



Acquisition de tolérance et modification de structure des communautés périphytiques : une réponse précoce à la pression urbaine dans les milieux aquatiques

Lise Fechner

► To cite this version:

Lise Fechner. Acquisition de tolérance et modification de structure des communautés périphytiques : une réponse précoce à la pression urbaine dans les milieux aquatiques. Sciences de la Terre. Université Paris-Est, 2010. Français. NNT : 2010PEST1062 . tel-00596853

HAL Id: tel-00596853

<https://pastel.hal.science/tel-00596853>

Submitted on 30 May 2011

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.

UNIVERSITÉ PARIS-EST

SCIENCES, INGÉNIERIE ET ENVIRONNEMENT

Acquisition de tolérance et modification de structure des
communautés périphytiques : une réponse précoce à la
pression urbaine dans les milieux aquatiques

Thèse de doctorat

Spécialité : **Ecotoxicologie**

Présentée et soutenue publiquement par

Lise FECHNER

le 14 décembre 2010

devant le jury suivant :

Renata BEHRA
Fabienne PETIT
Agnès BOUCHEZ
Alain BOUDOU
Josette GARNIER
Catherine GOURLAY-FRANCÉ
Marie-Hélène TUSSEAU-VUILLEMIN
Bruno TASSIN

Rapporteur
Rapporteur
Examineur
Examineur
Examineur
Examineur
Directeur de thèse
Co-directeur de thèse

Acquisition de tolérance et modification de
structure des communautés périphytiques : une
réponse précoce à la pression urbaine dans les
milieux aquatiques

Rapport de thèse

Lise Fechner

Remerciements

Je souhaite remercier tous ceux qui m'ont accompagnée pendant la réalisation de ce travail.

J'adresse tout d'abord mes remerciements aux membres du jury qui ont accepté d'évaluer mon travail de thèse : MM. Alain Boudou et Bruno Tassin, Mmes Agnès Bouchez, Josette Garnier, ainsi que Mmes Renata Behra et Fabienne Petit qui ont accepté d'être les rapporteurs de ce travail.

Je remercie aussi toutes les personnes ayant participé à mon comité de thèse : chaque réunion a été l'occasion de faire un point sur l'avancée de mes travaux et de prendre du recul. Je suis très reconnaissante à Annette Bérard, Bernard Montuelle et Jean-Marie Mouchel pour leurs conseils et leurs réponses à mes questions à l'occasion de ces réunions mais aussi lors de nos nombreux échanges par mail.

Je tiens à exprimer toute ma gratitude à Marie-Hélène Tusseau-Vuillemin, ma directrice de thèse, et à Catherine Gourlay-Francé, chef de l'équipe BELCA, qui m'ont encadrée pendant mon stage de master puis mon doctorat. Un grand merci à mes "mamans de thèse" d'avoir guidé mon travail, tout en m'accordant confiance et autonomie dès mes premiers pas dans le monde des biofilms.

Au Cemagref, je remercie Cécile Loumagne de m'avoir accueillie dans l'unité de recherche HBAN, Gérard Sachon puis Michel Penel de m'avoir accueillie au centre d'Antony.

J'exprime aussi ma reconnaissance à mes collègues microbiologistes de l'unité de recherche HBAN avec qui j'ai pu découvrir les joies de la PCR et de l'ARISA ; en particulier Théodore Bouchez, chef de l'équipe Sowaste, pour ses conseils, Ariane Bize, pour sa très grande disponibilité pour répondre à toutes mes questions, Céline Madigou, avec qui j'ai pu apprendre l'art du clonage enseigné par Rim Driss, et bien sûr toutes les personnes que j'ai cotoyées au laboratoire de microbiologie. Je remercie aussi Philippe Gaubert, chercheur au Muséum National d'Histoire Naturelle, pour son aide dans l'interprétation des résultats de séquençage des eucaryotes des biofilms.

Enfin, au sein de l'unité de recherche HBAN, je remercie toutes les personnes avec qui j'ai partagé mon quotidien de doctorante au laboratoire ou au bureau, mais aussi des cours de gym du jeudi midi, aux séances de running au Parc de Sceaux, en passant par les pauses "chocolats" à la

machine à café. Un grand merci à Sophie Morin ("Madame Sophie") et à Valérie Dansin pour leur disponibilité et leur bonne humeur !

Je tiens aussi bien sûr tout particulièrement à remercier mes collègues de l'équipe BELCA ("expertes" et maintenant "belcates"), en particulier Emmanuelle Uher, qui m'a fait faire mes premiers pas au labo avec le spectrofluorimètre, et a toujours prêté une oreille attentive à mes interrogations sur le sens de ma thèse (ou de la vie), a résolu avec le sourire mes problèmes de capillaire bouché ou de contaminations au cadmium à l'absorption atomique ou encore a su apprécier la beauté de mes solutions vertes de nickel ou bleues de cuivre (dommage que le cadmium et le plomb soient incolores !) ; Aurélie Germain, sans qui je n'aurais pas pu faire dire tant de choses à ces biofilms : merci pour ta bonne humeur et ta volonté de faire au mieux ton travail ; Françoise Vincent-Hubert, qui m'a introduite dans le monde étrange et fascinant de la biologie moléculaire ; mes collègues doctorantes Adeline Bourgeault et Cécile Michel pour leur bonne humeur, leur soutien, nos quelques séances de natation à la piscine de Fresnes et nos sympathiques voyages à Göteborg et en Andalousie ; Jérémie Lebrun, éleveur de gammars (et de chèvres?), qui assume bien son rôle d'homme de l'équipe ! Et à propos de belcates et affiliés, un grand merci à Olivier, presque "Docteur Chapleur", pour ses conseils en biologie moléculaire, la relecture de tout un chapitre de ma thèse, le domptage de l'EPmotion pour faire plus vite les PCR et surtout des biofilms récalcitrants, élevés au zinc et au Pio ! Je remercie aussi bien sûr les anciens d'EXPER : Cécile Mirande-Bret, Damien Devault, Pauline Robert-Sainte (finalement je n'ai pas suivi tes conseils pour le document maître !), les nouveaux BELCA et tous les stagiaires, dont bien entendu Céline Muffang et François Versace qui ont appris, eux aussi, à apprivoiser les biofilms et ont ainsi contribué à ce travail.

Enfin, merci à ma famille, en particulier à Alix et à Maximilien, qui ont accepté de jouer les cobayes pour une répétition de conférence at home ; special thanks to Max pour les relectures de passages de ma thèse et pour son soutien d'ex-thésard !

Merci surtout à Julien qui m'a toujours soutenue et a courageusement relu chaque ligne de ce manuscrit. A ton tour maintenant de rédiger !

Résumé

La contamination des milieux aquatiques urbains se caractérise aujourd'hui par un mélange de micropolluants d'origines et de types variés. Les conséquences de ce type de contamination, multiples mais faibles et chroniques, sur les écosystèmes aquatiques sont difficiles à évaluer. En effet, il est difficile d'une part de dresser un état des lieux précis de la contamination et d'autre part, de relier cette contamination à la réponse biologique des organismes exposés puisqu'elle n'engendre pas nécessairement des effets visibles et immédiats.

Cette étude a pour objectif de développer une méthodologie permettant d'utiliser le périphyton pour évaluer l'impact d'une contamination urbaine typique. Les biofilms sont des communautés aquatiques complexes jouant un rôle primordial dans le fonctionnement des écosystèmes aquatiques. Leur réponse biologique à une perturbation peut s'évaluer au niveau structural comme au niveau fonctionnel. Une première étape de ce travail a consisté à développer d'une part un test de toxicité aiguë permettant d'évaluer la tolérance de la composante hétérotrophe des biofilms selon le concept PICT, et d'autre part l'utilisation de la technique d'empreinte génétique ARISA pour évaluer des modifications de structure des communautés bactériennes et eucaryotes des biofilms.

Les méthodologies développées ont ensuite été testées au laboratoire par des expositions de périphyton à des métaux à des concentrations environnementales. Par la suite, elles ont pu être déployées *in situ* : d'abord dans un gradient de contamination multi-métallique sur la Seine avec des prélèvements ponctuels de biofilms naturels ainsi qu'une expérience de transposition (amont/aval de l'agglomération parisienne). Enfin, le lien entre la tolérance du périphyton et la contamination métallique globale du milieu a été exploré à l'échelle d'un bassin versant. Les résultats sont prometteurs quant à l'utilisation du périphyton pour évaluer l'impact d'une contamination urbaine.

Mots-clés : biofilm, contaminants urbains, PICT, ARISA

Abstract

Urban aquatic ecosystems are these days contaminated by mixtures of micropollutants of diverse types and origins. Such contaminations, which are multiple, chronic and non-lethal, raise increasing concern among the scientific community. Indeed, a precise evaluation of exposure levels is difficult to obtain. Moreover, establishing a causal link between contamination and the induced biological response of aquatic organisms is complex as no direct and visible effects can be observed.

The aim of this study is to develop a methodology to use periphyton as a biomarker of urban pollution. Biofilms are complex aquatic communities and play an important role in aquatic ecosystems. Their response to a disruption can be assessed both in terms of structure or functional modifications. Our first step was to develop both a PICT approach with a new short-term toxicity test to measure the tolerance to metal of the heterotrophic component of biofilms and the use of a fingerprinting technique (ARISA) to reveal structure modifications of both bacterial and eukaryotic communities.

The methodologies thus developed were tested in a microcosm study by exposing periphyton to metals at environmental levels. They were then used in field studies: first in a multi-metallic gradient along the Seine river by punctual sampling of natural periphyton and also in a translocation study (upstream/downstream the Paris urban area). Furthermore, the link between biofilm tolerance levels and the global metallic contamination was explored at the watershed scale. It is hoped that the future use of this approach will help to understand the impacts of human activities, especially toxic pressure, on aquatic ecosystems.

Keywords: biofilm, urban pollutants, PICT, ARISA

Sommaire

RESUME.....	7
ABSTRACT.....	8
LISTE DES ABREVIATIONS.....	13
INTRODUCTION.....	15
CHAPITRE 1. ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE	19
I. LES BIOFILMS D'EAU DOUCE OU PERIPHYTON.....	20
1. <i>Définition et caractéristiques</i>	20
1.1 Définition du terme <i>périphyton</i>	20
1.2 Les biofilms.....	21
1.2.1 Une structure microbienne organisée.....	21
1.2.2 La matrice d'EPS.....	22
1.3 Développement de biofilms périphytiques en milieu naturel	25
1.3.1 Le périphyton dans le continuum fluvial	25
1.3.2 Etapes de développement des biofilms.....	28
1.3.3 Facteurs structurants pour le périphyton.....	31
1.4 Rôle du périphyton dans la dégradation de la MO	34
1.4.1 Dégradation enzymatique de la MO.....	35
1.4.2 L'activité β -glucosidase.....	37
2. <i>Le périphyton comme marqueur d'une contamination</i>	38
2.1 Un matériel biologique de choix pour le scientifique.....	38
2.2 Biodescripteurs du périphyton.....	40
2.2.1 Modifications de structure	40
2.2.2 Approches métaboliques et physiologiques	43
2.3 Conclusion sur l'utilisation des biofilms pour évaluer l'impact des contaminations	45
II. L'APPROCHE PICT.....	46
1. <i>Phase de sélection</i>	47
1.1 Complexité du phénomène de succession	47
1.2 Durée de l'exposition et succession	48
1.3 Méthodes d'évaluation de la sélection.....	49
2. <i>Phase de détection : mise en évidence de la tolérance acquise</i>	49
2.1 Evaluation de la tolérance.....	50
2.2 Notion de tolérance de base (<i>baseline tolerance</i>).....	52
3. <i>Validation d'un effet PICT</i>	52
4. <i>Exemples d'application de l'approche PICT</i>	53
5. <i>Facteurs de variation de l'induction de tolérance des communautés</i>	55
5.1 Interactions de paramètres environnementaux.....	55
5.2 Phénomènes de co-tolérance.....	56
5.3 Biodisponibilité des contaminants	57
6. <i>Conclusion sur l'utilisation de l'approche PICT</i>	58
III. L'ARISA POUR EXPLORER LA DIVERSITE GENETIQUE DES BIOFILMS	60
1. <i>Explorer la diversité biologique</i>	60
1.1 Intérêt de l'approche moléculaire.....	60
1.2 Utilisation de l'opéron ribosomique comme outil d'identification.....	62
2. <i>Les techniques d'empreinte génétique</i>	64
2.1 Principe général	64
2.2 Les différentes techniques d'empreinte génétique	65
3. <i>Principe et utilisation de l'ARISA</i>	66
3.1 L'ARISA : exploitation du polymorphisme de taille des intergènes.....	66
3.1.1 ARISA Bactérie	66
3.1.2 ARISA Eucaryote	67
3.2 Applications.....	68
4. <i>Biais et limites des techniques d'empreinte génétique</i>	69
4.1 Biais liés à l'extraction d'ADN	70
4.2 Biais liés à l'amplification de l'ADN par PCR.....	71
4.3 Seuils de détection des techniques d'empreinte génétique	72
4.4 Conclusion sur l'utilisation des techniques d'empreinte génétique	74
5. <i>Interprétation des profils ARISA</i>	75
5.1 Signification d'un pic ou d'une bande sur le gel.....	75
5.2 Quantifier les abondances relatives.....	76

5.3 Méthodes d'analyse des profils ARISA.....	76
5.3.1 Calcul d'indices	77
5.3.2 Analyses multivariées.....	79
5.4 Conclusion sur l'utilisation de la technique ARISA.....	82
PROBLEMATIQUE.....	85
OBJECTIFS DE L'ETUDE	85
DEMARCHE GLOBALE.....	85
CHAPITRE 2. MESURE DE LA TOLERANCE DES COMMUNAUTES PERIPHYTIQUES EXPOSEES EN MILIEU URBAIN	89
I. COLLECTE DE BIOFILMS EN MILIEU NATUREL ET DESCRIPTEURS CLASSIQUES DE LEUR COMPOSITION	91
1. <i>Dispositif de collecte in situ</i>	91
2. <i>Descripteurs de la composition des biofilms</i>	92
2.1 Estimation de la biomasse totale	92
2.2 Estimation de la composition élémentaire du biofilm	93
2.3 Estimation de la biomasse algale	93
3. <i>Suivi de biofilms prélevés in situ</i>	94
II. DEVELOPPEMENT METHODOLOGIQUE DU TEST DE TOXICITE AIGUË B-GLUCOSIDASE SUR LES METAUX	97
1. <i>Choix du test de toxicité hétérotrophe</i>	97
2. <i>Protocole de mesure de l'activité β-glucosidase</i>	97
3. <i>Protocole du test de toxicité β-glucosidase</i>	100
3.1 Choix du médium pour fabriquer les suspensions de biofilm.....	100
3.2 Test de toxicité	100
4. <i>Tolérance et normalisation par les MES</i>	101
4.1 Inhibition de l'activité β -glucosidase par les métaux	101
4.2 Normalisation par les MES pour obtenir une mesure fiable de la tolérance	102
4.3 Le cas du plomb	108
5. <i>Paliers d'inhibition</i>	109
6. <i>Conclusion sur l'utilisation du test β-glucosidase pour évaluer des niveaux de tolérance aux métaux</i>	111
III. DEVELOPPEMENT DU TEST DE TOXICITE AIGUË B-GLUCOSIDASE MIS EN ŒUVRE AVEC DES CONTAMINANTS HYDROPHOBES.....	113
1. <i>Utilisation des échantillonneurs passifs pour la contamination hydrophobe</i>	113
2. <i>Protocole des tests de toxicité avec extraits de membranes LDPE et extraits de cartouches SPE</i>	115
2.1 Support de colonisation des biofilms	115
2.2 Exposition de LDPE <i>in situ</i> après purification des membranes	115
2.3 Extraction des contaminants au laboratoire	115
2.4 Choix du solvant de reprise	116
2.5 Test de toxicité β -glucosidase avec extraits de membranes LDPE.....	116
3. <i>Inhibition de l'activité β-glucosidase par les contaminants hydrophobes</i>	117
IV. DEVELOPPEMENT METHODOLOGIQUE DU TEST DE TOXICITE AIGUË PHOTOSYNTHETIQUE	120
1. <i>Mise au point du protocole de mesure de l'activité photosynthétique de biofilms naturels</i>	120
2. <i>Tests de toxicité</i>	121
CHAPITRE 3. UTILISATION DE LA TECHNIQUE ARISA : MISE EN EVIDENCE DE CHANGEMENTS DE STRUCTURE DANS LES BIOFILMS	125
I. UTILISATION DE L'ARISA BACTERIE SUR LES BIOFILMS	126
1. <i>Mises au point méthodologiques et protocoles</i>	126
1.1 Cryoconservation des échantillons	126
1.2 Extraction de l'ADN.....	126
1.3 Amplification des intergènes par PCR	127
1.4 ARISA Bactérie.....	127
2. <i>Modifications saisonnières des populations bactériennes de biofilms prélevés à Saint-Maurice en 2008</i>	128
II. DEVELOPPEMENTS METHODOLOGIQUES LIES A L'UTILISATION DE L'ARISA EUCARYOTE SUR LES BIOFILMS	131
1. <i>Conception d'un couple d'amorces ciblant la région ITS1-5.8S-ITS2 chez les diatomées des biofilms</i>	131

2.	<i>Mises au point méthodologiques et protocoles.....</i>	132
3.	<i>Clonage et analyse phylogénétique sur un échantillon de biofilm de Saint-Maurice.....</i>	134
4.	<i>Modifications saisonnières des populations eucaryotes de biofilms prélevés à Saint-Maurice en 2008</i>	137
III.	CONCLUSION SUR L'UTILISATION DE L'ARISA SUR BIOFILMS	140
CHAPITRE 4. VALIDATION DE LA METHODOLOGIE PICT EN CONDITIONS CONTROLEES : EXPOSITIONS EN MICROCOSMES.....		141
I.	OBJECTIFS	142
II.	DISPOSITIF EXPERIMENTAL.....	143
III.	RESULTATS.....	146
1.	<i>Paramètres d'exposition</i>	146
2.	<i>Caractérisation des biofilms</i>	148
2.1	Accumulation des métaux dans les biofilms	148
2.2	Descripteurs de biomasse	149
2.3	ARISA151	
3.	<i>Test β-glucosidase.....</i>	153
IV.	INTERPRETATION.....	155
1.	<i>Effet PICT sur biofilms exposés en microcosmes</i>	155
2.	<i>Descripteurs de biomasse : paramètres classiques et ARISA.....</i>	156
V.	CONCLUSION.....	158
CHAPITRE 5. APPLICATIONS IN SITU.....		159
I.	APPLICATION DE LA METHODOLOGIE PICT DANS UN GRADIENT DE POLLUTION URBAINE MULTI-METALLIQUE.....	160
1.	<i>Objectif et schéma expérimental.....</i>	160
2.	<i>Résultats.....</i>	161
2.1	Paramètres physico-chimiques de l'eau de la Seine sur les trois sites au cours de l'expérience.....	161
2.2	Gradient de contamination multi-métallique dans la Seine sur les trois sites au cours de l'expérience	162
2.3	Paramètres généraux des biofilms prélevés sur les trois sites	165
2.4	Niveaux de tolérance aux métaux des communautés hétérotrophes prélevées sur les trois sites.....	166
2.5	Analyses multivariées.....	167
2.6	Profils ARISA.....	171
3.	<i>Interprétation.....</i>	173
4.	<i>Conclusion.....</i>	175
II.	VARIABILITE DES NIVEAUX DE TOLERANCE DE COMMUNAUTES TRANSPPOSEES	176
1.	<i>Objectif et schéma expérimental.....</i>	176
2.	<i>Résultats et discussion</i>	177
2.1	Mesures des niveaux de tolérance au cuivre	177
2.2	Paramètres descripteurs des biofilms	179
2.3	Analyses multivariées.....	180
2.4	Profils ARISA.....	184
3.	<i>Conclusion.....</i>	186
III.	APPLICATION DE LA METHODOLOGIE PICT A L'ECHELLE D'UN BASSIN VERSANT.....	188
1.	<i>Objectif et dispositif expérimental.....</i>	188
2.	<i>Résultats et discussion</i>	189
2.1	Caractérisation des sites	189
2.2	Niveaux de tolérance au zinc et au cadmium et maxima d'inhibition.....	191
2.3	Mise en relation de la tolérance au zinc et au cadmium et des paramètres environnementaux	193
2.3.1	Relation entre les niveaux de tolérance et la contamination métallique du milieu	193
2.3.2	Relation entre les niveaux de tolérance au zinc et au cadmium et les paramètres environnementaux	195
2.3.3	Relation entre la tolérance et les paramètres environnementaux : prise en compte des paramètres descripteurs des biofilms dans le modèle de régression.....	197
2.4	Profils ARISA.....	199
3.	<i>Conclusion.....</i>	204
CONCLUSION		207
ANNEXES		215
CHAPITRE 2.....		216
CHAPITRE 3.....		240

CHAPITRE 4.....	273
CHAPITRE 5.....	306
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES	340

Liste des abréviations

ACP	Analyse en Composantes Principales (<i>PCA</i> ou <i>Principal Component Analysis</i>)
AESN	Agence de l'Eau Seine-Normandie
AFDW	<i>Ash-free dry weight</i> (masse sèche sans cendre)
AI	<i>Autotrophic Index</i> (indice autotrophe)
ARISA	<i>Automated Ribosomal Intergenic Spacer Analysis</i> (analyse automatisée des intergènes ribosomaux)
BaP	Benzo-a-pyrène
BET	Bromure d'éthidium
CCU	<i>Cumulative Criterion Unit</i>
COD	Carbone organique dissous
COT	Carbone organique total
CSLM	<i>Confocal scanning laser microscopy</i> (microscope confocal à balayage laser)
DBO	Demande biologique en oxygène
DCE	Directive Cadre européenne sur l'eau (2000/60/CE)
DGGE	<i>Denaturing gradient gel electrophoresis</i> (électrophorèse sur gel en gradient dénaturant)
DGT	<i>Diffusive gradient in thin films</i> (gradient diffusif sur couche fine)
DW	<i>Dry weight</i> (poids sec)
EPS	Exopolysaccharides
FISH	<i>Fluorescent in situ hybridization</i> (hybridation par fluorescence <i>in situ</i>)
FTIR	<i>Fourier Transformed InfraRed spectroscopy</i> (spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier)
HAP	Hydrocarbure aromatique polycyclique
HPLC	<i>High pressure liquid chromatography</i> (chromatographie à phase liquide à haute performance)
IBD	Indice Biologique Diatomique
ICP-MS	<i>Inductively coupled plasma mass spectroscopy</i> (spectrométrie de masse à plasma couplé par induction)
MO	Matière(s) organique(s)
MOD	Matière(s) organique(s) dissoute(s)
MOP	Matière(s) organique(s) particulaire(s)
NEC	<i>No Effect Concentration</i> (concentration sans effet observé)
NOM	<i>Natural organic matter</i> (Matière(s) organique(s) naturelle(s))
PCB	Polychlorobiphényles
PCR	<i>Polymerase Chain Reaction</i> (amplification en chaîne par polymérase)

(Phyto)-PAM (Phyto)-*Pulse Amplitude Modulation* (fluorimètre à amplitude modulée)

PICT *Pollution-Induced Community Tolerance* (tolérance induite par une pollution sur une communauté)

PLS *Partial Least Squares* (Moindres carrés partiels)

PSII Photosystème II

RDA *Redundancy Analysis* ou Analyse de Redondances

SAA Spectrométrie absorption atomique

SEM *Scanning electron microscopy* (microscopie électronique à balayage)

SPMD *Semi-permeable membrane device* (procédé à membrane semi-perméable)

STEP Station d'épuration

TAC Titre alcalimétrique complet

Introduction

La contamination globale actuelle des milieux aquatiques est la conséquence directe du développement des activités humaines (urbanisation, industrialisation, agriculture) au cours des siècles précédents, et en particulier du XX^{ème} siècle avec l'essor de l'industrie chimique. Suite à la prise de conscience de cette contamination, l'écotoxicologie a émergé en tant que discipline scientifique au cours des quarante dernières années, pour mettre en évidence, comprendre, et si possible prévoir les perturbations des écosystèmes aquatiques sous pression chimique. En effet, si le devenir et l'impact de la charge organique (C, N, P) ont été largement étudiés (par exemple Even *et al.* 2007; Garnier *et al.* 2008; Tusseau-Vuillemin *et al.* 1998) et sont aujourd'hui plutôt bien compris (Schwarzenbach *et al.* 2006), la connaissance et la maîtrise de la contamination chimique des milieux aquatiques et de ses impacts sur les écosystèmes reste un enjeu environnemental majeur. Pour certains contaminants, comme les métaux, l'émergence, au cours de la seconde moitié du XX^{ème} siècle, de techniques d'analyse suffisamment sensibles pour pouvoir doser les contaminants *in situ*, a graduellement permis la mise en place de normes de rejets dans les milieux aquatiques, entraînant une diminution des niveaux de contamination après des pics de pollution observés en général entre les années 1950 et 1980 (Meybeck 2003; Ricciardi *et al.* 2009). Ainsi, une décontamination progressive des sédiments de la Seine est observée depuis les années 1970 pour les métaux, les niveaux de contamination actuels étant maintenant de deux à six fois inférieurs aux niveaux correspondant aux années 1930 (Meybeck *et al.* 2007). Cependant, le problème de la contamination chimique des milieux aquatiques est loin d'être résolu.

Les contaminations actuelles se caractérisent par la présence de micropolluants, molécules présentes dans les milieux aquatiques à des concentrations très faibles voire à l'état de traces (concentrations de l'ordre du ng au µg/L). Il reste difficile de dresser un état des lieux précis de la contamination des cours d'eau, notamment du fait des difficultés analytiques liées à la détermination des concentrations des micropolluants en solution *in situ* (Elbaz-Poulichet *et al.* 2006). Par ailleurs, la diversité des composés chimiques rejetés dans l'environnement ne cesse d'augmenter, notamment avec les polluants dits émergents (produits pharmaceutiques, cosmétiques, etc.), dont les effets sur les organismes et sur les écosystèmes entiers ne sont pas connus à ce jour (Ricciardi *et al.* 2009). Ainsi, le suivi de la contamination de l'eau est en général loin d'être exhaustif pour les différents types de polluants.

En 2000, la Directive Cadre Européenne sur l'eau (DCE, Directive 2000/60/CE) a franchi un pas supplémentaire en imposant à tous les Etats Membres l'atteinte du *bon état* des cours d'eau d'ici 2015. Ce *bon état* repose autant sur le respect de normes de qualité

environnementales (NQE) pour les substances classées comme "dangereuses prioritaires" (directive 2008/105/CE), à savoir un *bon état chimique* des milieux aquatiques, que sur le retour au *bon état biologique* des organismes. La DCE propose ainsi des descripteurs biologiques (macrophytes, phytoplancton, algues benthiques et ichtyofaune) de l'état des écosystèmes aquatiques permettant de mesurer un écart à la référence (le *bon état écologique*). Cependant, la mesure des abondances taxonomiques de ces descripteurs, demandée par la DCE, n'est qu'une pièce du puzzle à assembler pour évaluer l'état de santé des écosystèmes aquatiques (Geiszinger *et al.* 2009). Les travaux de recherche actuels portent donc sur l'amélioration des indicateurs biologiques de l'état des milieux aquatiques, notamment pour mieux appréhender la réponse des organismes impactés par la pression chimique.

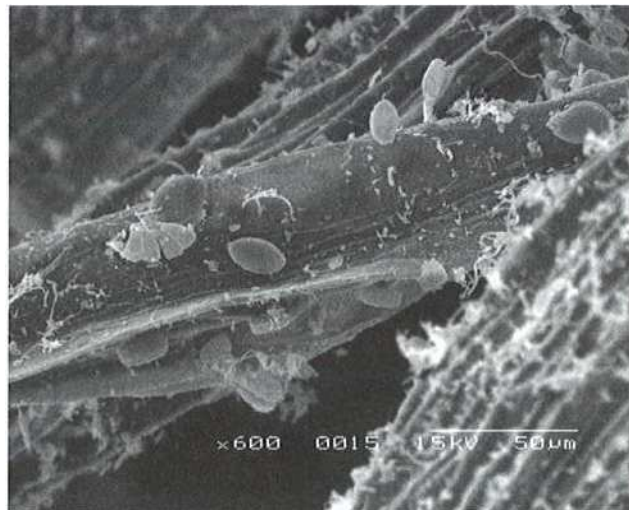
La contamination urbaine se caractérise aujourd'hui par un cocktail de micropolluants : métaux traces et composés organiques (Bourgeault *et al.* 2010; Meybeck 2003; Tusseau-Vuillemin *et al.* 2007). En effet, les milieux aquatiques urbains sont contaminés par des substances diverses, issues par exemple des effluents industriels ou encore évacuées vers les rivières par les eaux de ruissellement. Le suivi de ce type de multi-contamination est particulièrement délicat du fait de la multiplicité des sources de perturbation, mais aussi des faibles niveaux de contamination. Les effets, chroniques, de la présence des micropolluants urbains sont ainsi difficiles à mettre en lumière sur les organismes exposés. En outre, les indices biologiques classiques sont généralement peu performants pour évaluer les impacts de ce type de contamination diffuse, notamment parce-qu'ils ne prennent pas en compte les phénomènes d'adaptation, ni la santé des individus présents en milieu contaminé (Morin 2006; Nahmani & Rossi 2003; Pollard & Yuan 2006). Dans ce contexte environnemental complexe, il paraît nécessaire de développer des outils méthodologiques adaptés pour évaluer la sensibilité et la vulnérabilité des milieux aquatiques sous pression urbaine.

En particulier, il est nécessaire de développer des bio-marqueurs sensibles aux contaminations diffuses. En effet, les organismes vivants sont en constante interaction avec le milieu ; ils intègrent les évolutions environnementales et chimiques, et les effets antagonistes ou synergétiques du mélange de polluants auquel ils sont exposés. La réponse biologique à la pression urbaine des organismes aquatiques présents naturellement dans le milieu est donc particulièrement intéressante à évaluer. Par ailleurs, il est important d'étudier le comportement des organismes en milieu naturel pour pouvoir prendre en compte les phénomènes de biodisponibilité des contaminants *in situ*, mais aussi la variabilité biologique liée aux différents paramètres environnementaux (par exemple les cycles saisonniers, etc.).

Les communautés constituent un niveau d'organisation écologique particulièrement intéressant pour ce type d'étude. En effet, elles comportent, par définition, des populations d'organismes en interaction les uns avec les autres, appartenant souvent à des niveaux trophiques variés (dans les biofilms par exemple, où l'on retrouve des producteurs primaires mais aussi des niveaux trophiques supérieurs), dont les fonctions sont donc diversifiées au sein des écosystèmes. La réponse biologique d'une communauté est par conséquent un paramètre intégrant les différents niveaux de sensibilité de plusieurs types d'organismes ainsi que leurs interactions. Elle est de ce fait bien plus riche en informations et bien plus pertinente d'un point de vue écologique que les réponses obtenues au moyen de tests mono-spécifiques (Schmitt-Jansen *et al.* 2008). La richesse en espèce et la diversité génétique d'une communauté est, par ailleurs, un paramètre intimement lié à la santé de l'écosystème. En effet, la restauration des fonctions d'un écosystème sous l'effet d'une perturbation, anthropique ou naturelle, est d'autant plus rapide si les communautés y sont diversifiées (Clements & Rohr 2009).

Ce travail s'inscrit dans le contexte de contamination diffuse des écosystèmes aquatiques soumis à une pression anthropique d'origine urbaine. Dans ces milieux impactés par des contaminations multiples, chroniques et non létales, nous avons choisi de développer une approche à l'échelle de la communauté, fondée sur des mesures d'acquisition de tolérance par les communautés exposées. Ce travail a donc d'abord consisté en une phase de développements méthodologiques dans le but de mesurer les impacts d'une pression urbaine sur les structures des communautés périphytiques exposées ainsi que d'évaluer les niveaux de tolérance de ces dernières aux contaminants. Ces développements méthodologiques ont été suivis par la mise en évidence expérimentale au laboratoire puis *in situ* de la réponse biologique à la contamination urbaine ainsi identifiée. Ce travail contribue donc à l'évaluation des réponses biologiques de communautés périphytiques sous pression urbaine.

Chapitre 1. Etude bibliographique



Micro-colonies de diatomées *Gomphonema* et *Cocconeis* sur une algue filamenteuse *Cladophora* (Sabater & Admiraal 2005)

I. Les biofilms d'eau douce ou périphyton

1. Définition et caractéristiques

1.1 Définition du terme *périphyton*

Le terme *périphyton* désigne littéralement les communautés microflorales se développant sur des surfaces solides immergées. Certains auteurs (Aloi 1990; Lucey *et al.* 1987) ont utilisé cette définition en choisissant délibérément de ne pas considérer les champignons, bactéries, protozoaires et autres animaux se développant avec la microflore. En revanche, le terme allemand *Aufwuchs* permet de prendre en compte l'ensemble des micro-organismes sans distinction et rejoint en ce sens la définition du terme *périphyton* introduite par Cooke en 1956 (Austin *et al.* 1981; Cooke 1956; Lucey *et al.* 1987) : *ces organismes (plantes et animaux) attachés ou accrochés aux tiges, feuilles ou plantes enracinées dans l'eau, ou aux autres surfaces présentes au-dessus du fond de la rivière*¹.

Il est aussi possible de distinguer les organismes immobiles (attachés au substrat), parfois désignés par le terme "eupériphyton", du "pseudopériphyton" ou "métapériphyton" constitué des organismes motiles qui se déplacent à l'intérieur ou sur le périphyton (Azim *et al.* 2005).

Plusieurs types de communautés périphytiques peuvent être caractérisés suivant leur substrat d'origine (Aloi 1990; Azim *et al.* 2005; Lock 1993). Les différents termes employés figurent dans le Tableau 1.

Terme employé	Surface colonisée par le biofilm
<i>épilithon</i>	cailloux et autres surfaces minérales
<i>épipelon</i>	sédiments
<i>épixylon</i>	bois
<i>épipsammon</i>	sable
<i>épiphyton</i>	surfaces immergées des macrophytes

Tableau 1 : Termes employés pour désigner les différents types de biofilms se développant en milieu naturel

¹ "Those organisms (both plant and animal) attached or clinging to stems, leaves or rooted plants, or other surfaces projecting above the bottom".

Dans cette étude, nous désignerons par « *périphyton* » ou indifféremment par « *biofilm* » l'ensemble des organismes se développant sur les supports immergés, qu'ils soient ou non fixés sur le substrat, ce qui correspond d'ailleurs à la définition du terme « *périphyton* » par l'APHA (1989). Ainsi, le *périphyton* sera composé d'algues, de bactéries, de Fungi, de protozoaires, de zooplancton, d'invertébrés et de leurs larves, et autres organismes benthiques.

1.2 Les biofilms

Le *périphyton* constitue ce que l'on appelle un *biofilm*, c'est-à-dire une structure biologique organisée se développant sur une surface, constituée de micro-organismes et d'une matrice d'exopolymères sécrétés par ces derniers (Sabater *et al.* 2007). Le terme "*biofilm*" peut être utilisé dans des situations extrêmement différentes, allant d'un *biofilm* fin formé par quelques bactéries issues d'une souche pure cultivée en microplaque à un *biofilm* épais, prélevé en milieu naturel de composition taxonomique variée. D'après Wimpenny (2000), le terme "*biofilm*" doit toujours faire intervenir trois points :

- la présence d'une surface ou d'une interface sur laquelle se développent les micro-organismes
- la présence d'une matrice de polymères extracellulaires sécrétés par les micro-organismes qui unifie l'ensemble de la communauté
- l'émergence d'une communauté de micro-organismes avec, en général, l'idée que cette communauté possède ses propriétés propres.

Grâce au développement de méthodes appropriées à la quantification ou à l'observation des *biofilms*², on sait aujourd'hui que la très grande majorité des micro-organismes aquatiques se développent naturellement sous forme de *biofilms* (Watkins & Costerton 1984). Ainsi, les populations bactériennes planctoniques représentent une très faible part de la biomasse bactérienne totale : 95 à 99% de la biomasse totale est en général considérée comme existant sous forme de *biofilms* (Nikolaev & Plakunov 2007), et jusqu'à 99.9% dans certains milieux aquatiques (Costerton *et al.* 1995).

1.2.1 Une structure microbienne organisée

Par définition, les organismes constituant un *biofilm* sont en contact rapproché les uns avec les autres. Un *biofilm* est donc avant tout une communauté d'organismes qui interagissent

² D'abord la microscopie électronique, (*scanning/transmission electron microscopy* ou SEM/TEM), et plus récemment le microscope confocal à balayage laser (*confocal scanning laser microscopy* ou CSLM), couplé par exemple à l'utilisation de sonde fluorescentes (Costerton *et al.* 1994), pour caractériser l'architecture des *biofilms* (Donlan 2002).

entre eux. Les micro-organismes présents dans la matrice des biofilms peuvent s'organiser en consortium et coopérer les uns avec les autres, par exemple pour co-métaboliser des substrats complexes (Davey & O'Toole 2000; Wimpenny 2000). Ils dépendent les uns des autres pour se procurer des nutriments, se protéger de composés toxiques ou maintenir des conditions optimales de développement (pH, potentiel rédox au sein du biofilm, etc.).

Les biofilms sont bien des « communautés » de micro-organismes, au sens où les propriétés de la communauté sont plus importantes (par exemple une activité plus importante) et/ou plus variées (par exemple une forte résistance aux antibiotiques (Geesey *et al.* 1992)) que la somme des propriétés de chacun des micro-organismes (Sutherland 2001a; Wimpenny 2000). Un biofilm ne peut donc pas être considéré comme une simple somme des micro-organismes qui le composent (Nikolaev & Plakunov 2007). En effet, ceux-ci ne sont pas tout à fait comparables à leurs homologues planctoniques, puisqu'un changement phénotypique s'opère à partir de l'adhésion à une surface (Donlan 2002). Par exemple, l'adhésion à une surface provoque l'activation de gènes impliqués dans la synthèse de l'alginate chez *P. aeruginosa*, et la synthèse d'enzymes permettant de produire des exo-polysaccharides nécessaires à la formation et la cohésion des biofilms chez certaines bactéries Gram-positives (Costerton *et al.* 1995). Certains auteurs affirment même que les micro-organismes des biofilms peuvent subir un phénomène de spécialisation analogue à la différenciation des cellules dans un organisme multicellulaire (Nikolaev & Plakunov 2007). Les différences observées dans l'expression génétique, et donc dans l'activité physiologique, entre les micro-organismes planctoniques et leurs homologues se développant dans un biofilm s'expliquent notamment par des phénomènes de *quorum sensing*, c'est-à-dire l'utilisation de signaux moléculaires appelés auto-inducteurs (Decho 2000; Sigg 2005), qui déclenchent l'activation de certains gènes. Ceci pourrait, entre autres, être à l'origine des propriétés particulières de ces communautés, par exemple une résistance accrue à des antibiotiques ou des métaux (Harrison *et al.* 2007).

1.2.2 La matrice d'EPS

S'agréger en biofilm constitue une stratégie de développement pour les micro-organismes : l'adhésion à une surface provoque un changement phénotypique peut-être à l'origine d'une résistance accrue à d'éventuelles substances toxiques, comme nous l'avons vu ci-dessus. Ils sont aussi et avant tout protégés, par exemple de certains prédateurs ou de variations trop brusques de paramètres environnementaux. Cette stratégie de défense est observée assez couramment dans la nature : par exemple, certains germes pathogènes d'eau douce, évacués par ruissellement ou par rejet d'eaux usées dans les rivières, constituent des floes pour se protéger des conditions physico-chimiques stressantes – salinité élevée et radiations UV – en milieu marin

(Decho 2000). Cette stratégie de défense n'est d'ailleurs pas réservée aux seules bactéries car les algues sécrètent aussi des carbohydrates en présence de composés toxiques comme des métaux (Kučera *et al.* 2008; Pistocchi *et al.* 2000).

D'après Sutherland (2001a), la matrice (Figure 1) des biofilms est constituée de 97 % d'eau, le reste étant composé de cellules microbiennes (2 à 5 % de la matrice), exopolysaccharides, protéines, acides nucléiques et composés ioniques, sans oublier des produits de lyse cellulaire, nutriments adsorbés, acides humiques, particules et autres débris provenant de l'environnement du biofilm. Les exopolysaccharides sécrétés sont aussi appelés polymères extracellulaires bactériens (EPS ou *Extracellular Polymers* ou encore *Extracellular PolySaccharides*). Ils peuvent être dans des états physiques variés allant du gel poreux à l'état colloïdal ou dissous en passant par des gels visqueux ou presque liquides aussi appelés *slime* (Decho 2000; Lester 1983). Ce sont les EPS qui structurent la matrice des biofilms, leur rôle semble d'ailleurs tout particulièrement important au moment de l'adhésion à la surface des premières cellules et lors des premières phases de développement d'un biofilm (Gilbert *et al.* 1997). Ils permettent aussi aux micro-organismes de contrôler le maintien de conditions physico-chimiques adaptées au sein du biofilm.

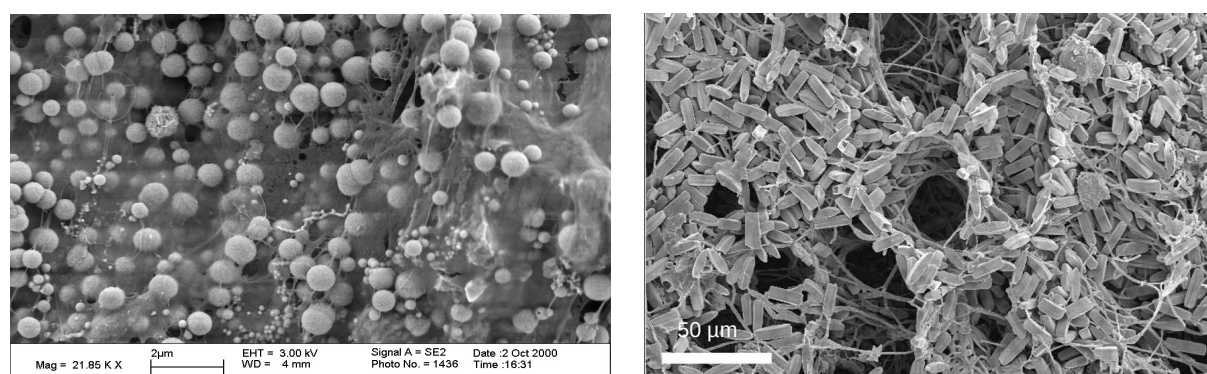


Figure 1 : Images de biofilms montrant la matrice. A gauche, image obtenue par micrographie électronique, grossissement 21.85 K × (<http://dujs.dartmouth.edu/fall-2009/biofilms-bacteria%E2%80%99s-elixer-of-survival>), à droite biofilm prélevé dans le Rio Tinto en Espagne (échelle 50 µm, l'espèce dominante est *Pinnularia acorcola* (diatomée) mais des filaments de *Klebsormidium* (chlorophyte) et de *Fungi* sont visibles (d'après Sabater *et al.* 2003).

La nature de la matrice dépend de facteurs intrinsèques au biofilm considéré, à savoir la composition génétique de la communauté, mais aussi de facteurs extrinsèques comme la surface colonisée, la vitesse du courant, la température, etc. Il s'agit donc d'une structure hétérogène et dynamique, en constant changement. On peut en effet décrire les biofilms comme des agrégats cellulaires compris dans une matrice de densité variable comprenant aussi des poches de vide interstitiel et des canaux séparant les micro-colonies (Davey & O'Toole 2000; Sutherland 2001a). La matrice permet ainsi de structurer différents micro-environnements ou niches écologiques

dans lesquelles les micro-organismes peuvent se développer en conditions adaptées. Certaines bactéries sont capables de synthétiser des bio-surfactants pour modifier localement la structure matricielle et solubiliser des nutriments (Sutherland 2001a). Les pores ou canaux sont, de plus, un moyen de circulation de l'eau qui véhicule les éléments essentiels au développement des micro-organismes. Moller *et al.* (1996) ont, par exemple, mis en évidence la présence d'une souche bactérienne capable de dégrader le toluène dans un biofilm³ non seulement à proximité de la surface mais aussi enfouie à proximité du substrat support de la communauté ; la présence de canaux visualisés en 3D par microscopie confocale à balayage laser montre que le toluène peut en effet diffuser jusqu'aux couches profondes du biofilm. Certains micro-organismes motiles sont d'ailleurs capables de se déplacer au sein de la matrice : par exemple des diatomées de genres mobiles⁴ comme *Navicula* ou *Frustulia* peuvent s'approcher de la surface du biofilm pour accéder à la lumière et s'enfouir dans des couches plus profondes de la matrice lorsque les conditions leur deviennent défavorables (Biggs 2000).

De nombreux auteurs se sont attachés à définir le rôle et les caractéristiques des EPS, notamment dans les biofilms de stations d'épuration (STEP), par exemple pour comprendre les mécanismes de floculation des boues et améliorer la filière de traitement des eaux usées, ou encore pour étudier la capacité des biofilms à accumuler certains toxiques (Sutherland 2001b), notamment dans la perspective de comprendre les mécanismes de résistances aux antibiotiques (Harrison *et al.* 2004). En effet, la matrice d'EPS se caractérise par une combinaison de charges positives et négatives accumulées sur les polypeptides, ce qui explique par exemple le fort pouvoir chélatant des biofilms pour les métaux (Decho 2000), des phénomènes de précipitation, de sorption, et de complexation intervenant simultanément (Fukushi *et al.* 2001; Guibaud *et al.* 2005; 2003; 2006). Les biofilms accumulent aussi les composés organiques, par exemple les molécules organiques naturellement présentes dans les eaux (Carlson & Silverstein 1998), voire des contaminants organiques (Maier *et al.* 2000; Wang *et al.* 2002). C'est donc grâce aux propriétés accumulatrices des EPS que les biofilms sont utilisés pour de nombreuses applications de bio-remédiation (Singh *et al.* 2006). La review de Vu *et al.* (2009) résume bien les différentes propriétés des EPS de biofilms.

Enfin, les EPS constituent aussi un micro-environnement protecteur pour le stockage des enzymes extracellulaires (Decho 2000) et pour les produits d'hydrolyse de ces enzymes (Lock 1993). Ainsi, Romani *et al.* (2008) montrent que les enzymes stockées dans la matrice peuvent représenter jusqu'à 65 à 81% de l'activité enzymatique totale chez des biofilms jeunes de rivière (1

³ Il s'agit d'un biofilm développé sur filtre biologique pour le re-traitement d'air pollué (*waste gas biofilter*).

⁴ La mobilité des diatomées pennées est un mécanisme liée à la forme de leur raphé, une fente longitudinale parcourant le frustule par laquelle les diatomées expulsent du mucilage (Herloy 2005).

à 4 jours), pourcentage qui tend à diminuer avec l'âge des biofilms. Certains auteurs ont aussi montré la présence de larges stocks d'exo-enzymes dans les flocs bactériens en STEP (Dignac *et al.* 1998; Frolund *et al.* 1995). Ces exo-enzymes, comme nous allons le voir (partie 1.4) jouent un rôle important dans les processus de biodégradation de la matière organique (MO) par les biofilms.

1.3 Développement de biofilms périphytiques en milieu naturel

Les biofilms microbiens sont aujourd'hui utilisés dans de nombreux procédés industriels (épuration des eaux usées, potabilisation de l'eau des rivières, etc.). Ils font l'objet d'études dans des domaines variés en relation avec notre quotidien : par exemple dans le domaine médical, dans le cadre de recherches sur les résistances aux antibiotiques (Gilbert *et al.* 1997), ou encore dans l'étude des réseaux d'eau potable (Obst & Schwartz 2007). Mais le rôle des biofilms dans les milieux naturels est aussi extrêmement important. En effet, le périphyton est un producteur primaire, parfois source principale de la photosynthèse notamment dans les petites rivières (Lamberti 1996). Le périphyton est aussi à la base de la chaîne trophique et permet à toutes sortes d'organismes aquatiques de se développer : petits invertébrés, crustacés, poissons etc. (Azim *et al.* 2005; Burns & Ryder 2001). Enfin, les populations périphytiques jouent un rôle primordial dans les cycles du carbone et de l'azote dans les milieux aquatiques (Flipo *et al.* 2004; 2007; Romani *et al.* 2004b).

1.3.1 Le périphyton dans le continuum fluvial

Le périphyton est une communauté complexe et hétérogène, constituée d'un mélange d'organismes autotrophes et hétérotrophes interagissant les uns avec les autres (Figure 2). Les autotrophes (algues, cyanobactéries, etc...) sont responsables de la production primaire : ils synthétisent la MO en utilisant le CO₂ ou les carbonates de l'eau comme source de carbone. Ils utilisent comme source d'énergie les radiations solaires (phototrophes réalisant la photosynthèse) ou certaines réactions chimiques de transformation de matières minérales réduites (lithotrophes), comme les produits soufrés, azotés, le méthane, l'hydrogène, le fer ou le manganèse. Les hétérotrophes dégradent et minéralisent la MO par différentes réactions d'oxydation pour se fournir en énergie : ils fabriquent leur matière vivante à partir de la MO présente dans le milieu, elle-même pouvant être d'origine autochtone (synthétisée par les autotrophes du système aquatique considéré) ou allochtone (MO apportée par le courant ou provenant de détritus, issus par exemple de la ripisylve).

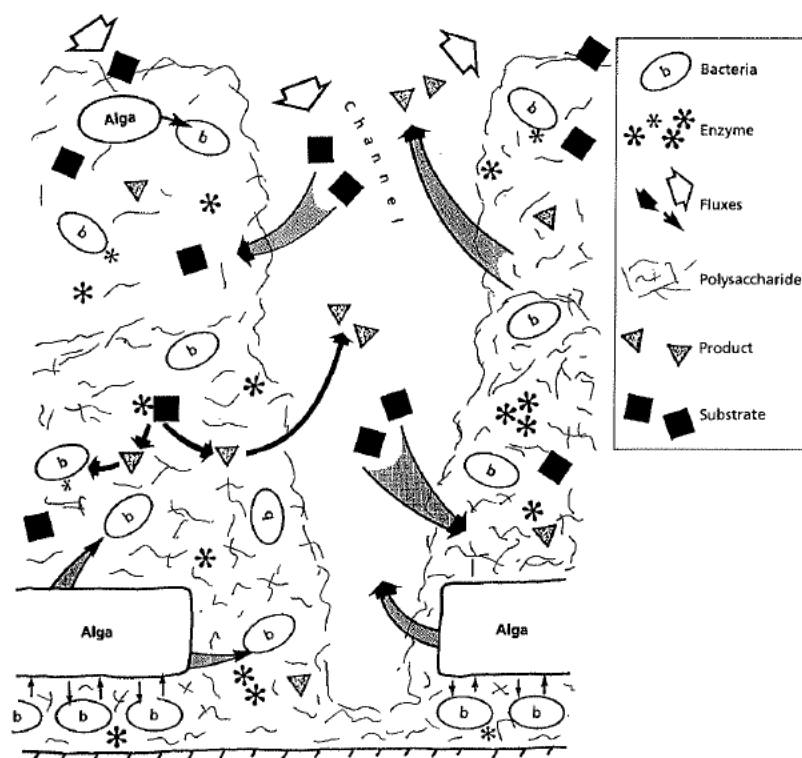


Figure 2 : Schéma synthétisant la structure d'un biofilm de rivière. Un pore (channel) traverse la matrice d'EPS et permet le passage de nutriments organiques et inorganiques. Les produits de la photosynthèse algale sont utilisés directement par les bactéries ou diffusent à l'extérieur du biofilm (flèches représentant les flux de matière). Les hétérotrophes (bactéries) sécrètent des enzymes qui peuvent être stockées dans la matrice et servent à hydrolyser les exsudats algaux comme des substrats en provenance de la rivière (MOD et MOP). Les produits d'hydrolyse peuvent être utilisés par les micro-organismes, stockés dans la matrice ou diffuser à l'extérieur du biofilm (Lock 1993).

Ainsi le périphyton, composé à la fois d'autotrophes et d'hétérotrophes, joue un rôle capital dans les cycles nutritifs (cycles du carbone, de l'azote, du phosphore). La thèse d'Erwann Madigou (2002) explique de façon détaillée le fonctionnement de ces trois grands cycles nutritifs et le rôle des micro-organismes dans la transformation et le recyclage des composés organiques et inorganiques en milieu aquatique.

La composition des biofilms périphytiques s'adapte au gradient physique (vitesse du courant, luminosité, température, etc.) et chimique (présence de MO grossière ou fine, turbidité, sels minéraux etc.) le long d'un cours d'eau. D'une manière générale, dans un environnement bien éclairé, le périphyton sera de nature plutôt autotrophe, dominé par des algues : chlorophytes, diatomées ou cyanobactéries. A l'opposé, dans un environnement peu éclairé, le périphyton sera à dominante hétérotrophe et donc plutôt bactérien. Les travaux de Vannote *et al.* (1980) montrent qu'il est théoriquement possible de définir trois grandes zones le long du *continuum fluvial*, c'est-à-dire le long du gradient physico-chimique et biologique du cours d'eau (Figure 3).

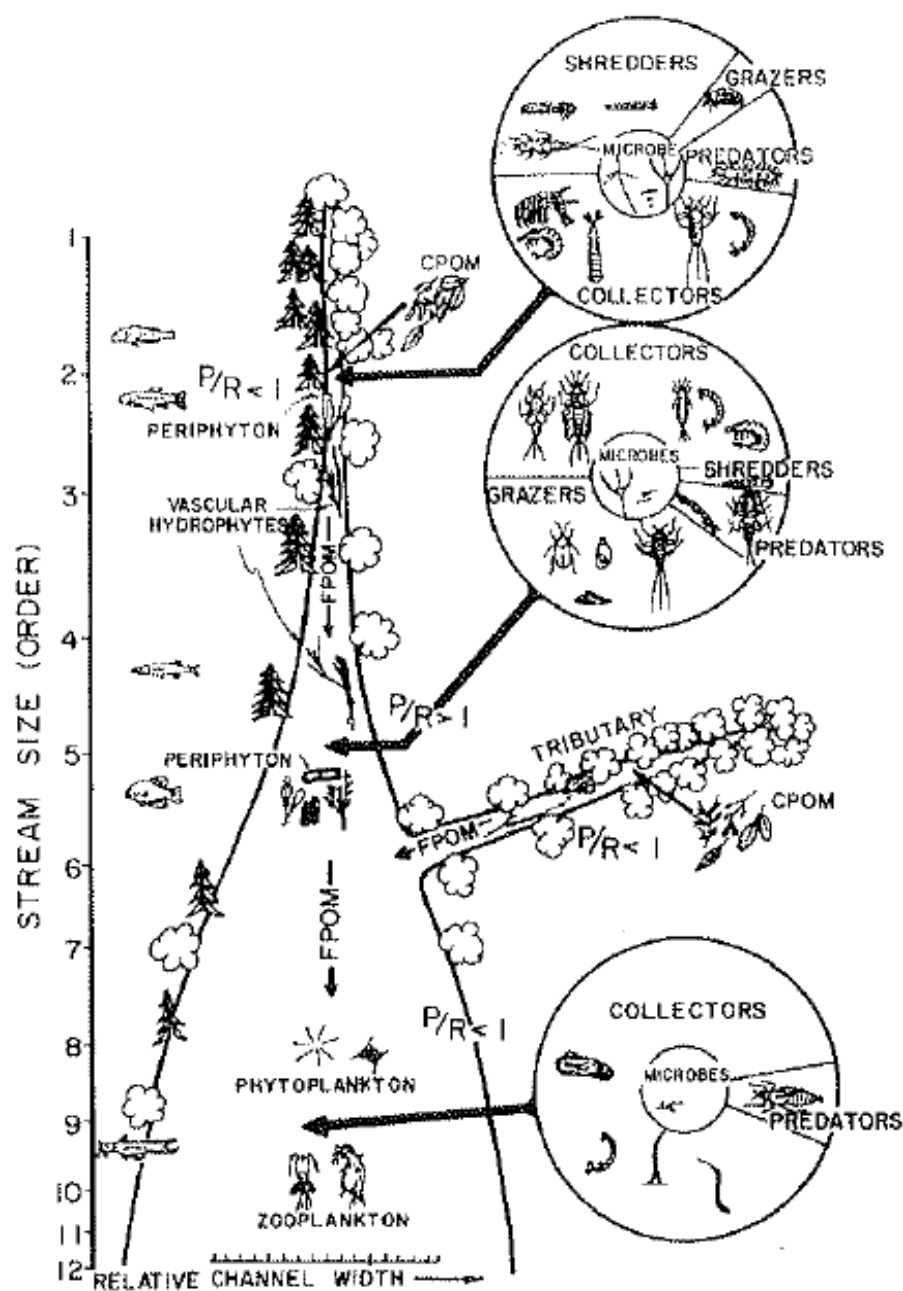


Figure 3 : Modèle d'évolution de la structure des communautés aquatiques et de la MO (MO grossière ou CPOM : Coarse Particulate Organic Matter en amont, MO fine ou FPOM : Fine Particulate Organic Matter en aval) en fonction de la taille d'une rivière (caractérisée par l'ordre de Strahler) suivant le principe du continuum fluvial (Vannote et al. 1980). Les populations de vertébrés s'adaptent aux ressources nutritives caractéristiques de chaque zone : en particulier, les proportions de brouteurs (grazers), prédateurs (predators), broyeurs-déchetteurs (shredders) et collecteurs (collectors) sont indiquées à droite.

Ainsi, un cours d'eau :

- amont (ordre de Strahler <3), plutôt boisé, caractérisé par une vitesse d'écoulement rapide et une MO grossière d'origine allochtone (feuilles et autres débris végétaux), sera majoritairement hétérotrophe (rapport Production primaire/Respiration (P/R) <1).
- d'ordre de Strahler compris entre 4 et 6 sera caractérisé par une activité autotrophe (rapport P/R >1), favorisée par un ensoleillement supérieur de la rivière (les rives sont plus éloignées).
- enfin, un cours d'eau d'ordre de Strahler supérieur à 6 sera caractérisé à nouveau par un système majoritairement hétérotrophe (rapport P/R <1). Dans ces grandes rivières, l'apport de MO fines par l'amont est important, ce qui génère une turbidité qui réduit le développement de la biomasse algale, notamment dans le lit de la rivière (épissammon et épilithion) (Knight & Bottorf 1981).

Le concept de *continuum fluvial* permet donc de mettre en relief les interactions complexes entre des paramètres physico-chimiques et des paramètres biologiques se répercutant sur la structure et le fonctionnement du périphyton.

En milieu naturel, les organismes autotrophes et hétérotrophes des biofilms sont en compétition pour l'utilisation des nutriments ; par exemple, ils utilisent le phosphore en provenance de la rivière. Les hétérotrophes utilisent aussi comme source de carbone les exudats algaux ou produits de lyse cellulaire : Romani & Sabater (2000) ont ainsi montré que les activités enzymatiques hétérotrophes de biofilms de rivière étaient maximisées quand la biomasse algale était importante. De même, les autotrophes vont utiliser les nutriments issus des processus de dégradation de la MO par les organismes hétérotrophes. Il existe donc aussi une relation d'interdépendance entre les autotrophes et hétérotrophes d'un biofilm (Ylla *et al.* 2009), l'équilibre entre hétérotrophie ou autotrophie globale étant contrôlée par divers facteurs tels que la lumière, les concentrations en nutriments ou encore les espèces algales et bactériennes présentes dans le biofilm (Burns & Ryder 2001).

1.3.2 Etapes de développement des biofilms

Le stade initial de colonisation d'une surface immergée par un biofilm est une étape au cours de laquelle quelques cellules, appartenant à une population de cellules capables de se fixer et de coloniser une surface (colonisateurs primaires), se retrouvent aléatoirement sur une surface et y adhèrent (Wimpenny *et al.* 2000). Le type de substrat et les charges ioniques qu'il possède en

surface conditionnent, entre autres, l'adhésion de ces premières cellules. Après la phase d'attachement réversible de ces premières cellules, les cellules s'attachent de manière irréversible : elles perdent leur capacité à se mouvoir sur la surface et la formation de la matrice d'EPS est amorcée (Nikolaev & Plakunov 2007). Les cellules se développent ensuite sous forme de micro-colonies. Trois modèles conceptuels, basés sur l'observation de biofilms naturels, ont été développés pour décrire le développement d'un biofilm (Wimpenny & Colasanti 1997) :

- le modèle "canal d'eau" (*water channel model*) dans lequel les micro-colonies, en proliférant, forment des structures en forme de cônes puis, en grandissant, en forme de champignons, peu à peu liées au substrat par des tiges d'EPS et de micro-organismes. La fusion de ces structures explique la formation de pores ou canaux permettant à l'eau de pénétrer jusqu'à la base des biofilms (Costerton *et al.* 1995). Ce type de structure (Figure 4) a été décrit pour des biofilms naturels se développant en milieu aquatique.

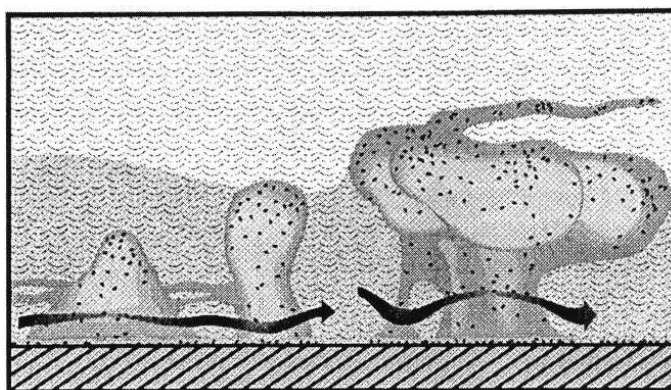


Figure 4 : Schéma du modèle "water channel" montrant le développement d'un biofilm, de la micro-colonie à forme conique à la micro-colonie à forme de champignon, puis l'attachement progressif de plusieurs micro-colonies entre elles. Le flux d'eau dans les canaux entre ou à la base des micro-colonies est matérialisé par les flèches noires (Costerton *et al.* 1995).

- le modèle des mosaïques hétérogènes (*heterogeneous mosaic biofilm model*) est une forme extrême du modèle *water channel* et a été utilisé pour décrire des biofilms se développant dans des réseaux d'eau potable. Dans ce modèle, les micro-colonies se développent de la même manière mais restent détachées les unes des autres, avec en général, un film très fin de cellules au niveau du substrat.

- le modèle des biofilms denses (*dense biofilm models*) permet de décrire le développement de biofilms particuliers comme la plaque dentaire. Ces biofilms se développent par association physique de bactéries sans formation de pores ou canaux.

Après l'adhésion des premières cellules et le développement des premières micro-colonies, la formation d'un biofilm va dépendre de paramètres biologiques et physico-chimiques, deux micro-colonies pouvant entrer en compétition (par exemple pour la consommation d'un nutriment), coopérer ou se développer indépendamment. Si les étapes initiales de développement

d'un biofilm sont très rapides et ne nécessitent que quelques minutes, la formation d'un biofilm mature nécessite quelques jours voire semaines en fonction des conditions environnementales (Figure 5). Le périphyton prélevé en rivière sur support artificiel est en général collecté au bout de 2 à 4 semaines de colonisation (Sabater *et al.* 2007; Tien *et al.* 2009).

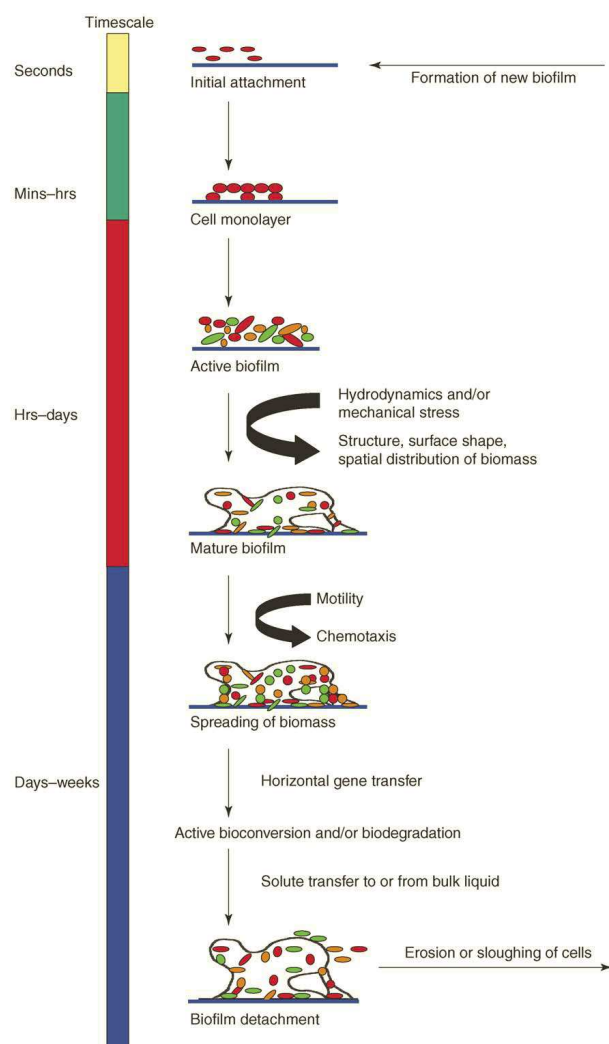


Figure 5 : Représentation schématique des étapes de développement d'un biofilm (Singh *et al.* 2006) : en premier lieu l'adhésion initiale de quelques cellules (*initial attachment*), puis la formation des micro-colonies et d'une couche de cellules sur la surface (*cell monolayer*), et le développement d'un biofilm fonctionnel par arrivée de différents types de micro-organismes (*active biofilm*), puis d'un biofilm mature dont la structure est influencée par les conditions environnementales (*hydrodynamic factors, mechanical stress*). Dans les biofilms matures, les cellules motiles peuvent se déplacer en fonction des conditions physico-chimiques plus ou moins favorables (*chemotaxis*) ; la biomasse s'étend (*spreading of biomass*) et avec elle la possibilité de transfert de gènes entre micro-organismes (*horizontal gene transfer*). Des phénomènes de mortalité cellulaire entraînent des mécanismes de dégradation. Enfin, des morceaux de biofilms se détachent naturellement ou par érosion (*erosion or sloughing of cells*). Les cellules ainsi libérées peuvent à nouveau coloniser une nouvelle surface.

La colonisation de supports immergés conduisant au développement de biofilms de rivière commence parfois avec des diatomées colonisatrices (Sigeo 2005) qui modifient localement l'environnement de la surface, notamment par production de mucilage (Stevenson 1983), et préparent ainsi l'arrivée d'autres micro-organismes. Dans certains cas, les premiers

colonisateurs peuvent aussi être des algues vertes ou des bactéries (Paule *et al.* 2009). Les biofilms constituent des structures dynamiques en constant changement, de nouveaux micro-organismes apportés par le courant pouvant s'attacher aux colonies pendant toutes les étapes du développement. Inversement, les processus de détachement de morceaux de biofilms ré-introduisent dans l'eau des micro-organismes qui pourront à nouveau coloniser de nouvelles surfaces.

1.3.3 Facteurs structurants pour le périphyton

En milieu naturel, le développement du périphyton est influencé par un certain nombre de facteurs, que l'on retrouve dans le schéma de Burns & Ryder (2001) (Figure 6).

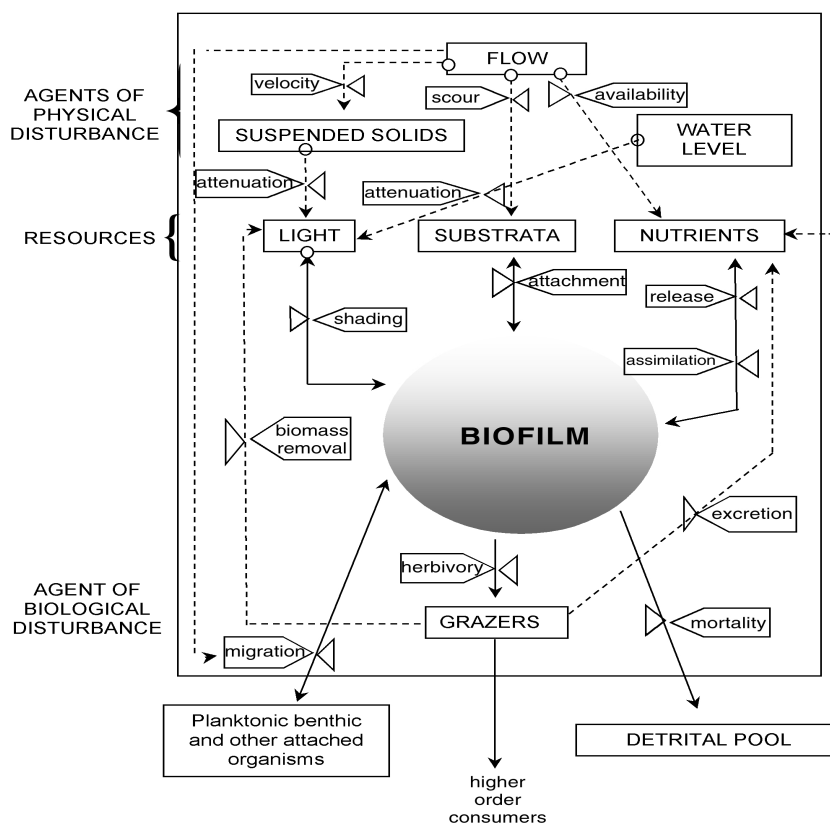


Figure 6 : Facteurs influençant la structure, la composition et la physiologie des biofilms en milieu naturel. Les flux de matière et d'énergie sont matérialisés par des flèches et la légende de chaque flèche est indiquée par une étiquette. Les facteurs influençant le développement des biofilms sont regroupés en trois types : les facteurs physiques sont la vitesse du courant (flow), le niveau de l'eau (water level) et la concentration en MES (suspended solids) ; les ressources du biofilm sont la lumière (light), le substrat (substrata) et les nutriments (nutrients). Enfin les organismes brouteurs (grazers), qui contribuent aussi à structurer la communauté, sont classés comme facteurs perturbateurs biologiques (Burns & Ryder 2001).

Parmi ces facteurs, on distingue en général :

- le support ou substrat

Par définition, les biofilms se développent sur toute surface immergée mais le substrat est à même de modifier les communautés qui se développent sur sa surface. Ainsi, Sinsabaugh *et al.* (1991) montrent que les communautés se développant sur du bois sont structurellement (biomasses algale et fongique plus importantes) et fonctionnellement (activités enzymatiques plus importantes) différentes de biofilms se développant dans les mêmes conditions mais sur plaques de verre. Dans cet exemple, il est probable que l'utilisation du bois comme source de carbone par les micro-organismes du biofilm, notamment les Fungi, soit un facteur non négligeable.

- la vitesse du courant

La vitesse du courant influe sur l'accumulation de biomasse : si la vitesse du courant est suffisante, le biofilm se développe plus rapidement que dans une eau stagnante. Son activité métabolique peut aussi augmenter puisque la couche limite de diffusion, contrôlant notamment l'accumulation des nutriments au sein du biofilm, est affinée (Biggs & Thomsen 1995). Toutefois, au-delà d'une certaine limite, des courants trop puissants empêchent les biofilms de se développer complètement (Figure 7).

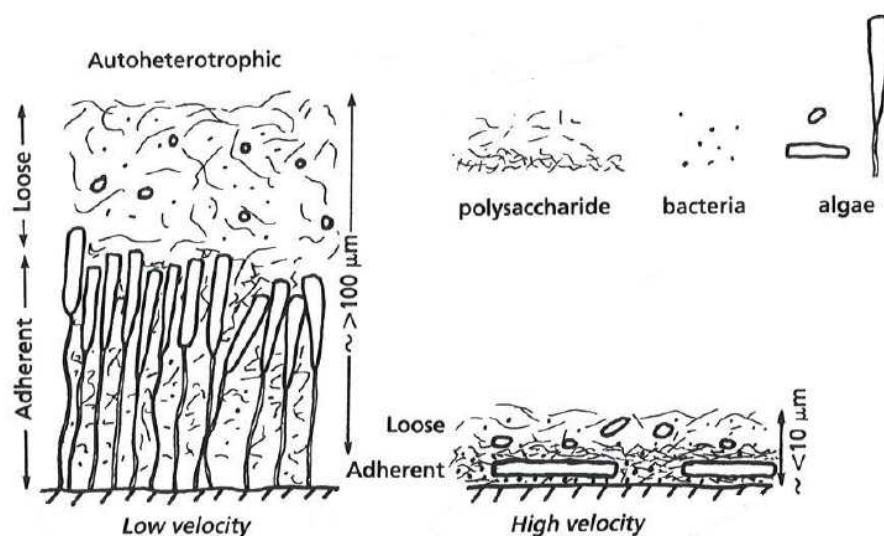


Figure 7: Représentation schématique de biofilms de rivière (Lock 1993). En présence de courant rapide (*high velocity*), les biofilms sont plutôt fins, alors qu'en présence de courant faible (*low velocity*), ils sont plus épais. Les biofilms sont souvent composés d'une première couche très adhérente au substrat (*adherent*) et d'une couche moins fermement attachée (*loose*).

Ainsi, le courant modèle l'architecture du périphyton. Les variations de courant et la fréquence des événements violents de type inondation sont aussi des facteurs structurants importants pour les biofilms (Clausen & Biggs 1997). Par exemple, Biggs & Close (1989) montrent que des changements mineurs du débit de l'eau peuvent dans certains cas modifier considérablement la biomasse : dans leur étude, un débit cinq fois plus élevé engendre une perte de biomasse de près de 95%. En revanche, dans des rivières soumises à de longues périodes de

bas débits sans épisodes pluvieux violents, on observe aussi des détachements autogéniques de fragments de biofilms (Bouletreau *et al.* 2006; Lappin-Scott & Bass 2001). Les micro-organismes ainsi détachés sont alors capables de coloniser de nouvelles surfaces.

- la température de l'eau et les variations saisonnières

La température joue un rôle dans le développement des biofilms : elle a un effet direct sur les cinétiques des réactions biochimiques, et donc sur la dégradation de la MO par les communautés hétérotrophes (Kirchman & Rich 1997). L'effet de la température sur les communautés bactériennes est particulièrement important pour les basses températures : Hoch et Kirchman (1997) montrent ainsi que la production bactérienne est corrélée positivement et significativement à la température quand celle-ci est inférieure à 12 °C ; pour des températures supérieures, les paramètres de biomasse bactérienne varient suivant la production algale (phytoplancton). Ils observent par exemple un temps de latence (« *lag* ») entre le bloom algal du printemps, et la hausse de la production bactérienne, car la température est encore basse (<12 °C) alors que la production primaire augmente. De même, Brümmer *et al.* (2004) mettent en évidence, par une technique de biologie moléculaire⁵, des populations microbiennes stables en été et hiver dans des biofilms de rivière, avec des changements visibles pendant les périodes de transition (printemps et automne). Enfin, Vis *et al.* (1998) étudient le périphyton récupéré sur des bouées de navigation placées à différents endroits dans le Saint-Laurent, le long d'un gradient de pollution urbaine, et concluent à une influence prépondérante de la variabilité saisonnière sur la biomasse périphytique : ils observent un cycle saisonnier marqué (bloom algal au printemps avec prédominance des diatomées, apparition et domination de la biomasse algale par les cyanophytes et les chlorophytes en été et à l'automne) et peu d'effet de l'effluent urbain sur les paramètres mesurés.

- la lumière et le "broutage" (*grazing*)

La lumière est, comme nous l'avons souligné précédemment, un facteur déterminant du développement des organismes autotrophes au sein du périphyton. Pour accéder à la lumière, les autotrophes d'un biofilm développent diverses stratégies pour rester en surface des biofilms : on parle de *physiognomies* (Figure 8). Celles-ci sont aussi influencées par l'activité des organismes brouteurs herbivores, qui s'exerce aussi sur la surface des biofilms, puisqu'ils consomment les algues. Selon leur morphologie, les organismes brouteurs ne s'attaquent pas forcément aux mêmes couches d'un biofilm et ne consomment donc pas tous les mêmes espèces algales. L'étude de Wellnitz & Ward (2000) met en lumière l'influence de ces deux facteurs antagonistes – la lumière permet aux algues périphytiques de se développer alors que les brouteurs les consomment – sur la structure tri-dimensionnelle des biofilms autotrophiques de rivière.

⁵ TGGE ou *Temperature Gradient Gel Analysis*, voir partie III de ce chapitre.

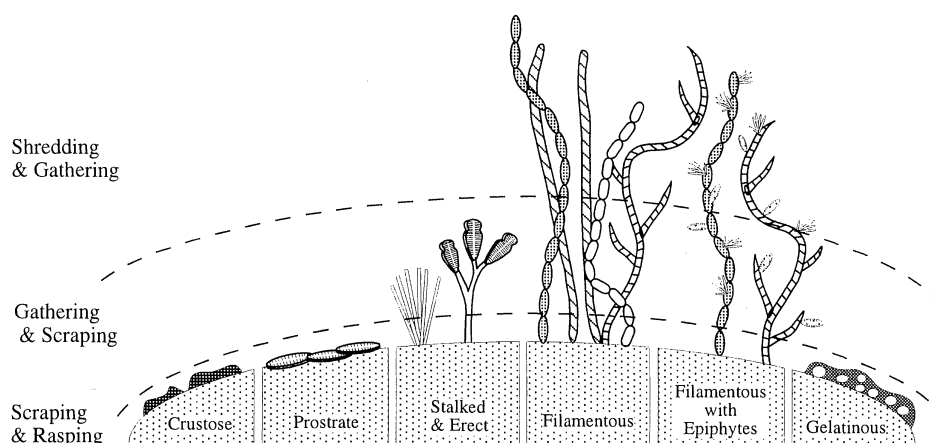


Figure 8 : Différentes physiognomies adoptées par les algues périphytiques. Selon la physiognomie adoptée, une algue sera vulnérable à un certain type d'organisme brouteur (Wellnitz & Ward 2000).

La review de Burns & Ryder (2001) reprend le détail des différents facteurs influençant le développement des biofilms en rivière cités ci-dessus. D'autres facteurs seraient à prendre en compte dans une étude exhaustive du développement des biofilms en rivière, comme les concentrations en nutriments, la stabilité du substrat, ou l'abrasion des biofilms par les matières en suspension (Biggs & Close 1989). Certaines études s'attachent à explorer l'influence conjointe de plusieurs facteurs, par exemple la lumière et la présence d'organismes brouteurs comme dans l'étude de Wellnitz & Ward (2000) citée ci-dessus, ou encore la lumière et la présence de MO directement assimilable (Ylla *et al.* 2009). Il est important de garder à l'esprit qu'aucun de ces facteurs n'est prépondérant et que c'est l'ensemble des conditions environnementales, ainsi que la composition en espèces spécifiques à la rivière, qui structurent les biofilms.

1.4 Rôle du périphyton dans la dégradation de la MO

Les biofilms jouent un rôle capital dans les capacités d'auto-épuration des rivières en tant que sites majeurs de rétention et de transformation de la matière organique dissoute ou MOD (Sabater *et al.* 2002). En effet, leur capacité à épurer le milieu aquatique de substances organiques et inorganiques est à l'origine de leur utilisation pour abaisser les concentrations en nitrates et phosphore dans les eaux usées, voire pour abaisser les concentrations en certains polluants (Maier *et al.* 2000; Sabater *et al.* 2002). Les organismes hétérotrophes (bactéries et Fungi) des biofilms contrôlent la transformation de la matière organique (MO) dissoute et particulaire et permettent ainsi le transfert de MO et d'énergie vers les niveaux trophiques supérieurs (Sanders *et al.* 1989). On résume le rôle des organismes hétérotrophes dans le flux de MO par le nom de *boucle microbienne* (Azam *et al.* 1983). En outre, après hydrolyse des macromolécules et oxydation de la MO au cours des processus de respiration, les organismes hétérotrophes produisent les

nutriments indispensables au développement de la biomasse algale (CO_2 , PO_4^{3-} , NH_4^+ , SO_4^{2-}) (Chrost 1992; Zheng *et al.* 2002).

1.4.1 Dégradation enzymatique de la MO

La MO dans les milieux aquatiques est très diversifiée, puisqu'elle se décline en organismes vivants, macromolécules (protéines, sucres, lipides, acides nucléiques, etc.) et petites molécules (sucres, acides aminés, etc.). Il s'agit des produits de la production primaire et des produits de transformations réalisées par les êtres vivants (biochimie), voire des produits issus de phénomènes géologiques. A cette liste, peuvent être ajoutés un certain nombre de composés organiques allochtones, d'origine tellurique (ruissellements, apports diffus du BV), ou anthropique (hydrocarbures, résidus pharmaceutiques, pesticides, détergents, etc.) (Montuelle & Volat 1993; Servais *et al.* 1998). Cette MO est présente dans l'eau sous forme dissoute, particulaire, voire colloïdale (par exemple les acides humiques). On distingue la MO dissoute ou MOD, qui passe à travers un filtre de porosité $0.45\ \mu\text{m}$ (ou $0.22\ \mu\text{m}$ selon la limite fixée par l'expérimentateur), et la MO particulaire ou MOP (macromolécules complexes), retenue sur le filtre.

Dans les rivières, la majeure partie de la matière organique est en général présente sous forme de MOD (75 à 99% de la MO), dont une faible partie seulement (moins de 5%) est directement assimilable par les bactéries (Chrost 1989, 1992; Chrost & Overboeck 1990), donc biodégradable (Servais *et al.* 1989; 1995). En effet, il s'agit majoritairement de macromolécules – protéines, polysaccharides, acides nucléiques, acides humiques – ne pouvant pénétrer à l'intérieur des cellules (Chrost 1991a). Cette MOD a pour origine les processus de biodégradation de la MOP par les micro-organismes, les excréments et fèces du micro et macro-zooplankton, les débris végétaux issus de la lyse des cellules algales ou du broutage par le zooplankton herbivore (Chrost 1989). Elle constitue un facteur limitant pour la production de biomasse bactérienne (Chrost 1992; Kirchman & Rich 1997).

Pour pouvoir dégrader la MO, les bactéries sécrètent des enzymes extracellulaires dont le rôle est d'hydrolyser la MO (*hydrolases*), c'est-à-dire les hydrates de carbone (glucides, polysaccharides et monosaccharides, par exemple la cellulose, l'amidon), protéines, lipides, etc. présents dans le milieu, en molécules plus petites (glucose, polypeptides, acide aminé, etc.), directement assimilables. Chrost (1992) qualifie d'*extracellulaires* les enzymes sécrétées et présentes dans le milieu sous forme libre ou associées à des particules ou surfaces autres que les organismes producteurs, par opposition aux enzymes *ectocellulaires* (ecto-enzymes), qui restent liées aux organismes producteurs, soit accrochées à la paroi cellulaire (face interne ou externe de la

membrane externe chez les bactéries Gram négatif, paroi cellulaire chez les bactéries Gram positif), soit présentes dans le périplasme des bactéries Gram négatif. Ainsi, les enzymes extracellulaires, au sens de Chrost, peuvent être secrétées activement ou libérées dans le milieu par lyse des cellules bactériennes productrices, ce qui signifie que les activités extracellulaires ne sont pas forcément associées à de la matière vivante (cellules viables et intègres). Ces enzymes jouent un rôle essentiel dans les processus de dégradation de la matière organique et dans la bioépuration des eaux riches en MO (Chappell & Goulder 1994).

La synthèse des enzymes extracellulaires est régulée au niveau transcriptionnel (ARNm) en présence de composés directement assimilables (produits de la réaction enzymatique) dans la cellule ou à proximité. Lorsque les composés assimilables se font plus rares, la synthèse de nouvelles enzymes est induite par dé-répression de la transcription du gène codant pour l'enzyme (Chrost 1989). Une fois produites, les enzymes présentes non protégées (par exemple produites par le bactérioplancton dans l'eau) sont sujettes aux variables physico-chimiques du milieu ambiant, en particulier le pH (Figure 9) et la température qui jouent un rôle sur l'activité.

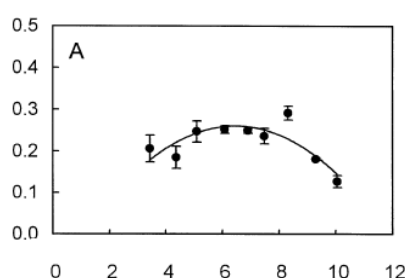


Figure 9 : Variation de l'activité β -glucosidase (en nmom/mL/h) en fonction du pH. Espeland et al.(2001).

Elles peuvent aussi être sujettes à une inhibition compétitive (par les produits de réaction enzymatique) ou non-compétitive, par exemple par des acides humiques, qui peuvent augmenter la stabilité des enzymes (augmentation du temps de demi-vie) et réduire leur activité (Espeland & Wetzel 2001; Sinsabaugh *et al.* 1997). Lorsqu'elles sont produites par les organismes hétérotrophes des biofilms, les enzymes peuvent être stockées dans la matrice dans laquelle elles sont protégées des variations environnementales (Romaní *et al.* 2008).

Parmi les hydrolases, on distingue les glucosidases, qui interviennent dans le processus de dégradation de la cellulose, les phosphatases, qui permettent aux bactéries de récupérer le phosphore inorganique à partir de monoesters orthophosphoriques, et les aminopeptidases, qui dégradent les protéines en peptides et acides aminés assimilables. Les activités enzymatiques les plus mesurées en milieu aquatique sont la leucine-aminopeptidase, la β -glucosidase et l' α -glucosidase, et la phosphatase. L'activité glucosidase est liée à la présence de polysaccharides,

donc au métabolisme du carbone, et l'activité leucine-aminopeptidase est liée à la présence de protéines, donc au métabolisme de l'azote (Sinsabaugh & Foreman 2001). Dans cette étude, nous nous sommes intéressés uniquement à l'activité β -glucosidase.

1.4.2 L'activité β -glucosidase

La β -D-glucosidase (β -D-glucoside glucohydrolase, EC 3.2.1.21) intervient dans la bio-dégradation de la cellulose ; elle catalyse l'hydrolyse d'une grande variété de carbohydrates, notamment les disaccharides de glucose (Figure 10). Il s'agit d'une enzyme à large spectre, catalysant l'hydrolyse d'un grand nombre de sucres. Sa température optimale est de 28 °C ; son activité décroît pour des températures supérieures à 30 °C et inférieures à 15 °C. La vitesse de la réaction enzymatique augmente avec la basicité du milieu jusqu'à son maximum à pH 8, puis diminue rapidement pour des pH supérieurs à 8.5 (Chrost 1992). La régulation de l'activité β -glucosidase se fait à deux niveaux : sur la synthèse de l'enzyme par induction (présence de carbohydrates complexes) et/ou répression (présence de sucres assimilables), mais aussi sur l'enzyme elle-même (pH, température, etc.) (Montuelle & Volat 1993).

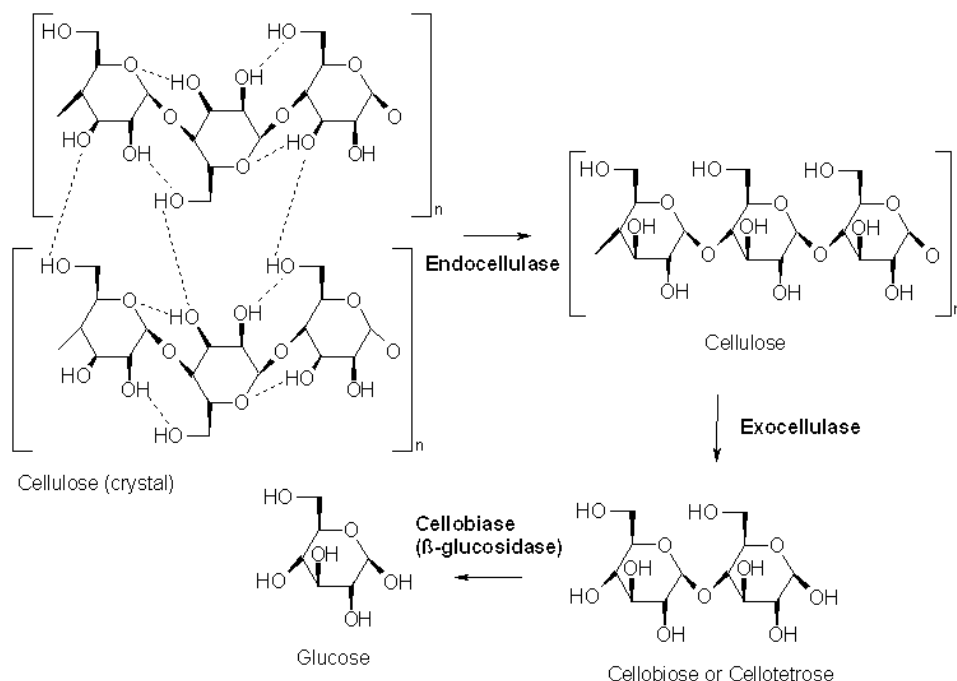


Figure 10 : Hydrolyse de la cellulose par trois cellulases. La β -glucosidase catalyse l'hydrolyse de la cellobiose (disaccharide de glucose) en deux molécules de glucose (<http://de.academic.ru>).

En milieu aquatique, la production de β -glucosidase est corrélée à la présence de MO polymérique et à la déplétion de la quantité de MOD directement assimilable (Chrost 1992). Les polysaccharides représentent 10 à 20 % de la MOD et 25 % de la MOP (Chrost 91) ; ils

représentent la forme majoritaire de carbone fixé par photosynthèse et la source majeure de carbone et d'énergie pour les hétérotrophes en milieu aquatique.

Selon Chrost *et al.* (1991a; 1992), l'activité β -glucosidase, mesurée dans des échantillons d'eau de lac, est associée aux microorganismes présents dans la fraction de taille 0.2 à 3.0 μm et non à la phase dissoute. Brown et Goulder (1996) observent également une activité β -glucosidase du bactérioplancton associée à la fraction de taille supérieure à 0.2 μm , soit des enzymes liées aux cellules et particules, c'est-à-dire des ectoenzymes, selon la définition de Chrost (1992). Elle est par ailleurs fortement corrélée à l'activité hétérotrophe des bactéries et champignons inférieurs (mesurée par exemple par incorporation de thymidine et de glucose) et au nombre de cellules bactériennes présentes.

