



HAL
open science

Effet de métaux tétravalents (thorium, zirconium) sur les communautés de microorganismes d'eau douce et transfert trophique aux brouteurs

Caroline Doose

► To cite this version:

Caroline Doose. Effet de métaux tétravalents (thorium, zirconium) sur les communautés de microorganismes d'eau douce et transfert trophique aux brouteurs. Sciences de l'environnement. Université du Québec, Institut national de la recherche scientifique, 2020. Français. NNT: . tel-04332110

HAL Id: tel-04332110

<https://hal.inrae.fr/tel-04332110>

Submitted on 8 Dec 2023

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

**Effet de métaux tétravalents (thorium, zirconium) sur les
communautés de microorganismes d'eau douce et transfert trophique
aux brouteurs**

Par
Caroline Doose

Thèse présentée pour l'obtention du grade de
Philosophiae Doctor (Ph.D.)
en sciences de l'eau

Jury d'évaluation

Présidente du jury et examinatrice interne	Isabelle Lavoie INRS ETE
Examinatrice externe	Karine Lemarchand UQAR
Examineur externe	Philippe Juneau UQAM
Directeur de recherche	Claude Fortin INRS ETE
Codirectrice de recherche	Soizic Morin INRAE

REMERCIEMENTS

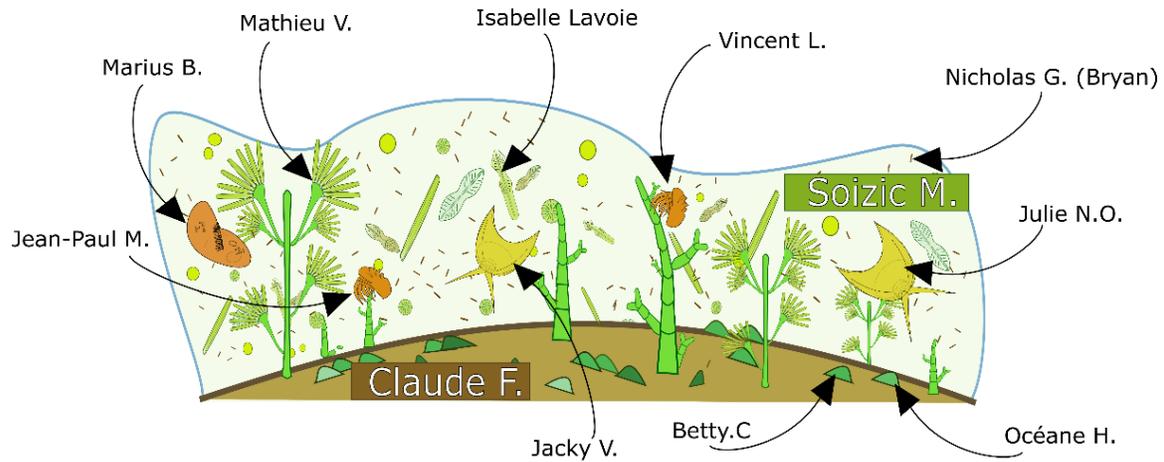


Figure A. Communauté d'organismes ayant grandement participé au maintien de la santé de mon écosystème doctoral.

La figure A. représente les acteurs fondamentaux ayant contribué scientifiquement et affectivement à l'élaboration de ces travaux de doctorat. Tout d'abord, un grand merci à mon directeur de thèse Claude Fortin, le substrat essentiel sans lequel rien n'aurait été possible. Je suis plus que reconnaissante pour la confiance et la grande liberté qu'il m'a données tout au long de ces 5 ans, rendant mon expérience de doctorat indescriptiblement fantastique sur le plan scientifique et personnel. Je remercie également de tout mon cœur ma codirectrice Soizic Morin, la matrice qui a permis de donner une forme à ce projet, source de motivation et d'optimisme infinie. Je me sens sincèrement chanceuse d'avoir eu ces deux mentors pour superviser mes travaux.



Communauté familiale (les 12)

Je voudrais remercier ma petite sœur, Hélène, pour avoir été près de moi lors de cette aventure et pour m'avoir intégrée dans son monde gastronomique plein de personnes colorées (j'en profite pour faire un clin d'œil à toute l'équipe du groupe la Tanière). Je remercie mes parents pour leur patience et soutien tout au long de ma scolarité pour me permettre d'arriver, 10 ans plus tard, au bout ! Merci à ma grand-mère Annick. Son courage et sa bonne humeur ont fait d'elle un modèle important pour moi et me donnent de la force face aux difficultés.



Communauté de la Team Fortin (clap clap !)

Merci aux anciens de l'équipe, Fengjie et Camille de m'avoir rapidement intégré au sein de l'équipe. Merci à Kim Racine pour son amitié et son aide essentielle au laboratoire. Merci à Imad pour son calme et sa bonne humeur quotidienne. Je remercie également le reste de l'équipe pour la bonne ambiance, notamment Faouzia et Emeric pour le partage de denrées rares comme les tulipes de filtration ou les plaques agitatrices du conviron. Un grand merci à Mariem F. d'avoir accepté de travailler et de partager ses compétences avec moi.



Communauté amicale (les espèces rares)

Un merci infini à mon cher Mathieu, mon plus vieil ami de Québec, pour cette étonnante vibration qui nous lie tous les deux et qui a toujours transformé les moments difficiles en expériences fascinantes. Julie la fan de rotifères, et Vincent(imes) le McGyver du lab, mes deux frangins de thèse ! Je me sens tous les jours extrêmement chanceuse de vous avoir rencontré. Toutes ces aventures amicales et scientifiques resteront à jamais gravées dans mes souvenirs, et j'espère qu'il y en aura plein d'autres ! Océane, petite sœur de la team Fortin, mais déjà bien installée au doc, je te remercie pour ton humour ultra frais, pour ton aide au labo qui m'a permis de rentrer chez moi à des heures décentes en temps de manip. Je remercie également ma première et unique stagiaire, Laura, qui a réalisé un travail plus qu'exemplaire et n'a pas hésité à mobiliser ses méninges et son cœur pour m'accompagner pendant son stage. Merci beaucoup à Betty Chou pour son amitié, son aide précieuse dans certains moments difficiles ainsi qu'au labo, et pour être venue me voir à Québec avec Bertille ! Merci, Bryan (Nicholas) pour les pauses café et l'aide en anglais, je t'apprécie beaucoup même si tu es « insufferable ». Un énorme cimer à mes colocataires du 156 (Tomtom, Vilou, Hélène et Flo) pour avoir partagé le Limnopalace avec moi. J'en profite pour remercier mon nouveau coloc Ashwin (thanks for having supported me during the last months of my PhD). Danke an Albrecht Bunner, der auch ein Stück von Doktorarbeit erlebt hat. Und vielen danke an die Familie Steitz, die bis am Ende da war. Merci aux amis qui sont loin, mais dont les rencontres rares donnent beaucoup d'énergie : Lucile et Édouard. Je termine par un grand merci à mon ronchon de Jeanpoli qui m'a beaucoup apporté en conseil, amitié et affection tout au long de ce doctorat et avec qui j'ai vécu de nombreuses aventures.

Et merci à : Renou, Sarah, PY, Giulio, Élis, Vinicius, Élisabeth, Laureline, François, Bertille, Marion ... et tous ce qui je n'ai pas la place de citer.



Communauté de l'INRS ETE

Je remercie chaleureusement l'équipe des techniciens de l'INRS pour leurs aides précieuses et en particulier Julie Perreault, la magicienne de l'ICP MS, pour son amitié et sa bonne humeur inconditionnelle. Je souhaite également remercier Linda Aubert et Mélanie Laverdière qui m'ont apporté leur précieux soutien dans la nébuleuse administrative. Un très grand merci à Isabelle Lavoie pour sa présence et ces précieux conseils tout au long de ce doctorat. Je souhaite remercier vivement Valérie Langlois et son équipe, en particulier Catherine, Sarah et Scott qui m'ont beaucoup aidé au sujet des questions génomiques et ont accepté de nous faire une petite place dans leurs laboratoires. Je remercie Isabelle Laurion d'avoir accepté de me prêter son Phyto-PAM.



Communauté d'Irstea Bordeaux

Tout d'abord un grand merci à Jacky pour m'avoir initié au monde de la microméiofaune, pour son œil de lynx pendant les corrections et pour sa patience. Merci à Éric Rochard, à Juliette Tison-Rosebery et Nicolas Mazzella de m'avoir accueillie dans les laboratoires d'IRSTEA Bordeaux. Un grand merci à David Carayon et Marie Wach de m'avoir aidée à tomber amoureuse avec le logiciel R. Merci à Seb et Aurélien pour la bonne humeur et les bonnes idées échangées pendant les pauses café. Merci à l'équipe technique des laboratoires de chimie ainsi qu'à tous les amis d'ETBX.



Communauté scientifique extérieure

Je me sens extrêmement reconnaissante envers Chloé Bonnineau qui, à plusieurs reprises, a bien voulu prendre de son temps pour m'aider dans les protocoles d'analyses 16s et d'activités enzymatiques. De même, je remercie chaleureusement Jérôme Cachot et son équipe, et en particulier Christelle Clérandeau, pour m'avoir accueillie dans leurs laboratoires alors que j'étais désespérément en recherche d'un spectromètre. Merci, Christelle, pour l'énergie et le temps que tu m'as donné lors de ces expériences.

Je terminerai par remercier mon cher Marius Bunner, compagnon courageux sur les chemins pentus de cette dernière année de doctorat. Schön, dass du da bist.

À mon grand-père, Jean-Pierre Marcou, et ma grand-mère, Marie-Thérèse Doose, à qui je pense tendrement en écrivant ces lignes.

RÉSUMÉ

L'intensification mondiale de la demande en métaux est à l'origine d'une remobilisation de plus en plus importante de ces éléments dans les milieux aquatiques. L'écotoxicité des métaux tétravalents dans les milieux aquatiques reste actuellement peu étudiée. La caractérisation de la prise en charge et des effets du thorium (Th) et du zirconium (Zr) sur les producteurs primaires, et sur les communautés de microorganismes autotrophes, permettrait de mieux prévenir la dégradation et l'exposition des écosystèmes aquatiques en contribuant à l'amélioration d'outils de biosuivi de la contamination métallique. Des expériences de prise en charge à court terme ont été effectuées afin de déterminer le flux d'internalisation du Th et du Zr dans des microalgues. Contrairement à ce que l'on observe habituellement avec les éléments de valence inférieure, aucune relation linéaire n'a été obtenue entre la quantité de métal internalisé dans les cellules et le temps d'exposition suggérant une importante adsorption par rapport à l'internalisation. Des expériences de fractionnement subcellulaire ont montré que le Th s'associe aux granules et aux organites avec des concentrations de Th intracellulaire total similaires à celles des expériences de prise en charge. Cette répartition représente un risque modéré de toxicité pour les cellules algales et de transfert trophique pour les brouteurs. Afin d'examiner les effets potentiels à l'échelle de la communauté, du biofilm cultivé en laboratoire a été exposé à ces métaux en microcosmes et sa structure taxonomique a été déterminée par microscopie (microméiofaune et diatomées) et par séquençage d'ARN 16s (bactéries). Les résultats montraient que ces métaux perturbaient les structures taxonomiques des communautés étudiées par des effets directs (diminution de croissance et d'abondance de certain taxon) et indirects (augmentation de l'abondance de certain taxon). Lors d'une expérience de transfert trophique, les escargots nourris au biofilm exposé ont accumulé plus de Th. Leurs compositions en acides gras différaient de celles des escargots témoins, avec une baisse significative des acides gras polyinsaturés (oméga 3 et oméga 6) jouant des rôles essentiels dans la physiologie de ces organismes.

Dans ces travaux, la présence du Th et du Zr à des concentrations environnementalement réalistes a montré des effets sur la structure taxonomique des communautés périphytiques. Dans le cas du Th, la bioaccumulation ainsi que les modifications du biofilm associées à l'exposition ont engendré des changements dans sa qualité nutritionnelle. Ces changements ont également perturbé la composition en acide gras et la prise alimentaire du brouteur utilisé, l'escargot. Ainsi, à la lumière de nos résultats, il semble que ces métaux peuvent présenter un risque pour les biofilms et leurs brouteurs. Ce travail montre la pertinence de continuer à étudier leurs effets sur

les organismes présents dans ces milieux, à différents niveaux d'organisation biologique et trophique.

Mots-clés : Biofilm périphytique ; métaux tétravalents ; transfert trophique ; qualité nutritionnelle ; contamination métallique ; bactéries ; diatomée ; microméiofaune ; acides gras ; effet indirect

ABSTRACT

Rising global demand for metals increases their remobilization in aquatic environments. The ecotoxicity of tetravalent metals in aquatic environments is still poorly studied. Characterization of the Th and Zr uptake and effects on primary producers, and on microbial communities, will contribute to improve the risk assessment of metallic contamination in aquatic ecosystems. Short-term uptake experiments were conducted to determine the internalization flux of Th and Zr in microalgae. Contrary to what is usually observed with lower-valence elements, no linear relationship was obtained between the amount of metal internalized in the cells and the exposure time. Subcellular fractionation experiments showed that Th associates with granules and organelles, and total intracellular Th concentrations were similar to those in the short-term uptake experiments. This distribution represents a moderate risk of toxicity to algal cells and of trophic transfer to grazers. To probe the impacts of these metals to the primary producer community, biofilms were exposed to Th and Zr in microcosms and their taxonomic structures were determined by microscopy (micromeiofauna and diatoms) and 16s RNA sequencing (bacteria). The results showed that these metals disrupted the taxonomic structures of the communities studied through direct and indirect effects. In a trophic transfer experiment, snails fed with the exposed biofilm accumulated more Th and their fatty acid compositions differed from those of the control snails.

In this work, the presence of Th and Zr at environmentally realistic concentrations showed effects on the taxonomic structure of periphytic communities. In the case of Th exposure, bioaccumulation as well as structure perturbations in the biofilm induced changes in its nutritional quality. These changes also affected grazers such as the snail *Lymnaea* sp. Thus, the release of these metals may pose a risk to freshwater biofilms and their consumers. This work shows the relevance of continuing to study their effects on organisms present in these environments, at different levels of biological and trophic organization.

Keywords: Periphytic biofilm tetravalent metals; trophic transfer; nutritional quality; metal contamination; bacteria; diatoms; micromeiofauna; direct effect; indirect effect

TABLE DES MATIÈRES

REMERCIEMENTS	III
RÉSUMÉ	VII
ABSTRACT	IX
TABLE DES MATIÈRES	XI
LISTE DES FIGURES	XV
LISTE DES TABLEAUX	XXI
LISTE DES ABRÉVIATIONS	XXIII
1 INTRODUCTION	1
1.1 MISE EN CONTEXTE	1
1.2 METAUX ET MILIEU AQUATIQUE	2
1.2.1 <i>Source des métaux dans l'environnement</i>	2
1.2.2 <i>Relation entre les métaux et le vivant</i>	2
1.2.3 <i>Mécanismes de prise en charge des métaux par les organismes dulcicoles</i>	3
1.2.4 <i>Mécanismes de toxicité des métaux</i>	7
1.3 LE THORIUM	9
1.3.1 <i>Propriétés</i>	9
1.3.2 <i>Sources et utilisations</i>	10
1.3.3 <i>Le thorium dans l'environnement</i>	11
1.4 LE ZIRCONIUM	13
1.4.1 <i>Propriétés</i>	13
1.4.2 <i>Sources et utilisations</i>	14
1.4.3 <i>Le zirconium dans l'environnement</i>	15
1.5 MODELES D'ETUDE	16
1.5.1 <i>Premier modèle d'étude : Chlamydomonas reinhardtii</i>	17
1.5.2 <i>Deuxième modèle d'étude : Le biofilm périphytique</i>	18
1.5.3 <i>Écotoxicologie des communautés du biofilm périphytique</i>	20
1.6 STRUCTURE DE LA THESE	27
BIBLIOGRAPHIE INTRODUCTION	31
2 EFFETS DE LA SPECIATION EXTRA ET INTRACELLULAIRE DU TH ET DU ZR : DE L'INTERNALISATION AUX MECANISMES DE TOXICITE	48
2.1 INTRODUCTION	48
2.2 MATERIEL ET METHODE.....	50
2.2.1 <i>Culture algale</i>	50
2.2.2 <i>Solution d'exposition</i>	50

2.2.3	<i>Prise en charge à court terme</i>	51
2.2.4	<i>Fractionnement subcellulaire</i>	51
2.2.5	<i>Accumulation du thorium et du zirconium dans les différentes fractions du biofilm périphytique</i>	53
2.2.6	<i>Mesures des concentrations en thorium et en zirconium</i>	54
2.2.7	<i>Traitement statistique des données</i>	55
2.3	RESULTATS ET DISCUSSION.....	55
2.3.1	<i>Prise en charge et répartition subcellulaire du thorium chez des algues vertes modèles</i>	55
2.3.2	<i>Bioaccumulation du thorium dans les différentes fractions du biofilm</i>	64
2.4	CONCLUSION DU CHAPITRE.....	67
BIBLIOGRAPHIE CHAPITRE 2		68
3 IMPACT OF ZIRCONIUM ON FRESHWATER PERIPHYTIC MICROORGANISMS		73
3.1	INTRODUCTION.....	76
3.2	MATERIALS AND METHODS.....	77
3.2.1	<i>Experimental setup</i>	77
3.2.2	<i>Biofilm microorganism analysis</i>	78
3.2.3	<i>Data treatment</i>	78
3.3	RESULTS.....	78
3.3.1	<i>Physicochemical conditions</i>	78
3.3.2	<i>Biofilm biomass and Zr effects on autotrophic organism composition</i>	79
3.3.1	<i>Effect on micromeiofauna composition</i>	81
	<i>Total counted individuals</i>	81
	<i>Micromeiofauna composition</i>	81
	<i>Ciliates</i>	82
	<i>Rotifers</i>	83
3.4	DISCUSSION.....	84
3.4.1	<i>Exposure conditions</i>	84
3.4.2	<i>Effects on autotrophic community structure</i>	84
3.4.3	<i>Effects on micromeiofauna community structure</i>	85
3.5	CONCLUSION.....	86
BIBLIOGRAPHIE CHAPITRE 3		89
4 EFFECTS OF THORIUM ON BACTERIAL, MICROALGAL AND MICROMEIOFAUNAL COMMUNITY STRUCTURES IN A PERIPHYTIC BIOFILM		95
4.1	INTRODUCTION.....	96
4.2	MATERIALS AND METHODS.....	98
4.2.1	<i>Experimental setup</i>	98
4.2.2	<i>Biofilm analysis</i>	98

4.2.3	<i>Data treatment</i>	99
4.3	RESULTS AND DISCUSSION	100
4.3.1	<i>Physicochemical composition</i>	100
4.3.2	<i>Effect of Th on the growth of biofilm communities</i>	101
4.3.3	<i>Effect on the diversity and taxonomic composition of biofilm communities</i>	103
4.3.4	<i>Effect of Th on the global taxonomic community structure</i>	109
4.4	CONCLUSION	112
BIBLIOGRAPHIE CHAPITRE 4		113
5 THORIUM EXPOSURE DRIVES FATTY ACID AND METAL TRANSFER FROM BIOFILMS TO THE GRAZER LYMNAEA SP.		122
5.1	INTRODUCTION	124
5.2	MATERIALS AND METHODS	125
5.2.1	<i>Experimental setup</i>	125
5.2.2	<i>Fatty acid analysis</i>	127
5.2.3	<i>Thorium quantification</i>	127
5.2.4	<i>Data treatment and analysis</i>	127
5.3	RESULTS AND DISCUSSION	128
5.3.1	<i>Fatty acid profiles of control biofilms and grazers</i>	128
5.3.1	<i>Effect of Th exposure on biofilm fatty acid profile</i>	134
5.3.1	<i>Effect of Th-exposed biofilm on grazers</i>	137
5.3.2	<i>Conclusion</i>	140
	<i>Acknowledgements</i>	141
BIBLIOGRAPHIE CHAPITRE 5		142
6 DISCUSSION GÉNÉRALE ET CONCLUSION		151
6.1	ACCUMULATION DU THORIUM PAR LES MICROORGANISMES D'EAU DOUCE ET TRANSFERT TROPHIQUE	151
6.1.1	<i>Accumulation du thorium par adsorption</i>	151
6.1.2	<i>Accumulation du thorium par internalisation à l'intérieur des cellules</i>	159
6.1.3	<i>Transfert trophique du thorium chez les consommateurs primaires</i>	161
6.2	PERTURBATION DES STRUCTURES DES COMMUNAUTES BENTHIQUES EXPOSEES AUX TH ET AU ZR	162
6.2.1	<i>Effets du thorium et du zirconium sur les communautés autotrophes</i>	163
6.2.2	<i>Effets du thorium et du zirconium sur les communautés hétérotrophes</i>	164
6.2.3	<i>Application à l'évaluation et au biosuivi des contaminations métalliques</i>	167
6.3	EFFET DE LA PERTURBATION DES COMMUNAUTES PERIPHYTIQUES EXPOSEES AU THORIUM SUR LA QUALITE NUTRITIONNELLE DU BIOFILM	168
6.3.1	<i>Liens entre les communautés et la qualité nutritionnelle</i>	168

6.3.2	<i>Effets des changements nutritionnels chez le brouteur Lymnaea sp.</i>	170
6.4	CONCLUSION.....	171
BIBLIOGRAPHIE DISCUSSION GENERALE		173
ANNEXE I		183
ANNEXE II		184
ANNEXE III		186
ANNEXE IV.....		187
ANNEXE V.....		188

LISTE DES FIGURES

Figure 1.1. Schéma des types de transports membranaire à la surface des cellules.....	4
Figure 1.2. Mécanisme de prise en charge d'un cation métallique M^{Z+} selon le modèle de l'ion libre [10]. Abréviations : L (ligand), ML (complexe ligand-métal), X (transporteur membranaire).....	5
Figure 1.3. Réponse toxique type des algues à une contamination par un métal non-essentiel d'après Simkiss 1989 [24].	8
Figure 1.4. Schéma général des mécanismes de génération du stress oxydatif par le cation métallique M^{Z+} et ses conséquences dans les cellules algales suite à une internalisation (adapté de Pinto et al., 2003). Les abréviations : superoxyde dismutase (SOD), catalase (CAT), ascorbate peroxydase (APX), glutathion peroxydase (GPX), molécules de glutathion liées par une liaison disulfide (GSSG), monodehydroascorbate (MDAsc).....	9
Figure 1.5. Production annuelle mondiale minière de Zr en tonnes (D'après le rapport USGS 2012)[77,78]	14
Figure 1.6. Représentation schématique de <i>Chlamydomonas reinhardtii</i>	17
Figure 1.7. Représentation schématique du biofilm périphytique	19
Figure 1.8. Effets des contaminants sur le biofilm périphytique à différentes échelles du vivant	21
Figure 1.9. Principales méthodologies et mesures effectuées pour évaluer les effets de contaminants sur les communautés autotrophes du biofilm périphytique.	22
Figure 1.10. Exemples de mesures effectuées pour évaluer les effets de contaminants sur le biofilm périphytique et leurs conséquences sur la chaîne trophique.	25
Figure 2.1. Représentation de la méthode de fractionnement subcellulaire appliquée à l'algue <i>C. reinhardtii</i> traduit de Lavoie et al. (2009) [20] et les différentes fractions obtenues : débris, granules, organites, protéines stables à la chaleur (HSP) et protéines instables à la chaleur (HDP). Les abréviations P et S signifiant culot (<i>pellet</i>) et surnageant respectivement.	53
Figure 2.2. Schéma du protocole de séparation des différentes fractions du périphyton d'après Stewart et al., 2015 [11].	54

Figure 2.3. Spéciation du thorium concentré à 1 nM dans l'eau en fonction du pH modélisé à l'aide du logiciel WHAM et des données thermodynamiques issues de la base de données Nagra/PSI 01/01 [25].....	56
Figure 2.4. Prise en charge à court terme du Th (1 nM) in <i>C. reinhardtii</i> (CR) et <i>R. subcapitata</i> (PS) en fonction du temps. Les droites représentent les régressions linéaires effectuées sur les données et les coefficients a représentent leurs pentes respectives. $[Th]_{algue}$ témoin représente les concentrations moyennes de Th mesurées dans les algues témoin référencées dans le tableau 2.2 pour chaque expérience.....	58
Figure 2.5. Répartition subcellulaire du Th chez l'algue verte <i>Chlamydomonas reinhardtii</i> (CR) après 1 h d'exposition en pourcentage de la somme des concentrations en Th mesurées dans les fractions. A. Conditions exposées à 1 nM de Th, les valeurs représentées sont les moyennes des trois répliques des trois expériences (n = 9). B. Conditions témoins les valeurs représentées sont les moyennes des échantillons des trois expériences (n = 3). Les barres d'erreurs correspondent aux écarts-types.....	61
Figure 2.6. Schéma récapitulatif des expériences de prise en charge à court terme et de fractionnement subcellulaire sur <i>C. reinhardtii</i> (CR) et <i>R. subcapitata</i> (PS, seulement prise en charge).....	64
Figure 2.7. Thorium mesuré dans les différentes factions du biofilm exposé à 0 nM (0,004 ± 0,002), 1 nM (0,18 ± 0,09) et 10 nM (8,7 ± 3,4) à 0, 1, 2 et 4 semaines. Les différentes fractions sont : EPSs (Exopolysaccharides solubles), Désorbable (fraction de rinçage à l'EDTA et au MOPS), Non désorbable (EPS capsulaires et organismes) et totale (somme de toute les fractions). Les différences significatives (n = 8) sont illustrées à l'aide des lettres (two-way ANOVA, p <0,05) et * (test de Wilcoxon, p <0,05).	66
Figure 3.1. Biofilm biomasses over time in control (C0 = 0.2 ± 0.1 nM) and Zr exposures (C1 = 0.5 ± 0.3 nM and C10 = 2.9 ± 0.3 nM). Values are averages and standard errors. Two-way ANOVA was performed to detect significant differences between exposure times, and these differences are indicated by letters (p<0.05; n = 3)..	79
Figure 3.2 . A. Diatom growth measured in the biofilm of controls (C0 = 0.2 ± 0.1 nM) and Zr exposures (C1 = 0.5 ± 0.3 nM and C10 = 2.9 ± 0.3 nM). A two-way ANCOVA	

was performed to detect significant differences between exposure times ($p < 0.05$; $n = 3$). B. Blue (Bl), brown (Br), and green (Gr) chlorophyll fluorescence from biofilm autotrophs measured in control and Zr exposures (C1 and C10) placed from the left to the right, respectively. Values are means and standard errors of total Chl fluorescence, no significant differences were found between conditions using a two-way ANOVA ($p < 0.05$; $n = 3$).....80

Figure 3.3 . Total micrometazoa individuals counted per mg of biofilm in control (C0 = 0.2 ± 0.1 nM) and Zr exposures (C1 = 0.5 ± 0.3 nM and C10 = 2.9 ± 0.3 nM). Values represent means \pm standard errors. Two-way ANOVA was performed to detect significant differences between exposure times ($p < 0.05$; $n = 3$).81

Figure 3.4 . The number of ciliate individuals per mg of biofilm dry weight in control C0 = 0.2 ± 0.1 nM) and Zr exposures (C1 = 0.5 ± 0.3 nM and C10 = 2.9 ± 0.3 nM). Values are means and standard errors. Two-way ANOVA was performed to detect significant differences between sampling times and treatments indicated by letters ($p < 0.05$; $n = 3$).82

Figure 3.5 . *Aspidisca cicada* (Foissner 1996), *Uronema* sp., *Trachelophyllum* sp. and undefined heterotrich species individuals present per mg of biofilm dry weight in control (C0 = 0.2 ± 0.1 nM) and Zr exposures (C1 = 0.5 ± 0.3 nM and C10 = 2.9 ± 0.3 nM). Values are means and standard errors. Two-way ANOVA was performed to detect significant differences between treatments as indicated by letters ($p < 0.05$; $n = 3$).83

Figure 3.6. Number of individuals (A) and rotifer eggs (B) per mg of biofilm dry weight in control C0 = 0.2 ± 0.1 nM) and Zr exposures (C1 = 0.5 ± 0.3 nM and C10 = 2.9 ± 0.3 nM). Values are means and standard errors. Two-way ANOVA was performed to detect significant differences between treatments as indicated by letters ($p < 0.05$; $n = 3$).84

Figure 4.1. Total individuals (In) normalized by biomass (live diatoms per mg of dry weight in red, number of *Eubacteria* 16s ARN genes copies obtained by qPCR per ng of total DNA sample in green, micrometazoa individuals per mg of dry weight in blue) observed over time in control C0 (0.004 ± 0.002 nM Th) and Th exposures (C1 = 0.18 ± 0.09 nM Th and C10 = 8.7 ± 3.4 nM Th). A two-way ANOVA was

performed to detect significant differences between treatments, indicated by letters ($p < 0.05$; $n = 8$). Curves were drawn to guide the eye..... 102

Figure 4.2. Relative abundance for the percentage of micromeiofauna, bacteria and diatoms taxa counted in the biofilm sampled over time in control ($0 = 0.004 \pm 0.002$ nM) and Th exposures ($1 = 0.18 \pm 0.09$ nM and $10 = 8.7 \pm 3.4$ nM). Bacteria genus represented were the top 20 amplicon sequence variants (ASV) obtained by analysing the 16s rRNA gene amplicon sequencing results. Sequences were binned to Amplicon sequence variants based on their taxonomy at genus levels. The top 20 ASV represented the maximum 33 % of the total genera found by the analysis, thus a scale zoom to 35 % was applied to the graphic to better illustrate the results. Values shown are the averages of replicate samples for micromeiofauna ($n = 8$) and bacteria ($n = 3$); for diatoms the eight sample replicates were pooled before counting. Diatom species are *Achnantheidium exiguum* (ADEG), *Stauroforma exiguiformis* (SEXG), *Fragilaria mesolepta* (FMES), *Eolimna minima* (EOMI), *Navicula* sp. 26 (NAVI26), *Navicula* sp. 22 (NAVI22), *Adlafia bryophila* (ABRY), *Nitzschia* cf. *acidoclinata* (NACD), *Nitzschia solgensis* (NSOL), *Navicula* aff. *reichardtiana* (NRCH), *Navicula exilis* (NEXI), *Fragilaria pectinalis* (FPEC), *Gomphonema pala* (GOPA), *Navicula* cf. *seminulum* (NSEM), undetermined 1-3 (XX1-3). 105

Figure 4.3. Number of individuals per mg of biofilm dry weight in control C0 (0.004 ± 0.002 nM) and Th exposures (C1 = 0.18 ± 0.09 nM and C10 = 8.7 ± 3.4 nM) as a function of time. A. Ciliates B. Rotifers (*Philodinidae*). A two-way ANOVA was performed to detect significant differences between treatments, as indicated by letters ($p < 0.05$; $n = 8$). 108

Figure 4.4. Principal component analysis (PCA) performed on taxonomic data (relative abundance and Shannon index of bacterial, diatom and micromeiofaunal communities) in biofilm in control C0 (0.004 ± 0.002 nM) and Th exposures (C1 = 0.18 ± 0.09 nM and C10 = 8.7 ± 3.4 nM) after 0, 1, 2 and 4 weeks of exposure (t_0 , t_1 , t_2 and t_4). Variables were classified in three groups using the K-means algorithm. Abbreviations: bacterial 16s gene copy number (Qt), Shannon indices of bacteria, diatoms and micromeiofauna (ShanBact, ShanDiato and ShanMeio respectively). Abbreviations of diatoms species names are described in Figure 4.2. 110

Figure 5.1. Schema of global experimental setup of biofilm Th exposition describe in Doose et al (submitted, chapitre 4), and the subsequent trofic transfer experiement..... 126

Figure 5.2. Biosynthetic pathways of polyunsaturated fatty acids in algae and invertebrates by desaturation and elongation (modified from Fadhlaoui et al. 2020, Monroig et al. 2018 and, Guschina and Harwood 2006)[3,10,60]. C18:2n-6 = linoleic acid; C20:4n-6 = arachidonic acid; C22:6n-3 = docosahexaenoic acid; C20:5n-3 = eicosapentaenoic acid; C18:3n-3 = linolenic acid, FAs shown in bold are known to accumulate in animal tissues with high concentration. The D12D: Δ 12-desaturase (in green) occurs only in algae, bacteria and protists of biofilm..... 134

Figure 5.3. Saturated (SFA), monounsaturated (MUFA) and polyunsaturated (PUFA) fatty acids measured in: A. biofilm samples after 4 weeks of exposure in control C0 (0.004 \pm 0.002 nM Th) or C10 (8.7 \pm 3.4 nM Th) (n = 6). B. in the snail *Lymnaea* sp. following 4 weeks of feeding with C0 (9.4 \pm 4.4 ng mg⁻¹ dw) or C10 (11.6 \pm 1.4 x10³ ng mg⁻¹ dw) biofilm. Significant differences between the two biofilm or grazer's conditions for each fatty acid are shown by *** (p < 0.001), ** (p < 0.01), * (p < 0.05) and \square (p < 0.1), one-way ANOVA (n = 6, except Th-exposed biofilm group n = 5)..... 135

Figure 5.4. Principal component analysis (PCA) realized on FAs data of samples of biofilms and snails, under control and Th-exposure conditions. n = 6, except Th-exposed biofilm group for which n = 5. Abbreviations: BCtrl (control biofilm), BCTh (exposed biofilm), SCtrl (control snails), SCTh (exposed Snails)..... 139

Figure 6.1. Résultats issus et traduit de Tsuruta et al. (2006) [19] : bioaccumulation du thorium par les cellules au repos de divers microorganismes suspendus dans 100 mL d'une solution à pH 3,5 contenant 50 μ M de Th pendant 1 h. GPB: bactéries gram-positives, A: actinomycètes, GNB: bactéries gram- négatives, F: champignons, Y: levures 155

Figure 6.2. Schéma illustrant les effets directs et indirects pouvant intervenir dans les communautés périphytiques soumise à une contamination inspiré de Proia et al. (2012) [59] 163

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 2.1. Composition de la solution d'exposition	50
Tableau 2.2. Concentrations en thorium mesurées dans les échantillons témoins et contrôles des expériences de prise en charge à court terme 1,2 et 3. Les valeurs correspondent aux moyennes \pm les écarts-types	56
Tableau 2.3. Concentration totale en Th dans les cellules de <i>Chlamydomonas reinhardtii</i> (CR) après 1 h de contact avec les milieux d'exposition dans les expériences de prise en charge à court terme et de fractionnement subcellulaire.....	60
Table 3.1. Physicochemical parameters (mean \pm standard error; n = 3) in the C0, C1 and C10 exposure conditions during the 4 weeks of exposure.	78
Table 4.1. Physicochemical conditions measured in the different exposure treatment over the 4 weeks of exposure. Values are presented as means \pm standard deviations (n = 4)	100
Table 5.1. Fatty acid composition of control biofilm, Th exposed biofilm and grazers (<i>Lymnaea</i> sp., control group and group feeding on contaminated biofilm). Values are shown as % mean \pm SEM for each biofilm or grazer's conditions (n = 6, for control biofilm and grazer, n = 5 for exposed biofilm). The significant differences between biofilm or grazer's conditions correspond to * p < 0.05; ** p < 0.01 and *** p < 0.001 (one-way ANOVA, n = 6). U/S = unsaturated to saturated fatty acid ratio, Σ n-3 = n-3 unsaturated fatty acid sum, Σ n-6 = n-6 unsaturated fatty acid sum and Σ n-9 = n-9 unsaturated fatty acid sum.....	129
Table 5.2. Thorium content in control (C0) and Th-exposed (C10) biofilms after 4 weeks of exposure and in the grazer <i>Lymnaea</i> sp. fed for 4 weeks with C0 and C10 biofilms, the significant differences between biofilm or grazer Th content is indicated by * (ANOVA, p < 0.05, n = 6).....	134
Table 5.3. Estimated fatty acid desaturase and elongase activities in biofilms and grazers from different exposure conditions. Values are shown as % mean \pm SEM for each condition (n = 6, except for exposed biofilm n = 5). D9D: Δ 9-desaturase (stearoyl-CoA-desaturase, $^{16:1n-7/16:0}$ and $^{218:1n-9/18:0}$); D12D: Δ 12-desaturase	

(18:2n-6/18:1n-9); D15D: Δ^{15} -desaturase (18:3n-3/18:2n-6), Δ^6 -desaturase (18:3n-6/18:2n-6 and 18:4n-3/18:3n-3) and elongase: ELOVL (18:0/16:0)..... 136

Tableau 6.1. Coefficients de Spearman et p value associés aux tests de corrélation entre les concentrations de thorium mesurées dans chaque fraction du biofilm avec les quantités de protéines et de polysaccharides mesurées dans ces mêmes fractions (n = 8). 152

Tableau 6.2. Coefficients de Spearman et p value associés aux tests de corrélation entre les concentrations de thorium mesurées dans chaque fraction du biofilm avec le nombre d'individus de chaque taxon de microméiofaune comptés dans le biofilm (n = 8). 158

Tableau 6.3. Coefficients de Spearman et p value associés aux tests de corrélation entre les concentrations de protéines et de polysaccharides mesurées dans chaque fraction du biofilm avec le nombre d'individus de chaque taxon de microméiofaune comptés dans le biofilm (n = 8). Abréviations : fraction non désorbable (ND), individus total (Ind Tot), Nema Tot (nématodes total), Nema G (grand nématode), Nema M (nématode moyen), Nema P (petit nématode). 169

LISTE DES ABRÉVIATIONS

ADEG *Achnanthydium exiguum*

ADNr 16s ADN codant pour la sous-unité du ribosome

AEAs activités enzymatiques anti-oxydantes

AEE activités des enzymes extracellulaires

APX ascorbate peroxydase

ASV amplicon sequence variants

BCG Biological Condition Gradient

C20/4n6 acide arachidonique

CAT catalase

CE₅₀ concentrations effectives 50%

cell-X-M complexes membranaires

Chl a chlorophyll a

CR *Chlamydomonas reinhardtii*

DL₅₀ doses létales 50 %

DTPA l'acide diéthyl-triamine-penta-acétique

EDTA acide éthylène-diamine tétra-acétique

EOMI *Eolimna minima*

EPS substances polymériques extracellulaires

EPSs substances polymériques extracellulaires solubles

EROs espèces réactives de l'oxygène

GPX glutathion peroxydase

GSH glutathion

HAPs hydrocarbures aromatiques polycycliques

HDP protéines instables à la chaleur

HPLC chromatographie liquide haute performance

HSP protéines stables à la chaleur

ICP spectrométrie à plasma à couplage inductif

IRTF analyse infrarouge à transformée de Fourier

L ligand

LPO peroxydation lipidique

M métal

MCLR microcystin-LR

MDA malondialdéhyde

MDAsc monodehydroascorbate

MIL modèle de l'ion libre

MLB modèle du ligand biotique

MOPS acide 3-morpholino-1-propanesulfonique

MUFAs acide gras monoinsaturés

M^Z+ cation métallique

NanoSIMS Nanoscale secondary ion mass spectrometry

ND fraction non désorbable à l'EDTA

PCA Principal component analysis

Phyto-PAM Pulse Amplified Modulated fluorometry

PS *Raphidocelis subcapitata*

PUFAs acide gras polyinsaturés

qPCR réaction de polymérisation quantitative en chaine en temps réel

SEM microscopie électronique à balayage

SEXG *Stauroforma exiguiformis*

SFAs acide gras saturés

SOD superoxyde dismutase

TEM microscopie électronique en transmission

Th Thorium

US EPA l'agence de protection environnementale des États-Unis

X sites biologiques

Zr Zirconium

γ -ECS γ -glutamylcysteine synthase

1 INTRODUCTION

1.1 Mise en contexte

La présence d'eau liquide est reconnue depuis longtemps comme un facteur essentiel au développement de la vie sur la planète. Au-delà de ses multiples fonctions biologiques, elle joue un rôle primordial dans le cycle des éléments, remobilisant et transportant la matière des continents dans les bassins versants vers les océans. Nos sociétés en sont fortement dépendantes et ne cessent d'accroître leurs besoins, particulièrement en eau douce [1]. Hormis le besoin en eau potable, le secteur agricole est le premier consommateur d'eau douce avec environ 70 % des prélèvements annuels. Si l'eau recouvre 72 % de la surface terrestre, l'eau douce, quant à elle, ne représente seulement que 2,5 % des réserves en eau mondiales [2] et dans un contexte de changement climatique, les demandes grandissantes de cette ressource représentent un véritable défi pour les sociétés actuelles et futures. L'intensification des activités anthropiques de ces deux derniers siècles exerce des pressions toujours plus complexes sur les écosystèmes aquatiques dépassant parfois leurs capacités de résilience. Afin de protéger ces ressources, des outils de suivi de la qualité des eaux sont mis en place par les gouvernements de certains pays [3]. Le développement de ces outils est dépendant des avancées techniques, notamment de la capacité des laboratoires à détecter et doser les contaminants parfois présents dans les eaux en très faibles concentrations. Leur amélioration dépend également des avancées sur la compréhension du comportement des polluants dans les milieux aquatiques ainsi que leurs possibles impacts sur le biote.

L'intensification mondiale de la demande en métaux est à l'origine d'une remobilisation de plus en plus importante des éléments métalliques dans les milieux aquatiques. Si nos connaissances sur les impacts des métaux dans l'environnement se sont fortement développées depuis les années 80, l'écotoxicité des métaux tétravalents (ex. : thorium, Th et zirconium, Zr) reste actuellement encore peu étudiée. La caractérisation de leurs impacts sur les producteurs primaires, et notamment sur le biofilm périphytique, pourrait, à terme, contribuer à l'amélioration d'outils de suivi de la contamination métallique existants tels que L'Indice Diatomées de l'Est du Canada [4] ou l'Indice Biologique Diatomées [5] et ainsi à mieux prévenir la dégradation et la contamination des écosystèmes aquatiques. Le biofilm périphytique d'eau douce est déjà considéré comme un biomoniteur potentiel pour plusieurs métaux et contaminants organiques [6]. L'étude du biofilm présent dans ces milieux permettrait d'évaluer la biodisponibilité réelle du Th et du Zr dans l'eau tout en intégrant les variations temporelles de contamination et les facteurs

environnementaux spécifiques du lieu. Le périphyton réalise également des fonctions écosystémiques très importantes comme la production primaire, la dégradation de la matière organique qui favorise la remobilisation des nutriments dans les milieux aquatiques. La perturbation des communautés microbiennes tant sur leur croissance que sur leur structure pourrait avoir des répercussions à l'échelle de l'écosystème. L'étude des effets du Th et du Zr sur la structure des communautés périphytiques et sur la qualité nutritionnelle du biofilm (composition en acides gras, protéines et polysaccharides) permettrait d'avoir une première idée sur les potentiels dangers de ces métaux sur les milieux d'eau douce. Ainsi, ce projet de doctorat vise à améliorer les connaissances sur l'impact de métaux tétravalents sur les microorganismes des milieux dulcicoles et s'inscrit dans ces démarches essentielles à la préservation des écosystèmes aquatiques.

1.2 Métaux et milieu aquatique

1.2.1 Source des métaux dans l'environnement

Les métaux sont contenus naturellement dans la croûte terrestre. Ils peuvent être remobilisés et redistribués dans les divers compartiments environnementaux par érosion des roches ou à la suite de remaniements géologiques. Leur dispersion dans l'environnement peut être influencée par quatre mécanismes principaux [7]:

- le transport par les eaux : lessivage et percolation dans les sols
- les phénomènes de diffusion dans les matrices (eaux, sédiments et sols)
- le transport biologique : internalisation, excrétion, transfert trophique
- le transport aérien.

Contrairement à certains contaminants organiques tels que les pesticides, les métaux sont naturellement présents dans tous les milieux. On parle ainsi de fond géochimique des métaux.

1.2.2 Relation entre les métaux et le vivant

On peut distinguer deux catégories de métaux en fonction de leur importance pour le vivant. Les métaux dits « essentiels » jouent un ou plusieurs rôles biologiques [8]. Les métaux dits « non-essentiels », eux, n'exercent pas de rôle biologique selon l'état des connaissances actuelles. Bien que certains métaux soient essentiels, leur présence insuffisante ou en excès dans le cytoplasme peut induire une toxicité pour les cellules. Ainsi, depuis l'apparition de la première cellule vivante, ces dernières se sont adaptées à leurs milieux et ont développé des mécanismes qui permettent

de maintenir un équilibre entre les métaux présents dans le milieu et le besoin des cellules. Ce processus est appelé homéostasie [9]. Depuis plus de 200 ans, les activités humaines s'intensifient et modifient les cycles biogéochimiques des éléments. Ces modifications sont si intenses que de nombreux articles scientifiques et revues décrivent le début d'une nouvelle ère géologique nommée Anthropocène [10]. Ainsi les organismes des milieux aquatiques se retrouvent parfois face à des concentrations métalliques enrayant leurs capacités de régulation homéostatique. Les deux métaux étudiés dans ces travaux, le thorium (Th) et le zirconium (Zr) n'ont pas de rôle biologique connu. Ainsi une interaction entre ces métaux et les organismes vivants ne pourra qu'être potentiellement désavantageuse pour ces derniers.

1.2.3 Mécanismes de prise en charge des métaux par les organismes dulcicoles

De nombreux métabolismes cellulaires dépendant des métaux essentiels, les cellules ont développé des mécanismes de prise en charge au cours de l'évolution (Figure 1.1) :

- Les transports passifs :
 - Diffusion passive à travers la membrane plasmique : ce mécanisme permet aux éléments de pénétrer par simple diffusion à travers la membrane cellulaire et ne concerne que les molécules lipophiles. Certains métaux peuvent être assimilés de cette manière dans des cas très spécifiques, comme celui du méthyl mercure.
 - Les canaux ioniques : ce sont des protéines formant un passage dans la membrane plasmique. Ils sont relativement spécifiques, un type de canal ne laisse passer que certains types d'ions. Comme la diffusion passive, ce mécanisme ne nécessite pas de dépense d'énergie de la part de la cellule et fonctionne par osmolarité. Il permet de réguler les échanges d'ions entre le milieu intra et extracellulaire en se fermant et s'ouvrant selon les besoins.
- Les transports actifs : ce mécanisme met en jeu des structures appelées transporteurs cellulaires. Ces transporteurs permettent de faire pénétrer contre les gradients de concentration des éléments ou des molécules dans le milieu intracellulaire au moyen d'une dépense énergétique.

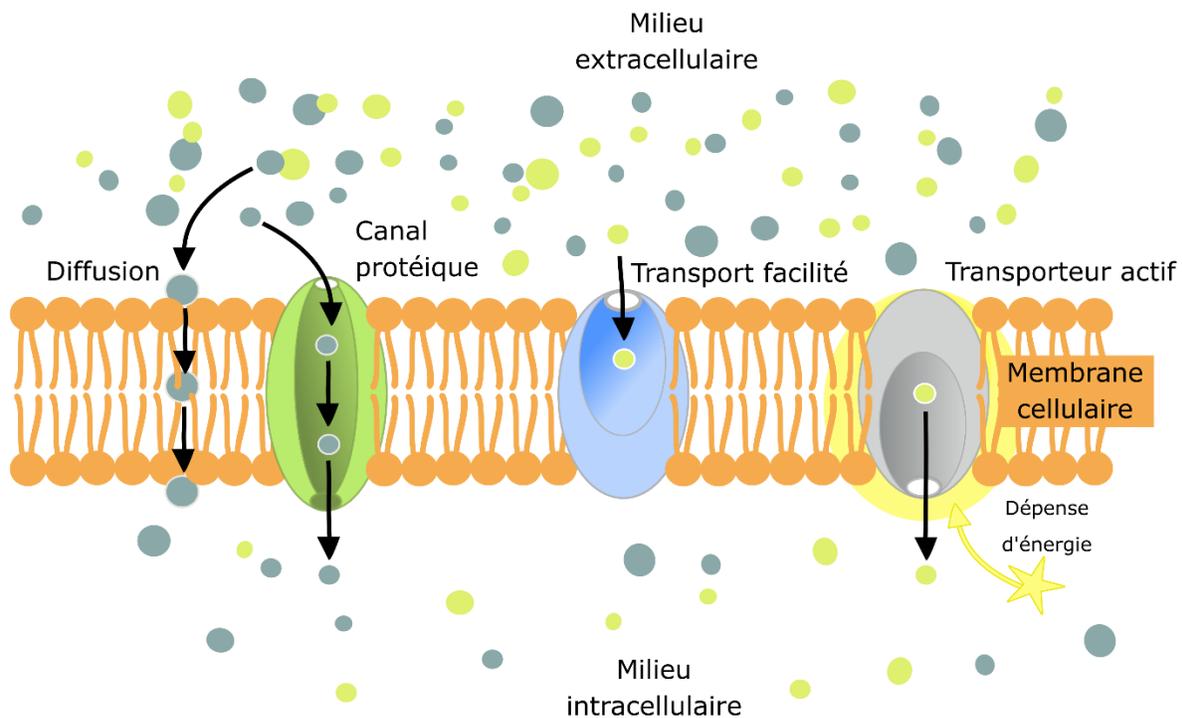


Figure 1.1. Schéma des types de transports membranaire à la surface des cellules

Le transport par diffusion passive ne concerne pas les molécules chargées : les transporteurs actifs et les canaux ioniques sont les voies d'entrée privilégiées des cations dans la cellule [11]. Même si les métaux non-essentiels ne jouent pas de rôle biologique, ils peuvent être également pris en charge. Possédant parfois des caractéristiques physicochimiques et structurales proches de métaux essentiels, ils empruntent les mêmes voies d'entrées cellulaires. C'est le cas par exemple du cadmium Cd^{2+} qui emprunte les transporteurs du calcium Ca^{2+} chez le blé tendre *Triticum aestivum* [12], mais également ceux du zinc (Zn^{2+}) [13] et du manganèse (Mn^{2+}) [14] pour l'algue verte *Chlamydomonas reinhardtii* et la diatomée marine *Thalassiosira oceanica* respectivement. Afin de pouvoir prédire les impacts de contaminations métalliques sur les organismes aquatiques, des modèles mathématiques de prise en charge des métaux ont été élaborés. Ils tentent d'intégrer tous les paramètres biologiques et physicochimiques en jeu pour mettre en relation la concentration du métal dans le milieu et son internalisation par les cellules.

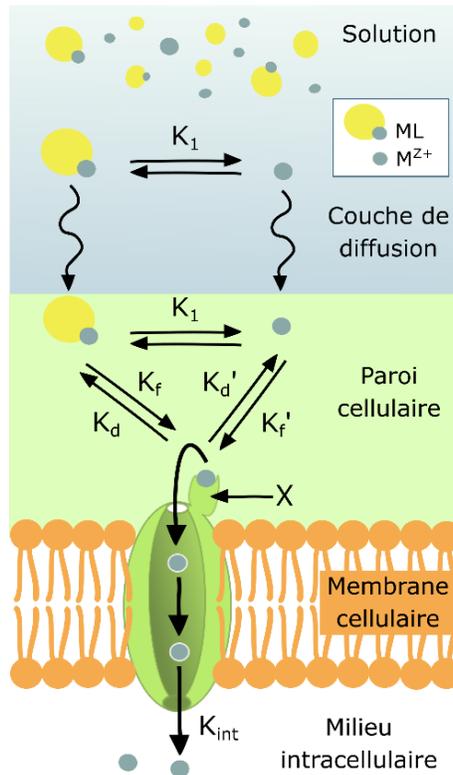


Figure 1.2. Mécanisme de *prise en charge* d'un cation métallique M^{Z+} selon le modèle de l'ion libre [10].
Abréviations : L (ligand), ML (complexe ligand-métal), X (transporteur membranaire)

Modèles de prise en charge

Dans la grande majorité des cas, la biodisponibilité et la toxicité dépendent de la concentration en ions libres des métaux dissous [15]. Ainsi, en 1983, Morel a formulé le modèle de l'ion libre (MIL, FIAM en anglais) prédisant l'impact toxique d'un métal cationique sur les organismes aquatiques en fonction de la concentration en métal libre dans l'eau [16,17]. Ce modèle tient compte des interactions ligand-métal (Figure 1.2) et dépend de plusieurs hypothèses décrites comme suit. La membrane cellulaire est considérée comme l'interface principale d'interaction entre le métal (M) et l'organisme, cette interaction se traduisant par la formation de complexes membranaires cell-X-M au niveau de sites biologiques (X). Si l'internalisation du métal n'induit pas de manière systématique une réponse toxique, lorsque des dommages sont causés par celui-ci, ils s'opèrent essentiellement dans le milieu intracellulaire. Ainsi, le MIL considère que la réponse toxique d'un organisme à une contamination métallique est dépendante de l'internalisation de l'ion libre. Le modèle considère également que la réponse biologique dépendant de ce complexe, le nombre de ligands biotiques à la surface cellulaire cell-X et les propriétés membranaires demeurent constants. Ainsi les mécanismes de transport par diffusion

passive à travers la bicouche phospholipidique et les mécanismes d'acquisition de tolérance des organismes sont considérés comme négligeables. L'internalisation du métal par le biais des protéines transmembranaires est définie comme l'étape limitante comparée à sa diffusion dans le milieu et sa fixation aux sites biologiques.

D'après la figure 1.2, le MIL tient compte de plusieurs réactions. La première concerne la liaison du cation métallique M^{Z+} à un ligand L présent dans le milieu pour former le complexe ML. La constante conditionnelle K_1 de cette réaction peut se calculer à partir de leur concentration de la manière suivante (équation 1) :

$$K_1 = \frac{[ML]}{[M^{Z+}] \cdot [L]}$$

Une seconde équation permet de prendre en compte la complexation entre les transporteurs membranaires cell-X⁻ et l'ion libre M^{Z+} . La constante conditionnelle K_f de cette réaction peut se calculer à partir de leur concentration de la manière suivante (équation 2) :

$$K_f = \frac{\{cell - X - M\}}{[M^{Z+}] \cdot \{cell - X^{-}\}}$$

La complexation entre le métal lié aux ligands sous forme ML et le site biologique de transport membranaire cell-X⁻ nécessite la perte du ligand L. Elle dépend donc de la stabilité et de la cinétique de dissociation du complexe ML.

Ces équations montrent que, selon le MIL, la réponse biologique est proportionnelle à la concentration en ion libre. Ce modèle a été testé et validé pour divers métaux principalement pour des modèles algaux [18]. Cependant le MIL ne tient pas compte de la formation possible d'un complexe ternaire cell-X-ML ni du nombre de sites biologiques disponibles. Le MIL a été élaboré à partir de données prélevées en milieu marin où le pH et la concentration en cations majeurs varient très peu. Les prédictions de toxicités métalliques par le MIL sur les organismes dulcicoles s'avèrent parfois inadaptées en fonction des caractéristiques physicochimiques des eaux. Meyer et al. (1999) ont démontré que le MIL n'était plus un bon prédicteur de l'impact du nickel (Ni) et du cuivre (Cu) sur les branchies de tête de boule (*Pimephales promelas*) lorsque la dureté de l'eau augmentait [19]. En effet, les doses létales 50% (DL₅₀) augmentaient de 10 fois lorsque la dureté de l'eau était également multipliée d'un facteur 10. Les ions Ca^{2+} étant les compétiteurs majeurs du Ni et du Cu pour les sites biologiques des branchies, la concentration en ions libres de ces deux métaux n'était plus le seul facteur majeur déterminant de leur internalisation et donc de leur toxicité. Cette compétition des ions divalents présents naturellement dans le milieu, essentiellement avec le calcium (Ca^{2+}) et le magnésium (Mg^{2+}), se

révèle donc protectrice vis-à-vis des métaux aux sites récepteurs à la surface des membranes [19]. Une étude plus récente menée par Heijerick et al. en 2002 [20] montrait également qu'une augmentation de la dureté de l'eau induisait une baisse de toxicité du zinc (Zn) sur l'algue verte *Pseudokirchneriella subcapitata*. En effet, des concentrations en Ca^{2+} et Mg^{2+} de 0,25 à 2,5 mM augmentaient respectivement de 1,7 et de 6 à 6,5 fois les valeurs de concentrations effectives 50 % (CE_{50}) calculées en fonction de la croissance algale (biomasse) et des concentrations en Zn^{2+} après 72 h d'exposition. Afin d'affiner la modélisation en fonction de la physicochimie du milieu, le modèle du ligand biotique (MLB) a été élaboré à partir du MIL pour prédire la toxicité des métaux en tenant compte de la présence de ligands et de cations dits « protecteurs » capables d'interagir avec les sites biologiques et les métaux [20–23]. Le MLB semble prédire efficacement l'impact des cations métalliques divalents sur les organismes. Cependant, il semble que le modèle soit moins efficace dans le cas des métaux trivalents [24]. La présence de ligands organiques tels que les acides fulviques ou humiques dans le milieu d'exposition semble également influencer les réponses des organismes aux contaminations métalliques [25]. De plus, l'accès des cations aux sites de transport peut être favorisé par leur liaison à des molécules organiques de faibles poids moléculaires présentes dans le milieu [11].

1.2.4 Mécanismes de toxicité des métaux

Les métaux non-essentiels sont connus pour suivre le modèle de réponse biologique présenté en figure 1.3. Pour de faibles concentrations, les organismes restent d'abord indifférents à leur présence. Passé un certain seuil de concentration spécifique intracellulaire (dose) de l'espèce et du métal étudié, la contamination métallique induit une réponse toxique chez les organismes pour suivre une courbe dose réponse. Les métaux non-essentiels ayant des caractéristiques physicochimiques semblables à celles de métaux essentiels peuvent interférer dans les voies métaboliques, la régulation et le transport cellulaires dans lesquels ces derniers sont impliqués. Ainsi, ils peuvent induire une toxicité pour de faibles concentrations.

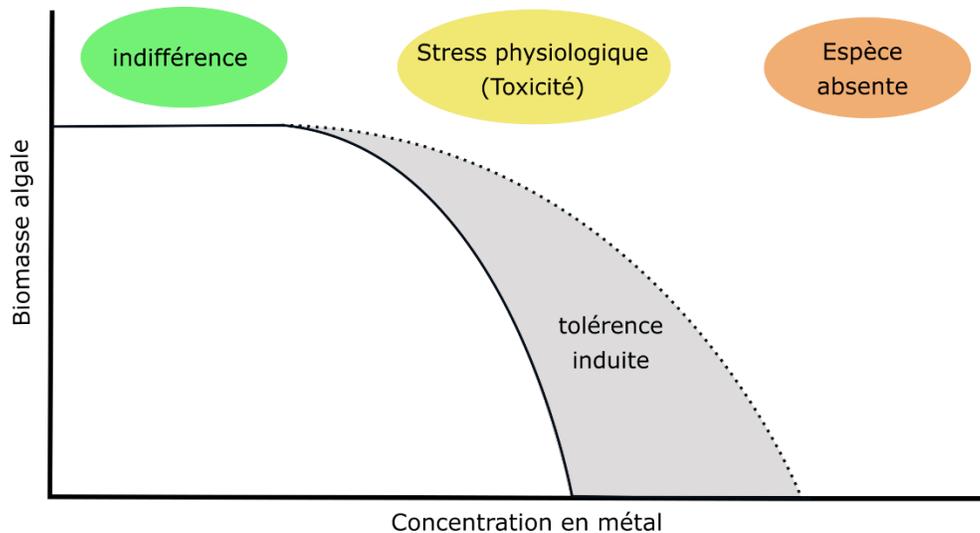


Figure 1.3. Réponse toxique type des algues à une contamination par un métal non-essentiel d'après Simkiss 1989 [26].

Perturbations de la prise en charge des métaux essentiels

Une des conséquences toxiques de la contamination métallique peut être observée au niveau de l'homéostasie cellulaire et la prise en charge des métaux essentiels. Les éléments métalliques non-essentiels peuvent en effet se substituer aux ions métalliques essentiels au niveau des transporteurs membranaires et donc limiter l'entrée en ions essentiels dans les cellules. De plus, les contaminations métalliques engendrent parfois des modifications biochimiques de la paroi et de la membrane cellulaire dont la dépolarisation peut perturber les échanges transmembranaires [27,28]. Le fer (Fe) et le Zn engendrent ainsi une baisse d'internalisation d'acide silicique chez la diatomée marine *Thalassiosira weissflogii* [29]. Une réponse similaire chez la diatomée d'eau douce *Asterionella formosa* a été observée avec la présence de Cd perturbant les perméases responsables du transfert des phosphates et de la silice [30].

Domages physiologiques et stress oxydant

Les métaux internalisés ne sont quasiment jamais à l'état d'ion libre, ils sont complexés et stockés sous des formes non toxiques dans le cytoplasme grâce à des peptides tels que les métallothionéines, les phytochélatines ou encore, par exemple, séquestrés dans des granules de phosphate. Cependant, lorsque les métaux sont en concentration trop forte dans la cellule, ces mécanismes de stockage peuvent être saturés. Les ions métalliques peuvent alors endommager le matériel cellulaire notamment par la génération d'un stress oxydant tel que présenté figure 1.4. Ce dernier se traduit par la production d'espèces réactives de l'oxygène (EROs) telles que le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) ou l'oxygène radicalaire ($O_2^{\cdot-}$). Ces espèces très réactives vont

endommager les lipides des membranes cellulaires ainsi que celles des organites telles que les chloroplastes ou les mitochondries. Ces dommages se traduisent par la peroxydation lipidique entraînant la génération de malondialdéhyde (MDA) et la perte de l'homéostasie membranaire [28,31]. Le choc oxydant peut également porter atteinte à l'ADN par la formation de cassures ou d'adduits et donc s'avérer mutagène [32]. Des enzymes cytoplasmiques telles que la superoxyde dismutase ou la catalase permettent de réduire les espèces oxydantes naturellement présentes. Cependant, ce mécanisme de défense peut s'avérer insuffisant lorsque les concentrations métalliques intracellulaires sont trop élevées.

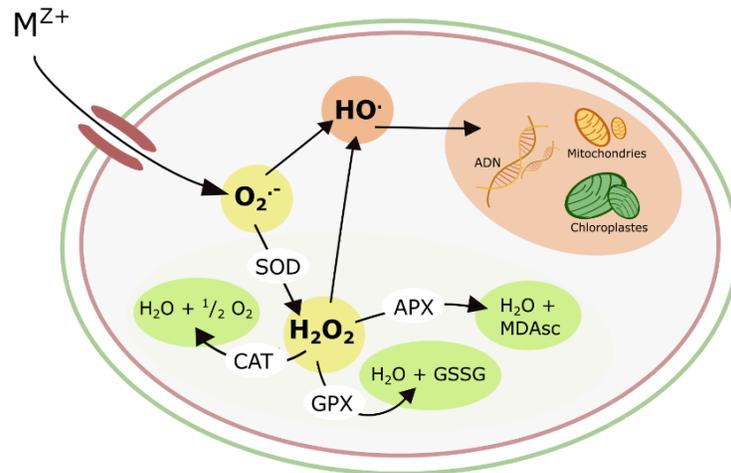


Figure 1.4. Schéma général des mécanismes de génération du stress oxydatif par le cation métallique M^{Z+} et ses conséquences dans les cellules algales suite à une internalisation (adapté de Pinto et al., 2003). Les abréviations : superoxyde dismutase (SOD), catalase (CAT), ascorbate peroxydase (APX), glutathion peroxydase (GPX), molécules de glutathion liées par une liaison disulfide (GSSG), monodehydroascorbate (MDA_{sc})

1.3 Le thorium

1.3.1 Propriétés

Le thorium (Th), métal de numéro atomique 90, est l'actinide tétravalent le plus répandu et a été isolé en 1828 par Jöns Jacob Berzelius [33,34]. Le Th est naturellement radioactif et possède de nombreux radio-isotopes. Le ^{232}Th est le plus répandu avec une demi-vie de 14,1 milliards d'années. C'est un émetteur α (90 %), β (1 %) et γ (9 %). L'ion Th^{4+} est un cation de classe A, c'est-à-dire que sa couche électronique supérieure est saturée en électrons ce qui lui donne une géométrie « sphérique ». Cette géométrie rend son enveloppe d'électrons peu déformable par les charges électriques d'un quelconque autre ion à proximité. Ainsi le thorium fait partie des métaux « durs » et préfère l'oxygène comme donneur d'électrons. Il forme majoritairement des

hydroxo-complexes et l'ion libre ne semble être présent que pour des pH inférieurs à 4. Il n'existe en solution que pour un degré d'oxydation IV, le potentiel d'oxydation ne semble donc pas influencer sa spéciation [35].

1.3.2 Sources et utilisations

Les différents compartiments environnementaux peuvent s'enrichir en Th par diverses sources anthropiques. Les industries principalement concernées par les rejets de Th sont rattachées à l'utilisation d'engrais phosphatés (activités de $5,9 \times 10^{-3}$ à $6,6 \times 10^{-2}$ Bq·g⁻¹) [36,37] ainsi qu'à la production, l'utilisation et au traitement des combustibles nucléaires. En effet, le Th est présent dans les minerais d'uranium (U) dans une proportion moyenne d'environ 3,5 atomes de Th par atome d'uranium. Par ailleurs, le ²³²Th est ce que l'on nomme un matériau fertile. Il possède un descendant fissible, l'²³³U [38]. Les accidents survenus dans les centrales nucléaires sont aussi une grande source de contamination au Th. Même si les concentrations dans les sols mesurées à la suite de ces accidents ne dépassaient pas celles retrouvées dans les zones naturellement riches, les retombées atmosphériques de l'accident survenu à Tchernobyl ont augmenté la teneur en Th dans les sols dans un rayon de 140 km [39].

