Elle a aussi un rôle de sorption de certains composés, notamment les nutriments et les ions inorganiques. Dans la matrice, il se produit des échanges (communication cellule-cellule et transfert de gènes) et des composés sont transformés dû à des réactions d'oxydo-réduction et des digestions de molécules par des enzymes. La matrice EPS possède des propriétés hydrophobes et hydrophiles. La caractéristique hydrophobe est liée à la présence des lipides et à certains EPS, notamment ceux qui possèdent des groupes méthyles. Cependant, des molécules comme les protéines et l'ADN ont des caractéristiques hydrophobes et hydrophiles. Certains polysaccharides possèdent des caractères hydrophiles. De plus, la matrice est essentiellement composée d'eau. Cela permet au périphyton de maintenir un environnement hydraté pour les cellules qui y vivent, et éviter le risque de dessiccation (Flemming et Wingender 2010).

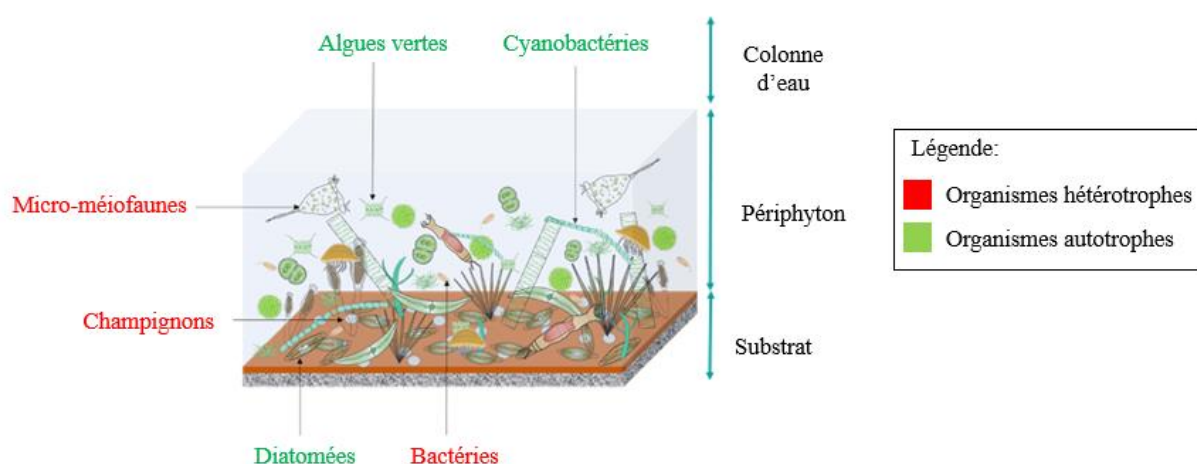


Figure 1: Représentation schématique du périphyton et des organismes qui le compose (© L. MALBEZIN)

2.2.2 Formation du périphyton dans le milieu aquatique

Pour que le périphyton se développe, il a besoin d'un substrat qu'il soit organique ou inorganique. Sa formation est un processus cyclique qui permet au périphyton de coloniser différentes surfaces. Son développement se décompose en plusieurs étapes schématisées dans la [Figure 2](#). Tout d'abord, des cellules planctoniques viennent s'attacher à la surface. Il s'agit de bactéries qui se fixent de manière réversible au substrat en utilisant notamment leur flagelle. Pour que l'attachement devienne irréversible, les bactéries commencent à sécréter des EPS au détriment de l'expression de leur gène lié à leur flagelle (Sauer et al. 2022). Les bactéries commencent à produire des EPS afin de se protéger contre leurs prédateurs et d'améliorer leur résistance aux radiations et à la déshydratation (Saikia 2011). Ensuite, il y a l'étape de maturation du périphyton, l'apparition d'amas de cellules (Maturation I), puis des agglomérations plus importantes appelées microcolonies (Maturation II). D'autres cellules comme les protozoaires, les microalgues ou les cyanobactéries viennent coloniser le substrat où les bactéries ont sécrété des EPS. Finalement, il y a l'étape de dispersion, qui coïncide avec la dégradation de la matrice, ce qui permettrait aux cellules de redevenir mobiles et d'aller coloniser un nouveau substrat (Sauer et al. 2022).

2.2.3 Fonctions du périphyton dans l'environnement

La structure particulière du périphyton, communautés variées et matrice, lui permet de remplir différents rôles dans l'environnement. Le périphyton contient des organismes autotrophes comme les microalgues et les cyanobactéries. En utilisant la photosynthèse, ces microorganismes produisent leur propre matière organique à partir de ressources minérales. De ce fait, le périphyton est à la base de la chaîne trophique. De nombreux consommateurs primaires l'utilisent comme source de nourriture. Par exemple, les larves de Chironomidae se réfugient dans le périphyton, s'en nourrissent et s'y développent. De manière générale, ce sont les algues qui sont responsables du transfert des nutriments vers les niveaux trophiques supérieurs (Saikia 2011).

La matrice d'EPS a aussi pour fonction d'absorber les nutriments présents dans la colonne d'eau, ainsi elle est consommée en même temps que les microorganismes du périphyton et, contribue aussi à la distribution des nutriments dans la chaîne alimentaire. Les organismes autotrophes interviennent aussi dans les cycles biogéochimiques, notamment le cycle du carbone et de l'oxygène. Ils piègent le carbone, présent dans l'eau sous forme de dioxyde de carbone (CO_2) dissous et l'utilisent

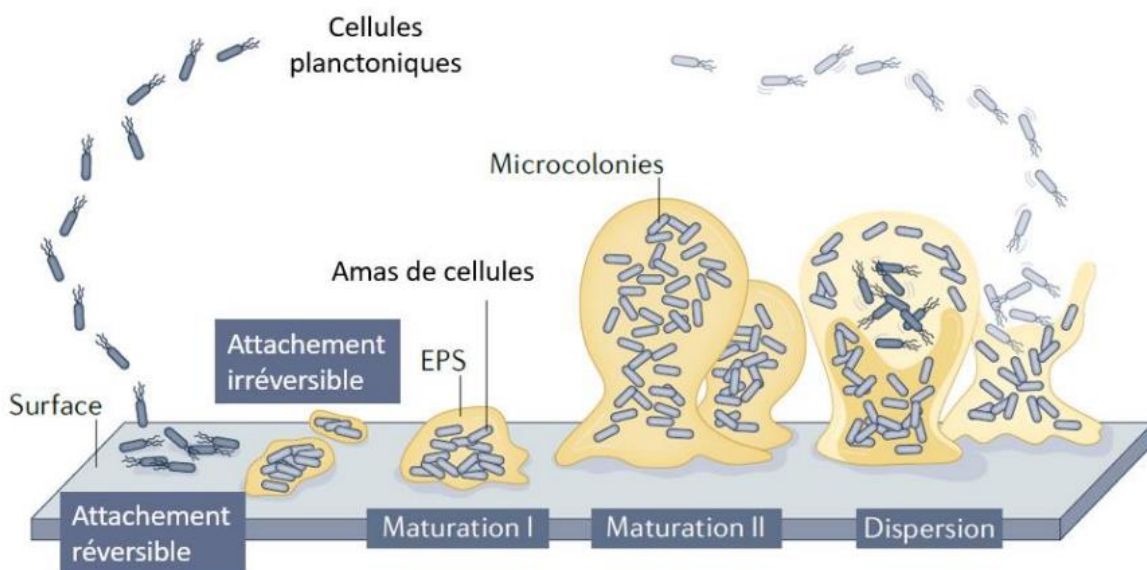


Figure 2: Étapes de la formation du biofilm (modifié de la Fig.1 ; (Sauer et al. 2022))

dans le processus de photosynthèse. Ainsi, les autotrophes produisent et libèrent du dioxygène (O₂) dans le milieu (Roeselers, Loosdrecht, et Muyzer 2008).

Le périphyton est aussi un site clé pour l'activité enzymatique (Battin et al. 2016). Les bactéries et certains champignons sont responsables de la production d'enzymes. Parmi ces molécules, il y a la leucine-aminopeptidase qui décompose les peptides, la β -glucosidase qui intervient dans la dégradation des polysaccharides et la β -glucosaminidase qui contribue en partie à dégrader la chitine (polymère de la famille des glucides) et le peptidoglycane (un composant de la paroi bactérienne) (Romaní et al. 2008). Ces enzymes interviennent dans la décomposition de polymères qui constituent la matrice, elles jouent donc un rôle dans l'étape finale de dispersion du périphyton. Elles permettent aux cellules de se détacher en dégradant les EPS. Elles ont donc un rôle important dans le cycle des éléments nutritifs. Par la dégradation de la matière organique, elles remettent en circulation les nutriments essentiels.

2.2.4 Interactions entre le périphyton et les contaminants

Il existe différentes façons pour les micro-organismes du périphyton d'interagir avec les contaminants (Figure 3). Différents mécanismes peuvent intervenir en fonction du type de polluant avec lequel le périphyton est en contact, comme schématisé ci-dessous (Fig. 3, Bonnineau et al., 2020).

La matrice intervient dans les interactions avec les polluants. Le contaminant peut être adsorbé par les EPS de façon passive, s'accumuler dedans, y être transformé ou bien encore y être séquestré. Notamment, certains polluants peuvent être dégradés par des enzymes présentes dans la matrice. Ensuite, les substances chimiques peuvent réagir avec les microorganismes du périphyton. Ils peuvent être adsorbés à la paroi cellulaire et, par exemple, en utilisant un transporteur transmembranaire (transport passif, facilité ou actif), entrer dans la cellule. Une fois dans la cellule, il y a aussi différents comportements possibles. Certaines substances s'accumulent dans la cellule, d'autres sont métabolisées et extraites de la cellule, ou bien séquestrées. D'autres substances sont minéralisées et ainsi la cellule garde les composés qui lui servent.

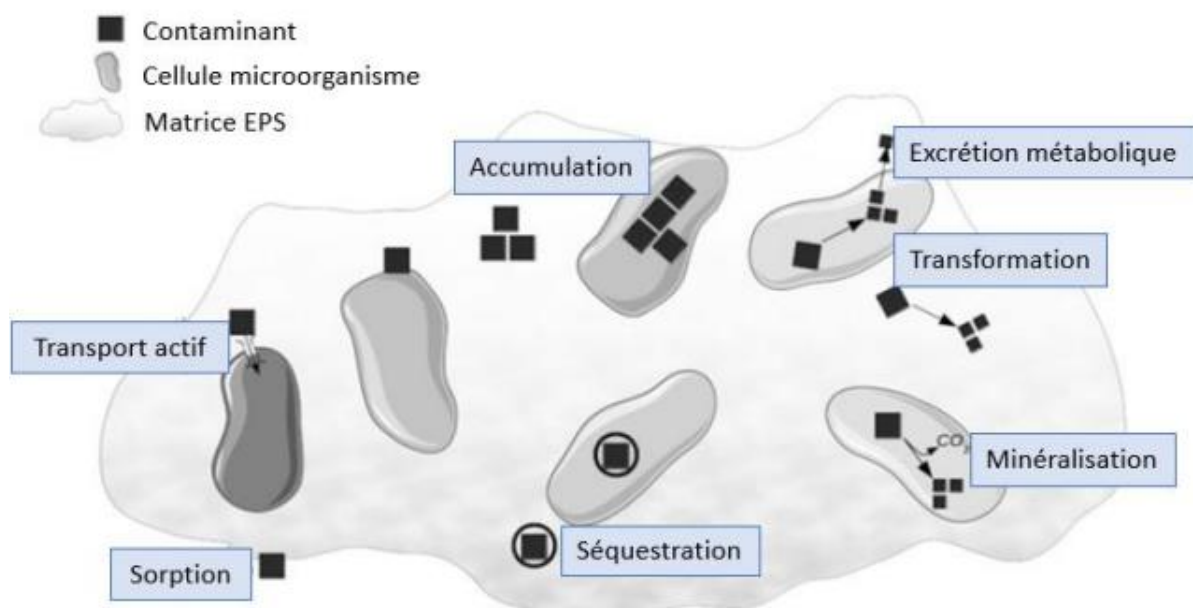


Figure 3: Représentation schématique des interactions entre le périphyton et les contaminants (modifié de la Fig.3 ; (Bonnineau et al. 2020))

Les métaux, comme le cuivre ainsi que les contaminants organiques peuvent s'accumuler dans les cellules du périphyton (Laderriere, Le Faucheur, et Fortin 2021; Rheinheimer Dos Santos et al. 2020). L'accumulation dans le périphyton ne concerne pas seulement les métaux. Une étude comparative de l'accumulation des composés organiques dans les sédiments et dans le périphyton a montré que plusieurs contaminants organiques, dont le boscalide, s'accumulaient plus dans le périphyton que dans le sédiment (Mahler et al. 2020). En ce qui concerne la toxicité, des études mettent en exergue l'effet des contaminants sur les communautés du périphyton. La présence de pesticides organiques peut entraîner une modification de la densité de diatomées, de la biomasse, de l'efficacité photosynthétique ou encore des activités enzymatiques (Kim Tiam et al. 2015). Le cuivre impacte également les communautés du périphyton. Ce métal peut, par exemple, modifier la structure et l'activité photosynthétique du périphyton (Lambert et al. 2016). L'ensemble des communautés du périphyton sont vulnérables à la présence de pesticides organiques et inorganiques. Néanmoins, la pression exercée par un polluant sur le périphyton est susceptible d'entraîner une modification moléculaire, structurelle et fonctionnelle des communautés périphytiques. Ces dernières peuvent alors devenir plus résistantes au polluant.

2.3 Approche PICT

L'approche *Pollution-Induced Community Tolerance* (Tolérance communautaire induite par une pollution ; PICT) repose sur le principe selon lequel une communauté d'organismes ayant été exposée à un contaminant développe par la suite une résistance à cette même substance chimique. Cette approche a été proposée par Blanck et al. (1988). Le principe de ce test peut être décrit en plusieurs étapes (Bérard et al. 2002) présentées dans le schéma de la [Figure 4](#). Les tests de toxicité aiguë réalisées permettent d'obtenir des courbes doses-réponses. Les valeurs seuils et leurs incertitudes associées, issues de ces courbes doses-réponses permettent de comparer le périphyton chroniquement exposé à un contaminant au contrôle et ainsi d'évaluer une éventuelle tolérance vis-à-vis du polluant chez le périphyton. Dans ce rapport, les valeurs seuils de CE10 et CE50 ont été utilisées. Elles correspondent respectivement aux concentrations d'un composé pour lesquelles 10 et 50 % de la population présente une réponse.

L'acquisition de tolérance vis-à-vis d'un contaminant provient d'une sélection intraspécifique et interspécifique. Au niveau intraspécifique, les organismes possèdent des différences sur leur phénotype ou leur génome. Ces différences impliquent que certains organismes sont plus sensibles à certains polluants et sont alors plus facilement éliminés que d'autres organismes plus résistants. De nombreuses études ont montré que certains organismes étaient plus tolérants que d'autres au sein d'une même espèce. Ce phénomène a notamment été observé chez les algues avec des contaminants organiques et inorganiques (Foster 1982; Hersh et Crumpton 1989; Takamura, Kasai, et Watanabe 1989; Kasai, Takamura, et Hatakeyama 1993).

Au niveau interspécifique, les communautés ont des caractéristiques différentes et par conséquent une tolérance différente vis-à-vis des polluants. Certaines espèces prolifèrent alors que d'autres seront totalement éliminées. Cette sélection a déjà été observée sur plusieurs communautés ; chez les algues exposées à des herbicides (Annette Bérard et Pelte 1999) ou bien encore chez les espèces phytoplanctoniques exposées à du zinc (Loez, Topalián, et Salibián 1995).

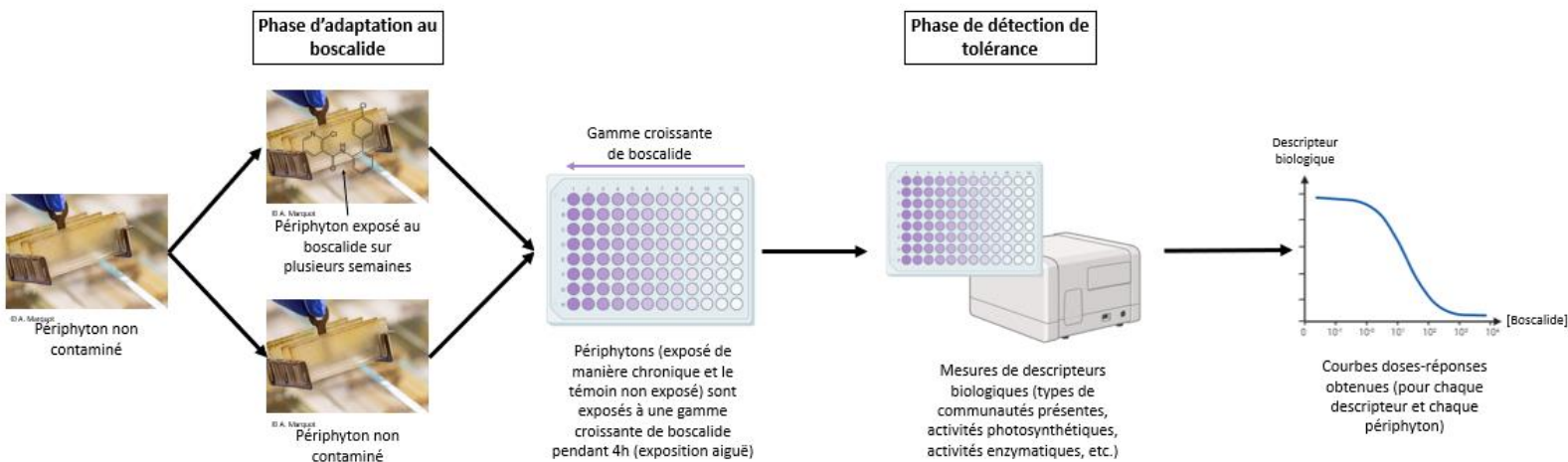


Figure 4: Principe de l'approche PICT décrite en plusieurs étapes en prenant pour exemple le périphyton et le boscalide

Le périphyton est composé de différentes communautés, notamment certaines capables de développer une tolérance. Des recherches ont été faites dans ce sens ; c'est-à-dire pour connaître les composés entraînant une résistance chez les communautés périphytiques. Ainsi Soldo et Behra (2000) ont mis en évidence une acquisition de tolérance au cuivre chez du périphyton exposé à une concentration supérieure ou égale à $0,1 \mu\text{M}$ de cuivre dans l'eau durant 12 semaines. Le même phénomène a été mis en évidence pour un fongicide et un herbicide organique. Les communautés du périphyton provenant d'un site pollué au tébuconazole étaient plus résistantes à ce polluant que les communautés qui n'y avaient jamais été exposées (Artigas et al. 2014). Dans une étude de Pesce et al. (2010), le périphyton venant de la rivière contaminée au diuron et à deux de ses métabolites, présentaient une plus grande résistance au diuron et à un de ses deux métabolites en comparaison avec le périphyton prélevé sur un site non exposé.

2.4 Objectif & hypothèses

L'expérimentation au cœur de ce stage a pour ambition de comparer l'effet de trois fongicides (boscalide, cuivre et kasugamycine) sur les communautés microbiennes du périphyton. L'objectif étant de vérifier si le périphyton développe une tolérance à ces fongicides et de caractériser les réponses moléculaires, structurales et fonctionnelles des communautés au travers de différents descripteurs biologiques et ainsi de mieux comprendre la façon dont les communautés peuvent devenir plus tolérantes à des pesticides.

L'hypothèse de ce travail est qu'une exposition chronique du périphyton à des fongicides (boscalide, cuivre et kasugamycine) permettrait aux communautés microbiennes de s'adapter aux polluants et ainsi le périphyton deviendrait plus tolérant à ces polluants. Il est également supposé que cette adaptation aux fongicides entraînerait une perte de fonction et/ou de diversité.

3 Matériels & méthodes

3.1 Colonisation du périphyton

La colonisation du périphyton a été réalisée dans un aquarium de 120 L. Les supports de colonisation étaient des lames de verre (surface recto-verso : 36,48 cm²) réparties sur 224 portoirs en inox (6 lames / portoir). L'inoculum a été réalisé en grattant dix-neuf grandes lames (318 cm² recto-verso) recouvertes de périphyton à la suite d'une immersion de 4 mois dans l'étang de Gazinet-Cestas (France). Six lames non grattées provenant de l'étang ont également été mises dans l'aquarium. L'eau de l'aquarium était composée de soixante litres d'eau du lac filtrée (sur une maille de 1 mm) et 60 L d'eau déchlorée (i.e. eau du robinet laissée reposer au moins 24 h). Des nutriments ont ensuite été ajoutés afin de favoriser le développement du périphyton, des phosphates ($C_{\text{finale}}(\text{PO}_4) = 0,23 \text{ mg/L}$), des nitrates ($C_{\text{finale}}(\text{NO}_3) = 2,40 \text{ mg/L}$) et de la silice ($C_{\text{finale}}(\text{SiO}_2) = 3,00 \text{ mg/L}$). Une fois par semaine, 60 L d'eau étaient enlevés et remplacés par de l'eau de l'étang filtrée et de l'eau déchlorée (50/50). En même temps que ce changement d'eau, les nutriments étaient rajoutés pour obtenir les mêmes concentrations que décrites précédemment. La circulation de l'eau dans l'aquarium était assurée par deux pompes (*NewJet 600* ; à une puissance de 7,5 W), la lumière était apportée par trois rampes de LED (*Solar Natur JBL* ; à une puissance de 22 W et un lumen = 2400 K) selon un cycle 12h:12h (jour:nuit). La température de la pièce était régulée par une climatisation réversible et maintenue à 18°C. Avant et après chaque changement d'eau, les mesures physico-chimiques de conductivité, de pH, de température et d'oxygène étaient réalisées. Le développement du périphyton a duré 2 mois dans l'aquarium.

3.2 Tests de toxicité aiguë

Ces tests ont été réalisés en amont de l'expérience de toxicité chronique afin de choisir les contaminants et d'identifier des paramètres biologiques sensibles pour chacun des contaminants testés (les résultats de ces tests sont présentés à la section 4.1). Pour cela, du périphyton issu des grandes lames en verre (surface de 318 cm²) préalablement colonisées par du périphyton dans l'étang de Gazinet-Cestas et mis en culture dans l'aquarium de colonisation (voir ci-dessus) ont été utilisées. Les tests ont été réalisés sur une suspension de périphyton obtenue en grattant avec un scalpel le périphyton sur la lame puis en le remettant en suspension dans de l'eau de l'aquarium à une densité de 2 cm²/mL. Il est à noter que pour les premiers tests, la densité était de 5 cm²/mL mais le périphyton étant trop concentré (pas d'effet aux concentrations attendues), la densité a été baissée pour les tests suivants. Les tests de toxicité aiguë pour lesquels la densité était à 5 cm²/mL sont les tests réalisés avec les contaminants boscalide (sauf pour le test de viabilité cellulaire basé sur la résazurine) et la fengycine.

Les tests ont été réalisés en exposant la suspension de périphyton à un contrôle et sept concentrations croissantes de contaminant (cf. annexe 8.1) dans des plaques de 96 puits. Six paramètres biologiques ont été testés via six tests différents.

1. Rendement photosynthétique

Dans chaque puits d'une microplaque noire à fonds transparent, il y avait 100 µL de suspension de périphyton et 200 µL de contaminant. Après une incubation de 4 et de 24 h sous agitation à température ambiante, le rendement photosynthétique de la suspension de périphyton dans chaque puits était mesuré au fluorimètre Pulse Amplitude Modulated (*Phyto-PAM Heinz Walz*).

2. Activité enzymatique de l'estérase

Dans chaque puits d'une microplaque transparente, il y avait 120 µL de suspension de périphyton et 150 µL de contaminant. Après 3h30 d'incubation sous agitation à température

ambiante, 30 μL de substrat diacétate de 5-carboxyfluorescéine, ester acétoxyméthyle (CFDA, AM) en solution à 60,3 μM ont été rajoutés ($C_{\text{dans le puit}}(\text{CFDA, AM}) = 6,03 \mu\text{M}$). Puis deux lectures ont été faites 30 min et 1 h après l'ajout du substrat avec un fluorimètre lecteur de microplaques (*Synergy HTX BioTek*, longueur d'onde absorbée ; $\lambda_{\text{abs}} = 492 \text{ nm}$, longueur d'onde émise ; $\lambda_{\text{em}} = 525 \text{ nm}$).

3. Test de viabilité cellulaire basé sur la résazurine

Dans chaque puits d'une microplaque transparente, il y avait 150 μL de suspension de périphyton, 100 μL de contaminant et 30 μL de substrat résazurine (CAS : 62758-13-8) en solution à 150 mg/L. Après une incubation de 2 et 4 h sous agitation à température ambiante, la fluorescence a été lue avec un fluorimètre lecteur de microplaques (*Synergy HTX BioTek*, $\lambda_{\text{abs}} = 530 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{em}} = 590 \text{ nm}$).

4. Activités enzymatiques extracellulaires : β -glucosidase, phosphatase et leucine aminopeptidase

Le même protocole a été employé pour les trois enzymes, seul le substrat change. Dans chaque puits d'une microplaque transparente, il y avait 150 μL de suspension de périphyton, 50 μL de contaminant et 70 μL de substrat. Après une incubation de 4 h sous agitation à température ambiante, 30 μL de tampon pH 10,4 (tampon glycine- NH_4OH : 0,05 M de glycine et 0,2 M de NH_4OH à pH 10,4) a été ajouté. La fluorescence a été lue avec un fluorimètre lecteur de microplaques (*Synergy HTX BioTek*, $\lambda_{\text{abs}} = 360 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{em}} = 460 \text{ nm}$). Le substrat de la β -glucosidase est la 4-Méthylumbelliféryl β -D Glucopyranoside (MUF-Glu ; CAS : 18997-57-4) en solution à 1,875 mM dans de l'eau minérale ($C_{\text{finale dans le puit}} = 486 \mu\text{M}$). Le substrat de la phosphatase est la 4-méthylumbelliféryl phosphatase (MUF-Pho ; CAS : 3368-04-5) en solution à 3 mM dans de l'eau minérale ($C_{\text{finale dans le puit}} = 778 \mu\text{M}$). Le substrat de la leucine aminopeptidase est la L-leucine-7-amido-4-méthylcoumarin hydrochloride (MCA-Leu ; CAS : 62480-44-8) en solution à 1,25 mM dans de l'eau minérale ($C_{\text{finale dans le puit}} = 324 \mu\text{M}$).

3.3 Tests de toxicité chronique

3.3.1 Design expérimental

Les cultures de périphyton ont été exposées à trois fongicides (boscalide, kasugamycine et cuivre) afin d'évaluer la toxicité de ces contaminants sur une période d'un mois. Pour étudier la réponse du périphyton à l'exposition chronique à différents fongicides, le périphyton a été exposé dans un système de 21 canaux indépendants pendant 26 jours (du 04/04/2024 au 30/04/2024). Trois fongicides ont été choisis pour cette expérience ; le boscalide, la kasugamycine et le cuivre. Chaque

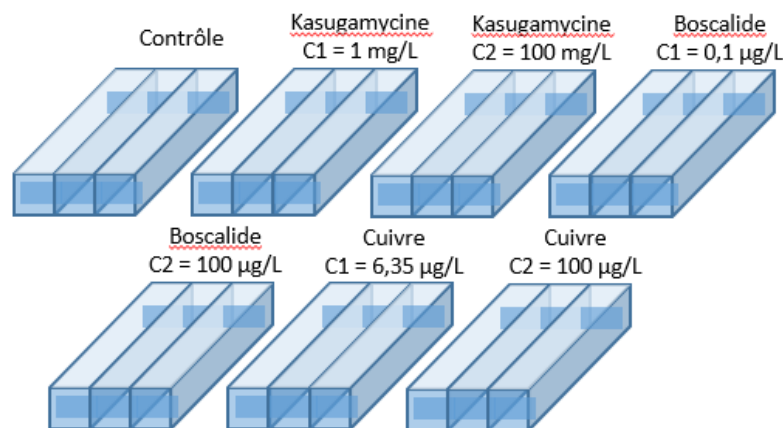


Figure 5: Schéma des conditions d'exposition avec leur concentration respective pour chaque triplicat

contaminant avait deux concentrations différentes ; une basse C1, proche des concentrations environnementales et une concentration C2 de 100 à 1000 fois plus élevée que C1 représentant le cas du pire scénario. Au total, il y avait sept conditions différentes et chaque condition était en triplicata (*Figure 5*).