2. Le périphyton comme marqueur d'une contamination

2.1 Un matériel biologique de choix pour le scientifique

Plusieurs caractéristiques du périphyton en font un matériel de choix comme indicateur de stress biotique ou abiotique du milieu :

- ubiquité et abondance

La présence et l'abondance de micro-organismes sessiles en milieu aquatique est avérée depuis longtemps (Geesey *et al.* 1978; Sládeček & Sládečková 1964). Les biofilms sont aussi capables de se développer dans des conditions très éloignées de celles du périphyton des rivières, par exemple dans les réseaux d'eau potable (Rogers *et al.* 1994), d'où des domaines d'application et de recherches variés.

- facilité de collecte et de transport

Le périphyton peut être collecté sur des supports artificiels disposés verticalement dans l'eau pour éviter tout dépôt par sédimentation (Sládeček & Sládečková 1964). La colonisation de ces supports ne permet pas de mimer la colonisation sur support naturel, mais elle réduit l'hétérogénéité entre les supports et permet d'obtenir un grand nombre de répliquats avec le même biais de colonisation (Aloi 1990; Austin et al. 1981). Un autre avantage lié à cette technique est de pouvoir maîtriser l'âge du biofilm, à savoir la durée de colonisation du support immergé.

Différents types de supports ont été utilisés dans la littérature : Aloï (1990) répertorie un certain nombre de supports comme des lames ou disques de verre (Blanck *et al.* 2003; Morin *et al.* 2008b), les plus couramment utilisés, mais aussi des cailloux, tuiles en céramique (Smucker *et al.* 2009), briques, plaques ou billes de polystyrène (styrofoam) ou de polyuréthane, des fils de nylon, des bouées de navigation (Vis *et al.* 1998), et même des substrats diffusant des nutriments (*nutrient diffusive substrate*), comme des boîtes de Pétri remplies de gel d'agar enrichi en nutriments. On peut ajouter à cette liste d'autres types de support comme des carreaux en téflon (Smoot *et al.* 1998) ou des feuilles de polyéthylène (Watanabe 1985).

- **caractère sessile**

Par définition, les biofilms sont immobilisés sur une surface, ce qui a l'avantage de les rendre caractéristiques de leur site de prélèvement : en effet, ils ne peuvent s'y soustraire par migration ou d'autres moyens et doivent donc y subsister. Ainsi, la condition du périphyton est le reflet de la qualité du milieu dans lequel il est prélevé.

- **diversité taxonomique**

Les biofilms en rivière sont composés d'organismes appartenant à des groupes taxonomiques variés et occupant des fonctions diverses dans la chaîne trophique (producteurs, consommateurs, brouteurs, etc.). L'étude de ces communautés complexes permet d'intégrer les rôles et les interactions entre ces différents types d'organismes.

- **rôle écologique**

A l'interface entre l'eau et les sédiments, ou entre l'eau et une autre surface colonisée (cailloux, macrophytes, etc.), le périphyton intègre les différents paramètres biotiques et abiotiques de leur environnement naturel (Sabater *et al.* 2007). Le périphyton est aussi le premier "organisme" à réagir à une variation ou perturbation puisque les micro-organismes (bactéries mais aussi algues) qui le composent ont un cycle de vie court et une grande réactivité à toute variation dans leur environnement.

En outre, comme ils sont à la base de la chaîne trophique, tout changement dans la structure des biofilms se répercutera sur l'ensemble de l'écosystème ; en particulier, le périphyton étant capable d'accumuler les contaminants (par exemple les métaux), ceux-ci peuvent ensuite être transmis aux niveaux trophiques supérieurs (Serra *et al.* 2009a).

Enfin, le périphyton joue un rôle essentiel dans le cycle des nutriments organiques et minéraux en milieu aquatique (Flipo *et al.* 2004; 2007; Romani *et al.* 2004b; Thouvenot *et al.* 2007).

Toute perturbation du périphyton est donc susceptible d'avoir des conséquences sur le fonctionnement de l'écosystème aquatique (Lowe & Pan 1996).

L'ensemble des caractéristiques détaillées ci-dessus font du périphyton un matériel de choix pour évaluer l'état d'un écosystème aquatique. Cependant, il convient de garder à l'esprit qu'il s'agit de communautés en interaction avec le milieu et donc de structures dynamiques, en constante évolution, dont on connaît en général mal la composition taxonomique globale.

2.2 Biodescripteurs du périphyton

Dans le cadre de l'utilisation du périphyton comme bioindicateur de la contamination chimique, deux niveaux de réponse biologique peuvent être étudiés : une réponse en termes de perturbation de la structure de la communauté, et une réponse en termes de perturbation des fonctions qu'elle exerce dans l'écosystème.

2.2.1 Modifications de structure

L'information la plus basique que l'on peut obtenir sur une communauté périphytique est une mesure de biomasse (Aloi 1990). La biomasse est classiquement estimée par unité de surface colonisée par le biofilm. On peut évaluer la biomasse par différentes méthodes dont les plus communes sont une mesure du poids sec ou *dry weight* (DW), que l'on obtient par filtration, et une mesure des matières volatiles (matières organiques) ou masse sèche sans cendre, soit *Ash-Free Dry Weight* (AFDW), que l'on obtient par combustion d'un filtre ou d'une quantité donnée de matière dans un four à moufle (500 °C). La mesure d'AFDW permet d'estimer la quantité de matières organiques contenues dans le biofilm, c'est-à-dire à la fois la matière vivante, et la MO issue de débris cellulaires ou détritiques accumulés dans la matrice en provenance de la rivière. Le poids sec permet d'estimer la quantité de matière contenue dans le biofilm, ce qui prend aussi en compte des débris ou détritiques charriés par la rivière. Ces deux mesures ne permettent donc pas d'estimer la biomasse réelle d'un biofilm.

La biomasse algale est en général évaluée par une mesure de la concentration en chlorophylle *a*. L'estimation ainsi faite n'est néanmoins pas toujours idéale pour évaluer la quantité d'algues, puisque la concentration en chlorophylle dans les cellules algales peut varier selon certains paramètres comme la lumière (Burns & Ryder 2001). La mesure de la concentration en chlorophylle *a* permet aussi de calculer l'indice autotrophe (*autotrophic index* ou AI) que l'on définit comme le ratio de AFDW sur la concentration en chlorophylle *a*. Les valeurs

standards évoluent généralement entre 50 et 200⁶ (Azim & Asaeda 2005), les faibles valeurs correspondant à des communautés plutôt autotrophes. Ainsi, Paule *et al.* (2009) obtiennent des valeurs comprises entre 42 et 258 pour des biofilms prélevés *in situ*, les valeurs les plus élevées étant obtenues pour les biofilms plus âgés (valeurs inférieures à 100 pour des biofilms collectés après 5 semaines et demie de colonisation, et supérieures à 150 pour des biofilms prélevés après seulement trois semaines de colonisation). Par ailleurs, l'estimation de la biomasse algale peut être affinée par des mesures de biovolumes (Burns & Ryder 2001).

La biomasse peut aussi être estimée à partir de la composition élémentaire du biofilm, c'est-à-dire la composition en carbone, azote et phosphore, voire les ratios C/N, C/P ou encore N/P. Par exemple, le ratio C/N est habituellement utilisé comme indicateur de la quantité protéique (densité de cellules algales et bactériennes) : une grande quantité protéique (haute concentration en azote donc ratio C/N faible) correspond à un biofilm composé de cellules en division rapide, soit plutôt des bactéries, diatomées et cyanobactéries (McMahon *et al.* 1974), donc un biofilm a priori plutôt mature (Romani *et al.* 2004a). Ces mesures simples de biomasse sont utilisées communément et ont permis, dans certaines études, de mettre en évidence des perturbations liées à la présence de substances toxiques dans le milieu comme des herbicides ou des métaux (Sabater *et al.* 2007).

Enfin, pour détailler l'impact d'une perturbation, deux approches taxonomiques par observation et comptage au microscope ont souvent été employées, en général sur les algues.

La première approche consiste à analyser la présence d'un type de micro-organisme particulier. Les diatomées, notamment, ont fait l'objet de nombreuses études taxonomiques sur périphyton. En effet, elles sont le genre taxonomique le plus représenté dans la majorité des cas ; il est, de plus, possible de les identifier par leur taille et la forme de leur frustule, à savoir leur squelette de silice (Morin 2006). Les densités des différents taxons identifiés peuvent être comparées, par exemple sur des sites de prélèvement différents. Ainsi, plusieurs indices basés sur la composition taxonomique des communautés de diatomées ont été développés, par exemple l'Indice Biologique Diatomique ou IBD (NF T 90 354). Certaines études ont montré que les indices diatomées étaient effectivement plus faibles sur des sites impactés par des herbicides ou des métaux (Dorigo *et al.* 2004; Sabater 2000). Cependant, ces indices reposent sur les *preferenda* écologiques des espèces de diatomées répertoriées : ils permettent, de ce fait, d'identifier différents niveaux de charge organique et ionique des cours d'eau, sans pour autant prendre en compte la contamination chimique du milieu. Ainsi, certaines diatomées sont considérées pour le calcul de l'IBD comme indicatrices d'une bonne qualité de l'eau, mais sont aussi observées sur des sites fortement contaminés par des métaux (Morin 2006). Plus simplement, une diminution de la

⁶ L'indice autotrophique s'exprime en unité de masse de MO (AFDW) par unité de masse de chlorophylle *a*.

densité cellulaire des diatomées peut être le signe d'une perturbation par un élément toxique (Sabater *et al.* 2007).

Une seconde approche consiste à intégrer la présence (ou l'absence) de toutes les algues identifiées pour calculer des indices de similarité, comme l'indice de Sorensen (Gustavson & Wängberg 1995), ou de dissimilarité comme l'indice de Bray-Curtis (Seguin *et al.* 2002a), voire des indices de diversité, comme l'indice de Shannon (Guasch *et al.* 1997; Serra *et al.* 2009a). Ces indices permettent de comparer la diversité ou l'évolution de la structure de communautés périphytiques prélevées dans un gradient de contamination ou exposées à différents niveaux de concentrations en agent toxique. Les indices peuvent aussi être calculés en considérant une classe d'algues particulière : par exemple, Serra *et al.* (2009a) évaluent la diversité en diatomées de périphyton exposé au cuivre par calcul de l'indice de Shannon après identification des diatomées au microscope. Ils observent une augmentation de la diversité taxonomique des communautés exposées au cuivre : en effet, les communautés adaptées au laboratoire sont dominées par une espèce de diatomée – *A. minutissima* – très sensible au métal. La présence de cuivre engendre la disparition de cette espèce et par conséquent l'augmentation de l'abondance relative des autres espèces de la communauté.

A de fortes contaminations, il est aussi possible d'observer des effets de déformation morphologique sous l'effet du stress toxique, par exemple chez certaines espèces de diatomées (Morin *et al.* 2008a; Sabater *et al.* 2007).

Plus récemment, de nouvelles techniques permettant d'éviter le comptage et l'identification par microscopie, étapes longues et fastidieuses d'une approche taxonomique, ont été développées. On peut par exemple citer l'utilisation des fluorimètres de type PAM (*Pulse Amplified Modulation*) qui permettent, par déconvolution du signal fluorescent émis par des communautés algales complexes, d'évaluer la répartition en chlorophycées (algues vertes), diatomées (algues brunes) et cyanobactéries (algues bleues). En effet, chaque classe algale possède une composition de pigments photosynthétiques et donc un spectre d'excitation spécifiques. En excitant les algues par un signal lumineux à 4 longueurs d'onde différentes (470, 520, 645, 665 nm), il est possible de quantifier les abondances relatives de chaque classe algale, les spectres d'excitation de chacune étant connus⁷ (Barranguet *et al.* 2004). Par exemple Serra & Guasch (2009) observent, sur des communautés exposées au cuivre, une augmentation de la proportion en algues vertes et une diminution de la proportion en algues brunes (diatomées), par comparaison avec une communauté témoin, les algues bleues n'étant pas impactées par le métal.

⁷ Des spectres de référence pour chaque classe algale, utilisables pour quantifier leur abondance relative dans des échantillons de périphyton, ont été déterminés sur des cultures pures, et validés (Schmitt-Jansen & Altenburger 2008).

Les fluorimètres de type PAM permettent aussi de quantifier la biomasse algale totale ; la technique est sensible puisqu'elle permet de détecter des concentrations faibles en chlorophylle ($0.1 \mu\text{g}/\text{cm}^3$). Cependant, le signal fluorescent est perturbé pour des biofilms épais ou matures contenant de grandes quantités de débris cellulaires, acides humiques et produits de dégradation des pigments photosynthétiques, ce qui rend la mesure peu fiable pour ce type de communautés (Schmitt-Jansen & Altenburger 2008)⁸. Il est aussi possible de déterminer la composition en pigments algaux par analyse HPLC, pour en déduire la composition en grands groupes algaux (diatomées, algues vertes et cyanobactéries) (Sabater *et al.* 2007). Cette technique a par exemple été utilisée par Dorigo *et al.* (2007) : ils ont pu mettre en évidence une évolution des communautés algales de biofilms prélevés *in situ* le long d'un gradient de contamination aux pesticides. Ces méthodes permettent d'identifier des modifications de la structure des communautés algales de manière beaucoup plus fine que les mesures grossières et globales de biomasse citées ci-dessus (poids sec, AFDW et concentration en chlorophylle *a*).

En ce qui concerne la biomasse bactérienne périphytique, elle peut être mesurée par comptage des bactéries par microscopie à épifluorescence, avec éventuellement distinction entre les bactéries vivantes et les bactéries mortes par utilisation de marqueurs fluorescents (Thomas *et al.* 2006). La biomasse fongique peut aussi être évaluée par extraction et dosage de l'ergostérol, un lipide membranaire caractéristique des espèces fongiques (Francoeur *et al.* 2006). En revanche, il est difficile, voire impossible, de distinguer les différentes classes de bactéries par microscopie car elles sont morphologiquement peu reconnaissables. Enfin, les techniques de biologie moléculaire récemment développées permettent d'estimer la diversité microbienne ou fongique par *fingerprinting*, voire d'identifier les grands groupes bactériens par la technique FISH (partie III de ce chapitre).

2.2.2 Approches métaboliques et physiologiques

Les perturbations fonctionnelles du périphyton sont en général étudiées par des mesures d'activité métabolique qui permettent pour certaines de distinguer les autotrophes (mesure de la photosynthèse) des hétérotrophes (activités enzymatiques par exemple), voire certains types de micro-organismes (par exemple ceux réalisant la nitrification). L'activité photosynthétique ou la respiration peuvent être mesurées par des changements de pH ou de concentration en oxygène et/ou CO_2 , par exemple dans des bouteilles hermétiques contenant le périphyton (méthode light and dark bottles ou méthode des bouteilles sombres et claires, Wetzel & Likens 1991). Des substrats radioactifs (carbonates marqués au ^{14}C pour la photosynthèse ou thymidine marquée au

⁸ SchmittJansen & Antenburger (2008) observent une bonne corrélation entre des mesures de biomasse algale classiques (dosage de la chlorophylle *a* par analyse HPLC) et par l'utilisation d'un phyto-PAM. La corrélation se dégrade pour des biofilms matures et/ou épais.

^{14}C pour l'activité bactérienne) sont aussi couramment utilisés. Enfin, les fluorimètres de type PAM ont été utilisés pour mettre en évidence des perturbations de la photosynthèse par des herbicides (Schmitt-Jansen & Altenburger 2008). Ces fluorimètres permettent en effet de mesurer un rendement photosynthétique (ou efficacité photosynthétique, qui traduit la transformation de l'énergie lumineuse en énergie chimique au niveau du photosystème II) en soumettant les communautés à des pulses de lumière. Les fluorimètres PAM sont néanmoins peu adaptés pour évaluer l'impact sur des communautés algales d'agents toxiques n'agissant pas directement sur la fonction photosynthétique, pour lesquels des mesures physiologiques moins spécifiques (par exemple la respiration, etc.) sont préférables (Sabater *et al.* 2007).

Les activités enzymatiques extracellulaires, bien que potentiellement pertinentes pour étudier l'effet d'une perturbation sur la communauté hétérotrophe (Sabater *et al.* 2007), sont encore relativement peu utilisées dans le cadre d'études sur les effets des composés toxiques. Elles sont pourtant largement employées pour étudier les mécanismes de bio-dégradation de la matière organique en milieu aquatique (Sinsabaugh *et al.* 1997; Sinsabaugh & Foreman 2001). On peut citer néanmoins l'activité phosphatase qui diminue par exemple sur du périphyton exposé au Zn (Paulsson *et al.* 2002; 2000). La toxicité du Cu a aussi été mise en évidence sur périphyton au moyen de plaques de culture BIOLOG : d'abord développées pour l'identification de souches bactériennes à partir de leur profil d'utilisation de substrats carbonés, ces plaques de culture, contenant 95 substrats différents, permettent en effet de mettre en évidence des perturbations physiologiques, par exemple sous l'effet d'un agent toxique (Boivin *et al.* 2006; 2005).

Les deux types d'approche, fonctionnelle et structurelle, permettent de mettre en évidence les effets d'une perturbation sur les communautés périphytiques. Elles se complètent car il est toujours possible que des modifications en termes de fonctionnement ne se traduisent pas en termes de changement de structure du périphyton : il peut y avoir, par exemple, des phénomènes d'adaptation. Réciproquement, une modification de la structure peut ne pas se traduire en termes fonctionnels pour la communauté. Par exemple, Serra & Guasch (2009) mesurent un même rendement photosynthétique sur deux biofilms, dont l'un seulement est cultivé en présence de cuivre. Cependant, l'analyse de la composition de ces deux communautés montre qu'elles sont différentes, la communauté exposée au cuivre ayant une proportion beaucoup plus élevée en algues vertes et beaucoup plus faible en diatomées. Des approches complémentaires structure/fonction sont donc *a priori* nécessaires pour évaluer l'impact d'une perturbation.

2.3 Conclusion sur l'utilisation des biofilms pour évaluer l'impact des contaminations

Pour évaluer les impacts d'une contamination urbaine, il est intéressant de se placer à l'échelle de la communauté, afin de prendre en compte des organismes appartenant à divers groupes taxonomiques, donc de sensibilités variables, et les interactions existant entre eux (Clements & Rohr 2009). Les biofilms d'eau douce - ou périphyton - constituent un bon exemple de communautés aquatiques dans lesquelles les micro-organismes sont impliqués dans un réseau complexe d'interactions symbiotiques ou compétitives. Leur ubiquité, leur abondance dans les écosystèmes aquatiques et leur rôle primordial à la base de la chaîne trophique en font un matériel de choix pour évaluer l'état du milieu aquatique ou l'impact d'une perturbation. En effet, la réponse biologique des biofilms à une perturbation environnementale et/ou chimique peut être évaluée au niveau fonctionnel, par l'évaluation de l'impact de la perturbation sur les activités métaboliques des micro-organismes qui le composent (typiquement photosynthèse, respiration, ou encore activités enzymatiques), mais aussi au niveau structurel, par l'évaluation des modifications de la structure des communautés impactées. Ces approches ne sont pas forcément adaptées pour identifier la cause des perturbations impactant les communautés, soit par manque de sensibilité, par exemple pour l'étude de contaminations faibles, soit par leur trop grande variabilité, par exemple si l'on considère l'ensemble des facteurs environnementaux. La méthode PICT (*Pollution-Induced Community Tolerance*) permet, en revanche, d'explorer les liens entre perturbation et exposition ; en effet, elle propose d'identifier une relation entre une exposition à un agent toxique et la tolérance acquise par une communauté exposée. Développée sur du périphyton marin, elle s'adapte tout particulièrement aux biofilms, pour lesquels on trouve de nombreux exemples d'application.

II. L'approche PICT

L'approche PICT (*Pollution-Induced Community Tolerance*) propose de mettre en évidence un lien entre une exposition à un agent toxique et la tolérance acquise par la communauté exposée. Selon le concept de l'approche PICT (Blanck *et al.* 1988), les composants de la communauté qui subsistent en environnement hostile, par exemple lors de l'exposition à un agent toxique, sont les composants les plus tolérants, et donc les plus concurrentiels. Ces composants peuvent être des espèces, des génotypes ou des phénotypes, c'est-à-dire que des phénomènes de sélection (par exemple disparition ou apparition d'espèces) et des phénomènes d'adaptation (par exemple apparition d'une souche résistante par mutation ou par adaptation phénotypique) sont en jeu. L'acquisition de tolérance est donc envisagée comme un indicateur de l'impact (sélection/adaptation) de l'agent toxique sur des communautés. En effet, elle a un coût non négligeable pour les communautés exposées en termes de diversité génétique notamment, celles-ci pouvant par exemple devenir plus vulnérables à une perturbation ultérieure (Clements & Rohr 2009). Ainsi, l'approche PICT, qui tente d'établir un lien causal entre le composé toxique et ses impacts sur la vie biologique, prend tout son intérêt en tant qu'outil d'évaluation de la contamination chimique d'un écosystème.

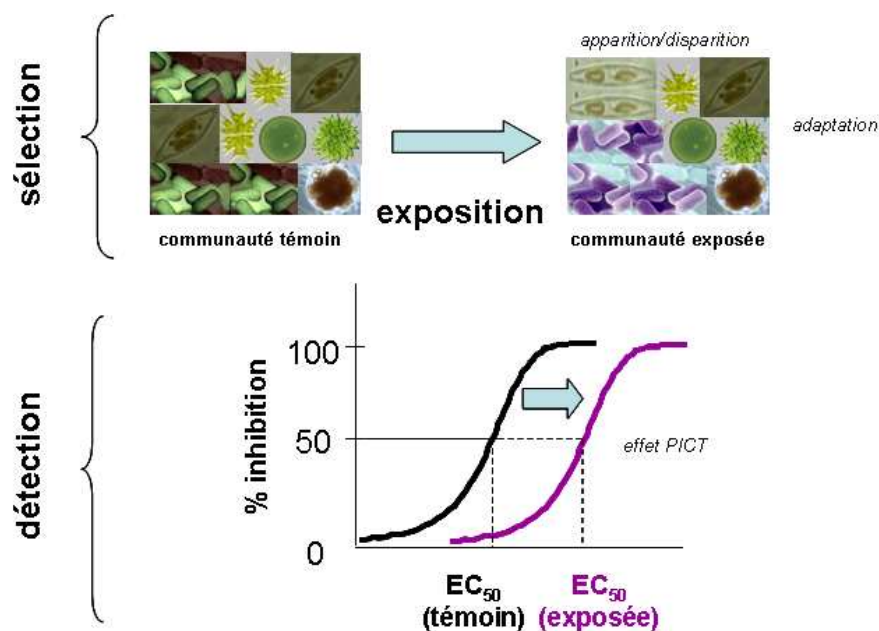


Figure 11 : Schéma conceptuel illustrant le principe de la méthode PICT. Au cours de la phase de sélection (exposition à un agent toxique), des phénomènes de disparition, d'apparition et d'adaptation d'espèces modifient la communauté. Les espèces, génotypes et phénotypes tolérants sont favorisés. Il en résulte un accroissement de la tolérance globale de la communauté que l'on peut quantifier (phase de détection) par le biais de tests de toxicité aiguë : l'augmentation de tolérance se traduit par l'augmentation de l' EC_{50} de la communauté impactée.

Une étude PICT se décline en deux phases : d'abord une phase de sélection au cours de laquelle la communauté est exposée au toxique, puis une phase de détection, au cours de laquelle la communauté est prélevée et sa tolérance au toxique évaluée, par une mesure d' EC_{50} obtenue avec un test de toxicité aiguë (Figure 11).

1. Phase de sélection

1.1 Complexité du phénomène de succession

Il existe deux niveaux de sélection :

- une sélection *intraspécifique*, par exemple entre deux génotypes caractérisés par deux souches d'une même espèce d'algue (Bérard *et al.* 1998) : l'une, issue d'un plan d'eau pollué, s'avère plus résistante à l'atrazine que l'autre, issue d'un milieu non contaminé,
- et une sélection *interspécifique*, lorsque le toxique favorise le développement de certaines espèces au détriment des autres.

Les différentes interactions entre espèces présentes dans la communauté interviennent dans les phénomènes de succession. En effet, les espèces ne réagissent pas de la même façon à la présence d'un contaminant si elles sont en monoculture ou si elles interagissent avec d'autres espèces. Ainsi, Bérard *et al.* (1999) ont montré que l'exposition de communautés phytoplanctoniques du lac Léman à l'atrazine provoque bien la disparition d'espèces algales sensibles, mais stimule en parallèle la croissance d'espèces algales plus tolérantes, et ce, par modification des effets de compétition entre espèces : par exemple, les diatomées *Nitzschia sp.*, exposées au laboratoire en monoculture, ne semblent pas affectées par la présence d'atrazine ; ces mêmes diatomées, exposées en microcosme (i.e. présentes au sein d'une communauté de phytoplancton), sont non seulement tolérantes à la présence d'atrazine, mais connaissent une augmentation de 97% de leur densité algale. De même, Rimet *et al.* (1999) montrent que l' EC_{50} en nicosulfuron est plus élevée pour des algues exposées en monoculture que pour ces mêmes algues étudiées en microcosmes. Ainsi, la sélection par l'agent toxique est modulée par la composition initiale de la communauté étudiée et les interactions entre les espèces qui la composent.

Par ailleurs, les interactions entre différents niveaux trophiques peuvent aussi influencer la sélection par un contaminant. Ainsi Hjorth *et al.* (2006) mettent en évidence la complexité des interactions entre zooplancton et phytoplancton marin au cours d'une exposition à un agent

toxique : leur étude propose d'évaluer l'impact d'une substance protectrice pour coques de bateau, le ZPT, sur différents niveaux trophiques. En particulier, sont analysées, en plus de l'activité photosynthétique du phytoplancton, l'activité bactérienne et l'activité du zooplancton. Ils observent à la fois des effets directs de l'exposition au toxique (par exemple, la réduction de l'activité phyto-planctonique) et des effets indirects (par exemple, un changement de la structure de la communauté algale au cours du temps, par diminution de la pression de prédation exercée par le zooplancton, lui-même perturbé par la diminution de la biomasse algale, plus que par exposition au ZPT). En effet, un effet indirect manifeste de l'exposition est un changement de la structure de la communauté de zooplancton, dont la croissance et la production de biomasse diminuent, par manque de proies disponibles. Le processus de sélection doit donc être envisagé sur l'ensemble d'une communauté, ce qui permet de prendre en compte des effets de toxicité indirecte, par exemple sur un niveau trophique a priori non impacté par l'agent toxique étudié.

Enfin, le processus de sélection est aussi modulé par des facteurs abiotiques. Selon Bérard & Benninghoff (2001), la pression de sélection exercée par l'atrazine à la même concentration d'exposition (10 µg/L) a des effets différents si les conditions environnementales ou encore l'état de la communauté testée varient, comme nous le verrons plus loin (voir II.5.1 de ce chapitre).

Enfin, en milieu naturel, les espèces qui disparaissent en présence d'un agent toxique sont remplacées par d'autres espèces plus tolérantes parfois non présentes dans la communauté initiale. Ainsi, une sélection induite par un agent toxique (*TIS* ou *toxicant-induced succession*) dépend à la fois de la perte d'organismes sensibles et de l'invasion de la communauté par de nouveaux organismes. Ceci est important pour les expériences menées en laboratoire en système fermé : comme il n'y a pas d'apport en nouvelles espèces, la sélection ne peut avoir lieu que dans le sens de la disparition d'espèces sensibles et le développement d'espèces tolérantes toutes déjà présentes dans la communauté initiale (témoin). Une exposition en système ouvert avec apport continu ou ponctuel mais répété en inoculum permet d'améliorer le réalisme écologique de l'expérience (Blanck 2002). Les expériences mises en œuvre au laboratoire sont toutefois extrêmement intéressantes pour pouvoir mettre en évidence un phénomène de sélection, puisque l'exposition est mise en œuvre en conditions contrôlées.

1.2 Durée de l'exposition et succession

La durée d'exposition au toxique est un paramètre crucial pour la sélection, puisqu'elle doit être supérieure au temps nécessaire à la réalisation d'une succession de la communauté lorsqu'elle n'est pas exposée. Il faut de plus que le contact entre la communauté et le toxique soit

réel. Ainsi, pour du périphyton marin, une phase de quelques semaines (environ un mois) d'exposition au TBT semble être suffisante pour observer une augmentation de tolérance de la communauté étudiée dans une même station d'échantillonnage (Blanck & Dahl 1996) ; de même, quatre semaines d'exposition de périphyton en mésocosme suffisent pour observer l'impact de la présence de zinc (Paulsson *et al.* 2000). En général, la durée d'exposition retenue est donc de l'ordre de quelques semaines pour les biofilms (Sabater *et al.* 2007).

1.3 Méthodes d'évaluation de la sélection

En général, la sélection est mise en évidence soit par des méthodes de taxonomie classique (observation et comptage des cellules au microscope inversé pour le phytoplancton, microscope à épifluorescence pour le périphyton avec éventuellement observation et comptage des diatomées), soit par des méthodes de biologie moléculaire. Les techniques d'empreinte génétique (partie III de ce chapitre) sont en général préférées pour leur rapidité : la DGGE (*Denaturing Gradient Gel Electrophoresis*), par exemple, permet de mettre en évidence l'évolution structurelle de communautés périphytiques exposées au cuivre (Boivin *et al.* 2006; Boivin *et al.* 2005; Massieux *et al.* 2004) ou à des pesticides (Dorigo *et al.* 2007), la T-RFLP (Ogilvie & Grant 2008), permet aussi d'observer l'évolution de communautés sédimentaires exposées au même métal. Dans le cadre d'études sur les effets des herbicides, des changements de composition de communautés algales peuvent aussi être mis en évidence par des mesures de fluorescence en utilisant un phyto-PAM (Serra & Guasch 2009) ou par analyse des pigments algaux par HPLC (Dorigo *et al.* 2007; Sabater *et al.* 2007).

2. Phase de détection : mise en évidence de la tolérance acquise

Des échantillons de communautés, exposées ou non (témoin) au cours de la phase précédente, sont soumis à un test de toxicité aiguë au laboratoire, pour mettre en évidence une éventuelle acquisition de tolérance.

2.1 Evaluation de la tolérance

La tolérance est exprimée par une valeur de ECx (*Effect Concentration*) ou LCx (*Lethal Concentration*), soit une concentration en toxique induisant un effet ou une mortalité de x %. Elle est évaluée par un test physiologique dont le choix est fondamental puisque c'est lui qui détermine la réponse PICT. Il s'agit en général d'une mesure d'activité métabolique (voir par exemple Figure 12). Le principe du test de toxicité aiguë ou de court terme (*short-term toxicity test*) consiste à exposer la communauté, au laboratoire, à une gamme de contaminants, s'étendant jusqu'à des doses élevées, permettant d'observer, sur des durées courtes d'exposition, une inhibition d'activité. Les courbes dose/effet obtenues permettent alors d'évaluer les ECx et LCx permettant d'estimer la tolérance de la communauté (en général, on utilise l'EC₅₀). Les tests ont pour objectif de mettre en évidence une augmentation de tolérance résultant de la phase d'exposition. Ainsi, la communauté étudiée ne doit pas évoluer au cours du test, ce qui nécessite des durées d'exposition très courtes (de l'ordre de quelques heures maximum pour les communautés bactériennes).

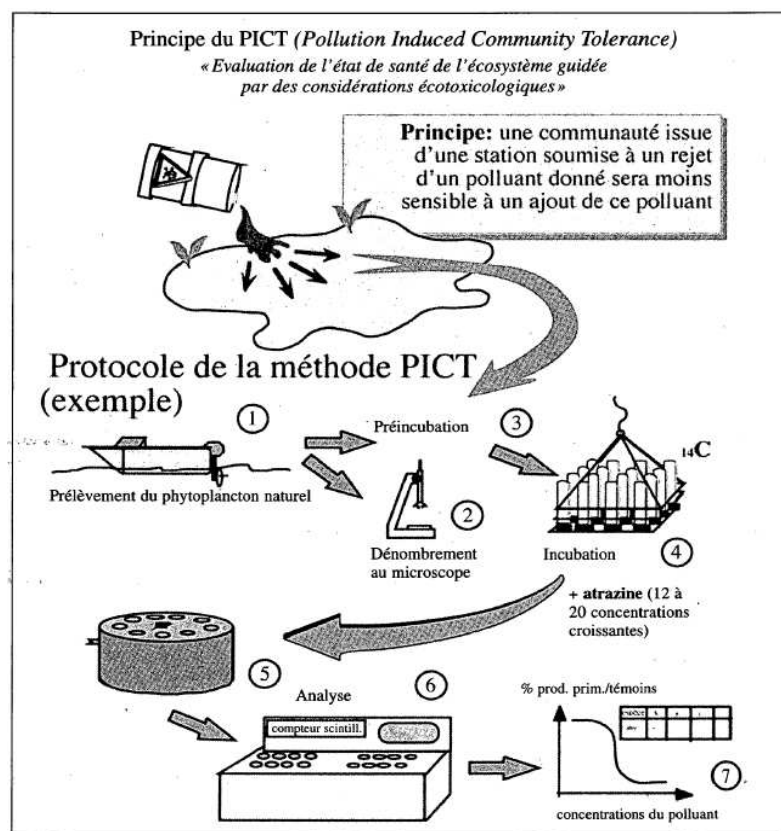


Figure 12 : Exemple de protocole d'application de l'approche PICT sur phytoplancton exposé à l'atrazine. L'acquisition de tolérance est mise en évidence par un test d'inhibition de l'activité photosynthétique avec utilisation de CO₂ marqué au ¹⁴C et par dénombrement au microscope des algues du phytoplancton (Bérard et al. 2002).

Les tests les plus couramment utilisés sont l'incorporation de carbone introduit sous forme de carbonates marqués au ^{14}C pour la photosynthèse (Figure 12) et l'incorporation de thymidine marquée au ^{14}C ou de leucine triciée pour l'activité bactérienne (Blanck 2002). D'autres tests permettent de mettre en évidence une induction de tolérance : par exemple des tests basés sur une mesure de la fluorescence *in vivo* (Bérard *et al.* 2001; Seguin *et al.* 2002b), mesurée à l'aide d'un fluorimètre de type PAM (Barranguet *et al.* 2002; Guasch *et al.* 2003), sont utilisés pour le cas spécifique des inhibiteurs de la photosynthèse (herbicides). Pour les communautés bactériennes, on peut citer aussi les plaques BIOLOG (Boivin *et al.* 2006; Boivin *et al.* 2005; Lock & Janssen 2005; Schmitt *et al.* 2005). Celles-ci ont notamment l'avantage de tester simultanément un grand nombre d'activités métaboliques, mais les temps d'incubation nécessaires, de l'ordre de quelques jours, introduisent un biais dans l'évaluation de la réponse biologique de la communauté prélevée initialement (Blanck 2002). En général, le test physiologique est choisi en fonction du mécanisme d'action du toxique étudié. Ainsi, si le mécanisme de tolérance est basé sur la modification d'une protéine cible du toxique, la détection de l'acquisition de tolérance se fera par évaluation des procédés métaboliques mettant en jeu cette protéine (Blanck 2002).

Le choix du test utilisé peut influencer sur les conclusions d'une étude PICT puisque les résultats obtenus, en termes de tolérance mesurée, dépendent de l'activité métabolique choisie, ainsi que du compartiment biologique ciblé par le test (par exemple les autotrophes avec un test d'inhibition de la photosynthèse). Ainsi, Paulsson *et al.* (2000) obtiennent une EC_{50} de 10 μM pour le zinc avec le test d'incorporation de thymidine marquée, et de 56 μM pour le même métal avec le test d'incorporation de CO_2 marqué par les algues, et ce, sur un même échantillon de périphyton. Les différences de tolérance observées s'expliquent par le choix des tests de toxicité, qui reflètent des processus métaboliques différents et concernent des populations distinctes. Dans certaines études, il n'a d'ailleurs pas toujours été possible de mesurer la tolérance au zinc du périphyton avec un test d'inhibition de l'activité photosynthétique (Admiraal *et al.* 1999; Blanck 2002; Lehmann *et al.* 1999; Paulsson *et al.* 2000). Par exemple, Lehmann *et al.* (1999) détectent pour le zinc un effet PICT sur l'activité bactérienne de biofilms prélevés *in situ* dans un gradient de contamination zinc/cadmium (les EC_{50} obtenues par le test d'incorporation de thymidine marquée indiquent une augmentation de la tolérance au zinc et au cadmium pour les biofilms prélevés sur les sites les plus pollués), mais pas d'effet sur l'activité photosynthétique (pas d' EC_{50} mesurable).

2.2 Notion de tolérance de base (*baseline tolerance*)

Idéalement, la tolérance de la communauté exposée est évaluée par comparaison avec la tolérance d'une communauté de référence ou *baseline tolerance* (Blanck 2002). Il est évident que l'interprétation d'un effet PICT dépend de cette tolérance de base, elle-même liée à un certain nombre de facteurs environnementaux qui peuvent réduire ou amplifier les impacts du toxique (voir II. 5 de ce chapitre).

3. Validation d'un effet PICT

Il est difficile de démontrer dans quelle mesure une communauté biotique est affectée par un agent toxique dans un environnement contaminé mais aux conditions fluctuantes. Il est encore moins aisé de prouver rigoureusement qu'un agent toxique donné est responsable d'un effet donné sur un certain type d'organisme ou de communauté.

Blanck *et al.* (Blanck 2002; Blanck & Dahl 1998) proposent d'appliquer un raisonnement qui s'inspire des postulats de Koch (1876, cité par Blanck 2002), quatre règles à suivre pour déterminer la pathogénicité d'un microbe :

- disposer d'un indicateur spécifique de l'exposition des organismes affectés (test de toxicité adapté) ;
- mettre en évidence une relation de cause à effet *in situ*, de préférence spatio-temporelle c'est-à-dire suivant un gradient de concentration en toxique comme dans l'étude de Blanck & Dahl sur le TBT, où les prélèvements de périphyton sont réalisés sur plusieurs stations, à degrés d'exposition différents, et à intervalles réguliers pendant plusieurs mois au cours desquels le degré d'exposition varie (Blanck & Dahl 1996) ;
- observer des effets concordants entre les mesures du stress sur le long terme et les mesures de la tolérance. En effet, les mesures du stress dites "à long terme", apportent des indications sur la modification de la structure des communautés ; il s'agit habituellement d'une évaluation des variations de la quantité de biomasse (par exemple concentration en chlorophylle *a* ou poids sec et/ou AFDW pour le périphyton). Pour conclure sans ambiguïté à un effet PICT, il est, selon Blanck (2002), préférable d'observer des effets sur le long terme (typiquement une diminution de la biomasse) et une induction de tolérance pour un même niveau d'exposition ;

- enfin, tester l'effet de l'agent toxique considéré sur les mêmes organismes au laboratoire par une exposition provoquée et trouver, en termes de sensibilité des communautés concernées et d'effets engendrés, des résultats concordants entre les expériences menées en laboratoire et les expériences et mesures réalisées sur le terrain.

Ces critères de validation d'un effet PICT ont été conçus à partir du schéma expérimental des études très complètes de Blanck & Dahl sur le TBT (Blanck & Dahl 1996; Dahl & Blanck 1996a) : les auteurs mettent en évidence des effets d'induction de tolérance au TBT sur périphyton, quantifiés par des tests d'activité photosynthétique, dus à l'exposition au TBT en aquarium, puis *in situ* selon un gradient d'exposition spatio-temporel. Après l'interdiction de l'utilisation de TBT sur les coques de bateaux en 1989, ils ont pu mesurer la baisse progressive du niveau de tolérance du périphyton au cours des années suivant l'interdiction (Blanck & Dahl 1998). Cependant le dernier point cité ci-dessus reste soumis à caution car, comme nous l'avons vu précédemment, la tolérance d'une communauté dépend de paramètres environnementaux mais aussi de la composition de la communauté initiale. Une communauté complexe mise en culture au laboratoire verra tout d'abord sa composition changer du fait des variations des conditions environnementales (Serra *et al.* 2009a). Par ailleurs, il est très difficile de reproduire au laboratoire des conditions d'exposition similaires à celles observées *in situ* (multi-contamination, influence de matières en suspension ou matières organiques modulant la biodisponibilité des contaminants via leur spéciation, etc.). Il n'est donc pas évident que l'on puisse comparer des niveaux de tolérance obtenus *in situ* et en conditions contrôlées au laboratoire.

4. Exemples d'application de l'approche PICT

L'approche PICT a été appliquée à divers types de communautés. La majorité des études portent sur les communautés algales, avec des tests de toxicité fondés sur la mesure d'activité photosynthétique après une exposition à un herbicide ou pesticide : par exemple le phytoplancton en eau douce exposé à l'atrazine, l'irgarol 1051 ou l'isoproturon (Bérard & Benninghoff 2001; Bérard *et al.* 2003; 1998; Dorigo *et al.* 2004; Seguin *et al.* 2002a), le phytoplancton en milieu marin exposé au biocide Sea Nine (Larsen *et al.* 2003), le plancton marin (Hjorth *et al.* 2006) exposé au ZPT, le périphyton (marin ou d'eau douce) exposé à l'irgarol 1051 (Bérard *et al.* 2003), au TBT (Blanck & Dahl 1996; 1998; Dahl & Blanck 1996a) ou encore à l'atrazine (Detenbeck *et al.* 1996;

Guasch *et al.* 1997), l'isoproturon (Schmitt-Jansen & Altenburger 2005), ou le diuron (Molander & Blanck 1992).

Certaines études cherchent aussi à mettre en évidence les effets d'une contamination métallique sur les algues benthiques : l'impact du cuivre, utilisé comme algicide, a été étudié sur périphyton (Barranguet *et al.* 2002; Guasch *et al.* 2002; Gustavson *et al.* 1999; Serra *et al.* 2009a; Serra & Guasch 2009; Serra *et al.* 2009b; Soldo & Behra 2000), parfois en parallèle d'une étude sur un autre algicide comme l'atrazine (Gustavson & Wängberg 1995). Guasch *et al.* (2003) prélèvent des biofilms *in situ* dans un gradient de contamination et testent la toxicité du zinc et de l'atrazine sur la composante algale. Enfin Ivorra *et al.* étudient aussi l'impact d'une pollution zinc/cadmium sur la composante algale du périphyton (Ivorra *et al.* 2002a; Ivorra *et al.* 2000).

Si les études sur les pesticides mettant l'accent sur les communautés algales sont nombreuses, les études plus récentes prennent aussi en compte la composante bactérienne du périphyton, par exemple après exposition au cuivre (Massieux *et al.* 2004; Ricart *et al.* 2009) ou dans le cadre d'études *in situ* sur des métaux comme le zinc et le cadmium (Admiraal *et al.* 1999; Blanck *et al.* 2003; Lehmann *et al.* 1999; Paulsson *et al.* 2002; 2000). A l'opposé, dans certains cas, c'est uniquement la composante microbienne qui est étudiée, par exemple dans les études de Boivin *et al.* (2006; 2005) sur périphyton exposé au cuivre, ou l'étude d'Ogilvie & Grant sur des communautés microbiennes de sédiments exposées au cuivre (2008).

L'approche PICT n'est pas seulement appliquée à des communautés aquatiques, on trouve aussi de nombreuses études sur des communautés microbiennes du sol, par exemple après exposition au cuivre et au zinc (Lock & Janssen 2005), à des produits pharmaceutiques (Demoling *et al.* 2009), ou des phénols (Demoling & Baath 2008a; 2008b), mais aussi des communautés de nématodes exposées au cuivre (Millward & Grant 1995).

Les études peuvent être réalisées en milieu naturel, par exemple en milieu marin pour le TBT (Blanck & Dahl 1996; Blanck & Dahl 1998; Dahl & Blanck 1996a, b), sur des systèmes naturels contaminés par des pesticides (Bérard *et al.* 1998), ou, comme c'est le cas la plupart du temps, sur des systèmes expérimentaux complexes : nanocosmes, microcosmes et mésocosmes, permettant d'étudier l'effet d'une exposition provoquée artificiellement.

5. Facteurs de variation de l'induction de tolérance des communautés

L'approche PICT est intéressante d'un point de vue écologique car, même dans un milieu aux conditions fluctuantes, elle reste basée sur une réponse spécifique choisie, le test de toxicité aiguë, qui permet d'évaluer la tolérance d'une communauté à un toxique donné. Une des premières difficultés d'interprétation relève, comme nous l'avons vu ci-dessus, de la complexité des phénomènes de sélection au sein de la communauté et de l'éventuelle influence de paramètres environnementaux. Il est donc nécessaire d'évaluer, dans la mesure du possible, les effets du toxique étudié sur la structure de la communauté et de bien définir la communauté de référence (témoin) qui sert à établir s'il y a ou non effet PICT. Il est aussi important d'obtenir des données comparables, à savoir bien choisir le site de référence (témoin permettant d'obtenir la *baseline tolerance*) ainsi que les conditions d'exposition et de colonisation : par exemple, il sera plus difficile de justifier une comparaison de niveaux de tolérance mesurés sur des biofilms d'âges différents, les communautés matures étant en général plus tolérantes (Ivorra *et al.* 2000). Il faut aussi prendre en compte les différents paramètres pouvant agir sur la communauté et par conséquent influencer les résultats des tests de toxicité.

5.1 Interactions de paramètres environnementaux

Les nombreuses études PICT sur les herbicides inhibiteurs du PSII comme l'atrazine, ont permis de montrer qu'il est parfois difficile de mettre en évidence un effet PICT, notamment quand des facteurs environnementaux modifient les seuils de tolérance (Blanck 2002). Par exemple Bérard & Benninghoff (2001) expliquent les variations de tolérance du phytoplancton exposé en nanoscosme⁹ à l'atrazine (Tableau 2) par des variations saisonnières (luminosité, qualité de l'eau, conditions climatiques) et par des différences initiales dans la composition des communautés.

Cette étude (Tableau 2) montre une certaine variabilité saisonnière des niveaux de tolérance de communautés prélevées à des dates différentes sur un même site. On observe aussi que les niveaux de tolérance des communautés exposées (EC_{50} traitements) ne sont pas toujours significativement plus élevés que ceux des communautés témoins (par exemple, prélèvement d'août 97, Tableau 2). On trouve d'autres exemples illustrant l'influence de paramètres environnementaux sur l'induction de tolérance, tels que la lumière dans le cas de communautés

⁹ Il s'agit de flacons en Pyrex de 5L, remplis d'eau du lac et immergées (après contamination et fermeture) dans le lac étudié pour harmoniser les conditions de température et d'ensoleillement avec celles du site d'étude.

exposées à l'atrazine (Guasch *et al.* 2003; Guasch & Sabater 1998), la température pour des communautés exposées au cuivre (Boivin *et al.* 2005), ou encore la concentration en phosphates dans le milieu d'exposition qui peut modifier la sensibilité au cuivre, au zinc ou au cadmium du périphyton (Ivorra *et al.* 2002b; Serra *et al.* 2010)

Nanocosmes	EC ₅₀ <i>témoins</i>	EC ₅₀ <i>traitements</i>
Mars 97	non déterminée	53 (42 -66)
Avril 97	308 (280 -338)	237 (218 – 258)
Juin 97	80 (93 -69)	192 (157 – 236)
Août 97	56 (52 – 60)	47 (43 – 51)
Mai 98	105 (93 – 118)	168 (135 – 208)
Juin 98	51 (44 – 60)	non déterminée
Juillet 98	47 (42 – 53)	78 (69 – 87)
Septembre 98	149 (109 – 204)	589 (421 – 823)

Tableau 2 : EC₅₀ (µg/L d'atrazine) obtenues par un test d'incorporation de ¹⁴C après une exposition de 20 jours à 10 µg/L d'atrazine en nanocosme des communautés "traitement" (Bérard & Benninghoff 2001).

La complexité de l'interprétation des niveaux de tolérance est aussi illustrée par l'étude de Paulsson *et al.* (2000), qui ont mis en évidence ce que Blanck qualifie d'« anomalie » (Blanck 2002) dans la méthode PICT. L'étude met en évidence deux effets de toxicité liés au zinc : un effet direct lié à l'exposition au métal, observé à des concentrations supérieures à 10 µM, et correspondant à un effet PICT (augmentation de la tolérance), et un effet indirect, lié à une carence en nutriments par interaction du zinc avec les phosphates - indispensables à la croissance algale - observé pour des concentrations en zinc beaucoup plus faibles. Ces différentes études montrent donc qu'il n'est pas toujours aisé de mettre en évidence un effet PICT, notamment dans le cadre d'études *in situ*, ni d'interpréter des différences entre niveaux de tolérance.

5.2 Phénomènes de co-tolérance

L'approche PICT repose sur le principe qu'une communauté exposée à un contaminant devient tolérante à ce même contaminant, ce qui devrait permettre d'établir un lien causal entre exposition et réponse biologique (Blanck *et al.* 1988). Cependant, il est possible que l'exposition à un toxique donné engendre l'acquisition d'une tolérance vis-à-vis d'un autre toxique (co-tolérance), souvent de structure chimique similaire ou ayant un mode d'action comparable, comme les herbicides atrazine et isoproturon, tous deux inhibiteurs du PSII (Knauer *et al.* 2010), ou plusieurs métaux. Par exemple, une induction de tolérance au cuivre provoquée par une

exposition à ce métal peut être accompagnée d'une induction de tolérance au zinc (Gustavson & Wängberg 1995) sur des communautés phytoplanctoniques, ou encore d'une induction de tolérance au nickel, à l'argent et au cadmium (Soldo & Behra 2000) sur des communautés périphtiques. Les co-tolérances sont susceptibles d'apparaître pour des agents toxiques ciblant une même protéine ou engendrant des mécanismes de dépuraction, de détoxification ou de métabolisation communs, pour lesquels une cellule peut donc développer des mécanismes de défense communs (Blanck & Wängberg 1988). Par exemple, la production de ligands cellulaires comme les phytochélatines produites par certaines algues peut expliquer des co-tolérances envers plusieurs métaux (Soldo & Behra 2000). Le mucilage (production de polysaccharides) peut aussi modifier la toxicité de nombreux agents toxiques vis-à-vis d'un biofilm et de ce fait intervenir dans les phénomènes de co-tolérance (Blanck 2002; Soldo & Behra 2000).

La co-tolérance est donc un phénomène à prendre en compte lors de l'interprétation des données, notamment pour les études *in situ* au cours desquelles les communautés sont exposées à un mélange de contaminants. En effet, la co-tolérance empêche de relier clairement l'acquisition de tolérance à un toxique à une exposition au même toxique. Bien que mentionnée par plusieurs auteurs, notamment par Blanck qui souligne les difficultés d'interprétation des effets PICT dans les cas où des co-tolérances seraient susceptibles d'intervenir (Blanck 2002), elle reste jusqu'à présent relativement peu étudiée (Knauer *et al.* 2010). Il est possible que l'approche PICT ne soit pas suffisamment résolutive pour distinguer des contaminants apparentés (dans leur mode d'action sur les cellules par exemple), c'est-à-dire des contaminants susceptibles de permettre le développement de co-tolérances. Dans ce cas, il est probable qu'il soit plus judicieux de regrouper les contaminants apparentés et d'en tester un par groupe identifié, comme le conclut Blanck (2002) dans sa revue sur l'approche PICT.

5.3 Biodisponibilité des contaminants

Les tests de toxicité aigüe sur périphyton tels qu'ils sont utilisés dans les études PICT sont en général des tests physiologiques utilisant comme médium de l'eau du site de prélèvement (ou du microcosme, mésocosme, etc. dans lequel le périphyton s'est développé), préalablement filtrée, pour plus de réalisme écologique (Blanck 2002; Guasch *et al.* 2003) : en effet, ceci permet d'éviter un stress supplémentaire pour les organismes qui sont alors exposés dans un médium auquel ils sont déjà adaptés. Par ailleurs, dans le cadre d'études de terrain avec des prélèvements de communautés naturelles dans un gradient de pollution, l'eau filtrée du site "amont" – non ou moins contaminé que les autres sites – est en général utilisée pour les tests (par exemple Admiraal *et al.* 1999; Lehmann *et al.* 1999) pour éviter d'utiliser comme médium un eau déjà contaminée.

Ainsi, la biodisponibilité des contaminants étudiés au cours des tests est influencée par la présence de ligands organiques ou inorganiques présents dans l'eau du site. Les problèmes de biodisponibilité, qui deviennent d'autant plus importants que l'on compare des sites très contrastés au niveau de la qualité des eaux, est mentionné dans plusieurs études (Blanck 2002; 2003; Guasch *et al.* 2003), mais finalement rarement pris en compte dans l'interprétation des résultats ; la solution proposée (Blanck 2002), à savoir utiliser le même medium (eau artificielle ou eau minérale) pour tous les tests de toxicité, n'est en général pas appliquée pour éviter d'infliger un stress supplémentaire aux organismes (Blanck *et al.* 2003).

La composition du biofilm est aussi à même d'influencer la biodisponibilité des contaminants au cours des tests de toxicité. En effet, la présence de mucus, débris ou encore de grandes quantités d'oxydes de fer et de manganèse accumulés dans les biofilms, agit sur la capacité de sorption des biofilms sur les métaux ou les contaminants organiques (Gray *et al.* 2001) : Admiraal *et al.* (1999) supposent que ces oxydes pourraient expliquer des niveaux de tolérance élevés mesurés sur des biofilms prélevés *in situ*, notamment sur un site amont pourtant peu contaminé en métaux.

Enfin, la biodisponibilité des contaminants au cours de la phase d'exposition est aussi un paramètre important à prendre en compte pour interpréter des effets biologiques d'une manière générale, et en particulier des mesures de tolérance : la présence de nutriments par exemple, comme nous l'avons vu précédemment dans le cas des phosphates (paragraphe 5.1), peut modifier la tolérance des communautés exposées lorsque la complexation par le métal diminue drastiquement les quantités de nutriments disponibles pour les organismes.

6. Conclusion sur l'utilisation de l'approche PICT

Le concept PICT, proposée par Blanck *et al.* (1988), propose d'identifier l'impact biologique d'une exposition à un agent toxique par des mesures de tolérance sur les communautés exposées. En effet, au cours de l'exposition, les espèces, génotypes ou phénotypes sensibles sont peu à peu remplacés par leurs homologues plus tolérants, d'où une augmentation de la tolérance globale de la communauté. L'approche PICT a été appliquée avec succès à des communautés périphtiques et phytoplanctoniques, exposées à des pesticides ou des métaux. La variabilité des niveaux de tolérance dans les études *in situ*, en relation avec les variations de

paramètres environnementaux, met en lumière la complexité du phénomène d'acquisition de tolérance sur le terrain. Il n'est pas pour autant impossible d'appliquer la méthode PICT *in situ* : par exemple, Blanck *et al.* (2003) mettent en évidence une relation entre les niveaux de tolérance au zinc de biofilms prélevés sur une quinzaine de sites dans toute l'Europe (Espagne, Suède, Pays-Bas) et la contamination en zinc des sites, et ce, malgré une grande variabilité des paramètres environnementaux.

Dans la majorité des études, la méthode PICT est employée pour étudier la composante autotrophe du périphyton avec des tests basés sur l'inhibition de l'activité photosynthétique. Il est donc intéressant d'étudier les effets biologiques d'une exposition sur la composante hétérotrophe périphytique et dans cette perspective de développer des tests ciblant cette composante des biofilms. Par ailleurs, la question de la biodisponibilité doit être abordée lors du développement et de l'utilisation de tests de toxicité, de manière à obtenir des mesures fiables et comparables de la tolérance. Enfin, si l'approche PICT est en général couplée à des mesures de descripteurs classiques (par exemple des mesures de concentration en chlorophylle *a* pour évaluer la biomasse algale), une analyse génétique plus fine des modifications de structure des communautés est aujourd'hui possible grâce aux outils de biologie moléculaire, qui permettent d'estimer les variations de diversité microbienne des communautés impactées.

III. L'ARISA pour explorer la diversité génétique des biofilms

1. *Explorer la diversité biologique*

1.1 Intérêt de l'approche moléculaire

L'étude de la diversité des micro-organismes est un outil majeur pour étudier l'impact de perturbations sur un écosystème. Dans le cadre de l'utilisation de la méthode PICT pour évaluer l'impact d'un agent toxique, il est par exemple très intéressant de pouvoir relier une acquisition de tolérance, mesurée globalement sur l'ensemble d'une communauté exposée, au coût génétique de cette acquisition pour la communauté, c'est-à-dire une perte de biodiversité et donc potentiellement une vulnérabilité plus grande de la communauté modifiée à une perturbation ultérieure.

Les techniques traditionnelles d'isolement et de mise en culture ne permettent pas d'estimer correctement la diversité en micro-organismes. En effet, moins de 0.1% des espèces prélevées *in situ* sont cultivables (Azam *et al.* 1983). En plus de la sélection d'une petite fraction - cultivable - des communautés, la mise en culture entraîne des modifications dans leur composition globale, notamment par la sélection des espèces qui se développent le plus rapidement dans le milieu de culture, par exemple celles qui utilisent les substrats carbonés puisque les milieux de culture sont très riches en carbone (Nocker *et al.* 2007). Ainsi, les différentes contraintes liées à la mise en culture ne permettent pas d'obtenir une vision fiable de la biodiversité microbienne réelle des échantillons. L'observation au microscope permet le comptage des cellules présentes mais, notamment dans le cas des cellules procaryotes, ne permet pas l'identification des espèces, la raison principale étant la simplicité morphologique des cellules microbiennes, qui empêche de distinguer correctement les espèces. En ce qui concerne les eucaryotes, l'identification de groupes taxonomiques est possible, par exemple pour les diatomées comme nous l'avons vu plus haut (partie I de ce chapitre), cependant le décompte et l'identification des cellules algales nécessite l'intervention d'experts formés à la taxonomie, et ne permet pas d'évaluer précisément la diversité algale totale, certaines espèces étant de petite taille et ayant peu de caractéristiques morphologiques distinctes (Stevenson 1996).

Depuis une quinzaine d'années, les approches moléculaires sont venues compléter les approches plus traditionnelles (Figure 13), avec le développement de l'écologie microbienne ou moléculaire. En effet, la biologie moléculaire permet d'estimer de manière plus fine la biodiversité

de communautés complexes par détection et/ou identification des micro-organismes au moyen de marqueurs moléculaires présents dans l'ensemble des communautés et non pas en se limitant à la seule fraction cultivable (v. Wintzingerode *et al.* 1997).

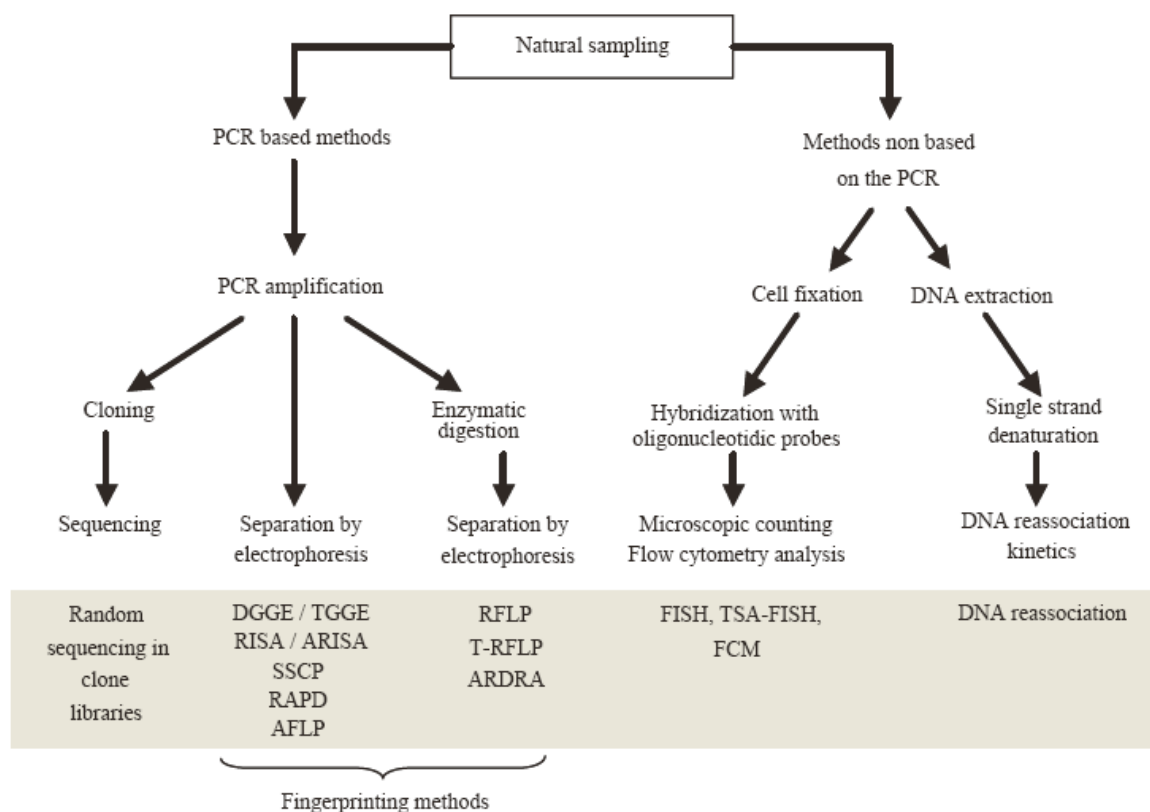


Figure 13 : Schéma des différentes techniques de biologie moléculaire utilisées pour explorer la diversité génétique de communautés aquatiques complexes (Dorigo *et al.* 2005). DGGE/TGGE : Denaturing/Temperature Gradient Gel Electrophoresis. (A)RISA : (Automated) Ribosomal Intergenic Spacer Analysis. SSCP : Single-Strand Conformation Polymorphism. RADP : Randomly Amplified Polymorphic DNA. AFLP : Amplified Fragment Length Polymorphism. (T)-RFLP : (Terminal)-Restriction Fragment Length Polymorphism. ARDRA : Amplified Ribosomal DNA Restriction Analysis. (TSA)-FISH : (Tyramide Signal Amplification)-Fluorescence In Situ Hybridization, FCM : Flow Cytometry. Les techniques de fingerprinting sont détaillées ci-dessous au III.2.2 de ce chapitre.

Parmi les techniques de biologie moléculaire couramment utilisées pour explorer la diversité génétique de communautés aquatiques complexes, on peut distinguer les approches basées sur la réaction d'amplification en chaîne par polymérase (*Polymerase Chain Reaction* ou PCR) (à gauche dans la Figure 13) des autres (à droite dans la Figure 13) (Dorigo *et al.* 2005). Les approches ne nécessitant pas une amplification par PCR se composent d'une part des techniques de marquage des échantillons par hybridation de sondes fluorescentes, et d'autre part de l'hybridation croisée (*cross-DNA hybridization* ou *DNA reassociation* dans la Figure 13). La première méthode (technique FISH et ses variantes TSA-FISH ou CARD-FISH pour *Catalysed Reporter Deposition-FISH*) est aujourd'hui couramment utilisée par les microbiologistes pour identifier des espèces, groupes, classes, voire des règnes entiers (par exemple *Bacteria*) de micro-organismes, selon la spécificité de la sonde moléculaire choisie. Une fois hybridées par la sonde, les cellules

sont identifiées par observation au microscope à épifluorescence, ou parfois par cytométrie de flux (Dorigo *et al.* 2005). La technique d'hybridation croisée est utilisée par exemple pour comparer deux à deux les ADN totaux extraits de deux communautés par hybridation croisée, après marquage radioactif d'une des communautés. Elle reste compliquée à mettre en œuvre du fait de la nécessité d'obtenir des ADN de bonne qualité, et peu adaptée au cas de communautés présentant un fort taux de similarité génomique (Ranjard *et al.* 2000c).

Les méthodes basées sur l'amplification de l'ADN par PCR (à gauche dans la Figure 13) sont aujourd'hui les méthodes moléculaires les plus couramment utilisées pour étudier la diversité génétique de communautés environnementales. On distingue parmi celles-ci les techniques d'empreinte génétique ou *fingerprinting* et le clonage/séquençage. Ce dernier est très performant pour explorer la diversité génétique d'un échantillon, mais long et difficile à mettre en œuvre, et de ce fait peu adapté à l'étude de l'évolution de structures de communautés complexes. En revanche, les techniques de *fingerprinting* constituent une alternative intéressante du fait de leur robustesse et de leur rapidité d'utilisation, en particulier pour traiter un nombre élevé d'échantillons (Hewson & Fuhrman 2004). Elles sont, de ce fait, particulièrement utiles pour une analyse comparative d'échantillons prélevés sur des sites ou dans des conditions différentes, ou encore pour une analyse dynamique de l'évolution temporelle d'une communauté.

1. 2 Utilisation de l'opéron ribosomique comme outil d'identification

Les ARN ribosomiaux (rRNA) sont les marqueurs phylogénétiques les plus couramment utilisés pour l'identification des micro-organismes procaryotes ou eucaryotes (Spiegelman *et al.* 2005). En effet, les gènes codant pour les ARN ribosomiaux sont présents dans toutes les cellules (procaryotes et eucaryotes), ce qui rend leur amplification et exploitation pour des études phylogénétiques plus aisées. Ils sont, de plus, essentiels pour le bon fonctionnement cellulaire, ce qui explique que leur structure soit globalement très conservée au cours de l'évolution. Enfin, ils ont l'avantage de posséder des régions peu conservées dont la variabilité de séquence peut être mise en relation avec une distance phylogénétique entre micro-organismes : ils permettent de distinguer des genres voire des espèces différentes. Les régions conservées ont, en revanche, une vitesse de mutation très lente et permettent de ce fait de différencier facilement les trois domaines du vivant (*Bacteria*, *Eucarya* et *Archea*).

On trouve trois types d'ARN ribosomiaux dans les ribosomes : 16S (ou gène *rrs*), 23S (ou gène *rrl*) et 5S (ou gène *rrf*) chez les procaryotes ; 18S, 5.8S et 28S chez les eucaryotes, la terminologie S étant une indication sur la taille de ces gènes, exprimée en vitesse de

sédimentation (Figure 14). Du fait de la différence de taille de ces ARN, on appelle communément le 16S : la petite sous-unité ribosomale ou SSU (*small-subunit*) et le 23S : la grande sous-unité ribosomale ou LSU (*large subunit*). Chez les bactéries, les gènes codant pour les ARN ribosomiaux sont, dans la majorité des cas, organisés en opérons (opérons *rrn*) : trois gènes séparés par des espaces (intergènes ou IGS) soumis à des phénomènes de régulation identiques et transcrits simultanément.

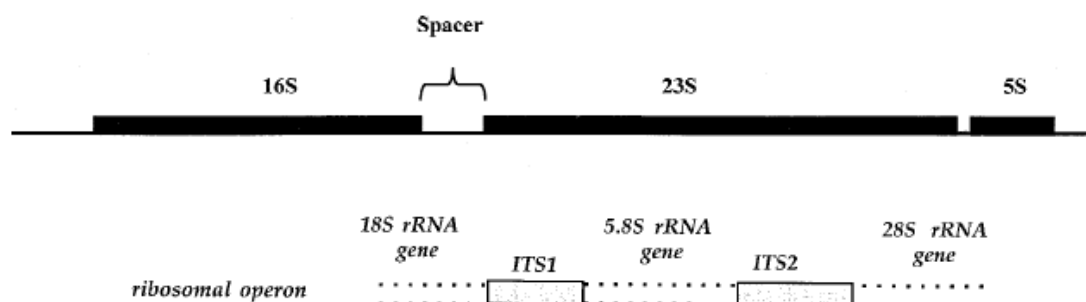


Figure 14 : Schéma de l'opéron ribosomal procaryote (d'après García-Martínez et al. 1999) et de la région 18S-5.8S-28S eucaryote. (d'après Ranjard et al. 2001).

Initialement le gène du 5S a été utilisé pour étudier la diversité microbienne de communautés environnementales, mais sa petite taille (environ 120 nucléotides) en a rapidement limité l'usage pour des études phylogénétiques plus poussées (Spiegelman *et al.* 2005). Aujourd'hui c'est le 16S (SSU) avec ses quelques 1500 bp qui s'est imposé comme marqueur phylogénétique pour étudier les procaryotes (18S pour les eucaryotes). Les amorces utilisées pour l'amplification des gènes codant pour les ARN ribosomiaux peuvent être conçues avec divers degrés de précision taxonomique allant d'amorces universelles, par exemple pour une grande majorité de bactéries présentes dans un échantillon, à des amorces spécifiques d'un domaine phylogénétique voire d'une espèce précise.

Néanmoins les gènes 16S et 18S ne permettent pas une séparation très fine par exemple entre des souches très proches, entre espèces apparentées voire dans certains cas entre genres. Des alternatives plus performantes en termes de résolution génétique existent, parmi lesquelles on peut citer les intergènes dont le polymorphisme de taille est exploité par la technique RISA ou ARISA (*Automated Ribosomal Intergenic Spacer Analysis*). Cependant, les bases de données contenant les séquences des intergènes ou autres alternatives au 16S sont encore relativement peu riches en séquences, ce qui rend leur exploitation plus difficile (Spiegelman *et al.* 2005). Actuellement, pour identifier une espèce microbienne, la technique la plus simple consiste donc à séquencer le gène 16S et à chercher à identifier des cellules cultivables apparentées, voire à étudier les relations phylogénétiques avec d'autres espèces environnementales.

2. Les techniques d'empreinte génétique

2.1 Principe général

Fondées sur l'analyse et la différenciation des acides nucléiques, les techniques d'empreinte génétique permettent d'obtenir des profils génétiques caractéristiques de chaque communauté, classiquement représentés sous forme de « codes-barres » (bandes sur un gel) que l'on peut comparer entre eux (Figure 15).

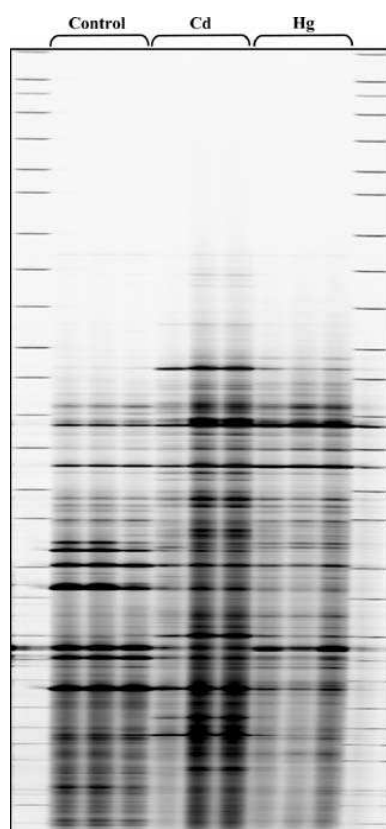


Figure 15 : Gels d'ARISA sur des communautés bactériennes d'eau douce exposées à une forte contamination métallique au cadmium (10 mg/L) ou au mercure (8 mg/L) pendant cinq jours, ou encore non exposées (control) (Maron et al. 2007). On voit le profil génétique évoluer avec l'exposition au métal, notamment l'apparition et la disparition de certaines bandes.

Elles commencent toutes par une étape d'extraction de l'ADN de la communauté étudiée après lyse cellulaire, suivie de l'amplification par PCR d'une zone cible de l'ADN, souvent localisée dans l'opéron ribosomique. Les brins d'ADN amplifiés sont ensuite séparés par électrophorèse sur un gel d'agarose ou de polyacrylamide. La visualisation de ce gel permet d'obtenir le « code-barre » caractéristique de la communauté étudiée. Les profils génétiques ainsi

obtenus peuvent ensuite être traités avec des méthodes classiques en taxonomie, par exemple le calcul d'indices de diversité ou de similarité (Brown *et al.* 2005).

2.2 Les différentes techniques d'empreinte génétique

Les techniques de *fingerprinting* utilisées pour étudier la diversité génétique de communautés complexes sont nombreuses :

- **ARDRA** et **T-RFLP** (*amplified ribosomal DNA restriction analysis* et *terminal restriction fragment length polymorphism*), basées sur l'amplification des ADN ribosomaux (16S, 23S, etc.) suivie d'une digestion des produits de PCR par des enzymes de restriction, puis migration sur gel ; la T-RFLP est une version modifiée de l'ARDRA dans laquelle les amorces de PCR sont marquées par fluorescence ce qui permet ensuite l'utilisation d'un analyseur automatisé ;
- **DGGE** et **TGGE** (*denaturing/temperature gradient gel electrophoresis*), basées sur l'amplification des ADN ribosomaux et leur migration sur gel dans un gradient dénaturant (DGGE) ou de température (TGGE) ; elles permettent de séparer sur gel les brins d'ADN en fonction de leur séquence. En effet, la composition en bases G+C et A+T modifie la position d'un brin d'ADN sur le gel puisqu'elle détermine la température de séparation des brins (pour le TGGE) et la facilité à dénaturer les brins (DGGE), les liens G-C étant plus solides que les liens A-T ;
- **LH-PCR** (*length heterogeneity-PCR*), basée sur une amplification de la région 5' du gène 16S et la séparation des brins selon leur taille par un analyseur automatisé ; comme pour la T-RFLP, les brins amplifiés peuvent être quantifiés car une des amorces utilisées est marquée par fluorescence ;
- **RISA** (*ribosomal intergenic spacer analysis*) et sa version automatisée **ARISA** (*automated-RISA*), basées sur l'amplification des intergènes de l'opéron ribosomique (voir ci-dessous) ;
- **SSCP** (*single-strand conformation polymorphism*), basée sur l'amplification des ADN ribosomaux qui sont dénaturés de manière à obtenir uniquement des brins simples d'ADN ; ces brins sont ensuite séparés par électrophorèse selon leur structure 3D, déterminée par leur séquence en nucléotides ;

- **RAPD** (*randomly amplified polymorphic DNA*), basée sur l'utilisation d'une amorce PCR de petite taille, susceptible de s'hybrider à divers endroits sur un génome : l'amplification n'a lieu que lorsque deux amorces s'hybrident à une distance suffisamment proche l'une de l'autre et dans le bon sens l'une par rapport à l'autre ; chaque génome permet ainsi de produire un set de 5 à 15 amplicons, caractéristique de l'espèce.

Toutes ces techniques possèdent des avantages et inconvénients spécifiques qui sont détaillés dans la revue de Spiegelman (2005). Malgré un certain nombre de biais engendrés notamment par l'utilisation d'ADN extraits de communautés complexes et de l'amplification par PCR (voir ci-dessous), les techniques de *fingerprinting* sont en général choisies pour leur rapidité, leur répétabilité et leur capacité à mettre en évidence des évolutions de structure au sein de communautés environnementales, notamment par comparaison aux techniques de clonage et séquençage, plus longues et fastidieuses à mettre en œuvre. Elles ont d'ailleurs été utilisées avec succès pour étudier la diversité microbienne de communautés aquatiques - DGGE, SSCP, T-RFLP, RISA ou ARISA (Dorigo *et al.* 2005) - ou des communautés microbiennes du sol - DGGE, T-RFLP, RISA et RAPD (Ranjard *et al.* 2000c).

3. Principe et utilisation de l'ARISA

3.1 L'ARISA : exploitation du polymorphisme de taille des intergènes

3.1.1 ARISA Bactérie

La technique RISA (*Ribosomal Intergenic Spacer Analysis*) ou sa version automatisée plus récente : l'ARISA (*Automated-RISA*) repose sur le polymorphisme de taille de l'intergène (IGS ou *Intergenic Spacer*) situé entre les gènes codant pour les ARN ribosomiaux 16S et 23S des bactéries. Les amorces de PCR utilisées sont donc en général choisies sur des zones conservées des gènes 16S et 23S (Figure 16).

Selon les organismes, on considère globalement que la taille de ce fragment d'ADN varie de 150 à 1500 bp environ (Ranjard *et al.* 2000a), sachant qu'il n'existe pas de corrélation entre le genre (ou l'espèce) et la taille de l'IGS correspondant. Les IGS amplifiés sont séparés sur un gel d'agarose ou de polyacrylamide suivant leur taille. La grande variabilité de taille de l'IGS permet de mettre en évidence de petites modifications dans la structure génétique et de ce fait de distinguer des espèces très proches phylogénétiquement (García-Martínez *et al.* 1999; Spiegelman

et al. 2005). L'utilisation d'une amorce marquée par fluorescence a rapidement permis l'automatisation de la méthode (Fisher & Triplett 1999).

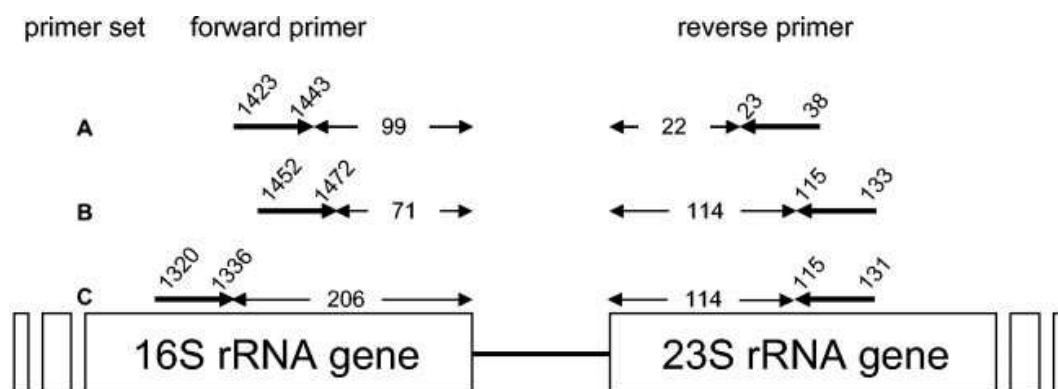


Figure 16 : Position sur les gènes 16S et 23S de trois sets d'amorces PCR couramment utilisés pour l'ARISA sur des communautés bactériennes. Le nombre de nucléotides des gènes 16S et 23S amplifiés par PCR sont indiqués avec les doubles-flèches. A : ITSf/ITSReub. B : SD-Bact/LD-Bact. C : 10406F/23Sr. (Cardinale *et al.* 2004).

La banque de données de séquences d'IGS disponibles est encore trop pauvre pour permettre une identification rapide et efficace des micro-organismes étudiés à partir des seuls IGS : en avril 2010, une recherche dans la base de données Genbank du NCBI donne 26 504 résultats pour une recherche ciblée sur l'intergène 16S-23S chez les bactéries¹⁰, et 2 010 399 résultats pour une recherche sur le 16S chez les bactéries¹¹. Si les amorces utilisées pour la PCR permettent d'amplifier, outre l'IGS, tout ou une partie du gène 16S une analyse encore plus fine basée sur l'identification taxonomique des bactéries présentes est possible (Brown *et al.* 2005). Cependant, ce type d'approche est encore peu utilisé.

L'ARISA est majoritairement utilisée pour étudier les communautés bactériennes, mais certaines études mettent à profit le polymorphisme de taille de la région 16S-23S chez les cyanobactéries (Wood *et al.* 2008) ou chez certains eucaryotes (voir ci-dessous), ou encore sur des communautés d'archées (Leuko *et al.* 2007; Qu *et al.* 2009).

3.1.2 ARISA Eucaryote

Chez les eucaryotes, l'ARISA exploite le polymorphisme de taille de la région située entre les gènes codant pour le 18S et le 28S, qui contient deux intergènes ITS1 et ITS2 de taille variable (Figure 14 et Figure 17). Ainsi, Ranjard *et al.* (2001) exploitent la région entière ITS1-5.8S-ITS2, dont la taille varie entre 300 et 1100 bp environ dans leurs échantillons, pour explorer la diversité génétique de communautés fongiques du sol avec l'ARISA. L'ARISA est cependant encore peu

¹⁰ Recherche dans la base de nucléotides avec les mots clés "ITS" et "16S-23S".

¹¹ Idem avec le mot clé "16S".

exploitée pour étudier les communautés eucaryotes, les séquences d'ITS étant surtout utilisées dans le cadre d'études phylogénétiques (Álvarez & Wendel 2003). Les amorces utilisées pour amplifier la région ITS1-5.8S-ITS2 des Fungi sont classiquement celles définies par White et al. (1990), en particulier les amorces "ITS1" et "ITS4" (Figure 17) ou des amorces très proches de celles-ci (Ranjard et al. 2001; Sequerra et al. 1997). Ces amorces sont utilisées pour les échantillons contenant des espèces fongiques dans le cadre des quelques rares études faisant intervenir des techniques de fingerprinting (ARISA ou T-RFLP (Klamer et al. 1997)). Elles permettent surtout l'exploitation de la région ITS1-5.8S-ITS2 dans des études phylogénétiques et sont parfois même remplacées par des amorces plus spécifiques de certaines espèces de Fungi (par exemple, "ITS1F" est spécifique des basidiomycètes (Larena et al. 1999)), voire moins sujettes à co-amplifier des espèces végétales (Larena *et al.* 1999; Martin & Rygielwicz 2005).

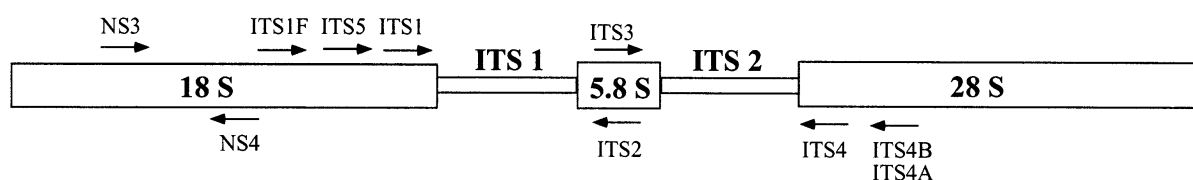


Figure 17 : Schéma représentant la région ITS1-5.8S-ITS2 chez les eucaryotes. Les flèches représentent des amorces utilisées pour amplifier l'ensemble de la région ou une partie seulement (ITS1 ou ITS2) et leur emplacement sur le 18S, 5.8S ou 28S (Larena et al. 1999).

En ce qui concerne les espèces végétales, il existe des exemples d'exploitation de la région ITS1-5.8S-ITS2, en général dans le cadre d'études phylogénétiques ciblant certaines espèces de diatomées. Par exemple Behnke *et al.* (2004) utilisent les amorces universelles "fungi" NS1 et ITS4 (White *et al.* 1990) pour amplifier la région ITS1-5.8S-ITS2 de souches de diatomées *Sellaphora pupula*, et Beszteri *et al.* (2005) utilisent aussi les amorces de White *et al.* (1990) pour amplifier la même région chez des souches de diatomées *Cyclotella meneghiniana*. Enfin, Marchetti et al. (2008) construisent des amorces eucaryotes pour amplifier l'ITS1 de diatomées *Pseudo-nitzschia* isolées à partir de phytoplancton marin et utilisent une ARISA basée sur les séquences d'ITS1 pour comparer des échantillons prélevés sur des sites différents.

3.2 Applications

La technique RISA a d'abord été développée sur des communautés microbiennes du sol (Borneman & Triplett 1997). Sa version automatisée, l'ARISA, développée par Fisher et Triplett (1999), a été utilisée sur des communautés bactériennes en eau douce (Arias *et al.* 2006; Jones *et al.* 2007; Maron *et al.* 2007; Newton *et al.* 2006; Yannarell *et al.* 2003; Yannarell & Triplett 2004), en milieu marin (Brown *et al.* 2005; Danovaro *et al.* 2006; Hewson *et al.* 2006), ou sur des

communautés microbiennes du sol et des sédiments (Cardinale *et al.* 2004; Cherif *et al.* 2007; Danovaro *et al.* 2006; Ranjard *et al.* 2001; Sigler *et al.* 2002; Sigler & Zeyer 2002), des biofilms en milieu marin (Hernandez-Raquet *et al.* 2006) et en eau douce (Lear *et al.* 2008; Lear & Lewis 2009a; Lear & Lewis 2009b) et des communautés microbiennes de la rhizosphère (Robledo *et al.* 1998) ou du compost (Schloss *et al.* 2003). Des amorces universelles ciblant les bactéries ont donc été optimisées et testées sur des communautés diverses (Cardinale *et al.* 2004).

L'ARISA est considérée comme une des techniques les plus rapides et les plus appropriées pour explorer la diversité taxonomique de communautés complexes, en particulier lorsqu'il s'agit de comparer entre eux un grand nombre d'échantillons. Ainsi, Cherif *et al.* (2007) comparent les techniques ARISA et DGGE sur des communautés bactériennes prélevées dans un sol agricole et concluent que l'ARISA est une technique plus facile à mettre en œuvre et moins onéreuse en temps que la DGGE, qui nécessite notamment une optimisation du gradient dénaturant laborieuse (Ranjard *et al.* 2000c).

L'ARISA permet effectivement de détecter des effets structuraux sur des populations bactériennes, par exemple lors d'une exposition à des métaux comme le cadmium et le mercure (Maron *et al.* 2007; Ranjard *et al.* 2000b), au cours des saisons (Yannarell *et al.* 2003), sous l'influence de fluctuations environnementales (Yannarell & Triplett 2005) ou encore à la suite d'un épisode de déforestation pour des populations microbiennes du sol en Amazonie (Borneman & Triplett 1997). Elle est aussi utilisée pour différencier des populations bactériennes (Lear *et al.* 2009) ou fongiques (Ranjard *et al.* 2001; Thakuria *et al.* 2008) issues de sites différents en fonction de paramètres physico-chimiques caractéristiques de chaque site (Lear *et al.* 2009).

4. Biais et limites des techniques d'empreinte génétique

Les techniques d'empreinte génétique se déroulent en plusieurs étapes : d'abord une lyse cellulaire suivie de l'extraction des acides nucléiques de la communauté étudiée, puis l'amplification par PCR d'un marqueur moléculaire, enfin la séparation sur gel des différents brins d'ADN amplifiés, suivie de la visualisation et de l'interprétation des profils. Chacune de ces étapes met en jeu des phénomènes physiques (lyse cellulaire par exemple), chimiques et biologiques, susceptibles d'être biaisés (v. Wintzingerode *et al.* 1997). En effet, en biologie moléculaire, la manipulation des échantillons est extrêmement délicate. Par exemple, le

conditionnement des échantillons (la technique de congélation, par paliers de température ou directement à -20 ou -80 °C, ou encore l'utilisation de cryoconservateurs) peut influencer sur la qualité des acides nucléiques extraits postérieurement (Hubálek 2003). Nous allons détailler ci-dessous les principaux biais qui peuvent conduire à une vision déformée de la diversité microbienne à partir de profils d'empreinte génétique, à savoir les biais liés à l'extraction des acides nucléiques et les biais liés à l'amplification par PCR. Enfin, nous aborderons la question des seuils de détection des techniques d'empreinte génétique.

4.1 Biais liés à l'extraction d'ADN

L'extraction des acides nucléiques est le point de départ de toutes les techniques de biologie moléculaire. Il s'agit d'une étape délicate lorsque l'on cherche à explorer la diversité génétique de communautés complexes. En effet, les extraits d'ADN obtenus à partir de communautés complexes ne peuvent pas être considérés comme complètement représentatifs de la diversité réelle des échantillons, puisque toutes les cellules ne sont pas lysées avec la même facilité (Frey *et al.* 2006; v. Wintzingerode *et al.* 1997). Il est par ailleurs difficile d'appliquer un traitement trop rigoureux aux échantillons (par exemple pour lyser efficacement toutes les cellules) car cela génère des acides nucléiques dégradés, sources d'erreur pour l'amplification par PCR (v. Wintzingerode *et al.* 1997). Ainsi, les proportions relatives des acides nucléiques – correspondant aux différentes espèces d'une communauté complexe – après extraction peuvent être modifiées par rapport aux proportions relatives initiales (dans la communauté échantillonnée).

L'extraction des acides nucléiques est aujourd'hui grandement facilitée par la commercialisation de kits dont les protocoles sont standardisés et diversifiés en fonction des différents types de micro-organismes ou d'échantillons. L'usage de kits permet d'obtenir plus facilement et plus rapidement des acides nucléiques à partir d'échantillons complexes environnementaux (qu'avec des protocoles d'extraction plus classiques), ainsi que de limiter l'usage de réactifs nocifs pour le manipulateur (Lear *et al.* 2010). Cependant, les kits ne permettent pas toujours de récupérer une quantité optimale d'acides nucléiques (Luna *et al.* 2006) ; ils peuvent aussi conduire à la dégradation des acides nucléiques obtenus (Frey *et al.* 2006; Lear *et al.* 2010; v. Wintzingerode *et al.* 1997). Le choix du kit influe donc sur la qualité de l'amplification par PCR ultérieure (par exemple en modifiant les quantités d'inhibiteurs de PCR présents dans les échantillons d'ADN obtenus).

En conclusion, l'extraction d'ADN est bien une étape délicate, dont le déroulement est à même d'influencer l'interprétation des résultats obtenus sur les profils d'empreinte génétique. D'une manière générale, on considère que les abondances relatives des acides nucléiques quantifiées par les techniques d'empreinte génétique ne correspondent pas exactement aux abondances relatives des communautés échantillonnées originelles du fait des biais liés à l'extraction, ainsi que des biais liés à l'amplification par PCR, comme nous allons le voir ci-dessous.

4.2 Biais liés à l'amplification de l'ADN par PCR

L'amplification d'ADN par PCR est une source d'erreurs importantes dans les études de biologie moléculaire. En effet, l'ADN amplifié par PCR ne reflète pas la diversité en différents groupes taxonomiques de l'échantillon étudié si l'amplification est sélective et d'efficacité différente suivant les séquences. Von Wintzingerode *et al.* (1997) détaillent les conditions nécessaires pour pouvoir quantifier les abondances relatives obtenues après une PCR :

- toutes les molécules d'ADN doivent être également accessibles aux amorces au moment de l'hybridation
- les hybrides amorce/brin à amplifier doivent se former avec la même efficacité pour tous les brins d'ADN de l'échantillon
- l'efficacité de polymérisation par la polymérase doit être équivalente pour tous les brins d'ADN
- la limitation de l'amplification par épuisement des substrats nécessaires doit affecter également l'extension de tous les fragments d'ADN.

La validation de ces hypothèses est évidemment peu probable pour des échantillons complexes, contenant des fragments d'ADN issus de micro-organismes variés, amplifiés avec des amorces universelles construites pour cibler un grand nombre de micro-organismes issus du même groupe taxonomique.