En ce qui concerne la production directe de Th, le principal minerai exploité à cet effet est la monazite (La, Ce, Th)PO₄. Les réserves mondiales sont évaluées à 2 millions de tonnes. Le premier producteur mondial de Th est l'Afrique du Sud, mais d'importants gisements sont situés en Inde et au Brésil, ainsi qu'en Australie, en Indonésie, en Malaisie et à Madagascar. Il est utilisé dans une grande variété de domaines en raison de diverses propriétés [40] :

- Résistance à la chaleur : en aéronautique il permet de rendre les métaux résistants à l'oxydation et à la chaleur. D'autres alliages, tels que la thorie (oxyde de Th) avec des céramiques, sont utilisés comme source d'électrons en électronique. Ils rentrent dans la fabrication de creusets et de fours à haute température en métallurgie. La thorie permet également la production de filaments de tungstène dans les lampes à incandescence.
- Propriétés catalytiques : la thorie permet de catalyser des réactions d'hydrogénation et de déshydrogénation utiles dans le craquage des pétroles.
- Propriétés radioactives : le Th étant un matériau fertile, il est envisagé en tant que nouveau combustible pour les centrales nucléaires. Des expériences sur des prototypes de réacteurs sont menées en Inde, au Canada et en Chine.

1.3.3 Le thorium dans l'environnement

1.3.3.1 Concentrations dans les eaux

Dans les océans, les concentrations de Th varient de $7 \text{ ng}\cdot\text{L}^{-1}$ à $1 \text{ }\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ ($0,04$ à 5 nM) en moyenne [41]. À pH 8, le Th se retrouve principalement, en proportions à peu près équivalentes, sous forme d'hydroxo- et de carbonato-complexes [33,42,43]. Dans les eaux continentales, le ^{232}Th est souvent associé aux particules et matières en suspension. Les concentrations peuvent grandement varier dépendamment des bassins versants ainsi que de l'analyse et des méthodes d'échantillonnage. Dans les eaux de surface et souterraines, sans distinction entre les formes dissoutes et colloïdales, elles sont généralement comprises entre $0,003$ et $12 \text{ }\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ ($0,01$ et 53 nM) [44–47]. Elles peuvent varier dans les eaux courantes de $0,2$ à $480 \text{ }\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ ($0,9 \text{ nM}$ à $2 \text{ }\mu\text{M}$) [48]. Dans des réservoirs d'eau stagnante, des concentrations allant jusqu'à $660 \text{ }\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ ($2,8 \text{ }\mu\text{M}$) ont été mesurées [49]. Ce métal peut également être présent en grande quantité dans les réservoirs d'eau voisins d'exploitations d'autres éléments. Il a été retrouvé à hauteur de $300 \text{ }\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ ($1,3 \text{ }\mu\text{M}$) dans des lacs de mines d'étain [50], et entre 800 et $1400 \text{ }\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ (3 et $6 \text{ }\mu\text{M}$) dans l'eau de drainage d'exploitations d'uranium et de minerais de fer du sud-est du Brésil [51]. La contamination des écosystèmes au Th peut également provenir de divers rejets atmosphériques [52,53].

1.3.3.2 Spéciation et transport

Le thorium est retrouvé sous forme d'hydroxyde $\text{Th}(\text{OH})_4$ peu soluble dans les eaux douces et cela pour toutes les conditions rédox et de pH habituellement rencontré en milieux naturels. Il est donc peu mobile entre les différents compartiments des milieux aquatiques [33,54–57]. Le Th se déplace essentiellement lorsqu'il est lié à des supports solides tels que les matières en suspension et sédimentaires. Une grande partie des activités mesurées dans les eaux filtrées ($<0,45 \text{ }\mu\text{m}$) proviennent aussi des colloïdes, tels que la matière organique dissoute, avec laquelle le thorium forme des complexes réversibles [54,58]. Il peut être fortement complexé par des ligands organiques naturels tels que les acides humiques et fulviques [59]. De plus, il peut former des complexes avec des ligands inorganiques comme les carbonates et les phosphates. Ces derniers étant présents entre $0,005$ et $0,05 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ [60] dans les eaux naturelles avec lesquels il précipite facilement [57].

1.3.3.3 Toxicité

Certaines études en toxicologie fondamentale et en épidémiologie peuvent également apporter certains renseignements sur les perturbations métaboliques induites par ce métal. Par exemple, des études menées sur des ouvriers confrontés à des poussières de Th ont montré que ces dernières favorisaient l'apparition de cancers, de maladies pulmonaires et pancréatiques des années après la période d'exposition. Des impacts au niveau du matériel génétique ont également été observés ce qui serait potentiellement expliqué par la capacité du Th de se complexer avec les groupements phosphates de la molécule d'ADN. Il peut également produire des malformations durant la gestation et induire la stérilité chez l'homme [52].

En ce qui concerne la toxicité environnementale du Th, peu d'études ont été réalisées en écotoxicologie [61]. Une grande partie des travaux concernant les interactions du Th avec le biote se focalisent sur la biosorption du Th par des microorganismes (en majorité les bactéries, les champignons et parfois les microalgues vertes), ne dissociant pas les phénomènes d'internalisation et d'adsorption [62–66]. En 1982, Poston a étudié en laboratoire l'impact sur la truite arc-en-ciel *Oncorhynchus mykiss* de concentrations en Th de 5,2 nM ($1,2 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$) et de 4,3 nM ($1 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$). Il a déduit de ses résultats que les truites n'internalisaient pas de Th, le métal s'accumulant uniquement dans le tractus digestif dû à l'ingestion de matière particulaire (nourriture, matière fécale) sur lesquelles le Th peut s'adsorber. Cependant, une étude plus récente sur la bioaccumulation du Th et l'induction de stress oxydant chez les juvéniles de poisson chat argenté *Rhamdia quelen*, menée en laboratoire par Correa et al. en 2009 [44], montrait une augmentation progressive des concentrations dans les branchies, le foie, les reins et la peau en fonction de la concentration en Th mesurée dans le milieu. Les concentrations de Th dans chaque condition d'exposition variaient de $25,3 \pm 3,2$ à $609 \pm 61 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ (0,1 et $2,6 \mu\text{M}$). Les mesures d'activités enzymatiques anti-oxydantes (AEAs), catalase et glutathion-S-transférase, ainsi que la mesure de la peroxydation lipidique ont montré que le Th déclenchait un stress oxydant dans les tissus hépatiques et musculaires. Cependant si les AEAs se trouvaient stimulées pour les faibles concentrations d'exposition, elles diminuaient pour les plus fortes doses. En ce qui concerne les algues, Evseeva et al. en 2010 ont comparé les effets du Th^{232} et du cérium (III) (Ce) sur l'algue verte *Chlorella vulgaris* [67]. Les CE_{50} de ces deux métaux étant de 15,4 [IC 95 % = 13,9-17,1] et 35,7 [IC 95 % = 26,7-39,5] μM ($3,6 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ et $8,3 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ respectivement) montreraient que, dans ces conditions, le Th est plus toxique que le Ce. Cependant ces valeurs de CE_{50} semblent très élevées au regard des concentrations retrouvées dans l'environnement ainsi que de la solubilité du Th (partie 3.3.1, figure 3.3). De plus, les concentrations métalliques

ne semblent pas avoir été mesurées. Les auteurs travaillent donc avec des concentrations nominales dans des conditions de pH non précisées. La toxicité observée pourrait être due à des biais expérimentaux tels que la précipitation d'éléments nutritifs comme le phosphate après l'ajout de Th. L'addition d'un inhibiteur de γ -glutamylcystéine synthase (γ -ECS) jouant un rôle dans la biosynthèse du glutathion (GSH) dans les milieux d'exposition a augmenté l'impact du Ce sur les algues, mais n'a pas changé la réponse vis-à-vis du Th. Bien que la toxicité du Th observée dans ces travaux soit peut-être liée en grande partie à des effets indirects de la présence du Th, il est cependant intéressant de discuter de l'efficacité des mécanismes de détoxification étudiés. Le GSH est une molécule permettant de séquestrer les métaux internalisés dans la cellule et fait partie des principaux mécanismes cellulaires de détoxification vis-à-vis des métaux [68]. Les résultats tels que présentés dans cet article montraient que ces mécanismes semblent être inefficaces pour le Th. Les molécules de GSH fixent les métaux à l'aide de groupement thiol (-SH). Si ces groupements sont très affins pour les métaux de classe B, la structure sphérique et dure de la couche électronique du Th ne permet pas aux thiols de fixer facilement ce dernier.

1.4 Le zirconium

1.4.1 Propriétés

Le zirconium (Zr) est un métal de transition tétravalent de numéro atomique 40. Il fut extrait pour la première fois du zircon en 1789 sous forme d'oxyde par Martin Heinrich Klaproth à Berlin et isolé sous forme de métal en 1824 par Jöns Jacob Berzelius. Le Zr s'est fait connaître du public par la découverte, en 1999, d'un morceau de cristal de zircon en Australie datant de 4,4 milliards d'années, le plus vieil objet terrestre connu. Il possède cinq isotopes stables. Des radio-isotopes existent, résultant de leur synthèse ou de l'utilisation du métal dans l'industrie du nucléaire [69]. C'est un métal dur avec un état d'oxydation +IV. Sa structure électronique et sa charge sont similaires à celles du Th. Il est cependant moins lourd et moins volumineux. Sa forte charge concentrée dans sa petite taille lui confère une solubilité encore plus faible que celle du Th. Son affinité pour les atomes d'oxygène est telle que pour un pH nul il est retrouvé sous forme d'hydroxyde [70,71]. Ainsi l'ion libre Zr^{4+} n'existe pas dans les conditions environnementales. Cependant il peut former l'ion libre zirconyl ZrO^{2+} .

1.4.2 Sources et utilisations

Le Zr représente 0,0165 % de la croûte terrestre [72]. Son abondance est comprise entre 20 et 500 mg·Kg⁻¹. Il est principalement retrouvé sous forme d'oxydes et de silicates insolubles dans l'environnement, en particulier sous les formes :

- Le zircon : ZrSiO₄
- La baddeleyite ou dioxyde de zirconium : ZrO₂

Les apports de Zr dans l'environnement proviennent essentiellement du zircon retrouvé dans les sables de minerais lourds [73]. Cependant, l'augmentation de l'utilisation du Zr dans de nombreux domaines encourage la production minière de ce métal et mène à des rejets de plus en plus importants (Figure 1.5) [74–77]. La production annuelle mondiale de zircon s'élève à 1,25 million de tonnes dont les deux tiers sont assurés par l'Australie et l'Afrique du Sud. Les réserves estimées à 56 millions de tonnes, réparties principalement entre les États-Unis, le Brésil, l'Inde et l'Ukraine, permettraient au rythme de production actuel d'alimenter les marchés pendant 40 ans [78].

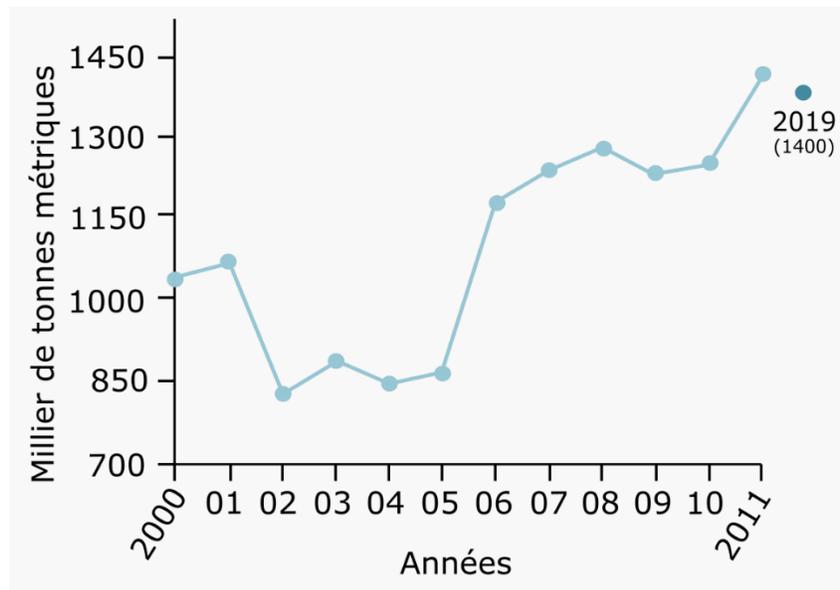


Figure 1.5. Production annuelle mondiale minière de Zr en tonnes (D'après le rapport USGS 2012) [77,78]

Le zirconium est utilisé dans divers domaines d'activités tels que :

- L'industrie nucléaire : du fait de sa transparence aux neutrons, il est utilisé dans le revêtement des combustibles nucléaires [76],

- L'industrie chimique et aéronautique : le Zr est utilisé comme revêtement protecteur pour manipuler des agents corrosifs, dans les moteurs à réaction ainsi que dans des alliages pour améliorer des caractéristiques mécaniques,
- Le traitement des eaux : des granules d'oxyde de Zr et de Fe peuvent également être utilisés pour retirer le fluorure de l'eau destinée à la consommation humaine [82]. Les hydroxydes amorphes de Zr sont également étudiés pour permettre l'adsorption des phosphates dans les rejets agricoles [83,84]. Ceci permet au phosphate de décanter en se liant durablement aux sédiments et ainsi réduire de manière satisfaisante l'eutrophisation en réduisant la croissance algale,
- Les effets spéciaux : le caractère pyrophorique du Zr ainsi que sa friction contre du sable de forte granulométrie engendre des étincelles.

1.4.3 Le zirconium dans l'environnement

1.4.3.1 Concentrations dans les eaux

Le Zr dissous dans l'océan est distribué de façon similaire aux nutriments avec des concentrations comprises de 12 à 95 pmol·Kg⁻¹ (environ 1,1 à 8,7 pM) de Zr en surface et jusqu'à 300 pmol·Kg⁻¹ (27,4 pM) en eaux profondes [72,85,86]. Schaller (1991) a mesuré des concentrations de Zr en eau douce entre 0,2 et 5,5 nM (0,02 et 0,5 µg·L⁻¹), sans distinction entre les formes dissoutes et solides du métal [70]. En ce qui concerne les eaux douces, il a mesuré de la même façon des concentrations variant de 0,02 à 0,2 nM (2 à 20 µg·L⁻¹). Dans le fleuve Saint-Laurent, les concentrations en Zr sont de 7,1 ± 4,5 ng·L⁻¹ (0,03 ± 0,02 nM) à l'embouchure et de 22 ± 7,8 ng·L⁻¹ (0,9 ± 0,03 nM) au niveau des rejets du traitement des eaux usées montréalaises. Ces résultats ont été obtenus après filtration des échantillons d'eau à 0,45 µm, ils correspondent donc à la fraction dissoute du Zr. Le suivi des flux d'eaux indiquaient que seulement 1 % du Zr mesuré dans le Saint-Laurent provient des effluents urbains [87].

1.4.3.2 Enjeux environnementaux et écotoxicité

Le Zr n'est pas actuellement considéré comme un contaminant prioritaire par l'agence de protection de l'environnement des États-Unis (US EPA) [88], mais sa consommation annuelle moyenne augmentant (de 3 % entre 2008 et 2019), ce métal tend à se retrouver plus fréquemment dans les milieux naturels qu'auparavant. Il est donc nécessaire d'établir les risques environnementaux qui lui sont associés [78]. De plus, on retrouve peu d'informations dans la

littérature concernant les interactions du Zr avec le biote [89]. De même que pour le Th, peu de données sont disponibles en écotoxicologie au sujet du Zr. Cependant des études réalisées sur des mammifères modèles ont permis de montrer que le Zr, affiné pour les groupements phosphatés, pouvait affecter beaucoup d'activités enzymatiques qui en sont dépendantes (ATPase, phosphatase, etc.) [90]. En ce qui concerne les organismes aquatiques, Couture et al. (1989) n'ont pas constaté d'effets toxiques aigus lors de leurs travaux [83]. Ils ont notamment réalisé un test de toxicité sur microplaque. La CE_{50} à 96 h sur la croissance de la microalgue *Selenastrum capricornutum* était de 13 μM ($2,6 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$). Des concentrations inhibitrices 50 % (CI_{50}) très élevées ont également été mesurées pour la croissance de *Chlorella kessleri* par Fujiwara et al. (2008), atteignant 1,5 mM ($136 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$) [91]. Cependant, ces valeurs très élevées ne sont pas réalistes vis-à-vis de la faible solubilité du Zr et des concentrations environnementales. Ces toxicités apparentes seraient dues à la complexation des nutriments et notamment du phosphate par le Zr dans le milieu qui formerait une espèce phosphatée précipitée ou moins disponible pour les algues. Garnham et al. (1993) [92] ont également étudié l'accumulation chez plusieurs espèces de microalgues et de cyanobactéries d'espèces polymériques solubles du Zr dont ils ont déterminé la forme comme étant $\text{Zr}_4(\text{OH})_8(\text{H}_2\text{O})_{16}^{8+}$ [93]. Cependant la présence de cette forme ionique du Zr est contestée et ne semble pas être prédominante dans les milieux naturels [57]. Le Zr associé aux cellules dans ces travaux était essentiellement dû à un phénomène d'adsorption et non à une internalisation du métal. Si le métal adsorbé n'est pas nécessairement toxique pour les cellules algales, il peut représenter un danger en termes de transfert trophique. Dans la même étude, pour la microalgue *Chlorella pyrenoidosa* une contamination au Zr de 0,5 et 50 mM (45 et $450 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$) a induit une réduction des pigments chlorophylles a et b, des xanthophylles et des caroténoïdes entre 13 et 33 %. Les expériences de désorption du Zr montraient que de 28 à 80 % du métal se dissociait des cellules au bout de 5 minutes, les concentrations mesurées jusqu'à 1 h semblaient rester constantes [94]. Cette association durable du Zr restant avec les cellules pourrait être due en partie à son internalisation et expliquer l'induction d'une réponse toxique au niveau des pigments chlorophylliens. Cependant, comme dans le cas de l'étude de Fujiwara et al., les effets observés sont probablement induits par des biais expérimentaux, tels que la précipitation des phosphates du milieu de culture, dus aux fortes concentrations de Zr utilisées.

1.5 Modèles d'étude

Les algues unicellulaires d'eau douce, sont des modèles d'étude privilégiés en écotoxicologie. Ces organismes sont faciles à cultiver et de nombreuses connaissances sur leur métabolisme,

leur génome et leur écologie sont disponibles dans la littérature. Les milieux de culture et d'exposition sont simples à réaliser, ne contiennent pas nécessairement de substrats organiques et peuvent être modifiés selon les besoins expérimentaux. Le ratio élevé entre la surface des algues et leur volume leur confère une sensibilité aux contaminants même lorsqu'ils sont à l'état de trace. Leur voie de contamination étant réduite à la voie directe, elle ne dépend que de la phase dissoute. Ceci facilite la compréhension des mécanismes d'absorption et de prise en charge des métaux par la cellule. Ces producteurs primaires sont présents dans une grande diversité de milieux terrestres et aquatiques. Ainsi une perturbation de ces organismes ubiquistes pourrait avoir de grandes répercussions sur l'ensemble de ces écosystèmes, ce qui les place comme un modèle pertinent en écotoxicologie.

1.5.1 Premier modèle d'étude : *Chlamydomonas reinhardtii*

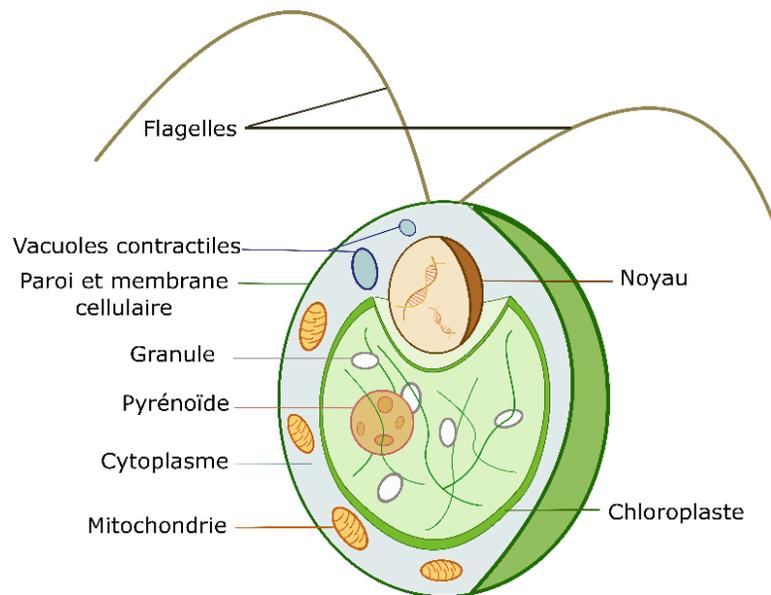


Figure 1.6. Représentation schématique de *Chlamydomonas reinhardtii*

Chlamydomonas reinhardtii (Figure 1.6) est une algue verte unicellulaire appartenant à la classe des Chlorophycées et à l'ordre des Volvocales. Elle mesure de 3 à 15 μm avec un diamètre moyen de 5 μm . Elle est présente dans divers milieux terrestres, estuariens et dulcicoles dans lesquels elle se déplace grâce à deux flagelles. Bien que sa présence ne soit pas d'une importance cruciale dans les écosystèmes, elle a fait l'objet de nombreux travaux qui ont permis de bien décrire sa physiologie, son cycle de vie et également son génome [95]. Son cycle de vie rapide (jusqu'à deux divisions par jour) et sa facilité de maintien en culture dans un milieu pauvre en éléments font de cette algue un excellent modèle de laboratoire en écotoxicologie. Cette

espèce d'algue possède également une tolérance à une large gamme de pH. Les conditions optimales de croissance étant comprises entre 6,5 et 8,0, *C. reinhardtii* est cependant capable de se développer dans un pH allant de 4,5 à 12,0 [96,97]. Ainsi, la littérature offre de nombreux résultats concernant les impacts d'une grande diversité de métaux sur ce modèle vivant. Ils ont permis de mettre en évidence certaines de leurs voies d'entrée et leur action sur les fonctions biologiques de la cellule [98,99].

1.5.2 Deuxième modèle d'étude : Le biofilm périphytique

1.5.2.1 Définition

Le biofilm périphytique est la microflore aquatique retrouvée sur une grande diversité de substrats immergés [100] (Figure 1.7). La microméiofaune, les protozoaires et les invertébrés se nourrissant de microalgues, de champignons et de bactéries sont également présents dans les biofilms. La cohésion du périphyton est assurée par une matrice d'exopolysaccharides sécrétée par certaines espèces d'algues et de bactéries. Cette matrice protectrice leur permet de faire face aux variations environnementales et de coloniser une grande diversité de milieux. Cette matrice est également responsable de l'adhésion du périphyton au support qu'il colonise [101–104]. Le biofilm peut être dénommé en fonction du substrat sur lequel il est observé :

- L'épiphyton est retrouvé sur les végétaux : macrophytes, lentilles d'eau, etc.
- L'épilithon est retrouvé sur les substrats minéraux durs : cailloux, rochers, galets, etc.
- L'épipélon est retrouvé sur la vase.
- L'épipsammon est retrouvé sur le sable.

Les expérimentations dont il est question dans cette thèse se sont intéressées à l'épilithon. Aucune distinction ne sera faite entre les termes périphyton et biofilm qui seront utilisés pour désigner l'épilithon. De plus, les expérimentations présentées ont été réalisées à l'aide de substrats artificiels en verre.

La composition taxonomique du biofilm peut grandement différer d'un milieu à l'autre dépendamment des caractéristiques physicochimiques et nutritives de ce dernier. Il colonise le substrat en plusieurs étapes. Des bactéries et des espèces de diatomées (algues brunes) de petite taille dites pionnières adhèrent au support où un peu de matière organique et de bactéries encouragent leur développement. Cette première colonisation permet à des espèces filamenteuses et érigées de coloniser le milieu à leur tour. Plus le biofilm est âgé et plus sa structure se complexifie notamment grâce à la sécrétion de la matrice protectrice.

L'épaisseur du biofilm mature est influencée par divers facteurs :

- Les espèces qui le composent
- La prédation
- Le substrat
- Les facteurs environnementaux : lumière, courant, présence de nutriments ou de toxiques, température, etc.

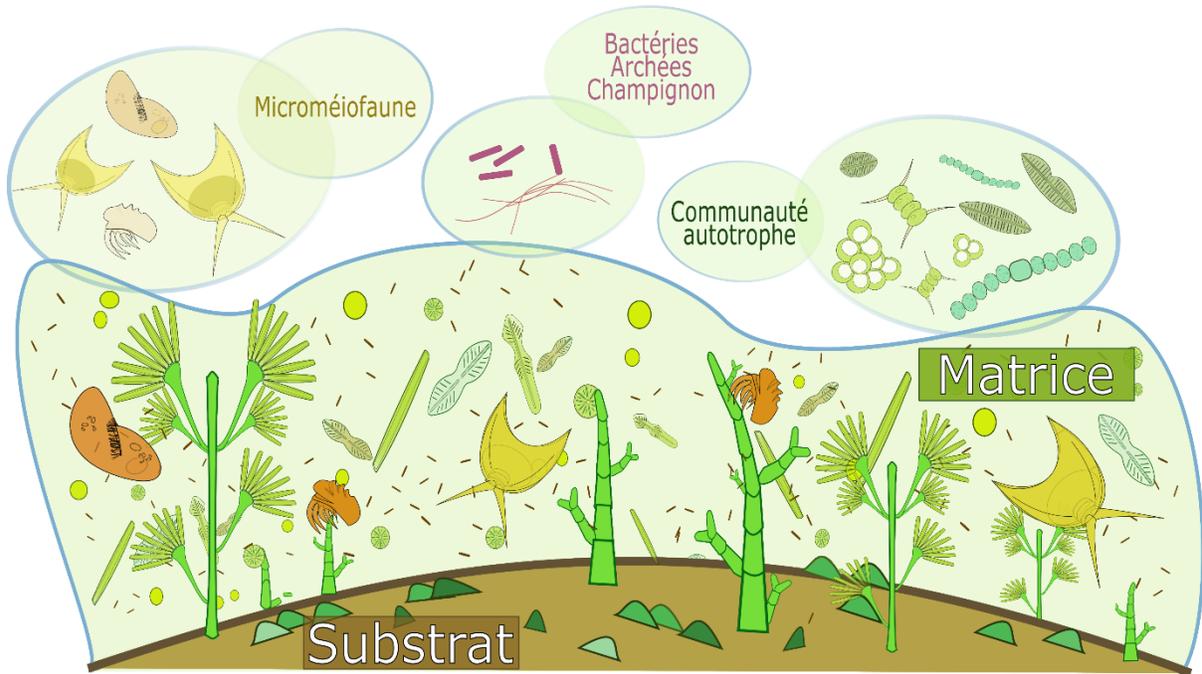


Figure 1.7. Représentation schématique du biofilm périphytique

1.5.2.2 Le périphyton en tant qu'outil de biosuivi

Le biosuivi peut être défini comme l'utilisation des organismes vivants pour suivre les changements environnementaux et tenter de déterminer leurs causes [105]. Cette technique est apparue au milieu du 19^e siècle suite à la recrudescence de maladies induites par le développement industriel et démographique de plus en plus intense en Europe. Les premiers suivis de microorganismes dans les cours d'eau se sont donc effectués dans les eaux courantes afin de résoudre ces problèmes sanitaires (Hynes, 1960 cité par [106]). Par la suite, cette démarche a été appliquée à l'écotoxicologie afin d'évaluer et de suivre la qualité des cours d'eau soumis à une grande diversité de stress anthropiques et environnementaux [107,108]. Pour réaliser de bonnes estimations, les mesures s'effectuent sur une grande diversité d'organismes

représentatifs des milieux étudiés. Les outils de biosuivi ont été intégrés dans les politiques de préservation des eaux de programmes gouvernementaux ou institutionnels comme la Directive Cadre sur l'Eau mise en place par le parlement européen (Directive 2000/60/CE). Le périphyton est une composante essentielle de la santé des écosystèmes aquatiques en tant que premier maillon de la chaîne trophique [109,110]. L'impact sur les biofilms périphytiques peut avoir des conséquences sur l'ensemble du milieu (biofilm moins nutritif, bioamplification des contaminants, etc.), c'est pourquoi il est intéressant de suivre leurs réponses à la présence de contaminants. Ils sont retrouvés dans une grande diversité de milieux, l'assimilation dans les organismes vivants au sein de cette matrice permet de piéger les contaminants pendant plusieurs semaines [111,112]. De plus, l'observation de changements structurels des communautés de diatomées lors d'expositions environnementales a permis l'établissement de classifications basées sur la tolérance et la sensibilité des espèces [113,114]. L'apparition de déformations morphologiques en présence de pollution métallique (formes tératogènes [115] ou variations de la taille cellulaire [116]) permet également la détection des métaux et de leurs toxicités potentielles dans les eaux douces. Toutes ces caractéristiques ont mené à une vaste utilisation dans le monde du périphyton comme outil de biosuivi de la qualité des eaux [117–120].

Un autre avantage du biofilm périphytique consiste en la présence de plusieurs phylums (algues, bactéries, champignons, etc.). Ils permettent de rendre compte de la toxicité de contaminant sur divers types d'organismes. Seulement, une grande majorité des outils de biosuivi concernant le biofilm périphytique est établie à partir de sa composante algale [121], malgré l'importance de compartiments peu étudiés. Par exemple, la microméiofaune joue un rôle primordial dans la chaîne trophique et la structure taxonomique du biofilm [122,123]. Certains microorganismes comme certaines algues ou champignons, peuvent également interférer avec les communautés bactériennes par exemple avec l'excrétion de composés stimulant la croissance de certaines souches [124,125]. Ainsi la réalisation d'études écotoxicologiques sur ces compartiments permettrait l'amélioration des outils de biosuivi basé sur le biofilm périphytique.

1.5.3 Écotoxicologie des communautés du biofilm périphytique

Les contaminants peuvent avoir une grande diversité d'effets sur le périphyton au regard des échelles d'observations possibles (Figure 1.8) :

- Des effets physiologiques et métaboliques au niveau cellulaire
- Des effets morphologiques (par exemple la taille et la déformation des frustules de diatomées) et comportementaux au niveau individuel

- Des effets sur la densité cellulaire, la composition spécifique du biofilm, et sur les relations trophiques au niveau communautaire

Ces effets peuvent être observés au niveau des différentes composantes taxonomiques du biofilm qui sont les communautés algales et bactériennes, la microméiofaune et les champignons. Lors de ces travaux, les expériences réalisées se sont focalisées sur les trois premiers groupes. Ainsi, les effets sur la communauté des champignons ne seront pas détaillés dans ce document.

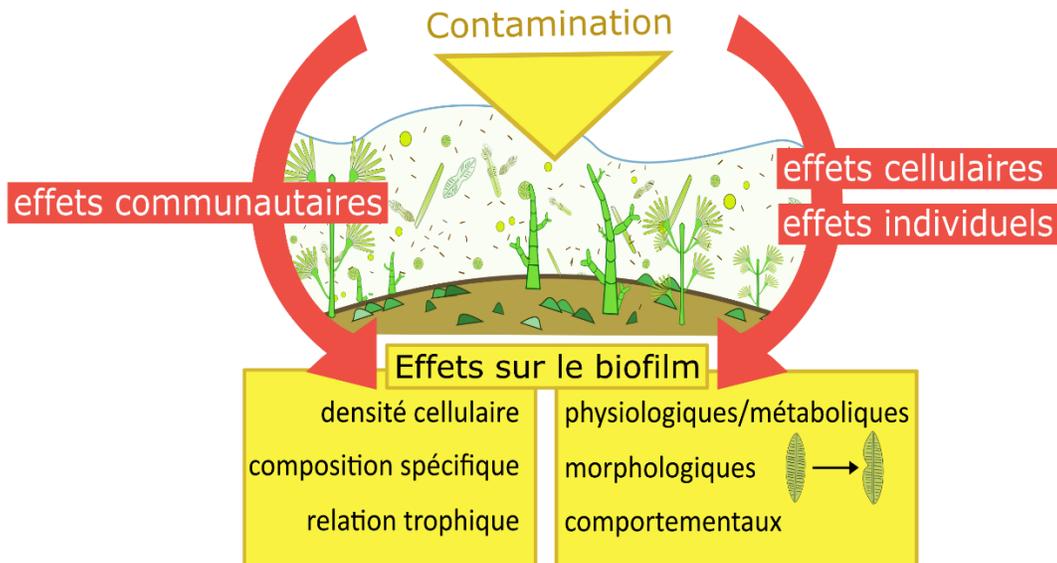


Figure 1.8. Effets des contaminants sur le biofilm périphytique à différentes échelles du vivant

1.5.3.1 Effet sur les communautés autotrophes

Lorsque la lumière n'est pas une ressource limitante, les organismes autotrophes et notamment les diatomées (algues brunes) sont en général les composants majoritaires du biofilm [126]. Pour décrire les différents effets des contaminants sur ces communautés, plusieurs techniques d'analyse telles que la microscopie ou la spectrophotométrie sont disponibles, telles que décrites à la figure 1.9.

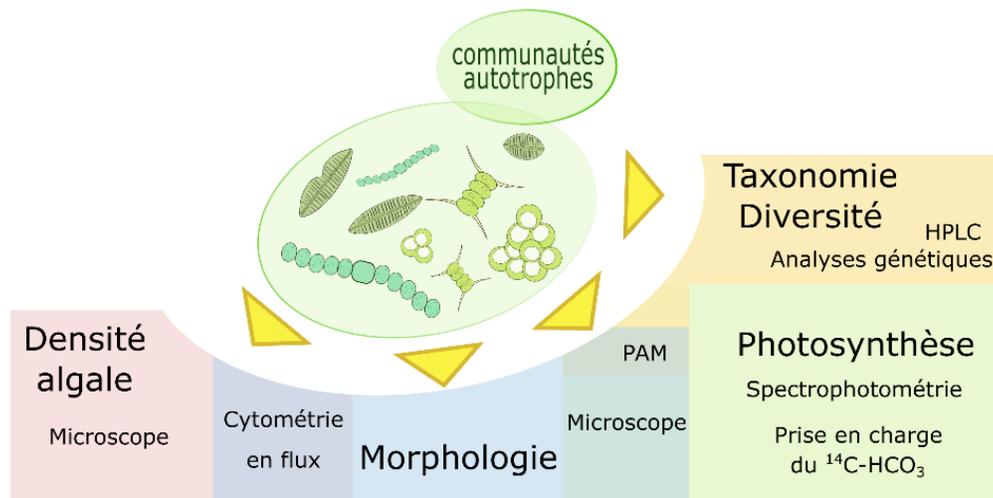


Figure 1.9. Principales méthodologies et mesures effectuées pour évaluer les effets de contaminants sur les communautés autotrophes du biofilm périphytique.

Mesure des effets sur les groupes algaux et analyses taxonomiques

La taxonomie algale ainsi que bactérienne ont été privilégiées ces dernières décennies pour étudier les effets induits par les contaminants sur les communautés périphytiques car ces organismes montrent une grande sensibilité à la pollution, mais également parce qu'ils ont été historiquement très étudiés. Les identifications taxonomiques ont été en majorité effectuée sur les communautés de diatomées par microscopie [120]. Comme mentionné précédemment, les changements structurels des assemblages de diatomées permettent la détection des métaux et de leurs possibles effets (cf. introduction 1.2.4.2). De nos jours, les outils de biologie moléculaire tels que le séquençage d'ADN s'avèrent prometteurs pour affiner et standardiser les analyses taxonomiques, mais également pour la mise en évidence de gènes impliqués dans la tolérance aux contaminations [127]. La proportion des trois grands groupes algaux (vert, bleu et brun) peut être déterminée dans le biofilm par fluorimétrie. Le Phyto-PAM (basé sur la mesure de fluorescence en lumière modulée - Pulse Amplified Modulated fluorometry), mis au point par Heinz Walz GmbH (Allemagne) permet d'effectuer ces mesures rapidement et sans endommager les échantillons [102,103]. Des analyses par chromatographie liquide haute performance (HPLC) permettent également de déterminer la proportion des trois grands groupes algaux avec une quantification plus précise des différents pigments. Cette technique est cependant destructive et plus coûteuse [121,128].

Mesure des effets sur le métabolisme cellulaire

Lorsque les métaux pénètrent dans la cellule, ils sont susceptibles d'interférer dans de nombreux mécanismes cellulaires dépendamment de leur spéciation intracellulaire et de leur capacité à générer des EROs (cf. introduction 1.2.1.3).

La photosynthèse est une voie métabolique cruciale dans le monde végétal et microbien. Elle permet aux algues et aux cyanobactéries de créer des molécules carbonées nécessaires au métabolisme des cellules algales, mais également pour les autres maillons trophiques des écosystèmes. Dans la littérature, il est reconnu depuis de nombreuses années que les contaminations métalliques peuvent affecter l'activité photosynthétique des algues [96,98,99]. Les perturbations peuvent s'effectuer au niveau des activités enzymatiques liées à la photosynthèse ainsi qu'au niveau des structures responsables de la photosynthèse appelées photosystèmes [100,101]. Cette mesure de toxicité est toutefois peu sensible, les impacts sur la photosynthèse sont généralement observés pour des concentrations métalliques qui induisent des retards de croissance importants. Cependant, les mesures de perturbation d'activité photosynthétique permettent d'obtenir des informations rapidement quant à la toxicité aiguë des métaux. Les perturbations au niveau de l'appareil photosynthétique peuvent être observées en dosant la chlorophylle par spectrophotométrie et également en mesurant le rendement photosynthétique à l'aide d'un Phyto-PAM.

La réaction de polymérisation en chaîne quantitative en temps réel (qPCR) est à présent utilisée fréquemment dans le domaine de l'écotoxicologie aquatique. Cette méthode a été de nombreuses fois appliquée sur les diatomées planctoniques et benthiques exposées aux métaux. Cette technique permet de mesurer les effets sur des mécanismes cellulaires précis tels que le métabolisme de la silice avec l'expression du gène *sil3* contribuant à la formation des frustules [129]. Kim Tiam et al. (2012) ont pu observer des effets du cadmium sur le métabolisme de la diatomée *Eolimna minima* exposée à 10 et 100 $\mu\text{g Cd L}^{-1}$. Les effets sur le métabolisme mitochondrial ont été observés avec l'induction de *cox1*, *nad5* et *12s* et sur la photosynthèse avec l'induction de *d1* and *psaA* [130]. Cependant, l'expression génétique reste un marqueur de réponse et non d'effet, car la production de protéines dépend également de mécanismes d'épissage alternatifs. Ainsi, la surexpression d'un gène n'est pas toujours suivie de l'augmentation de la protéine associée. C'est pourquoi la métabolomique, c'est-à-dire l'étude du métabolome et notamment du protéome, est une discipline en plein essor dans le domaine de l'écotoxicologie.

1.5.3.2 Effet sur les communautés bactériennes

Les bactéries périphytiques sont grandement impliquées dans le cycle biogéochimique des nutriments au sein des écosystèmes aquatiques. Certaines sont en effet capables de remobiliser l'azote et le carbone présents dans la matière organique notamment en excréant des enzymes extracellulaires telles que la β -glucosidase [131,132]. Ainsi, en écotoxicologie microbienne, les communautés bactériennes sont, après les communautés algales, le compartiment du biofilm le plus étudié. Par ailleurs, un lien étroit a été mis en évidence entre la production bactérienne et algale du biofilm [133]. Ainsi, les contaminants ayant un effet direct sur certaines bactéries peuvent également affecter directement ou indirectement la communauté autotrophe [131,134]. Les réponses des communautés bactériennes au contaminant peuvent être observées à l'aide d'une grande diversité de mesures telles que :

- La production et la croissance bactérienne [135–137]
- Le taux de survie bactérienne [138]
- La perturbation du métabolisme lié à la dégradation de la matière organique avec la mesure des activités des enzymes extracellulaires (AEE).
- Les changements de composition des communautés par microscopie, cytométrie en flux ou séquençage ADN nouvelle génération [139–141]

1.5.3.3 Effet sur la microméiofaune

La microméiofaune définit l'ensemble des consommateurs primaires des biofilms aquatiques, regroupant les protozoaires et des organismes pluricellulaires compris entre 2 μm et 2 mm [142,143]. Ces organismes appartiennent à un grand nombre de taxons différents. Ils peuvent être des protozoaires tels que les ciliés, les amibes, les técamébiens, les héliozoaires, mais aussi de petits métazoaires tels que les rotifères, les vers oligochètes et les chironomides [144]. Les bactéries et microalgues ainsi que la matrice d'exopolysaccharides (EPS) qu'ils sécrètent constitue un habitat attractif pour ces protozoaires et petits métazoaires. Ils peuvent s'établir temporairement ou définitivement dans le biofilm [145,146].

Les communautés de protozoaires ont un cycle de vie plus rapide et un taux de croissance plus élevé que les autres consommateurs aquatiques. Ceci induit généralement des réponses physiologiques plus rapides aux pressions environnementales et d'origine anthropique en comparaison avec les autres brouteurs [147–150]. Par ailleurs, plusieurs études ont déjà démontré des effets de contaminants métalliques tels que le Zn ou le Ni sur les protozoaires

[151–154]. Dans ces études, la richesse spécifique ou les effets sur la composition taxonomique ont été mesurés.

1.5.3.4 Mesure des effets à l'échelle du biofilm entier

Alors que beaucoup de travaux se concentrent sur un compartiment biologique à la fois, d'autres s'intéressent aux effets des contaminants sur la totalité du biofilm périphytique. En mesurant la bioaccumulation ou la variation de la qualité nutritionnelle (figure 1.10), ces études permettent d'extrapoler les effets de perturbations des microorganismes périphytiques à l'échelle des écosystèmes aquatiques.

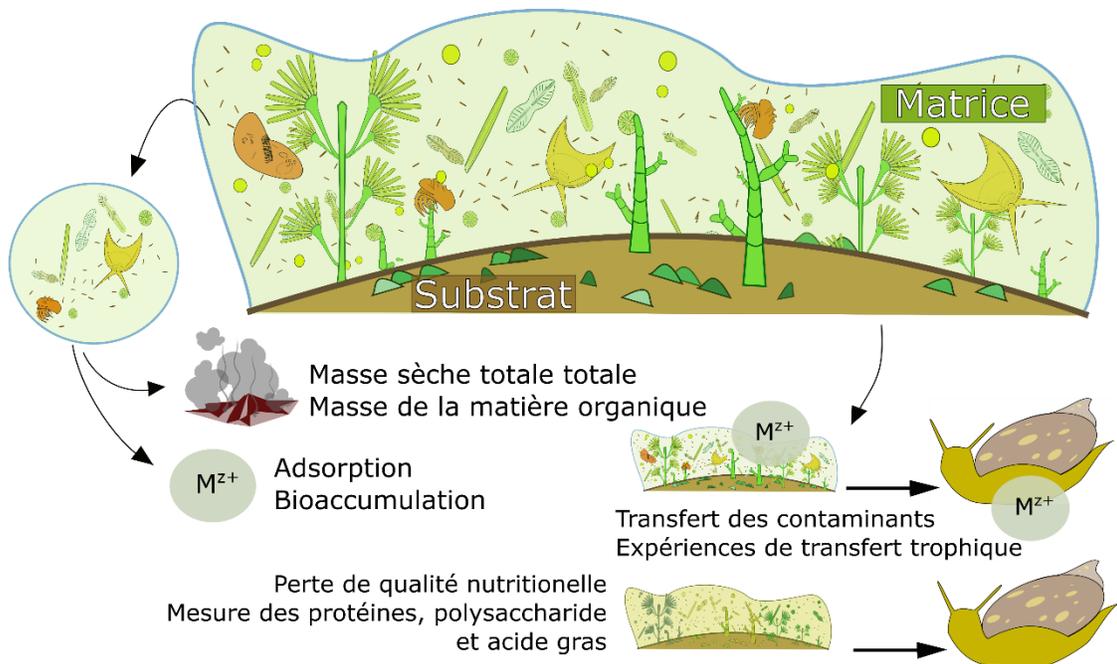


Figure 1.10. Exemples de mesures effectuées pour évaluer les effets de contaminants sur le biofilm périphytique et leurs conséquences sur la chaîne trophique.

Bioaccumulation des contaminants dans le biofilm périphytique

Différents paramètres chimiques et physicochimiques peuvent influencer la bioaccumulation des contaminants dans le biofilm. Comme présenté précédemment dans la l'introduction 1.2.3, la spéciation des métaux dans les eaux douces est considérée comme le principal facteur régissant la bioaccumulation par les organismes et dépend de la composition chimique et du pH. Mais les propriétés intrinsèques du biofilm sont également importantes telles que son âge, son épaisseur et sa composition [155,156]. La bioaccumulation des métaux par les organismes du biofilm a été

largement documentée dans la littérature et suit le même processus que présenté dans l'introduction 1.2.3 par la figure 1.2. Les métaux sont tout d'abord complexés par des sites biologiques extracellulaires situés à la surface des cellules, mais aussi parfois liés aux EPS, puis ils sont internalisés par des mécanismes de transports tels que décrits dans la figure 1.1 [157]. Malgré la grande variabilité attendue dans les niveaux d'accumulation de métaux parmi les organismes du biofilm, des liens étroits entre la bioaccumulation des métaux et des effets sur les communautés algales et bactériennes au niveau de leurs structures, compositions et de leurs fonctions ont été démontrés dans la littérature [158–161]. Les concentrations métalliques totales bioaccumulées par le biofilm sont facilement mesurables par spectrométrie à plasma à couplage inductif (ICP) après digestion acide des échantillons [159,162,163].

Effets sur les relations trophiques et bioamplification

Lorsque les métaux sont internalisés ou adsorbés par les organismes au sein du biofilm, ils peuvent représenter une menace pour les maillons supérieurs de la chaîne trophique. Plusieurs études ont montré le rôle du biofilm périphytique dans l'introduction des contaminants métalliques dans la chaîne alimentaire. Le transfert du zinc et du cadmium du biofilm aux larves d'éphémères a été démontré [164,165]. Si le transfert des métaux du biofilm vers les consommateurs primaires a été démontré, des effets d'une source de nourriture contaminée sur ces derniers ont été également observés. Dans le cas du cadmium, les larves montraient un retard significatif de croissance lorsqu'elles étaient nourries avec du biofilm contaminé en comparaison avec les larves exposées simplement par voie directe [165]. Une étude mesurant des réponses biochimiques a confirmé que le cadmium était plus toxique pour les larves d'éphémères lorsqu'il était ingéré à travers un biofilm contaminé que par exposition directe et ceci pour des concentrations en Cd tissulaire similaires dans les deux types d'expositions [166]. Dans une autre étude portant également sur les éphémères, les auteurs ont démontré une atténuation des effets du sélénium sur les larves nourries avec de grandes quantités de biofilm de haute qualité nutritionnelle (protéines, polysaccharides, acides gras polyinsaturés, ...) [167]. Les effets toxiques sur les consommateurs primaires peuvent être directement liés à l'effet de l'ingestion des contaminants métalliques bioaccumulés par le biofilm, mais peut être également induit indirectement par la perte des qualités nutritives et de biomasse de ce dernier lorsque soumis aux pressions de contamination [6,168].

1.6 Structure de la thèse

Cette thèse comprend quatre chapitres (chapitres 2, 3, 4 et 5) visant à comprendre les effets des expositions au Zr et au Th à travers plusieurs échelles du vivant et échelles trophiques dans les écosystèmes d'eau douce.

Les hypothèses de ces travaux étaient les suivantes :

- La spéciation du Th et du Zr dans les eaux douces influence leurs biodisponibilités pour les organismes aquatiques et suivent le modèle du ligand biotique
- La structure des communautés périphytiques est perturbée par la présence de Th et de Zr en concentrations environnementalement réalistes
- Les microorganismes périphytiques d'eau douce sont capables de bioaccumuler ces métaux
- Le Th bioaccumulé par le biofilm est transférable trophiquement aux brouteurs
- La présence de Th diminue la qualité nutritionnelle du biofilm

Chapitre 2. Effets de la spéciation extra et intracellulaire du Th: de l'internalisation aux mécanismes de détoxification.

Dans une première partie, nous voulions déterminer la capacité du Th et du Zr à pénétrer dans les cellules algales et vérifier si le MLB était applicable pour ces deux métaux. En raison de contraintes expérimentales, il est actuellement impossible de caractériser en détail les effets de la spéciation de ces deux métaux, cependant ils ouvrent certaines voies d'interprétation et pistes d'exploration intéressantes à discuter pour de futurs travaux. Nous voulions également déterminer le devenir intracellulaire de ces métaux une fois internalisés dans les cellules afin d'obtenir des indications quant aux possibles mécanismes de détoxification et risques de transfert trophique des deux éléments étudiés. Pour cela, des expériences ont été effectuées sur les algues modèles *C. reinhardtii* (prise en charge et fractionnement subcellulaire) et *Raphidocelis subcapitata* (prise en charge) avec des milieux d'exposition contenant 1 nM de Zr ou de Th.

Chapitre 3. Effets du zirconium sur les microorganismes périphytiques d'eau douce.

C. Doose, S. Morin, J. Vedrenne, C. Fortin, **Impact of Zirconium on Freshwater Periphytic Microorganisms**, *Environments*. 6 (2019) 1–13. doi:10.3390/environments6100111.

Dans cette deuxième partie, des expérimentations sur les effets du Zr sur la structure taxonomique des communautés périphytiques ont été menées. Les expériences suivantes ont

été réalisées au laboratoire d'IRSTEA centre de Bordeaux au sein de l'unité de recherche Écosystèmes Aquatiques et changements globaux (EABX) dans l'équipe Contaminants Anthropiques et réponse des Milieux Aquatiques (CARMA) maintenant appelée ECOVEA. Des lames de verre ont été mises à coloniser pendant un mois dans un étang (Cestas, France). Elles ont ensuite été réparties dans trois aquariums contenant un milieu de culture contaminé en Zr (n = 3) à $0,2 \pm 0,1$ nM (C0, témoins), $0,5 \pm 0,3$ nM (C1) et $2,9 \pm 0,3$ nM (C10) et prélevées à 1, 2 et 4 semaines d'exposition (t1, t2 et t4). La production de biomasse ainsi que le taux de croissance des diatomées étaient significativement plus faibles pour les milieux d'exposition C10 que pour les milieux témoins au cours du temps. Le dénombrement des prédateurs primaires du périphyton a montré un effet de C10 sur la composition de la microméiofaune. Les résultats obtenus dans ces travaux montrent qu'une exposition au Zr peut perturber la structure taxonomique du biofilm et ses fonctions clefs. Une meilleure compréhension des effets des métaux sur la microméiofaune permettra d'améliorer l'évaluation des risques des expositions métalliques dans les milieux aquatiques.

Chapitre 4. Effet du thorium sur les communautés de microorganismes benthiques d'eau douce (article scientifique soumis pour publication)

L'objectif de cette partie était de caractériser les effets du Th sur les communautés de microorganisme du biofilm, ce qui contribuera à mieux comprendre le risque que pose cet élément pour les écosystèmes aquatiques. Des plaques en céramique ont été mises à coloniser pendant un mois en laboratoire avec un biofilm prélevé en rivière. Elles ont ensuite été réparties aléatoirement dans 12 canaux contenant un milieu de culture contaminé en Th (n = 8) $0,004 \pm 0,002$ nM (C0), $0,19 \pm 0,09$ nM (C1) et $8,7 \pm 3,5$ nM (C10). Chaque condition correspond au prélèvement de quatre plaques à 1, 2 et 4 semaines d'exposition (t1, t2 et t4). La présence du Th a eu des effets sur la communauté des diatomées en changeant sa structure taxonomique, en réduisant sa diversité et en augmentant la densité cellulaire. La structure taxonomique de la communauté bactérienne étudiée par analyse de l'ADN 16s codant pour la petite sous-unité 30s du ribosome (ADNr 16s) a également été perturbée par la présence du métal. Aucun effet toxique direct n'a été observé sur la microméiofaune comptée, de plus, l'augmentation du nombre d'individus observé dans cette communauté pourrait être due aux changements observés dans les communautés bactériennes et diatomiques. Les résultats obtenus dans ces travaux montrent qu'une exposition à des concentrations environnementalement réalistes de Th peut perturber la structure taxonomique du biofilm et ses fonctions clefs (production primaire, cycles des nutriments et dégradation de la matière organique, etc).

Chapitre 5. Effet du Th sur la qualité nutritive du biofilm et transfert trophique (article scientifique soumis et accepté provisoirement avec modifications)

Le biofilm représente une importante source de nourriture dans les environnements aquatiques. Ainsi dans ce chapitre, l'objectif était de déterminer si le Th pouvait avoir un effet sur la qualité nutritionnelle des biofilms périphytiques d'eau douce et être transféré trophiquement aux consommateurs primaires. Pour cela le thorium bioaccumulé, les protéines et polysaccharides totaux ont été mesurés dans les mêmes échantillons de biofilm que ceux du chapitre 4. Les concentrations en protéines ont significativement variées dans les conditions C10 alors qu'elles sont restées constantes au cours de l'expérience dans les autres conditions. Les concentrations en polysaccharides n'ont pas varié en fonction des conditions d'expositions. À la fin des 4 semaines d'exposition, du biofilm exposé dans les conditions témoins et C10 a été préservé pour réaliser une expérience de transfert trophique avec les brouteurs *Lymnaea sp.* Les brouteurs ont consommé ces échantillons de biofilm pendant 4 semaines. Les concentrations en Th mesurées dans les brouteurs ayant consommé du biofilm exposé au Th étaient significativement supérieures à celles mesurée dans les brouteurs témoins. Les compositions en acide gras déterminées dans le biofilm et dans les tissus des brouteurs se sont révélées différentes entre les conditions témoins et exposées au Th. Ces résultats montrent un potentiel de transfert trophique et de modification des échanges entre le biofilm et les organismes brouteurs. Ils mettent en évidence la nécessité de mieux comprendre les risques associés à la contamination par des métaux tétravalents tels que le Th dans les milieux aquatiques d'eau douce.

BIBLIOGRAPHIE INTRODUCTION

- [1] Z. Khan, P. Linares, J. García-González, Integrating water and energy models for policy driven applications. A review of contemporary work and recommendations for future developments, *Renew. Sustain. Energy Rev.* 67 (2017) 1123–1138. <https://doi.org/10.1016/j.rser.2016.08.043>.
- [2] I.A. Shiklomanov, J.C. Rodda, *World water resources at the beginning of the twenty-first century*, Cambridge University Press, (2003),25 .
- [3] C.J. Vorosmarty, P. Green, J. Salisbury, R.B. Lammers, Global water resources: vulnerability from climate change and population growth, *Science.* 289 (2013) 284–288. <https://doi.org/10.1126/science.289.5477.284>.
- [4] I. Lavoie, P.B. Hamilton, S. Campeau, M. Grenier, P.J. Dillon, *Guide d'identification des diatomées des rivières de l'Est du Canada*, (2008), 252.
- [5] A. Lenoir, M. Coste, Development of a practical diatom index of overall water quality applicable to the French national water Board network, in: E. Whitton, B.A., Rott (Ed.), *Use of algae for monitoring rivers*, Hungarian Algological Society, (1996) : pp. 29–43. <https://doi.org/10.2478/s13545-013-0073-z>.
- [6] C. Bonnineau, J. Artigas, B. Chaumet, A. Dabrin, J. Faburé, B.J. Ferrari, J.D. Lebrun, C. Margoum, N. Mazzella, C. Miège, S. Morin, E. Uher, M. Babut, S. Pesce, Role of biofilms in contaminant bioaccumulation and trophic transfer in aquatic ecosystems: current state of knowledge and future challenges, in: P. de Voogt (Ed.), *Reviews of Environmental Contamination and Toxicology*, Springer, New York, NY, (2020): pp. 1–39. https://doi.org/10.1007/398_2019_39.
- [7] D. Ribera, F. Labrot, G. Tisnerat, J.-F. Narbonne, Uranium in the environment: occurrence, transfer, and biological effects., in: *Reviews of Environmental Contamination and Toxicology*, (1996): pp. 53–89. https://doi.org/10.1007/978-1-4613-8478-6_3.
- [8] L.. De Filippis, C.K. Pallaghy, Heavy metals : sources and biological effects., in: L.C. Rai, J.P. Gaur, C.J. Soeder (Eds.), *Adv. Limnol. Ser. Algae Water Pollut.*, E. Scheizerbartsche Press, Stuttgart, (1994): pp. 31–77.
- [9] H.V. Perales-Vela, J.M. Peña-Castro, R.O. Cañizares-Villanueva, Heavy metal detoxification in eukaryotic microalgae, *Chemosphere.* 64 (2006) 1–10.