3.3.2 Préparation des solutions de contaminants

À l'issue des tests de toxicité aiguë, trois fongicides ont été conservés pour l'exposition chronique : boscalide, kasugamycine et cuivre. Pour chaque concentration testée une solution mère a été préparée selon le tableau ci-dessous (*Tableau 2*). Dans tous les canaux où les solutions mères ne contenaient pas d'acétone, y compris les contrôles, de l'acétone à 50% mélangée avec de l'eau minérale, était rajoutée. Ainsi, chaque canal contenait 0,02% d'acétone.

Tableau 2: Caractéristiques des solutions mères utilisées pour la contamination des canaux

	<i>Boscalide C1</i>	<i>Boscalide C2</i>	<i>Kasugamycine C1</i>	<i>Kasugamycine C2</i>	<i>Cuivre C1</i>	<i>Cuivre C2</i>
<i>n°CAS</i>	188425-85-6	188425-85-6	19408-46-9	19408-46-9	7758-99-8	7758-99-8
<i>Concentration solution mère (mg/L)</i>	0,250	250	57 140	571,4	21,9	344,8
<i>Composition de la solution mère</i>	50 % d'acétone et 50 % d'eau minérale	50 % d'acétone et 50 % d'eau minérale	100 % d'eau minérale	100 % d'eau minérale	69 % d'acétone et 31 % d'eau déminée	100 % d'eau déminée
<i>Conservation</i>	-20°C	-20°C	4°C	4°C	4°C	4°C
<i>Concentration finale dans le canal (µg/L)</i>	100	0,1	1 000	100 000	6,35	100

3.3.3 Conditions d'exposition chronique

Après la colonisation des lames par le périphyton, neuf portoirs contenant chacun six lames ont été placés dans chacun des 21 canaux en verre (schéma avec dimension du canal). Chaque canal était relié à un aquarium indépendant dans lequel une pompe (*NewJet 600*, à une puissance de 7,5 W) assurait la recirculation de 10 L de milieu d'exposition dans le système « canal + aquarium » (*Figure 6*). L'eau circulait en passant dans des tubes en plastique. Le débit moyen dans les canaux était de $50,6 \pm 6,7$ mL/s ($n = 21$). Tout comme pour la colonisation, la luminosité était en cycle 12:12h assurée par des rampes de LED (*Solar Natur JBL* ; à une puissance de 22 W et un lumen = 2400 K). L'intensité lumineuse moyenne était de $61,2 \pm 15,2$ µmol de photons/m²/cm ($n = 21$, mesurée avec un photomètre). La température de la pièce était régulée grâce à une climatisation réversible et maintenue à 18°C.

Deux changements du milieu d'exposition étaient réalisés par semaine (entre 3 et 4 jours d'intervalle) pendant toute la durée de l'exposition. Afin de limiter les différences entre les canaux, le milieu d'exposition était préparé dans une cuve à part et servait ensuite à remplir les canaux. Dans la

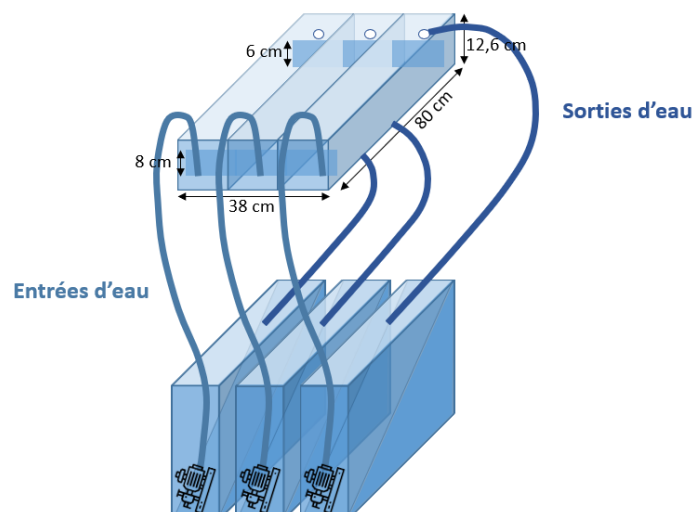


Figure 6: Schéma de trois canaux et de leurs aquariums utilisés pour l'exposition chronique

cuve, de l'eau du robinet déchlorée ainsi que de l'eau de l'étang filtrée (sur une maille de 1 mm) étaient mélangés en volumes égaux. Des nutriments étaient également rajoutés à partir de solutions mères de nutriments conservées à 4°C (K_2HPO_4 à 6,25 g/L, KNO_3 à 50 g/L, $Na_2SiO_3 \cdot 5H_2O$ à 50 g/L) : phosphates ($C_{finale}(PO_4) = 0,23$ mg/L), nitrates ($C_{finale}(NO_3) = 2,40$ mg/L) et silice ($C_{finale}(SiO_2) = 3,00$ mg/L). A chaque changement d'eau, les pompes de chaque canal étaient éteintes, puis les aquariums étaient vidés (5 L étaient enlevés) à l'aide d'une pompe électrique de transvasement. Puis chaque aquarium était rempli (ajout de 5 L d'eau de la cuve) avec une pompe électrique (différente de celle utilisée pour vider). Chaque canal était de nouveau contaminé individuellement selon les conditions souhaitées à partir de solutions mères conservées soit à 4°C (pour le cuivre et la kasugamycine) ou à -20°C (pour le boscalide). Ensuite, les pompes étaient rallumées et 1 h après la contamination des canaux, les paramètres physico-chimiques étaient mesurés et les prélèvements pour le dosage des contaminants étaient effectués.

3.3.4 Prélèvements

Afin de valider les concentrations en nutriments initiales, des prélèvements d'eau étaient réalisés à chaque changement d'eau dans la cuve de préparation du milieu d'exposition après ajout des nutriments. Un volume de 200 mL du milieu était prélevé et stocké dans un flacon en plastique à -20°C jusqu'à analyse du Carbone Organique Total (COT). Un volume de 10 mL était prélevé et filtré (filtre de 0,45 µm en nylon) puis stocké dans un flacon en plastique à 4°C pour l'analyse de la teneur en anions ($[NO_2^-]$, $[NO_3^-]$, $[PO_4^{3-}]$, $[SO_4^{2-}]$, $[Cl^-]$).

Pour suivre la concentration des contaminants dans les canaux, des prélèvements d'eau étaient réalisés avant et après le changement dans chaque canal. Pour les conditions contrôle et contaminées au cuivre, un volume de 15 mL d'eau était prélevé et stocké à 4°C dans des tubes jusqu'à analyse. Pour les canaux contrôles et ceux contaminés à la kasugamycine et au boscalide, les échantillons d'eau étaient filtrés (filtre à membrane en cellulose régénérée 0,45 µm), puis stockés à -20°C dans des flacons en verre jusqu'à analyse. Pour les faibles concentrations C1, un volume de 10 mL était récupéré et pour les concentrations plus élevées un volume de 1 mL était prélevé.

3.4 Chimie analytique

3.4.1 Paramètres physico-chimiques

Avant et après chaque changement d'eau, les paramètres physico-chimiques de chaque canal étaient mesurés : le pH (avec un pH-mètre, sonde WTW3110), la conductivité (avec un conductimètre,

sonde *WTW3110*), l'oxygène dissous (avec un oxymètre, sonde *WTW3205*) et la température (indiquée par le pH-mètre, sonde *WTW3110*). Chaque appareil a été préalablement calibré avant chaque mesure.

3.4.2 Analyse des anions majeurs

Les anions ont été dosés par chromatographie ionique (*Metrohm compact 881*). Pour séparer les composés chargés négativement, cette chromatographie utilise une colonne composée d'alcool polyvinylique avec groupes d'ammonium quaternaire (phase stationnaire). Pour la phase liquide qui traverse la colonne, c'est un éluant composé de carbonate de sodium (Na_2CO_3 à 3,2 mM) avec du bicarbonate de sodium (NaHCO_3 à 1 mM). Pour que l'analyse se fasse correctement, il faut que le pH des solutions soit compris entre 3 et 12, que la température soit entre 20 et 60°C (de préférence à température ambiante) et que la pression n'excède pas 15 MPa. La colonne a une longueur de 250 mm et un diamètre de 4,0 mm. Il est recommandé de maintenir son débit d'écoulement à 0,7 mL/min (maximum 0,8 mL/min). Pour réaliser l'analyse, il faut aussi utiliser une solution de suppression chimique (mélange d'acide sulfurique H_2SO_4 à 100 mM et d'eau ultrapure), cela permet d'obtenir des pics plus nets et plus grands. Les échantillons peuvent finalement être injectés dans une boucle d'injection de 200 μL à volume variable. Les anions $[\text{NO}_2^-]$, $[\text{NO}_3^-]$, $[\text{PO}_4^{3-}]$, $[\text{SO}_4^{2-}]$, $[\text{Cl}^-]$ ont chacun des temps de rétention différent ce qui permet de les identifier puis grâce à une gamme d'étalonnage, leur concentration est déterminée à l'aide d'un conductimètre. Une fois l'analyse terminée, un liquide de rinçage (NaOH à 5 mM) sert à nettoyer la colonne.

3.4.3 Dosage du carbone Organique total (COT)

Le COT permet d'évaluer la quantité de matière organique en suspension dans l'eau. Pour réaliser cette analyse, le COT-mètre (*Shimadzu TOC-V Wp*) est employé. Le COT représente le carbone organique non purgeable et le carbone organique purgeable. Le second étant plus volatil est négligé pour cette analyse. Pour réaliser cette analyse, il faut enlever le carbone inorganique. Ce dernier est transformé en dioxyde de carbone (CO_2) en mélangeant de l'acide phosphorique (H_3PO_4 (20% (v/v))) à l'échantillon (solution avec un pH < 3). Le dioxyde de carbone (CO_2) lié à la partie inorganique est alors enlevé à l'aide du gaz vecteur ; l'azote (N_2). Après cette étape, il ne reste plus que le carbone organique en solution. Ces composés carbonés sont ensuite oxydés à leur tour, en dioxyde de carbone dû à la présence de persulfate de sodium ($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_8$, 120 g/L) et d'une lampe UV. Ce CO_2 est emmené par le gaz vecteur, puis séché et analysé avec le détecteur infrarouge. La quantité de dioxyde de carbone est proportionnelle à la quantité de carbone organique totale dans l'échantillon et est déterminée à l'aide d'une gamme étalon.

3.4.4 Dosage des contaminants dans l'eau

3.4.4.1 Dosage de la kasugamycine et du boscalide

Pour les concentrations les plus faibles (C1 et contrôle), les échantillons d'eau ont été reconcentrés afin d'obtenir un facteur de concentration de 10. Un volume de 3 mL a été reconcentré dans 300 μL en suivant les étapes décrites dans la [Figure 7](#). Les contaminants organiques, kasugamycine et boscalide, ont été dosés par Ultra Performance Liquid Chromatography *Waters* (Chromatographie Liquide Ultra-Performance ; UPLC). Les échantillons sont ionisés en entrée de l'appareil. Ils traversent ensuite la colonne de chromatographie. Leur masse est mesurée à l'aide d'un détecteur *Xevo G2-XS Time of Flight* (Temps de vol ; ToF). Ce dernier mesure la différence de temps que mettent deux particules à parcourir une distance. Cette différence est reliée directement à la masse. Afin de calibrer le détecteur ToF, toutes les minutes une solution de leucine (de masse connue) est injectée durant l'analyse. Un échantillon de blanc est également passé tous les six échantillons pour s'assurer qu'il n'y ait pas de contamination.

Les deux composés ayant des propriétés chimiques différentes, ils n'ont pas été analysés de la même façon avec l'UPLC. Deux colonnes différentes avec des particules Ethylene Bridged Hybrid

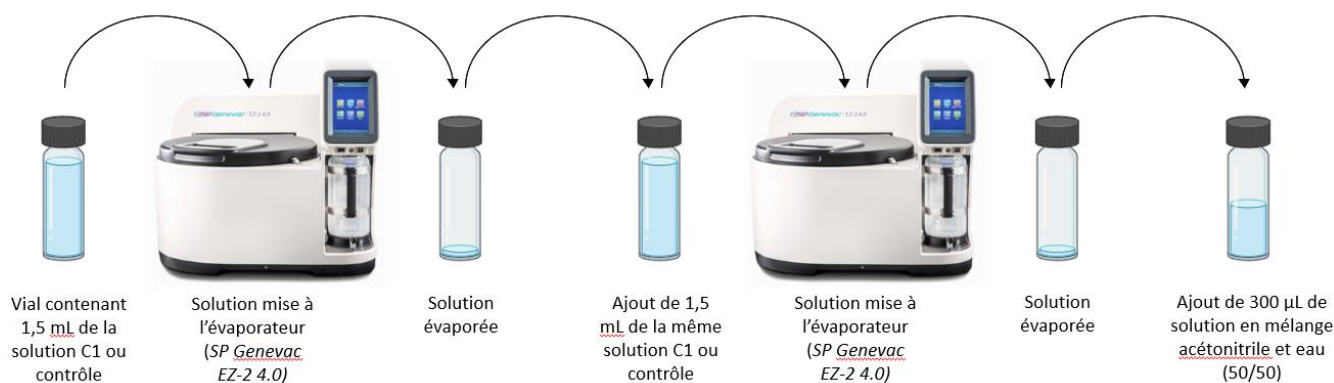


Figure 7: Schéma des étapes suivies afin d'obtenir un facteur de concentration de 10 pour l'analyse des contaminants organiques

(hybrides à ponts éthane ; BEH) ont été utilisées. Elles ont toutes les deux les mêmes dimensions, un diamètre interne de 2,1 mm, une longueur de 50 mm et une granulométrie de 1,7 µm. Pour l'analyse, la colonne était maintenue à une température de 40 °C.

La kasugamycine a été analysée avec une colonne BEH HILIC. Cette colonne est conçue pour retenir les composés polaires. Elle utilise un substrat non greffé. Pour ce fongicide, il s'agit d'une ionisation positive. La vitesse d'injection est de 0,6 mL/min. L'éluant utilisé a un gradient variant au cours du temps et il est constitué d'un mélange de deux composés. Le composé A est une solution aqueuse de formate d'ammonium (NH_4HCO_2 à 20 mM) et de 0,3 % (v/v) d'acide formique (H_2CO_2). Le composé B est une solution d'acétonitrile. Pour le gradient, l'analyse débute avec 90 % du composé B et 10 % de la solution A. Puis le volume du composé A, plus hydrophile que le B, augmente jusqu'à ce qu'il représente 80 % du volume de l'éluant, puis sa quantité diminue de nouveau jusqu'à atteindre 10 % du volume total. Ce gradient permet de mieux séparer les composés hydrophiles présents dans les échantillons et ainsi d'obtenir des pics plus facilement caractérisables.

Le boscalide a été analysé avec une colonne BEH C18. Elle utilise un substrat à greffage trifonctionnel. Pour ce fongicide, il s'agit d'une ionisation négative. La vitesse d'injection est de 0,4 mL/min. L'éluant utilisé a un gradient variant au cours du temps, il est composé d'un mélange de deux composés, différents de ceux utilisés pour l'analyse de la kasugamycine. Le composé A est une solution aqueuse contenant 0,1 % (v/v) d'acide formique (H_2CO_2). Le composé B est une solution d'acétonitrile avec 0,1 % (v/v) d'acide formique (H_2CO_2). Pour le gradient, l'analyse débute avec 98 % du composé A et seulement 2 % du composé B. Puis le volume du composé B, moins hydrophile que le A, augmente jusqu'à ce qu'il représente 99 % du volume de l'éluant, puis sa quantité diminue rapidement de nouveau jusqu'à atteindre 2 % du volume total. Ce gradient permet de mieux séparer les composés présents dans les échantillons et ainsi obtenir des pics plus facilement caractérisables.

3.4.4.2 Dosage du cuivre

Le cuivre a quant à lui été dosé par *Inductively Coupled Plasma – Mass Spectrometry* (spectrométrie de masse à plasma à couplage inductif ; ICP-MS *ThermoScientific*) après filtration (filtre acétate de cellulose à 0,45 µm *Minisart® NML Sartorius*) et acidification des échantillons (acide nitrique à 2% (v/v)). A l'exception des contrôles, les échantillons ont dû être dilués à l'eau ultrapure. Les échantillons de cuivre C1 avaient un facteur de dilution de 2 et les échantillons de cuivre C2 ont été dilués par 40. Afin de vérifier la qualité des mesures de cuivre, un échantillon certifié (SLRS-6) a été dosé et le taux de recouvrement était de 99,0% ($\pm 7,8$).

3.5 Descripteurs biologiques

3.5.1 Prélèvements

A chaque temps de prélèvement et pour chaque canal, des lames de microscope ont été prélevées aléatoirement dans le canal et grattées à l'aide d'une lame de rasoir. Le périphyton gratté a été remis en suspension dans de l'eau de son canal dans un ballon en verre afin d'obtenir une densité de périphyton de 2 cm²/mL. Les solutions de périphyton étaient maintenues sous agitation à température ambiante jusqu'à analyse ou prélèvement. Les analyses réalisées à chaque temps sont regroupées dans le tableau ci-dessous (*Tableau 3*). Pour chaque condition, un mélange de l'eau des canaux des trois réplicats était filtré (filtre à membrane en polyéthersulfone 0,22 µm) afin de constituer un blanc. Des lames ont également été prélevées à chaque temps, quenchées dans de l'azote liquide puis conservées à -80°C pour réaliser des analyses métabolomiques. Ces échantillons ne sont pas traités dans le cadre de ce stage mais serviront par la suite.

Tableau 3: Les types de descripteurs biologiques analysés à chaque temps (N : NON; analyse non réalisée, O : OUI; analyse réalisée)

Descripteurs biologiques	t4h	t24h	t1 (= 5 jours)	t2 (= 12 jours)	t3 (= 19 jours)	t4 (=26 jours)
<i>AFDW</i>	N	N	O	O	O	O
<i>Chlorophylle totale</i>	O	O	O	O	O	O
<i>Rendement photosynthétique</i>	O	O	O	O	O	O
<i>Groupes phototrophes</i>	O	O	O	O	O	O
<i>Activités enzymatiques</i>	O	N	O	O	O	O
<i>PICT</i>	N	O	O	O	O	O

3.5.2 Ash-Free Dry Weight (AFDW)

Le *Ash-Free Dry Weight* (poids sec sans cendre ; AFDW) permet d'évaluer la manière dont la biomasse évolue au cours du temps. Pour déterminer l'AFDW, 15 mL de solution de périphyton de chaque réplication a été prélevée et déposée dans des creusets préalablement pesés. Les suspensions de périphyton ont ensuite été séchées à l'étuve à 60°C pendant 48 h, pour finalement être brûlées pendant 1 h à 500°C au four. Les creusets ont été pesés après le séchage à l'étuve et après le four. L'AFDW et le pourcentage de Matière Organique (MO) ont ensuite été calculés comme suit :

$$AFDW = m(\text{biofilm après étuve}) - m(\text{biofilm après four})$$

$$MO = \frac{m(\text{biofilm après four})}{m(\text{biofilm après étuve})} \times 100$$

3.5.3 Chlorophylle totale, groupes d'organismes phototrophes et rendement photosynthétique

Ces descripteurs donnent des renseignements sur la partie autotrophe du périphyton (algues vertes, diatomées, cyanobactéries). Ces trois paramètres ont été mesurés avec le même appareil le Phyto-PAM. Pour ce faire, un volume de 3 mL de suspension de périphyton a été transféré dans une

cuve en quartz puis un agitateur a été ajouté afin d'éviter que le périphyton ne sédimente. Les eaux filtrées de chaque condition ont été utilisés comme blanc pour ces mesures. Le *Phyto-PAM* (*Heinz Walz*) mesure l'émission de photons à une longueur d'onde donnée pour les différents pigments photosynthétiques à la suite de l'excitation par une autre longueur d'onde (il y a plusieurs longueurs d'onde d'excitation 470, 520, 645 et 665 nm). La chlorophylle totale est mesurée grâce à une courbe de calibration interne et donne une estimation de la biomasse phototrophe. La proportion de chacun des trois groupes d'organismes phototrophes (algues vertes, diatomées, cyanobactéries) est évaluée à l'aide de spectres de référence (décrivant leur propriété d'émission).

Le rendement photosynthétique permet d'évaluer l'état physiologique des organismes autotrophes, plus il est important plus les organismes sont en bonne santé. Le rendement photosynthétique rend compte de la capacité de l'organisme à convertir l'énergie lumineuse en Adénosine TriPhosphate (ATP), utilisée dans le processus de photosynthèse. L'énergie lumineuse peut aussi être dissipée par chaleur ou fluorescence, elle est alors inutilisable pour servir à la fabrication d'ATP. Ce phénomène est d'autant plus présent que l'organisme autotrophe est stressé, notamment par la présence de contaminant. La mesure de fluorescence (en l'absence de dissipation par la chaleur) est reliée directement à l'état des cultures. Le rendement photosynthétique a été mesuré avec le *Phyto-PAM* en condition *Measuring Light (ML)* après l'application d'un *SAT-Pulse (pulse de saturation lumineuse)*.

3.5.4 Activités enzymatiques hétérotrophes

L'activité potentielle de trois enzymes hétérotrophes (la β -glucosidase (Glu), la phosphatase (Pho), et la leucine aminopeptidase (Leu)) a été quantifiée afin de rendre compte de l'activité bactérienne du périphyton. La Glu et la Leu sont des enzymes impliquées dans la décomposition des protéines et des polysaccharides, elles sont importantes dans le cycle du carbone (Su et al. 2021). La Leu intervient aussi dans le cycle de l'azote (Matsui, Fowler, et Walling 2006). L'enzyme Pho est impliquée dans le cycle du phosphore (Chróst 1990). Pour réaliser ces mesures d'activités, les communautés microbiennes sont mises en présence d'un substrat (similaire à celui de l'enzyme) complexé avec un composé fluorochrome. En consommant le substrat, les enzymes présentes dans la suspension microbienne libèrent le fluorochrome qui devient alors fluorescent.

Pour ces trois enzymes, le même protocole a été employé, seul le substrat change. Dans chaque puits d'une microplaque transparente de 96 puits, ont été ajoutés 150 μ L de suspension de périphyton ou d'eau filtrée (*i.e.* blancs), 50 μ L d'eau minérale (Evian) et 70 μ L de substrat (pour la β -glucosidase ; MUF-Glu, pour la phosphatase ; MUF-Pho et pour la leucine aminopeptidase ; MCA-Leu). Après une incubation de 1 h pour la Leu et 2 h pour la Glu et la Pho sous agitation et à température ambiante, 30 μ L de tampon pH 10,4 (tampon glycine- NH_4OH : 0,05 M de glycine et 0,2 M de NH_4OH à pH 10,4) a été ajouté afin de stopper la réaction. La fluorescence des échantillons est ensuite évaluée avec un fluorimètre lecteur de microplaques (*Synergy HTX BioTek*, $\lambda_{\text{abs}} = 360 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{em}} = 460 \text{ nm}$).

Pour chacune des enzymes étudiées, les concentrations saturantes de chaque substrat ont été déterminées avec les suspensions de périphyton prélevées à $t = 4 \text{ h}$ exposées à une gamme de substrat préparée dans de l'eau minérale. Ces concentrations saturantes ont ensuite été conservées pour les mesures réalisées aux autres temps de prélèvement : MUF-Glu à 622 μM , MUF-Pho à 101 μM et MCA-Leu à 864 μM .

Afin de convertir les Unités de Fluorescence (UF) en μmol de fluorochrome (MUF ou MCA), des courbes étalons de chaque fluorochrome étaient réalisées à chaque temps. A chaque temps de prélèvement, pour chaque fluorochrome et chaque échantillon, ont été ajoutés dans chaque puits d'une microplaque transparente de 96 puits : 150 μ L de suspension de périphyton, 50 μ L d'eau minérale (Evian) et 70 μ L de fluorochrome à différentes concentrations (0, 2,40, 4,00, 6,70, 11,2, 18,7, 31,1 et 51,9 mg/L). Ces microplaques ont ensuite été traitées comme les échantillons. Une courbe

exponentielle de degré 2 est ajustée aux données afin de convertir les valeurs en UF en μmol de MUF ou MCA, qui sont ensuite converties en activités enzymatiques avec la formule ci-dessous.

$$\text{Activité } (\mu\text{mol} \cdot \text{h}^{-1} \cdot \text{cm}^{-2}) = \frac{\mu\text{mol (MUF ou MCA par puit)}}{\text{Temps (h)} \times \text{surface (cm}^2 \text{ par puit)}}$$

3.5.5 Tests de toxicité aiguë – approche PICT

Les tests de toxicité aiguë permettent d'évaluer la tolérance d'une communauté microbienne à un contaminant et d'identifier le développement d'une tolérance vis-à-vis d'un ou plusieurs contaminants à la suite d'une exposition chronique (Pollution Induced Community Tolerance : PICT). Suite aux tests de toxicité aiguë, trois couples paramètre biologique / contaminant ont été sélectionnés : beta-glucosidase / cuivre, rendement photosynthétique / cuivre et estérase / kasugamycine. Les tests de toxicité aiguë ont été réalisés dans des microplaques 96 puits comme décrit dans la section « *Tests de toxicité aiguë* », les gammes de concentrations utilisées sont décrites dans le *Tableau 4*.

Tableau 4: Gamme de contaminants utilisée pour les tests PICT

Gamme de contaminants	C0	C1	C2	C3	C4	C5	C6	C7
<i>Cuivre/rendement photosynthétique (mg/L par puit)</i>	0	10,42	20,83	41,67	83,33	166,67	333,33	1 333,3
<i>Cuivre/glu (mg/l par puit)</i>	0	2,893	5,787	11,574	23,148	46,30	92,59	370,37
<i>Kasugamycine/estérase (mg/L par puit)</i>	0	86,8	173,6	347,2	694,4	1 388,9	2 777,8	8 333,3

3.6 Analyses statistiques

Tous les tests statistiques ont été faits avec le logiciel R version 4.4.0 (*R Core team 2024* ; <https://www.R-project.org/>). Pour l'intégralité des résultats, les tests ont été réalisés pour un risque α fixé à 5 %, soit une p-value inférieure à 0,05. A chaque temps et pour chaque paramètre, pour déterminer les différences entre les conditions, des ANOVAs à un facteur ont été réalisées après vérification de l'homogénéité des variances (test de *Levene*), de l'indépendance des variances (test de *Durbin Watson*) et de la normalité des résidus (test de *Shapiro-Wilk*). Les ANOVAs étaient suivies d'un test *Post-Hoc de Tukey* pour mettre en évidence les différences entre les conditions. Pour comparer les différentes conditions au contrôle, des tests de *Dunnnett* ont été réalisés.

Pour les tests de toxicité aiguë, les courbes doses-réponses ont été ajustées aux données normalisées (*i.e.* exprimées en pourcentage des échantillons non-exposés pour chaque répétition) à l'aide de différents modèles (log-logistic, Weibull, Brain-Cousens) présents dans le package « *drc* » (*Ritz et al. 2015*). Pour chaque courbe dose-réponse, le meilleur modèle a été choisi en se basant sur la valeur de l'AIC (Critère d'Information d'Akaike), le test *lack of fit* contre un modèle ANOVA à un paramètre et une inspection visuelle. Les valeurs seuils (CE10 et CE50) ont été calculées en se basant sur les modèles obtenus. Les graphiques présentés dans ce rapport ont été réalisés avec le package « *ggplot2* » (*Wickham 2016*).