Ainsi, certaines séquences risquent de pas être amplifiées ou d'être amplifiées de manière marginale par rapport à d'autres (Amann *et al.* 1995; Hansen *et al.* 1998; v. Wintzingerode *et al.* 1997), par exemple suivant leur richesse en bases G et C¹² (Head *et al.* 1998; Polz & Cavanaugh 1998), ou tout simplement suivant leur abondance relative parmi l'ensemble des séquences de la communauté (Head *et al.* 1998; Nocker *et al.* 2007). La présence d'impuretés ou de composés inhibiteurs de PCR dans le mélange réactionnel, la qualité des séquences à amplifier, mais aussi

¹² La richesse en bases G et C modifie le taux de dénaturation de l'ADN et donc le taux d'amplification des séquences.

leurs concentrations et leur diversité vont influencer l'efficacité et la représentativité de la réaction de PCR (Chandler *et al.* 1997). Le choix des amorces de PCR est aussi déterminant puisque l'hybridation des amorces peut se faire préférentiellement sur certaines séquences, par exemple selon leur structure secondaire (Suzuki & Giovannoni 1996).

Enfin, la PCR peut aussi être une source d'erreurs de réplication, par exemple par formation d'hétéroduplexes¹³, qui engendrent des difficultés d'interprétations des gels de DGGE et TGGE (Muyzer 1999), ou de molécules chimériques¹⁴, voire tout simplement des erreurs lors de l'élongation (v. Wintzingerode *et al.* 1997). Dans le cas particulier de la technique ARISA, certains auteurs observent, lors de la PCR, une amplification préférentielle des petits fragments d'ADN (Fisher & Triplett 1999).

Ainsi, l'interprétation des profils obtenus par une technique d'empreinte génétique doit prendre en compte le fait qu'ils reflètent la diversité génétique du pool de séquences amplifiés par PCR, et non la diversité génétique de la communauté initiale (Head *et al.* 1998; Nocker *et al.* 2007). Les biais engendrés par la PCR peuvent toutefois être réduits en modifiant les conditions expérimentales de la réaction, par exemple en modifiant les quantités des différents réactifs utilisés ou en réduisant le nombre de cycles de réplication (Nocker *et al.* 2007; Polz & Cavanaugh 1998). En outre, certaines études montrent que les analyses basées sur des résultats de PCR permettent d'obtenir des résultats similaires, en termes de diversité microbienne, à d'autres techniques de quantification plus lourdes à mettre en œuvre, par exemple par hybridation de sondes (Buckley & Schmidt 2001; Schloss *et al.* 2003).

4.3 Seuils de détection des techniques d'empreinte génétique

La notion d'espèce chez les bactéries reste un concept assez difficile à appréhender, la reproduction asexuée et le transfert de gènes rendant les frontières inter-espèces assez floues. Ainsi, l'approche phylogénétique basée sur le polymorphisme du gène 16S consiste plutôt à identifier des unités opérationnelles taxonomiques ou OTU (operational taxonomic units) (Bent & Forney 2008). Plus généralement, la notion d'OTU désigne, dans une étude phylogénétique, un groupe taxonomique particulier, souvent les derniers nœuds ou feuilles d'un arbre phylogénétique. La notion d'OTU est intéressante pour interpréter les profils d'empreinte

¹³ Fragments d'ADN formés de deux brins non complémentaires appartenant à deux produits de PCR différents.

¹⁴ Les molécules chimériques peuvent se former par hybridation de deux brins appartenant à des espèces différentes.

génétique : on peut par exemple comparer le nombre d'OTU obtenues par clonage et séquençage au nombre d'OTU obtenues avec une technique comme l'ARISA (Schloss *et al.* 2003).

Il est toujours très difficile de quantifier la part de la diversité génétique observable par le biais d'une technique de biologie moléculaire. On sait par exemple que les techniques d'empreinte génétique ne permettent pas de détecter les phylotypes rares au sein d'une communauté : typiquement avec l'ARISA, un signal fluorescent faible ne peut pas être distingué du bruit de fond et l'OTU correspondante n'est donc pas prise en compte pour estimer la biodiversité (Bent & Forney 2008). Ainsi, le nombre de bandes sur le gel (ou d'amplicons/pics fluorescents sur un profil ARISA) ne représente pas la totalité des espèces présentes, mais uniquement les espèces dominantes, ce qui revient, d'après Bent et Forney (2008), à faire un « *screening* » pour déterminer la présence ou l'absence de certaines OTU. Il est difficile de savoir quelle partie de la diversité génétique peut être ainsi détectée, en particulier dans le cas d'échantillons complexes comprenant un nombre élevés d'OTU à des concentrations situées en-dessous du niveau de détection de la technique. Avec une technique comme la DGGE, la limite de détection pour une espèce est d'environ 1% de la population totale, ce qui signifie qu'en-deçà de cette limite, l'espèce ne peut pas être détectée par la technique ; avec la T-RFLP le seuil de détection se situe entre 0.1 et 1% (Luna *et al.* 2006). L'ARISA peut en théorie détecter des pics (ou bandes) contenant moins de 0.1 % de l'ADN total d'un échantillon (Hewson & Fuhrman 2004). Mais ces seuils de détection ne sont certainement pas directement applicables à des échantillons complexes et varient avec la diversité génétique des communautés étudiées ainsi que les protocoles expérimentaux utilisés pour extraire, amplifier puis faire migrer et observer les acides nucléiques.

4.4 Conclusion sur l'utilisation des techniques d'empreinte génétique

Les différents types de biais cités ci-dessus ne remettent pas en cause l'utilisation de la technique ARISA, ou de toute autre technique d'empreinte génétique, pour explorer la diversité microbienne de communautés complexes. Il est bien sûr nécessaire de connaître et de maîtriser, dans la mesure du possible, les différentes sources d'erreurs et d'être prudent dans l'interprétation des résultats obtenus. Il est, par exemple, préférable de comparer des profils obtenus à partir d'échantillons ayant subi les mêmes traitements, de la collecte à la migration sur gel, en passant par l'extraction d'ADN et la PCR. Les biais sont ainsi comparables et reproductibles d'un échantillon à l'autre (Schloss *et al.* 2003). D'une manière générale, il convient de tester les différentes étapes, de l'extraction d'ADN à l'obtention des empreintes génétiques, sur le type d'échantillons à étudier et d'optimiser au mieux les protocoles pour limiter les sources d'erreurs (choix du kit d'extraction, conditions optimales pour la PCR, etc.).

Malgré les difficultés d'interprétations engendrées par les biais, la richesse des informations obtenues grâce aux techniques d'empreinte génétique est considérable. Ces techniques ont non seulement enrichi notre vision de la biodiversité microbienne mais encore, elles permettent l'étude des différents facteurs environnementaux qui modèlent les communautés microbiennes aquatiques et terrestres (Yannarell & Triplett 2005). Sans elles, impossible d'étudier la pression de sélection exercée par un gradient environnemental ou un gradient de pollution sur une communauté complexe. En outre, si les biais associés à ces techniques et notamment liés à l'utilisation de la PCR sont réels et non triviaux, elles restent de puissants outils pour obtenir une vision globale de la diversité génétiques de communautés complexes (Schloss *et al.* 2003). En particulier, il existe de nombreux exemples dans lesquels les résultats obtenus par utilisation de la PCR sont tout à fait comparables à d'autres techniques plus quantitatives (Buckley & Schmidt 2001).

Les techniques d'empreinte génétique sont donc des outils performants pour l'étude de la diversité microbienne d'échantillons complexes (Loisel *et al.* 2006), notamment pour détecter des variations structurelles dans les communautés, que l'on peut ensuite mettre en relation avec des variations environnementales. Les exemples d'utilisation de ces techniques sont nombreux pour des analyses comparatives d'échantillons prélevés sur des sites différents ou dans des conditions différentes, ou encore pour des analyses dynamiques de l'évolution temporelle d'une communauté (Bent & Forney 2008; Dorigo *et al.* 2005). L'ARISA se distingue des autres techniques par sa facilité d'utilisation et sa rapidité, notamment liée à son automatisation. Elle est considérée comme une des techniques les plus intéressantes pour analyser et comparer un grand

nombre d'échantillons et a déjà permis de mettre en évidence des variations de structure sur des échantillons variés comme des communautés de bactérioplancton, des communautés du sol ou encore des biofilms (voir III. 3.2).

5. *Interprétation des profils ARISA*

Les profils d'empreinte génétique d'une manière générale, et en particulier les profils ARISA, sont obtenus sous forme de bandes sur un gel, ou de pics de fluorescence sur un électrophorégramme. Ces profils sont caractéristiques de communautés échantillonnées et leur interprétation se fait généralement, à partir de la visualisation du gel, par comparaison de différents profils : par exemple les profils correspondant à une même communauté échantillonnée au cours du temps pour en déterminer l'évolution au cours d'une perturbation. On peut ainsi voir le profil changer, c'est-à-dire voir apparaître et disparaître des bandes sur le gel, comme sur la Figure 15 pour des communautés exposées à des métaux. Ainsi, on compare le nombre de bandes sur le gel (ou de pics de fluorescence) et leurs intensités relatives. Certaines méthodes d'analyse récentes permettent de comparer directement plusieurs profils par traitement informatique sans passer par une étape de comptage et d'analyse visuels des bandes ou pics.

5.1 Signification d'un pic ou d'une bande sur le gel

Outre le fait que la notion d'espèce est assez floue chez les bactéries, en pratique le lien entre une taille d'TTS (un pic fluorescent dans un profil ARISA) et une espèce donnée présente dans l'échantillon à analyser est difficile à établir.

D'une part, il est possible que deux micro-organismes non apparentés possèdent des intergènes de même taille et soient de ce fait à l'origine d'un pic commun dans un profil ARISA (Crosby & Criddle 2003; Fisher & Triplett 1999; Schloss *et al.* 2003). Sur une base de données de 307 intergènes procaryotes, Fisher et Triplett (1999) constatent la présence de 200 tailles de fragments différentes dont 59 (soit 29.5%) sont partagées par plus d'un micro-organisme. Ce type de situation peut avoir lieu pour des souches d'une même espèce ou à l'inverse pour des espèces éloignées, n'appartenant pas au même phylum.

D'autre part, la présence de plusieurs opérons *rnm* non exactement semblables dans les mêmes micro-organismes peut biaiser l'interprétation du nombre de fragments observés, le

nombre de copies pouvant varier de 1 à 14 suivant les organismes (Crosby & Criddle 2003; Fisher & Triplett 1999; Head *et al.* 1998; Newton *et al.* 2006). L'étude de Jensen *et al.* (1993) montre ainsi que pour 85% des espèces bactériennes qu'ils considèrent (sur 300 espèces appartenant à 8 genres bactériens différents), l'amplification de la région 16S-23S génère 2 à 3 amplicons au lieu d'un seul (c'est-à-dire deux ou trois pics de fluorescence ou bandes sur le gel pour un seul micro-organisme). Il existe donc un polymorphisme de taille intragénomique pour les intergènes.

5.2 Quantifier les abondances relatives

Les abondances relatives de chaque OTU peuvent être estimées, par exemple par comparaison des aires des pics dans un profil ou des intensités des bandes sur un gel, mais le résultat obtenu n'est en général pas totalement exploitable. En effet, les techniques d'empreinte génétique actuelles ne permettent pas de quantifier correctement les abondances relatives, notamment du fait des biais associés à la PCR et à l'extraction d'ADN (Ramette 2009). Par ailleurs, comme nous l'avons vu ci-dessus, le nombre de copies des gènes codant pour les ARN ribosomaux dans les génomes des micro-organismes est variable suivant les espèces, ce qui limite d'autant plus la quantification.

Cependant, le biais lié à la quantification n'est pas systématique et n'empêche pas de comparer des échantillons entre eux. Par exemple Brown *et al.* (2005) obtiennent, dans leur étude, une bonne corrélation entre l'aire obtenue sous un pic d'un profil ARISA et le nombre de clones correspondant au même taxon. Ils concluent donc que les données ARISA sont globalement proportionnelles aux abondances cellulaires. Il convient donc, pour une exploitation correcte des profils d'empreinte génétique, de garder à l'esprit que les ratios d'aires de pics obtenus sur un profil reflètent les abondances relatives des amplicons obtenus par PCR et non les abondances relatives des différentes OTU dans la communauté étudiée (Bent & Forney 2008; Frey *et al.* 2006).

5.3 Méthodes d'analyse des profils ARISA

Les profils ARISA (Figure 18) sont en général exploités par l'intermédiaire de logiciels adaptés : Genemapper (Lear *et al.* 2008) ou GeneScan (Ranjard *et al.* 2001) permettent ainsi d'obtenir des électrophorégrammes en convertissant le temps de migration associé à chaque fragment (pic de fluorescence) en taille d'ITS (en nombre de paires de bases ou bp) par l'intermédiaire d'un marqueur de taille (ladder) standard co-migré avec les échantillons.

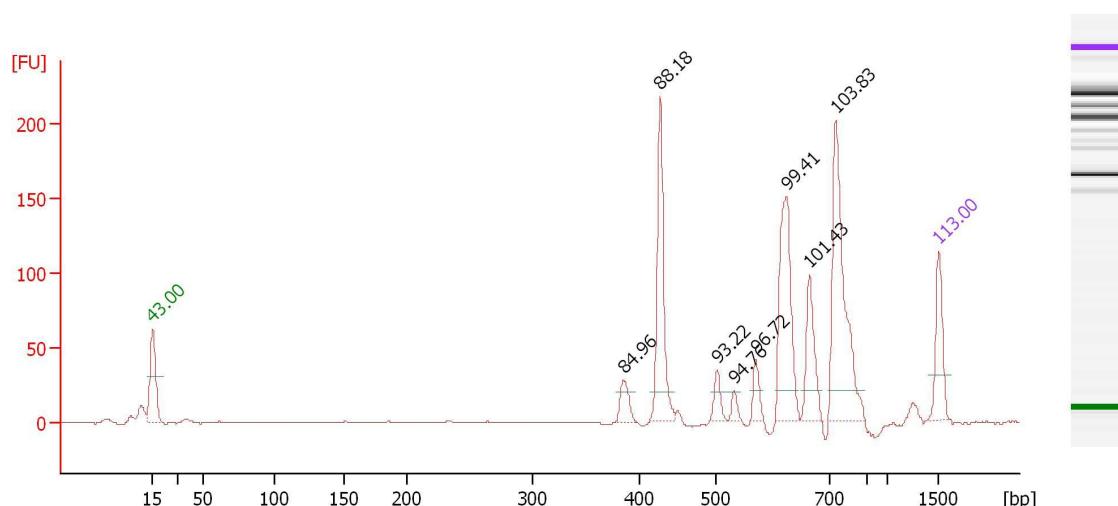


Figure 18 : Profil ARISA d'un échantillon de biofilm sous forme d'électrophorégramme (profil en unités de fluorescence FU en fonction de la taille des amplicons en bp) ou de gel (logiciel Expert 2100, Agilent). Les marqueurs de taille co-migrés avec l'échantillon (respectivement 15 et 1500 bp, soit 43 et 113 secondes en temps de migration) apparaissent en vert et violet. La durée de migration (en secondes) des différents amplicons figure en haut de chaque pic.

La résolution dépend des appareils utilisés : avec un séquenceur, une résolution de 1 bp peut être atteinte (Ranjard *et al.* 2001). En général, une valeur seuil de fluorescence est fixée de manière à éliminer le bruit de fond (les pics dont l'intensité de fluorescence est plus faible que ce seuil sont éliminés). Les aires sous chaque courbe (électrophorégramme) sont ensuite normalisées à 1 pour corriger d'éventuels écarts dans les quantités d'ADN introduites avant PCR (Lear *et al.* 2008). Les profils ainsi obtenus peuvent être directement exploités sous la forme d'électrophorégrammes, par exemple dans le package StatFingerprints du logiciel R (Michelland *et al.* 2009), ou transformés en matrice contenant les informations relatives aux pics de fluorescence (nom ou numéro du pic, taille de l'amplicon en bp, aire ou intensité de fluorescence).

5.3.1 Calcul d'indices

Comme pour d'autres techniques d'empreinte génétique (par exemple la DGGE), les données peuvent être caractérisées par le calcul d'indices biologiques faisant intervenir le nombre de pics de fluorescence (bandes sur un gel) dans les profils (exploitation de données qualitatives type absence/présence de pics) et/ou leur abondance relative (exploitation de données quantitatives basées sur l'aire ou la hauteur des pics de fluorescence).

Les indices les plus couramment utilisées sont les indices de Shannon et de Simpson (Hill *et al.* 2003). L'indice de Shannon est défini de la manière suivante :

$$H' = -\sum_{i=1}^n p_i \ln(p_i)$$

où n est le nombre d'OTU (pics/bandes) identifiées et p_i l'abondance/intensité relative de l' i ème OTU (typiquement, dans un profil ARISA, p_i correspond au ratio entre l'intensité de fluorescence du i ème pic et de l'intensité de fluorescence totale).

L'indice de Shannon est une mesure d'entropie de l'échantillon : pour une communauté dans laquelle chaque organisme est distinct des autres, l'entropie est maximisée (Bent & Forney 2008). Ainsi plus la communauté est riche en OTU, plus H' augmente. Cet indice est influencé par les variations d'abondances des OTU rares (Hill *et al.* 2003).

L'indice de Simpson se calcule de la manière suivante :

$$D = \sum_{i=1}^n p_i^2$$

où p_i représente l'abondance/intensité relative de l' i ème OTU.

L'indice de Simpson reflète la probabilité que deux OTU tirées au hasard dans l'échantillon considéré appartiennent au même phylotype (Bent & Forney 2008).

Ces deux indices sont utilisés pour estimer la diversité d'échantillons que l'on souhaite comparer entre eux. Par exemple Cardinale *et al.* (2004) comparent les performances de plusieurs sets d'amorces universelles ciblant les bactéries pour l'ARISA par l'intermédiaire des indices de Shannon et Simpson obtenus à partir de différents types d'échantillons.

Les indices de diversité biologique apportent une information globale sur la richesse en espèces des communautés. Ils ne permettent donc pas de différencier des communautés de même richesse en espèce mais de composition différente. Les indices de similarité/dissimilarité, en revanche, permettent de comparer les profils des échantillons deux à deux. Cette approche est qualitative (présence/absence) et ne tient donc pas compte des abondances relatives entre les espèces (différences entre les aires des différents pics de fluorescence dans un profil). Parmi les indices utilisés, on peut citer par exemple :

- l'indice de Sorenson : $Cs = \frac{2j}{a+b}$, où j correspond au nombre de fragments communs aux deux échantillons, et a et b le nombre de fragments contenus dans les échantillons A et B (Fisher & Triplett 1999) ;

- l'indice de Jaccard : $J = \frac{j}{j+b+c}$, où j désigne le nombre de fragments communs aux deux échantillons comparés, b et c le nombre de fragments présents dans l'un des échantillons mais absents dans l'autre. L'indice de Jaccard, exprimé en %, permet d'obtenir un pourcentage de

similarité entre les deux échantillons étudiés. Dans certains cas, on utilise plutôt la distance de Jaccard (1-J) qui permet d'obtenir un pourcentage de dissimilarité (Schloss *et al.* 2003).

5.3.2 Analyses multivariées

Les analyses multivariées sont des techniques permettant de mettre en évidence des relations entre l'évolution génétique des communautés étudiées, prise en compte par le biais des variations observées sur les profils d'empreinte génétique, et différents facteurs intervenant dans l'étude. Elles s'avèrent nécessaire pour une analyse globale de l'ensemble des échantillons étudiés, par opposition aux indices présentés ci-dessus qui ne permettent qu'une analyse des échantillons deux à deux. En écologie microbienne comme en écologie des populations de poissons, plantes, oiseaux, etc., les méthodes les plus utilisées sont le clustering et l'ACP (Tableau 3).

Les techniques d'ordination permettent d'explorer les relations entre les objets, par exemple leurs similarités ou dissimilarités, basées sur les paramètres correspondant aux variables mesurées, de telle sorte que les objets similaires apparaissent à côté les uns des autres dans la représentation graphique, et les objets dissimilaires apparaissent éloignés. Les méthodes d'ordination permettent donc d'observer des dynamiques, des évolutions de populations mais pas forcément de les expliquer.

Mots clés	Analyse exploratoire				Test d'hypothèse						total
	cluster	ACP	MDS	PCoA	CCA	RDA	Manova	Mantel	ANOSIM	CVA	
Bacter*	48.5	38	4.5	0.4	3.2	1.8	1.3	0.4	0.9	1.1	1141
Microb*	45.8	40.2	3.9	1.1	2.2	2.2	1.1	1.7	0.6	1.1	179
Plant*	40.3	28.5	4.6	1.7	15.5	3.7	1.9	2.3	0.6	0.9	3335
Fung*	54	27.2	2.8	1.1	8.5	2.8	0.9	1.1	0.2	1.4	563
Fish*	30.1	33.7	9.8	0.3	13.5	2.7	3.6	2.9	2.3	1.2	1464
Bird*	41	20.5	5.4	0.7	21.2	3.5	2.1	4.2	0.5	0.9	429
Insect*	54.3	13.7	6.1	0.8	11.5	4.4	3.5	3	1.1	1.7	637

Tableau 3 : Résultats d'une étude bibliographique sur la base de données ISI Web of Science (Thomson ISI research tool) sur les titres et résumés d'articles scientifiques. La recherche bibliographique a été lancée avec les mots clés figurant dans la première colonne du tableau ; l'astérisque permet d'élargir le champ de la recherche en cas de variations. Chaque mot-clé a été combiné avec un des tests statistiques cités sur la deuxième ligne (PcoA : principal coordinate analysis, CCA : canonical correspondence analysis, CVA : canonical variate analysis) pour lancer différentes recherches. Les nombres affichés représentent le nombre de publications identifiées dans chaque cas, ou en totalité pour chaque mot-clé. D'après Ramette (2007).

Parmi les techniques d'ordination, on distingue notamment :

- **l'analyse par cluster** : elle permet de regrouper les objets similaires de manière à maximiser la variabilité inter-groupes et à minimiser la variabilité intra-groupes. L'analyse par

cluster est recommandée lorsque des discontinuités sont attendues au sein du groupe d'échantillons (Figure 19).

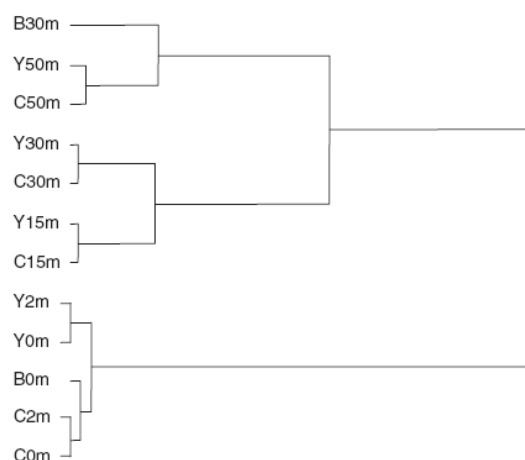


Figure 19 : Analyse par cluster de profils DGGE de bactérioplancton prélevé sur trois stations (B, C et Y) à différentes profondeurs (0, 2, 15, 30 et 50 m). Les profils DGGE ont été traduits en matrices de présence/absence (pour chaque bande en prenant en compte les intensités relatives), utilisées pour construire le dendrogramme (méthode de Ward). Les échantillons en provenance de couches de profondeur similaire sont regroupés dans un même cluster (15 et 30 m d'une part et 0 et 2 m d'autre part). Dorigo et al. (2006).

L'approche *hierarchical clustering* est couramment utilisée : une loi de formation des clusters et du nombre de clusters adéquat à la base de données est définie a priori. Plusieurs types de lois peuvent être utilisées : *nearest neighbor* (la distance entre deux clusters est la distance entre leurs points les plus proches), *furthest neighbor* (la distance entre deux clusters correspond à la distance entre leur points les plus éloignés), ou encore la méthode de Ward, qui fusionne deux clusters seulement s'ils augmentent la variabilité inter-cluster le moins possible.

- **l'analyse en composantes principales ou ACP** : elle est une des techniques les plus couramment utilisées pour observer des variations saisonnières ou géographiques à partir de données de *fingerprinting*. L'ACP permet de calculer de nouvelles variables (les composantes principales), qui sont des combinaisons linéaires des variables originelles. Les objets sont ensuite représentés graphiquement dans le nouveau système de coordonnées de manière à ce que la variance des données originelles soit le mieux conservée ; autrement dit, on représente, en général en deux dimensions, le nuage de points correspondant aux données de manière à obtenir une représentation la moins déformée possible du nuage de points d'origine (Figure 20).

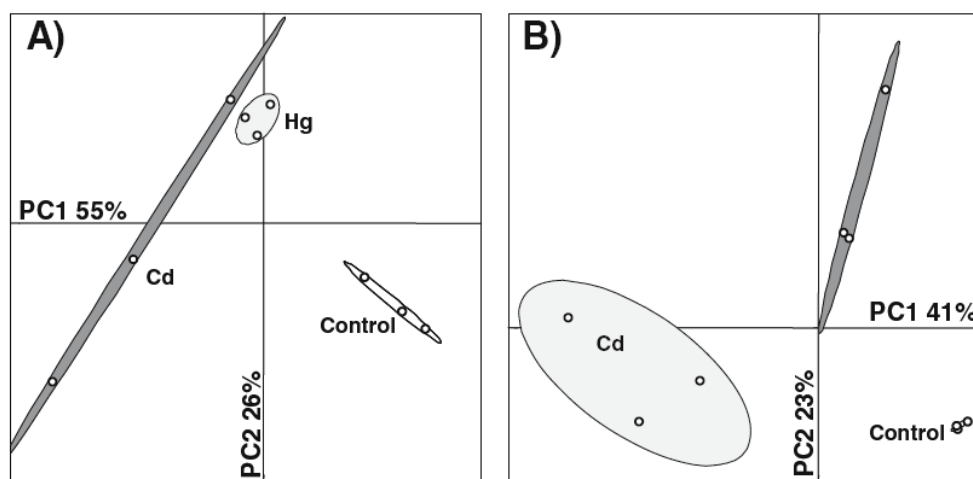


Figure 20 : Représentation graphique dans le plan factoriel correspondant aux deux premières composantes principales obtenues par analyse ACP à partir: A) des profils protéiques, B) des profils ARISA de communautés de biofilms après 5 jours d'exposition au Cd (10 mg/L) ou au Hg (8 mg/L) ; le biofilm témoin est le "control". Les ellipses délimitent des zones de confiance à 90%. L'analyse ACP permet de distinguer le biofilm témoin des biofilms exposés aux métaux (A et B) et les deux types de contamination (B). D'après Maron et al. (2007).

- la **nMDS** (*non metric multidimensional scaling*) : elle permet d'identifier des gradients à partir d'une matrice de distances entre les objets étudiés. L'algorithme de la nMDS affecte des rangs aux distances entre les objets puis construit une carte en deux ou trois dimensions de manière à préserver les rangs et non les distances originelles. Ainsi, deux objets similaires seront à proximité dans la représentation graphique (voir par exemple la Figure 21). La nMDS a beaucoup été utilisée pour analyser des données de *fingerprinting* (Ramette 2007)

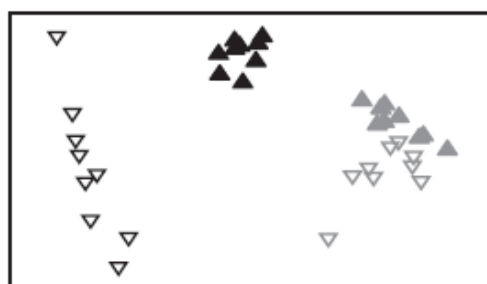


Figure 21 : Comparaison de biofilms prélevés sur deux sites différents (correspondant aux deux couleurs : noir et gris) à deux dates différentes (triangles pleins et triangles vides) par analyse nMDS à partir des distances de Manhattan entre profils ARISA. Le graphe permet d'observer une évolution temporelle pour un des sites (en noir) et de séparer les communautés suivant leur localisation. Lear et al. (2008).

L'article de Ramette (2007) détaille aussi l'utilisation d'autres techniques moins couramment utilisées (PCoA ou *Principal Coordinate Analysis*, CA ou *Correspondence Analysis*). Il existe aussi des techniques d'ordination qui permettent de tester les différences entre des groupes d'objets : par exemple l'ANOSIM compare les rangs des distances inter-groupes aux rangs des distances intra-groupes. Un test statistique permet de vérifier si la séparation en groupes est fondée ou non.

Dans le cas où un tableau de données environnementales correspondant aux objets est disponible, il devient possible d'examiner les relations entre les dynamiques mises en évidence par ordination et les variations des données environnementales, voire de mettre en évidence les variables affectant de manière prépondérante les structures des communautés. Par exemple la RDA (Analyse de Redondances ou *Redundancy analysis*) peut être considérée comme une ACP dans laquelle les composantes principales sont des combinaisons linéaires uniquement des variables environnementales. Elle permet d'étudier les relations entre deux tableaux de données : un tableau pour les données correspondant aux espèces et un tableau pour les variables environnementales. Une régression linéaire multiple permet d'étudier les relations entre les deux types de variables et une procédure itérative permet de trouver la meilleure ordination des objets. La CCA (Analyse Canonique des Correspondances ou *Canonical correspondence Analysis*) est une technique très similaire, basée sur des relations unimodales entre les espèces et les variables environnementales (alors que la RDA, comme l'ACP, suppose des relations linéaires).

5.4 Conclusion sur l'utilisation de la technique ARISA

Les différents biais identifiés précédemment, propres à toutes les techniques de biologie moléculaire ou en particulier à l'ARISA, montrent qu'il est difficile d'interpréter un profil ARISA, notamment en termes de diversité de la communauté étudiée. Cependant, les techniques d'empreinte génétique ont fait leurs preuves en tant qu'outils puissants d'analyse de l'évolution de communautés microbiennes. Elles permettent en effet de s'affranchir des biais liés à la culture des micro-organismes au laboratoire, et de mettre en évidence des dynamiques populationnelles dans des gradients environnementaux, par exemple des gradients saisonniers ou de pollution, comme le montrent de nombreux exemples dans la littérature scientifique des quinze dernières années. L'ARISA est une technique particulièrement intéressante pour traiter un grand nombre d'échantillons du fait de sa rapidité et sa simplicité d'utilisation, notamment parce-que, contrairement à la DGGE, il s'agit d'une technique automatisée ; de plus, les problèmes liés à la manipulation, la visualisation et à l'interprétation d'images de gels sont éliminés. Par ailleurs, l'utilisation couplée d'outils d'analyses statistiques est particulièrement intéressante pour étudier l'influence de facteurs environnementaux sur les communautés microbiennes. L'ARISA est donc une technique performante pour évaluer des modifications de structure de communautés impactées. A ce titre, son utilisation peut être couplée à la mise en place de mesures de tolérance, dans le cadre de l'application de la méthode PICT.

Problématique

Objectifs de l'étude

L'objectif de la thèse consiste à développer une méthodologie PICT' permettant d'évaluer les effets d'une contamination d'origine urbaine sur des communautés périphytiques. L'état des connaissances actuelles (**Chapitre 1, partie I**) sur les biofilms a en effet permis de montrer que ces communautés peuvent servir de bio-indicateurs de perturbations chimiques ou environnementales. Par ailleurs, l'acquisition de tolérance par des communautés exposées à un agent toxique, exploitée par l'approche PICT' (**Chapitre 1, partie II**), constitue une réponse biologique intéressante, pour tenter de faire le lien entre le degré d'exposition et les effets qui en découlent à l'échelle de la communauté (périphyton) exposée en milieu urbain. Enfin, les outils de biologie moléculaire (**Chapitre 1, partie III**) développés au cours des quinze dernières années, en particulier les techniques d'empreinte génétique, permettent d'évaluer les effets d'une exposition sur la structure des communautés impactées, plus finement que les descripteurs plus classiques du périphyton (typiquement des mesures de biomasse). Elles constituent donc une approche complémentaire à une méthodologie PICT' (mesures de tolérance) pour évaluer l'impact d'une perturbation anthropique.

Démarche globale

L'étape préliminaire à l'évaluation de l'impact d'une contamination urbaine sur périphyton a donc été le développement d'une méthodologie PICT' adaptée à une problématique urbaine. En particulier, nous avons :

- **mis au point des tests de toxicité aiguë pour caractériser la réponse biologique des communautés exposées d'un point de vue fonctionnel**, c'est-à-dire pour évaluer l'impact d'une perturbation sur le métabolisme par des mesures de tolérance sur l'activité hétérotrophe, l'activité photosynthétique et la respiration. La mesure de tolérance sur la composante hétérotrophe des biofilms constitue une approche originale dans la mesure où la méthode PICT' est plus couramment utilisée pour évaluer l'impact de pesticides sur des communautés algales (par des mesures de tolérance basées sur l'activité photosynthétique). Elle est, en outre, adaptée à une thématique urbaine puisque les communautés prélevées dans de grands fleuves urbains comme la Seine sont *a priori* plutôt hétérotrophes. Enfin, nous avons choisi de développer un test de toxicité sans utilisation de réactifs radioactifs, à la différence des

tests classiquement utilisés dans les études PICT' comme le test bactérien fondé sur l'incorporation de thymidine marquée par les bactéries. Le **Chapitre 2** rassemble les résultats obtenus au cours de ces développements méthodologiques : dans une première partie, les protocoles généraux de collecte et de caractérisation des biofilms sont présentés ; dans une seconde partie, figure le développement d'un test de toxicité à partir de la mesure d'activité β -glucosidase (hétérotrophe) sur des biofilms exposés à des métaux urbains ; dans une troisième partie, le développement méthodologique de ce même test sur des biofilms exposés à des contaminants hydrophobes urbains ; et, dans une quatrième partie, le développement méthodologique d'un test de toxicité à partir de mesures de concentrations en oxygène permettant d'estimer l'impact de métaux urbains sur l'activité photosynthétique des autotrophes et la respiration.

- **mis au point une technique de biologie moléculaire rapide et innovante pour caractériser les changements de structure des communautés exposées.** Le **Chapitre 3** récapitule dans une première partie les développements méthodologiques associés à l'utilisation de l'ARISA Bactérie sur des biofilms prélevés en milieu urbain et, dans une seconde partie, les développements méthodologiques associés à l'utilisation de l'ARISA sur la composante eucaryote de ce mêmes biofilms.

Les **Chapitres 2 et 3** sont donc des chapitres de développements méthodologiques, dans lesquels sont abordés les protocoles de collecte, de caractérisation des biofilms et de mesure de la tolérance d'une part (**Chapitre 2**), et les protocoles d'extraction des acides nucléiques, de PCR et d'empreinte génétique d'autre part (**Chapitre 3**).

L'étape suivante a consisté en la **validation de ces méthodes au laboratoire en conditions contrôlées** (expériences d'exposition de biofilms en microcosmes), et notamment de la **sensibilité des outils développés (test β -glucosidase et ARISA) à des niveaux d'exposition environnementaux**. Le **Chapitre 4** détaille le dispositif expérimental et rassemble les résultats obtenus.

Enfin, la **méthodologie a pu être appliquée *in situ***, c'est-à-dire sur des biofilms prélevés et exposés en milieu naturel. Une première étude a été réalisée dans un gradient de contamination urbaine sur trois sites localisés le long de la Seine (**Chapitre 5, partie I**). Une seconde étude a été mise en œuvre sur des échantillons de biofilms prélevés en amont et transplantés en aval d'une même rivière, et, réciproquement, prélevés en aval et transplantés en amont (**Chapitre 5, partie II**). Enfin, une troisième étude a permis de mettre en application la méthodologie sur l'ensemble du bassin de la Seine, de manière à prendre en compte la variabilité

physico-chimique à l'échelle du bassin (**Chapitre 5, partie III**). Le **Chapitre 5** rassemble les résultats de ces trois études de terrain.

Chapitre 2. Mesure de la tolérance des communautés périphytiques exposées en milieu urbain



Pour évaluer l'impact d'une contamination urbaine sur le périphyton, nous avons choisi, dans le cadre de cette étude, de développer des tests de toxicité adaptés. En effet, la mise en œuvre de la méthode PICT implique l'utilisation de tests de toxicité aiguë pour mesurer la tolérance des biofilms étudiés. Dans un contexte de contamination urbaine, il est intéressant de pouvoir mesurer la tolérance de la composante hétérotrophe. Dans une première partie figure une description du protocole de collecte des biofilms et de leur caractérisation par des bio-descripteurs classiques. Le choix et le développement d'un test de toxicité aiguë pour mesurer la tolérance de la composante hétérotrophe de biofilms, exposés à des métaux typiques d'une contamination urbaine (Cd, Cu, Ni, Pb et Zn), sont présentés dans une seconde partie. Dans une troisième partie figurent les essais de développement de ce même test de toxicité pour évaluer la tolérance de la composante hétérotrophe des biofilms exposés aux contaminants hydrophobes urbains. Cette étape a notamment nécessité l'utilisation d'un échantillonneur passif sur le terrain. Enfin, une quatrième partie présente le développement d'un test de toxicité basé sur une mesure d'activité photosynthétique pour évaluer la tolérance aux métaux de la composante autotrophe des biofilms.

I. Collecte de biofilms en milieu naturel et descripteurs classiques de leur composition

1. Dispositif de collecte in situ

Dans le cadre de cette étude, les biofilms sont collectés en milieu naturel après colonisation sur des supports artificiels : des membranes (typiquement 30 cm × 10 cm) en plastique souple LDPE (*Low density polyethylene* ou polyéthylène basse densité). Celles-ci sont accrochées verticalement sur des cagettes plastiques immergées dans l'eau, de manière à éviter tout dépôt par sédimentation. Le fond des cagettes est préalablement découpé de manière à éviter l'accumulation de débris charriés par la rivière, pouvant endommager ou enfouir les membranes (Figure 22). L'ensemble (cagette et membranes) est immergé à une vingtaine de centimètres de la surface de l'eau, pour permettre aux algues de se développer (en présence de lumière).



Figure 22 : Cagette en plastique et membranes LDPE recouvertes de périphyton sur le site de Saint-Maurice.

Ce support de colonisation (membranes plastiques) a été choisi notamment pour des raisons de facilité de manipulation, et d'adaptabilité par exemple en termes de taille (les membranes sont découpées aux ciseaux à partir d'un rouleau de plastique LDPE).

Chaque cagette peut recevoir une quinzaine de membranes dont la récupération sur le terrain est aisée : les membranes sont détachées, roulées sur elles-mêmes et introduites dans un flacon en verre propre (250 mL) rempli d'eau minérale (Montdore, source Grand Barbier, France). Le flacon est ensuite rapporté au laboratoire dans une glacière, puis conservé moins de 24h à 4°C (réfrigérateur) avant la mise en place des tests de toxicité ou la mesure de paramètres descripteurs du périphyton.

2. Descripteurs de la composition des biofilms

Les membranes recouvertes de biofilm sont grattées dans de l'eau minérale (Montdore, source Grand Barbier, France) à la main gantée. Le choix de cette eau minérale est commenté ci-dessous (partie II.3 de ce chapitre). La suspension ainsi obtenue, homogénéisée par agitation magnétique, sert de base pour les tests de toxicité mais aussi pour la mesure des différents descripteurs du périphyton.

2.1 Estimation de la biomasse totale

A partir de la suspension, on peut estimer la biomasse totale de la communauté. Une mesure de la concentration en MES (Matières En Suspension) de la suspension, qui sert ensuite à calculer le poids sec de biofilm (DW) exprimé en g par unité de surface colonisée, permet d'estimer la masse totale accumulée sur les supports de colonisation. Le poids sec correspond à la somme de la matière organique (organismes vivants du biofilm mais aussi cellules mortes, éléments de la matrice et dépôts de matières organiques en provenance de la rivière) et de la matière minérale (par exemple des matières sableuses en provenance de la rivière). La mesure des MES s'effectue à partir d'un aliquot de suspension de biofilm (typiquement 10 mL), filtré sur filtre GF/F (Whatman, porosité 0.7 μm) avec une pompe à vide. Pour obtenir un aliquot représentatif de la suspension de biofilm, le volume est en général prélevé en plusieurs fois (par exemple 3 fois 3 mL), la suspension de biofilm étant laissée sous agitation magnétique pendant la prise de volume. Le filtre est ensuite séché à l'étuve (100 °C) pendant au moins deux heures, puis refroidi à température ambiante au dessiccateur pendant au moins 30 minutes (Figure 23). La concentration en MES est calculée à partir de la différence de masse mesurée sur le filtre avant et après filtration :

$$[MES] = \frac{(m_f - m_i)}{V_{\text{filtré}}}$$

où m_i est la masse initiale du filtre seul, m_f la masse finale du filtre après séchage à l'étuve et $V_{\text{filtré}}$ le volume de suspension de biofilm filtrée.

On peut ensuite estimer les quantités respectives des matières organique et minérale accumulées sur le filtre. La concentration en MVS (Matière Volatiles Sèches) de la suspension, exprimées en g/L est évaluée par la différence de masse mesurée sur le filtre après grillage dans un four à moufle à 500 °C pendant 1h. Le filtre est ensuite refroidi au dessiccateur pendant au moins 30 minutes puis pesé à nouveau. La concentration en permet de calculer la masse de MO

par unité de surface colonisée (AFDW du biofilm). La quantité de matière minérale peut ensuite être calculée par différence entre le poids sec total et la masse organique.

$$[MVS] = \frac{(m_f - m_{\text{grillé}})}{V_{\text{filtré}}}$$

où $m_{\text{grillé}}$ correspond à la masse finale du filtre après grillage au four à 500°C.

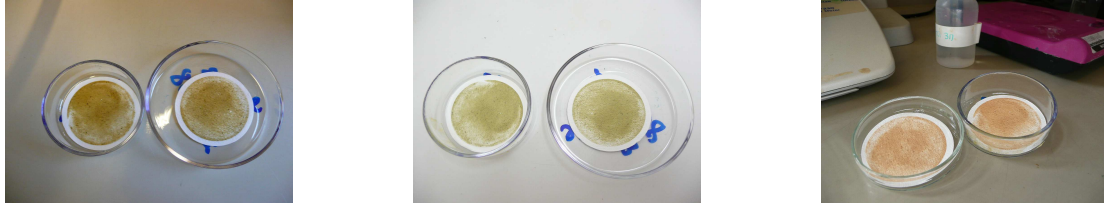


Figure 23 : Filtres GF/F utilisés pour déterminer le poids sec et la masse organique de biofilms. De gauche à droite : les filtres après filtration de la suspension de biofilms, les filtres après séchage à l'étuve, les filtres après grillage au four à moufle.

2.2 Estimation de la composition élémentaire du biofilm

Le ratio C/N est un indicateur de la quantité protéique du biofilm. La mesure du ratio C/N se fait à partir des quantités d'azote et de carbone contenues dans 8 mg du culot de centrifugation (3000 rpm, 15 minutes) d'un aliquot de suspension de biofilm, après acidification (acide chlorhydrique 10%) et chauffage à sec (100 °C, environ 12h) sous hotte. Les 8 mg sont pesés dans des capsules en étain introduites ensuite dans un analyseur élémentaire (VarioELIII, Elementar).

2.3 Estimation de la biomasse algale

La biomasse algale est estimée par une mesure de la concentration en chlorophylle *a*. Un aliquot de suspension de biofilm (typiquement ≤ 1 mL) est filtré sous vide manuel sur un filtre de nitrocellulose (pore = 0.8 μm , Nuclepore). Le filtre est ensuite introduit dans un tube plastique avec 6 mL d'acétone à 90% et conservé au congélateur (-20°C) avant analyse au spectrofluorimètre. La quantité de chlorophylle *a* extraite est mesurée par fluorescence (excitation 428 nm, émission : 600-730 nm) selon le protocole de l'US EPA (Arar & Collins 1997).

3. *Suivi de biofilms prélevés in situ*

Le Tableau 4 récapitule le suivi terrain de biofilms échantillonnés sur les sites de Saint-Maurice (94) sur la Marne en amont de Paris, et Andrésy (78) sur la Seine en aval de Paris (Figure 24). Ces échantillons ont été utilisés pour les mises au point méthodologiques des tests de toxicité aiguë (test β -glucosidase et test photosynthétique, détaillés ci-dessous, et technique ARISA détaillée au Chapitre 3).

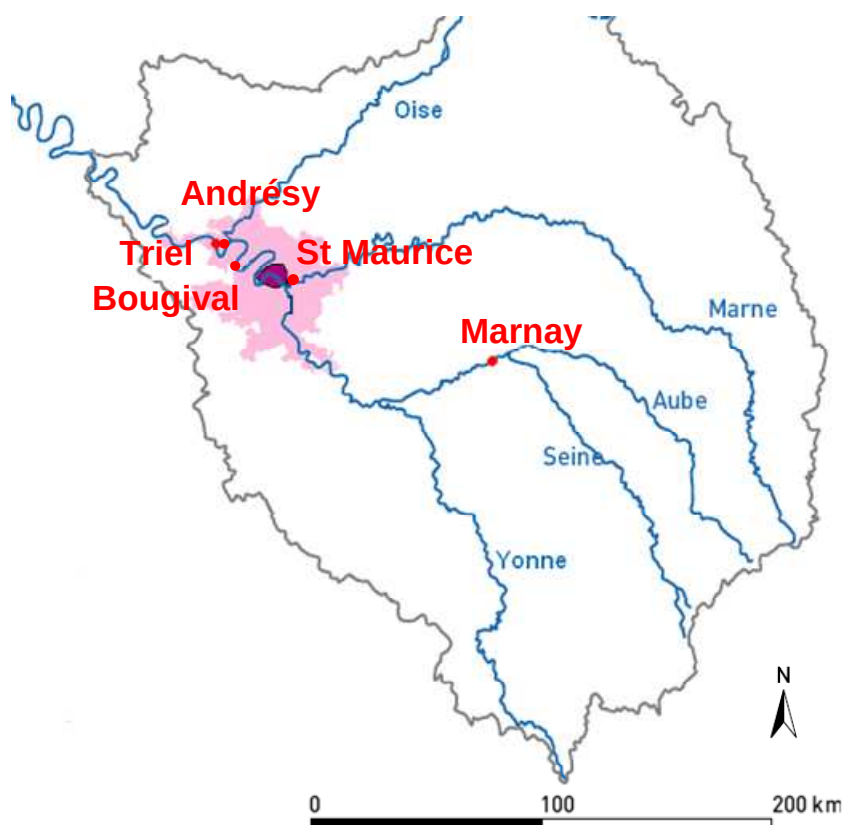


Figure 24 : Carte du bassin de la Seine représentant les sites de prélèvements de biofilms mentionnés pour les développements méthodologiques des mesures de tolérance des biofilms.

Le suivi permet d'observer une augmentation de la quantité de biofilm récupéré avec l'âge (durée de colonisation) de celui-ci. Dans certains cas, il est aussi possible d'observer un décrochage du biofilm à la suite de fortes précipitations (cf. prélèvement du 11 mars 2008, Tableau 4). On remarque aussi une diminution de la biomasse totale et de la biomasse algale au cours de l'hiver sur le site de Saint-Maurice. Les variations de biomasse et de l'indice autotrophe (AI) (Azim & Asaeda 2005) permettent de mettre en évidence des variations dans la structure des communautés. En particulier, une baisse des valeurs d'indice autotrophe indique un développement de la composante autotrophe des biofilms, notamment au printemps.

En outre, on remarque qu'une quinzaine de jours de colonisation semblent suffisants pour récupérer des membranes chargées de biofilm, mais il paraît plus judicieux de laisser un temps de colonisation un peu plus long (environ un mois), notamment parce-que la vitesse de développement dépend fortement de la température et donc de la saison. En outre, la sensibilité des biofilms aux polluants varie suivant leur âge (durée de colonisation). Par exemple, Ivorra et al. (2000) comparent la sensibilité au cadmium et au zinc de biofilms jeunes (deux semaines de colonisation *in situ*) et de biofilms matures (six semaines de colonisation *in situ*). Ils remarquent que le biofilm jeune est plus sensible aux métaux testés que le biofilm mature. Cet effet de l'âge du biofilm a déjà été remarqué par d'autres auteurs (Riber & Wetzel 1987; Watanabe 1985) : dans les biofilms matures, plus denses et plus épais, les échanges avec le milieu extérieur sont plus limités (formation d'une couche de diffusion à la surface du biofilm) et le fonctionnement plus autonome (les bactéries dégradent les produits d'excrétion des algues ainsi que les produits issus de la lyse des cellules mortes, et les algues obtiennent leurs nutriments des processus de dégradation bactérienne).

Site	Date	Age du biofilm (jours)	Poids sec (g/m ²)	AFDW (g/m ²)	Ch <i>a</i> (mg/m ²)	AI
Saint-Maurice	24/10/2007	14	16.65	nd	51.58	nd
	26/11/2007	39	24.5	nd	77.36	nd
	04/12/2007	41	25.94	nd	95.02	nd
	09/01/2008	44	7.51	nd	4.31	nd
	14/01/2008	49	8.72	nd	4.92	nd
	21/01/2008	56	6.89	nd	7.76	nd
	18/02/2008	75	102.88	29.56	132.9	222
	25/02/2008	83	140.45	21.34	nd	nd
	11/03/2008	98	51.32	12.31	92.6	133
	18/03/2008	105	57.95	9.43	83.8	113
	25/03/2008	50	21.38	5.27	34	155
	31/03/2008	56	21.82	6.83	50.8	134
	07/04/2008	63	30.58	7.63	70.6	108
	17/04/2008	73	16.84	2.59	33.12	78
	03/06/2008	174	65.52	15.52	112.15	138
	17/06/2008	189	167.53	22.99	132.41	174
	01/07/2008	69	54.35	8.7	43.4	200
	07/07/2008	76	85.78	16.01	117	137
Andrésy	06/11/2006	12	12.72	5.2	nd	nd
	14/11/2006	7	2.12	1.44	nd	nd
	28/11/2006	15	15.4	7	nd	nd
	11/12/2006	14	5.48	1.6	nd	nd

Tableau 4 : Suivi de la composition des biofilms prélevés à Saint-Maurice et à Andrésy de 2006 à 2008.

Dans le cadre de la mise au point méthodologique des tests de toxicité, les durées de colonisation dépassent souvent un mois pour des raisons pratiques, les biofilms étant prélevés petit à petit sur plusieurs semaines à partir d'une même cagette, contenant à l'origine une vingtaine de membranes. Dans le cadre de ces expériences de mise au point, une durée de colonisation longue n'est pas gênante puisqu'il ne s'agit pas de comparer les réponses de biofilms de maturités différentes.

II. Développement méthodologique du test de toxicité aiguë β -glucosidase sur les métaux

1. *Choix du test de toxicité hétérotrophe*

Les enzymes extracellulaires contrôlent des processus métaboliques extrêmement importants dans le fonctionnement des écosystèmes aquatiques. Les activités enzymatiques sont donc tout particulièrement intéressantes pour étudier, par exemple, l'effet d'une perturbation (Admiraal & Tubbing 1991; Tubbing & Admiraal 1991). En particulier, l'activité β -glucosidase, qui représente l'activité globale hétérotrophe (Chrost 1989, 1991b), est un paramètre adéquat pour développer un test de toxicité aiguë permettant de caractériser la tolérance de la composante hétérotrophe des biofilms.

2. *Protocole de mesure de l'activité β -glucosidase*

L'activité β -glucosidase se mesure classiquement par fluorescence, après introduction d'un substrat (Methylumbelliferyl- β -D-glucopyranoside ou MUF-GLU) qui, après hydrolyse par l'enzyme, libère une molécule fluorescente (4-Méthyllumbelliférone ou MUF). Dans le cadre de cette étude, la mesure de fluorescence a d'abord été réalisée par un spectrofluorimètre à cuve SAFAS SP 2000 Xenius (Safas SA), excitation à 348 nm et émission à 448 nm, au cours de la mise au point méthodologique du test, puis sur un lecteur de microplaques LB 941 Tristar Ti (Berthold Technologies), avec des filtres à 355 nm (excitation) et 460 nm (émission).

L'activité β -glucosidase peut être mesurée à partir d'une suspension de périphyton. Ceci permet d'éviter des problèmes de diffusion du substrat à travers la matrice du biofilm et d'obtenir des mesures plus comparables entre elles, puisque les suspensions de biofilms sont homogénéisées (Romaní *et al.* 2008; Smucker *et al.* 2009). Le protocole de mesure sur suspension de biofilm est le suivant, pour une mesure sur spectrofluorimètre à microplaques : un volume v de substrat (MUF-GLU) est introduit dans un aliquot de suspension de biofilm (1 mL). Les échantillons sont vortexés puis mis à incuber pendant 30 minutes, à température ambiante, sous agitation (table d'agitation rotative) et dans l'obscurité. La réaction enzymatique est ensuite

stoppée par ajout de soude à 1M (Li & Chrost 2006) (100 μ L). Les échantillons sont centrifugés (2000g, 5 minutes), puis les surnageants sont introduits dans une microplaque à raison de 200 μ L par puits. La mesure d'activité β -glucosidase a toujours été réalisée en triplicats. Par ailleurs, un témoin négatif, dont la réaction est stoppée par ajout de soude concomitante à l'ajout de substrat, permet de vérifier qu'aucun signal parasite, en provenance du substrat, du biofilm, ou d'un autre réactif, ne vient perturber le signal fluorescent mesuré¹⁵. L'intensité de fluorescence de ce témoin négatif est retranchée aux intensités de fluorescence mesurées sur les échantillons. Pour une mesure sur spectrofluorimètre à cuve, le protocole est le même mais les volumes de réactifs sont multipliés par quatre (il faut environ 3 mL de surnageant pour remplir une cuve).

La mesure d'activité doit être réalisée à concentration saturante en substrat (Hoppe 1983; Montuelle & Volat 1993). En effet, la réaction enzymatique peut être décrite par une loi de Michaëlis-Menten qui relie la concentration en substrat à la vitesse de réaction. La vitesse de réaction devient indépendante de la concentration en substrat lorsque celle-ci est élevée (cinétique d'ordre 0 : toutes les enzymes présentes sont en contact avec le substrat). La concentration saturante en substrat (C_{sat}) est estimée à partir de courbes de saturation obtenues selon le protocole suivant : une gamme de solutions de substrat (concentrations en MUF-GLU variant de 40 à 4000 μ M) est préparée à partir d'une solution mère à 4 mM (elle-même préparée par dilution de MUF-GLU en poudre (Sigma-Aldrich) dans un mélange eau/2-méthoxyéthanol 1:1, v:v). La suspension de biofilm est ensuite incubée avec les différentes solutions de substrat dans des eppendorfs contenant 500 μ L de suspension de biofilm et 500 μ L de solution de MUF-GLU (concentrations de MUF-GLU variant maintenant de 20 à 2000 μ M du fait de la dilution). L'incubation, l'arrêt de la réaction enzymatique et la mesure de fluorescence sont réalisées comme indiqué précédemment. La concentration saturante, déterminée expérimentalement à partir de la courbe de saturation obtenue, correspond au début du plateau observé (typiquement aux alentours de 500 μ M pour du périphyton de rivière). Dans le cadre de cette étude, la concentration saturante en substrat a été mesurée à chaque retour de terrain et sur chaque échantillon de biofilm. Pour chaque concentration en substrat testée, les mesures d'activité enzymatique ont été réalisées en duplicats (voir par exemple Figure 25).

¹⁵ Le témoin négatif est un échantillon de biofilm traité de la même manière que les autres mais pour lequel l'ajout de soude a lieu simultanément à l'ajout de substrat, ce qui empêche la formation de MUF.

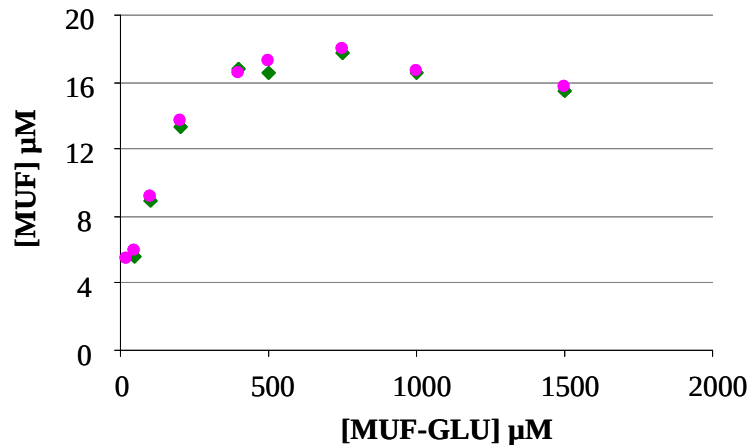


Figure 25 : Exemples de courbe de saturation. La concentration en MUF produite (en μM de MUF) est représentée en fonction de la concentration en substrat (μM de MUF-GLU) utilisée à raison de deux réplicats par concentration. Pour ce biofilm, la concentration saturante se situe aux alentours de $500 \mu M$ de MUF-GLU.

Enfin, l'utilisation d'une courbe de calibration (gamme de concentrations en MUF) permet d'exprimer les signaux fluorescents obtenus en concentration de produit formé (MUF) par heure et par g de MO du biofilm. Si la gamme de calibration est linéaire au spectrofluorimètre à cuve SAFAS SP 2000 Xenius, elle ne l'est pas pour le lecteur de microplaques LB 941 Tristar Ti (Figure 26), ce qui nécessite dans ce dernier cas d'utiliser une gamme faible (linéaire) ou une gamme forte (non linéaire) suivant les valeurs de fluorescence obtenues lors des tests.

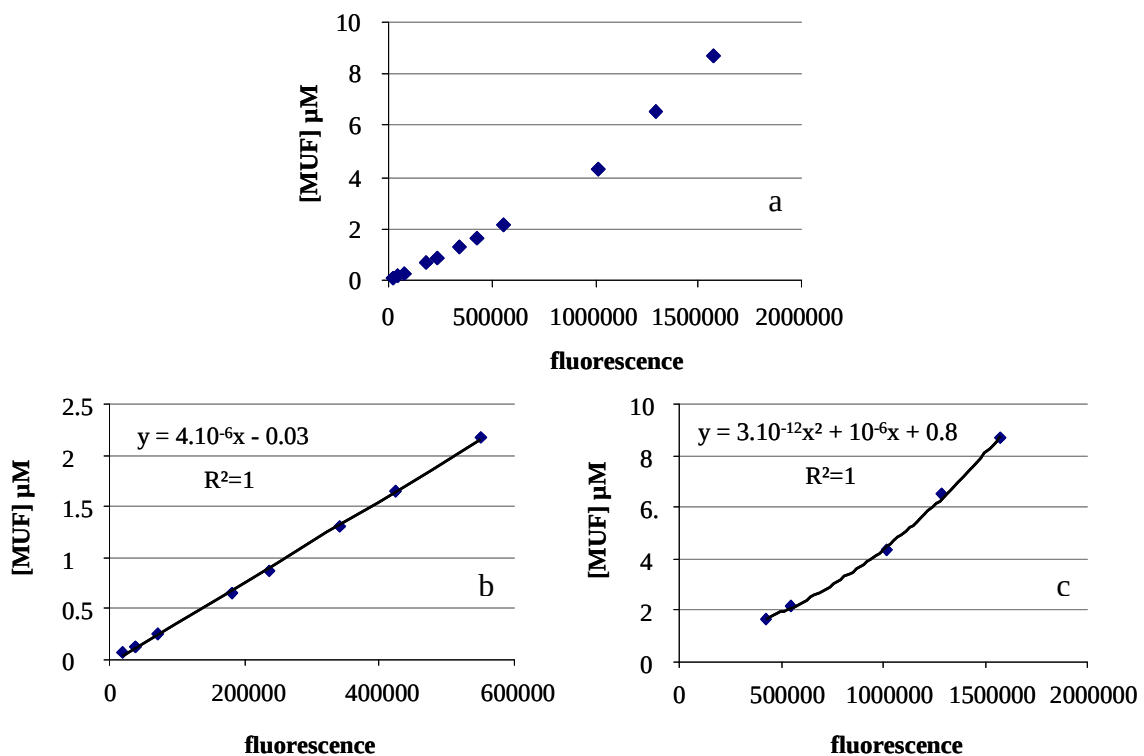


Figure 26 : Gammes de calibration obtenues au lecteur de microplaques (a : gamme entière, b : gamme faible, c : gamme forte). En sélectionnant les concentrations les plus faibles (b), la gamme reste linéaire, en revanche pour des concentrations plus élevées (c), la gamme ne l'est plus.

3. Protocole du test de toxicité β -glucosidase

3.1 Choix du médium pour fabriquer les suspensions de biofilm

Les premiers développements ont permis de choisir un médium adéquat pour les tests de toxicité : l'eau minérale Montdore (Grand Barbier, France, composition : 4.1 mg/L de Ca^{2+} , 1.7 mg/L de Mg^{2+} , 2.7 mg/L de Na^+ , 0.9 mg/L de K^+ , 1.14 mg/L de SO_4^{2-} , 25.8 mg/L de HCO_3^- , 0.9 mg/L de Cl^- , 0.8 mg/L de NO_3^- , 0.0 mg/L de NO_2^-). En effet, les mesures d'activité enzymatique sont habituellement menées dans une solution tamponnée permettant d'atteindre un pH optimal de mesure de l'activité mesurée. Dans le cas de l'activité β -glucosidase, on se place, de plus, au moment de la mesure de fluorescence, à pH basique, classiquement en utilisant un tampon glycine/soude (Montuelle & Volat 1993) pour améliorer la fluorescence du fluorophore utilisé (MUF ou méthyllumbelliférone). Le MUF, de pKa égal à 7.8, fait en effet partie de la classe des fluorophores à transfert de photons photoinduits (classe A), pour lesquels la forme qui émet est la forme basique, car l'excitation de la forme acide est suivie d'une déprotonation de l'état excité (Valeur 2002, 2004). Ainsi, l'intensité de fluorescence est maximale quand le pH atteint des valeurs proches de 10 (Haugland 2002).

Les premiers essais de toxicité sur suspensions de biofilms dans des tampons (tampon de Sørensen¹⁶ à pH 7, NaCl) n'ont pas permis d'observer une toxicité des métaux par la mesure de l'activité β -glucosidase, probablement en raison de la formation de complexes avec les ions métalliques ajoutés. Pour éviter de modifier la spéciation des métaux en ajoutant des agents complexants, de l'eau minérale a donc été utilisée pour tous les tests de toxicité. Avant la mesure de fluorescence, le pH des échantillons est optimisé par ajout de soude (Li & Chrost 2006), ce qui permet aussi de stopper la réaction enzymatique (pH > 10 pour tous les échantillons).

3.2 Test de toxicité

Le protocole du test de toxicité sur la composante hétérotrophe des biofilms, par inhibition de l'activité β -glucosidase, est le suivant : les échantillons de biofilms (aliquots) sont d'abord exposés au métal pendant une heure, à 20°C, sous agitation et à l'obscurité, par ajout de 10 μL de solution de métal à 990 μL de suspension de biofilm. Pour chaque test, une gamme d'au moins six concentrations de métal est testée en triplicats, avec un témoin négatif. Le substrat (MUF-GLU) est ensuite ajouté (à partir d'une solution mère à 4 mM de MUF-GLU) à saturation

¹⁶ Le tampon phosphate de Sorensen est constitué d'un mélange de NaH_2PO_4 et Na_2HPO_4 . Selon les différentes proportions, le pH varie entre 5.8 et 8.

([MUF-GLU]=Csat, la Csat étant mesurée lors d'une étape préliminaire), et les protocoles d'incubation (30 minutes) et de mesure (arrêt de la réaction enzymatique, centrifugation, passage au fluorimètre, interprétation avec la gamme de calibration) sont les mêmes que précédemment. Pour chaque test, une gamme de calibration en MUF est passée au spectrofluorimètre en parallèle des échantillons de biofilms.

4. Tolérance et normalisation par les MES

4.1 Inhibition de l'activité β -glucosidase par les métaux

Tous les métaux testés (Cd, Cu, Ni, Pb et Zn) inhibent l'activité β -glucosidase des biofilms après une heure d'exposition et les courbes dose/effet obtenues permettent d'estimer une EC_{50} et son intervalle de confiance à 95 %, avec la macro REGTOX (<http://eric.vindimian.9online.fr>). La macro modélise la diminution de l'activité hétérotrophe en fonction de la concentration en métal ajoutée lors du test par le modèle de Hill (1910) avec une régression non-linéaire (Duggleby 1981). L'équation de la courbe est la suivante :

$$F(x) = (p_{\max} - p_0) \frac{x^H}{x^H + EC_{50}^H} + p_0$$

où x est la concentration en métal, p_0 l'effet observé en l'absence de métal (activité du témoin), $p_{\max}$ l'effet prédit à concentration infinie en métal et $F(x)$ une loi de probabilité ; H est le nombre de Hill associé. Chaque paramètre (p_0 , $p_{\max}$, EC_{50} and H) est ajusté pour le calcul. Des intervalles de confiance sont ensuite calculés pour chacun des paramètres par Bootstrap. Il est aussi possible de travailler à partir des courbes de pourcentage d'inhibition de la fluorescence (Figure 27).

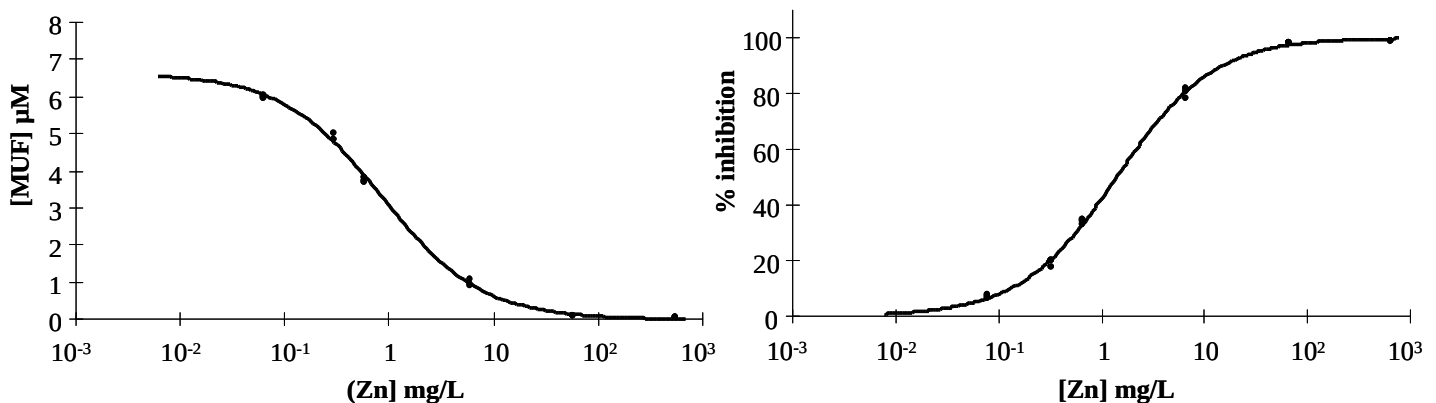


Figure 27 : Courbes dose/effet d'un test de toxicité β -glucosidase permettant d'obtenir la tolérance au Zn d'un biofilm. La courbe dose/effet peut être tracée avec l'activité β -glucosidase en ordonnée (ici exprimée en μM de MUF), à gauche, ou en pourcentage d'inhibition de l'activité β -glucosidase, calculé par rapport à l'activité du biofilm témoin, à droite.

Des exemples d' EC_{50} mesurées sur des biofilms prélevés à Saint-Maurice et à Andrésey figurent dans le Tableau 5. Les niveaux de tolérance mesurés sont du même ordre de grandeur que ceux obtenus dans la littérature scientifique sur périphyton exposé au cadmium et au zinc par un test de toxicité proche (inhibition de l'incorporation de thymidine marquée, qui est une mesure de la production bactérienne) (Admiraal *et al.* 1999; Lehmann *et al.* 1999).

Métal	Date de prélèvement	EC_{50} et intervalle de confiance à 95%
Cu	06 Nov. 06 ^a	12.15 (11.15-13.25)
	11 Dec. 06 ^a	1.24 (0.86-2.82)
	14 Jan. 08	0.54 (0.46-0.63)
	07 Juil. 08	0.18 (0.17-0.19)
Cd	06 Nov. 06 ^a	12.78 (5.92-25.15)
	07 Juil. 08	2.49 (2.33-2.64)
Ni	14 Nov. 06 ^a	25.24 (12.78-778.06)
	28 Nov. 06 ^a	43.40 (38.32-49.13)
	07 Juil. 08	7.40 (7.09-7.77)
Zn	06 Nov. 06 ^a	19.37 (14.87-32.91)
	07 Jul. 08	0.68 (0.54-0.85)
Pb	14 Nov. 06 ^a	50.13 (36.00-51.63)
	11 Mar. 08	47.16 (39.70-55.10)

Tableau 5 : EC_{50} (mg/L) avec leurs intervalles de confiance à 95% obtenues pour le Cu, Cd, Ni, Zn et Pb sur des biofilms prélevés à Saint-Maurice et à Andrésey (a).

La comparaison des différents niveaux de tolérance reste difficile du fait de l'absence de standardisation des paramètres de colonisation et de prélèvement. En effet, la variabilité des niveaux de tolérance suivant les dates de prélèvement n'est pas étonnante du fait des variations liées à l'échantillonnage *in situ* au cours des saisons, et à l'absence de standardisation des paramètres de colonisation (variant de 7 à 189 jours, Tableau 4). Cependant, on remarque que les niveaux de tolérance sont globalement plus élevés sur le site d'Andrésey, ce qui pourrait être lié à une contamination métallique plus importante qu'à Saint-Maurice (Tusseau-Vuillemin *et al.* 2007).

4.2 Normalisation par les MES pour obtenir une mesure fiable de la tolérance

Les premiers résultats d'inhibition de l'activité β -glucosidase par les métaux ont mis en évidence un effet de la concentration de la suspension de biofilm utilisée pour les tests de toxicité sur les EC_{50} obtenues : ainsi, plus une solution de biofilm est concentrée (ce que l'on peut caractériser par la concentration en MES de la suspension), plus l' EC_{50} obtenue est élevée, i.e. plus

le biofilm paraît tolérant au métal. Ce phénomène a été mis en évidence par des expériences de dilution (**Erreur ! Source du renvoi introuvable.**) où pour chaque expérience, trois dilutions d'une même suspension de biofilm ont été utilisées pour réaliser trois tests de toxicité (avec un même métal).

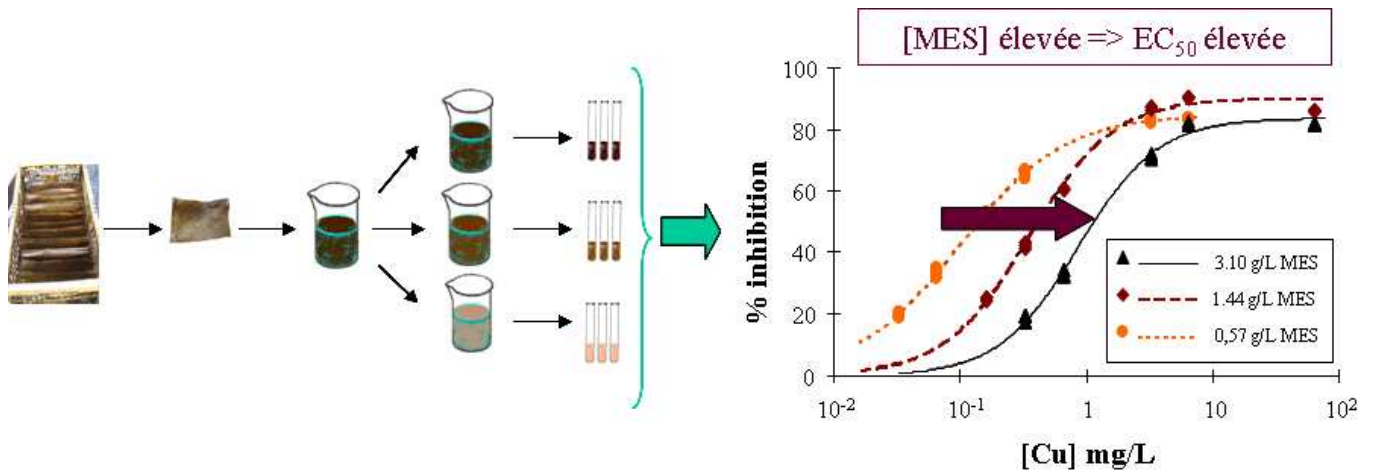


Figure 28 : Schéma illustrant les expériences de dilutions de suspensions de biofilm mettant en évidence la variabilité des niveaux de tolérance mesurés par le test β -glucosidase en fonction de la concentration de la suspension de biofilm. A partir d'une solution mère de biofilm, trois solutions filles sont préparées par dilution dans de l'eau Mondore. Ces trois solutions filles sont utilisées pour mettre en œuvre trois tests de toxicité, ici avec le cuivre comme métal. Les trois courbes dose/effet obtenues permettent d'obtenir trois EC_{50} distinctes. Plus la suspension de biofilm est concentrée (concentration en MES élevée), plus l' EC_{50} est élevée.

Cette observation conduit à définir une EC_{50} normalisée : le quotient de l' EC_{50} (en g/L) obtenue lors d'un test de toxicité par la valeur de MES (en g/L) de la suspension de biofilm utilisée. Ainsi, pour un même biofilm, on peut obtenir plusieurs EC_{50} en fonction du degré de dilution de la suspension de biofilm, mais une seule EC_{50} normalisée, caractéristique de la sensibilité du biofilm étudié (Figure 29 et Figure 30).

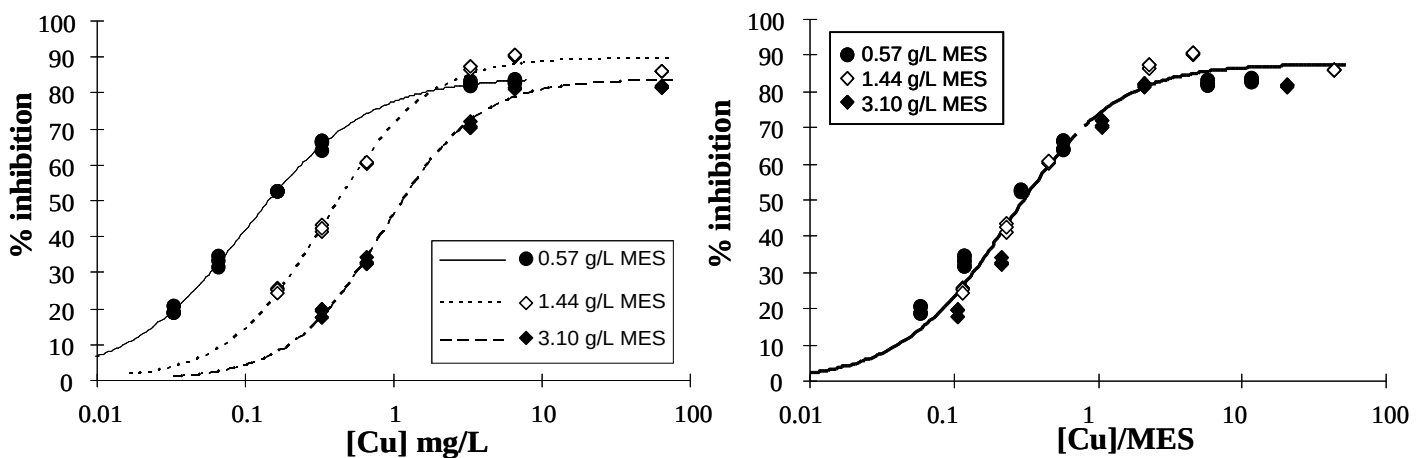


Figure 29 : Courbes dose/effet exprimées en pourcentage d'inhibition de l'activité β -glucosidase de trois solutions de biofilm obtenue par dilution d'une même suspension de biofilm exposée au cuivre. A gauche, les pourcentages d'inhibition sont représentés en fonction de la concentration d'exposition en métal lors du test ; à droite, en fonction de la concentration en cuivre normalisée par la concentration en MES de la suspension de biofilm correspondante.

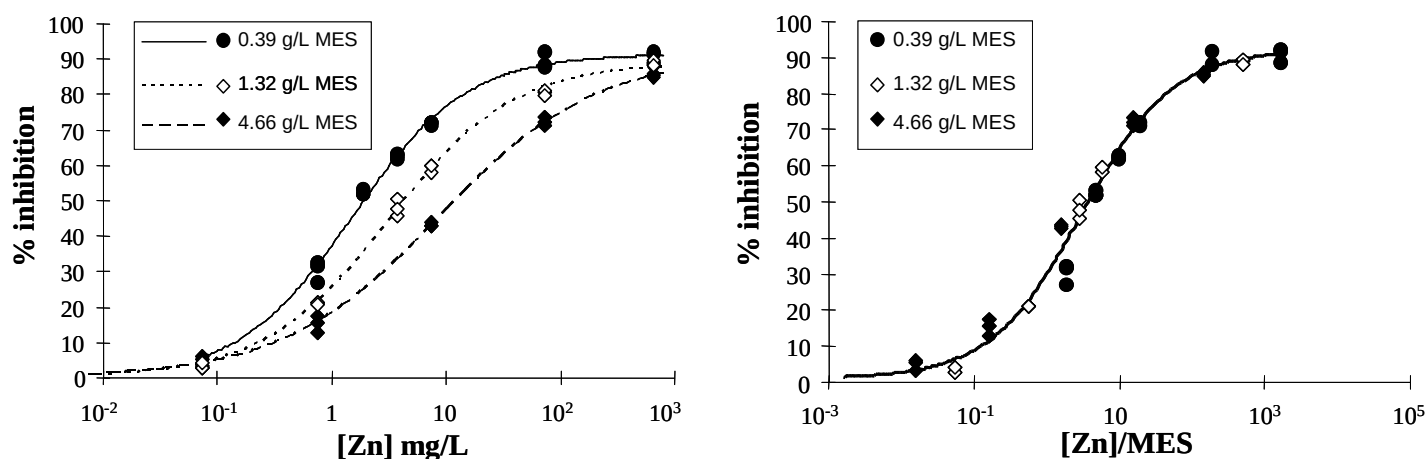


Figure 30 : Courbes dose/effet exprimées en pourcentage d'inhibition de l'activité β -glucosidase de trois solutions de biofilm obtenue par dilution d'une même suspension de biofilm exposée au zinc. A gauche, les pourcentages d'inhibition sont représentés en fonction de la concentration d'exposition en métal lors du test ; à droite, en fonction de la concentration en cuivre normalisée par la concentration en MES de la suspension de biofilm correspondante.

Des Figures similaires pour les métaux cadmium, nickel et plomb apparaissent en annexe parmi les figures de la note technique publiée dans Ecotoxicology.

L'expérience a en effet été mise en œuvre pour chaque métal sur des biofilms différents (communautés prélevées à des dates différentes sur le site de Saint-Maurice) comme on peut le voir dans le Tableau 6 où figurent à la fois les EC_{50} standards et les EC_{50} normalisées obtenues au cours d'expériences de dilution. Des exemples de courbes dose/effet obtenues pour le nickel, le plomb et le cadmium figurent dans la note technique en annexe.

Ce résultat est important car, dans le cadre de la mise en œuvre d'une approche PICT, il est nécessaire de pouvoir comparer des biofilms exposés à des niveaux de contamination différents et, en particulier, de comparer les EC_{50} obtenues pour ces biofilms, de manière à pouvoir mettre en évidence une acquisition de tolérance des communautés exposées par rapport à une communauté de référence (en principe non exposée). Or, la concentration de la suspension de périphyton est déterminée par l'expérimentateur : il choisit, en effet, le nombre de membranes supports récupérées sur le terrain et le volume d'eau utilisé pour faire la suspension. Il est donc impératif de pallier cette variabilité expérimentale des EC_{50} obtenues par le test de toxicité pour pouvoir mettre en œuvre la méthode PICT. L' EC_{50} normalisée permet de réduire cette variabilité et d'obtenir des niveaux de tolérance comparables.

Métal	Date de prélèvement	EC ₅₀ et intervalle de confiance à 95%	EC ₅₀ /MES et intervalle de confiance à 95%
Cu	09 Jan. 08	0.44 (0.42-0.46)	0.3 (0.27-0.32)
		0.25 (0.18-0.41)	0.4 (0.11-0.69)
		0.07 (0.05-0.12)	0.29 (0.10-0.48)
	18 Fev. 08	0.87 (0.79-0.96)	0.28 (0.21-0.35)
		0.36 (0.33-0.39)	0.25 (0.22-0.28)
		0.1 (0.10-0.11)	0.18 (0.14-0.22)
Cd	14 Jan. 08	5.25 (4.15-7.49)	3.25 (1.24-5.26)
		2.79 (1.71-7.28)	3.97 (0-10.73)
		1.38 (1.15-10.69)	2.43 (1.39-3.46)
	21 Jan. 08	6.18 (5.49-7.14)	5.49 (4.62-6.36)
		3.92 (3.58-4.34)	7.37 (6.02-8.71)
		1.38 (1.15-1.69)	6.96 (0-20.39)
	28 Jan. 08	2.43 (2.17-2.73)	1.03 (0.89-1.17)
		2 (1.72-2.34)	2.68 (2.22-3.13)
		0.45 (0.34-0.59)	1.19 (0.61-1.77)
Ni	25 Fev. 08	3.57 (3.16-4.03)	1.85 (1.59-2.11)
		1.67 (1.29-2.16)	2.67 (1.71-3.63)
		1.36 (1.02-1.86)	3.36 (0.54-6.19)
	31 Mar. 08	44.02 (40.42-48.80)	31.35 (16.91-45.78)
		18.24 (15.72-21.19)	25.54 (11.42-39.66)
		9.67 (8.19-11.6)	16.47 (7.11-25.83)
Zn	18 Mar. 08	8.84 (7.92-9.70)	1.90 (1.70-2.09)
		3.12 (2.79-3.47)	2.36 (2.07-2.65)
		1.52 (1.28-1.77)	3.87 (3.08-4.67)
	07 Avr. 08	4.52 (4.07-4.99)	2.12 (1.86-2.39)
		2.39 (2.22-2.56)	2.32 (1.76-2.87)
		1.87 (1.66-2.11)	3.55 (1.14-5.97)
Pb	25 Mar. 08	57.28 (50.66-65.63)	38.49 (32.33-44.65)
		77.57 (66.42-91.77)	85.95 (67.99-103.91)
		47.5 (42.65-53.19)	110.12 (66.78-153.46)
	01 Juil. 08	51.96 (50.16-53.67)	25.22 (22.40-28.04)
		32.4 (29.73-35.39)	32.86 (29.82-35.90)
		24.9 (22.25-27.36)	40.27 (31.76-48.78)

Tableau 6 : EC₅₀ et EC₅₀ normalisées (avec leurs intervalles de confiance à 95%) obtenues au cours des expériences de dilution sur biofilms prélevés à Saint-Maurice. Les EC₅₀ sont exprimées en mg/L et les EC₅₀ normalisées en mg_{métal}/g_{MES}.

On peut interpréter ces résultats en supposant d'une part, un équilibre entre le métal lié aux MES, considéré comme non bio-disponible ($M_{\text{non-biodisp}}$), et le métal biodisponible (M_{biodisp}) en solution, caractérisé par une loi d'action des masses avec une constante K de complexation, et d'autre part, en faisant l'hypothèse que le métal non lié aux MES (M_{biodisp}) est la forme toxique du métal.

On obtient ainsi les équations suivantes :

$$M_{\text{biodisp}} + \text{MES} \leftrightarrow M_{\text{non-biodisp}} \quad \text{et} \quad M_{\text{tot}} = M_{\text{biodisp}} + M_{\text{non-biodisp}}$$

$$\text{soit} \quad M_{\text{tot}} = M_{\text{biodisp}} \times K \times \text{MES} + M_{\text{biodisp}}.$$

A l' EC_{50} , cette équation devient :

$$EC_{50} = M_{\text{biodisp} - EC_{50}} \times K \times \text{MES} + M_{\text{biodisp} - EC_{50}}$$

ce qui correspond à une relation affine entre l' EC_{50} et la concentration en MES de la suspension. On obtient effectivement expérimentalement des droites pour le cadmium, le cuivre, le nickel, et le zinc lorsque l'on représente graphiquement, pour un même biofilm, les EC_{50} en fonction des concentrations en MES des trois suspensions de biofilm (Figure 31).

La question de la biodisponibilité des métaux au cours des tests de toxicité est rarement abordée dans la littérature scientifique. Pourtant, des modifications de la spéciation des métaux au cours de l'exposition sont susceptibles d'intervenir et de modifier les résultats des tests, que l'on utilise des suspensions de biofilms ou des biofilms intègres, encore accrochés à leur support, comme c'est le cas par exemple pour des tests basés sur l'incorporation de thymidine marquée pour mesurer la production de biomasse bactérienne ou l'incorporation de carbonates marqués pour mesurer l'activité photosynthétique (par exemple Blanck *et al.* 2003). En effet, il est possible que la MOD ou encore d'autres composants abiotiques, par exemple des matières minérales, présents dans la matrice des biofilms, modifient la biodisponibilité des métaux au cours des tests. Il est en général difficile de mettre en évidence ces effets. Dans cette étude, où nous avons utilisé des suspensions de biofilm pour mesurer une activité enzymatique, nous avons pu mettre en évidence l'influence de la concentration de ces suspensions sur la biodisponibilité des métaux testés par des expériences de dilution. La question de la normalisation a déjà été abordée par Soldo & Behra (2000) dans leur étude sur du périphyton exposé au cuivre : les tests basés sur l'inhibition de l'activité photosynthétique sont aussi réalisés sur des suspensions de biofilm, et les résultats normalisés à la concentration en chlorophylle *a* des échantillons.

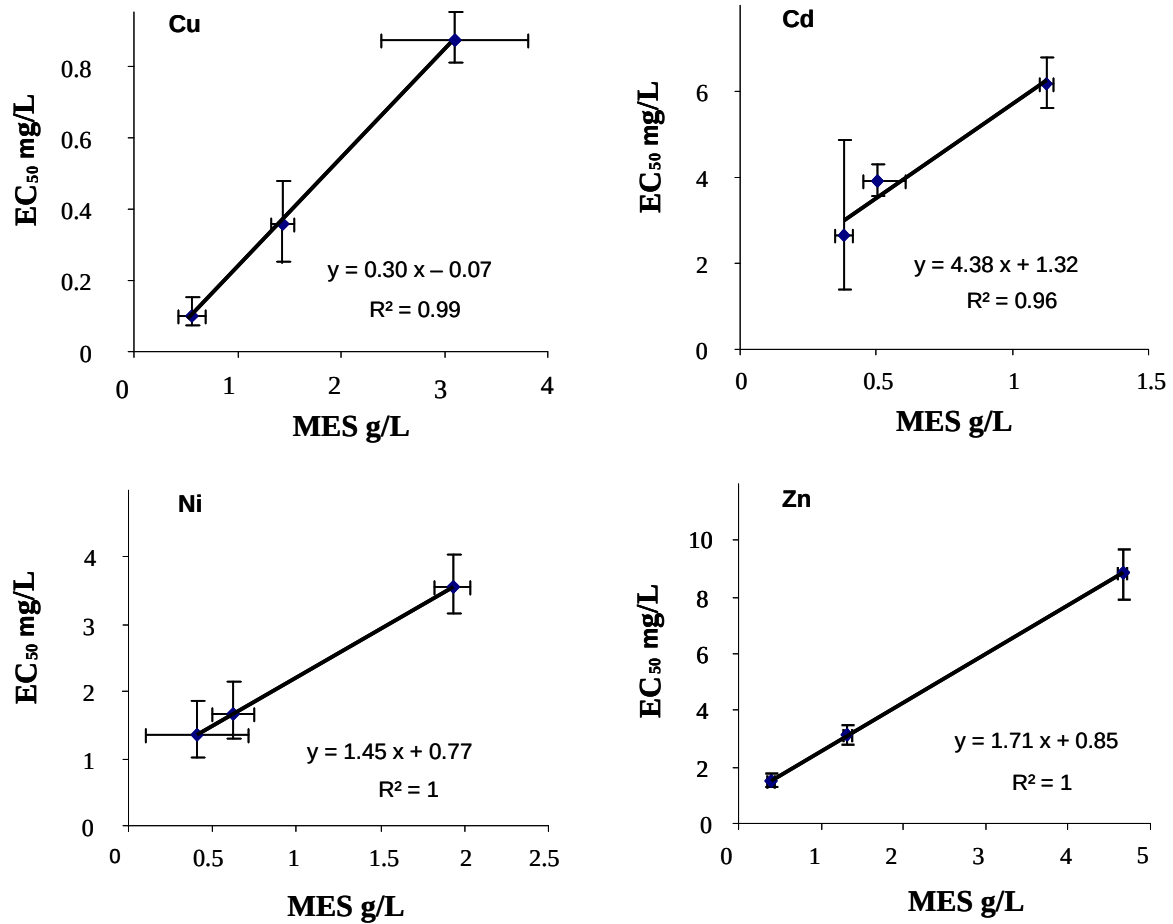


Figure 31 : Droites de régression obtenues à partir des niveaux de tolérance (EC_{50} exprimées en mg/L) pour le Cu, Cd, Ni et Zn en fonction des concentrations en MES (exprimées en g/L) des suspensions de biofilm utilisées pour les tests de toxicité. Pour chaque métal, les trois données correspondent à trois niveaux de tolérance mesurés sur trois dilutions d'une même suspension mère de biofilm. Les barres d'erreur représentent les écarts-types en abscisse et les intervalles de confiance à 95% en ordonnée.

Le modèle proposé ci-dessus est une description grossière de la spéciation des métaux dans la suspension de biofilm puisque, par exemple, le métal n'est pas seulement adsorbé sur les particules en suspension (MES) comme le décrit l'équilibre entre M_{biodis} et $M_{\text{non-biodisp}}$. La MOD peut aussi jouer un rôle protecteur vis-à-vis des organismes vivants en diminuant la biodisponibilité des métaux (Campbell 1995; Morel 1983), or elle n'est pas prise en compte dans la mesure de la concentration en MES. La concentration en MES est donc une estimation grossière de la quantité de matière organique et minérale comprise dans le biofilm, qui modifie la biodisponibilité des métaux vis-à-vis des organismes hétérotrophes.

4.3 Le cas du plomb

La normalisation par les MES permet bien d'obtenir une EC_{50} unique pour un biofilm, indépendamment de la concentration de la suspension de biofilm utilisée pour les tests, pour le cuivre, le cadmium, le nickel et le zinc. Dans le cas du plomb, la relation entre l' EC_{50} et la concentration du biofilm est moins claire (voir ci-dessous et Tableau 6).