- <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2005.11.024>.
- [10] J.O. Nriagu, A history of global metal pollution, *Science*. 272 (1996) 223–224. <https://doi.org/10.1126/science.272.5259.223>.
- [11] P.G.C. Campbell, O. Errécalde, C. Fortin, V.P. Hiriart-Baer, B. Vigneault, Metal bioavailability to phytoplankton-applicability of the biotic ligand model, *Comp. Biochem. Physiol. C. Toxicol. Pharmacol.* 133 (2002) 189–206. [https://doi.org/10.1016/S1532-0456\(02\)00104-7](https://doi.org/10.1016/S1532-0456(02)00104-7).
- [12] L.-Z. Li, C. Tu, W.J.G.M. Peijnenburg, Y.-M. Luo, Characteristics of cadmium uptake and membrane transport in roots of intact wheat (*Triticum aestivum* L.) seedlings, *Environ. Pollut.* 221 (2017) 351–358. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2016.11.085>.
- [13] M. Lavoie, P.G.C. Campbell, C. Fortin, Extending the biotic ligand model to account for positive and negative feedback interactions between cadmium and zinc in a freshwater alga, *Environ. Sci. Technol.* 46 (2012) 12129–12136. <https://doi.org/10.1021/es302512r>.
- [14] W.G. Sunda, S. a. Huntsman, Effect of Zn, Mn, and Fe on Cd accumulation in phytoplankton: Implications for oceanic Cd cycling, *Limnol. Oceanogr.* 45 (2000) 1501–1516. <https://doi.org/10.4319/lo.2000.45.7.1501>.
- [15] J.R. O'Donnel, B.M. Kaplan, H.E. Allen, Bioavailability of trace metals in natural waters, in: R.D. Cardwell, R. Purdy, R.C. Bahner (Eds.), *Aquatic Toxicology and Hazard Assessment, 7th Symposium*, American Society for Testing and Materials, Philadelphia, (1985): pp. 485–501.
- [16] F.M.M. Morel, *Principles of aquatic chemistry.*, John Wiley and Sons Inc., New York, (1983), 446.
- [17] P.G.C. Campbell, Interactions between trace metals and aquatic organisms: a critique of the free ion activity model, in: A. Tessier, D.R. Turner (Eds.), *Metal speciation and bioavailability in aquatic systems*, John Wiley & Sons, Incorporated, 3 (1995): pp. 45–102.
- [18] W. Adams, R. Blust, R. Dwyer, D. Mount, E. Nordheim, P.H. Rodriguez, D. Spry, Bioavailability assessment of metals in freshwater environments: A historical review, *Environ. Toxicol. Chem.* 39 (2020) 48–59. <https://doi.org/10.1002/etc.4558>.
- [19] J.S. Meyer, R.C. Santore, J.P. Bobbitt, L.D. Debrey, C.J. Boese, P.R. Paquin, H.E. Allen, H.L. Bergmann, D.M. Ditoro, Binding of nickel and copper to fish gills predicts toxicity when water hardness varies, but free-ion activity does not, *Environ. Sci. Technol.* 33 (1999) 913–

916. <https://doi.org/10.1021/es980715q>.
- [20] D.G. Heijerick, K.A.C. De Schamphelaere, C.R. Janssen, Biotic ligand model development predicting Zn toxicity to the alga *Pseudokirchneriella subcapitata*: Possibilities and limitations, *Comp. Biochem. Physiol. - C Toxicol. Pharmacol.* 133 (2002) 207–218. [https://doi.org/10.1016/S1532-0456\(02\)00077-7](https://doi.org/10.1016/S1532-0456(02)00077-7).
- [21] D.M. Di Toro, H.E. Allen, H.L. Bergman, J.S. Meyer, P.R. Paquin, R.C. Santore, Biotic ligand model of the acute toxicity of metals. 1. Technical basis., *Environ. Toxicol. Chem.* 20 (2001) 2383–2396. [https://doi.org/10.1897/1551-5028\(2001\)020<2383:blmota>2.0.co;2](https://doi.org/10.1897/1551-5028(2001)020<2383:blmota>2.0.co;2).
- [22] S. Niyogi, C.M. Wood, Biotic ligand model, a flexible tool for developing site-specific water quality guidelines for metals, *Environ. Sci. Technol.* 38 (2004) 6177–6192. <https://doi.org/10.1021/es0496524>.
- [23] R.J. Erickson, The biotic ligand model approach for addressing effects of exposure water chemistry on aquatic toxicity of metals: genesis and challenges, *Environ. Toxicol. Chem.* 32 (2013) 1212–1214. <https://doi.org/10.1002/etc.2222>.
- [24] A. Crémazy, P.G.C. Campbell, C. Fortin, In the presence of fluoride, free Sc^{3+} is not a good predictor of Sc bioaccumulation by two unicellular algae: Possible role of fluoro-complexes, *Environ. Sci. Technol.* 48 (2014) 9754–9761. <https://doi.org/10.1021/es5016247>.
- [25] I.A.M. Worms, V.I. Slaveykova, K.J. Wilkinson, Lead bioavailability to freshwater microalgae in the presence of dissolved organic matter: contrasting effect of model humic substances and marsh water fractions obtained by ultrafiltration, *Aquat. Geochem.* (2015) 217–230. <https://doi.org/10.1007/s10498-015-9256-0>.
- [26] K. Simkiss, M. Taylor, Metal fluxes across the membranes of aquatic organisms, *Aquat. Sci.* 1 (1989) 173–188.
- [27] S.D. Conner, S.L. Schmid, Regulated portals of entry into the cell, *Nature.* 422 (2003) 37–44. <https://doi.org/10.1038/nature01451>.
- [28] E. Pinto, T.C.S. Sigaud- Kutner, M.A.S. Leitao, O.K. Okamoto, Heavy metal - induced oxidative stress in algae, *J. Phycol.* 39 (2003) 1008–1018. <https://doi.org/10.1111/j.0022-3646.2003.02-193.x>.
- [29] C.L. De La Rocha, D. a. Hutchins, M. a. Brzezinski, Y. Zhang, Effects of iron and zinc deficiency on elemental composition and silica production by diatoms, *Mar. Ecol. Prog.*

- Ser. 195 (2000) 71–79. <https://doi.org/10.3354/meps195071>.
- [30] H.L. Conway, Sorption of arsenic and cadmium and their effects on growth, micronutrient utilization, and photosynthetic pigment composition of *Asterionella formosa*, *J. Fish.* 35 (1978) 286–294. <https://doi.org/10.1139/f78-052>.
- [31] K.H.M.. Cardozo, M.A.L.. De Oliveira, M.F.M.. Tavares, P.. Colepicolo, E.. Pinto, Daily oscillation of fatty acids and malondialdehyde in the dinoflagellate *Lingulodinium polyedrum*, *Biol. Rhythm Res.* 33 (2002) 371–381. <https://doi.org/10.1076/brhm.33.4.371.8802>.
- [32] T. Debenest, J. Silvestre, M. Coste, F. Delmas, E. Pinelli, Herbicide effects on freshwater benthic diatoms: Induction of nucleus alterations and silica cell wall abnormalities, *Aquat. Toxicol.* 88 (2008) 88–94. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2008.03.011>.
- [33] G.R. Choppin, P.J. Wong, The chemistry of actinide behavior in marine systems, *Aquat. Geochem.* 4 (1998) 77–101. <https://doi.org/10.1023/A:1009679303073>.
- [34] I.A. Bhatti, M.A. Hayat, M. Iqbal, Assessment of thorium in the environment (a review), *J. Chem. Soc. Pakistan.* 34 (2012) 1012–1022.
- [35] K.B. Krauskopf, Thorium and rare-earth metals as analogs for actinide elements, *Chem. Geol.* 55 (1986) 323–335. [https://doi.org/10.1016/0009-2541\(86\)90033-1](https://doi.org/10.1016/0009-2541(86)90033-1).
- [36] E.I. Ashkinazi, Quantitative patterns governing the migration of magnesium, calcium and radium-226, thorium-228 in the link between soils and plants, *Gig Sanit.* 80 (1980) 38–40.
- [37] A. Martinez-Aguirrea, M. Garcia-Leona, M. Ivanovich, U and Th speciation speciation in river sediments, 9697 (1995) 203–209.
- [38] M. Lung, O. Gremm, Perspectives of the thorium fuel cycle, *Nucl. Eng. Des.* 180 (1998) 133–146. [https://doi.org/10.1016/S0029-5493\(97\)00296-3](https://doi.org/10.1016/S0029-5493(97)00296-3).
- [39] H. Michel, J. Gasparro, G. Barci-Funel, J. Dalmasso, G. Ardisson, G. Sharovarov, Radioanalytical determination of actinides and fission products in Belarus soils, *Talanta.* 48 (1999) 821–825. [https://doi.org/10.1016/S0039-9140\(98\)00098-8](https://doi.org/10.1016/S0039-9140(98)00098-8).
- [40] T.P. Mernagh, Y. Miezeitis, A Review of the geochemical processes controlling the distribution of thorium in the earth's crust and Australia's thorium resources, *Geosci. Aust. Rec.* 05 (2008) 48. http://www.ga.gov.au/image_cache/GA11421.pdf.
- [41] P. Henner, L. Garcia-Sanchez, Fiche radionucléide - Thorium 232 et environnement,

- (2002), 13.
- [42] E. Östhols, Some processes affecting the mobility of thorium in natural ground waters, TRITA-OOK-1038 (1994), 63.
- [43] R.J. Murphy, J.J. Lenhart, B.D. Honeyman, The sorption of thorium(IV) and uranium(VI) to hematite in the presence of natural organic matter, *Colloids Surfaces A: Physicochem. Eng. Asp.* 157 (1999) 47–62. [https://doi.org/10.1016/S0927-7757\(99\)00115-6](https://doi.org/10.1016/S0927-7757(99)00115-6).
- [44] L.M. Correa, D. Kochhann, M. a. Pavanato, S.F. Llesuy, A.P. Konzen Riffel, V.L. Loro, M.F. Mesko, E.M.M. Flores, V.L. Dressler, B. Baldisserotto, Bioaccumulation and oxidative stress parameters in silver catfish (*Rhamdia quelen*) exposed to different thorium concentrations, *Chemosphere.* 77 (2009) 384–391. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2009.07.022>.
- [45] D.C. Lauria, J.M. Godoy, Abnormal high natural radium concentration in surface waters, *J. Environ. Radioact.* 61 (2002) 159–168. [https://doi.org/10.1016/S0265-931X\(01\)00123-0](https://doi.org/10.1016/S0265-931X(01)00123-0).
- [46] E.A. Casartelli, N. Miekeley, Determination of thorium and light rare-earth elements in soil water and its high molecular mass organic fractions by inductively coupled plasma mass spectrometry and on-line-coupled size-exclusion chromatography, *Anal. Bioanal. Chem.* 377 (2003) 58–64. <https://doi.org/10.1007/s00216-003-2069-9>.
- [47] J.M. Godoy, M.L. Godoy, Natural radioactivity in Brazilian groundwater, *J. Environ. Radioact.* 85 (2006) 71–83. <https://doi.org/10.1016/j.jenvrad.2005.05.009>.
- [48] L. Zhang, M. Chen, W. Yang, N. Xing, Y. Li, Y. Qiu, Y. Huang, Size-fractionated thorium isotopes (^{228}Th , ^{230}Th , ^{232}Th) in surface waters in the Jiulong river estuary, China, *J. Environ. Radioact.* 78 (2004) 199–216. <https://doi.org/10.1016/j.jenvrad.2004.05.004>.
- [49] A.T. Ramli, A.W.M.A. Hussein, A.K. Wood, Environmental ^{238}U and ^{232}Th concentration measurements in an area of high level natural background radiation at Palong, Johor, Malaysia, *J. Environ. Radioact.* 80 (2005) 287–304. <https://doi.org/10.1016/j.jenvrad.2004.06.008>.
- [50] A.M. Yusof, M.N. Mahat, N. Omar, A.K.H. Wood, Water quality studies in an aquatic environment of disused tin-mining pools and in drinking water, *Ecol. Eng.* 16 (2001) 405–414. [https://doi.org/10.1016/S0925-8574\(00\)00124-5](https://doi.org/10.1016/S0925-8574(00)00124-5).
- [51] M.A.R. V Veado, I.A. Arantes, A.H. Oliveira, M.R.M.G. Almeida, R.A. Miguel, M.I. Severo, H.L. Cabaleiro, Metal pollution in the environment of minas gerais state - Brazil, *Environ.*

- Monit. Assess. 117 (2006) 157–172. <https://doi.org/10.1007/s10661-006-8716-9>.
- [52] US EPA, Registry Agency for Toxic Substances and Disease, Toxicological profile for thorium, (1990), 153. ATSDR/TP-90/25
- [53] G.M. Stewart, S.W. Fowler, N.S. Fisher, The bioaccumulation of U- and Th-series radionuclides in marine organisms, in: *Radioact. Environ.*, (2008): pp. 269–305. [https://doi.org/10.1016/S1569-4860\(07\)00008-3](https://doi.org/10.1016/S1569-4860(07)00008-3).
- [54] K.A. Orlandini, W.R. Penrose, B.R. Harvey, M.B. Lovett, M.W. Findlay, Colloidal behavior of actinides in an oligotrophic lake, *Environ. Sci. Technol.* 24 (1990) 706–712. <https://doi.org/10.1021/es00075a015>.
- [55] F. Sanchez, M.J. Rodriguez-Alvarez, Effect of pH, temperature, conductivity and sediment size on thorium and radium activities along Jucar river (Spain), *J. Radioanal. Nucl. Chem.* 242 (1999) 671–681. <https://doi.org/10.1007/BF02347378>.
- [56] C. Degueldre, a. Kline, Study of thorium association and surface precipitation on colloids, *Earth Planet. Sci. Lett.* 264 (2007) 104–113. <https://doi.org/10.1016/j.epsl.2007.09.012>.
- [57] W. Hummel, U. Berner, E. Curti, F.J. Pearson, T. Thoenen, Chemical thermodynamic data base, Technical, National Cooperative for the Disposal of Radioactive Waste, Wettingen, Switzerland, (2002), 565 .
- [58] M. Gascoyne, Geochemistry of the actinides and their daughters, in: M. Ivanovich, R.. Harmon (Eds.), *Uranium-series disequilibrium applied to earth, marine and environmental sciences.*, Clarendon Press, Oxford, UK, (1982): pp. 34–61.
- [59] P.H. Santschi, J.W. Murray, M. Baskaran, C.R. Benitez-nelson, L.D. Guo, Thorium speciation in seawater, *J. Mar. Chem.* 100 (2006) 250–268. <https://doi.org/10.1016/j.marchem.2005.10.024>.
- [60] T. Dunne, L.B. Leopold, *Water in Environmental Planning*, W. H. Freeman & Co., San Francisco, (1978), 818.
- [61] N. Paquet, G. Triffault-Bouchet, Étude du thorium vis-à-vis des organismes terrestres et aquatiques, (2014), 33 . ISBN : 978-2-550-69463-2
- [62] M. Tsezos, B. Volesky, The mechanism of thorium biosorption by *Rhizopus arrhizus*, *Biotechnol. Bioeng.* 24 (1982) 955–969. <https://doi.org/10.1002/bit.260240211>.
- [63] M. Tsezos, B. Volesky, Biosorption of uranium and thorium, *Biotechnol. Bioeng.* 23 (1981)

- 583–604. <https://doi.org/10.1002/bit.260230309>.
- [64] T. Tsuruta, Bioaccumulation of uranium and thorium from the solution containing both elements using various microorganisms, *J. Alloys Compd.* 408–412 (2006) 1312–1315. <https://doi.org/10.1016/j.jallcom.2005.04.131>.
- [65] M. Riazi, A.R. Keshtkar, M.A. Moosavian, Batch and continuous fixed-bed column biosorption of thorium(IV) from aqueous solutions: equilibrium and dynamic modeling, *J. Radioanal. Nucl. Chem.* 301 (2014) 493–503. <https://doi.org/10.1007/s10967-014-3129-7>.
- [66] A.R. Keshtkar, M.A. Hassani, Biosorption of thorium from aqueous solution by Ca-pretreated brown algae *Cystoseira indica*, *Korean J. Chem. Eng.* 31 (2014) 289–295. <https://doi.org/10.1007/s11814-013-0220-7>.
- [67] T. Evseeva, S. Geras'kin, T. Majstrenko, J. Brown, E. Belykh, Comparative estimation of ²³²Th and stable Ce (III) toxicity and detoxification pathways in freshwater alga *Chlorella vulgaris*, *Chemosphere.* 81 (2010) 1320–1327. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2010.08.028>.
- [68] S. Le Faucheur, F. Schildknecht, R. Behra, L. Sigg, Thiols in *Scenedesmus vacuolatus* upon exposure to metals and metalloids, *Aquat. Toxicol.* 80 (2006) 355–361. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2006.10.002>.
- [69] A. Nechaev, Corrosion of zirconium alloys in nuclear power plants, *Iaea Tecdoc.* (1993) 177. <https://doi.org/IAEA-TECDOC-684>.
- [70] K.H. Schaller, Zirconium, in: E. Merian (Ed.), *Metal and their compounds in the environment*, VCH, Weinheim, Germany, (1991): pp. 1343–1347.
- [71] A. Kabata-Pendias, H. Pendias, *Trace elements in soils and plants*, 2nd ed., CRC Press, Inc., Boca Raton, Florida, (1992), 342.
- [72] B.A. McKelvey, K.J. Orians, Dissolved zirconium in the North Pacific Ocean, *Geochim. Cosmochim. Acta.* 57 (1993) 3801–3805. [https://doi.org/10.1016/0016-7037\(93\)90157-R](https://doi.org/10.1016/0016-7037(93)90157-R).
- [73] G.M. Bedinger, 2012 Minerals Yearbook, (2014), 161. <http://minerals.usgs.gov/minerals/pubs/country/2012/myb3-2012-my.pdf>.
- [74] O. Abollino, M. Aceto, M. Malandrino, E. Mentasti, C. Sarzanini, R. Barberis, Distribution and mobility of metals in contaminated sites. Chemometric investigation of pollutant profiles, *Environ. Pollut.* 119 (2002) 177–193. [https://doi.org/10.1016/S0269-7491\(01\)00333-5](https://doi.org/10.1016/S0269-7491(01)00333-5).

- [75] R. Schulín, F. Curchod, M. Mondeshka, A. Daskalova, A. Keller, Heavy metal contamination along a soil transect in the vicinity of the iron smelter of Kremikovtzi (Bulgaria), *Geoderma*. 140 (2007) 52–61. <https://doi.org/10.1016/j.geoderma.2007.03.007>.
- [76] C.B. Brun, M.E. Åström, P. Peltola, M.B. Johansson, Trends in major and trace elements in decomposing needle litters during a long-term experiment in Swedish forests, *Plant Soil*. 306 (2008) 199–210. <https://doi.org/10.1007/s11104-008-9572-x>.
- [77] M.G. Little, C.T.A. Lee, Sequential extraction of labile elements and chemical characterization of a basaltic soil from Mt. Meru, Tanzania, *J. African Earth Sci.* 57 (2010) 444–454. <https://doi.org/10.1016/j.jafrearsci.2009.12.001>.
- [78] P. Bihouix, B. Guillebon, *Quel futur pour les métaux ?*, EDP. Sciences, (2010), 300.
- [79] M. Shadid, E. Ferrand, E. Schreck, C. Dumat, Behavior and impact of zirconium in the soil-plant system: plant uptake and phytotoxicity, *Rev. Environ. Contam. Toxicol.* 221 (2013) 1–105. <https://doi.org/10.1007/978-1-4614-4448-0>.
- [80] E. Sangine, Zirconium and Hafnium, in: U.S. Geological Survey, *Mineral Commodity Summaries*, (2020) : pp. 192-193.
- [81] H. Klemic, D. Gottfried, M. Copper, S.P. Marsh, Zirconium and Hafnium Minerals, in: S.J. Lefond (Ed.), *Industrial minerals and rocks*, American Institute of Mining, Metallurgical, and Petroleum Engineers, Inc., New-York, (1975): pp. 1275–1283.
- [82] X. Dou, Y. Zhang, H. Wang, T. Wang, Y. Wang, Performance of granular zirconium-iron oxide in the removal of fluoride from drinking water, *Water Res.* 45 (2011) 3571–3578. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2011.04.002>.
- [83] P. Couture, C. Blaise, D. Cluis, C. Bastien, Zirconium toxicity assessment using bacteria, algae and fish assays, *Water. Air. Soil Pollut.* 47 (1989) 87–100. <https://doi.org/10.1007/BF00469000>.
- [84] R. Chitrakar, S. Tezuka, A. Sonoda, K. Sakane, K. Ooi, T. Hirotsu, Selective adsorption of phosphate from seawater and wastewater by amorphous zirconium hydroxide, *J. Colloid Interface Sci.* 297 (2006) 426–433. <https://doi.org/10.1016/j.jcis.2005.11.011>.
- [85] S.M. Boswell, H. Elderfield, The determination of zirconium and hafnium in natural waters by isotope dilution mass spectrometry, *Mar. Chem.* 25 (1988) 197–209. [https://doi.org/10.1016/0304-4203\(88\)90050-3](https://doi.org/10.1016/0304-4203(88)90050-3).
- [86] M.L. Firdaus, A.S. Mashio, H. Obata, J.A. McAlister, K.J. Orians, Distribution of zirconium,

- hafnium, niobium and tantalum in the North Atlantic Ocean, northeastern Indian Ocean and its adjacent seas, *Deep. Res. Part I Oceanogr. Res. Pap.* 140 (2018) 128–135. <https://doi.org/10.1016/j.dsr.2018.08.008>.
- [87] C. Gobeil, B. Rondeau, L. Beaudin, Contribution of municipal effluents to metal fluxes in the St. Lawrence river, *Environ. Sci. Technol.* 39 (2005) 456–464. <https://doi.org/10.1021/es049335x>.
- [88] United States Environmental Protection Agency, Priority Pollutant List, (2014), 2. <https://www.epa.gov/sites/production/files/2015-09/documents/priority-pollutant-list-epa.pdf>
- [89] L.E. Macaskie, The application of biotechnology to the treatment of wastes produced from the nuclear fuel cycle: biodegradation and bioaccumulation as a means of treating radionuclide-containing streams., *Crit. Rev. Biotechnol.* 11 (1991) 41–112. <https://doi.org/10.3109/07388559109069183>.
- [90] I. Smith, B. Carson, Trace metals in the environment, Zirconium, Ann Arbor Science Publishers, Michigan, 3 (1978) 1241-1247.
- [91] K. Fujiwara, Y.M. To, H. Kawakami, M. Aoki, M. Tuzuki, Evaluation of metal toxicity in *Chlorella kessleri* from the perspective of the periodic table, *Bull. Chem. Soc. Jpn.* 81 (2008) 478–488. <https://doi.org/10.1246/bcsj.81.478>.
- [92] G.W. Garnham, G.A. Codd, G.M. Gadd, Accumulation of zirconium by microalgae and cyanobacteria, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 39 (1993) 666–672. <https://doi.org/10.1007/BF00205072>.
- [93] C. Housecroft, A. Sharp, Inorganic chemistry, Longman, London, (2012), 1256.
- [94] L. Simon, M. Fodor, I. Pais, Effects of zirconium on the growth and photosynthetic pigment composition of *Chlorella pyrenoidosa* green algae, *J. Plant Nutr.* 24 (2001) 159–174. <https://doi.org/10.1081/PLN-100000318>.
- [95] T. Pröschold, E.H. Harris, A.W. Coleman, Portrait of a species: *Chlamydomonas reinhardtii*, *Genetics.* 170 (2005) 1601–1610. <https://doi.org/10.1534/genetics.105.044503>.
- [96] E.H. Harris, Culture and storage methods, in: *Chlamydomonas Sourcebook- A comprehensive guide to biology and laboratory use*, Academic Press: San Diego, (1989): p. 780.
- [97] B. Lustigman, L.H. Lee, C. Weiss-Magasic, Effects of cobalt and pH on the growth of

- Chlamydomonas reinhardtii*, Bull. Environ. Contam. Toxicol. 55 (1995) 65–72. <https://doi.org/10.1007/BF00212390>.
- [98] C. Fortin, P.G.C. Campbell, Silver uptake by the green alga *Chlamydomonas reinhardtii* in relation to chemical speciation: Influence of chloride, Environ. Toxicol. Chem. 19 (2000) 2769–2778. [https://doi.org/10.1897/1551-5028\(2000\)019<2769:Subtga>2.0.Co;2](https://doi.org/10.1897/1551-5028(2000)019<2769:Subtga>2.0.Co;2).
- [99] M. Vítová, K. Bišová, D. Umysová, M. Hlavová, S. Kawano, Zachleder, M. Cížková, *Chlamydomonas reinhardtii*: Duration of its cell cycle and phases at growth rates affected by light intensity, Planta. 233 (2011) 75–86. <https://doi.org/10.1007/s00425-010-1282-y>.
- [100] R. Wetzel, Attached algal-substrata interactions : fact or myth, and when and how ?, in: R. Wetzel (Ed.), Proceedings of the first international workshop on periphyton of freshwater ecosystems, Dr W. Junk Publishers, (1983): pp. 207–215.
- [101] I.W. Sutherland, The biofilm matrix - An immobilized but dynamic microbial environment, Trends Microbiol. 9 (2001) 222–227. [https://doi.org/10.1016/S0966-842X\(01\)02012-1](https://doi.org/10.1016/S0966-842X(01)02012-1).
- [102] X. Chen, P.S. Stewart, Role of electrostatic interactions in cohesion of bacterial biofilms, Appl. Microbiol. Biotechnol. 59 (2002) 718–720. <https://doi.org/10.1007/s00253-002-1044-2>.
- [103] E. Denkhaus, S. Meisen, U. Telgheder, J. Wingender, Review Chemical and physical methods for characterisation of biofilms, 27 (2007) 1–27. <https://doi.org/10.1007/s00604-006-0688-5>.
- [104] C. Wang, L. Miao, J. Hou, P. Wang, J. Qian, S. Dai, The effect of flow velocity on the distribution and composition of extracellular polymeric substances in biofilms and the detachment mechanism of biofilms, Water Sci. Technol. 69 (2014) 825. <https://doi.org/10.2166/wst.2013.785>.
- [105] A. Gerhardt, Biomonitoring of polluted water: reviews on actual topics, Environmental Research Forum Series, Trans Tech publication Inc., 9 (2000) 320.
- [106] B. Bonada, N., Prat, N., Resh, V.H., Stutzner, Development in aquatic insect biomonitoring : A comparative analysis of recent approaches, Annu. Rev. Entomol. 51 (2006) 495–523. <https://doi.org/10.1146/annurev.ento.51.110104.151124>.
- [107] A. Hoffmann, J. Penner, K. Vohland, W. Cramer, R. Doubleday, K. Henle, U. Kõljalg, I. Kühn, W.E. Kunin, J. José, N.L. Penev, C. Rodríguez, H. Saarenmaa, D.S. Schmeller, P. Stoev, W.J. Sutherland, É.Ó. Tuama, F.T. Wetzel, C.L. Häuser, Improved access to

integrated biodiversity data for science, practice, and policy - the European Biodiversity Observation Network (EU BON), *Nat. Conserv.* 6 (2014) 49–65.

- [108] H.M. Pereira, S. Ferrier, M. Walters, G.N. Geller, R. Jongman, R. Scholes, M.W. Bruford, N. Brummitt, S.H.M. Butchart, A.C. Cardoso, N.C. Coops, E. Dulloo, Essential biodiversity variables, *Science* (80-.). 339 (2013) 277–278.
- [109] G. Lamberti, The Role of Periphyton in Benthic Food Webs., in: R. Stevenson, M.L. Bothwell, R.L. Lowe (Eds.), *Algal ecology : freshwater benthic ecosystems*, Academic Press, San Diego, (1996): p. 753.
- [110] H. Hillebrand, G. De Montpellier, A. Liess, Effects of macrograzers and light on periphyton stoichiometry, *Oikos*. 106 (2004) 93–104. <https://doi.org/10.1111/j.0030-1299.2004.13166.x>.
- [111] R. Pistocchi, F. Guerrini, L. Boni, V. Balboni, Copper toxicity and carbohydrate production in the microalgae *Cylindrotheca fusiformis* and *gymnodinium* sp., *Eur. J. Phycol.* 32 (1997) 125–132. <https://doi.org/10.1080/09670269710001737049>.
- [112] A.W. Decho, Microbial biofilms in intertidal systems: an overview, *Cont. Shelf Res.* 20 (2000) 1257–1273. <https://doi.org/10.1016/j.seares.2014.07.003>.
- [113] S. Morin, M. Bottin, N. Mazzella, F. Macary, F. Delmas, P. Winterton, M. Coste, Linking diatom community structure to pesticide input as evaluated through a spatial contamination potential (Phytopixal): A case study in the Neste river system (South-West France), *Aquat. Toxicol.* 94 (2009) 28–39. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2009.05.012>.
- [114] Morin S., A. Cordonier, I. Lavoie, A. Arini, S. Blanco, T.T. Duong, E. Tornés, B. Bonet, N. Corcoll, L. Faggiano, M. Laviale, F. Pérès, E. Becares, M. Coste, A. Feurtet-Mazel, C. Fortin, H. Guasch, S. Sabater, Consistency in diatom response to metal-contaminated environments, in: H. Guasch, A. Ginebreda, A. Geiszinger (Eds.), *Handbook of environmental chemistry : emerging and priority pollutants in Rivers*, 19 (2012): pp. 117–146. https://doi.org/10.1007/978-3-642-25722-3_5.
- [115] E. Falasco, F. Bona, G. Badino, L. Hoffmann, L. Ector, Diatom teratological forms and environmental alterations: A review, *Hydrobiologia*. 623 (2009) 1–35. <https://doi.org/10.1007/s10750-008-9687-3>.
- [116] A.T. Luís, B. Bonet, N. Corcoll, S.F.P. Almeida, E.F. Da Silva, E. Figueira, H. Guasch, Experimental evaluation of the contribution of acidic pH and Fe concentration to the

- structure, function and tolerance to metals (Cu and Zn) exposure in fluvial biofilms, *Ecotoxicology*. 23 (2014) 1270–1282. <https://doi.org/10.1007/s10646-014-1270-2>.
- [117] H. V Leland, J.L. Carter, U.S.G. Survey, W. Resources, D. Menlo, F. Navicula, Effects of copper on species composition of periphyton in a Sierra Nevada, California, stream, *Freshw. Biol.* 14 (1984) 281–296. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2427.1984.tb00041.x>.
- [118] M.C. Newman, J.J. Alberts, Geochemical factors complicating the use of Aufwuchs to monitor bioaccumulation of arsenic, cadmium, chromium, copper and zinc, *Water Res.* 19 (1985) 1157–1165.
- [119] M. Rémy, V. Berthon, V. Castets, F. Rimet, A. Thiers, F. Labat, B. Fontan, Modelling diatom life forms and ecological guilds for river biomonitoring, *Knowl. Manag. Aquat. Ecosyst.* 418 (2017) 15. <https://doi.org/doi.org/10.1051/kmae/2016033>.
- [120] S. Morin, N. Gómez, E. Tornés, M. Licursi, J. Rosebery, Benthic diatom monitoring and assessment of freshwater environments: standard methods and future challenges, in: A.M. Romaní, H. Guasch, M.D. Balaguer (Eds.), *Aquatic biofilms: ecology, water quality and wastewater treatment*, Caister Academic Press, (2016): pp. 111–124. <https://doi.org/10.21775/9781910190173>.
- [121] N. Corcoll, M. Ricart, S. Franz, F. Sans-Piché, M. Schmitt-Jansen, H. Guasch, The use of photosynthetic fluorescence parameters from autotrophic biofilms for monitoring the effect of chemicals in river ecosystems, in: H. Guasch, A. Ginebreda, A. Geislinger, M. Gros, M. Petrovic (Eds.), *Emerging and priority pollutants in rivers bringing science into river management plans*, *The handbook of environmental chemistry*, Springer, Berlin, Heidelberg, (2012): pp. 85–115. <https://doi.org/10.1007/978-3-642-25722-3>.
- [122] J.R. Pratt, J. Cairns, Functional groups in the Protozoa: roles in differing ecosystems, *J. Protozool.* 32 (1985) 356–360. <https://doi.org/10.1111/j.1550-7408.1985.tb04037.x>.
- [123] P. Madoni, S. Zangrossi, Ciliated protozoa and saprobial evaluation of water quality in the Taro River (northern Italy), *Ital. J. Zool.* 72 (2009) 20–25. <https://doi.org/10.1080/11250000509356648>.
- [124] B. Nisbet, Heterotrophic Feeding, in: Dordrecht (Ed.), *Nutr. Feed. Strateg. Protozoa*, Springer, (1984): pp. 84–100.
- [125] N.J. Horan, *Biological wastewater treatment systems: theory and operation*, 1 edition, Wiley, (1989) 320.

- [126] C. Koedooder, W. Stock, A. Willems, S. Mangelinckx, M. De Troch, W. Vyverman, K. Sabbe, Diatom-bacteria interactions modulate the composition and productivity of benthic diatom biofilms, *Front. Microbiol.* 10 (2019) 1–11. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.01255>.
- [127] K.M. Eriksson, A. Antonelli, R.H. Nilsson, A.K. Clarke, H. Blanck, A phylogenetic approach to detect selection on the target site of the antifouling compound irgarol in tolerant periphyton communities, *Environ. Microbiol.* 11 (2009) 2065–2077. <https://doi.org/10.1111/j.1462-2920.2009.01928.x>.
- [128] H. Guasch, A. Serra, N. Corcoll, B. Bonet, M. Leira, Metal ecotoxicology in fluvial biofilms : potential influence of water scarcity, *The handbook of environmental chemistry.* 8 (2010) 41–53. <https://doi.org/10.1007/698>.
- [129] S. Kim Tiam, I. Lavoie, C. Doose, P.B. Hamilton, C. Fortin, Morphological, physiological and molecular responses of *Nitzschia palea* under cadmium stress, *Ecotoxicology.* 27 (2018) 675–688. <https://doi.org/10.1007/s10646-018-1945-1>.
- [130] S. Kim Tiam, A. Feurtet-Mazel, F. Delmas, N. Mazzella, S. Morin, G. Daffe, P. Gonzalez, Development of q-PCR approaches to assess water quality: effects of cadmium on gene expression of the diatom *Eolimna minima*, *Water Res.* 46 (2012) 934–942. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2011.11.005>.
- [131] M. Ricart, D. Barceló, A. Geiszinger, H. Guasch, M.L. de Alda, A.M. Romaní, G. Vidal, M. Villagrasa, S. Sabater, Effects of low concentrations of the phenylurea herbicide diuron on biofilm algae and bacteria, *Chemosphere.* 76 (2009) 1392–1401. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2009.06.017>.
- [132] L.C. Fechner, C. Gourlay-Francé, A. Bourgeault, M.H. Tusseau-Vuillemin, Diffuse urban pollution increases metal tolerance of natural heterotrophic biofilms, *Environ. Pollut.* 162 (2012) 311–318. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2011.11.033>.
- [133] J.T. Scott, J.A. Back, J.M. Taylor, R.S. King, Does nutrient enrichment decouple algal – bacterial production in periphyton?, *J. North Am. Benthol. Soc.* 27 (2008) 332–344. <https://doi.org/10.1899/07-108.1>.
- [134] L. Proia, F. Cassio, C. Pascoal, A. Tlili, A.M. Romani, The use of attached microbial communities to assess ecological risks of pollutants in river ecosystems : the role of heterotrophs, in: H. Guasch, A. Ginebreda, A. Geiszinger (Eds.), *Emerging and priority*

- pollutants in rivers bringing science into river management plans, *The handbook of environmental chemistry*, Springer, Berlin, Heidelberg, (2012): pp. 55–84. <https://doi.org/10.1007/978-3-642-25722-3>.
- [135] J.R. Lawrence, G.D.W. Swerhone, E. Topp, D.R. Korber, T.R. Neu, L.I. Wassenaar, Structural and functional responses of river biofilm communities to the nonsteroidal anti-inflammatory diclofenac, *Environ. Chem.* 26 (2007) 573–582. <https://doi.org/10.1897/06-340r.1>.
- [136] H. Blanck, W. Admiraal, R.F.M.J. Cleven, H. Guasch, M.A.G.T. Van den Hoop, N. Ivorra, B. Nyström, M. Paulsson, R.P. Petterson, S. Sabater, G.M.J. Tubbing, Variability in zinc tolerance, measured as incorporation of radio-labeled carbon dioxide and thymidine, in periphyton communities sampled from 15 European river stretches, *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 44 (2003) 17–29. <https://doi.org/10.1007/s00244-002-1258-4>.
- [137] M. Paulsson, B. Nyström, H. Blanck, Long-term toxicity of zinc to bacteria and algae in periphyton communities from the river Gota Alv, based on a microcosm study, *Aquat. Toxicol.* 47 (2000) 243–257. [https://doi.org/10.1016/S0166-445X\(99\)00013-2](https://doi.org/10.1016/S0166-445X(99)00013-2).
- [138] M. Ricart, H. Guasch, M. Alberch, D. Barceló, C. Bonninaeu, A. Geiszinger, J. Ferrer, F. Ricciardi, A.M. Romaní, S. Morin, L. Proia, L. Sala, D. Sureda, S. Sabater, Triclosan persistence through wastewater treatment plants and its potential toxic effects on river biofilms, *Aquat. Toxicol.* 100 (2010) 346–353. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2010.08.010>.
- [139] K. Besemer, H. Peter, L.J. Tranvik, T.J. Battin, Unraveling assembly of stream biofilm communities, *ISME J.* 6 (2012) 1459–1468. <https://doi.org/10.1038/ismej.2011.205>.
- [140] E.K. Hall, K. Besemer, L. Kohl, C. Preiler, K. Riedel, T. Schneider, W. Wanek, T.J. Battin, S.L. Mccallister, Effects of resource chemistry on the composition and function of stream hyporheic biofilms, *Front. Microbiol.* 3 (2012) 1–14. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2012.00035>.
- [141] G. Bricheux, L. Morin, G. Le Moal, G. Coffe, D. Balestrino, N. Charbonnel, J. Bohatier, C. Forestier, Pyrosequencing assessment of prokaryotic and eukaryotic diversity in biofilm communities from a French river, *Microbiol. Open.* 2 (2013) 402–414. <https://doi.org/10.1002/mbo3.80>.
- [142] T. Artois, D. Fontaneto, W.D. Hummon, S.J. McInnes, M.A. Todaro, M. V Sørensen, A.

- Zullini, Approach in species identification, in: D. Fontaneto (Ed.), *Biogeogr. Microsc. Org. Is Everything Small Everywhere?*, Cambridge University Press, (2011): p. 384.
- [143] M. Weitere, M. Erken, N. Majdi, H. Norf, M. Reinshaen, W. Traunspurger, A. Walterscheid, K.J. Wey, The food web perspective on aquatic biofilms, *Ecol. Monogr.* (2018) 1–17. <https://doi.org/10.1002/ecm.1315>.
- [144] J. Neury-Ormanni, J. Vedrenne, M. Wagner, G. Jan, S. Morin, Micro-meiofauna morphofunctional traits linked to trophic activity, *Hydrobiologia.* 847, (2019) 2725–2736. <https://doi.org/10.1007/s10750-019-04120-0>.
- [145] K.G. Porter, M.L. Place, J.F. Battey, Ciliate protozoans as links in freshwater planktonic food chains, *Nature.* 277 (1979) 563–565. <https://doi.org/10.1038/277563a0>.
- [146] K.G. Porter, E.B. Sherr, B.F. Sherr, M. Pace, R.W. Sanders, Protozoa in planktonic food webs, *J. Protozool.* 32 (1985) 409–415. <https://doi.org/10.1111/j.1550-7408.1985.tb04036.x>.
- [147] P. Madoni, Protozoa in wastewater treatment processes: a minireview, *Ital. J. Zool.* 78 (2011) 3–11. <https://doi.org/10.1080/11250000903373797>.
- [148] H. Salvadó, M.P. Gracia, J.M. Amigó, Capability of ciliated protozoa as incators of effluent quality in activated sludge plants, *Water Res.* 29 (1995) 1041–1050. [https://doi.org/10.1016/0043-1354\(94\)00258-9](https://doi.org/10.1016/0043-1354(94)00258-9).
- [149] A. Nicolau, N. Dias, M. Mota, N. Lima, Trends in the use of protozoa in the assessment of wastewater treatment, *Res. Microbiol.* 152 (2001) 621–630. [https://doi.org/10.1016/s0923-2508\(01\)01241-4](https://doi.org/10.1016/s0923-2508(01)01241-4).
- [150] Q. Zhou, J. Zhang, J. Fu, J. Shi, G. Jiang, Biomonitoring : an appealing tool for assessment of metal pollution in the aquatic ecosystem, *Anal. Chim. Acta.* 606 (2008) 135–150. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2007.11.018>.
- [151] B.R. Niederlehner, J. Cairns, Community response to cumulative toxic impact: effects of acclimation on zinc tolerance of Aufwuchs, *Can. J. Fish. Aquat. Sci.* 49 (1992) 2155–2163. <https://doi.org/10.1139/f92-238>.
- [152] P. Madoni, The acute toxicity of nickel to freshwater ciliates, *Environ. Pollut.* 109 (2000) 53–59. [https://doi.org/10.1016/S0269-7491\(99\)00226-2](https://doi.org/10.1016/S0269-7491(99)00226-2).
- [153] M.S. Holtze, F. Ekelund, L.D. Rasmussen, C.S. Jacobsen, K. Johnsen, Prey-predator dynamics in communities of culturable soil bacteria and protozoa: Differential effects of

- mercury, *Soil Biol. Biochem.* 35 (2003) 1175–1181. [https://doi.org/10.1016/S0038-0717\(03\)00178-0](https://doi.org/10.1016/S0038-0717(03)00178-0).
- [154] P.Y. Ancion, G. Lear, A. Dopheide, G.D. Lewis, Metal concentrations in stream biofilm and sediments and their potential to explain biofilm microbial community structure, *Environ. Pollut.* 173 (2013) 117–124. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2012.10.012>.
- [155] J.R. Lawrence, G. Kopf, J. V Headley, T.R. Neu, Sorption and metabolism of selected herbicides in river biofilm communities, *Can. J. Microbiol.* 47 (2001) 634–641. <https://doi.org/10.1139/cjm-47-7-634>.
- [156] J. V Headley, J. Gandrass, J. Kuballa, K.M. Peru, Y. Gong, Rates of sorption and partitioning of contaminants in river biofilm, *Environ. Sci. Technol.* 32 (1998) 3968–3973. <https://doi.org/10.1021/es980499l>.
- [157] K.L. Holding, R.A. Gill, J. Carter, The relationship between epilithic periphyton (biofilm) bound metals and metals bound to sediments in freshwater systems, *Environ. Geochem. Health.* 25 (2003) 87–93. <https://doi.org/10.1023/A:1021205101133>.
- [158] T.T. Duong, S. Morin, O. Herlory, A. Feurtet-Mazel, M. Coste, A. Boudou, Seasonal effects of cadmium accumulation in periphytic diatom communities of freshwater biofilms, *Aquat. Toxicol.* 90 (2008) 19–28. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2008.07.012>.
- [159] S. Morin, T.T. Duong, a. Dabrin, a. Coynel, O. Herlory, M. Baudrimont, F. Delmas, G. Durrieu, J. Schäfer, P. Winterton, G. Blanc, M. Coste, Long-term survey of heavy-metal pollution, biofilm contamination and diatom community structure in the Riou Mort watershed, South-West France, *Environ. Pollut.* 151 (2008) 532–542. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2007.04.023>.
- [160] B. Bonet, N. Corcoll, H. Guasch, Antioxidant enzyme activities as biomarkers of Zn pollution in fluvial biofilms, *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 80 (2012) 172–178. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2012.02.024>.
- [161] N. Corcoll, B. Bonet, S. Morin, A. Tlili, M. Leira, H. Guasch, The effect of metals on photosynthesis processes and diatom metrics of biofilm from a metal-contaminated river: A translocation experiment, *Ecol. Indic.* 18 (2012) 620–631. <https://doi.org/10.1016/j.ecolind.2012.01.026>.
- [162] S. Meylan, R. Behra, L. Sigg, Accumulation of copper and zinc in periphyton in response to dynamic variations of metal speciation in freshwater, *Environ. Sci. Technol.* 37 (2003)

5204–5212. <https://doi.org/doi.org/10.1021/es034566>.

- [163] A. Serra, N. Corcoll, H. Guasch, Copper accumulation and toxicity in fluvial periphyton : The influence of exposure history, *Chemosphere*. 74 (2009) 633–641. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2008.10.036>.
- [164] K.S. Kim, D.H. Funk, D.B. Buchwalter, Dietary (periphyton) and aqueous Zn bioaccumulation dynamics in the mayfly *Centroptilum triangulifer*, *Ecotoxicology*. 21 (2012) 2288–2296. <https://doi.org/10.1007/s10646-012-0985-1>.
- [165] E.L.C. Irving, D.O.J. Baird, J.O.M. Culp, Ecotoxicological responses of the mayfly *Baetis tricaudatus* to dietary and waterborne cadmium : implication for toxicity testing, *Environ. Toxicol. Chem.* 22 (2003) 1058–1064.
- [166] L. Xie, D.B. Buchwalter, Cadmium exposure route affects antioxidant responses in the mayfly *Centroptilum triangulifer*, *Aquat. Toxicol.* 105 (2011) 199–205. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2011.06.009>.
- [167] J.M. Conley, D.H. Funk, N.J. Cariello, D.B. Buchwalter, Food rationing affects dietary selenium bioaccumulation and life cycle performance in the mayfly *Centroptilum triangulifer*, *Ecotoxicology*. 20 (2011) 1840–1851. <https://doi.org/10.1007/s10646-011-0722-1>.
- [168] J. Neury-Ormanni, C. Doose, N. Majdi, J. Vedrenne, W. Traunspurger, S. Morin, Selective grazing behaviour of chironomids on microalgae under pesticide pressure, *Sci. Total Environ.* 730 (2020) 138673. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.138673>.

2 EFFETS DE LA SPECIATION EXTRA ET INTRACELLULAIRE DU TH ET DU ZR : DE L'INTERNALISATION AUX MECANISMES DE TOXICITE

2.1 Introduction

Dans la grande majorité des cas, la toxicité provoquée par les éléments métalliques dans les milieux aquatiques est dépendante de leur capacité à être pris en charge par les cellules des organismes [1,2] Comme vu précédemment dans l'introduction générale, l'internalisation des métaux est fortement dépendante de leur spéciation, qui elle-même dépend d'un ensemble de paramètres physicochimiques tels que le pH et la quantité de ligands de même que leur capacité de complexation (cf. 1.2.3). La concentration métallique totale, c'est-à-dire la quantité totale de l'élément indépendamment des formes sous lesquelles il se trouve dans les eaux, est connue pour être un mauvais indicateur quant aux effets des expositions aux métaux sur les organismes aquatiques [3]. En réalité, pour un bon nombre de métaux tels que l'Ag, le Cd, le Cu, le Ni, le Pb et le Zn, les concentrations en ion libre sont celles qui permettent de prédire le mieux leur toxicité [4]. La capacité des formes chimiques des métaux de se lier aux sites biologiques est également importante pour expliquer leurs effets toxiques. C'est à partir de ces constats que le modèle de l'ion libre (MIL, FIAM en anglais) et le modèle du ligand biotique (MLB, BLM en anglais) ont été développés et se sont montrés applicables chez plusieurs organismes et notamment chez les microalgues vertes [1]. Ces modèles représentent donc des outils intéressants à intégrer dans les démarches de protections et de suivis des contaminations métalliques dans les eaux douces. Cependant ces modèles présentent des limites. Dans le cas du scandium (Sc), ils ne fonctionnent que dans une certaine gamme de pH [5] et ne sont pas de bons prédicteurs lorsque celui-ci est en présence de fluorures [6]. Autre exemple, dans le cas du Pb, en présence de matière organique, le métal était plus fortement accumulé par les microalgues vertes *Chlorella kesslerii* qu'en absence de matière organique, donc l'accumulation ne dépendait plus uniquement de la concentrations en ion libre [7]. C'est pourquoi, pour l'évaluation des risques liés aux contaminations métalliques, il est intéressant de coupler ces modèles à d'autres outils de biosuivi basés sur l'étude des organismes présents dans les milieux étudiés tels que les biofilms périphytiques.

Le biofilm périphytique est composé de nombreux microorganismes, appartenant à différents phylums, vivants dans une matrice d'EPS (cf. 1.5.2.1). Facile à échantillonner, il permet d'observer la toxicité des contaminants en intégrant toutes les variabilités naturelles et

physicochimiques [8]. Il permet également de mesurer certains contaminants bioaccumulés par les organismes qui sont indétectables par dosage dans les eaux car trop faiblement concentrés ou parce que l'évènement de contamination est terminé lors de l'échantillonnage. Il est également ubiquiste et peut être retrouvé dans des milieux extrêmes (pH élevé, faible ou forte température, etc). Cependant, l'hétérogénéité du biofilm rend parfois difficile la compréhension des mécanismes d'accumulation [9,10]. En effet, la composition complexe de la matrice d'EPS offre une grande diversité de sites de complexation et de ligands pour les métaux [11–13], et peut réduire la concentration des éléments métalliques libres dans la colonne d'eau. La baisse de la bioaccumulation par les microorganismes grâce à ces mécanismes de complexation a été observée pour le Cu, mais pas dans le cas du Zn [14]. Ainsi, mieux comprendre la répartition des métaux dans les différentes fractions du biofilm telles que les EPS solubles (EPSs), la fraction adsorbée à la surface des organismes et la fraction fortement associée aux organismes (adsorbée ou internalisée), pourrait aider à mieux comprendre les effets des métaux sur les communautés périphytiques. De plus, ces communautés étant à la base de la chaîne trophique aquatique, il a été démontré que l'assimilation des consommateurs était étroitement liée avec la composition taxonomique du biofilm, la capacité de ces organismes à bioaccumuler les métaux et la répartition subcellulaire de ces derniers une fois internalisés [15–18]. Ainsi déterminer la capacité des organismes du biofilm à bioaccumuler les contaminants métalliques en fonction de la spéciation des métaux dans la colonne d'eau et dans la matrice d'EPS permettrait d'évaluer les risques des contaminations non seulement sur les communautés microbiennes, mais également sur les maillons supérieurs de la chaîne trophique.

La spéciation des métaux tétravalents tels que le Th et le Zr, ainsi que leur potentiel toxique dans les milieux aquatiques, ont été et sont encore peu étudiés (cf. 1.3 et 1.4). Déterminer leurs comportements dans les eaux et leurs capacités à être bioaccumulés par le biofilm périphytique permettrait de mieux comprendre les enjeux écotoxicologiques de ces éléments en cas de contamination des écosystèmes aquatiques.

Dans ce chapitre, la capacité des microalgues vertes modèles et des différentes fractions du biofilm à accumuler le Th sera discutée grâce à la réalisation d'expériences de prise en charge à court terme, de fractionnement subcellulaire et de répartition dans les différentes fractions du biofilm définie ci-dessus. N'ayant pas réussi à obtenir des courbes d'internalisation du Th linéaire en fonction du temps (pentes peu ou pas significatives), les résultats obtenus concernant les effets de la spéciation de ces deux métaux n'ont pas encore permis de les caractériser. En ce qui concerne les résultats de la prise en charge et du fractionnement subcellulaire du Zr, les dosages

obtenus à l'ICP MS présentait de trop fortes variations, n'étant pas exploitables, ils ne seront donc pas présentés. Ceci pouvant être dû à l'adsorption du Zr sur les filtres en polycarbonate et dans les erlenmeyers utilisés dans les protocoles. Cependant, ceux concernant la prise en charge et le fractionnement subcellulaire du Th ouvrent certaines voies d'interprétation et pistes d'exploration intéressantes à discuter pour de futurs travaux.

2.2 Matériel et méthode

2.2.1 Culture algale

Les cultures de *Chlamydomonas reinhardtii* (CR) et de *Raphidocelis subcapitata* (PS) ont été mises à croître en chambre environnementale (Conviron, CMP3023) dans du MHSM 1 (cf. Annexe I), un milieu de culture synthétique utilisé couramment pour la culture de CR [19], et repiquées tous les 3 jours la semaine précédant l'exposition. Ainsi la culture était maintenue en phase exponentielle de croissance. Les cultures étaient maintenues sous une luminosité ($100 \text{ mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$), une température ($20,0 \pm 0,2 \text{ }^\circ\text{C}$) et une agitation (ca. 60 rotations m^{-1}) constantes.

2.2.2 Solution d'exposition

Toutes les solutions d'exposition ont été réalisées telles que décrit dans [19], à partir d'une solution contenant les espèces chimiques répertoriées dans le tableau 2.1 ci-dessous avec leurs concentrations respectives :

Tableau 2.1. Composition de la solution d'exposition

Espèces chimiques	Concentrations (M)
NH_4NO_3	$9,37 \times 10^{-4}$
$\text{MgSO}_4, 7 \text{ H}_2\text{O}$	$8,12 \times 10^{-5}$
$\text{Ca}(\text{NO}_3)_2, 4 \text{ H}_2\text{O}$	$6,80 \times 10^{-5}$
KNO_3	$4,00 \times 10^{-3}$

Des ajouts de Th et de Zr étaient réalisés à l'aide d'une solution stock ICP (1000 ppm, soit 4,31 et 10,96 mM respectivement) pour obtenir une concentration de 1 nM pour les deux métaux. L'ajustement du pH à 5 a été effectué en ajoutant de faibles volumes de NaOH (1 M).

2.2.3 Prise en charge à court terme

Les cultures algales ont été concentrées par filtration sur filtre en polycarbonate de 2 μm après 48 h de croissance en milieu MHSM 1. Les algues ont été resuspendues dans 10 mL de solution d'exposition sans métal. Afin de mesurer la densité algale, 100 μL de la suspension ont été dilués dans 9,90 mL de solution Isoton (Beckman Coulter) et placés dans le compteur à particules (Counter Multisizer III, Beckman Coulter). Une fois la densité déterminée, le volume d'ajout de la solution d'algues dans les erlenmeyer contenant 100 mL de milieu d'exposition (à 1 nM de Th ou de Zr) a été calculé afin d'obtenir une densité algale de $50 \times 10^3 \text{ cell} \cdot \text{mL}^{-1}$.

L'internalisation du métal par les algues a été suivie pendant 1 h avec un prélèvement à 2, 22, 42 et 62 min, maintenues sous une luminosité ($100 \text{ mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$), une température ($20,0 \pm 0,2 \text{ }^\circ\text{C}$) et une agitation (ca. 60 rotations min^{-1}) constantes en chambre environnementale (Conviron, CMP3023). Chaque temps de prélèvement correspond à des erlenmeyers ($n = 3$) de 100 mL de solution d'exposition. Pour prélever les algues, le volume total de l'erlenmeyer (100 mL) a été filtré à l'aide d'une tulipe de filtration où deux filtres en polycarbonate de porosité de 2 μm ($\text{Ø} 47 \text{ mm}$) ont été placés l'un sur l'autre. Le premier permet de récolter les algues pour ensuite déterminer le métal accumulé dans les cellules. Le second filtre (filtre témoin) permet de vérifier si une partie du métal y reste liée après les lavages successifs. Lors de la première filtration, la solution filtrée était récoltée dans des tubes de 50 mL pour déterminer la concentration finale en métal dans la solution d'exposition. Les filtres étaient ensuite lavés à trois reprises à l'aide de 10 mL de solution d'EDTA (0,1 mM) laissée 5 min en contact avec les filtres. Ainsi le métal extracellulaire est, en principe, éliminé et lors du dosage de la solution d'algues digérées, seul le métal intracellulaire est détecté.

Des erlenmeyers témoins ($n = 3$) remplis avec une solution d'exposition dépourvue de Th et la même concentration algale ont été préparés. Les algues ont été collectées à la fin de l'expérience à environ 64 min afin de quantifier le niveau de base en Th et en Zr présent dans les cellules.

2.2.4 Fractionnement subcellulaire

Les cultures algales ont été concentrées par filtration sur des filtres en polycarbonate de porosité de 2 μm ($\text{Ø} 47 \text{ mm}$) après 48 h de croissance. Les algues ont été resuspendues dans 10 mL de solution d'exposition sans métal. La densité algale a été mesurée avec un compteur de particules (Counter Multisizer III, Beckman Coulter) avec la dilution de 50 μL de la suspension dans 9,950 mL de solution Isoton (Beckman Coulter). Une fois la densité déterminée, le volume d'ajout de la solution d'algues dans les différentes conditions a été calculé afin d'obtenir une densité algale de

150 000 cellules·mL⁻¹. Les algues ont été laissées en contact avec le thorium (1 nM) pendant 1 h dans 400 mL de solution d'exposition. La condition d'exposition a été réalisée en triplicata et une condition témoin sans thorium a également été effectuée.

Les algues ont été récoltées par centrifugation (8 min, 9000 rpm). Le culot obtenu a été resuspendu avec 10 mL de solution de rinçage à l'EDTA puis centrifugé de nouveau (4 min, 9000 rpm). Le lavage a été effectué à trois reprises afin d'éliminer le Th extracellulaire. Des aliquotes de 4 mL de chaque surnageant ont été prélevées afin de vérifier que les lavages ont bien fonctionné (absence de Th désorbé lors du 3^e lavage). Les culots d'algues obtenus ont été suspendus à nouveau dans 2 mL de solution d'exposition sans Th dont 0,5 mL a été prélevé pour déterminer le Th intracellulaire total. La densité algale des échantillons a été contrôlée au compteur de particules en diluant 20 µL de chaque échantillon dans 9,98 mL d'Isoton. Le reste du volume a été placé dans des tubes Ependorff de 1,5 mL. À partir de cette étape, les échantillons ont été maintenus à 4°C tout au long de l'expérience. Afin de briser la paroi cellulaire des algues et d'extraire leur contenu cellulaire, les échantillons ont été passés au sonicateur pendant 4 minutes à 22 W. Les expériences de fractionnement subcellulaire ont été réalisées selon le protocole utilisé par notre équipe de recherche [20], adapté du protocole de Wallace (2003) pour l'algue *Chlamydomonas reinhardtii* [21]. Un résumé des étapes de l'expérience est présenté en Figure 2.1. Tous les tubes contenant les algues intactes (afin de quantifier le Th et le Zr total intracellulaire) ainsi que les différentes fractions subcellulaires ont été pesés avant et après le prélèvement des échantillons afin de déterminer le volume exact du culot et des surnageants obtenus. Ce protocole a été réalisé deux fois dans l'objectif de valider les résultats obtenus.

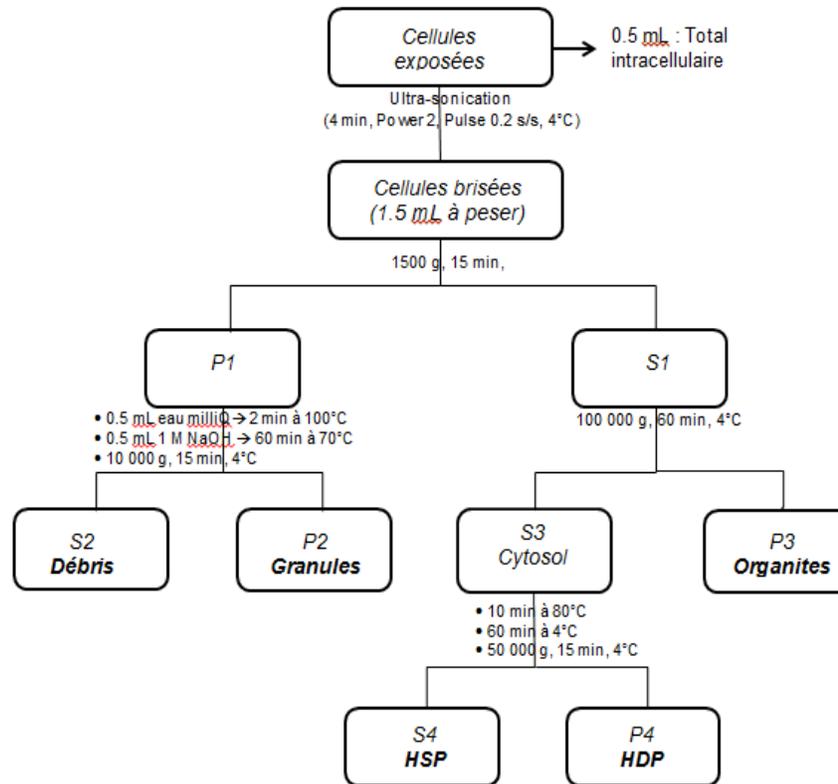


Figure 2.1. Représentation de la méthode de fractionnement subcellulaire appliquée à l'algue *C. reinhardtii* traduit de Lavoie et al. (2009) [20] et les différentes fractions obtenues : débris, granules, organites, protéines stables à la chaleur (HSP) et protéines instables à la chaleur (HDP). Les abréviations P et S signifiant culot (*pellet*) et surnageant respectivement.

2.2.5 Accumulation du thorium et du zirconium dans les différentes fractions du biofilm périphytique

Le biofilm périphytique utilisé pour ces expériences est le même que décrit dans le matériel et méthode du chapitre 4 (Cf. 4.2.1). Brièvement, le biofilm a été mis à coloniser durant 1 mois pour ensuite être exposé aux métaux en canaux pendant 4 semaines. Une condition témoin (sans métal), une condition à 1 nM (C1) et à 10 nM (C10) pour lesquelles quatre canaux pour chacune des conditions d'exposition ont été destinés ($n = 4$). Dans chaque canal, deux échantillons de biofilm ont été prélevés à 1, 2 et 4 semaines par canaux, produisant ainsi huit répliques par condition pour chaque temps de prélèvement.

La méthode de séparation des différentes fractions du biofilm par centrifugation a été réalisée selon le protocole de Stewart et al (2015) (Figure 2.2) [11]. Pour chaque condition, deux aliquotes de 4,5 mL et 1 mL furent tout d'abord prélevés dans la suspension de biofilm afin de déterminer la concentration totale en Th, polysaccharides et protéines des échantillons. Le reste de la

suspension de biofilm a ensuite été centrifugée à 1880 g pendant 10 min. Le surnageant obtenu contenait les substances polymériques extracellulaires solubles (EPSs). Deux aliquotes de 4,5 mL et 1 mL furent prélevés dans tous les surnageants après chaque centrifugation pour déterminer les concentrations en Th dans chaque fraction obtenue au court de cette expérience. Le culot obtenu fut resuspendu dans 10 mL d'une solution d'EDTA à 4 mM (pH 8). La solution a été laissée 10 min en contact avec l'échantillon afin de permettre à l'EDTA de complexer le Th non fortement lié à la biomasse. Une centrifugation de 10 min à 1880 g a ensuite été effectuée. Le surnageant obtenu représente la fraction dite « sorbée » (désorbable à l'EDTA). Un lavage des complexes EDTA-métal restants dans le culot a été réalisé en ajoutant 10 mL d'une solution d'acide 3-morpholino-1-propanesulfonique (MOPS) à 10 mM (pH 7,5). Une dernière centrifugation similaire au deux précédentes a été effectuée. Le surnageant contenant les résidus des complexes EDTA-Th, les concentrations en Th déterminées ultérieurement seront assimilés à la fraction « sorbée ». Le culot obtenu fut ensuite resuspendu dans 10 mL de milieu Dauta frais afin de pouvoir prélever les deux aliquotes destinées aux dosages des protéines, polysaccharides et Th. Le dosage des polysaccharides a été réalisé selon la méthode de Dubois et al. (1956) [22] et celui des protéines selon la méthode de Bradford (1976) [23] adapté au biofilm tel que réalisé par Chaumet et al. (2019) [24].

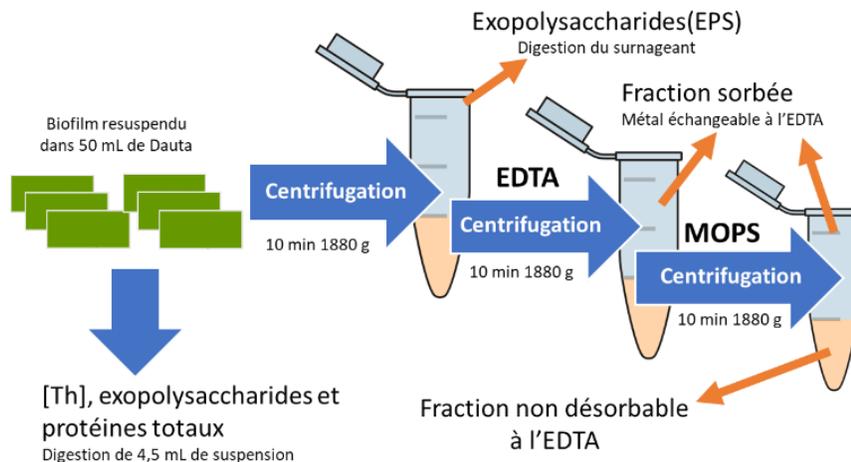


Figure 2.2. Schéma du protocole de séparation des différentes fractions du périphyton d'après Stewart et al., 2015 [11].

2.2.6 Mesures des concentrations en thorium et en zirconium

Tous les échantillons de milieux d'exposition ainsi que ceux pour la mesure du Th et du Zr ont été acidifiés (HNO₃ 10 %). Les filtres témoins et ceux contenant les algues des expériences de

prise en charge à court terme ont été placés dans des tubes Falcon de 50 mL où l'on a ajouté 500 μL de HNO_3 (99,9 %, *trace metal*). Les tubes ont été chauffés à 92°C dans un bloc digesteur puis un volume d'eau Milli-Q de 4,5 mL a été ajouté pour obtenir une concentration d'acide à 10 %.

Les échantillons pour le dosage du métal total intracellulaire et du métal contenu dans les fractions subcellulaires ont tout d'abord été mis en contact avec 0,5 mL de HNO_3 (99,9 %, *trace metal*) durant 48 h. Puis 160 μL de H_2O_2 30 % ont été ajoutés dans les fractions contenant les granules, les protéines instables à la chaleur HDP, les organites, et 400 μL dans les échantillons de métal total intracellulaire. Ces derniers échantillons ont été laissés à digérer 24 h puis un volume d'eau a été ajouté dans chacun d'entre eux afin d'obtenir une concentration d'acide à 10%.

Les échantillons de biofilm ont été lyophilisés puis pesés pour déterminer leur masse sèche. Ensuite ils ont été digérés dans des tubes de 50 mL dans 500 μL de HNO_3 (99,9 %, *trace metal*) et 10 μL d'acide fluoridrique (99,9 %, *optima*). Après 24 h, un volume d'eau de 4,5 mL a été ajouté pour obtenir une concentration d'acide à 10 %. Les mesures des concentrations en Th et Zr dans tous les échantillons ont été réalisées à l'ICP-MS.

2.2.7 Traitement statistique des données

Les tests statistiques tels que les ANOVA two-way, test non paramétrique de Wilcoxon, modèle à effet mixte et test de corrélation ont été effectués à l'aide du logiciel R avec les packages factoMineR, lme4 et le package de base respectivement. Les valeurs étaient considérées comme significativement différentes lorsque la valeur de p était inférieure à 0,05.

2.3 Résultats et discussion

2.3.1 Prise en charge et répartition subcellulaire du thorium chez des algues vertes modèles

Expériences de prise en charge du thorium par les algues vertes

La spéciation du Th (1 nM) dans l'eau pure est représentée figure 2.3. À pH 5, le Th se trouve principalement sous deux formes hydroxydes : $\text{Th}(\text{OH})_4^0$ et $\text{Th}(\text{OH})_2^{+2}$.

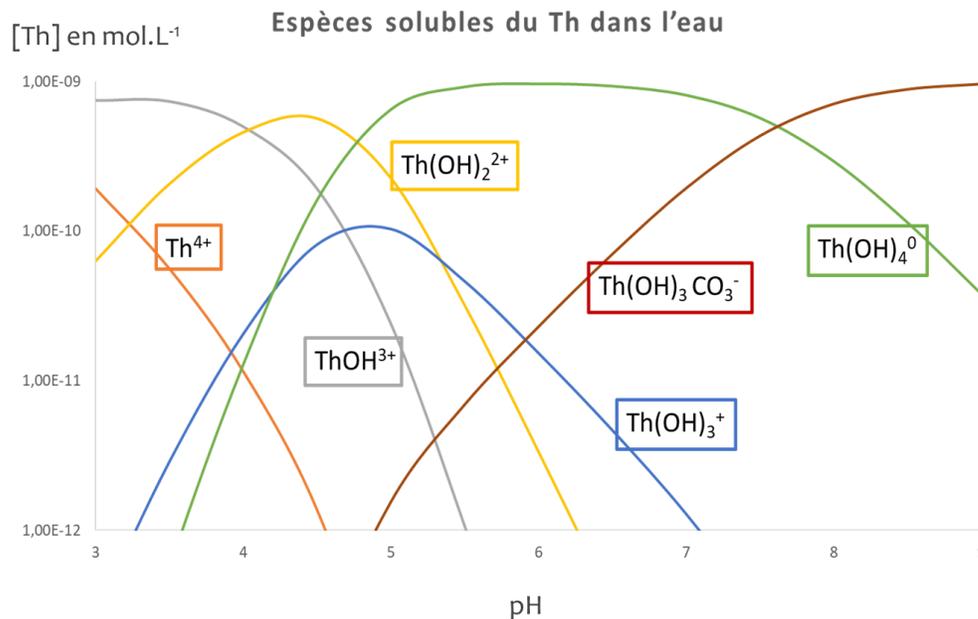


Figure 2.3. Spéciation du thorium concentré à 1 nM dans l'eau en fonction du pH modélisé à l'aide du logiciel WHAM et des données thermodynamiques issues de la base de données Nagra/PSI 01/01 [25]

Les concentrations en Th mesurées dans le milieu témoin sont environ 10 fois plus faibles que celles mesurées dans les milieux d'exposition avec Th (Tableau 2.2). De même, dans les filtres témoins, les quantités de Th étaient environ deux fois inférieures à celles mesurées sur les filtres recueillant les algues. Par ailleurs, aucune différence statistique entre les filtres témoins des conditions sans Th et ceux des conditions avec Th n'a été observée ($p < 0,05$). Ceci montre bien que le bruit de fond est constant et que la différence dans la concentration de Th mesuré entre les algues exposées et témoins est due à l'ajout de Th dans les milieux d'exposition.

Tableau 2.2. Concentrations en thorium mesurées dans les échantillons témoins et contrôles des expériences de prise en charge à court terme 1,2 et 3. Les valeurs correspondent aux moyennes \pm les écarts-types

Expérience	Algue	[Th] _{milieu témoin} (nM)	Th retenu par le filtre témoin (ng)	[Th] _{algue témoin} (amol cell ⁻¹)	[Th] _{expo} (nM)
1	<i>C. reinhardtii</i>	0,031 \pm 0,001	84,1 \pm 4,5	0,07 \pm 0,01	0,78 \pm 0,08
2	<i>C. reinhardtii</i>	0,034 \pm 0,001	74,1 \pm 3,3	0,041 \pm 0,001	0,47 \pm 0,03
3	<i>C. reinhardtii</i>	0,140 \pm 0,002	NA	0,054 \pm 0,001	NA

Les expériences de prise en charge à court terme sont habituellement conçues pour quantifier les flux transmembranaires dans différentes conditions afin de les comparer et de déterminer l'impact de la spéciation du métal étudié et de tester la pertinence du MLB. Lors de ces expositions de courtes durées (≤ 1 h), l'accumulation est habituellement linéaire avec le temps. Les pentes obtenues avec ou sans la présence de ligand représentent les flux transmembranaires et leur comparaison permet de déduire l'effet de ces ligands sur la prise en charge en fonction de la spéciation. Dans la figure 2.4, représentant les concentrations intracellulaires du Th dans les algues *C. reinhardtii* (CR) et *R. subcapitata* (PS) en fonction du temps d'exposition, les résultats ne démontrent aucune relation linéaire à l'exception de l'expérience 4 menée avec PS mais dont la relation est inverse. La concentration moyenne de Th associé aux cellules (non désorbable à l'EDTA) était de $0,16 \pm 0,02$, $0,11 \pm 0,02$, $0,26 \pm 0,04$ et $0,30 \pm 0,04$ amol·cell⁻¹ dans les expériences 1, 2, 3 et 4 respectivement. Ces concentrations intracellulaires sont significativement plus de deux fois supérieures à celles mesurées dans les algues témoins pour les expériences 1 et 2 (test de Wilcoxon, $p = 0,0002$). En d'autres termes, le Th mesuré dans les témoins représente 38 ± 12 % du Th mesuré dans les conditions exposées.