4 Résultats

4.1 Tests de toxicité aiguë

Les tests de toxicité aiguë ont permis de choisir les contaminants pour l'exposition chronique ainsi que les paramètres sur lesquels ils avaient un effet. Au total six paramètres ont été investigués et huit contaminants ont été testés (*Tableau 5*). Les résultats détaillés sont présentés en annexe 8.2 et des exemples sont donnés dans la *Figure 8*.

Tableau 5: Résultats des tests de toxicité aiguë des différents contaminants réalisés sur les descripteurs biologiques. Les cases rouges signifient que la concentration max testés du contaminant a entraîné une inhibition d'au moins 50 % de la valeur du descripteur biologique du contrôle. Les C_{max} représentent les concentrations maximales testées par descripteur et par contaminant. Glu : β -Glucosidase, Leu : Leucine-aminopeptidase, Pho : Phosphatase.

Contaminants testés	<i>Rendement photosynthétique</i>	<i>Estérase</i>	<i>Résazurine</i>	<i>Glu</i>	<i>Pho</i>	<i>Leu</i>
<i>Azoxystrobine</i>	$C_{max} = 5,00$ mg/L	$C_{max} = 4,17$ mg/L	$C_{max} = 2,50$ mg/L	$C_{max} = 1,39$ mg/L	$C_{max} = 1,39$ mg/L	$C_{max} = 1,39$ mg/L
<i>Boscalide</i>	$C_{max} = 5,57$ mg/L	$C_{max} = 4,64$ mg/L	$C_{max} = 2,79$ mg/L	$C_{max} = 1,55$ mg/L	$C_{max} = 1,55$ mg/L	$C_{max} = 1,55$ mg/L
<i>Sulfate de cuivre</i>	$C_{max} = 1\ 000$ mg/L	Pas testé	Pas testé	$C_{max} = 278$ mg/L	Pas testé	Pas testé
<i>Fengycine</i>	$C_{max} = 1\ 110$ mg/L	$C_{max} = 926$ mg/L	Pas testé	$C_{max} = 309$ mg/L	$C_{max} = 309$ mg/L	$C_{max} = 309$ mg/L
<i>Kasugamycine</i>	$C_{max} = 6\ 670$ mg/L	$C_{max} = 5\ 560$ mg/L	Pas testé	$C_{max} = 1\ 850$ mg/L	$C_{max} = 1\ 850$ mg/L	$C_{max} = 1\ 850$ mg/L
<i>Laminarin</i>	$C_{max} = 4\ 000$ mg/L	$C_{max} = 3\ 330$ mg/L	Pas testé	$C_{max} = 1\ 110$ mg/L	$C_{max} = 1\ 110$ mg/L	$C_{max} = 1\ 110$ mg/L
<i>Surfactine</i>	$C_{max} = 50,0$ mg/L	$C_{max} = 41,7$ mg/L	$C_{max} = 25,0$ mg/L	$C_{max} = 13,9$ mg/L	$C_{max} = 13,9$ mg/L	$C_{max} = 13,9$ mg/L
<i>Tébuconazole</i>	$C_{max} = 50,0$ mg/L	$C_{max} = 41,6$ mg/L	Pas testé	$C_{max} = 13,9$ mg/L	$C_{max} = 13,9$ mg/L	$C_{max} = 13,9$ mg/L

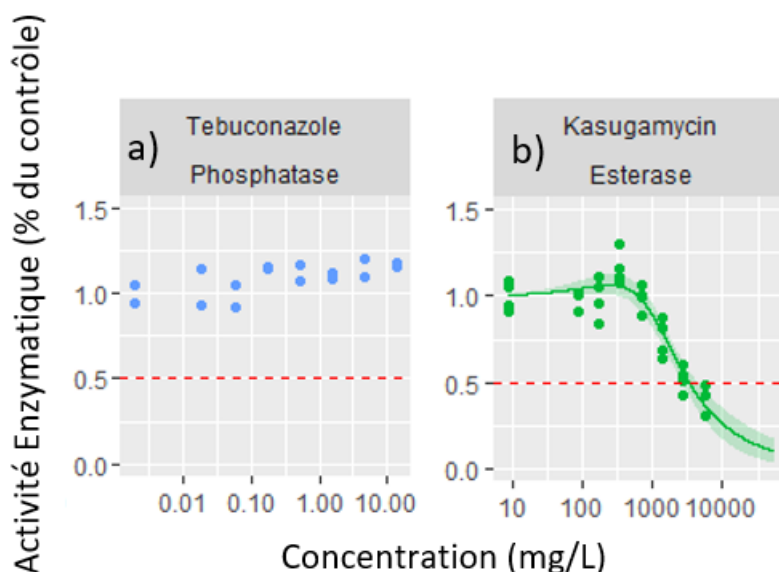


Figure 8 : Exemples des résultats des tests de toxicité aiguë. Le graphe a) montre un exemple de contaminant qui n'a pas d'effet sur le descripteur biologique. Le graphe b) montre un exemple de contaminant dont l'exposition à la concentration max testée réduit de plus de 50% l'activité du descripteur biologique testé

4.1.1 Les fongicides de synthèse : Azoxystrobin, boscalide et tébuconazole

Majoritairement, dans les gammes de concentrations testées, les fongicides de synthèse n'ont pas eu d'impact significatif sur les descripteurs biologiques analysés. Le tébuconazole a montré des effets sur le rendement photosynthétique mais seulement pour les concentrations maximales (~50 mg/L). Le biofilm exposé à l'azoxystrobin a quant à lui vu son rendement photosynthétique baisser légèrement à mesure que la concentration en polluant augmentait. Néanmoins à l'exception du tébuconazole, sur l'ensemble de ces tests aucun pourcentage d'inhibition n'a dépassé 50% d'inhibition. Le boscalide n'a pas montré de toxicité aiguë significative dans les gammes de concentrations testées.

4.1.2 Les fongicides utilisés en agriculture biologique : sulfate de cuivre et laminarin

Pour le cuivre, les deux tests réalisés sur l'enzyme Glu et le rendement photosynthétique ont montré des effets sur les communautés périphytiques. Pour la Glu, 50% d'inhibition était atteinte autour de 30 mg/L dans le puit. Pour la photosynthèse, dès la première concentration de la gamme (soit $C_{\min} = 15$ mg/L) le rendement photosynthétique était en dessous des limites de détection de l'appareil. Pour la laminarin, le seul paramètre qui s'est révélé sensible est l'enzyme estérase. La CE_{50} était atteinte uniquement pour la concentration la plus élevée ($C_{\max} = 3\,333$ mg/L).

4.1.3 Les fongicides non autorisés dans l'UE : fengycine, kasugamycine et surfactine

Aucun des trois contaminants n'a eu d'effet sur les organismes autotrophes (d'après les mesures du rendement photosynthétique) aux concentrations testées. Les communautés microbiennes exposées à la fengycine et à la kasugamycine ont montré une baisse de 50 % de l'activité de l'enzyme estérase pour des concentrations respectives de fengycine et de kasugamycine d'environ 450 mg/L et de 2 700 mg/L. L'exposition aiguë à la surfactine n'a entraîné aucune différence significative entre le périphyton exposé et le contrôle, quelque soient les descripteurs biologiques observés.

4.2 Tests de toxicité chronique

4.2.1 Les conditions d'expérimentations

Les valeurs moyennes des paramètres physico-chimiques et des concentrations en polluants, mesurées tout le long de l'expérience, sont regroupées dans le [Tableau 6](#) ci-dessous, en fonction des conditions d'exposition. Entre les conditions, les valeurs des paramètres sont assez stables et ne s'éloignent jamais de celle du contrôle. Le dosage du cuivre dans le contrôle a révélé que la concentration en cuivre moyenne durant l'exposition était de 27,3 (\pm 2,6) $\mu\text{g/L}$. Cette valeur est similaire à celle de la condition cuivre C1 (29,5 (\pm 3,0) $\mu\text{g/L}$). Pour expliquer cette contamination au cuivre dans les canaux contrôle, la concentration en cuivre dans l'eau du robinet et l'eau de l'étang, utilisée pour remplir les canaux (ratio 50/50) a été dosée. La concentration en cuivre mesurée était de 127 $\mu\text{g/L}$ dans l'eau du robinet et de 0,53 $\mu\text{g/L}$ dans l'eau de l'étang, indiquant que la contamination en cuivre provenait de l'eau du robinet. De ce fait, la condition cuivre C1 ne peut pas être différenciée de la condition contrôle d'un point de vue de leur concentration en cuivre. Les concentrations en anions et en COT n'ont quasiment pas varié durant toute la durée de l'exposition chronique [Tableau 7](#).

Tableau 6: Moyennes et écart-types des paramètres physico-chimiques et des concentrations en fongicides de chaque condition d'exposition. Les valeurs de pH, température, conductivité et oxygène ont été mesurés dans chaque canal avant et après chaque changement d'eau. Le débit a été mesuré trois fois dans chaque canal, les valeurs d'illumination ont été mesurées deux fois par canal. Les concentrations en fongicide ont été mesurées une fois par semaine dans chaque canal après et avant changement d'eau.

Paramètres	Contrôle	Boscalide C1	Boscalide C2	Kasugamycine C1	Kasugamycine C2	Cuivre C1	Cuivre C2
pH (n = 42)	8,41 (\pm 0,04)	8,44 (\pm 0,16)	8,43 (\pm 0,06)	8,42 (\pm 0,05)	8,36 (\pm 0,09)	8,47 (\pm 0,10)	8,41 (\pm 0,05)
Température (°C ; n = 42)	16,8 (\pm 0,9)	16,9 (\pm 0,8)	17,2 (\pm 0,8)	17,0 (\pm 0,9)	17,0 (\pm 0,9)	17,1 (\pm 0,8)	17,1 (\pm 0,8)
Conductivité ($\mu\text{s/cm}$; n = 42)	382 (\pm 10)	379 (\pm 10)	371 (\pm 7)	378 (\pm 9)	381 (\pm 7)	370 (\pm 7)	377 (\pm 8)
Oxygène (% ; n = 42)	95,7 (\pm 2,7)	97,6 (\pm 2,4)	98,0 (\pm 2,3)	98,4 (\pm 2,1)	95,8 (\pm 5,3)	97,4 (\pm 3,5)	97,8 (\pm 2,6)
Débit (mL/s ; n = 9)	47,8 (\pm 2,8)	54 (\pm 12)	46,1 (\pm 1,4)	48,9 (\pm 3,2)	52,1 (\pm 3,1)	46,5 (\pm 0,5)	54,5 (\pm 8,0)
Lumière ($\mu\text{mol de photons/m}^2/\text{cm}$; n = 6)	51 (\pm 11)	35,5 (\pm 9,0)	68,0 (\pm 9,7)	66,3 (\pm 8,1)	61,4 (\pm 6,3)	76,9 (\pm 8,2)	69,0 (\pm 7,0)
[Fongicide] ($\mu\text{g/L}$)	C (Cuivre) = 27,3 (\pm 2,6) $\mu\text{g/L}$ (n = 24)	-----	-----	-----	-----	C (Cuivre) = 29,5 (\pm 3,0) $\mu\text{g/L}$ (n = 24)	C (Cuivre) = 91 (\pm 22) $\mu\text{g/L}$ (n = 24)

Tableau 7: Moyennes et écart-types des anions et du COT prélevées dans la cuve de préparation de l'eau des canaux

	NO_2	NO_3	PO_4	SO_4	Cl	COT
Concentration (mg/L ; n = 8)	0,253 (± 0,053)	2,93 (± 0,14)	0,170 (± 0,012)	11,24 (± 0,32)	27,74 (± 0,44)	9,78 (± 0,96)

4.2.2 Évolution temporelle des communautés microbiennes contrôle

Les communautés microbiennes contrôle avait un rendement photosynthétique moyen de 0,47, indiquant un bon état physiologique des organismes autotrophes. Le AFDW a évolué de 45 (± 62) µg/L (n = 3) t0 à 202 (± 58) µg/L (n = 3) après 26 jours d'expérience reflétant la croissance du contrôle pendant l'expérience. De même pour les activités enzymatiques hétérotrophes, leurs augmentations au cours du temps reflètent la croissance du biofilm et son activité (pour la Glu : de 1,61 (± 0,57) µmol/h/cm² à T0 à 7,0 (± 1,9) µmol/h/cm² après 26 jours ; pour la Pho : de 8,5 (± 3,9) µmol/h/cm² à t0 à 53 (± 11) µmol/h/cm² après 26 jours ; pour la Leu : de 56 (± 25) µmol/h/cm² à t0 à 99 (± 19) µmol/h/cm² après 26 jours ; avec n = 3 pour chaque enzyme).

4.2.3 Effets des fongicides sur la biomasse microbienne

4.2.3.1 Ash-Free Dry Weight (AFDW)

L'AFDW représente le poids sec sans cendre. Il a été mesuré à quatre temps à 5 jours, 12 jours, 19 jours et 26 jours. Ce descripteur augmente constamment au cours des 4 semaines d'expositions comme illustré dans la *Figure 9* que ce soit pour le contrôle ou pour les autres conditions contaminées. Cette augmentation est commune à l'ensemble des échantillons de périphyton, aucune différence significative entre les conditions n'a été trouvée (p-value > 0,05, test ANOVA, n = 3).

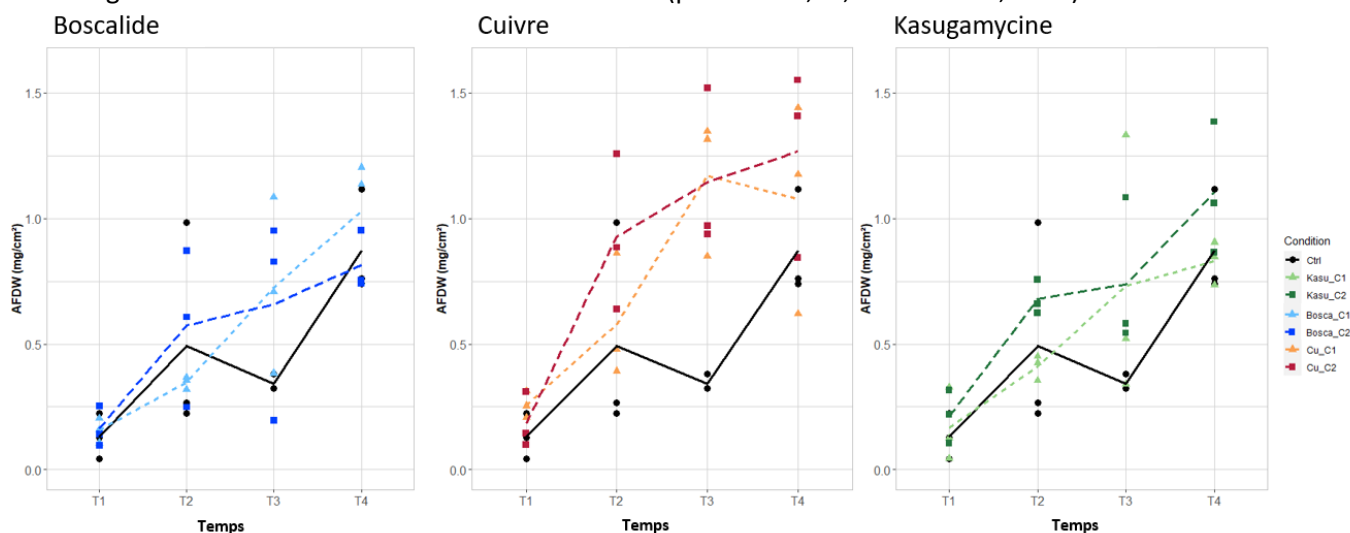


Figure 9: AFDW (µg/cm²) de chaque condition d'exposition comparée au contrôle en fonction du temps. Les points représentent les valeurs d'AFDW par répétition. Les lignes passent par la moyenne de chaque répétition à chaque temps. T1 = 5 jours ; T2 = 12 jours ; T3 = 19 jours ; T4 = 26 jours.

4.2.3.2 La Matière Organique (MO)

La quantité de MO permet d'évaluer la quantité de biomasse organique contenue dans le périphyton. La MO du contrôle a particulièrement varié au début de l'exposition, passant de moins de 10% à presque 100%, elle s'est ensuite stabilisée pour les deux derniers prélèvements (19 et 26 jours). Le % de MO du périphyton exposé au cuivre et au boscalide est significativement différent de celui du témoin au début de l'exposition. Pour ceux exposés à la kasugamycine, cette différence est significative uniquement après 12 jours d'exposition. Pour la fin de l'expérience les valeurs sont toutes similaires entre les conditions (pour 19 et 26 jours) (Figure 10).

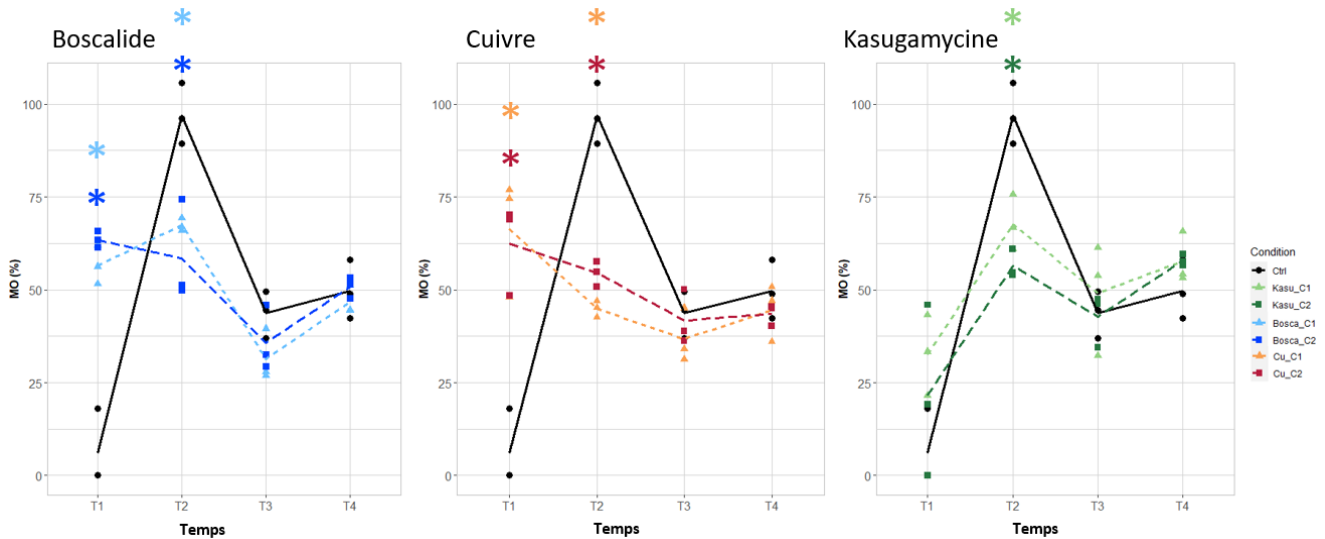


Figure 10: Matière Organique (%) de chaque condition comparée au contrôle en fonction du temps. (* représente une différence significative avec le contrôle pour chaque temps pour une p -value $< 0,05$, test ANOVA et $n = 3$). Les points représentent les valeurs de la MO par réplication. Les lignes passent par la moyenne de chaque réplication à chaque temps. T1 = 5 jours ; T2 = 12 jours ; T3 = 19 jours ; T4 = 26 jours.

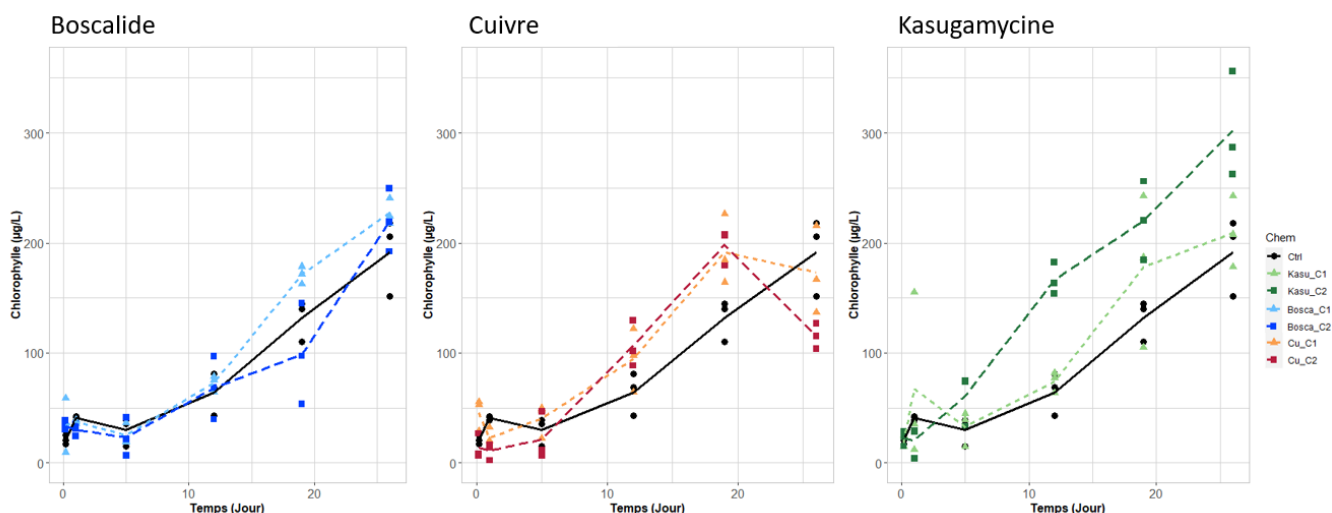


Figure 11 : Chlorophylle totale ($\mu\text{g/L}$) de chaque condition comparée au contrôle en fonction du temps. Les points représentent les valeurs de chlorophylle totale par réplication. Les lignes passent par la moyenne de chaque réplication à chaque temps

4.2.4 Effets des fongicides sur la structure autotrophe du périphyton

4.2.4.1 La chlorophylle totale

Les mesures de chlorophylle ont été réalisées à chaque temps. Elles sont représentées dans les graphes de la [Figure 11](#). Toutes les conditions évoluent de la même façon au cours du temps et aucune différence significative n'a été trouvée entre les conditions et le contrôle ($p\text{-value} > 0,05$, test ANOVA). Une augmentation croissante est observée pour l'ensemble des échantillons de périphyton et le périphyton contaminé a une croissance similaire à celle du contrôle.

4.2.4.2 Effets des fongicides sur la composition autotrophe du périphyton

Les groupes autotrophes du périphyton sont répartis en trois communautés ; les algues vertes, les diatomées et les cyanobactéries. Il s'agit des trois groupes de micro-organismes principaux qui réalisent la photosynthèse dans le biofilm. L'évolution temporelle de la proportion de chacun de ces groupes phototrophes par condition est présentée dans la [Figure 12](#). Dans l'ensemble les diatomées et les cyanobactéries restent les groupes majoritaires dans le périphyton à tous les temps et dans toutes les conditions. Il n'y a que très peu d'algues vertes. Dans la condition contrôle, les diatomées ainsi que les cyanobactéries ont gardé les mêmes proportions tout au long de l'expérience avec une proportion moyenne de $33 \pm 10\%$ ($n = 18$) de cyanobactéries et $67 \pm 10\%$ ($n = 18$) de diatomées (aucune différence significative dans la composition au cours du temps, $p\text{-value} > 0,05$, test ANOVA). La proportion de diatomées n'est jamais descendue en dessous de 48% pour toutes les répétitions confondues du contrôle. Aucune algue verte n'a été détectée dans les canaux contrôle durant toute l'expérience.

Chez le périphyton exposé au boscalide, des algues vertes ont été détectées à 5 jours d'exposition pour les deux concentrations et à 12 jours pour la concentration la plus élevée. Les proportions de cyanobactéries et diatomées varient peu au cours du temps avec des moyennes de $37 \pm 11\%$ ($n = 18$) pour les cyanobactéries, $62 \pm 12\%$ ($n = 18$) pour les diatomées et de $1 \pm 3\%$ ($n = 18$) pour les algues vertes chez le périphyton exposé à $100 \mu\text{g/L}$ et des moyennes de $30 \pm 13\%$ ($n = 18$) pour les cyanobactéries, $69 \pm 12\%$ ($n = 18$) pour les diatomées et $>1\%$ ($n = 18$) pour les algues vertes chez le périphyton exposé à $0,1 \mu\text{g/L}$. Cependant une légère baisse de la proportion de diatomées ($\sim 15\%$) et une légère augmentation de la proportion de cyanobactéries ($\sim 16\%$) est observée à partir de 12 jours d'exposition par rapport aux mesures à 24 h chez le périphyton exposé au boscalide. Ces variations ne sont significatives que chez le périphyton exposé à la plus faible concentration ($0,1 \mu\text{g/L}$). Ainsi, chez le périphyton exposé à $0,1 \mu\text{g/L}$ de boscalide, la proportion de diatomées est significativement plus

importante à 24 h qu'à 12 jours (p -value = 0,0217 < 0,05, test de Tukey) et la proportion de cyanobactéries est quant à elle plus petite à 24 h qu'à 12 jours (p -value = 0,017 < 0,05, test de Tukey). La proportion des cyanobactéries a également augmenté entre 24 h et le dernier jour de prélèvement, soit 26 jours (p -value = 0,046 < 0,05, test de Tukey) chez le périphyton exposé à 0,1 $\mu\text{g/L}$ de boscalide.

Chez le périphyton exposé à la kasugamycine, des algues vertes ont été détectées à 24 h pour les deux concentrations et à 4 h et 12 jours d'exposition pour la concentration la plus faible. Les proportions de cyanobactéries et diatomées varient peu au cours du temps avec des moyennes de $27 \pm 13\%$ ($n = 18$) pour les cyanobactéries, $71 \pm 12\%$ ($n = 18$) pour les diatomées et de $1 \pm 4\%$ ($n = 18$) pour les algues vertes chez le périphyton exposé à 1 mg/L et des moyennes de $21 \pm 12\%$ ($n = 18$) pour les cyanobactéries, $79 \pm 11\%$ ($n = 18$) pour les diatomées et $>1\%$ ($n = 18$) pour les algues vertes chez le périphyton exposé à 100 mg/L . Cependant une augmentation de la proportion de diatomées ($\sim +20\%$) est observée à partir de 12 jours d'exposition par rapport aux mesures à 24 h chez le périphyton exposé à la kasugamycine. Ces variations ne sont significatives que chez le périphyton exposé à la plus forte concentration (100 mg/L). Ainsi, chez le périphyton exposé à 100 mg/L de boscalide, la proportion de diatomées est significativement plus importante à 24 h qu'à 12 jours (p -value = 0,04 < 0,05, test de Tukey). Néanmoins, cette différence s'estompe par la suite car aucune autre différence n'a été trouvée entre les autres temps de prélèvements (p -value > 0,05, test ANOVA).

Chez le périphyton exposé au sulfate de cuivre, des algues vertes ont été détectées à 5 jours d'exposition pour les deux concentrations et à 4 h d'exposition pour la concentration la plus élevée. Les proportions de cyanobactéries et diatomées varient peu au cours du temps avec des moyennes de $40 \pm 11\%$ ($n = 18$) pour les cyanobactéries, $60 \pm 12\%$ ($n = 18$) pour les diatomées et de $>1\%$ ($n = 18$) pour les algues vertes chez le périphyton exposé à 30 $\mu\text{g/L}$ et des moyennes de $37 \pm 13\%$ ($n = 18$) pour les cyanobactéries, $61 \pm 12\%$ ($n = 18$) pour les diatomées et $2 \pm 4\%$ ($n = 18$) pour les algues vertes chez le périphyton exposé à 100 $\mu\text{g/L}$. Cependant une baisse de la proportion de diatomées ($\approx 40\%$ pour la concentration faible et $\approx 18\%$ pour la concentration forte) et une légère augmentation de la proportion de cyanobactéries ($\approx 40\%$ pour la concentration faible et $\approx 18\%$ pour la concentration forte) sont observées à partir de 12 jours d'exposition par rapport aux mesures à 24 h. Ces variations sont significatives pour les deux concentrations en cuivre. Ainsi, chez le périphyton exposé à 0,1 $\mu\text{g/L}$ de cuivre, la proportion de diatomées est significativement plus importante à 24 h qu'à 12 jours (p -value = 0,0009 < 0,05, test de Tukey) et la proportion de cyanobactéries est quant à elle plus petite à 24 h qu'à 12 jours (p -value = 0,003 < 0,05, test de Tukey). La proportion des cyanobactéries a également augmenté entre 24 h et 19 jours (p -value = 0,004 < 0,05, test de Tukey) et entre 24 h et le dernier jour de prélèvement (p -value = 0,004 < 0,05, test de Tukey). Chez le périphyton exposé à 100 $\mu\text{g/L}$ de cuivre, la proportion de cyanobactéries est significativement plus faible à 24 h qu'à 12 jours (p -value = 0,001 < 0,05, test de Tukey), qu'à 19 jours (p -value = 0,0025 < 0,05, test de Tukey), et qu'à 26 jours (p -value = 0,004 < 0,05, test de Tukey).