En effet, il est plus difficile d'établir un lien entre toxicité du plomb et spéciation comme en témoignent certains exemples dans la littérature scientifique. La MOD peut avoir sur les organismes exposés au plomb un rôle protecteur ou non selon sa composition : par exemple Sánchez-Marín *et al.* (2010) observent une diminution ou une augmentation de la toxicité du plomb avec un biotest de croissance d'embryons d'oursins (*Paracentrotus lividus* : *embryo-larval bioassay*) en présence de différents échantillons de MO naturelles issues de sédiments. Dans le cadre de cette étude, il semble aussi que la biodisponibilité du plomb soit affectée de manière différente selon la composition du biofilm puisque dans un cas on observe bien un effet d'augmentation de la tolérance avec la concentration en MES caractérisant la concentration de la suspension de biofilm utilisée (Figure 32 à gauche) et dans un autre, il n'y a pas de relation nette entre la tolérance de la communauté au plomb et la concentration de la suspension de biofilm (Figure 32 à droite).

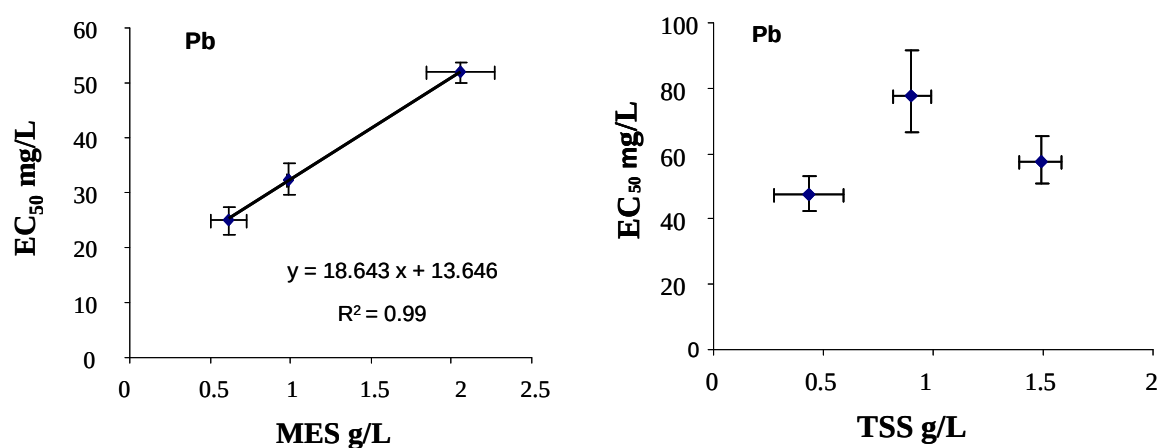


Figure 32 : EC_{50} (exprimées en mg/L) obtenues au cours d'expériences de dilutions sur deux biofilms prélevés à Saint-Maurice (le 01/07/08 à gauche et le 25/03/08 à droite) représentées en fonction des concentrations en MES des trois suspensions de biofilms utilisées dans chaque expérience.

Ces observations nous amènent à considérer avec plus de prudence la normalisation par les MES des EC_{50} calculées à partir du test de toxicité β -glucosidase dans le cas du plomb.

5. Paliers d'inhibition

Les premiers résultats de mesures d' EC_{50} sur des biofilms prélevés à Saint-Maurice montrent qu'il n'est pas toujours possible d'inhiber à 100% l'activité β -glucosidase au cours d'un test de toxicité (Figure 33).

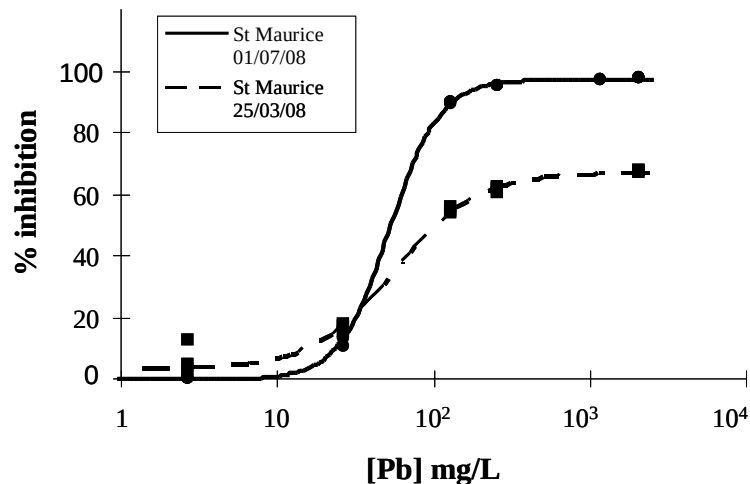


Figure 33 : Courbes dose/effet obtenues sur deux biofilms prélevés à Saint-Maurice et exposés au Pb (test de toxicité β -glucosidase).

Ce phénomène (apparition d'un palier d'inhibition) n'est pas lié à un métal particulier et apparaît aléatoirement au fil des saisons (Tableau 7). Les biofilms étant échantillonnés sur un site urbain impacté (Tusseau-Vuillemin *et al.* 2007), il est possible que l'apparition de ce palier d'inhibition fasse partie intégrante de la réponse biologique des micro-organismes exposés et adaptés à une pollution métallique.

Plusieurs hypothèses peuvent être proposées pour expliquer ce phénomène :

- le temps d'action du métal sur l'activité β -glucosidase est long et une durée d'exposition d'une heure n'est donc pas toujours suffisante pour inhiber totalement l'activité enzymatique. Cette hypothèse a été testée par un essai de variation des temps d'incubation : en effet, si tel était le cas, en augmentant le temps d'exposition au métal, on devrait voir diminuer, voire disparaître, le palier, ce qui n'est pas le cas, même en augmentant la durée d'exposition à 4h (4h étant une limite raisonnable pour un test de toxicité aiguë sur bactéries prélevées *in situ*) (Figure 34).

- une population résistante au métal est présente dans le biofilm et responsable d'un signal fluorescent même des concentrations d'exposition élevées en métal
- le biofilm contient un stock d'enzymes β -glucosidase responsable du palier observé. Il reste néanmoins peu probable que les enzymes de matrice soient à l'origine d'une activité résiduelle à fortes doses en métal, car les métaux inhibent aussi directement les enzymes (Geiger *et al.* 1998).

Métal	Date de prélèvement	% maximal d'inhibition et intervalle de confiance à 95%
Cu	06/11/06 ^a	97.73 (96.95-98.53)
	11/12/06 ^a	100 (87.81-100)
	09/01/08	92.25 (90.17-94.14)
	14/01/08	95.55 (91.63-99.64)
	18/02/08	83.64 (81.55-86.29)
	07/07/08	99.73 (99.08-100)
Cd	06/11/06 ^a	98.88 (96.45-100)
	14/01/08	86.04 (76.06-100)
	21/01/08	79.85 (75.05-85.20)
	28/01/08	86.55 (84.50-88.77)
	07/07/08	97.98 (96.61-99.60)
Ni	14/11/06 ^a	67.30 (50.56-100)
	28/11/06 ^a	67.15 (64.91-69.85)
	25/02/08	88.42 (88.42-88.42)
	31/03/08	68.21 (66.49-70.06)
	07/07/08	91.79 (90.90-92.62)
Zn	06/11/06 ^a	92.49 (86.38-100)
	18/03/08	90.89 (89.15-92.79)
	07/04/08	88.22 (86.32-89.84)
	07/07/08	98.15 (97.87-98.49)
Pb	14/11/06 ^a	89.93 (87.45-93.71)
	11/03/08	90.88 (88.13-93.87)
	25/03/08	66.83 (66.01-67.57)
	01/07/08	96.72 (95.90-97.39)

Tableau 7 : Pourcentages maximum d'inhibition et intervalles de confiance à 95% associés, calculés à l'aide de la macro Regtox sur des biofilms prélevés à Saint-Maurice et à Andrésey (a).

Il semble donc que l'apparition d'un palier d'inhibition soit liée à la présence d'organismes résistants ou à une composition particulière de la matrice du biofilm conférant une résistance à des micro-organismes ou à des enzymes stockées dans la matrice. Au vu de ces premiers résultats, on peut dire que la présence d'un palier d'inhibition fait probablement partie intégrante de la

réponse biologique observée, au même titre que l' EC_{50} . Une exposition de biofilms en conditions contrôlées pourra apporter des éléments de réponse sur l'apparition de ce palier.

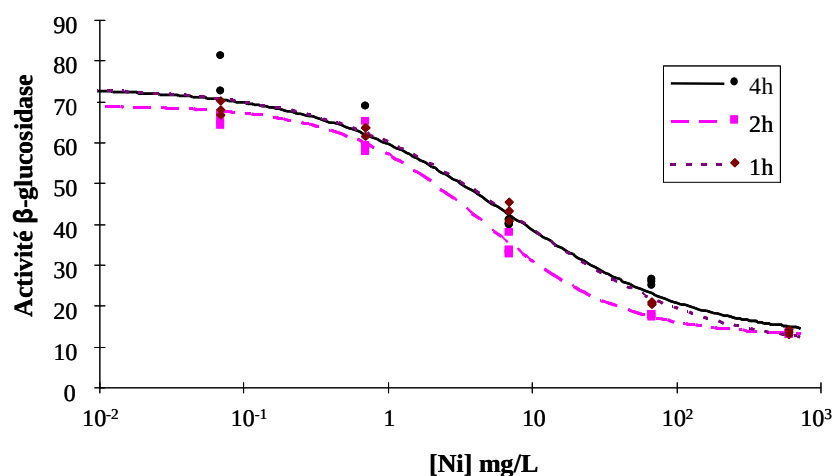


Figure 34 : Courbes dose/effet obtenues avec trois tests de toxicité au nickel sur un même biofilm avec des temps d'exposition au métal variant de 1 à 4 heures. L'activité β -glucosidase est ici exprimée en unités de fluorescence (gamme de calibration du MUF linéaire).

6. Conclusion sur l'utilisation du test β -glucosidase pour évaluer des niveaux de tolérance aux métaux

L'ensemble des résultats de mise au point méthodologique du test de toxicité β -glucosidase permet de conclure que ce test est approprié pour évaluer des niveaux de tolérance aux métaux (cadmium, cuivre, nickel, plomb et zinc) sur des biofilms. L'utilisation d'une EC_{50} normalisée permet de réduire la variabilité des niveaux de tolérance, variabilité que l'on peut relier à des phénomènes de modifications de la biodisponibilité des métaux au cours des tests de toxicité. Ainsi, l' EC_{50} normalisée constitue une mesure fiable et robuste de la tolérance. Parmi les différents métaux testés, seul le plomb apparaît comme un cas particulier, l'augmentation de la concentration en MES des suspensions de biofilm n'ayant pas toujours pour effet de réduire la toxicité du métal lors du test.

La mise au point méthodologique du test de toxicité β -glucosidase a fait l'objet d'une note technique (Adapting an enzymatic toxicity test to allow comparative evaluation of natural freshwater biofilms' tolerance to metals, Fechner L. C., Gourlay-

Francé C., Uher E., Tusseau-Vuillemin M.-H.), publiée dans *Ecotoxicology* en juin 2010 (annexe).

III. Développement du test de toxicité aiguë β -glucosidase mis en œuvre avec des contaminants hydrophobes

Le test de toxicité β -glucosidase, développé pour évaluer des niveaux de tolérance de biofilms exposés à des métaux, pourrait aussi permettre d'estimer la tolérance de ces communautés à d'autres types de contaminants. Les rivières en milieu urbain sont en effet impactées par une large gamme de contaminants organiques, parmi lesquels on peut citer des composés de synthèse d'usages variés comme les phtalates, les PCB ou encore des composés produits involontairement comme les dioxines ou les HAP. Il est aujourd'hui extrêmement difficile de quantifier l'ensemble des polluants organiques de par leur diversité mais aussi la faiblesse des concentrations atteintes dans les eaux de rivières.

1. *Utilisation des échantillonneurs passifs pour la contamination hydrophobe*

Les techniques d'échantillonnage passif offrent la possibilité d'obtenir une mesure intégrée de la contamination tout en s'affranchissant des difficultés liées aux prélèvements ponctuels, notamment la variabilité des niveaux de contamination, mais aussi, sur un plan pratique, la lourdeur des prélèvements, du fait des volumes d'eau nécessaires pour échantillonner des polluants organiques. Les SPMD (*Semi-Permeable Membrane Devices*), inventées par Huckins (1990) sont des tubes de membrane plastique (polyéthylène), contenant un solvant lipidique, la trioléine, qui, exposés à l'air, dans des sédiments ou en milieu aquatique, servent à accumuler les polluants organiques hydrophobes. Ces derniers, présents dans l'eau à très faibles concentrations, s'accumulent selon une cinétique spécifique des polluants considérés et du milieu d'exposition, à la fois dans la membrane et dans la trioléine ; ils peuvent ensuite être identifiés après dialyse des SPMD et analyse des composés présents dans le solvant d'extraction.

Les SPMD sont des dispositifs intégratifs d'échantillonnage des contaminants hydrophobes d'un milieu aquatique permettant d'analyser la contamination hydrophobe des cours d'eau. Elles permettent en effet d'obtenir un mélange de contaminants représentatif des micropolluants hydrophobes présents sur le site étudié ; il est aussi possible d'évaluer la toxicité de ce mélange. Les polluants organiques s'y accumulent à des doses suffisantes pour mettre en

œuvre un certain nombre de biotests. Ainsi, plusieurs équipes ont commencé à utiliser des extraits de SPMD pour réaliser des tests de toxicité ou de génotoxicité ; en général, il s'agit de tests standardisés, par exemple Microtox (Sabaliunas et al. (1999; 1998b; 2000; 1997), Cleveland et al. (1997), Johnson et al. (2004), Lebo et al. (2004), Rogers et al. (2005)) ou Mutatox (Sabaliunas et al. (2000), Cleveland et al. (1997), Johnson et al. (2004)). Dans certains cas, il est possible de mettre en évidence des phénomènes de synergie entre polluants hydrophobes accumulés dans les SPMD (Sabaliunas *et al.* 2000).

Cependant, dans le cadre de l'utilisation des extraits de SPMD pour réaliser des biotests, les protocoles d'utilisation des SPMD doivent être modifiés par rapport aux techniques de traitement utilisées pour faire une analyse chimique de la contamination hydrophobe des cours d'eau : en particulier, il est d'une part nécessaire que le test de toxicité puisse être réalisé à partir de petits volumes d'extraits de SPMD, c'est-à-dire soit sensible à des quantités de toxiques hydrophobes correspondant à ce que l'on peut espérer accumuler dans les SPMD utilisées, et d'autre part, les solvants organiques (solvant d'extraction et solvant intermédiaire permettant de dissoudre l'extrait de SPMD pour les biotests) doivent être compatibles avec le matériel biologique du test, c'est-à-dire non toxiques. Les proportions de solvant dans la solution finale varient suivant les tests mais restent en général proches de 1 % de solvant. Maron et al. (1981) ont testé la compatibilité de solvants organiques avec le test mutagène Salmonella et en ont retenu 12 dont le DMSO, l'acétonitrile, l'éthanol à 95%, l'acétone, l'éthylène glycol, le DMF, et le formamide. Ce sont ces solvants qui sont utilisés pour les biotests avec extraits de SPMD.

Enfin, les études de Sabaliunas et al. (1998a; 1999; 1998b; 2000) ont permis de mettre en évidence une toxicité liée à la trioléine contenue dans les SPMD : des acides oléiques provenant soit de l'hydrolyse de la trioléine des SPMD, soit de l'oléate de méthyle, qui constitue la majeure partie des 5% d'impuretés de la trioléine commerciale. Ainsi, dans la mesure où les membranes des SPMD accumulent aussi les polluants organiques – 25 à 50% de composés accumulés dans les SPMD sont en fait retenus dans les membranes et non dans la trioléine (Booij *et al.* 2002; Huckins *et al.* 1990), il est plus intéressant de travailler directement avec les membranes (plastique LDPE), et de s'affranchir, de la sorte, de toutes les difficultés liées à la toxicité de la trioléine ou de ses impuretés. En revanche, les cinétiques d'accumulation dans les membranes LDPE n'étant pas encore bien connues, elles ne peuvent pas encore, à l'heure actuelle, être utilisées pour quantifier l'ensemble de la contamination hydrophobe *in situ*.

2. Protocole des tests de toxicité avec extraits de membranes LDPE et extraits de cartouches SPE

Dans le cadre de ce travail, nous avons mis au point un protocole de mesure de la tolérance de communautés périphytiques avec des extraits de membranes LDPE. L'objectif est de pouvoir mesurer l'acquisition de tolérance du périphyton au mélange de micropolluants organiques hydrophobes spécifique du site d'exposition *in situ*, et prélevé, simultanément à l'exposition des communautés, par échantillonneur passif.

2.1 Support de colonisation des biofilms

Dans le cadre des essais de toxicité (test β -glucosidase) avec contaminants hydrophobes, des plaques de verre (10 cm $\times$ 30 cm, 2 mm d'épaisseur) ont été utilisées comme support de colonisation pour les biofilms. Les LDPE accumulant les contaminants hydrophobes, il est préférable d'utiliser un autre support de colonisation, inerte vis-à-vis de ces mêmes contaminants. En effet, le biofilm se développant sur des supports accumulant les hydrophobes du milieu est susceptible d'être adapté à ceux-ci et donc d'introduire un biais dans la détermination de la sensibilité du périphyton du site étudié vis-à-vis des polluants hydrophobes.

2.2 Exposition de LDPE *in situ* après purification des membranes

Pour l'échantillonnage des contaminants hydrophobes, des membranes LDPE (10 cm $\times$ 30 cm) ont été exposées *in situ* dans des conditions similaires à celles de la colonisation des biofilms (voir partie I de ce chapitre). Les membranes contiennent des substances organiques (plastifiants, résidus de synthèse, additifs, etc.) qu'il est nécessaire d'éliminer avant la phase d'exposition. Avant déploiement des dispositifs (cagette et membranes), les membranes ont donc été purifiées pendant 48h dans un bain d'hexane (environ 500 mL pour 30 membranes), puis séchées à l'air libre. La durée de la phase d'exposition a été fixée à environ 1 mois.

2.3 Extraction des contaminants au laboratoire

Pour l'extraction des contaminants, le matériel de laboratoire est exclusivement constitué de vaisselle en verre préalablement lavée et grillée à 500 °C pendant 2h.

Les membranes prélevées *in situ* sont d'abord brossées fermement avec une brosse à dents pour éliminer le biofilm, puis rincées à l'eau ultra-pure et séchées. La méthode d'extraction des membranes reprend celle développée par Catherine Lorgeoux (2008). Les membranes propres et sèches sont découpées puis extraites dans un mélange acétate d'éthyle:heptane 1:1 v:v dans des flacons en verre de 250 mL (jusqu'à trois membranes extraites par flacon) pendant 24h sur table d'agitation. Le solvant d'extraction est ensuite renouvelé et l'extraction se poursuit pendant 24 h. Les deux fractions sont rassemblées dans un ballon-cœur, et évaporées sur évaporateur rotatif, à 50°C, sous vide. Lorsque le volume a été réduit à environ 500 μ L, le résidu est transféré dans un vial puis évaporé à sec sous flux d'azote, à température ambiante. Enfin, l'extrait est repris dans un petit volume d'acétone (250 μ L sont nécessaires pour pouvoir exposer les biofilms à une gamme de dilution de l'extrait). Les extraits sont conservés à -20°C, à l'abri de la lumière.

Ce protocole a aussi été appliqué à une membrane non exposée sur le terrain. L'extrait "blanc" obtenu a servi à tester un éventuel effet toxique causé par les membranes elles-mêmes.

2.4 Choix du solvant de reprise

La toxicité de quatre solvants (DMSO, acétonitrile, acétone, éthanol) susceptibles d'être utilisés pour la reprise des contaminants hydrophobes extraits des membranes LDPE a été testée sur des biofilms prélevés *in situ* (site de Saint-Maurice). Pour chaque solvant, trois concentrations ont été testées (1, 2 et 5% du volume final). Le protocole d'exposition est similaire au protocole d'exposition aux métaux (voir partie II de ce chapitre). Les effets de l'ajout de solvant sont évalués par comparaison à un biofilm non exposé (ajout de 1, 2 et 5 % d'eau ultrapure).

Les essais de toxicité de solvants sur l'activité β -glucosidase ont permis de choisir l'acétone, ajoutée aux échantillons de biofilm à raison de 1% en volume.

2.5 Test de toxicité β -glucosidase avec extraits de membranes LDPE

Le protocole du test de toxicité avec extrait de membrane LDPE est similaire au protocole décrit ci-dessus pour les métaux. Une gamme de concentrations en extrait est réalisée par dilution dans le solvant choisi à partir de l'extrait : 100, 70, 60, 50, 35, 25 et 0 % de l'extrait initial. Les contaminants sont ajoutés à hauteur de 1%. Deux durées d'exposition (1 et 2 heures) ont été testées.

3. Inhibition de l'activité β -glucosidase par les contaminants hydrophobes

La mise au point des protocoles d'extraction a été réalisée sur une membrane LDPE exposée pendant une année dans la Marne à Saint-Maurice. Pour cet extrait, une toxicité a pu être mise en évidence par le test β -glucosidase, après une heure d'exposition à une gamme de concentrations de l'extrait, avec une inhibition maximale proche de 80% (Figure 35).

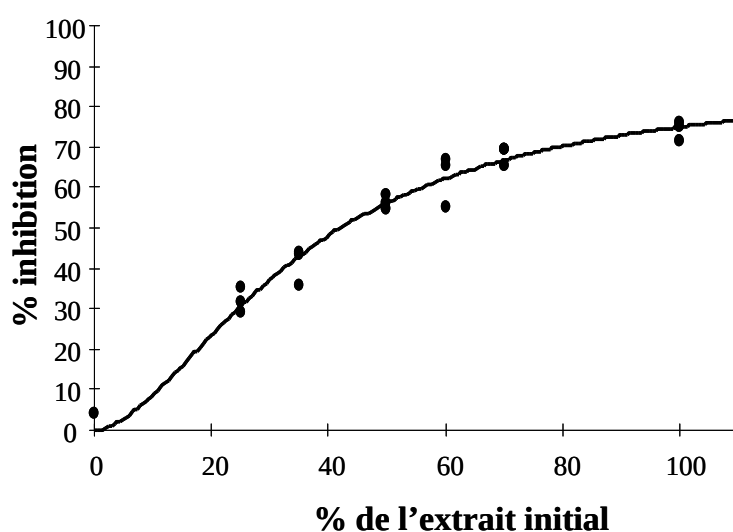


Figure 35 : Courbe dose/effet obtenue avec le test β -glucosidase sur biofilm de Saint-Maurice exposé à une gamme de concentrations d'un extrait de membrane LDPE prélevée en avril 2009.

Par ailleurs, aucune toxicité n'a été détectée à partir d'un extrait de membrane non exposée, ce qui laisse penser que la toxicité observée provient bien de composés accumulés dans la membrane au cours de son immersion dans la rivière. Cependant, la durée d'exposition de la membrane testée n'étant pas très réaliste, d'autres essais ont été effectués à partir de membranes exposées sur des durées d'environ un mois. Les différents essais ont permis de tester la toxicité de membranes exposées sur des sites variés comme Saint-Maurice mais aussi Marnay-sur-Seine (10) sur la Seine à environ 200 km en amont de Paris, Bougival (78) sur la Seine en aval de Paris ainsi que Triel (78) sur la Seine en aval de la station d'épuration Seine Aval. La toxicité des extraits a été testée sur les biofilms provenant de ces mêmes sites. Aucun effet inhibiteur de l'activité β -glucosidase n'a pu être observé, même en concentrant les extraits et en diluant les suspensions de biofilm, voire en augmentant la durée d'exposition du test à deux heures (Tableau 8).

Lieu d'exposition	Temps d'exposition	Nombre de membranes	Volume de reprise	Biofilms testés	Résultat
St Maurice	27 jours	1	250 μ L	St Maurice	X
St Maurice	27 jours	2	250 μ L	St Maurice	X
St Maurice	55 jours	5	250 μ L	St Maurice	X
				Bassin CEMAGREF	X
Marnay-sur-Seine	31 jours	3	250 μ L	St Maurice	XX
			50 μ L	Marnay-sur-Seine	X
				Triel-sur-Seine	X
Triel-sur-Seine	31 jours	3	250 μ L	St Maurice	XX
			50 μ L	Marnay-sur-Seine	X
				Triel-sur-Seine	Inhibition $\approx 20\%$
Bougival	31 jours	3	250 μ L	St Maurice	XX
		3	50 μ L	St Maurice (0,11 mg.mL ⁻¹)	X
				St Maurice (0,05 mg.mL ⁻¹)	X
				St Maurice (0,02 mg.mL ⁻¹)	X

Tableau 8 : Récapitulatif des essais de toxicité à partir d'extraits de membranes LDPE. X : pas d'effet inhibiteur observé après 1h d'exposition, XX : pas d'effet inhibiteur observé après 1h ni 2h d'exposition. Lorsque ce n'est pas précisé, la concentration en MES des suspensions de biofilm utilisées pour les tests est de l'ordre de 1 mg/L.

Ces différents essais de toxicité montrent que le test de toxicité aiguë β -glucosidase n'est probablement pas adapté pour obtenir des niveaux de tolérance de biofilms exposés à des contaminants hydrophobes. Des essais précédents, non détaillés ici, avaient aussi montré une absence d'effet inhibiteur sur l'activité β -glucosidase du BaP seul (Fechner 2007). La toxicité mise en évidence sur une membrane exposée pendant une durée très longue (1 an) laisse penser que la présence de composés plus hydrophobes, qui s'accumulent plus lentement dans les membranes LDPE et seraient donc présents en quantité beaucoup plus faibles pour des durées d'exposition *in situ* plus réalistes (de l'ordre d'un mois), pourraient être responsables de la toxicité observée.

Par ailleurs, la toxicité d'extraits de cartouche d'extraction sur phase solide (SPE) sur l'activité β -glucosidase de biofilms a aussi été testée. Les cartouches utilisées, recommandées pour l'extraction des pesticides dans les eaux de rivière, permettent de recueillir des contaminants organiques moins hydrophobes que ceux accumulés par les membranes LDPE. Les essais de toxicité sur biofilms ont montré un léger effet inhibiteur sur l'activité β -glucosidase (voir annexe). Ces essais de toxicité à partir de contaminants organiques n'ont pas été poursuivis dans le cadre

de cette étude, au cours de laquelle nous avons choisi d'approfondir l'approche PICT sur les métaux uniquement.

Ce travail a fait l'objet d'un stage de fin d'études (Versace 2009).

IV. Développement méthodologique du test de toxicité aiguë photosynthétique

Le test d'inhibition de l'activité photosynthétique choisi est basé sur la méthode "des bouteilles claires et des bouteilles sombres" ou *light and dark bottle method*, initialement développée pour évaluer l'activité photosynthétique du phytoplancton (Wetzel & Likens 1991). Cette méthode consiste à mesurer d'une part la production brute d'oxygène par les algues au cours d'une exposition à la lumière dans des flacons hermétiques (différences entre la concentration initiale "i" et la concentration finale "f"), d'autre part la déplétion en oxygène due à la respiration des organismes vivants dans les mêmes flacons exposés, pendant une durée équivalente, à l'obscurité. Les mesures de production d'oxygène brute et de respiration permettent de calculer la production d'oxygène nette, qui correspond à la production d'oxygène par les autotrophes (activité photosynthétique), selon les équations suivantes :

$$PO_2 \text{ brute} = [O_2]f - [O_2]i \text{ (bouteilles claires ou } \textit{light bottles})$$

$$Resp = [O_2]f - [O_2]i \text{ (bouteilles sombres ou } \textit{dark bottles})$$

$$PO_2 \text{ nette} = PO_2 \text{ brute} - Resp \text{ (si } PO_2 \text{ brute} > 0)$$

$$\text{ou } |Resp| - |PO_2 \text{ brute}| \text{ (sinon).}$$

On fait donc l'hypothèse que la respiration est équivalente dans les bouteilles claires et sombres. Ce test d'activité photosynthétique devrait permettre de compléter les mesures de tolérance obtenues sur la composante hétérotrophe avec le test β -glucosidase, par des mesures de tolérance de la composante autotrophe (EC_{50} calculée sur la PO_2 nette) et de l'ensemble des micro-organismes (EC_{50} calculée sur la respiration). Par ailleurs, le test constitue une alternative intéressante aux tests d'inhibition de l'activité photosynthétique plus classiques nécessitant l'utilisation de réactifs radioactifs (carbonates marqués au ^{13}C).

1. Mise au point du protocole de mesure de l'activité photosynthétique de biofilms naturels

La PO_2 nette et la respiration peuvent être mesurées à partir de suspensions de biofilms introduites dans des flacons DBO (hermétiques), que l'on prend soin de faire "déborder" avant

fermeture, pour éviter d'emprisonner des bulles d'air. Le protocole du test de toxicité par la méthode *light and dark* est le suivant :

- remplissage de flacons DBO de suspension de biofilm (20 mL par flacon) contaminée selon une gamme de six concentrations en métal en triplicats pour chaque phase (claire et sombre) et mesure de la concentration initiale en $[O_2]$ dissous sous agitation magnétique
- exposition simultanée à la lumière (bouteilles claires) ou à l'obscurité (bouteilles sombres), à 20 °C, sous agitation (table d'agitation rotative)
- mesures finales de $[O_2]$ dissous sous agitation magnétique

L'électrode utilisée (Unisense, Aarhus, Danemark) pour mesurer la concentration en O_2 dans les suspensions de biofilms est une électrode de type Clark, sélectionnée pour son bout fin (500 μm), adapté à l'utilisation de vaisselle de petite taille (flacons DBO de 20 mL), et sa grande rapidité de mesure (option "fast", électrode plus rapide qu'un modèle standard mais consommant plus d' O_2 donc nécessitant une bonne agitation du milieu pendant la mesure). La réponse de l'électrode est effectivement rapide ; elle se stabilise dans les flacons DBO contenant les suspensions de biofilms au bout d'une dizaine de secondes en conditions normales, ce qui est suffisant pour pouvoir mesurer la concentration en O_2 dissous dans les suspensions de biofilms avant que celles-ci puissent s'équilibrer avec l'atmosphère.

Dans un premier temps, des développements méthodologiques sur des suspensions de biofilms prélevés à Saint-Maurice ont permis de déterminer une durée d'incubation de deux heures (exposition au contaminant lors du test de toxicité mais aussi à la lumière pour les bouteilles claires et à l'obscurité pour les bouteilles sombres) ainsi qu'une concentration optimale de la suspension de biofilm utilisée pour le test (environ 1 mg/L). Par ailleurs, différents modes d'agitation des suspensions de biofilms au cours de l'exposition dans les flacons ont permis de déterminer un mode d'agitation douce (sur table d'agitation rotative) optimal pour effectuer des mesures de photosynthèse (voir annexe pour le détail de ces mises au point méthodologiques).

2. Tests de toxicité

Des tests de toxicité avec les métaux (cadmium, cuivre, nickel, plomb et zinc) ont pu être mis en œuvre avec le test de toxicité aiguë ainsi développé. Cependant, l'exploitation des résultats obtenus est difficile. En effet, les mesures de respiration comportent des valeurs aberrantes (respiration positives) qu'il est difficile d'interpréter puisque cela signifie qu'il y a

production d' O_2 dans les bouteilles sombres (non éclairées). Dans certains cas, il n'est d'ailleurs pas possible de calculer une EC_{50} sur la respiration (Figure 36). Ce phénomène est difficile à expliquer et pourrait être lié à un certain nombre de variations physico-chimiques dans les flacons au cours de l'incubation, (il ne s'agit pas d'une variation de pH, car cette hypothèse a été réfutée par un test complémentaire). Par ailleurs, l'hypothèse du test selon laquelle la respiration est la même dans les bouteilles claires et sombres n'est peut-être pas vérifiée.

Ce type de difficulté (production d'oxygène dans les bouteilles non éclairées) a été déjà été souligné dans la littérature scientifique, l'hypothèse selon laquelle les variations de niveaux d'oxygène dans des flacons hermétiques remplis de phytoplancton (ou de suspensions de biofilm) sont uniquement causées par des processus photosynthétiques et respiratoires n'étant pas forcément toujours valable : en particulier la présence d' H_2O_2 et de catalase peut conduire à une production d' O_2 dans des bouteilles non éclairées (Pamatmat 1997).

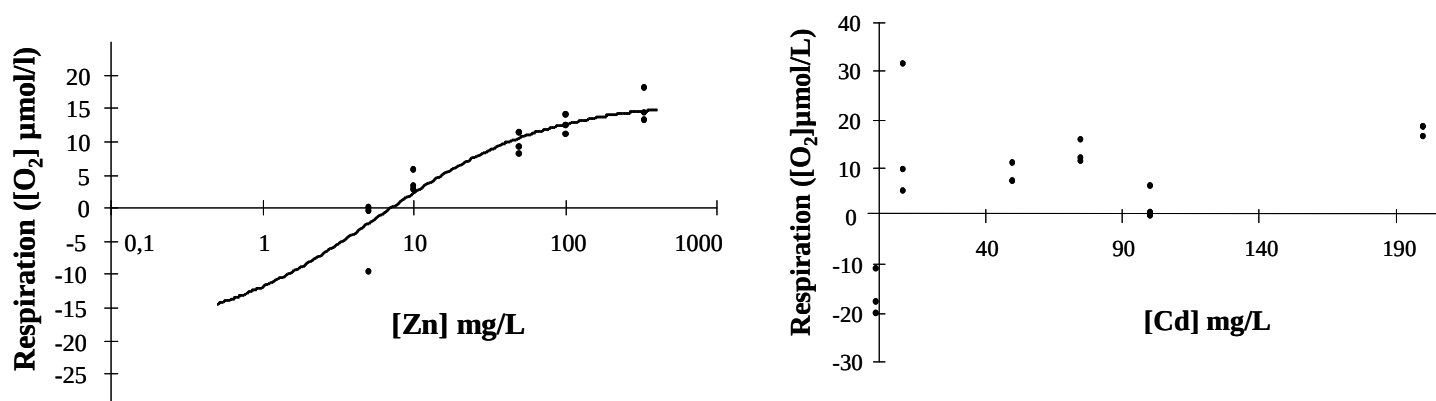


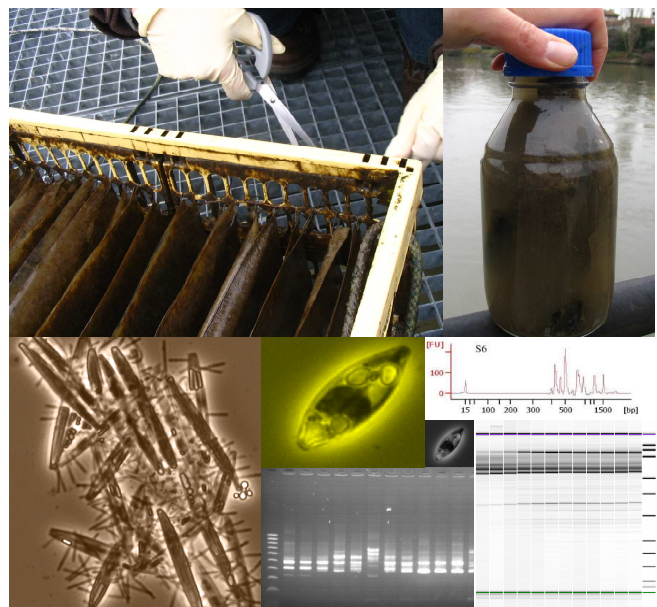
Figure 36 : *Respiration (exprimée en $\mu\text{mol } O_2/\text{L}$) mesurée au cours de tests de toxicité avec le zinc et le cadmium sur biofilms prélevés à St Maurice. On peut ajuster une courbe dose/effet sur les données pour le test avec le zinc mais pas pour le test avec le cadmium. Dans les deux cas on observe un changement de signe de la respiration au cours de test (il y a production d' O_2 dans les flacons sombres).*

En conclusion, la méthode des bouteilles sombres et claires est difficile à utiliser pour évaluer la tolérance aux métaux de biofilms. D'une part, la méthode, bien qu'optimisée avec une électrode rapide et une vaisselle miniaturisée, est lourde à mettre en œuvre, notamment du fait du nombre d'échantillons et du volume de biofilm nécessaire pour réaliser un test (>1 L de suspension). Par ailleurs, il est difficile d'obtenir des mesures de la concentration en O_2 dissous dans une solution complexe comme une suspension de biofilm, notamment du fait de la fragilité de l'électrode et de son encrassement rapide. En plus des difficultés pratiques, les résultats obtenus avec cinq métaux montrent qu'il est difficile d'interpréter les données en termes d'inhibition de la respiration et donc de la photosynthèse (puisque la mesure de la PO_2 nette découle du calcul de la respiration).

Ce travail a fait l'objet d'un stage de M1 (Muffang 2008).

Dans la suite de ce travail, seul le test β -glucosidase a été utilisé pour évaluer les niveaux de tolérance du périphyton exposé à des métaux urbains.

Chapitre 3. Utilisation de la technique ARISA : mise en évidence de changements de structure dans les biofilms



Dans le cadre de ce travail, les changements de structure des populations bactériennes et eucaryotes des biofilms ont été étudiés par le biais d'une technique d'empreinte génétique : l'ARISA. Dans ce chapitre, nous détaillerons les différents développements méthodologiques associés à l'utilisation de cette technique pour obtenir le profil génétique des populations bactériennes mais aussi eucaryotes de communautés périphytiques naturelles. Enfin, nous donnerons un exemple d'application sur des échantillons de biofilms prélevés sur le site de Saint-Maurice au cours de l'année 2008.

I. Utilisation de l'ARISA Bactérie sur les biofilms

1. Mises au point méthodologiques et protocoles

Différentes mises au point méthodologiques ont permis de définir un protocole adapté aux échantillons de biofilms.

1.1 Cryoconservation des échantillons

La congélation et conservation des échantillons est une étape importante et parfois délicate pouvant endommager les acides nucléiques des cellules et donc modifier les résultats obtenus par les techniques d'empreinte génétique. Nous avons donc testé l'influence de l'utilisation de deux cryoprotecteurs – le DMSO et le glycérol qui sont les cryoprotecteurs les plus utilisés pour la cryoconservation des microorganismes (Hubálek 2003) – sur des échantillons de biofilms prélevés sur le site de Saint-Maurice. Les profils ARISA obtenus ne présentant pas de différences significatives liées à l'usage d'un cryoprotecteur (annexe), dans la suite de cette étude, les échantillons ont été directement congelés (sans ajout de cryoprotecteur) à -80 °C après centrifugation (15 minutes, 10 000 g, 4 °C ; le surnageant est jeté avant congélation).

1.2 Extraction de l'ADN

Pour l'extraction des acides nucléiques des échantillons de biofilm, le kit commercial Mobio PowerSoil DNA Isolation Kit (MOBIO Laboratories, Inc), commercialisé pour extraire l'ADN de communautés bactériennes du sol, a été utilisé. Ce kit est spécialement adapté aux

échantillons environnementaux complexes, notamment ceux contenant des acides humiques, ce qui peut être le cas des échantillons de périphyton. Nous n'avons pas cherché à tester d'autres kits. Cependant les quantités d'ADN extraites (dosage par fluorimétrie après chaque extraction sur Qubit fluorometer, Quant-iT DNA Assay Kit, Invitrogen) sont satisfaisantes puisqu'on obtient toujours des concentrations d'ADN de l'ordre de 1 à 90 µg/mL, ce qui est très largement suffisant pour pouvoir lancer une réaction de PCR puis une ARISA.

1.3 Amplification des intergènes par PCR

Les amorces utilisées pour la PCR bactérie sont celles décrites par Cardinale et al. (2004) et Jones et al. (2007) :

- ITSF : 5'-GTCGTAACAAGGTAGCCGTA-3'
- ITSReub : 5'-GCCAAGGCATCCACC-3'.

Les conditions de PCR ont été établies à partir de données bibliographiques sur l'ARISA et après quelques essais de mise au point sur des échantillons de biofilms de Saint-Maurice. Le protocole d'amplification est le suivant :

- mix PCR : 200 µM de chaque dNTP, 1X de Thermo Star buffer, 1.5 mM MgCl₂, 0.5 µM d'amorces, 0.5 mg/mL, 1.25 U de Taq polymerase par échantillon
- programme de PCR (thermocycleur) : 94 °C, 3 minutes, 35 cycles (94 °C, 1 minute, 56 °C, 1 minute, 72 °C, 2 minutes), puis 72 °C, 10 minutes, et redescente à 4°C.

On vérifie ensuite si l'amplification s'est correctement déroulée par migration des échantillons sur un gel d'agarose à 1.5%, marquage au bromure d'éthidium (BET) et visualisation aux UV (Gel-Doc XR System, Bio-Rad, RU).

1.4 ARISA Bactérie

Les échantillons amplifiés sont ensuite utilisés pour l'ARISA qui est mise en œuvre sur un bioanalyseur (2100 Electrophoresis Bioanalyzer, Agilent Technologies, Santa Clara, US) avec un kit Agilent DNA 1000 (Agilent Technologies, Santa Clara, US), selon les recommandations du fabricant. Le système repose sur le principe de migration par électrophorèse (les amplicons sont séparés au cours de la migration suivant leur taille), avec une électrophorèse capillaire. Les échantillons sont traités par douzaines (douze échantillons par « puce »). Pour chaque douzaine d'échantillon (une puce ou un *assay*), un marqueur de taille contenant des fragments d'ADN de tailles connues (de 15 à 1500 bp) est d'abord migré pour obtenir une courbe de calibration reliant

le temps de migration à la taille du fragment. Les échantillons sont ensuite migrés un par un. Des marqueurs de fluorescence s'intercalent avec les amplicons qui sont donc détectés par fluorescence. Enfin, deux marqueurs de taille supplémentaires (15 et 1500 bp) sont co-migrés avec chaque échantillon pour corriger les décalages inter-échantillons (le logiciel aligne systématiquement ces deux marqueurs de taille pour tous les échantillons d'une même puce). Les profils ARISA sont obtenus sous forme d'électrophorégrammes dans le logiciel 2100 Expert (Agilent Technologies, Santa Clara, US). Ils peuvent être exportés sous format texte (ASCII) dans R puis traités avec le programme StatFingerprints (Michelland *et al.* 2009). Ce programme permet de corriger les erreurs d'alignement entre profils (notamment les profils correspondant à des échantillons migrés à partir de puces différentes) et de normaliser les aires sous chaque électrophorégramme.

2. Modifications saisonnières des populations bactériennes de biofilms prélevés à Saint-Maurice en 2008

L'évolution des profils ARISA Bactérie des échantillons de biofilms prélevés à Saint-Maurice entre janvier et juillet 2008 (voir Tableau 4) a été analysée par ACP dans StatFingerprints.

Echantillon	Date de prélèvement
S1	9 Jan. 08
S2	14 Jan. 08
S3	21 Jan. 08
S4	18 Fev. 08
S5	25 Fev. 08
S6	11 Mar. 08
S7	18 Mar. 08
S8	25 Mar. 08
S9	31 Mar. 08
S10	07 Avr. 08
S11	17 Avr. 08
S12	03 Juin 08
S13	17 Juin 08
S14	01 Juil. 08

Tableau 9 : Noms des échantillons prélevés à Saint-Maurice et dates de prélèvement correspondantes.

Cette ACP est calculée sur une matrice contenant les échantillons (en ligne) et leurs profils ARISA, (alignés et normalisés), codés en intensités de fluorescence en fonction de la taille des fragments en bp (variant entre 0 et 1500 bp) : chaque colonne de la matrice correspond à une taille de fragments (en bp), et pour chaque échantillon, la matrice contient les valeurs de fluorescence correspondant à l'électrophorégramme (après corrections pour alignement et normalisation). L'analyse ne fait donc pas intervenir les variables du milieu de prélèvement. Elle permet de visualiser graphiquement les similitudes et différences entre profils : les profils similaires sont proches sur le plan factoriel, et inversement, les profils dissimilaires sont éloignés sur le plan factoriel. Les noms des échantillons utilisés pour plus de lisibilité, et les dates de prélèvement correspondantes, figurent dans le Tableau 9.

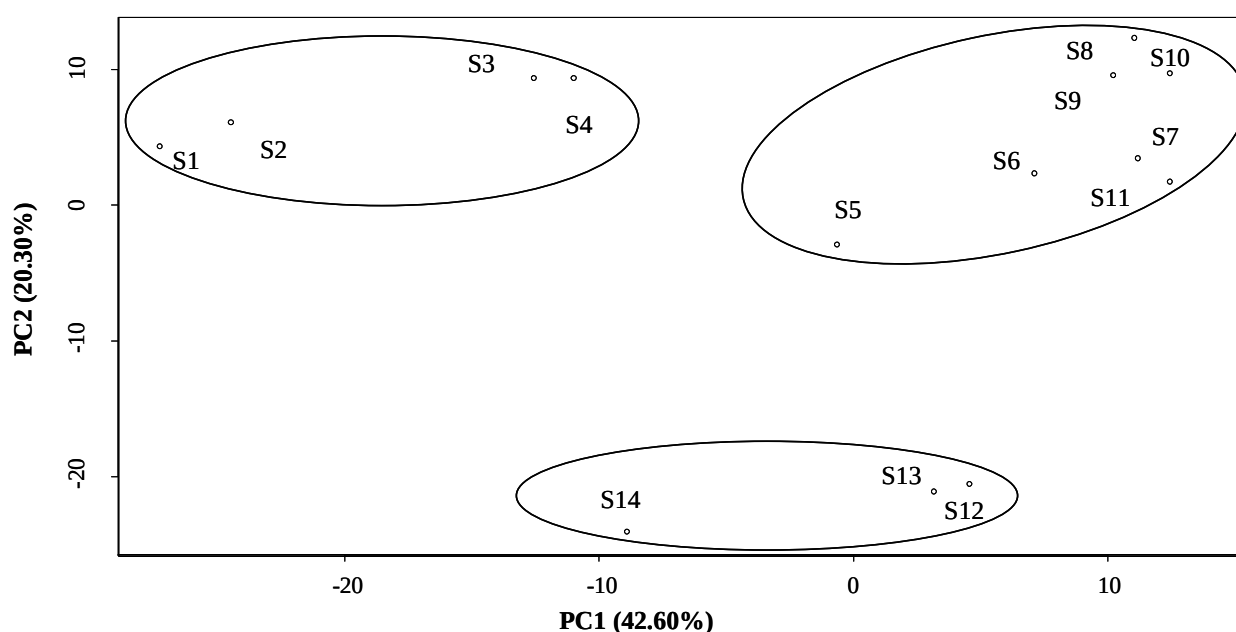


Figure 37 : Projection des échantillons sur le plan factoriel constitué par les deux premières composantes principales obtenues par ACP à partir des profils ARISA bactérie sur des échantillons de biofilms de Saint-Maurice.

Malgré l'absence de standardisation des conditions de prélèvement, notamment des durées de colonisation des biofilms, l'ACP (Figure 37) révèle des variations saisonnières des populations bactériennes des biofilms prélevés à Saint-Maurice. En effet, les biofilms sont structurés en trois groupes selon les saisons : S1 à S4 (de janvier à février), puis S5 à S11 (février à avril) et enfin S12 à S14 (avril à juillet). Ces variations correspondent probablement à des variations de température, auxquelles les communautés bactériennes sont très sensibles (Brummer *et al.* 2003; Lear *et al.* 2008).

En conclusion, la technique ARISA Bactérie permet bien de mettre en lumière des variations de populations bactériennes au sein des biofilms. Elle constitue donc un outil intéressant, notamment de par sa rapidité de mise en œuvre, pour étudier des changements de

structure des biofilms sous l'effet d'une perturbation. Il est donc particulièrement utile de développer l'usage de cette technique pour observer des variations de populations périphytiques eucaryotes, et obtenir ainsi une vision plus globale des changements de structure des biofilms (par exemple sous l'effet d'une perturbation).

II. Développements méthodologiques liés à l'utilisation de l'ARISA Eucaryote sur les biofilms

En l'absence de couples d'amorces disponibles pour amplifier la région ITS1-5.8S-ITS2 des eucaryotes périphytiques, et plus spécifiquement des diatomées dans leur ensemble, nous avons cherché à concevoir un nouveau couple d'amorces pour PCR. Nous avons en parallèle testé l'usage d'un couple d'amorce utilisé dans la littérature scientifique pour la technique ARISA appliquée à des communautés fongiques des sols (Ranjard et al. 2001). Par la suite, nous appellerons ces couples "diat" (ARAlg18S/ITS4) et "euk" (2234C/312T) respectivement.

1. Conception d'un couple d'amorces ciblant la région ITS1-5.8S-ITS2 chez les diatomées des biofilms

Nous avons procédé par alignements de séquences de 18S et de 28S d'algues périphytiques référencées dans la littérature scientifique (Blanck *et al.* 2003; Gold *et al.* 2002; Guasch *et al.* 2002; Morin *et al.* 2008a; Soldo & Behra 2000; Watanabe 1985) et disponibles dans la base de nucléotides du NCBI (alignements réalisés à partir de la plateforme T-coffee (Poirot *et al.* 2003)). L'alignement a permis de déterminer une nouvelle amorce *forward* (ARAlg18S) en position 3' du gène 18S (Figure 38).

En revanche, il n'a pas été possible de déterminer une séquence consensus en position 5' des séquences de 28S alignées. Une amorce *reverse* (ITS4, White *et al.* 1990), utilisée dans la littérature pour amplifier la région ITS1-5.8S-ITS2 d'espèces fongiques a donc été utilisée pour compléter le nouveau couple d'amorces.

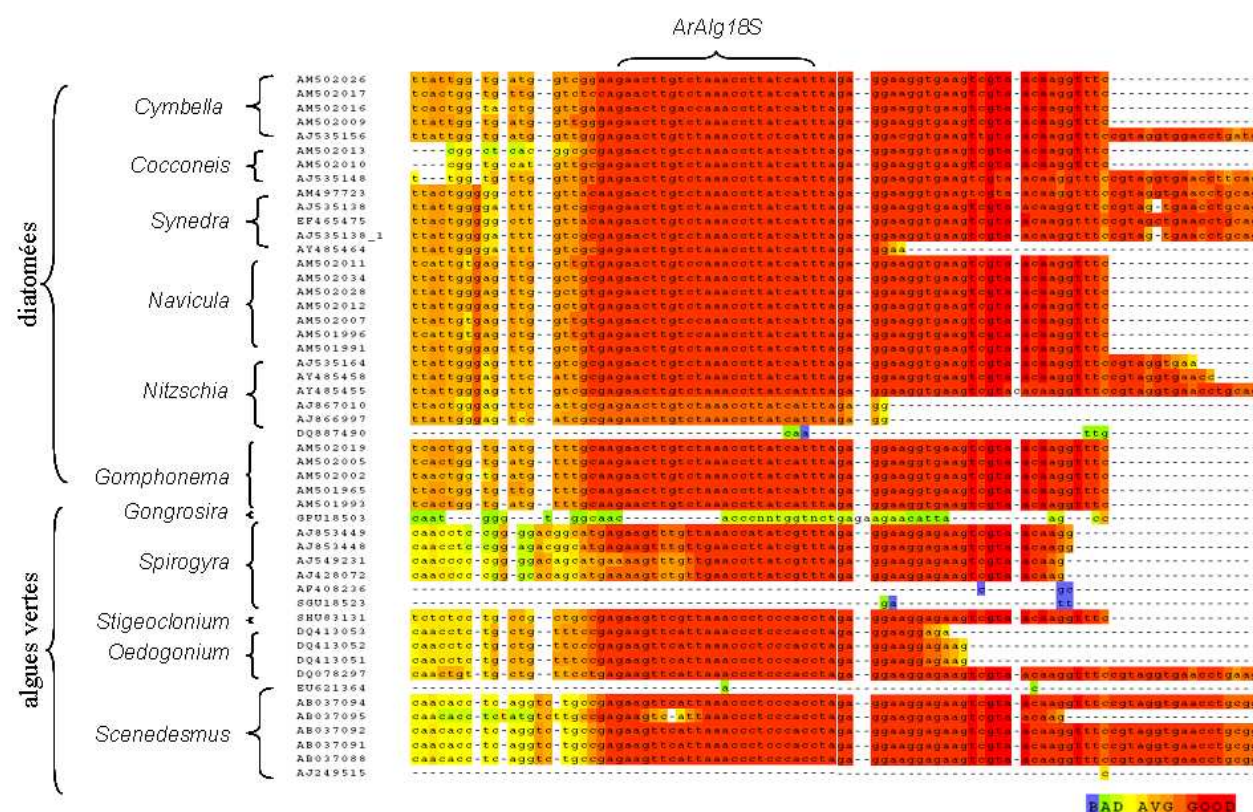


Figure 38 : Dernière partie de l'alignement de séquences de 18S d'algues périphytiques dans laquelle l'amorce ARA18S a été sélectionnée

2. Mises au point méthodologiques et protocoles

Les protocoles de conservation et d'extraction d'ADN puis d'obtention des profils ARISA sont les mêmes que ceux détaillés pour le cas des populations bactériennes. Pour obtenir des profils ARISA eucaryotes, seule l'étape de PCR a donc nécessité une mise au point.

Les conditions de PCR ont été établies à partir de données bibliographiques sur l'ARISA (en ce qui concerne l'utilisation du couples d'amorce "euk"), et après quelques essais de mise au point sur des échantillons de biofilms de Saint-Maurice. Le protocole de PCR pour les couples euk/diat est le suivant :

- mix PCR : 200µM de chaque dNTP, 1X de Thermo Star buffer, 1.5 mM MgCl₂, 0.5 µM d'amorces, 0.5 mg/mL, 2 U de Taq polymérase par échantillon
- programme de PCR : 94 °C, 3 minutes, 35 cycles (94 °C, 1 minute, 56.8 °C, 1 minute, 72 °C, 2 minutes), puis 72 °C, 10 minutes, et redescende à 4°C.

Les deux couples d'amorces ont d'abord été testés sur des souches d'algues (INRA, UMR CARRTEL) appartenant aux classes algales communément trouvées en eau douce : une Chlorophyceae (TCC-144-1, *Scenedesmus quadricauda*), une Trebouxiophyceae (TCC148-1, *Chlorella vulgaris*), une Bacillariophyceae (TCC107, *Navicula accomoda*, TCC139-1, *Nitzschia palea*) et une Synurophyceae (TCC167, *Synura petersenii*). Cette expérience préliminaire a montré que le couple euk amplifie une large variété d'algues de classes différentes, tandis que le couple diat semble plus adapté à l'amplification de diatomées.

Ces résultats ont été ensuite confirmés par analyse de la couverture théorique des différentes amorces sur des bases de données SSU (séquences 18S) pour ARAlg18S et 2234C et LSU (28S) pour ITS4 et 3126T (Silva comprehensive SSU and LSU RNA databases : SSU Ref 102 and LSU Ref 102, Pruesse *et al.* 2007). Les alignements des amorces sur ces bases de données ont été réalisés en utilisant la fonction ProbeMatch dans le logiciel ARB (Ludwig *et al.* 2004). Pour évaluer le pourcentage de séquences ciblées par les amorces sur certains groupes eucaryotes, les séquences incomplètes dans les zones correspondant aux amorces ont été manuellement retirées des bases de données. Les pourcentages ainsi obtenus figurent dans le Tableau 10. On remarque que l'amorce *forward* ARAlg18S est effectivement très spécifique des diatomées, alors que l'amorce 2234C permet d'amplifier aussi bien des diatomées, que des Fungi, algues vertes ou autres organismes eucaryotes. Les deux amorces *reverse* ciblent une très grande majorité des Fungi, aucune diatomée¹⁷ et diffèrent entre elles par les proportions d'autres espèces eucaryotes amplifiées (par exemple une quantité non négligeable d'algues vertes pour ITS4 mais beaucoup moins pour 3126T).

Amorce	Fungi	Bacillariophyta (diatomées)	Stramenopiles (dont diatomées)	Viridiplantae (dont algues vertes)
ARAlg18S	0,00%	47,69%	18,33%	0,00%
2234C	67,44%	82,08%	83,04%	78,84%
ITS4	83,02%	0,00%	1,82%	47,82%
3126T	86,47%	0,00%	16,67%	3,04%

Tableau 10 : Pourcentages de séquences ciblées par les amorces de PCR utilisées pour l'ARISA eucaryote dans cette étude (couple eu : 2234C/3126T et diat : ARAlg18S et ITS4).

La grande spécificité du couple d'amorces diat se traduit sur les profils ARISA par un nombre de pics de fluorescence plus faible que pour les profils obtenus avec le couple euk ou encore les profils bactériens (Figure 39).

¹⁷ Cependant les amorces de White *et al.* (1990) dont ITS4 sont bien utilisées dans la littérature scientifique pour amplifier les ITS de diatomées (voir III.3.1.2 du Chapitre Etat des connaissances).

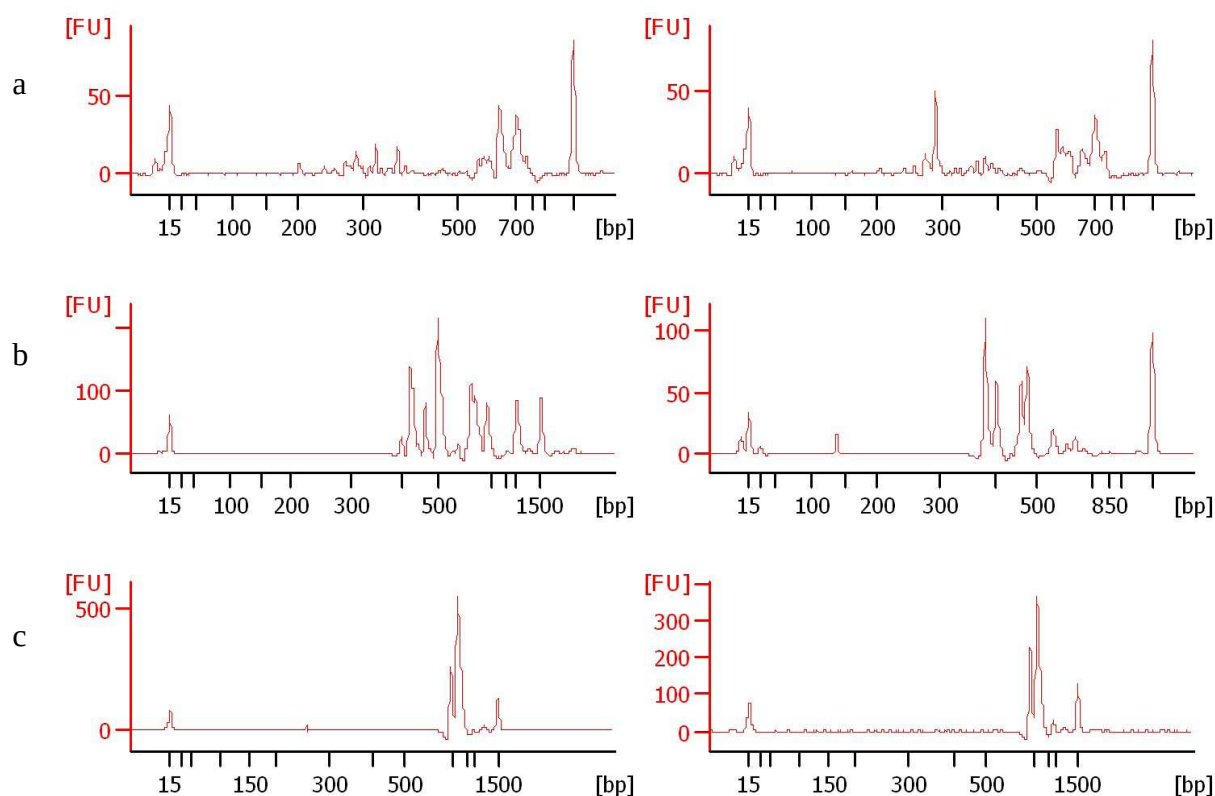


Figure 39 : Profils ARISA des échantillons S6 (à gauche) et S7 (à droite) prélevés sur le site de Saint-Maurice obtenus avec les couples d'amorces a) bactéries, b) euk et c) diat.

3. Clonage et analyse phylogénétique sur un échantillon de biofilm de Saint-Maurice

Une expérience de clonage/séquençage réalisée sur deux produits post-PCR obtenus sur un biofilm de Saint-Maurice (biofilm S6, prélevé le 11 mars 2008) avec les deux couples d'amorces eukaryotes (euk et diat), a permis d'identifier les types de séquences ciblées. Le clonage a été mis en œuvre avec un kit (Topo TA cloning kit for Sequencing, Invitrogen, Carlsbad, US) selon les instructions du fabricant à partir des produits post-PCR (contenant donc chacun un mélange d'amplicons ITS1-5.8S-ITS2 différent selon les couples d'amorces utilisés). 48 et 96 clones ont été sélectionnés pour le séquençage pour les couples diat et euk respectivement. Le séquençage a été réalisé par le laboratoire Cogenics (Beckman Coulter Genomics, France).

Les séquences de clones ont ensuite été alignées avec la base de nucléotides du NCBI pour identification. Les résultats ont confirmé que les deux couples d'amorces amplifient bien la région ITS1-5.8S-ITS2 d'organismes eucaryotes. Les bases de données contenant relativement

peu de ce type de séquences, il n'a pas été possible de les identifier précisément. En revanche, la région correspondant au gène codant pour le 5.8S a pu être identifiée pour chaque séquence. Le 5.8S est un gène très intéressant pour l'identification des organismes (Coleman 2003; Cullings & Vogler 1998). L'alignement des séquences de 5.8S avec la base de données du NCBI a confirmé que le couple diat amplifie exclusivement des séquences de diatomées et le couple euk une plus grande diversité de séquences eucaryotes, parmi lesquelles des diatomées, des ciliés mais aussi des espèces fongiques.

L'alignement multiple des séquences de 5.8S a permis de déterminer respectivement 13 et 18 groupes de séquences similaires (Tableau 11 et Tableau 12) parmi les séquences obtenues avec les couples d'amorces diat et euk. Une séquence a été choisie dans chaque groupe et déposée sur la base de données du NCBI (références Genbank : GQ281523 à GQ281540 pour le couple d'amorces euk et GQ 273989 à GQ274000 pour le couple d'amorces diat).

Séquences ITS1-5.8S-ITS2	Taille (bp)	Nombre de clones par groupe (% d'homologie entre les clones de chaque groupe)	Proche parent sur la base de données Genbank (obtenu par l'algorithme Blastn à partir du 5.8S)	% d'homologie avec le proche parent (Blastn)
GQ274000	613*	1	FJ624230 (<i>Navicula phyllepta</i>)	77
GQ273996	660	9 (87-99%)	FJ624230 (<i>Navicula phyllepta</i>)	87
GQ273990	681	5 (84-99%)	FJ624230 (<i>Navicula phyllepta</i>)	87
GQ273999	763	1	FJ624230 (<i>Navicula phyllepta</i>)	88
GQ273998	767	1	DQ235782 (<i>Navicula arenaria</i>)	98
GQ274001	767	7 (94-99%)	DQ235782 (<i>Navicula arenaria</i>)	98
GQ273995	771	1	DQ235780 (<i>Navicula gregaria</i>)	92
GQ273991	821	3 (95-96%)	AJ544675 (<i>Sellaphora pupula</i>)	90
GQ273994	823	5 (95-99%)	AJ544675 (<i>Sellaphora pupula</i>)	90
GQ273997	824	1	DQ235780 (<i>Navicula gregaria</i>)	95
GQ273993	829	4 (86-96%)	DQ235782 (<i>Navicula arenaria</i>)	98
GQ273992	851	3 (74-93%)	DQ235780 (<i>Navicula gregaria</i>)	92
GQ273989	967	1	DQ235780 (<i>Navicula gregaria</i>)	96

Tableau 11 : 13 séquences ITS1-5.8S-ITS2, obtenues par PCR sur l'échantillon S6 avec le couple d'amorces diat, soumises sur la base de données Genbank et leurs caractéristiques : taille (en bp), nombre de clones appartenant au groupe de séquences similaires, proche parent (séquence la plus homologue) trouvé dans la base de données Genbank et pourcentage d'homologie entre le 5.8S de la séquence clonée et le 5.8S du proche parent.

Les Tableaux 11 et 12 récapitulent les principaux résultats obtenus par cette expérience de clonage/séquençage : les séquences homologues aux 5.8S des séquences clonées, trouvées dans la base de données Genbank (NCBI), sont des 5.8S de diatomées pour les clones obtenus avec le produit de PCR correspondant au couple diat (*Navicula sp.*, *Sellaphora pupula*), et des 5.8S d'algues

(diatomées – *Bacillariophyceae* – ou *Synurophyceae*), de ciliés (*Spathidium sp.*, *Zoothamnium sp.*, *Lacrymaria sp.*, *Oxytrichidae sp.*) ou de Fungi (*uncultured fungus*) pour le produit de PCR correspondant au couple euk.

Séquences ITS1-5.8S-ITS2	Taille (bp)	Nombre de clones par groupe (% d'homologie entre les clones de chaque groupe)	Proche parent sur la base de données Genbank (obtenu par l'algorithme Blastn à partir du 5.8S)	% d'homologie avec le proche parent (Blastn)
GQ281528	356	1	AF223570 (ciliate: <i>Spathidium amphoriforme</i>)	85
GQ281526	408	10 (96-98%)	AF223570 (ciliate: <i>Spathidium amphoriforme</i>)	87
GQ281527	412	6 (91-99%)	DQ811088 (ciliate: <i>Lacrymaria marina</i>)	87
GQ281529	418	1	AF223570 (ciliate: <i>Spathidium amphoriforme</i>)	85
GQ281530	418	4 (72-99%)	AF223570 (ciliate: <i>Spathidium amphoriforme</i>)	87
GQ281532	467	9 (78-99%)	EU047813 (ciliate: <i>Chilodonella uncinata</i>)	98
GQ281533	487	14 (93-99%)	EU340860 (ciliate: <i>Zoothamnium plumula</i>)	98
GQ281534	492	2 (96%)	FJ810405 (ciliate: <i>Carchesium polypinum</i>)	100
GQ281535	492	4 (85-97%)	FJ810404 (ciliate: <i>Carchesium polypinum</i>)	99
GQ281523	518	1	EU340860 (ciliate: <i>Zoothamnium plumula</i>)	87
GQ281524	519	1	EU340860 (ciliate: <i>Zoothamnium plumula</i>)	94
GQ281531	540	1	FJ554412 (ciliate: <i>Oxytrichidae environmental sample</i>)	93
GQ281540	568	25 (78-99%)	FJ624230 (alge, Bacillariophyceae: <i>Navicula phyllepta</i>)	90
GQ281539	571	2 (94%)	FJ624230 (alge, Bacillariophyceae: <i>Navicula phyllepta</i>)	94
GQ281536	615	1	FJ624230 (alge, Bacillariophyceae: <i>Navicula phyllepta</i>)	94
GQ281538	639	7 (84-98%)	FJ624230 (alge, Bacillariophyceae: <i>Navicula phyllepta</i>)	97
GQ281525	704	1	FM178514 (algae, Synurophyceae: <i>Synura glabra</i>)	72
GQ281537	885	3 (99%)	AM999752 (fungus: <i>Uncultured fungus</i>)	98

Tableau 12 : 18 séquences ITS1-5.8S-ITS2, obtenues par PCR sur l'échantillon S6 avec le couple d'amorces euk, soumises sur la base de données Genbank et leurs caractéristiques : taille (en bp), nombre de clones appartenant au groupe de séquences similaire,s, proche parent (séquence la plus homologue) trouvé dans la base de données Genbank et pourcentage d'homologie entre le 5.8S de la séquence clonée et le 5.8S du proche parent.

Enfin, un arbre phylogénétique a pu être construit à partir des 21 séquences sélectionnées (5.8S) et de leurs homologues les plus proches dans la base de données du NCBI (Figure 40) avec le logiciel MEGA4 (Tamura et al. 2007).

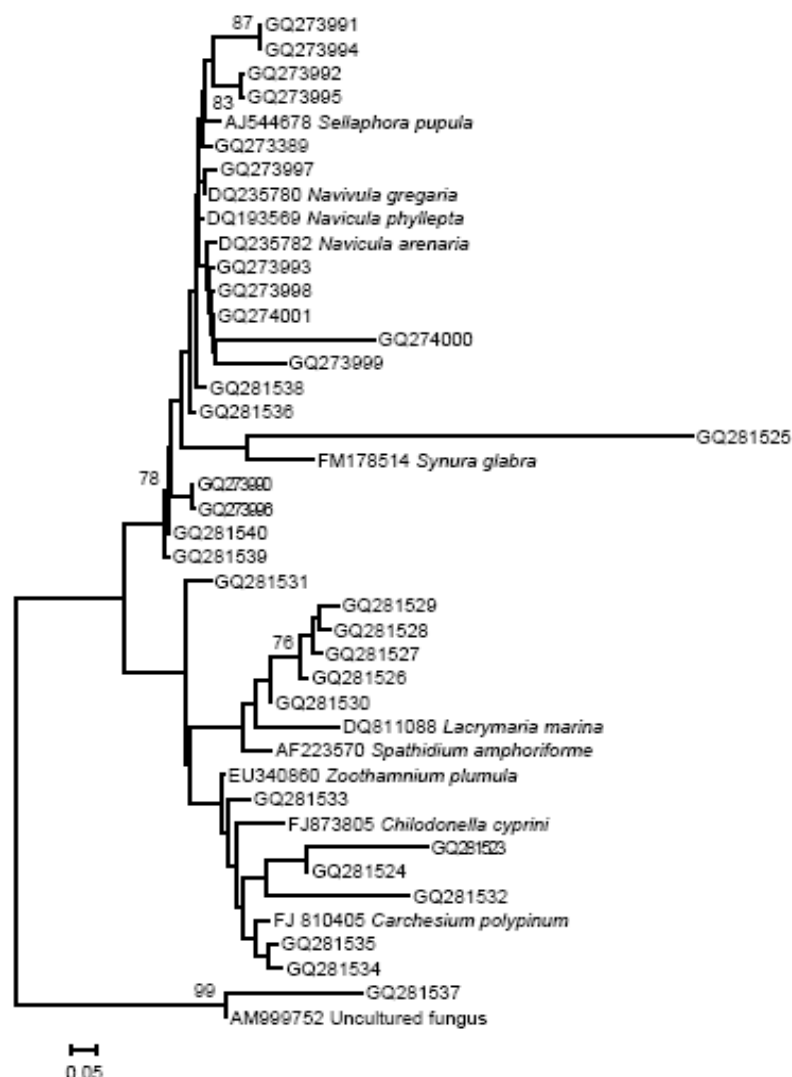


Figure 40 : Arbre phylogénétique (Neighbour-Joining) obtenu avec les séquences identifiées dans un biofilm prélevé à Saint-Maurice ainsi que les séquences proches de la base de données Genbank (notées avec le nom de l'espèce en italique). Le soutien des branches internes a été évalué par Bootstrap avec 1000 répliques (seules les valeurs supérieures à 75 % sont affichées).

L'arbre phylogénétique permet de mettre en évidence les trois grands types de séquences obtenues par l'expérience de clonage/séquençage, à savoir les algues, les ciliés et les Fungi.

4. Modifications saisonnières des populations eucaryotes de biofilms prélevés à Saint-Maurice en 2008

Les deux couples d'amorces ont ensuite été testés sur des biofilms prélevés dans la Marne (Saint-Maurice, 94) en 2008. Les profils ARISA obtenus permettent, après traitement statistique

avec StatFingerprints, d'observer par ACP une évolution des populations eukaryotes au cours des saisons (Figure 41 et Figure 42).

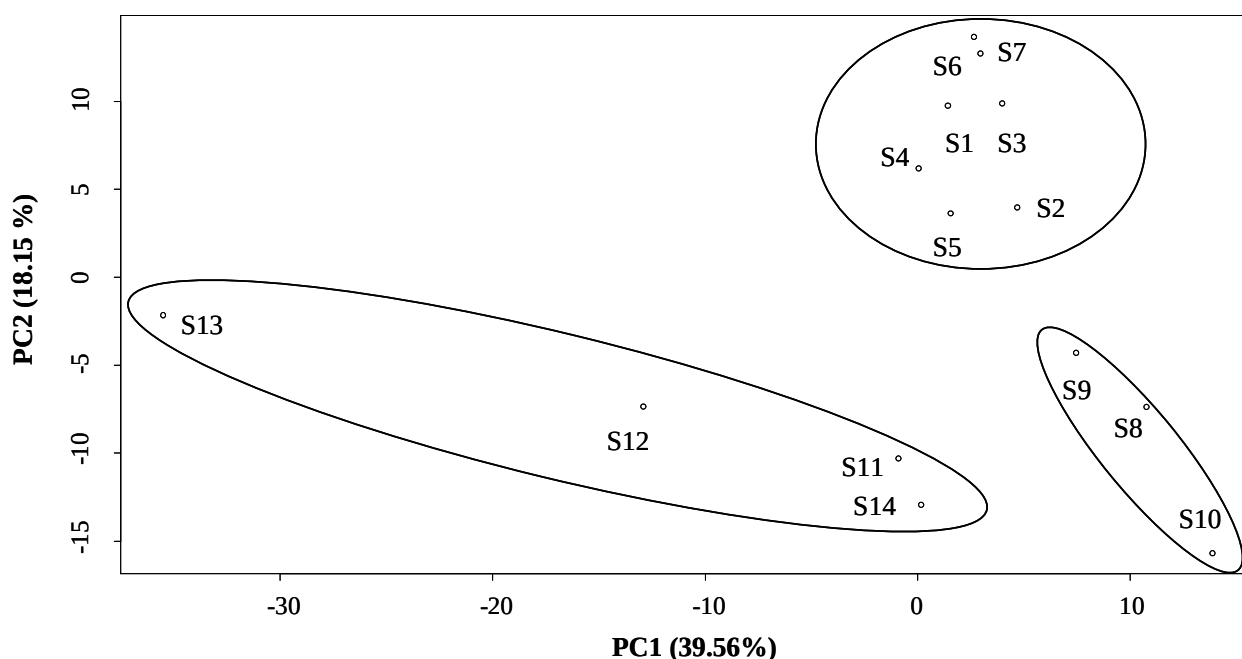


Figure 41 : Projection des échantillons sur le plan factoriel constitué des deux premières composantes principales obtenues par ACP à partir des profils ARISA eucaryote (couple euk) sur des échantillons de biofilms de Saint-Maurice

L'ACP calculée à partir des profils obtenus avec le couple euk (Figure 41) permet de mettre en évidence trois groupes de profils ARISA en fonction de la date de prélèvement : les biofilms S1 à S7 (janvier à mi-mars 2008), puis les biofilms S8 à S10 (fin mars à début avril), et enfin S11 à S14 (avril à juillet). Les profils correspondant aux biofilms prélevés de janvier à mars (S1 à S7) sont regroupés en haut du plan factoriel, alors que les biofilms prélevés ultérieurement sont regroupés en bas du plan factoriel. En ce qui concerne le couple diat, il est plus difficile d'observer une évolution temporelle pour les biofilms prélevés en début d'année (S1 à S10), en revanche les biofilms prélevés d'avril à juillet (S11 à S14) sont bien regroupés en bas à gauche du plan factoriel (Figure 42).

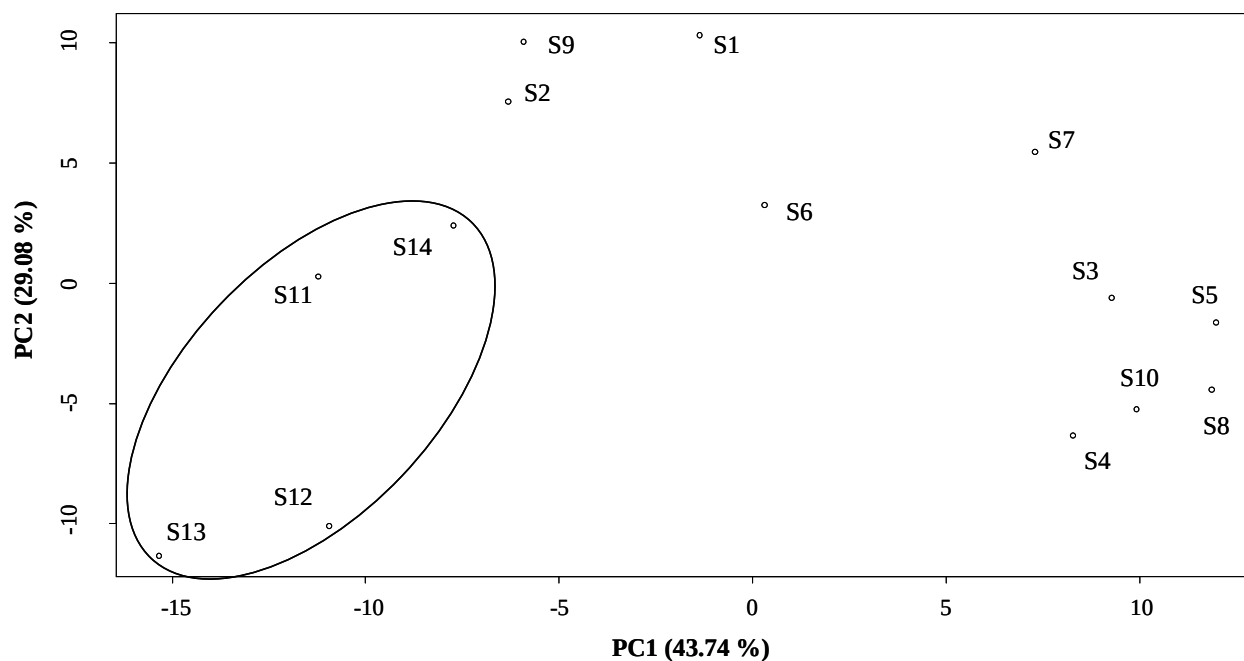


Figure 42 : Projection des échantillons sur le plan factoriel constitué des deux premières composantes principales obtenues par ACP à partir des profils ARISA eucaryote (couple diat) sur des échantillons de biofilms de Saint-Maurice

Comme pour les profils ARISA Bactérie, les évolutions mises en évidence par ACP peuvent être mises en relation avec des variations saisonnières. L'ARISA Eucaryote permet d'observer une modification des populations périphtiques, entre fin mars et mi-avril (S9 à S11) avec les deux couples d'amorces testés, modification non révélée par l'ARISA Bactérie. Par ailleurs, les deux couples d'amorces utilisés ne donnent pas des résultats totalement similaires.

III. Conclusion sur l'utilisation de l'ARISA sur biofilms

Les biofilms sont des communautés complexes d'organismes appartenant à des groupes taxonomiques variés, interagissant les uns avec les autres. Il est donc intéressant de pouvoir observer les évolutions des populations bactériennes et eucaryotes en parallèle, par exemple pour mettre en évidence des variations de structure causées par une perturbation. L'ARISA permet d'obtenir une empreinte génétique des deux types de communautés et d'observer des modifications au sein de celles-ci. En effet, le couple euk, développé pour l'utilisation de la technique ARISA sur des communautés fongiques du sol, semble être un outil approprié pour amplifier la région ITS1-5.8S-ITS2 chez des espèces eucaryotes périphytiques variées. Le couple diat a été conçu pour cibler plus spécifiquement les algues périphytiques, en particulier les diatomées. Les deux couples d'amorces ont permis d'identifier des variations saisonnières sur des échantillons de biofilms prélevés à Saint-Maurice. En revanche, le nombre de pics fluorescents obtenus sur les profils ARISA Eucaryote en utilisant le couple diat est assez réduit, ceux-ci étant restreints à une zone de tailles d'amplicons comprises entre 600 et 900 bp. La pauvreté en pics de ces profils rend leur utilisation pour observer des modifications de structure plus délicate. Elle a pour origine la grande spécificité de l'amorce ARAlg18S qui ne cible qu'une partie des diatomées. Les profils d'échantillons de biofilms prélevés à Saint-Maurice ont tout de même permis d'observer des variations saisonnières des populations de diatomées (couple diat). En conclusion, le couple d'amorce euk est approprié pour observer des modifications de structure des communautés eucaryotes périphytiques soumises à une perturbation.

La mise au point méthodologique de l'ARISA Eucaryote sur biofilms et l'application de cette technique d'empreinte génétique à des échantillons de biofilms prélevés au cours de plusieurs mois sur le site de Saint-Maurice ont fait l'objet d'une publication (Combined eukaryotic and bacterial community fingerprinting of natural freshwater biofilms using Automated Ribosomal Intergenic Spacer Analysis, Fechner L. C., Vincent-Hubert F., Gaubert P., Bouchez T., Gourlay-Francé C., Tusseau-Vuillemin M.-H.), soumise à *FEMS Microbiology Ecology* et acceptée en août 2010.

Chapitre 4. Validation de la méthodologie PICT en conditions contrôlées : expositions en microcosmes



I. Objectifs

Les deux chapitres précédents ont permis de détailler le développement méthodologique du test de toxicité aiguë β -glucosidase et de la technique ARISA sur des biofilms. Il est ensuite indispensable de pouvoir valider ces développements en conditions contrôlées, par des expositions de biofilms à des métaux, au laboratoire : il s'agit donc de vérifier que le test β -glucosidase permet bien de détecter une acquisition de tolérance aux métaux, et l'ARISA des modifications de structure des communautés, en conditions d'exposition contrôlées. Au laboratoire, il est effectivement possible de comparer de manière fiable des communautés exposées à divers degrés de toxicité, tout en préservant une continuité des autres paramètres d'exposition entre les différents traitements. En outre, il est nécessaire de tester la sensibilité de la gamme d'outils utilisés pour détecter les impacts à long terme d'une exposition métallique à des concentrations réalistes, c'est-à-dire correspondant à ce qu'on peut observer en milieu urbain, typiquement dans le bassin de la Seine. En effet, si les outils s'avèrent suffisamment sensibles pour observer des effets sur les biofilms, en termes d'acquisition de tolérance et de changements de structure, ils pourront raisonnablement être utilisés pour des expériences de terrain, c'est-à-dire sur des biofilms prélevés et exposés *in situ*.

Concentrations ($\mu\text{g/L}$)	[Cd]	[Ni]	[Zn]
min	0.008	0.3	< 0.5
max	0.1	3.7	24.1

Tableau 13 : Concentrations minimales et maximales en Cd, Ni et Zn dissous mesurées dans le bassin de la Seine pour le Cd, le Ni (Tusseau-Vuillemin *et al.* 2007), et pour le Zn (Bourgeault 2010).

Trois expériences d'exposition de biofilms en microcosmes ont donc été mises en œuvre au laboratoire avec trois métaux : le cadmium, métal inessentiel, le zinc, métal essentiel, et le nickel, essentiel pour certains organismes aquatiques (Muyssen *et al.* 2004). Pour chaque expérience, deux concentrations d'exposition ont été testées, afin d'observer des effets à deux ordres de grandeurs différents, tout en maintenant des niveaux d'exposition réalistes (Tableau 13 et Tableau 14). Après trois semaines d'exposition, les biofilms sont prélevés, puis caractérisés (mesures de poids sec, AFDW, concentrations en chlorophylle *a*, concentrations en métaux totaux et intracellulaires accumulés dans les biofilms) et leurs niveaux de tolérance respectifs sont estimés par les tests de toxicité β -glucosidase.

II. Dispositif expérimental

Des essais de culture de biofilms au laboratoire ont permis de déterminer les conditions de déroulement des expériences d'exposition de biofilms en microcosmes :

- 3 semaines d'exposition/colonisation pour mettre l'accent sur les processus de sélection et éviter d'obtenir un biofilm trop "vieux" en fin d'expérience (pour éviter notamment le décrochage éventuel de communautés matures, et surtout des problèmes de mesure de la tolérance des biofilms cultivés, les biofilms matures étaient de sensibilité moindre que les biofilms jeunes).

- inoculum prélevé sur la Rémarde : cette rivière est un affluent de l'Orge ; le site de prélèvement se situe à la station 03075000 de la DIREN (St-Cyr-sous-Dourdan dans l'Essonne, site classé « bon état » pour les métaux par la DIREN). L'inoculum, qui sert à ensemercer les microcosmes, est constitué de biofilms se développant sur des membranes plastiques LDPE immergées dans la rivière au moins 1 mois avant le début de l'exposition au laboratoire.

- milieux de culture/exposition : les microcosmes sont des aquariums en plastique (capacité 10L) remplis de 7.5L d'eau minérale Valvert (choisie pour sa composition, proche de celle de la Rémarde), dopée en nutriments à hauteur de 20 mg/L pour les nitrates (NO_3), 1 mg/L pour les phosphates (PO_4), et 25 mg/L pour la silice (SiO_2). Ces paramètres physico-chimiques ont été fixés au vu des résultats des essais de culture et des valeurs obtenues dans l'eau de la Rémarde et dans les grands fleuves urbains dans le bassin parisien (Seine et Marne). L'usage de récipients en plastique est recommandé pour mettre en place des expositions d'organismes à des métaux pour limiter l'adsorption des contaminants sur les parois des récipients (Batley *et al.* 1999) ; ceux-ci sont, en outre, lavés à l'acide (HNO_3 , 10 %) puis rincés deux fois à l'eau distillée, puis à l'eau Valvert, et enfin équilibrés avec le médium de culture dopé en métal pendant 24h avant le début de chaque expérience. Le dopage en nutriments des milieux de culture est réalisé par ajout d'aliquotes de solutions mères de $\text{Ca}(\text{H}_2\text{PO}_4)_2$, $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ et Na_2SiO_3 et le dopage en métaux par ajout de solutions mères de CdNO_3 , NiSO_4 or ZnSO_4 , fabriquées par dilution des quantités idoines de sel métallique dans de l'eau distillée.

- exposition à 20 °C en armoire thermostatée, avec un cycle jour/nuit de 13/11h (néons horticoles Grolux, Sylvania, utilisés pour favoriser le développement des plantes en aquarium), et une agitation continue à l'aide d'un système de tuyau en plastique permettant de

répartir également le flux d'eau projeté par une pompe à eau (Eheim Compact 300) dans l'ensemble de l'aquarium (Figure 43).



Figure 43 : Armoire thermostatée contenant les bacs d'exposition (à gauche) et bac d'exposition rempli avec son système d'agitation (pompe à eau et tuyau en plastique percé sur la longueur pour répartir le flux d'eau).

- renouvellement hebdomadaire des milieux de culture des bacs (avec dopage en nutriments et en métaux) : les bacs sont vidés à l'aide d'un tuyau en plastique (principe du siphon) puis remplis à nouveau.
- enfin, un dopage quotidien en métal après mesure des concentrations dans les différents bacs (prélèvement quotidien d'une aliquote de 5 mL d'eau des bacs et analyse au SAA) pour maintenir un niveau d'exposition constant. Une quantité adéquate de solution mère de sel métallique ($\leq 100 \mu\text{L}$ pour chaque dopage) est ensuite ajoutée pour ajuster la concentration métallique au niveau d'exposition (Tableau 14).

Expérience	Cd	Ni	Zn
Dates	01/10/08-22/10/08	12/11/08-03/12/08	10/02/09-03/03/09
Concentration faible	0.3	5	20
Concentration forte	3	50	200

Tableau 14 : Dates d'exposition et concentrations d'exposition des trois expériences (Cd, Ni et Zn).

Chaque expérience d'exposition dure trois semaines, pendant lesquelles le biofilm se développe sur des membranes LDPE (12 à 14 membranes de taille 7 cm $\times$ 20 cm par aquarium) immergées dans les aquariums, à raison de deux concentrations d'exposition testées par

expérience (Tableau 14). Puis, les biofilms sont récupérés et mis en suspension par grattage des membranes dans un volume donné d'eau minérale Montdore¹⁸ (mesuré à la burette graduée). Ces suspensions de biofilm dans l'eau minérale sont utilisées le jour même pour les filtrations permettant de caractériser les biofilms (mesures de poids sec, AFDW, Ch *a* et des concentrations en métaux totaux et intracellulaires) et pour la détermination de la concentration saturante en MUF-GLU (étape préliminaire du test β -glucosidase, voir Chapitre 2). Les suspensions sont conservées à l'obscurité et au réfrigérateur, pour éviter toute modification des communautés, pendant moins de 24h avant la mise en œuvre des tests de toxicité β -glucosidase. Pour chaque expérience, les niveaux de tolérance au métal d'exposition sont évalués pour les trois biofilms (témoin non exposé, et niveaux bas et haut d'exposition). Dans le cas de l'expérience d'exposition au zinc, la tolérance au cadmium des biofilms exposés au zinc a aussi été évaluée de manière à mettre en évidence un éventuel phénomène de co-tolérance.

¹⁸ Eau minérale en bouteille faiblement minéralisée utilisée pour les tests de toxicité β -glucosidase (voir Chapitre 2).

III. Résultats

1. *Paramètres d'exposition*

Les concentrations ioniques du milieu de culture (eau minérale Valvert dopée en nutriments et métal) des biofilms en laboratoire correspondent globalement aux concentrations mesurées sur des échantillons d'eau de la Rémarde (Tableau 15). Les variations des concentrations en nutriments, mais aussi en anions/cations (par exemple le calcium), dans les bacs, correspondent au développement observé des communautés périphytiques sur les membranes immergées. En effet, on observe bien une diminution des concentrations en nutriments, les nitrates et les phosphates étant consommés par l'ensemble des micro-organismes et la silice plus spécifiquement par les diatomées.

Des évolutions peuvent être soulignées au cours des trois semaines d'exposition et de développement des biofilms. Ainsi, les concentrations en nutriments restent proches des niveaux initiaux au cours de la première semaine pour toutes les expériences (avant renouvellement des milieux), soulignant un faible développement des communautés en début d'expérience, mais diminuent après deux ou trois semaines de développement des biofilms.

Par ailleurs, on observe aussi des différences entre les niveaux d'exposition d'une même expérience : par exemple, un développement très lent du biofilm exposé au niveau haut de zinc (200 µg/L), par comparaison aux communautés témoin et exposée au niveau bas (20 µg/L). En effet, les concentrations en nutriments sont pratiquement identiques aux concentrations initiales même au bout de 15 jours d'exposition (pour le niveau haut d'exposition).