L'absence de relation linéaire entre la concentration intracellulaire chez l'algue CR et le temps d'exposition laisserait penser que le Th mesuré dans les échantillons d'algues serait dû à un phénomène d'adsorption tel que décrit pour le scandium (Sc) par Crémazy et al. (2013) [5]. Cependant, contrairement au Sc, les constantes de complexation des formes de Th présentent en solution avec l'EDTA sont élevées [26]. Pour des pH compris entre 2 et 7, l'espèce prédominante formée est Th-EDTA ($\log K = 23,2$) [27]. Ainsi, l'ajout d'EDTA et les rinçages effectués devraient être suffisants pour complexer et éliminer le thorium adsorbé. Cependant, il existe des cas où ce lavage ne permettait pas de discriminer parfaitement le métal intracellulaire et adsorbé. En effet, le rinçage à l'EDTA ne permettait pas d'extraire la totalité de l'aluminium extracellulaire des branchies de saumon Atlantique ainsi que l'uranium adsorbé aux parois de *Chlamydomonas reinhardtii* malgré des constantes de complexation très élevées ($\log K$ (Al-EDTA) = 16,5 et $\log K$ (UO₂-EDTA) = 25,7) [19,28]. Ainsi l'hypothèse suggérée par les auteurs, était que ces deux métaux soient très fortement liés aux sites présents à la surface des cellules. Cependant, dans les expériences de prise en charge menée avec le Th la concentration en EDTA est sensée largement excéder celle des sites biologiques [29], et est donc plus susceptible de complexer le Th libre. Mais dans les travaux de Fortin et al. (2004) effectué sur l'uranium, il a été démontré qu'une fois le métal complexé à certains sites à la surface des cellules de *C. reinhardtii*, ces derniers devenaient non disponibles pour des échanges rapides avec des ligands forts tels que l'EDTA. Un autre résultat surprenant concerne la relation linéaire décroissante obtenue pour

l'algue PS, toutefois la différence observée est inférieure à l'amplitude du bruit de fond en Th (0,04 à 0,07 amol·cell⁻¹) et il serait hasardeux de conclure à une baisse réelle. L'hypothèse d'une élimination du Th de la cellule vers le milieu extérieur ne semble pas raisonnable au regard de l'échelle de temps. En effet, les flux cellulaires vers l'extérieur sont souvent décrits comme dépendant du métal internalisé [30] et souvent induit après de longues expositions (> 1 h) à de fortes concentrations en métaux chez les microorganismes [31–33]. La diminution du Th non désorbable à l'EDTA pourrait être due à la sénescence des algues. En effet, le milieu simplifié est carencé en nutriment et pourrait, combiné avec un potentiel effet toxique du Th, ralentir le métabolisme des algues pendant l'exposition et donc réduire la capacité de ces dernières à internaliser le métal. Cependant cette explication est peu probable au regard des résultats obtenus avec des expériences similaires réalisées dans notre équipe avec d'autres métaux [34,35]. L'interprétation la plus probable à nos yeux est que le flux d'internalisation du Th est trop faible pour observer une augmentation significative sur une période d'une heure

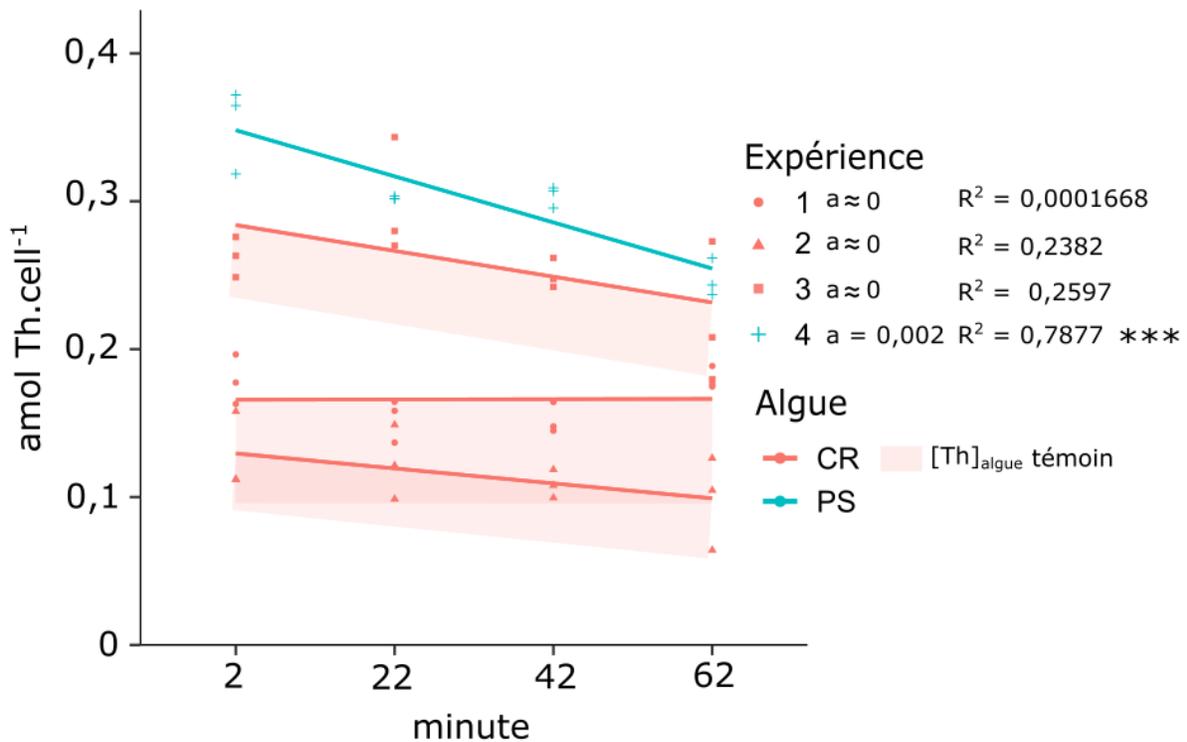


Figure 2.4. Prise en charge à court terme du Th (1 nM) in *C. reinhardtii* (CR) et *R. subcapitata* (PS) en fonction du temps. Les droites représentent les régressions linéaires effectuées sur les données et les coefficients a représentent leurs pentes respectives. [Th]_{algue témoin} représente les concentrations moyennes de Th mesurées dans les algues témoin référencées dans le tableau 2.2 pour chaque expérience.

Distribution subcellulaire du thorium

Les concentrations effectives des solutions d'exposition mesurées à l'ICP-MS étaient de $1,05 \pm 0,01$ nM (244 ± 2 ng·L⁻¹), $0,743 \pm 0,004$ nM (172 ± 1 ng·L⁻¹) et $0,51 \pm 0,01$ nM (140 ± 5 ng·L⁻¹) dans les expériences 1, 2 et 3 telles que présentées au tableau 2.3 respectivement. Les limites de détection de l'appareil calculées pour les trois expériences étaient de 0,004 nM (1 ng·L⁻¹) et 0,002 nM (0,5 ng·L⁻¹ et 0,4 ng·L⁻¹) pour l'expérience 1 et les expériences 2 et 3 respectivement. Il est également à noter que le bruit de fond dans les « blancs », c'est-à-dire les témoins de l'analyse effectuée à l'ICP-MS (HNO₃ TM 10 %), étaient en dessous des limites de détection. Le dosage d'échantillons prélevés lors des trois lavages successifs réalisés avant le fractionnement montre que le thorium désorbable à l'EDTA est bien rincé, les échantillons du dernier rinçage correspondant au bruit de fond de l'appareil. La concentration des conditions témoin en thorium était en moyenne significativement $5,7 \pm 0,2$ fois plus faible que celles des conditions exposées (modèle à effet mixte, $p = 0,006$). En d'autres termes, les concentrations des témoins représentaient 15 ± 9 % des concentrations mesurées dans les algues exposées. Selon les résultats présentés dans la figure 2.5., le thorium semble se loger préférentiellement dans la fraction associée à la détoxification des métaux (protéines stables à la chaleur : HSP, et granules avec environ $30,7 \pm 2,1$ %) du Th intracellulaire, et dans les organites avec $24,6 \pm 2,0$ %. Les granules ($19,2 \pm 7,2$ % du Th) peuvent être constituées de chaînes de polyphosphates ayant une grande affinité pour les métaux et notamment le thorium. Elles sont donc capables de le séquestrer l'empêchant ainsi de se lier aux sites biologiques [20]. Cette fraction ne représente pas un grand danger en ce qui concerne le transfert trophique, car elle est très faiblement voire non assimilée par les prédateurs [36]. Les organites sont des structures cellulaires ayant des fonctions diverses. L'accumulation du thorium dans ces organites pourrait perturber les fonctions qu'elles assurent. Ainsi la présence de thorium dans cette fraction témoigne d'un possible danger du métal pour la cellule. De plus, les organites peuvent être plus facilement assimilés par les prédateurs que les granules et représentent un risque de transfert trophique plus élevé que pour les granules [37]. Quant aux autres fractions, elles ne semblent pas interagir de manière significative avec le thorium. Ces résultats indiquent une répartition subcellulaire similaire à celles des éléments des terres rares. En effet, dans les travaux de Racine (2016) [38] environ 50 % des terres rares intracellulaires se liaient aux organites et 21-23 % se liaient aux granules.

Tableau 2.3. Concentration totale en Th dans les cellules de *Chlamydomonas reinhardtii* (CR) après 1 h de contact avec les milieux d'exposition dans les expériences de prise en charge à court terme et de fractionnement subcellulaire.

Expérience	Prise en charge (t = 62 min)			Fractionnement subcellulaire		
	1	2	3	1	2	3
[Th] _{algue} (amol·cell ⁻¹)	0,180 ± 0,008	0,10 ± 0,03	0,22 ± 0,05	0,08 ± 0,02*	0,014 ± 0,002	0,098 ± 0,045
[Th] _{expo} (nM)	0,78 ± 0,08	0,47 ± 0,03	NA	1,05 ± 0,01	0,743 ± 0,004	0,51 ± 0,01
[Th] _{algue témoin} (amol·cell ⁻¹)	0,07 ± 0,01	0,041 ± 0,001	0,054 ± 0,001	0,01	0,003	0,004

* Les valeurs de Th intracellulaire de l'expérience 1 du fractionnement subcellulaire sont issues de la somme du Th mesuré dans les fractions.

Les concentrations en Th lié aux cellules obtenues lors de l'expérience de fractionnement 2 sont étonnamment faibles comparées aux deux autres expériences ainsi qu'aux concentrations obtenues dans les prises en charge (Tableau 2.3). Elles correspondent aux concentrations retrouvées dans les témoins des prises en charge. Cependant, le thorium associé aux algues dans les conditions témoins pour cette expérience était de 0,002 amol·cell⁻¹, soit une concentration 10 fois inférieure à celles observées en présence de Th. Il est également intéressant de noter que, malgré la différence de quantité de métal total internalisé, la répartition subcellulaire reste la même que pour les deux autres expériences. Ceci a été également observé pour la répartition du Th présent dans les cellules avant l'exposition déterminé dans les cellules témoins lors des trois expériences de fractionnement (Figure 2.5.B). La répartition subcellulaire du Th ne semble pas être dépendante de la concentration en métal dans le milieu pour de faibles concentrations.

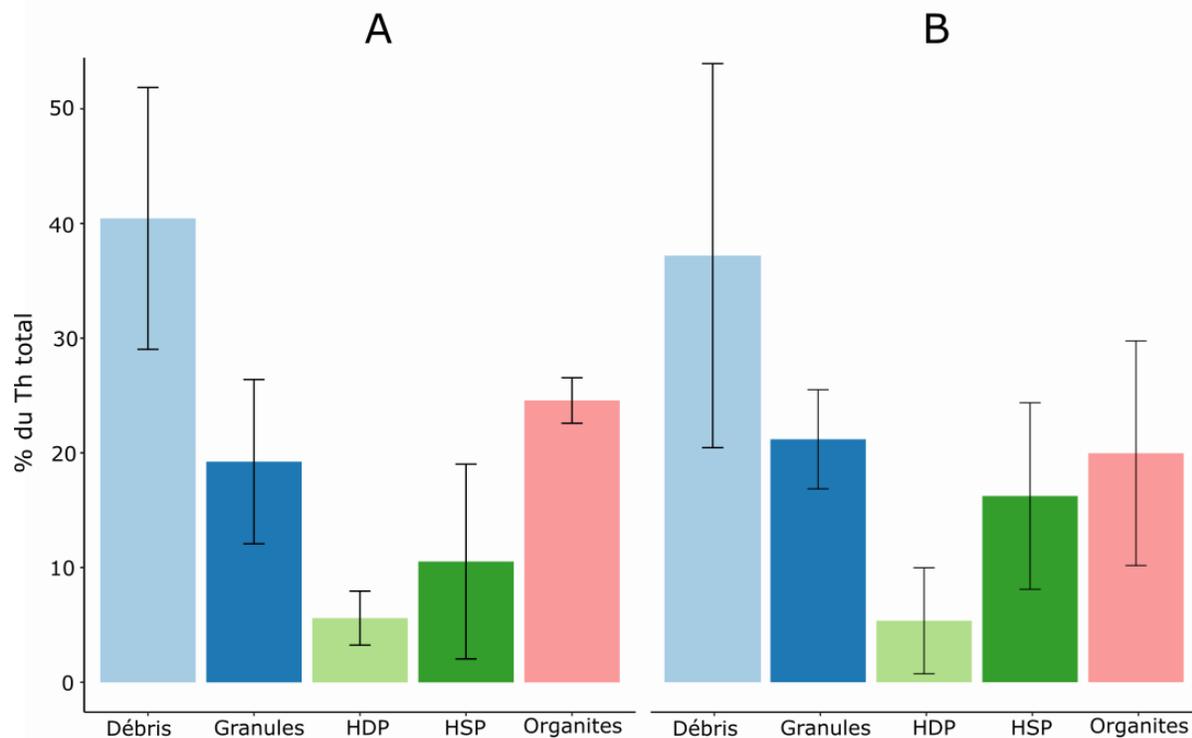


Figure 2.5. Répartition subcellulaire du Th chez l'algue verte *Chlamydomonas reinhardtii* (CR) après 1 h d'exposition en pourcentage de la somme des concentrations en Th mesurées dans les fractions. A. Conditions exposées à 1 nM de Th, les valeurs représentées sont les moyennes des trois répliques des trois expériences (n = 9). B. Conditions témoins les valeurs représentées sont les moyennes des échantillons des trois expériences (n = 3). Les barres d'erreurs correspondent aux écarts-types.

Perspectives et conclusion sur l'accumulation du thorium par les algues vertes

Lorsque les données de prise en charge et de fractionnement subcellulaire (Tableau 2.3) sont analysées ensemble, les concentrations mesurées dans les témoins étaient significativement inférieures à celles des conditions exposées. L'utilisation d'un test statistique de type modèle mixte avec la variable « expérience » comme effet fixe a permis d'analyser les résultats de fractionnement et de prise en charges regroupés dans un même jeu de donnée. Ainsi, les concentrations de Th lié aux cellules étaient significativement plus élevées dans les conditions exposées.

Cependant $40,4 \pm 11,4$ % du Th intracellulaire était lié à la fraction nommée débris. Cette fraction contient le reste du contenu cellulaire tel que, le noyau, la membrane et la paroi cellulaire. Il est difficile d'interpréter l'implication de la présence des métaux dans cette fraction, car le noyau est une partie sensible de la cellule, susceptible d'être endommagée par une possible interaction

avec le Th. Cependant, si le Th est lié à la paroi ou à la membrane plasmique, ceci signifie que le lavage à l'EDTA n'arrive pas à éliminer la totalité du Th adsorbé à l'extérieur de la cellule.

Par ailleurs, si après 1 h d'exposition au Th, 40 % du Th lié aux cellules correspond à une fraction adsorbée, ceci signifie que cette fraction de Th est également présente autour des cellules dès les 2 premières minutes d'exposition dans les expériences de prise en charge à court terme, l'adsorption atteignant rapidement un plateau lors de la première minute d'exposition (Figure 2.4). De plus, dans les témoins des expériences de prise en charge et de fractionnement subcellulaire, la concentration en Th lié aux cellules représentait respectivement 20 % et 15 % de celles mesurées dans les algues exposées. Ces résultats suggèrent donc que les flux intracellulaires du Th sont très lents et que 15 à 20 % du Th mesuré étaient initialement présent dans les cellules avant l'exposition dus à la faible présence de Th dans les milieux de culture (bruit de fond dû à la présence des métaux dans l'environnement). Ainsi seulement 85 à 81 % du Th mesuré dans les algues exposées seraient dus à l'ajout de Th pour l'exposition. En faisant l'hypothèse que ce « nouveau » Th est entièrement adsorbé à l'extérieur de la cellule, nous devrions donc retrouver entre 85 et 81 % de Th associé à la fraction débris. Cependant, si les résultats de fractionnement subcellulaire suggèrent que 40 % du Th pouvaient être associé à la paroi, 60 % du Th mesuré dans les algues étaient bien présents à l'intérieur de la cellule. Si l'on soustrait les valeurs obtenues dans les témoins, 41 à 45 % du Th mesuré n'est alors pas expliqué par cette hypothèse. En effet la quantité de Th internalisée au court du temps dans les expériences de prise en charge devrait alors augmenter théoriquement de 41 à 45 % entre 2 min et 62 min, ce qui ne semble pas être le cas. De plus, la répartition subcellulaire du Th associé aux cellules témoins était similaire à celle observée dans les algues des conditions Th (Figure 2.6). Ce qui signifie que le Th associé aux cellules dans les conditions contaminées s'est réparti de la même façon et donc ne s'est pas uniquement adsorbé à la surface des cellules. Mais les expériences de prise en charge ne montrent pas de relation entre le temps et la concentration de métal internalisé. De plus, les concentrations de Th mesurées dans les algues lors des expériences de prise en charge sont similaires à celles obtenues dans les expériences de fractionnement. Deux hypothèses peuvent expliquer de tels résultats. Premièrement, des sites à la surface des cellules possèderaient une très forte affinité pour le Th et le lavage à l'EDTA ne pourrait pas éliminer entièrement le métal complexé à ces sites. Ceci implique une remobilisation du métal difficile à expliquer lors des étapes de fractionnement subcellulaire. Une seconde hypothèse serait que le Th a bel et bien été internalisé, mais que des mécanismes d'excrétion sont rapidement mis en branle par les cellules, ce qui contribuerait à maintenir un état stationnaire entre accumulation et excrétion. Dans un

article sur les mécanismes de séquestration du Th et de l'U par *Pseudomonas* sp., Kazy et al. (2008) avait mis en évidence la présence de nanoparticule de Th dans le cytoplasme par microscopie dense aux électrons et analyses aux rayons X à dispersion d'énergie, ce qui confirmerait la capacité du métal à pénétrer dans les cellules [39]. De plus, le Th y était en partie associé aux phosphates ce qui pourrait être en cohérence avec le Th trouvé associé aux granules dans les expériences de fractionnement réalisées dans ces travaux de thèse. Des résultats similaires ont été publiés par Peng et al. (2017) concernant l'accumulation du Th par l'algue verte *Chlorella pyrenoidosa* [40].

Un autre point intéressant concernant le Th est qu'il n'est quasiment pas présent sous forme d'ion libre en solution au-dessus de pH 4, mais qu'il s'avère tout de même internalisé par les organismes, ce qui suggère que d'autres formes pourraient être assimilées. Dans leur article, Kazy et al. (2008) ont suggéré que l'internalisation du Th dans les cellules pourrait s'effectuer via des transports non spécifiques à la suite de phénomène de perméabilisation membranaire [39]. D'autres mécanismes peuvent également faciliter la diffusion des ions à travers les membranes tels que la sécrétion d'ionophores par les microorganismes [41]. Chez les bactéries, ces molécules peuvent complexer et transporter les ions à travers la membrane cellulaire telle que la valinomycine [42] ou former des canaux comme dans le cas de la gramicidine A [43].

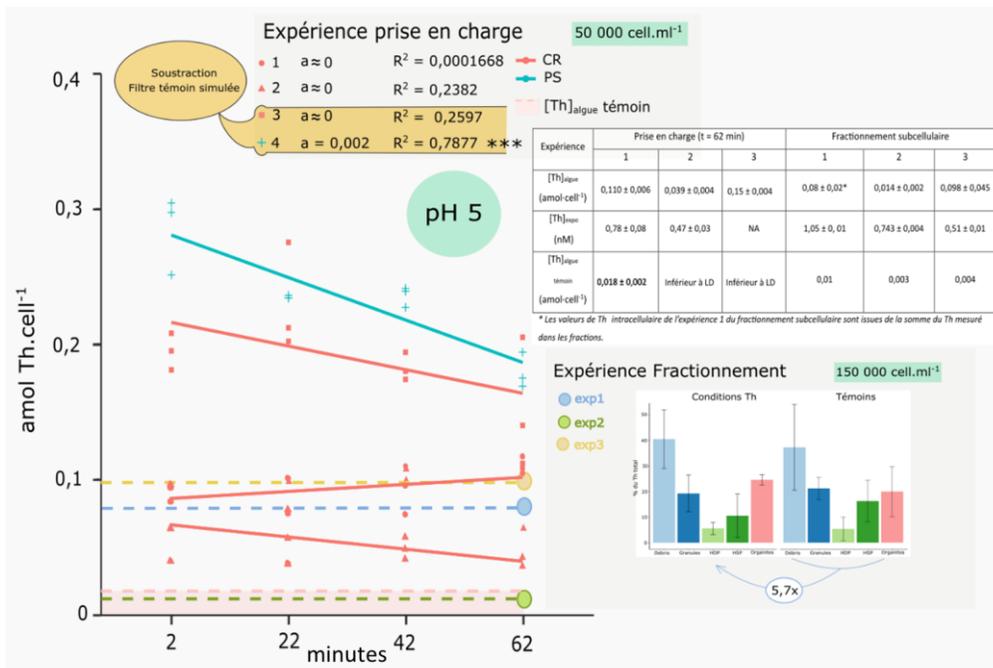


Figure 2.6. Schéma récapitulatif des expériences de prise en charge à court terme et de fractionnement subcellulaire sur *C. reinhardtii* (CR) et *R. subcapitata* (PS, seulement prise en charge)

2.3.2 Bioaccumulation du thorium dans les différentes fractions du biofilm

Le thorium bioaccumulé dans les différentes fractions du biofilm est présenté figure 2.7. Dans la condition témoin, le Th a été mesuré durant les 4 semaines d'exposition avec en moyenne $1,7 \pm 0,9 \times 10^{-3}$ ng mg dw⁻¹ dans la fraction exopolysaccharides solubles (EPSs), $0,5 \pm 0,6$ ng mg dw⁻¹ dans la fraction désorbable, 39 ± 19 ng.mg dw⁻¹ dans la fraction non désorbable à l'EDTA (ND) et 40 ± 19 ng mg dw⁻¹ dans le total des fractions. Le thorium étant un élément métallique naturellement présent dans les milieux, il est normal d'en détecter de faibles concentrations dans le biofilm témoins. Les concentrations en Th dans les fractions du biofilm étaient réparties dans l'ordre croissant suivant : EPSs < Désorbable < ND, ceci pour tous les temps et dans toutes les conditions d'exposition. Les travaux de Stewart et al. (2015) visaient à déterminer la localisation du Pb après une exposition à ce dernier, dans les différentes fractions de différents biofilms. Les auteurs ont mesuré les concentrations en Cu, Mn et Fe dans le périphyton afin d'observer le rôle de ces éléments dans l'adsorption du Pb dans le biofilm. Le Mn et le Fe présents dans les différents échantillons de périphyton étaient mesurés en grande majorité dans la fraction ND, faiblement dans les EPSs, et suivaient donc la même tendance que les résultats concernant le

Th dans ces travaux de thèse. Cependant, dans ce même article, le Pb et le Cu n'étaient pas répartis de la même façon. Le Pb semblait être présent en quantité équivalente dans la fraction désorbable et dans la fraction ND avec également une grande quantité mesurée dans les EPSs. Le Cu présentait également des concentrations équivalentes entre les fractions désorbable et ND, mais n'était pas détecté dans les EPSs [11].

Le biofilm exposé à la condition C10 a significativement plus accumulé de Th que le biofilm témoin dès la première semaine et dans toutes les fractions, excepté dans la fraction désorbable à l'EDTA à 1 semaine d'exposition. Celui présent exposé à la condition intermédiaire C1 a accumulé également plus de Th à la première et la dernière semaine que le témoin avec des concentrations de Th total, dans la fraction ND ($201 \pm 61 \text{ ng mg dw}^{-1}$) et dans les EPSs ($0,010 \pm 0,002 \text{ ng mg dw}^{-1}$), significativement supérieures à celle de la condition témoin. Ceci démontre la capacité du biofilm et de ses organismes à bioaccumuler le Th et cette accumulation se montre dépendante de la concentration du métal dans le milieu. Ceci a précédemment été démontré pour d'autres métaux tels que le Cu, le Pb, le Fe et le Mn [11]. La grande majorité du Th mesuré était retrouvée associée à la fraction ND, et donc aux organismes et aux EPS capsulaires qui les entourent.

Dans les conditions C10, la concentration totale en Th dans le biofilm augmentait graduellement de 2143 ± 301 à $11620 \pm 1410 \text{ ng mg dw}^{-1}$ entre la première et la dernière semaine d'exposition respectivement. Au contraire, le Th mesuré dans la fraction EPSs suivait la tendance inverse avec $0,9 \pm 0,2$, $0,32 \pm 0,04$ et $0,13 \pm 0,04 \text{ ng mg dw}^{-1}$ à la première, deuxième et quatrième semaine respectivement. De même, dans la fraction désorbable, les concentrations passaient de 134 ± 15 à $9,1 \pm 1,1 \text{ ng mg dw}^{-1}$ de la 2^{ème} à la 4^{ème} d'exposition. La baisse du Th dans les EPSs pourrait être associée à une baisse de leur synthèse et excrétion par les microorganismes. Cependant, un test de corrélation de Spearman effectué entre la quantité de thorium et la quantité de polysaccharide dans la fraction EPSs a montré que ces deux variables étaient négativement corrélées ($\rho = -0,4$, $p = 0.0003$). Il a été démontré que certains types de polysaccharides tels que les acides uroniques jouent un rôle important dans la séquestration et la distribution du Th dans les océans [44,45]. Ainsi, un changement dans la composition des EPSs réduisant le nombre de sites de complexation pourrait expliquer la baisse de Th mesuré dans la fraction EPSs du biofilm. La quantité d'EPS produite pourrait également avoir des effets sur leurs capacités à complexer les métaux.

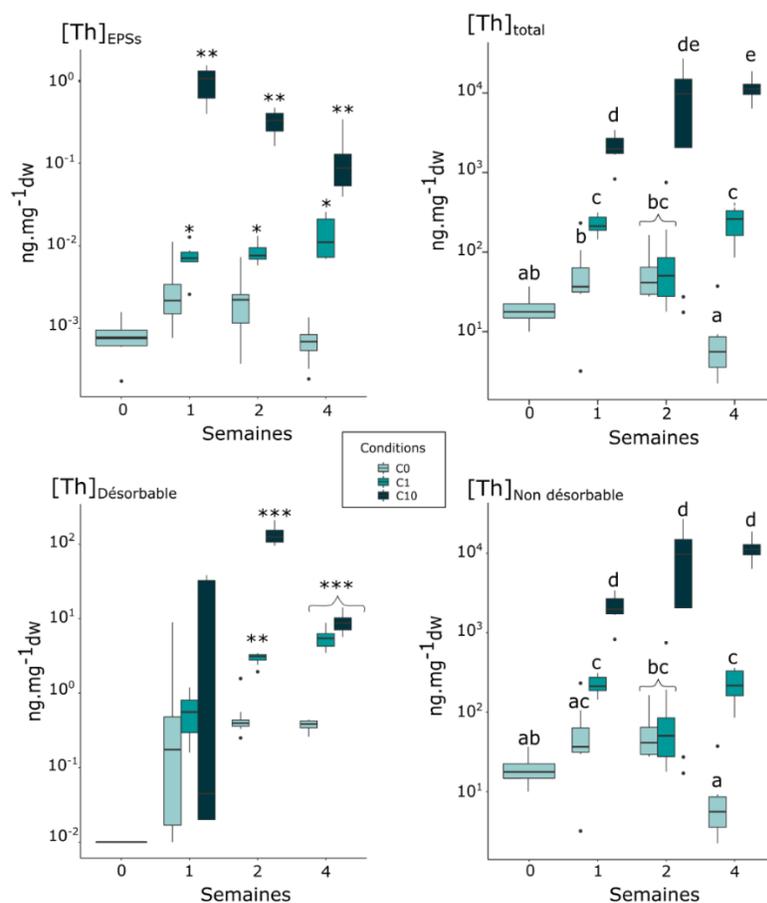


Figure 2.7. Thorium mesuré dans les différentes fractions du biofilm exposé à 0 nM ($0,004 \pm 0,002$), 1 nM ($0,18 \pm 0,09$) et 10 nM ($8,7 \pm 3,4$) à 0, 1, 2 et 4 semaines. Les différentes fractions sont : EPSs (Exopolysaccharides solubles), Désorbable (fraction de rinçage à l'EDTA et au MOPS), Non désorbable (EPS capsulaires et organismes) et totale (somme de toute les fractions). Les différences significatives ($n = 8$) sont illustrées à l'aide des lettres (two-way ANOVA, $p < 0,05$) et * (test de Wilcoxon, $p < 0,05$).

Les expériences de bioaccumulation du Th dans le biofilm ont montré qu'une très grande majorité du métal se trouvait associée aux organismes. La quantité de Th retrouvée dans la fraction EPSs et désorbable sont extrêmement faibles comparées à celle retrouvée dans la fraction associée aux organismes. La matrice d'EPS ne semble donc pas jouer un grand rôle dans la bioaccumulation de ce métal par le biofilm. Les lavages à l'EDTA ont permis de désorber une partie du Th de la surface des microorganismes, mais ne nous permettent pas de conclure que le métal mesuré associé à la fraction ND soit internalisé.

2.4 Conclusion du chapitre

Les expériences de fractionnement subcellulaire ont démontré la présence de Th dans le milieu intracellulaire des algues modèles signifiant que cet élément peut être internalisé par ces dernières. Cependant les expériences de prise en charge à court terme ne confirmaient pas ces résultats sur ces mêmes algues, et suggéraient plutôt un phénomène d'adsorption. Le Th était également bioaccumulé par le biofilm et était en majorité lié avec la fraction comprenant les organismes. Cependant, les analyses effectuées ne permettent pas de conclure sur l'internalisation du Th par les organismes du biofilm. L'utilisation de la technique NanoSIMS (Nanoscale secondary ion mass spectrometry), couplant le dosage de métaux dans les structures intracellulaires avec de l'imagerie, permettrait de confirmer les résultats de fractionnement subcellulaire et de vérifier que le Th se trouve dans le milieu intracellulaire.

Si les expériences menées dans ce chapitre n'ont pas permis de comprendre les effets de la spéciation sur l'internalisation du Th par les microalgues modèles, elles suggèrent que le métal se lie préférentiellement avec les organismes du biofilm plutôt qu'avec les EPSs. L'association du Th avec les organismes du biofilm et les résultats de fractionnement subcellulaire chez *C. reinhardtii* indique que le Th serait au moins en partie biodisponible, et qu'il représente un risque de transfert trophique vers les consommateurs primaires dépendamment de la capacité digestive de ces derniers. Dans les chapitres suivants, les effets du Th sur les communautés microbiennes et son possible transfert vers les gastéropodes seront présentés et permettront de mieux comprendre l'écotoxicité de cet élément dans les milieux aquatiques d'eau douce.

BIBLIOGRAPHIE CHAPITRE 2

- [1] P.G.C. Campbell, O. Errécalde, C. Fortin, V.P. Hiriart-Baer, B. Vigneault, Metal bioavailability to phytoplankton - applicability of the biotic ligand model, *Comp. Biochem. Physiol. -C Toxicol. Pharmacol.* 133 (2002) 189–206. [https://doi.org/10.1016/S1532-0456\(02\)00104-7](https://doi.org/10.1016/S1532-0456(02)00104-7).
- [2] C.-M. Zhao, P.G.C. Campbell, K.J. Wilkinson, When are metal complexes bioavailable ?, *Environ. Chem.* 13 (2016) 425–433. <https://doi.org/10.1071/EN15205>.
- [3] J.S. Meyer, The utility of the terms “bioavailability” and “bioavailable fraction” for metals, *Mar. Environ. Res.* 53 (2002) 417–423. [https://doi.org/10.1016/S0141-1136\(01\)00121-0](https://doi.org/10.1016/S0141-1136(01)00121-0).
- [4] P.G.C. Campbell, Interactions between trace metals and aquatic organisms: a critique of the free ion activity model, in: A. Tessier, D.R. Turner (Eds.), *Metal speciation and bioavailability in aquatic systems*, New York: John Wiley & Sons, 3 (1995): pp. 45–102.
- [5] A. Crémazy, P.G.C. Campbell, C. Fortin, The biotic ligand model can successfully predict the uptake of a trivalent ion by a unicellular alga below pH 6.50 but not above: Possible role of hydroxo-species, *Environ. Sci. Technol.* 47 (2013) 2408–2415. <https://doi.org/10.1021/es3038388>.
- [6] A. Crémazy, P.G.C. Campbell, C. Fortin, In the presence of fluoride, free Sc^{3+} is not a good predictor of Sc bioaccumulation by two unicellular algae: Possible role of fluoro-complexes, *Environ. Sci. Technol.* 48 (2014) 9754–9761. <https://doi.org/10.1021/es5016247>.
- [7] V.I. Slaveykova, K.J. Wilkinson, A. Ceresa, E. Pretsch, Role of fulvic acid on lead bioaccumulation by *Chlorella kesslerii*, *Environ. Sci. Technol.* 37 (2003) 1114–1121. <https://doi.org/10.1021/es025993a>.
- [8] H. Guasch, A. Serra, N. Corcoll, B. Bonet, M. Leira, Metal ecotoxicology in fluvial biofilms : potential influence of water scarcity, *Hdb Env Chem.* (2010) 41–53. <https://doi.org/10.1007/698>.
- [9] A.S. Lambert, A. Dabrin, S. Morin, J. Gahou, A. Foulquier, M. Coquery, S. Pesce, Temperature modulates phototrophic periphyton response to chronic copper exposure, *Environ. Pollut.* 208 (2016) 821–829. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2015.11.004>.
- [10] S. Pesce, A.S. Lambert, S. Morin, A. Foulquier, M. Coquery, A. Dabrin, Experimental warming differentially influences the vulnerability of phototrophic and heterotrophic

- periphytic communities to copper toxicity, *Front. Microbiol.* 9 (2018) 1–14. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.01424>.
- [11] T.J. Stewart, R. Behra, L. Sigg, Impact of chronic lead exposure on metal distribution and biological effects to periphyton, *Environ. Sci. Technol.* 49 (2015) 5044–5051. <https://doi.org/10.1021/es505289b>.
- [12] M. Schorer, M. Eisele, Accumulation of inorganic and organic pollutants by biofilm in the aquatic environment, *Water. Air. Soil Pollut.* 99 (1997) 651–659. <https://doi.org/10.1023/A:1018384616442>.
- [13] J. Wingender, T.R. Neu, H.-C. Flemming, Microbial extracellular polymeric substances: characterization, structure, and function, Springer (1999), 258. ISBN 978-3-642-60147-7
- [14] S. Meylan, R. Behra, L. Sigg, Influence of metal speciation in natural freshwater on bioaccumulation of copper and zinc in periphyton: A microcosm study, *Environ. Sci. Technol.* 38 (2004) 3104–3111. <https://doi.org/10.1021/es034993n>.
- [15] R.R. Goulet, S. Krack, P.J. Doyle, L. Hare, B. Vigneault, J.C. Mcgeer, Dynamic multipathway modeling of Cd bioaccumulation in *Daphnia magna* using waterborne and dietborne exposures, 81 (2007) 117–125. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2006.11.008>.
- [16] J.M. Conley, D.H. Funk, N.J. Cariello, D.B. Buchwalter, Food rationing affects dietary selenium bioaccumulation and life cycle performance in the mayfly *Centroptilum triangulifer*, *Ecotoxicology.* 20 (2011) 1840–1851. <https://doi.org/10.1007/s10646-011-0722-1>.
- [17] L.A. Golding, U. Borgmann, D.G. Dixon, Cadmium bioavailability to *Hyalella azteca* from a periphyton diet compared to an artificial diet and application of a biokinetic model, *Aquat. Toxicol.* 126 (2013) 291–298. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2012.09.016>.
- [18] I.R. Komjarova, R. Blust, Application of a stable isotope technique to determine the simultaneous uptake of cadmium, copper, nickel, lead and zinc by the water flea *Daphnia magna* from water and the green algae *Pseudokirchneriella subcapitata*, *Environ. Toxicol. Chem.* 28 (2009) 1739–1748. <https://doi.org/10.1897/08-437.1>.
- [19] C. Fortin, L. Dutel, J. Garnier-Laplace, Uranium complexation and uptake by a green alga in relation to chemical speciation: the importance of the free uranyl ion., *Environ. Toxicol. Chem.* 23 (2004) 974–981. <https://doi.org/10.1897/03-90>.
- [20] M. Lavoie, J. Bernier, C. Fortin, P.G.C. Campbell, Cell homogenization and subcellular

- fractionation in two phytoplanktonic algae: implications for the assessment of metal subcellular distributions, *Limnol. Oceanogr. Methods.* 7 (2009) 277–286. <https://doi.org/10.4319/lom.2009.7.277>.
- [21] W.G. Wallace, B.G. Lee, S.N. Luoma, Subcellular compartmentalization of Cd and Zn in two bivalves. I. Significance of metal-sensitive fractions (MSF) and biologically detoxified metal (BDM), *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 249 (2003) 183–197. <https://doi.org/10.3354/meps257125>.
- [22] M. Dubois, K.A. Gilles, J.K. Hamilton, P.A. Rebers, F. Smith, Colorimetric method for determination of sugars and related substances, *Anal. Chem.* 28 (1956) 350–356. <https://doi.org/10.1021/ac60111a017>.
- [23] M.M. Bradford, A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding, *Anal. Biochem.* 72 (1976) 248–254. [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(76\)90527-3](https://doi.org/10.1016/0003-2697(76)90527-3).
- [24] B. Chaumet, S. Morin, O. Hourtané, J. Artigas, B. Delest, M. Eon, N. Mazzella, Flow conditions influence diuron toxicokinetics and toxicodynamics in freshwater biofilms, *Sci. Total Environ.* 652 (2019) 1242–1251. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2018.10.265>.
- [25] W. Hummel, U. Berner, E. Curti, F.J. Pearson, T. Thoenen, Nagra/PSI Chemical thermodynamic data base 01/01, Universal Publishers, Wettingen, Switzerland, (2002) 592.
- [26] A.J. Cartwright, C.C. May, P.J. Worsfold, M.J. Keith-Roach, Characterisation of thorium-ethylenediaminetetraacetic acid and thorium-nitrilotriacetic acid species by electrospray ionisation-mass spectrometry, *Anal. Chim. Acta.* 590 (2007) 125–131. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2007.03.010>.
- [27] R.M. Smith, A.E. Martell, Critical stability constants: second supplement, vol. 6, Kluwer Aca, Plenum Publishers, New York, (1989) 604. <https://doi.org/10.1007/978-1-4615-6764-6>.
- [28] K.J. Wilkinson, P.G.C. Campbell, Aluminum bioconcentration at the gill surface of juvenile Atlantic salmon in acidic media, *Environ. Toxicol. Chem.* 12 (1993) 2083–2095. <https://doi.org/10.1002/etc.5620121116>.
- [29] R.H. Crist, K. Oberholser, N. Shank, M. Nguyen, Nature of bonding between metallic ions and algal cell walls, *Environ. Sci. Technol.* 15 (1981) 1212–1217.

<https://doi.org/10.1021/es00092a010>.

- [30] C.S. Hassler, V.I. Slaveykova, K.J. Wilkinson, Discriminating between intra- and extracellular metals using chemical extractions, *Limnol. Oceanogr. Methods*. 2 (2004) 237–247. <https://doi.org/10.4319/lom.2004.2.237>.
- [31] H.T. Wolterbeek, A. Viragh, J.E. Sloof, G. Bolier, B. Van Der Vee, J. De Kok, On the uptake and release of zinc (65Zn) in the growing alga *Selenastrum capricornutum* Printz, *Environ. Pollut.* 88 (1995) 85–90. [https://doi.org/10.1016/0269-7491\(95\)91051-L](https://doi.org/10.1016/0269-7491(95)91051-L).
- [32] N. Mirimanoff, K.J. Wilkinson, Regulation of Zn accumulation by a freshwater gram-positive bacterium (*Rhodococcus opacus*), *Environ. Sci. Technol.* 34 (2000) 616–622. <https://doi.org/10.1021/es990744g>.
- [33] A. Smiejan, K.J. Wilkinson, C. Rossier, Cd bioaccumulation by a freshwater bacterium, *Rhodospirillum rubrum*, *Environ. Sci. Technol.* 37 (2003) 701–706. <https://doi.org/10.1021/es025901h>.
- [34] S. Le Faucheur, Y. Tremblay, C. Fortin, P.G.C. Campbell, Acidification increases mercury uptake by a freshwater alga, *Chlamydomonas reinhardtii*, *Environ. Chem.* 8 (2011) 612–622. <https://doi.org/10.1071/EN11006>.
- [35] P. Sánchez-Marín, C. Fortin, P.G.C. Campbell, Lead (Pb) and copper (Cu) share a common uptake transporter in the unicellular alga *Chlamydomonas reinhardtii*, *BioMetals*. 27 (2014) 173–181. <https://doi.org/10.1007/s10534-013-9699-y>.
- [36] P.S. Rainbow, S.N. Luoma, Metal toxicity, uptake and bioaccumulation in aquatic invertebrates-Modelling zinc in crustaceans, *Aquat. Toxicol.* 105 (2011) 455–465. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2011.08.001>.
- [37] M. Findeiß, Effects of radioactive by-products along the extraction of rare earth elements on aquatic and terrestrial organisms, PhD Thesis, (2016) 108.
- [38] K. Racine, Étude de la répartition subcellulaire des éléments du groupe platine et des terres rares chez l'algue verte *Chlamydomonas reinhardtii*, (2016) 91.
- [39] S.K. Kazy, S.F. D'Souza, P. Sar, Uranium and thorium sequestration by a *Pseudomonas* sp.: Mechanism and chemical characterization, *J. Hazard. Mater.* 163 (2009) 65–72. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2008.06.076>.
- [40] C. Peng, Y. Ma, Y. Ding, X. He, P. Zhang, T. Lan, D. Wang, Influence of speciation of thorium on toxic effects to green algae *Chlorella pyrenoidosa*, *Int. J. Mol. Sci.* (2017).

<https://doi.org/10.3390/ijms18040795>.

- [41] N.J. Yang, M.J. Hinner, Getting across the cell membrane: an overview for small molecules, peptides, and proteins, *Site-Specific Protein Labeling Methods Protoc.* (2015) 29–53. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-2272-7_3.
- [42] W.L. Duax, D.A. Langs, G.D. Smith, P. Grochulski, V. Pletnev, V. Ivanov, Molecular structure and mechanisms of action of cyclic and linear ion transport antibiotics, *Bioorg. Khim.* 18 (1992) 1341–1360. [https://doi.org/10.1002/\(sici\)1097-0282\(1996\)40:1<141::aid-bip6>3.0.co;2-w](https://doi.org/10.1002/(sici)1097-0282(1996)40:1<141::aid-bip6>3.0.co;2-w).
- [43] B.A. Wallace, Recent advances in the high resolution structures of bacterial channels: Gramicidin A, *J. Struct. Biol.* 121 (1998) 123–141. <https://doi.org/10.1006/jsbi.1997.3948>.
- [44] L. Guo, C. Hung, P.H. Santschi, I.D. Walsh, Th scavenging and its relationship to acid polysaccharide abundance in the Gulf of Mexico, 78 (2002) 103–119. [https://doi.org/10.1016/S0304-4203\(02\)00012-9](https://doi.org/10.1016/S0304-4203(02)00012-9).
- [45] M.S. Quigley, P.H. Santschi, C. Hung, L. Guo, B.D. Honeyman, Importance of acid polysaccharides for Th complexation to marine organic matter, 47 (2002) 367–377. <https://doi.org/10.4319/lo.2002.47.2.0367>.

3 IMPACT OF ZIRCONIUM ON FRESHWATER PERIPHYTIC MICROORGANISMS

Effets du zirconium sur les microorganismes périphytiques d'eau douce

Auteurs :

Doose Caroline¹, Morin Soizic², Vedrenne Jacky², Fortin Claude¹

¹ Institut national de la recherche scientifique, 490 rue de la Couronne G1K 9A9, Quebec City, QC, Canada Affiliations professionnelles

² Irstea, UR EABX, 50 avenue de Verdun 33612 Cestas Cedex, France

Titre de la revue ou de l'ouvrage :

MDPI Environments

Publié le 1er Octobre 2019

Doi :10.3390/environments6100111

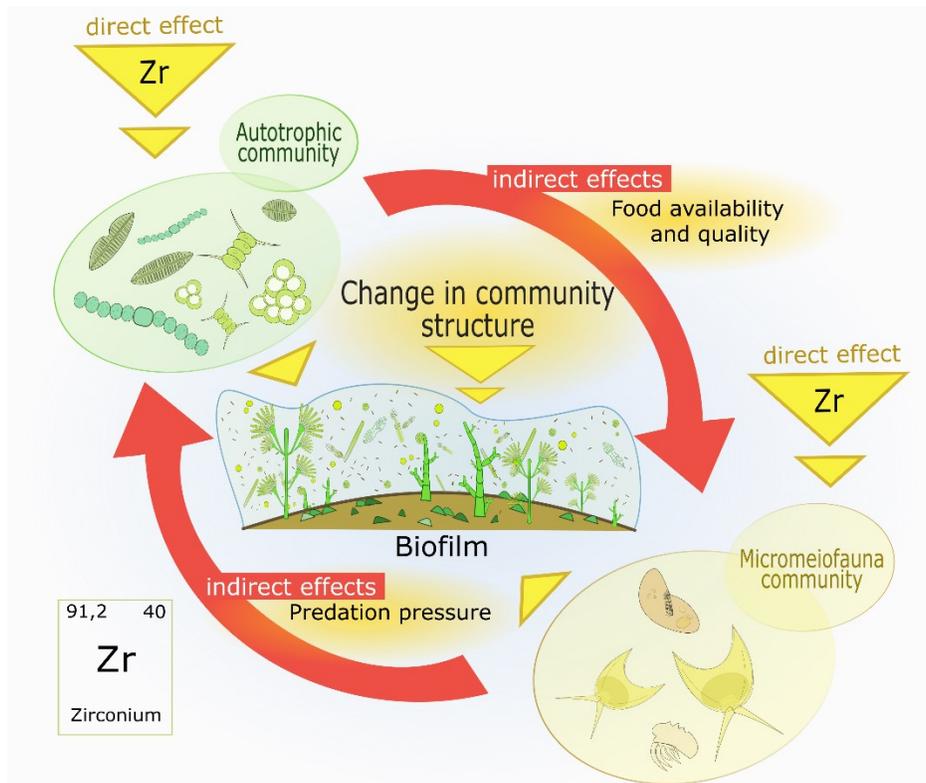
Contribution des auteurs :

Caroline Doose est l'auteure principale de ce document. Elle était en charge de la conduite des expériences, de l'interprétation des données et de la rédaction de la première version de cet article. Jacky Vedrenne est un ingénieur de recherche spécialisé en microméiofaune. Il a contribué à l'identification taxonomique et à la révision de l'article. Claude Fortin est le superviseur et Soizic Morin la co-superviseuse de thèse, tous deux ont contribué à la conception expérimentale, à l'interprétation des données et à l'examen du document.

Abstract

The majority of studies on biofilms have focused on autotrophic and bacterial taxa, without considering the potential effects on biofilm grazers. In this work, we investigated the effects of realistic environmental concentrations of zirconium (Zr) on periphyton algal growth and micrometazoan biodiversity. Glass slides were submerged in a pond for four weeks to colonize biofilms and exposed for four weeks in aquaria to targeted Zr concentrations of 0, 1, and 10 nM, which were monitored over time (average measured concentrations were 0.2 ± 0.1 , 0.5 ± 0.3 , and 2.9 ± 0.3 nM Zr). The four-week exposure to the highest concentration (3 nM) affected the micrometazoan structure of biofilm and modified the autotrophic biofilm structure by increasing the proportion of green algae and decreasing the abundance of cyanobacteria and brown algae. Rotifers and the ciliate *Aspidisca cicada* appeared to be the most sensitive organisms among the observed micrometazoan. A toxic effect of Zr on rotifers could explain such results. Indirect effects, such as reduced food availability given the reduced algal growth in the presence of Zr, could also play a role in the changes of micrometazoan community structure. These results are among the few published data on the effects of Zr.

Graphical abstract



3.1 Introduction

Increased global use of metals has led to an increase in metallic elements mobilized in aquatic systems in the last century. Although the effect of metals on freshwater ecosystems is well documented, studies on the impacts of tetravalent metals are very scarce. Zirconium (Zr) is a tetravalent element, predominantly found as zircon (ZrSiO_4), and constitutes 0.0165 % of the Earth's crust. Measurements of surface water concentrations of Zr are scarce. Gobeil et al. (2005) found average dissolved Zr concentrations of $7 \pm 5 \text{ ng L}^{-1}$ ($0.08 \pm 0.05 \text{ nM}$) to $22 \pm 8 \text{ ng L}^{-1}$ ($0.24 \pm 0.09 \text{ nM}$) in the St. Lawrence River (Canada). In the same study, Zr associated with suspended particulate matter showed concentrations one order of magnitude higher. Dissolved forms are generally less than 1 nM due to the low solubility of the hydroxide $\text{Zr}(\text{OH})_4$ [1–3]. Australia and South Africa are the largest producers of Zr minerals in the world. The global demand for Zr has been steadily increasing in the last few decades due to its anticorrosive properties and for nuclear fuel cladding [4–7]. This element is also included in the composition of cosmetics and deodorants. In tetrachloride form (ZrCl_4), is used for phosphorus precipitation in water effluents [8]. All these activities may lead to an increase of Zr concentrations in natural freshwaters. Thus, it is important to understand its potential impact on aquatic ecosystems to contribute to the environmental risk assessment for this metal.

Several biomonitoring tools have been developed to assess metal exposure on aquatic organisms. In particular, periphyton (benthic microorganism communities) have shown promising potential [9–11]. These microorganisms are able to internalize and sequester metallic contaminants, which allows for the detection of ultra-trace elements up to several days after contamination events in natural freshwater ecosystems [12,13]. Periphytic diatoms react to contamination, eutrophication, and acidification, and are thus very useful for water quality monitoring, including metal impact assessment [14,15]. Diatom biochemical responses such as anti-oxidant enzymes and gene expressions related to oxidative stress can be also used to determine the effects of metal contamination on biofilm microorganisms [16–18]. The majority of these studies on biofilms focus on autotrophic and bacterial taxa, without considering the effect of contamination on biofilm grazers. When studied, the only grazers considered are macroinvertebrates [19] or fish [20], with small grazing consumers rarely considered [21]. However, micromeiofauna communities represent important aquatic ecosystem components which play a key role in the biofilm food web (Pratt & Cairns 2007; Madoni & Zangrossi 2009). Some microorganisms can also have effects on bacterial activity by excreting growth-stimulating

compounds [28,29]. Contamination impacts on micrometazoofauna can disturb trophic food webs and the taxonomic structure of periphytic biofilm.

In this work we investigated the effect of realistic environmental concentrations of Zr on periphyton algal growth and composition, and micrometazoofauna biodiversity to better understand the impacts of this metal on the taxonomic structure of biofilm. The results obtained will help to improve the use of periphytic biofilm as a contamination assessment tool for zirconium and to better understand its potential impacts on aquatic ecosystems.

3.2 Materials and methods

3.2.1 Experimental setup

To colonise periphyton, glass slides of 220 cm² were submerged in Gazinet-Cestas Pond, France (South West France, geographical coordinates: 44°46'30.1"N, 0°41'44.3"W) for one month in October 2016. The slides were then randomly distributed to three aquaria containing a synthetic culture medium (Dauta) [30]. Targeted Zr concentrations were 0 nM (C0), 1 nM (C1) and 10 nM (C10), which do not exceed the Zr solubility limit ($\text{Log } K_{\text{sp}} = -62.46 \pm 0.10$) [31]. Before the beginning of the experiment, aquaria were filled with different exposure media to pre-equilibrate the metal with the adsorption sites of glass walls. Light flux was $9.20 \mu\text{mol photon}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ and the photoperiod was 14:10 for day and night, respectively. Water temperature and pH were monitored weekly, before and after water renewal, and were maintained at 21.5 ± 0.7 °C and between 7.5 and 8.0, respectively. Each aquarium was divided into three separate sections to obtain three experimental replicates. One slide per aquarium section was sampled after 1, 2 and 4 weeks of exposure. Water temperature and pH (at 21.5 ± 0.7 °C and between 7.5 and 8.0, respectively), total concentrations of Zr, orthophosphates and nitrates were monitored once a week throughout the 4 weeks of exposure, along with pH, oxygen, and temperature before and after media renewal. Zirconium concentrations were determined by Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry after an addition of 500 μL of nitric acid to 4.5 mL of sample. The calibration curve was validated with certified control solution 401 (SCP science). Each exposure medium was sampled in three replicate sections of the aquaria. Zirconium speciation in solution was estimated using the MINEQL thermodynamic model.

The slides sampled were rinsed with fresh Dauta medium without Zr before scraping and re-suspending the biofilm in 50 mL of Dauta medium. A volume of 1 mL was sampled for the subsequent analyses: dry weight, chlorophyll *a* (Chl *a*) fluorescence, photosynthetic activity, and

microscopic microorganism identification. Biofilm dry weight was quantified after filtration of a 20 mL aliquot on pre-weighted and dried GF/F filters, and lyophilisation according to the NF EN 872 standard method [32].

3.2.2 Biofilm microorganism analysis

To determine the proportion of green and brown algae and cyanobacteria *in vivo*, chl *a* fluorescence measurements were conducted on samples with a PhytoPAM (Heinz Walz GmbH, Germany). To determine diatom growth, living and dead cells were counted using a DMLS Leica microscope. They were counted using a Nageotte cell at 200x magnification after fixation (0.01 % of Lugol solution in the final concentration of each sample).

Micromeiofauna individuals were also enumerated after Lugol fixation (0.01 %) using a Nageotte counting cell as described for diatoms. Determination of the protozoan composition within micromeiofauna was realized on fresh samples and was established with the help of the user-friendly identification key for ciliates [33], and the *Precis of Protistology* for other protozoans, such as flagellates, heliozoans, amoebae, thecamoebians [34]. Rotifers were identified with the help of *The Rotifer World Catalog* [35].

3.2.3 Data treatment

The number of individuals was normalized for the dry weight (dw) of the samples. To determine significant differences between treatment groups and exposure times, ANOVA analyses were computed using Tukey's post hoc with R software (*car* and *MASS* packages). Significance differences between diatom growth curves were determined by an ANCOVA analysis [36].

3.3 Results

3.3.1 Physicochemical conditions

Table 3.1 Physicochemical parameters (mean \pm standard error; n = 3) in the C0, C1 and C10 exposure conditions during the 4 weeks of exposure.

Parameter	C0	C1	C10
[Zr]total (nM)	0.2 \pm 0.1	0.5 \pm 0.3	2.9 \pm 0.3
Orthophosphate (mg P-PO ₄ ·L ⁻¹)	2.8 \pm 1.1	4.0 \pm 1.9	3.4 \pm 0.9
Nitrate (mg N-NO ₃ ·L ⁻¹)	9.2 \pm 2.0	13.5 \pm 7.0	10.2 \pm 1.8
Water temperature (°C)	21.1 \pm 0.6	21.7 \pm 0.6	21.8 \pm 0.5

Nutrient concentrations (orthophosphates and nitrates) and water temperature presented in Table 3.1 were constant over exposure time and not statistically different (ANOVA, $p < 0.05$) between treatments. Concentration of Zr in C1 and C10 exposure conditions were lower than the targeted nominal concentrations. Note that the Zr concentration for the C10 condition is statistically higher than C0 and C1 treatments ($p < 0.05$). Very few thermodynamic data are available for Zr. However, due to its high valence, it is expected that the tetra-hydroxo complex ($Zr(OH)_4$) is the dominant species in our experimental conditions.

3.3.2 Biofilm biomass and Zr effects on autotrophic organism composition

Biofilm biomasses were measured at 0, 1, 2 and 4 (t_0 to t_4) weeks of exposure (Figure 3.1). The statistical analyses by two-way ANOVA showed that the biomass increased significantly for all Zr concentrations tested between t_2 and t_4 .

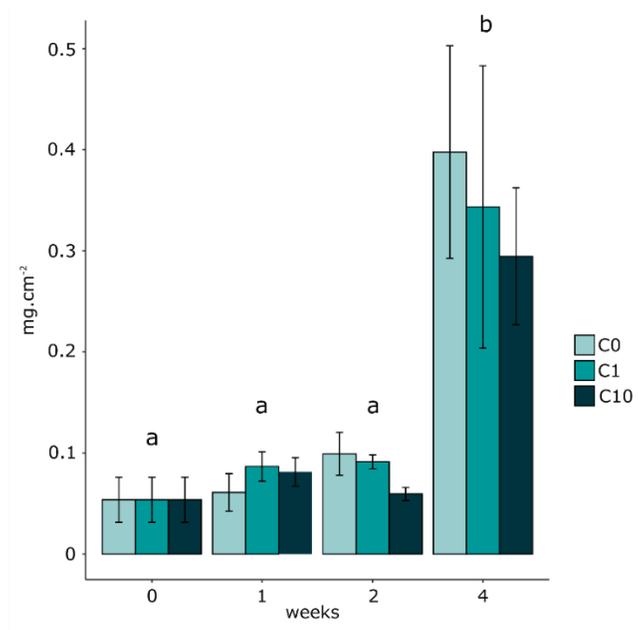


Figure 3.1. Biofilm biomasses over time in control (C0 = 0.2 ± 0.1 nM) and Zr exposures (C1 = 0.5 ± 0.3 nM and C10 = 2.9 ± 0.3 nM). Values are averages and standard errors. Two-way ANOVA was performed to detect significant differences between exposure times, and these differences are indicated by letters ($p < 0.05$; $n = 3$).

Diatom cell density followed a linear relation with time on a natural log-scale (Figure 3.2A), which shows that algae were in an exponential growth phase. The growth rate appeared to be similar for the C0 (1.15 ± 0.40 week⁻¹) and C1 exposures (1.08 ± 0.50 week⁻¹), whereas in the C10

condition this rate ($0.78 \pm 0.35 \text{ week}^{-1}$) and the quantity of cells were significantly lower. Figure 3.2B shows Chl a fluorescence of green (Gr), blue (BI) and brown (Br) algae. The values obtained for control exposures were slightly lower at t0 and did not vary between the two first weeks of exposure. At t4, green algae were no longer detected in any Zr exposure condition. Based on green algae fluorescence (Gr), the concentration of Chl increased from t0 to t2 with 2.4 ± 0.3 and $6.9 \pm 0.8 \mu\text{g Chl}\cdot\text{mg}^{-1} \text{ dw}$ in the C1 condition and was significantly higher than the control. The Chl in the C10 condition was also significantly higher than the control except at t2. Cyanobacteria Chl (BI) values were low at t0 and t1 for all exposure conditions. The control C0 conditions remained low until t2, with a mean value of $0.5 \pm 0.2 \mu\text{g Chl}\cdot\text{mg}^{-1} \text{ dw}$, and increased at t4 to $42 \pm 18 \mu\text{g Chl}\cdot\text{mg}^{-1} \text{ dw}$. In the C1 condition, the amount of Chl began to slightly increase at t2 and continued until the last exposure time with mean values of 8.5 ± 1.4 and $55 \pm 18 \mu\text{g Chl}\cdot\text{mg}^{-1} \text{ dw}$, respectively. The amount of Chl in the C10 condition did not vary during the experiment ($1.3 \pm 0.6 \mu\text{g Chl}\cdot\text{mg}^{-1} \text{ dw}$) and was lower than the two other conditions at t4, however, this difference was not significant. Brown algae Chl (Br) variation followed the same pattern as cyanobacteria Chl fluorescence throughout the exposure. The lower fluorescence at t4 for the C10 condition corresponded to the lower diatom density found in figure. 3.2A for the same condition and time.

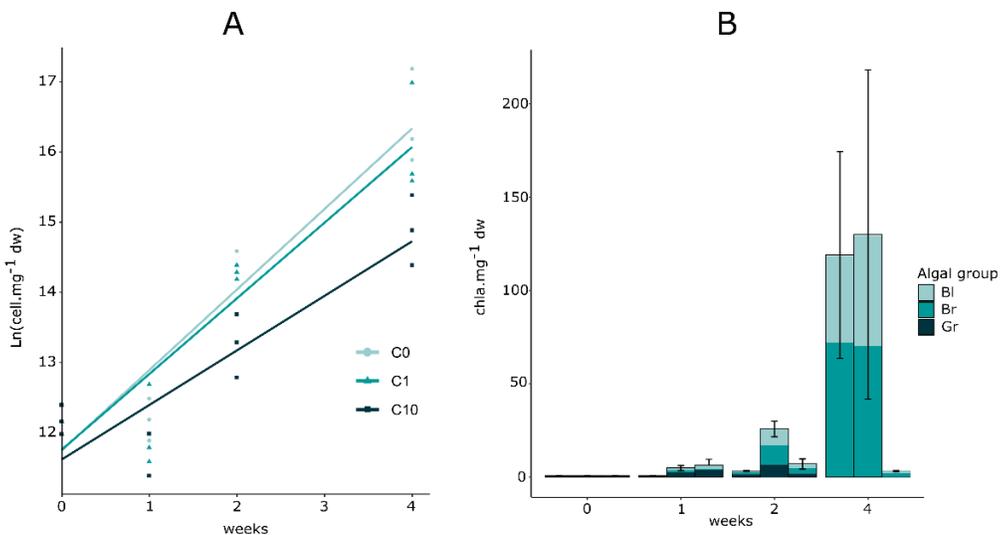


Figure 3.2 . A. Diatom growth measured in the biofilm of controls (C0 = $0.2 \pm 0.1 \text{ nM}$) and Zr exposures (C1 = $0.5 \pm 0.3 \text{ nM}$ and C10 = $2.9 \pm 0.3 \text{ nM}$). A two-way ANCOVA was performed to detect significant differences between exposure times ($p < 0.05$; $n = 3$). B. Blue (BI), brown (Br), and green (Gr) algae chlorophyll fluorescence from biofilm autotrophs measured in control and Zr exposures (C1 and C10) placed from the left to the right, respectively. Values are means and standard errors of total Chl fluorescence, no significant differences were found between conditions using a two-way ANOVA ($p < 0.05$; $n = 3$).

3.3.1 Effect on micromeiofauna composition

Total counted individuals

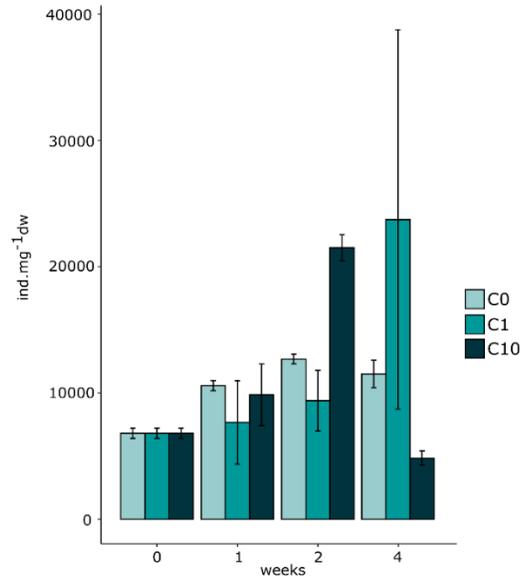


Figure 3.3 . Total micromeiofauna individuals counted per mg of biofilm in control (C0 = 0.2 ± 0.1 nM) and Zr exposures (C1 = 0.5 ± 0.3 nM and C10 = 2.9 ± 0.3 nM). Values represent means \pm standard errors. Two-way ANOVA was performed to detect significant differences between exposure times ($p < 0.05$; $n = 3$).

Figure 3.3 shows the total micromeiofauna individuals counted in the biofilm over the 4 weeks of exposure. The two-way ANOVA analysis showed a significant combined effect of time and concentration ($p < 0.05$). The total number of individuals remained constant throughout all experimental conditions, except for C10. In C10, values increased at t2 (21493 ± 1454 ind·mg⁻¹ dw) but decreased at t4 to a level lower than that of the control and the C1 conditions (4840 ± 795 ind·mg⁻¹ dw).

Micromeiofauna composition

During the 4 weeks of exposure, rotifers and ciliates were the most prevalent taxa in all conditions. The population of all the other taxa counted such as amoeba or flagellates did not vary significantly between the exposure conditions.

Ciliates

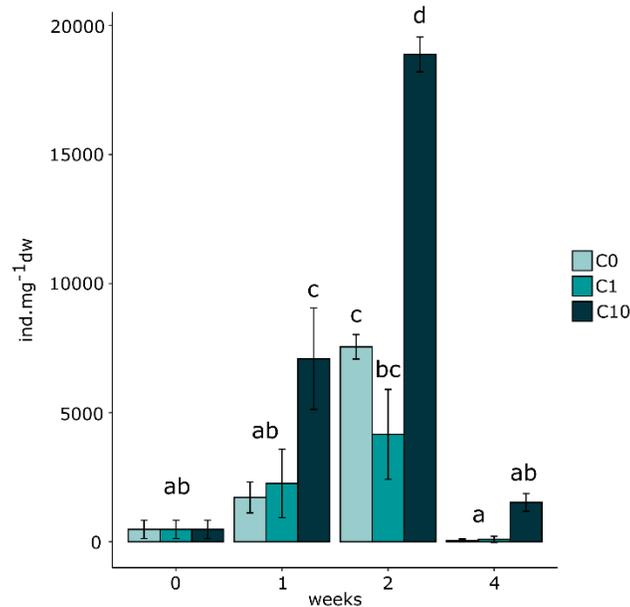


Figure 3.4 . The number of ciliate individuals per mg of biofilm dry weight in control C0 = 0.2 ± 0.1 nM) and Zr exposures (C1 = 0.5 ± 0.3 nM and C10 = 2.9 ± 0.3 nM). Values are means and standard errors. Two-way ANOVA was performed to detect significant differences between sampling times and treatments indicated by letters (p<0.05; n = 3).