A chaque temps de prélèvement, la comparaison des proportions des différents groupes phototrophes des périphytons exposés au fongicides par rapport aux proportions du contrôle a mis en évidence des différences significatives uniquement pour les biofilms exposés à la plus forte concentration de kasugamycine (p -value < 0,05, test de Tukey). La proportion des diatomées était plus importante dans le périphyton exposé à la kasugamycine (100 mg/L) que dans le contrôle pour les deux derniers temps de prélèvement (à 19 et 26 jours). De plus, la proportion de cyanobactéries était moins importante après 19 et 26 jours d'exposition dans les canaux exposés à 100 $\mu\text{g/L}$ de kasugamycine que dans les contrôles.

Pour les deux conditions de cuivre, les proportions de cyanobactéries augmentent et celles de diatomées diminuent entre le début et la fin de l'exposition. Ce changement de communautés n'est pas observé dans le périphyton de la condition contrôle. Toutefois cette différence n'est pas significative (p -value > 0,05, test ANOVA).

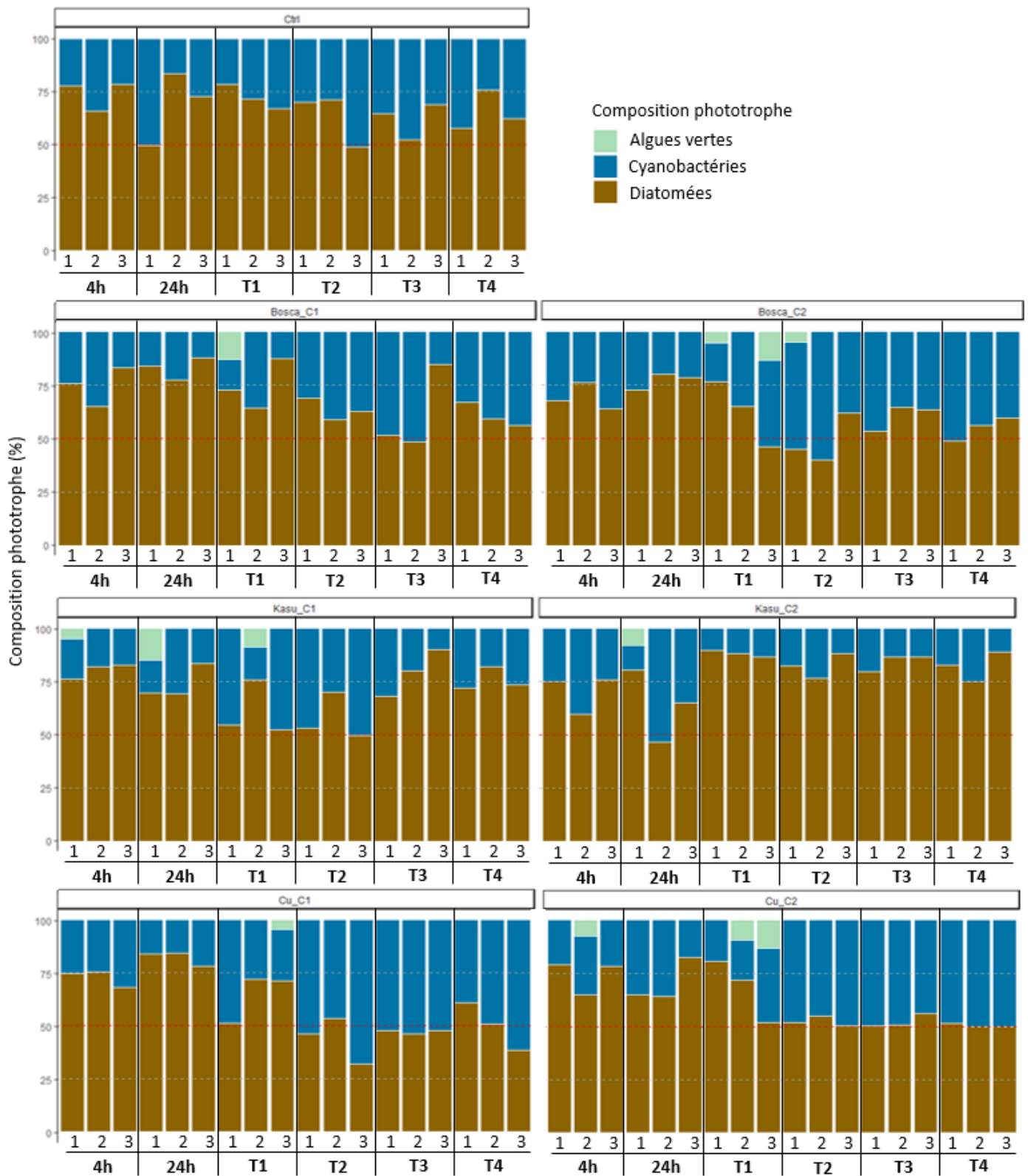


Figure 12 : Composition des organismes phototrophes (%) de chaque condition d'exposition en fonction des temps de prélèvement

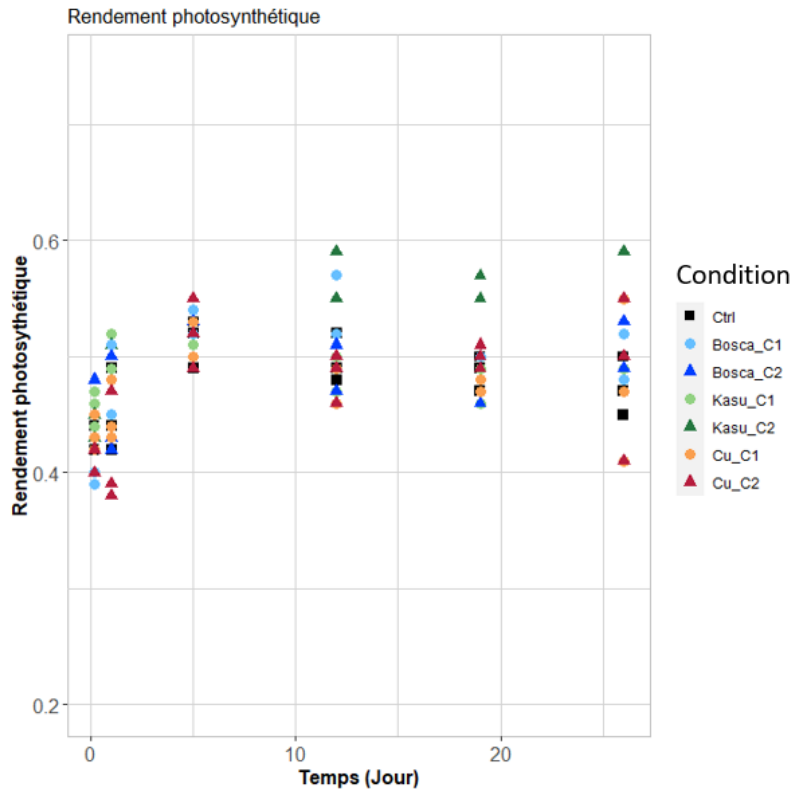


Figure 13 : Rendement photosynthétique en fonction du temps pour chaque condition

4.2.5 Pas d'effet des fongicides sur les activités autotrophes du périphyton

L'activité autotrophe des organismes périphytiques est représentée par la mesure du rendement photosynthétique. Ce dernier permet de rendre compte de l'état physiologique des organismes autotrophes. Lorsque le rendement est supérieur à 0,3, cela signifie que la fonction photosynthèse n'est pas affectée. Sur le graphique de [Figure 13](#), les périphytons exposés aux fongicides ont toujours un rendement photosynthétique supérieur à 0,3 et aucune différence significative avec le contrôle n'a pu être mise en évidence.

4.2.6 Effets des fongicides sur les activités hétérotrophes du périphyton

4.2.6.1 La β -glucosidase (Glu)

Pour évaluer les activités hétérotrophes du périphyton, les activités enzymatiques de trois enzymes (la β -glucosidase, la phosphatase et la leucine aminopeptidase) ont été mesurées. L'activité enzymatique de la Glu est représentée sur les graphiques de la [Figure 14](#). L'activité de cette enzyme dans le biofilm contrôle montre une croissance tout au long de l'exposition, avec une légère diminution au 19^{ème} jour. L'activité Glu du périphyton exposé aux fongicides suit cette tendance. Néanmoins l'exposition prolongée aux fongicides semble réduire l'activité de la Glu qui est plus faible après 26 jours d'exposition à tous les fongicides testés que celle du contrôle. Cette tendance est significative chez le périphyton exposé à la plus faible concentration en cuivre (30 $\mu\text{g/L}$) avec une inhibition significative de 84% de la Glu par rapport au contrôle (p-value < 0,05, test de Tukey).

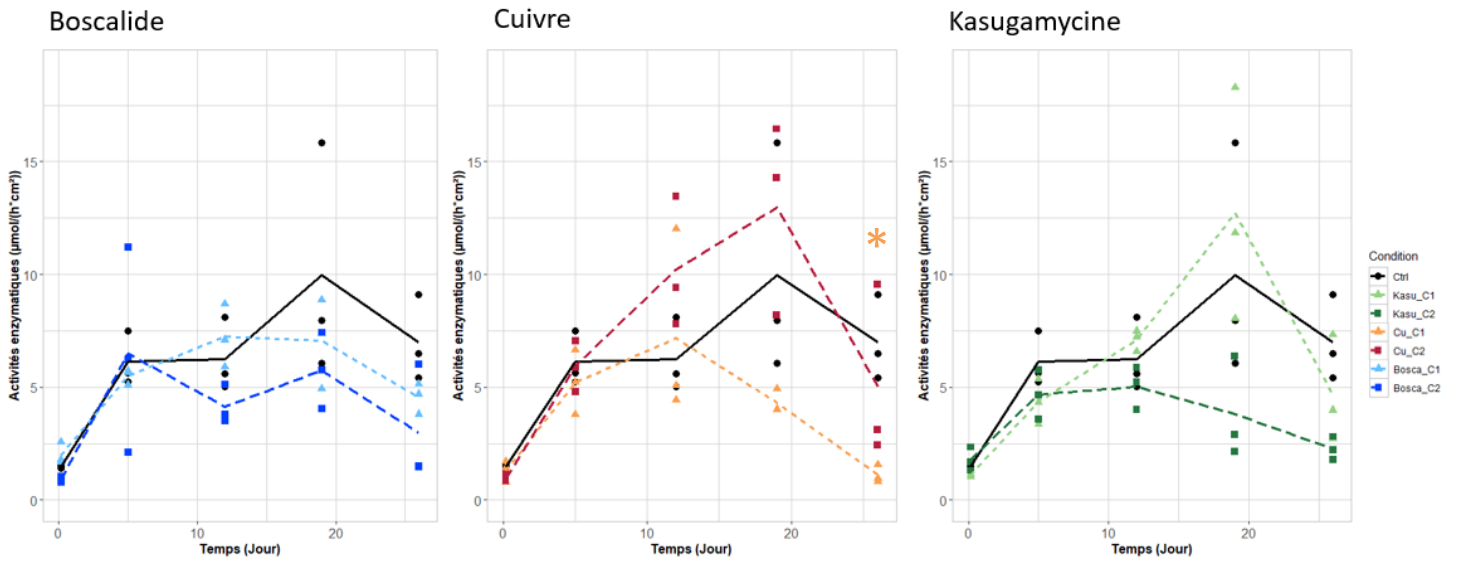


Figure 14 : Activité de l'enzyme Glu ($\mu\text{mol/h/cm}^2$) de chaque condition comparée au contrôle en fonction du temps. Les points représentent les valeurs d'activités enzymatiques de la Glu par réplication. Les lignes passent par la moyenne de chaque réplication à chaque temps (* représente une différence significative avec le contrôle pour une p -value $< 0,05$, test Dunnett et $n = 3$).

4.2.6.2 La Phosphatase (Pho)

L'activité enzymatique de la Pho est représentée sur les graphiques de la Figure 15. L'activité de cette enzyme augmente dans le périphyton contrôle durant toute l'expérience. L'activité Pho des périphytons exposés aux fongicides suit cette même tendance. En effet, aucune différence significative n'a été observée entre les conditions contaminées et le contrôle (p -value $> 0,05$, test ANOVA, $n = 3$).

4.2.6.3 La Leucine aminopeptidase (Leu)

L'activité enzymatique de la Leu est représentée sur les graphiques de la Figure 16. L'activité de cette enzyme dans le biofilm contrôle croit jusqu'au 12^{ème} jour d'exposition puis se stabilise jusqu'à la fin de l'expérience. Le même phénomène est observé pour le périphyton exposé au boscalide et au

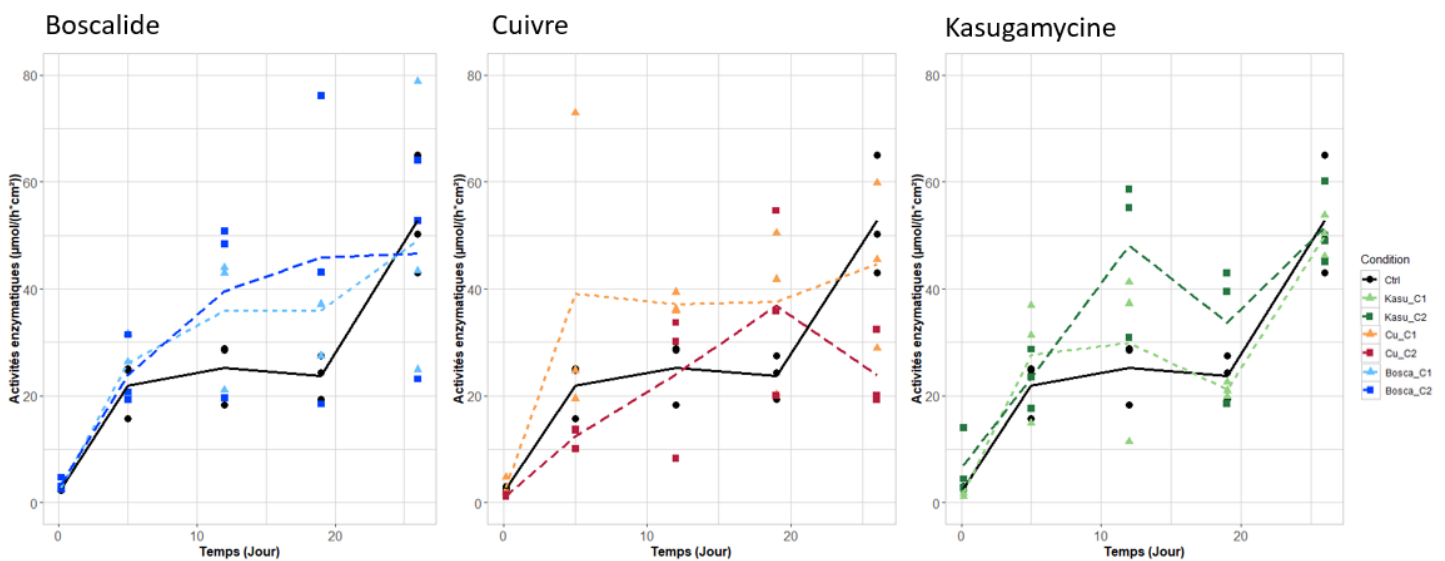


Figure 15 : Activité de l'enzyme Pho ($\mu\text{mol/h/cm}^2$) de chaque condition comparée au contrôle en fonction du temps. Les points représentent les valeurs d'activités enzymatiques de la Pho par réplication. Les lignes passent par la moyenne de chaque réplication à chaque temps

sulfate de cuivre (pour les deux concentrations testées). Pour le périphyton exposé à la kasugamycine, l'activité de l'enzyme Leu ne se stabilise pas après le 19^{ème} jour. Pour le périphyton exposé à 1 mg/L de kasugamycine, Leu diminue à partir du 19^{ème} jour pour atteindre le niveau du contrôle à la fin de l'expérience. Pour le périphyton exposé à 100 mg/L de kasugamycine, Leu continue d'augmenter jusqu'au 12^{ème} jour d'exposition puis décroît jusqu'au niveau du contrôle au dernier jour d'exposition. Ainsi, l'activité Leu du biofilm contaminé à 100 mg/L de kasugamycine est significativement plus élevée que celle du contrôle après 5 et 12 jours d'exposition (p -value > 0,05, test de Tukey). Pour le 5^{ème} et le 12^{ème} jour, des augmentations respectives de 114% et 88% de l'activité enzymatique de la Glu était mesurée par rapport au contrôle.

4.3 Tests de toxicité aiguë – Approche PICT

Trois tests de toxicité aiguë ont été réalisés pour évaluer l'acquisition de tolérance induite par la pollution (PICT) ; cuivre / Glu, cuivre / rendement photosynthétique et kasugamycine / estérase. L'objectif de ces tests est de savoir si l'exposition chronique aux contaminants testés a entraîné une adaptation des organismes du biofilm à ces contaminants, les rendant plus résistants à ce contaminant. Les tests ont été réalisés à plusieurs moments dans l'expérience pour définir le moment où cette résistance pourrait se développer. Les tests ont, à chaque fois, été réalisés sur les biofilms de chaque condition, dans le but de détecter une éventuelle co-tolérance.

4.3.1 Approche PICT – Estérase et kasugamycine

Ce test de toxicité aiguë a été réalisée après 5 (t1), 12 (t2) et 26 (t3) jours d'exposition. Les dose-réponses obtenues sont présentées dans la section 8.4.1. L'exposition aiguë à la kasugamycine ayant rarement entraîné plus de 50% d'inhibition de l'activité estérase, les CE10 plutôt que les CE50 ont été choisis pour illustrer la tolérance des communautés microbiennes exposées. Pour le contrôle, les intervalles de confiance sont importants, reflétant la variabilité des réponses. Le contrôle est stable tout au long de l'exposition avec des CE10 similaires à tous les temps avec une CE10 moyenne de $1,75 \pm 0,79$ g/L.

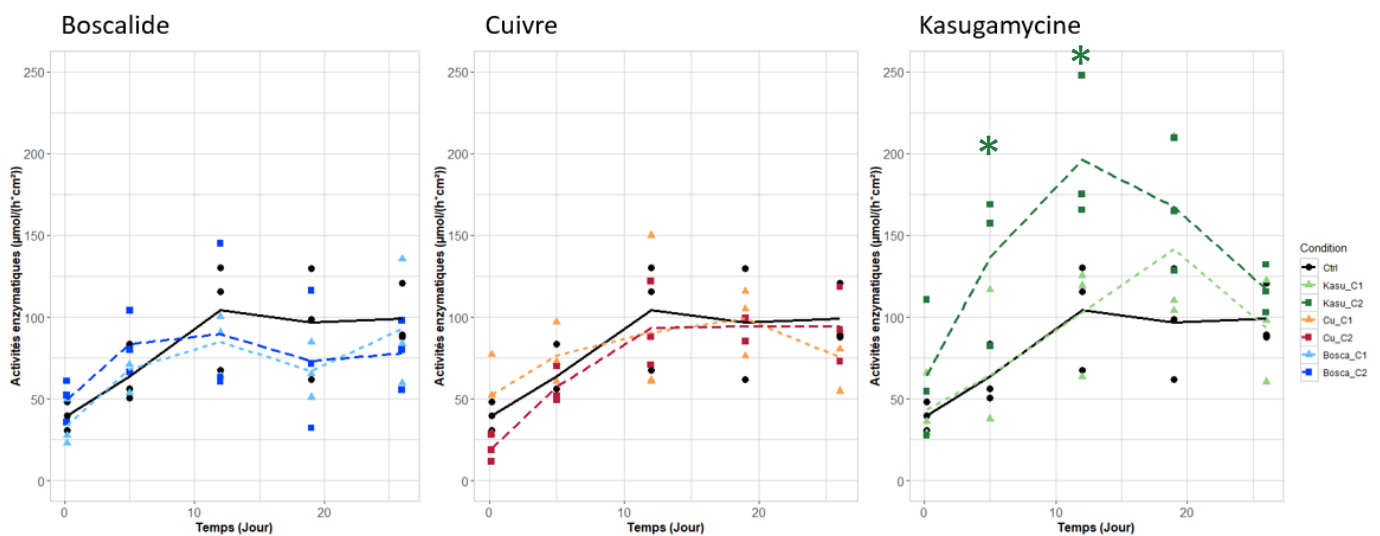


Figure 16 : Activité de l'enzyme Leu ($\mu\text{mol/h}\cdot\text{cm}^2$) de chaque condition comparée au contrôle en fonction du temps. Les points représentent les valeurs d'activités enzymatiques de la Leu par réplification. Les lignes passent par la moyenne de chaque réplification à chaque temps. (* représente une différence significative avec le contrôle pour une p -value > 0,05, test Dunnett et $n = 3$)

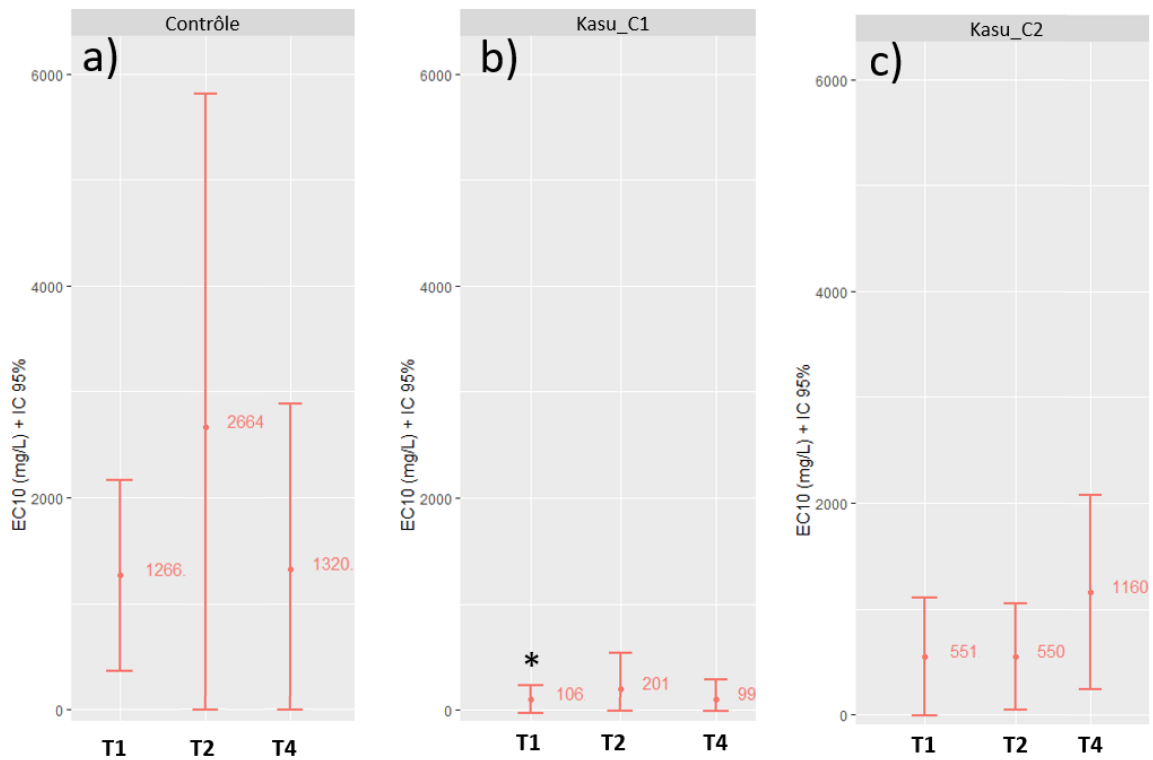


Figure 17: CE10 de kasugamycine pour l'activité de l'enzyme estérase des périphytons contrôle et exposés à deux concentrations en kasugamycine (C1 = 1 mg/L, C2 = 100 mg/L) après 5 (T1), 12 (T2) et 26 jours (T4) d'exposition. Le point indique la valeur de la CE10 modélisée et les barres d'erreur correspondent à l'intervalle de confiance à 95%. * indique une différence significative entre les échantillons exposés et le contrôle.

Pour les périphytons exposés à la kasugamycine, les CE10 ne varient pas au cours du temps avec une valeur moyenne de 135 ± 57 mg/L ($n = 3$) pour le périphyton exposé à 1 mg/L de kasugamycine et de 750 ± 350 mg/L ($n = 3$) pour les ceux exposés à 100 mg/L (Figure 17). Toutes les CE10 des biofilms exposés à la kasugamycine sont inférieures aux valeurs du contrôle, néanmoins, cette différence est significative uniquement après 5 jours d'exposition chez le périphyton exposés à 1 mg/L de kasugamycine.

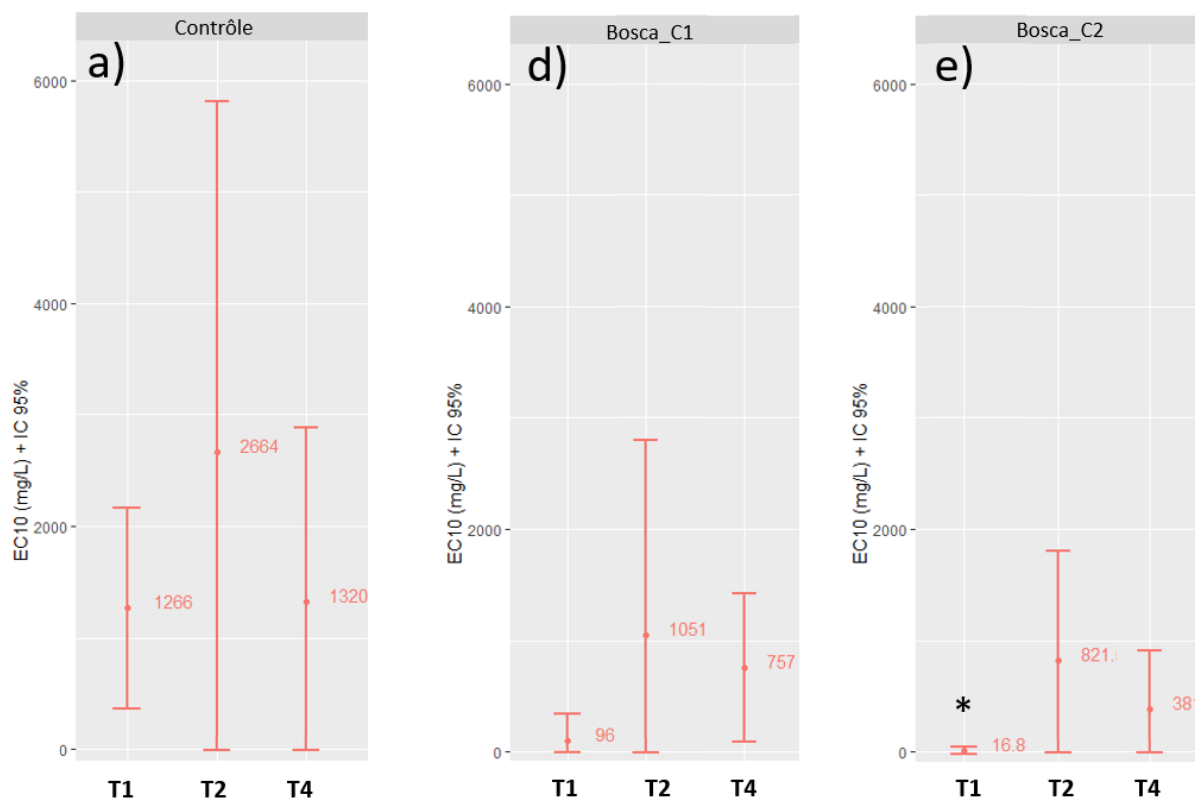


Figure 18 : CE10 de kasugamycine pour l'activité de l'enzyme estérase des périphytons contrôle et exposés à deux concentrations en boscalide (C1 = 0,1 µg/L, C2 = 100 µg/L) après 5 (T1), 12 (T2) et 26 jours (T4) d'exposition. Le point indique la valeur de la CE10 modélisée et les barres d'erreur correspondent à l'intervalle de confiance à 95%. * indique une différence significative entre exposés et contrôle.