	Echantillons	Date/Jour	Ca ²⁺	Mg ²⁺	Na ⁺	SO ₄ ²⁻	Cl ⁻	NO ₃ ⁻	SiO ₂	PO ₄ ³⁻	NO ₂ ⁻
	Valvert	Août 08	72.6	2.2	3.0	15.7	4.3	0	nd	nd	<0.1
	Rémarde	01/10/2008	86.7	7.3	22.1	36.8	35.8	17.2	35.76	nd	<0.1
		12/11/2008	86.0	6.1	18.8	42.2	31.8	12.1	22.3	nd	<0.1
		10/02/2009	62.7	6.5	15.4	30.5	28.2	23.5	nd	nd	<0.1
Cd	témoin	jour 8	101.1	3.6	16.1	22.1	4.1	21.3	28.4	0.7	<0.1
		jour 15	31.6	3.1	17.1	20.1	3.8	8.8	0.10	0.03	<0.1
		jour 22	20.4	3.2	16.5	19.7	3.9	1.5	<0.1	0.04	0.1
	bas	jour 8	59.3	3.0	15.9	19.0	3.4	14.0	3.7	0.19	<0.1
		jour 15	22.7	2.9	16.8	17.9	3.3	6.4	0.50	0.02	<0.1
		jour 22	20.9	2.9	15.8	18.3	3.5	5.4	0.1	0.05	0.1
	haut	jour 8	80.3	3.3	16.2	20.6	3.7	19.0	19.7	0.37	<0.1
		jour 15	34.0	3.1	16.9	20.0	3.9	11.0	0.30	0.04	<0.1
		jour 22	38.0	3.2	16.0	19.6	3.6	10.7	<0.1	0.05	0.1
Ni	témoin	jour 8	93.7	3.0	14.1	15.7	2.7	18.7	32.1	0.65	<0.1
		jour 15	19.1	3.4	15.1	19.4	3.5	5.4	0.2	0.06	<0.1
		jour 22	19.2	2.5	15.0	19.2	3.8	6.7	0.1	0.02	0.1
	bas	jour 8	89.4	2.9	13.5	17.8	3.1	17.5	32.6	0.75	<0.1
		jour 15	16.4	3.1	15.6	17.7	3.3	5.9	0.8	0.04	<0.1
		jour 22	14.7	2.2	14.7	18.3	3.4	6.3	0.1	0.02	0.1
	haut	jour 8	90.7	2.9	13.7	18.2	3.1	19.0	33.8	0.74	<0.1
		jour 15	20.8	3.3	15.2	18.7	3.3	8.5	1.55	0.06	<0.1
		jour 22	10.2	1.9	14.5	18.0	3.2	3.7	9.6	0.02	0.2
Zn	témoin	jour 8	85.3	3.9	14.4	22.9	4.0	19.2	17.4	0.25	<0.1
		jour 15	38.2	2.0	13.4	18.4	3.9	13.1	0.8	0.02	<0.1
		jour 22	27.8	3.2	17.8	17.4	4.0	11.8	0.1	0.03	<0.1
	bas	jour 8	87.8	3.6	14.3	21.8	3.8	21.5	15.7	0.5	<0.1
		jour 15	22.6	1.8	13.2	16.7	3.6	11.8	0.65	0.01	<0.1
		jour 22	24.4	1.9	15.1	15.9	3.6	9.9	0.05	0.05	<0.1
	haut	jour 8	90.7	3.8	13.6	23.2	3.8	25.0	31.8	0.65	<0.1
		jour 15	82.6	2.0	13.0	19.3	3.7	26.0	32.6	0.84	<0.1
		jour 22	60.9	2.1	15.2	18.0	3.5	17.1	23.6	0.13	<0.1

Tableau 15 : Concentrations en certains anions/cations (mg/L) dans la rivière à la date du prélèvement de l'inoculum (les trois dates correspondent au début de chaque expérience), puis dans les bacs d'exposition correspondant au biofilm témoin, au biofilm exposé à la faible concentration en métal (bas) et au biofilm exposé à la forte concentration en métal (haut) à 8, 15 ou 22 jours d'exposition (avant changement des milieux d'exposition).

Le pH des milieux, mesuré ponctuellement dans les bacs, augmente : d'environ 7.9 en début d'expérience, il passe à des valeurs assez élevées (autour de 9.5) au cours de la phase d'exposition à la lumière. Ce type de phénomène est prévisible dans des microcosmes non tamponnés, du fait de l'activité photosynthétique des algues du périphyton (Gustavson & Wängberg 1995; McClellan *et al.* 2008).

Les niveaux d'exposition aux métaux ont été suivis quotidiennement par analyse au SAA. Comme observé au cours des expériences préliminaires, les niveaux d'exposition baissent effectivement, et, pour les maintenir, il est nécessaire de doper les bacs chaque jour. Les concentrations moyennes en métaux dans les bacs avant et après dopage figurent dans le Tableau 16. On constate que les niveaux d'exposition atteints sont légèrement plus faibles que les niveaux théoriques (Tableau 14 et Tableau 16).

Expérience	Cd		Ni		Zn	
	avant dopage (n=14)	après dopage (n = 6)	avant dopage (n=15)	après dopage (n = 14)	avant dopage (n=18)	après dopage (n = 14)
bas	0.14 ($\pm$ 0.16)	0.37 ($\pm$ 0.22)	3.26 ($\pm$ 1.07)	4.68 ($\pm$ 0.59)	9.44 ($\pm$ 5.11)	15.12 ($\pm$ 4.28)
haut	1.11 ($\pm$ 0.5)	2.07 ($\pm$ 0.61)	43.07 ($\pm$ 8.29)	49.62 ($\pm$ 3.73)	171.0 ($\pm$ 26.56)	192.25 ($\pm$ 20.53)

Tableau 16 : Concentrations moyennes ($\mu\text{g/L}$) en Cd, Ni et Zn mesurées dans les bacs d'exposition avant et après-redopage (moyenne sur n prélèvements indiqués dans le tableau). Le nombre de prélèvements est inférieur pour l'exposition au Cd car au cours de cette expérience, la concentration en métal n'a pas été systématiquement vérifiée après re-dopage quotidien.

La concentration en métal dans le bac témoin est toujours inférieure au seuil de détection par analyse au SAA pour les expériences d'exposition au cadmium et au nickel (respectivement 0.03 et 1 $\mu\text{g/L}$). En ce qui concerne l'exposition au zinc, la concentration moyenne dans le bac témoin est de 1.3 $\mu\text{g/L}$ de zinc, ce qui correspond au niveau de base de zinc détectable dans l'eau minérale Valvert prélevée directement dans la bouteille.

2. Caractérisation des biofilms

2.1 Accumulation des métaux dans les biofilms

Les métaux s'accumulent dans les biofilms au cours de l'exposition, soit dans les cellules (métaux intracellulaires, dont les concentrations sont déterminées après lavage à l'EDTA), soit dans la matrice du biofilm. Les quantités accumulées (totales et intracellulaires) augmentent avec les niveaux d'exposition pour une même expérience (Figure 44).

Pour les expositions au cadmium et au nickel, le métal intracellulaire représente une forte proportion du métal total accumulé dans les biofilms (entre 47 et 70%), alors que pour l'exposition au zinc, il ne représente que 46 et 28 % du Zn total pour les niveaux d'exposition bas et haut respectivement.

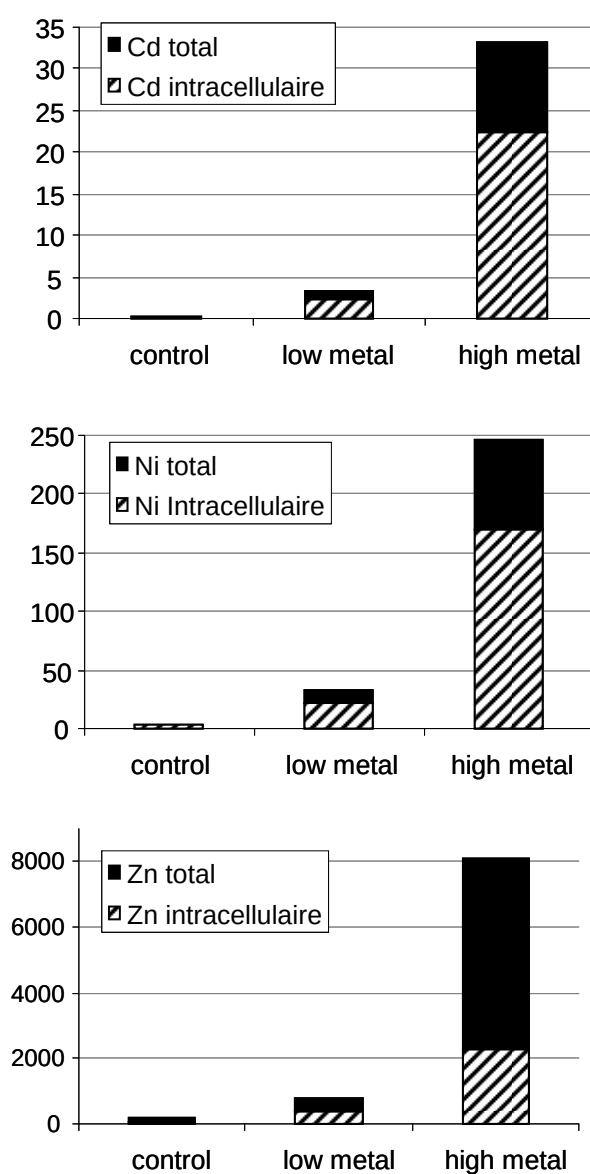


Figure 44 : Concentrations totales ou intracellulaires en Cd, Ni et Zn (μg métal/g de poids sec). Les proportions de métaux intracellulaires sont représentées par des hachures.

2.2 Descripteurs de biomasse

Les mesures de poids sec, AFDW, des concentrations en chlorophylle *a* et de l'activité hétérotrophe (β -glucosidase) des biofilms prélevés à la fin de chaque expérience d'exposition permettent d'évaluer les impacts des métaux sur ces biodescripteurs classiques du périphyton (Figure 45).

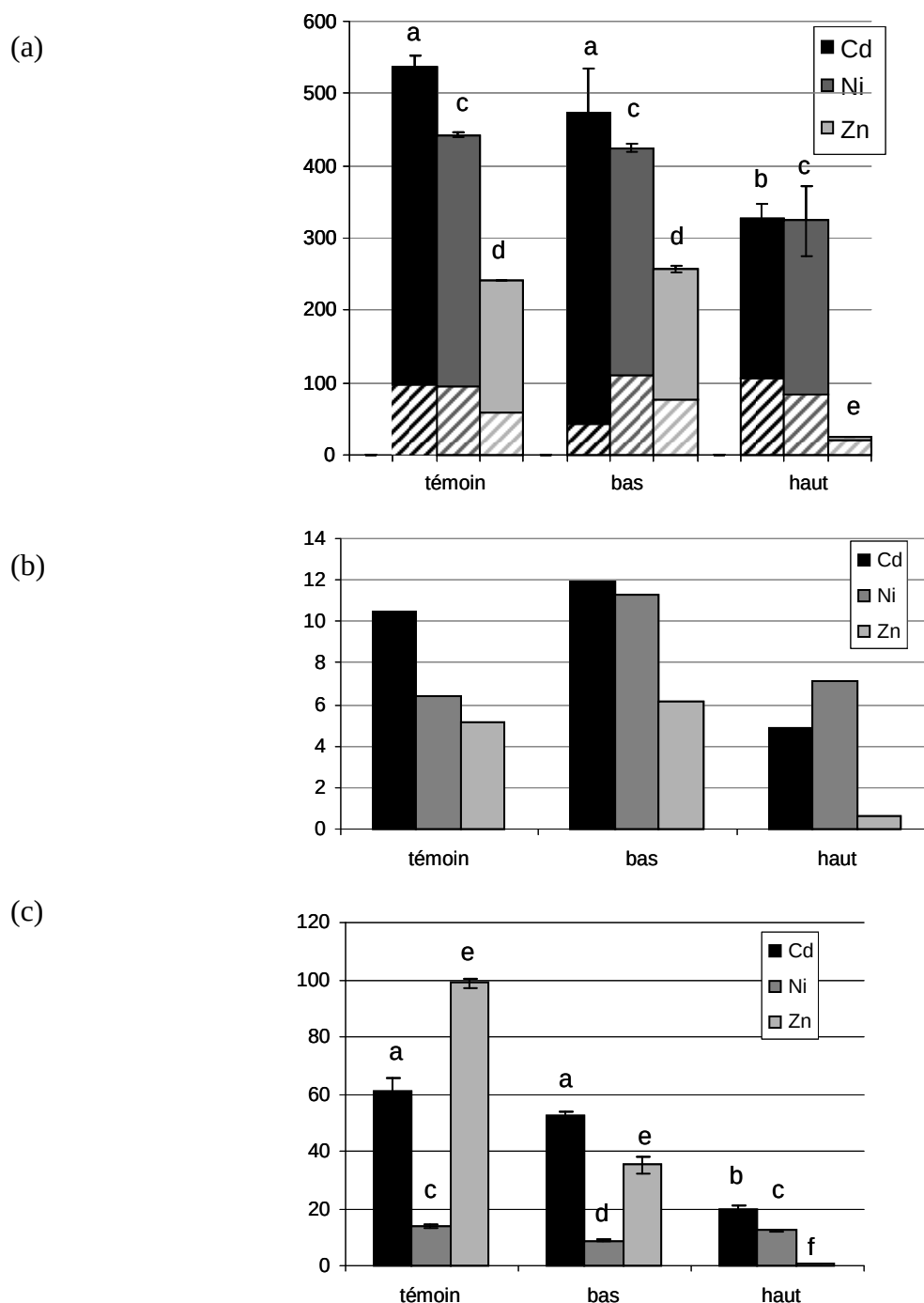


Figure 45 : Impact du Cd, Ni et Zn après trois semaines d'exposition en microcosme sur (a) le poids sec ($\mu\text{g}/\text{cm}^2$ de surface de membrane, $n=2$), la proportion en matière organique (AFDW) est représentée par des hachures, (b) la concentration en chlorophylle *a* ($\text{mg Ch } a/\text{m}^2$ de surface de membrane, $n=1$), (c) l'activité β -glucosidase ($\mu\text{M MUF}/\text{gMO}/\text{h}$, $n=3$). Les lettres indiquent des différences significatives (lettres différentes) ou non (même lettre) entre les valeurs correspondant aux trois biofilms d'une même expérience d'exposition avec le test de Kruskal Wallis, suivi du test Dunn : (a) $p = 0.1$ et 0.05 pour le Cd et le Zn, (c) $p = 0.0025$ pour les trois expériences. Les barres d'erreur indiquent les écarts-types.

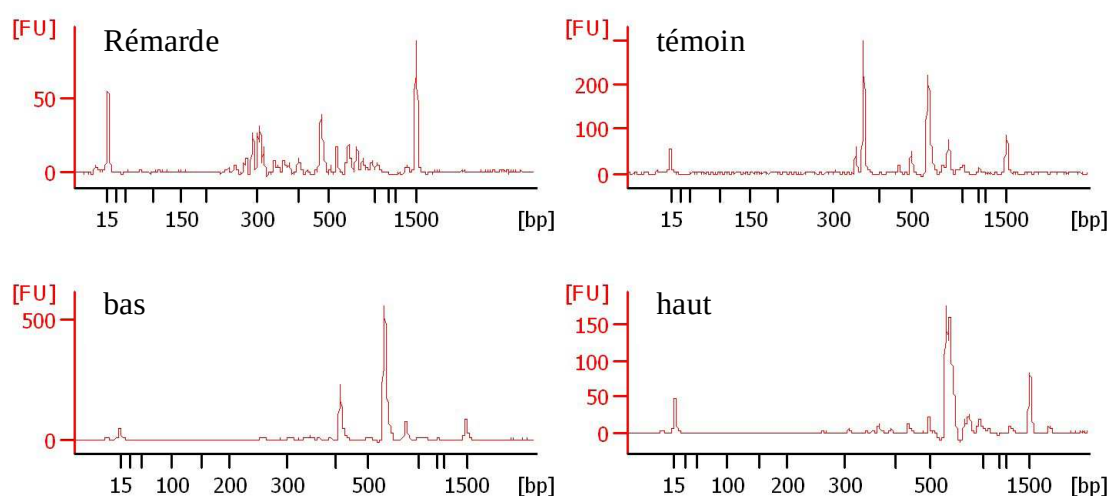
On observe en effet une baisse du poids sec des biofilms avec les niveaux d'exposition, significative pour le niveau haut dans les expériences d'exposition au cadmium et au zinc (non

significative pour le nickel). La biomasse algale augmente pour les niveaux bas d'exposition, et diminue pour les niveaux hauts dans le cas du cadmium et du zinc seulement. Enfin, l'activité hétérotrophe diminue avec les niveaux d'exposition pour le cadmium et le zinc, seulement avec le niveau bas pour le nickel.

2.3 ARISA

Les profils ARISA montrent une variation détectable de la structure des communautés bactériennes et eucaryotes des biofilms avec les niveaux d'exposition.

En effet, on observe une nette baisse de la diversité bactérienne en termes de nombres de pics par profil ARISA avec le niveau d'exposition (Figure 46 pour les profils des biofilms de l'expérience d'exposition au cadmium, annexe pour les expériences d'exposition au nickel et au zinc), confirmée par une diminution de l'indice de Shannon-Weaver, calculé à partir des profils avec le logiciel StatFingerprints (Tableau 17).



ARISA Bactérie : exposition au Cd

Figure 46 : Profils ARISA Bactérie des biofilms de l'expérience d'exposition au Cd (témoin, biofilms exposés au niveau "haut" et au niveau "bas" de métal) et du biofilm de la Rémarde utilisé comme inoculum.

On remarque par ailleurs que l'indice de Shannon-Weaver est plus élevé pour les biofilms prélevés en milieu naturel (inoculum provenant de la rivière Rémarde) que pour les communautés cultivées en laboratoire (Tableau 17, ARISA bactérie).

biofilm	Exposition au Cd		Exposition au Ni		Exposition au Zn	
	bactéries	eucaryotes	bactéries	eucaryotes	bactéries	eucaryotes
Rémarde	3.4	2.6	3.8	1.0	3.2	2.0
témoin	2.0	1.7	2.4	1.6	2.5	1.6
bas	1.0	1.7	1.5	1.2	1.0	1.5
haut	1.5	1.8	0.8	2.0	2.5	1.7

Tableau 17 : Indices de Shannon-Weaver calculés à partir des profils ARISA (bactérie et eucaryote avec le couple d'amorces euk) des biofilms témoins et exposés aux niveaux de concentrations bas et haut pour les trois expériences en microcosmes.

En revanche, les profils obtenus avec l'ARISA eucaryote (couple d'amorces euk) ne permettent pas de détecter une diminution de diversité équivalente à celle observée pour les communautés bactériennes. Il y a néanmoins bien une évolution de la structure des communautés eucaryotes, liée au métal, puisque les profils évoluent (Figure 47).

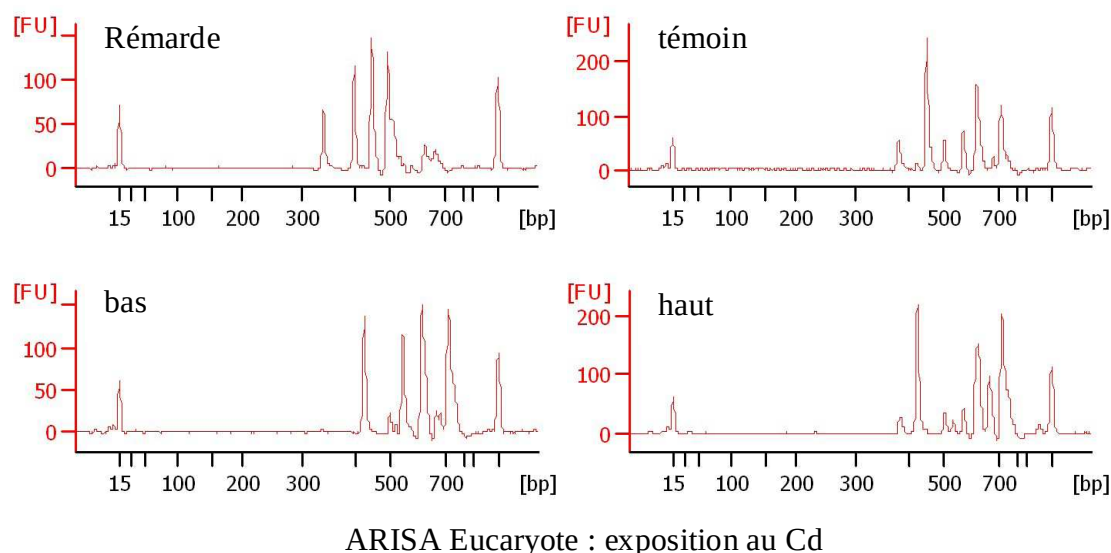


Figure 47 : Profils ARISA eucaryote des biofilms de l'expérience d'exposition au Cd (témoin, biofilms exposés au niveau "haut" et au niveau "bas" de métal) et du biofilm de la Rémarde utilisé comme inoculum.

Enfin, les profils ARISA eucaryote obtenus en utilisant le couple d'amorces diat ne permettent pas de conclure quant à l'évolution de la communauté de diatomées. En effet, avec ces communautés moins riches en espèces cultivées en laboratoire, les profils présentent un nombre insuffisant de pics fluorescents pour pouvoir observer une évolution de la communauté (annexe).

3. Test β -glucosidase

Les tests β -glucosidase permettent de mettre en évidence une acquisition de tolérance aux métaux après trois semaines d'exposition pour des concentrations minimales égales à 0.3, 50 et 200 $\mu\text{g/L}$ de cadmium, nickel et zinc respectivement, soit pour les hauts niveaux d'exposition seulement, sauf pour l'expérience d'exposition au cadmium, pour laquelle on détecte une acquisition de tolérance au niveau bas d'exposition. Pour ce dernier cas, les niveaux de tolérance des deux biofilms exposés au cadmium sont similaires. On constate aussi, pour le nickel, une diminution de la tolérance du biofilm exposé à faible concentration en métal. Enfin, pour l'expérience d'exposition au zinc, le biofilm exposé au niveau haut de métal (200 $\mu\text{g/L}$ de zinc) devient tolérant à la fois au zinc et au cadmium (Tableau 18).

Exposition	Traitement	EC ₅₀ normalisée en mg _{metal} /g _{MES} (intervalle de confiance à 95%)	% maximum d'inhibition (intervalle de confiance à 95%)
Cd	témoin	1.17 (0.85-1.49)	97 (96.2-97.9)
	bas	1.93 (1.56-2.30)	90.2 (88.2-92.2)
	haut	2.21 (1.64-2.78)	92.3 (91.3-94.7)
Ni	témoin	4.75 (3.35-6.15)	68 (65.2-71.2)
	bas	1.45 (0.74-2.15)	62.2 (59.0-66.8)
	haut	19.21 (6.4-128.07)	63.2 (53.8-84.7)
Zn	témoin	1.32 (1.15-1.49)	100.2 (99.2-101.1)
	Zn bas	1.69 (1.20-2.18)	100.6 (99.4-102.2)
	Zn haut	46.26 (36.96-55.56)	84.8 (83.5-86.6)
	témoin	1.56 (1.32-1.80)	100.4 (99.3-101.8)
	Cd bas	1.50 (1.36-1.64)	99.1 (98.7-99.5)
	Cd haut	37.60 (16.24-58.97)	67.4 (62.3-74.3)

Tableau 18 : EC₅₀ normalisées et paliers d'inhibition, avec leurs intervalles de confiance à 95%, calculés à partir des courbes dose/effet obtenues par le test β -glucosidase sur les biofilms témoins et exposés aux niveaux bas et hauts de métal, pour les trois expériences d'exposition en microcosmes.

On remarque, par ailleurs, que les paliers d'inhibition (% maximal d'inhibition de l'activité β -glucosidase, obtenu lors des tests de toxicité) tendent nettement à diminuer pour les biofilms exposés, parallèlement à l'augmentation de tolérance.

Ainsi, pour le cas du cadmium, pour les deux biofilms exposés au métal et présentant des niveaux de tolérance similaires, on observe un léger palier d'inhibition (baisse du % maximal d'inhibition) similaire pour les deux niveaux d'exposition. De même, dans le cas du zinc, le palier d'inhibition, très net, apparaît dans les tests de toxicité au cadmium et au zinc pour le biofilm exposé à 200 $\mu\text{g/L}$ de zinc, et n'apparaît pas pour le biofilm exposé au niveau bas de zinc,

d'ailleurs non tolérant aux métaux testés. Dans le cas du nickel, le maximum d'inhibition diminue pour les biofilms exposés au métal, mais de manière non significative, du fait de larges intervalles de confiance. Pour le nickel, on constate d'ailleurs aussi la présence d'un maximum d'inhibition inférieur à 100% pour le biofilm témoin, non exposé au nickel.

IV. Interprétation

1. *Effet PICT sur biofilms exposés en microcosmes*

Les trois expériences d'exposition en microcosmes permettent de valider l'usage du test β -glucosidase pour détecter une acquisition de tolérance des communautés périphytiques hétérotrophes exposées à des concentrations environnementales en métaux. En effet, on détecte bien une augmentation de tolérance (augmentation des EC_{50} mesurées) pour les trois biofilms exposés aux niveaux hauts de métaux dans les trois expériences, ainsi que pour le biofilm exposé au niveau bas de cadmium. Par ailleurs, l'augmentation des EC_{50} s'accompagne dans tous les cas de l'apparition de paliers d'inhibition, ce qui permet de confirmer l'hypothèse que ces paliers constituent bien une réponse biologique des biofilms à une exposition (Chapitre 2).

La mise en évidence d'un effet PICT (augmentation des niveaux de tolérance) et de modifications de la structure des communautés, au cours de ces trois expériences d'exposition de biofilms en microcosmes, est tout particulièrement intéressante du fait des concentrations en métaux testées. En effet, le niveau bas d'exposition a été choisi pour son réalisme environnemental et le niveau haut est un ordre de grandeur plus élevé. Il est en général difficile de pouvoir mettre en évidence des effets PICT sur des communautés exposées en laboratoire à des concentrations en métal faible. Par exemple, Gustavson & Wängberg (1995) n'observent pas d'acquisition de tolérance sur du périphyton exposé à 15 $\mu\text{g/L}$ de Cu, alors qu'ils observent une augmentation de la tolérance du phytoplancton (test d'inhibition de l'activité photosynthétique). Ainsi, les niveaux d'exposition trouvés dans la littérature sont souvent élevés : par exemple Morin *et al.* (2008a) exposent des biofilms à des concentrations de cadmium de 10 et 100 $\mu\text{g/L}$, et Ivorra *et al.* (2000; 2002b) à des concentrations de zinc allant de 1000 à 3000 $\mu\text{g/L}$ et de cadmium allant de 64 à 100 $\mu\text{g/L}$. Les effets sont souvent détectés à des concentrations fortes : Paulsson *et al.* (2000) exposent du périphyton au zinc à des concentrations variant de 3 $\mu\text{g/L}$ à 2 mg/L de zinc et observent une acquisition de tolérance à partir de 600 $\mu\text{g/L}$ seulement. Enfin, la mise en évidence d'un effet PICT dépend des tests de toxicité utilisés et de la démarche expérimentale : Soldo & Behra (2000) mettent en évidence une acquisition de tolérance dès 6 $\mu\text{g/L}$ d'exposition au cuivre, pour une durée d'exposition longue (12 semaines). Dans le cadre de notre étude, nous avons pu mettre en évidence un effet PICT à des niveaux d'exposition réalistes en utilisant un dispositif expérimental simple à mettre en œuvre avec une durée d'exposition relativement courte (trois semaines).

Cette étude a aussi permis de mettre en évidence un phénomène de co-tolérance, détectable par le test β -glucosidase sur une communauté périphytique hétérotrophe exposée au zinc, tolérante au zinc et au cadmium. La co-tolérance peut compliquer l'interprétation d'un effet PICT : en effet, l'approche PICT suppose que l'on puisse relier une acquisition de tolérance à un agent toxique à une exposition de la communauté étudiée à ce même agent toxique (Chapitre 1). Il est probable que l'utilisation du même test (β -glucosidase) pour étudier l'acquisition de tolérance de biofilms exposés *in situ* à une multi-contamination métallique, typique des milieux urbains, engendre des réponses d'interprétation complexe. Dans ce contexte, il semble qu'il serait certainement plus intéressant d'étudier la réponse de biofilms exposés en milieu urbain de manière plus globale, sans chercher à relier la tolérance à un métal particulier à l'exposition *in situ* à ce seul métal.

2. Descripteurs de biomasse : paramètres classiques et ARISA

Les biofilms se développent correctement dans les microcosmes. Les ratios poids sec/AFDW sont en revanche plutôt faibles, sauf pour le biofilm exposé au niveau haut de métal dans l'expérience d'exposition au zinc. Des ratios poids sec/AFDW faibles sont pourtant en général observés pour des communautés périphytiques naturelles avec de grandes quantités de matières inorganiques telles que des résidus de sable ou de vase, charriés par les eaux de rivière (Barranguet *et al.* 2000; Paule *et al.* 2009).

Les ratios métal intracellulaire/métal total accumulés correspondent à des gammes de valeurs observées sur des biofilms de rivière ou de laboratoire (Behra *et al.* 2002; Serra & Guasch 2009). Ce ratio diminue pour le biofilm exposé au niveau haut de métal dans l'expérience d'exposition au zinc, ce qui peut être mis en relation avec la diminution du ratio poids sec/AFDW qui dénote une augmentation de la quantité de matière organique dans le biofilm : en effet, cette augmentation de la quantité de matière organique pourrait traduire une production plus forte d'EPS, dont les propriétés chélatantes pour les métaux sont connues (Serra & Guasch 2009). L'ensemble des paramètres et des observations visuelles montrent donc un impact particulièrement fort de l'exposition à 200 $\mu\text{g/L}$ de zinc (très forte acquisition de tolérance, forte diminution de la biomasse, développement plus lent, etc.).

Bien qu'ils ne coïncident pas toujours avec un accroissement de tolérance, les descripteurs de biomasse (poids sec, biomasse algale, activité hétérotrophe) reflètent globalement l'impact des expositions métalliques sur le périphyton. On constate qu'on observe conjointement un accroissement de l'EC₅₀ (test β -glucosidase) et une diminution des paramètres descripteurs mesurés pour les niveaux hauts d'exposition au cadmium et au zinc uniquement. Selon Blanck *et al.* (2002; 1988), il est donc possible de conclure à un effet PICT pour ces deux biofilms uniquement. Cependant, l'utilisation d'une technique d'empreinte génétique (ARISA) permet de mettre en évidence des changements de structure de manière plus fine qu'une simple mesure de biomasse. En effet, un effet PICT peut tout à fait traduire des phénomènes d'adaptation, ou de sélection, ne s'accompagnant pas nécessairement de modifications de paramètres comme le poids sec ou la concentration en chlorophylle *a*.

L'ARISA permet effectivement, pour ces trois expériences d'exposition, de mettre en évidence des changements de structure des communautés bactériennes et eucaryotes liés à la présence des métaux cadmium, nickel et zinc. Ainsi, on observe une nette diminution de la diversité bactérienne. En ce qui concerne les communautés eucaryotes, la diversité tend plutôt à augmenter avec l'exposition. Ce type de phénomène a déjà été décrit dans la littérature : Serra *et al.* (2009a), par exemple, observent une augmentation de la diversité de communautés de diatomées après exposition au cuivre, qui s'explique par l'éradication par le métal (cuivre) d'une espèce dominante dans les communautés non exposées : la disparition de cette espèce dominante permet à de nombreuses autres espèces de se développer, et ce, malgré la présence de métal. L'ARISA permet aussi, pour les niveaux bas d'exposition au nickel et au zinc, de détecter des modifications de structure pour des communautés exposées mais n'ayant pas acquis de tolérance. Elle constitue donc une approche complémentaire à la mesure de tolérance par des tests de toxicité aiguë, et permet d'affiner l'appréciation grossière des modifications de structure détectées par le biais de descripteurs type poids sec, AFDW et chlorophylle *a*.

V. Conclusion

Les expériences d'exposition en microcosmes ont permis de valider la méthodologie précédemment développée, notamment la mise en évidence par le biais du test β -glucosidase d'une acquisition de tolérance de biofilms exposés à des concentrations environnementales en métaux, et la mise en évidence par l'utilisation de la technique ARISA de modifications de la structure des communautés périphytiques bactériennes et eucaryotes. Les résultats ont aussi permis de confirmer que l'apparition d'un palier d'inhibition était bien une réponse biologique des communautés impactées par des métaux. L'ensemble de ces résultats montre donc que la méthodologie PICT développée peut être utilisée pour étudier des effets PICT sur des biofilms exposés à une multi-contamination urbaine *in situ*. Du fait de la présence probable de co-tolérances, dont un exemple est mis en évidence ici en microcosme entre le zinc et le cadmium, il ne sera sans doute pas possible de relier l'acquisition de tolérance à un métal au niveau de contamination de ce même métal *in situ* ; en revanche, une contamination multi-métallique peut être considérée dans son ensemble pour étudier la réponse biologique du périphyton.

Cette étude a fait l'objet d'une publication (**Low exposure levels of urban metals induce heterotrophic community tolerance: a microcosm validation**, Fechner L.C., Gourlay-Francé C., Tusseau-Vuillemin M.-H.) soumise à *Ecotoxicology* en octobre 2010.

Chapitre 5. Applications *in situ*



I. Application de la méthodologie PICT dans un gradient de pollution urbaine multi-métallique

1. Objectif et schéma expérimental

L'objectif de cette première application de la méthodologie développée est de mettre en évidence *in situ* les effets d'un gradient de contamination urbaine, entre autres multi-métallique, sur des communautés périphytiques naturelles.

Cette première expérience de terrain s'est déroulée au cours de l'été 2009 sur trois sites localisés le long de la Seine : le site de Marnay, à 200 km en amont de l'agglomération parisienne, (Strahler : 6, débit moyen annuel 50 m³/s), et les sites de Bougival (Strahler : 7, débit moyen annuel 184 m³/s) et de Triel (Strahler : 8, débit moyen annuel 340 m³/s) situés tous les deux en aval de Paris (Bourgeault 2010; 2010b). Les biofilms ont été prélevés simultanément après environ un mois de colonisation sur les trois sites (Figure 48).

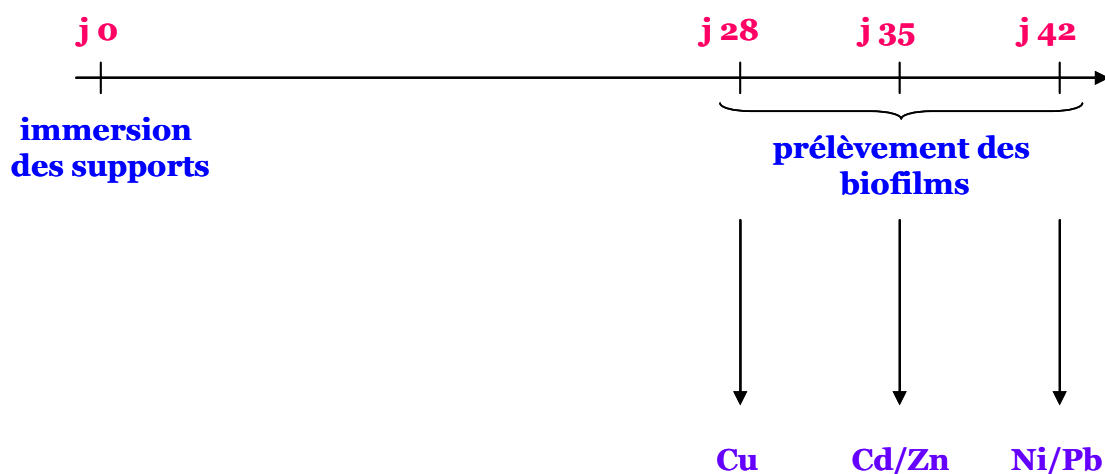


Figure 48 : Schéma de l'expérience de terrain dans un gradient de contamination urbaine le long de la Seine. A j0, les membranes LDPE – support de colonisation du périphyton – sont immergées dans la rivière sur les trois sites. Les communautés sont prélevées en trois fois après 28, 35 et 42 jours de colonisation. A chaque prélèvement, la tolérance à un ou deux métaux des biofilms des trois sites est évaluée par le test β -glucosidase.

2. Résultats

2.1 Paramètres physico-chimiques de l'eau de la Seine sur les trois sites au cours de l'expérience

Les trois sites ayant fait l'objet d'une campagne annuelle, les paramètres physico-chimiques de l'eau ont pu être moyennés sur la période de colonisation *in situ* des biofilms¹⁹ (Tableau 19). Ces valeurs moyennes correspondent en effet aux ordres de grandeur des moyennes annuelles mesurées sur les trois sites (Priadi *et al.* 2010a). On remarque que les paramètres physico-chimiques dans leur ensemble tendent à augmenter de l'amont vers l'aval, à l'exception du pH qui diminue. L'effet de l'urbanisation en aval est visible avec une acidification de l'eau et l'augmentation de paramètres tels que le COP, le COD, la concentration en nitrates et en phosphates. On note de plus une augmentation de la concentration en MES de l'eau en aval, notamment sur le site de Bougival.

Paramètres	Marnay	Bougival	Triel
Na ⁺ (mg/L)	8.23 (± 2.33)	15.78 (± 0.75)	20.76 (± 1.37)
NH ₄ ⁺ (mg/L)	0	1.12 (± 1.57)	1.64 (± 2.29)
K ⁺ (mg/L)	2.17 (± 0.19)	4.45 (± 0.14)	5.67 (± 0.38)
Mg ²⁺ (mg/L)	5.06 (± 2.20)	8.04 (± 1.96)	8.38 (± 0.40)
Ca ²⁺ (mg/L)	83.13 (± 9.35)	90.63 (± 5.31)	97.01 (± 3.87)
Cl ⁻ (mg/L)	19.12 (± 5.46)	31.90 (± 2.50)	40.43 (± 1.90)
NO ₃ ⁻ (mg/L)	15.14 (± 3.43)	20.25 (± 4.72)	31.50 (± 2.11)
SO ₄ ²⁻ (mg/L)	16.73 (± 2.36)	42.02 (± 3.27)	50.53 (± 0.88)
HCO ₃ ⁻ (mg/L)	217.57 (± 19.61)	229.77 (± 9.32)	239.93 (± 9.32)
SiO ₂ (mgSiO ₂ /L)	6.45	11	13.15
P-PO4 (mg/L)	< 0.06	0.14	0.14
T (°C)	19.03 (± 2.65)	21.1 (± 1.54)	20.37 (± 1.52)
pH	8.16 (± 0.09)	7.56 (± 0.31)	7.58 (± 0.03)
COD (mg/L)	2.15 (± 0.09)	3.60 (± 0.64)	4.35 (± 0.97)
Conductivité (µS/cm)	473 (± 64)	588 (± 33)	564 (± 181)
MES (mg/L)	8.11 (± 2.89)	11.37 (± 5.24)	10.10 (± 2.81)
COP (mg/L)	0.31 (± 0.22)	0.96 (± 0.57)	0.97 (± 0.27)

Tableau 19 : Principaux paramètres physico-chimiques de l'eau sur les sites de Marnay, Bougival et Triel. Les moyennes (et écarts-types figurant entre parenthèses) sont calculées à partir des valeurs obtenues pour trois prélèvements en mai, juin et juillet 2009.

Si un gradient est visible pour la majorité des paramètres mesurés entre l'amont et l'aval, les deux sites aval ont des caractéristiques physico-chimiques similaires, ce qui s'explique par leur proximité géographique, même si le site de Triel se situe en aval de la confluence de l'Oise avec la Seine.

¹⁹ Moyenne sur trois prélèvements réalisés entre mai et juillet 2009, période correspondant à cette expérience.

2.2 Gradient de contamination multi-métallique dans la Seine sur les trois sites au cours de l'expérience

De même, la contamination multi-métallique en termes de concentrations en métaux totaux, dissous et labiles²⁰, a été moyennée sur les trois sites pendant la période correspondant à cette expérience (Figure 49 et tableau de valeurs en annexe).

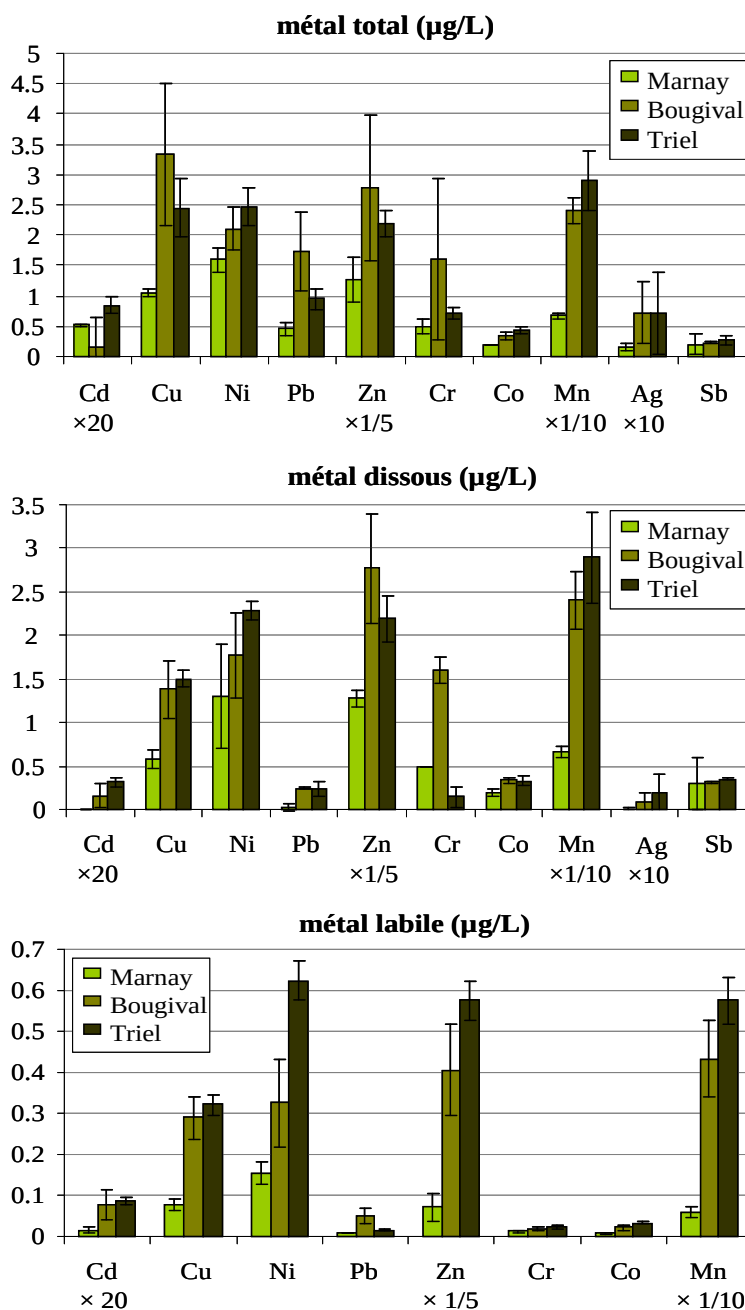


Figure 49 : Histogrammes des concentrations en métaux totaux, dissous et labiles (µg/L) sur les trois sites. Les barres d'erreur représentent les écarts-types ($\pm \sigma$) sur les valeurs correspondant aux trois prélèvements réalisés entre mai et juillet.

²⁰ Les concentrations en métaux totaux, dissous et labiles ont été mesurées mensuellement sur les trois sites au cours de la campagne annuelle dont ils ont fait l'objet. Chaque mois, les concentrations en métaux labiles ont été mesurées à partir de trois DGT (immergées dans la rivière pendant un mois). Les concentrations labiles figurant de la Figure 49 sont les moyennes arithmétiques des trois valeurs de métaux labiles calculées pour chaque prélèvement par exploitation des DGT.

On note une augmentation des concentrations en métaux de l'amont à l'aval, le long de la rivière, avec des niveaux de contamination en général très similaires pour les deux sites en aval de Paris. Pour certains paramètres (cuivre, cadmium, plomb, zinc et chrome total, ainsi que plomb dissous et labile), les concentrations sont plus élevées sur le site de Bougival que sur le site de Triel ; cependant les différences de concentrations entre les deux sites en aval de Paris ne sont pas significatives, comme on peut le voir avec les écarts-types sur les trois prélèvements considérés. On note que les niveaux de contamination restent faibles par comparaison à d'autres sites fortement impactés, par exemple par l'exploitation de mines ou d'usines de production de métaux comme le Riou Mort en France (par exemple Duong *et al.* 2008; Morin *et al.* 2008b) ou la rivière Dommel en Belgique (par exemple Admiraal *et al.* 1999; Ivorra *et al.* 2002a; Ivorra *et al.* 2000; Lehmann *et al.* 1999). Aussi, pour le cadmium, le plomb et le nickel, les concentrations mesurées sur les deux sites les plus contaminés (Bougival et Triel) sont inférieures aux NQE mentionnées dans la DCE (Directive 2008 : respectivement 0.25, 7.2 et 20 $\mu\text{g/L}$, en considérant une eau de dureté $> 200 \text{ mg/L}$ pour le cadmium).

On retrouve globalement le gradient de contamination métallique dans les concentrations en métaux accumulés par les biofilms prélevés à j 35 sur les trois sites (Figure 50).

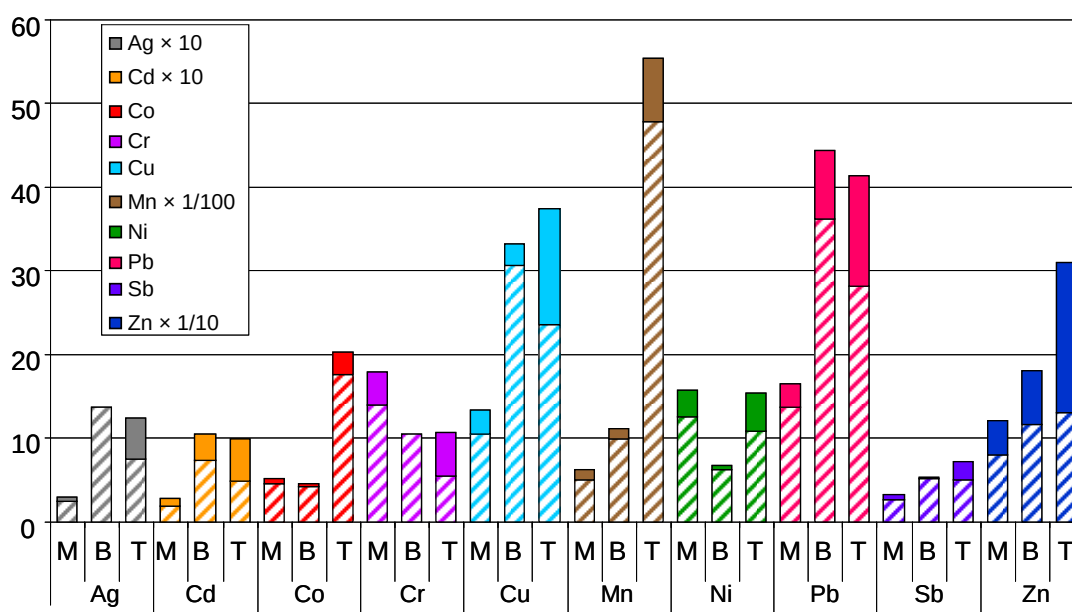


Figure 50 : Concentrations en métaux totaux en $\mu\text{g}_{\text{méta}}/\text{l/g}$ de poids sec dans les biofilms prélevés sur les trois sites. La proportion en métaux intracellulaire est représentée en hachuré.

En effet, on remarque que les concentrations en métaux accumulés mesurées sur le biofilm de Marnay sont toujours inférieures à celles observées pour les biofilms prélevés en aval, à l'exception du cobalt, du chrome et du nickel (pour ce dernier on obtient des niveaux équivalents dans le biofilm de Triel). Pour certains métaux, la quantité accumulée est similaire sur

les deux sites situés en aval de Paris (argent, cadmium, chrome, cuivre, plomb) ; pour d'autres, il y a une nette différence entre ces deux sites (cobalt, manganèse, zinc). L'accumulation de métaux par les biofilms reflète donc probablement des mécanismes complexes dépendant à la fois de la composition biologique de la communauté (par exemple de la capacité des micro-organismes à accumuler les métaux intracellulaires) et de la composition de la matrice d'exo-polysaccharides, dont les propriétés chélatantes pour les métaux sont avérées (Chapitre 1).

Métaux accumulés dans les biofilms	Métal correspondant		
	Total	dissous	labile
Cu total	0.93	1	1
Cu intracellulaire	1	0.95	0.95
Cd total	0.90	0.95	1
Cd intracellulaire	0.98	0.83	0.94
Ni total	-0.19	-0.08	-0.06
Ni intracellulaire	-0.36	-0.25	-0.23
Pb total	0.92	1	0.75
Pb intracellulaire	0.98	0.97	0.86
Zn total	0.61	0.90	0.90
Zn intracellulaire	0.86	1	1
Cr total	-0.77	-0.92	-0.98
Cr intracellulaire	-0.07	-0.91	-0.83
Mn total	0.78	0.83	0.78
Mn intracellulaire	0.81	0.85	0.81
Co total	0.67	0.76	0.69
Co intracellulaire	0.69	0.79	0.72
Ag total	1	0.97	
Ag intracellulaire	0.94	0.83	
Sb total	0.97	0.88	
Sb intracellulaire	0.79	0.61	

Tableau 20 : Coefficients de corrélation de Pearson entre les concentrations en métaux accumulées dans les biofilms (totales et intracellulaires) et les concentrations en métal dans la rivière (total, dissous et labile). Les coefficients supérieurs à 0.8 apparaissent en gras.

En effet, dans certains cas, il est plus difficile de relier ces concentrations en métaux accumulés aux concentrations mesurées *in situ*. Ainsi, les proportions relatives en différents métaux ne sont pas forcément les mêmes selon les cas : si on a globalement plus de plomb accumulé dans les biofilms de Bougival et de Triel (en $\mu\text{g}_{\text{métal}}/\text{g}_{\text{poids sec}}$) que, par exemple, de cuivre ou de nickel, on ne retrouve pas les mêmes proportions relatives pour ces métaux dans la rivière (il n'y a pas plus de plomb que de cuivre et de nickel). Il n'est d'ailleurs pas étonnant d'observer un comportement différent du plomb, puisque la spéciation de ce métal en présence de matière organique est complexe (Lamelas *et al.* 2005; Sánchez-Marín *et al.* 2010; Slaveykova *et al.* 2003). De même, le niveau de nickel accumulé, très faible sur le site de Bougival, plus faible même que

pour le biofilm prélevé à Marnay, ne reflète pas le gradient de concentration en nickel mesuré *in situ*. Cependant, on retrouve globalement de bons coefficients de corrélations entre les concentrations accumulées et les concentrations *in situ* pour chaque métal (Tableau 20), à l'exception du nickel.

2.3 Paramètres généraux des biofilms prélevés sur les trois sites

Les descripteurs généraux des biofilms (poids sec ou DW, AFDW, concentration en chlorophylle *a*, et ratio C/N) ont été mesurés sur chaque échantillon de biofilm. Les moyennes de ces différents paramètres sur les trois prélèvements (j 25, 38 et 42) figurent dans le Tableau 21.

Paramètres	Sites	Moyenne sur trois prélèvements	Écarts-types
DW ($\mu\text{g}/\text{cm}^2$)	Marnay	3.60	1.03
	Bougival	4.18	0.77
	Triel	1.23 *	0.31
AFDW ($\mu\text{g}/\text{cm}^2$)	Marnay	0.61	0.16
	Bougival	1.59 *	0.27
	Triel	0.63	0.18
Ch <i>a</i> (mg/m^2)	Marnay	32.85	14.40
	Bougival	79.80 *	27.25
	Triel	21.15	9.30
C/N ratio	Marnay	6.93	0.25
	Bougival	6.52	0.30
	Triel	5.76 *	0.18

Tableau 21 : Moyennes (et écarts-types) des paramètres généraux décrivant le périphyton sur les trois prélèvements réalisés sur chacun des trois sites ($n=9$). * indique une différence statistique significative entre sites pour un paramètre (test de Kruskal-Wallis, suivi d'un test de comparaison deux à deux de Dunn, $p < 0.05$).

Pour ces paramètres permettant de décrire grossièrement les communautés périphytiques, on n'observe pas de gradient particulier. En effet, on mesure par exemple une densité de biofilm (en poids sec) plus faible sur le site le plus aval, et plus élevée sur le site intermédiaire (Bougival). En considérant les paramètres liés à la biomasse (en particulier AFDW et la concentration en chlorophylle *a*), on observe une différence statistique significative pour le biofilm prélevé à Bougival, dont la biomasse est plus élevée (on observe d'ailleurs aussi un poids sec plus important pour ce biofilm).

2.4 Niveaux de tolérance aux métaux des communautés hétérotrophes prélevées sur les trois sites

Les courbes dose/effet des tests de toxicité au cuivre, cadmium, zinc, nickel et plomb pour les biofilms prélevés à Marnay, Bougival et Triel sont représentées dans la Figure 51. Les niveaux de tolérance normalisés et les maxima d'inhibition de l'activité β -glucosidase figurent aussi en annexe.

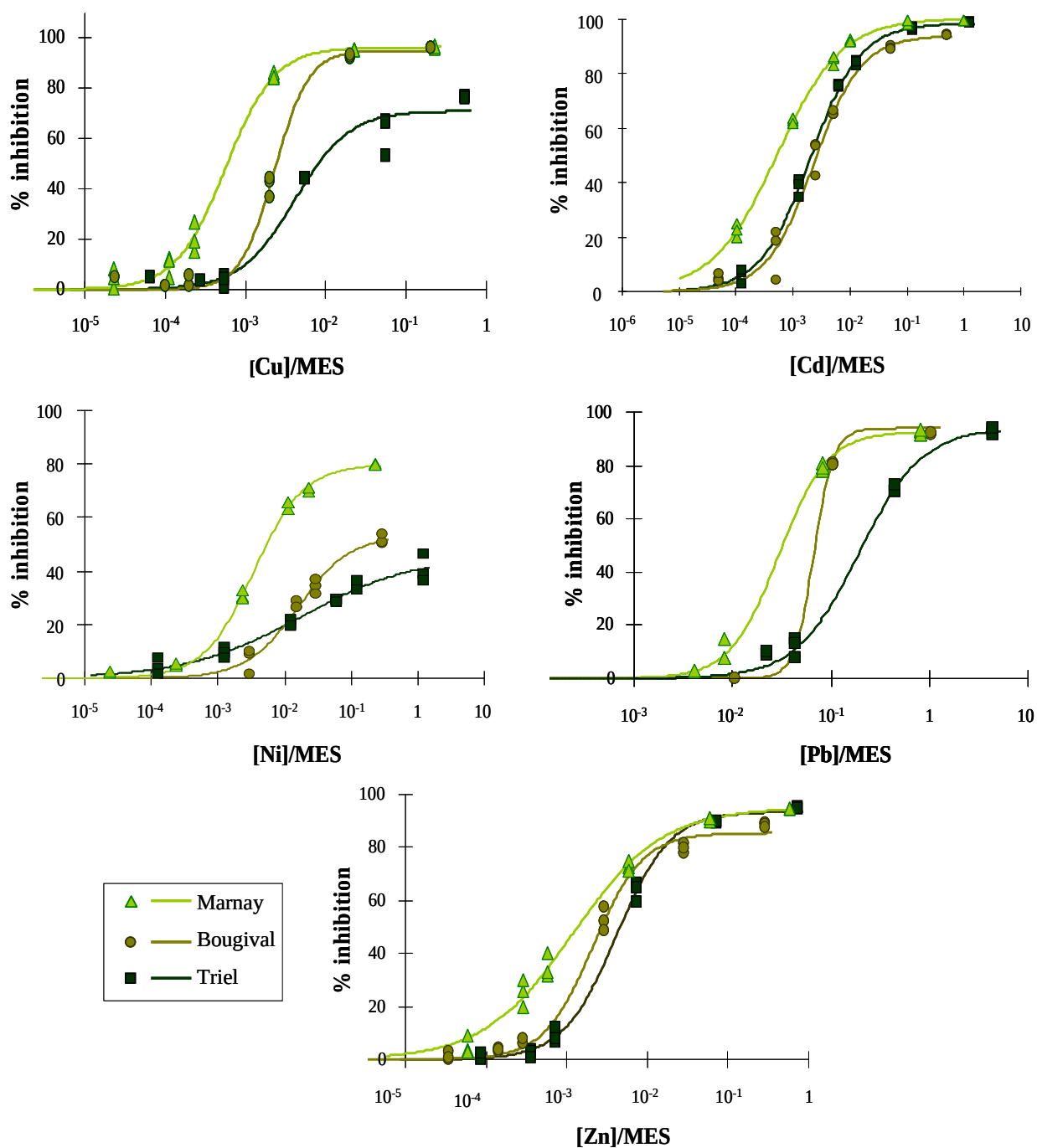


Figure 51 : Courbes dose/effet obtenues avec le test β -glucosidase sur les biofilms de Marnay, Bougival et Triel avec le Cu, Cd, Ni, Pb et Zn. Les concentrations en métaux normalisées en abscisse sont exprimées en $\text{mg}_{\text{métal}}/\text{g}_{\text{MES}}$.

On remarque une nette augmentation de la tolérance entre l'amont et l'aval, le niveau de tolérance du biofilm prélevé à Marnay étant toujours inférieur à ceux des biofilms prélevés en aval, et ce pour les cinq métaux testés. Pour le cuivre, le cadmium et le nickel, on n'observe pas de différence significative entre les niveaux de tolérance des deux biofilms prélevés en aval. On obtient néanmoins pour tous les métaux une bonne corrélation entre les niveaux de tolérance à un métal et les concentrations en ce même métal dans le milieu (Tableau 22). En effet, les coefficients de corrélations de Pearson sont élevés (> 0.7 dans tous les cas sauf pour le plomb total, le plomb labile et le pour le zinc total).

Métal	Fraction métallique		
	total	dissous	labile
Cu	0.58	0.89	0.98
Cd	0.91	0.77	0.97
Ni	0.96	0.92	0.86
Pb	0.24	0.75	-0.03
Zn	0.44	0.90	0.93

Tableau 22 : Coefficients de corrélation de Pearson entre les niveaux de tolérance à un métal (EC_{50} normalisées) et les concentrations en ce même métal dans le milieu sur les trois sites.

Enfin, on note une diminution des maxima d'inhibition le long de la Seine, bien corrélée avec l'augmentation de la tolérance pour tous les métaux, sauf pour le zinc (Tableau 23).

Métal	Coefficient de corrélation
Cu	-0.86
Cd	-0.84
Ni	-0.99
Pb	-0.99
Zn	0.11

Tableau 23 : Coefficients de corrélation de Pearson (régression linéaire simple), entre les niveaux de tolérance, exprimés en EC_{50} normalisées, et les maxima d'inhibition mesurés par le test β -glucosidase.

Pour ce métal, la corrélation est moins bonne car le palier d'inhibition est plus faible (88%) pour le biofilm prélevé à Bougival. Un cas similaire se présente pour le cadmium (palier minimal pour le biofilm de Bougival) mais l'écart entre les deux sites en aval de Paris est bien moindre (94% pour Bougival et 98% pour Triel).

2.5 Analyses multivariées

Pour aller plus loin dans l'étude des relations entre les niveaux de tolérance et les paramètres environnementaux de la rivière (non seulement les concentrations métalliques mais

aussi les paramètres physico-chimiques, qui influencent également la composition des communautés périphytiques et leurs niveaux de tolérance), des analyses multivariées des jeux de données obtenus ont été mises en œuvre. Nous avons tout d'abord cherché à mettre en évidence des corrélations entre les paramètres environnementaux, par une analyse en composantes principales (ACP) sur les paramètres environnementaux mesurés sur les trois sites aux trois dates de prélèvements de mai à juillet 2009 (Figure 52).

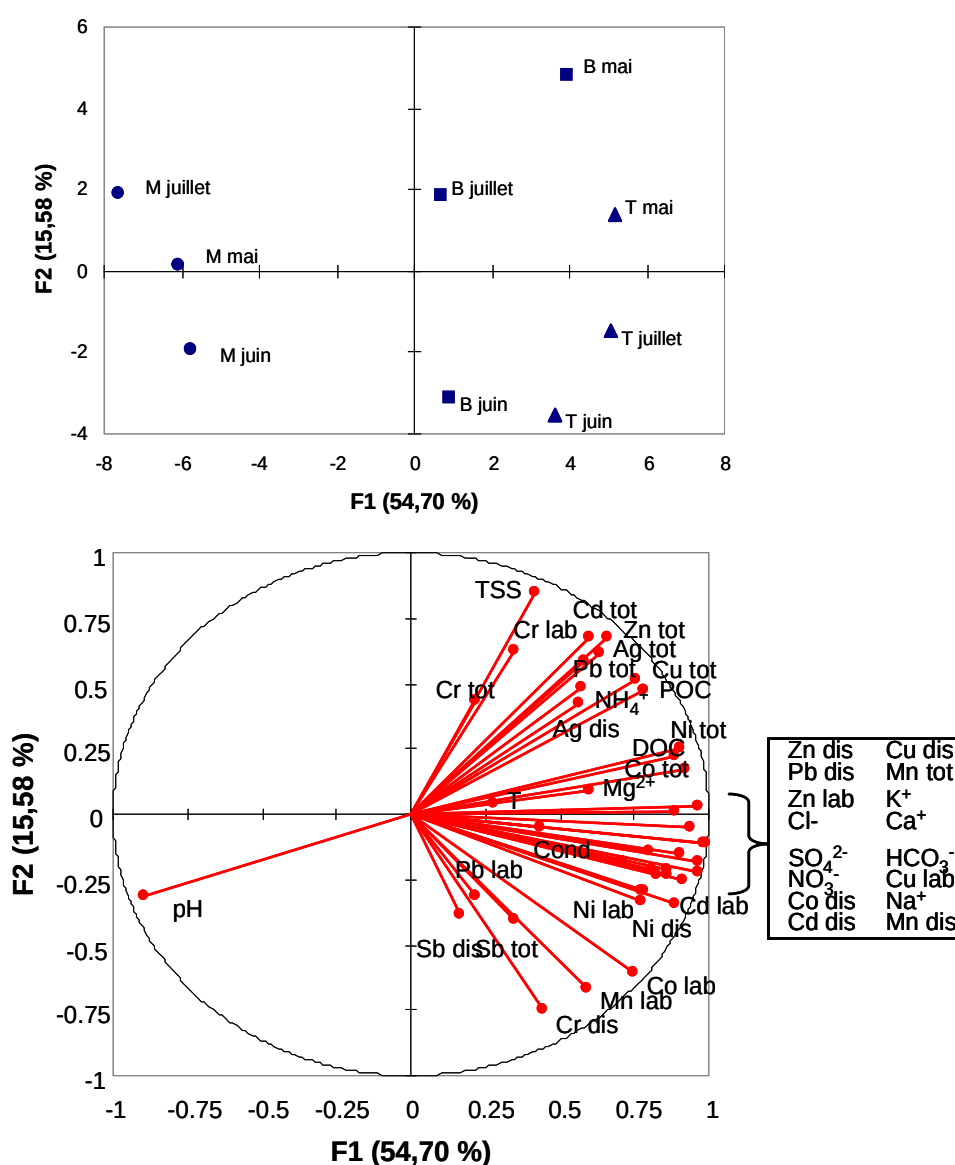


Figure 52 : Représentation des différents sites (Marnay = M, Bougival = B et Triel = T) dans le plan formé par les deux premières composantes principales et cercle des corrélations obtenus par ACP des paramètres environnementaux (concentrations métalliques et paramètres physico-chimiques) sur les trois sites aux trois dates de prélèvement de mai à juillet 2009. Les données ont été log-transformées puis normalisées avant ACP.

La première composante principale, qui porte 54.7% de la variance totale, est très fortement corrélée à la majorité des paramètres physico-chimiques (seul le pH est fortement mais négativement corrélé). Cet axe représente donc le gradient de contamination urbaine. Les

paramètres qui ne sont pas fortement corrélés à cet axe sont ceux pour lesquels on n'observe pas de fort gradient amont/aval sur la Seine (température, conductivité, la concentration en MES de l'eau, et certaines concentrations métalliques comme le chrome, l'antimoine et le plomb labile). Le second axe, porteur de seulement 15.6% de la variance totale, est plutôt corrélé aux concentrations en métaux totaux (argent, cuivre, cadmium, plomb, zinc) et certains métaux dissous et labiles (chrome, cobalt, manganèse).

L'axe 1 sépare bien les trois sites selon le gradient de contamination urbaine (Figure 52). Le site de Bougival est représenté dans la partie supérieure du plan factoriel, du fait de fortes concentrations en métaux totaux mesurées sur ce site. En revanche, on n'observe pas d'évolution temporelle nette, ce qui est assez logique compte tenu de la courte durée d'échantillonnage considérée (deux mois), et de l'absence de changement exceptionnel dans les paramètres étudiés au cours de cette période.

L'ACP des mêmes données mais moyennées sur les trois prélèvements d'eau de rivière donne des résultats tout à fait similaires (annexe). Les paramètres physico-chimiques étant fortement corrélés entre eux, nous avons choisi d'explorer uniquement la relation entre les niveaux de tolérance mesurés sur les biofilms et la contamination métallique, par une analyse de redondances (RDA). Ce type d'analyse permet d'étudier les relations entre deux types de tableaux : un tableau de variables réponses (ici les niveaux de tolérance ainsi que les paramètres descripteurs des biofilms) et un tableau de variables explicatives (ici les concentrations métalliques sur les trois sites). La RDA se ramène à une ACP de la projection de Y sur X : elle permet ainsi d'obtenir une description de X orientée vers l'explication de Y (Tenenhaus 1998). Les résultats obtenus (Figure 53) sont similaires à l'ACP : l'axe 1, porteur d'une très grande majorité de la variance (68%), est à nouveau un axe de contamination, et l'axe 2, moins significatif (32% de la variance totale), est plutôt corrélé aux concentrations en métaux totaux (chrome, plomb, cadmium, cuivre, zinc) et en plomb labile. Les trois sites sont répartis le long du premier axe selon le gradient de contamination urbaine, et le site de Bougival est situé dans la partie haute du plan, du fait des fortes concentrations en métaux totaux et plomb labile sur ce site.

La RDA permet, en outre, de visualiser les corrélations entre les concentrations métalliques et les variables réponses des biofilms : on remarque que les tolérances aux métaux sont toutes positivement et fortement corrélées entre elles d'une part, et d'autre part, qu'elles sont corrélées à l'axe de contamination métallique (axe 1).

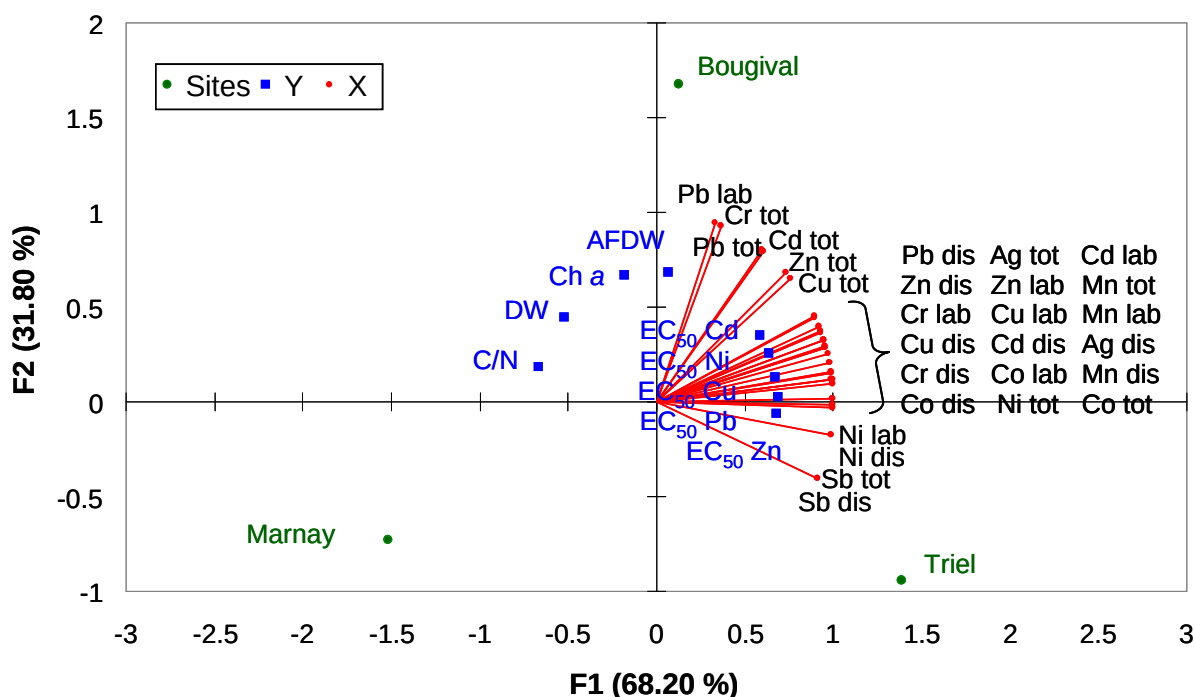


Figure 53 : RDA entre les concentrations métalliques (variables explicatives X) en métaux totaux (tot), dissous (dis) ou labiles (lab), représentés ici sous forme de vecteurs en rouge, et les niveaux de tolérance exprimés en EC_{50} normalisées ainsi que des paramètres descripteurs des biofilms (variables réponse Y).

Par ailleurs, la RDA laisse supposer que les tolérances sont plus fortement corrélées aux concentrations en métaux dissous et labiles qu'aux concentrations de la fraction totale, pour des métaux comme le cadmium, le zinc, le cuivre et le chrome. La RDA mise en œuvre avec l'ensemble des paramètres environnementaux (et non avec les seules concentrations métalliques) permet d'obtenir des résultats similaires (mais le graphe est moins lisible en raison du nombre de paramètres corrélés à l'axe 1). Une analyse des relations entre les paramètres environnementaux et les tolérances aux métaux par une régression PLS ou *Partial Least Squares* (annexe) donne d'ailleurs des résultats très similaires à la RDA.

Enfin, une RDA sur les tolérances aux métaux des biofilms prélevés sur les trois sites de l'étude (matrice Y) et les concentrations en métaux totaux et intracellulaires accumulés dans les biofilms (matrice X) permet de mettre en lumière la corrélation entre les niveaux de tolérance aux métaux et les quantités de métaux accumulés par le périphyton pour le cadmium, le cuivre, le plomb et le zinc (Figure 54). On observe aussi l'absence de corrélation entre les niveaux de nickel accumulés et la tolérance des biofilms à ce même métal, cohérente avec l'absence de corrélation observée entre la tolérance au nickel et les concentrations en nickel dans le milieu (Tableau 20).

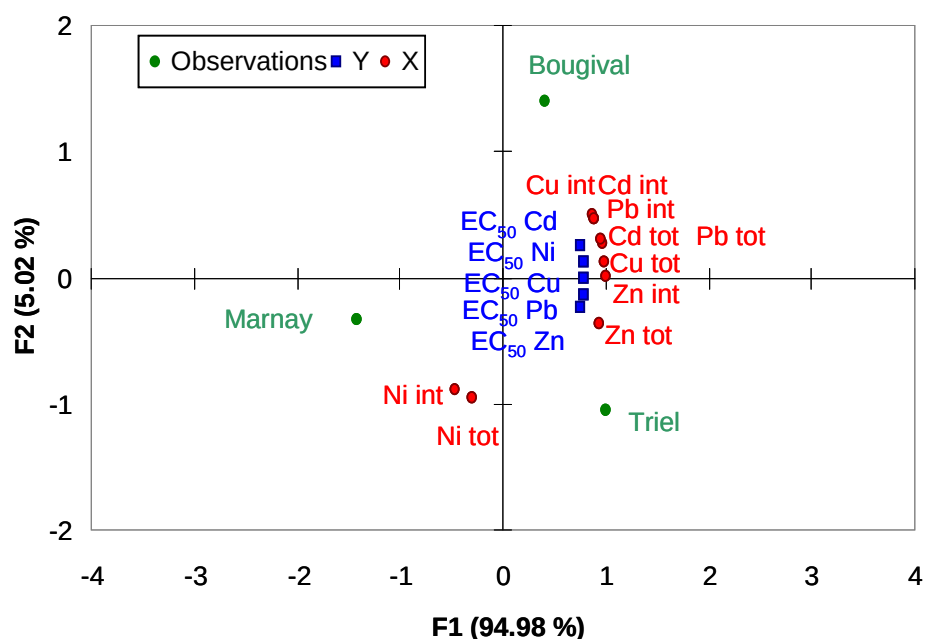


Figure 54 : RDA entre les niveaux de tolérance aux cinq métaux testés exprimés en EC_{50} normalisées (variables réponses Y) et les concentrations correspondantes en métal intracellulaire (int) et total (tot) accumulées dans les biofilms (variables explicatives X).

2.6 Profils ARISA

Les profils ARISA de chaque échantillon de biofilm sur les trois sites de Marnay, Bougival et Triel ont été obtenus (avec des triplicats pour chaque suspension de biofilm) pour chaque date de prélèvement. L'analyse nMDS de ces profils permet d'identifier des différences entre le site de Marnay d'une part, et les sites de Bougival et de Triel d'autre part, pour les communautés bactériennes (ARISA Bactérie) et eucaryotes (ARISA eucaryote, couple d'amorces euk) (Figure 55).

Ces observations sur la structure des communautés correspondent aux observations générales précédentes (contamination métallique du milieu et paramètres physico-chimiques) puisqu'on observe d'une part un contraste entre le site de Marnay et les deux sites aval, et d'autre part, des similarités entre les deux sites aval. Les profils obtenus avec le couple d'amorce diat (ARISA algues) sont moins distinguables et plus variables temporellement (par exemple les profils du biofilm de Triel prélevé le 24 juin 2006 – T1 – est très éloigné, dans le plan, des profils des biofilms du même site prélevés les 1^{er} et 8 juillet 2009 – T2 et T3). Ces résultats sont prévisibles du fait du faible nombre de pics fluorescents obtenus avec ce couple d'amorces (Chapitre 3) : on ne voit qu'une petite partie de la communauté algale, il est donc plus difficile d'identifier des différences ou similitudes entre profils.

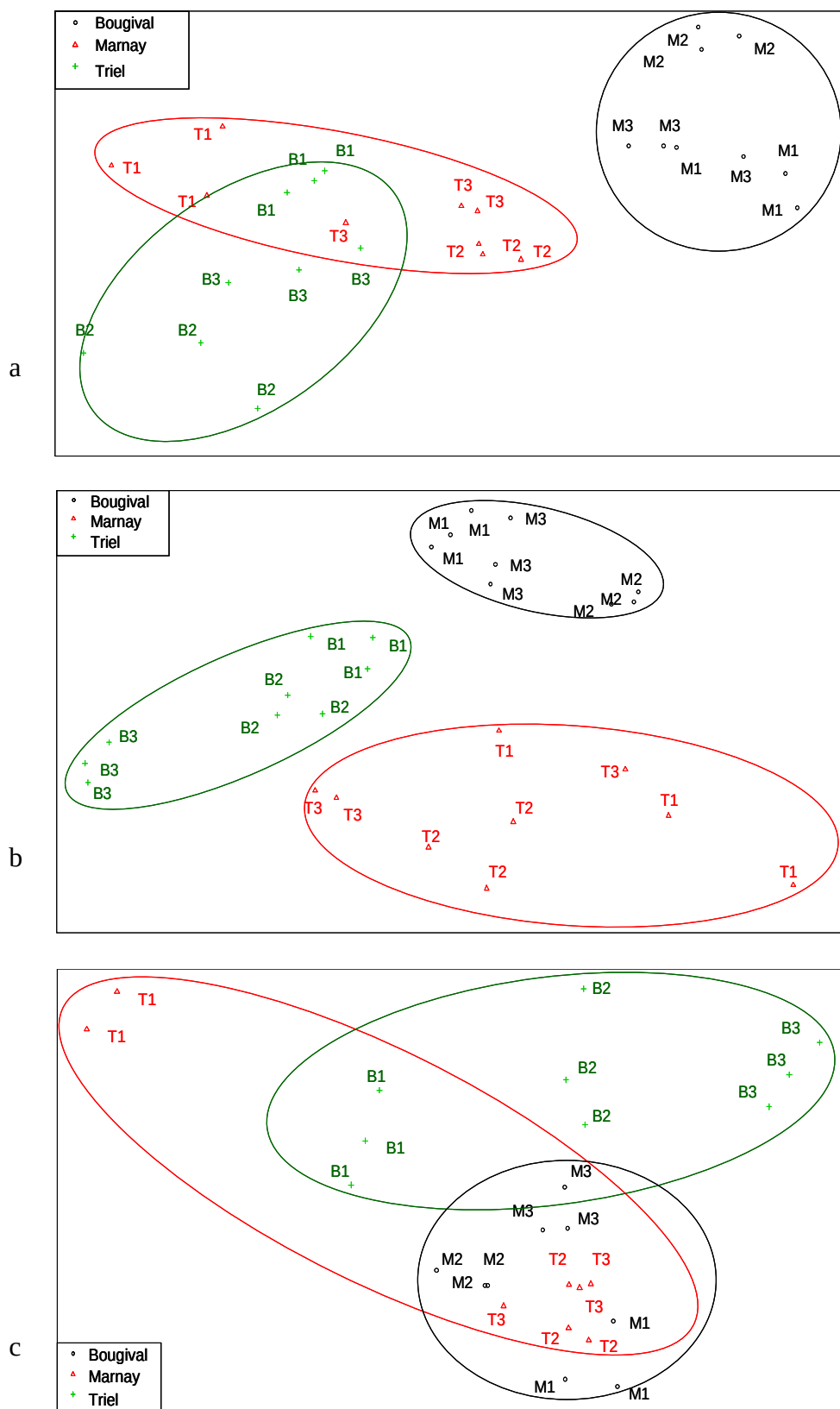


Figure 55 : Représentation nMDS des distances entre les profils génétiques des communautés a : eucaryotes (couple d'amorces euk), b : bactériennes, c : eucaryotes (couple d'amorces diat). L'analyse nMDS a été lancée à partir des matrices des distances de Manhattan. Le facteur de stress (Kruskal) est de a : 0.01, b : 0.097, c : 0.07, ce qui correspond à une ordination correcte des données (Clarke 1993).

3. Interprétation

Cette première expérience de terrain permet de mettre en évidence une réponse biologique, en termes d'acquisition de tolérance, des communautés périphytiques prélevées dans un gradient de contamination urbaine. En effet, les tolérances au cadmium, cuivre, nickel, plomb et zinc, exprimées en EC_{50} normalisées obtenues avec le test de toxicité β -glucosidase, augmentent de l'amont à l'aval de la Seine. Le traitement statistique des données obtenues permet de confirmer la corrélation positive entre les concentrations métalliques dans le milieu et la tolérance des biofilms prélevés *in situ* aux cinq métaux testés. De plus, les autres paramètres associés aux biofilms (poids sec, AFDW, concentration en chlorophylle *a* et ratio C/N) ne sont pas corrélés au gradient de contamination urbaine. La tolérance apparaît donc comme un paramètre suffisamment sensible pour détecter une réponse biologique *in situ* à une contamination urbaine, caractérisée par des concentrations faibles en métaux.

Le traitement statistique des données ne permet pas de distinguer correctement les effets biologiques liés au gradient de contamination métallique (*a priori* la tolérance aux métaux) des effets biologiques liés au reste des paramètres environnementaux, puisque la majorité de ceux-ci sont très fortement corrélés aux concentrations métalliques. En effet, le gradient de contamination urbaine induit non seulement une hausse des niveaux de la contamination en métaux, mais encore une hausse des autres paramètres environnementaux, par exemple les concentrations en nutriments (phosphates et nitrates) en aval de l'agglomération parisienne. Or, des études récentes ont montré l'influence de différents facteurs environnementaux (pH (Guasch *et al.* 2002), lumière (Guasch *et al.* 1998; Guasch & Sabater 1998), concentrations en phosphates (Serra *et al.* 2010) ou encore température (Boivin *et al.* 2005)) sur la tolérance du périphyton. Il est ainsi possible que le gradient en paramètres environnementaux (autres que les concentrations métalliques) joue un rôle non négligeable dans l'acquisition de tolérance observée de l'amont à l'aval de l'agglomération parisienne. Il convient donc d'exploiter les résultats obtenus en mettant en relation les niveaux de tolérance avec l'ensemble du gradient urbain et non avec les seules concentrations métalliques dans le milieu. Par ailleurs, dans le cas d'une exposition multi-métallique, des phénomènes de co-tolérance interviennent de manière probable (Soldo & Behra 2000 et Chapitre 4). Il ne sera donc probablement pas possible de corrélér directement la tolérance à un métal au niveau d'exposition à ce même métal. Il paraît plus intéressant d'exploiter des mesures de tolérance aux métaux en liaison avec une pression urbaine globale.

Le traitement statistique des données par analyses multivariées suggère une corrélation forte entre les tolérances et les concentrations en métaux dissous et labiles pour certains métaux

(cadmium, cuivre et zinc notamment). Ces résultats confirment la nécessité d'utiliser des échantillonneurs passifs comme les DGT afin d'évaluer les concentrations en métaux biodisponibles dans le milieu (Ferreira *et al.* 2008; Tusseau-Vuillemin *et al.* 2004) – et donc susceptibles d'induire une tolérance – pour étudier les réponses biologiques des micro-organismes des biofilms (Bradac *et al.* 2010; Guasch *et al.* 2009). Par ailleurs, les DGT sont des outils particulièrement intéressants du fait de leur caractère intégratif pour évaluer des contaminations complexes et fluctuantes *in situ*, mais aussi pour pouvoir évaluer les niveaux de contamination dans le milieu pour tous les métaux (certaines concentrations en métaux dissous sont en effet parfois inférieures à la limite de quantification).

Enfin, il est nécessaire de souligner que cette expérience confirme la très grande sensibilité des mesures de tolérance pour évaluer la réponse biologique du périphyton à une contamination multi-métallique. En effet, si les sites de Marnay d'une part et de Bougival et de Triel d'autre part ont bien été choisis dans un gradient de contamination métallique, les niveaux de contamination en aval de Paris restent faibles au regard d'autres sites étudiés dans la littérature et des NQE proposées par la DCE pour le cadmium, le plomb et le zinc. Ainsi, certaines équipes ont pu mettre en évidence une augmentation de la tolérance des communautés bactériennes périphytiques prélevées *in situ* dans un gradient de contamination en cadmium et en zinc, avec un test d'inhibition de l'incorporation de thymidine ; mais les niveaux de contamination étaient substantiellement plus élevés, même pour les sites amont, puisqu'il s'agissait de sites impactés par des rejets miniers (Admiraal *et al.* 1999; Lehmann *et al.* 1999). Les résultats obtenus sur la Seine sont d'autant plus intéressants que la sensibilité des biofilms apparaît plus élevée *in situ* que lors des expériences d'exposition en microcosmes : en effet, on n'observait pas d'acquisition de tolérance pour un biofilm exposé au laboratoire à 20 µg/L de zinc (Chapitre 4) alors que la concentration moyenne annuelle sur le site de Bougival en zinc total est de 17 µg/L. Des effets liés à l'exposition à une multi-contamination (métaux mais aussi autres types de micropolluants) sont certainement à l'origine de cette sensibilité accrue du périphyton. En effet, il est possible qu'un mélange de composés chimiques, chacun présent à une concentration faible et n'engendrant pas d'effet à elle seule sur la communauté étudiée, ait un impact non négligeable par additivité des effets (Arrhenius *et al.* 2004). Les phénomènes de co-tolérance liés à cette multi-contamination métallique sont peut-être aussi à l'origine de cette sensibilité accrue.

4. Conclusion

Cette première expérience de mesure des niveaux de tolérance par le test β -glucosidase sur périphyton collecté *in situ* a permis de mettre en évidence une acquisition de tolérance aux métaux pour des biofilms prélevés dans un gradient de contamination multi-métallique. Bien que la majorité des paramètres environnementaux soient corrélés et qu'il soit donc difficile de distinguer les effets liés aux concentrations métalliques des effets liés au reste des paramètres environnementaux, les niveaux de tolérance traduisent une modification des communautés périphytiques le long de la rivière sous l'effet du gradient urbain. Cette étude met aussi en lumière certaines difficultés à relier les niveaux d'exposition *in situ* et l'accumulation des métaux par les communautés périphytiques, par exemple dans le cas du nickel. Par ailleurs, la diminution des maxima d'inhibition mesurés par le test β -glucosidase avec le gradient de contamination confirme les résultats précédemment obtenus, notamment au cours d'expositions en microcosmes (Chapitre 2 et Chapitre 4) : en effet, les paliers d'inhibition apparaissent uniquement pour les biofilms prélevés dans les sites plus impactés (Bougival et Triel), qui sont les plus tolérants aux métaux. Cependant, dans le cadre plus complexe d'une étude de terrain, il reste difficile d'interpréter cette réponse des biofilms, par exemple dans le cas du zinc, métal pour lequel on observe un palier d'inhibition pour le biofilm de Bougival et non pour le biofilm de Triel, ce dernier étant pourtant significativement plus tolérant (au zinc) que le premier. La réponse biologique constituée par le palier d'inhibition apparaît donc moins sensible que l'acquisition de tolérance (on ne l'observe pas systématiquement pour les biofilms prélevés en aval). La tolérance, en revanche, apparaît comme un indicateur biologique de perturbations urbaines particulièrement sensible du fait des faibles niveaux de contamination métallique sur les sites en aval de l'agglomération parisienne. Les résultats obtenus sont ainsi encourageants en vue d'une future utilisation du périphyton comme indicateur d'une pression d'origine urbaine.

Cette étude fait l'objet d'un article (*In situ* evidence of PICT effects at EQS exposure concentrations, Fechner L.C., Gourlay-Francé C., Bourgeault A., Tusseau-Vuillemin M.-H.) en préparation (voir annexe).

II. Variabilité des niveaux de tolérance de communautés transposées

1. Objectif et schéma expérimental

L'objectif de l'expérience de transposition est de mettre en évidence *in situ* l'acquisition – transposition de l'amont à l'aval – et la disparition (ou résilience) – transposition de l'aval à l'amont – de la tolérance aux métaux de communautés périphytiques naturelles. Il s'agit, de plus, de vérifier si les modifications des niveaux de tolérance sont visibles au bout de seulement quelques semaines d'adaptation au nouveau milieu.

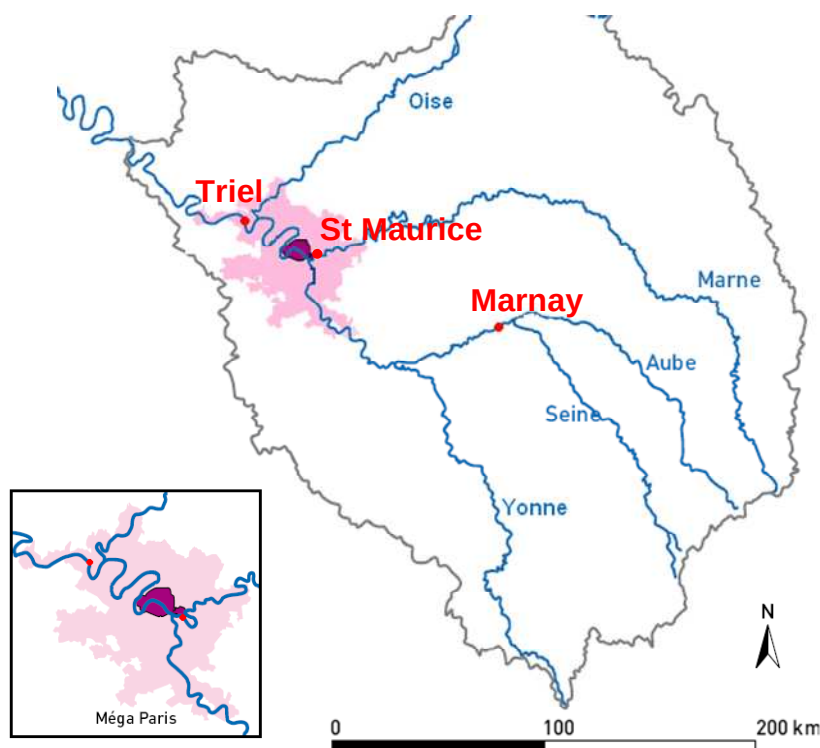


Figure 56 : Carte du bassin de la Seine représentant les sites de l'expérience de transposition de biofilms : le site amont (Marnay) et les deux sites aval (Saint-Maurice et Triel).

Pour atteindre ces objectifs, nous avons choisi de travailler sur la tolérance au cuivre de communautés périphytiques prélevées dans de grands fleuves urbains dans le bassin de la Seine. Le site amont est le site de Marnay sur la Seine, et les sites situés en aval sont Triel sur la Seine (transposition de l'amont à l'aval) et Saint-Maurice sur la Marne (transposition de l'aval vers l'amont). Ainsi, au commencement de l'expérience (j 0), des membranes colonisées par du

périphyton, prélevées sur le site de Marnay, ont été transposées sur le site de Triel. Le lendemain (j1), des membranes colonisées, prélevées sur le site de Saint-Maurice²¹ sur la Marne, ont été transposées sur le site de Marnay (Figure 56).

Pour la transplantation, les membranes prélevées sur le terrain ont été mises dans un contenant en plastique propre (préalablement lavé à l'acide et rincé à l'eau distillée) rempli d'eau du site de provenance et conservé lors du trajet dans une glacière. Les biofilms transposés ont ensuite été prélevés au bout de deux (j 15) puis quatre semaines (j 30) de colonisation dans leur nouveau milieu. En parallèle, des biofilms non transposés (sites de Saint-Maurice, de Triel et de Marnay) ont aussi été prélevés. La tolérance au cuivre de ces biofilms a été testée (test β -glucosidase) et les changements de structure ont été mis en évidence par la technique ARISA.

Par la suite, nous noterons **t Marnay** et **t Saint-Maurice** les biofilms transposés à partir de ces deux sites, à savoir des biofilms transposés à Triel et à Marnay respectivement.

2. Résultats et discussion

2.1 Mesures des niveaux de tolérance au cuivre

Les EC_{50} normalisées et pourcentages maximum d'inhibition calculés à partir des courbes dose/effet sont représentés dans les Figure 57 et Figure 58 .

On remarque que les niveaux de tolérance au cuivre sont significativement plus faibles pour les biofilms prélevés en amont (biofilms de Marnay et t Saint-Maurice). Ceci confirme les résultats obtenus précédemment (partie I de ce chapitre) puisque la tolérance au cuivre du biofilm de Marnay est plus faible que celle du biofilm de Triel. En outre, la communauté prélevée en aval à Saint-Maurice et transposée en amont à Marnay (t Saint-Maurice) a un niveau de tolérance au cuivre comparable à celui du biofilm amont originel (Marnay), et ce, au bout de 15 jours seulement après la transposition.