Figure 3.4 presents the variation of individual ciliates counted during the experiment. Total individuals counted increased between t0 and t2 and decreased at t4 in all exposure conditions. The number of individuals in the C10 condition were significantly greater at t1 and t2 with $7.1 (\pm 2.0) \times 10^3$ and $18.9 (\pm 0.7) \times 10^3$ ind mg⁻¹ dw respectively. During the experiment, the most numerous ciliate family observed was *Trachelophyllum* sp. (Figure 3.5). The number of *Aspidisca cicada* individuals stayed relatively constant between t0 and t1, increased at t2 and decreased at t4 in all exposure conditions. At t4, the C10 values were significantly lower than the controls with 911 ± 87 ind mg⁻¹ dw and 1510 ± 130 ind mg⁻¹ dw. The number of *Uronema* sp. individuals stayed constant over exposure time in all conditions, except at t2, for which the individuals in C10 were significantly higher than for C0 with 8300 ± 3100 ind mg⁻¹ dw. *Trachelophyllum* and undefined heterotrich individuals followed the same pattern as *Uronema*. For the undefined heterotrichs, the number of individuals in the C10 exposure condition was significantly greater than that observed in the control from the first week of exposure with 2180 ± 410 ind mg⁻¹ dw. At t1, the number of *Trachelophyllum* individuals also tended to be higher than the control with 420 ± 73 ind mg⁻¹ dw. Treatments and time did not significantly affect the number of counted *Vorticella* sp.

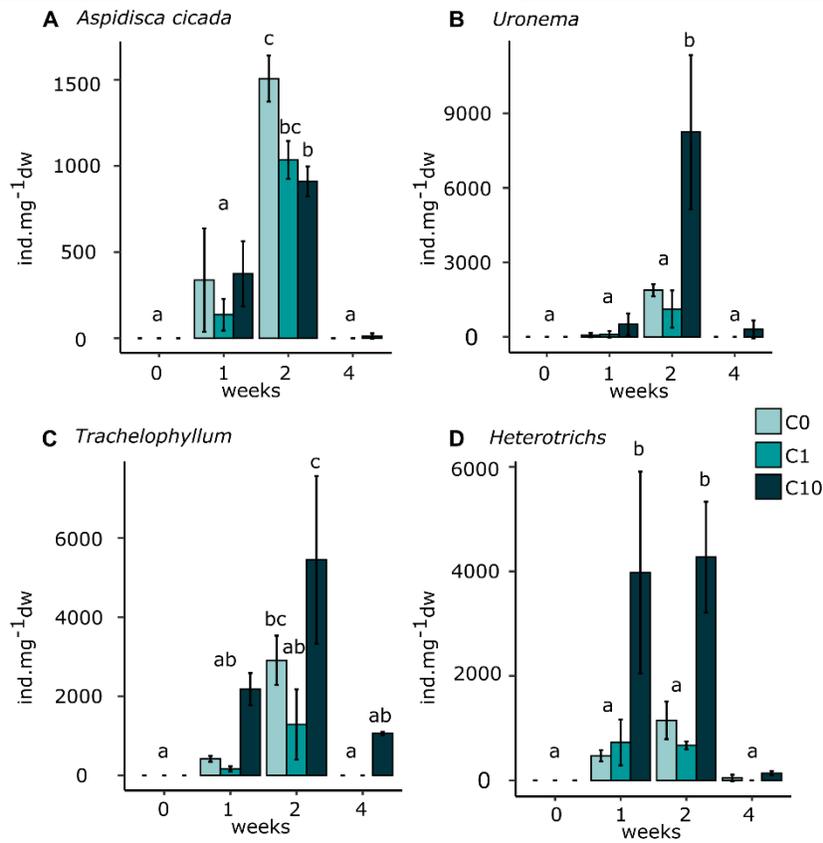


Figure 3.5 . *Aspidisca cicada* (Foissner 1996), *Uronema* sp., *Trachelophyllum* sp. and undefined heterotrach species individuals present per mg of biofilm dry weight in control (C0 = 0.2 ± 0.1 nM) and Zr exposures (C1 = 0.5 ± 0.3 nM and C10 = 2.9 ± 0.3 nM). Values are means and standard errors. Two-way ANOVA was performed to detect significant differences between treatments as indicated by letters (p<0.05; n = 3).

Rotifers

Figure 3.6 presents the number of rotifers and associated eggs as a function of time for the different metal exposure concentrations. Across all treatment conditions, the number of rotifers decreased significantly as the exposure time increased. The values of C10 (730 ± 520 ind mg⁻¹ dw) were significantly lower than C0 (2130 ± 220 ind mg⁻¹ dw) at t1 and t2 with 250 ± 160 and 1640 ± 290 ind mg⁻¹ dw, respectively. The number of rotifers eggs counted increased drastically between t0 and t1 for the C0 and C1 exposure conditions and less so for C10. C0 values (5490 ± 380 ind mg⁻¹ dw) were significantly higher than C1 (3280 ± 660 ind mg⁻¹ dw) and C10 values (480 ± 170 ind mg⁻¹ dw). Values decreased between t1 and t2 in C0 and C1 and did not change significantly until t4 while values stayed relatively constant in C10 over time.

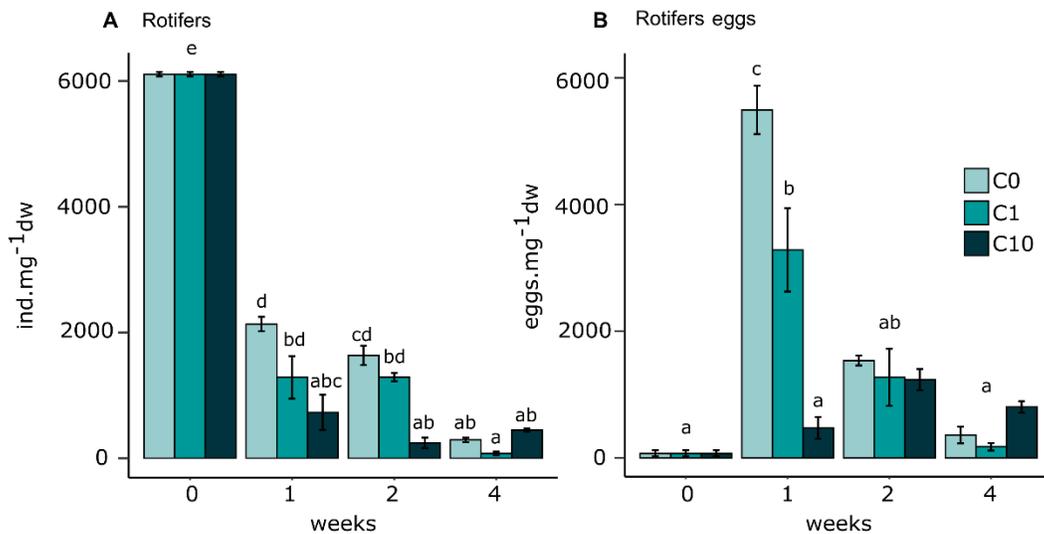


Figure 3.6. Number of individuals (A) and rotifer eggs (B) per mg of biofilm dry weight in control C0 = 0.2 ± 0.1 nM) and Zr exposures (C1 = 0.5 ± 0.3 nM and C10 = 2.9 ± 0.3 nM). Values are means and standard errors. Two-way ANOVA was performed to detect significant differences between treatments as indicated by letters ($p < 0.05$; $n = 3$).

3.4 Discussion

3.4.1 Exposure conditions

Differences observed between nominal and measured Zr concentrations could be due to Zr adsorption to aquaria walls despite the 2 days of pre-equilibration of adsorption sites followed by full medium-renewal before the start of the experiment. However, the concentration observed for the C10 condition was significantly higher than the two other conditions.

3.4.2 Effects on autotrophic community structure

The increase of biofilm biomasses and diatom growth over the 4 weeks experiment showed that the biofilm had not reached its maturity stage when the exposure began. The presence of Zr affected diatom growth in the C10 condition and autotroph biofilm structure notably with the increased proportion of green algae in C10 at t1 and C1 at t2. Green algae are known to be more tolerant than other phototrophs to metals [37,38]. The disappearance of green algae Chl *a* in all conditions during the last 2 weeks of exposure could be explained by environmental changes between the pond and the laboratory aquaria, increasing competition between algal groups. The nutrient rich Dauta culture medium, which stimulates the growth of diatoms, and the lower incident

light in the laboratory could explain such changes. Biofilm biomasses tended to be less as Zr concentration increased at t2 and t4. These differences were not significant at t4 despite diatom growth being less in the C10 exposure and the disappearance of green algae Chl *a* in all conditions at t4. These results suggest that the biomass contribution of heterotrophs or cyanobacteria could be more important than that of diatoms. The presence of Zr modified the autotrophic biofilm structure by increasing the proportion of green algae and decreasing the abundance of cyanobacteria and brown algae at the end of the 4th week of the C10 exposure.

3.4.3 Effects on micromeiofauna community structure

From t0 to t1, the number of rotifer eggs increased drastically while the number of individuals decreased. The Lugol fixation mainly allows the counting of the rotifer individuals belonging to the class of *Monogononta*, while eggs observed could belong to all rotifer classes. This former class of rotifers have a solid cuticle (lorica) which preserves the individual shape during fixation [39,40]. This group is the most diverse, with approximately 80 % of rotifer species known, and is notable for cyclical parthenogenetic and occasional sexual reproduction [40,41]. Moreover, the majority of rotifers observed within the fresh samples (without addition of Lugol's) in this study were *Monogononta*, thus, we can assume that the bulk of eggs originated from this taxon. The rotifers mictic and amictic oviposition and hatching depend on environmental conditions such as light, food and competition from other rotifers [41–43]. Therefore, the increase of oviposition during the first week of exposure in the control and C1 exposures could be due to the environmental changes from the pond to the aquaria. However, the number of eggs in C10 did not increase significantly from t0 to t1, and those in the C1 exposure conditions were significantly lower than in C0. This shows a dose-response effect of the Zr on the oviposition of rotifers. Several studies showed that metals such as copper, cadmium and chromium can decrease rotifer offspring production [44,45]. During the first 2 weeks of exposure we also observed a dose-response effect on the number of rotifers counted, with significantly lower numbers in C10 compared to control and C1 conditions.

Aspidisca cicada was the only ciliate species counted that was negatively impacted by Zr in this study. This species is known to crawl and to be dominant in benthic microorganism communities. Two metal toxicity studies on ciliates from activated sludge treatment plants showed that this species was one of the least sensitive to metal contamination [46,47]. However, *A. cicada* predominantly feeds itself by grazing bacteria and algae [27,48,49], thus the lower diatom growth could have contributed to the decreased number of species in this Zr exposure. Some studies

also report that crawling ciliates species seem to be more sensitive to metals than attached ciliates [46,47,50].

Rotifers decreased over exposure time along with ciliates during the last 2 weeks of exposure, even though total micrometazoan individual numbers remained constant. This can be explained by the increase of other microorganisms counted such as amoeba or flagellates (data not shown). Moreover, the decrease in the number of individuals at t4 for these two taxa can be explained by the varying environmental conditions between the colonization period in the pond and the exposure in the aquaria, and by the disappearance of green algae. The effects of Zr were not similar among these two taxa. While the number of rotifer individuals and eggs decreased under C1 and C10 conditions during the first 2 weeks of exposure, the majority of ciliate species observed seemed to increase in the presence of Zr. The increase in the number of ciliates during t1 and t2 in Zr exposure conditions could be linked to the lower number of rotifers in the same treatments. The decrease in rotifers likely led to a decrease in predation pressure on algae and bacteria, and probably left more food available for ciliates.

In this study, Zr affected the micrometazoan structure in the biofilm exposed at the highest Zr concentration tested (3 nM). Rotifera and the ciliate *Aspidisca cicada* appeared to be the most sensitive organisms among the observed micrometazoan. A toxic effect of Zr on rotifers could explain such results. But indirect effects such as a decrease in food source with lower algal growth in the presence of Zr could also play a role in the changes of micrometazoan community structure. These results suggest that a Zr contamination in natural freshwater may affect aquatic ecosystem structure and function by destabilizing the first trophic chain level.

3.5 Conclusion

To the best of our knowledge, this is the first time that a study investigates the effect of Zr on several biological compartments of periphytic biofilms, such as autotrophic organisms and benthic micrometazoan. It was shown that this tetravalent metallic element can affect the periphyton microorganism composition and could disturb key periphyton functions (organic matter decomposition, primary production, etc.) such as those previously observed for zinc, copper and lead [51–53]. Biofilm microbial life in freshwaters is responsible for major ecosystem processes and play a large role in biogeochemical fluxes [54]. Effects of metals on micrometazoan are still scarcely investigated and their understanding could improve the risk assessment of metal repercussions on aquatic ecosystems [55,56].

Acknowledgements

Financial support from the *Fonds de recherche du Québec sur la nature et les technologies* (FRQNT; grant number 2015-MI-190537) is acknowledged as well as the mobility funding provided by LabEx COTE and IRSTEA. Caroline Doose acknowledges the language assistance received from Nicholas Gibb and Scott Hepditch, as well as statistical help provided by Jean-Paul Maalouf, Marie Wach and David Carayon. C. Fortin is supported by the Canada Research Chair program (grant number 950-231107).

BIBLIOGRAPHIE CHAPITRE 3

- [1] T.M. Poston, D.C. Klopfer, A literature review of the concentration ratios of selected radionuclides in freshwater and marine fish, U.S. Department of Energy, (1986) 272.
- [2] S.M. Boswell, H. Elderfield, The determination of zirconium and hafnium in natural waters by isotope dilution mass spectrometry, *Mar. Chem.* 25 (1988) 197–209. [https://doi.org/10.1016/0304-4203\(88\)90050-3](https://doi.org/10.1016/0304-4203(88)90050-3).
- [3] C. Gobeil, B. Rondeau, L. Beaudin, Contribution of municipal effluents to metal fluxes in the St. Lawrence river, *Environ. Sci. Technol.* 39 (2005) 456–464. <https://doi.org/10.1021/es049335x>.
- [4] G.M. Bedinger, 2012 Minerals Yearbook, USGS, (2014) 174. <http://minerals.usgs.gov/minerals/pubs/country/2012/myb3-2012-my.pdf>.
- [5] O. Abollino, M. Aceto, M. Malandrino, E. Mentasti, C. Sarzanini, R. Barberis, Distribution and mobility of metals in contaminated sites. Chemometric investigation of pollutant profiles, *Environ. Pollut.* 119 (2002) 177–193. [https://doi.org/10.1016/S0269-7491\(01\)00333-5](https://doi.org/10.1016/S0269-7491(01)00333-5).
- [6] R. Schulin, F. Curchod, M. Mondeshka, A. Daskalova, A. Keller, Heavy metal contamination along a soil transect in the vicinity of the iron smelter of Kremikovtzi (Bulgaria), *Geoderma*. 140 (2007) 52–61. <https://doi.org/10.1016/j.geoderma.2007.03.007>.
- [7] M.G. Little, C.T.A. Lee, Sequential extraction of labile elements and chemical characterization of a basaltic soil from Mt. Meru, Tanzania, *J. African Earth Sci.* 57 (2010) 444–454. <https://doi.org/10.1016/j.jafrearsci.2009.12.001>.
- [8] P. Couture, D. Cluis, C. Bastien, Phosphorus removal from swine manure supernatant : precipitant efficiency, *Water. Air. Soil Pollut.* (1988) 353–364.
- [9] M. Coste, S. Boutry, J. Tison-Rosebery, F. Delmas, Improvements of the Biological Diatom Index (BDI): description and efficiency of the new version (BDI-2006), *Ecol. Indic.* 9 (2009) 621–650. <https://doi.org/10.1016/j.ecolind.2008.06.003>.
- [10] A.M. Romaní, H. Guasch, M.D. Balaguer, Aquatic biofilms: ecology, water quality and wastewater treatment, Caister Academic Press, (2016), 229. <https://doi.org/10.21775/9781910190173>.
- [11] I. Lavoie, M. Lavoie, C. Fortin, A mine of information: benthic algal communities as

- biomonitors of metal contamination from abandoned tailings, *Sci. Total Environ.* 425 (2012) 231–241. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2012.02.057>.
- [12] R. Behra, R. Landwehrjohann, K. Vogel, B. Wagner, L. Sigg, Copper and zinc content of periphyton from two rivers as a function of dissolved metal concentration, *Aquat. Sci.* 64 (2002) 300–306. <https://doi.org/10.1007/s00027-002-8074-9>.
- [13] K.L. Holding, R.A. Gill, J. Carter, The relationship between epilithic periphyton (biofilm) bound metals and metals bound to sediments in freshwater systems, *Environ. Geochem. Health.* 25 (2003) 87–93. <https://doi.org/10.1023/A:1021205101133>.
- [14] J. Prygiel, M. Coste, J. Bukowska, Review of the major diatom-based techniques for the quality assessment of rivers-State of the art in Europe, in: J. Prygiel, B.A. Whitton, J. Buckowska (Eds.), *Use of algae for monitoring rivers*, Agence de l'Eau Artois-Picardie, (1999): pp. 224–238.
- [15] Morin S., A. Cordonier, I. Lavoie, A. Arini, S. Blanco, T.T. Duong, E. Tornés, B. Bonet, N. Corcoll, L. Faggiano, M. Laviale, F. Pérès, E. Becares, M. Coste, A. Feurtet-Mazel, C. Fortin, H. Guasch, S. Sabater, Consistency in diatom response to metal-contaminated environments, in: H. Guasch, A. Ginebreda, A. Geiszinger (Eds.), *Handbook of environmental Chemistry, Emerging and Priority Pollutants in Rivers*, 19 (2012) : pp. 117–146. https://doi.org/10.1007/978-3-642-25722-3_5.
- [16] S. Kim Tiam, A. Feurtet-Mazel, F. Delmas, N. Mazzella, S. Morin, G. Daffe, P. Gonzalez, Development of q-PCR approaches to assess water quality: effects of cadmium on gene expression of the diatom *Eolimna minima*, *Water Res.* 46 (2012) 934–942. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2011.11.005>.
- [17] J.F. A. Borja *, I. Muxika, AZTI, Experimental evaluation of the contribution of acidic pH and Fe concentration to the structure, function and tolerance to metals (Cu and Zn) exposure in fluvial biofilms, *Mar. Pollut. Bull.* 46 (2013) 835–845. <https://doi.org/DOI.10.1007/s10646-014-1270-2>.
- [18] C. Bonnineau, A. Tlili, L. Faggiano, B. Montuelle, H. Guasch, The use of antioxidant enzymes in freshwater biofilms: temporal variability vs. toxicological responses, *Aquat. Toxicol.* 136–137 (2013) 60–71. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2013.03.009>.
- [19] H. Guasch, M. Ricart, J. López-Doval, C. Bonnineau, L. Proia, S. Morin, I. Muñoz, A.M. Romaní, S. Sabater, Influence of grazing on triclosan toxicity to stream periphyton, *Freshw.*

- Biol. 61 (2016) 2002–2012. <https://doi.org/10.1111/fwb.12797>.
- [20] F. Perrier, M. Baudrimont, S. Mornet, N. Mesmer-dudons, S. Lacomme, B. Etcheverria, O. Simon, A. Feurtet-mazel, Gold nanoparticle trophic transfer from natural biofilm to grazer fish, *Gold Bull.* 51 (2018) 163–173.
- [21] J. Neury-Ormanni, J. Vedrenne, S. Morin, Who eats who in biofilms? Exploring the drivers of microalgal and micromeiofaunal abundance, *Bot. Lett.* 163 (2016) 83–92. <https://doi.org/10.1080/23818107.2016.1151827>.
- [22] B. Finlay, P. Bannister, J. Stewart, Temporal variation in benthic ciliates and the application of association analysis, *Freshw. Biol.* 9 (1979) 45–53. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2427.1979.tb01485.x>.
- [23] B.J. Finlay, K.J. Clarke, A.J. Cowling, R.M. Hindle, A. Rogerson, U.G. Berninger, On the abundance and distribution of protozoa and their food in a productive freshwater pond, *Eur. J. Protistol.* 23 (1988) 205–217. [https://doi.org/10.1016/S0932-4739\(88\)80037-3](https://doi.org/10.1016/S0932-4739(88)80037-3).
- [24] J.R. Pratt, J. Cairns, Functional groups in the Protozoa : roles in differing ecosystems, *J. Protozool.* 32 (1985) 356–360. <https://doi.org/10.1111/j.1550-7408.1985.tb04037.x>.
- [25] E.B. Sherr, B.F. Sherr, High rates of consumption of bacteria by pelagic ciliates, *Nature.* 325 (1987) 710–711. <https://doi.org/10.1038/325710a0>.
- [26] J.C. Goldman, D.A. Caron, Experimental studies on an omnivorous microflagellate: implications for grazing and nutrient regeneration in the marine microbial food chain, *Deep Sea Res. Part A, Oceanogr. Res. Pap.* 32 (1985) 899–915. [https://doi.org/10.1016/0198-0149\(85\)90035-4](https://doi.org/10.1016/0198-0149(85)90035-4).
- [27] P. Madoni, S. Zangrossi, Ciliated protozoa and saprobical evaluation of water quality in the Taro River (northern Italy), *Ital. J. Zool.* 72 (2009) 20–25. <https://doi.org/10.1080/11250000509356648>.
- [28] B. Nisbet, Heterotrophic Feeding, in: Dordrecht (Ed.), *Nutr. Feed. Strateg. Protozoa*, Springer, (1984): pp. 84–100.
- [29] N.J. Horan, *Biological wastewater treatment systems: theory and operation*, 1 edition, Wiley, (1989), p.320.
- [30] A. Dauta, Conditions de développement du phytoplancton. Etude comparative du comportement de huit espèces en culture., *Annales de limnologie*, 18 (1982) 217–262. <https://doi.org/10.1051/limn/1982005>.

- [31] T. Kobayashi, T. Sasaki, I. Takagi, H. Moriyama, Solubility of zirconium (IV) hydrous oxides, *J. Nucl. Sci. Technol.* 44 (2007) 90–94. <https://doi.org/10.3327/jnst.44.90>.
- [32] AFNOR, Qualité de l'eau - Dosage des matières en suspension - Méthode par filtration sur filtre en fibres de verre, (2005) 16 (NF EN 872).
- [33] Foissner, W., & Berger, H. (1996). A user-friendly guide to the ciliates (Protozoa, Ciliophora) commonly used by hydrobiologists as bioindicators in rivers, lakes, and waste waters, with notes on their ecology. *Freshw. Biol.*, 35(2), 375-482.
- [34] P. De Puytorac, J. Grain, J.-P. Mignot, Précis de protistologie, Editions Boubée: Paris, France, (1987) 581.
- [35] C.D. Jersabek, M.F. Leitner, The rotifer world catalog. World Wide Web electronic publication, (2013). <http://www.rotifera.hausdernatur.at/>.
- [36] S.E. Fienberg, R.R. Sokal, F.J. Rohlf, F.J. Rohlf, R.R. Sokal, Biometry. The principles and practice of statistics in biological research statistical tables, *Biometrics.* 26 (2012) 351. <https://doi.org/10.2307/2529087>.
- [37] D. Soldo, R. Behra, Long-term effects of copper on the structure of fresh water periphyton communities and tolerance to copper, zinc, nickel and silver., *Aquat. Toxicol.* 47 (2000) 181–189.
- [38] P.L. Foster, Metal resistances of Chlorophyta from rivers polluted by heavy metals, *Freshw. Biol.* 12 (1982) 41–61. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2427.1982.tb00602.x>.
- [39] H.H. Segers, C.M. Yule, Rotifera : Monogononta, in: *Freshwater Invertebrates of the Malaysian Region*, (2012): pp. 106–120.
- [40] R.L. Wallace, T.W. Snell, Rotifera, in: J.T.A. Covich (Ed.), *Ecology and classification of North American freshwater invertebrates*, Elsevier Inc. All, 3 (2010): pp. 173–235. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-374855-3.00008-X>.
- [41] M. Serra, E. Aparici, M.J. Carmona, When to be sexual: sex allocation theory and population density-dependent induction of sex in cyclical parthenogens, *J. Plankton Res.* 30 (2008) 1207–1214. <https://doi.org/10.1093/plankt/fbn077>.
- [42] W.T. Edmonson, Reproductive rate of planktonic rotifers as related to food and temperature in nature, *Ecol. Monogr.* 35 (1965) 61–111. <https://doi.org/10.2307/1942218>.
- [43] T. Ramakrishna rao, S.S.S. Sarma, Mitic and amitic modes of reproduction in the rotifer

- Brachionus patulus*, Curr. Sci. Assoc. 54 (2018) 499–501. <https://www.jstor.org/stable/24088008>.
- [44] H.U. Dahms, A. Hagiwara, J.S. Lee, Ecotoxicology, ecophysiology, and mechanistic studies with rotifers, Aquat. Toxicol. 101 (2011) 1–12. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2010.09.006>.
- [45] I. Moreno-Garrido, L.M. Lubián, A.M.V.M. Soares, In vitro populations of rotifer *Brachionus plicatilis* (Muller) demonstrate inhibition when fed with copper-preaccumulating microalgae, Ecotoxicol. Environ. Saf. 44 (1999) 220–225. <https://doi.org/10.1006/eesa.1999.1826>.
- [46] P. Madoni, G. Esteban, G. Gorbi, D.I. Agua, L. Poveda, A. Rey, Acute toxicity of cadmium, copper, mercury and zinc to ciliates from activated sludge plants, Bull. Environ. Contam. Toxicol. 49 (1992) 900–905.
- [47] P. Madoni, D. Davoli, G. Gorbi, Acute toxicity of lead, chromium, and other heavy metals to ciliates from activated sludge plants, Bull. Environ. Contam. Toxicol. 53 (1994) 420–425. <https://doi.org/10.1007/BF00197235>.
- [48] B. Gücker, H. Fischer, Flagellate and ciliate distribution in sediments of a lowland river: Relationships with environmental gradients and bacteria, Aquat. Microb. Ecol. 31 (2003) 67–76. <https://doi.org/10.3354/ame031067>.
- [49] C.R. Curds, The ecology and role of Protozoa in aerobic sewage treatment processes, Annu. Rev. Microbiol., 46 (1982) 27–44. <https://doi.org/10.1146/annurev.mi.36.100182.000331>.
- [50] P. Madoni, Protozoa in wastewater treatment processes: a minireview, Ital. J. Zool. 78 (2011) 3–11. <https://doi.org/10.1080/11250000903373797>.
- [51] P.Y. Ancion, G. Lear, A. Dopheide, G.D. Lewis, Metal concentrations in stream biofilm and sediments and their potential to explain biofilm microbial community structure, Environ. Pollut. 173 (2013) 117–124. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2012.10.012>.
- [52] R.J. Ellis, B. Neish, M.W. Trett, J.G. Best, A.J. Weightman, P. Morgan, J.C. Fry, Comparison of microbial and meiofaunal community analyses for determining impact of heavy metal contamination, J. Microbiol. Methods. 45 (2001) 171–185. [https://doi.org/10.1016/S0167-7012\(01\)00245-7](https://doi.org/10.1016/S0167-7012(01)00245-7).
- [53] M.S. Strickland, C. Lauber, N. Fierer, M.A. Bradford, Testing the functional significance of microbial community composition, Ecology. 90 (2009) 441–51. <https://doi.org/10.1890/08->

0296.1.

- [54] T.J. Battin, K. Besemer, M.M. Bengtsson, A.M. Romani, A.I. Packmann, The ecology and biogeochemistry of stream biofilms, *Nat. Rev. Microbiol.* 14 (2016) 251–263. <https://doi.org/10.1038/nrmicro.2016.15>.
- [55] S. Singh, A. James, R. Bharose, Biological assessment of water pollution using periphyton productivity : a review, *Nat. Environ. Pollut. Technol.* 16 (2017) 559–567.
- [56] C. Barranguet, E. Charantoni, M. Plans, W. Admiraal, Short-term response of monospecific and natural algal biofilms to copper exposure, *Eur. J. Phycol.* 35 (2000) 397–406. <https://doi.org/10.1080/09670260010001736001>.

4 EFFECTS OF THORIUM ON BACTERIAL, MICROALGAL AND MICROMEIOFAUNAL COMMUNITY STRUCTURES IN A PERIPHYTIC BIOFILM

Effet du thorium sur les communautés bactériennes, de microalgues et de la microméiofaune d'un biofilm périphytique

Auteurs :

Doose Caroline ¹, Morin Soizic ², Malbezin Laura¹, Vedrenne Jacky ², Fortin Claude ¹

¹Institut national de la recherche scientifique, 490 rue de la Couronne G1K 9A9, Quebec City, QC, Canada; claud.fortin@ete.inrs.ca; caroline.doose@ete.inrs.ca; laura.malbezin@ete.inrs.ca

²INRAE, EABX, 50 avenue de Verdun 33612 Cestas Cedex, France; soizic.morin@inrae.fr; jacky.vedrenne@inrae.fr

Titre de la revue ou de l'ouvrage :

Ecotoxicology and Environmental Safety

Soumis le 17 août 2020 et accepté provisoirement (modifications mineures) le 20 novembre 2020

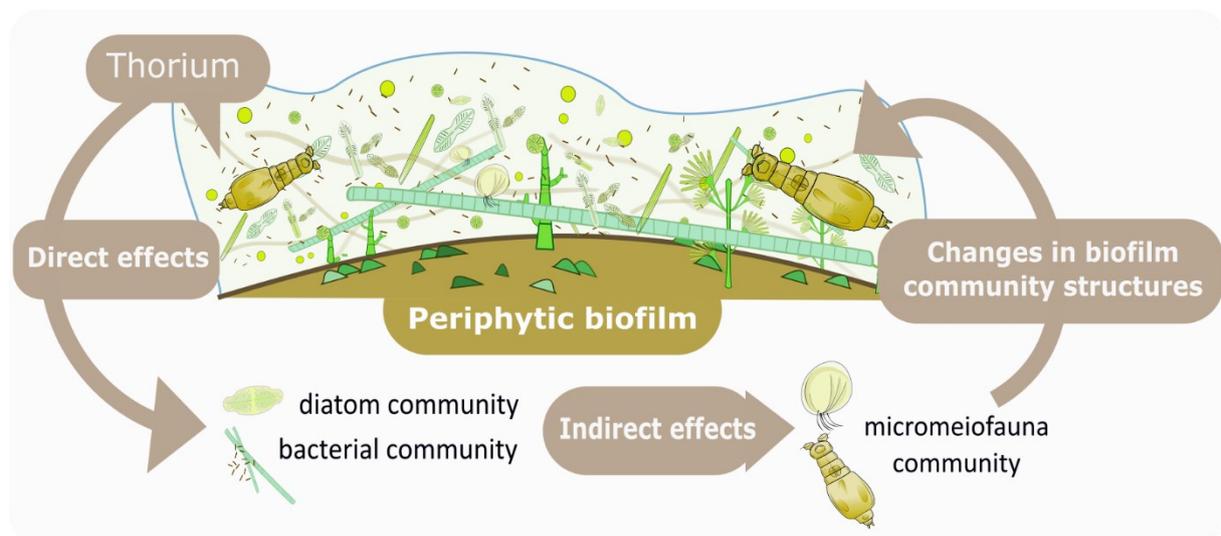
Contribution des auteurs :

Caroline Doose est l'auteure principale de ce document. Elle avait la charge de la conduite des expériences, de l'interprétation des données et de la rédaction de la première version de cet article. Laura Malbezin était stagiaire de Master 2 ayant participé à la mise au point de certain protocoles expérimentaux mis en œuvre dans ces travaux ainsi qu'à l'acquisition des données sur les communautés bactérienne et algale pour la réalisation de son stage. Jacky Vedrenne est un ingénieur de recherche spécialisé en microméiofaune. Il a contribué à l'identification taxonomique et à la révision de l'article. Claude Fortin est le superviseur et Soizic Morin la co-superviseure, tous deux ont contribué à la conception expérimentale, à l'interprétation des données et à l'examen du document.

Abstract

Few ecotoxicity studies are available on thorium (Th) which hinders the ability to evaluate its ecotoxicological risk. This study investigates the effects of Th on microbial communities of periphytic biofilms. Biofilms host a diverse ecosystem comprising of bacteria, fungi, algae and micrometazoans. Ceramic plates were left to colonize for one month in the laboratory with a biofilm sampled from a nearby river. Plates were randomly placed in channels containing culture media representing three different conditions: a control condition (C0; background Th concentrations of 0.004 ± 0.002 nM), a low Th concentration condition (C1; 0.18 ± 0.09 nM Th) and a moderately high Th condition (C10; 8.7 ± 3.4 nM) for up to 4 weeks. The presence of Th modified the diatom community by changing its taxonomic structure, reducing diversity and increasing cell density. The taxonomic structure of the bacterial community was also affected. No direct toxic effect of Th was observed on counted micrometazoans but the changes in diatom and bacterial communities could explain the higher individual number of diatoms and micrometazoans observed in Th-exposed conditions. This work shows that low concentrations of Th can modify biofilm structure, which, in turn, could disturb its ecological key functions.

Graphical abstract



4.1 Introduction

The development of new technologies has significantly increased the demand for rare earth elements. Canada has a strong mining potential, notably for rare earth elements and uranium, for which the country is the second largest world producer. Thorium (Th) is a natural, radioactive, tetravalent, metallic element, often associated with the waste of heavy metal and uranium mining extraction, and is also found in phosphate fertilizers [1]. Thorium is used in the aeronautic, electronic and metallurgic industries notably for its resistance to high temperature, but it is also used in petrochemistry for cracking [2]. Moreover, it has good potential for future

use as a nuclear power combustible [3]. These activities and uses can cause the release of Th in the environment. However, environmental risks associated with Th are still not well understood, particularly in aquatic ecosystems. In natural freshwaters, Th has been found at concentrations between 0.003 and 700 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ (0.01 nM and 3 μM) [4–9]. Concentrations of up to 300 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ (1.3 μM) of Th were measured in lakes located next to tin mines and between 800 and 1400 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ (3.4 and 6.0 μM) in the drainage water of uranium and iron mines in southern Brazil [10,11]. In freshwater, dissolved Th is mostly found in the hydroxide form $\text{Th}(\text{OH})_4$. Its low solubility appears to reduce its mobility between the compartments of aquatic ecosystems and its mobility is influenced by associations with particles, colloids and dissolved organic matter [12–17]. Literature on Th toxicity on freshwater organisms is scarce. For the cladoceran, *Daphnia magna*, 24-h and 48-h EC_{50} s (95 % confidence interval) of Th on mortality were 7.3 (5.8-9.2) and 4.7 (3.2-6.6) μM , respectively [18]. In another study, the growth of the green alga, *Monoraphidium* sp., was negatively impacted at a concentration of 43 μM of Th or higher and *Scenedesmus* sp. grew 16 % and 26 % less than controls at Th concentrations of 43 and 110 μM , respectively [19]. The EC_{50} for *Chlorella vulgaris*, another green alga, was reported at 15 μM [20]. Recently, Peng et al. (2017) investigated the effect of Th speciation on the green alga, *Chlorella pyrenoidosa*. The 96-h EC_{50} based on growth inhibition of this alga was 10 μM and nano-sized Th precipitates were observed inside the cells by transmission electron microscopy [21]. Therefore, there is a need to better understand the potential of Th toxicity on aquatic organisms and to improve the risk assessment linked to this actinide.

Currently, bioindicators are widely used for ecotoxicological risk assessment in freshwater ecosystems [22]. Recent work on biofilm has demonstrated its potential as a bioindicator for freshwater contamination [23–25]. First, the internalization and capacity to retain metallic elements by benthic microorganisms facilitates the detection of ultra-trace elements [26,27]. Second, periphytic microorganisms, such as diatom and bacterial communities, are currently used for freshwater monitoring, including metal impact assessments [28–30]. Finally, periphytic biofilms have a key role in the functioning of aquatic ecosystems, where perturbations can lead to important perturbations of ecosystem services [24]. While the majority of studies conducted on biofilms focus on autotrophic and bacterial taxa, grazing microbes are rarely considered [31]. However, micrometazoan communities play a key role in the biofilm food web and their disturbance can affect the global biological structure and its ecological function [32,33]. In a previous study, we showed that zirconium (Zr), another tetravalent metallic element, had an effect on ciliate and rotifer populations at low concentrations (0.5 ± 0.3 and 2.9 ± 0.3 nM respectively) [34]. In this work, the effect of Th on the microbial communities of a periphytic biofilm was investigated to better understand its potential hazard for freshwater ecosystems and contribute to improved risk assessment of mining activities that release Th in aquatic ecosystems.

4.2 Materials and methods

4.2.1 Experimental setup

To colonize periphyton, ceramic slides of 23 cm² were submerged for one month in a large channel inoculated with a periphyton suspension sampled from the Cap-Rouge river (Quebec, Canada, geographical coordinates: 46°45'48.8"N 71°21'24.0"W). The light flux was 80 $\mu\text{mol photon}\cdot\text{cm}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ and the photoperiod was 14:10 for day and night, respectively. The slides were then randomly distributed into 12 aquaria containing a synthetic culture medium (Dauta) [35]. One week prior to Th exposure, three sets of quadruplicate, independent experimental channels (dimensions: 100 x 20 x 10 cm, 6 L) were filled with different exposure media to pre-equilibrate the metal with the adsorption sites of walls, tubes and reservoirs. At the beginning of the experiment, 288 slides were randomly transferred from the colonisation channel to the 12 experimental channels with targeted Th concentrations of 0 (C0), 1 (C1) and 10 nM (C10). Following 1, 2 and 4 weeks of exposure, eight slides per channel were randomly sampled to make two composite samples per channel by pooling four slides. With four channels per condition, eight replicates were used for each exposure condition (C0, C1 and C10). Exposure solutions were renewed weekly and the temperature and pH were monitored before and after water renewal (18.3 ± 0.3 °C and 8.1 ± 0.4 respectively; expressed as mean \pm standard deviation). Total concentrations of Th, orthophosphates and nitrates were monitored once a week throughout the 4 weeks of exposure, along with pH, and temperature before and after media renewal. Thorium concentrations were determined by Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry after an addition of 500 μL of nitric acid to 4.5 mL of sample. The calibration curve was validated with certified control solution 406 (SCP science, Baie-d'Urfé, Canada). Each exposure medium was sampled with two replicates per channel (i.e. eight values per condition and sampling event), totaling 16 samples per channel and 64 per condition.

Sampled slides were first rinsed with fresh Dauta medium without Th and then scraped to re-suspend the biofilm in 50 mL of Dauta medium. Three volumes of 1 mL were sampled for the subsequent analyses: chlorophyll *a* fluorescence, photosynthetic activity, and microscopic microorganisms' identification. Biofilm dry weight was quantified after filtration of a 20 mL aliquot on pre-weighed and dried GF/F filters, and lyophilisation according to the NF EN 872 standard method [36].

4.2.2 Biofilm analysis

4.2.2.1 Microscopy analysis

To determine the number of diatoms, live and dead cells were counted using an Axioplan Zeiss microscope. They were counted using a Nageotte cell at 200x magnification after fixation

(using Lugol solution to reach a final concentration of 0.01 % in each sample), following the method described in Morin et al. [37]. The taxonomic determination of diatoms was conducted using pooled replicate samples digested 15 h with concentrated HNO₃ (68 %; ACS) and then with hydrogen peroxide (30 %). Subsequently, samples were mounted onto microscope slides using Naphrax (*Brunel Microscopes Ltd.*, Chippenham, UK). A minimum of 400 valves per slide were counted and identified to the species level, when possible, and results were expressed as relative abundances. The determination was conducted using a key specialized in diatoms from eastern Canada [38].

Micromeiofauna individuals were also enumerated in all samples, after Lugol fixation (0.01 % final concentration) and using a Nageotte counting cell as described for diatoms. Determination of the protozoan composition within micromeiofauna was established with the help of the user-friendly identification key for ciliates [33], and the *Precis of Protistology* for other protozoans, such as flagellates, heliozoans, amoebae and thecamoebians [40]. Rotifers were identified with the help of *The Rotifer World Catalog* [41].

4.2.2.2 Genomic analyses

The diversity of the bacterial communities was followed over the exposure time by amplifying and sequencing the 16S ribosomal DNA in the variable V3 and V4 regions. The DNA of each sample was extracted using the FastDNA™ Spin Kit For Soil (MP Biomedicals, Thermo Fisher Scientific) recommended for biofilm [42]. The number of gene copies was determined in each sample by realizing a qPCR in 96 well plates with PCR CFX96™ Real-Time System C1000™ Thermal Cycler (Biorad). In each well, 5 µL of DNA sample diluted at 1 ng·L⁻¹ with nuclease-free water was added to 15 µL of the mix provided by the manufacturer. In order to quantify the amount of bacteria in each sample, a qPCR was realized with the following universal primers specific for members of *Eubacteria* : 341F-(5'- CCT ACG GGA GGC AGC AG -3') and 515R (5'- ATT ACC GCG GCT GCT GGC A -3') as described in López-Gutiérrez et al. (2004) [43]. A standard curve was established from 20 to 8·10⁷ copies of plasmids containing a reference 16s sequence of 169 pb from the strain *Bradyrhizobium japonicum* manufactured by Invitrogen, Life Technologies (Carlsbad, CA, USA). DNA sample weight was determined using a Thermo Scientific™ NanoDrop 2000. The sequencing of 16s rDNA of samples were realized with Illumina Miseq by the IBIS genomic platform of Laval University, Canada.

4.2.3 Data treatment

The number of diatoms and micromeiofauna individuals were normalized for the dry weight (dw) of the samples while the number of 16S gene copies of the bacterial community were normalized for the DNA sample weight. Shannon indices were calculated using R (vegan

package). To determine significant differences between treatment groups and exposure times, ANOVA analyses were computed using Tukey's post hoc tests with R software (car and MASS packages). Significant differences between diatom growth curves were determined by an ANCOVA analysis [44]. The taxonomic data obtained with the sequencing of 16s rDNA were analyzed following the Workflow for Microbiome Data Analysis using the Dada2 and phyloseq R packages and using the SILVA database for the taxonomy assignment [45]. A principal component analysis was realised with the FactoMineR and factoextra packages [46] on the taxonomic data (Shannon indices and log-transformed relative abundances of taxa) to provide a better overview on global effects of Th to community structures.

4.3 Results and discussion

4.3.1 Physicochemical composition

Nutrient concentrations (orthophosphates and nitrates), pH and water temperature are shown in Table 4.1 and remained constant during the 4-week exposure experiments and were similar between treatments (ANOVA, $p < 0.05$). Thorium concentrations in the C1 exposure conditions were lower than the targeted nominal concentrations despite the pre-equilibration of channel binding sites before the beginning of exposure. Nevertheless, the obtained concentrations were statistically higher than the background concentrations measured in the C0 exposure conditions ($p < 0.05$).

Table 4.1. Physicochemical conditions measured in the different exposure treatment over the 4 weeks of exposure. Values are presented as means \pm standard deviations (n = 4)

Parameter	C0	C1	C10
[Th] total (nM)	0.004 \pm 0.002	0.18 \pm 0.09	8.7 \pm 3.4
pH	8.0 \pm 0.4	8.1 \pm 0.4	8.2 \pm 0.4
Orthophosphate (mg P-PO ₄ ·L ⁻¹)	2.9 \pm 0.2	3.1 \pm 0.3	3.3 \pm 0.3
Nitrate (mg N-NO ₃ ·L ⁻¹)	63 \pm 8	56 \pm 3	53 \pm 1
Water temperature (°C)	18.4 \pm 0.1	18.5 \pm 0.1	18.3 \pm 0.1

The Th speciation in the Dauta medium was calculated using the MINEQL software over the range of observed pHs (7.7 to 8.5). In this pH range, the tetrahydroxo-complex dominated the aqueous speciation of Th (99.5 % Th(OH)₄) with a small presence of Th(OH)₃ (0.5 %). The aqueous speciation of Th is mostly controlled by pH and it is thus anticipated that for neutral and alkaline surface waters, Th(OH)₄ would be the dominant aqueous species present while less highly substituted Th(OH)_n (where $n \leq 3$) species become successively dominant at pH [47] < 7 . Our experimental conditions, in terms of Th chemical speciation, thus reflect those expected in a natural aquatic ecosystem.

4.3.2 Effect of Th on the growth of biofilm communities

Figure 4.1 shows the variation of diatom (red), bacteria (green) and micromeiofauna (blue) individuals' numbers over time in the different exposure conditions. The number of diatoms augmented approximately of six times in the first week in all conditions. Thereafter, cell concentrations appeared to be stable over the exposure time for the Th-exposed conditions with average concentrations of $8.1 \pm 2.5 \times 10^5$ (C1) and $9.7 \pm 1.9 \times 10^5$ cell·mg⁻¹ (C10) from weeks 1 to 4. In the control condition, no significant growth was observed between the first and the second week of exposure based on diatom density values. However, a slight decrease between weeks 1 and 2 resulted in values significantly lower in the control than in the C1 and C10 conditions at 2 weeks of exposure ($p < 0.05$). Thorium is not known to play an essential biological role in organisms; it is thus unlikely that the Th was directly responsible for the diatom growth in the Th-exposure conditions after 2 weeks. Moreover, the diatom population tended to decrease between weeks 1 and 2 in control conditions, while they remained constant in Th-exposed channels. This means that at week 2, Th might have affected another biofilm component which influenced the diatom growth. The cell numbers in the control experiment increased during the two last weeks to reach $1.38 \pm 0.6 \times 10^6$ cell·mg⁻¹ at week 4.

The number of *Eubacteria* 16s rRNA gene copies present in the biofilm samples over the experiment (Figure 4.1, data in green) showed no significant differences over exposure time and between treatments for the two Th exposure conditions with an average of $4.03 \pm 0.68 \times 10^5$ and $4.96 \pm 0.79 \times 10^5$ copies·ng of DNA⁻¹. However, the control showed a significant increase between weeks 1 and 2 going from $4.79 \pm 0.61 \times 10^5$ to $8.41 \pm 1.72 \times 10^5$ copies·ng of DNA⁻¹, followed by a decrease over the last two weeks to reach $4.46 \pm 0.67 \times 10^5$ copies·ng of DNA⁻¹. Thorium is already known to be internalized and to modify the cell morphology at high concentrations in bacteria genera like *Pseudomonas* (internalization characterized by transmission electron microscopy and energy dispersive X-ray microanalysis when the cells were exposed to 431 μM during 12 h), and *Bradyrhizobium* (growth inhibition of 83.6 ± 8.1 % under 100 μM Th during 95 h) [48,49]. In this study, the results showed that Th can inhibit the growth of some bacteria in the Th-exposed conditions after 2 weeks of exposure at much lower concentrations than those typically used in the literature. However, because the 16s gene copy number present in the bacterial cells can vary from 1 to 7 depending on the species, we cannot make a direct link with the decrease in the total numbers of bacteria.

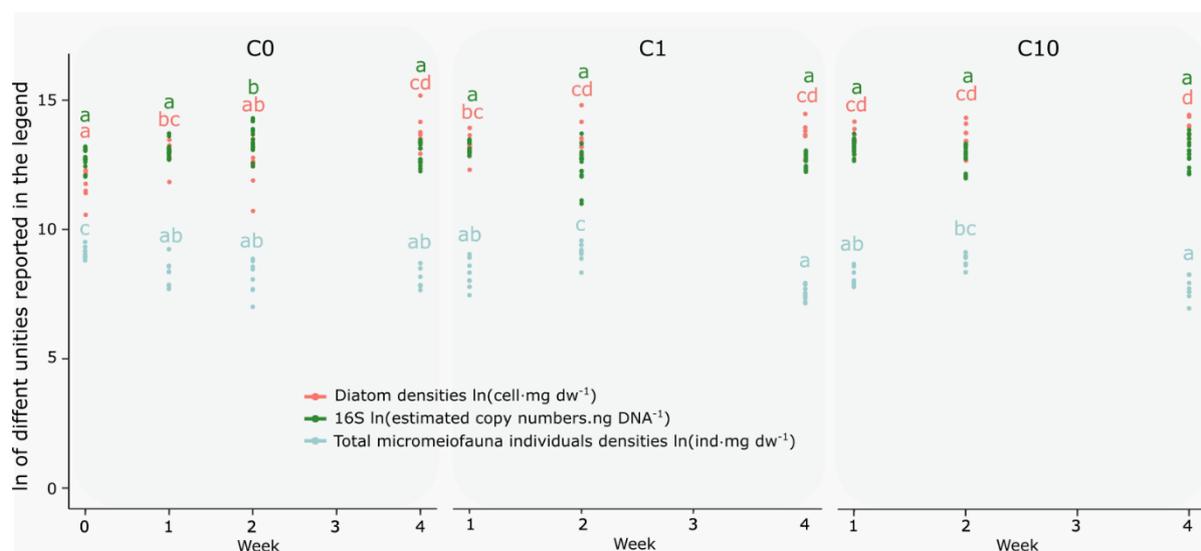


Figure 4.1. Total individuals (ln) normalized by biomass (live diatoms per mg of dry weight in red, number of *Eubacteria* 16s ARN genes copies obtained by qPCR per ng of total DNA sample in green, micrometazoans individuals per mg of dry weight in blue) observed over time in control C0 (0.004 ± 0.002 nM Th) and Th exposures (C1 = 0.18 ± 0.09 nM Th and C10 = 8.7 ± 3.4 nM Th). A two-way ANOVA was performed to detect significant differences between treatments, indicated by letters ($p < 0.05$; $n = 8$).

The total micrometazoans individuals counted during the experiment are presented in Figure 4.1 (data in blue). The number of individuals decreased over the first week in all conditions from $9.23 \pm 0.92 \times 10^3$ to $4.22 \pm 0.19 \times 10^3$ ind·mg⁻¹ dw. Control values were then stable over the experiment with an average of $5.36 \pm 0.99 \times 10^3$ ind·mg⁻¹ dw between weeks 1 and 4. In the Th-exposed channels, the number of individuals augmented at week 2 ($9.17 \pm 1.1 \times 10^3$ and $7.03 \pm 0.61 \times 10^3$ ind·mg⁻¹ dw C1 and C10 respectively) with a significant difference for the intermediate exposure condition C1 ($p < 0.05$) compared to the control. As mentioned previously for diatoms, Th is not known to have an essential biological role, thus it is unlikely that Th directly enhanced the micrometazoans organismal growth. Thus, increases in the number of individuals observed in the C1 condition at week 2 could be attributed to indirect effects such as the decrease of competing organisms. The number of individuals then decreased during the last 2 weeks of exposure to $1.90 \pm 0.21 \times 10^3$ and $2.46 \pm 0.39 \times 10^3$ ind·mg⁻¹ dw at week 4 for C1 and C10 exposure conditions, respectively.

Globally, these results showed that the two Th-exposed conditions had the same population variation pattern for the three biofilm compartments observed (diatoms, bacteria and micrometazoans), in contrast with the pattern observed in the control condition. In the C1 and C10 exposure conditions, diatoms were clearly dominating the biofilm in the last 2 weeks of exposure, while bacteria seemed to be dominant in the control. Taxonomic diversity observed within the biofilms of this experiment is reported in supporting information (Annexe II).

4.3.3 Effect on the diversity and taxonomic composition of biofilm communities

A high-throughput sequencing of the 16s rRNA genes was performed on the biofilm samples to characterize the bacterial community. The relative abundance of the 20 most prevalent bacterial 16s rRNA gene sequences are presented in Figure 4.2. Over the exposure time, eight main genera were detected and the abundance of two of them, *Pseudanabaena* and *Sphingopyxis*, varied significantly depending on time and exposure conditions. At the beginning of the experiment, the bacterial community was dominated by the *Pseudanabaena* genus (15.1 ± 3.3 %) composed of filamentous cyanobacteria. After 1 week of exposure, this genus decreased significantly in the control and C10 conditions with relative proportions of 2.0 ± 1.7 and 4.24 ± 1.1 % of the bacterial population, respectively, while it was still the principal genus in the C1 condition with a proportion of 18.3 ± 6.9 %. Then, relative abundances of *Pseudanabaena* in the C1 condition decreased significantly after the second week of exposure with a relative abundance of 3.2 ± 2.2 % (ANOVA, $p < 0.001$). From the second week on to the end of the exposure, values remained low and constant in all conditions. In contrary, *Sphingopyxis* genus was not present among the eight most abundant genera from the beginning of this experiment until the second week of exposure. After two weeks, this genus abundance significantly increased to become the most abundant genus in the control at 23.1 ± 11.6 % (ANOVA, $p < 0.05$) while it was also detected in the C1 and C10 conditions (4.1 ± 2.3 % and 11.9 ± 8.0 % respectively). During the last 2 weeks of exposure, the *Sphingopyxis* relative abundance decreased significantly in the control to reach 6.6 ± 5.7 % while values stayed constant in the two Th-exposed conditions.

Pseudanabaena is a genus of cyanobacteria in which some species are able to produce cyanotoxins such as the microcystin-LR (MCLR) [50]. *Sphingopyxis* genus is well-known to degrade MCLR [51]. Because the number of MCLR degrading bacteria was shown to depend on this toxin concentration, Ho et al. suggested that MCLR could be a primary substrate for those bacteria in the biofilm [52,53]. It was previously shown that copper and cadmium could modulate the transcription of genes coding for MCLR synthesis in cyanobacterial cells [54,55]. After 2 weeks, the lower abundance of *Sphingopyxis* genus in the C1 and C10 exposure conditions could be attributed to a reduction of cyanotoxin synthesis by cyanobacteria such as *Pseudanabaena*, although subsequent analyses would need to be done to demonstrate such an effect

Moreover, the *Sphingopyxis* genera was also reported to degrade organic contaminants such as the polycyclic aromatic hydrocarbons (PHAs) [56], crude oils, diesel and kerosene [63] and polyvinyl alcohol [64]. A study on chromate (Cr (VI)) bioremediation by bacteria belonging to *Sphingopyxis* genera (*Sphingopyxis macrogoltabida* SUK2c) showed that their biomass reduced and complexed the Cr. The authors suggested that this metal could be bound and

reduced by (-NH), (-COOH) and (P=O) groups present in the glycosphingolipids, surface proteins and on the fine peptidoglycan layer of those bacteria [57]. As the Th, the Cr is a class A metal and preferably bound to N, O and F atoms. Thus, we can imagine that Th could follow similar complexation mechanisms on the *Sphingopyxis* bacteria surfaces observed in this work. Moreover, these bacteria sensibility to Th could be linked with their capacity to bioaccumulate the Th.

For the last week of exposure, despite the lack of significance, the composition of the bacterial community in the three exposure conditions appeared to be different from each other. In the control condition, the *Blastomonas* genus and the SM 1A02 group were present in abundance, while in the C1 and C10 conditions they were not in the major genera detected by the analysis. Additionally, *Rhizorhapis* amplicon sequence variants (ASV) were part of the top 20 sequences only in the Th exposed conditions after 4 weeks, while *Flavobacterium* genus only represented 6.6 ± 8.1 % of the population in the C10 exposure condition.

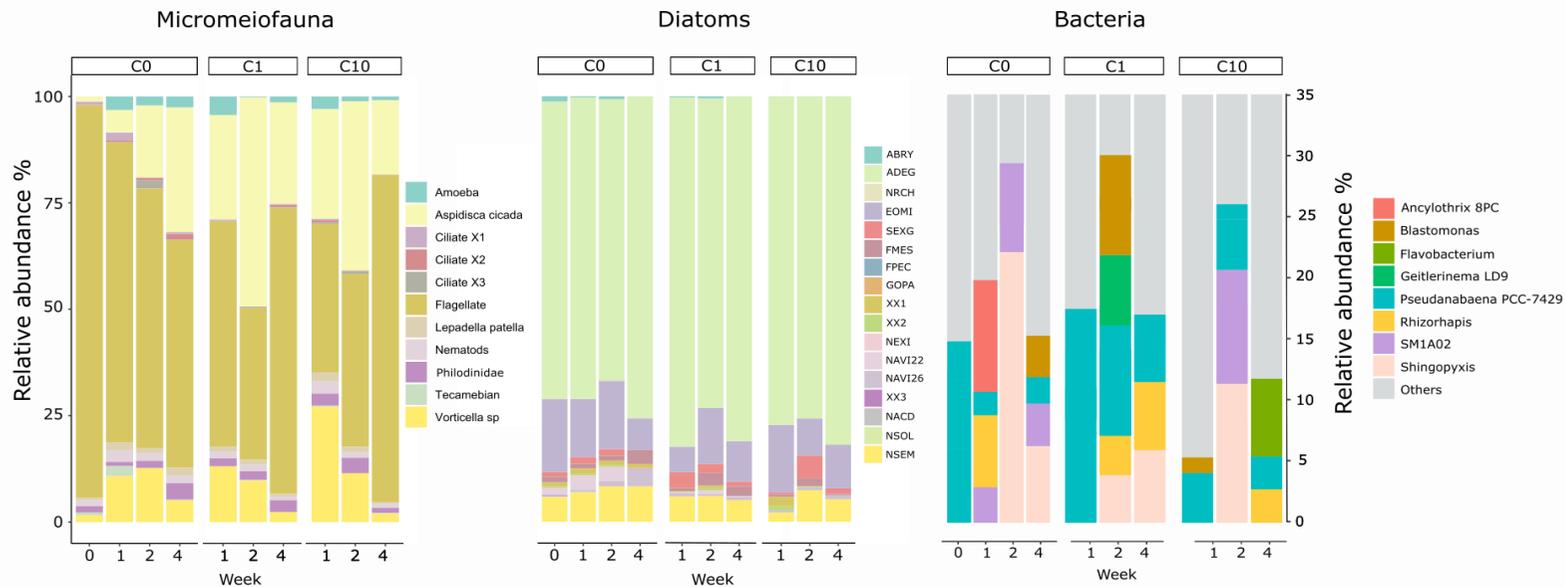


Figure 4.2. Relative abundance for the percentage of micromeiofauna, bacteria and diatoms taxa counted in the biofilm sampled over time in control (0 = 0.004 ± 0.002 nM) and Th exposures (1 = 0.18 ± 0.09 nM and 10 = 8.7 ± 3.4 nM). Bacteria genus represented were the top 20 amplicon sequence variants (ASV) obtained by analysing the 16s rRNA gene amplicon sequencing results. Sequences were binned to Amplicon sequence variants based on their taxonomy at genus levels. The top 20 ASV represented the maximum 33 % of the total genera found by the analysis, thus a scale zoom to 35 % was applied to the graphic to better illustrate the results. Values shown are the averages of replicate samples for micromeiofauna (n = 8) and bacteria (n = 3); for diatoms the eight sample replicates were pooled before counting. Diatom species are *Achnanthydium exiguum* (ADEG), *Stauroforma exiguiformis* (SEXG), *Fragilaria mesolepta* (FMES), *Eolimna minima* (EOMI), *Navicula* sp. 26 (NAVI26), *Navicula* sp. 22 (NAVI22), *Adlafia bryophila* (ABRY), *Nitzschia* cf. *acidoclinata* (NACD), *Nitzschia solgensis* (NSOL), *Navicula* aff. *reichardtiana* (NRCH), *Navicula exilis* (NEXI), *Fragilaria pectinalis* (FPEC), *Gomphonema pala* (GOPA), *Navicula* cf. *seminulum* (NSEM), undetermined 1-3 (Sp1-3).

Relative abundance of the diatom taxa counted in the pooled samples of biofilm are presented in Figure 4.2. During the exposure time the dominant species was *Achnanthydium exiguum* (ADEG) (Grunow Czarnecki) in all conditions. This diatom tended to be less present in the control condition during the experiment compared to the Th-exposed biofilms, with an abundance of 70.5 ± 2.8 % over the 4 weeks of exposure. ADEG was more abundant in the C1 and C10 exposure conditions with relative abundances of 78.6 ± 3.6 and 78.3 ± 2.3 %, respectively. This diatom appears to be tolerant to the presence of Th and is known to be found in freshwater of bad quality [58]. Moreover the combination of copper exposure and high temperatures (18 and 23°C) was shown to promote ADEG's dominance over the other species of the diatom community [59]. The second most abundant diatom species was *Eolimna minima* (EOMI). This diatom represented 17 % of the diatom population at t0. At t2, the EOMI abundance followed a Th dose-response trend with 16.1, 13.1 and 8.7 % in control, C1 and C10 exposure conditions, respectively. These results demonstrate a sensitivity of EOMI to Th, even though this diatom is usually described as tolerant to metallic contamination [29]. After 2 weeks, *Stauroforma exiguiformis* (SEXG) (Lange-Bertalot, Flower Jones and Round) followed the inverse trend of EOMI and was more abundant in the C10 condition (5.5 %) as compared to the C1 (2.1 %) and control conditions (1.5 %). This trend was unexpected considering that the Biological Condition Gradient (BCG) considers SEXG to be a highly sensitive species to metallic concentration disturbances [60].

The relative abundances of micrometazoa observed in biofilm samples (Figure 4.2) showed that the flagellates were the most abundant taxa in all conditions with an average of 58.3 ± 8.1 % during the 4 weeks of exposure. However, they tended to be more represented at the beginning of the exposure and in the control condition where their abundance decreased gradually over time from 70.6 ± 5.8 % at t1 to 53.6 ± 4.4 % at t4. The inverse was observed for the ciliate *Aspidisca cicada* for which an increase of almost 30% was observed over the exposure time.

Rotifers (*Philodinidae*) and ciliates populations varied according to the exposure conditions over the course of the experiment. All other taxa counted, such as amoeba, nematodes or flagellates, did not vary significantly between the exposure conditions.

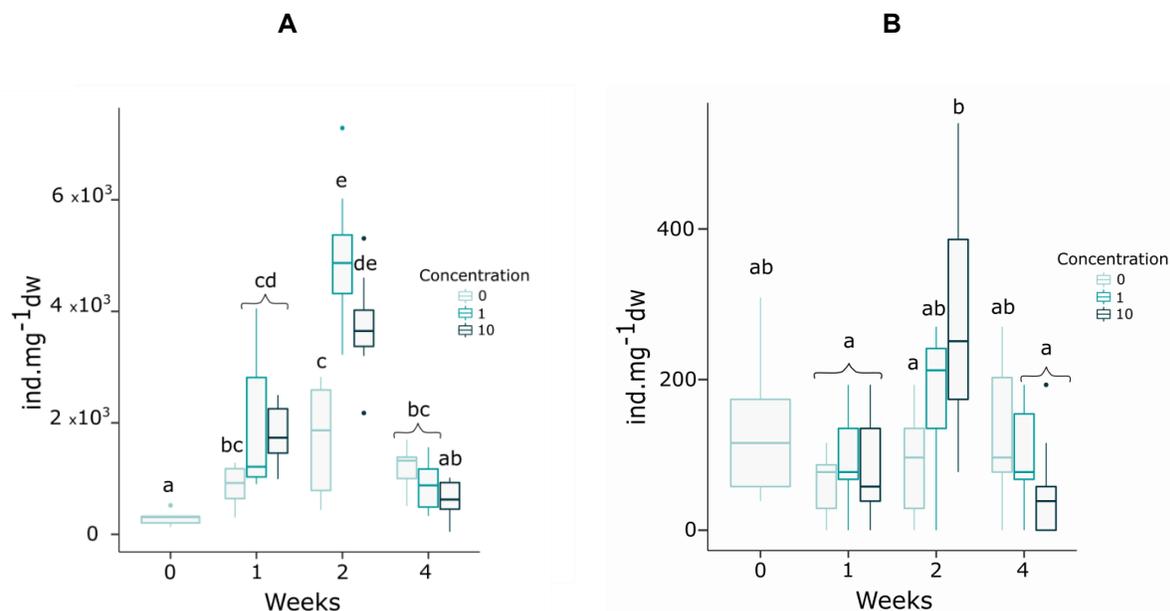


Figure 4.3. Number of individuals per mg of biofilm dry weight in control C0 (0.004 ± 0.002 nM) and Th exposures (C1 = 0.18 ± 0.09 nM and C10 = 8.7 ± 3.4 nM) as a function of time. **A.** Ciliates **B.** Rotifers (*Philodinidae*). A two-way ANOVA was performed to detect significant differences between treatments, as indicated by letters ($p < 0.05$; $n = 8$).

Figure 4.3.A shows the total count of ciliate individuals in the biofilm over the 4 weeks of exposure. A significant increase between t0 and t1 was observed in all conditions. Afterwards, the population of the controls did not vary. The values increased between t1 and t2 in the C1 and C10 exposures to reach 4987 ± 469 and 3730 ± 352 ind·mg⁻¹ dw, and decreased during the last 2 weeks of exposure to 878 ± 173 and 627 ± 132 ind·mg⁻¹ dw, respectively. *Aspidisca cicada* was the most abundant species observed and the number of individuals for this species had the same variation pattern throughout the exposure as the total number of ciliates for all conditions. This ciliate is commonly found as a dominant species in benthic biofilms and is characterized to be among the least sensitive to metal contamination [61–63]. *Aspidisca cicada* feeds itself mostly by grazing bacteria and algae [33,63,64]. Thus, the increase in the number of ciliates after 2 weeks in the Th-exposed conditions could be linked to the higher diatom densities in those conditions for the same exposure time.

Figure 4.3.B shows the rotifer individuals belonging to *Philodinidae* family counted in the biofilm over the 4 weeks of exposure. This family is found in a great diversity of ecosystems is

reported as a detritivore, microalgae and microorganism consumer [65,66]. The population in the control condition did not vary during the experiment, with an average of $104 \pm 12 \text{ ind}\cdot\text{mg}^{-1} \text{ dw}$, as well as the C1 condition which stayed around $124 \pm 12 \text{ ind}\cdot\text{mg}^{-1} \text{ dw}$. On the other hand, the number of individuals significantly increased after 2 weeks in the C10 exposure condition to reach $285 \pm 65 \text{ ind}\cdot\text{mg}^{-1} \text{ dw}$. Like *A. cicada*, those high numbers of *Philodinidae* rotifer seemed to be linked with high diatom densities in the Th-exposed conditions after 2 weeks. Then values in Th exposure conditions decreased during the last 2 weeks of exposure to an average of 97 ± 25 and $53 \pm 26 \text{ ind}\cdot\text{mg}^{-1} \text{ dw}$ in the C1 and C10 exposure conditions, respectively. Other rotifers are known to be sensitive to metals [67]. A 96 h-LC50 of $5.8 \mu\text{M}$ Cd was observed for *Philodina cf roseola* and deformations appeared above a threshold concentration of $2.7 \mu\text{M}$ after 24 h of exposure [68]. Moreover, our previous study on the impact of Zr on biofilm taxonomic structure showed that this metal can induce a dose-response effect on rotifers and the number of ciliate, *A. cicada*, individuals when they were exposed during 2 weeks to a low concentration ($2.9 \pm 0.3 \text{ nM}$ Zr) [34]. In contrary, Th did not have a negative effect on both rotifers' species observed and the ciliate, *A. cicada*. In fact, after 2 weeks of exposure, there were more individuals in Th-exposed media than in the control condition. Such effects on the micrometazoofauna observed during this experiment cannot be explained by direct effects of Th on those taxa. Bacterial and diatom communities represent the main food source for ciliates and rotifers. Thus, it is likely that the direct effects of Th on those two compartments, by reducing individual numbers or changing their taxonomic composition, is leading to an indirect effect on micrometazoofauna by increasing the numbers of ciliates and rotifers.