Chez le périphyton exposé au boscalide, les CE10 n'ont pas variées au cours du temps (Figure 18). Ces CE10 sont globalement plus faibles que celles du contrôle, cependant seule la CE10 du périphyton exposé à 100 µg/L de boscalide pendant 5 jours est significativement plus faible que celle du contrôle.

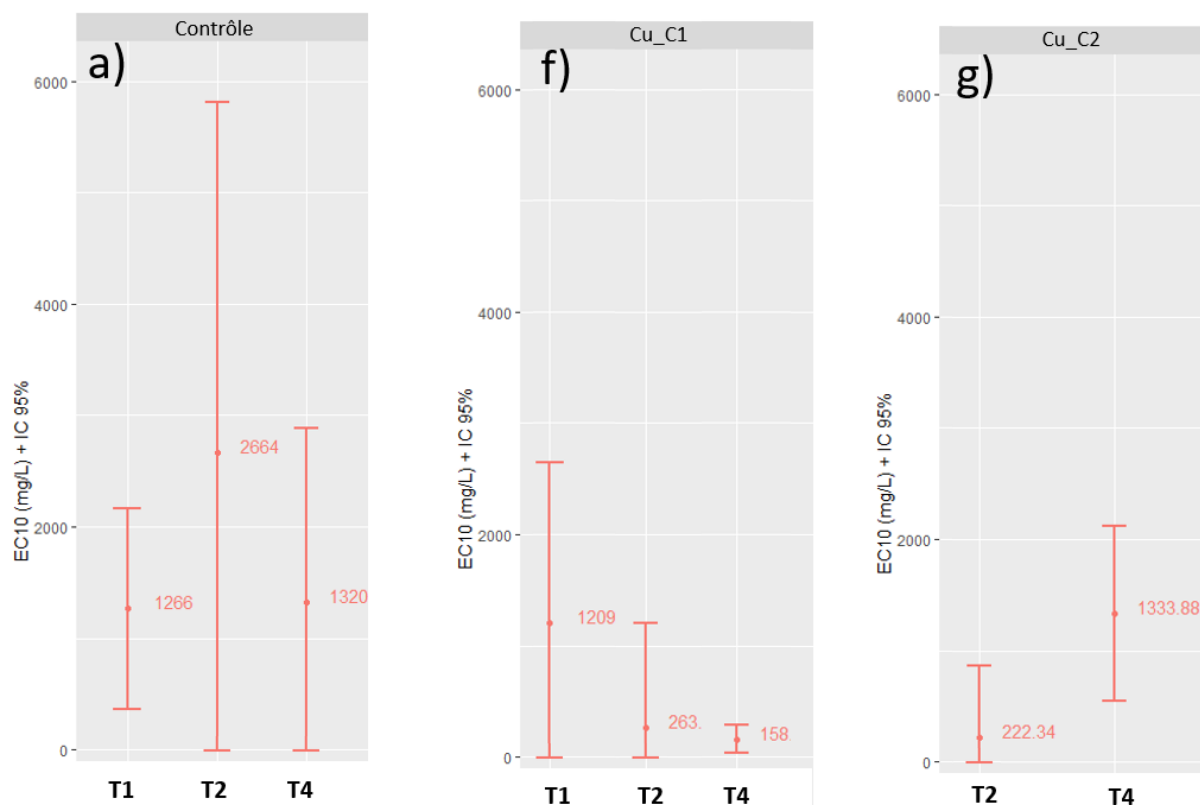


Figure 19: CE10 de kasugamycine pour l'activité de l'enzyme estérase des périphytons contrôle et exposés à deux concentrations en cuivre (C1 = 30 µg/L, C2 = 100 µg/L) après 5 (T1), 12 (T2) et 26 jours (T4) d'exposition. Le point indique la valeur de la CE10 modélisée et les barres d'erreur correspondent à l'intervalle de confiance à 95%. * indique une différence significative entre les échantillons exposés et le contrôle.

Chez le périphyton exposé au cuivre, les CE10 étaient très proches des CE10 des populations du contrôle notamment pour le périphyton exposé à 30 µg/L après 5 jours d'exposition (T1), et celui exposé à 100 µg/L à la fin de l'exposition (Figure 19). Pour tous les temps de prélèvement aucune différence n'a été remarquée entre la condition contrôle et les conditions exposées au cuivre. La CE10 des périphytons exposés pendant 5 jours à 100 µg/L de cuivre n'a pas pu être calculée car même à la concentration la plus élevée de kasugamycine, il n'y avait que très peu d'inhibition de l'activité estérase.

4.3.2 Approche PICT – β -glucosidase et cuivre

Ces tests de toxicité aiguë au cuivre ont été réalisés après 24 h et après 5, 12, 19 et 26 jours d'exposition. Les doses-réponses obtenues sont présentées dans la section 8.4.2. Dans cette section, les CE50 sont utilisées pour comparer la tolérance au cuivre des biofilms exposés au fongicide à celle du contrôle. Pour le périphyton contrôle, les CE50 de cuivre sont restées stables durant toute l'expérience, aucune variation significative n'a été trouvée au sein du contrôle. En moyenne pour le contrôle, les CE50 de l'activité de l'enzyme Glu étaient atteintes pour $34 \text{ mg/L} \pm 4 \text{ mg/L}$ ($n=5$) de cuivre. Chez le périphyton exposé à la kasugamycine, il y a eu de faibles variations temporelles des CE50 mais aucune significative (Figure 20). Le périphyton exposé à 1 mg/L de kasugamycine pendant 12 jours était significativement plus sensible au cuivre que le contrôle avec une CE50 $\approx 2x$ plus faible que celle du contrôle. Les niveaux de tolérance des périphytons exposés à la kasugamycine aux autres temps de prélèvement ne présentaient aucune différence significative avec le contrôle. Chez le périphyton exposé chroniquement au boscalide (Figure 21) comme au cuivre (Figure 22), les CE50 sont du même ordre de grandeur que celles du contrôle, à tous les temps de prélèvement.

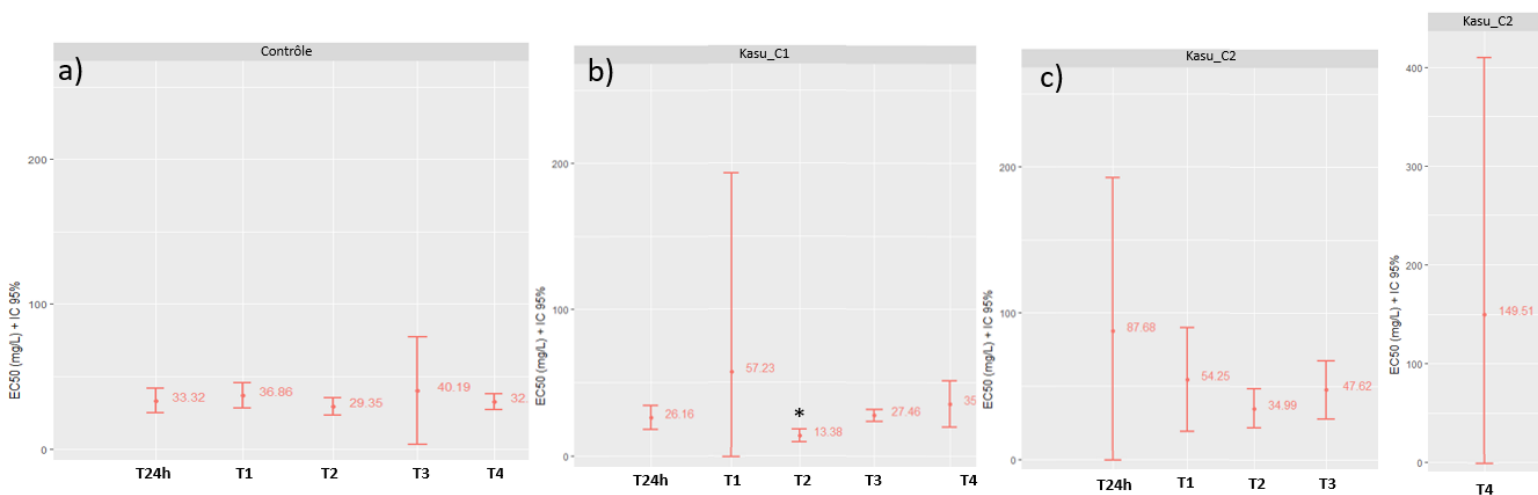


Figure 20 : CE50 de cuivre pour l'activité de l'enzyme estérase des périphytons contrôle et exposés à deux concentrations en kasugamycine (C1 = 1 mg/L, C2 = 100 mg/L) après 24 h, 5 (T1), 12 (T2), 19 (T3) et 26 jours (T4) d'exposition. Le point indique la valeur de la CE50 modélisée et les barres d'erreur correspondent à l'intervalle de confiance à 95%. * indique une différence significative entre exposés et contrôle.

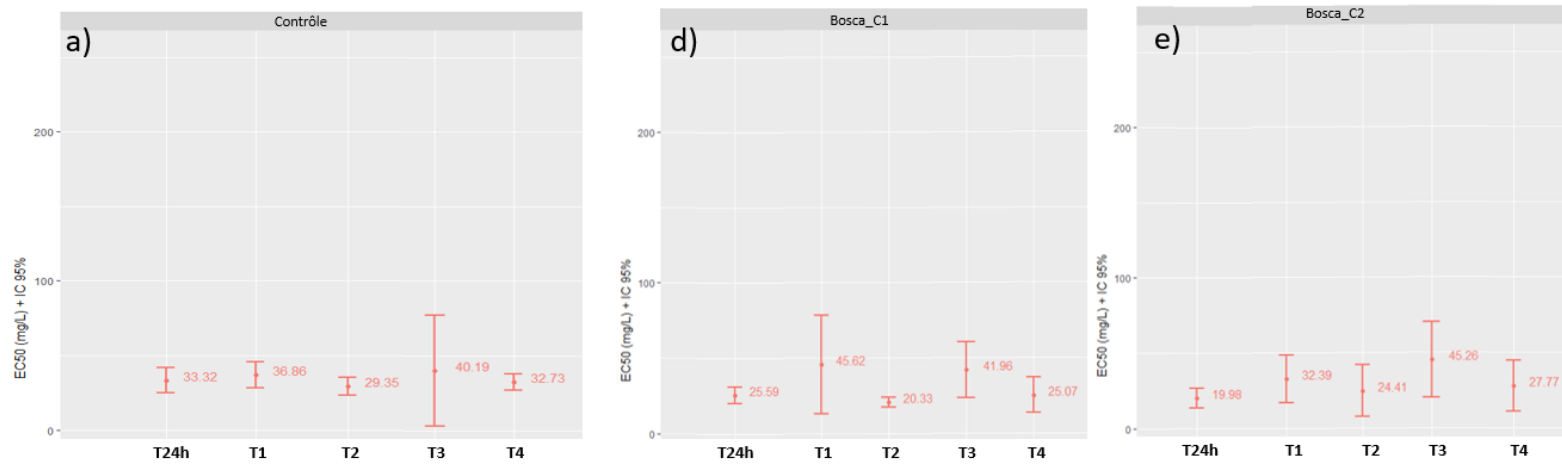


Figure 21 : CE50 de cuivre pour l'activité de l'enzyme estérase des périphytons contrôle et exposés à deux concentrations en boscalide (C1 = 0,1 µg/L, C2 = 100 µg/L) après 24 h, 5 (T1), 12 (T2), 19 (T3) et 26 jours (T4) d'exposition. Le point indique la valeur de la CE50 modélisée et les barres d'erreur correspondent à l'intervalle de confiance à 95%. * indique une différence significative entre les échantillons exposés et le contrôle.

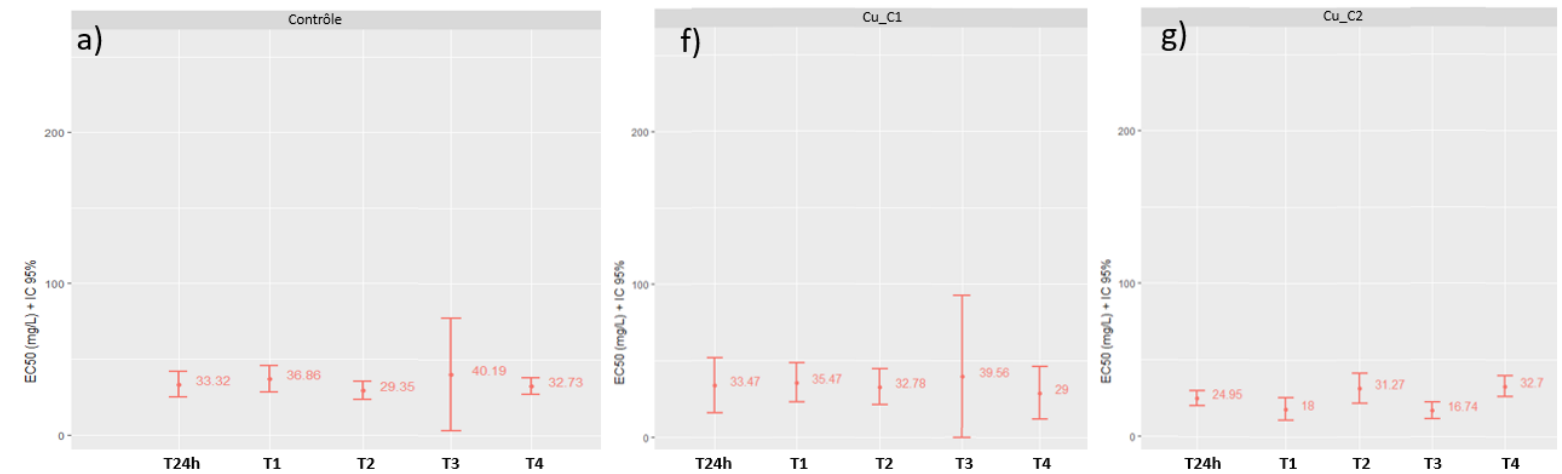


Figure 22 : CE50 de cuivre pour l'activité de l'enzyme estérase des périphytons contrôle et exposés à deux concentrations en cuivre (C1 = 30 µg/L, C2 = 100 µg/L) après 24 h, 5 (T1), 12 (T2), 19 (T3) et 26 jours (T4) d'exposition. Le point indique la valeur de la CE50 modélisée et les barres d'erreur correspondent à l'intervalle de confiance à 95%. * indique une différence significative entre les échantillons exposés et le contrôle.

4.3.3 Approche PICT – Rendement photosynthétique et cuivre

Ce test de toxicité aiguë a été réalisé au dernier prélèvement après 26 jours d'exposition, sur un nombre limité de conditions. Les doses-réponses obtenues de ces tests sont présentées en section 8.4.3. Dans cette section, les EC50 sont utilisées pour comparer la tolérance au cuivre des biofilms exposés chroniquement au sulfate de cuivre à celle du contrôle. Les CE50 obtenues pour le rendement photosynthétique sont similaires aux résultats obtenus pour la Glu. Le périphyton exposé chroniquement au sulfate de cuivre et les contrôles ont des CE50 de cuivre similaires pour leur rendement photosynthétique (Figure 23).

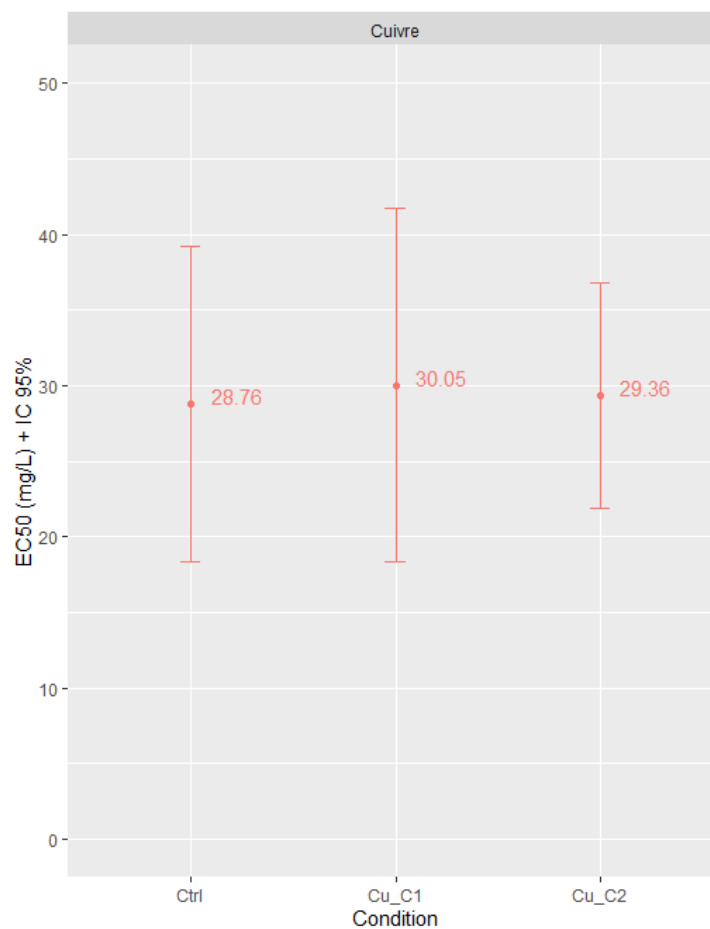


Figure 23 : CE50 de cuivre pour le rendement photosynthétique des périphytons contrôle et exposés à deux concentrations en cuivre (C1 = 1 mg/L, C2 = 100 mg/L) après 26 jours d'exposition. Le point indique la valeur de la CE50 modélisée et les barres d'erreur correspondent à l'intervalle de confiance à 95%. * indique une différence significative entre les échantillons exposés et le contrôle.

5 Discussion

5.1 Tests de toxicité aiguë

Parmi tous les contaminants testés, trois fongicides ont été sélectionnés ; le boscalide, le sulfate de cuivre et la kasugamycine. Le boscalide et la kasugamycine ont été choisis car peu d'études se sont intéressées à leur toxicité. Le cuivre, quant à lui, a une toxicité connue depuis plusieurs années. Néanmoins, il est toujours utilisé, notamment sous forme de sulfate de cuivre. De ce fait, il est intéressant de continuer à caractériser sa toxicité, particulièrement avec le périphyton à la base des réseaux trophiques. De plus, comme sa toxicité est connue, il peut servir de témoin positif pour l'expérience.

Le boscalide n'a montré aucune toxicité aiguë sur les paramètres que nous avons testés et dans nos gammes de concentrations. Le boscalide est classé comme « toxique pour les organismes aquatiques, et entraîne des effets néfastes à long terme » (mention H411). De ce fait, les effets de ce pesticide se manifesteraient à long terme. Il est donc intéressant de vérifier, comme il l'a été fait lors de ce stage, si après une exposition chronique (26 jours) les micro-organismes exposés au boscalide présentent une toxicité.

Le sulfate de cuivre a été testé seulement sur l'activité de l'enzyme Glu et sur le rendement photosynthétique. En effet, des études ont montré la toxicité du cuivre pour la photosynthèse (Marques et al. 2019; Brunetto et al. 2019) et pour l'activité de l'enzyme Glu (Geiger et al. 1998; Wyszowska, Kucharski, et Kucharski 2010) sur les micro-organismes exposés. Le cuivre pouvant être impliqué dans la création de radicaux libres tels que l'hydroxyle HO^{*}, ces derniers pourraient être à l'origine de la toxicité observée. Par exemple, ils pourraient oxyder les enzymes et les rendre ainsi moins efficaces (Solioz 2018).

La kasugamycine a montré des effets sur l'estérase en inhibant son activité enzymatique. La kasugamycine fait partie de la famille des aminoglycosides. Les molécules de cette famille se fixent au ribosome perturbant ainsi la traduction du code génétique et donc la synthèse des protéines chez les bactéries (Kotra, Haddad, et Mobashery 2000; Krause et al. 2016). De ce fait, la kasugamycine pourrait réduire l'activité de l'estérase en limitant la traduction du code par le ribosome.

5.2 Tests de toxicité chronique

La biomasse totale (AFDW) et la biomasse algale (chlorophylle totale) ont constamment progressé durant toute l'expérience. De plus, le rendement synthétique est resté élevé. Ces trois paramètres montrent que le périphyton a gardé un bon état physiologique et une bonne croissance durant toute l'expérience et pour toutes les conditions confondues.

La quantité de MO du contrôle a beaucoup varié sur les deux premiers temps, passant de moins de 10% à presque 100%. De ce fait, des différences significatives ont été trouvées avec les autres conditions. Néanmoins, la masse à peser du contrôle était relativement faible lors des premiers prélèvements, il est alors possible de remettre en doute la validité de la première mesure du contrôle (à 5 jours). La pesée à 12 jours était réalisée dans le même creuset que celle du contrôle à 5 jours, la masse à 5 jours était ensuite soustraite à celle de 12 jours. Ainsi, si la première était erronée, la seconde l'était également. Bien que cette méthode permette de gagner du temps, elle peut entraîner des erreurs en cascade.

5.2.1 Contamination au cuivre dans le contrôle

La concentration en cuivre dans le contrôle était similaire à celle de la condition cuivre C1 à ≈ 30 µg/L. Cette contamination vient de l'eau du robinet utilisée pour remplir les canaux. Bien que le cuivre n'ait pas été dosé dans les autres conditions (boscalide et kasugamycine), mais que la même

eau du robinet a été utilisée, il est supposé que la concentration en cuivre était d'environ 27 µg/L dans tous les canaux (sauf pour la condition cuivre C2, [Cu]_{moyenne} ≈ 70 µg/L). De plus, le périphyton utilisé pour l'expérience s'est développé dans un volume d'eau contenant 50% d'eau du robinet, donc il était déjà exposé au cuivre lors de la colonisation, probablement à environ 30 µg/L. Néanmoins, la condition cuivre C1 a été conservée car à chaque changement d'eau, une solution de sulfate de cuivre était rajoutée. Il est supposé que le cuivre présent dans l'eau du robinet soit différent du sulfate de cuivre en solution présent dans la condition cuivre C1 et cuivre C2. De plus, le cuivre sous forme de sulfate de cuivre est potentiellement plus biodisponible que le cuivre présent dans l'eau du robinet (probablement présent sous différentes formes d'ions).

5.2.2 Toxicité du boscalide

L'exposition au boscalide a modifié la composition autotrophe du périphyton au cours du temps, en particulier chez les communautés exposées à 100 µg/L. Alors que les proportions de diatomées et cyanobactéries sont restées stables au cours du temps chez le périphyton exposé à 0,1 µg/L de boscalide, l'exposition à 100 µg/L de boscalide a entraîné une diminution de la proportion de diatomées et une augmentation de la proportion de cyanobactéries au cours des 26 jours d'exposition. Ce résultat suggère que les diatomées seraient plus sensibles que les cyanobactéries au boscalide. La diminution de la proportion de diatomées favoriserait le développement des cyanobactéries. A notre connaissance, aucune étude n'a mis en évidence les différences de sensibilité au boscalide entre diatomées et cyanobactéries. Cependant, Lu et al. (2019) ont mis en évidence que d'autres fongicides pouvaient également modifier la composition autotrophe du périphyton exposé. Ainsi, Lu et al. (2019) ont montré qu'après 7 jours d'exposition à 2,5 mg/L d'azoxystrobin, la proportion d'algues vertes diminuait alors que celle de cyanobactéries augmentait.

Dans notre étude, l'exposition au boscalide n'a pas entraîné de différence significative avec le périphyton du contrôle que ce soit pour la composition phototrophe, le rendement photosynthétique ou les activités enzymatiques hétérotrophes. Au contraire d'autres études ont montré une inhibition des enzymes microbiennes hétérotrophes par le boscalide, notamment dans le sol. Ainsi Xiong et al. (2014) ont montré que le boscalide inhibait l'activité de la phosphatase et de la β-glucosidase des communautés microbiennes du sol suite à une exposition de 200 mg/kg pendant 60 jours. Cette différence entre les résultats obtenus dans notre étude et ceux de Xiong et al. (2014) peut être expliqué par plusieurs raisons. Il ne s'agit pas du même compartiment, les communautés microbiennes du sol sont majoritairement hétérotrophes contrairement aux communautés du périphyton, il ne s'agit donc pas des mêmes communautés de micro-organismes. De plus, les concentrations d'exposition sont difficiles à comparer et peut être que les concentrations dans l'eau doivent être plus élevées pour observer un effet sur les activités enzymatiques. Il faut également noter que dans l'expérience de Xiong et al. (2014) le temps d'exposition est deux fois plus long que celui de notre expérience.

5.2.3 Toxicité de la kasugamycine

L'exposition à la kasugamycine a entraîné, à la plus forte concentration, des modifications de la composition autotrophe avec notamment une augmentation de la proportion des diatomées et une diminution de celle des cyanobactéries au cours du temps et par rapport au contrôle. Ces résultats sont cohérents avec l'étude de Yalcin et al. (2022), sur la kanamycin, un composé de la même famille de la kasugamycine. Dans cette étude, l'exposition pendant 6 jours à 6,4 – 102,5 mg/L a entraîné une baisse de la croissance chez une cyanobactérie (*Fremyella diplosiphon*). Si la kasugamycine réduit la proportion de cyanobactéries, alors la proportion de diatomées peut augmenter. La kasugamycine en concentration à 100 mg/L a également augmenté l'activité hétérotrophe de l'enzyme Leu à 5 et 12 jours d'exposition. Aucune étude n'a été trouvée pour comparer nos résultats.

5.2.4 Toxicité du sulfate de cuivre

Comme observé pour les fongicides organiques, l'exposition chronique au cuivre a entraîné une modification de la composition phototrophe avec une réduction de la proportion de diatomées et

une augmentation de la proportion de cyanobactéries au cours du temps chez le périphyton exposé à 100 µg/L de cuivre. Ce changement de composition des communautés microbiennes a déjà été observé lors d'exposition à métaux ayant la même spéciation que le cuivre dissous (Cu^{2+}) ; notamment le zinc, Zn^{2+} (Genter et al. 1987). Dans cette étude, le périphyton avait été exposé à différentes concentrations (0,05, 0,5 et 1 mg/L) en zinc tout au long de l'année. Dès 0,05 mg/L de zinc, les cyanobactéries devenaient dominantes dans le périphyton au détriment des diatomées, notamment en automne. Une autre expérience menée sur le périphyton a aussi montré un changement de communautés phototrophes après 12 semaines d'exposition 5 µM de sulfate de cuivre (Soldo et Behra 2000). Contrairement aux résultats de notre expérience, dans l'expérimentation de Soldo et Behra (2000) ; les cyanobactéries étaient la composante autotrophe majoritaire au début de l'expérience, puis cette communauté a été remplacée par des algues vertes à la fin des 12 semaines d'exposition. Dans une autre étude de terrain d'un an, Leland et Carter (1984) ont montré que les populations de diatomées et d'algues vertes du périphyton étaient réduites dans des rivières contaminées au cuivre (5 µg/L) par rapport au périphyton prélevé sur un site non contaminée. Nos résultats, en accord avec la littérature, mettent en avant une sensibilité accrue des diatomées à l'exposition aux métaux (voir nos résultats ainsi que les études de Genter et al. 1987, Leland et Carter 1984). Cependant pour l'étude de Soldo et Behra (2000), les effets de l'exposition aux métaux sur les proportions de cyanobactéries et algues vertes sont plus variables et pourraient s'expliquer par des conditions d'exposition différentes, notamment en termes de composition de l'eau (l'eau utilisée provenait directement de la rivière).