En parallèle, on remarque aussi que le biofilm transposé en aval (t Marnay) sur le site de Triel a un niveau de tolérance au cuivre comparable à celui de Saint-Maurice, et significativement plus élevé que la communauté parente non transposée (biofilm de Marnay).

²¹ En raison de la perte accidentelle des membranes colonisées à Triel, nous avons dû transposer à Marnay un biofilm en provenance du site de Saint-Maurice. A l'origine, l'expérience était prévue avec un unique site aval (Triel).

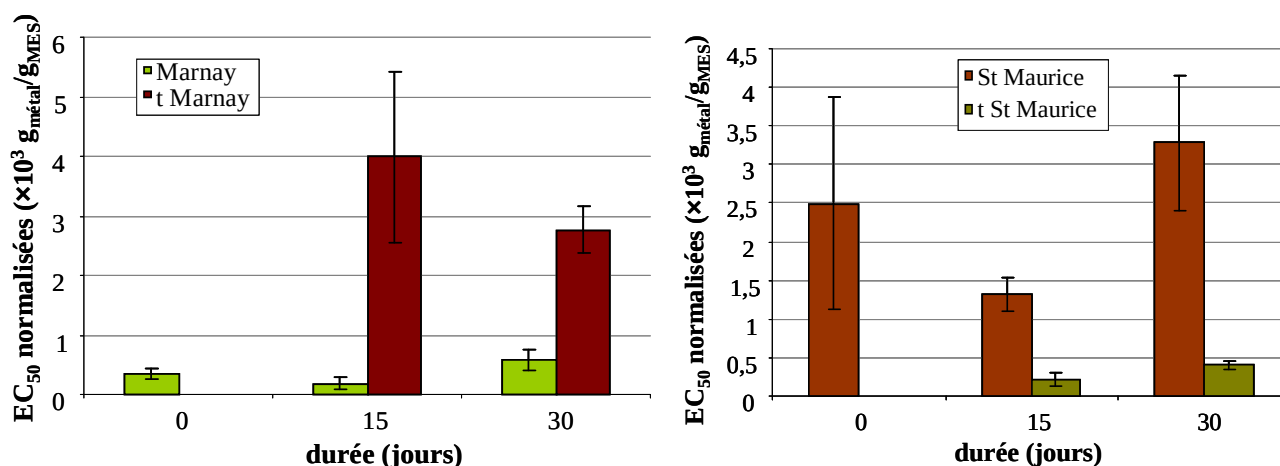


Figure 57 : Histogrammes des EC_{50} normalisées des biofilms a) de Marnay et t Marnay(transposé à Triel) et b) de St Maurice et t St Maurice (transposé à Marnay) à j 0, j 15 et j 30 jours après la transposition. Les barres d'erreur représentent les intervalles de confiance à 95%. Les EC_{50} normalisées (en $g_{\text{métal}}/g_{\text{MES}}$) ont été multipliées par 10^3 pour plus de clarté.

Le suivi des niveaux de tolérance au cuivre du biofilm de Saint-Maurice (non transposé) montre une grande variabilité de ces niveaux sur une période de 30 jours (Figure 57). Cependant, cette variabilité reste cohérente au vu des intervalles de confiance à 95% (les biofilms prélevés à j 0 et j 15 d'une part, à j 0 et j 30 d'autre part, ont des niveaux de tolérance non significativement différents du fait du chevauchement des intervalles de confiance). Par ailleurs, les niveaux de tolérance mesurés sur les communautés prélevées sur le site de Saint-Maurice restent significativement plus élevés que ceux mesurés en amont, sur le site de Marnay (biofilm du site et biofilm transposé sur le site).

En ce qui concerne les pourcentages maximum d'inhibition (Figure 58) calculés à partir des courbes dose/effet des tests β -glucosidase, on observe un pourcentage maximum d'inhibition assez variable pour les communautés prélevées à Marnay à j 0, j 15 et j 30 avec une baisse significative à 15 jours, et un niveau de base (à j 0) plus faible que pour les autres biofilms. Dans la mesure où ce maximum d'inhibition a été identifié comme une réponse biologique à une contamination (Chapitres 2 et 4), il est plutôt surprenant d'obtenir des niveaux plus faibles, à j 0 et j 15, pour cette communauté (prélevée en amont) ; elle est en effet la communauté la plus sensible aux métaux (niveau de tolérance le plus faible, Figure 57), car la moins exposée. Cependant, le pourcentage maximum d'inhibition de ce biofilm devient comparable à celui mesuré pour les autres communautés à j 30. Dans le cadre de cette expérience, il n'y a donc pas de lien entre les deux réponses biologiques mesurées : le niveau de tolérance et le palier d'inhibition. Par exemple, les deux communautés transposées (l'une à Marnay, l'autre à Triel) ont des maxima d'inhibition similaires.

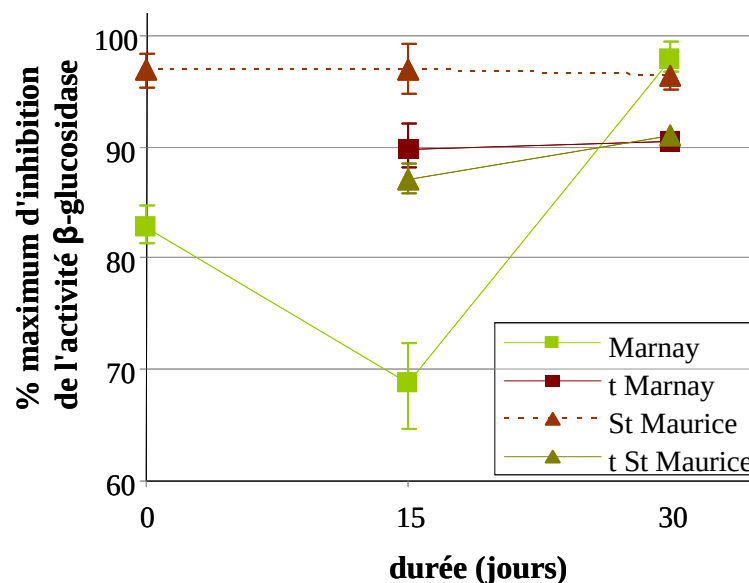


Figure 58 : Pourcentages maximum d'inhibition de l'activité β -glucosidase calculés à partir des courbes dose/effet obtenues pour les biofilms transposés (t Marnay à Triel et t Saint-Maurice à Marnay) et non transposés (Saint-Maurice et Marnay) à j 0, j 15 et j 30 après la transposition. Les barres d'erreur représentent les intervalles de confiance à 95%.

2.2 Paramètres descripteurs des biofilms

Les descripteurs généraux des biofilms (poids sec ou DW, AFDW, concentration en chlorophylle *a*, et ratio C/N) ont été mesurés sur chaque échantillon de biofilm. Les moyennes de ces différents paramètres sur les trois prélèvements (j 0, j 15 et j 30) figurent dans le Tableau 24.

Paramètre	Site	j 0	j 15	j 30
DW (mg/cm ²)	Marnay	2.37 ($\pm$ 0.06)	9.07	2.48
	t Marnay		1.54	1.96
	St Maurice	4.65 ($\pm$ 0.06)	6.47	4.49
	t St Maurice		9.26	4.71
AFDW (mg/cm ²)	Marnay	0.31 ($\pm$ 0.005)	1.12	0.41
	t Marnay		0.51	0.7
	St Maurice	1.08 ($\pm$ 0.05)	1.23	1.41
	t St Maurice		1.19	0.88
Ch <i>a</i> (mg/m ²)	Marnay	21.04 ($\pm$ 1.37)	46.56 ($\pm$ 2.86)	24.95 ($\pm$ 2.19)
	t Marnay		56.18 ($\pm$ 3.24)	65.01 ($\pm$ 10.79)
	St Maurice	122.68 ($\pm$ 13.13)	124.87 ($\pm$ 5.52)	85.34 ($\pm$ 10.52)
	t St Maurice		56.31 ($\pm$ 4.95)	36.2 ($\pm$ 1.11)

Tableau 24 : Paramètres généraux décrivant le périphyton aux trois dates de prélèvement (j 0, j 15 et j 30) pour chaque biofilm. Les écarts-types sont indiqués pour les cas où des triplicats de mesures ont été réalisés.

Pour ces paramètres permettant de décrire grossièrement les communautés périphytiques, on n'observe pas d'effet particulier de la transplantation. Ainsi, la biomasse algale du périphyton

transposé en provenance du site de Saint-Maurice (t Saint-Maurice) diminue par comparaison au biofilm d'origine (Saint-Maurice) et reste supérieure à la biomasse algale du site de Marnay à j 15 et j 30 ; en parallèle, la biomasse algale du biofilm transposé de Marnay à Triel augmente par rapport à la communauté d'origine (Marnay). En revanche, il est plus difficile d'interpréter les valeurs de poids secs, celles-ci étant assez variables d'un prélèvement à l'autre (voir par exemple les poids secs des échantillons de Marnay), ou les valeurs d'AFDW, celles-ci étant similaires pour les biofilms prélevés à Saint-Maurice et à Marnay (transposés ou non). On remarque tout de même que le poids sec et l'AFDW du biofilm transposé à Triel (t Marnay) est plus faible que les autres, comme observé dans l'étude précédente (Tableau 21).

2.3 Analyses multivariées

Les relations entre les niveaux de tolérance mesurés sur les biofilms (transplantés ou non) et les paramètres environnementaux des sites de prélèvement, à savoir les paramètres physico-chimiques de la rivière ainsi que les concentrations en métaux totaux, dissous et labiles sur les trois sites, ont aussi été explorées par des analyses multivariées. Pour ce faire, nous avons utilisé les données collectées au cours de campagnes de prélèvement réalisées sur ces mêmes sites²² pour les concentrations en métaux (totaux, dissous et labiles), et les paramètres physico-chimiques de l'eau mesurés au cours de l'expérience à j 0, j 15 et j 30²³ (annexe).

Une ACP sur les paramètres environnementaux révèle une corrélation positive et très forte entre la majorité des paramètres (Figure 59), d'ailleurs fortement corrélés à l'axe 1, portant 78 % de la variance. En effet, les corrélations entre la première composante et les paramètres sont compris entre 0.8 et 1, à l'exception de HCO_3^- , NH_4^+ , NO_3^- et NO_2^- , variables mal représentées par le modèle (non situées sur le cercle des corrélations). Certaines variables sont assez bien corrélées avec l'axe 2 (13% de la variance), par exemple NO_3^- , le plomb labile, le chrome total, dissous et labile.

²² Dans le cadre de la thèse de doctorat d'Adeline Bourgeault (Bourgeault 2010) pour les sites de Marnay et Triel, et d'une campagne (Bioconbas) sur l'ensemble du bassin de la Seine pour le site de Saint-Maurice. Des données précises correspondant à chaque prélèvement (0, 15 et 30 jours) n'étant pas toujours disponibles, nous avons travaillé à partir de moyennes obtenues sur des prélèvements correspondant à des dates proches. Dans le cas du site de Saint-Maurice, nous avons, en particulier, dû travailler à partir de moyennes de données collectées en janvier et en septembre 2009 (alors que l'expérience de transplantation a été mise en œuvre entre fin juillet et fin août de la même année).

²³ Pour le site de St Maurice, nous avons utilisé une moyenne des valeurs obtenues à j 15 et j 30 pour j 0.

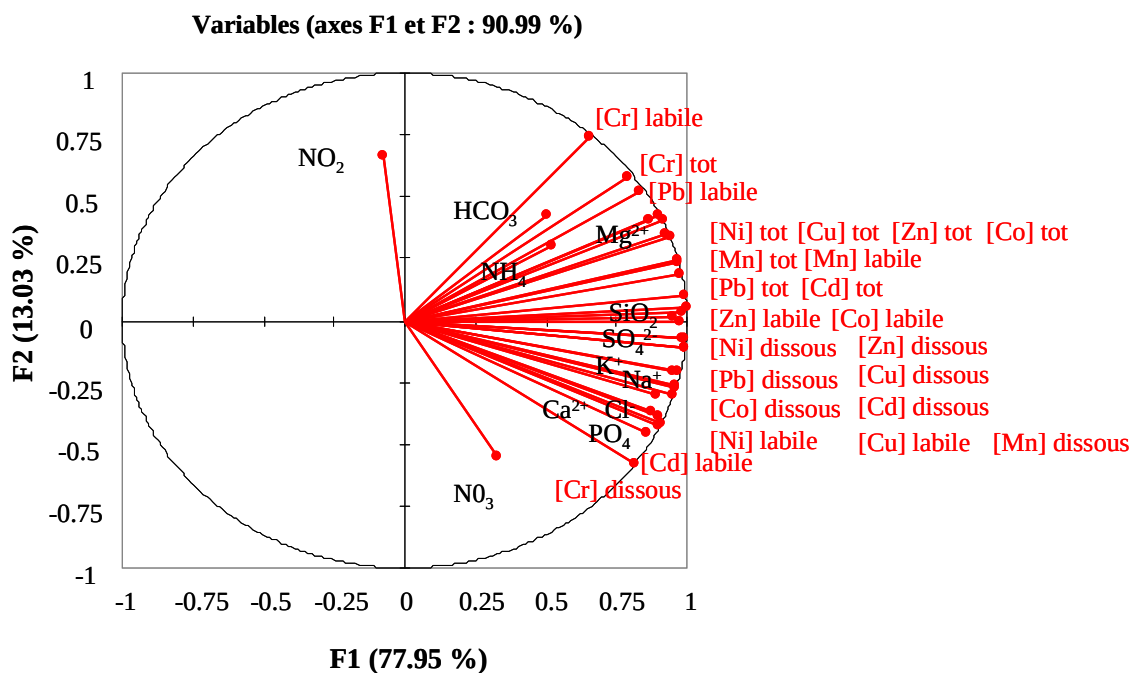


Figure 59 : Cercle des corrélations de l'ACP des données environnementales correspondant à l'expérience de transposition. Les données ont été log-transformées et normalisées.

La représentation des sites dans le plan constitué par les deux premières composantes principales permet bien de séparer les différents sites de prélèvement, le long de l'axe de contamination (axe 1, Figure 60). Les sites de Saint-Maurice et de Triel se distinguent par les valeurs des paramètres corrélés à l'axe 2, signalés ci-dessus (par exemple une concentration en nitrates plus forte à Triel, et une concentration en chrome et en plomb labile plus élevée à Saint-Maurice).

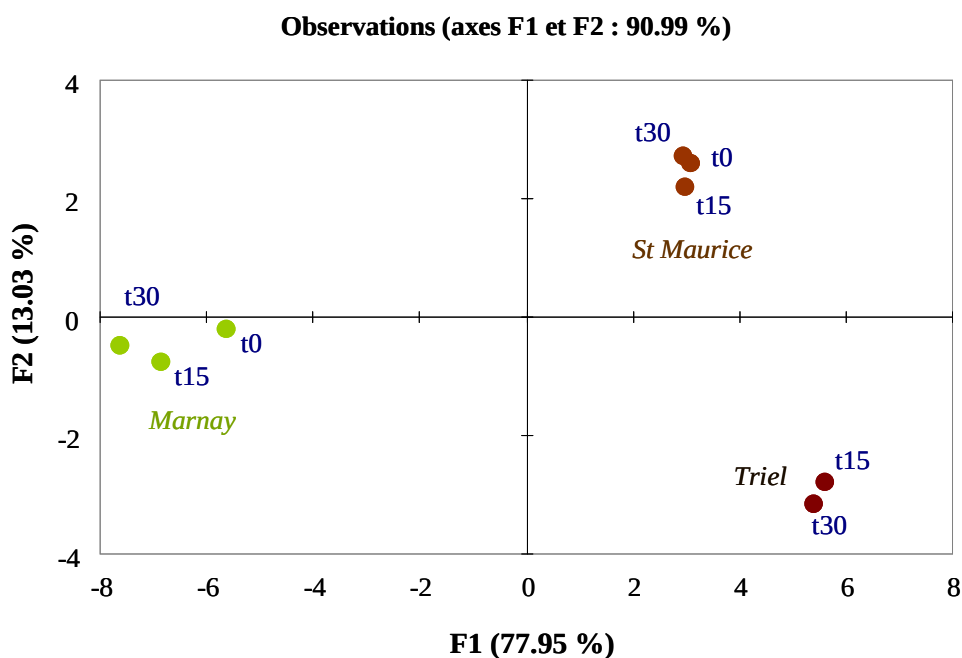


Figure 60 : Représentation graphique des différents sites dans le plan formés par les deux premières composantes principales. (Les données correspondant à Triel t0 ont été supprimées pour causes de données incomplètes).

Une régression PLS (*Partial Least Squares*) a permis d'explorer en détail les relations entre les paramètres environnementaux et les paramètres du biofilm (niveau de tolérance au cuivre, et paramètres descripteurs du type poids sec, AFDW et concentration en chlorophylle *a*). La régression PLS est une méthode d'analyse des données permettant de relier deux tableaux X et Y. Elle est tout particulièrement adaptée aux cas où le nombre de variables d'entrée X est très important, ainsi qu'aux cas où les variables d'entrées (x_j) sont corrélées entre elles²⁴. Enfin, ce type de régression permet d'évaluer la contribution de chaque variable d'entrée (x_j) aux variables réponses Y (Tenenhaus 1998). L'interprétation de la PLS se fonde sur l'analyse des poids w^*/c (correspondant aux données X/Y²⁵), qui reflètent les relations entre les variables. Les coefficients VIP (*Variable Importance in the Projection*) résument l'importance relative de chaque variable x_j du tableau X dans le modèle (Eriksson *et al.* 2006; Tenenhaus 1998).

La régression PLS des données obtenues au cours de l'expérience (log-transformées et normalisées) génère un modèle à deux composantes (Tableau 25).

	R^2_X	R^2_Y	Q^2	R^2_{tol}	Q^2_{tol}	R^2_{DW}	Q^2_{DW}	R^2_{AFDW}	Q^2_{AFDW}	$R^2_{Ch a}$	$Q^2_{Ch a}$
Comp1	0.793	0.397	0.245	0.873	0.838	0.148	-0.082	0.041	-0.187	0.524	0.413
Comp2	0.087	0.399	0.446	0.004	-0.129	0.614	0.517	0.616	0.411	0.361	0.542
cumulé	0.880	0.795	0.582	0.878	0.817	0.762	0.477	0.657	0.300	0.885	0.731

Tableau 25 : Résultats obtenus par régression PLS sur les données Y (quatre variables associées au biofilm : la tolérance – tol – le poids sec – DW – l'AFDW et la biomasse algale – Ch a) et X (paramètres environnementaux : 36 variables) pour chacune des deux composantes (Comp) et les deux composantes cumulées. Les R^2 (goodness of fit) sur les données X et Y permettent d'évaluer le % de variance de chaque tableau ou chaque variable y expliqué par le modèle alors que le Q^2 (goodness of prediction²⁶) évalue les qualités prédictives du modèle.

On remarque que le modèle explique 87.8% des variations des données de tolérance au cuivre (R^2_{tol} cumulé) entre les différents échantillons de biofilm et une part importante de la variation des données associées aux descripteurs du biofilm avec un R^2_Y cumulé de 79.5%. Les qualités prédictives du modèle sont aussi satisfaisantes pour la tolérance (81.7%), la biomasse algale (73.1%) et un peu plus faible pour le poids sec et l'AFDW : 47.7 et 30 % respectivement, ce qui reste raisonnable. La carte des poids (Figure 61) permet d'étudier les relations entre les variables ; on remarque notamment que la tolérance est peu corrélée aux autres variables associées au biofilm et fortement corrélée avec la majorité des paramètres environnementaux, notamment les concentrations métalliques dans le milieu.

²⁴ Ce qui est le cas pour des concentrations en métaux sur un même site

²⁵ Les poids traduisent la relation entre chaque composante de la régression et les données : pour la première composante t_1 , on a : $t_1 = w_1x_1 + \dots + w_{12}x_{12}$ dans le cas où on a p variables x_j et $y = c_1t_1 + y_1$ où y_1 est le résidu de la régression de y sur la première composante

²⁶ Le Q^2 est une mesure globale de la qualité de l'ajustement et de la qualité prédictive du modèle de régression, calculée par validation croisée. En général, on considère qu'un Q^2 cumulé ≥ 0.5 correspond à une réponse Y bien modélisée (Tenenhaus 1998).

Les coefficients VIP obtenus (annexe) permettent de retrouver les tendances principales identifiées sur la carte des poids : les paramètres ayant l'influence la plus faible dans le modèle (donc sur les communautés) sont NH_4^+ et NO_3^- . Il est plus difficile de faire une distinction entre les autres paramètres qui sont tous corrélés et d'importance (coefficients VIP) équivalente dans le modèle.

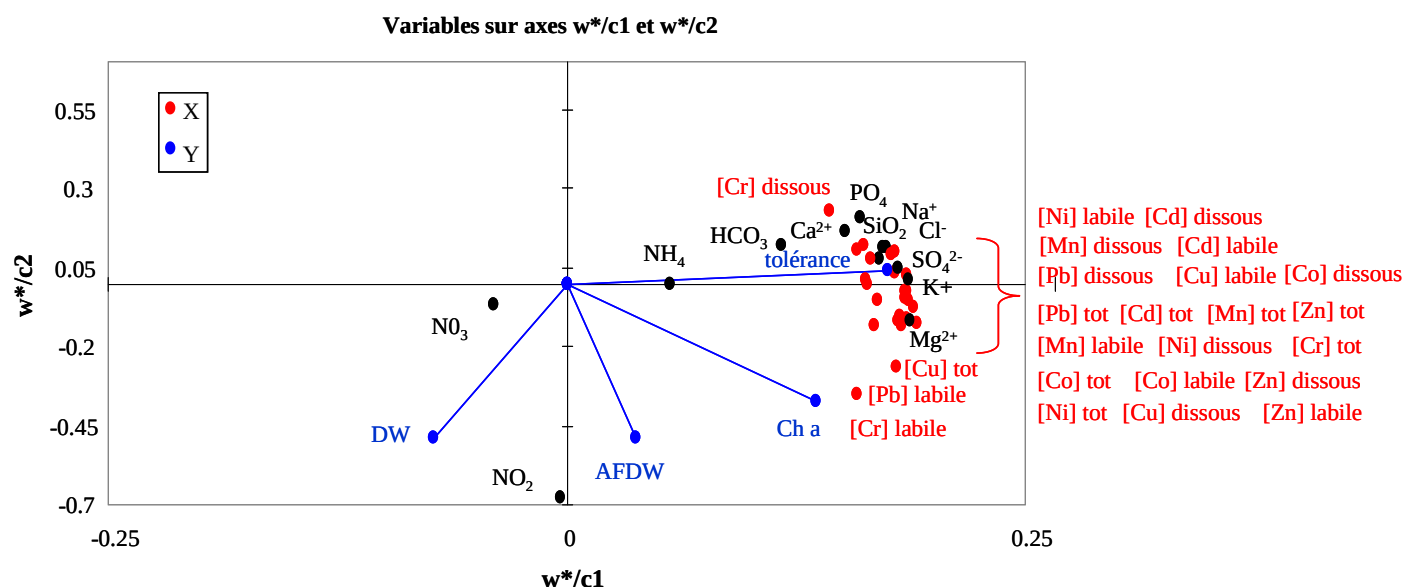


Figure 61 : Carte des poids w^* et c pour les deux composantes du modèle PLS. Pour plus de clarté, les variables réponses apparaissent en bleu, et les variables explicatives en rouge (métaux) ou en noir (paramètres physico-chimiques de l'eau).

Enfin, la régression PLS permet bien de séparer d'une part, les biofilms prélevés à Marnay (biofilms de Marnay et t Marnay) et, d'autre part, les biofilms prélevés en aval le long de l'axe 1 (première composante représentant notamment la contamination métallique) sur la Figure 62.

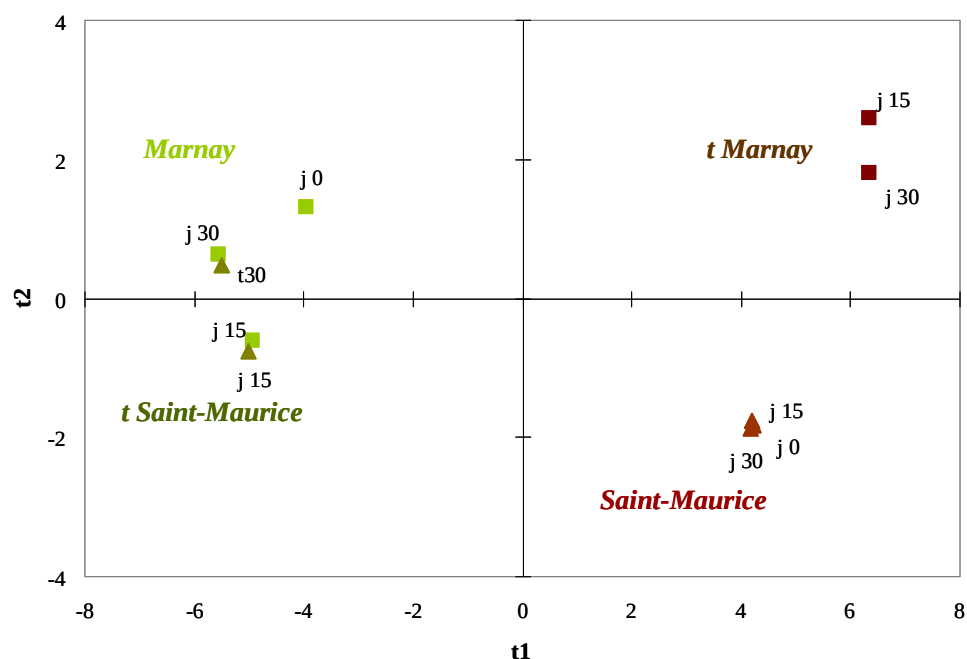


Figure 62 : Carte des observations (échantillons de biofilms) sur le plan formé par les composantes t1 et t2 du modèle PLS. Les biofilms en provenance de Marnay sont représentés par des ■ et les biofilms en provenance de Saint-Maurice par des ▲, les biofilms prélevés en amont en vert et en aval en marron.

La régression PLS permet de mettre en relation les niveaux de tolérance avec l'ensemble des paramètres environnementaux, tout en tenant compte des autres paramètres descripteurs des biofilms. Les résultats confirment les observations faites sur les variations des niveaux de tolérance et des paramètres descripteurs des biofilms avec la transposition (parties II.2.1 et II.2.2 de ce chapitre) : les biofilms transposés acquièrent au bout de seulement deux semaines des propriétés similaires à celles des communautés d'origine sur les sites de transposition, en termes de tolérance au cuivre. En revanche, les paramètres environnementaux étant tous très corrélés, il n'est pas possible de distinguer avec la régression PLS la contribution de la contamination métallique à la variation de tolérance induite par la transplantation et celle des paramètres physico-chimiques.

2.4 Profils ARISA

Les profils ARISA obtenus à partir des échantillons de biofilms prélevés à Marnay, Saint-Maurice et Triel (en triplicats²⁷) ont été traités avec le logiciel StatFingerprints (alignement des profils, normalisation des aires sous les courbes, etc., voir Chapitre 3). Les profils ARISA Bactérie obtenus présentent de nombreux pics mais des intensités de fluorescence faibles alors que les profils ARISA Eucaryote²⁸ (couple euk) sont tout à fait exploitables. Ce phénomène semble lié à la composition des échantillons et non à un problème survenu lors de la PCR (quantités d'ADN bactérien plus faibles pour les biofilms prélevés en été, présence d'inhibiteurs de PCR, etc.). Les intensités de fluorescence étant comparable pour tous les profils ARISA Bactérie, ceux-ci ont tout de même pu être exploités. On note tout de même une plus grande variabilité entre les triplicats pour les profils ARISA Bactérie.

Une ACP des profils ARISA Bactérie et Eucaryote des biofilms prélevés après 15 puis 30 jours à la suite de la transplantation, permet d'identifier des similarités dans les structures des différents biofilms, transposés ou non. La Figure 63 montre la projection des profils ARISA Bactérie dans le plan formé par les deux premières composantes principales.

²⁷ Il s'agit de triplicats de suspensions de biofilm.

²⁸ Profils ARISA obtenus avec le couple d'amorces euk. Les profils obtenus avec le couple d'amorces diat présentent peu de pics et n'ont pas été utilisés pour interpréter les modifications de structure des communautés.

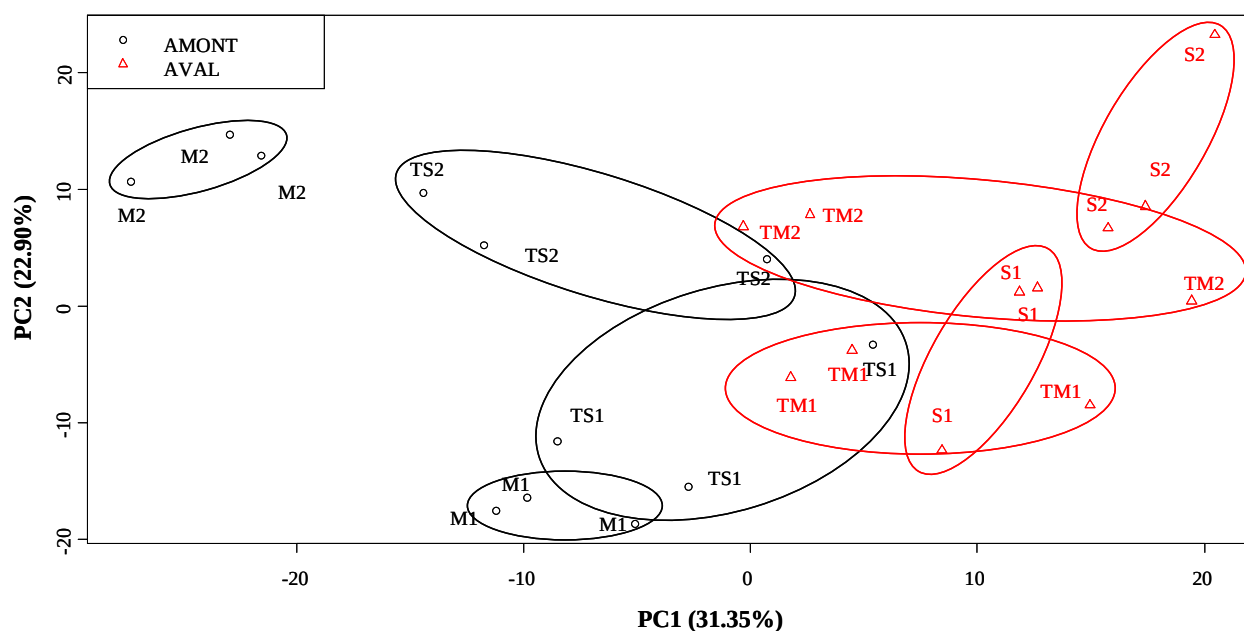


Figure 63 : ACP des profils ARISA Bactérie. Les biofilms de Marnay sont notés M, de Saint-Maurice S, et les biofilms transposés sont notés T puis la lettre identifiant le site d'origine (ainsi TM est le biofilm de Marnay, transposé à Triel). Les biofilms amont sont représentés en noir et les biofilms aval en rouge. Des ellipses permettent de rassembler les triplicats de biofilm (trois profils) correspondant à chaque site. Les chiffres 1 et 2 désignent les deux prélèvements à 15 et 30 jours.

L'ACP sur les profils ARISA Bactérie permet de séparer les biofilms prélevés en amont (Marnay), représentés en noir et sur la gauche du plan factoriel, des biofilms prélevés sur les deux sites situés en aval (Triel et Saint-Maurice), représentés en rouge et sur la droite du plan. Les biofilms de Saint-Maurice transposés à Marnay (TS1 et TS2 sur la Figure 63) sont en effet plus proches des biofilms des sites amont (M1 et M2) que les autres biofilms prélevés en aval. Il y a donc un effet de la transposition, tempéré par une importante variabilité temporelle des profils : par exemple, les profils correspondant aux triplicats du biofilm prélevé à Marnay après 15 jours (M1) sont nettement séparés du biofilm prélevé au même endroit deux semaines plus tard (M2). Le résultat obtenu est d'autant plus remarquable que les profils ARISA Bactérie obtenus sur ces échantillons sont d'intensité de fluorescence assez faibles et donc d'exploitation difficile.

L'ACP des profils ARISA Eucaryote (Figure 64) donne des résultats similaires pour les communautés eucaryotes. On retrouve la séparation entre les biofilms prélevés en amont (en noir, en bas à gauche du plan factoriel) et les biofilms prélevés en aval (sur les sites de Triel et de Saint-Maurice, représentés en rouge et situés en haut et à droite du plan factoriel). La variabilité temporelle des profils obtenus sur les biofilms de Marnay et de Saint-Maurice (biofilms "amont") est faible, les prélèvements correspondant aux deux dates (15 et 30 jours de transposition) étant spatialement proches dans le plan. La variabilité temporelle est plus grande pour les biofilms prélevés en aval, notamment pour les communautés de Saint-Maurice (S1 et S2). On peut mettre cette observation en relation avec les niveaux de tolérance mesurés sur les biofilms de Saint-

Maurice pour lesquels une grande variabilité a été observée (Figure 57). L'ACP sépare bien les deux séries (amont et aval), et confirme donc qu'au bout de 15 jours de transposition, les communautés eucaryotes transposées sont modifiées, et structurellement plus proches de celles de leur site de transplantation, que de celles de leur site d'origine.

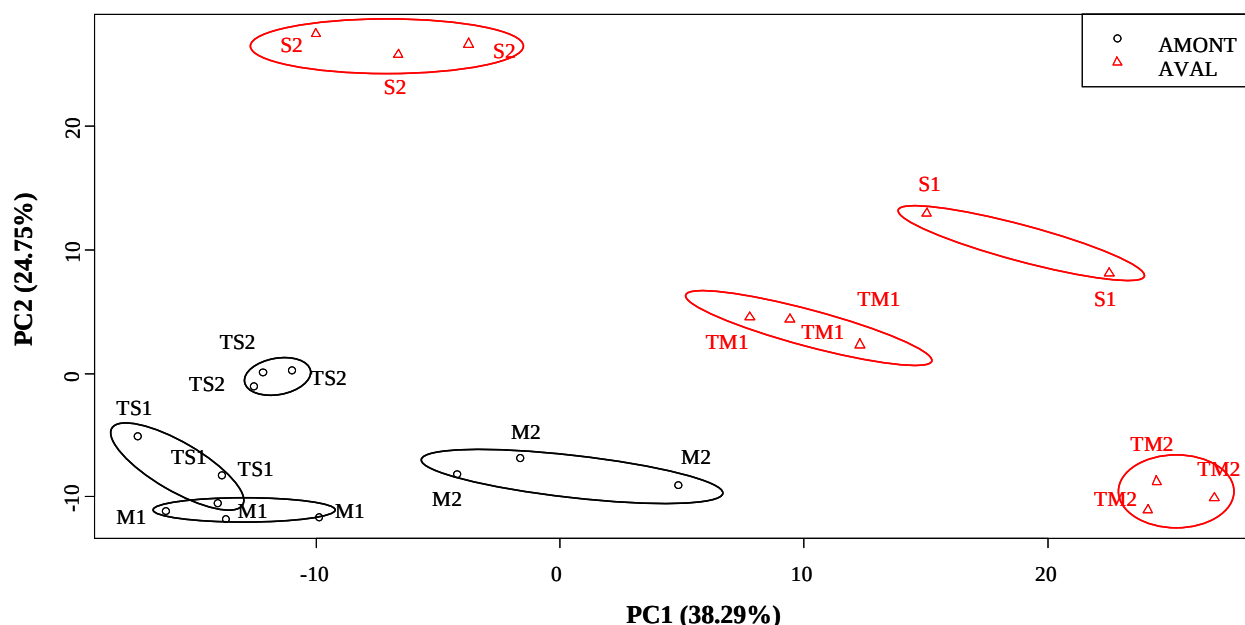


Figure 64 : ACP des profils ARISA eucaryote. Les biofilms de Marnay sont notés M, de Saint-Maurice S, et les biofilms transposés sont notés T puis la lettre identifiant le site d'origine (ainsi TM est le biofilm de Marnay, transposé à Triel). Les biofilms amont sont représentés en noir et les biofilms aval en rouge. Des ellipses permettent de rassembler les triplicats de biofilm (trois profils) correspondant à chaque site. Les chiffres 1 et 2 désignent les deux prélèvements à j 15 et j 30.

3. Conclusion

L'expérience de transposition de biofilms a permis de mettre en évidence des modifications des niveaux de tolérance au cuivre de communautés transplantées de l'amont (Marnay) vers l'aval (Triel) (*acquisition de tolérance*) et réciproquement de l'aval (Saint-Maurice) vers l'amont (Marnay) (*perte de tolérance*). Ces modifications des niveaux de tolérance des communautés transposées sont à relier à des phénomènes probables de succession. Il est intéressant de noter que ces phénomènes sont visibles, en termes de tolérance globale de la communauté, au bout de seulement deux semaines de transplantation, et se maintiennent au bout d'un mois. L'exploitation des profils ARISA permet de confirmer ces observations : les ACP permettent en effet de séparer les communautés "amont" des communautés "aval" et ce indépendamment de la transplantation, mais il n'est pas possible de déterminer si les modifications observées sont dues à une colonisation des supports transposés par une nouvelle communauté ou une adaptation de la

communauté d'origine au milieu environnant. Ces résultats soulignent à nouveau la grande sensibilité des mesures de tolérance sur périphyton, les paramètres descripteurs du biofilm traduisant peu ou pas la transposition des communautés d'un site à l'autre. Une analyse multivariée des résultats obtenus confirme par ailleurs la forte corrélation entre la tolérance (au cuivre) des communautés et les paramètres environnementaux, notamment les concentrations métalliques dans le milieu.

III. Application de la méthodologie PICT à l'échelle d'un bassin versant

1. Objectif et dispositif expérimental

L'objectif de cette troisième étude sur le terrain est de mettre en relation des niveaux de tolérance aux métaux de communautés périphytiques prélevées *in situ* et une contamination multi-métallique en prenant en compte la variabilité des paramètres environnementaux, cette fois-ci à l'échelle d'un bassin versant.

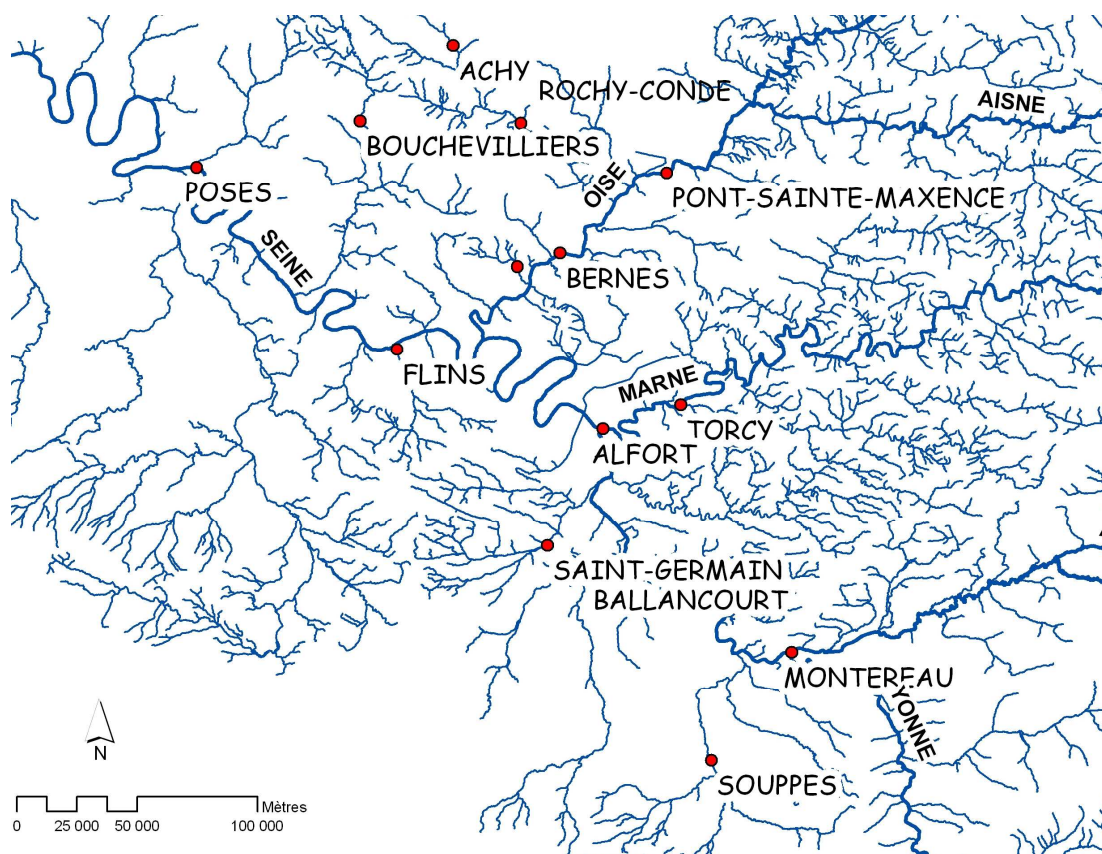


Figure 65 : Carte du bassin de la Seine représentant les treize sites de l'étude. Le site de Flins, représenté ici, n'a finalement pas été pris en compte dans l'étude. Le site dénommé Alfort correspond au site de Saint-Maurice.

Ainsi, treize sites localisés dans l'ensemble du bassin de la Seine ont été choisis selon un éventail varié de types de cours d'eau (Figure 65). Les biofilms ont été collectés sur des membranes plastiques LDPE immergées dans les rivières pendant deux semaines, puis rapportés au laboratoire et soumis au test β -glucosidase entre août et novembre 2009. Les niveaux de

tolérance au cadmium et au zinc ont ainsi pu être évalués. Pour chaque site, des prélèvements ponctuels d'eau sur deux semaines (trois prélèvements, donc un prélèvement par semaine) ont permis d'évaluer les concentrations moyennes en paramètres physico-chimiques et en métaux totaux et dissous. En parallèle de la colonisation des membranes LDPE par les biofilms, des DGT immergées ont permis d'établir une estimation des concentrations en métaux labiles (six réplicats de DGT par site, dont trois prélevés au bout d'une semaine d'immersion dans la rivière et trois autres après deux semaines *in situ*).

2. Résultats et discussion

2.1 Caractérisation des sites

La variabilité des sites en termes de paramètres environnementaux a d'abord été explorée par une ACP sur la matrice contenant les paramètres physico-chimiques de l'eau sur chaque site, ainsi que les concentrations en métaux totaux, dissous et labiles moyennes (Figure 66 et cercle des corrélations en annexe).

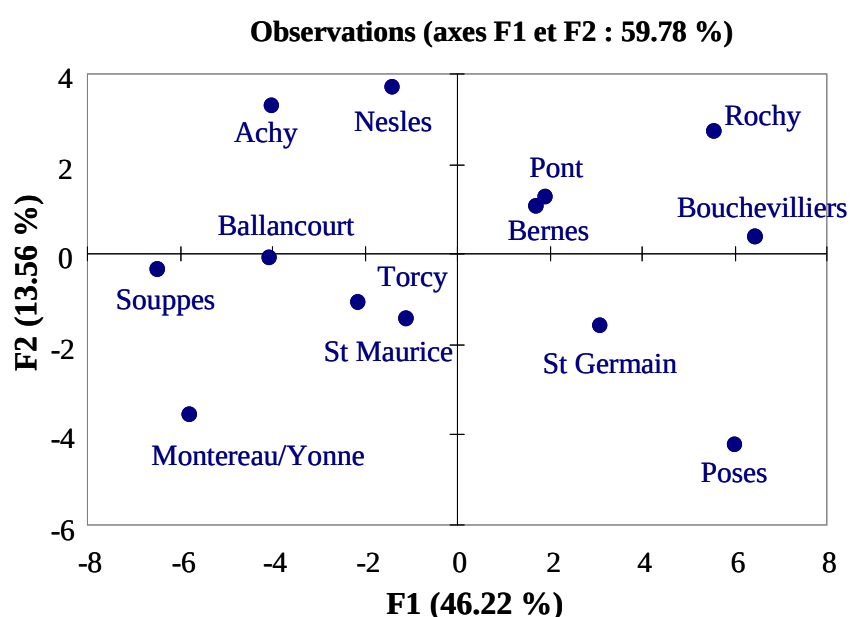


Figure 66 : Représentation des sites dans le plan formé par les deux premières composantes principales obtenues par ACP des données environnementales des 13 sites. Les données ont été log-transformées et normalisées. Le cercle des corrélations figure en annexe.

L'ACP permet de séparer les différents sites selon l'axe 1 (première composante principale) qui porte 46.22% de la variance totale (contre 13.56% seulement pour l'axe 2). Cet axe est porteur de la contamination multi-métallique puisque les concentrations en métaux totaux, dissous et labiles y sont positivement corrélées. L'axe 2 est positivement corrélé à des variables

comme le TAC et négativement corrélé à certaines concentrations en métaux comme le cuivre et le plomb dissous. Les sites sont classés dans le plan formé par les deux premières composantes principales selon l'axe de contamination (axe 1) ; on retrouve aussi les sites dont la dureté de l'eau est la plus forte (Pont, Achy, Rochy, Nesles et Bernes) en haut du plan et les sites de dureté plus faible en bas du plan (Montereau sur Yonne, Torcy, St Maurice, Poses). Il est intéressant de noter qu'une ACP sur les données de contamination métallique²⁹ uniquement permet d'obtenir une répartition très similaire des différents sites (Figure 67), ce qui laisse penser que les concentrations métalliques seraient les paramètres prépondérants pour différencier les sites, parmi l'ensemble des paramètres environnementaux. Il paraît donc judicieux, dans un premier temps, d'étudier la relation entre les niveaux de tolérance et les concentrations métalliques dans le milieu.

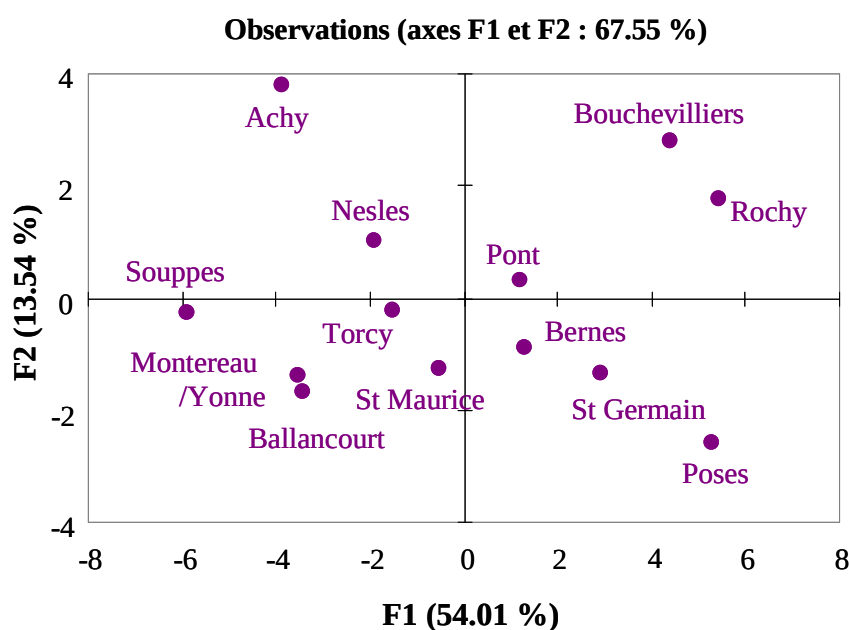


Figure 67 : Représentation graphique des différents sites dans le plan formé par les deux composantes principales issues de l'ACP sur les concentrations métalliques (données log-transformées et normalisées). L'axe 1 est porteur de la contamination métallique globale, l'axe 2 est surtout négativement corrélé à la concentration en Cu total et labile et en Pb dissous, mais est peu représentatif des données avec seulement 13.54% de la variance totale.

Dans les deux cas, on retrouve dans la zone la moins contaminée (à gauche du plan) Achy et Souppes (sites classés comme sites de référence par l'AESN), et le site de Poses³⁰ dans la zone la plus contaminée (à droite du plan). Par ailleurs, on retrouve un classement similaire des sites selon leur critère CCU : le CCU (*Cumulative Criterion Unit*) est un critère cumulatif proposé par Clements *et al.* (2000) pour caractériser des sites contaminés par un mélange de métaux. Le critère se calcule selon la formule suivante :

$$CCU = \sum m_i / c_i$$

²⁹ Concentrations en métaux totaux, dissous et labiles uniquement.

³⁰ Poses est le site le plus proche de l'embouchure de la Seine.

où m_i est la concentration en métal dissous dans le milieu (les concentrations en métaux totaux peuvent aussi être utilisées) et c_i le critère correspondant au $i^{\text{ème}}$ métal présent dans le milieu étudié. Les critères c_i figurent dans les bases de données de l'US EPA (2009) et définissent, pour chaque métal, une concentration chronique (ou aiguë) à ne pas dépasser dans le milieu pour ne pas impacter les organismes vivants ; certains critères, notamment pour certains métaux, sont corrigés en fonction de la dureté de l'eau qui peut modifier la biodisponibilité et la toxicité des métaux vis-à-vis des organismes (Niyogi & Wood 2004). Les formules utilisées pour calculer les critères correspondant à chaque métal figurent en annexe.

Le critère CCU a été utilisé dans la littérature scientifique pour analyser les impacts de multi-contaminations métalliques sur des populations de diatomées (Guasch *et al.* 2009; Hirst *et al.* 2002) ou de macro-invertébrés benthiques (Clements *et al.* 2000; Hickey & Golding 2002). Le Tableau 26 récapitule les CCU correspondant aux treize sites en métal dissous en considérant la contamination en cadmium, cuivre, nickel, plomb et zinc uniquement. On retrouve effectivement, avec des CCU plus élevés, les sites figurant à droite du plan dans les Figures 66 et 67.

Sites	CCU
Nesles	0.06
Achy	0.08
Ballancourt	0.09
Souppes	0.11
Pont	0.12
Montereau/Yonne	0.16
Bernes	0.16
St Maurice	0.17
Torcy	0.17
St Germain	0.23
Bouchevilliers	0.23
Rochy	0.38
Poses	0.45

Tableau 26 : Sites classés par CCU croissant. Le CCU est ici calculé à partir des critères correspondant à la contamination en Cu, Cd, Ni, Pb et Zn dissous, après correction des critères selon la dureté de l'eau sur chaque site.

2.2 Niveaux de tolérance au zinc et au cadmium et maxima d'inhibition

Les niveaux de tolérance au zinc et au cadmium apparaissent dans la Figure 68 (les valeurs numériques figurent dans un tableau en annexe). On obtient une tolérance moyenne de 3.8 et de 6.2 pour le cadmium et le zinc respectivement (exprimées en tolérance normalisées soit en

$\text{mg}_{\text{m\u00e9tal}}/\text{g}_{\text{MES}}$; les coefficients de variation relatifs sont respectivement 45 et 65 %). On remarque que les niveaux de tol\u00e9rance au cadmium sont globalement bien corr\u00e9l\u00e9s aux niveaux de tol\u00e9rance au zinc ($R = 0.74$, $p\text{-value} = 0.004$).

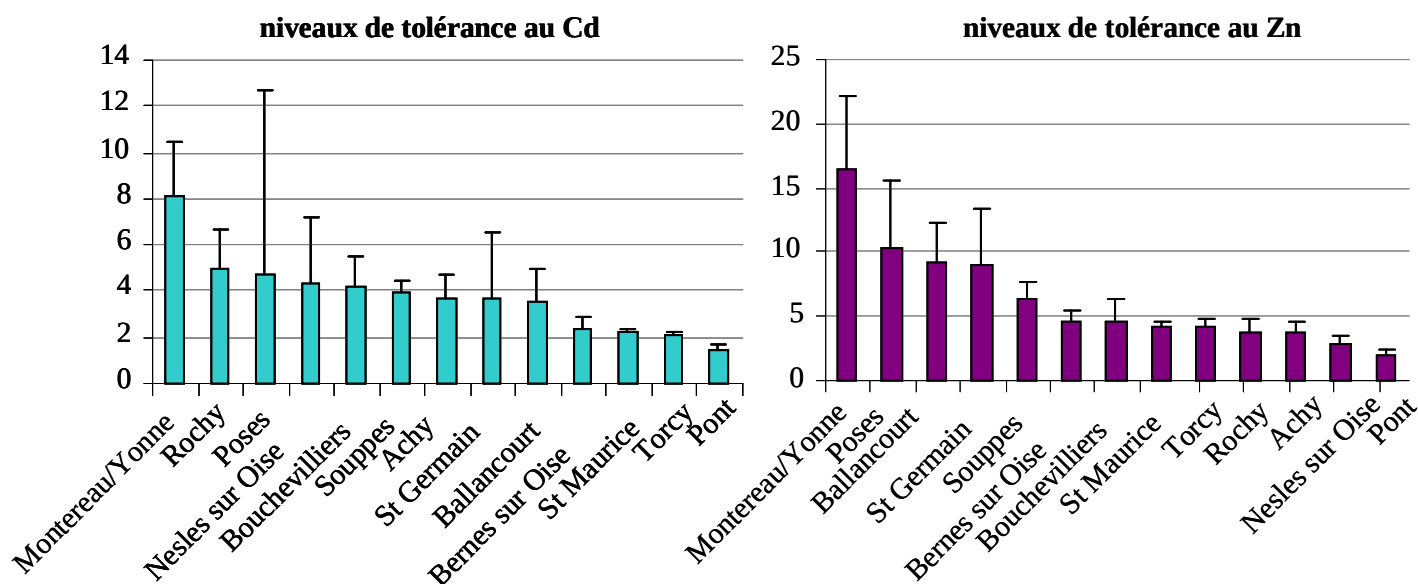


Figure 68 : Histogrammes des niveaux de tol\u00e9rance au cadmium et au zinc des biofilms en provenance des 13 sites, exprim\u00e9s en EC_{50} normalis\u00e9es ($\text{mg}_{\text{m\u00e9tal}}/\text{g}_{\text{MES}}$). Les niveaux de tol\u00e9rance sont class\u00e9s par ordre d\u00e9croissant pour chaque m\u00e9tal. Les barres d'erreur repr\u00e9sentent la borne sup\u00e9rieure de l'intervalle de confiance \u00e0 95% sur l' EC_{50} normalis\u00e9e.

Par ailleurs, les maxima d'inhibition obtenus avec les tests de toxicit\u00e9 β -glucosidase sont assez bien corr\u00e9l\u00e9s aux niveaux de tol\u00e9rance correspondants dans le cas du cadmium ($R = 0.72$, $p\text{-value} = 0.006$), mais la relation est moins nette, malgr\u00e9 une tendance globale \u00e0 la diminution du maximum d'inhibition quand la tol\u00e9rance augmente, pour le zinc ($R = 0.49$, $p\text{-value} = 0.090$) comme on peut le voir dans la Figure 69.

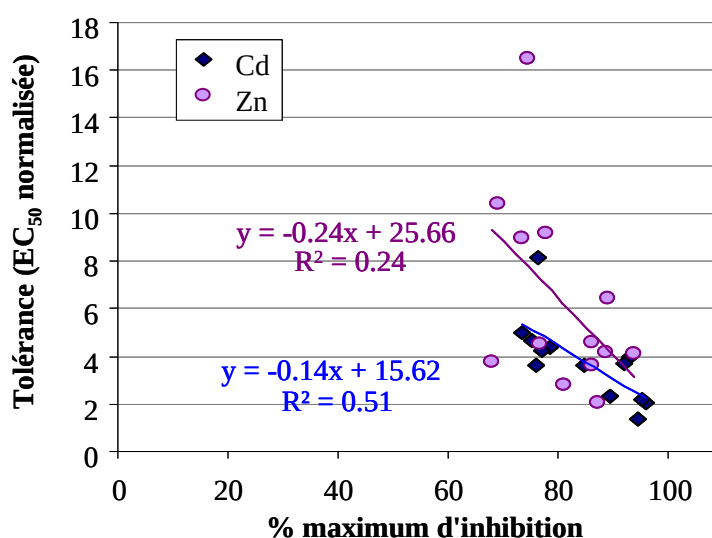


Figure 69 : Repr\u00e9sentation graphique des niveaux de tol\u00e9rance (exprim\u00e9s en EC_{50} normalis\u00e9es en $\text{mg}_{\text{m\u00e9tal}}/\text{g}_{\text{MES}}$) au Cd et au Zn en fonction des maxima d'inhibition correspondants (exprim\u00e9s en pourcentages d'inhibition de l'activit\u00e9 β -glucosidase).

Enfin, il est difficile de corrélérer les niveaux de tolérance (zinc et cadmium) aux concentrations métalliques en cadmium et en zinc dans le milieu (Tableau 27). Il paraît donc nécessaire d'interpréter ces niveaux de tolérance en tenant compte des phénomènes de co-tolérances, c'est-à-dire en relation avec la contamination métallique globale.

Niveau de tolérance (EC ₅₀ normalisée)	total	dissous	labile
Cd	0.17	0.08	0.10
Zn	0.07	0.13	0.13

Tableau 27 : Coefficients de corrélation de Pearson entre les niveaux de tolérance (Cd/Zn) des biofilms prélevés sur les 13 sites et les concentrations métalliques (métal total, dissous et labile) correspondantes.

Par ailleurs, les niveaux de tolérance les plus élevés ne correspondent pas forcément aux sites identifiés précédemment comme les plus contaminés. Ainsi, les communautés des sites de Souppes, Ballancourt et Montereau sur Yonne se distinguent par leurs forts niveaux de tolérance aux deux métaux (Figure 68 et annexe). Il n'y a donc pas de lien évident entre la contamination chimique globale (caractérisée ici par un critère de contamination métallique : le CCU) et les niveaux de tolérance.

Il semble donc nécessaire d'explorer les relations entre les tolérances au cadmium et au zinc des biofilms et la contamination métallique globale de chaque site ainsi que les paramètres environnementaux.

2.3 Mise en relation de la tolérance au zinc et au cadmium et des paramètres environnementaux

2.3.1 Relation entre les niveaux de tolérance et la contamination métallique du milieu

Dans un premier temps, la relation entre les niveaux de tolérance et la contamination métallique du milieu, caractérisée par le critère CCU, peut être étudiée par régression linéaire simple. Il n'y a pas de corrélation nette entre les niveaux de tolérance et la contamination métallique du milieu (Figure 70), ce qui confirme les résultats précédents (Tableau 27).

Il est donc intéressant d'utiliser l'approche PLS qui permet par régression multiple de prendre en compte simultanément les deux niveaux de tolérance au zinc et au cadmium (matrice

réponse Y), et leurs relations avec l'ensemble des concentrations en métaux (totaux, dissous et labiles) dans le milieu (matrice explicative X).

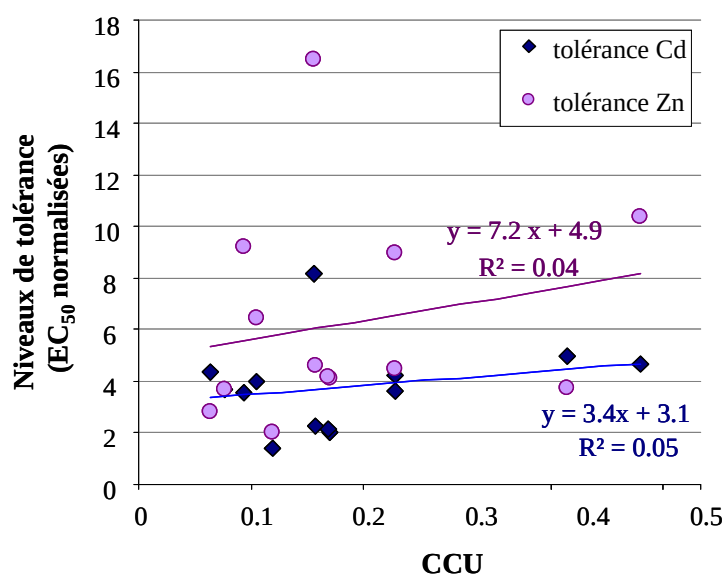


Figure 70 : Représentation graphique des niveaux de tolérance au Cd et au Zn des biofilms collectés sur les treize sites (exprimés en EC₅₀ normalisées en kg_{métal}/g_{MES}).

Le modèle de régression PLS généré³¹ est à trois composantes avec de bonnes valeurs cumulées de R²X (75.3%), R²Y (77.4%) et un Q² un peu faible (28.7%) mais satisfaisant étant donnée la variabilité des jeux de données. Le Tableau 28 montre les 13 variables les plus influentes dans le modèle de régression (sur 24) selon le critère : VIP > 0.8 (Eriksson *et al.* 2006). Les variables positivement corrélées aux niveaux de tolérance au cadmium et au zinc sont le plomb, le chrome et le cuivre dissous et le plomb total. On peut donc supposer que ces métaux sont à l'origine de co-tolérances pour le cadmium et le zinc. En revanche, les autres concentrations métalliques figurant dans le Tableau 28 sont négativement corrélées aux tolérances mesurées.

On remarque aussi que, parmi les concentrations métalliques en zinc et en cadmium, seul le cadmium labile apparaît dans les variables prépondérantes du modèle, mais il est négativement corrélé aux tolérances en zinc et cadmium (coefficients de régression négatifs, Tableau 28). La régression PLS confirme donc l'absence de relation entre les niveaux de tolérance mesurés et les concentrations en métaux correspondants (cadmium et zinc) dans le milieu.

³¹ Sur données log-transformées et normalisées.

Variable	VIP	Coeff tolérance Cd	Coeff tolérance Zn
labileCr	1.86	-0.23	-0.29
dissous Pb	1.75	0.17	0.28
dissous Cr	1.45	0.32	0.19
labile Ni	1.26	-0.22	-0.14
labile Mn	1.17	-0.08	-0.15
labile Co	1.17	-0.07	-0.15
total Pb	1.14	0.11	0.18
total Ni	1.06	-0.11	-0.13
dissous Cu	0.98	0.00	0.12
labile Cd	0.98	-0.19	-0.03
labile Pb	0.91	-0.21	-0.09
labile Cu	0.86	-0.16	-0.03
total Cu	0.80	-0.06	0.07

Tableau 28 : VIP des variables les plus importantes ($VIP > 0.8$) dans le modèle de régression PLS (tolérances au Cd et au Zn en Y et concentrations métalliques en X) et coefficients de régressions associés aux deux variables réponses.

La carte des sites obtenue sur les deux premières composantes du modèle (Figure 71) sépare nettement les quatre sites identifiés précédemment comme les plus contaminés suivant le critère CCU (St Germain, Bouchevilliers, Rochy et Poses). Les sites de Montereau sur Yonne, Ballancourt et Souppes, caractérisés par des niveaux de tolérances élevés et une contamination chimique faible sont aussi regroupés en bas à droite de la carte.

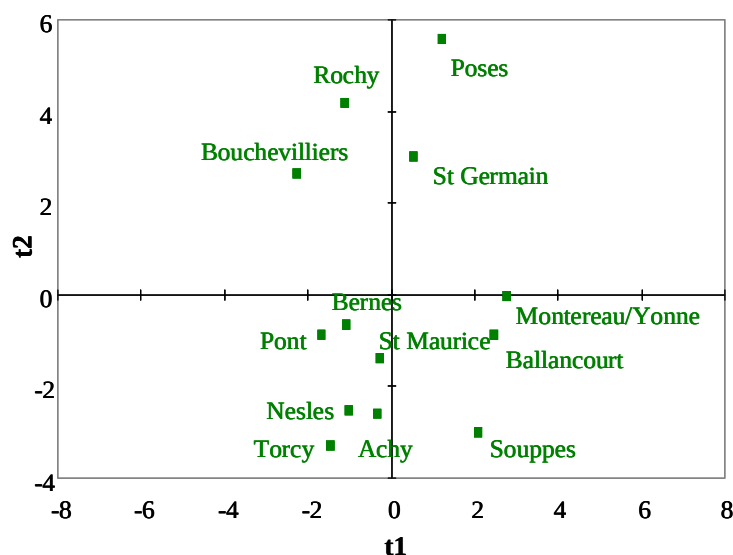


Figure 71 : Carte des observations (sites) dans le plan formé par les deux premières composantes $t1$ et $t2$ de la régression PLS

2.3.2 Relation entre les niveaux de tolérance eu zinc et au cadmium et les paramètres environnementaux

La relation entre tolérance et contamination peut aussi être envisagée entre les tolérances (cadmium et zinc) en Y et l'ensemble des paramètres environnementaux (on ajoute les paramètres physico-chimiques de l'eau en X). On obtient à nouveau un modèle de régression PLS à 3

composantes, de bonne qualité : $R^2X = 0.69$, $R^2Y = 0.85$ et $Q^2 = 0.43$ (valeurs cumulées sur les trois composantes). Les concentrations métalliques prépondérantes dans le modèle (Tableau 29) sont sensiblement les mêmes que dans le modèle précédent.

Variable	VIP	Coeff tolérance Cd	Coeff tolérance Zn
pH	1.93	-0.13	-0.17
NH ₄ ⁺	1.57	-0.18	-0.11
labile Cr	1.56	-0.07	-0.13
dissous Pb	1.52	0.08	0.14
TAC	1.52	-0.04	-0.13
dissous Cr	1.38	0.19	0.08
Mg ²⁺	1.33	-0.12	-0.10
Na ⁺	1.29	-0.10	-0.08
labile Ni	1.13	-0.12	-0.05
Ca ²⁺	1.09	-0.03	-0.09
total Pb	1.07	0.06	0.10
labile Co	1.03	-0.01	-0.06
dissous Cu	1.00	-0.03	0.07
labile Mn	0.99	-0.04	-0.06
NO ₂ ⁻	0.98	-0.09	-0.09
T	0.96	-0.08	0.03
MES	0.95	0.00	-0.06
SO ₄ ²⁻	0.91	-0.03	-0.05
total Ni	0.91	-0.05	-0.05
labile Cd	0.84	-0.08	0.01

Tableau 29 : VIP des variables les plus importantes (VIP > 0.8) dans le modèle de régression PLS (tolérances au Cd et au Zn en Y et paramètres environnementaux en X) et coefficients de régressions associés aux deux variables réponses.

Les paramètres physico-chimiques prépondérants sont : le pH, les concentrations en ammonium, magnésium, calcium, nitrites, sulfates et MES de l'eau, ainsi que la température et le TAC (Tableau 29). La capacité à diminuer la biodisponibilité des métaux de la majorité de ces paramètres est bien connue et pourrait être à l'origine des coefficients négatifs obtenus dans le modèle de régression (Tableau 29). En effet, des ions comme le calcium et le magnésium entrent en compétition avec les métaux libres pour se fixer au ligand biologique et donc limiter leur toxicité (Niyogi & Wood 2004). Par ailleurs, il paraît logique d'observer une influence négative du pH sur les niveaux de tolérance puisque lorsque le pH augmente, la toxicité des métaux diminue (De Schamphelaere & Janssen 2006). En outre, une influence négative de la concentration en MES de l'eau sur les niveaux de tolérance aux métaux des micro-organismes des biofilms peut aussi s'expliquer par des phénomènes d'adsorption et de complexation des métaux par les particules en suspension présentes dans l'eau, ce qui diminue leur biodisponibilité (Boenigk *et al.* 2005; Gadd & Griffiths 1977; Zevenhuizen *et al.* 1979). Enfin, certains paramètres comme le pH

ou la température ont déjà été identifiés comme des facteurs modifiant les niveaux de tolérance du périphyton (Boivin *et al.* 2005; Guasch *et al.* 2002).

La carte des sites obtenue avec ce modèle (les sites sont représentés dans le plan formé par les deux premières composantes du modèle, Figure 72) est très similaire à celle obtenue précédemment (Figure 71), c'est-à-dire sans prendre en compte les variables physico-chimiques de l'eau. Les quatre sites les plus contaminés selon le critère CCU sont toujours nettement différenciés des autres.

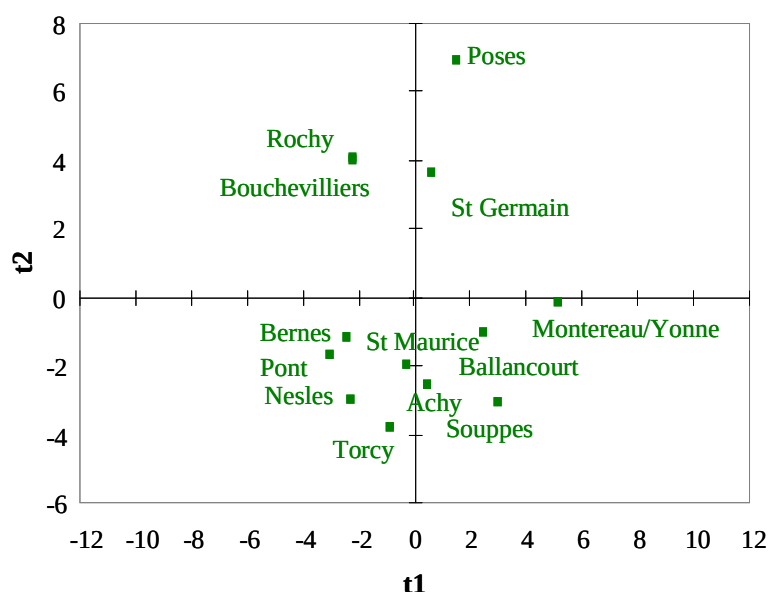


Figure 72 : Carte des observations (sites) dans le plan formé par les deux premières composantes t_1 et t_2 de la régression PLS

2.3.3 Relation entre la tolérance et les paramètres environnementaux : prise en compte des paramètres descripteurs des biofilms dans le modèle de régression

Enfin, il est intéressant de considérer dans le modèle de régression PLS les paramètres descripteurs associés aux biofilms (poids sec, AFDW et concentration en chlorophylle *a*). Si on considère ces variables comme des variables réponses (tableau Y), le modèle obtenu, assez complexe, est de mauvaise qualité prédictive (Tableau 30). Le modèle n'est, de ce fait, pas vraiment exploitable, notamment en raison d'une valeur de Q^2 très faible, qui montre que le modèle n'est pas robuste.

Indice	Comp1	Comp2	Comp3	Comp4	Comp5	Comp6
Q^2 cum	0.018	0.061	0.041	-0.180	-0.119	0.041
R^2Y cum	0.290	0.467	0.622	0.721	0.834	0.891
R^2X cum	0.320	0.571	0.688	0.761	0.814	0.859

Tableau 30 : Paramètres associés au modèle de régression PLS avec en Y les tolérances au Cd et au Zn et les paramètres descripteurs des biofilms et en X les paramètres environnementaux.

En revanche, on peut inclure ces paramètres descripteurs des biofilms dans les variables explicatives (tableau X) comme dans l'étude de Blanck (2002), ce qui revient à considérer que ces paramètres influent sur les niveaux de tolérance (dans ce cas, ils ne sont plus considérés dans le modèle comme faisant partie intégrante de la réponse biologique des biofilms à leur milieu mais comme facteurs modifiant la réponse biologique mesurée, à savoir la tolérance). Le modèle généré, à cinq composantes, est de très bonne qualité avec $R^2X = 0.80$, $R^2Y = 0.96$ et $Q^2 = 0.49$ (valeurs cumulées pour le modèle à cinq composantes). La majorité des métaux identifiés dans les modèles précédents comme variables prépondérantes apparaît à nouveau parmi les variables prépondérantes dans ce modèle, avec quelques modifications qui concernent des variables de $VIP < 1$ uniquement (Tableau 31). De même, les variables physico-chimiques prépondérantes dans ce modèle sont majoritairement similaires à celles identifiées précédemment, hormis la température qui n'apparaît plus dans les variables de $VIP > 0.8$.

Variable	VIP	Coeff tolérance Cd	Coeff tolérance Zn
pH	1.828	-0.06	-0.15
NH ₄ ⁺	1.606	-0.33	-0.15
Dissous Pb	1.504	0.11	0.17
labile Cr	1.463	-0.03	-0.11
TAC	1.433	-0.07	-0.13
DW	1.400	-0.10	-0.08
dissous Cr	1.281	0.14	0.07
Mg	1.269	-0.06	-0.07
AFDW	1.241	-0.12	-0.05
Ch a	1.232	-0.17	-0.05
Na	1.196	-0.08	-0.07
total Pb	1.080	0.08	0.12
labile Ni	1.077	-0.15	-0.07
Ca	1.044	-0.03	-0.08
NO ₂ ⁻	1.007	-0.05	-0.05
labile Co	0.941	0.00	-0.05
total Cu	0.936	-0.07	0.02
dissous Cu	0.921	-0.07	0.05
labile Mn	0.913	-0.02	-0.06
MES	0.908	0.04	-0.04
SO ₄ ²⁻	0.902	0.04	-0.02

Tableau 31 : Importance des variables dans le modèle de régression PLS ($VIP > 0.8$) et coefficients de régressions associés aux deux variables réponses. Les paramètres des biofilms sont indiqués en violet.

Dans ce modèle, les paramètres associés au biofilm (poids sec, AFDW et Ch a) apparaissent parmi les variables explicatives de la tolérance les plus importantes, ce qui n'était pas le cas pour les expériences mises en œuvre sur l'axe Seine (parties I et II de ce chapitre). On peut donc conclure à une corrélation forte entre les descripteurs des biofilms et les niveaux de tolérance correspondants pour cette expérience.

Cette analyse par régression PLS des données obtenues sur l'ensemble du bassin de la Seine permet donc d'identifier certaines concentrations métalliques et un certain nombre de paramètres physico-chimiques comme des variables explicatives importantes pour les niveaux de tolérance des biofilms au cadmium et au zinc. Les concentrations métalliques prépondérantes identifiées restent sensiblement les mêmes dans les différents essais, c'est-à-dire en prenant en compte uniquement les concentrations métalliques sur les sites, ou en y ajoutant les paramètres physico-chimiques ou encore les paramètres descripteurs des biofilms. Les différents essais de régressions linéaires et multi-linéaires montrent par ailleurs qu'on ne retrouve pas les concentrations en cadmium et en zinc du milieu parmi ces paramètres prépondérants, ce qui suggère que des phénomènes de co-tolérance interviennent. Enfin, l'importance des paramètres associés à la composition des biofilms (poids sec, concentrations en chlorophylle *a* et AFDW) laisse penser qu'une analyse de la composition des communautés plus fine, grâce à la technique ARISA, apportera des éléments de réponse sur les impacts de la contamination métallique sur les biofilms à l'échelle du bassin versant.

2.4 Profils ARISA

Des triplicats d'échantillons de biofilms³² ont été utilisés pour obtenir les profils ARISA des treize échantillons de biofilms. Les données ont été traitées dans StatFingerprints par ACP. La Figure 73 représente les profils dans le plan formé par les deux premières composantes principales des ACP des données ARISA Bactérie (Figure 73 a) et ARISA Eucaryote (couple d'amorces "euk", Figure 73 b).

Certains profils de biofilms prélevés dans des sites *a priori* plutôt contrastés, d'après les critères de contamination chimique CCU mais aussi en prenant en compte les niveaux de tolérance des biofilms avec les résultats obtenus précédemment par régression PLS, sont observés dans des zones proches dans le plan : par exemple, Souppes et Poses pour l'ARISA Bactérie, ou encore Achy et Bouchevilliers pour l'ARISA Eucaryote. On arrive tout de même à regrouper globalement les profils selon le critère CCU du site de prélèvement, ce qui permet de délimiter des zones dans le plan formé par les deux premières composantes principales : une zone pour les sites de CCU > 0.2, idem pour les sites de CCU > 0.15, > 0.1, etc. (Figure 73).

³² Comme dans les expériences précédentes, il s'agit de triplicats de suspension de biofilm, avec une unique suspension de biofilm par site étudié.

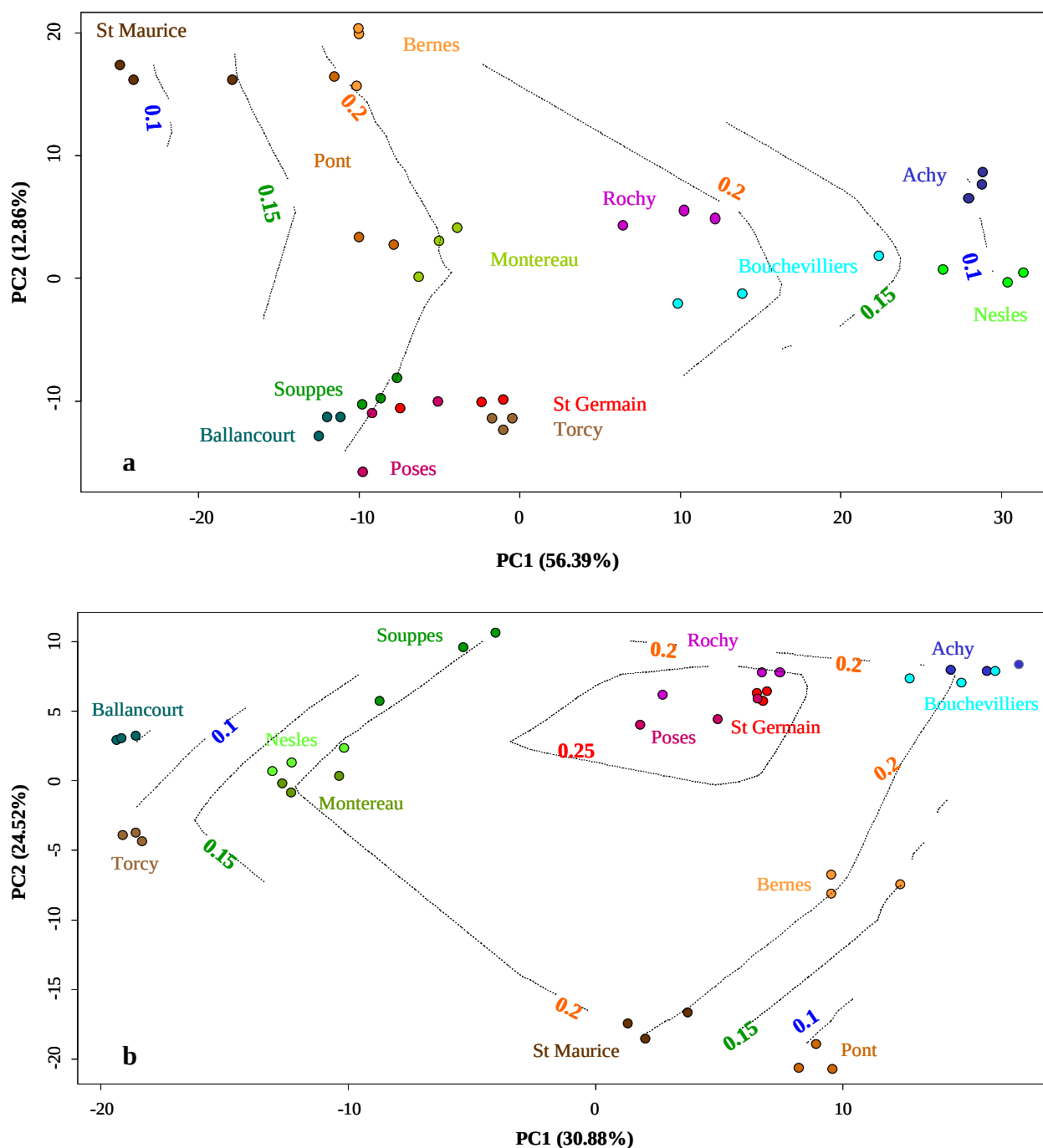


Figure 73 : Représentation dans le plan formé par les deux premières composantes principales obtenues par ACP des triplicats de profils : a) ARISA Bactérie et b) ARISA Eucaryote (couple euk) pour les treize sites de l'étude. Les lignes (tracées par le logiciel StatFingerprints) permettent de délimiter des zones correspondant à certaines valeurs de CCU pour les sites.

Les lignes de niveaux sont tracées automatiquement par le logiciel StatFingerprints, utilisé pour les ACP des profils ARISA. Certaines zones ne sont pas parfaitement définies : par exemple les profils ARISA Bactérie du biofilm du site de Saint-Maurice sont représentés dans la zone $CCU < 0.15$, alors que le CCU vaut 0.17 pour ce site, de même, le site de Souppes apparaît dans les deux cas à proximité de la ligne de niveaux 0.2 alors que le CCU de ce site est à 0.11. Cependant les sites de CCU élevés (Poses, Rochy, Saint-Germain, Bouchevilliers) se retrouvent globalement au même endroit dans le plan (position plutôt centrale dans les deux cas) et réciproquement, les sites les moins contaminés (CCU faibles) sont globalement regroupés dans les mêmes zones : Nesles, Ballancourt, Achy, Souppes et Pont sont ainsi situés aux extrémités des représentations graphiques.

On remarque, en outre, que les profils ARISA sont également bien regroupés, dans le plan formé par les deux premières composantes principales de l'ACP, selon les niveaux de tolérance au cadmium et au zinc des communautés (Figure 74 et Figure 75³³).

Ainsi, on retrouve les sites de Montereau, Poses, Ballancourt, St Germain et Souppes (qui sont les sites pour lesquels la tolérance du périphyton au zinc est la plus élevée) regroupés dans une zone centrale pour les deux types d'ARISA (Figure 75) ; de même, pour le cadmium, on retrouve dans la Figure 74, les sites de Rochy, Montereau, Bouchevilliers, Poses et Nesles (uniquement pour l'ARISA Eucaryote pour ce dernier) regroupés dans la zone correspondant aux fortes tolérances au métal et les sites dont les niveaux de tolérance au cadmium sont les plus faibles (à savoir Pont, Torcy, Saint-Maurice et Bernes sur Oise, Figure 68) aux extrémités du plan pour les deux ACP, le site de Torcy étant à proximité des sites correspondant à des communautés ayant une forte tolérance pour l'ARISA Bactérie.

³³ Les Figure 74 et 74 sont les mêmes représentations graphiques des deux ACP des profils ARISA Bactérie et Eucaryote (Figure 73) mais en traçant, dans le plan formé par les deux premières composantes principales, des lignes définissant des zones de tolérances au cadmium (Figure 74) et au zinc (Figure 75).

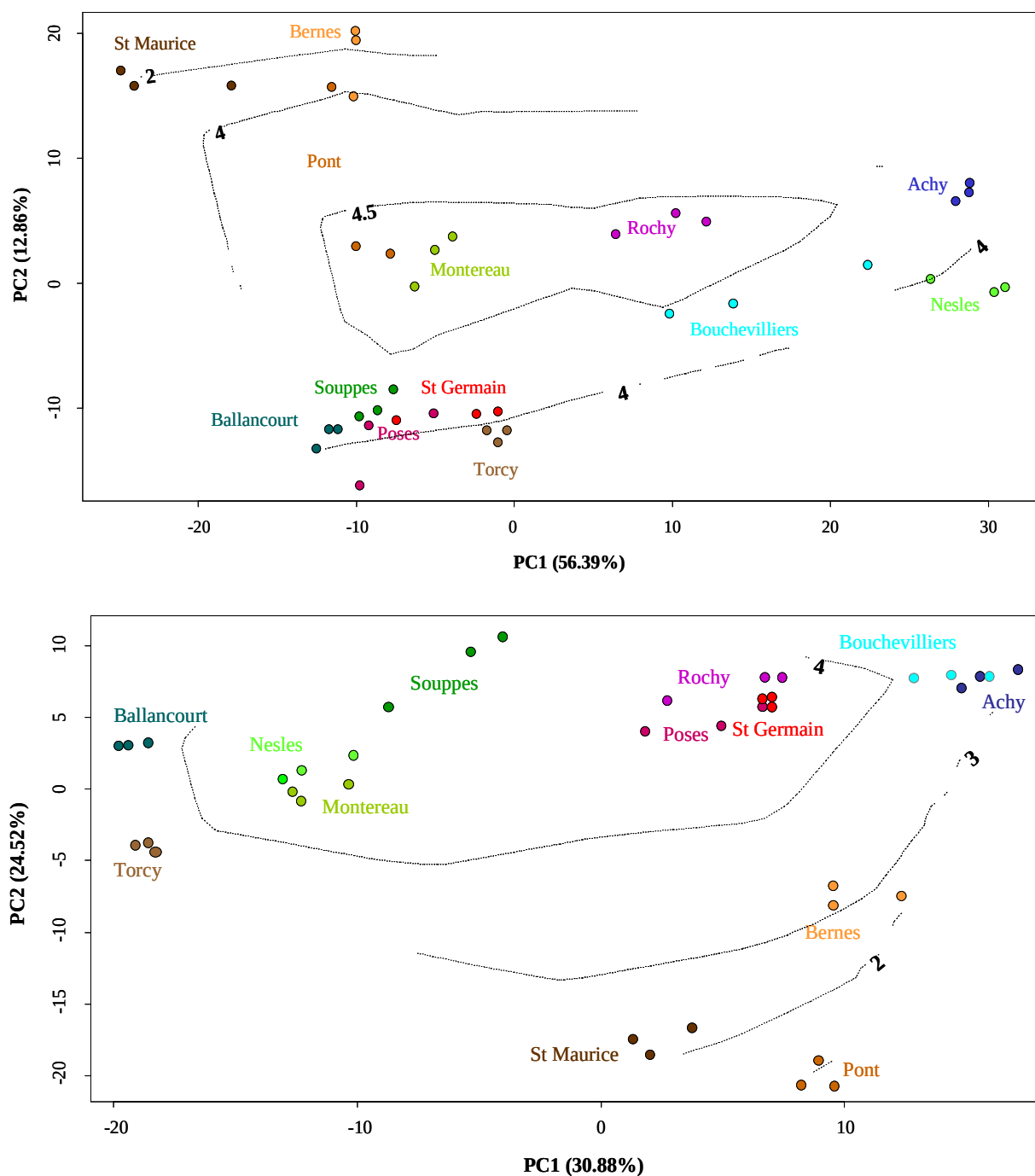


Figure 74 : Représentation dans le plan formé par les deux premières composantes principales obtenus par ACP des triplicats de profils a : ARISA Bactérie et b : ARISA eucaryote (couple euk) pour les treize sites de l'étude. Les lignes permettent de délimiter des zones correspondant à certaines valeurs de tolérance au cadmium.

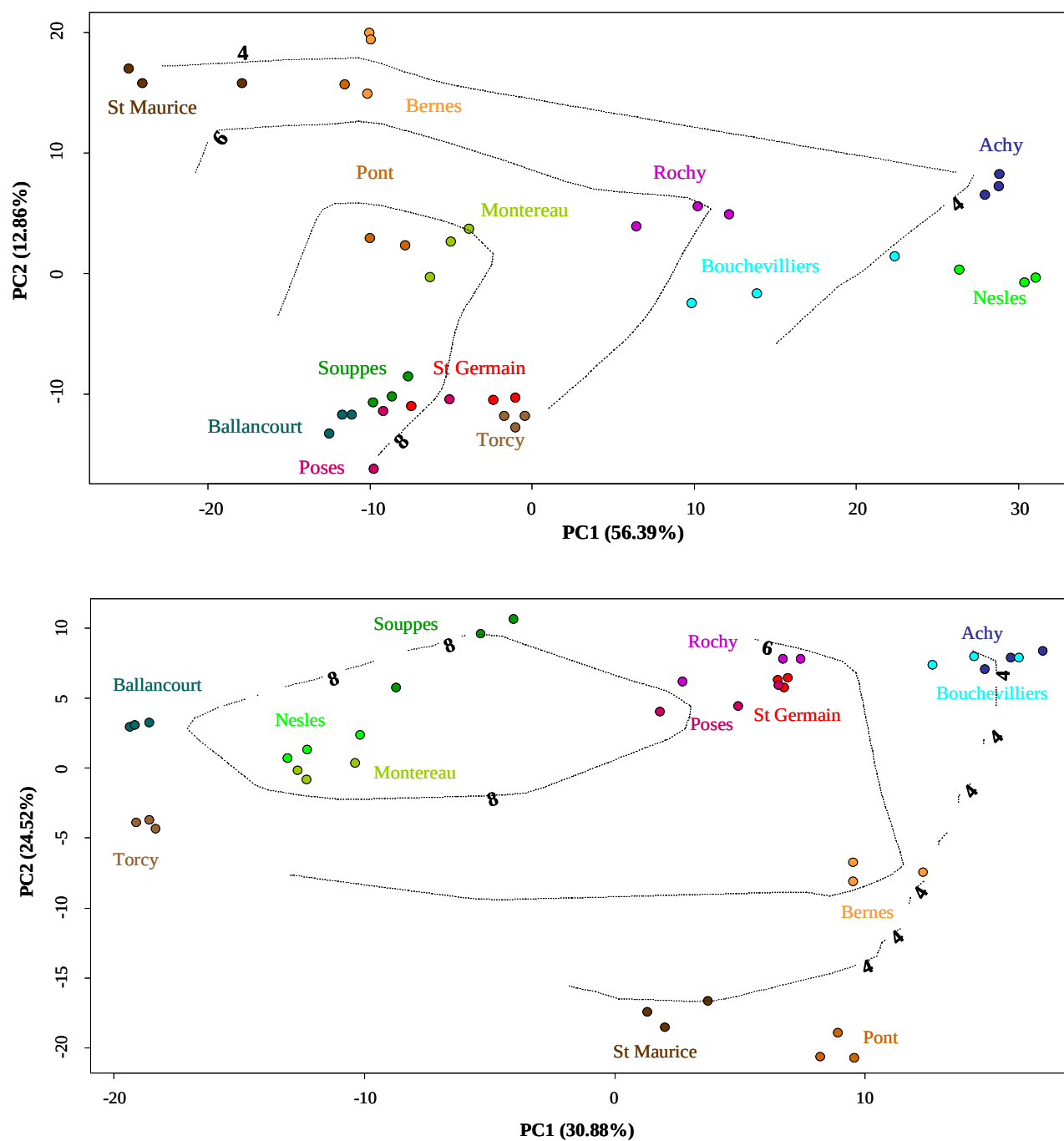


Figure 75 : Représentation dans le plan formé par les deux premières composantes principales obtenus par ACP des triplicats de profils a : ARISA Bactérie et b : ARISA eucaryote (couple euk) pour les treize sites de l'étude. Les lignes permettent de délimiter des zones correspondant à certaines valeurs de tolérance au zinc.