4.3.4 Effect of Th on the global taxonomic community structure

The Principal component analysis (PCA) presented in Figure 4.4 was performed to better understand possible interactions between the different communities observed during this work. The PCA shows a clear separation of the control conditions from the Th-exposure conditions for the first 2 weeks. The results indicate that control samples are quite dispersed along Dimension 2 of the PCA, which suggests that major structural changes in the biofilm community happened during the experiment. At the beginning and after 2 weeks of exposure, the samples seemed to have higher diatom diversities with a Shannon index of 1.42. After 1 week, the samples were characterized by a higher micrometazoofauna diversity with a Shannon index of 1.5 ± 0.2 .

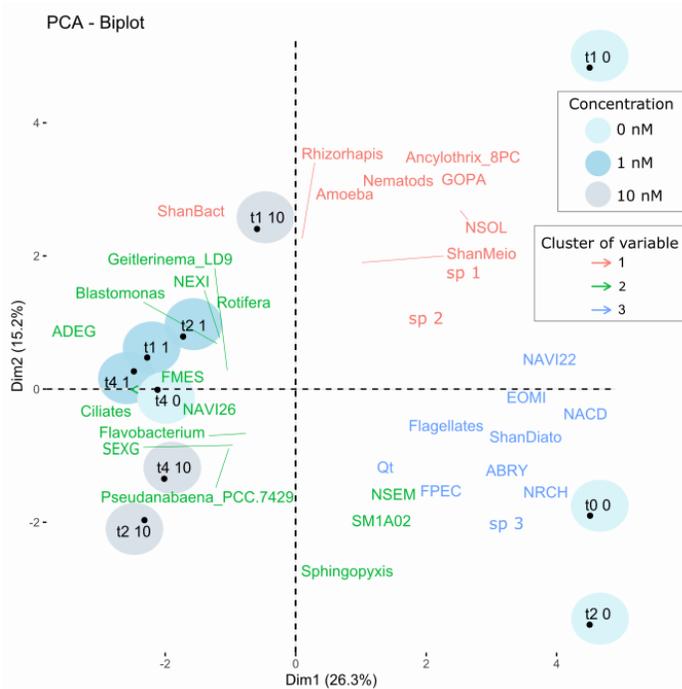


Figure 4.4. Principal component analysis (PCA) performed on taxonomic data (relative abundance and Shannon index of bacterial, diatom and micrometazoan communities) in biofilm in control C0 (0.004 ± 0.002 nM) and Th exposures (C1 = 0.18 ± 0.09 nM and C10 = 8.7 ± 3.4 nM) after 0, 1, 2 and 4 weeks of exposure (t0, t1, t2 and t4). Variables were classified in three groups using the K-means algorithm. Abbreviations: bacterial 16s gene copy number (Qt), Shannon indices of bacteria, diatoms and micrometazoans (ShanBact, ShanDiato and ShanMeio respectively). Abbreviations of diatoms species names are described in Figure 4.2.

Thorium-exposed conditions C1 and C10 appeared to be well discriminated from the control condition along Dimension 1. Community structures in the C1 exposure condition were close to each other over the entire exposure duration. This suggests that this Th concentration rapidly and consistently affected the taxonomic structure of biofilm. These conditions were characterized by ADEG and a high number of ciliate individuals which suggests that ADEG could be a preferential food source for the ciliates observed in this experiment. Higher temporal variability was found in the C10 exposure condition compared to that of C1. After 1 week of exposure, the biofilm samples were characterized by high bacterial diversity (Shannon index of 2.25 ± 0.54). Then, after 2 and 4 weeks of exposure, the bacterial community in the C10 exposure condition was characterized by *Pseudanabaena* and *Flavobacterium*, as well as the diatom SEXG. The biofilm samples were characterized by low bacterial and micrometazoan diversity after 4 weeks with Shannon indices

of 1.65 ± 0.83 and 1.0 ± 0.1 , respectively. In these samples, the micromeiofaunal and bacterial diversity appeared to be affected by the presence of the dominant diatom SEXG, *Pseudanabaena* and *Flavobacterium* bacterial genera in the C10 exposure condition. Because the relation between diatoms and heterotrophic bacteria are known to be generally species-specific, the increase of SEXG could favor the increase of one symbiotic bacteria species leading to a loss of bacterial diversity.

Microbial community compositions of the biofilm samples within the control condition after 4 weeks of exposure were grouped with those of the Th exposed biofilm samples on the PCA representation, separated from the other control samples along Dimension 1. In these samples, the biofilm is characterized by a low diatom diversity (Shannon index of 1.3 in the pooled samples). The less diverse taxonomic communities could be explained by the biofilm senescence after 4 weeks in the channel. The proximity of the control biofilm samples at 4 weeks of exposure with all the Th-exposed conditions and all exposure times on the PCA figure suggests that Th could have accelerated this senescence in the exposed biofilm.

The microorganism communities of biofilms are in constant interaction with each other. Benthic diatoms are reported to be the dominant primary producers in periphytic biofilms and to provide organic carbon to consumers and decomposer [69]. Induced changes in their community by factors like seasonal variation, grazing or contamination can lead to important indirect effects on biofilm productivity, extracellular polymeric substance composition, and thus on the heterotrophic compartments of the biofilm [70,71]. On the other hand, reciprocal diatom-bacterial interactions can be negative (parasitic, competition) or positive with species-specific symbiosis, leading to compositional shifts in diatom species abundances [72,73]. Moreover, forcing factors such as contaminants can also influence the grazing pressure on bacterial and diatom communities provided by meiofauna and micromeiofauna by changing their taxonomic structure [31,74]. Thus, as previously demonstrated for other metals, Th contamination could affect this complex ecosystem equilibrium by directly affecting a biofilm compartment's sensitive species and via indirect effects on additional or the aforementioned biofilm compartments [75].

4.4 Conclusion

To the best of our knowledge, this is the first time that a study investigates the effects of Th on different periphytic biofilm communities and especially on benthic micromeiofauna. Major processes of freshwater ecosystems and biogeochemical fluxes are depending on biofilm health [76]. In this study, significant changes were observed in bacteria and micromeiofauna taxonomic composition, with lower abundances of *Pseudanabaena* and *Sphingopyxis* genera, and higher ciliate and rotifer individual numbers, like *A. cicada* and *Philodinidae*, in the Th-exposed conditions compared to control. A PCA indicated a clear separation in the global taxonomic structure between the control and the Th exposure conditions over exposure time. Finally this work shows the importance of better understanding the indirect effects of metallic contamination on periphytic micromeiofauna to improve risk assessment of metals on aquatic ecosystems based on biofilm descriptors [77,78].

Acknowledgements

Financial support from the Fonds de recherche du Québec sur la nature et les technologies (FRQNT; grant number 2015-MI-190537) is acknowledged. Caroline Doose acknowledges the language assistance received from Scott Hepditch, as well as statistical help provided by Jean-Paul Maalouf. The technical support from the team of Valérie Langlois (INRS, Canada) was much appreciated with special thanks to Catherine Potvin and Sarah Wallace for their precious help at the laboratory. Isabelle Lavoie, Karine Lemarchand and Philippe Juneau are also acknowledged for their participation at the manuscript's revisions. Claude Fortin is supported by the Canada Research Chair program (grant number 950-231107).

BIBLIOGRAPHIE CHAPITRE 4

- [1] US EPA, Registry Agency for Toxic Substances and Disease, Toxicological profile for thorium, (1990), 253. ATSDR/TP-90/25
- [2] T.P. Mernagh, Y. Mieзитis, A Review of the geochemical processes controlling the distribution of thorium in the earth's crust and Australia's thorium resources, Geosci. Aust. Rec. 05 (2008) 48. http://www.ga.gov.au/image_cache/GA11421.pdf.
- [3] J. Loiseaux, S. David, D. Heuer, A. Nuttin, Thorium fuel, an interesting option for future nuclear energy, Phys. Appliquée/Applied Phys. 3 (2002) 1023–1034.
- [4] A.T. Ramli, A.W.M.A. Hussein, A.K. Wood, Environmental ^{238}U and ^{232}Th concentration measurements in an area of high level natural background radiation at Palong, Johor, Malaysia, J. Environ. Radioact. 80 (2005) 287–304. <https://doi.org/10.1016/j.jenvrad.2004.06.008>.
- [5] L.M. Correa, D. Kochhann, M. a. Pavanato, S.F. Llesuy, A.P. Konzen Riffel, V.L. Loro, M.F. Mesko, E.M.M. Flores, V.L. Dressler, B. Baldisserotto, Bioaccumulation and oxidative stress parameters in silver catfish (*Rhamdia quelen*) exposed to different thorium concentrations, Chemosphere. 77 (2009) 384–391. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2009.07.022>.
- [6] D.C. Lauria, J.M. Godoy, Abnormal high natural radium concentration in surface waters, J. Environ. Radioact. 61 (2002) 159–168. [https://doi.org/10.1016/S0265-931X\(01\)00123-0](https://doi.org/10.1016/S0265-931X(01)00123-0).
- [7] E.A. Casartelli, N. Miekeley, Determination of thorium and light rare-earth elements in soil water and its high molecular mass organic fractions by inductively coupled plasma mass spectrometry and on-line-coupled size-exclusion chromatography, Anal. Bioanal. Chem. 377 (2003) 58–64. <https://doi.org/10.1007/s00216-003-2069-9>.
- [8] J.M. Godoy, M.L. Godoy, Natural radioactivity in Brazilian groundwater, J. Environ. Radioact. 85 (2006) 71–83. <https://doi.org/10.1016/j.jenvrad.2005.05.009>.
- [9] L. Zhang, M. Chen, W. Yang, N. Xing, Y. Li, Y. Qiu, Y. Huang, Size-fractionated thorium isotopes (^{228}Th , ^{230}Th , ^{232}Th) in surface waters in the Jiulong River estuary, China, J. Environ. Radioact. 78 (2004) 199–216. <https://doi.org/10.1016/j.jenvrad.2004.05.004>.
- [10] A.M. Yusof, M.N. Mahat, N. Omar, A.K.H. Wood, Water quality studies in an aquatic environment of disused tin-mining pools and in drinking water, Ecol. Eng. 16 (2001) 405–

414. [https://doi.org/10.1016/S0925-8574\(00\)00124-5](https://doi.org/10.1016/S0925-8574(00)00124-5).
- [11] M.A.R. V Veado, I.A. Arantes, A.H. Oliveira, M.R.M.G. Almeida, R.A. Miguel, M.I. Severo, H.L. Cabaleiro, Metal pollution in the environment of Minas Gerais state - Brazil, *Environ. Monit. Assess.* 117 (2006) 157–172. <https://doi.org/10.1007/s10661-006-8716-9>.
- [12] K.A. Orlandini, W.R. Penrose, B.R. Harvey, M.B. Lovett, M.W. Findlay, Colloidal behavior of actinides in an oligotrophic lake, *Environ. Sci. Technol.* 24 (1990) 706–712. <https://doi.org/10.1021/es00075a015>.
- [13] G.R. Choppin, P.J. Wong, The chemistry of actinide behavior in marine systems, *Aquat. Geochem.* 4 (1998) 77–101. <https://doi.org/10.1023/A:1009679303073>.
- [14] F. Sanchez, M.J. Rodriguez-Alvarez, Effect of pH, temperature, conductivity and sediment size on thorium and radium activities along Jucar river (Spain), *J. Radioanal. Nucl. Chem.* 242 (1999) 671–681. <https://doi.org/10.1007/BF02347378>.
- [15] C. Degueldre, a. Kline, Study of thorium association and surface precipitation on colloids, *Earth Planet. Sci. Lett.* 264 (2007) 104–113. <https://doi.org/10.1016/j.epsl.2007.09.012>.
- [16] W. Hummel, U. Berner, E. Curti, F.J. Pearson, T. Thoenen, Nagra/PSI Chemical thermodynamic data base 01/01, Universal Publishers, Wettingen, Switzerland, (2002) 592.
- [17] M. Gascoyne, Geochemistry of the actinides and their daughters, in: M. Ivanovich, R. Harmon (Eds.), *Uranium-Series Disequilibrium Appl. to Earth, Mar. Environ. Sci.*, Clarendon Press, Oxford, UK, (1982): pp. 34–61.
- [18] Y. Ma, J. Wang, C. Peng, Y. Ding, X. He, P. Zhang, N. Li, T. Lan, D. Wang, Z. Zhang, F. Sun, H. Liao, Z. Zhang, Toxicity of cerium and thorium on *Daphnia magna*, *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 134 (2016) 226–232. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2016.09.006>.
- [19] J.C. de Queiroz, A.C.D.M. Ferreira, A.C.A. da Costa, The Growth of *Monoraphidium* sp. and *Scenedesmus* sp. cells in the presence of thorium, *Sci. World J.* 2012 (2012) 1–8. <https://doi.org/10.1100/2012/592721>.
- [20] T. Evseeva, S. Geras'kin, T. Majstrenko, J. Brown, E. Belykh, Comparative estimation of ^{232}Th and stable Ce (III) toxicity and detoxification pathways in freshwater alga *Chlorella*

vulgaris, Chemosphere. 81 (2010) 1320–1327.
<https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2010.08.028>.

- [21] C. Peng, Y. Ma, Y. Ding, X. He, P. Zhang, T. Lan, D. Wang, Influence of speciation of thorium on toxic effects to green algae *Chlorella pyrenoidosa*, *Int. J. Mol. Sci.* (2017) 795–805. <https://doi.org/10.3390/ijms18040795>.
- [22] L. Li, B. Zheng, L. Liu, Biomonitoring and bioindicators used for river ecosystems: Definitions, approaches and trends, *Procedia Environ. Sci.* 2 (2010) 1510–1524. <https://doi.org/10.1016/j.proenv.2010.10.164>.
- [23] M. Coste, S. Boutry, J. Tison-Rosebery, F. Delmas, Improvements of the biological diatom Index (BDI): description and efficiency of the new version (BDI-2006), *Ecol. Indic.* 9 (2009) 621–650. <https://doi.org/10.1016/j.ecolind.2008.06.003>.
- [24] A.M. Romaní, H. Guasch, M.D. Balaguer, Aquatic biofilms: ecology, water quality and wastewater treatment, Caister Academic Press, (2016) 229. <https://doi.org/10.21775/9781910190173>.
- [25] I. Lavoie, M. Lavoie, C. Fortin, A mine of information: benthic algal communities as biomonitors of metal contamination from abandoned tailings, *Sci. Total Environ.* 425 (2012) 231–241. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2012.02.057>.
- [26] R. Behra, R. Landwehrjohann, K. Vogel, B. Wagner, L. Sigg, Copper and zinc content of periphyton from two rivers as a function of dissolved metal concentration, *Aquat. Sci.* 64 (2002) 300–306. <https://doi.org/10.1007/s00027-002-8074-9>.
- [27] K.L. Holding, R.A. Gill, J. Carter, The relationship between epilithic periphyton (biofilm) bound metals and metals bound to sediments in freshwater systems, *Environ. Geochem. Health.* 25 (2003) 87–93. <https://doi.org/10.1023/A:1021205101133>.
- [28] J. Prygiel, M. Coste, J. Bukowska, Review of the major diatom-based techniques for the quality assessment of rivers-State of the art in Europe, in: J. Prygiel, B.A. Whitton, J. Buckowska (Eds.), *Use of algae for monitoring rivers*, Agence de l'Eau Artois-Picardie, (1999): pp. 224–238.
- [29] Morin S., A. Cordonier, I. Lavoie, A. Arini, S. Blanco, T.T. Duong, E. Tornés, B. Bonet, N.

- Corcoll, L. Faggiano, M. Laviale, F. Pérès, E. Becares, M. Coste, A. Feurtet-Mazel, C. Fortin, H. Guasch, S. Sabater, Consistency in diatom response to metal-contaminated environments, in: H. Guasch, A. Ginebreda, A. Geislinger (Eds.), *Handbook of environmental chemistry, Emerging and priority pollutants in rivers*, 19 (2012): pp. 117–146. https://doi.org/10.1007/978-3-642-25722-3_5.
- [30] I. Lavoie, S. Morin, V. Laderriere, L.-E. Paris, C. Fortin, Assessment of diatom assemblages in close proximity to mining activities in Nunavik, Northern Quebec (Canada), *Environments*. 6 (2019) 74. <https://doi.org/10.3390/environments6060074>.
- [31] J. Neury-Ormanni, J. Vedrenne, S. Morin, Who eats who in biofilms? Exploring the drivers of microalgal and micromeiofaunal abundance, *Bot. Lett.* 163 (2016) 83–92. <https://doi.org/10.1080/23818107.2016.1151827>.
- [32] J.R. Pratt, J. Cairns, Functional groups in the Protozoa : roles in differing ecosystems, *J. Protozool.* 32 (1985) 356–360. <https://doi.org/10.1111/j.1550-7408.1985.tb04037.x>.
- [33] P. Madoni, S. Zangrossi, Ciliated Protozoa and saprobical evaluation of water quality in the Taro River (northern Italy), *Ital. J. Zool.* 72 (2009) 20–25. <https://doi.org/10.1080/11250000509356648>.
- [34] C. Doose, S. Morin, J. Vedrenne, C. Fortin, Impact of zirconium on freshwater periphytic microorganisms, *Environments*. 6 (2019) 1–13. <https://doi.org/10.3390/environments6100111>.
- [35] A. Dauta, Conditions de développement du phytoplancton. Etude comparative du comportement de huit espèces en culture, *Annales de Limnologie* 18 (1982) 217–262. <https://doi.org/10.1051/limn/1982005>.
- [36] AFNOR, Qualité de l'eau - Dosage des matières en suspension - Méthode par filtration sur filtre en fibres de verre, (2005) 16 (NF EN 872).
- [37] S. Morin, L. Proia, M. Ricart, C. Bonnineau, A. Geislinger, F. Ricciardi, H. Guasch, A.M. Romani, S. Sabater, Effects of a bactericide on the structure and survival of benthic diatom communities, *Vie Milieu*. 60 (2010) 109–116.
- [38] I. Lavoie, P.B. Hamilton, S. Campeau, M. Grenier, P.J. Dillon, Guide d'identification des

- diatomées des rivières de l'Est du Canada, (2008), p.252.
- [39] A. Foissner, H. Berger, A user friendly guide to the ciliates, *Freshw. Biol.* 35 (1996) 375–482.
- [40] P. De Puytorac, J. Grain, J.-P. Mignot, *Précis de protistologie*, Editions Boubée: Paris, France, (1987), 581.
- [41] C.D. Jersabek, M.F. Leitner, The rotifer world catalog. World Wide Web electronic publication, (2013). <http://www.rotifera.hausdernatur.at/>.
- [42] N. Corcoll, T. Österlund, L. Sinclair, A. Eiler, E. Kristiansson, T. Backhaus, K. Martin Eriksson, Comparison of four DNA extraction methods for comprehensive assessment of 16S rRNA bacterial diversity in marine biofilms using high-throughput sequencing, *FEMS Microbiol. Lett.* 364 (2017) 1–9. <https://doi.org/10.1093/femsle/fnx139>.
- [43] J.C. López-Gutiérrez, S. Henry, S. Hallet, F. Martin-Laurent, G. Catroux, L. Philippot, Quantification of a novel group of nitrate-reducing bacteria in the environment by real-time PCR, *J. Microbiol. Methods.* 57 (2004) 399–407. <https://doi.org/10.1016/j.mimet.2004.02.009>.
- [44] S.E. Fienberg, R.R. Sokal, F.J. Rohlf, F.J. Rohlf, R.R. Sokal, *Biometry. The principles and practice of statistics in biological research statistical tables*, *Biometrics.* 26 (2012) 351. <https://doi.org/10.2307/2529087>.
- [45] B.J. Callahan, P.J. McMurdie, M.J. Rosen, A.W. Han, A.J.A. Johnson, S.P. Holmes, DADA2: High-resolution sample inference from Illumina amplicon data, *Nat. Methods.* 13 (2016) 581–583. <https://doi.org/10.1038/nmeth.3869>.
- [46] F. Husson, S. Le, J. Pagès, *Exploratory Multivariate Analysis by Example Using R*, Chapman & CRC press, (2017) 248.
- [47] D.P. Wickleder MS, Fourest B, Thorium, in: F.J. Morss LR, Edelstein NM (Ed.), *The Chemistry of the Actinide and Transactinide Elements*, 3 ed, Springer, (2011): pp. 52–160.
- [48] M. Santamaría, A.R. Díaz-Marrero, J. Hernández, A.M. Gutiérrez-Navarro, J. Corzo, Effect of thorium on the growth and capsule morphology of *Bradyrhizobium*, *Environ. Microbiol.* 5 (2003) 916–924. <https://doi.org/10.1046/j.1462-2920.2003.00487.x>.

- [49] S.K. Kazy, S.F. D'Souza, P. Sar, Uranium and thorium sequestration by a *Pseudomonas* sp.: Mechanism and chemical characterization, *J. Hazard. Mater.* 163 (2009) 65–72. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2008.06.076>.
- [50] L.T.T. Nguyen, G. Cronberg, H. Annadotter, J. Larsen, Planktic cyanobacteria from freshwater localities in Thua Thien-Hue province, Vietnam. II. Algal biomass and microcystin production, *Nov. Hedwigia.* 85 (2007) 35–49. <https://doi.org/10.1127/0029-5035/2007/0085-0035>.
- [51] C. Xiao, H. Yan, J. Wang, W. Wei, J. Ning, G. Pan, Microcystin-LR biodegradation by *Sphingopyxis* sp. USTB-05, *Front. Environ. Sci. Eng. China.* 5 (2011) 526–532. <https://doi.org/10.1007/s11783-010-0261-7>.
- [52] L. Ho, D. Hoefel, S. Palazot, E. Sawade, G. Newcombe, C.P. Saint, J.D. Brookes, Investigations into the biodegradation of microcystin-LR in wastewaters, *J. Hazard. Mater.* 180 (2010) 628–633. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2010.04.081>.
- [53] L. Ho, E. Sawade, G. Newcombe, Biological treatment options for cyanobacteria metabolite removal - A review, *Water Res.* 46 (2012) 1536–1548. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2011.11.018>.
- [54] H. Qian, X. Pan, J. Chen, D. Zhou, Z. Chen, L. Zhang, Z. Fu, Analyses of gene expression and physiological changes in *Microcystis aeruginosa* reveal the phytotoxicities of three environmental pollutants, *Ecotoxicology.* 21 (2012) 847–859. <https://doi.org/10.1007/s10646-011-0845-4>.
- [55] H. Qian, S. Yu, Z. Sun, X. Xie, W. Liu, Z. Fu, Effects of copper sulfate, hydrogen peroxide and N-phenyl-2-naphthylamine on oxidative stress and the expression of genes involved photosynthesis and microcystin disposition in *Microcystis aeruginosa*, *Aquat. Toxicol.* 99 (2010) 405–412. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2010.05.018>.
- [56] S. Shokrollahzadeh, F. Golmohammad, H. Shokouhi, Study of *Sphingopyxis* isolates in degradation of polycyclic aromatic hydrocarbons, *Chem. Eng. Trans.* 27 (2012) 55–60. <https://doi.org/10.3303/CET1227010>.
- [57] D.C. Prabhakaran, V. Bolaños-Benitez, Y. Sivry, A. Gelabert, J. Riotte, S. Subramanian, Mechanistic studies on the bioremediation of Cr(VI) using *Sphingopyxis macrogoltabida*

- SUK2c, a Cr(VI) tolerant bacterial isolate, *Biochem. Eng. J.* 150 (2019) 107292. <https://doi.org/10.1016/j.bej.2019.107292>.
- [58] W.O. Wan Maznah, M. Mansor, Aquatic pollution assessment based on attached diatom communities in the Pinang River Basin, Malaysia, *Hydrobiologia*. 487 (2002) 229–241. <https://doi.org/10.1023/A:1022942200740>.
- [59] S. Morin, A.S. Lambert, E.P. Rodriguez, A. Dabrin, M. Coquery, S. Pesce, Changes in copper toxicity towards diatom communities with experimental warming, *J. Hazard. Mater.* 334 (2017) 223–232. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2017.04.016>.
- [60] S.P. Davies, S.K. Jackson, The biological condition gradient: A descriptive model for interpreting change in aquatic ecosystems, *Ecol. Appl.* 16 (2006) 1251–1266. [https://doi.org/10.1890/1051-0761\(2006\)016\[1251:TBCGAD\]2.0.CO;2](https://doi.org/10.1890/1051-0761(2006)016[1251:TBCGAD]2.0.CO;2).
- [61] P. Madoni, D. Davoli, G. Gorbi, Acute toxicity of lead, chromium, and other heavy metals to ciliates from activated sludge plants, *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 53 (1994) 420–425. <https://doi.org/10.1007/BF00197235>.
- [62] P. Madoni, G. Esteban, G. Gorbi, D.I. Agua, L. Poveda, A. Rey, Acute toxicity of cadmium, copper, mercury and zinc to ciliates from activated sludge plants, *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 49 (1992) 900–905.
- [63] B. Gücker, H. Fischer, Flagellate and ciliate distribution in sediments of a lowland river: Relationships with environmental gradients and bacteria, *Aquat. Microb. Ecol.* 31 (2003) 67–76. <https://doi.org/10.3354/ame031067>.
- [64] C.R. Curds, The ecology and role of Protozoa in aerobic sewage treatment processes, *Annu. Rev. Microbiol.* 46 (1982) 27–44. <https://doi.org/10.1146/annurev.mi.36.100182.000331>.
- [65] C. Ricci, B. Maria, The biology and ecology of lotic rotifers and gastrotrichs, *Freshw. Biol.* (2000) 15–28.
- [66] H. Segers, Annotated checklist of the rotifers (Phylum Rotifera), with notes on nomenclature, taxonomy and distribution, *Zootaxa* (2007) 104. <https://doi.org/10.11646/zootaxa.1564.1.1>.

- [67] J. Alvarado-Flores, R. Rico-Martínez, Bioconcentration of lead and X-ray microanalysis with SEM in the freshwater rotifer *Lecane quadridentata* (Rotifera: Monogononta), Polish J. Environ. Stud. 26 (2017) 2869–2872. <https://doi.org/10.15244/pjoes/67331>.
- [68] D. Pérez-Yañez, D.R. Soriano-Martínez, M.E. Damian-Ku, E. Cejudo-Espinosa, J. Alvarado-Flores, Cadmium and morphological alterations in the rotifer *Philodina cf. Roseola* (Bdelloidea: Philodinidae) and the worm *Aeolosoma hemprichi* (Annelida: Aeolosomatidae), Rev. Biol. Trop. 67 (2019) 1406–1417. <https://doi.org/10.15517/rbt.v67i6.35981>.
- [69] C. Koedooder, W. Stock, A. Willems, S. Mangelinckx, M. De Troch, W. Vyverman, K. Sabbe, Diatom-bacteria interactions modulate the composition and productivity of benthic diatom biofilms, Front. Microbiol. 10 (2019) 1–11. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.01255>.
- [70] T. Wichard, A. Gerecht, M. Boersma, S.A. Poulet, K. Wiltshire, G. Pohnert, Lipid and fatty acid composition of diatoms revisited: Rapid wound-activated change of food quality parameters influences herbivorous copepod reproductive success, ChemBioChem. 8 (2007) 1146–1153. <https://doi.org/10.1002/cbic.200700053>.
- [71] C. Passarelli, T. Meziane, N. Thiney, D. Boeuf, B. Jesus, M. Ruivo, C. Jeanthon, C. Hubas, Seasonal variations of the composition of microbial biofilms in sandy tidal flats: focus of fatty acids, pigments and exopolymers, Estuar. Coast. Shelf Sci. 153 (2015) 29–37. <https://doi.org/10.1016/j.ecss.2014.11.013>.
- [72] A. Zak, A. Kosakowska, The influence of extracellular compounds produced by selected baltic cyanobacteria, diatoms and dinoflagellates on growth of green algae *Chlorella vulgaris*, Estuar. Coast. Shelf Sci. 167 (2015) 113–118. <https://doi.org/10.1016/j.ecss.2015.07.038>.
- [73] S.A. Amin, M.S. Parker, E. V. Armbrust, Interactions between diatoms and bacteria, Microbiol. Mol. Biol. Rev. 76 (2012) 667–684. <https://doi.org/10.1128/mubr.00007-12>.
- [74] H. Guasch, M. Ricart, J. López-Doval, C. Bonninaeu, L. Proia, S. Morin, I. Muñoz, A.M. Romani, S. Sabater, Influence of grazing on triclosan toxicity to stream periphyton, Freshw. Biol. 61 (2016) 2002–2012. <https://doi.org/10.1111/fwb.12797>.

- [75] J.W. Fleeger, K.R. Carman, R.M. Nisbet, Indirect effects of contaminants in aquatic ecosystems, *Sci. Total Environ.* 317 (2003) 207–233. [https://doi.org/10.1016/S0048-9697\(03\)00141-4](https://doi.org/10.1016/S0048-9697(03)00141-4).
- [76] T.J. Battin, K. Besemer, M.M. Bengtsson, A.M. Romani, A.I. Packmann, The ecology and biogeochemistry of stream biofilms, *Nat. Rev. Microbiol.* 14 (2016) 251–263. <https://doi.org/10.1038/nrmicro.2016.15>.
- [77] S. Singh, A. James, R. Bharose, Biological assessment of water pollution using periphyton productivity: a review, *Nat. Environ. Pollut. Technol.* 16 (2017) 559–567. <https://doi.org/10.1002/iroh.201111456>.
- [78] C. Barranguet, E. Charantoni, M. Plans, W. Admiraal, Short-term response of monospecific and natural algal biofilms to copper exposure, *Eur. J. Phycol.* 35 (2000) 397–406. <https://doi.org/10.1080/09670260010001736001>.

5 THORIUM EXPOSURE DRIVES FATTY ACID AND METAL TRANSFER FROM BIOFILMS TO THE GRAZER *LYMNAEA* SP.

L'exposition au thorium affecte son transfert et celui des acides gras du biofilm vers les brouteurs *Lymnaea* sp.

Auteurs :

Doose Caroline ¹, Fadhlaoui Mariem ¹, Morin Soizic ², Fortin Claude ¹

¹Institut national de la recherche scientifique, 490 rue de la Couronne G1K 9A9, Quebec City, QC, Canada; claud.fortin@ete.inrs.ca; caroline.doose@ete.inrs.ca; Affiliations professionnelles

Titre de la revue ou de l'ouvrage :

Environmental Toxicology and Chemistry

Soumis le 17 août 2020 et accepté provisoirement (modifications mineures) le 6 octobre 2020.

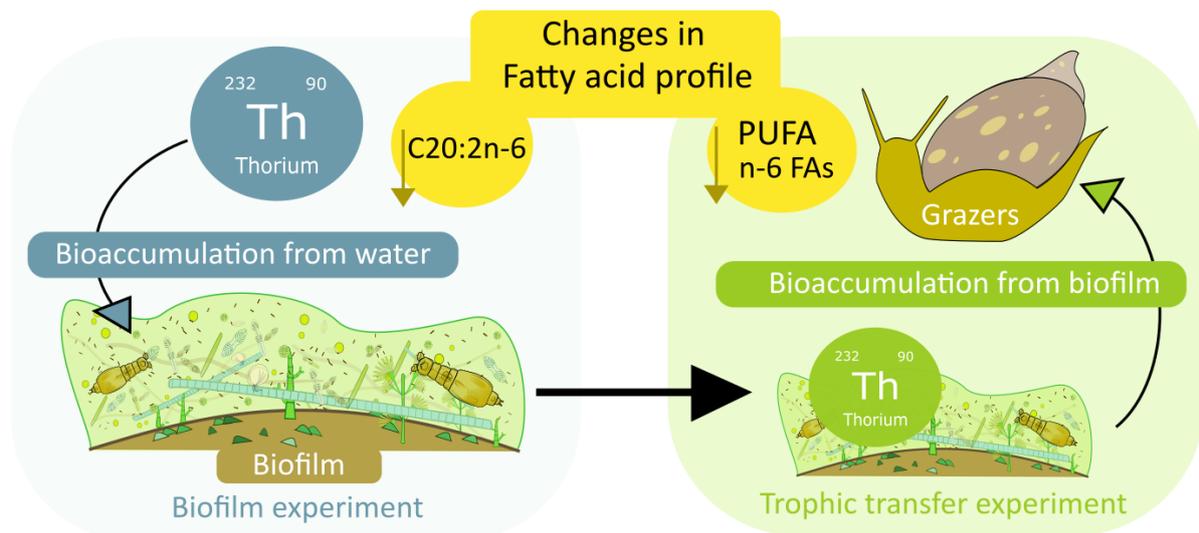
Contribution des auteurs :

Caroline Doose est l'auteure principale de ce document. Elle avait la charge de la conduite des expériences, de l'interprétation des données et de la rédaction du premier essai cet article. Mariem Fadhlaoui est une stagiaire postdoctorale ayant réalisé l'acquisition des données sur les acides gras et les calculs concernant les index d'activités enzymatique. Claude Fortin est le superviseur et Soizic Morin la co-superviseuse des travaux de doctorat. Tous les co-auteurs ont contribué à la conception expérimentale, à l'interprétation des données et à l'examen du document.

Abstract

Aquatic ecotoxicological risks associated with tetravalent metallic elements such as thorium (Th) are still poorly understood. Periphytic biofilm represents an important food source in aquatic environments, thus such risks could severely affect nutrient and energy cycling in freshwater ecosystem. In the present study, we investigated the potential for Th to change fatty acid compositions of biofilm communities within experimental channels. Th bioaccumulation and fatty acids (FAs) were measured after 4 weeks to two exposure conditions: a control (0.004 ± 0.002 nM; C0) and 8.7 ± 3.4 nM Th (C10). Biofilm Th accumulation was significantly higher in the C10 condition (of $8.1 \pm 2.6 \times 10^3$ ng mg^{-1} dw) than in the control conditions. Some major FAs such as C16:1n-7 and the docosahexaenoic acid C22:6n-3 varied significantly after 4 weeks of exposure to Th. To determine if the Th can be trophically transferred and to investigate the impacts of nutritional quality changes on primary consumers, common pond snails (*Lymnaea* sp.) were fed for 4 weeks with control and Th-exposed biofilm. Thorium was trophically transferable to the grazers with 2.4 ± 0.2 ng mg^{-1} ww measured in the soft bodies of snails fed with Th-laden biofilm. The composition of major FAs observed in the grazers was also significantly affected, notably by a decrease of total polyunsaturated FAs in snails fed with Th-exposed biofilm. These results indicate that very low Th concentrations can decrease the nutritional quality of organisms at the base of the food chain.

Graphical abstract



5.1 Introduction

Aquatic benthic biofilms (periphyton) are composed of different microorganisms belonging to bacteria, fungi, algae and micrometazoa taxa, and are embedded in a matrix of extracellular polymeric substances (EPS) and host a diverse ecosystem that provides different ecological services. These biofilms are often very productive and can recycle nutrients, stabilize sediments, and thus play an important role in benthic organism recruitment [1]. Their perturbation, notably in the context of metallic pollution, can lead to important changes in aquatic environments [2].

Metal effects on biofilm microorganisms could impact aquatic food webs by affecting fatty acid (FA) synthesis [3,4]. Benthic diatoms, unicellular algae within biofilms, are known to be particularly rich in polyunsaturated fatty acids (PUFAs) which provide a high-quality food source to periphyton grazers, such as cladoceran or insects [5,6]. PUFAs can be divided into three groups depending on the first unsaturation location: n-3, n-6 and n-9. They are major constituents of cellular membranes, important energy sources and are required in various biochemical pathways. They play a crucial role at the biological level and are the most transferred molecules across food webs [7]. PUFAs are exclusively synthesized by primary producers. Animals are capable of modifying PUFAs to another form through elongation and desaturation reactions, but cannot synthesize PUFAs *de novo* and need to obtain them from their diet [8]. Therefore, periphyton represents an important source of these FAs for animals in aquatic ecosystems [9,10].

Metallic contaminants such as chromium can generate oxidative stress, and the PUFAs composing the cell membrane are more prone to lipid peroxidation [11]. Copper exposure was shown to affect lipid composition of the diatoms *Tabellaria flocculosa* and *Thalassiosira weissflogii* by decreasing the amount of unsaturated FAs (UFAs) [12–15] and by altering glycerophospholipid biosynthesis pathways of the green alga *Chlorella* sp. [16]. Other FAs produced by biofilm microorganisms such as saturated and monounsaturated fatty acids (SFA and MUFA) represent an important energy source for their consumers [8,17]. Consequently, a perturbation within periphytic communities can lead to changes in their nutritional quality and can perturb energy transfers in freshwater ecosystems [18].

In addition, it is well established that the benthic microorganisms can internalize metallic elements such as selenium [19,20], cadmium [21], zinc [22], copper [23] and nickel [3], and can retain them up to several days after exposure events [24,25]. As diet can be a predominant

source of metal exposure [26], especially for aquatic insects, the capacity for periphytic biofilm to bioaccumulate metals can affect its consumers [19,21,27–29]. Hence, the consumption of metal contaminated biofilm may impact grazers by reducing their food quality and by metal contamination at the same time [30]. A decrease in food quality can also stimulate the grazers to increase their consumption of contaminated food to compensate for the loss of nutritive values, further increasing contaminant ingestion [31].

Thorium (Th) is a tetravalent metallic element often found in uranium mining waste. Aeronautic, metallurgy and petrochemistry industries use it for its capacity to resist high temperatures [32]. Because of its affinity for phosphate, it is also found in phosphate fertilizers [33]. Moreover, Th is 3 times more abundant than uranium and will potentially be used as a future nuclear power plant combustible [34]. While these activities lead to Th release within the environment, aquatic ecotoxicological risks associated with thorium are still poorly understood. Thorium concentrations between 0.003 and 700 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ (0.01 nM and 3.0 μM) have been observed in natural freshwater and up to 1400 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ (6.0 μM) in the drainage water of uranium and iron mines in the south of Brazil [35–42]. In this work, Th accumulation and fatty acid composition in periphytic biofilms were determined after 4 weeks of exposure at 10 nM to explore whether this metal can affect the nutritional quality of the biofilm. The grazer, *Lymnaea* sp. was then exposed to this biofilm to investigate the double impact of Th exposure upon food and nutritional characteristic changes. These results will contribute to a better comprehension of the potential for Th trophic transfer from biofilm to grazers and its subsequent impacts by altering the nutritional quality of trophic chains within freshwater ecosystems.

5.2 Materials and methods

5.2.1 Experimental setup

Biofilm experiment

The biofilm used for this study was the same as described in Doose et al. (submitted, chapitre 4). Four experimental conditions were tested as described in Figure 5.1 : biofilm controls, biofilms exposed to Th, snails (*Lymnaea* sp.) fed with biofilm controls, and snails fed with biofilm exposed to Th. Firstly, the biofilm was exposed to Th in channels for 4 weeks. The slides of biofilm were randomly distributed to 8 channels (4 channels per condition) containing a synthetic culture medium (Dauta) [43] with targeted Th concentrations of 0 (C0) and 10 nM (C10). One week before Th exposure, independent experimental channels (dimensions: 100

x 20 x 10 cm, 6 L) were filled with the different exposure media (C0 and C10) to pre-equilibrate the metal of the treatment (C10) with the adsorption sites of walls, tubes and reservoirs. Following 4 weeks of exposure, eight slides per channel (32 per condition) were randomly sampled, pooled, and homogenized in 200 mL final volume of Dauta medium to make one composite sample per condition. Biofilm dry weight was quantified after filtration of a 20 mL aliquot (on pre-weighed and dried GF/F filters) and lyophilisation according to the NF EN 872 standard method [44]. Aliquots of 1.5 mL were sampled from the 200 mL of homogenized biofilm suspension and kept frozen at -80°C to be later given as a food source to grazers and to conduct fatty acid analyses.

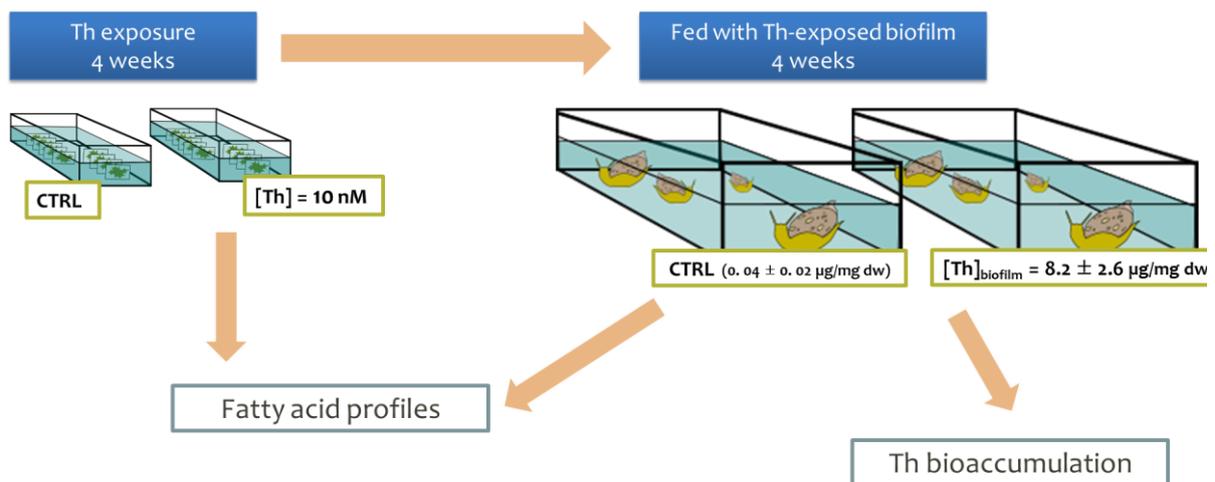


Figure 5.1. Overview of the experimental setup of biofilm Th exposure described in Doose et al (submitted, chapitre 4), and the subsequent trophic transfer experiment.

Trophic transfer experiment

Furthermore, in order to determine if the Th accumulated in biofilm can be trophically transferred to grazers, a trophic experiment was designed with the snail *Lymnaea* sp. and contaminated biofilm. A total of 48 snails were dispatched in three control and three exposed-food aquaria in order to obtain eight snails per aquarium. Snails in control aquaria were fed with C0 biofilm and snails in the exposed-food aquaria were fed with the C10 biofilm for 4 weeks. Each aquarium contained 8 snails which were acclimated for 1 week in an aquarium filled with dechlorinated tap water and fed with the biofilm for 4 weeks. One aliquot of 1.5 mL of control or Th-exposed biofilm per aquarium was given per day as a food source to the grazers. Aquaria were filled with dechlorinated tap water and half of the media volume was renewed daily. At the end of the 4 weeks of food-exposure, the live snails were sampled and

placed in a Petri dish on ice, then soft bodies were separated from the shell and weighted before being frozen in liquid nitrogen and stored at -80°C before further analysis. To realize the FA analysis and Th measurements, 6 snails for each analysis were randomly taken in the total of 24 snails per condition.

5.2.2 Fatty acid analysis

To obtain technical replicates, six aliquots of the pooled control and exposed biofilm samples were sampled. Total lipids were extracted from the whole biofilm in those aliquots according to Folch et al. (1957) [45]. The detailed procedure for lipid extraction was described in Fadhlaoui et al. (2020) [3]. Total lipids were extracted in a chloroform/methanol mix (1V/2V). The obtained fraction was then esterified in boron trifluoride (BF_3 , 4 % methanol) to obtain fatty acid methyl esters (FAME). The resultant FAMEs were analyzed by gas chromatography-flame ionization detector (GC-FID) and the relative FAME content was determined by comparing chromatograms to reference standards (mixtures of 37 fatty acids, NHI-F, a fatty acid methyl ester mix, PUFA NO. 2, an animal source and fatty acid methyl esters kit; Sigma-Aldrich, Canada).

5.2.3 Thorium quantification

In order to determine the amount of Th in the biofilm and the snails, samples were lyophilized and digested according to Fadhlaoui et al. (2020) [3]. Then Th was quantified with an inductively coupled plasma-atomic emission spectrometry (ICP-MS). The calibration curve was validated with certified control solution 406 (SCP Science, Baie-d'Urfé, Canada).

5.2.4 Data treatment and analysis

To determine the significant differences, one and two-way ANOVA statistical tests were performed with the R software (vegan package). The PCA was also constructed on biofilm and snails FA analysis data with R (FactoMineR package). The PCA's function in this package automatically normalizes the data during the calculation. Ellipses were built around centroids to represent 95 % of data from biofilm and grazer's conditions.

In order to estimate fatty acid desaturase and elongase activities in the biofilms, the product/precursor ratios were used as described in Fadhlaoui et al. (2016) [46]. The ratios $16:1n-7/16:0$ and $18:1n-9/18:0$ was used to estimate the $\Delta 9$ -desaturase (D9D; stearoyl-CoA-desaturase), the ratio $18:2n-6/18:1n-9$ for the $\Delta 12$ -desaturase (D12D), and $18:3n-3/18:2n-6$ for

the $\Delta 15$ -desaturase (D15D). The ratio 18:0/16:0 was used to calculate the elongase activity (ELOVL, long chain fatty acids elongation).

5.3 Results and discussion

5.3.1 Fatty acid profiles of control biofilms and grazers

The biofilm FA profile can give qualitative information about bacteria, green algae, and diatom composition. These biofilm FA profiles were obtained for the control (sampled after 4 weeks of exposure, Table 5.1). The main SFA were palmitic acid C16:0 and stearic acid C18:0 representing respectively 25.17 ± 0.82 and 14.12 ± 3.30 % of the FAs measured in the control condition biofilm. The MUFAs were dominated by palmitoleic acid C16:1n-7 and oleic acid C18:1n-9 with 16.90 ± 2.91 and 10.51 ± 2.17 %, PUFAs by C18:3n-3, arachidonic acid C20:4n-6 and eicosapentaenoic acid C20:5n-3 with 3.85 ± 0.58 , 3.67 ± 0.70 and 5.36 ± 0.19 % in the control condition biofilm respectively. The dominance of C16:0, C16:1n-7, C18:3n-3 in the control biofilm FA profile suggested a dominance of green algae and cyanobacteria [47]. These results are in line with the taxonomic observations made in the same biofilm samples (Doose et al., submitted), especially concerning the presence of the cyanobacteria genus *Pseudanabaena*. The n-3, n-6 and n-9 were present in the same proportion representing around 10 to 11 % of the total FAs in the control biofilm.

1
2
3
4

Table 5.1. Fatty acid composition of control biofilm, Th exposed biofilm and grazers (*Lymnaea* sp., control group and group feeding on contaminated biofilm). Values are shown as % mean \pm SEM for each biofilm or grazer's conditions (n = 6, for control biofilm and grazer, n = 5 for exposed biofilm). The significant differences between biofilm or grazer's conditions correspond to * p < 0.05; ** p < 0.01 and * p < 0.001 (one-way ANOVA, n = 6). U/S = unsaturated to saturated fatty acid ratio, Σ n-3 = n-3 unsaturated fatty acid sum, Σ n-6 = n-6 unsaturated fatty acid sum and Σ n-9 = n-9 unsaturated fatty acid sum.**

	Control biofilm	Contaminated biofilm	Control grazers	Grazers feeding contaminated biofilm
C14:0	3.86 \pm 0.32	3.39 \pm 0.46	1.45 \pm 0.25	2.70 \pm 0.47
C15:0	1.20 \pm 0.19	0.51 \pm 0.06 *	0.48 \pm 0.05	0.84 \pm 0.20
C16:0	25.17 \pm 0.82	27.14 \pm 1.74	10.53 \pm 0.37	12.30 \pm 1.73
C17:0	1.09 \pm 0.08	0.73 \pm 0.11 *	1.32 \pm 0.12	1.50 \pm 0.20
C18:0	14.12 \pm 3.30	12.83 \pm 1.26	14.41 \pm 0.73	15.33 \pm 1.78
C20:0	0.66 \pm 0.24	0.21 \pm 0.13	1.27 \pm 0.54	0.68 \pm 0.21
C:21	0.00 \pm 0.00	0.46 \pm 0.35	0.71 \pm 0.19	2.68 \pm 1.23
C22:0	0.07 \pm 0.05	0.33 \pm 0.24	0.04 \pm 0.04	0.06 \pm 0.04
C24:0	1.53 \pm 0.65	0.50 \pm 0.21	0.17 \pm 0.12	0.65 \pm 0.09

C14:1n-5	0.32 ± 0.17	0.47 ± 0.16	0.20 ± 0.13	0.09 ± 0.06
C15:1	0.42 ± 0.19	0.40 ± 0.25	0.00 ± 0.00	0.04 ± 0.04
C16:1n-7	16.90 ± 2.91	15.13 ± 0.72 *	1.58 ± 0.31	1.82 ± 0.36
C17:1	1.73 ± 0.22	1.56 ± 0.36	0.44 ± 0.10	0.57 ± 0.11
C18:1n-9	10.51 ± 2.17	10.39 ± 1.18	9.77 ± 0.38	10.91 ± 0.77
C20:1n-9	0.42 ± 0.23	0.25 ± 0.13	4.99 ± 0.60	2.97 ± 0.68 *
C22:1n-9	0.00 ± 0.00	0.06 ± 0.06 *	0.08 ± 0.08	0.15 ± 0.10 **
C24:1n-9	-	0.21 ± 0.12	0.15 ± 0.15	3.22 ± 1.58
<hr/>				
C16:2n-4	-	1.27 ± 0.79	-	0.33 ± 0.33
C16:3n-4	-	0.09 ± 0.05	0.08 ± 0.05	0.29 ± 0.04
C18:2n-6	2.98 ± 0.48	3.43 ± 0.90	5.10 ± 0.33	4.76 ± 0.66
C18:3n-6	1.02 ± 0.24	1.30 ± 0.43	-	0.99 ± 0.10 ***

C18:3n-4	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.12 ± 0.12	0.18 ± 0.11
C18:3n-3	3.85 ± 0.58	3.67 ± 1.23	1.20 ± 0.19	1.21 ± 0.09
C18:4n-3	0.00 ± 0.00	0.32 ± 0.21 *	0.46 ± 0.18	0.27 ± 0.17
C20:2n-6	1.94 ± 0.37	0.43 ± 0.32 *	7.21 ± 1.08	2.24 ± 1.03 **
C20:3n-6	0.24 ± 0.12	0.42 ± 0.24	1.34 ± 0.08	2.88 ± 0.70
C20:4n-6	3.67 ± 0.70	1.48 ± 0.65 *	21.61 ± 2.02	10.15 ± 3.43 *
C20:3n-3	0.00 ± 0.00	1.21 ± 0.74	0.18 ± 0.08	7.54 ± 4.66
C20:4n-3	0.12 ± 0.12	0.31 ± 0.15	0.41 ± 0.32	0.24 ± 0.13
C20:5n-3	5.36 ± 0.19	4.97 ± 1.04	4.35 ± 0.40	5.99 ± 0.87
C22:2n-6	1.62 ± 0.22	0.32 ± 0.20 **	0.57 ± 0.31	0.15 ± 0.10
C22:5n-3	1.18 ± 1.18	0.62 ± 0.23	6.19 ± 2.77	0.09 ± 0.09 **
C22:6n-3	-	5.63 ± 2.15 **	3.68 ± 2.07	6.17 ± 4.42

$\Sigma n-3$	10.51 ± 1.41	16.12 ± 2.38	10.05 ± 2.39	21.51 ± 5.08
$\Sigma n-6$	11.47 ± 1.61	7.37 ± 1.01	35.83 ± 1.92	$20.36 \pm 3.53^{**}$
$\Sigma n-9$	10.94 ± 2.38	10.90 ± 1.25	15.00 ± 0.61	17.25 ± 1.38
U/S	1.15 ± 0.15	1.20 ± 0.13	2.31 ± 0.12	1.60 ± 0.14

5

The FA compositions were also determined in the grazers *Lymnaea* sp. (Table 5.1). The SFAs were dominated by C16:0 and C18:0 representing 10.53 ± 0.37 % and 14.41 ± 0.73 %, respectively. The predominant MUFAs were C18:1n-9 and C20:1n-9 representing 9.77 ± 0.38 % and 4.99 ± 0.60 %, respectively. The predominant PUFAs were C18:2n-6, C20:2n-6, C20:4n-6, C20:5n-3 and C22:5n-3 representing 5.10 ± 0.33 , 7.21 ± 1.08 , 21.61 ± 2.02 , 4.35 ± 0.40 and 6.19 ± 2.77 %, respectively. This composition is in accordance with that of other snails found in the literature, except for the presence of C20:5n-3 (Annexe III) [48–52]. This PUFA was found to be characteristic of fatty acid profiles for marine invertebrates (mostly molluscs) and was also a major component of the marine gastropods *Rapana venosa* and *Turbo cornutus* [49,50]. The FA content in animal tissues according to Kelly et al. (2012) is similar to our results (Figure 5.2). In addition, the SFA, MUFA and PUFA amounts in the diet have been reported to directly affect the FA composition of the consumers [51–53], and C18:1n-9, C18:2n-6 and C20:5n-3 in animal tissues are known to originate from dietary sources. For example, C20:5n-3 is a typical biomarker for diatoms and their presence in the snail's tissue highlights the presence of diatoms in the grazed biofilm [54]. Burns et al. (2011) measured the C18:2n-6 FA principally in Chlorophyceae such as *Choricystis coccooides*, *Pseudokirchneriella subcapitata*, *Stichococcus chodatii* and also in Cyanobacteria. In the same study, they also observed that C18:2n-6 percentage in the grazers *Daphnia* and *Ceriodaphnia* fed with these algae were significantly correlated with its percentage in their diet [55]. In the literature, some molluscs, such as pulmonated snails, are expected to be able to synthesize PUFAs *de novo* [56,57], but we didn't find any information about such metabolic pathways occurring in the genera *Lymnaea*. Thus, these results are in line with the observation of Kelly et al. (2012) and show that the grazers are able to assimilate and retain these PUFAs from a biofilm diet [47]. The C20:4n-6 is known to be accumulated at a relatively high level in several molluscs, which Kharlamenko et al. (2001) attributed to the consumption of fungi [58]. However, it has been suggested that the accumulation of C20:4n-6 might be due to its biosynthesis from its precursor C18:2n-6, since this has been observed in other molluscs like the scallop *Pecten maximus* [47,59]. These interpretations are coherent with our results regarding the high C18:2n-6 accumulation in the grazers' tissues.

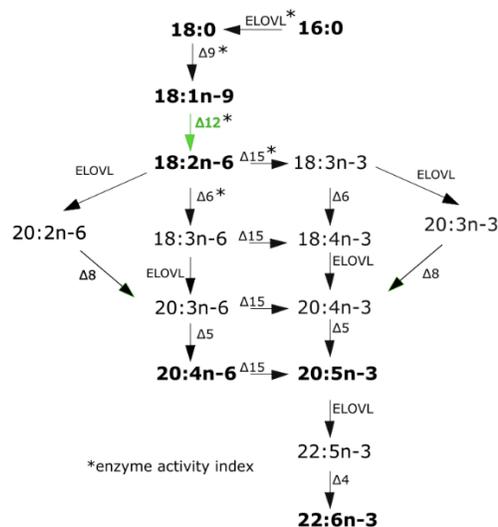


Figure 5.2. Biosynthetic pathways of polyunsaturated fatty acids (FAs) in algae and invertebrates by desaturation and elongation (modified from Fadhlouli et al. 2020, Monroig et al. 2018 and Guschina and Harwood 2006) [3,10,60]. C18:2n-6 = linoleic acid; C20:4n-6 = arachidonic acid; C22:6n-3 = docosahexaenoic acid; C20:5n-3 = eicosapentaenoic acid; C18:3n-3 = linolenic acid, FAs shown in bold are known to accumulate in animal tissues with high concentration. The D12D: Δ12-desaturase (in green) occurs only in algae, bacteria and protists of biofilm.

5.3.1 Effect of Th exposure on biofilm fatty acid profile

The Th bioaccumulated concentrations measured in the biofilm after the 4 weeks of exposure are presented in Table 5.2. The control biofilm contained a baseline Th content of 0.009 ± 0.004 ng mg^{-1} dw despite that Th was not added into the exposure medium. Thorium, like all other metallic elements, is naturally present in environmental freshwater and tap water [38–41]. Therefore, it is normal to find a background signal in the biofilm. The concentration measured in the C10 condition was significantly higher than the control conditions with $11.6 \pm 1.4 \times 10^3$ ng mg^{-1} dw. These results show the ability for Th to be accumulated by the periphytic biofilm. Thorium accumulation in the biofilm can result from internalization and adsorption onto the cells surface [30].

Table 5.2. Thorium content in control (C0) and Th-exposed (C10) biofilms after 4 weeks of exposure and in the grazer *Lymnaea* sp. fed for 4 weeks with C0 and C10 biofilms, the significant differences between biofilm or grazer Th content is indicated by * (ANOVA, $p < 0.05$, $n = 6$).

		C0	C10
Biofilm	Th ($\mu\text{g mg}^{-1}$ dw)	0.009 ± 0.004	11.6 ± 1.4 *
Grazers	Th ($\mu\text{g mg}^{-1}$ ww)	1.3 ± 0.1	2.4 ± 0.2 *

The FA composition in the biofilm samples (Figure 5.3A) was not significantly different in the control and the C10 condition after 4 weeks of exposure (MUFA = 29 ± 1 , PUFA = 23 ± 3 , SFA = 47 ± 3 %). Whereas the total SFAs, MUFAs and PUFAs in the biofilm were not significantly affected by the Th exposure, the amounts of some minor FAs belonging to these groups significantly varied (Table 5.1). The SFAs C15:0 and C17:0 values were significantly higher in the control (1.20 ± 0.19 and 1.09 ± 0.08 respectively) than in the C10 biofilm (0.51 ± 0.06 and 0.73 ± 0.11 % respectively). The MUFAs C22:1n-9, C16:2n-4 and C16:3n-4 were not detected in the control biofilms but represented 0.06 ± 0.06 , 1.27 ± 0.79 and 0.09 ± 0.05 % of the FAs measured in the C10 biofilms, respectively. Then, the PUFAs C18:4n-3 and C22:6n-3, which were not detected in the control biofilm, were present in the C10 biofilm. The C22:6n-3 represented 5.6 ± 2.2 % of the total FAs and was thus one of the main FAs of the C10 biofilm. This showed that Th exposure can induce significant FA metabolism perturbations at low concentration.

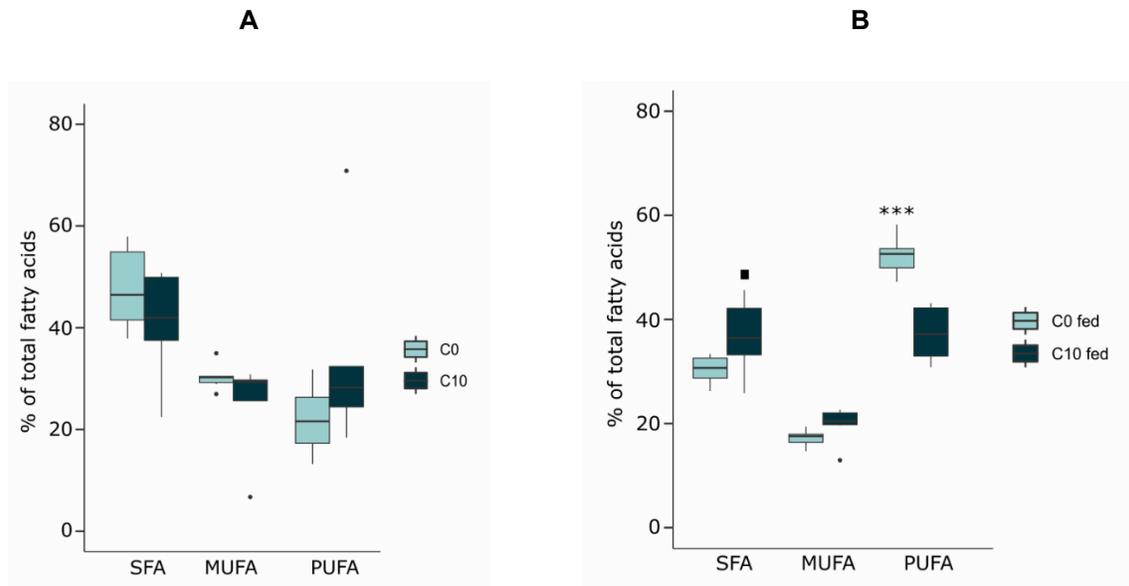


Figure 5.3. Saturated (SFA), monounsaturated (MUFA) and polyunsaturated (PUFA) fatty acids measured in: A. biofilm samples after 4 weeks of exposure in control C0 (0.004 ± 0.002 nM Th) or C10 (8.7 ± 3.4 nM Th) ($n = 6$). B. in the snail *Lymnaea* sp. following 4 weeks of feeding with C0 (9.4 ± 4.4 ng mg^{-1} dw) or C10 ($11.6 \pm 1.4 \times 10^3$ ng mg^{-1} dw) biofilm. Significant differences between the two biofilm or grazer's conditions for each fatty acid are shown by * ($p < 0.001$), ** ($p < 0.01$), * ($p < 0.05$) and \square ($p < 0.1$), one-way ANOVA ($n = 6$, except Th-exposed biofilm group $n = 5$).**

As opposed to C22:6n-3, the biofilm content in PUFAs C20:2n-6 and C20:4n-6 were significantly higher in the control than in the C10 condition with 1.94 ± 0.37 and 0.43 ± 0.32 % for the C20:2n-

6, and 3.67 ± 0.70 and 1.48 ± 0.65 % for the C20:4n-6, respectively. The C20:4n-6 is known to play an important role in mollusc cellular signalling [65], the nervous system [66] [62] and reproduction [67,68]. Its decrease in snail tissues could lead to important physiological damages in the grazers and also in their consumers since this PUFA cannot be synthesized by most animals, especially by mammals.

Table 5.3. Estimated fatty acid desaturase and elongase activities in biofilms and grazers from different exposure conditions. Values are shown as % mean \pm SEM for each condition (n = 6, except for exposed biofilm n = 5). D9D: Δ 9-desaturase (stearoyl-CoA-desaturase, $^{16:1n-7/16:0}$ and $^{18:1n-9/18:0}$); D12D: Δ 12-desaturase ($^{18:2n-6/18:1n-9}$); D15D: Δ 15-desaturase ($^{18:3n-3/18:2n-6}$), Δ 6-desaturase ($^{18:3n-6/18:2n-6}$ and $^{18:4n-3/18:3n-3}$) and elongase: ELOVL ($^{18:0/16:0}$).

	Biofilm		Grazers	
	Control biofilm	Contaminated biofilm	Control grazers	Grazers feeding on contaminated biofilm
D9D ¹	0.69 ± 0.13	0.57 ± 0.05	0.15 ± 0.03	0.16 ± 0.03
D9D2	0.78 ± 0.06	0.81 ± 0.06	0.68 ± 0.03	0.74 ± 0.06
D12D	0.41 ± 0.13	0.33 ± 0.09	n.c.	n.c.
D15D	1.31 ± 0.03	2.21 ± 1.54	n.c.	n.c.
D6D	0.32 ± 0.04	0.38 ± 0.18	0.13 ± 0.09	0.12 ± 0.08
ELOVL	0.55 ± 0.12	0.48 ± 0.05	1.37 ± 0.04	1.26 ± 0.04

n.c. = not calculated (because of the absence of either the precursor or the product).

The indices of enzymatic activities presented in Table 5.3 can be used to estimate the effects of metallic exposure on elongation and desaturation reactions. The values calculated for D9D, D12D and ELOVL were lower than those previously found in the control biofilm observed by Fadhlouli et al. (2020), but the D15D indices were similar (1.31 ± 0.03 and 1.35 ± 0.06 , respectively) [3]. These dissimilarities could be explained by differences in the biofilm's taxonomic composition. Despite the significant changes in some FA amounts observed between the control and Th-exposed condition in the biofilm, no significant differences were found between indices of enzyme activities. This indicates that the changes induced by the Th exposure could rather be attributed to lipid peroxidation rather than to the reduction of the enzymes' activities. However, those indices are calculated from ratios of corresponding FA amounts which also depend on previous or subsequent enzymatic reactions of the FAs biosynthesis pathways. Thus, the indices calculation might not allow for observation of Th effects on the enzymatic activities. For example, the significant increase of C18:4n-3 in the C10 biofilm, while C20:2n-6 and C20:4n-6 being more present in the control biofilm, could be partly explained by an increase of the desaturase D15

activity in the C10 exposed biofilm. In the control biofilm, the activities of the elongase (EVOVL) and the desaturase D8 enzymes could be dominant (Figure 5.2).