Dans la condition cuivre C1, l'objectif était d'atteindre ~6µg/L de Cu dans l'eau en ajoutant du sulfate de cuivre mais l'eau utilisée était contaminée en cuivre et la quantité de cuivre dosée dans la condition cuivre C1 était de 30 µg/L, proche de la concentration mesurée dans le contrôle. Bien que les concentrations en cuivre dans le contrôle et dans la condition cuivre C1 soient similaires, des différences ont été observées dans la structure (composition phototrophe) et les fonctions (activité glucosidase) des périphytons entre ces 2 conditions. De ce fait, le sulfate de cuivre ajouté dans la condition C1 serait plus toxique que la forme du cuivre présente dans l'eau du robinet (dans le contrôle). Ces résultats sont en accord avec des expériences sur la toxicité du cuivre réalisées au laboratoire (par C. Bonnineau à l'INRAE), ces expériences ont permis de montrer que le sulfate de cuivre était l'une des formes les plus toxiques du cuivre sur le périphyton, notamment par rapport au citrate de cuivre $\text{Cu}_3(\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7)_2$ et à l'hydroxyde de cuivre $\text{Cu}(\text{OH})_2$.

5.2.5 Acquisition de tolérance du périphyton

Après avoir été exposé pendant 26 jours à la kasugamycine (1 et 100 mg/L) et au cuivre (30 et 100 µg/L), aucun échantillon de périphyton n'a montré d'acquisition de tolérance envers l'un ou l'autre de ces contaminants. En effet, les CE10 ou CE50 n'ont pas différé du contrôle après 26 jours d'exposition. Néanmoins, les intervalles de confiances obtenus pour les CE10 de kasugamycine pour l'estérase étaient importantes, une expérience avec plus de répliques pourrait permettre de les réduire et donc de mieux détecter la présence de variations entre les conditions contaminées et contrôle.

Pour les périphytons exposés au boscalide et à la kasugamycine, les CE10 de kasugamycine de l'activité enzymatique de l'estérase étaient globalement plus faibles que celle du contrôle. La présence de ces contaminants organiques aurait rendu les communautés bactériennes plus sensibles à la kasugamycine. A notre connaissance, il s'agit de la première étude sur la tolérance des micro-organismes à la kasugamycine.

Pour les CE50 du cuivre du rendement photosynthétique et pour les CE50 de l'activité enzymatique de la Glu, les périphytons exposés aux deux concentrations de cuivre ne présentaient aucune différence de tolérance au cuivre avec les périphytons du contrôle. Le même comportement a été observé pour les communautés phototrophes et hétérotrophes. Cela peut s'expliquer par la contamination des canaux contrôle par environ 30 µg/L de cuivre qui aurait entraîné une adaptation des communautés microbiennes contrôle au cuivre. En effet, Lambert et al. (2017) ont montré

qu'après 6 semaines d'exposition à 60 µg/L de cuivre, les CE50 pour le rendement photosynthétique du périphyton exposé étaient d'environ 40 mg/L, alors que pour le périphyton non exposé, les CE50 étaient d'environ 2 mg/L. Donc les CE50 des communautés pré-exposées au cuivre étaient similaires à celles de nos expérimentations (≈ 30 mg/L). De plus, le périphyton exposé à la concentration forte de cuivre (100 µg/L) présentait des valeurs seuils de CE50 similaires à celles du contrôle et de la concentration faible en cuivre (30 µg/L). Ces résultats semblent indiquer que l'augmentation de la CE50 au cuivre n'est pas linéaire avec la concentration d'exposition mais atteint un plateau.

6 Conclusion

Le périphyton contaminé a eu des réponses physiologiques différentes selon l'exposition. Dans les trois cas, il y a eu un changement dans la composition phototrophe du périphyton. Le boscalide est le fongicide qui a montré le moins de toxicité pour le périphyton durant notre expérience. Il a seulement montré des effets sur la composition phototrophe. Néanmoins, ces résultats sont à relativiser car la gamme de boscalide utilisée pour les tests de toxicité aiguë contenait les concentrations les plus basses en comparaison aux deux autres fongicides. Il est possible qu'à des concentrations plus élevées des effets auraient pu être identifiés. De plus, le boscalide a peut-être des effets sur des descripteurs biologiques qui n'ont pas été caractérisés durant cette expérience.

Après une exposition de 26 jours, les communautés microbiennes du périphyton n'ont pas montré d'acquisition de tolérance à la kasugamycine pour les descripteurs étudiés. Les communautés microbiennes pourraient avoir besoin de plus de temps pour développer une tolérance à ce contaminant. Le périphyton utilisé pour l'expérience serait plus tolérant au cuivre, dû notamment au fait qu'ils se soient développés dans de l'eau contaminée en cuivre, donc exposés plus longtemps que celui exposé à la kasugamycine. Il serait intéressant de refaire une expérience similaire avec des temps d'exposition plus long afin de voir les communautés du périphyton peuvent développer une tolérance à la kasugamycine.

De plus, des comportements différents entre le contrôle et les conditions de sulfate de cuivre ont été observés, notamment, un changement de communautés entre les compositions autotrophes contaminées au sulfate de cuivre et celle du contrôle. Le sulfate de cuivre serait plus toxique que le cuivre présent dans l'eau du robinet, mais ce dernier permettrait quand même aux communautés de développer une résistance au cuivre.

Des prélèvements pour des analyses métabolomiques ont été réalisés durant l'expérience à tous les temps. Ces analyses pourraient permettre de mieux caractériser les effets que les fongicides ont eu sur les communautés microbiennes et de déceler des effets que les descripteurs étudiés jusqu'à présent n'ont pas pu révéler.

7 Liste des références bibliographiques

- Aksakal, Feyza Icoğlu. 2020. « Évaluation de la toxicité du boscalid sur *Daphnia magna* en utilisant les activités enzymatiques antioxydantes, l'expression de gènes liés aux systèmes antioxydants et de détoxification et les paramètres d'histoire de vie ». *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology* 237 (novembre):108830. <https://doi.org/10.1016/j.cbpc.2020.108830>.
- Anses. 2020. « Fongicides SDHI : les travaux de l'Anses ». Anses - Agence nationale de sécurité sanitaire de l'alimentation, de l'environnement et du travail. 21 janvier 2020. <https://www.anses.fr/fr/content/fongicides-sdhi-les-travaux-de-lanses>.
- Anses. 2022. « Cartographie des utilisations des produits phytopharmaceutiques à base de cuivre en France en considérant leur application en agriculture biologique et conventionnelle. », 2022, (saisine 2021-AUTO-0060) Maisons-Alfort : Anses. 133-p
- Artigas, J., N. Pascual, A. Bouchez, J. Chastain, D. Debroas, J. F. Humbert, J. Leloup, R. D. Tadonleke, A. ter Halle, et S. Pesce. 2014. « Comparative sensitivity to the fungicide tebuconazole of biofilm and plankton microbial communities in freshwater ecosystems ». *Science of The Total Environment* 468-469 (janvier):326-36. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2013.08.074>.
- Ayilara, Modupe S., Bartholomew S. Adeleke, Saheed A. Akinola, Chris A. Fayose, Uswat T. Adeyemi, Lanre A. Gbadegesin, Richard K. Omole, Remilekun M. Johnson, Qudus O. Uthman, et Olubukola O. Babalola. 2023. « Biopesticides as a Promising Alternative to Synthetic Pesticides: A Case for Microbial Pesticides, Phytopesticides, and Nanobiopesticides ». *Frontiers in Microbiology* 14 (février). <https://doi.org/10.3389/fmicb.2023.1040901>.
- Battin, Tom J., Katharina Besemer, Mia M. Bengtsson, Anna M. Romani, et Aaron I. Packmann. 2016. « The Ecology and Biogeochemistry of Stream Biofilms ». *Nature Reviews Microbiology* 14 (4): 251-63. <https://doi.org/10.1038/nrmicro.2016.15>.
- Bénit, Paule, Sylvie Bortoli, Dominique Chrétien, Malgorzata Rak, et Pierre Rustin. 2018. « Pathologies liées aux déficits du cycle de Krebs ». *Revue Francophone des Laboratoires*, Cytopathies mitochondriales, 2018 (501): 49-57. [https://doi.org/10.1016/S1773-035X\(18\)30120-5](https://doi.org/10.1016/S1773-035X(18)30120-5).
- Bérard, A., U. Dorigo, J. F. Humbert, C. Leboulanger, et F. Seguin. 2002. « La méthode PICT (Pollution-Induced Community Tolerance) appliquée aux communautés algales : intérêt comme outil de diagnose et d'évaluation du risque écotoxicologique en milieu aquatique ». *Annales de Limnologie - International Journal of Limnology* 38 (3): 247-61. <https://doi.org/10.1051/limn/2002020>.
- Bérard, Annette, et T. Pelte. 1999. « Les herbicides inhibiteurs du photosystème II, effets sur les communautés algales et leur dynamique ». *Revue des sciences de l'eau* 12 (janvier):333. <https://doi.org/10.7202/705355ar>.
- Blanck, Hans, Wangberg, S. A., Molander, et S. 1988. « Pollution-Induced Community Tolerance – A New Ecotoxicological Tool." Functional Testing of Aquatic Biota for Estimating Hazards of Chemicals ». *American Society for Testing and Materials*.
- Bonnineau, Chloé, Joan Artigas, Betty Chaumet, Aymeric Dabrin, Juliette Faburé, Benoît J. D. Ferrari, Jérémie D. Lebrun, et al. 2020. « Role of Biofilms in Contaminant Bioaccumulation and Trophic Transfer in Aquatic Ecosystems: Current State of Knowledge and Future Challenges ». In *Reviews of Environmental Contamination and Toxicology Volume 253*, édité par Pim de Voogt, 253:115-53. *Reviews of Environmental Contamination and Toxicology*. Cham: Springer International Publishing. https://doi.org/10.1007/398_2019_39.
- Brown, Marilyn B., Cristine Marie B. Brown, et Robert A. Nepomuceno. 2016. « Regulatory Requirements and Registration of Biopesticides in the Philippines ». In *Agriculturally Important*

- Microorganisms*, édité par Harikesh Bahadur Singh, Birinchi Kumar Sarma, et Chetan Keswani, 183-95. Singapore: Springer Singapore. https://doi.org/10.1007/978-981-10-2576-1_11.
- Brunetto, Gustavo, Daniel Rosa, Vítor Ambrosini, Janaína Heinzen, Paulo Ferreira, Carlos Ceretta, Claudio Soares, et al. 2019. « Use of phosphorus fertilization and mycorrhization as strategies for reducing copper toxicity in young grapevines ». *Scientia Horticulturae* 248 (janvier):176-83. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2019.01.026>.
- Buettner, G. R. 1993. « The Pecking Order of Free Radicals and Antioxidants: Lipid Peroxidation, Alpha-Tocopherol, and Ascorbate ». *Archives of Biochemistry and Biophysics* 300 (2): 535-43. <https://doi.org/10.1006/abbi.1993.1074>.
- Canada, Santé. 2012. « Projet de décision d'homologation PRD2012-30, Kasugamycine ». Avis;consultations. 27 novembre 2012. <https://www.canada.ca/fr/sante-canada/services/securite-produits-consommation/pesticides-lutte-antiparasitaire/public/consultations/kasugamycine-projet-decision-homologation-prd2012-30-document-consultation-sante-canada.html>.
- Chróst, Ryszard J. 1990. « Microbial Ectoenzymes in Aquatic Environments ». In *Aquatic Microbial Ecology*, édité par Jürgen Overbeck et Ryszard J. Chróst, 47-78. Brock/Springer Series in Contemporary Bioscience. New York, NY: Springer New York. https://doi.org/10.1007/978-1-4612-3382-4_3.
- Commission Européenne. 2021. « Règlement d'exécution (UE) 2021/1165 de la commission », 2021. <https://eur-lex.europa.eu/legal-content/FR/TXT/PDF/?uri=CELEX:32021R1165>.
- Commission, Européenne. 2022. « Pesticides - European Commission ». octobre 2022. https://food.ec.europa.eu/plants/pesticides_en.
- Desmyttere, Hélène, Caroline Deweer, Jérôme Muchembled, Karin Sahmer, Justine Jacquin, François Coutte, et Philippe Jacques. 2019. « Antifungal Activities of Bacillus Subtilis Lipopeptides to Two Venturia Inaequalis Strains Possessing Different Tebuconazole Sensitivity ». *Frontiers in Microbiology* 10 (octobre). <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.02327>.
- Direction Régionale, de l'Alimentation, de l'Agriculture et de la Forêt Nouvelle-Aquitaine. 2019. « Agreste, la statistique agricole ». 2019. https://draaf.nouvelle-aquitaine.agriculture.gouv.fr/IMG/pdf/AgresteNA_AR_64_201903phytoviti_cle4951bc.pdf.
- Djeukam, C. L., G. Theriault, P. Michael, et K. K. Nkongolo. 2016. « Analysis of Gene Expression Associated with Copper Toxicity in White Birch (*Betula Papyrifera*) Populations from a Mining Region ». *Biotechnology Journal International*, août, 1-10. <https://doi.org/10.9734/BBJ/2016/28425>.
- EauFrance, et INERIS. 2022. « La pollution des eaux superficielles et souterraines en France - Synthèse des connaissances en 2022 ». Données et études statistiques pour le changement climatique, l'énergie, l'environnement, le logement, et les transports. 2022. <https://www.statistiques.developpement-durable.gouv.fr/la-pollution-des-eaux-superficielles-et-souterraines-en-france-synthese-des-connaissances-en-2022>.
- ECHA. s. d. « Substance Information ». Consulté le 23 juin 2024. <https://echa.europa.eu/fr/substance-information/-/substanceinfo/100.115.343>.
- El Azzi, D., J. Viers, M. Guiresse, A. Probst, D. Aubert, J. Caparros, F. Charles, K. Guizien, et J.L. Probst. 2013. « Origin and Fate of Copper in a Small Mediterranean Vineyard Catchment: New Insights from Combined Chemical Extraction and $\delta^{65}\text{Cu}$ Isotopic Composition ». *Science of The Total Environment* 463-464 (octobre):91-101. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2013.05.058>.

- Notre-environnement, Gouvernement notre-. 2023. « Comment mesurer la toxicité des mélanges de polluants dans l'eau ? » notre-environnement. 28 juin 2023. <https://www.notre-environnement.gouv.fr/>.
- Notre-environnement. 2024. « Les pesticides dans les eaux souterraines ». notre-environnement. 2024. <https://www.notre-environnement.gouv.fr/>.
- Flemming, Hans-Curt, et Jost Wingender. 2010. « The Biofilm Matrix ». *Nature Reviews Microbiology* 8 (9): 623-33. <https://doi.org/10.1038/nrmicro2415>.
- Foster, Patricia L. 1982. « Metal Resistances of Chlorophyta from Rivers Polluted by Heavy Metals ». *Freshwater Biology* 12 (1): 41-61. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2427.1982.tb00602.x>.
- Gaetke, Lisa M., et Ching Kuang Chow. 2003. « Copper toxicity, oxidative stress, and antioxidant nutrients ». *Toxicology, Environmental and Nutritional Interactions Antioxidant Nutrients and Environmental Health, Part C*, 189 (1): 147-63. [https://doi.org/10.1016/S0300-483X\(03\)00159-8](https://doi.org/10.1016/S0300-483X(03)00159-8).
- Geiger, G., M. P. Livingston, F. Funk, et R. Schulin. 1998. « β -Glucosidase Activity in the Presence of Copper and Goethite ». *European Journal of Soil Science* 49 (1): 17-23. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2389.1998.00135.x>.
- Genter, R. B., D. S. Cherry, E. P. Smith, et J. Cairns. 1987. « Algal-Periphyton Population and Community Changes from Zinc Stress in Stream Mesocosms ». *Hydrobiologia* 153 (3): 261-75. <https://doi.org/10.1007/BF00007213>.
- Guasch, Helena, Joan Artigas, Berta Bonet, Chloe Bonnineau, Oriol Canals, Natàlia Corcoll, Arnaud Foulquier, et al. 2016. « The Use of Biofilms to Assess the Effects of Chemicals on Freshwater Ecosystems ». In *Aquatic Biofilms: Ecology, Water Quality and Wastewater Treatment*, 125-44. Caister Academic Press. <https://doi.org/10.21775/9781910190173.07>.
- Guasch, Helena, Berta Bonet, Chloé Bonnineau, et Laura Barral. 2017. « Microbial Biomarkers ». In *Microbial Ecotoxicology*, édité par Cristiana Cravo-Laureau, Christine Cagnon, Béatrice Lauga, et Robert Duran, 251-81. Cham: Springer International Publishing. https://doi.org/10.1007/978-3-319-61795-4_11.
- Hersh, Charles M., et William G. Crumpton. 1989. « Atrazine Tolerance of Algae Isolated from Two Agricultural Streams ». *Environmental Toxicology and Chemistry* 8 (4): 327-32. <https://doi.org/10.1002/etc.5620080409>.
- Huang, Chi-Yu, Chih-Hung Ho, Chien-Ju LIN, et Chi-Chu Lo. 2010. « Exposure effect of fungicide kasugamycin on bacterial community in natural river sediment ». *Journal of Environmental Science and Health, Part B* 45 (5): 485-91. <https://doi.org/10.1080/03601231003800412>.
- Ishiyama, T., I. Hara, M. Matsuoka, K. Sato, S. Shimada, R. Izawa, T. Hashimoto, et al. 1965. « STUDIES ON THE PREVENTIVE EFFECT OF KASUGAMYCIN ON RICE BLAST ». *The Journal of Antibiotics* 18 (mai):115-19.
- Kasai, F., N. Takamura, et S. Hatakeyama. 1993. « Effects of Simetryne on Growth of Various Freshwater Algal Taxa ». *Environmental Pollution (Barking, Essex: 1987)* 79 (1): 77-83. [https://doi.org/10.1016/0269-7491\(93\)90180-v](https://doi.org/10.1016/0269-7491(93)90180-v).
- Kim Tiam, Sandra, Soizic Morin, Berta Bonet, Helena Guasch, Agnès Feurtet-Mazel, Mélissa Eon, Patrice Gonzalez, et Nicolas Mazzella. 2015. « Is the Toxicity of Pesticide Mixtures on River Biofilm Accounted for Solely by the Major Compounds Identified? » *Environmental Science and Pollution Research* 22 (6): 4009-24. <https://doi.org/10.1007/s11356-014-3373-y>.

- Kotra, L. P., J. Haddad, et S. Mobashery. 2000. « Aminoglycosides: Perspectives on Mechanisms of Action and Resistance and Strategies to Counter Resistance ». *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 44 (12): 3249-56. <https://doi.org/10.1128/AAC.44.12.3249-3256.2000>.
- Krause, Kevin M., Alisa W. Serio, Timothy R. Kane, et Lynn E. Connolly. 2016. « Aminoglycosides: An Overview ». *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine* 6 (6): a027029. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a027029>.
- Laderriere, Vincent, Séverine Le Faucheur, et Claude Fortin. 2021. « Exploring the Role of Water Chemistry on Metal Accumulation in Biofilms from Streams in Mining Areas ». *Science of The Total Environment* 784 (août):146986. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2021.146986>.
- Lambert, Anne Sophie, Aymeric Dabrin, Arnaud Foulquier, Soizic Morin, Christophe Rosy, Marina Coquery, et Stéphane Pesce. 2017. « Influence of temperature in pollution-induced community tolerance approaches used to assess effects of copper on freshwater phototrophic periphyton ». *Science of The Total Environment* 607-608 (décembre):1018-25. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2017.07.035>.
- Lambert, Anne Sophie, Aymeric Dabrin, Soizic Morin, Josiane Gahou, Arnaud Foulquier, Marina Coquery, et Stéphane Pesce. 2016. « Temperature modulates phototrophic periphyton response to chronic copper exposure ». *Environmental Pollution* 208 (janvier):821-29. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2015.11.004>.
- Leland, Harry V., et James L. Carter. 1984. « Effects of Copper on Species Composition of Periphyton in a Sierra Nevada, California, Stream ». *Freshwater Biology* 14 (3): 281-96. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2427.1984.tb00041.x>.
- Loez, C. R., M. L. Topalián, et A. Salibián. 1995. « Effects of Zinc on the Structure and Growth Dynamics of a Natural Freshwater Phytoplankton Assemblage Reared in the Laboratory ». *Environmental Pollution (Barking, Essex: 1987)* 88 (3): 275-81. [https://doi.org/10.1016/0269-7491\(95\)93440-b](https://doi.org/10.1016/0269-7491(95)93440-b).
- Lu, Tao, Qi Zhang, Michel Lavoie, Youchao Zhu, Yizhi Ye, Jun Yang, Hans W. Paerl, Haifeng Qian, et Yong-Guan Zhu. 2019. « The fungicide azoxystrobin promotes freshwater cyanobacterial dominance through altering competition ». *Microbiome* 7 (1): 128. <https://doi.org/10.1186/s40168-019-0744-0>.
- Mahler, Barbara J., Travis S. Schmidt, Lisa H. Nowell, Sharon L. Qi, Peter C. Van Metre, Michelle L. Hladik, Daren M. Carlisle, Mark D. Munn, et Jason May. 2020. « Biofilms Provide New Insight into Pesticide Occurrence in Streams and Links to Aquatic Ecological Communities ». *Environmental Science & Technology* 54 (9): 5509-19. <https://doi.org/10.1021/acs.est.9b07430>.
- Marques, D. M., A. B. da Silva, J. R. Mantovani, P. C. Magalhães, et T. C. de Souza. 2019. « Root morphology and leaf gas exchange in *Peltophorum dubium* (Spreng.) Taub. (Caesalpinioideae) exposed to copper-induced toxicity ». *South African Journal of Botany* 121 (mars):186-92. <https://doi.org/10.1016/j.sajb.2018.11.007>.
- Matsui, Mikiko, Jonathan H. Fowler, et Linda L. Walling. 2006. « Leucine Aminopeptidases: Diversity in Structure and Function ». *Biological Chemistry* 387 (12): 1535-44. <https://doi.org/10.1515/BC.2006.191>.
- Ministère. s. d. « Questions / réponses : l'utilisation du cuivre en agriculture ». Ministère de l'Agriculture et de la Souveraineté alimentaire. Consulté le 25 juin 2024. <https://agriculture.gouv.fr/questions-reponses-lutilisation-du-cuivre-en-agriculture>.
- Ministère, de la Transition Ecologique et de la Cohésion des Territoire. 2022. « Publication des données provisoires des ventes de produits phytopharmaceutiques en 2021 | Ministère de la Transition

- écologique et de la Cohésion des territoires ». 2022. <https://www.ecologie.gouv.fr/actualites/publication-donnees-provisoires-ventes-produits-phytopharmaceutiques-2021>.
- Ministère de l'Agriculture et de la Souveraineté alimentaire. 2020. « Indicateurs des ventes de produits phytopharmaceutiques ». Ministère de l'Agriculture et de la Souveraineté alimentaire. 2020. <https://agriculture.gouv.fr/indicateurs-des-ventes-de-produits-phytopharmaceutiques>.
- Ministère de l'Agriculture et de la Souveraineté alimentaire. 2022. « Le plan Écophyto, qu'est-ce que c'est ? » Ministère de l'Agriculture et de la Souveraineté alimentaire. 2022. <https://agriculture.gouv.fr/le-plan-ecophyto-quest-ce-que-cest>.
- Ministère de l'Agriculture et de la Souveraineté alimentaire. 2024. « Planification écologique et agriculture : le Gouvernement publie la stratégie Écophyto 2030 ». Ministère de l'Agriculture et de la Souveraineté alimentaire. 2024. <https://agriculture.gouv.fr/planification-ecologique-et-agriculture-le-gouvernement-publie-la-strategie-ecophyto-2030>.
- Ministère Japonais. « Informations sur la kasugamycine ». Consulté le 24 juin 2024. <https://www.maff.go.jp/result.html?cx=015840603635610229114%3Ad5nyfxhiq78&ie=UTF-8&q=kasugamycin&sa=Search&siteurl=www.maff.go.jp%2Fe%2F&ref=&ss=4003j2075925j11#gsc.tab=0&gsc.q=kasugamycin&gsc.page=1>.
- Montuelle, B., U. Dorigo, A. Bérard, B. Volat, A. Bouchez, A. Tlili, V. Gouy, et S. Pesce. 2010. « The Periphyton as a Multimetric Bioindicator for Assessing the Impact of Land Use on Rivers: An Overview of the Ardières-Morcille Experimental Watershed (France) ». *Hydrobiologia* 657 (1): 123-41. <https://doi.org/10.1007/s10750-010-0105-2>.
- Morin, Soizic, et Joan Artigas. 2023. « Twenty Years of Research in Ecosystem Functions in Aquatic Microbial Ecotoxicology ». *Environmental Toxicology and Chemistry* 42 (9): 1867-88. <https://doi.org/10.1002/etc.5708>.
- Nor, Yahya M. 1987. « Ecotoxicity of copper to aquatic biota: A review ». *Environmental Research* 43 (1): 274-82. [https://doi.org/10.1016/S0013-9351\(87\)80078-6](https://doi.org/10.1016/S0013-9351(87)80078-6).
- Olivier, Arthur. 2024. « Qu'est-ce que le Pacte vert pour l'Europe ? » Touteurope.eu. 3 juin 2024. <https://www.touteurope.eu/economie-et-social/qu-est-ce-que-le-pacte-vert-pour-l-europe/>.
- Oyedotun, Kayode S., et Bernard D. Lemire. 2004. « The Quaternary Structure of the Saccharomyces Cerevisiae Succinate Dehydrogenase: HOMOLOGUE MODELING, COFACTOR DOCKING, AND MOLECULAR DYNAMICS SIMULATION STUDIES * ». *Journal of Biological Chemistry* 279 (10): 9424-31. <https://doi.org/10.1074/jbc.M311876200>.
- Pesce, Stéphane, Sophie Lissalde, Delphine Lavieille, Christelle Margoum, Nicolas Mazzella, Vincent Roubeix, et Bernard Montuelle. 2010. « Evaluation of single and joint toxic effects of diuron and its main metabolites on natural phototrophic biofilms using a pollution-induced community tolerance (PICT) approach ». *Aquatic Toxicology* 99 (4): 492-99. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2010.06.006>.
- Pino-Otín, M Rosa, Diego Ballesteros, Enrique Navarro, Azucena González-Coloma, Jonatan Val, et Ana M. Mainar. 2019. « Ecotoxicity of a novel biopesticide from Artemisia absinthium on non-target aquatic organisms ». *Chemosphere* 216 (février):131-46. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2018.09.071>.
- Puig, Sergi, Nuria Andrés-Colás, Antoni García-Molina, et Lola Peñarrubia. 2007. « Copper and Iron Homeostasis in Arabidopsis: Responses to Metal Deficiencies, Interactions and Biotechnological Applications ». *Plant, Cell & Environment* 30 (3): 271-90. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3040.2007.01642.x>.