Il est donc possible d'identifier un lien global entre la contamination chimique du milieu (caractérisée ici par le critère CCU) et les profils ARISA d'une part (Figure 73), et un lien entre les niveaux de tolérance mesurés et les profils ARISA d'autre part (Figure 74 et Figure 75). Ce résultat est particulièrement intéressant car cela signifie que la contamination chimique agit sur la structure des communautés d'une part, et d'autre part que des similarités/différences dans les structures bactériennes et eucaryotes telles qu'on peut les identifier avec l'ARISA traduisent des similitudes/différences entre les niveaux de tolérance de ces mêmes communautés.

L'interprétation des différences et similitudes entre les profils reste complexe du fait de l'ensemble des paramètres agissant sur la structure des communautés prélevées *in situ* et de la variabilité des sites de prélèvement. En effet, il reste difficile de caractériser un site : ainsi, le site de Nesles est le moins contaminé, selon le critère CCU, cependant la tolérance au cadmium du périphyton prélevé sur ce site reste une des plus élevées. L'ACP des profils ARISA Eucaryote (Figure 73, Figure 74, Figure 75) place ce site à proximité de Montereau sur Yonne, site pour lequel on obtient les niveaux de tolérance au zinc et au cadmium les plus élevés (Figure 68). En revanche, l'ACP des profils ARISA Bactérie place ce site en dehors d'une zone où l'on retrouve les profils correspondant aux biofilms les plus tolérants aux métaux (dont celui prélevé à Montereau sur Yonne). Suivant le type de communautés (bactérienne ou eucaryote) étudiée, l'ARISA permet donc de regrouper les communautés ayant des niveaux de tolérance similaire.

3. Conclusion

Finalement, cette étude montre qu'il existe bien une relation entre les niveaux de tolérance mesurés et certains paramètres environnementaux, dont certaines concentrations métalliques. En particulier, la tolérance au cadmium et au zinc des communautés prélevées semble liée à la présence de métaux comme le plomb, le chrome, le nickel, le cobalt, le cuivre et le manganèse. En revanche, on ne retrouve pas parmi ces variables les concentrations en cadmium et en zinc, ce qui confirme l'absence de relation simple entre les tolérances au cadmium et au zinc et les concentrations en ces mêmes métaux dans la rivière. Les résultats, à ce titre, valident l'importance des phénomènes de co-tolérances multi-métalliques pour les biofilms. Ainsi, l'augmentation de certaines concentrations métalliques comme le plomb (dissous et total), le chrome (dissous) et le cuivre (dissous) semble liée à une augmentation de la tolérance au cadmium et au zinc des biofilms exposés (coefficients de régression positifs). Pour d'autres métaux (par exemple le nickel ou le manganèse), voire d'autres fractions métalliques (chrome labile par exemple), les analyses

statistiques suggèrent une corrélation négative avec les niveaux de tolérance mesurés (coefficients de régression négatifs). Par ailleurs, les résultats confirment aussi l'importance de certains paramètres physico-chimiques de l'eau sur la composition du périphyton et donc sur sa tolérance aux métaux. Parmi ces paramètres physico-chimiques, on retrouve des paramètres dont l'influence sur la tolérance (température, pH) ou plus précisément la biodisponibilité des métaux (dureté de l'eau, TAC, pH, etc.) a déjà été mise en évidence dans la littérature scientifique.

Cette campagne illustre les difficultés liées à la recherche de lien causal entre des niveaux de tolérance et la contamination du milieu dans un contexte très variable (à l'échelle du bassin de la Seine). Les difficultés d'interprétation sont à mettre en relation avec les niveaux de contamination relativement faibles à l'échelle du bassin versant de la Seine, caractérisé par une pollution urbaine diffuse, mais sans site très contrasté, comme on peut le voir pour les valeurs de CCU calculées, qui restent faibles même pour les sites les plus contaminés de l'étude. Il semble nécessaire, pour interpréter les niveaux de tolérance mesurés, de prendre en compte non seulement l'ensemble de la contamination multi-métallique, mais encore les paramètres physico-chimiques de l'eau. Enfin, l'exploitation des profils ARISA Bactérie et Eucaryote permet de mettre en lumière des similitudes entre les biofilms de mêmes niveaux de tolérance, qui sont globalement regroupés par ACP. On identifie toutefois certaines particularités, par exemple certaines communautés de niveaux de tolérance contrastés ont des profils ARISA similaires. Enfin, la répartition des sites par ACP est différente suivant l'utilisation de l'ARISA Bactérie et Eucaryote, ce qui démontre la richesse des informations obtenues par l'étude de ces deux types de communautés périphytiques, mais aussi les difficultés d'interprétation liées à l'usage de cette technique.

Cette première utilisation des outils développés au cours de ce travail dans un contexte extrêmement variable est donc prometteuse quant à l'utilisation de la méthodologie PICT couplée à la technique ARISA pour caractériser la réponse biologique de communautés périphytiques exposées à une contamination urbaine.

Conclusion

La prise de conscience relativement récente des conséquences néfastes pour l'environnement, et par conséquent pour la santé humaine, de la présence de mélanges de contaminants dans les écosystèmes aquatiques, nécessite de développer des outils écotoxicologiques adéquats. En effet, les contaminations anthropiques actuelles se caractérisent plutôt par des expositions chroniques et diffuses à des contaminants d'origines et de types variés que par la présence, à des doses élevées, d'un nombre limité d'agents toxiques engendrant des effets immédiats et aisément visibles sur les organismes exposés. Pour répondre à l'impératif de retour au *bon état* imposé par la Directive Cadre, il est donc nécessaire de pouvoir mettre en évidence les effets chroniques, à des doses faibles et non létales, de ces mélanges de micropolluants.

Ainsi, ce travail avait pour but de contribuer à l'évaluation de l'impact biologique d'une contamination urbaine typique. La stratégie adoptée a consisté en l'utilisation de l'approche PICT sur du périphyton exposé en milieu urbain. Cette approche exploite les modifications des communautés exposées, en termes d'adaptation et de sélection (modifications des espèces, génotypes et phénotypes) dues à la pression toxique : ces modifications se traduisent par un accroissement de la tolérance globale de la communauté exposée, classiquement mesurée par le biais de tests de toxicité aiguë. En outre, l'utilisation de techniques d'empreinte génétique s'étant beaucoup développée, notamment pour l'étude de modifications de communautés environnementales soumises à des perturbations, la technique ARISA a été choisie pour obtenir des informations sur les changements de structure des biofilms au cours d'une exposition.

Ce travail a donc consisté en quatre grandes étapes :

- dans un premier temps, le développement méthodologique d'un test de toxicité aiguë permettant de caractériser la tolérance de communautés périphytiques exposées à des contaminants urbains ;
- dans un deuxième temps, la mise au point de l'utilisation d'une technique de biologie moléculaire, l'ARISA, pour évaluer des modifications de structure de communautés bactériennes et eucaryotes impactées ;
- les différentes méthodologies développées ont ensuite été testées en laboratoire, par des expositions de périphyton en conditions contrôlées, pour mettre en évidence, directement et sans équivoque, l'impact d'un métal sur la structure des communautés périphytiques (ARISA Bactérie et Eucaryote) et évaluer la réponse biologique des communautés hétérotrophes en termes d'acquisition de tolérance. Ces expériences en microcosmes ont aussi permis de tester la

sensibilité des outils utilisés pour mettre en évidence l'impact d'une pression métallique à des concentrations d'exposition environnementales, c'est-à-dire réalistes par comparaison aux niveaux de contamination observés *in situ* ;

- enfin, les méthodologies ont été déployées sur le terrain, et ce tout d'abord dans un gradient de contamination urbaine le long d'un même fleuve : des communautés ont été prélevées simultanément sur trois sites localisés le long de la Seine et leurs niveaux de tolérances à cinq métaux ont été évalués. Ensuite, une expérience de transposition a permis de mettre en évidence, sur une durée de quelques semaines seulement, l'adaptation des niveaux de tolérance au cuivre de communautés transposées aux niveaux de tolérance des biofilms autochtones. Enfin, le lien entre les niveaux de tolérance du périphyton (au zinc et au cadmium) et la contamination métallique globale du milieu a été exploré à l'échelle d'un bassin versant.

Cette étude a permis de mettre au point, puis de tester au laboratoire et *in situ*, une méthodologie PICT permettant d'évaluer la réponse biologique de communautés hétérotrophes périphytiques exposées à des métaux urbains. En effet, elle a montré que l'activité β -glucosidase était un bio-marqueur pertinent pour mesurer la réponse biologique de communautés impactées par les métaux à des concentrations environnementales. Ainsi, deux réponses biologiques du périphyton ont été identifiées avec le test d'inhibition d'activité enzymatique :

- une **mesure de la tolérance** : comme pour les autres tests de toxicité aiguë utilisés, dans le cadre de l'approche PICT, pour évaluer les niveaux de tolérance de communautés exposées à un agent toxique, le test β -glucosidase permet d'évaluer la tolérance de la communauté hétérotrophe par une estimation de l' EC_{50} . Celle-ci est en effet obtenue en ajustant les activités β -glucosidase d'aliqotes de suspension de biofilm – exposées à une gamme de concentrations en métal – au modèle de Hill, classiquement utilisé en écotoxicologie pour modéliser des courbes dose/effet. La mise au point méthodologique du test β -glucosidase a, en outre, permis, avec les EC_{50} normalisées, d'obtenir des mesures plus robustes et fiables de la tolérance au cadmium, au cuivre, au nickel et au zinc des communautés périphytiques hétérotrophes. Les EC_{50} non normalisées sont en effet susceptibles de varier suivant le protocole expérimental choisi, notamment suivant la concentration des suspensions de biofilms utilisées pour les tests, et ne peuvent donc pas être exploitées pour comparer les niveaux de tolérance de biofilms différents. Parmi les cinq métaux testés, le cas du plomb, en particulier, reste à éclaircir : en effet, les difficultés d'interprétation des expériences de normalisation semblent liées à la spéciation complexe du plomb en présence de matière organique d'origine naturelle, puisque, selon la composition du biofilm, celle-ci peut avoir un effet protecteur ou non pour les micro-organismes hétérotrophes exposés au métal au cours du test. Enfin, la mise en application du test avec des

expériences d'exposition en conditions contrôlées (microcosmes), puis sur des communautés prélevées et exposées *in situ*, a confirmé la pertinence de l'utilisation d'une activité enzymatique pour évaluer la tolérance de communautés hétérotrophes exposées à des concentrations métalliques environnementales.

- **maximum d'inhibition** : ce paramètre a été d'abord identifié comme une réponse biologique probable, mesurable simultanément à l'EC₅₀ à partir des courbes dose/effet obtenues grâce au test de toxicité (qui permet également, comme pour l'EC₅₀, d'estimer ce paramètre avec un intervalle de confiance à 95%). Cette hypothèse s'est trouvée confirmée par les expériences d'exposition en conditions contrôlées (microcosmes), puisque les "paliers" d'inhibition (maxima d'inhibition de l'activité β -glucosidase < 100%) ont été observés uniquement pour les biofilms ayant acquis une tolérance au métal d'exposition, l'inhibition maximale des biofilms témoins étant de 100 % pour les trois expériences. En revanche, pour des communautés exposées et prélevées *in situ*, l'interprétation de la présence de paliers d'inhibition reste complexe. Si on la relie pour la majorité des métaux avec le gradient de contamination amont/aval le long de la Seine, et par conséquent avec l'augmentation de la tolérance des biofilms prélevés (en d'autres termes le palier diminue quand la tolérance augmente), le cas du zinc se distingue des autres par une absence de corrélation entre tolérance et palier. De même, pour l'expérience de transposition, les modifications nettes des niveaux de tolérance au cuivre ne sont pas accompagnées d'une baisse des maxima d'inhibition. On observe même des niveaux plus faibles pour certains échantillons de biofilms prélevés sur le site amont (Marnay). Enfin, dans le cadre de la campagne sur le bassin de la Seine, les maxima d'inhibition tendent bien à diminuer lorsque les niveaux de tolérance augmentent, mais la relation entre les deux réponses est moins nette dans le cas du zinc. Il semble donc que ce paramètre constitue bien une réponse biologique mesurable avec le test de toxicité β -glucosidase mais moins sensible que l'acquisition de tolérance mesurée par une augmentation de l'EC₅₀ des communautés exposées.

Cette étude a aussi permis d'exploiter la **technique ARISA** sur des communautés périphytiques bactériennes et eucaryotes. Elle est encore peu utilisée sur des biofilms et, en particulier, peu développée pour cibler les micro-organismes eucaryotes. Dans un premier temps, nous avons donc testé et, le cas échéant, mis au point les protocoles des différentes étapes nécessaires à l'obtention des profils ARISA (extraction des acides nucléiques, amplification par PCR, ARISA, traitement et exploitation des électrophorégrammes). En particulier, pour les communautés eucaryotes, ce travail a d'abord consisté en la définition de nouvelles amorces de PCR ciblant spécifiquement les diatomées présentes dans les biofilms. La technique ARISA a ensuite permis d'obtenir des profils génétiques dont l'exploitation, par exemple dans le cadre des expériences d'exposition en microcosmes, a mis en lumière des variations de structure des

communautés exposées, par comparaison aux communautés témoins. Dans le cadre de l'expérience de transposition de biofilm, cette technique a aussi été particulièrement utile pour observer des similarités de profils génétiques entre les communautés transposées et les communautés d'origine des sites de transposition. Enfin, pour des communautés prélevés *in situ* simultanément sur plusieurs sites, l'ARISA (Bactérie et Eucaryote) permet bien de regrouper des communautés similaires, par exemple celles de Bougival et de Triel dans l'expérience mise en œuvre sur la Seine.

L'utilisation des biofilms permet de s'affranchir des problèmes d'habitat du fait de leur caractère ubiquiste. Les expériences de terrain ont ainsi pu être mises en œuvre sur des sites variés : dans un gradient de contamination urbaine le long d'un même fleuve, ou suivant un échantillonnage diversifié de sites dans l'ensemble d'un bassin versant. Les résultats obtenus montrent que la contamination métallique est en général corrélée à d'autres paramètres environnementaux, par exemple les concentrations en nutriments, ou certains paramètres physico-chimiques de l'eau. Ces paramètres environnementaux sont susceptibles d'agir directement sur les organismes exposés ou encore, dans certains cas, sur la spéciation et donc la biodisponibilité des contaminants. Il est donc difficile de distinguer les effets des différents paramètres environnementaux sur les communautés naturelles. En effet, l'influence de paramètres physico-chimiques, identifiés dans cette étude comme des paramètres prépondérants agissant sur les niveaux de tolérance mesurés, ne peut être négligée devant l'influence de la contamination métallique. Par ailleurs, dans les cas très complexes de multi-contaminations métalliques, des phénomènes de co-tolérance interviennent. Ainsi, les tolérances au cadmium et au zinc d'échantillons de périphyton prélevés dans le bassin de la Seine sont peu corrélées aux concentrations en cadmium et en zinc dans le milieu ; en revanche, l'influence d'autres métaux est visible sur ces niveaux de tolérance, par analyse statistique des données obtenues. Toutefois, les résultats sont tout à fait prometteurs quant à l'utilisation des biofilms comme bio-marqueurs d'une contamination urbaine puisque, pour chaque expérience, les niveaux de tolérance augmentent sur les sites les plus contaminés. Ces derniers constituent, de plus, des exemples de sites soumis à une contamination urbaine diffuse non liée à des rejets miniers ; par conséquent, les niveaux de contamination métallique dans les eaux de rivière restent finalement faibles. La technique ARISA permet, de plus, d'identifier des similarités entre des communautés de niveaux de tolérance similaires et confirme à ce titre que l'acquisition de tolérance doit être reliée à des modifications de structure des communautés exposées. Enfin, cette étude valide l'intérêt de développer des bio-marqueurs sensibles de l'impact d'une contamination diffuse et donc faible, puisque les paramètres classiquement associés aux biofilms, tels que des mesures de biomasse, apparaissent en général peu voire pas corrélés à la contamination du milieu.

Ce travail doit être considéré comme une première opportunité d'exploitation des mesures de tolérances de communautés périphytiques hétérotrophes pour évaluer les impacts d'une contamination urbaine multi-métallique. Il démontre la pertinence écologique d'une démarche PICT puisqu'il est possible d'établir un lien entre les niveaux de tolérance des communautés hétérotrophes périphytiques et la contamination chimique du milieu. Ainsi, la tolérance apparaît dans les expériences de terrain comme un bio-marqueur approprié et particulièrement sensible de la réponse biologique de communautés périphytiques exposées en milieu urbain. En revanche, les mesures de tolérance seules ne sont pas suffisantes pour conclure à un impact de la contamination chimique sur les communautés, notamment du fait de l'influence d'autres facteurs environnementaux pour les études de terrain, mais aussi du fait de leur absence de spécificité en raison des phénomènes de co-tolérance. Cette étude montre donc l'intérêt de considérer la contamination urbaine dans sa totalité, par opposition à une approche sélective d'un contaminant, par exemple un métal, choisi comme représentatif de la contamination parmi le cocktail de micropolluants identifiés. Par ailleurs, l'utilisation d'une technique d'empreinte génétique permet d'enrichir les connaissances obtenues sur l'impact de la contamination chimique en examinant les réponses biologiques en termes de modifications de la structure et donc de la composition des communautés. Les deux réponses biologiques (acquisition de tolérance et modifications de structure) apportent des informations sur le coût génétique et donc écologique de l'adaptation des communautés à un environnement impacté.

La réponse biologique, en termes de tolérance, de la composante hétérotrophe des biofilms a été exploitée dans le cadre de cette étude. Pour avoir une vision plus complète des impacts urbains, il serait utile de prolonger ce travail en exploitant la richesse taxonomique et fonctionnelle du périphyton par des mesures de la tolérance d'autres éléments de ces communautés (autotrophes par une approche photosynthétique, ou autres activités enzymatiques permettant d'observer des impacts sur d'autres chaînes métaboliques, etc.). Par ailleurs, une contamination urbaine se caractérise par la présence d'autres types de contaminants. Les développements méthodologiques du test β -glucosidase ont montré que celui-ci n'était pas forcément adapté pour évaluer la tolérance de communautés exposées à des contaminants hydrophobes. Ainsi, une perspective intéressante de ce travail serait de développer des outils de mesure de tolérances sensibles aux contaminants organiques.

Annexes

Chapitre 2.

Mesure de la tolérance des communautés périphytiques exposées en milieu urbain

Résultats des essais de toxicité avec extraits de cartouches SPE (test β -glucosidase)

Protocole des essais de toxicité sur extraits de cartouches SPE

Des essais de toxicité ont aussi été réalisés à partir d'extraits de contaminants obtenus avec des cartouches d'extraction sur phase solide (SPE). Deux types de cartouches SPE, recommandées par le fournisseur pour l'extraction de pesticides dans l'eau, ont été utilisées : Chromabond® EASY et HR-X (Macherey-Nagel, France) en format 6mL/500mg.

L'eau est prélevée in situ à l'aide d'un seau, transvasée dans une bouteille brune préalablement grillée (2,5 L), puis transportée dans une glacière jusqu'au laboratoire. Elle est ensuite filtrée, sous vide, sur filtre GF/F (Whatman, porosité 0.7 μ m) pour éliminer les matières en suspension. Enfin, l'eau est passée sur les cartouches fixées sur support Visiprep (Supelco), après conditionnement de celles-ci par 6 mL de méthanol et 6 mL d'eau ultra-pure, et à raison de 2 L d'eau filtrée par cartouche. Les cartouches sont ensuite rincées à l'eau ultra-pure, puis séchées sous vide pendant 20 minutes. L'étape d'élution suit (3 x 2 mL de méthanol), puis on évapore sous flux d'azote. Les manipulations de transvasement, ainsi que le solvant et le volume de reprise, sont les mêmes que pour les extraits de membranes LDPE.

Mise au point méthodologique

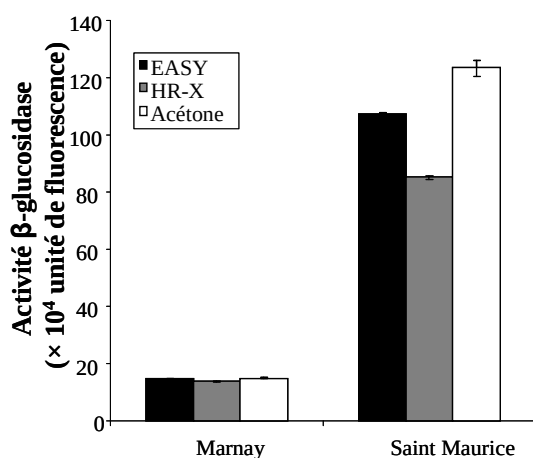


Figure 76 : Activité β -glucosidase (exprimée en unités de fluorescence mesurée au fluorimètre) de biofilms exposés pendant 1h à des extraits d'eau du rû de Rungis filtré sur cartouches SPE. Le biofilm témoin a été exposé à de l'actéone

Les premiers essais de toxicité ont permis de déterminer la cartouche la plus adaptée pour réaliser des essais de toxicité avec le test β -glucosidase : chaque extrait correspond à 2L d'eau du rû de Rungis prélevés simultanément et filtrés sur deux types de cartouches SPE. La toxicité des deux extraits a été testée sur deux biofilms en provenance des sites de Marnay et de Saint-Maurice (Figure 76). Les résultats ne sont pas très tranchés entre les deux types d'extraits, cependant on observe une inhibition significative de l'activité β -glucosidase du biofilm prélevé à Saint-Maurice dans les deux cas, avec une baisse d'activité plus forte pour l'extrait de cartouche HR-X. Cette phase a donc été retenue pour les essais ultérieurs.

Par ailleurs un essai de toxicité avec des blancs d'extraits de cartouches (extraits obtenus en filtrant 2L d'eau ultrapure) a permis de montrer que les cartouches elles-mêmes n'avaient pas d'effet inhibiteur sur l'activité β -glucosidase.

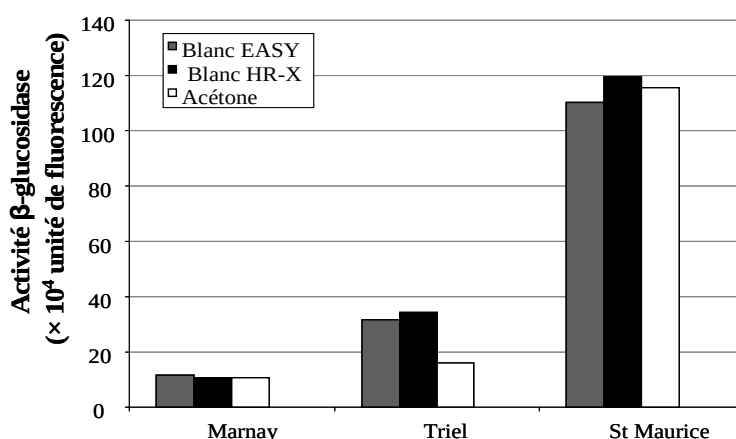


Figure 77 : Activité β -glucosidase (exprimée en unités de fluorescence mesurée par fluorimètre) de biofilms prélevés à Marnay, Triel et St Maurice et exposés pendant 1h à des extraits de cartouches de SPE "blancs" ou à de l'acétone (témoin)

Tests de toxicité d'extraits de cartouche HR-X

Enfin, la toxicité d'extraits d'eau prélevée sur deux sites contrastés (Marnay en amont de Paris en région plutôt agricole, et Triel en aval de Paris, en milieu urbain) a été testée sur deux biofilms (en provenance des sites de Marnay et de Saint-Maurice). Les résultats montrent un effet inhibiteur sur l'activité β -glucosidase limité (inhibition maximale de 14% pour l'extrait de Marnay-sur-Seine sur le biofilm de Saint-Maurice).

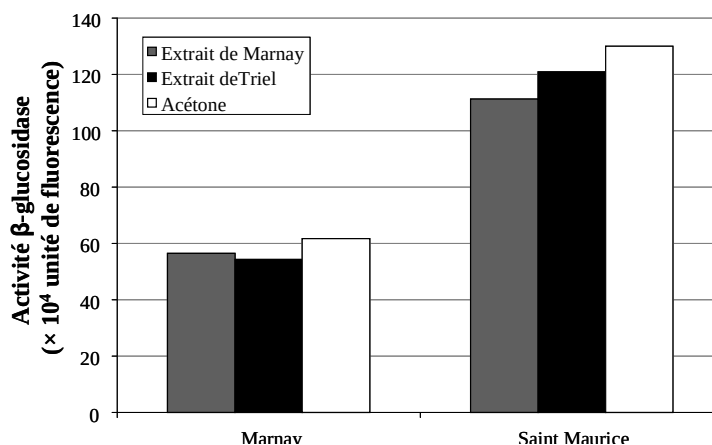


Figure 78 : Activités β -glucosidase (en unités de fluorescence), obtenues sur périphyton en provenance des sites de Marnay et de Saint-Maurice exposé à des extraits d'eau des sites de Marnay et de Triel.

Il est toutefois probable que l'effet inhibiteur pourrait être augmenté en concentrant davantage les extraits de cartouche SPE. Mais ceci nécessiterait l'utilisation de volumes d'eau de rivière très importants et d'une grande quantité de cartouches. L'expérience n'a pas pu être mise en œuvre dans le cadre de cette étude. Par ailleurs, l'utilisation de cartouches SPE signifie que l'on teste la toxicité d'extraits de prélèvements ponctuels des eaux de rivière, ce qui constitue une approche moins intéressante que de travailler à partir d'extraits d'échantillonneur passif.

Mise au point méthodologique du test de toxicité photosynthétique

Détermination du temps d'incubation et de la concentration en MES optimale de la suspension de biofilm

Ces deux paramètres ont été testés simultanément par mesure de la PO₂ nette sur plusieurs suspensions de biofilms prélevés à Saint-Maurice, à divers degrés de dilutions.

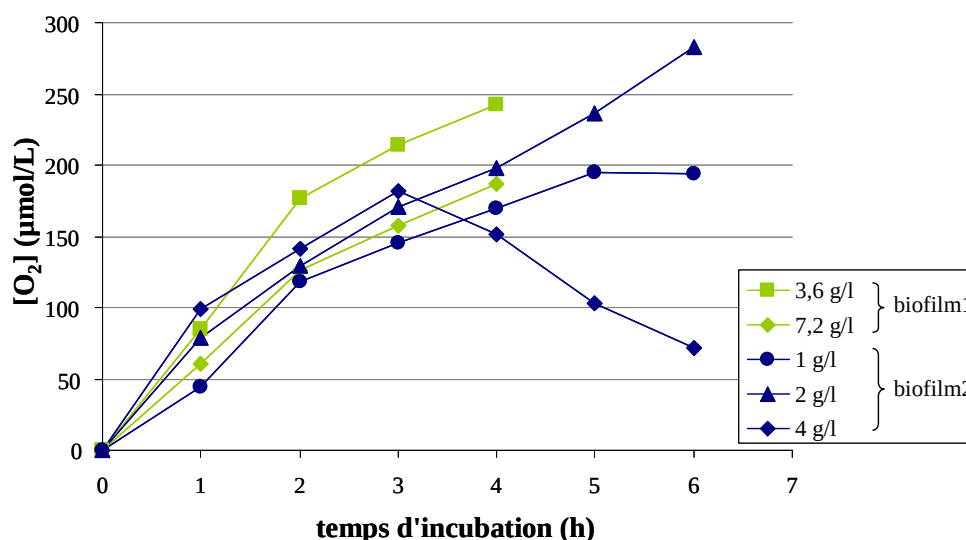


Figure 79 : PO₂ nette (exprimée en $\mu\text{mol O}_2/\text{L}$) mesurée au bout de 1, 2, 3, 4, 5 ou 6 heures d'incubation sur deux suspensions de biofilms prélevés à St Maurice à différents degrés de dilution.

L'expérience montre qu'une durée d'exposition/incubation de 2 heures est suffisante pour observer une PO_2 nette significative. De plus, les PO_2 nettes mesurées pour des durées supérieures, qui rendent par ailleurs la mise en place du test de toxicité beaucoup plus lourde, sont plus fluctuantes suivant les échantillons testés. Enfin, la concentration en MES optimales choisie est de 1 g/L, ce qui correspond à une concentration facile à obtenir tout à long de l'année pour des biofilms prélevés sur le terrain avec un nombre raisonnable de membranes support de colonisation. Par ailleurs, le choix d'une concentration de la suspension peu élevée est nécessaire pour éviter les phénomènes d'auto-ombrage (dans une suspension trop concentrée en particules, les algues reçoivent moins de lumière et la PO_2 nette chute).

Détermination du mode d'agitation

Deux modes d'agitation (magnétique et agitation douce sur table d'agitation rotative) ont été testés sur une même suspension de biofilm. La PO_2 brute mesurée au bout de deux heures d'incubation diminue significativement voire devient négative dans le cas de l'agitation magnétique (Figure 80). Ce résultat s'explique probablement par la fragilité de certaines cellules algales. L'agitation douce a donc été retenue.

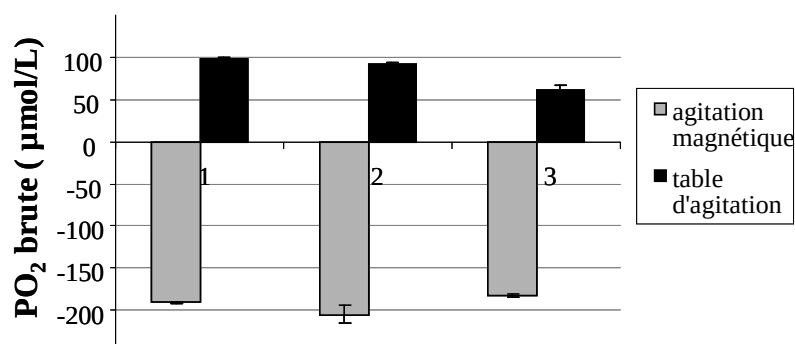


Figure 80 : PO_2 brute (exprimée en $\mu\text{mol O}_2/\text{L}$) obtenue pour trois répliquats d'une même suspension de biofilm après 2h d'incubation à la lumière sous agitation forte (magnétique) ou douce (table d'agitation rotative)

Note technique Ecotoxicology

Adapting an enzymatic toxicity test to allow comparative evaluation of natural freshwater biofilms' tolerance to metals

Ecotoxicology

19: 1302-1311

Accepted: 29 June 2010 / Published online: 10 July 2010

The original publication is available at www.springerlink.com

Lise C. Fechner[^], Catherine Gourlay-Francé, Emmanuelle Uher, Marie-Hélène Tusseau-Vuillemin

Cemagref – Unité de Recherche Hydrosystèmes et Bioprocédés

Parc de Tourvoie, BP 44

F 92163 Antony Cedex

France

[^]Tel: +33140966568

[^]Fax: +33140966199

[^]E-mail: lise.fechner@cemagref.fr

Abstract

A simple, low-cost and non-radioactive short-term toxicity test was developed to study the effects of urban metals on natural freshwater periphytic communities. β -glucosidase activity of natural freshwater biofilms collected *in situ* was chosen as an endpoint. Metals (Cd, Cu, Ni, Pb, and Zn) successfully inhibited bacterial enzymatic activity after a one-hour exposure enabling the calculation of EC_{50} . The EC_{50} value of a biofilm sample varied with the Total Suspended Solids concentration (TSS) of the biofilm suspension, showing that EC_{50} values (expressed as total added metal concentrations) are not representative of the bioavailable metal concentration during the toxicity test. For Cu, Cd, Ni, Zn and Pb, the EC_{50} values increased linearly with the TSS concentration leading us to define a normalized EC_{50} : the value of the EC_{50} divided by the corresponding TSS concentration. Normalized EC_{50} proved to be a robust, reliable way to assess metal tolerance of a biofilm for Cd, Cu, Ni, Zn and Pb. Normalized EC_{50} obtained, expressed as $kg_{\text{metal}}/g_{\text{TSS}}$, varied between 0.2 to 7.6 for Cu, 1 to 8 for Cd, 1.8 to 92.3 for Ni, 1.8 to 76.6 for Zn and 25 to 189 for Pb.

Key words: periphyton, enzymatic activity, short-term toxicity test, metal tolerance

Introduction

Anthropogenic pressure in aquatic systems leads to the presence of a mixture of toxicants in a range of concentrations that are usually not lethal but that are the cause of more subtle, chronic effects on the composition and behaviour of biological communities. It is not easy to establish the link between long-term exposure to multiple and diffuse contaminations and a possible biological response in natural ecosystems. Indeed the biological response is particularly complex because of the exposed organisms' adaptation, the lengths of time that are required to observe chronic effects and the multiplicity of stress parameters both natural and anthropogenic.

In this context, it is necessary to develop methods allowing to discriminate pollution-induced modifications from those due to other causes. Exposure to a toxicant induces community changes by selecting tolerant components, which can be either species, genotypes or phenotypes (Bérard et al. 2002; Blanck 2002). As a result, the exposed community becomes less sensitive to the toxicant. Community tolerance as described in the PICT – Pollution Induced Community Tolerance – concept, introduced by Blanck et al. (2002), is thus an interesting tool to study the effects of a chronic contamination.

The determination of community tolerance to a given contaminant is achieved by the means of short-term toxicity tests. Community tolerance, usually expressed as an Effect Concentration (EC), is a complex parameter which integrates the response of numerous species within the studied community and their interactions. Comparisons of tolerance levels (usually EC₅₀) allow to determine if the toxicant has affected the studied community. The toxicity tests are performed using metabolic endpoints such as bacterial or photosynthetic activities, mostly with the use of radioactive reagents (Blanck 2002; Blanck et al. 2003).

Periphyton is a biofilm composed of algae, bacteria, fungi, protozoan and other species that develop on submerged objects such as rocks, macrophytes and other substrates. It plays an important part in aquatic ecosystems as primary producer and can be useful in assessing the overall health of an aquatic system. For instance, biofilms are regarded as good early warning indicators of the presence of toxicants in aquatic ecosystems (Sabater et al. 2007). They have also been used for PICT measurements with herbicides, antifouling agents or metals (Blanck 2002; Sabater et al. 2007).

Metal toxicity has long been studied on aquatic organisms (Tessier and Turner 1995). As regards micro-organisms and in particular bacteria, many toxicity tests have been widely used, for instance the classical Microtox test (Bulich and Isenberg 1981). However those tests do not provide information on the impact of metal exposure on natural organisms. Moreover toxicity testing at the community level provides a much broader context for the assessment of environmental contamination than studies on individual species (Clements and Rohr 2009). It is therefore most interesting to develop toxicity tests to study the effects of metals on natural biofilms.

Exo-enzymes, and in particular β -glucosidase, which controls essential metabolic pathways in aquatic ecosystems, are interesting to study the effects of environmental perturbation on the functioning of aquatic ecosystems (Admiraal and Tubbing 1991). Exo-enzymatic activities have already been used for metal toxicity testing on bacterioplankton (Tubbing and Admiraal 1991). β -glucosidase activity, which represents the global activity of heterotrophic micro-organisms (Chrost 1991), is therefore an interesting endpoint for a short-term toxicity test used to assess metal tolerance of natural biofilms. To avoid problems related to biofilm thickness such as poor diffusion of the substrate inside the biofilm matrix and also to obtain comparable activity measurements via better homogenization of the biofilms, β -glucosidase activity is usually measured on disrupted biofilms (biofilm suspensions) (Romaní et al. 2008; Smucker et al. 2009). The issue of bioavailability during the short-term toxicity tests is not often addressed. It is however an essential point when quantifying community tolerance with EC_{50} values. EC_{50} are usually expressed as nominal (or total added) metal concentrations and are not good indicators of metal exposure: if bioavailability is low during the test, it can be erroneously interpreted as an increase in community tolerance (Blanck 2002; Blanck et al. 2003). Bioavailability can be affected either by the test media which is usually filtered river water, a problem which can be eliminated by using the same test medium for all biofilm samples (Blanck et al. 2003), or by the periphyton composition itself. Indeed periphyton is a complex matrix of microorganisms, particulate matter and extracellular polymers (EPS) (Wimpenny 2000). The composition of the biofilm matrix is influenced by its environment, for instance via the production of EPS (Serra and Guasch 2009) or cellular ligands (Soldo and Behra 2000), or the presence of iron and manganese oxides, which can sometimes induce precipitation of metals within biofilms (Admiraal et al. 1999; Lehmann et al. 1999): all these elements are likely to modify metal speciation during metal toxicity testing. Indeed the biofilm composition affects metal bioavailability and thus metal exposure levels during the tests. For instance, the presence of inorganic particles like silt in natural river biofilms

can influence metal bioavailability and thus modify the EC₅₀ value obtained with a short-term toxicity test.

This paper presents the development of a new method allowing comparative evaluation of natural freshwater biofilms' tolerance to metals using exo-enzymatic activities. We chose to focus on several metals present in urban rivers (Cd, Cu, Ni, Pb and Zn) and on their effects on the β -glucosidase activity of the heterotrophic component of periphyton. In order to obtain comparable tolerance levels, we also investigated the influence of the biofilm concentration on toxicity tests' results: for each metal, EC₅₀ values were calculated for several dilutions of the same biofilm suspension. We then developed a simple normalization process to take into account metal bioavailability during the toxicity tests.

Material and methods

Sampling sites

Periphyton was collected on Low Density PolyEthylene plastic membranes that were vertically attached and immersed either in the Seine river at Andresy (downstream from Paris, Strahler: 8, mean annual flow in 2007: 450 m³/s) or the Marne river at Saint-Maurice (upstream from Paris, Strahler: 6; mean annual flow in 2007: 112 m³/s). Andresy is located approximately 4 kilometres downstream the effluent discharge from the sewer treatment plant Seine-Aval (nominal capacity 8 10⁶ inhabitants, flow 24 m³/s). Periphyton was collected on plastic membranes all year round after colonization times of at least 7 days. Biofilms were collected from both sites at different periods of the year and with different colonization times to adjust the methodology of the toxicity test.

Preparation of the periphyton suspension

Colonized membranes were taken out of the water and carried in 250 mL glass bottles filled with mineral water (Grand Barbier, Mont-Dore, France). Blanck *et al.* (2002; 2003) recommend to use the same medium for all toxicity tests, in order to avoid changes in metal bioavailability during metal toxicity testing. Mineral water was used instead of a buffer, in order to avoid modifying metal speciation within the biofilm suspension during the toxicity tests by adding metal complexing agents. Mont-Dore water, which is weakly mineralized, was chosen to avoid adding too many mineral substances during the experiments (composition in mg/L: Ca²⁺: 4.1, Mg²⁺: 1.7, Na⁺: 2.7, K⁺: 0.9, SO₄²⁻: 1.1, HCO₃⁻: 25.8, Cl⁻: 0.9, NO₃⁻: 0.8, NO₂: 0.0). The bottles were taken back to the laboratory in an cooler and then rinsed with mineral water. The membranes were

hand-scraped to remove periphyton. The periphyton suspensions (made with mineral water) were homogenized by fast magnetic stirring before being aliquoted for periphyton analyses or toxicity testing.

Characterization of the periphyton suspensions

Periphyton samples were characterized by their Dry Weight (DW) expressed in gram per m² of plastic membrane. DW were determined by filtration of a known volume of biofilm suspension (between 5 to 20 mL according to the concentration of the suspension) on calcinated 0.7 µm-glass-fiber filters (GF/F Whatmann®, Kent, UK) further dried out at 100°C for 2 to 3 hours.

Periphyton suspensions used for the toxicity tests were characterized by their TSS (Total Suspended Solids) concentrations expressed in gram of dry matter per liter of biofilm suspension. TSS concentrations were calculated simultaneously with DW concentrations by filtration of a known volume of suspension. TSS concentrations were measured for each dilution of periphyton suspensions used for the toxicity tests.

β-glucosidase activity measurement

The enzymatic activity of periphyton was determined using methylumbelliferone-β-D-glucopyranoside or MUF-GLU (Sigma-Aldrich). Prior to its addition to the periphyton samples, MUF-GLU was dissolved in demineralized water in order to achieve 4 mM MUF-GLU. The MUF-GLU stock solution was stored at a deep-freeze temperature of – 20 °C. Aliquots of this stock solution (100 or 200 µL) were added to 4 mL of periphyton suspension which was vortexed and then left to incubate in the dark on an orbital shaker for 30 minutes at 20°C. 400 µL of 1M NaOH were then added to stop the enzymatic reaction according to Li & Chrost (2006). The assays were performed at saturating levels of substrate (100 or 200 µM MUF-GLU) after determination of the saturation concentration. Fluorescence of MUF was measured without delay following centrifugation (15 minutes, 3000 rpm) by adding about 3 mL of the supernatant to a UV-cuvette and using a SAFAS SP 2000 Xenius spectrofluorimeter at an excitation wavelength of 348 nm and an emission wavelength of 448 nm. For each periphyton assay, a standard curve was also produced by plotting the peak heights of a range of MUF solutions as a function of the corresponding MUF concentrations. Results showed that fluorescence peak height was proportional to the MUF concentration. Therefore β-glucosidase activity was expressed as MUF fluorescence peak height at 448 nm. Control samples were assessed with a null incubation time by adding NaOH directly after the substrate. Fluorescence of the control was always negligible

when compared to fluorescence levels of other samples and pH was >13 in all supernatants due to NaOH addition.

β-glucosidase toxicity test on periphyton

Solutions of metals were prepared using demineralized water and metallic salts $\text{Cd}(\text{NO}_3)_2$, $\text{ZnSO}_4(\text{H}_2\text{O})_7$, CuCl_2 , and $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$ (Acros Organics, Geel, Belgium).

3.96 mL of periphyton suspension in mineral water were added to 15 mL plastic tubes with 40 μL of metal solution. One control (40 μL of demineralized water instead of metal solution) and 5-6 metal concentrations were tested in triplicates. Nominal exposure concentration of metals varied between 0.32 and 63.5 mg/L for Cu, 0.25 and 100 mg/L for Cd, 0.1 and 599 mg/L for Ni, 0.1 and 657.7 mg/L for Zn, 0.3 to 2084 mg/L for Pb. Concentrations were chosen so that maximum inhibition of β-glucosidase activity was reached. For that purpose the highest concentration tested in the range was often at least ten times higher than the second highest concentration tested. The tubes were vortexed and left to incubate in the dark at 20°C on an orbital shaker for one hour. A one-hour exposure time was sufficient to inhibit β-glucosidase activity in all experiments. β-glucosidase activity was then measured according to the protocol described above. Preliminary studies showed that fluorescence levels were not disrupted by adding high concentrations of metal. Metal effect on β-glucosidase activity was reported as the decrease of MUF fluorescence signal. Dose/effect curves were obtained by plotting MUF fluorescence signal as a function of metal concentration. The curves were fitted to the Hill model (Hill 1910) by non-linear regression using the algorithm of Marquardt (1963) and a non-linear regression program proposed by Duggleby (Duggleby 1981) (for more details, see <http://eric.vindimian.9online.fr>). The general form of the curve fitted on the data is:

$$F(x) = (p_{\max} - p_0) \frac{x^H}{x^H + EC_{50}^H} + p_0$$

where x is the metal concentration, p_0 is the effect observed without toxicant, $p_{\max}$ is the predicted effect when the toxicant concentration is infinite and $F(x)$ is a probability law. H is the Hill number (slope of the toxicity curve) and EC_{50} the median effect concentration. Each parameter (p_0 , $p_{\max}$, EC_{50} and H) is adjusted for the calculation. Confidence intervals around the fitted parameters were estimated using a Bootstrap method. Dose/effect curves are represented as an augmentation of the percentage of inhibition of the MUF fluorescence signal of the control with the metal concentration.

Influence of the periphyton suspension concentration

For each metal, dilution experiments (two per metal, see Table 1 and Table 2) were performed to investigate the influence of biofilm suspensions' concentrations on the measurement of tolerance: for each dilution experiment, three dilutions were prepared in mineral water from a unique biofilm suspension and used to perform three toxicity tests. Metals were tested separately i.e. on different biofilms (collected at different times of the year): testing different biofilms allowed to validate the fact that the influence of the biofilm suspension's concentration on tolerance measurement is not related to the particular composition of a given biofilm sample but to modifications of metal bioavailability during the toxicity tests. Dilution factors ranged between 2 and 10. The three dilutions were used to perform β -glucosidase toxicity tests and determine three EC_{50} values. Data from the three toxicity tests were also gathered on the same plot to produce a unique dose/effect curve with the % inhibition of β -glucosidase activity as a function of TSS-normalized metal concentrations from the three toxicity tests.

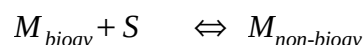
Results and Discussion *β -glucosidase inhibition by metals*

Table 1 gives information on the sampled biofilms (sampling site, sampling date, colonization time, DW and metal tested). All the metals that were tested (Cd, Cu, Ni, Pb, Zn) successfully inhibited the β -glucosidase activity of periphyton after a one-hour exposure and EC_{50} could be assessed using the dose/effect curves. The EC_{50} that we obtained cover a large range of values (Table 2 and 3). Such variations of tolerance of complex, natural communities are not surprising considering that susceptibility to toxicants can vary by several orders of magnitude among taxonomically different species (Slooff et al. 1983) and is a well known phenomenon in biofilms varying in age and succession status (Sabater et al. 2007). Interpretation of such variability is outside of the scope of the present study, which was to further develop an enzymatic toxicity test. The EC_{50} that we obtained are in the range of values from various studies using radioactive short-term toxicity tests, for instance with Cd (Lehmann et al. 1999) or Zn (Admiraal et al. 1999; Blanck et al. 2003; Lehmann et al. 1999) using thymidine incorporation as an endpoint. The EC_{50} of the biofilms collected at Andresy are rather high and closer to EC_{50} measured on sludge by inhibition of alanine-aminopeptidase activity (Dalzell et al. 2002).

Bioavailability of metals using the β -glucosidase toxicity test

The issue we want to address is that the EC_{50} value for a given biofilm varies with the concentration of the biofilm suspension. Yet, in order to compare the tolerance of communities exposed to different levels of contamination – which is compulsory when trying to investigate pollution-induced community modifications - it is important to develop a measure of the short-term toxicity of the contaminant (expressed as EC_{50}) that does not depend on metal bioavailability during the toxicity test.

To investigate this phenomenon, β -glucosidase toxicity tests were performed on dilution series of the same biofilm suspension (three dilutions of a biofilm suspension for each dilution experiment). Biofilm suspensions were not diluted more than 2 to 10 times so that there should be no radical changes in the composition of the community. The biofilm suspensions' concentrations were roughly estimated by their TSS concentrations. For each dilution experiment, EC_{50} values were calculated using the three dose/effect curves corresponding to the three biofilm dilutions. Results show that the more concentrated the biofilm suspension, the greater the EC_{50} value (Fig. 1 and Table 3). Doubtlessly mineral or organic particles present in the biofilm suspension affect metal bioavailability to biofilm organisms. It all happens as if there was a physico-chemical equilibrium between the metal and the metal sorption sites (S), in which metal was partitioned between bioavailable and non-bioavailable metal (fixed to the sorption sites), which can be translated into equations (1) and (2):



$$K = \frac{[M_{non-bioav}]}{[M_{bioav}] \times [S]} \quad (1)$$

$$[M_{tot}] = [M_{bioav}] + [M_{non-bioav}] \quad (2)$$

where K is the equilibrium constant, M_{tot} is the total metal concentration, M_{bioav} the bioavailable fraction of the metal, and $M_{non-bioav}$ the concentration of metal which is not bio-available.

Equations (1) and (2) can be combined to express M_{tot} as a function of [S] and M_{bioav} :

$$[M_{tot}] = [M_{bioav}] \times K \times [S] + [M_{bioav}] \quad (3)$$

Equation 3 can be written as equation 4 for a metal exposure level corresponding to the EC_{50} value (expressed in total added metal concentrations):

$$EC_{50} = [M_{bioav_EC50}] \times K \times [S] + [M_{bioav-EC50}] \quad (4)$$

Plots of EC_{50} values experimentally obtained for dilution series of a biofilm suspension and the corresponding TSS concentrations are shown in Fig. 1. If we further assume that the concentration of metal sorption sites $[S]$ is proportional to the biofilm concentration ($[TSS]$), the linear relationship observed between the EC_{50} and the corresponding TSS concentrations in Fig. 1 is validated by the theoretical equation (4). The y-intercept (M_{bioav_EC50}) would be the hypothetical bioavailable metal concentration, at the EC_{50} , for a biofilm suspension with no particles ($[S] = [TSS] = 0$). It is therefore not a very realistic parameter to consider. As shown in Fig. 1, the y-intercept is also close to zero and cannot be estimated reliably by this method.

Variations of EC_{50} values with the TSS concentration led us to define a normalized EC_{50} which is the value of the EC_{50} (g/L) divided by the TSS concentration of the corresponding biofilm suspension (expressed in g/L). Fig. 2 shows, for all five metals, on the one hand, the three distinct dose/effect curves corresponding to the three dilutions of a biofilm suspension (percentage of enzymatic activity inhibition as a function of metal concentration), and, on the other hand, the unique dose/effect curve obtained by gathering the data from the three toxicity tests: percentages of enzymatic activity inhibition from the three toxicity tests are expressed as a function of TSS-normalized concentrations of metal and plotted together. Therefore three distinct dose/effect curves can be merged into a single one by a simple normalization process.

Table 3 shows, for each dilution experiment, the three TSS-normalized EC_{50} values, calculated from the three dose/effect curves from the three biofilm dilutions and the global EC_{50} value calculated from the unique corresponding dose/effect curve. Considering the 95% confidence intervals, for one dilution experiment, the three TSS-normalized EC_{50} values (from the three dilutions) can be considered equal for Cd, Cu, Ni and Zn. For some biofilm samples (Table 3), the 95% confidence intervals of the global EC_{50} and the first biofilm dilution do not strictly overlap, but the limits of both confidence intervals remain close.

Modification of metal bioavailability, in the presence of environmental samples, during toxicity tests, is a problem likely to be encountered in any toxicity test, even when undisrupted biofilm is used, e.g. with colonized glass disks (as used for instance in (Blanck et al. 2003; Lehmann et al. 1999)). For instance, it is possible that Dissolved Organic Matter (DOM) or other abiotic components (e.g. silt particles) embedded in the biofilm matrix modify metal bioavailability during the toxicity tests but these effects are not easily detected. Indeed, in our study, it was

possible to highlight problems related to metal bioavailability with toxicity tests performed on several dilutions of a biofilm suspension. Soldo & Behra (2000) already underlined the importance of metal speciation in the design of toxicity tests: they also used periphyton suspensions and normalized their toxicity data to the concentration of chlorophyll *a* in their periphyton suspensions.

It is obvious that the model we propose is a rough description of the phenomenon and that sorbed-metal is not limited to metal bound to particles. For instance, it is likely that DOM also plays a protective role on the biofilm microorganisms in the biofilm suspensions as has previously been shown (Campbell 1995; Morel 1983) – more recently such a protective role of anthropic DOM from filtered wastewater samples on *Daphnia magna* was also uncovered (Buzier et al. 2006). However in complex, heavily-loaded biofilm suspensions, it is likely that the metal/particles equilibrium is predominant. In our model, the TSS concentration provides a rough estimate of a quantity of matter (mineral and organic) which acts directly on metal bioavailability without presuming on the nature of the matter considered (silt particles, EPS - produced by microorganisms, DOM, etc.). With TSS-normalization, the variation of metal tolerance (EC_{50}) with the dilution of the biofilm suspension disappears. Consequently, a normalized EC_{50} is a reliable and robust estimation of metal tolerance that does not depend on experimental conditions as standard EC_{50} do: it can thus be used to compare different biofilms which was beyond the scope of this study.

β -glucosidase toxicity tests with Pb

As far as Pb is concerned, the relationship between the concentration of the biofilm suspension and the toxicity of the metal is less clear (Table 3). Indeed metal bioavailability and toxicity for Pb are likely to be affected differently by interactions with the particles in the biofilm suspension than for the other four metals studied. The difference of behaviour between Pb and the other metals that were tested in this study has been noticed before in the presence of metal ligands: for instance, both Tsiridis *et al.* (2006) and Sánchez-Marín *et al.* (2007) observed an increase of Pb toxicity in the presence of humic acids. Possible explanations mentioned in those studies are modifications of cell surface charge by DOM adsorption to cell membranes and the formation of ternary complexes between Pb, DOM components and the cell membrane, which could explain the increased uptake of Pb by organisms in the presence of DOM (Slaveykova 2007). Depending on its composition, DOM can also have a protective effect against Pb toxicity (Sánchez-Marín et al. 2010). It is therefore difficult to model Pb toxicity to aquatic organisms as a function of Pb

speciation. In our study, Pb bioavailability is probably affected differently by particles or DOM in the biofilm suspensions, as the biofilms' composition varied between both dilution experiments. Hence normalization of EC_{50} might not be a sufficient means to reliably assess lead tolerance of a heterotrophic periphyton community.

Conclusion

This study was a first step towards assessing metal tolerance of freshwater biofilms. It focused on the development and interpretation of a short-term toxicity test based on the measure of the β -glucosidase activity of the heterotrophic part in biofilms. The test was developed on natural biofilm samples collected *in situ* at two different sites, and at different dates. Our first results show that β -glucosidase activity is inhibited by all the metals tested, and that EC_{50} values can be calculated from the resulting concentration/effect curves. We observed that EC_{50} values vary with the concentration of the biofilm suspension used for the tests. This led us to define a normalized EC_{50} which can be used to reliably compare Cd, Cu, Ni, and Zn tolerance levels of biofilms sampled at different sites. Normalized EC_{50} values obtained in a heavily polluted site (Andresy) can be more than 10 times higher than normalized EC_{50} values obtained at Saint-Maurice, which is less polluted although it is still located in an urban area (Tusseau-Vuillemin et al. 2007). Therefore metal tolerance of periphyton can be simply assessed by metal toxicity testing using β -glucosidase activity as an endpoint and uncomplicated biomass measurements by filtration for TSS normalization.

Acknowledgments

This study was supported by ONEMA (Office National de l'Eau et des Milieux Aquatiques) and is part of the SISTEO project from the Ile-de-France Regional Council. We thank Françoise Lucas for her valuable help.

References

- Admiraal W, Blanck H, Buckert-de Jong M, Guasch H, Ivorra N, Lehmann V, Nystrom BAH, Paulsson M, Sabater S (1999) Short-term toxicity of zinc to microbenthic algae and bacteria in a metal polluted stream. *Water Research* 33(9):1989-1996.
- Admiraal W, Tubbing DMJ (1991) Extracellular enzyme activity associated with suspended matter in the River Rhine. *Freshwater Biology* 26:507-517.
- Bérard A, Dorigo U, Humbert JF, Leboulanger C, Seguin F (2002) La méthode PICT (Pollution-Induced Community Tolerance) appliquée aux communautés algales: intérêt comme outil de diagnose et d'évaluation du risque écotoxicologique en milieu aquatique. *Annales de Limnologie* 38(3).
- Blanck H (2002) A Critical Review of Procedures and Approaches Used for Assessing Pollution-Induced Community Tolerance (PICT) in Biotic Communities. *Human and Ecological Risk Assessment* 8:1003-1034.
- Blanck H, Admiraal W, Cleven RFMJ, Guasch H, Hoop MAGTvd, Ivorra N, Nyström B, Paulsson M, Petterson RP, Sabater S and others (2003) Variability in Zinc Tolerance, Measured as Incorporation of Radio-Labeled Carbon Dioxide and Thymidine, in Periphyton Communities Sampled from 15 European River Stretches. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology* 44(1):17-29.
- Bulich AA, Isenberg DL (1981) Use of the luminescent bacterial system for the rapid assessment of aquatic toxicity. *ISA Transactions* 20(1):29-34.
- Buzier R, Tusseau-Vuillemin MH, Mouchel JM (2006) Evaluation of DGT as a metal speciation tool in wastewater. *Science of the Total Environment* 358(1-3):277-285.
- Campbell PGC (1995) Interactions between Trace Metals and Aquatic Organisms: A Critique of the Free-ion Activity Model. In: Tessier A, Turner DR (eds) *Metal Speciation and Bioavailability in Aquatic Systems*. John Wiley & Sons LTd, Chichester, pp 45-102
- Chrost RJ (1991) Environmental Control of the Synthesis and Activity of Aquatic Microbial Ectoenzymes. In: Chrost RJ (ed) *Microbial Enzymes in Aquatic Environments*. Springer-Verlag, New-York, USA, pp 29-59
- Clements WH, Rohr JR (2009) COMMUNITY RESPONSES TO CONTAMINANTS: USING BASIC ECOLOGICAL PRINCIPLES TO PREDICT ECOTOXICOLOGICAL EFFECTS. *Environmental Toxicology and Chemistry* 28(9):1789-1800.
- Dalzell DJB, Alte S, Aspichueta E, de la Sota A, Etxebarria J, Gutierrez M, Hoffmann CC, Sales D, Obst U, Christofi N (2002) A comparison of five rapid direct toxicity assessment methods to determine toxicity of pollutants to activated sludge. *Chemosphere* 47(5):535-545.
- Duggleby RG (1981) A nonlinear regression program for small computers. *Analytical Biochemistry* 110(1):9-18.
- Hill AV (1910) The possible effects of the aggregation of the molecules of haemoglobin on its dissociation curves. *Journal of Physiology* 40:iv-vii.
- Lehmann V, Tubbing GMJ, Admiraal W (1999) Induced Metal Tolerance in Microbenthic Communities from Three Lowland Rivers with Different Metal Loads. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology* 36(4):384-391.
- Li Y, Chrost RJ (2006) Microbial enzymatic activities in aerobic activated sludge model reactors. *Enzyme and Microbial Technology* 39(4):568-572.
- Marquardt DW (1963) An Algorithm for Least-Squares Estimation of Nonlinear Parameters. *SIAM Journal on Applied Mathematics* 11(2):431-441.
- Morel FM (1983) *Principles of Aquatic Chemistry*. John Wiley & Sons, New York, NY, USA
- Romani A, Fund K, Artigas J, Schwartz T, Sabater S, Obst U (2008) Relevance of Polymeric Matrix Enzymes During Biofilm Formation. *Microbial Ecology* 56(3):427-436.

- Sabater S, Guasch H, Ricart M, Romaní A, Vidal G, Klünder C, Schmitt-Jansen M (2007) Monitoring the effect of chemicals on biological communities. The biofilm as an interface. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 387(4):1425-1434.
- Sánchez-Marín P, Lorenzo JI, Blust R, Beiras R (2007) Humic Acids Increase Dissolved Lead Bioavailability for Marine Invertebrates. *Environ. Sci. Technol.* 41(16):5679-5684.
- Sánchez-Marín P, Santos-Echeandía J, Nieto-Cid M, Álvarez-Salgado XA, Beiras R (2010) Effect of dissolved organic matter (DOM) of contrasting origins on Cu and Pb speciation and toxicity to *Paracentrotus lividus* larvae. *Aquatic Toxicology* 96(2):90-102.
- Serra A, Guasch H (2009) Effects of chronic copper exposure on fluvial systems: Linking structural and physiological changes of fluvial biofilms with the in-stream copper retention. *Science of The Total Environment* 407(19):5274-5282.
- Slaveykova VI (2007) Predicting Pb bioavailability to freshwater microalgae in the presence of fulvic acid: Algal cell density as a variable. *Chemosphere* 69(9):1438-1445.
- Slooff W, Canton JH, Hermens JLM (1983) Comparison of the susceptibility of 22 freshwater species to 15 chemical compounds. I. (Sub)acute toxicity tests. *Aquatic Toxicology* 4(2):113-128.
- Smucker N, DeForest J, Vis M (2009) Different methods and storage duration affect measurements of epilithic extracellular enzyme activities in lotic biofilms. *Hydrobiologia* 636(1):153-162.
- Soldo D, Behra R (2000) Long-term effects of copper on the structure of freshwater periphyton communities and their tolerance to copper, zinc, nickel and silver. *Aquatic Toxicology* 47(3-4):181-189.
- Tessier A, Turner DR (1995) *Metal Speciation and Bioavailability in Aquatic Systems*. John Wiley & Sons, Chichester
- Tsiridis V, Petala M, Samaras P, Hadjispyrou S, Sakellaropoulos G, Kungolos A (2006) Interactive toxic effects of heavy metals and humic acids on *Vibrio fischeri*. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 63(1):158-167.
- Tubbing DMJ, Admiraal W (1991) Sensitivity of bacterioplankton in the Rhine River to various toxicants measured by thymidine incorporation and activity of exoenzymes. *Environmental Toxicology and Chemistry* 10(9):1161-1172.
- Tusseau-Vuillemin M-H, Gourlay C, Lorgeoux C, Mouchel J-M, Buzier R, Gilbin R, Seidel J-L, Elbaz-Poulichet F (2007) Dissolved and bioavailable contaminants in the Seine river basin. *Science of The Total Environment* 375(1-3):244-256.
- Wimpenny JWT (2000) An overview of biofilms as functional communities. In: Allison DG, Gilbert P, Lapin-Scott HM, Wilson M (eds) *Community Structure and Co-operation in Biofilms*, SGM Symposium Series ed. Cambridge University Press, Cambridge, UK, pp 1-24

Table 1. TSS, colonization time and metals tested on biofilms collected at Saint-Maurice and Andresy (nd: not determined, d: a dilution experiment was performed).

sampling site	sampling date	colonization time (days)	DW (g/m ²)	metal tested
Saint-Maurice	9 Jan. 08	44	7,51	Cu (d)
	14 Jan. 08	49	8,72	Cu, Cd (d)
	21 Jan. 08	56	6,89	Cd (d)
	28 Jan. 08	54	30,04	Cd (d)
	18 Feb. 08	75	102,88	Cu (d)
	25 Feb. 08	83	140,45	Ni (d)
	11 Mar. 08	98	51,32	Pb
	18 Mar. 08	105	57,95	Zn (d)
	25 Mar. 08	50	21,38	Pb (d)
	31 Mar. 08	56	21,82	Ni (d)
	07 Apr. 08	63	30,58	Zn (d)
	01 Jul. 08	69	54,35	Pb (d)
	07 Jul. 08	76	85,78	Cu, Cd, Zn, Ni
Andresy	06 Nov. 06	12	12,72	Cu, Cd, Zn
	14 Nov. 06	7	2,12	Ni, Pb
	28 Nov. 06	15	15,40	Ni
	11 Dec. 06	14	5,48	Cu

Table 2. EC₅₀ (mg/L) and normalized EC₅₀ (*10³ g_{metal}/g_{TSS}) obtained for Cu, Cd, Ni, Zn and Pb from biofilms collected at Saint-Maurice and Andresy (a) with their 95% confidence intervals (in brackets). Normalized values are multiplied by 10³ for more convenient reading.

Metal	EC ₅₀ and 95% confidence interval	EC ₅₀ /TSS
Cu	12.15 ^a (11.15-13.25)	7.63 (7.01-8.34)
	1.24 ^a (0.86-2.82)	1.81 (0.00-4.52)
	0.54 (0.46-0.63)	0.33 (0.28-0.38)
	0.18 (0.17-0.19)	0.36 (0.29-0.44)
Cd	12.78 ^a (5.92-25.15)	8.03 (0.23-15.84)
	2.49 (2.33-2.64)	2.54 (2.38-2.69)
Ni	25.24 ^a (12.78-778.06)	92.26 (48.22-2936.09)
	43.40 ^a (38.32-49.13)	28.18 (23.37-32.99)
	7.40 (7.09-7.77)	7.54 (7.22-7.92)
Zn	19.37 ^a (14.87-32.91)	76.58 (41.28-111.88)
	0.68 (0.54-0.85)	1.38 (0.94-1.81)
Pb	50.13 ^a (36.00-51.63)	189.18 (135.88-194.81)
	47.16 (39.70-55.10)	34.28 (28.4-40.1)

Table 3. EC₅₀ (mg/L) and normalized EC₅₀ (*10³ g_{metal}/g_{TSS}), with their 95% confidence intervals (in brackets), for Cu, Cd, Ni, Zn and Pb from biofilms collected at Saint-Maurice used in the dilution experiments. Normalized values are multiplied by 10³ for more convenient reading. For the dilution experiments, the global EC₅₀ value obtained from the unique dose/effect curve calculated with the TSS-normalized metal concentrations and corresponding inhibition data is shown (last column).

Metal	EC ₅₀	EC ₅₀ /TSS	Global EC ₅₀ /TSS from the unique dose effect curve (dilution)
Cu	0.44 (0.42-0.46)	0.3 (0.27-0.32)	0.32 (0.30-0.34)
	0.25 (0.18-0.41)	0.4 (0.11-0.69)	
	0.07 (0.05-0.12)	0.29 (0.10-0.48)	
	0.87 (0.79-0.96)	0.28 (0.21-0.35)	0.24 (0.22-0.26)
	0.36 (0.33-0.39)	0.25 (0.22-0.28)	
	0.1 (0.10-0.11)	0.18 (0.14-0.22)	
Cd	5.25 (4.15-7.49)	3.25 (1.24-5.26)	2.89 (1.84-4.36)
	2.79 (1.71-7.28)	3.97 (0-10.73)	
	1.38 (1.15-10.69)	2.43 (1.39-3.46)	
	6.18 (5.49-7.14)	5.49 (4.62-6.36)	6.37 (5.72-7.16)
	3.92 (3.58-4.34)	7.37 (6.02-8.71)	
	1.38 (1.15-1.69)	6.96 (0-20.39)	
	2.43 (2.17-2.73)	1.03 (0.89-1.17)	1.96 (1.48-2.56)
	2 (1.72-2.34)	2.68 (2.22-3.13)	
	0.45 (0.34-0.59)	1.19 (0.61-1.77)	
Ni	3.57 (3.16-4.03)	1.85 (1.59-2.11)	2.55 (2.05-3.08)
	1.67 (1.29-2.16)	2.67 (1.71-3.63)	
	1.36 (1.02-1.86)	3.36 (0.54-6.19)	
	44.02 (40.42-48.80)	31.35 (16.91-45.78)	27.32 (19.50-40.23)
	18.24 (15.72-21.19)	25.54 (11.42-39.66)	
	9.67 (8.19-11.6)	16.47 (7.11-25.83)	
Zn	8.84 (7.92-9.70)	1.90 (1.70-2.09)	3.00 (2.59-3.52)
	3.12 (2.79-3.47)	2.36 (2.07-2.65)	
	1.52 (1.28-1.77)	3.87 (3.08-4.67)	
	4.52 (4.07-4.99)	2.12 (1.86-2.39)	2.72 (2.45-2.99)
	2.39 (2.22-2.56)	2.32 (1.76-2.87)	
	1.87 (1.66-2.11)	3.55 (1.14-5.97)	
Pb	57.28 (50.66-65.63)	38.49 (32.33-44.65)	62.25 (50.90-78.74)
	77.57 (66.42-91.77)	85.95 (67.99-103.91)	
	47.5 (42.65-53.19)	110.12 (66.78-153.46)	
	51.96 (50.16-53.67)	25.22 (22.40-28.04)	31.50 (28.95-33.54)
	32.4 (29.73-35.39)	32.86 (29.82-35.90)	
	24.9 (22.25-27.36)	40.27 (31.76-48.78)	

Fig. 1 Effect of TSS (g/L) on EC_{50} (g/L) for β -glucosidase activity of biofilm with Cd (biofilm sampled on January 21st), Cu (biofilm sampled on February 18th), Zn (biofilm sampled on March 18th), Ni (biofilm sampled on February 25th) and Pb (biofilm sampled on July 1st). Linear regression was performed on the mean values of EC_{50} and TSS concentrations. Error bars show 95% confidence intervals for EC_{50} and standard deviations for TSS concentrations.

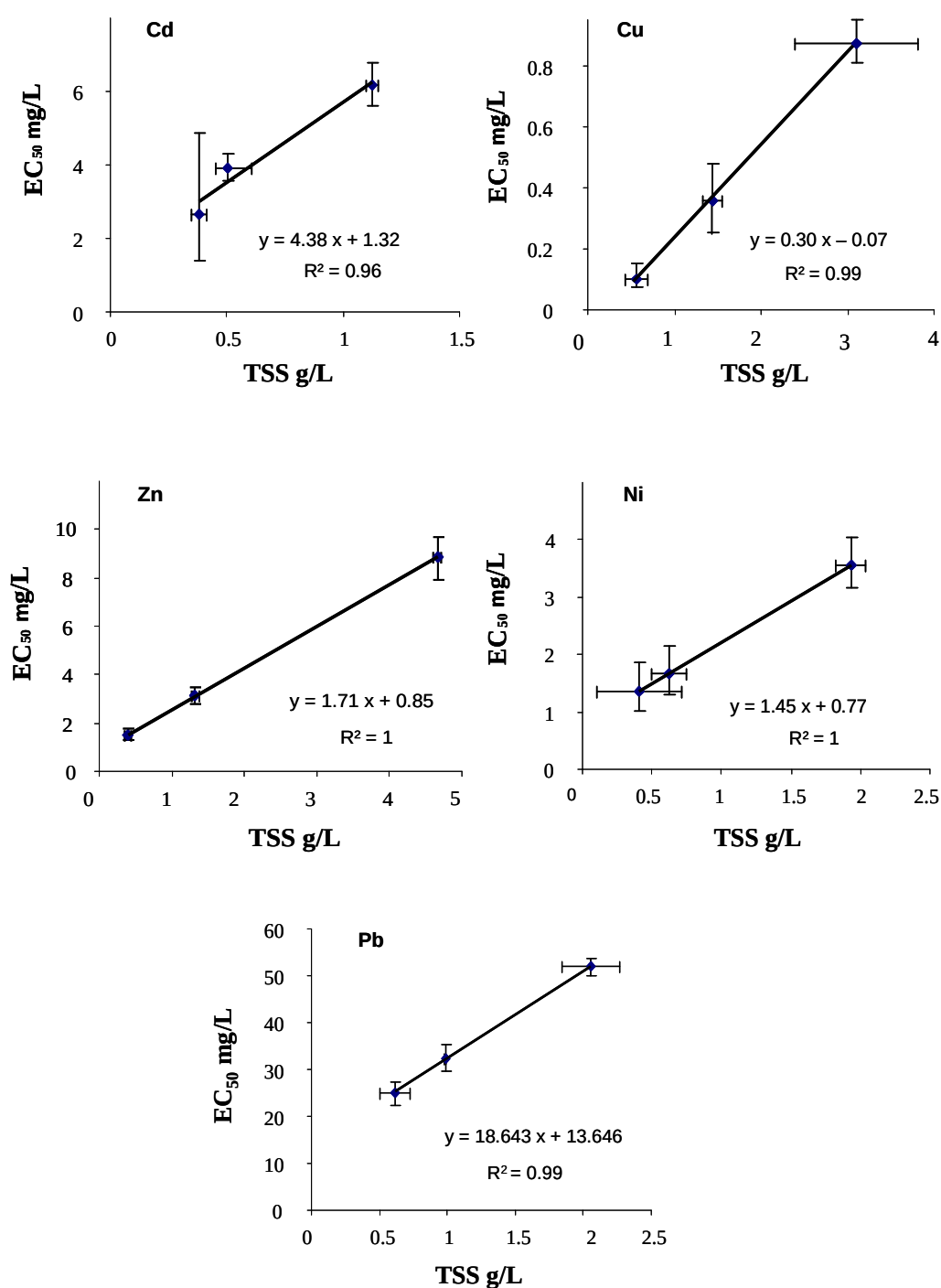
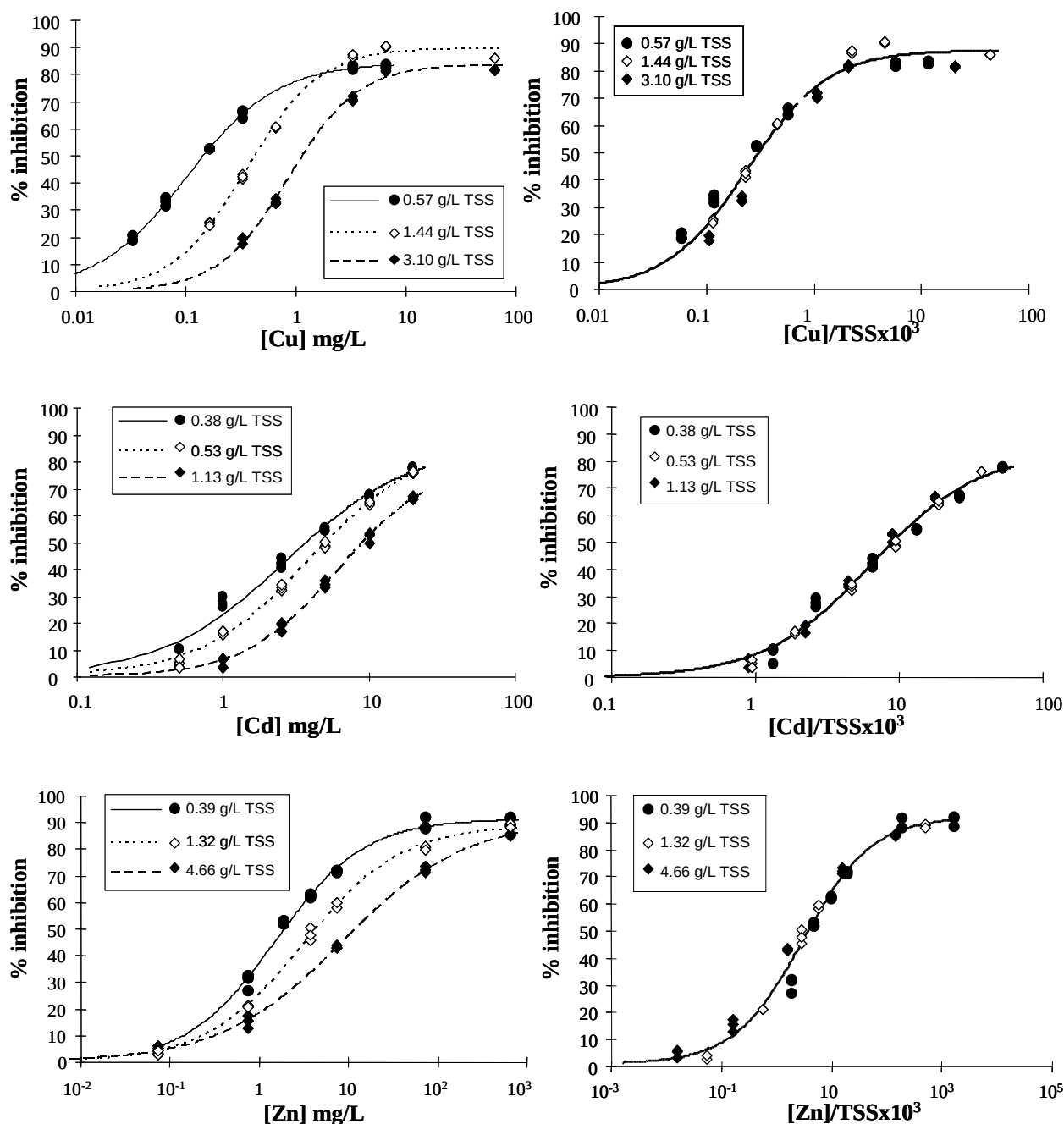
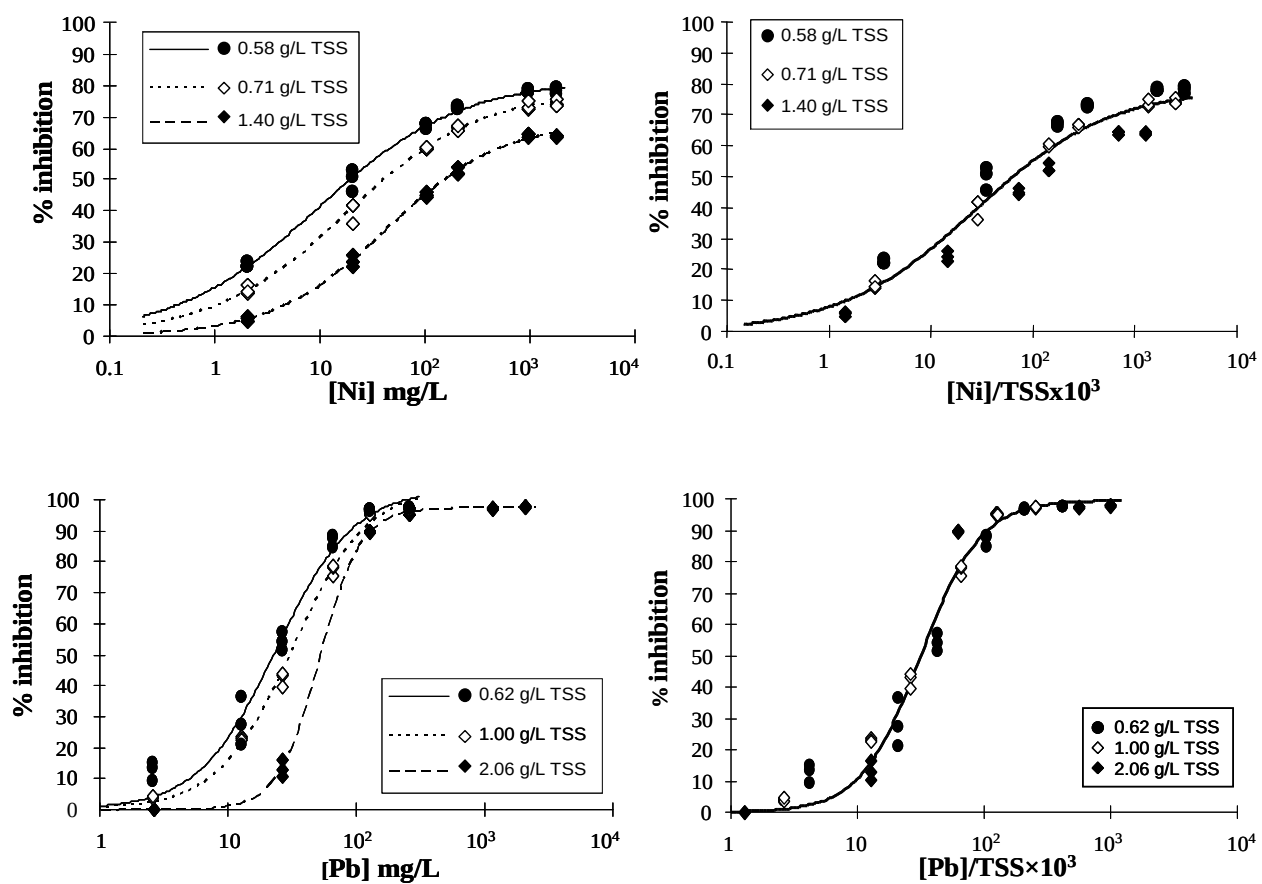


Fig. 2 Concentration/effect curves for three dilutions of a biofilm suspension with % inhibition of β -glucosidase activity of biofilm as a function of metal concentrations (left graph) or normalized metal concentrations (right graph) for Cu, Cd, Zn, Ni and Pb.





Chapitre 3.

Utilisation de la technique ARISA : mise en évidence de changements de structure dans les biofilms

Test de cryoconservation d'échantillons de biofilms de St Maurice

Protocole de cryoconservation

Les échantillons sont des aliquots de 50 mL de suspension de biofilm prélevés dans des tubes stériles. Ils sont d'abord centrifugés (10 000g, 15 minutes, 4 °C). Pour les essais avec cryoprotecteur, on prélève 45 mL de surnageant, le culot de biofilm est remis en suspension et le glycérol ou DMSO est ajouté à 4 °C avant congélation des échantillons (- 80°C). Les échantillons sans cryoprotecteur sont directement congelés (totalité du surnageant jeté).

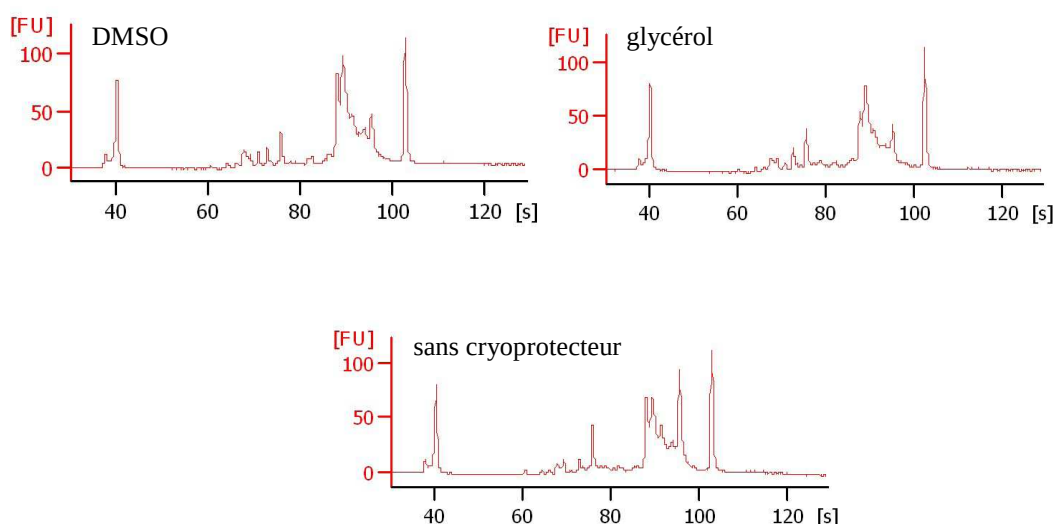


Figure 81 : Profils ARISA bactéries (unités de fluorescence FU en fonction du temps de migration en secondes) des trois échantillons de biofilms utilisés pour les tests de cryoconservation avec DMSO (12 %), glycérol (30%) et sans cryoprotecteur.

Les différences observées entre les trois profils sont faibles, l'intensité du pic à 790 bp (104 s) est nettement plus élevée pour le biofilm conservé sans cryoprotecteur. Il ne semble donc pas nécessaire d'utiliser un cryoprotecteur pour la conservation des échantillons de biofilms au congélateur.

Article FEMS Microbiology and Ecology

**Combined eukaryotic and bacterial community fingerprinting of
natural freshwater biofilms using Automated Ribosomal
Intergenic Spacer Analysis**

FEMS Microbiology Ecology

74(3): 542-553

Received 4 May 2010; revised 28 July 2010; accepted 31 August 2010.

Final version published online 30 September 2010.

The original publication is available at <http://onlinelibrary.wiley.com>.

Lise C. Fechner^{13*}, Françoise Vincent-Hubert¹³, Philippe Gaubert², Théodore Bouchez¹³,
Catherine Gourlay-Francé¹³, Marie-Hélène Tusseau-Vuillemin¹³

¹Cemagref- Unité de Recherche Hydrosystèmes et Bioprocédés
Parc de Tourvoie, BP 44, F 92163 Antony Cedex, France

²Muséum National d'Histoire Naturelle
UMR BOREA IRD 207
43, rue Cuvier - CP 26 75005 Paris, France

³FIRE
FR-3020 4 place Jussieu 75005 Paris, France

Abstract

Biofilms are complex communities playing an important role in aquatic ecosystems. Automated Ribosomal Intergenic Spacer Analysis (ARISA) has been successfully used to explore biofilm bacterial diversity. However a gap remains to be filled as regards its application to biofilm eukaryotic populations. The aim of this study is to use ARISA to detect eukaryotic population shifts in biofilm. We designed a new set of primers to focus specifically on the ITS1-5.8S-ITS2 region of diatoms and tested it on natural biofilms. Additionally, we tested universal primers, previously used to perform ARISA on fungal communities. Cloning and sequencing showed that the universal primer set amplified various eukaryotes whereas the new set was diatom-specific. The new set amplified a wider variety of diatoms. Therefore, the universal set is appropriate to study general eukaryotic population shifts in biofilms, whereas the new set is more appropriate to study diatoms specifically. We used both primer sets, along with a bacterial set, to study population shifts in natural river biofilms. PCA analysis of the ARISA fingerprints revealed seasonal shifts which did not coincide for bacterial and eukaryotic communities. Therefore the use of both eukaryotic and bacterial primers gives useful insight to assess microbial succession in biofilms.

Keywords: ARISA, freshwater periphyton, eukaryotic community, bacterial community

Introduction

Periphyton is a biofilm composed of algae, bacteria, fungi, protozoa and other organisms that develop on submerged objects such as rocks, macrophytes and other substrates. It is useful for assessing the overall health of aquatic systems, due to its ubiquity, rapid growth and rapid response to environmental stress (Burns & Ryder, 2001; 2007). Moreover biofilms play an important role in aquatic ecosystems due to their pivotal position at the interface between physical-chemical and biotic components. In particular, biofilms collected in well-illuminated environments contain numerous micro-algae which play a vital role as primary producers. A disruption of biofilm community structure can therefore greatly influence the rest of the aquatic community.

Because they are complex communities which include representatives of several taxonomic kingdoms, biofilms integrate responses to chemical stressors from heterotrophic organisms (mostly bacteria and fungi) to autotrophic organisms (algae, cyanobacteria) (Sabater *et al.*, 2007). Changes in biofilm community structure, for instance in a pollution gradient or with seasonal variations, can be assessed by the use of biomolecular approaches, especially fingerprinting techniques. For instance, Denaturing Gradient Gel Electrophoresis or DGGE (Paule *et al.*, 2009), Terminal-Restriction Fragment Length Polymorphism or T-RFLP (Dopheide *et al.*, 2009), and more recently Automated Ribosomal Intergenic Spacer Analysis or ARISA (Lear *et al.*, 2008), have already been used to study changes in biofilm structure. Except for DGGE (Dorigo *et al.*, 2009), those techniques usually focus on the bacterial component of biofilms. It is however obvious that shifts in community structure involve communities as a whole and not only bacteria. It is therefore essential to develop efficient technical approaches to observe both bacterial and eukaryotic population shifts simultaneously when studying biofilms. Fingerprints of both bacteria and eukaryotes present in biofilms could for instance be used for a more thorough interpretation of toxic selection pressures on biofilms, which affects both the algal and the heterotrophic compartments of biofilms (Blanck *et al.*, 2003).

Fingerprinting techniques involve DNA extraction of the environmental samples, amplification of a target usually located within the ribosomal operon using PCR, and electrophoretic analysis to separate the mixture of fragments. Among the techniques currently used to assess the microbial diversity of aquatic communities (Dorigo *et al.*, 2005), ARISA has proved to be a powerful tool,

mostly for its simplicity and rapidity (Crosby & Criddle, 2003; García-Martínez *et al.*, 1999). It creates a fingerprint of a community by exploiting the length polymorphism of the 16S-23S intergenic spacer of bacteria. ARISA was first developed as an automated version of the RISA technique on freshwater bacterioplankton (Fisher & Triplett, 1999) and has since been applied to various types of communities, for instance soil samples (Ranjard *et al.*, 2001) and more recently aquatic biofilms (Lear *et al.*, 2008; 2009). It can be considered as one of the most convenient fingerprinting techniques to analyze and compare large numbers of samples, especially due to automation and easy use of the output data (Cardinale *et al.*, 2004). It is indeed less time-consuming than other fingerprinting techniques like DGGE (Cherif *et al.*, 2007), especially if it is performed with a capillary electrophoresis bioanalyzer which enables ultra-fast processing of numerous samples (Qu *et al.*, 2009). However, ARISA has mostly been used on bacterial communities.

The ITS1-5.8S-ITS2 region which contains the two internal transcribed spacers (ITS1 and ITS2) of eukaryotes has been extensively used for phylogenetic analyses of fungal species using fungal universal primers (Sequerra *et al.*, 1997; White *et al.*, 1990) or, in some cases, other primers for specific amplification of a class of fungi (Larena *et al.*, 1999). Only a few studies have exploited fungal universal primers to perform ARISA of soil samples to characterize fungal communities (Ranjard *et al.*, 2001). Moreover, universal PCR primers designed for amplification of fungal ITS1-5.8S-ITS2 regions are not exclusively specific to fungi (Martin & Rygielwicz, 2005) and have thus been commonly used for phylogenetic analysis of plant phyla including diatoms (Álvarez & Wendel, 2003; Orsini *et al.*, 2004). Therefore, universal fungal primers targeting the ITS1-5.8S-ITS2 region could be used to obtain global eukaryotic fingerprints of complex, environmental communities such as freshwater biofilms.

The aim of this study was to test the ability of ARISA to point out variations in the structure of eukaryotic communities from freshwater biofilms. We designed a new set of primers to focus more closely on the algal component of biofilms, mostly on diatoms which typically amount to the majority of algal species in such communities (Allan & Castillo). Along with a universal fungal set of primers, previously used to perform ARISA on soil fungi, the new set of primers was tested on natural freshwater biofilms and a cloning/sequencing approach was used to investigate broadly the classes of targeted organisms. As a general application of the methodology, we then applied the ARISA technique on biofilms collected at different times of the year with universal

bacterial primers (Cardinale *et al.*, 2004) and the two sets of eukaryotic primers to study population shifts in periphyton.

Materials and methods

Study sites and periphyton in situ sampling

Periphyton was collected regularly from January to July 2008 on low density polyethylene plastic membranes (approximately 25 cm*10cm), that were vertically attached to plastic crates immersed in the Marne river at Saint-Maurice (upstream from Paris, Strahler: 6; mean annual flow in 2007: 112 m³ s⁻¹). Membranes were kept just below the surface of the water (no more than 10 cm deep) to allow algae to grow. Mature periphyton was collected on plastic membranes (at least two membranes per sampling) after colonization times of at least 44 days.

Periphyton characterization

Colonized membranes were taken out of the water and carried in 250 mL glass bottles filled with mineral water (Grand Barbier, Mont-Dore, France). The bottles were taken back to the laboratory in an ice tank and membranes were then carefully hand-scraped to remove periphyton. Periphyton suspension was characterized by determining the dry-weight (DW) as in Fechner *et al.* (2010), ash-free dry weight (AFDW), which was calculated as loss of weight of the GF/F filter (Whatmann®, Kent, UK) used to determine biofilm DW after ignition at 500 °C for 2 hours. Chlorophyll *a* concentration was measured using a SAFAS SP 2000 Xenius spectrofluorimeter after filtration on 0.8 µm cellulose ester filter (Millipore®) and a 24h-extraction in acetone 90%. The Autotrophic Index (AI), which is the ratio of AFDW to chlorophyll *a*, was calculated for each biofilm sample. Aliquots of 50 mL of each periphyton suspension were centrifuged for 15 minutes at 10 000 g, and 4°C. Supernatants were discarded and pellets were frozen and stored at -80°C for further use.