5.3.1 Effect of Th-exposed biofilm on grazers

The Th content measured in the grazer's (*Lymnaea* sp.) soft bodies fed with the control and Th-exposed biofilm are presented in Table 5.2. Thorium bioaccumulation by the snails fed with the C10 biofilm was significantly higher than by snails fed with the control biofilm, with 1.3 ± 0.1 and $2.4 \pm 0.2 \mu\text{g}\cdot\text{mg}^{-1}$ ww, respectively ($p < 0.05$). These results suggest that the Th bioaccumulated by the biofilm could be trophically transferred to grazers. The proportions of the FA categories measured in the snail soft bodies after 4 weeks of feeding on Th-exposed biofilm were different from the controls (Figure 5.3A). The proportions of PUFAs were significantly higher in the control grazers than in snails fed with the C10 biofilm with 52 ± 2 and 43 ± 5 %, respectively. On the contrary, SFA tended to be higher in the C10 fed snails (36 ± 3 %) as compared to the control biofilm fed snails (30 ± 1 %). Significant differences in the MUFA group were observed (Table 5.1) for the eicosenoic (C20:1n-9) and erucic (C22:1n-9) acids between the two diet exposure conditions. The C20:1n-9 was higher in the control condition with 4.99 ± 0.60 % than in the C10 fed condition (2.97 ± 0.68 %). On the contrary, C22:1n-9 was found in higher amounts in the C10 fed condition than in control snails. Because the ELOVL enzyme is involved in the elongation of eicosenoic acid to erucic acid, Th exposure could have led to an elongation rate increases but this hypothesis is not supported by the ELOVL calculated activity, which was not significantly different between the control and exposed conditions (Table 5.3). A significant decrease of the biomass of the snails was observed in the C10 fed condition (from 0.12 ± 0.01 to 0.08 ± 0.01 mg ww) while it remained constant in the control condition (0.12 ± 0.01 mg ww). This decrease of biomass can be attributed to a grazing reduction of the snails in the presence of Th, perhaps by reducing the biofilm palatability. In this experiment, the only source of PUFAs was the biofilm provided as food, thus, the decrease of PUFA abundance in the snails of the C10 fed condition could be linked with a decrease in their food intake. The n-6 FAs were significantly lower in the grazers fed with the C10 biofilm than in those fed with the control biofilm with 35.8 ± 1.9 and 20.4 ± 3.5 %, respectively. Moreover, PUFAs C20:2n-6, C20:4n-6 and C22:5n-3 were significantly different and 3 times more abundant in the control as compared to the C10 fed condition. Numerous metallic elements are known to produce reactive oxygen species (ROS) which can initiate lipid peroxidation (LPO) [69]. Correa et al. (2011) showed that Th waterborne exposure from 25.3 ± 3.2 to $609 \pm 61 \mu\text{g L}^{-1}$ induced oxidative stress in the bile, gills, liver, muscle, brain, skin, kidney and blood of the silver catfish (*Rhamdia quelen*) [38]. Because PUFAs are

relatively easy to breakdown during oxidative reactions, the Th bioaccumulated in the biofilm could have generated ROS in the snail tissues during and after the food uptake [70,71]. This could explain the lower amount of PUFAs in the C10 fed snails despite the lack of significant differences in the amount of PUFAs between control and C10 biofilms. While nonsignificant differences were observed for the C18:2n-6, the snails fed with the control biofilm accumulated around 1.6 times more of this FA than those fed with the Th-exposed biofilm. This decrease of accumulation was also observed for the C20:2n-6 and the C20:4n-6. Because n-3 and n-6 PUFAs such as C22:5n-3 and C20:4n-6 are essential for the consumer's physiology and metabolism, their decrease in the C10-fed grazer tissues could affect the snail's fitness [8]. Moreover, these PUFAs can only be synthesized de novo in plants and algae and can only be provided to the consumers through diet. Therefore, their decrease in the grazers could affect the rate of PUFA flow in the upper trophic levels [72–74].

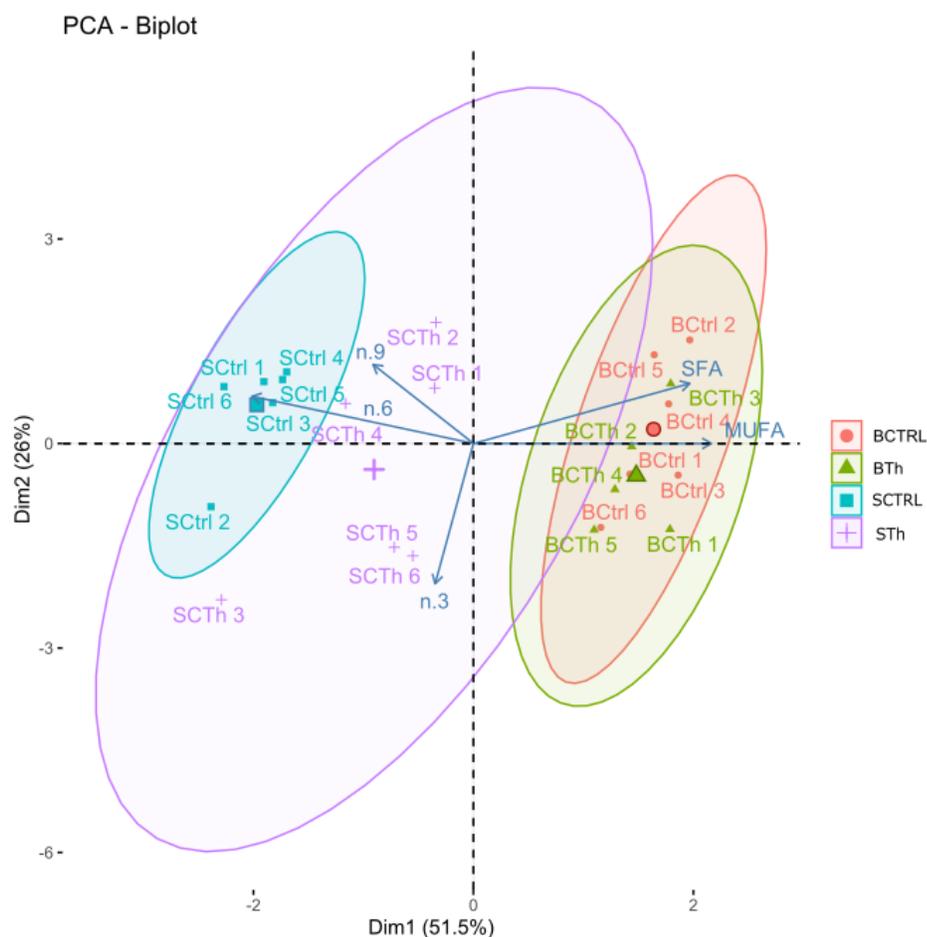


Figure 5.4. Principal component analysis (PCA) realized on FAs data of samples of biofilms and snails, under control and Th-exposure conditions. n = 6, except Th-exposed biofilm group for which n = 5. Abbreviations: BCTRL (control biofilm), BCTH (exposed biofilm), SCTRL (control snails), SCTH (exposed Snails).

The principal component analysis (PCA; Figure 5.4) shows the repartition of biofilm and snail samples as a function of their FA profiles. Biofilms and snails appeared well separated along Dim1. Biofilm samples were characterized by high SFAs and MUFAs content, while snails were more characterized by PUFAs, notably by the n-6. This shows the ability of the grazer to accumulate the n-6 PUFAs from the biofilm, as it was already observed in the literature [47].

Biofilm FA profiles in control and Th-exposed conditions were not separated by the PCA and thus seemed non-affected by the exposition. It has been shown that metal contamination in acid mine drainage waters leads to FA profile changes in biofilm [75], but in the case of our study, the Th exposure might be too low to induce such changes. However, the centroids of PCA points for

control and Th-exposed snails appeared to be spatially discriminated along Dim1. The control snails were characterized by higher n-6 PUFAs compared to those fed with Th-exposed biofilm. In the grazers, Th diet exposure appeared to affect the amount of n-6. This could be explained by the tendency of those PUFAs to decrease in the Th-exposed biofilm and/or by a lipid peroxidation occurring during feeding, as suggested previously. Moreover, the Th diet-exposed snail samples were more dispersed than the control. This shows that Th dietary exposure to Th-exposed biofilm leads to changes in the FA profile of the grazers. The two patterns of changes induced by Th diet exposure could be explained by individual variations such as the rate of egg production and laying which involve PUFAs in hormone synthesis and nutritive stock for the eggs and could lead to a change of fatty acid profile [68]. Moreover, laying could be a Th excretion pathway for the snails if the Th is able to bioaccumulate inside the eggs like Cu and Zn in squid [76]. The Th bioaccumulated in the biofilm was transferable to the grazer and the Th-exposed biofilm diet affected the snail's FA composition, notably by reducing PUFA and n-6 abundance. Moreover, the grazers, when fed with the Th-exposed biofilm, presented more heterogeneous FA profiles than the control grazers, probably due to individual physiologic and metabolic variations.

5.3.2 Conclusion

In this study, Th was shown to be accumulated by a periphytic biofilm and to affect its fatty acid composition. When this biofilm was consumed by the grazer *Lymnaea* sp., Th bioaccumulated and affected the biofilm nutritional quality, notably by a significant decrease of C20:2n-6, which plays essential roles in metazoan metabolisms. Snail exposure to Th through the diet together with changes in the fatty acid composition of the biofilm, led to changes in the FA composition of the grazer. Indeed, the grazers fed with Th-laden biofilms had less PUFA and n-6 FA compared to the snails fed with the control biofilm. These results show that a very low concentration of Th can induce a change in the nutritional quality of the organisms studied. Thus, Th can represent a hazard for the entire freshwater ecosystem by being accumulated and affecting the energy transfer along the trophic chain. This study shows the pertinence of examining sublethal endpoints, such as FA profiles, and multiple trophic levels in order to improve our knowledge of metal impacts on the aquatic food chain. As these effects were observed at very low Th concentrations, more work should be initiated on the potential impacts of this data-poor element on aquatic ecosystems.

Acknowledgements

Financial support from the Fonds de recherche du Québec sur la nature et les technologies (FRQNT; grant number 2015-MI-190537) is acknowledged. Caroline Doose acknowledges the language assistance received from Scott Hepditch. Isabelle Lavoie, Karine Lemarchand and Philippe Juneau are also acknowledged for their participation at the manuscript's revisions. Claude Fortin is supported by the Canada Research Chair program (grant number 950-231107).

BIBLIOGRAPHIE CHAPITRE 5

- [1] A.W. Decho, Microbial biofilms in intertidal systems: an overview, *Cont. Shelf Res.* 20 (2000) 1257–1273. <https://doi.org/10.1016/j.seares.2014.07.003>.
- [2] A.M. Romani, H. Guasch, M.D. Balaguer, *Aquatic biofilms: ecology, water quality and wastewater treatment*, Caister Academic Press, (2016), 229. <https://doi.org/10.21775/9781910190173>.
- [3] M. Fadhlaoui, V. Laderriere, I. Lavoie, C. Fortin, Influence of temperature and nickel on algal biofilm fatty acid composition, *Environ. Toxicol. Chem.* (2020) 1–12. <https://doi.org/10.1002/etc.4741>.
- [4] S.A. Drerup, M.L. Vis, Seasonality of total fatty acid profiles in acid mine drainage impaired streams, *Environ. Monit. Assess.* 190, 467 (2018) 1-7. <https://doi.org/10.1007/s10661-018-6832-y>.
- [5] G. Ahlgren, L. Lundstedt, M. Brett, C. Forsberg, Lipid composition and food quality of some freshwater phytoplankton for cladoceran zooplankters, *J. Plankton Res.* 12 (1990) 809–818. <https://doi.org/10.1093/plankt/12.4.809>.
- [6] H. V Leland, J.L. Carter, Effects of copper on species composition of periphyton in a Sierra Nevada, California, stream, *Freshw. Biol.* 14 (1984) 281–296. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2427.1984.tb00041.x>.
- [7] A.M.M. Gonçalves, A.F. Mesquita, T. Verdelhos, J.A.P. Coutinho, J.C. Marques, F. Gonçalves, Fatty acids' profiles as indicators of stress induced by of a common herbicide on two marine bivalves species: *Cerastoderma edule* (Linnaeus, 1758) and *Scrobicularia plana* (da Costa, 1778), *Ecol. Indic.* 63 (2016) 209–218. <https://doi.org/10.1016/j.ecolind.2015.12.006>.
- [8] M.T. Brett, D.C. Muller-Navarra, The role of highly unsaturated fatty acids in aquatic food web processes, *Freshw. Biol.* 38 (1997) 483–499. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2427.1997.00220.x>.
- [9] H. Masclaux, A. Bec, G. Bourdier, Trophic partitioning among three littoral microcrustaceans: relative importance of periphyton as food resource, *J. Limnol.* 71 (2012) 261–266. <https://doi.org/10.4081/jlimnol.2012.e28>.
- [10] Ó. Monroig, N. Kabeya, Desaturases and elongases involved in polyunsaturated fatty acid

- biosynthesis in aquatic invertebrates: a comprehensive review, *Fish. Sci.* 84 (2018) 911–928. <https://doi.org/10.1007/s12562-018-1254-x>.
- [11] I. Rocchetta, M. Mazzuca, V. Conforti, L. Ruiz, V. Balzaretto, M.D.C.R. De Molina, Effect of chromium on the fatty acid composition of two strains of *Euglena gracilis*, *Environ. Pollut.* 141 (2006) 353–358. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2005.08.035>.
- [12] S. Gonçalves, M. Kahlert, S.F.P. Almeida, E. Figueira, Assessing Cu impacts on freshwater diatoms: biochemical and metabolomic responses of *Tabellaria flocculosa* (Roth) Kützing, *Sci. Total Environ.* 625 (2018) 1234–1246. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2017.12.320>.
- [13] V. Filimonova, F. Gonçalves, J.C. Marques, M. De Troch, A.M.M. Gonçalves, Biochemical and toxicological effects of organic (herbicide Primextra® Gold TZ) and inorganic (copper) compounds on zooplankton and phytoplankton species, *Aquat. Toxicol.* 177 (2016) 33–43. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2016.05.008>.
- [14] M. Real, I. Muñoz, H. Guasch, E. Navarro, S. Sabater, The effect of copper exposure on a simple aquatic food chain, *Aquat. Toxicol.* 63 (2003) 283–291. [https://doi.org/10.1016/S0166-445X\(02\)00187-X](https://doi.org/10.1016/S0166-445X(02)00187-X).
- [15] L. Gauthier, J. Tison-Rosebery, S. Morin, N. Mazzella, Metabolome response to anthropogenic contamination on microalgae: a review, *Metabolomics.* 16 (2020) 1–13. <https://doi.org/10.1007/s11306-019-1628-9>.
- [16] W. Zhang, N.G.J. Tan, B. Fu, S.F.Y. Li, Metallomics and NMR-based metabolomics of *Chlorella* sp. reveal the synergistic role of copper and cadmium in multi-metal toxicity and oxidative stress, *Metallomics.* 7 (2015) 426–438. <https://doi.org/10.1039/c4mt00253a>.
- [17] M. Olofsson, T. Lamela, E. Nilsson, J.P. Bergé, V. del Pino, P. Uronen, C. Legrand, Seasonal variation of lipids and fatty acids of the microalgae *Nannochloropsis oculata* grown in outdoor large-scale photobioreactors, *Energies.* 5 (2012) 1577–1592. <https://doi.org/10.3390/en5051577>.
- [18] I.G. Boëchat, A. Krüger, A. Giani, C.C. Figueredo, B. Gücker, Agricultural land-use affects the nutritional quality of stream microbial communities, *FEMS Microbiol. Ecol.* 77 (2011) 568–576. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6941.2011.01137.x>.
- [19] J.M. Conley, D.H. Funk, N.J. Cariello, D.B. Buchwalter, Food rationing affects dietary selenium bioaccumulation and life cycle performance in the mayfly *Centroptilum triangulifer*, *Ecotoxicology.* 20 (2011) 1840–1851. <https://doi.org/10.1007/s10646-011->

0722-1.

- [20] J.M. Conley, D.H. Funk, D.H. Hesterberg, L.C. Hsu, J. Kan, Y.T. Liu, D.B. Buchwalter, Bioconcentration and biotransformation of selenite versus selenate exposed periphyton and subsequent toxicity to the mayfly *Centroptilum triangulifer*, *Environ. Sci. Technol.* 47 (2013) 7965–7973. <https://doi.org/10.1021/es400643x>.
- [21] L. Xie, D.H. Funk, D.B. Buchwalter, Trophic transfer of Cd from natural periphyton to the grazing mayfly *Centroptilum triangulifer* in a life cycle test, *Environ. Pollut.* 158 (2010) 272–277. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2009.07.010>.
- [22] K.S. Kim, D.H. Funk, D.B. Buchwalter, Dietary (periphyton) and aqueous Zn bioaccumulation dynamics in the mayfly *Centroptilum triangulifer*, *Ecotoxicology.* 21 (2012) 2288–2296. <https://doi.org/10.1007/s10646-012-0985-1>.
- [23] S. Meylan, R. Behra, L. Sigg, Influence of metal speciation in natural freshwater on bioaccumulation of copper and zinc in periphyton: A microcosm study, *Environ. Sci. Technol.* 38 (2004) 3104–3111. <https://doi.org/10.1021/es034993n>.
- [24] K.L. Holding, R.A. Gill, J. Carter, The relationship between epilithic periphyton (biofilm) bound metals and metals bound to sediments in freshwater systems, *Environ. Geochem. Health.* 25 (2003) 87–93. <https://doi.org/10.1023/A:1021205101133>.
- [25] R. Behra, R. Landwehrjohann, K. Vogel, B. Wagner, L. Sigg, Copper and zinc content of periphyton from two rivers as a function of dissolved metal concentration, *Aquat. Sci.* 64 (2002) 300–306. <https://doi.org/10.1007/s00027-002-8074-9>.
- [26] S.N. Luoma, P.S. Rainbow, Why is metal bioaccumulation so variable? Biodynamics as a unifying concept, *Environ. Sci. Technol.* 39 (2005) 1921–1931.
- [27] C.A. Martin, S.N. Luoma, D.J. Cain, D.B. Buchwalter, Cadmium ecophysiology in seven stonefly (*Plecoptera*) species: Delineating sources and estimating susceptibility, *Environ. Sci. Technol.* 41 (2007) 7171–7177. <https://doi.org/10.1021/es071205b>.
- [28] D. Cain, M.N. Croteau, S. Luoma, Bioaccumulation dynamics and exposure routes of Cd and Cu among species of aquatic mayflies, *Environ. Toxicol. Chem.* 30 (2011) 2532–2541. <https://doi.org/10.1002/etc.663>.
- [29] L. Xie, D.B. Buchwalter, Cadmium exposure route affects antioxidant responses in the mayfly *Centroptilum triangulifer*, *Aquat. Toxicol.* 105 (2011) 199–205. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2011.06.009>.

- [30] C. Bonnineau, J. Artigas, B. Chaumet, A. Dabrin, J. Faburé, B.J.. Ferrari, J.D. Lebrun, C. Margoum, N. Mazzella, C. Miège, S. Morin, E. Uher, M. Babut, S. Pesce, Role of biofilms in contaminant bioaccumulation and trophic transfer in aquatic ecosystems: current state of knowledge and future challenges, in: P. de Voogt (Ed.), Rev. Environ. Contam. Toxicol., Springer, New York, NY, 2020: pp. 1–39. https://doi.org/10.1007/398_2019_39.
- [31] J. Neury-Ormanni, C. Doose, N. Majdi, J. Vedrenne, W. Traunspurger, S. Morin, Selective grazing behaviour of chironomids on microalgae under pesticide pressure, Sci. Total Environ. 730 (2020) 138673 . <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.138673>.
- [32] T.P. Mernagh, Y. Mieztis, A Review of the geochemical processes controlling the distribution of thorium in the earth' s crust and Australia' s thorium resources, Geosci. Aust. Rec. 05 (2008) 48. http://www.ga.gov.au/image_cache/GA11421.pdf.
- [33] US EPA, Registry Agency for Toxic Substances and Disease, Toxicological profile for thorium, (1990) 153. ATSDR/TP-90/25
- [34] J. Loiseaux, S. David, D. Heuer, A. Nuttin, Thorium fuel, an interesting option for future nuclear energy, Phys. Appliquée/Applied Phys. 3 (2002) 1023–1034.
- [35] A.M. Yusof, M.N. Mahat, N. Omar, A.K.H. Wood, Water quality studies in an aquatic environment of disused tin-mining pools and in drinking water, Ecol. Eng. 16 (2001) 405–414. [https://doi.org/10.1016/S0925-8574\(00\)00124-5](https://doi.org/10.1016/S0925-8574(00)00124-5).
- [36] M.A.R. V Veado, I.A. Arantes, A.H. Oliveira, M.R.M.G. Almeida, R.A. Miguel, M.I. Severo, H.L. Cabaleiro, Metal pollution in the environment of Minas Gerais state - Brazil, Environ. Monit. Assess. 117 (2006) 157–172. <https://doi.org/10.1007/s10661-006-8716-9>.
- [37] A.T. Ramli, A.W.M.A. Hussein, A.K. Wood, Environmental ^{238}U and ^{232}Th concentration measurements in an area of high level natural background radiation at Palong, Johor, Malaysia, J. Environ. Radioact. 80 (2005) 287–304. <https://doi.org/10.1016/j.jenvrad.2004.06.008>.
- [38] L.M. Correa, D. Kochhann, M. a. Pavanato, S.F. Llesuy, A.P. Konzen Riffel, V.L. Loro, M.F. Mesko, E.M.M. Flores, V.L. Dressler, B. Baldisserotto, Bioaccumulation and oxidative stress parameters in silver catfish (*Rhamdia quelen*) exposed to different thorium concentrations, Chemosphere. 77 (2009) 384–391. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2009.07.022>.
- [39] D.C. Lauria, J.M. Godoy, Abnormal high natural radium concentration in surface waters, J.

- Environ. Radioact. 61 (2002) 159–168. [https://doi.org/10.1016/S0265-931X\(01\)00123-0](https://doi.org/10.1016/S0265-931X(01)00123-0).
- [40] E.A. Casartelli, N. Miekeley, Determination of thorium and light rare-earth elements in soil water and its high molecular mass organic fractions by inductively coupled plasma mass spectrometry and on-line-coupled size-exclusion chromatography, *Anal. Bioanal. Chem.* 377 (2003) 58–64. <https://doi.org/10.1007/s00216-003-2069-9>.
- [41] J.M. Godoy, M.L. Godoy, Natural radioactivity in Brazilian groundwater, *J. Environ. Radioact.* 85 (2006) 71–83. <https://doi.org/10.1016/j.jenvrad.2005.05.009>.
- [42] L. Zhang, M. Chen, W. Yang, N. Xing, Y. Li, Y. Qiu, Y. Huang, Size-fractionated thorium isotopes (^{228}Th , ^{230}Th , ^{232}Th) in surface waters in the Jiulong river estuary, China, *J. Environ. Radioact.* 78 (2004) 199–216. <https://doi.org/10.1016/j.jenvrad.2004.05.004>.
- [43] A. Dauta, Conditions de développement du phytoplancton. Etude comparative du comportement de huit espèces en culture, *Annales de limnologie.* 18 (1982) 217–262. <https://doi.org/10.1051/limn/1982005>.
- [44] AFNOR, Qualité de l'eau - Dosage des matières en suspension - Méthode par filtration sur filtre en fibres de verre, (2005) 16 (NF EN 872).
- [45] J. Folch, M. Lees, G.H. Solane Stanley, A simple method for the isolation and purification of total lipides from animal tissues, *J. Biol. Chem.* 226 (1957) 497–509. <https://doi.org/10.1016/j.athoracsur.2011.06.016>.
- [46] M. Fadhlaoui, P. Couture, Combined effects of temperature and metal exposure on the fatty acid composition of cell membranes, antioxidant enzyme activities and lipid peroxidation in yellow perch (*Perca flavescens*), *Aquat. Toxicol.* 180 (2016) 45–55. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2016.09.005>.
- [47] J.R. Kelly, R.E. Scheibling, Fatty acids as dietary tracers in benthic food webs, *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 446 (2012) 1–22. <https://doi.org/10.3354/meps09559>.
- [48] C.O. Silva, T. Simões, S.C. Novais, I. Pimparel, L. Granada, A.M.V.M. Soares, C. Barata, M.F.L. Lemos, Fatty acid profile of the sea snail *Gibbula umbilicalis* as a biomarker for coastal metal pollution, *Sci. Total Environ.* 586 (2017) 542–550. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2017.02.015>.
- [49] M.Y. Çelik, M.B.D.M. Sariipek, G.U. Gören, D.K. Öztürk, D. Kocatepe, S. Karayücel, Comparison of fatty acids and some mineral matter profiles of wild and farmed snails, *Cornu aspersum* Müller, 1774, *Molluscan Res.* 39:3 (2019) 34–240.

<https://doi.org/10.1080/13235818.2019.1596531>.

- [50] V.Z. Panayotova, A. V. Merdzhanova, D.A. Dobрева, R.S. Stancheva, K. Peycheva, Seasonal variation in fat-soluble vitamins, cholesterol and fatty acid profile of lipid classes of *Rapana venosa*, Bulg. Chem. Commun. 51 (2019) 251–255.
- [51] İ. Ekin, R. Şeşen, Investigation of the fatty acid contents of edible snails *Helix lucorum* , *Eobania vermiculata* and Non-Edible Slug *Limax flavus*, Rec. Nat. Prod. 11 (2017) 562–567.
- [52] N. Zhu, X. Dai, D.S. Lin, W.E. Connor, The Lipids of slugs and snails : evolution , diet and biosynthesis, Lipids. 29 (1994) 869–875.
- [53] S. V Isay, N.G. Busarova, Study on fatty acid composition of marine organisms unsaturated fatty acids of japan sea invertebrates, Comp. Biochem. Physiol. 77 (1984) 803–810.
- [54] H. Saito, H. Aono, Characteristics of lipid and fatty acid of marine gastropod *Turbo cornutus*: High levels of arachidonic and n-3 docosapentaenoic acid, Food Chem. 145 (2014) 135–144. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2013.08.011>.
- [55] M.C. Milinsk, R. Das Graças Padre, C. Hayashi, N.E. De Souza, M. Matsushita, Influence of diets enriched with different vegetable oils on the fatty acid profiles of snail *Helix aspersa maxima*, Food Chem. 82 (2003) 553–558. [https://doi.org/10.1016/S0308-8146\(03\)00010-4](https://doi.org/10.1016/S0308-8146(03)00010-4).
- [56] Y. Özogul, F. Özogul, A.I. Olgunoglu, Fatty acid profile and mineral content of the wild snail (*Helix pomatia*) from the region of the south of the Turkey, Eur. Food Res. Technol. (2005) 547–549. <https://doi.org/10.1007/s00217-005-1191-7>.
- [57] D. Ikauniece, A. Jemeljanovs, V. Sterna, V. Strazdina, Evaluation of nutrition value of roman snail's (*Helix pomatia*) meat obtained in Latvia, FoodBalt (2014) 28–31.
- [58] G.. Napolitano, Fatty acids as chemical and trophic markers in freshwater ecosystems, in: Lipids in freshwater ecosystems, (1999): pp. 21–44.
- [59] C.W. Burns, M.T. Brett, M. Schallenberg, A comparison of the trophic transfer of fatty acids in freshwater plankton by cladocerans and calanoid copepods, Freshw. Biol. 56 (2011) 889–903. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2427.2010.02534.x>.
- [60] N. Kabeya, M.M. Fonseca, D.E.K. Ferrier, J.C. Navarro, L.K. Bay, D.S. Francis, D.R. Tocher, L.F.C. Castro, Ó. Monroig, Genes for de novo biosynthesis of omega-3 polyunsaturated fatty acids are widespread in animals, Sci. Adv. 4 (2018) 1–8.

<https://doi.org/10.1126/sciadv.aar6849>.

- [61] J. Weinert, G.J. Blomquist, C.E. Borgeson, De novo biosynthesis of linoleic acid in two non-insect invertebrates: the land slug and the garden snail, *Experientia*, 49 (1993) 919–921. <https://doi.org/10.1007/BF01952610>.
- [62] V.I. Kharlamenko, S.I. Kiyashko, A.B. Imbs, D.I. Vyshkvartzev, Identification of food sources of invertebrates from the seagrass *Zostera marina* community using carbon and sulfur stable isotope ratio and fatty acid analyses, *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 220 (2001) 103–117. <https://doi.org/10.3354/meps220103>.
- [63] P. Soudant, J. Moal, Y. Marty, J.F. Samain, Impact of the quality of dietary fatty acids on metabolism and the composition of polar lipid classes in female gonads of *Pecten maximus* (L.), *J. Exp. Mar. Bio. Ecol.* 205 (1996) 149–163. [https://doi.org/10.1016/S0022-0981\(96\)02608-1](https://doi.org/10.1016/S0022-0981(96)02608-1).
- [64] I.A. Guschina, J.L. Harwood, Lipids and lipid metabolism in eukaryotic algae, *Prog. Lipid Res.* 45 (2006) 160–186. <https://doi.org/10.1016/j.plipres.2006.01.001>.
- [65] Y. Ye, M. Liu, H. Yuan, S. Ning, Y. Wang, Z. Chen, R. Ji, Q. Guo, Q. Li, Y. Zhou, COX-2 regulates Snail expression in gastric cancer via the Notch1 signaling pathway, *Int. J. Mol. Med.* 40 (2017) 512–522. <https://doi.org/10.3892/ijmm.2017.3011>.
- [66] D. Piomelli, Metabolism of arachidonic acid in nervous system of marine mollusk *Aplysia californica*, *Am. J. Physiol. - Regul. Integr. Comp. Physiol.* 260 (1991) 844–848. <https://doi.org/10.1152/ajpregu.1991.260.5.r844>.
- [67] I.I. Deridovich, O. V. Reunova, Prostaglandins: Reproduction control in bivalve molluscs, *Comp. Biochem. Physiol.* 104 (1993) 23–27. [https://doi.org/10.1016/0300-9629\(93\)90003-M](https://doi.org/10.1016/0300-9629(93)90003-M).
- [68] A.S. Clare, R. Van Elk, J.H.M. Feyen, Eicosanoids: Their biosynthesis in accessory sex organs of *Lymnaea stagnalis* (L.), *Int. J. Invertebr. Reprod. Dev.* 10 (1986) 125–131. <https://doi.org/10.1080/01688170.1986.10510235>.
- [69] A. Valavanidis, T. Vlahogianni, M. Dassenakis, M. Scoullou, Molecular biomarkers of oxidative stress in aquatic organisms in relation to toxic environmental pollutants, *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 64 (2006) 178–189. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2005.03.013>.
- [70] D.R. Livingstone, P. Garcia Martinez, X. Michel, J.-F. Narbonne, S. O'Hara, D. Ribera,

- G.W. Wingston, Oxyradical production as a pollution-mediated in the common mussel , mechanism of toxicity *Mytilus edulis* (L.), and other molluscs, *Funct. Ecol.* 4 (1990) 415–424. <https://doi.org/10.2307/2389604>.
- [71] F. G eret, A. Jouan, V. Turpin, M. João, R.P. Cosson, Influence of metal exposure on metallothionein synthesis and lipid peroxidation in two bivalve mollusks : the oyster (*Crassostrea gigas*) and the mussel (*Mytilus edulis*), *Aquat. Living Resour.* 15 (2002) 61–66. [https://doi.org/10.1016/S0990-7440\(01\)01147-0](https://doi.org/10.1016/S0990-7440(01)01147-0).
- [72] D.C. Müller-Navarra, M.T. Brett, A.M. Liston, C.R. Goldman, A highly unsaturated fatty acid predicts carbon transfer between primary producers and consumers, *Nature.* 403 (2000) 73–77. <https://doi.org/10.1038/47469>.
- [73] M. Torres-Ruiz, J.D. Wehr, Changes in the nutritional quality of decaying leaf litter in a stream based on fatty acid content, *Hydrobiologia.* 651 (2010) 265–278. <https://doi.org/10.1007/s10750-010-0305-9>.
- [74] M. Torres-Ruiz, J.D. Wehr, A.A. Perrone, Trophic relations in a stream food web: Importance of fatty acids for macroinvertebrate consumers, *J. North Am. Benthol. Soc.* 26 (2007) 509–522. <https://doi.org/10.1899/06-070.1>.
- [75] S.A. Drerup, M.L. Vis, Responses of stream biofilm phospholipid fatty acid profiles to acid mine drainage impairment and remediation, *Water. Air. Soil Pollut.* 227 (2016). <https://doi.org/10.1007/s11270-016-2856-5>.
- [76] S. Craig, J. Overnell, Metals in squid, *Loligo forbesi*, adults, eggs and hatchlings. No evidence for a role for Cu- or Zn-metallothionein, *Comp. Biochem. Physiol. - C Toxicol. Pharmacol.* 134 (2003) 311–317. [https://doi.org/10.1016/S1532-0456\(02\)00274-0](https://doi.org/10.1016/S1532-0456(02)00274-0).

6 DISCUSSION GÉNÉRALE ET CONCLUSION

Cette thèse avait pour but d'étudier les risques associés aux métaux tétravalents tels que le Th et le Zr pour les microorganismes d'eau douce. Pour cela il était important de mieux comprendre quatre grands enjeux à trois échelles différentes du vivant :

- Comprendre sous quelles formes ces métaux sont présents dans les eaux et à quel point ils sont assimilables par les microorganismes
- Comprendre leur potentiel toxique à l'échelle cellulaire, une fois internalisé
- Comprendre les effets de ces métaux sur les différents individus à l'échelle de la communauté
- Comprendre comment la perturbation des communautés périphytiques peut affecter les milieux aquatiques à l'échelle des écosystèmes.

Lors de ces travaux de thèse, les résultats obtenus ont permis d'enrichir la connaissance sur certains de ces points. Cependant, des problèmes de dosage du Zr à l'ICP-MS (présence d'interférents) dans le biofilm et dans les algues vertes n'ont pas permis de quantifier l'accumulation de Zr dans les organismes ni d'examiner le fractionnement subcellulaire.

6.1 Accumulation du thorium par les microorganismes d'eau douce et transfert trophique

Dans ces travaux de thèse, l'accumulation du Th par les microorganismes d'eau douce a été observée à différentes échelles (de la cellule à l'écosystème) et au moyen de différentes expériences (prise en charge et fractionnement subcellulaire ; exposition du biofilm en aquariums et canaux). Dans le biofilm, le Th était majoritairement associé aux organismes. Plusieurs hypothèses ont pu être ainsi formulées quant aux mécanismes en jeu. Le Th associé aux microorganismes pourrait être séquestré par adsorption ou par internalisation à l'intérieur des organismes.

6.1.1 Accumulation du thorium par adsorption

6.1.1.1 Répartition du Thorium dans les différentes fractions du biofilm

Les quantités associées aux EPSs représentaient $0,03 \pm 0,02$ % du Th total mesuré dans le biofilm. Ceci montre que le Th est très peu associé la matrice du périphyton. Pourtant, dans la littérature, plusieurs travaux sur l'adsorption de ce métal par les EPS de microorganismes, en

majorité des bactéries, ont montré que ce métal était capable de s'associer aux peptides et oligopeptides présents dans la matrice [1,2]. En effet, Shukla et al. (2020) ont publié cette année des travaux sur une souche de bactérie, *Ochrobactrum intermedium* AM7, capable de croître dans des milieux contenant une concentration très élevée en Th (1 g L^{-1}). Bien que ces concentrations d'exposition nominales soient peu crédibles au regard de la solubilité du Th, les auteurs ont pu caractériser les groupes fonctionnels des EPS avec lesquels le Th était associé par analyse infrarouge à transformée de Fourier (IRTF) et ont observé que le métal était associé en majorité aux groupes hydroxyles, amines et carboxyles [3]. Cependant, dans nos travaux de thèse, la plus grande quantité de Th mesurée était retrouvée dans la fraction non désorbable à l'EDTA (ND), c'est-à-dire associée aux organismes, avec 97 ± 2 et 92 ± 9 % du total dans les biofilms exposés à C1 ($0,18 \pm 0,09 \text{ nM}$) et C10 ($8,7 \pm 3,4 \text{ nM}$) respectivement. Cette fraction de métal mesurée peut être soit présente à l'intérieur des cellules, soit adsorbée à leur surface au niveau de sites biologiques membranaires ou à des formes solides précipitées.

Association aux polysaccharides et aux protéines

Les protéines et les polysaccharides présents à la surface des cellules sont potentiellement des sites de complexation pour les métaux de classe A tels que le Th, notamment au niveau des groupements (-NH) et (-COOH). Afin de vérifier leur implication dans la bioaccumulation de cet élément dans le biofilm, des tests de corrélation de Spearman ont été effectués pour déterminer si les concentrations en protéine et polysaccharides dans les fractions EPSs, désorbable à l'EDTA, ND et dans le biofilm total influençaient la quantité de Th associée à ces différentes fractions.

Tableau 6.1. Coefficients de Spearman et p value associés aux tests de corrélation entre les concentrations de thorium mesurées dans chaque fraction du biofilm avec les quantités de protéines et de polysaccharides mesurées dans ces mêmes fractions (n = 8).

	EPSs		Désorbable à l'EDTA		ND		Total	
	ρ	P value	ρ	P value	ρ	P value	ρ	P value
Protéines	-	-	-	-	NS	NS	- 0,3	0,02
Polysaccharides	- 0,4	0,0003	NS	NS	-0,3	0,02	- 0.2	0,04

* NS : non significatif

Les valeurs de Th dans les fractions EPSs, ND et dans le total étaient significativement négativement corrélées avec les concentrations en polysaccharides (Tableau 6.1). Il n'y avait aucune corrélation dans la fraction désorbable à l'EDTA (test de corrélation de Spearman, $p < 0,05$) ce qui indique que les polysaccharides n'étaient pas responsables de la faible quantité de métal retrouvée dans ces fractions. Dans les EPSs et la fraction désorbable à l'EDTA, la méthode

Bradford de dosage de protéines n'était peut-être pas assez sensible pour mesurer leurs concentrations dans ces fractions.

Association aux oxydes de fer et de manganèse

La synthèse de ces oxydes peut avoir des origines biotiques et abiotiques [4]. Dans le traitement des eaux de drainage minier, les oxydes de Mn d'origine biotique et abiotique ont été observés comme capables de sorber les métaux tels que le Zn, le Ni, et le Co [5–7]. Dynes et al. (2016) ont également observé cela pour le Ni par microscopie électronique à balayage couplée à un détecteur de rayons X (*scanning transmission X-ray microscopy*), mais ils n'ont pu déterminer si le métal était associé aux oxydes de Mn ou aux polysaccharides qui leur sont associés [8].

Si les oxydes de Mn et de Fe sont retrouvés dans la matrice d'EPS du biofilm, ils sont également retrouvés associés aux cellules des microorganismes. Dans ces travaux de thèse, le protocole de séparation des fractions du biofilm a été réalisé selon celui de Stewart et al. (2015) [9]. Dans cet article, les auteurs ont étudié la répartition du Pb, du Cu, du Mn et du Fe dans plusieurs biofilms soumis ou non à une exposition au Pb. Ils ont observé que le Mn et le Fe étaient principalement associés à la fraction non désorbable (ND, correspondant au métal fortement adsorbé ou internalisé par les organismes). De plus, le haut ratio de Fe:C et de Mn:C (1100 ± 100 and $590 \pm 70 \mu\text{mol mol}^{-1}$ respectivement) ont permis aux auteurs de suggérer que ces deux éléments étaient probablement présents sous la forme d'oxydes à l'extérieur des cellules et qu'ils séquestraient la plupart du Pb associé dans cette fraction. Similairement à leurs résultats, dans nos expériences le Th était majoritairement présent dans la fraction ND (92 à 97 %). Comme le Pb, le Th peut être retrouvé associé à ces oxydes [10]. C'est pourquoi il est probable qu'une grande partie du Th mesuré dans la fraction ND soit liée aux biomatériaux d'oxydes de Mn et de Fe à la surface des organismes en comparaison avec une possible internalisation.

Les biomatériaux d'oxydes de Mn et Fe ne sont pas les seuls ligands (autres que les ligands biotiques) à être présents à la surface des cellules de microorganismes. Des complexes métalliques ternaires pourraient se former à la surface des organismes. En effet, Morel (1983) observait que la réaction des complexes métal-EDTA à la surface des algues était étonnamment rapide et suggérait qu'un complexe ternaire tel que L-M-X-cellule (où L = EDTA) pouvait se former de manière transitoire avant que le métal ne se lie seul au site biologique X pour former M-X-cellule [11]. Campbell et al. (2002) ont observé que les CE_{50} du Cd en présence d'alanine étaient 3 à 4 fois plus faibles que le métal seul sur la croissance des algues *Pseudokirchneriella subcapitata* [12]. Les auteurs suggéraient également que le Cd en présence d'alanine pouvait non seulement former ce type de complexe ternaire, pas seulement en tant que forme transitoire,

mais en tant qu'espèce à l'équilibre pouvant induire une toxicité chez les microalgues. Comme le Cd, le Th est capable de se lier à certains acides aminés tels que l'alanine, la sérine et la thréonine, au niveau des groupes hydroxyles (-OH) [13], de même qu'à des oligopeptides susceptibles d'être retrouvés dans la matrice du biofilm [1,2]. Ainsi, il serait possible que le Th forme des complexes ternaires avec les acides aminés à la surface des cellules, mais aussi avec l'EDTA présent dans les solutions de rinçage lors des étapes du protocole de séparation des fractions du biofilm.

6.1.1.2 Adsorption du Thorium à la surface des microorganismes du biofilm

Dans le cas des organismes unicellulaires, la capacité d'un ion métallique ou d'un complexe L-M présent en solution de se lier avec les sites biologiques à la surface des cellules dépend bien évidemment de la quantité de ces sites, mais aussi de leur affinité pour le métal ou le complexe L-M. Ainsi, la composition de la membrane cellulaire joue un rôle très important dans l'interaction métal-cellule. La composition des membranes cellulaires et des parois peut être très différente d'un microorganisme à un autre et la capacité de ces derniers à adsorber les métaux est donc espèce- ou souche- (pour les bactéries, champignons et algues) dépendante [14,15]. Dans le but d'améliorer les outils de bioremédiation, notamment en cas d'accident nucléaire, l'adsorption des radionucléides tels que le Th par différentes espèces et souches de bactéries et de mycètes a fait l'objet d'un grand nombre d'études dans la littérature, et plus rarement certaines s'intéressent aux algues [16]. Même si ces études sont réalisées dans des conditions très éloignées de celles retrouvées dans les biofilms en milieu naturel (culture monospécifique, pH faibles, cellules non actives ou mortes, etc), elles nous donnent des renseignements intéressants quant aux possibles mécanismes d'adsorption pouvant se produire à la surface des microorganismes.

Bactéries et champignons

Le biofilm périphytique est connu pour être dominé par des espèces autotrophes telles que les diatomées et les cyanobactéries pour lesquelles peu de données sur l'accumulation du Th sont disponibles. Cependant, comme mentionné dans l'introduction (cf. 1.5.2), il peut également héberger une grande diversité de bactéries jouant des rôles essentiels dans la colonisation du milieu par le périphyton ainsi que dans le cycle des nutriments. Plusieurs espèces et souches de bactéries isolées à partir de biofilm ont démontré de grandes capacités d'adsorption du Th. Andres et al. (1993) mesuraient une concentration de $170 \mu\text{mol g dw}^{-1}$ de Th associé aux cellules de bactéries *Mycobacterium smegmatis* en suspension à pH = 1. Une souche de *Pseudomonas*

sp. était capable d'accumuler entre 430 et 541 mg g dw⁻¹ de Th, avec un optimum pour des pH compris entre 4 et 5 [17]. Tsuruta et al. (2004) ont étudié l'adsorption du Th concentré à 50 µM à pH = 3.5 par la bactérie gram-positive *Streptomyces levoris*, qui adsorbait un maximum d'environ 300 µmol g dw⁻¹ [18].

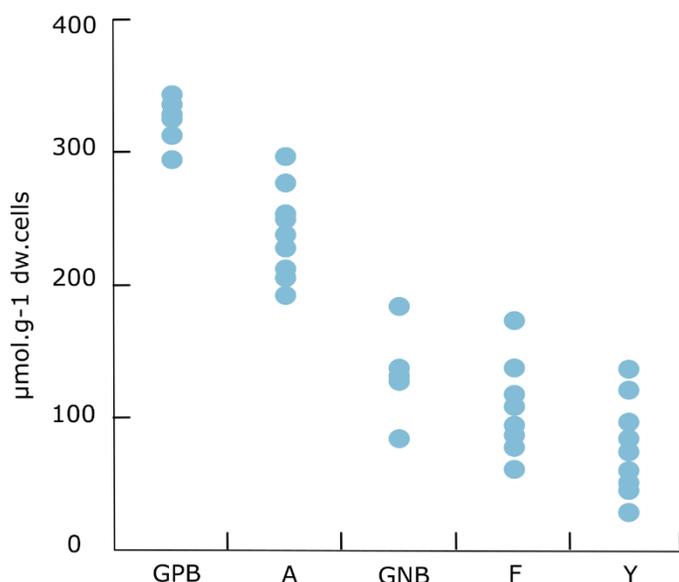


Figure 6.1. Résultats issus et traduit de Tsuruta et al. (2006) [19] : bioaccumulation du thorium par les cellules au repos de divers microorganismes suspendus dans 100 mL d'une solution à pH 3,5 contenant 50 µM de Th pendant 1 h. GPB: bactéries gram-positives, A: actinomycètes, GNB: bactéries gram- négatives, F: champignons, Y: levures

Les bactéries gram-positives semblent avoir une capacité d'adsorption plus élevée due à leurs couches de peptidoglycanes, contenant de nombreux sites d'adsorptions pour les métaux, plus épaisse que celle des gram-négatives [20,21]. Dans un autre article, les mêmes auteurs comparaient la capacité de *S. levoris* à accumuler le Th avec d'autres bactéries gram-positives, des bactéries gram-négatives et des levures [19]. Les résultats de Tsuruta et al. (2006) sont présentés dans la Figure 6.1. Les valeurs montrent effectivement que les bactéries gram-positives telles que *Micrococcus luteus*, *Arthrobacter nicotianae*, *Bacillus subtilis* et *B. megaterium* accumulaient jusqu'à environ 50 µmol g dw⁻¹ de plus que les actinomycètes, et jusqu'à trois fois plus que les bactéries gram-négatives, les mycètes et les levures. Pourtant, la biomasse des champignons est considérée comme ayant d'excellentes propriétés pour la sorption des radionucléides [22] et a montré de bonnes capacités d'accumulation des radionucléides dont le Th et également le ⁹⁵Zr [23,24]. White et Gadd (1990) ont observé l'accumulation de 90 à 95 % du Th présent par *Rhizopus arrhizus*, et *Aspergillus niger*. Ces deux

champignons étaient capables d'accumuler 0,5 et 0,6 mmol g dw⁻¹ respectivement (116 and 138 mg g dw⁻¹) lorsqu'ils étaient exposés à une solution concentrée en Th (3 mM) [24]. Les bactéries et les champignons représentent donc deux composantes biologiques du biofilm susceptibles d'avoir un rôle dans la bioaccumulation du Th dans le périphyton telle qu'observée dans ces travaux de thèse.

Microalgues

Les expériences de prise en charge à court terme présentées dans la section 2.3.1 n'ont pas abouti aux courbes d'internalisation habituellement observées, mais montraient plutôt la présence d'un phénomène d'adsorption s'opérant potentiellement à la surface des cellules algales.

Dans la littérature, il semble que peu de travaux ont été effectués sur la bioaccumulation du Th par les microalgues. Cependant, des sites potentiels de complexation des métaux sont également présents à la surface des cellules algales tels que des groupements carboxyles, phosphates, imidazoles, hydroxyles ainsi que d'autres groupes ionisables [25]. Des études ont été menées sur l'adsorption de métaux bivalents par des microalgues d'eau douce (*Chlorella vulgaris*) et marines (*Heterosigma akashiwo*) et ont montré le rôle des groupements carboxyles à la surface des cellules [26] ainsi que des sites de types carboxyliques et phosphatés dans la complexation [27] de ces éléments. Les biomasses sèches des microalgues marines *Chlorella salina* et *Isochrysis galbana* sont capables d'adsorber le Th, mais l'existence et la nature de possibles sites d'adsorption ne sont pas discutés, alors que la biomasse de *C. salina* adsorbe plus efficacement le Th que celle de *I. galbana* [28]. Peng et al. (2017) ont observé par spectroscopie de rayons X à dispersion d'énergie l'adsorption non quantifiée de Th à la surface de l'algue verte *Chlorella pyrenoidosa* [29]. Les auteurs suggéraient que le Th adsorbé était sous forme de Th(OH)₄ précipité.

Microméiofaune

La microméiofaune est un compartiment du biofilm périphytique qui a longtemps été négligé dans les études en écotoxicologie et qui pourtant peut jouer un grand rôle dans sa biodiversité et donc sa réponse aux contaminants [30,31]. Ce compartiment est composé de consommateurs primaires ayant une taille comprise entre 2 µm to 2 mm et appartenant à divers groupes taxonomiques (cf. 1.5.3.3). Cette diversité sous-entend également une diversité de potentiels d'adsorption à leur surface. Les plus gros organismes appartenant à cette communauté ont bien sûr une surface spécifique et un nombre d'individus moins important que pour les producteurs primaires, les bactéries et les champignons, ce qui induit une capacité d'adsorption moins

importante que ces derniers. Cependant, certains organismes, comme les familles de rotifères, possèdent des cuticules capables d'adsorber les métaux. Chez les rotifères, des micro-analyses aux rayons X par dispersion d'énergie ont montré que les lorica, principalement composées de chitine, permettent l'accumulation des métaux tels que le Cr et le Pb à la surface de ces organismes [32,33]. Une autre étude sur cinq espèces de rotifères et une espèce de cilié échantillonnées dans quatre sites différents a mis en évidence leur capacité à bioaccumuler des métaux présents dans le milieu (Cr, Mn, Fe, Ni, Cu, Zn, As, Pb), cependant la différence entre adsorption et internalisation n'a pas été discutée [34].

Dans le Tableau 6.2, les valeurs des coefficients de Spearman ainsi que les valeurs de p associées aux tests de corrélations nous indiquent si le nombre d'individus des différents taxons varient en fonction de la quantité de Th mesurée dans les fractions des biofilms témoins, C1 et C10. Les résultats de ces tests peuvent mener à plusieurs hypothèses. Dans le cas d'une corrélation négative, soit la présence de Th est néfaste pour l'organisme en question, soit cet organisme accumule peu le Th, ce qui défavorise la bioaccumulation du Th dans le biofilm. Cependant, les tests ANOVA réalisés sur les données de comptage de la microméiofaune nous renseignent sur les effets significatifs du Th sur le nombre d'individus (cf. chapitre 5). Ainsi, les ANOVAs effectuées n'étant pas significatives pour les organismes, on peut conclure que la corrélation observée est plutôt liée à la capacité de bioaccumulation. Les organismes de la microméiofaune ayant significativement varié dans le biofilm exposé au Th sont les ciliés totaux, *A. cicada* et les rotifères de la famille des *Philodinae*. Mais ces individus étaient retrouvés en plus grand nombre dans les conditions exposées au Th, ce qui signifie que ce dernier n'induit pas d'effet toxique ou que ces derniers sont tolérants aux expositions réalisées dans ces travaux.

Tableau 6.2. Coefficients de Spearman et p value associés aux tests de corrélation entre les concentrations de thorium mesurées dans chaque fraction du biofilm avec le nombre d'individus de chaque taxon de microméiofaune comptés dans le biofilm (n = 8).

	Th Total		Th ND		Th Désorbable		Th EPSs	
	ρ	P value	ρ	P value	ρ	P value	ρ	P value
Individus Total	-0,29	9 x10 ⁻³	-0,27	2 x10 ⁻²	-	-	-	-
Œufs de rotifère	-	-	-0,25	2 x10 ⁻²	-	-	-0,27	1 x10 ⁻²
Flagellés	-0,24	4 x10 ⁻²	-	-	-	-	-0,28	1 x10 ⁻²
Amibes	-	-	-	-	-	-	-	-
Técamébiens	-0,38	5 x10 ⁻⁴	-0,40	2 x10 ⁻⁴	-0,44	4 x10 ⁻⁵	-0,44	5 x10 ⁻⁵
Ciliés Total	-	-	-	-	0,33	3 x10 ⁻³	0,31	5 x10 ⁻³
Vorticelles	-	-	-	-	-	-	0,24	3 x10 ⁻²
<i>A. cicada</i>	-	-	-	-	0,45	3 x10 ⁻⁵	0,30	6 x10 ⁻³
Nématodes Total	-0,27	1 x10 ⁻²	-0,22	5 x10 ⁻²	-	-	-	-
Nématodes moyens	-0,36	1 x10 ⁻²	-0,32	4 x10 ⁻³	-	-	-0,24	3 x10 ⁻²
Nématodes petits	-	-	-0,25	3 x10 ⁻²	-	-	-	-

Le nombre total d'individus observés dans ces travaux était négativement corrélé avec les concentrations de Th dans le biofilm total et associées aux organismes (ND), ainsi que les nématodes, les flagellés et les técamébiens. Ces corrélations négatives pourraient être attribuées aux relations trophiques de certains organismes de la microméiofaune avec les bactéries et les algues en exerçant une pression de sélection sur les espèces qui bioaccumuleraient plus le Th. Seule la présence des ciliés (totaux, vorticelles et *A. cicada*) était corrélée avec l'augmentation du Th mesuré dans les fractions EPSs et désorbable à l'EDTA, ce qui indique qu'une partie du Th bioaccumulé dans le biofilm se trouvait complexée à la surface de ces organismes. Ainsi, les ciliés semblent faiblement favoriser la bioaccumulation du Th par le biofilm.

L'adsorption du Th par le biofilm : un mécanisme dépendant de la taxonomie

Pour résumer les propos tenus précédemment, les bactéries gram-positives et les champignons ont des propriétés d'adsorption, notamment au niveau des parois cellulaires, qui peuvent leur permettre de complexer de grandes quantités de Th dans certaines conditions. Les résultats de prise en charge à court terme sur *C. reinhardtii* indiquent que ces microalgues sont susceptibles

d'absorber le Th. Les groupements à la surface de ces microorganismes qui sembleraient être majoritairement impliqués dans la complexation du Th sont les groupes carboxyliques, hydroxyles et phosphatés. Les corrélations négatives du nombre d'individus de la microméiofaune avec la présence de Th indiquent que ces organismes jouent un rôle défavorable dans l'accumulation de ce métal, notamment par le biais de la prédation des espèces accumulatrices (bactéries, algues, champignons). Ainsi nous pouvons émettre l'hypothèse que, dans le biofilm, bactéries, champignons et microalgues, vivants ou morts, ont un rôle important et prédominant dans l'adsorption du Th et du Zr.

6.1.2 Accumulation du thorium par internalisation à l'intérieur des cellules

La majorité des études effectuées sur le Th et les microorganismes se sont focalisées sur la capacité de ces derniers à adsorber ce métal, mais peu se sont intéressées à son internalisation [35–38]. Une des raisons de cette lacune est que la spéciation des métaux tétravalents et son influence sur leur prise en charge par les organismes d'eau douce est encore mal comprise. Dans les eaux naturelles, la spéciation du Th et du Zr est encore difficile à appréhender dû à un manque de constantes de complexation (cf. Annexes IV et V), notamment en ce qui concerne les carbonates. Cependant, plusieurs publications s'accordent pour dire que l'ion Th^{4+} est quasiment inexistant dans les eaux douces naturelles et que le Zr est biologiquement inerte, c'est-à-dire n'interagissant pas et n'induisant pas d'effet toxique sur les organismes (cf. introduction 1.3 et 1.4). Dans les parties suivantes, des expériences dans ces travaux de thèse suggérant que le Th est internalisable par les algues modèles, les capacités de certaines formes chimiques du Th à pénétrer dans les cellules seront discutées.

Gadd et White (1989) ont étudié la prise en charge du Th par les levures *Saccharomyces cerevisiae* exposées à 20 μM de Th à pH 6.5 pendant 90 min. Après filtration et lavage à 0,1 M de Na_2CO_3 pour désorber le Th associé à l'extérieur des cellules, le métal a été mesuré par scintillation liquide [39]. Les auteurs ont observé une courbe similaire à celle de prise en charge d'autres cations métalliques, avec une première phase d'adsorption et une seconde correspondant normalement à un transport intracellulaire médié. Les micrographies obtenues au microscope électronique confirmaient la présence du Th dans les cellules au niveau des granules. L'absence de stimulation de la prise en charge avec la présence de 50 mM de glucose dans le milieu permettait aux auteurs de conclure que la prise en charge du Th n'était pas dépendante de l'activité métabolique et de l'attribuer à des phénomènes de transport passif, répondant avec la majorité des métaux.

Dans un article sur les mécanismes de séquestration du Th et de l'U par *Pseudomonas* sp., Kazy et al. (2008) ont également démontré la présence de nanoparticules de Th dans le cytoplasme par microscopie dense aux électrons et analyses aux rayons X à dispersion d'énergie à la suite d'une exposition de 12 h à 430 μM (100 mg L^{-1}), à pH = 4,0. Les auteurs concluaient également que cette internalisation était indépendante du métabolisme cellulaire et qu'il résultait d'une perméabilisation membranaire causée par le Th et facilitant son entrée [40]. Dans ces mêmes travaux, le Th était été en partie associé aux phosphates ce qui pourrait être en cohérence avec le Th trouvé associé aux granules dans les expériences Gadd et White [39] et celles de fractionnement réalisées dans ces travaux de thèse. Cependant, Peng et al. (2017) ont montré par microscopie électronique à balayage (SEM) et microscopie électronique en transmission (TEM) que le Th se retrouvait sous forme de $\text{Th}(\text{OH})_4$ nanoparticulaire dans les cellules de *C. pyrenoidosa* [29].

La microméiofaune étant peu étudiée en comparaison avec d'autres taxons tels que les microalgues ou les bactéries, il n'est pas surprenant de peiner à trouver des informations sur l'internalisation du Th par ce compartiment du biofilm. Dans une publication de Barbeau et al. (2001), les auteurs ont étudié la remobilisation du Th associé à des bactéries (*Halomonas halodurans*) dans le milieu de culture par broutage de trois protistes marins dont deux flagellés (*Cafeteria* sp. et *Paraphysomonas imperforata*) et un cilié (*Uronema* sp.) [41]. Une désorption significative du Th associé aux bactéries d'environ 40 % était observée dans les conditions d'exposition en absence de protistes, ce qui sous-entend que l'exposition des protistes était à la fois trophique et directe. *Cafeteria* sp. était l'espèce remobilisant le plus de Th avec une remobilisation de 42 % du métal initialement associé aux bactéries sous forme dissoute ($<0,2 \mu\text{m}$) alors que *P. imperforata* en remobilisait seulement 2 % et les valeurs d'*Uronema* sp. se situaient entre les deux avec 20 %. Les résultats d'ultrafiltration montraient également que le Th remobilisé dans la fraction dissoute était associé à des complexes organiques de faibles et hauts poids moléculaires [41]. Ainsi, les organismes de la microméiofaune pourraient grandement influencer la biogéochimie du Th dans le biofilm et contribuer à sa remobilisation dans les écosystèmes aquatiques. Dans cette même étude, les auteurs n'ont pas déterminé l'assimilation du Th par ces microorganismes, cependant ils ont observé une redistribution similaire entre le Fe et le Th dans les fractions particulières et dissoutes obtenues après le broutage. Contrairement à ce qui est généralement observé par d'autres études concernant les brouteurs métabozoaires où de fortes corrélations étaient établies entre la présence des éléments traces dans le cytoplasme des proies et leur assimilation [42–44], ce constat les amenait à conclure que la localisation du

métal au niveau de la cellule (internalisé et/ou adsorbé à la surface chez les bactéries) ne jouait pas de rôle dans leur allocation pendant le broutage.

Ces études ont démontré l'internalisation du Th par les bactéries, les champignons et les algues auxquels s'ajoutent les résultats obtenus dans ces travaux de thèse sur l'algue verte *C. reinhardtii*. Cependant, les mécanismes menant à cette internalisation demeurent difficiles à identifier, et cette difficulté est notamment liée au manque de données concernant la complexation du Th aux ligands naturels dans des conditions environnementales. Dans les trois publications présentées plus haut, Gadd et White (1989), Kazy et al. (2008) et Peng et al. (2017) suggéraient que le transport du Th s'effectuait, sans toutefois pouvoir le démontrer, émettant l'hypothèse d'une perméabilisation membranaire dans le cas des levures et des bactéries qui permettrait au Th de diffuser passivement à l'intérieur des cellules [29,39,45].

Dans ces travaux de thèse, il a été démontré que les organismes du biofilm étaient capables de bioaccumuler le Th. Cependant, les individus de la microméiofaune ne favorisaient pas l'accumulation du Th. Ainsi, d'autres compartiments biologiques du biofilm tels que les microalgues, les bactéries et les champignons sont responsables de cette bioaccumulation. L'internalisation du Th par ces derniers est susceptible de mener à la contamination des consommateurs par voie trophique. La répartition subcellulaire des éléments traces dans les proies est connue pour affecter leur assimilation par les consommateurs métazoaires [42–44].

6.1.3 Transfert trophique du thorium chez les consommateurs primaires

Qu'il s'agisse de métaux essentiels (Cu, Zn, Se) ou non (Hg, Cd), les métaux associés aux producteurs primaires peuvent être transférables du biofilm vers les brouteurs [46,47]. Mais leur bioamplification n'a été observée pour le moment que dans les cas du Hg et du Se [48–50].

Dans le chapitre 5, les biofilms périphytiques témoins et exposé pendant 4 semaines à 10 nM de Th présentés dans le chapitre 4 ont été donnés comme source de nourriture à des gastéropodes *Lymnaea* sp. Les mesures du Th dans les escargots ont démontré que ces derniers étaient effectivement capables de bioaccumuler le métal contenu dans le périphyton. Cependant, aucune analyse n'ayant été faite sur la répartition du Th dans les tissus de l'escargot, il est impossible de conclure si le métal a été internalisé ou bien est resté adsorbé dans le tractus digestif.

Le transfert trophique des métaux des proies aux prédateurs métazoaires, comme mentionné précédemment, dépend de la spéciation subcellulaire, mais aussi de la capacité digestive des prédateurs [51]. Les gastéropodes sont connus pour avoir de grandes capacités digestives [52],

ainsi ces organismes sont susceptibles d'assimiler les métaux présents dans leur nourriture même lorsque ces derniers sont associés à des granules intracellulaires. Précédemment, le Th a été décrit comme présent à l'intérieur des cellules sous forme de granules dans les levures *S. cerevisiae* et les bactéries *Pseudomonas* sp., et représentait 14 % du total intracellulaire chez les algues vertes *C. reinhardtii*. Une fraction de 26 % était également associée aux organites dans les microalgues. Il est donc envisageable qu'une partie du Th mesuré ait été assimilée par les gastéropodes.

Pour conclure, l'accumulation des métaux par les organismes n'induit pas toujours un effet chez ces derniers. Si pour Newman et Jagoe (1994), la biodisponibilité d'un métal est sa capacité à être internalisé et/ou adsorbé par les organismes, la définition de Campbell (1995) nécessite l'internalisation du métal dans les cellules et/ou aussi l'induction d'un effet sur ces dernières, parfois indépendamment de l'internalisation [53,54]. Il semblerait que les mécanismes de bioaccumulation principaux concernent l'adsorption et l'internalisation du métal au niveau des organismes. Le Th ainsi présent dans le biofilm a été observé trophiquement accumulable par le gastéropode *Lymnaea* sp. Si l'internalisation des métaux par les prédateurs dépend de leur répartition subcellulaire dans les proies, il est évident que la composition taxonomique du biofilm joue un rôle clef dans l'efficacité du transfert trophique. Ainsi, pour mieux comprendre les effets de la présence du Th sur les organismes aquatiques, il est nécessaire d'étudier son influence sur la structure des communautés du biofilm périphytique.

6.2 Perturbation des structures des communautés benthiques exposées aux Th et au Zr

Au cours des expériences menées sur le biofilm périphytique exposé au Th ou au Zr, des changements structuraux ont pu être observés dans les différentes communautés de microorganismes. Ces changements pouvaient se traduire par la diminution ou bien une augmentation du nombre d'individus total ou de l'abondance relative de certaines espèces. Dans le cas d'une diminution, plusieurs hypothèses peuvent expliquer l'effet du métal sur les microorganismes périphytiques (Figure 6.2) . Il peut s'agir d'un effet toxique direct causé par l'interaction du métal avec un site biologique sensible à l'intérieur ou à l'extérieur des microorganismes [55]. Cependant, le biofilm est un ensemble complexe d'organismes pouvant avoir des relations très diverses les uns avec les autres (symbiose, facilitation, compétition, relations trophiques...) [31,56,57]. Il est difficile d'avoir en même temps une vision d'ensemble de tous les organismes présents, notamment en ce qui concerne la microméiofaune. Ainsi, la baisse du nombre d'individus d'une première espèce peut être également attribuée à des effets indirects,

c'est-à-dire à un effet direct du Th sur une ou plusieurs autres espèces ayant des relations écologiques étroites avec la première (relation trophique, symbiotique, relation de compétition pour les ressources, etc.) [58]. Dans le cas d'une augmentation du nombre d'individus ou de l'abondance relative, comme le Th et le Zr ne jouent aucun rôle biologique connu, il ne peut s'agir que d'effets indirects.