- Qian, Le, Suzhen Qi, Fangjie Cao, Jie Zhang, Feng Zhao, Changping Li, et Chengju Wang. 2018. « Toxic effects of boscalid on the growth, photosynthesis, antioxidant system and metabolism of *Chlorella vulgaris* ». *Environmental Pollution* 242 (novembre):171-81. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2018.06.055>.
- Reilly, Timothy J., Kelly L. Smalling, James L. Orlando, et Kathryn M. Kuivila. 2012. « Occurrence of boscalid and other selected fungicides in surface water and groundwater in three targeted use areas in the United States ». *Chemosphere* 89 (3): 228-34. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2012.04.023>.
- Rheinheimer Dos Santos, Danilo, José Augusto Monteiro De Castro Lima, Jocelina Paranhos Rosa De Vargas, Marilia Camotti Bastos, Maria Alice Santanna Dos Santos, Leslie Mondamert, et Jérôme Labanowski. 2020. « Pesticide Bioaccumulation in Epilithic Biofilms as a Biomarker of Agricultural Activities in a Representative Watershed ». *Environmental Monitoring and Assessment* 192 (6): 381. <https://doi.org/10.1007/s10661-020-08264-8>.
- Ritz, Christian, Florent Baty, Jens C. Streibig, et Daniel Gerhard. 2015. « Dose-Response Analysis Using R ». *PLOS ONE* 10 (12): e0146021. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0146021>.
- Roeselers, G., M. C. M. van Loosdrecht, et G. Muyzer. 2008. « Phototrophic Biofilms and Their Potential Applications ». *Journal of Applied Phycology* 20 (3): 227-35. <https://doi.org/10.1007/s10811-007-9223-2>.
- Romaní, Anna M., Katharina Fund, Joan Artigas, Thomas Schwartz, Sergi Sabater, et Ursula Obst. 2008. « Relevance of Polymeric Matrix Enzymes During Biofilm Formation ». *Microbial Ecology* 56 (3): 427-36. <https://doi.org/10.1007/s00248-007-9361-8>.
- Sabater, Sergi, H. Guasch, I. Muñoz, et A. Romaní. 2006. « Hydrology, Light and the Use of Organic and Inorganic Materials as Structuring Factors of Biological Communities in Mediterranean Streams ». *Limnetica* 25 (1): 335-48. <https://doi.org/10.23818/limn.25.23>.
- Saikia, Surjya K. 2011. « Review on Periphyton as Mediator of Nutrient Transfer in Aquatic Ecosystems ». *Ecologia Balkanica* 3 (décembre):65-78.
- Sauer, Karin, Paul Stoodley, Darla M. Goeres, Luanne Hall-Stoodley, Mette Burmølle, Philip S. Stewart, et Thomas Bjarnsholt. 2022. « The Biofilm Life Cycle: Expanding the Conceptual Model of Biofilm Formation ». *Nature Reviews Microbiology* 20 (10): 608-20. <https://doi.org/10.1038/s41579-022-00767-0>.
- Soldo, Diana, et Renata Behra. 2000. « Long-Term Effects of Copper on the Structure of Freshwater Periphyton Communities and Their Tolerance to Copper, Zinc, Nickel and Silver ». *Aquatic Toxicology* 47 (3): 181-89. [https://doi.org/10.1016/S0166-445X\(99\)00020-X](https://doi.org/10.1016/S0166-445X(99)00020-X).
- Soliz, Marc. 2018. « Copper Toxicity ». In *Copper and Bacteria: Evolution, Homeostasis and Toxicity*, édité par Marc Soliz, 11-19. Cham: Springer International Publishing. https://doi.org/10.1007/978-3-319-94439-5_2.
- Su, Hongfei, Zhenlun Xiao, Kefu Yu, Qi Zhang, Chunrong Lu, Guanghua Wang, Yinghui Wang, et al. 2021. « High Diversity of β -Glucosidase-Producing Bacteria and Their Genes Associated with Scleractinian Corals ». *International Journal of Molecular Sciences* 22 (7): 3523. <https://doi.org/10.3390/ijms22073523>.
- Takamura, Noriko, Fumie Kasai, et Makoto M. Watanabe. 1989. « Effects of Cu, Cd and Zn on Photosynthesis of Freshwater Benthic Algae ». *Journal of Applied Phycology* 1 (1): 39-52. <https://doi.org/10.1007/BF00003534>.
- Thompson, Terrence P. et World Health Organization, éd. 2007. *Chemical safety of drinking-water: assessing priorities for risk assessment*. Geneva: World Health Organization.

- Trentin, Edicarla, Daniela Basso Facco, Rodrigo Knevez Hammerschmitt, Paulo Ademar Avelar Ferreira, Letícia Morsch, Simoni Weide Belles, Felipe Klein Ricachenevsky, et al. 2019. « Potential of Vermicompost and Limestone in Reducing Copper Toxicity in Young Grapevines Grown in Cu-Contaminated Vineyard Soil ». *Chemosphere* 226 (juillet):421-30. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2019.03.141>.
- Union, Européenne. 2022. « Règles de l'Union Européenne Relatives à La Production Biologique et à l'étiquetage Des Produits Biologiques (à Compter de 2022) | EUR-Lex ». 2022. <https://eur-lex.europa.eu/FR/legal-content/summary/eu-rules-on-producing-and-labelling-organic-products-from-2022.html>.
- Wang, Yan, Yujie Jin, Ping Han, Jianjun Hao, Hongyu Pan, et Jinliang Liu. 2021. « Impact of Soil Disinfestation on Fungal and Bacterial Communities in Soil With Cucumber Cultivation ». *Frontiers in Microbiology* 12 (août):685111. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2021.685111>.
- Wetzel, Robert G., éd. 1983. *Periphyton of Freshwater Ecosystems: Proceedings of the First International Workshop on Periphyton of Freshwater Ecosystems Held in Växjö, Sweden, 14–17 September 1982*. Dordrecht: Springer Netherlands. <https://doi.org/10.1007/978-94-009-7293-3>.
- Wickham, Hadley. 2016. *Ggplot2: Elegant Graphics for Data Analysis*. Second edition. Use R! Switzerland: Springer. <https://doi.org/10.1007/978-3-319-24277-4>.
- Wyszkowska, J., M. Kucharski, et J. Kucharski. 2010. « Activity of Beta-Glucosidase, Arylsulfatase and Phosphatases in Soil Contaminated with Copper ». *Journal of Elementology* 15 (1): 213-26.
- Xiong, Dan, Yajin Li, Yanmei Xiong, Xiaobing Li, Yu Xiao, Zhaohai Qin, et Yumei Xiao. 2014. « Influence of boscalid on the activities of soil enzymes and soil respiration ». *European Journal of Soil Biology* 61 (mars):1-5. <https://doi.org/10.1016/j.ejsobi.2013.12.006>.
- Yalcin, Yavuz S., Busra N. Aydin, Mst Sayadujhara, et Viji Sittther. 2022. « Antibiotic-Induced Changes in Pigment Accumulation, Photosystem II, and Membrane Permeability in a Model Cyanobacterium ». *Frontiers in Microbiology* 13 (juin). <https://doi.org/10.3389/fmicb.2022.930357>.
- Ylla, Irene, Carles Borrego, Anna M. Romani, et Sergi Sabater. 2009. « Availability of glucose and light modulates the structure and function of a microbial biofilm ». *FEMS Microbiology Ecology* 69 (1): 27-42. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6941.2009.00689.x>.
- Yruela, Inmaculada. 2009. « Copper in Plants: Acquisition, Transport and Interactions ». *Functional Plant Biology* 36 (5): 409-30. <https://doi.org/10.1071/FP08288>.

8 Annexes :

8.1 Annexe 1 : Gammes des tests de toxicité aiguë

Les mêmes concentrations ont été utilisées pour les activités des enzymes β -glucosidase, phosphatase et Leucine-aminopeptidase. Leur gamme est nommée : activités enzymatiques.

Tableau 8: Gamme de concentrations du boscalide (mg/L) utilisée pour les tests de toxicité aiguë

Gamme de concentrations du boscalide (mg/L)	<i>C0</i>	<i>C1</i>	<i>C2</i>	<i>C3</i>	<i>C4</i>	<i>C5</i>	<i>C6</i>	<i>C7</i>
<i>Rendement photosynthétique</i>	0	0,228	0,057	0,143	0,357	0,890	2,23	5,57
<i>Activité de l'enzyme estérase</i>	0	0,0190	0,0480	0,119	0,297	0,740	1,86	4,64
<i>Test de viabilité cellulaire basé sur la résazurine</i>	0	0,0110	0,0290	0,0710	0,180	0,450	1,11	2,79
<i>Activités enzymatiques</i>	0	0,00630	0,0160	0,0400	0,0990	0,250	0,620	1,55

Tableau 9: Gamme de concentrations de la fengycine (mg/L) utilisée pour les tests de toxicité aiguë

Gamme de concentrations de la fengycine (mg/L)	<i>C0</i>	<i>C1</i>	<i>C2</i>	<i>C3</i>	<i>C4</i>	<i>C5</i>	<i>C6</i>	<i>C7</i>
<i>Rendement photosynthétique</i>	0	17,4	34,7	69,4	139	278	556	1110
<i>Activité de l'enzyme estérase</i>	0	14,5	28,9	57,9	116	231	463	926
<i>Activités enzymatiques</i>	0	4,82	9,65	19,3	38,6	77,2	154	309

Tableau 10: Gamme de concentrations de l'azoxystrobin (mg/L) utilisée pour les tests de toxicité aiguë

Gamme de concentrations de l'azoxystrobin (mg/L)	<i>C0</i>	<i>C1</i>	<i>C2</i>	<i>C3</i>	<i>C4</i>	<i>C5</i>	<i>C6</i>	<i>C7</i>
<i>Rendement photosynthétique</i>	0	0,00690	0,0210	0,0620	0,185	0,560	1,67	5,00
<i>Activité de l'enzyme estérase</i>	0	0,00570	0,0170	0,0510	0,154	0,460	1,39	4,17
<i>Test de viabilité cellulaire basé sur la résazurine</i>	0	0,00340	0,0103	0,0309	0,0930	0,278	0,833	2,50
<i>Activités enzymatiques</i>	0	0,00190	0,00600	0,0170	0,0510	0,150	0,460	1,39

Tableau 11: Gamme de concentrations de la surfactine (mg/L) utilisée pour les tests de toxicité aiguë

Gamme de concentrations de surfactine (mg/L)	<i>C0</i>	<i>C1</i>	<i>C2</i>	<i>C3</i>	<i>C4</i>	<i>C5</i>	<i>C6</i>	<i>C7</i>
<i>Rendement photosynthétique</i>	0	4,39	6,58	9,88	14,8	22,2	33,3	50,0
<i>Activité de l'enzyme estérase</i>	0	3,66	5,49	8,23	12,4	18,5	27,8	41,7
<i>Test de viabilité cellulaire basé sur la résazurine</i>	0	2,19	3,29	4,94	7,41	11,1	16,7	25,0
<i>Activités enzymatiques</i>	0	1,22	1,83	2,74	4,12	6,17	9,26	13,9

Tableau 12: Gamme de concentrations du sulfate de cuivre (mg/L de Cu) utilisée pour les tests de toxicité aiguë

Gamme de concentrations de sulfate de cuivre (mg/L de Cu)	<i>C0</i>	<i>C1</i>	<i>C2</i>	<i>C3</i>	<i>C4</i>	<i>C5</i>	<i>C6</i>	<i>C7</i>
<i>Rendement photosynthétique</i>	0	15,6	31,3	62,5	125	250	500	1000
<i>Activités enzymatiques</i>	0	4,34	8,68	17,4	34,7	69,4	139	278

Tableau 13: Gamme de concentrations de laminarin (mg/L) utilisée pour les tests de toxicité aiguë

Gamme de concentrations de laminarin (mg/L)	<i>C0</i>	<i>C1</i>	<i>C2</i>	<i>C3</i>	<i>C4</i>	<i>C5</i>	<i>C6</i>	<i>C7</i>
<i>Rendement photosynthétique</i>	0	62,5	125	250	500	1000	2000	4000
<i>Activité de l'enzyme estérase</i>	0	52,1	104	208	417	833	1670	3333
<i>Test de viabilité cellulaire basé sur la résazurine</i>	0	31,3	62,5	125	250	500	1000	2000
<i>Activités enzymatiques</i>	0	17,4	34,7	69,4	139	278	556	1110

Tableau 14: Gamme de concentrations de kasugamycine (mg/L) utilisée pour les tests de toxicité aiguë

Gamme de concentrations de Kasugamycine (mg/L)	<i>C0</i>	<i>C1</i>	<i>C2</i>	<i>C3</i>	<i>C4</i>	<i>C5</i>	<i>C6</i>	<i>C7</i>
<i>Rendement photosynthétique</i>	0	104	208	417	833	1670	3333	6670
<i>Activité de l'enzyme estérase</i>	0	86,8	174	347	694	1390	2780	5560
<i>Test de viabilité cellulaire basé sur la résazurine</i>	0	52,1	104	208	417	933	1670	3330
<i>Activités enzymatiques</i>	0	28,9	57,9	116	232	463	926	1850

Tableau 15: Gamme de concentrations de tébuconazole (mg/L) utilisée pour les tests de toxicité aiguë

Gamme de concentrations de Tébuconazole (mg/L)	<i>C0</i>	<i>C1</i>	<i>C2</i>	<i>C3</i>	<i>C4</i>	<i>C5</i>	<i>C6</i>	<i>C7</i>
<i>Rendement photosynthétique</i>	0	0,0685	0,206	0,617	1,85	5,55	16,7	50,0
<i>Activité de l'enzyme estérase</i>	0	0,0571	0,171	0,514	1,54	4,63	13,9	41,6
<i>Test de viabilité cellulaire basé sur la résazurine</i>	0	0,0343	0,103	0,308	0,925	2,78	8,33	25,0
<i>Activités enzymatiques</i>	0	0,0190	0,0570	0,171	0,514	1,54	4,63	13,9

8.2 Annexe 2 : Tests de toxicité aiguë

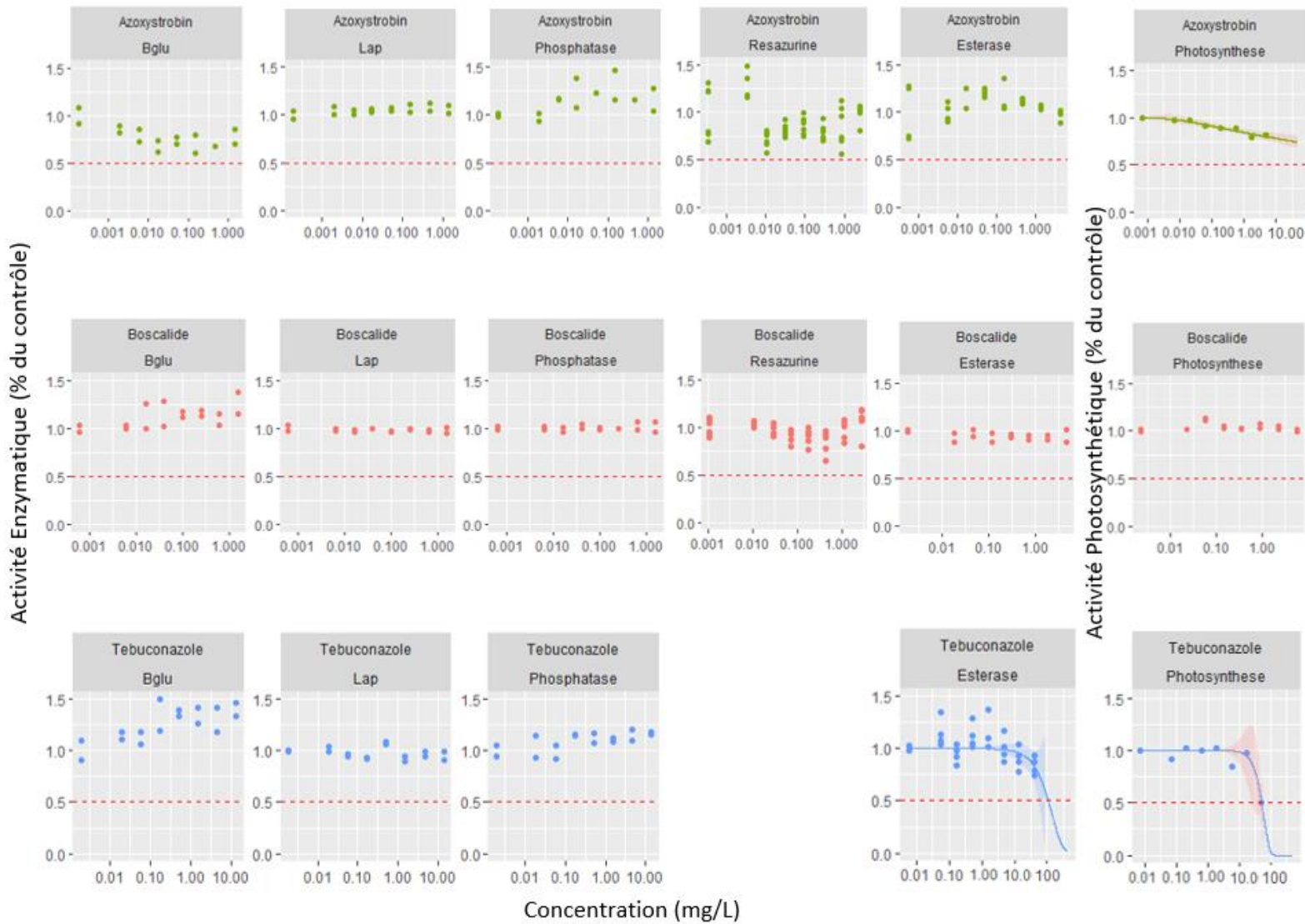


Figure 24: Tests de toxicité aiguë réalisés sur les fongicides de synthèse ; boscalide, azoxystrobin et tébuconazole. Les points représentent les valeurs mesurées, les courbes sont tracées à partir des modèles et les zones ombragées représentent les intervalles de confiance à 95%. La droite en pointillée rouge représente la valeur de CE50.

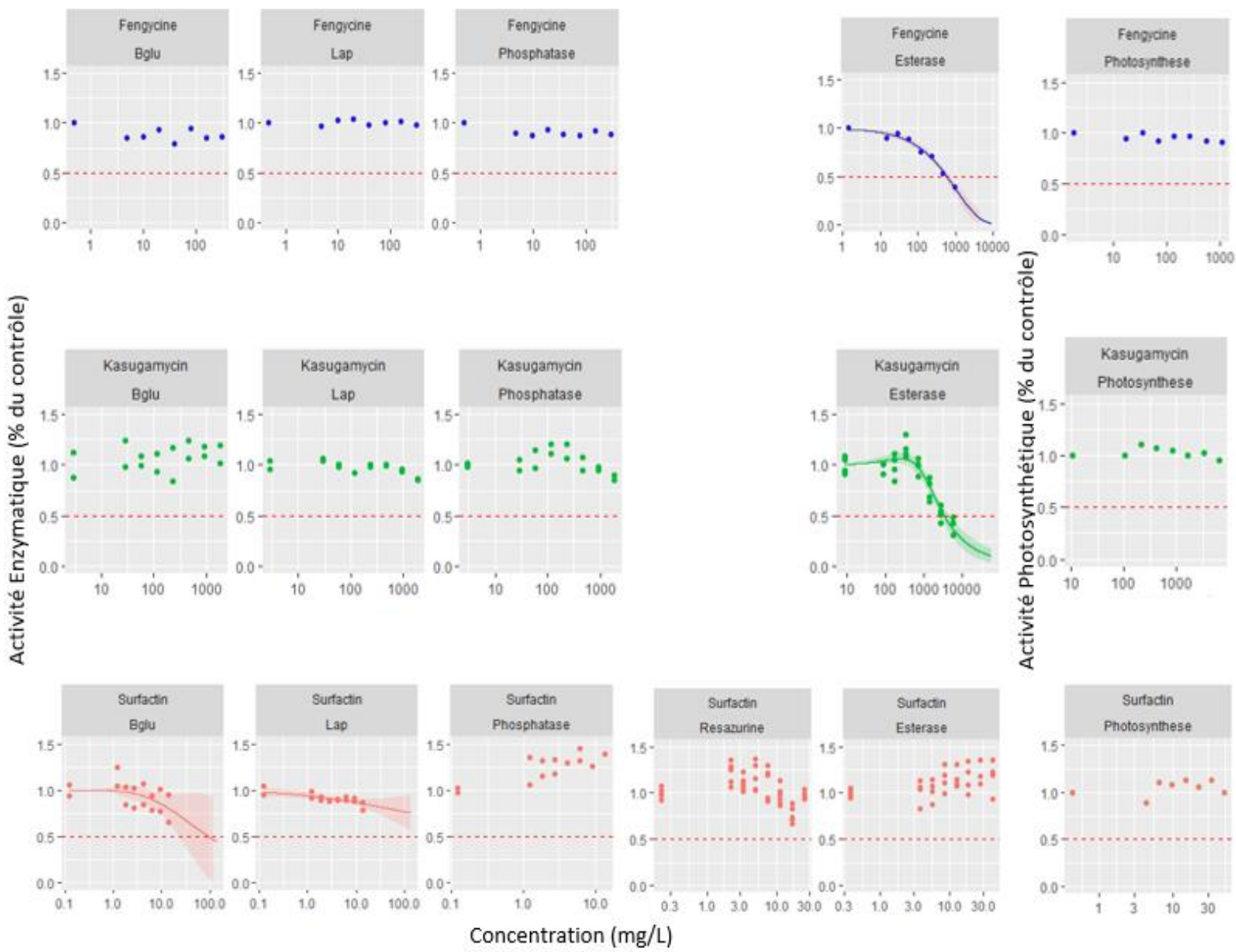


Figure 25 : Tests de toxicité aiguë réalisée sur les fongicides (non autorisée dans l'UE); fengycine, kasugamycine et surfactine. Les points représentent les valeurs mesurées, les courbes sont tracées à partir des modèles et les zones ombragées représentent les intervalles de confiance à 95%. La droite en pointillée rouge représente la valeur de CE50.

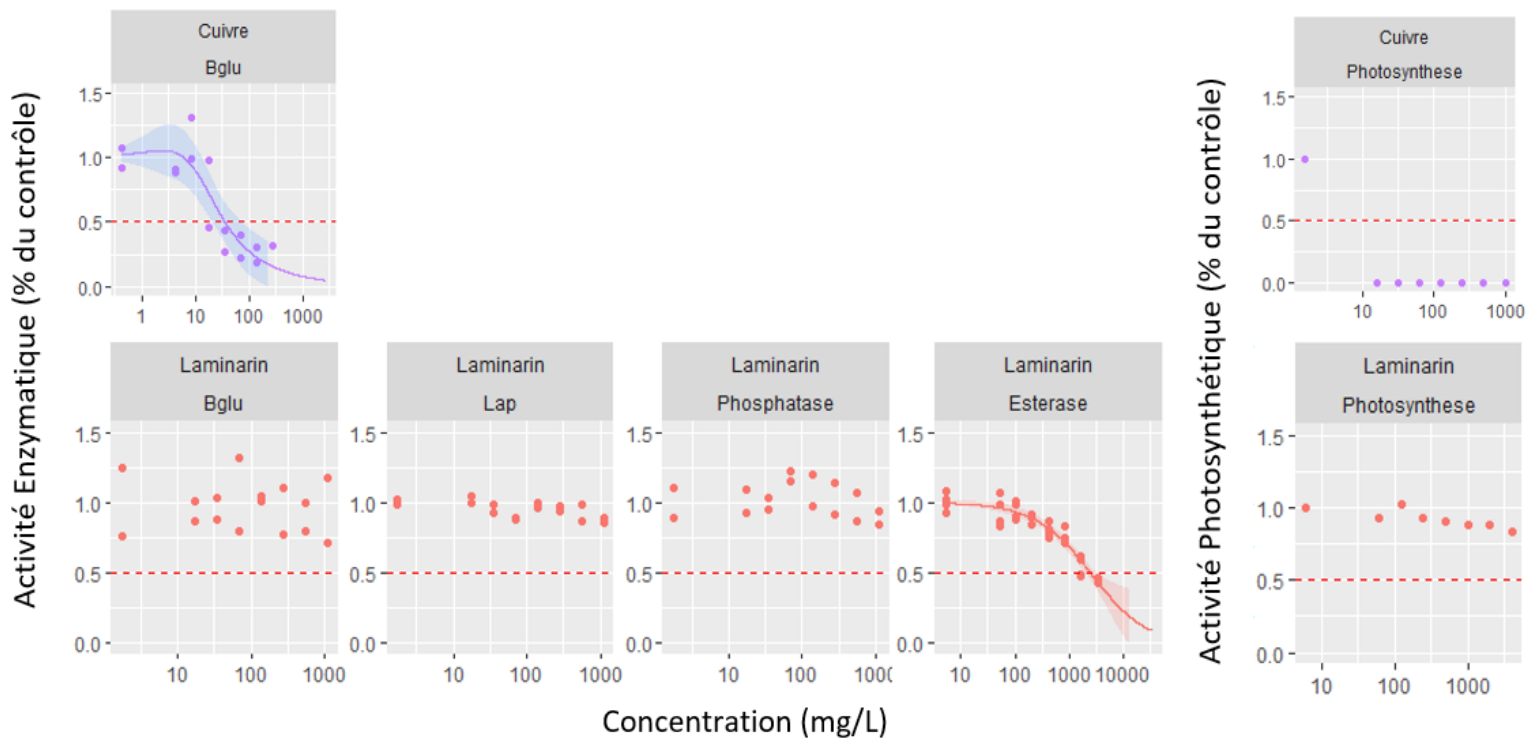


Figure 26 : Tests de toxicité aiguë réalisée sur les biofongicides; sulfate de cuivre et laminarin. Les points représentent les valeurs mesurées, les courbes sont tracées à partir des modèles et les zones ombragées représentent les intervalles de confiance à 95%. La droite en pointillée rouge représente la valeur de CE50.

8.3 Gradients utilisés pour analyser les contaminants organiques

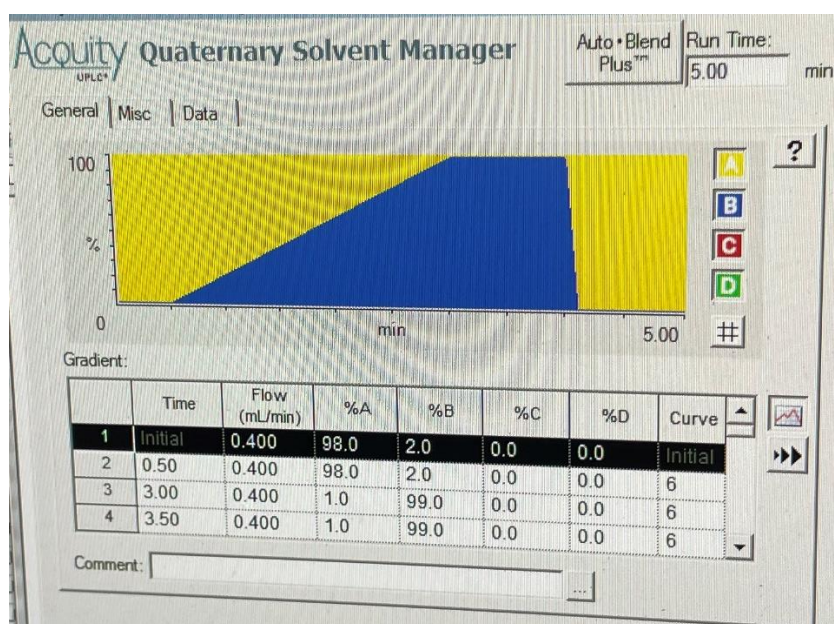


Figure 27: Gradient utilisé pour doser le boscalide dans les échantillons. Le composé A est une solution aqueuse contenant 0,1 % (v/v) d'acide formique (H_2CO_2). Le composé B est une solution d'acétonitrile avec 0,1 % (v/v) d'acide formique (H_2CO_2).

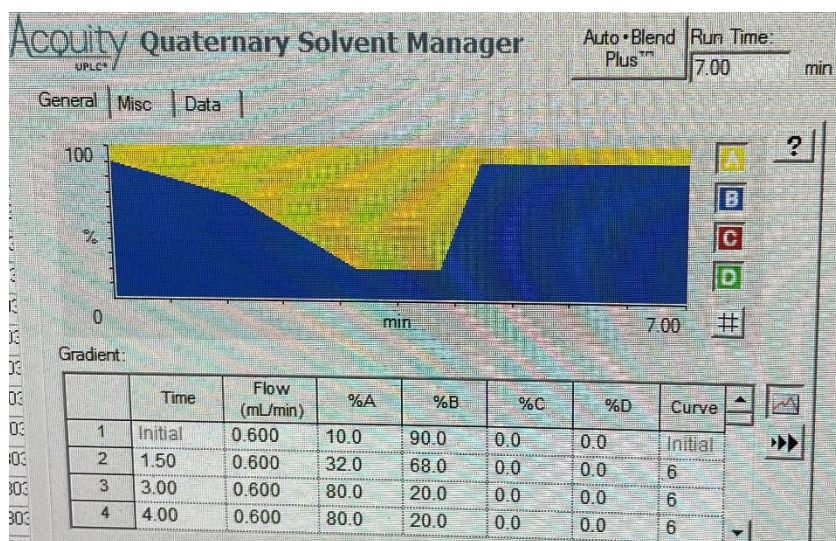


Figure 28: Gradient utilisé pour doser la kasugamycine dans les échantillons. Le composé A est une solution aqueuse de formate d'ammonium (NH_4HCO_2 à 20 mM) et de 0,3 % (v/v) d'acide formique (H_2CO_2). Le composé B est une solution d'acétonitrile.

8.4 Annexe 3 : Approche PICT – Tests de toxicité aiguë

8.4.1 Approche PICT – Estérase et kasugamycine

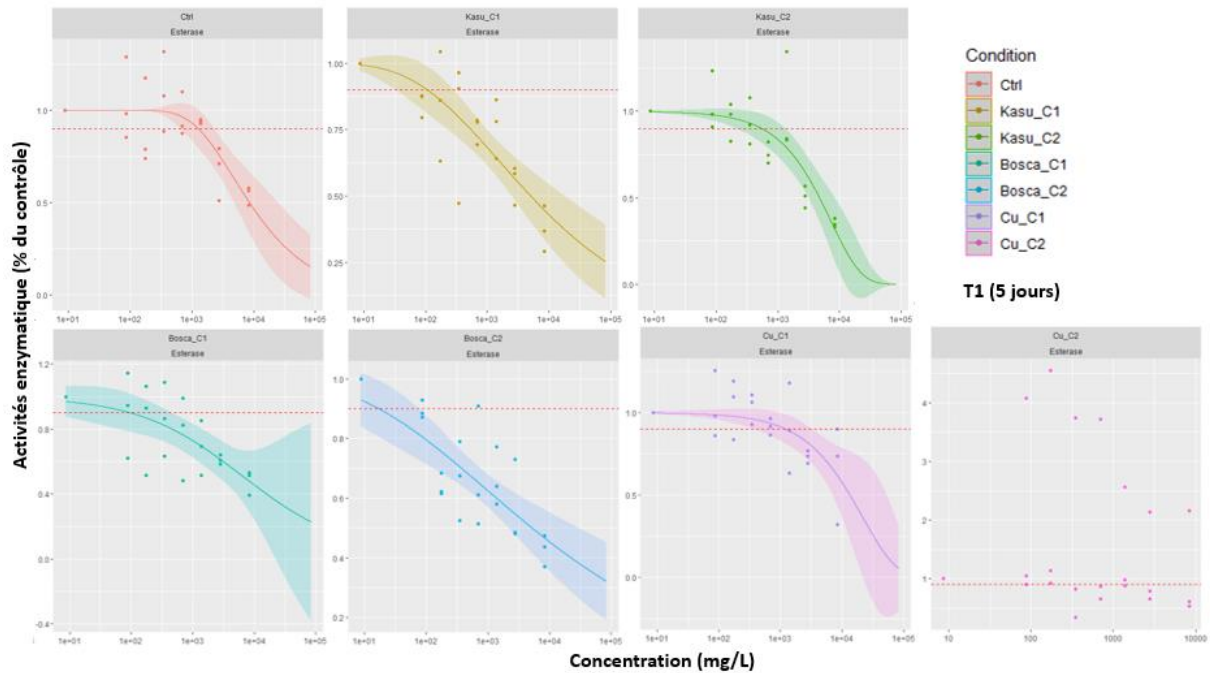


Figure 29: Tests de toxicité aiguë de la kasugamycine réalisés sur l'activité de l'enzyme estérase après 5 jours d'exposition. Les points représentent les valeurs mesurées, les courbes sont tracées à partir des modèles et les zones ombragées représentent les intervalles de confiance à 95%. La droite en pointillée rouge représente la valeur de CE10.

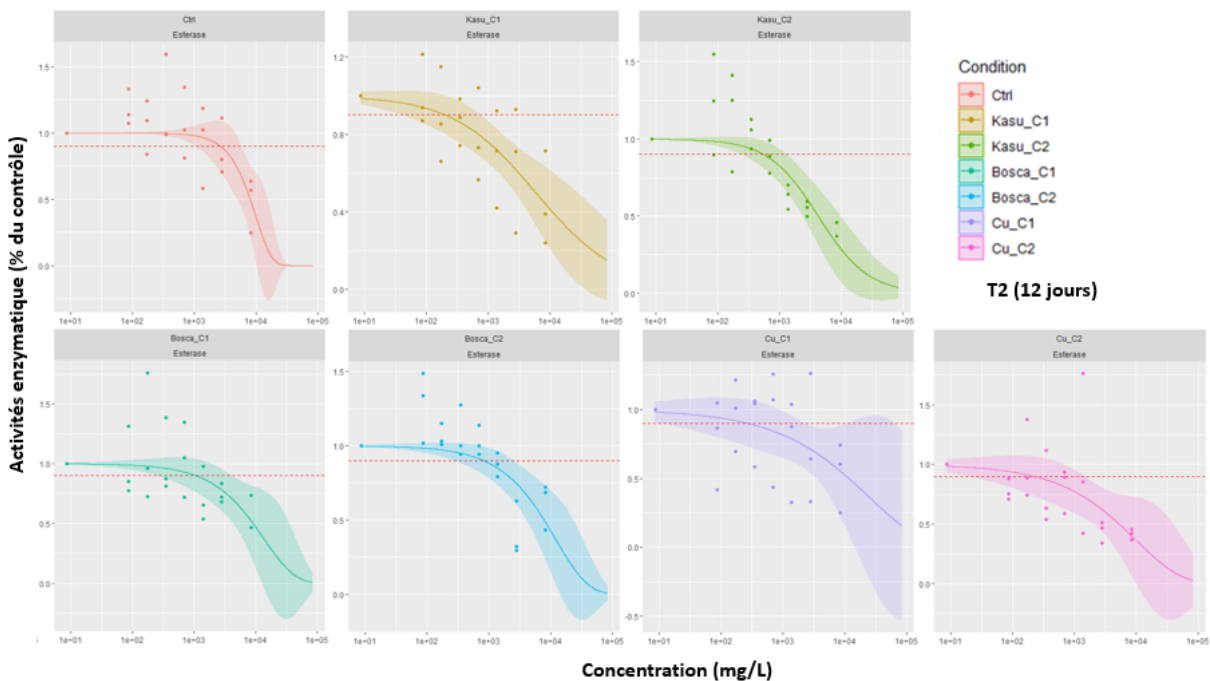


Figure 30: Tests de toxicité aiguë de la kasugamycine réalisés sur l'activité de l'enzyme estérase après 12 jours d'exposition. Les points représentent les valeurs mesurées, les courbes sont tracées à partir des modèles et les zones ombragées représentent les intervalles de confiance à 95%. La droite en pointillée rouge représente la valeur de CE10.

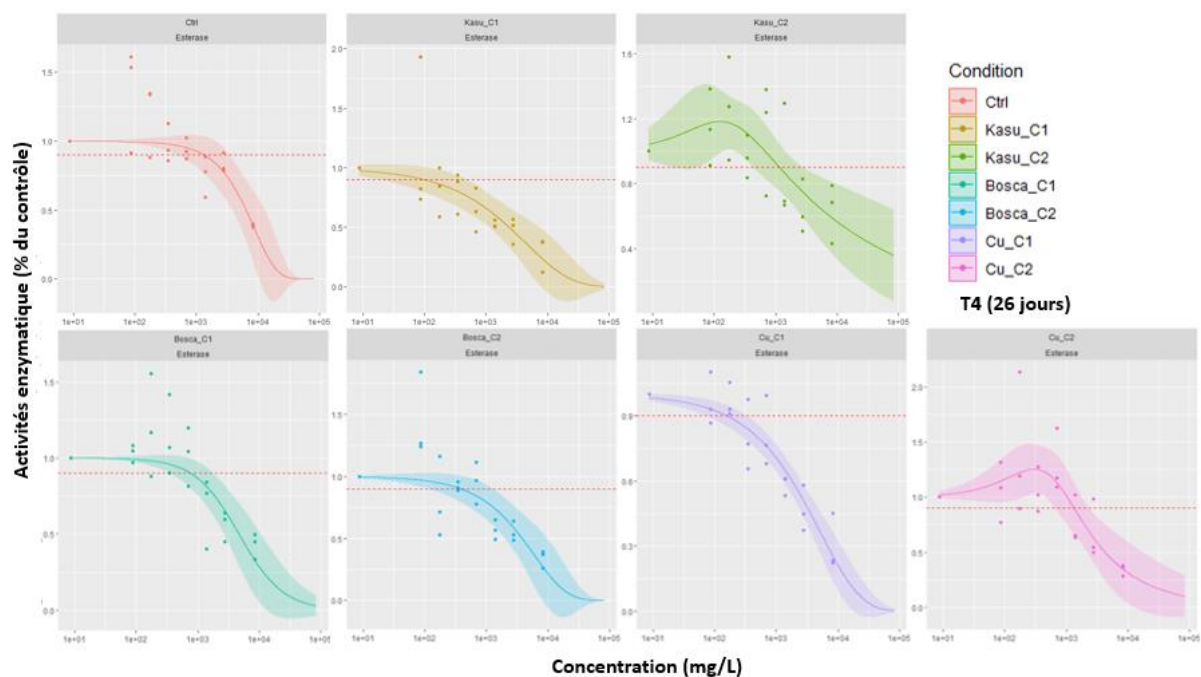


Figure 31: Tests de toxicité aiguë de la kasugamycine réalisés sur l'activité de l'enzyme estérase après 26 jours d'exposition. Les points représentent les valeurs mesurées, les courbes sont tracées à partir des modèles et les zones ombragées représentent les intervalles de confiance à 95%. La droite en pointillée rouge représente la valeur de CE10.

8.4.2 Approche PICT – β -glucosidase et cuivre

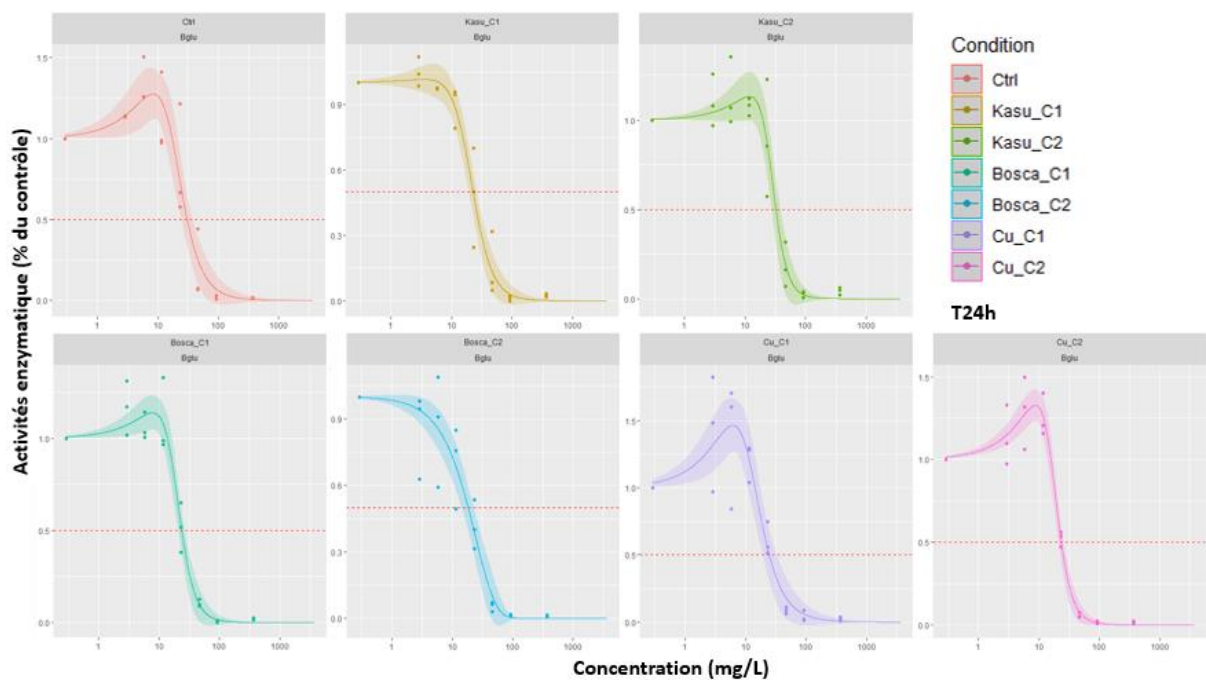


Figure 32: Tests de toxicité aiguë du cuivre réalisés sur l'activité de l'enzyme β -glucosidase après 24h d'exposition. Les points représentent les valeurs mesurées, les courbes sont tracées à partir des modèles et les zones ombragées représentent les intervalles de confiance à 95%. La droite en pointillée rouge représente la valeur de CE50.

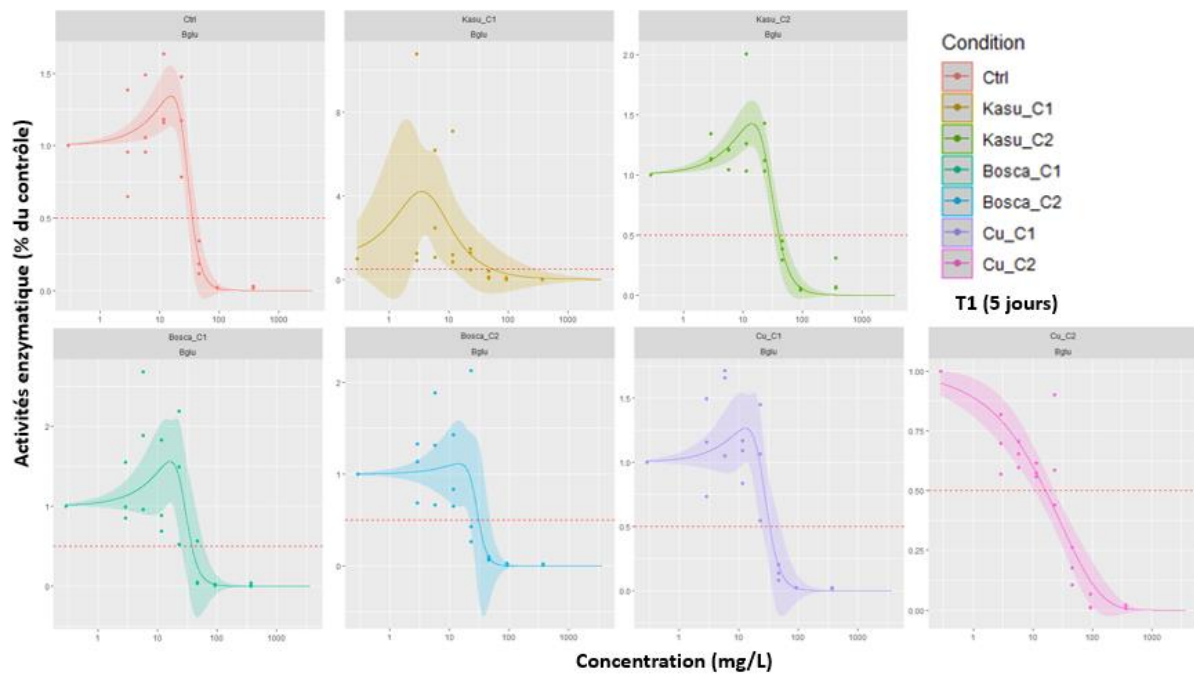


Figure 33: Tests de toxicité aiguë du cuivre réalisés sur l'activité de l'enzyme β -glucosidase après 5 jours d'exposition. Les points représentent les valeurs mesurées, les courbes sont tracées à partir des modèles et les zones ombragées représentent les intervalles de confiance à 95%. La droite en pointillée rouge représente la valeur de CE50.

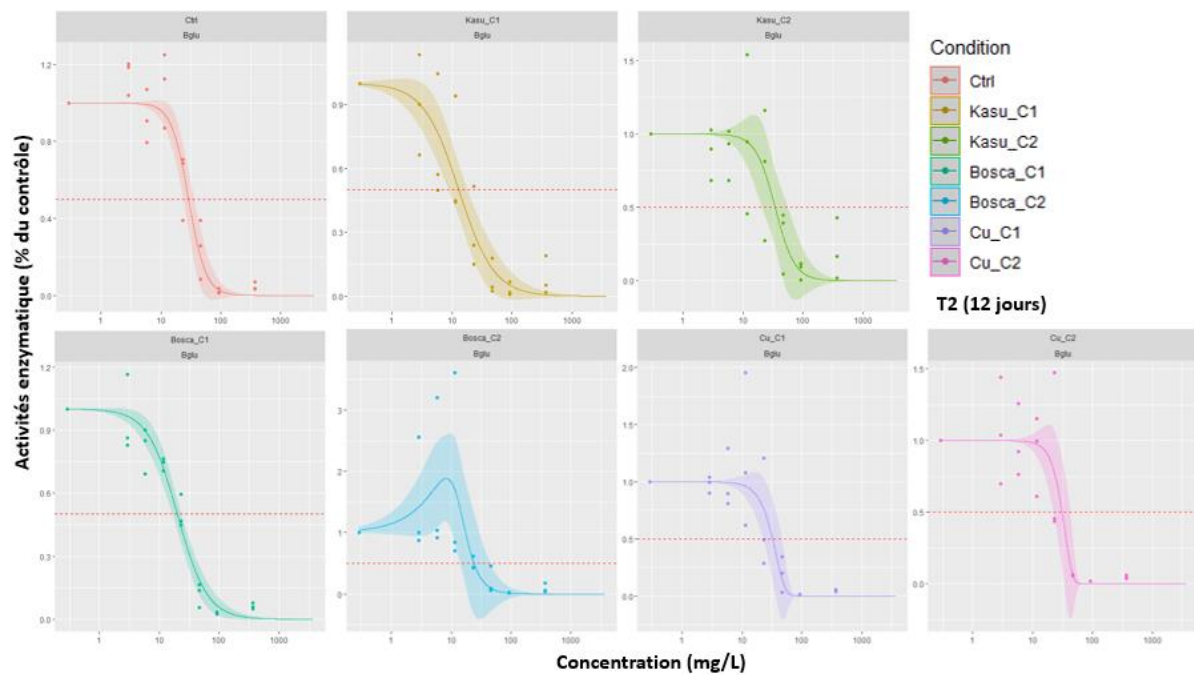


Figure 34: Tests de toxicité aiguë du cuivre réalisés sur l'activité de l'enzyme β -glucosidase après 12 jours d'exposition. Les points représentent les valeurs mesurées, les courbes sont tracées à partir des modèles et les zones ombragées représentent les intervalles de confiance à 95%. La droite en pointillée rouge représente la valeur de CE50.

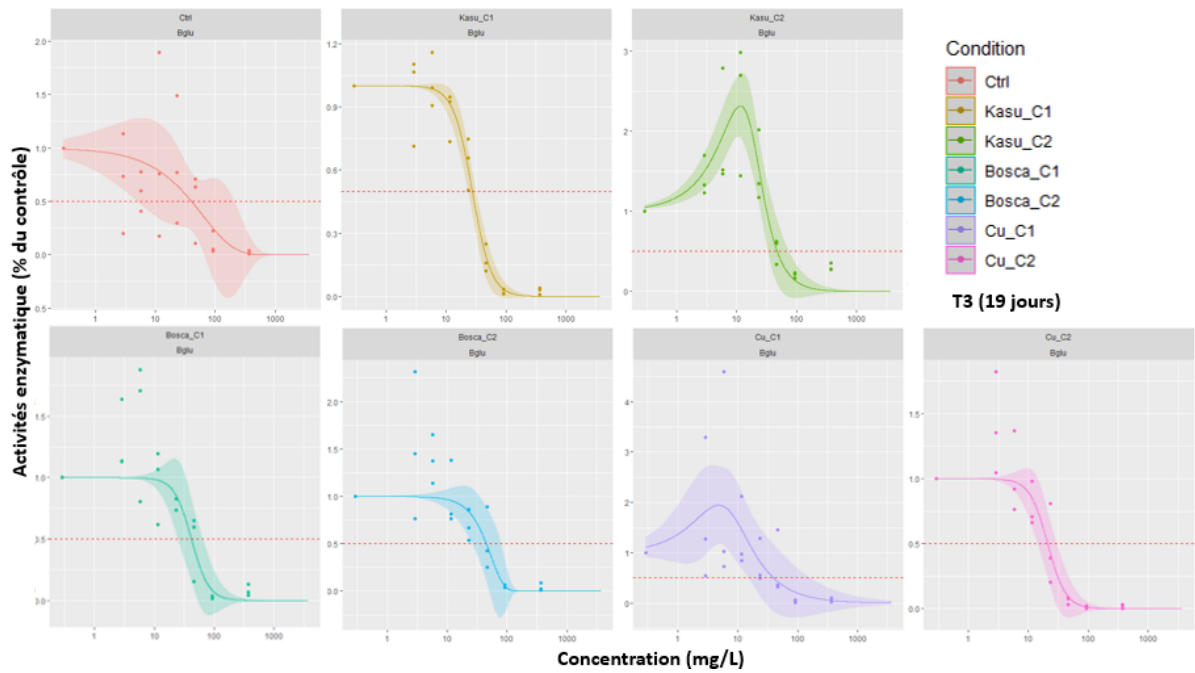


Figure 35: Tests de toxicité aiguë du cuivre réalisés sur l'activité de l'enzyme β -glucosidase après 19 jours d'exposition. Les points représentent les valeurs mesurées, les courbes sont tracées à partir des modèles et les zones ombragées représentent les intervalles de confiance à 95%. La droite en pointillée rouge représente la valeur de CE50.

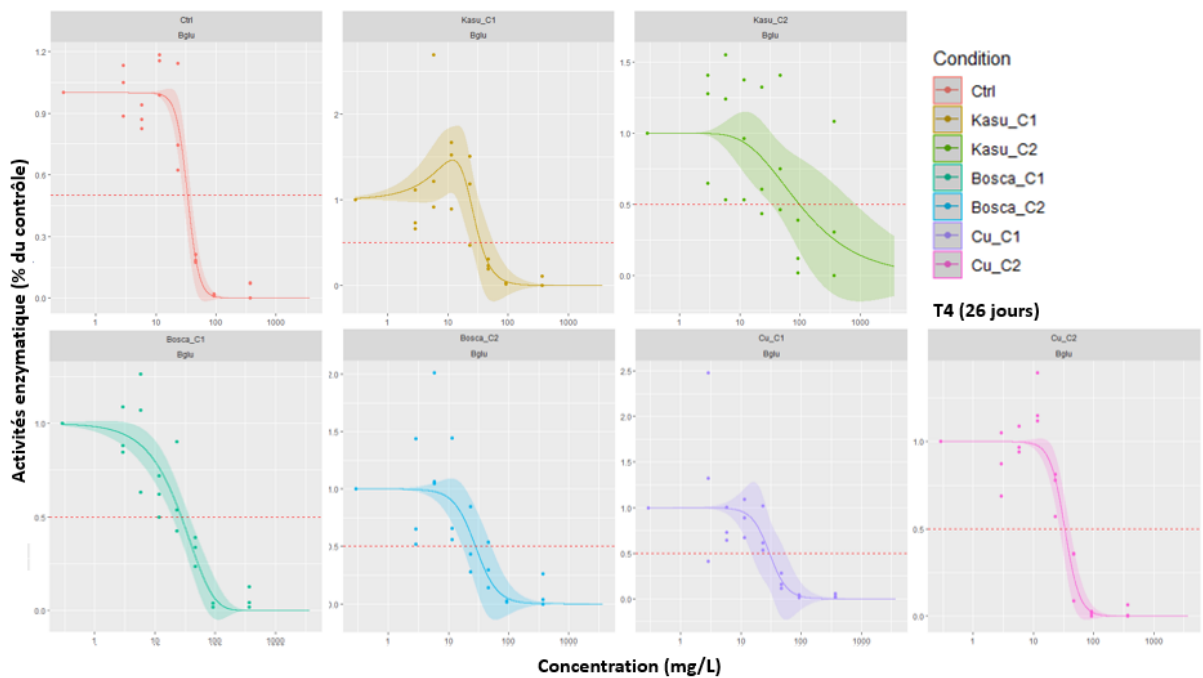


Figure 36: Tests de toxicité aiguë du cuivre réalisés sur l'activité de l'enzyme β -glucosidase après 26 jours d'exposition. Les points représentent les valeurs mesurées, les courbes sont tracées à partir des modèles et les zones ombragées représentent les intervalles de confiance à 95%. La droite en pointillée rouge représente la valeur de CE50.

8.4.3 Approche PICT – Rendement photosynthétique et cuivre

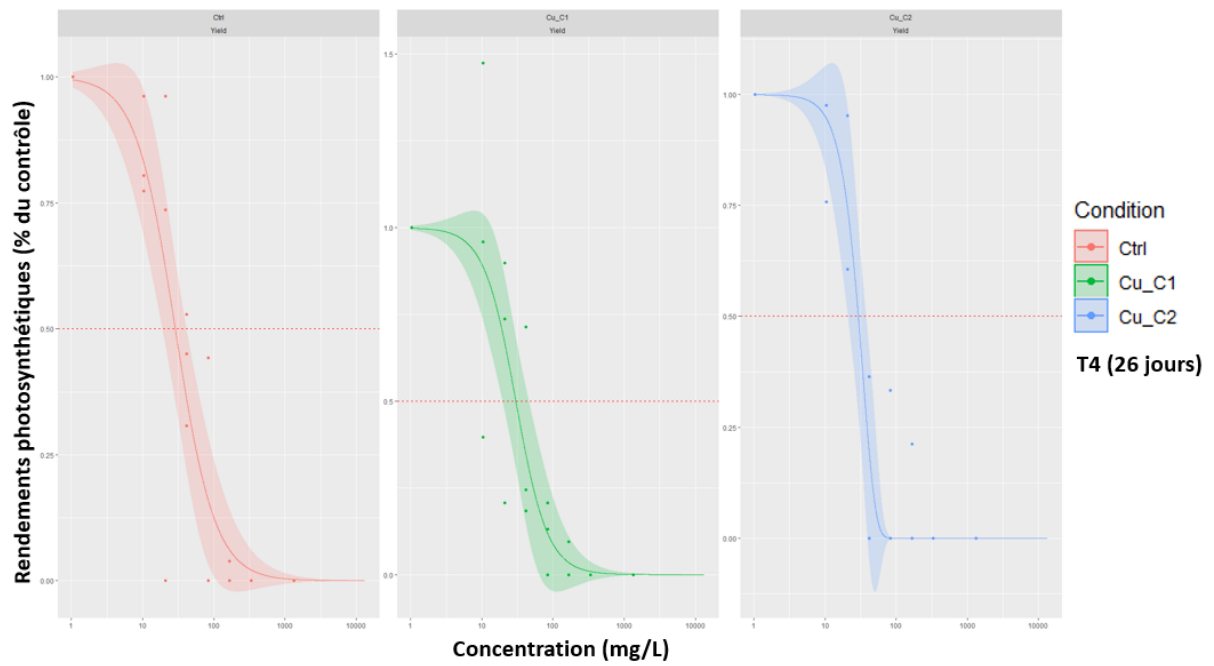


Figure 37: Tests de toxicité aiguë du cuivre réalisés sur le rendement photosynthétique après 26 jours d'exposition. Les points représentent les valeurs mesurées, les courbes sont tracées à partir des modèles et les zones ombragées représentent les intervalles de confiance à 95%. La droite en pointillée rouge représente la valeur de CE50.