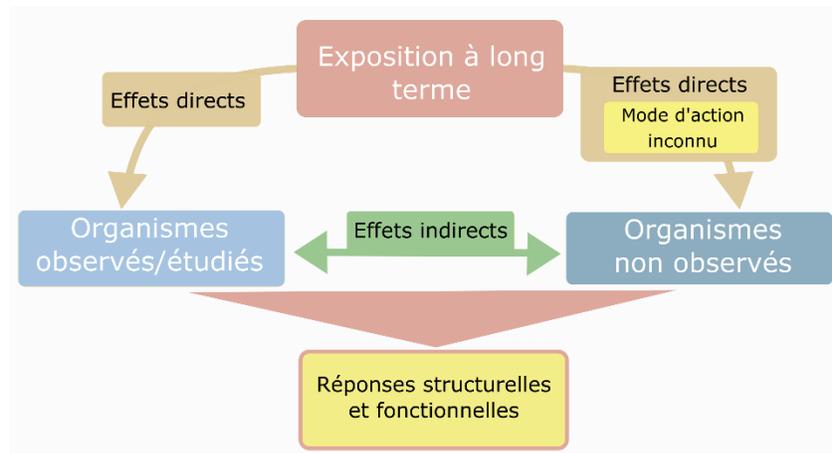


Figure 6.2. Schéma illustrant les effets directs et indirects pouvant intervenir dans les communautés périphytiques soumise à une contamination inspiré de Proia et al. (2012) [59]

Dans cette partie, les effets directs et indirects des deux métaux tétravalents seront présentés ensemble en gardant l'idée en tête que les conditions expérimentales étaient tout de même différentes (condition lentique pour le Zr, lotique pour le Th, luminosités différentes, biofilms provenant de deux continents différents, etc).

6.2.1 Effets du thorium et du zirconium sur les communautés autotrophes

Effets du zirconium

Comme présenté dans le chapitre 4, l'exposition au Zr ($2,9 \pm 0,3$ nM) affectait la communauté autotrophe du biofilm par une réduction de la chlorophylle totale, de croissance des diatomées, confirmée par une réduction de la Chl associée aux algues brunes. En parallèle, une augmentation de Chl correspondant aux algues vertes avait été observée dans les mêmes conditions d'exposition.

Effets du thorium

Les augmentations de la croissance des diatomées dans les expositions au Th étaient similaires pour les conditions intermédiaire ($C1 = 0,18 \pm 0,09$ nM) et maximale ($C10 = 8,7 \pm 3,4$ nM), et ont été observées dès la deuxième semaine d'exposition. Ces effets étaient principalement indirects, car, alors que dans le témoin une baisse significative du nombre d'individus s'opérait à deux semaines, les valeurs avaient légèrement augmenté dans les deux autres conditions.

En ce qui concerne la taxonomie, le Th a démontré des effets sur les structures des communautés diatomiques, avec notamment l'augmentation des abondances d'*Achnanthidium exiguum* (ADEG) et *Stauriforma exiguiformis* (SEXG) et la diminution de celle de *Eolimna minima* (EOMI), habituellement décrite comme tolérante aux contaminants [60]. Finalement, une diminution des cyanobactéries du genre *Pseudanabaena* a été observée en présence de Th.

Le Th et le Zr ont eu des effets différents sur la communauté de diatomées. Alors que le premier semble induire un effet indirectement positif sur le nombre total d'individus, le Zr affectait négativement de façon significative la croissance des diatomées. Ceci peut être expliqué par la différence de composition des communautés initiales. Malgré cet apparent effet positif du Th sur le nombre d'individus, la diversité des diatomées avait tendance à être plus faible dans les conditions exposées et des espèces telles que EOMI semblaient sensibles à la présence du métal. Les deux métaux induisaient cependant des effets négatifs sur les cyanobactéries observées dans ces travaux, avec une diminution de l'abondance de *Pseudanabaena* pour le Th et une tendance à la diminution de la Chl *a* pour le Zr.

6.2.2 Effets du thorium et du zirconium sur les communautés hétérotrophes

Effets du zirconium sur la microméiofaune

L'effet de la présence du Zr sur la microméiofaune était dépendant du temps d'exposition et de sa concentration. À la deuxième semaine d'exposition, dans les conditions d'exposition à 2.9 ± 0.3 nM, le nombre total de ciliés a significativement augmenté menant à une augmentation du nombre d'individus de la microméiofaune totale observée. Cependant, le cilié *Aspidisca cicada* ne suivait pas cette augmentation et au contraire, semblait sensible à la présence du métal à la deuxième semaine d'exposition. Le nombre de rotifères était plus faible dans les milieux contenant du Zr et suivaient des tendances concentration-réponse à la première et deuxième semaine d'exposition. Une baisse marquée de l'oviposition de ces derniers à la première semaine

a également été observée, suggérant que le Zr pourrait être toxique pour ces rotifères dans ces conditions.

Contrairement à la communauté autotrophe, la microméiofaune semblait réagir à la présence du Zr essentiellement à la deuxième semaine d'exposition alors que les nombres d'individus n'étaient plus significativement différents à la dernière semaine d'exposition. Mais le nombre total d'individus à la quatrième semaine tendait à être plus faible dans le milieu contenant la plus forte concentration de Zr comparée aux deux autres milieux. Les effets observés sur la microméiofaune à la deuxième semaine pourraient être la conséquence de la toxicité du Zr sur les organismes autotrophes dont ils se nourrissent. Les effets indirects étant observés plus tard car dépendant du temps de réponse des autotrophes à l'exposition. Mais ce pourrait être également un effet direct de l'exposition par la colonne d'eau au Zr, les organismes s'intoxiquant plus lentement, car leur constitution étant plus complexe.

Effets du thorium sur la communauté bactérienne hétérotrophe

À la deuxième semaine d'exposition, des bactéries du genre *Sphingopyxis* étaient significativement plus abondantes dans le témoin que dans les conditions exposées au Th. Ce genre récemment créé par Takeuchi et al. (2001) regroupe des bactéries Gram-négatives, aérobies non-fermentatives, ne formant pas de spores et pouvant être motiles ou non [61]. Ces bactéries sont capables de synthétiser des glycosphingolipides [62]. Le genre a été observé capable de dégrader plusieurs contaminants organiques tels que les hydrocarbures aromatiques polycycliques (HAPs) [63], des huiles brutes, du diésel et du kérosène [64] et de l'alcool polyvinyle [65]. Une étude sur la biorémédiation du chromate (Cr (VI)) par une bactérie du genre *Sphingopyxis* (*Sphingopyxis macrogoltabida* SUK2c) a montré la capacité de la biomasse de ces dernières à réduire et complexer le Cr. Les auteurs ont observé que ce métal était lié et réduit par des groupements (-NH), (-COOH) et (P=O) présents dans les glycosphingolipides, les protéines de surface et la fine couche de peptidoglycane de ces bactéries [62]. Comme le Th, le Cr est un métal de classe A, se liant préférentiellement aux atomes N, O et F. Il est alors possible d'imaginer que le Th puisse suivre un mécanisme de complexation similaire à la surface des bactéries du genre *Sphingopyxis* observées dans ces travaux de thèse et que la sensibilité de ces bactéries puisse en partie être liée à leur capacité de bioaccumuler le Th.

Une autre hypothèse développée dans le chapitre 5 mentionnait un effet du Th sur les cyanobactéries du genre *Pseudanabaena* capables de produire des microcystines. Ces cyanotoxines servant de substrat pour des bactéries du genre *Sphingopyxis*, un effet du Th sur

la présence de ces toxines (par réduction de la synthèse ou par réduction de la croissance de la cyanobactérie) pourrait indirectement affecter la présence de ces bactéries (cf.5.3.3).

L'analyse taxonomique au moyen de la technique ADNr 16s a permis de suivre la diversité bactérienne et de pouvoir mettre en évidence des changements structuraux. Cependant cette technique reste assez coûteuse et serait difficilement applicable en routine dans le cadre de suivis de la contamination et de la qualité des eaux, du moins pour le moment. Le nombre de copie de l'ADN 16s variant de 1 à 7 chez les espèces de bactéries, cette différence peut induire des biais et les bases de données possèdent parfois des lacunes nécessitant d'être prudent dans l'interprétation des données. De plus, les analyses sur les fonctions des communautés bactériennes sont parfois plus appropriées pour comprendre l'effet des répercussions d'un changement de ces communautés dû à une contamination. Les résultats obtenus dans ces travaux ont tout de même permis de montrer que l'exposition au Th, pour des concentrations environnementalement réalistes, induisait des changements structuraux dans les communautés bactériennes.

Effet du thorium sur la microméiofaune

Les deux taxons du biofilm ayant répondu à l'exposition au Th dans le biofilm sont les rotifères (*Philodinidae*) et les ciliés, notamment *Aspidisca cicada*. Contrairement aux expériences menées avec le Zr, le nombre d'individus de ces taxons était significativement plus élevé lors de la deuxième semaine en présence de Th. Ceci pouvait être expliqué par des effets indirects provenant des changements structuraux des communautés diatomiques et bactériennes en présence du métal.

Les travaux de Barbeau et al. (2001) présentés précédemment (cf.6.1.2) montraient que le Th adsorbé aux bactéries pouvait être remobilisé par le cilié *Uronema* sp. ou par des flagellés tels que *Cafeteria* sp. dans des formes solubles potentiellement disponibles pour les organismes du biofilm [41]. Les flagellés représentaient $58,3 \pm 8,1$ % des individus de la microméiofaune observée et ne semblaient pas affectés par les expositions au Th. Ainsi, l'exposition au Th pourrait non seulement changer la pression de broutage exercée par la microméiofaune sur les bactéries et microalgues en modifiant sa structure taxonomique, mais certains organismes tolérants à l'exposition pourraient également remobiliser le métal adsorbé sur les microorganismes consommés dans des formes potentiellement biodisponibles.

Dans le cas du Zr, si *A. cicada* était sensible à l'exposition contrairement au Th, d'autres genres ou familles de ciliés semblaient également profiter d'un effet indirect favorable à leur croissance tels que *Uronema* sp. et pourraient être également à l'origine d'une remobilisation de cet élément.

Dans les expériences menées sur le biofilm au cours de ce doctorat, le Th et le Zr se sont montrés perturbateurs dans la structure des communautés microbiennes périphytiques pour des concentrations environnementalement réalistes. Si ces travaux ne permettent pas de comprendre l'ensemble des mécanismes menant aux effets observés, des hypothèses ont été discutées au regard des informations encore rares sur les effets des métaux tétravalents dans la littérature et suggèrent des pistes de recherche pour les études à venir.

6.2.3 Application à l'évaluation et au biosuivi des contaminations métalliques

Les outils de biosuivi des contaminations métalliques utilisant le biofilm peuvent faire appel à de multiples techniques et sur n'importe quel niveau d'organisation biologique (cf. introduction 1.5.3). Les suivis biologiques à l'échelle des communautés ont deux prérequis principaux, 1) que leur composition reflète les conditions environnementales locales et, 2) que les espèces qui la composent aient des sensibilités ou tolérances variables aux contaminants menant à des changements structuraux et fonctionnels dans les sites exposés [66]. Cette approche a notamment mené à l'établissement d'indices aujourd'hui appliqués tels que les indices diatomées (IDEC et IBD). Ces indices offrent des exemples prometteurs pour l'application d'outils similaires au suivi des contaminants métalliques, notamment grâce à l'observation des déformations de frustules [67,68]. Dans ces travaux de thèse, les expositions au Th ont montré que la structure taxonomique des communautés diatomiques pouvait être perturbée, et celle au Zr affectait leur croissance. Les changements structuraux observés dans la microméiofaune et au niveau de la communauté bactérienne pourraient être également utilisés à ces fins. Ces résultats montrent que, comme pour d'autres métaux, l'observation des changements structuraux des communautés périphytiques couplés à d'autres mesures, représente une bonne alternative pour le suivi des effets des métaux tétravalents.

Cependant, comme discuté précédemment, il est difficile d'interpréter les changements taxonomiques quant aux effets directs et indirects liés à l'exposition [69,70]. Les mesures des effets à l'échelle globale du biofilm comme la bioaccumulation, la génération du stress oxydatif, etc, peuvent permettre d'évaluer la réponse globale du biofilm périphytique et de s'affranchir des qualités directes ou indirectes des effets [58]. Dans ces travaux de thèse, le Th a été démontré

comme bioaccumulable dans différentes fractions du biofilm et des relations entre la présence de certaines espèces de la microméiofaune et l'accumulation ont pu être discutées.

Le biofilm périphytique semble donc être un outil potentiellement applicable pour le biosuivi des effets des métaux tétravalents. Le Th et le Zr ne sont pas les seuls métaux tétravalents à avoir montré des effets sur les communautés périphytiques. Le titane, un autre métal tétravalent, utilisé sous forme de nanoparticules (TiO₂-NPs) considérées par l'OCDE comme un nanomatériau prioritaire pour évaluation écotoxicologique, a été démontré comme perturbateur des communautés bactériennes et algales et également comme générant des réponses toxiques telles que de la peroxydation lipidique (LPO) dans les biofilms [71,72]. Pour continuer sur la lancée de ces travaux, il serait intéressant d'étudier les effets des métaux tétravalents sur les fonctions écosystémiques du biofilm.

6.3 Effet de la perturbation des communautés périphytiques exposées au thorium sur la qualité nutritionnelle du biofilm

6.3.1 Liens entre les communautés et la qualité nutritionnelle

Les protéines et les lipides sont deux composants majeurs du périphyton essentiels pour les consommateurs primaires, représentant 12 à 30 % et 2 à 9 % de la biomasse sèche du biofilm respectivement [73]. Les protéines et les polysaccharides de la matrice sont une source de nutriments pour les microorganismes du biofilm périphytique. Sur des échelles trophiques plus grandes, la composition des profils en acide gras des microorganismes benthiques est connue pour jouer un grand rôle dans la qualité nutritionnelle, car, les métazoaires ne possédant pas les enzymes permettant de synthétiser les acide gras polyinsaturés (PUFAs) *de novo*, il leur est nécessaire de les trouver dans leur nourriture [74,75].

Les variations de la qualité nutritionnelle du périphyton sont connues pour dépendre en grande partie de la succession microbienne [76]. C'est pourquoi, dans le tableau 6.3 les valeurs des coefficients de Spearman ainsi que les valeurs de p associées aux tests de corrélations nous indiquent si les quantités de protéines et de polysaccharides mesurées dans les fractions des biofilms témoins, C1 et C10, varient en fonction du nombre d'individus des différents taxons de la microméiofaune. Le nombre d'individus total de la microméiofaune comptée, et notamment les vorticelles, étaient positivement corrélées avec les protéines mesurées dans la fraction associée aux organismes (ND). Les técamébiens et les flagellés étaient également positivement corrélés avec les protéines totales du biofilm, ce qui signifie que leur présence augmente la richesse nutritionnelle. Les ciliés totaux ainsi que les vorticelles étaient négativement corrélés avec les

protéines et les polysaccharides mesurés dans le biofilm total, mais étaient positivement corrélés avec les polysaccharides mesurés dans la fraction ND (associé aux organismes).

Tableau 6.3. Coefficients de Spearman et p value associés aux tests de corrélation entre les concentrations de protéines et de polysaccharides mesurées dans chaque fraction du biofilm avec le nombre d'individus de chaque taxon de microméiofaune comptés dans le biofilm (n = 8). Abréviations : fraction non désorbable (ND), individus total (Ind Tot), Nema Tot (nématodes total), Nema G (grand nématode), Nema M (nématode moyen), Nema P (petit nématode).

	Protéines Total		Protéines ND		Polysaccharides Total		Polysaccharides ND	
	Coef	P value	Coef	P value	Coef	P value	Coef	P value
Ind Tot	-	-	0,31	0,5 x 10 ⁻²	-	-	-	-
<i>Philodinae</i>	-	-	-	-	-	-	-0,23	0,04
<i>L. patella</i>	-	-	-	-	-0,35	0,1 x 10 ⁻²	-0,30	0,7 x 10 ⁻²
Rotif. œuf	-	-	-	-	-	-	-	-
Flagellés	0,36	0,1 x 10 ⁻²	-	-	-	-	-	-
Amibe	-	-	-	-	-0,34	0,2 x 10 ⁻²	-0,31	0,5 x 10 ⁻²
Técamébiens	0,37	0,9 x 10 ⁻³	-	-	-	-	-	-
Ciliés Totaux	-0,49	3,2 x 10 ⁻⁶	-	-	-0,31	0,3 x 10 ⁻²	-0,44	4,4 x 10 ⁻²
Vorticella	-0,36	0,1 x 10 ⁻²	0,32	0,004	-0,57	4,5 x 10 ⁻⁸	0,6	8,3 x 10 ⁻⁶
Cilié X1	-	-	-0,23	0,04	-	-	-	-
<i>A. cicada</i>	-0,49	3,2 x 10 ⁻⁶	-	-	-	-	-0,30	0,6 x 10 ⁻²
Nema. Tot	-	-	-	-	-0,28	0,01	-0,35	0,2 x 10 ⁻²
Nema. G	-0,29	0,8x 10 ⁻²	-	-	-	-	-	-
Nema. M	-	-	-	-	-	-	-	-

Comme observé dans ces travaux, les variations de la qualité nutritionnelle du périphyton sont connues pour dépendre en grande partie de la composition taxonomique microbienne [76]. En effet, les diatomées sont riches en PUFAs [77], alors que les cyanobactéries le sont un peu moins et que la plupart des bactéries, bien que riches en lipides, n'en contiennent généralement pas [78]. Dans le réseau trophique microbien, les ciliés et les flagellés, qui sont les consommateurs principaux des bactéries, sont considérés comme d'importants producteurs de PUFAs [79]. Les nématodes peuvent aussi être d'importants bactérivores et fournir de grandes quantités de PUFAs [80–82].

Les mesures d'acides gras effectuées dans les biofilms témoins et exposé à $8,7 \pm 3,4$ nM lors de la 4^e semaine d'exposition ne montraient pas de différences significatives en teneurs d'acide gras saturés (SFAs), acide gras monoinsaturés (MUFAs) et PUFAs totaux. Il est intéressant de

remarquer que les principaux effets sur la structure taxonomique des communautés périphytiques ont eu lieu à la 2^e semaine d'exposition et qu'à la 4^e semaine, les biofilms témoins et exposés semblent de nouveau similaires, excepté pour la composition bactérienne. Ainsi, l'atténuation des principaux changements taxonomiques observés pourrait expliquer l'absence de différence en teneurs d'acides gras entre les conditions. Cependant, des teneurs de C20:4n6, plus connu sous le nom d'acide arachidonique, étaient significativement plus faibles dans la condition exposée que dans les témoins. D'autres acides gras polyinsaturés et monoinsaturés suivaient la même tendance.

Les ciliés et les flagellés sont positivement corrélés aux éléments nutritifs tels que les protéines, les polysaccharides et les PUFAs. Les protistes hétérotrophes sont connus pour avoir des ratios C:N faibles, ce qui suggère que ces derniers sont une bonne source de composés riches en azote comme les acides aminés ou les protéines [83]. Dans la littérature, certains nématodes sont également associés à des teneurs élevées de PUFAs, mais dans ces travaux de thèse ils étaient plutôt corrélés avec une baisse des protéines totales du biofilm. Malheureusement, les analyses des acides gras et le comptage de la microméiofaune n'ont pas été effectués sur les mêmes échantillons, mais sur des prélèvements différents. De ce fait, les tests de corrélations ne peuvent pas être établis entre ces deux types de données. Celles de taxonomie concernant les diatomées ont été collectées sur des échantillons composites et la variabilité des données concernant les bactéries ne permettait pas non plus de réaliser les tests de corrélation.

6.3.2 Effets des changements nutritionnels chez le brouteur *Lymnaea* sp.

Dans les parties précédentes, il a été montré que le Th était capable d'être bioaccumulé par les organismes du biofilm, de modifier sa qualité nutritionnelle et d'être transférable par voie trophique au brouteur *Lymnaea* sp. Ainsi, la présence du thorium dans le biofilm peut avoir deux conséquences, la première étant d'intoxiquer l'escargot et la seconde de lui fournir diète moins nutritive comme cela a été observé pour le Ni [84]. La baisse de la qualité nutritionnelle pouvant affecter la santé de l'escargot et le rendre potentiellement plus sensible à la toxicité du Th.

Les consommateurs primaires sont le premier maillon de la chaîne trophique et sont une source de nourriture à leur tour pour les maillons supérieurs. Il a été montré dans la littérature que les herbivores et notamment des protistes contenaient de plus grande quantité de composés initialement présents dans leurs nourritures tels que les protéines, les acides taniques et les sucres digestibles [85]. Les acides gras sont également connus pour être trophiquement transférables, ce qui a mené à l'établissement d'indices basés sur ces derniers pour caractériser

les chaînes trophiques [86]. Ainsi, s'ils ne sont pas ou pas suffisamment bioaccumulés par ces consommateurs primaires, cela peut générer des perturbations sur tous les maillons de l'écosystème aquatique [87].

Si les sommes des SFAs, MUFAs et PUFAs n'étaient pas significativement différentes entre les biofilms, les escargots nourris au biofilm exposé au Th contenaient significativement moins de PUFAs, avec notamment moins de C20:2n6 et C22:5n3 que le biofilm témoin. Ces baisses pouvant être dues à une LPO générée par l'exposition au Th durant et après la prise de nourriture [88–91]. Une baisse significative de la masse du corps mou des brouteurs dans la condition exposée au Th montrait que ces derniers se nourrissaient moins lorsque le biofilm contenait du métal ou que l'apport en nutriment du biofilm n'était pas suffisant. La baisse des acides gras C20:2n6 et C22:5n3 dans les escargots exposés, connus pour être essentiels aux métabolismes des consommateurs métazoaires, pourrait altérer leur santé et leurs aptitudes ainsi que celles de leurs prédateurs [87,92,93]. La perturbation de la qualité nutritionnelle du biofilm exposé au Th peut engendrer des effets sur les consommateurs primaires tels que *Lymnaea* sp. et ces effets sont susceptibles de se répercuter sur l'ensemble de la chaîne trophique de l'écosystème aquatique.

6.4 Conclusion

Cette thèse avait pour but d'étudier les effets de deux métaux tétravalents (Th, Zr) sur les microorganismes périphytiques et de discuter du potentiel de leurs répercussions sur les écosystèmes d'eau douce.

Le fractionnement subcellulaire chez les microalgues modèles confirme la présence de Th dans le milieu intracellulaire et son association avec les organites suggère une atteinte de sites sensibles chez *C. reinhardtii*. Dans le biofilm, le Th est majoritairement associé aux organismes, soit internalisé comme pour la microalgue modèle, soit adsorbé à leurs surfaces membranaires. Les organismes de la microméiofaune paraissent négativement corrélés avec la présence de Th total et lié aux organismes, ce qui suggère que les communautés fongiques, bactériennes et algales sont plus responsables de la bioaccumulation du Th par le biofilm que ces derniers. Cependant, les protistes de la microméiofaune pourraient jouer un rôle de remobilisation du Th adsorbé à la surface des bactéries ou des microalgues dans des formes plus solubles.

Les qualités nutritives du biofilm sont également altérées par la présence du Th au niveau de la synthèse d'acides gras, des protéines et des polysaccharides. Certaines valeurs nutritives sont corrélées aux flagellés et aux ciliés, reportés également comme riches en acides gras essentiels

dans la littérature. Lors des expériences de transfert trophique du biofilm vers l'escargot *Lymnaea* sp., une accumulation de Th dans les tissus mous de l'escargot s'accompagnait d'une réduction des PUFAs. Ainsi, le Th affectait les brouteurs du biofilm en le contaminant lors de la prise de nourriture, mais également en fournissant des qualités nutritives amoindries comparées à celles d'un biofilm témoin.

Ces travaux de thèse sont parmi les rares à avoir étudié les effets de métaux tétravalents sur les microorganismes d'eau douce. Ce sont les seuls, à notre connaissance, à s'intéresser aux réponses des différents compartiments biologiques du biofilm périphtyque, et notamment la microméiofaune, en présence de Th et du Zr. La faible abondance d'études en ce sens est sûrement explicable par la chimie complexe et la faible solubilité de ces deux métaux. Cependant, il est intéressant d'observer que le Zr, qui est pourtant souvent déclaré comme biologiquement inerte, a été capable, dans nos conditions expérimentales, d'induire des effets significatifs sur la structure des communautés benthiques. Les perturbations induites par les expositions à des concentrations de Th environnementalement réalistes ont montré que ses effets et sa bioaccumulation dans le biofilm pouvaient avoir des conséquences sur les communautés périphtyques, mais également sur les maillons de la chaîne trophique supérieurs. La contamination des eaux au Th pourrait donc grandement affecter les écosystèmes aquatiques. Ainsi, ces travaux encouragent fortement à la poursuite de la recherche sur l'écotoxicité des métaux tétravalents dans les milieux d'eau douce.

BIBLIOGRAPHIE DISCUSSION GÉNÉRALE

- [1] J. Wingender, T.R. Neu, H.-C. Flemming, Microbial extracellular polymeric substances: characterization, structure, and function, (1999) 258. <https://doi.org/10.1007/BF00582584>.
- [2] F. Kiani, A.A. Rostami, S. Sharifi, F. Gharib, Complex formation of thorium(IV) Ion with glycyl-glycine and glycyl-valine, J. Chem. Eng. Data. 54 (2009) 3247–3251. <https://doi.org/10.1021/je9002288>.
- [3] A. Shukla, P. Parmar, D. Goswami, B. Patel, M. Saraf, Characterization of novel thorium tolerant *Ochrobactrum intermedium* AM7 in consort with assessing its EPS-thorium binding, J. Hazard. Mater. 388 (2020) 122–147. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2020.122047>.
- [4] C.S. Chan, G. De Stasio, S.A. Welch, M. Girasole, B.H. Frazer, M. V. Nesterova, S. Fakra, J.F. Banfield, Microbial polysaccharides template assembly of nanocrystal fiber, Science, 303 (2004) 1656–1658. <https://doi.org/10.1126/science.1092098>.
- [5] H. Tan, G. Zang, P.J. Heaney, S. Webb, W. Burgos, Mineralogical characterization of manganese oxides in mine water treatment systems, Appl. Geochem. 25 (2010) 389–399.
- [6] E.A. Haack, L.A. Warren, Biofilm hydrous manganese oxyhydroxides and metal dynamics in acid rock drainage, Environ. Sci. Technol. 37 (2003) 4138–4147. <https://doi.org/10.1021/es026274z>.
- [7] F. Luan, C.M. Santelli, C.M. Hansel, W.D. Burgos, Defining manganese(II) removal processes in passive coal mine drainage treatment systems through laboratory incubation experiments, Appl. Geochem. 27 (2012) 1567–1578. <https://doi.org/10.1016/j.apgeochem.2012.03.010>.
- [8] J.J. Dynes, T. Tyliczszak, T. Araki, J.R. Lawrence, G.D.W. Swerhone, G.G. Leppard, A.P. Hitchcock, Speciation and quantitative mapping of metal species in microbial biofilms using scanning transmission X-ray microscopy, Environ. Sci. Technol. 40 (2006) 1556–1565. <https://doi.org/10.1021/es0513638>.
- [9] T.J. Stewart, R. Behra, L. Sigg, Impact of chronic lead exposure on metal distribution and biological effects to periphyton, Environ. Sci. Technol. 49 (2015) 5044–5051. <https://doi.org/10.1021/es505289b>.
- [10] W.S. Moore, Sampling ²²⁸Ra in the deep ocean, Deep. Res. Oceanogr. Abstr. 23 (1976)

- 647–651. [https://doi.org/10.1016/0011-7471\(76\)90007-3](https://doi.org/10.1016/0011-7471(76)90007-3).
- [11] F.M.M. Morel, Principles of aquatic chemistry, John Wiley and Sons Inc., New York, (1983) 446.
- [12] P.G.C. Campbell, O. Errécalde, C. Fortin, V.P. Hiriart-Baer, B. Vigneault, Metal bioavailability to phytoplankton - applicability of the biotic ligand model, *Comp. Biochem. Physiol. - C Toxicol. Pharmacol.* 133 (2002) 189–206. [https://doi.org/10.1016/S1532-0456\(02\)00104-7](https://doi.org/10.1016/S1532-0456(02)00104-7).
- [13] M. Nourmand, N. Meissami, Complex formation between uranium(VI) and thorium(IV) ions with some α -amino-acids, *J. Chem. Soc. Dalt. Trans.* 3 (1983) 1529–1533. <https://doi.org/10.1039/DT9830001529>.
- [14] E.D. van Hullebusch, M.H. Zandvoort, P.N.L. Lens, Metal immobilisation by biofilms: Mechanisms and analytical tools, *Rev. Environ. Sci. Biotechnol.* 2 (2003) 9–33. <https://doi.org/10.1023/B:RESB.0000022995.48330.55>.
- [15] C. Bonnineau, J. Artigas, B. Chaumet, A. Dabrin, J. Faburé, B.J.. Ferrari, J.D. Lebrun, C. Margoum, N. Mazzella, C. Miège, S. Morin, E. Uher, M. Babut, S. Pesce, Role of biofilms in contaminant bioaccumulation and trophic transfer in aquatic ecosystems: current state of knowledge and future challenges, in: P. de Voogt (Ed.), *Reviews of Environmental Contamination and Toxicology*, Springer, New York, NY, (2020): pp. 1–39. https://doi.org/10.1007/398_2019_39.
- [16] N. Das, P. Chandran, Microbial degradation of petroleum hydrocarbon contaminants: an overview, *Biotechnol. Res. Int.* 2011 (2011) 1–13. <https://doi.org/10.4061/2011/941810>.
- [17] P. Sar, S.F. D'Souza, Biosorption of thorium (IV) by a *Pseudomonas biomass*, *Biotechnol. Lett.* 24 (2002) 239–243. <https://doi.org/10.1023/A:1014153913287>.
- [18] T. Tsuruta, Adsorption of uranium from acidic solution by microbes and effect of thorium on uranium adsorption by *Streptomyces levoris*, *J. Biosci. Bioeng.* 97 (2004) 275–277. <https://doi.org/10.1263/jbb.97.275>.
- [19] T. Tsuruta, Bioaccumulation of uranium and thorium from the solution containing both elements using various microorganisms, *J. Alloys Compd.* 408–412 (2006) 1312–1315. <https://doi.org/10.1016/j.jallcom.2005.04.131>.
- [20] T.J. Beveridge, Role of cellular design in bacterial metal accumulation and mineralization, *Annu. Rev. Microbiol.* 43 (1989) 147–171.

- <https://doi.org/10.1146/annurev.mi.43.100189.001051>.
- [21] T.J. Beveridge, S.A. Makin, J.L. Kadurugamuwa, L. Zusheng, Interactions between biofilms and the environment, *FEMS Microbiol. Rev.* 20 (1997) 291–303. [https://doi.org/10.1016/S0168-6445\(97\)00012-0](https://doi.org/10.1016/S0168-6445(97)00012-0).
- [22] T. Horikoshi, A. Nakajima, T. Sakaguchi, Studies on the accumulation of heavy metal elements in biological systems, *European J. Appl. Microbiol. Biotechnol.* (1981) 90–96. <https://doi.org/10.1007/BF01970040>.
- [23] P.S. Dhama, V. Gopalakrishnan, R. Kannan, A. Ramanujam, N. Salvi, S.R. Udupa, Biosorption of radionuclides by *Rhizopus arrhizus*, *Biotechnol. Lett.* 20 (1998) 225–228. <https://doi.org/https://doi.org/10.1023/A:1005313532334>.
- [24] C. White, G.M. Gadd, Biosorption of radionuclides by fungal biomass, *J. Chem. Technol. Biotechnol.* (1990) 331–343. <https://doi.org/10.1002/jctb.280490406>.
- [25] B. Greene, D.W. Darnall, Microbial oxygenic photoautotrophs (cyanobacteria and algae) for metal ion binding, in: H.L. Ehlich, C.L. Brierley (Eds.), *Microbial Mineral Recovery*, McGraw-Hill, (1990): pp. 277–302. https://doi.org/10.1007/978-3-662-10863-5_7.
- [26] S.K. Mehta, B.N. Tripathi, J.P. Gaur, Enhanced sorption of Cu²⁺ and Ni²⁺ by acid-pretreated *Chlorella vulgaris* from single and binary metal solutions, *J. Appl. Phycol.* (2002) 267–273. <https://doi.org/10.1023/A:1021149119472>.
- [27] H. Seki, A. Suzuki, Y. Ihuri, Biosorption of heavy metal ions to a marine microalga, *Heterosigma akashiwo* (Hada) Hada, *J. Colloid Interface Sci.* 229 (2000) 196–198. <https://doi.org/10.1006/jcis.2000.6998>.
- [28] N. Manikandan, C.S.S. Prasath, S. Prakash, Biosorption of uranium and thorium by Marine micro algae, *Indian J. Geo-Marine Sci.* 40 (2011) 121–124.
- [29] C. Peng, Y. Ma, Y. Ding, X. He, P. Zhang, T. Lan, D. Wang, Influence of speciation of thorium on toxic effects to green algae *Chlorella pyrenoidosa*, *Int. J. Mol. Sci.* (2017). <https://doi.org/10.3390/ijms18040795>.
- [30] J. Neury-Ormanni, J. Vedrenne, M. Wagner, G. Jan, S. Morin, Micro-meiofauna morphofunctional traits linked to trophic activity, *Hydrobiologia.* 847, (2019) 2725–2736. <https://doi.org/10.1007/s10750-019-04120-0>.
- [31] J. Neury-Ormanni, J. Vedrenne, S. Morin, Who eats who in biofilms? Exploring the drivers of microalgal and micromeiofaunal abundance, *Bot. Lett.* 163 (2016) 83–92.

<https://doi.org/10.1080/23818107.2016.1151827>.

- [32] E. Hernández-Ruiz, J. Alvarado-Flores, I. Rubio-Franchini, J. Ventura-Juárez, R. Rico-Martínez, Adverse effects and bioconcentration of chromium in two freshwater rotifer species, *Chemosphere*. 158 (2016) 107–115. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2016.05.067>.
- [33] J. Alvarado-Flores, R. Rico-Martínez, Bioconcentration of lead and X-ray microanalysis with SEM in the freshwater rotifer *Lecane quadridentata* (Rotifera: Monogononta), *Polish J. Environ. Stud.* 26 (2017) 2869–2872. <https://doi.org/10.15244/pjoes/67331>.
- [34] S. Woelfl, M. Óvári, J. Nimptsch, T.R. Neu, M. Mages, Determination of trace elements in freshwater rotifers and ciliates by total reflection X-ray fluorescence spectrometry, *Spectrochim. Acta - Part B At. Spectrosc.* 116 (2016) 28–33. <https://doi.org/10.1016/j.sab.2015.12.001>.
- [35] N.S. Fisher, J.-L. Teyssié, S. Krishnaswami, M. Baskaran, Accumulation of Th, Pb, U, and Ra in marine phytoplankton and its geochemical significance, *Limnol. Oceanogr.* 32 (1987) 131–142. <https://doi.org/10.4319/lo.1987.32.1.0131>.
- [36] K.C. Bhainsa, S.F. D'Souza, Thorium biosorption by *Aspergillus fumigatus*, a filamentous fungal biomass, *J. Hazard. Mater.* 165 (2009) 670–676. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2008.10.033>.
- [37] A.R. Keshtkar, M.A. Hassani, Biosorption of thorium from aqueous solution by Ca-pretreated brown algae *Cystoseira indica*, *Korean J. Chem. Eng.* 31 (2014) 289–295. <https://doi.org/10.1007/s11814-013-0220-7>.
- [38] M. Sasmaz, E. Obek, A. Sasmaz, Bioaccumulation of Uranium and Thorium by *Lemna minor* and *Lemna gibba* in Pb-Zn-Ag tailing water, *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 97 (2016) 832–837. <https://doi.org/10.1007/s00128-016-1929-x>.
- [39] G.M. Gadd, C. White, Uptake and intracellular compartmentation of thorium in *Saccharomyces cerevisiae*, *Environ. Pollut.* 61 (1989) 187–197.
- [40] S.K. Kazy, S.F. D'Souza, P. Sar, Uranium and thorium sequestration by a *Pseudomonas* sp.: Mechanism and chemical characterization, *J. Hazard. Mater.* 163 (2009) 65–72. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2008.06.076>.
- [41] K. Barbeau, E.B. Kujawinski, J.W. Moffett, Remineralization and recycling of iron, thorium and organic carbon by heterotrophic marine protists in culture, *Aquat. Microb. Ecol.* 24

- (2001) 69–81. <https://doi.org/10.3354/ame024069>.
- [42] P.S. Rainbow, S.N. Luoma, W.X. Wang, Trophically available metal - A variable feast, *Environ. Pollut.* 159 (2011) 2347–2349. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2011.06.040>.
- [43] J.R. Reinfelder, N.S. Fisher, The assimilation of elements ingested by marine copepods, *Science* (80-.). 251 (1981) 794–796. <https://doi.org/10.1126/science.251.4995.794>.
- [44] D.A. Hutchins, K.W. Bruland, S. Cruz, Grazer-mediated regeneration and assimilation of Fe , Zn and Mn from planktonic prey, *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 110 (1994) 259–269. <https://doi.org/10.3354/meps110259>.
- [45] S.K. Kazy, S.F. D'Souza, P. Sar, Uranium and thorium sequestration by a *Pseudomonas* sp.: Mechanism and chemical characterization, *J. Hazard. Mater.* 163 (2009) 65–72. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2008.06.076>.
- [46] L. Xie, D.H. Funk, D.B. Buchwalter, Trophic transfer of Cd from natural periphyton to the grazing mayfly *Centroptilum triangulifer* in a life cycle test, *Environ. Pollut.* 158 (2010) 272–277. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2009.07.010>.
- [47] D.M. Walters, E. Rosi-Marshall, T.A. Kennedy, W.F. Cross, C. V. Baxter, Mercury and selenium accumulation in the Colorado River food web, Grand Canyon, USA, *Environ. Toxicol. Chem.* 34 (2015) 2385–2394. <https://doi.org/10.1002/etc.3077>.
- [48] T.D. Jardine, K.A. Kidd, N. O' Driscoll, Food web analysis reveals effects of pH on mercury bioaccumulation at multiple trophic levels in streams, *Aquat. Toxicol.* 132–133 (2013) 46–52. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2013.01.013>.
- [49] J.M. Conley, D.H. Funk, D.B. Buchwalter, Selenium bioaccumulation and maternal transfer in the mayfly *Centroptilum triangulifer* in a life-cycle, periphyton-biofilm trophic assay, *Environ. Sci. Technol.* 43 (2009) 7952–7957. <https://doi.org/10.1021/es9016377>.
- [50] A.M. Farag, D.A. Nimick, B.A. Kimball, S.E. Church, D.D. Harper, W.G. Brumbaugh, Concentrations of metals in water , sediment , biofilm , benthic macroinvertebrates , and fish in the boulder river watershed , montana , and the role of colloids in metal uptake, *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 409 (2007) 397–409. <https://doi.org/10.1007/s00244-005-0021-z>.
- [51] P.S. Rainbow, S.N. Luoma, Metal toxicity, uptake and bioaccumulation in aquatic invertebrates—Modelling zinc in crustaceans, *Aquat. Toxicol.* 105 (2011) 455–465. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2011.08.001>.

- [52] P.S. Rainbow, J.C. Amiard, C. Amiard-Triquet, M.S. Cheung, L. Zhang, H. Zhong, W.X. Wang, Trophic transfer of trace metals: Subcellular compartmentalization in bivalve prey, assimilation by a gastropod predator and in vitro digestion simulations, *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 348 (2007) 128–138. <https://doi.org/10.3354/meps07086>.
- [53] P.G.C. Campbell, Interactions between trace metals and aquatic organisms: a critique of the free ion activity model, in: A. Tessier, D.R. Turner (Eds.), *Metal speciation and bioavailability in aquatic systems*, New York: John Wiley & Sons, Incorporated, (1995): pp. 45–102.
- [54] M. Newman, C. Jagoe, Ligands and the bioavailability of metals in aquatic environments, in: H. JL, L. PF, B. HL, B. WH (Eds.), *Bioavailab. Phys. Chem. Biol. Interact.*, CRC, Boca Raton, FL, USA, (1994): pp. 39–61.
- [55] P.G.C. Campbell, O. Errécalde, C. Fortin, V.P. Hiriart-Baer, B. Vigneault, Metal bioavailability to phytoplankton-applicability of the biotic ligand model, *Comp. Biochem. Physiol. C. Toxicol. Pharmacol.* 133 (2002) 189–206. [https://doi.org/10.1016/S1532-0456\(02\)00104-7](https://doi.org/10.1016/S1532-0456(02)00104-7).
- [56] S.A. Amin, M.S. Parker, E. V. Armbrust, Interactions between diatoms and bacteria, *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 76 (2012) 667–684. <https://doi.org/10.1128/membr.00007-12>.
- [57] C. Koedooder, W. Stock, A. Willems, S. Mangelinckx, M. De Troch, W. Vyverman, K. Sabbe, Diatom-bacteria interactions modulate the composition and productivity of benthic diatom biofilms, *Front. Microbiol.* 10 (2019) 1–11. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.01255>.
- [58] A.M. Romani, H. Guasch, M.D. Balaguer, *Aquatic biofilms: ecology, water quality and wastewater treatment*, Caister Academic Press, (2016) 229. <https://doi.org/10.21775/9781910190173>.
- [59] L. Proia, F. Cassio, C. Pascoal, A. Tlili, A.M. Romani, The use of attached microbial communities to assess ecological risks of pollutants in river ecosystems: the role of heterotrophs, in: H. Guasch, A. Ginebreda, A. Geiszinger (Eds.), *Emerging and Priority Pollutants in Rivers*, Springer-Verlag Berlin Heidelberg, (2012): pp. 55–84. <https://doi.org/10.1007/978-3-642-25722-3>.
- [60] Morin S., A. Cordonier, I. Lavoie, A. Arini, S. Blanco, T.T. Duong, E. Tornés, B. Bonet, N. Corcoll, L. Faggiano, M. Laviale, F. Pérès, E. Becares, M. Coste, A. Feurtet-Mazel, C.

- Fortin, H. Guasch, S. Sabater, Consistency in diatom response to metal-contaminated environments, in: H. Guasch, A. Ginebreda, A. Geiszinger (Eds.), Handbook of Environmental Chemistry : Emerging and Priority Pollutants in Rivers, 19 (2012): pp. 117–146. https://doi.org/10.1007/978-3-642-25722-3_5.
- [61] M. Takeuchi, K. Hamana, A. Hiraishi, Proposal of the genus *Sphingomonas sensu stricto* and three new genera, Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 51 (2001) 1405–17. <https://doi.org/10.1099/00207713-51-4-1405>.
- [62] D.C. Prabhakaran, V. Bolaños-Benitez, Y. Sivry, A. Gelabert, J. Riotte, S. Subramanian, Mechanistic studies on the bioremediation of Cr(VI) using *Sphingopyxis macrogoltabida* SUK2c, a Cr(VI) tolerant bacterial isolate, Biochem. Eng. J. 150 (2019) 107292. <https://doi.org/10.1016/j.bej.2019.107292>.
- [63] S. Shokrollahzadeh, F. Golmohammad, H. Shokouhi, Study of *Sphingopyxis* isolates in degradation of polycyclic aromatic hydrocarbons, Chem. Eng. Trans. 27 (2012) 55–60. <https://doi.org/10.3303/CET1227010>.
- [64] J. Kim, J. Kim, H. Kim, I. Kim, Y. Moon, S. Park, H. Kahng, Oil-Degrading marine bacterium, Genome Announc. 2 (2014) 2007–2008. <https://doi.org/10.1128/genomeA.01256-14>. Copyright.
- [65] A. Yamatsu, R. Matsumi, H. Atomi, T. Imanaka, Isolation and characterization of a novel poly(vinyl alcohol)-degrading bacterium, *Sphingopyxis* sp. PVA3, Appl. Microbiol. Biotechnol. 72 (2006) 804–811. <https://doi.org/10.1007/s00253-006-0351-4>.
- [66] M. Newman, W. Clements, Biomonitoring and the Responses of communities to contaminants, in: H. William, M. Clements, C. Newman (Eds.), Community Ecotoxicology, John Wiley & Sons Ltd, (2002): pp. 409–438. <https://doi.org/10.1201/9781420005011.ch22>.
- [67] S. Morin, M. Coste, Metal-induced shifts in the morphology of diatoms from the Riou Mort and Riou Viou streams (South West France), in: Use of algae for monitoring rivers, VI, Hungarian Algological Society, (2006): pp. 91–106.
- [68] A. Lenoir, M. Coste, Development of a practical diatom index of overall water quality applicable to the French national water Board network., in: E. Whitton, B.A., Rott (Ed.), Use Algae Monit. Rivers., Studia Student, G.m.b.H, Innsbruck, Lindstrøm, (1996): pp. 29–43. <https://doi.org/10.2478/s13545-013-0073-z>.

- [69] M. Ricart, D. Barceló, A. Geiszinger, H. Guasch, M.L. de Alda, A.M. Romaní, G. Vidal, M. Villagrasa, S. Sabater, Effects of low concentrations of the phenylurea herbicide diuron on biofilm algae and bacteria, *Chemosphere*. 76 (2009) 1392–1401. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2009.06.017>.
- [70] L. Proia, S. Morin, M. Peipoch, A.M. Romaní, S. Sabater, Resistance and recovery of river biofilms receiving short pulses of triclosan and diuron, *Sci. Total Environ*. 409 (2011) 3129–3137. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2011.05.013>.
- [71] J. Qian, K. Li, P. Wang, C. Wang, M. Shen, J. Liu, Toxic effects of three crystalline phases of TiO₂ nanoparticles on extracellular polymeric substances in freshwater biofilms, *Bioresour. Technol*. 241 (2017) 276–283. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2017.05.121>.
- [72] S. Jomini, H. Clivot, P. Bauda, C. Pagnout, Impact of manufactured TiO₂ nanoparticles on planktonic and sessile bacterial communities, *Environ. Pollut*. 202 (2015) 196–204. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2015.03.022>.
- [73] A.A. Van Dam, M.C.M. Beveridge, M.E. Azim, M.C.J. Verdegem, The potential of fish production based on periphyton, *Fish Biol. Fish*. 12 (2002) 1–31. <https://doi.org/10.1023/A>.
- [74] H. Masclaux, A. Bec, G. Bourdier, Trophic partitioning among three littoral microcrustaceans: Relative importance of periphyton as food resource, *J. Limnol*. 71 (2012) 261–266. <https://doi.org/10.4081/jlimnol.2012.e28>.
- [75] Ó. Monroig, N. Kabeya, Desaturases and elongases involved in polyunsaturated fatty acid biosynthesis in aquatic invertebrates: a comprehensive review, *Fish. Sci*. 84 (2018) 911–928. <https://doi.org/10.1007/s12562-018-1254-x>.
- [76] M.E. Azim, M.A. Wahab, A.A. Van Dam, M.C.M. Beveridge, A. Milstein, M.C.J. Verdegem, Optimization of fertilization rate for maximizing periphyton production on artificial substrates and the implications for periphyton-based aquaculture, *Aquac. Res*. 32 (2001) 749–760. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2109.2001.00613.x>.
- [77] G. Ahlgren, L. Lundstedt, M. Brett, C. Forsberg, Lipid composition and food quality of some freshwater phytoplankton for cladoceran zooplankters, *J. Plankton Res*. 12 (1990) 809–818. <https://doi.org/10.1093/plankt/12.4.809>.
- [78] K. Kurmaly, D.A. Jones, A.B. Yule, J. East, Comparative analysis of the growth and survival of *Penaeus monodon* (Fabricius) larvae, from protozoa 1 to postlarva 1, on live feeds, artificial diets and on combinations of both, *Aquaculture*. 81 (1989) 27–45.

[https://doi.org/10.1016/0044-8486\(89\)90228-7](https://doi.org/10.1016/0044-8486(89)90228-7).

- [79] N. V. Zhukova, V.I. Kharlamenko, Sources of essential fatty acids in the marine microbial loop, *Aquat. Microb. Ecol.* 17 (1999) 153–157. <https://doi.org/10.3354/ame017153>.
- [80] M. Kumlu, Feeding and digestion in larval decapod crustaceans, *Turkish J. Biol.* 23 (1999) 215–230.
- [81] C. Schlechtriem, M. Ricci, U. Focken, K. Becker, Mass produced nematodes *Panagrellus redivivus* as live food for rearing carp larvae: Preliminary results, *Aquac. Res.* 35 (2004) 547–551. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2109.2004.01049.x>.
- [82] C. Fernandes Da Silva, E. Ballester, J. Monserrat, L. Geracitano, W. Wasielesky, P.C. Abreu, Contribution of microorganisms to the biofilm nutritional quality: Protein and lipid contents, *Aquac. Nutr.* 14 (2008) 507–514. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2095.2007.00556.x>.
- [83] D.K. Stoecker, J.M. Capuzzo, Predation on Protozoa : its importance to zooplankton, *J. Plankton Res.* 12 (1990) 891–908. <https://doi.org/10.1093/plankt/12.5.891>.
- [84] M. Fadhlou, V. Laderriere, I. Lavoie, C. Fortin, Influence of temperature and nickel on algal biofilm fatty acid composition, *Environ. Toxicol. Chem.* 39 (2020) 1566-1577. <https://doi.org/10.1002/etc.4741>.
- [85] D. Raubenheimer, Tannic acid , protein , and digestible carbohydrate : dietary imbalance and nutritional compensation in locusts, *Ecology.* 73 (1992) 1012–1027.
- [86] J.R. Kelly, R.E. Scheibling, Fatty acids as dietary tracers in benthic food webs, *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 446 (2012) 1–22. <https://doi.org/10.3354/meps09559>.
- [87] D.C. Müller-Navarra, M.T. Brett, A.M. Liston, C.R. Goldman, A highly unsaturated fatty acid predicts carbon transfer between primary producers and consumers, *Nature.* 403 (2000) 73–77. <https://doi.org/10.1038/47469>.
- [88] A. Valavanidis, T. Vlahogianni, M. Dassenakis, M. Scoullas, Molecular biomarkers of oxidative stress in aquatic organisms in relation to toxic environmental pollutants, *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 64 (2006) 178–189. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2005.03.013>.
- [89] L.M. Correa, D. Kochhann, M. a. Pavanato, S.F. Llesuy, A.P. Konzen Riffel, V.L. Loro, M.F. Mesko, E.M.M. Flores, V.L. Dressler, B. Baldisserotto, Bioaccumulation and oxidative stress parameters in silver catfish (*Rhamdia quelen*) exposed to different thorium

concentrations, *Chemosphere*. 77 (2009) 384–391.
<https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2009.07.022>.

- [90] F. G eret, A. Jouan, V. Turpin, M. João, R.P. Cosson, Influence of metal exposure on metallothionein synthesis and lipid peroxidation in two bivalve mollusks: the oyster (*Crassostrea gigas*) and the mussel (*Mytilus edulis*), *Aquat. Living Resour.* 15 (2002) 61–66. [https://doi.org/10.1016/S0990-7440\(01\)01147-0](https://doi.org/10.1016/S0990-7440(01)01147-0).
- [91] D.R. Livingstone, P. Garcia Martinez, X. Michel, J.-F. Narbonne, S. O'Hara, D. Ribera, G.W. Wingston, Oxyradical production as a pollution-mediated in the common mussel, mechanism of toxicity *Mytilus edulis* (L.), and other molluscs, *Funct. Ecol.* 4 (1990) 415–424. <https://doi.org/10.2307/2389604>.
- [92] W. Goedkoop, M. Demandt, G. Ahlgren, Interactions between food quantity and quality (long-chain polyunsaturated fatty acid concentrations) effects on growth and development of *Chironomus riparius*, *Can. J. Fish. Aquat. Sci.* 64 (2007) 425–436. <https://doi.org/10.1139/f07-016>.
- [93] M.T. Brett, D.C. Muller-Navarra, The role of highly unsaturated fatty acids in aquatic food web processes, *Freshw. Biol.* 38 (1997) 483–499. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2427.1997.00220.x>.

ANNEXE I

Composition du milieu MHSM1

Produit	Concentration finale dans le milieu (M)	Produit	Concentration finale dans le milieu (M)
NH ₄ NO ₃	9,37E ⁻⁰⁴	Na ₂ EDTA,2H ₂ O	8,06E ⁻⁰⁷
MgSO ₄ ,7H ₂ O	8,12E ⁻⁰⁵	Fe	5,92E ⁻⁰⁷
Ca(NO ₃) ₂ ,4H ₂ O	6,80E ⁻⁰⁵	H ₃ BO ₃	3,01E ⁻⁰⁶
KH ₂ PO ₄	5,44E ⁻⁰⁵	MnCl ₂ ,4H ₂ O	2,10E ⁻⁰⁶
K ₂ HPO ₄	8,27E ⁻⁰⁵	Zn	2,43E ⁻⁰⁸
KNO ₃	4,00E ⁻⁰³	Co	1,09E ⁻⁰⁸
NaOH	5,00E ⁻³	Mo	3,00E ⁻⁰⁸
MOPS	1,00E ⁻⁰²	Cu	7,04E ⁻¹¹

ANNEXE II

Major species observed in the biofilm samples over the 4 weeks of exposure in the control, C1 and C10 conditions. NSD = not statistical differences; *no statistical test performed on data, qualitative results; ↓ and ↑ means diminution and augmentation respectively.

	Phylum	Genus	Time effect	Th effect
Bacteria		Pseudanabaena_PCC-7429	t1↓ t2↓ t3↓	C1↓C10↓
	Cyanobacteria	Ancylothrix_8PC	NSD	NSD
		Geitlerinema_LD9	NSD	NSD
	Bacteroidetes	Flavobacterium	NSD	NSD
	Planctomycetes	SM1A02	NSD	NSD
		Blastomonas	NSD	NSD
	Proteobacteria	Sphingopyxis	t2↑	C1↓-C10↓
		Rhizorhapis	NSD	NSD
Diatoms	Species	code	Time effect *	Th effect *
	<i>Achnanthydium exiguum</i> (Grunow) Czarnecki	ADEG	t2↓ t3↑	C1↑C10↑
	<i>Stauroforma exiguiformis</i> (Lange-Bertalot) Flower Jones & Round	SEXG	t3↓	C1↑C10↑
	<i>Fragilaria mesolepta</i> Rabenhorst	FMES	t3↑	C1↑↓C10↑↓
	<i>Eolimna minima</i> (Grunow) Lange-Bertalot	EOMI	t3↓	C1↓C10↓
	Unidentified sp 1	Sp1	No effect	C1↓C10↑↓
	Unidentified sp 2	Sp2	t3↓	C1↓C10↑
	Unidentified sp 3	Sp3	t1↓ t2↓ t3↓	C1↓-C10↓
	<i>Adlafia bryophila</i> (Petersen) Moser Lange-Bertalot & Metzeltin	ABRY	t1↓ t2↓ t3↓	C10↓
	<i>Navicula</i> sp. 22 (in Lavoie <i>et al.</i> 2013)	NAVI22	t1↑ t2↑ t3↓	C1↓-C10↓
	<i>Navicula</i> sp. 26 (in Lavoie <i>et al.</i> 2013)	NAVI26	t3↑	C1↓C10↓
	<i>Nitzschia</i> cf. <i>acidoclinata</i> Lange-Bertalot	NACD	t1↓ t2↓ t3↓	C1↓-C10↓
	<i>Nitzschia solgensis</i> Cleve-Euler	NSOL	t1↑	C1↓-C10↓
	<i>Navicula</i> aff. <i>reichardtiana</i> Lange-Bertalot	NRCH	t1↓ t2↑ t3↓	C1↓-C10↓
	<i>Navicula</i> cf. <i>seminulum</i>	NSEM	t2↑ t3↑	C1↓C10↓
	<i>Navicula exilis</i> Kützing	NEXI	No effect	C1↑
	<i>Nitzschia</i> sp 2 (in Lavoie <i>et al.</i> 2013)	NITZ2	No effect	No effect
	<i>Fragilaria pectinalis</i> (O.F.Müller) Lyngbye	FPEC	t1↓ t2↓ t3↓	No effect
<i>Gomphonema pala</i> Reichardt	GOPA	t1↓ t2↓ t3↓	C1↓-C10↓	

	Group	species	Time effect	Th effect
Micromeiofauna		<i>Aspidisca cicada</i>	t1↑t2↑t3↑	C1↑-C10↑
	Ciliates	<i>Vorticella sp</i>	t1↑t2↑	NSD
		Unidentified (X1)	t2↑	NSD
		Nematods	Unidentified	NSD
	Amoeba	Unidentified	t1↑t2↑t3↑	NSD
	Flagellates	Unidentified	t1↓-t2↓-t3↓	NSD
	Rotifera	<i>Lepadella patella</i>	t2↑	C10↑
		<i>Philodinidae</i>	NSD	NSD

ANNEXE III

Main fatty acid abundance as percent measured in *Lymnaea* sp. and in other snail species reported in the recent literature.

	<i>Lymnaea</i> sp.	<i>Gibbula</i> <i>umbilicalis</i>	<i>Turbo</i> <i>cornutus</i> viscera	<i>Turbo</i> <i>cornutus</i> foot	<i>Cornu</i> <i>aspersum</i> viscera	<i>Cornu</i> <i>aspersum</i> foot	<i>Rapana</i> <i>venosa</i> Spring	<i>Rapana</i> <i>venosa</i> Summer	<i>Eobania</i> <i>vermiculata</i>	<i>Helix</i> <i>pomatia</i>	<i>Helix</i> <i>lucorum</i>	<i>Limax</i> <i>flavus</i>
SFA	16:0 /10.53 ± 0.37 18:0 /14.41 ± 0.73	16:0 /28.07 ± 2.53 18:0 /28.52 ± 5.65	16:0 /22.6 ± 2.8	16:0 /17.8 ± 1.3 18:0 /4.7 ± 0.2	16:0 /11.54 ± 0.03 18:0 /12.65 ± 0.0	16:0 /6.48 ± 0.08 18:0 /16.51 ± 0.01	16:0 /15.6 ± 0.9 18:0 /7.6 ± 0.7	16:0 /10.53 ± 0.37 18:0 /9.89 ± 0.9	16:0 /10.49 ± 0.90 18:0 /7.76 ± 0.75	16:0 /10.29 ± 0.01 18:0 /16.38 ± 0.10 22:0 /6.27 ± 0.01	16:0 /9.66 ± 1.10 18:0 /6.75 ± 0.55	16:0 /4.62 ± 0.36 18:0 /20.53 ± 1.18 18:0 /5.54 ± 0.47 22:0 /6.27 ± 0.01
MUFA	18:1n-9 / 9.77 ± 0.38 20:1n-9 / 4.99 ± 0.60	16:1n-7 /4.75 ± 0.42 18:1n-9 /31.94 ± 1.70	18:1n-9 /15.5 ± 1.0 18:1n-7 /9.3 ± 1.9	18:1n-9 /10.7 ± 0.9 18:1n-7 /8.6 ± 0.4 20:1n-13 /6.5 ± 0.8	18:1n-9 /14.46 ± 0.1 24:1 /4.75 ± 0.2	18:1n-9 /13.6 ± 0.23 24:1 /6.47 ± 0.21	16:1n-7 /6.67 ± 0.6 18:1n-9 / 3.08 ± 0.3	16:1n-7 /4.51 ± 0.43 18:1n-9 /3.95 ± 0.4	18:1n-9 /19.07 ± 1.18	18:1n-9 /14.70 ± 0.08	18:1n-9 /22.02 ± 1.48	16:1n-7 /4.75 ± 0.42 18:1n-9 /31.94 ± 1.70
PUFA	18:2n-6 /5.10 ± 0.33 20:2n-6 /7.21 ± 1.08 20:4n-6 /21.61 ± 2.02 20:5n-3 /4.35 ± 0.40 22:5n-3 /6.19 ± 2.77	18:2n-6 /6.05 ± 4.06	18:2n-6 /3.7 ± 1.2 18:4n-3 /3.6 ± 1.6 20:4n-6 /8.3 ± 2.3 20:5n-3 /3.2 ± 1.2	18:2n-6 /3.0 ± 0.1 20:4n-6 /10.2 ± 0.6 20:5n-3 /2.1 ± 0.1	18:2n-6 /16.15 ± 0.01 20:2 /8.38 ± 0.0 20:3n-3 /17.72 ± 0.04	18:2n-6 /18.60 ± 0.1 20:2 /11.20 ± 0.2 20:3n-3 /13.37 ± 0.3	20:4n-6 /4.17 ± 0.4 20:5n-3 /24.5 ± 2.3 22:5n-3 /6.60 ± 0.6 22:6n-3 /6.60 ± 0.6	20:4n-6 /2.37 ± 0.2 20:5n-3 /28.7 ± 2.6 22:5n-3 /15.06 ± 1.5 22:6n-3 /15.06 ± 1.5	18:2n-6 /37.67 ± 1.83 18:3n-3 /7.31 ± 0.74 20:2n-6 /5.43 ± 0.50 20:4n-6 /3.54 ± 0.37	18:2n-6 /13.53 ± 0.05 20:2n /9.08 ± 0.03	18:2n-6 /21.76 ± 1.27 18:3n-3 /10.08 ± 0.84 20:2n-6 /6.90 ± 0.71 20:4n-6 /9.85 ± 1.06	18:2n-6 /13.03 ± 1.04 20:2n-6 /2.49 ± 0.22 20:4n-6 /3.48 ± 0.29
Ref.	This study	Silva et al. (2017) [48]	Saito et al. (2014) [54]	Saito et al. (2014) [54]	Çelik et al. (2019) [49]	Çelik et al. (2019) [49]	Panayotova et al. (2019) [50]	Panayotova et al. (2019) [50]	Ekin et al. (2017) [51]	Özogul et al. (2005) [56]	Ekin et al. (2017) [51]	Ekin et al. (2017) [51]

ANNEXE IV

Constante de complexation du thorium avec différent ligands naturels, source : Nagra/PSI Chemical Thermodynamic Data Base 01/01 [56].

Complexe	Log K	Complexe	Log K
ThO ₂	9,9	ThHPO ₄ ²⁺	13,199
ThOH ³⁺	-2,4	ThH ₂ PO ₄ ³⁺	11,749
ThOH ₂ ²⁺	-6,95	ThH ₃ PO ₄ ⁴⁺	11,249
ThOH ₃ ⁺	-11,7	Th(HPO ₄) ₂	26,397
ThOH ₄	-18,4	Th(H ₂ PO ₄) ₂ ²⁺	23,317
Th ₂ OH ₂ ⁶⁺	-6,1	Th(HPO ₄) ₃ ²⁻	34,946
Th ₄ OH ₈ ⁸⁺	-21,1	ThSO ₄ ²⁺	7,6
Th ₆ OH ₁₅ ⁹⁺	-36,7	Th(SO ₄) ₂	11,6
ThCl ³⁺	1,1	Th(SO ₄) ₃ ²⁻	12,4
ThCl ₂ ²⁺	0,8	Th(SO ₄) ₄ ⁴⁻	8,5
ThCl ₃ ⁺	1,65	ThNO ₃ ³⁺	0,94
ThCl ₄	1,26	Th(NO ₃) ₂ ²⁺	1,97
ThCO ₃ ²⁺	0,671	ThF ³⁺	8,03
Th(CO ₃) ₅ ⁶⁻	29,8	ThF ₂ ²⁺	14,25
ThCO ₃ ²⁺	-3,1	ThF ₃ ⁺	18,93
Th(OH) ₃ CO ₃ ⁻	41,5		

ANNEXE V

Constantes de complexation du zirconium avec différent ligands naturels, source : Nagra/PSI Chemical Thermodynamic Data Base 01/01 [56].

Complexe	Log K	Complexe	Log K
ZrOH ³⁺	0,32 ± 0,22	ZrSO ₄ ²⁺	7,04 ± 0,09
Zr(OH) ₂ ²⁺	0,98 ± 1,06	Zr(SO ₄) ₃ ²⁻	14,3 ± 0,5
Zr(OH) ₄	- 2,19 ± 1,70	Zr(SO ₄) _{2(aq)}	11,54 ± 0,21
Zr(OH) ₅ ⁻	-16	Zr(CO ₃) ₄ ⁻⁴	42,9 ± 1,0
Zr(OH) ₆ ²⁻	-29,0 ± 0,7	ZrNO ₃ ³⁺	1,59 ± 0,08
Zr ₃ (OH) ₄ ⁸⁺	0,4 ± 0,3	Zr(NO ₃) ₂ ²⁺	2,64 ± 0,17
Zr ₃ (OH) ₉ ³⁺	12,19 ± 0,08	Zr(NO ₃) ₂ ²⁺	2,64 ± 0,17
Zr ₄ (OH) ₈ ⁸⁺	6,52 ± 0,65	ZrSO ₄ ²⁺	5,06 ± 0,08
Zr ₄ (OH) ₁₅ ⁺	12,58 ± 0,24	Zr(SO ₄) _{2(aq)}	11,54 ± 0,21
Zr ₄ (OH) ₁₆	8,39 ± 0,80		
Ca ₂ Zr(OH) ₆ ²⁺	- 22,6 ± 0,3		
Ca ₃ Zr(OH) ₆ ⁴⁺	-23,2 ± 0,3		
CaZr(OH) ₆ (aq)	59,4 ± 0,3		
ZrSO ₄ ²⁺	5,06 ± 0,08		
Zr(SO ₄) _{2(aq)}	11,54 ± 0,21		