PCR primers

Three different sets of primers were used to perform ARISA on natural biofilm samples. The bacterial set ITSF/ITSReub (Cardinale *et al.*, 2004) was used for amplification of the 16S-23S ITS of bacteria. Two sets of primers: (i) the primers 2234C (Ranjard *et al.*, 2001) and 3126T (Ranjard *et al.*, 2001), referred to below as “set euk”, and (ii) the primer pair “set diat”, which was composed of the forward primer ARAlg18S (which we designed to target the 18S region of common freshwater algae) and the reverse primer ITS4 (White *et al.*, 1990), were used for

amplification of the ITS1-5.8S-ITS2 region of eukaryotes present in biofilms. The forward primer ARAlg18S (5'-GAACITGTCTAAACCTTATCAT-3') was designed after alignment of 50 18S gene sequences of eukaryotic algae reported in periphyton (Blanck *et al.*, 2003; Gold *et al.*, 2002; Guasch *et al.*, 2002; Soldo & Behra, 2000). It was chosen among the consensus sequence at the 3'-end of the multiple alignment performed using the T-coffee web server (Poirot *et al.*, 2003). The algae that were used in the alignment represented the genera *Cymbella*, *Cocconeis*, *Synedra*, *Navicula*, *Nitzschia*, *Gomphonema*, which are diatoms (Bacillariophyceae), as well as non-diatom algal species (19 sequences out of 50): *Gongrosira*, *Spirogyra*, *Stigeoclonium*, *Oedogonium*, *Scenedesmus*. Both sets euk and diat were also tested on five monoclonal cultures of freshwater algae belonging to common freshwater algal classes, which had been kindly given by the French National Institute for Agricultural Research INRA (UMR CARRETEL): a Chlorophyceae (TCC-144-1, *Scenedesmus quadricauda*), a Trebouxiophyceae (TCC148-1, *Chlorella vulgaris*), Bacillariophyceae (TCC107, *Navicula accomoda*, TCC139-1, *Nitzschia palea*) and a Synurophyceae (TCC167, *Synura petersenii*). This preliminary study showed that set euk covered a large spectrum of algal classes (all algal classes were amplified), whereas set diat was probably more specific to diatoms (TCC107 and TCC139-1 were amplified).

Those results were confirmed by investigating the theoretical coverage of the primers in PCR amplification: the primers were checked using the Silva LSU (ITS4 and 3126T) and SSU (ARAlg18S and 2234C) comprehensive RNA databases (SSU Ref 102 and LSU Ref 102) (Pruesse *et al.*, 2007), using the Probe Match function in the ARB software (Ludwig *et al.*, 2004) with no mismatch allowed. In order to evaluate the percentages of group coverage for the different primers, sequences that were incomplete in the regions targeted by each primer were manually discarded from the databases. Percentages of hits could thus be calculated on the basis of the only database entries containing reliable sequence information in the region targeted by the primers. The theoretical coverage of each primer was calculated for the following groups: Fungi, Bacillariophyta (diatoms), and Viridiplantae (among which green algae).

DNA extraction and amplification

DNA was extracted from the frozen biofilm pellets with the Power Soil DNA Isolation Kit (Mobio Laboratories, Inc., Carlsbad, USA) according to the manufacturer's instructions. Although commercially-available extraction kits tend to provide lower DNA yields and DNA quality than lab-performed techniques (Lear *et al.*, 2010), the Power Soil DNA Isolation Kit is a fast and easy technique to extract DNA from all environmental samples, especially with large

quantities of humic acids, and had also been successfully tested on the algal cultures mentioned above. Bacterial 16S-23S ITS DNA (between 2 and 30 ng of environmental DNA depending on the sample) was amplified in a 50 µL reaction mixture containing 1× PCR buffer, 1.25 U of Thermo-Start Taq DNA polymerase (ABGene Ltd, Epsom, UK), 0.2 mM (each) deoxynucleoside triphosphate, 1.5 mM of MgCl₂, 0.5 mg mL⁻¹ BSA, and 0.5 µM ITSF and ITSReub (each). The mixture was held at 94°C for 3 min, followed by 35 cycles of 94°C for 1 min, 56°C for 1 min, 72°C for 2 min, and a final extension step at 72°C for 10 min. The PCR protocol that was used to amplify the ITS1-5.8S-ITS2 region of eukaryotes was similar (annealing temperature: 57.5 °C).

Cloning and sequencing of the ITS1-5.8S-ITS2 regions of eukaryotes from a biofilm sample

PCR products obtained after amplification of DNA extracted from a biofilm sampled at Saint-Maurice on 11 March 08 (S6 in Table 1), using both sets euk and diat as primers, were directly cloned using the Topo TA cloning kit for Sequencing (Invitrogen, Carlsbad, CA) according to the manufacturer's instructions. Prior to sequencing, insertion of the plasmids was checked by PCR using the Takara High Performance PCR kit (Clontech Laboratories, Inc., Mountain View, USA). Using sets euk and diat, respectively 96 and 48 clones were chosen for sequencing and sent to Cogenics (Beckman Coulter Genomics, France) for unidirectional sequencing using primers specific to the PCR4-Topo plasmid : T3 (5'-ATTAACCCTCACTAAAG-3') and T7 (5'-TAATACGACTCACTATAGGG-3') (Topo TA cloning kit for sequencing) on an ABI 3730xl sequencer (Applied Biosystems, Foster City, USA).

5.8 S sequence analysis and construction of a phylogenetic tree

Accurate delimitation of the 5.8S region was determined by alignment with 5.8S closest sequences from Genbank (NCBI database) and was cross-checked with the ITS2 database (Schultz *et al.*, 2006; Selig *et al.*, 2008). We included in our alignments a series of 11 most similar sequences (% similarity > 72%) available in Genbank using nBlast (Altschul *et al.*, 1997) to estimate an order of magnitude of the taxonomic coverage amplifiable by sets euk and diat. The final set of sequences was manually aligned using BioEdit (<http://www.mbio.ncsu.edu/BioEdit/bioedit.html>). Nucleotide sequences obtained from primer sets euk and diat were deposited in Genbank under accession numbers GQ281523-GQ281540 and GQ273989-GQ274001 respectively.

We selected the best-fitted model of molecular evolution to the final 5.8S alignment pruned from indels and incomplete nucleotide sequences using ModelGenerator 0.85 and the Bayesian information criterion (Keane *et al.*, 2006). We then built a Neighbor-Joining (NJ) tree based on the Tamura-Nei (Tamura & Nei, 1993) model, implementing a Gamma distribution ($\Gamma = 0.92$), following ModelGenerator's output, under MEGA4 (Tamura *et al.*, 2007). Node support was assessed using 1000 bootstrap pseudo-replicates (Felsenstein, 1985). Fungi (AM99756 and GQ281537) were used as outgroup. To compare the genetic diversity of diatoms obtained between both sets of primers, genetic distance means were calculated under MEGA4 for a series of set 1 / set 2 partitions (standard error were obtained by 1000 bootstrap replications).

We also assessed the impact of the number of clones sequenced on the detection of genetic diversity by primer sets euk and diat, through the rarefaction analysis (Simberloff, 1972) as applied to haplotype frequencies (e.g. Bernatchez *et al.*, 1989). This method is based on the assumption that a greater sampling/sequencing effort is likely to yield a higher diversity of haplotypes at greater frequencies. We used the online analytical tool Rarefaction Calculator (J.Brzustowski, <http://www.biology.ualberta.ca/jbrzusto/rarefact.php>) to estimate the rarefaction curves of the expected number of haplotypes detected as a function of the number of clones sequenced. We calculated the rarefaction curves using sub-samples randomly taken from the totality of the 5.8S sequences obtained using primer sets euk and diat (respectively, 93 and 42 nucleotide sequences), by changing their size incrementally from 1 to 93 (euk) and 1 to 42 (diat).

ARISA and ARISA profiles analysis

ARISA was performed with a capillary electrophoresis bioanalyzer for a fast processing of biofilm samples. Amplified ITS fragments were separated on an electrophoresis Bioanalyzer (2100 Electrophoresis Bioanalyzer, Agilent Technologies, Santa Clara, USA) using the Agilent DNA 1000 kit (Agilent Technologies, Santa Clara, USA). The system is based on traditional gel electrophoresis principles. Dye molecules intercalate into DNA strands and are detected by laser-induced fluorescence. With the help of an internal ladder containing DNA strands of known sizes, a standard curve of migration time versus fragments size is plotted and used to calculate the size of each DNA fragment in the samples. Two markers bracketing the overall sizing range are also co-migrated with each sample and used to align the ladder data with data from the sample. Fluorescence data was converted into electrophoregrams using the 2100 Expert software (Agilent Technologies, Santa Clara, USA). Electrophoregrams in ASCII formats were then imported into the StatFingerprints program in R (Michelland *et al.*, 2009) and aligned. To efficiently compare

fingerprint profiles, the area under each curve was normalized to 1. Principal Component Analysis (PCA) was performed on the electrophoregrams using StatFingerprints.

Results and discussion

Sequence analysis of clone libraries

Primer sets euk and diat were used to amplify the ITS1-5.8S-ITS2 regions of eukaryotes from a freshwater biofilm sample collected *in situ* (biofilm S6 in Table 1). Cloning and sequencing were performed on both PCR products to investigate the specificity of the primers. Alignment of the sequenced clones with the NCBI nucleotide database confirmed the presence of the sequences of interest. The 5.8S, which is a highly conserved gene sequence useful for identification of organisms (Coleman, 2003; Cullings & Vogler, 1998), was then exploited to compare and identify the clone sequences. Indeed alignment over the whole ITS1-5.8S-ITS2 regions is often ambiguous due to high sequence length variability (Behnke *et al.*, 2004). Multiple alignments of the 5.8S of each set of clone sequences resulted in identification of groups of similar sequences: 18 and 13 groups of clone sequences were obtained with respectively set euk and set diat. Clone sequences belonging to the same group presented various similarity percentages (from 72 to 100 %). One sequence was selected from each group and deposited into the Genbank database (Table 2 and 3).

The 5.8S gene sequences of the clones always had a high level of similarity (from 72 to 100 % for set 1 and from 77 to 98% for set 2) with 5.8S sequences available in the NCBI nucleotide database. The lowest percentage (72%) was observed for sequence GQ281525. Indeed identification of the organisms was not always straightforward, as databases such as the NCBI nucleotide database, contain fewer occurrences of ITS1-5.8S-ITS2 sequences than for instance 18S sequences or prokaryotic sequences. For primer set euk, the closest matches with sequences from the NCBI database were the 5.8S regions of algae (mostly diatoms), ciliates and an uncultured fungus (Table 2). The most prevalent sequence type (35 clones out of 96) was associated with the diatom genus *Navicula* and the second most prevalent sequence types were associated with the ciliate genera *Spathidium* and *Zoothamnium* (16 clones each). The least prevalent sequence type (only 3 clones) was associated with an uncultured fungus from the NCBI database (AM999752). For primer set diat, sequence homology was found with the 5.8S regions of diatoms registered in the NCBI database (Table 3). As with primer set euk, the most prevalent

sequence type (34 clones out of 42) that was obtained with primer set diat was associated with the genus *Navicula*, which is frequent within freshwater biofilms (Blanck *et al.*, 2003).

Thus the cloning/sequencing approach showed that both sets of primers prompt amplification of the ITS1-5.8S-ITS2 region of eukaryotes, mostly algae and ciliates which are known to be a common type of freshwater protozoa (Sigee, 2005). A wide range of eukaryotic species were targeted by primer set euk whereas primer set diat targeted only diatoms, thus confirming previous results that were obtained using algal monocultures for PCR amplification (data not shown) or by checking alignment of the primers with RNA databases (Table SI1). Indeed the forward primer ARAlg18S almost only targeted diatoms (475 hits out of 477 in the Bacillariophyta group, along with one uncultured alveolate and one ciliate), whereas forward primer 2234C targeted a wide range of eukaryotic species (12019 hits in the Eukarya group of sequences). Reverse primers ITS4 and 3126T were similar in terms of % of hits among the Fungi group, but differences could be noticed in the main eukaryotic groups: for instance primer 3126T targeted 38% of sequences from the Alveolata group (among which ciliates are found), whereas primer ITS4 did not target any alveolate (data not shown).

Search parameters of the Probe Match function were very stringent (0 mismatch allowed) and many incomplete sequences were deleted from the database. Therefore, the percentages obtained might be lower than could be expected. However, they give a good idea of the theoretical coverage of two sets of primers and confirm that set diat is likely to target diatoms and set euk various algal species and other eukaryotic micro-organisms such as ciliates.

Phylogenetic analysis and genetic diversity of the sequences obtained from primer sets 1 and 2

The 5.8S gene sequences of the clones were also used for phylogenetic analysis (Cullings & Vogler, 1998). Figure 1 shows the NJ tree of the 5.8S gene sequences obtained from both sets of primers and their closest relatives.

Results from the distance tree match the results that were obtained by the nBlast similarity search tool (Figure 1, Table 2 and Table 3). Three groups of sequences (algae, ciliates and fungi) could be identified. Two groups showed bootstrap values > 75 % (algae – excluding GQ281539 and fungi). Yet bootstrap values within the groups were generally weak, which means that no conclusion can be drawn on phylogenetic relationships between sequences from the same group.

The long branch of sequence GQ281525 in the phylogenetic tree is due to the lack of homologous sequences both in the NCBI nucleotide database and other clone sequences.

As shown in Table 4, mean distances within the diatom sequences that were produced were respectively $0.07 (\pm 0.02)$ and $0.18 (\pm 0.03)$ for set euk (sequences GQ281536 and GQ281538 to GQ281540) and set diat (all sequences), and 0.15 ± 0.03 for all the diatom sequences (overall mean distances of diatom sequences from both sets of primers). With primer set diat amplifying a wider variety of diatoms than primer set euk, we suggest that the diatom-specific set of primers (set diat) should be used when focusing on diatoms. Conversely, primer set euk gives an overall fingerprint of eukaryotes present in the biofilm sample: algae, among which mostly diatoms and a *Synurophyceae* (GQ281525), as well as ciliates and a fungus species. Mean distance for algal sequences from set euk is much higher (0.42 ± 0.1) than mean distance for diatom sequences only. Mean distance for all sequences is $0.60 (\pm 0.15)$ for set euk (0.18 ± 0.03 for set diat). As discussed earlier, alignments of the primers with RNA LSU and SSU databases (Table SI1) also indicate that set euk targets a wide range of eukaryotic species, whereas set diat is specific to diatoms (especially because of the forward primer ArAlg18S). The rarefaction curves (Figure SI1) indicate that primer set euk shows a slightly higher tendency to detect more genetic diversity, especially from 7 clones and more. Plateau is not attained with either primer sets, suggesting that a higher effort in sequencing additional clones is needed to embrace the global genetic diversity of periphytic eukaryotes in sample S6. However, our analysis shows that set euk will be probably more useful for a global overview of biofilm eukaryotes with ARISA.

Comparison between sequencing results and ARISA profiles

The PCR products were also used to perform ARISA (Figure 2). It is therefore interesting to compare both types of results, especially the number of different species that can be identified and the number of fluorescence peaks from the corresponding fingerprint profiles. The lengths of the sequences obtained for both sets were long: they varied from 408 to 885 bp for the sequences obtained with set euk and from 613 to 967 bp for the sequences obtained with set diat (Table 2 and 3). They matched the lengths of the fluorescence peaks in the corresponding ARISA profiles (Figure 2) except for the large amplicons – above 1000 bp – and the lengths of ITS1-5.8S-ITS2 regions from diatoms or fungi which can be found in the NCBI database or described in other studies (Behnke *et al.*, 2004; Ranjard *et al.*, 2001).

Even though it is related to the number of distinct sequences that were identified by cloning (the more peaks, the more species identified), the number of fluorescence peaks on an electrophoregram does not provide an estimation of the taxonomic richness of a sample. Indeed the profile corresponding to set diat (Figure 2b) has only 5 distinct peaks and yet 13 distinct groups of sequences could be identified by cloning. Our results thus confirm that one must be cautious while interpreting fingerprints in terms of microbial diversity. Gillevet *et al.* (2009) also observed a greater resolution by cloning and sequencing than by ARISA profiles. Moreover, with the methodology used in our study, and considering the small number of clones that were sequenced from a statistical point of view, there was indeed no guarantee to obtain a thorough overview of all the species that were amplified by PCR with the cloning and sequencing approach. For instance, it is possible that no clone with one of the long amplicons of more than 1000 bp was obtained or selected during the cloning experiment. Similarly, ARISA profiles are not always easily interpreted in terms of microbial diversity as a fluorescence peak may represent more than one taxon and inversely a given taxon might exhibit more than one amplicon length (Crosby & Criddle, 2003; Gillevet *et al.*, 2009). In this study, the sizing accuracy of the bioanalyzer, renders comparison between both methods even more delicate. Indeed, it can reach $\pm 10\%$ according to the manufacturer, although it is actually much smaller as Panaro *et al.* (2000) obtained a CV inferior to 2.1 % for DNA sizing of fragments using the same technique. Assigning accurate sizes to DNA fragments is a problem encountered with every quantification technique, but it is emphasized when using the 2100 Agilent Bioanalyzer, which is fast and practical, but in return less precise than, for instance, a sequencer. It is therefore improbable to obtain exactly the same number of species by cloning and on the corresponding ARISA profile. However ARISA remains a powerful tool to obtain fast snapshots of the diversity of a community, which is very useful to reveal succession patterns, for instance population shifts along a seasonal gradient.

Biofilm community structure using ARISA profiles

Biofilms were sampled at different times of the year at the same river site in order to test the ability of ARISA, performed with set euk and diat and a universal set of bacterial primers, to detect community changes through time. The biofilms' characteristics are shown in Table 1. Shifts in community structure are revealed between February and March, with more important biomass and lower AI values (lower AI values indicate that the periphyton community becomes more autotrophic (Azim & Asaeda, 2005)) and at the end of Spring with lower AI values for samples S10 and S11.

Eukaryotic ARISA profiles were similar in aspect to the profiles corresponding to sample S6 shown in Figure 2 (Figure SI2). Bacterial ARISA and eukaryotic ARISA performed with set euk as PCR primer set (Figure S1) produced profiles that displayed several major fluorescence peaks (2-12 major peaks), usually ranging from 300 to 1000 bp. Eukaryotic ARISA performed with primer set diat (Figure S1) produced profiles that displayed fluorescence peaks in smaller numbers (2 to 5 major peaks) and with long amplicons (650 to 1000 bp).

PCA analysis reveals seasonal patterns for samples collected from January to July at Saint-Maurice with ARISA performed with all sets of primers. With bacterial ARISA (Figure 3a), biofilms collected in winter (S1 to S4), spring (S5 to S11) and early summer (S12 to S14) are well separated. Consequently important bacterial population shifts occurred in the transition phases between winter and summer. Those population shifts are probably linked to temperature changes, as temperature has proved to be an important structural parameter for bacterial communities (Brummer *et al.*, 2003; Lear *et al.*, 2008). Those succession patterns appear simultaneously with changes in AI values (Table 1) indicating changes in the periphyton structure.

Eukaryotic ARISA reveals different seasonal succession patterns whether set euk or set diat is used as PCR primers (Figure 3b and 3c). Using set euk as PCR primer set, a shift in community structure is revealed in March as all samples from S8 to S14 are located in the lower part of the plot, with samples S1 to S7 grouped at the upper right part of the plot. There is also a less marked shift in community structure between April and June (the group of samples S11 to S14 is located on the left of the plot). As regards ARISA performed with set diat, no clear pattern can be identified for diatom succession in the beginning of the year (samples S1 to S10), but a clear population shift is revealed in early summer (S11 to S14). This seasonal shift, which, besides, does not appear with bacterial ARISA (Figure 3a), could be linked to the development of green algae (Chlorophyceae), incidental with the decline of the diatom population, which usually takes place at the end of spring in the Seine river basin (Garnier *et al.*, 1995). It also coincides with very low AI values indicating a development of the autotrophic community.

Therefore the three sets of primers do not give the same information on community structure changes. In particular, PCA performed on ARISA profiles from either bacterial or eukaryotic primer sets reveal different patterns. Moreover, the two sets of eukaryotic primers also give different information on the eukaryotic succession pattern. For instance, a much clearer seasonal

shift in community structure is observed with set diat at the end of Spring than when using set euk.

Biofilm succession is the consequence of multiple interactions between physical, chemical and biotic factors. Indeed biofilms are complex assemblages of micro-organisms belonging to various taxonomic groups: in particular, the balance between heterotrophs and autotrophs is modified by environmental parameters among which light has a prevailing role (Burns & Ryder, 2001). In addition, biofilms are communities of interacting micro-organisms and consequently a modification of part of the community will affect the rest. Therefore, the combined use of the three sets of ARISA primers is a means to observe succession patterns of both autotrophic and heterotrophic micro-organisms in biofilms. Succession patterns of different types of interacting micro-organisms might be simultaneous or distinct. In either case, they reflect the dynamics of the different trophic levels among the periphyton community. Studying those dynamics will reveal variations among different population levels and the interactions between them, resulting in more ecological relevance.

Conclusion

Different types of microorganisms are likely to evolve jointly within biofilms, which are complex communities of interacting microorganisms. It is therefore useful to be able to observe the evolution of both eukaryotic and bacterial populations when studying, for instance, the effects of a toxic exposure on river periphyton. In this study, ARISA was used as a fingerprinting technique providing broad and fast snapshots of the microbial diversity of complex, environmental communities for comparison purposes. Primer set euk, previously used for the observation of soil fungal diversity, has proved to be a powerful tool to observe eukaryotic population shifts within freshwater biofilms. Indeed, algae and other eukaryotes (mostly ciliates) were detected using those primers. Primer set diat was designed to be more specific to diatoms. Because fluorescence peaks are in small numbers in the ARISA profiles that are obtained using primer set diat, it might be more difficult to compare fingerprints obtained with that set of primers. Yet the variety of diatoms detected using set diat by cloning and sequencing was higher than with set euk. Set diat also enabled us to identify a shift in the diatom population in early summer. More studies will be necessary to determine whether primer set diat can be used to amplify the ITS1-5.8S-ITS2 region of a wide spectrum of diatoms present in biofilms or only a small part.

Comparison of cloning and sequencing and ARISA profiles confirmed that fingerprinting techniques cannot be used to assess the species richness of a sample, but ARISA combined with multivariate analysis is an efficient tool to identify succession patterns or dynamics. With that perspective, performing ARISA with a bioanalyzer is a powerful analytical means to obtain ultra-fast fingerprints of a large number of samples and is therefore an efficient technique to compare fingerprints and thus reveal succession patterns. Application to biofilm samples collected over several months on the same river site showed that it could detect seasonal succession of both bacterial and eukaryotic populations and reveal distinct patterns of succession between bacterial and eukaryotic populations. The use of both eukaryotic and bacterial ARISA is thus likely to provide a more thorough evaluation of microbial population changes in periphyton. It is hoped that the future use of the methodology will help to understand the impacts of human activities, especially toxic pressure, on aquatic ecosystems.

Acknowledgements

This study was supported by ONEMA (Office National de l'Eau et des Milieux Aquatiques). We are grateful to Frédéric Rimet from INRA Thonon-les-Bains for providing the algal cultures and to Aurélie Germain for her valuable help in the laboratory.

References

- Burns, A & Ryder, DS (2001) Potential for biofilms as biological indicators in Australian riverine systems. *Ecological Management & Restoration* 2: 53-64.
- Sabater, S et al. (2007) Monitoring the effect of chemicals on biological communities. The biofilm as an interface. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 387: 1425-1434.
- Paule, A et al. (2009) Autogenic versus environmental control during development of river biofilm. *Ann. Limnol. - Int. J. Lim.* 45: 1-10.
- Dopheide, A et al. (2009) Relative Diversity and Community Structure of Ciliates in Stream Biofilms According to Molecular and Microscopy Methods. *Appl. Environ. Microbiol.* 75: 5261-5272.
- Lear, G et al. (2008) Spatial and temporal heterogeneity of the bacterial communities in stream epilithic biofilms. *FEMS Microbiology Ecology* 65: 463-473.
- Dorigo, U et al. (2009) Spatial heterogeneity of periphytic microbial communities in a small pesticide-polluted river. *FEMS Microbiology Ecology* 67: 491-501.
- Blanck, H et al. (2003) Variability in Zinc Tolerance, Measured as Incorporation of Radio-Labeled Carbon Dioxide and Thymidine, in Periphyton Communities Sampled from 15 European River Stretches. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology* 44: 17-29.
- Dorigo, U et al. (2005) Molecular approaches to the assessment of biodiversity in aquatic microbial communities. *Water Research* 39: 2207-2218.
- Crosby, LD & Criddle, CS (2003) Understanding bias in microbial community analysis techniques due to rrn operon copy number heterogeneity. *BioTechniques* 34: 790-802.
- García-Martínez, J et al. (1999) Use of the 16S-23S ribosomal genes spacer region in studies of prokaryotic diversity. *Journal of Microbiological Methods* 36: 55-64.
- Fisher, MM & Triplett, EW (1999) Automated Approach for Ribosomal Intergenic Spacer Analysis of Microbial Diversity and Its Application to Freshwater Bacterial Communities. *Appl. Environ. Microbiol.* 65: 4630-4636.
- Ranjard, L et al. (2001) Characterization of Bacterial and Fungal Soil Communities by Automated Ribosomal Intergenic Spacer Analysis Fingerprints: Biological and Methodological Variability. *Appl. Environ. Microbiol.* 67: 4479-4487.
- Lear, G et al. (2009) Biofilm bacterial community structure in streams affected by acid mine drainage. *Applied and Environmental Microbiology* 75: 3455-3460.
- Cardinale, M et al. (2004) Comparison of Different Primer Sets for Use in Automated Ribosomal Intergenic Spacer Analysis of Complex Bacterial Communities. *Appl. Environ. Microbiol.* 70: 6147-6156.
- Cherif, H et al. (2007) Bacterial community diversity assessment in municipal solid waste compost amended soil using DGGE and ARISA fingerprinting methods. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*.
- Qu, X et al. (2009) Combined monitoring of changes in $\delta^{13}\text{CH}_4$ and archaeal community structure during mesophilic methanization of municipal solid waste. *FEMS Microbiology Ecology* 68: 236-245.
- Sequerra, J et al. (1997) Taxonomic position and intraspecific variability of the nodule forming *Penicillium nodositatum* inferred from RFLP analysis of the ribosomal intergenic spacer and Random Amplified Polymorphic DNA. *Mycological Research* 101: 465-472.
- White, TJ et al. (1990) Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics In: *PCR Protocols : A Guide to Methods and Applications* (Innes, MA, Gelfand, DH, Sninsky, JJ and White, TJ, Eds.), pp. 315-322. Academic Press, New York, USA.

- Larena, I et al. (1999) Design of a primer for ribosomal DNA internal transcribed spacer with enhanced specificity for ascomycetes. *Journal of Biotechnology* 75: 187-194.
- Martin, K & Rygielwicz, P (2005) Fungal-specific PCR primers developed for analysis of the ITS region of environmental DNA extracts. *BMC Microbiology* 5: 28.
- Álvarez, I & Wendel, JF (2003) Ribosomal ITS sequences and plant phylogenetic inference. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 29: 417-434.
- Orsini, L et al. (2004) Multiple rDNA ITS-types within the diatom *Pseudo-nitzschia delicatissima* (Bacillariophyceae) and their relative abundances across a spring bloom in the Gulf of Naples. *Marine Ecology Progress Series* 271: 87-98.
- Allan, JD & Castillo, MM (2007) *Stream Ecology, Structure and Function of Running Waters*, 2nd Edn. Springer, New York.
- Fechner, L et al. (2010) Adapting an enzymatic toxicity test to allow comparative evaluation of natural freshwater biofilms' tolerance to metals. *Ecotoxicology* In press. DOI: 10.1007/s10646-010-0517-9.
- Gold, C et al. (2002) Field transfer of periphytic diatom communities to assess short-term structural effects of metals (Cd, Zn) in rivers. *Water Research* 36: 3654–3664.
- Guasch, H et al. (2002) Effect of copper on algal communities from oligotrophic calcareous streams. *Journal of Phycology* 38: 241-248.
- Soldo, D & Behra, R (2000) Long-term effects of copper on the structure of freshwater periphyton communities and their tolerance to copper, zinc, nickel and silver. *Aquatic Toxicology* 47: 181-189.
- Poirot, O et al. (2003) Tcoffee@igs: a web server for computing, evaluating and combining multiple sequence alignments. *Nucl. Acids Res.* 31: 3503-3506.
- Pruesse, E et al. (2007) SILVA: a comprehensive online resource for quality checked and aligned ribosomal RNA sequence data compatible with ARB. *Nucl. Acids Res.* 35: 7188-7196.
- Ludwig, W et al. (2004) ARB: a software environment for sequence data. *Nucl. Acids Res.* 32: 1363-1371.
- Lear, G et al. (2010) Comparison of methods for the extraction of DNA from stream epilithic biofilms. *Antonie van Leeuwenhoek, International Journal of General and Molecular Microbiology* 1-5.
- Schultz, J et al. (2006) The internal transcribed spacer 2 database--a web server for (not only) low level phylogenetic analyses. *Nucl. Acids Res.* 34: W704-707.
- Selig, C et al. (2008) The ITS2 Database II: homology modelling RNA structure for molecular systematics. *Nucl. Acids Res.* 36: D377-380.
- Altschul, SF et al. (1997) Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucl. Acids Res.* 25: 3389-3402.
- Keane, T et al. (2006) Assessment of methods for amino acid matrix selection and their use on empirical data shows that ad hoc assumptions for choice of matrix are not justified. *BMC Evolutionary Biology* 6: 29.
- Tamura, K & Nei, M (1993) Estimation of the number of nucleotide substitutions in the control region of mitochondrial DNA in humans and chimpanzees. *Molecular Biology and Evolution* 10: 512-526.
- Tamura, K et al. (2007) MEGA4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) Software Version 4.0. *Mol Biol Evol* 24: 1596-1599.
- Felsenstein, J (1985) Phylogenies and the comparative method. *American Naturalist* 125: 1-15.
- Simberloff, D (1972) Properties of the Rarefaction Diversity Measurement. *The American Naturalist* 106: 414-418.
- Bernatchez, L et al. (1989) Population bottlenecks: influence on mitochondrial DNA diversity and its effect in coregonine stock discrimination. *Journal of Fish Biology* 35: 233-244.
- Michelland, RJ et al. (2009) StatFingerprints: a friendly graphical interface program for processing and analysis of microbial fingerprint profiles. *Molecular Ecology Resources* 9: 1359-1363.

- Coleman, AW (2003) ITS2 is a double-edged tool for eukaryote evolutionary comparisons. *Trends in Genetics* 19: 370-375.
- Cullings, KW & Vogler, DR (1998) A 5.8S nuclear ribosomal RNA gene sequence database: applications to ecology and evolution. *Molecular Ecology* 7: 919-923.
- Behnke, A et al. (2004) Reproductive compatibility and rDNA sequence analyses in the *Sellaphora pupula* species complex (Bacillariophyta) *Journal of Phycology* 40: 193-208.
- Sigee, DC (2005) *Freshwater Microbiology. Biodiversity and Dynamic Interactions of Microorganisms in the Aquatic Environment*. John Wiley & Sons, Chichester, UK.
- Gillevet, PM et al. (2009) Analyzing salt-marsh fungal diversity: comparing ARISA fingerprinting with clone sequencing and pyrosequencing. *Fungal Ecology* 2: 160-167.
- Panaro, NJ et al. (2000) Evaluation of DNA Fragment Sizing and Quantification by the Agilent 2100 Bioanalyzer. *Clin Chem* 46: 1851-1853.
- Azim, ME & Asaeda, T (2005) Periphyton Structure, Diversity and Colonization In: *Periphyton: Ecology, Exploitation and Management* (Azim, ME, Verdegem, MCJ, van Dam, AA and Beveridge, MCM, Eds.), CABI.
- Brummer, IHM et al. (2003) Diversity and Seasonal Variability of Beta-Proteobacteria in Biofilms of Polluted Rivers: Analysis by Temperature Gradient Gel Electrophoresis and Cloning. *Appl. Environ. Microbiol.* 69: 4463-4473.
- Garnier, J et al. (1995) Seasonal Succession of Diatoms and Chlorophyceae in the Drainage Network of the Seine River: Observations and Modeling. *Limnology and Oceanography* 40: 750-765.

TABLE 1. Characteristics of biofilms S1 to S14 sampled at Saint-Maurice (DW: Dry Weight, AFDW: Ash-Free Dry Weight, Ch *a*: Chlorophyll *a*, AI: Autotrophic Index).

Sample	Sampling date	Colonization time (days)	DW (g m ⁻²)	AFDW (g m ⁻²)	Ch <i>a</i> (mg m ⁻²)	AI
S1	9 Jan. 08	44	7.5	nd	4.3	nd
S2	14 Jan. 08	49	8.7	nd	4.9	nd
S3	21 Jan. 08	56	6.9	nd	7.8	nd
S4	18 Feb. 08	75	102.9	29.6	132.9	223
S5	25 Feb. 08	83	140.4	21.3	nd	nd
S6	11 Mar. 08	98	51.3	12.3	92.6	133
S7	18 Mar. 08	105	58.0	9.4	83.8	113
S8	25 Mar. 08	50	21.4	5.3	34.0	155
S9	31 Mar. 08	56	21.8	6.8	50.8	135
S10	07 Apr. 08	63	30.6	7.6	70.6	108
S11	17 Apr. 08	73	16.8	2.6	33.1	78
S12	03 Jun. 08	174	65.5	15.5	112.2	138
S13	17 Jun. 08	189	167.5	23.0	132.4	174
S14	01 Jul. 08	69	54.4	8.7	43.4	201

TABLE 2. Characteristics of the ITS1-5.8S-ITS2 sequences obtained with set euk as PCR primer set.

ITS1-5.8S-ITS2 sequences	length of sequences	Number of clones per group (% similarity between clones of the same group)	Closest relative (Blastn of 5.8S)	% similarity with closest relative (Blastn of 5.8S)
GQ281528	356	1	AF223570 (ciliate: <i>Spathidium amphoriforme</i>)	85
GQ281526	408	10 (96-98%)	AF223570 (ciliate: <i>Spathidium amphoriforme</i>)	87
GQ281527	412	6 (91-99%)	DQ811088 (ciliate: <i>Lacrymaria marina</i>)	87
GQ281529	418	1	AF223570 (ciliate: <i>Spathidium amphoriforme</i>)	85
GQ281530	418	4 (72-99%)	AF223570 (ciliate: <i>Spathidium amphoriforme</i>)	87
GQ281532	467	9 (78-99%)	EU047813 (ciliate: <i>Chilodonella uncinata</i>)	98
GQ281533	487	14 (93-99%)	EU340860 (ciliate: <i>Zoothamnium plumula</i>)	98
GQ281534	492	2 (96%)	FJ810405 (ciliate: <i>Carchesium polypinum</i>)	100
GQ281535	492	4 (85-97%)	FJ810404 (ciliate: <i>Carchesium polypinum</i>)	99
GQ281523	518	1	EU340860 (ciliate: <i>Zoothamnium plumula</i>)	87
GQ281524	519	1	EU340860 (ciliate: <i>Zoothamnium plumula</i>)	94
GQ281531	540	1	FJ554412 (ciliate: <i>Oxytrichidae environmental sample</i>)	93
GQ281540	568	25 (78-99%)	FJ624230 (alge, Bacillariophyceae: <i>Navicula phyllepta</i>)	90
GQ281539	571	2 (94%)	FJ624230 (alge, Bacillariophyceae: <i>Navicula phyllepta</i>)	94
GQ281536	615	1	FJ624230 (alge, Bacillariophyceae: <i>Navicula phyllepta</i>)	94
GQ281538	639	7 (84-98%)	FJ624230 (alge, Bacillariophyceae: <i>Navicula phyllepta</i>)	97
GQ281525	704	1	FM178514 (algae, Synurophyceae: <i>Synura glabra</i>)	72
GQ281537	885	3 (99%)	AM999752 (fungus: <i>Uncultured fungus</i>)	98

TABLE 3. Characteristics of the ITS1-5.8S-ITS2 clone sequences obtained with set diat as PCR primer set.

ITS1-5.8S-ITS2 sequences	Length of sequences (bp)	Number of clones per group (% of similarity between clones of the same group)	Closest relative (Blastn of 5.8S)	% similarity with closest relative (Blastn of 5.8S)
GQ274000	613*	1	FJ624230 (<i>Navicula phyllepta</i>)	77
GQ273996	660	9 (87-99%)	FJ624230 (<i>Navicula phyllepta</i>)	87
GQ273990	681	5 (84-99%)	FJ624230 (<i>Navicula phyllepta</i>)	87
GQ273999	763	1	FJ624230 (<i>Navicula phyllepta</i>)	88
GQ273998	767	1	DQ235782 (<i>Navicula arenaria</i>)	98
GQ274001	767	7 (94-99%)	DQ235782 (<i>Navicula arenaria</i>)	98
GQ273995	771	1	DQ235780 (<i>Navicula gregaria</i>)	92
GQ273991	821	3 (95-96%)	AJ544675 (<i>Sellaphora pupula</i>)	90
GQ273994	823	5 (95-99%)	AJ544675 (<i>Sellaphora pupula</i>)	90
GQ273997	824	1	DQ235780 (<i>Navicula gregaria</i>)	95
GQ273993	829	4 (86-96%)	DQ235782 (<i>Navicula arenaria</i>)	98
GQ273992	851	3 (74-93%)	DQ235780 (<i>Navicula gregaria</i>)	92
GQ273989	967	1	DQ235780 (<i>Navicula gregaria</i>)	96

* Sequence GQ274000 is shorter than the other sequences due to an unexpected interruption during sequencing

TABLE 4. Genetic distances between 5.8S obtained with both sets of primers and set1/set 2 partitions (SE :standard deviation, 1000 bootstrap replications).

5.8S sequences	min		max		overall mean	
Groups of 5.8S sequences	value	SE	value	SE	value	SE
All sequences (set 1 + set 2)	0.007	0.008	2.77	3.01	0.51	0.13
Set 1	0.022	0.014	2.77	3.27	0.60	0.15
Set 2	0.007	0.007	0.47	0.15	0.18	0.03
All algal sequences (set 1 + set 2)	0.007	0.007	1.06	0.81	0.25	0.04
Algal sequences from set 1	0.022	0.014	0.99	0.30	0.42	0.10
All diatom sequences (set 1 + set 2)	0.007	0.007	0.47	0.15	0.15	0.03
Diatom sequences (set 1)	0.047	0.021	0.11	0.04	0.07	0.02

Fig. 1 Neighbor-Joining tree built from 5.8S alignment. Bootstrap values greater than 75 % are indicated at nodes. Sequence IDs starting with GQ281 and GQ273 were produced by primer sets euk and diat, respectively. Sequence numbers followed by a species name were taken as ‘closest relatives’ from Genbank. Scale bar corresponds to 5 % sequence divergence.

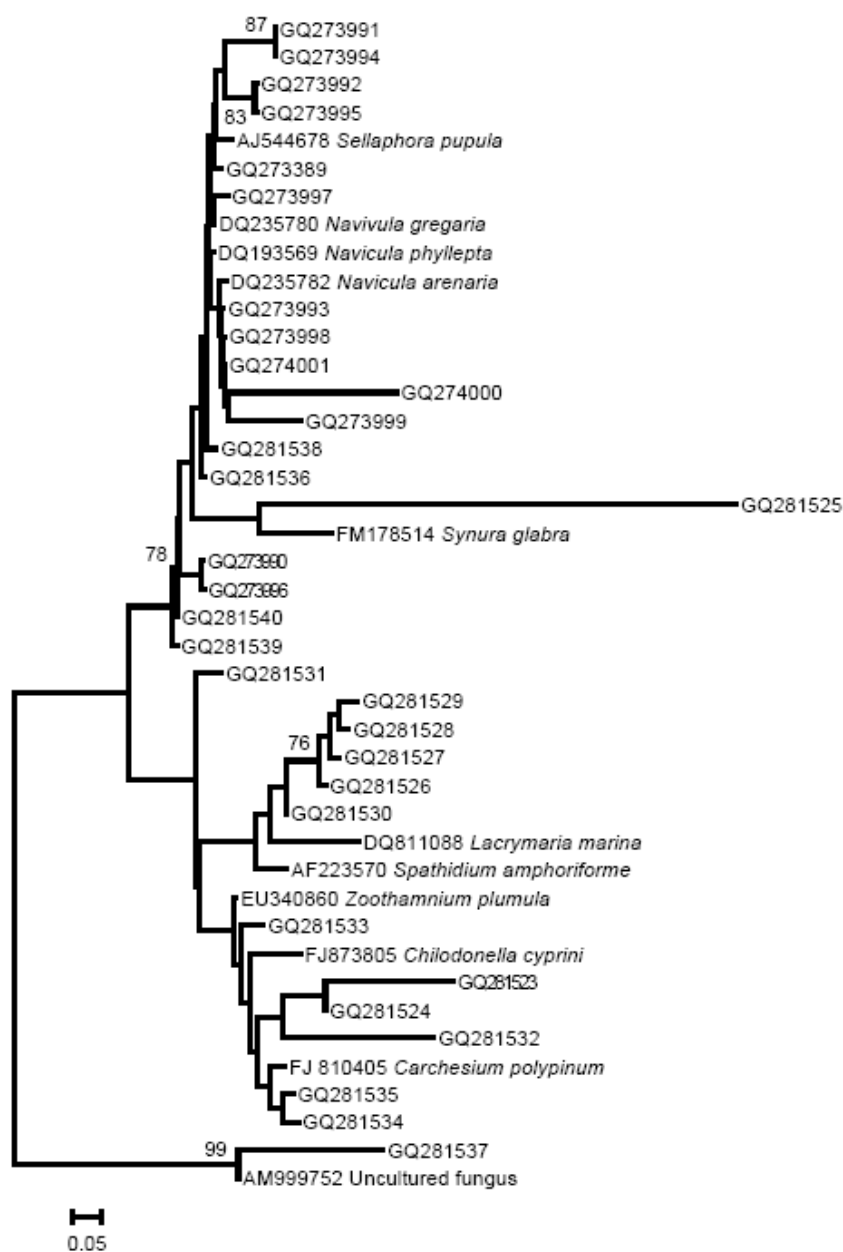


Fig. 2 ARISA profiles of PCR products obtained with set euk (a) and set diat (b) on biofilm S6; lengths of amplicons appear above the fluorescence peaks in bp.

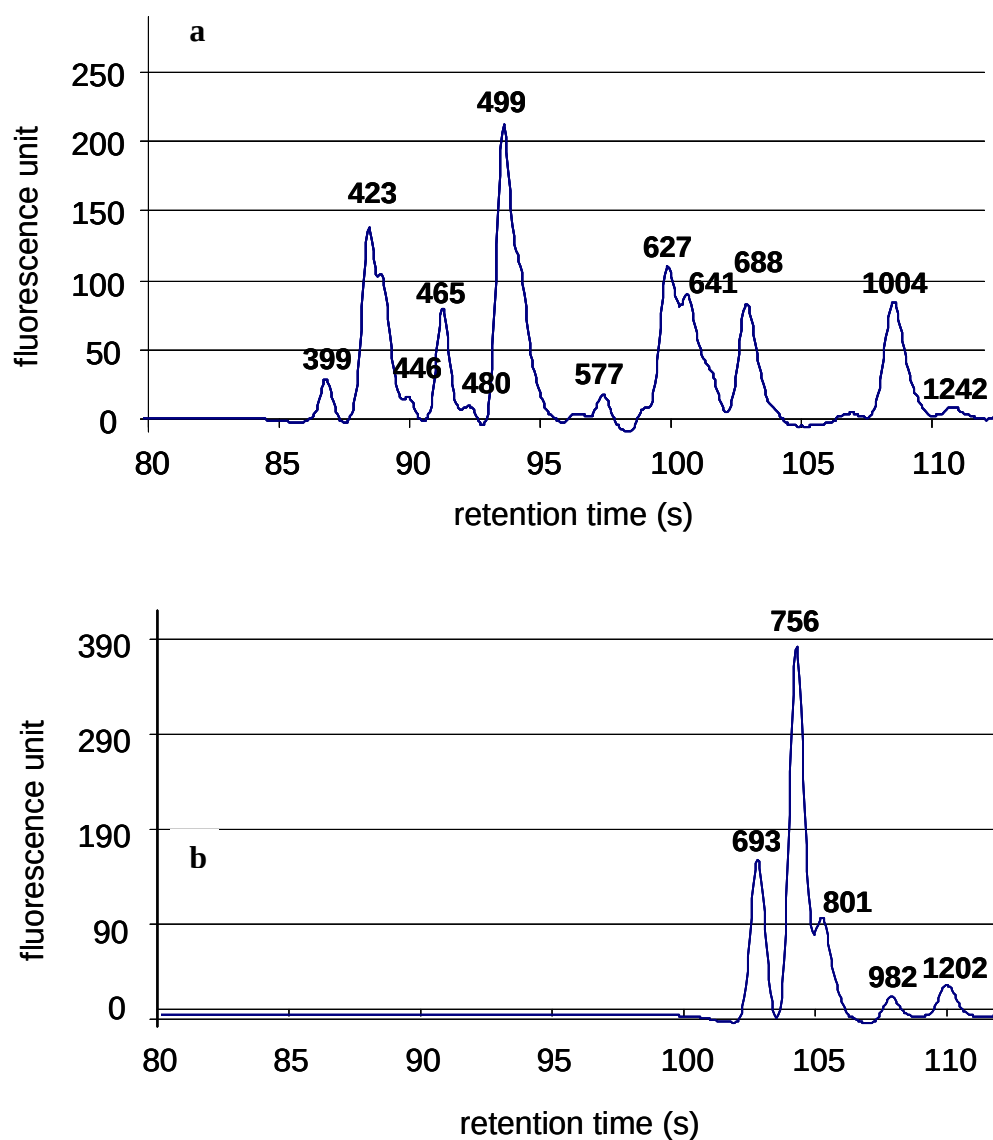
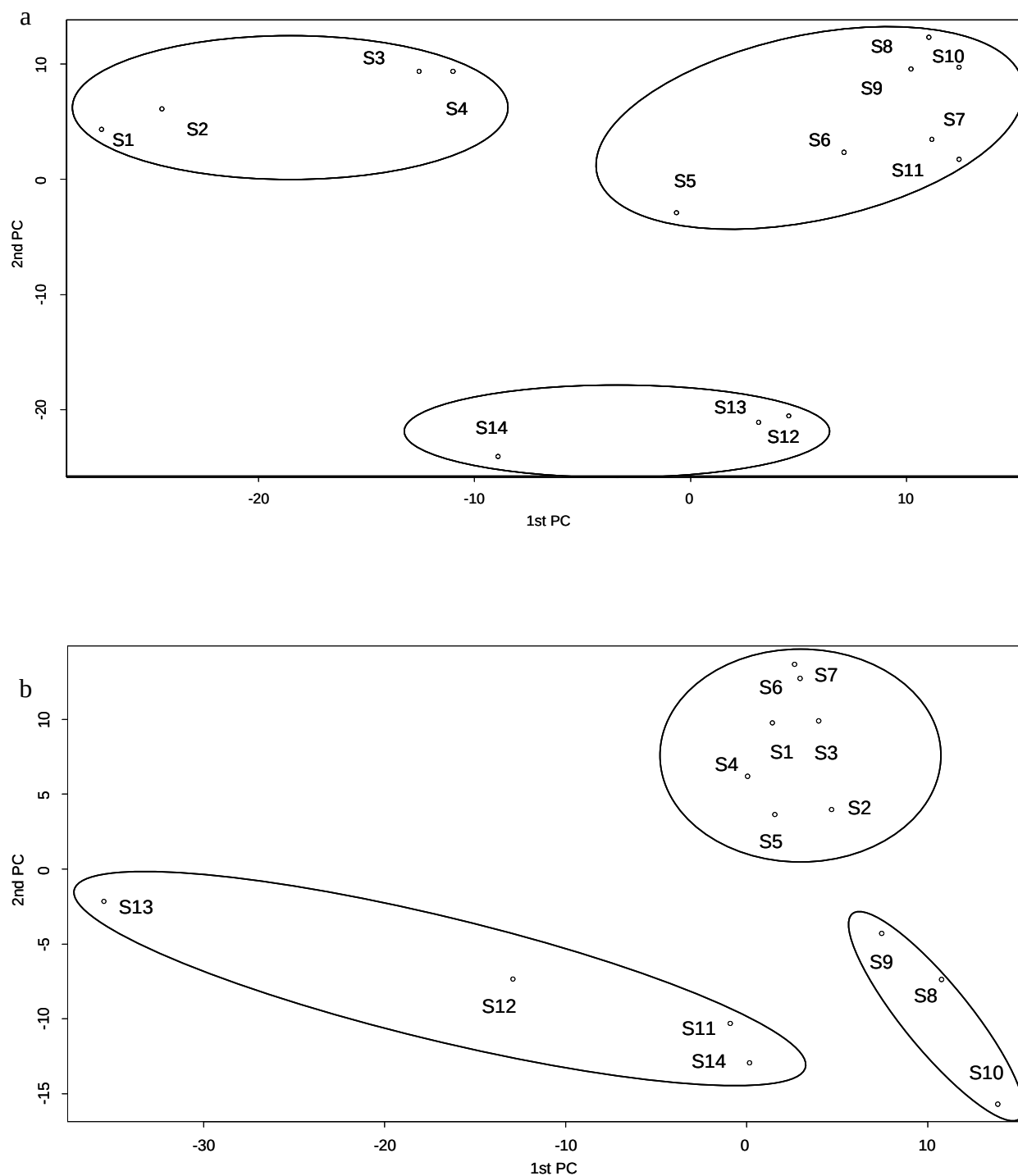


Fig. 3 Biplots of PCA of ARISA profiles obtained with bacterial primers (a), eukaryotic primer set euk (b) and eukaryotic primer set diat (c) used for PCR amplification of freshwater biofilm samples collected *in situ* over several months. Groups of similar profiles identified with PCA are materialized by circles. The explained variance for respectively principal component 1 and 2 is 42.60% and 20.30 % (a), 39.56% and 18.15 % (b), 43.74% and 29.08 % (c).



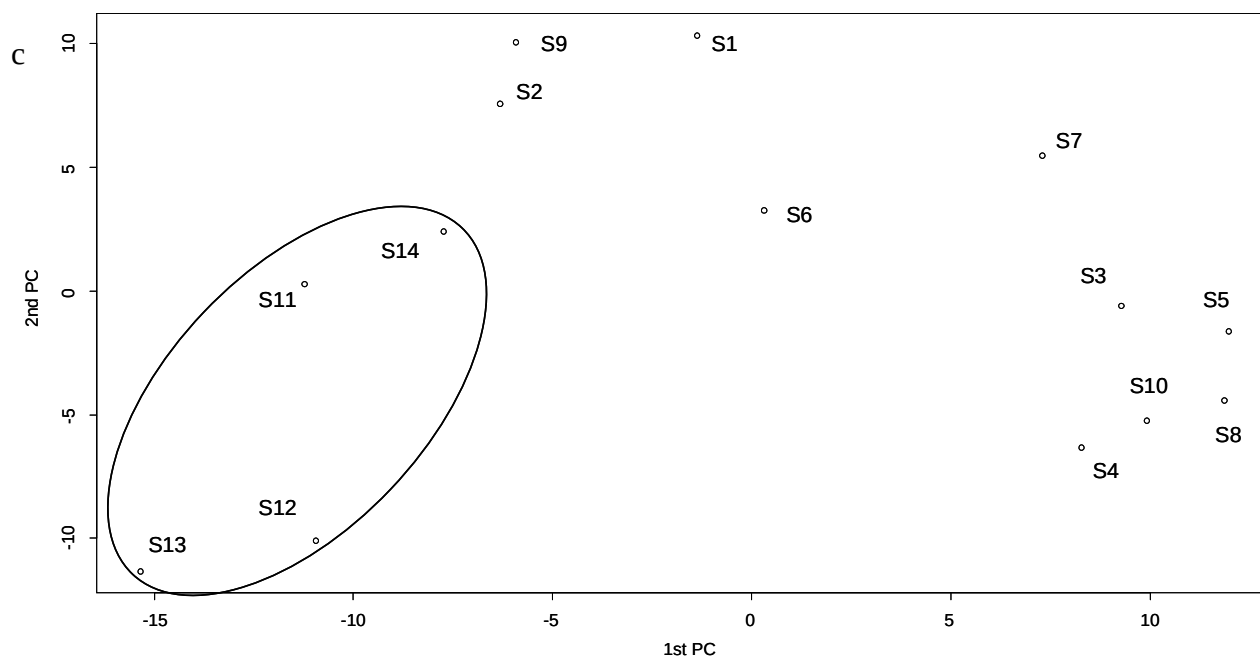


TABLE SI1. Percentages of hits obtained in the Fungi, Bacillariophyta (diatoms) and Viridiplantae groups of the SSU and LSU Silva RNA databases (SSU and LSU Ref 102) with the two sets of eukaryotic primers by using Probe Match in the ARB software. Percentages were calculated after manually removing the Fungi, Bacillariophyta (diatoms) and Viridiplantae groups of incomplete sequences (sequences which ended before or started after the primer considered). The total number of hits among the group Eukarya (which contains 50356 and 6724 sequences for the SSU and LSU Silva databases respectively) is given in the second column.

Primer	Total number of hits (Eukarya)	Fungi	Bacillaryophyta (diatoms)	Viridiplantae (among which green algae)
ArAlg18S	477	0%	48%	0%
2234C	12019	67%	82%	79%
ITS4	1186	83%	0%	48%
3126T	702	86%	0%	3%

Fig SI1 Rarefaction curves of haplotype diversity obtained from primer sets euk (circles) and diat (triangles). 95% confidence interval (vertical bars) = standard deviation $\times$ 1.96. X-axis units from 1 to 93.

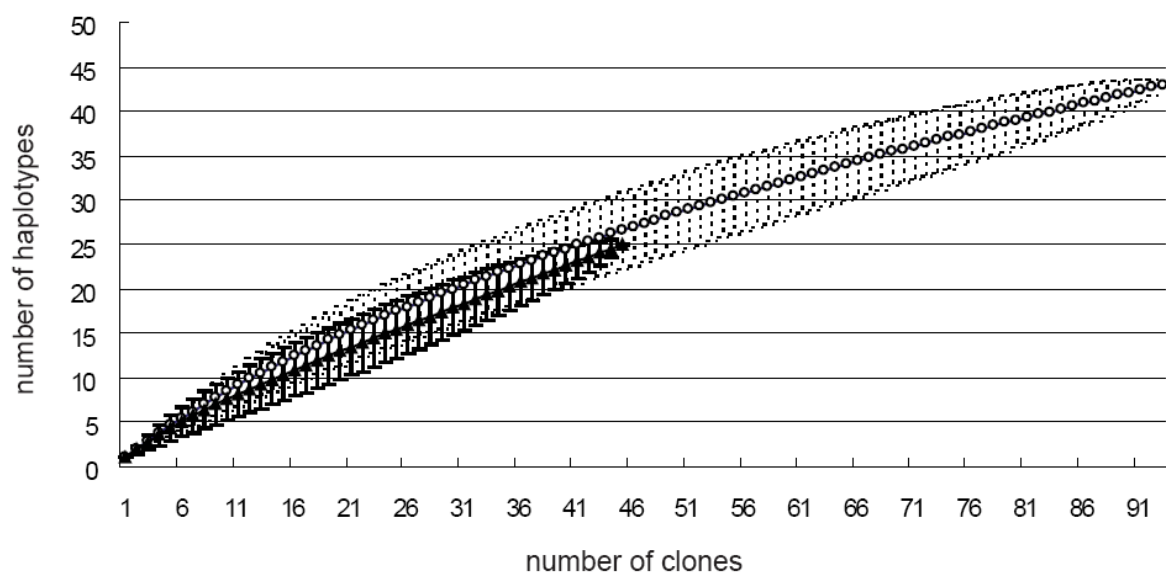
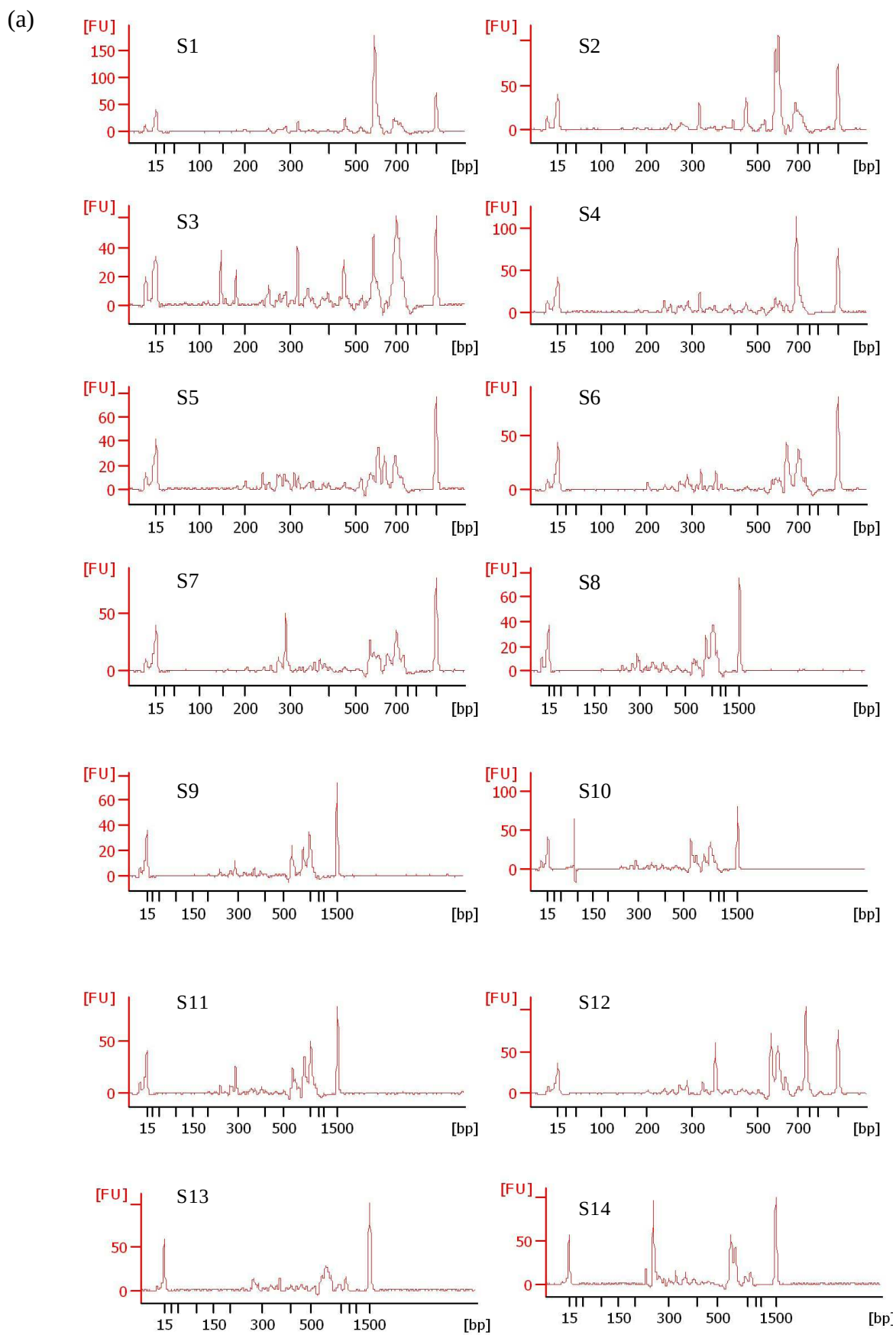
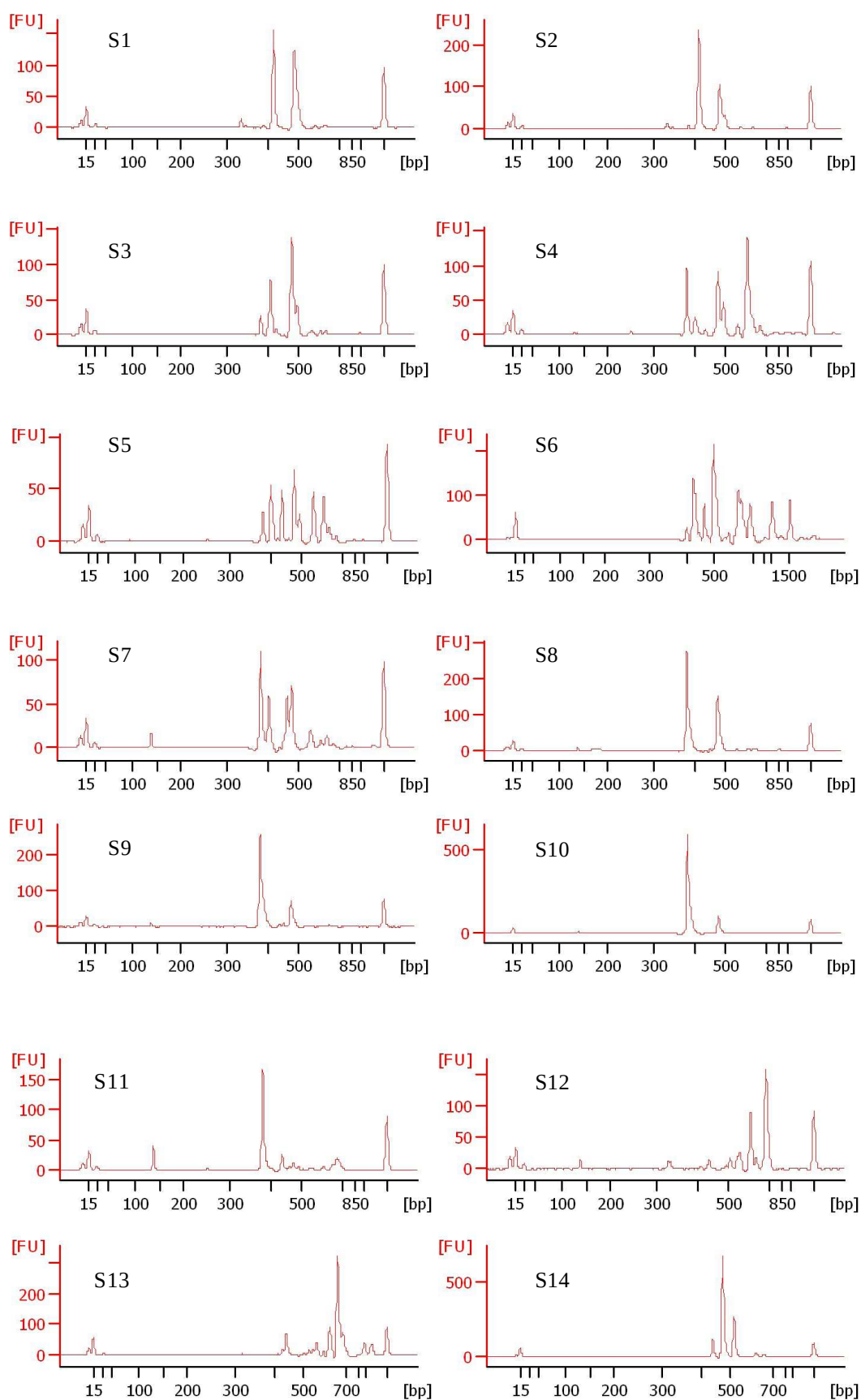


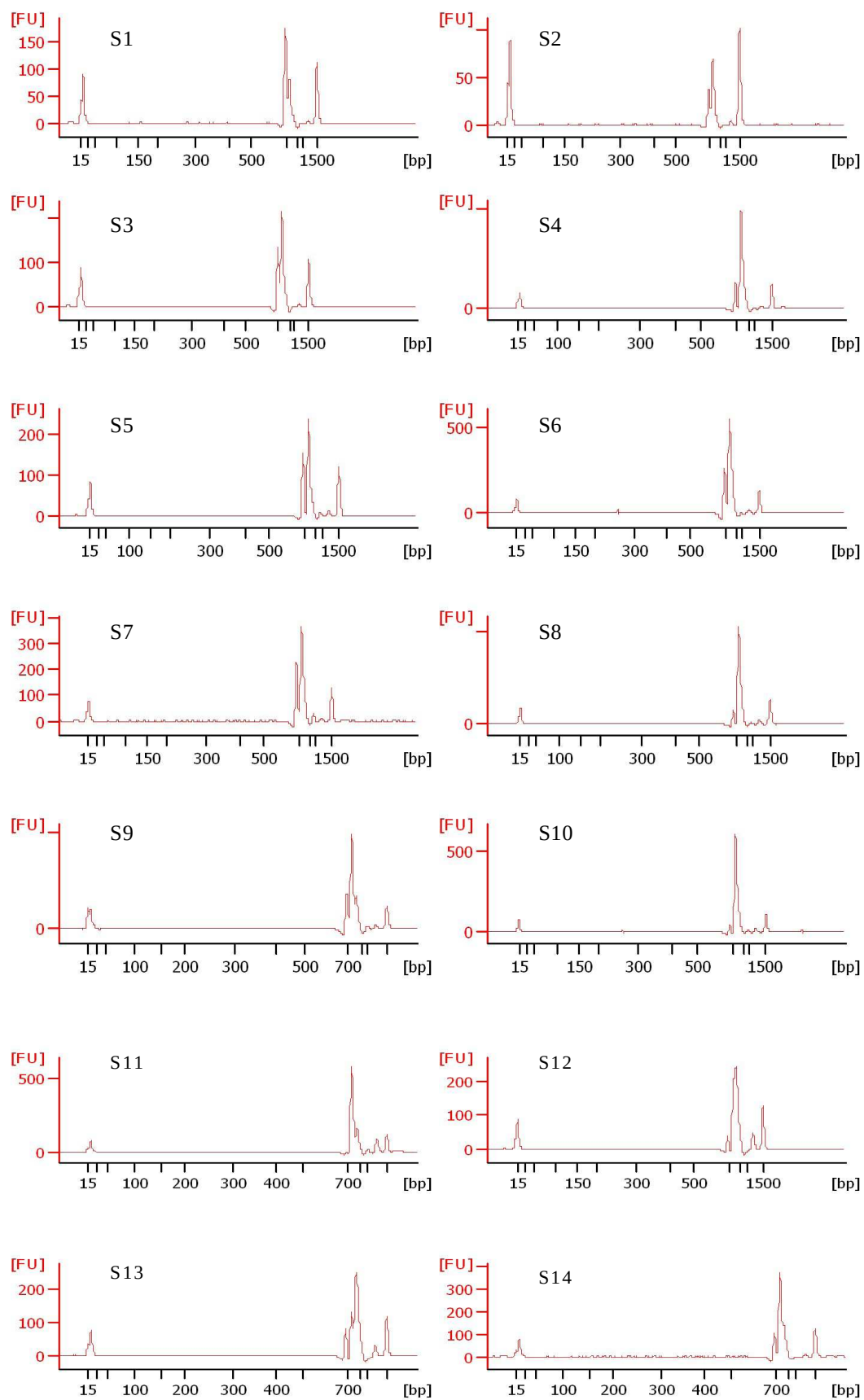
Fig. SI2 ARISA profiles of PCR products (fluorescence of peaks in fluorescence units, FU, as a function of the length of amplicons in bp) obtained with the bacterial set (a) and the eukaryotic sets euk (b) and diat (c) on biofilms S1 to S14.



(b)



(c)



Chapitre 4.

Validation de la méthodologie PICT en conditions contrôlées : expositions en microcosmes

Protocole de dosage des métaux totaux et intracellulaires accumulés dans les biofilms

Le protocole de dosage a été mis au point à partir du protocole développé par Meylan *et al.* (2004). Des aliquots de suspension de biofilm (en général < 20 mL) sont filtrés sur filtres PES (0.45 µm, 47 mm de diamètre, Sartorius Biolab Products, Sartorius Stedim Biotech) préalablement immergés pendant 48h dans de l'acide nitrique à 10 % (65% suprapure, Merck) puis rincés deux fois dans de l'eau ultrapure. Pour chaque échantillon de biofilm, on additionne avant filtration de l'EDTA (concentration finale 4 mM) dans un aliquot. Le lavage à l'EDTA (10 minutes) permet de décrocher les métaux adsorbés sur les membranes cellulaires et les complexes inorganiques présents dans la suspension. La filtration est mise en œuvre à l'aide d'une pompe à vide. Les filtres sont ensuite digérés sur DigiPREP Jr. (SCP Science) : ils sont transférés dans des tubes plastiques de 50 mL (SCP Science) auxquels sont ajoutés 4 mL d'acide nitrique (65% suprapure, Merck), puis les tubes sont chauffés à 100 °C pendant deux heures (sous hotte aspirante). On ajoute ensuite 2 mL d'eau oxygénée (suprapure, Merck) puis les tubes sont à nouveau chauffés à 100 °C pendant deux heures. Après dilution à 50 mL avec de l'eau ultrapure, les concentrations en métaux sont mesurées par SAA ou ICP-MS.

Mise au point du protocole :

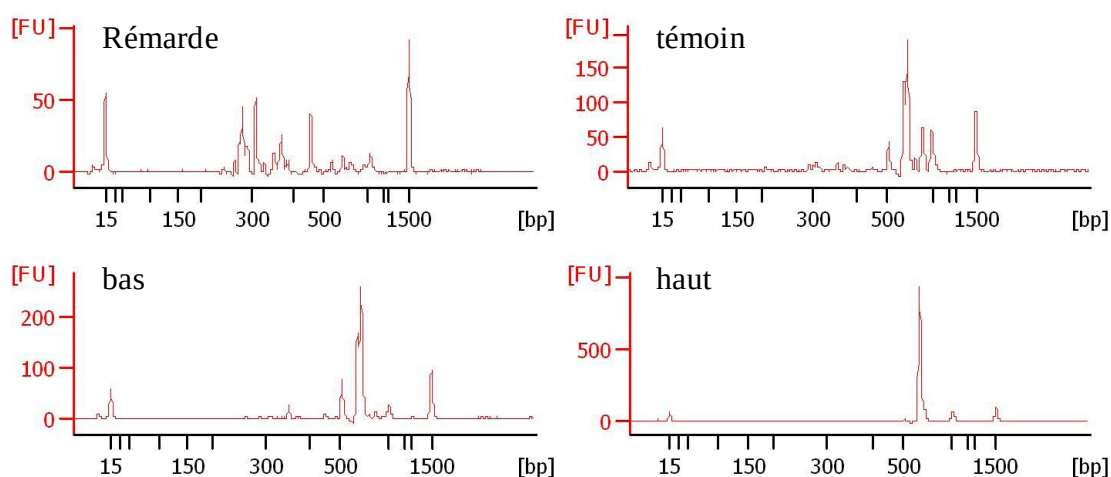
- Tests de minéralisation de biofilms (aliquots de suspension d'un biofilm prélevé à St Maurice) avec deux méthodes de digestion testées en parallèle (micro-onde/DigiPREP Jr.), avec eau régale ou avec mélange HNO₃/H₂O₂ (quatre traitements, à raison de trois réplicats par traitement).
- Dosage des métaux Cu, Ni et Pb au SAA four.
- Résultats : pas de différences significatives entre les différents types de traitements, et ce, pour les trois métaux testés.
- Conclusion : les différents traitements donnant des résultats comparables, la méthode choisie est la 4 (digestion par DigiPREP avec HNO₃/H₂O₂) pour les raisons suivantes :
 - moins de risques de contamination (pas de transvasement dans un réacteur pour la digestion au micro-onde)
 - possibilité de traiter plus d'échantillons à la fois

- matrice acide nitrique uniquement (limitation des effets de matrice au niveau analytique).

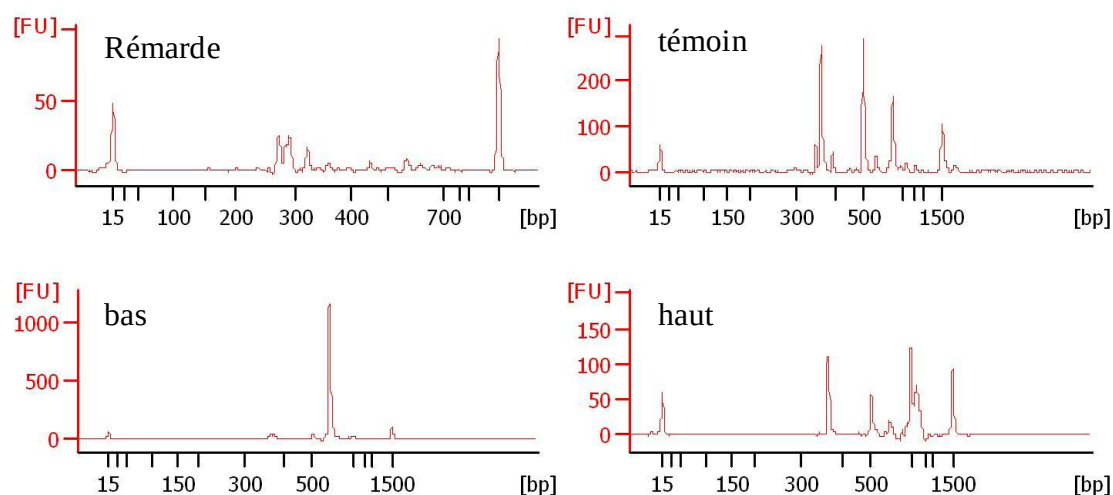
Digestion au micro-onde		Digestion par DigiPREP	
1 : Eau régale 2 mL HNO ₃ / 6 mL HCl	2 : HNO ₃ /H ₂ O ₂ 5 mL HNO ₃ / 3 mL H ₂ O ₂	3 : Eau régale 1 mL HNO ₃ / 4 mL HCl	4 : HNO ₃ /H ₂ O ₂ 5 mL HNO ₃ / 2 mL H ₂ O ₂
↗ 180 °C 10 min → 180 °C 10 min	↗ 180 °C 10 min → 180 °C 10 min	Reflux 1h à 95°C avec premier réactif puis idem avec deuxième réactif	Reflux 1h à 95°C avec premier réactif puis idem avec deuxième réactif

Tableau 32 : Tests de minéralisation de suspensions de biofilm pour le dosage des métaux totaux et intracellulaires. Quatre types de digestion ont été testées sur le même échantillon de biofilm (St Maurice).

Profils ARISA Bactérie des biofilms des expériences d'exposition au Ni et au Zn (témoin, biofilms exposés au niveau "haut" et au niveau "bas" de métal) et du biofilm de la Rémarde utilisé comme inoculum

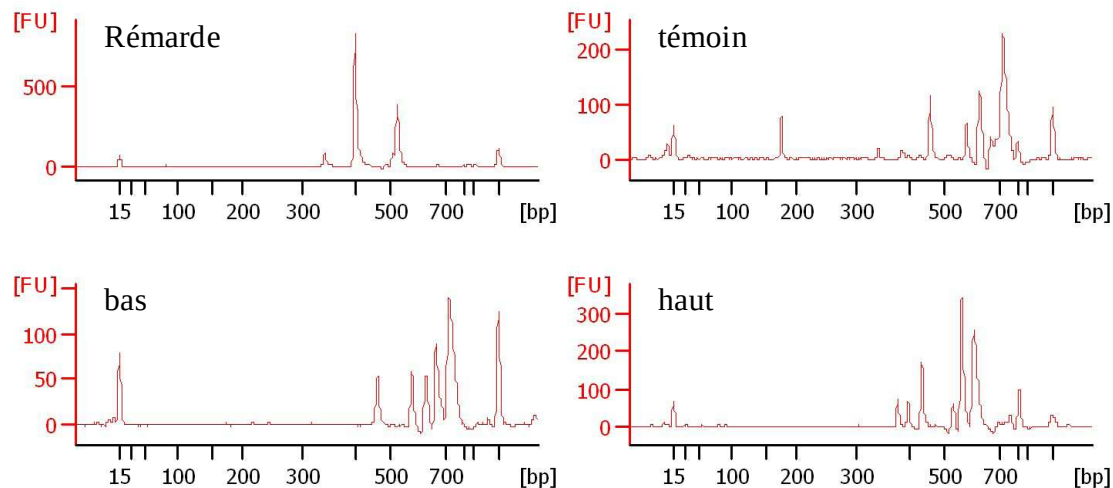


ARISA Bactérie : exposition au Ni

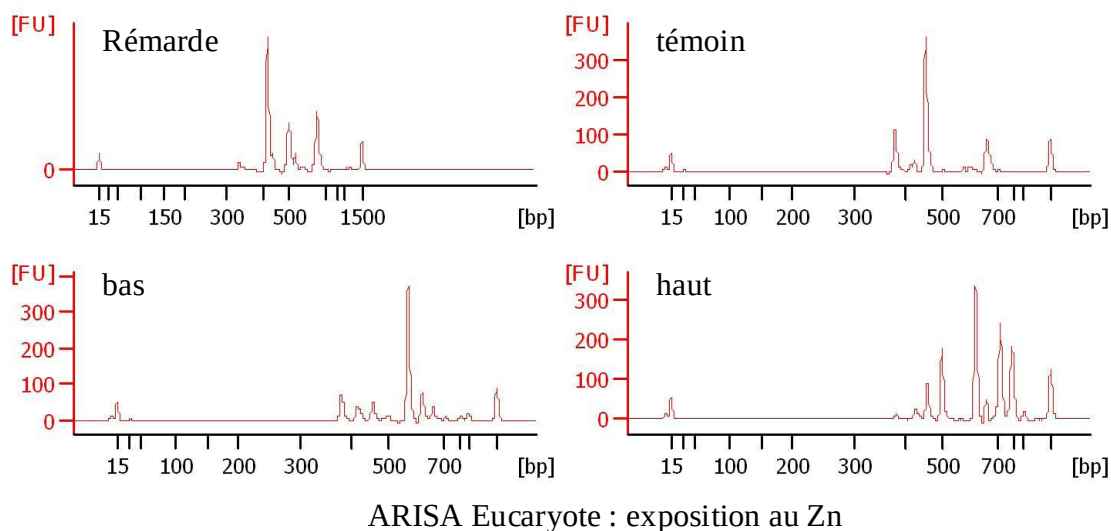


ARISA Bactérie : exposition au Zn

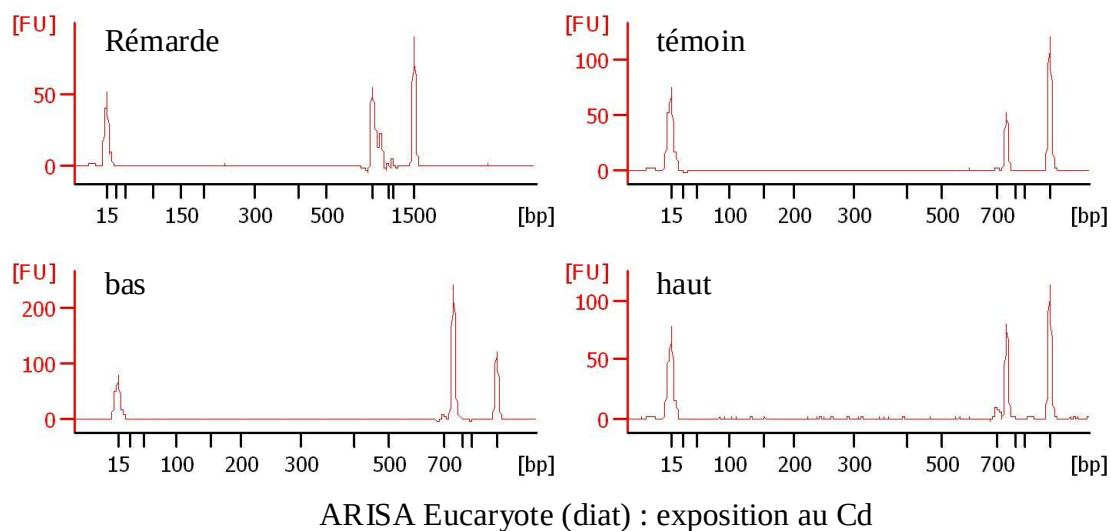
Profils ARISA Eucaryote (amorces du couple euk) des biofilms des expériences d'exposition au Ni et au Zn (témoin, biofilms exposés au niveau "haut" et au niveau "bas" de métal) et du biofilm de la Rémarde utilisé comme inoculum

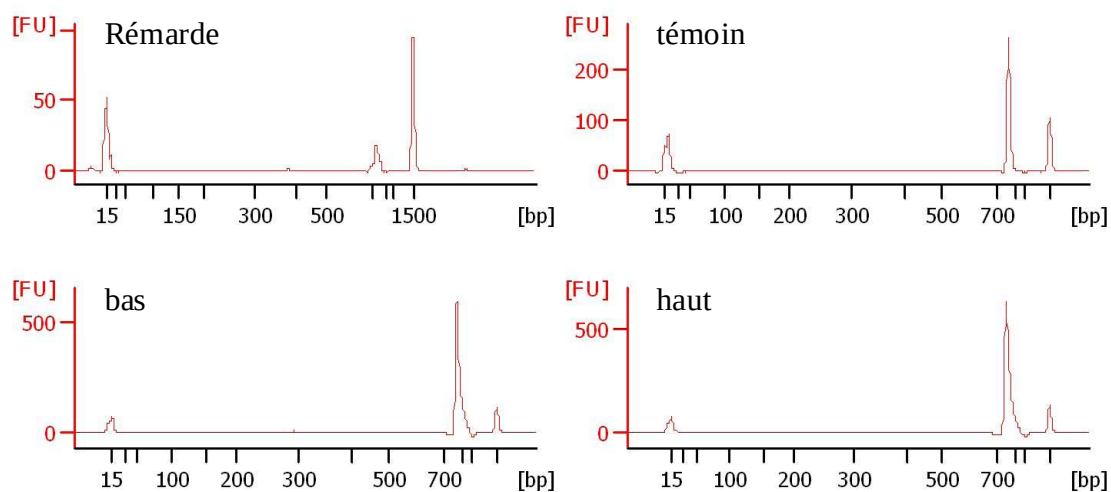


ARISA Eucaryote : exposition au Ni

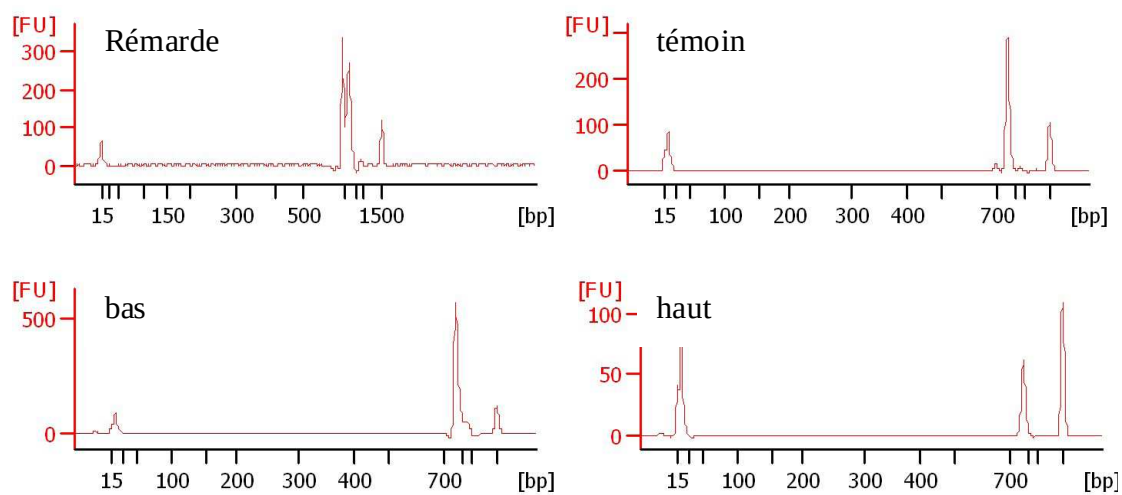


Profils ARISA Eucaryote (amorces du couple diat) des biofilms des expériences d'exposition au Cd, Ni et au Zn (témoin, biofilms exposés au niveau "haut" et au niveau "bas" de métal) et du biofilm de la Rémarde utilisé comme inoculum





ARISA Eucaryote (diat) : exposition au Ni



ARISA Eucaryote (diat) : exposition au Zn

Article soumis à Ecotoxicology

Low exposure levels of urban metals induce heterotrophic community tolerance: a microcosm validation

Lise C. Fechner^{1,2,†}, Catherine Gourlay-France^{1,2}, Marie-Hélène Tusseau-Vuillemin³

¹Cemagref- Unité de Recherche Hydrosystèmes et Bioprocédés
Parc de Tourvoie, BP 44 F 92163 Antony Cedex, France

²FIRE
FR-3020, 4 place Jussieu 75005 Paris France

³IFREMER
Technopolis 40,155 rue Jean-Jacques Rousseau 92138 Issy-Les-Moulineaux France

Abstract

The biological response of periphyton chronically exposed to metals of urban origin (Cd, Ni and Zn) was investigated with a PICT (Pollution-Induced Community Tolerance) approach using a previously developed short-term toxicity test based on β -glucosidase (heterotrophic) activity. Periphyton was grown on plastic membranes immersed in indoor aquaria contaminated with metals at realistic contamination levels (0.3, 3 $\mu\text{g/L}$ for Cd, 5, 50 $\mu\text{g/L}$ for Ni, 20, 200 $\mu\text{g/L}$ for Zn). After three weeks of exposure, biofilms parameters (dry-weight, chlorophyll *a* concentrations, heterotrophic activity) were analyzed and tolerance acquisition of the heterotrophic communities was assessed using the toxicity test. Modifications of bacterial and eukaryotic community structure were assessed with ARISA (Automated Ribosomal Intergenic Spacer Analysis). Effects of metal exposure were observed on biofilms parameters in the Cd and Zn experiments. Tolerance levels increased for both Cd-exposed biofilms, and for the high metal treatment biofilms in the Ni and Zn experiments. Analysis of the ARISA profiles showed that metal exposure affected the structure of both bacterial and eukaryotic communities. Moreover, Cd tolerance of the Zn-exposed heterotrophic communities was evaluated, which showed that the Zn-tolerant community (high metal treatment in the Zn experiment) also became tolerant to Cd (co-tolerance). The study shows that tolerance acquisition can be detected after exposure to environmental metal concentrations using β -glucosidase activity as an endpoint in short-term toxicity tests.

Keywords: biofilms, urban metal, community tolerance, ARISA

Introduction

Urban pollution is characterized by a mixture of contaminants at low and sub-lethal levels (Thévenot et al. 2007; Tusseau-Vuillemin et al. 2007). Linking urban chemical contamination to biological impairment is therefore a complex task as the effects of subtle, chronic contaminations do not engender easily-detectable biological responses (Bourgeault et al. 2010). The PICT (*Pollution-Induced Community Tolerance*) concept was proposed by Blanck (1988) as a new ecotoxicological approach using tolerance acquisition at the community level to detect a biological response to a toxic exposure. Increased community tolerance to a toxic agent is indeed assumed to be the consequence of a selection pressure on the community caused by the toxic agent (Clements and Rohr 2009). PICT is induced either by selection of more tolerant species or by phenotypic or genotypic adaptation of already present species (Blanck 2002).

Periphyton (or biofilm) is composed of both autotrophic and heterotrophic microorganisms embedded in a matrix of polysaccharides. It develops on immersed substrata like rocks, macrophytes or sediment. In streams and rivers, periphyton is often the first biological entity to respond and recover from stress (Burns and Ryder 2001; Sabater et al. 2007). It also plays an important part in nutrient and energetic cycles in aquatic systems. Collected *in situ* on artificial substrata, biofilms provide a representative sample of the natural community and an indication of the overall health of aquatic ecosystems (Sabater et al. 2007). They have indeed been successfully used to identify PICT effects with herbicides, antifouling agents or metals (Blanck 2002; Sabater et al. 2007).

The crucial feature of the PICT concept is that community tolerance is determined by the means of short-term toxicity tests: comparison of the obtained EC₅₀ value with that of an unexposed (reference) community clarifies whether or not the toxicant has affected the community (Blanck and Dahl 1996). Most studies have focused on the impact of toxicants (metals, pesticides, etc.) on the algal component of periphyton or phytoplankton using short-term photosynthetic toxicity tests to bring to light tolerance induction (for instance Dorigo et al. (2010) or Serra et al. (2010)). Moreover, the toxicity tests are usually performed with the use of radioactive reagents, like incorporation of labelled-thymidine for bacterial growth and labelled-CO₂ for photosynthesis (see for instance Blanck et al. (2002; 2003)). In this study, a recently-developed short-term toxicity test, based on β -glucosidase activity (Fechner et al. 2010a) was used for comparative evaluation of tolerance levels of heterotrophic communities exposed to urban metals. Indeed exo-enzymes

control essential metabolic pathways in aquatic ecosystems and are thus interesting to study the effects of environmental perturbation on the functioning of aquatic ecosystems (Admiraal and Tubbing 1991). In particular, β -glucosidase represents the global activity of heterotrophic microorganisms (Chrost 1991). To our knowledge, the impact of metals of urban origin on heterotrophic communities has not yet been studied using a PICT approach.

PICT is a sign that the community under study has been affected and is therefore usually accompanied by changes in biofilm community structure. These modifications can be assessed by the use of indicators like biofilm biomass, species richness or the abundance of particular taxa (Blanck 2002). More recently, modifications of community structure have been identified using fingerprinting techniques like DGGE (Dorigo et al. 2010), or ARISA (Fechner et al. 2010b).

The aim of this study is to test the sensitivity of tolerance measurements obtained with the β -glucosidase toxicity test to assess the impact of metallic exposure at realistic, environmental concentrations. Periphyton was thus exposed to metals that are typical of urban contamination (Cd, Ni and Zn) under controlled conditions in microcosms. ARISA fingerprints of the communities were also used to assess modifications of bacterial and eukaryotic community structures under metallic exposure.

Material and methods

Biofilm inoculum

Periphyton was grown on LDPE (*Low Density PolyEthylene*) plastic membranes immersed in a third-order river: the Rémarde river (mean annual flow in 2008: 0.5 m³/s) which is relatively unaffected by the urban area of Paris in terms of metallic contamination (Table S1). After a colonization time of at least 50 days (50, 56 and 82 days for the Cd, Ni and Zn experiments respectively), colonized membranes were brought back to the laboratory in 250 mL glass bottles filled with mineral water (Valvert, France). Membranes were carefully hand-scraped to remove periphyton and make a periphyton suspension in Valvert mineral water. This periphyton suspension was used to inoculate the microcosms at the beginning of each experiment, therefore a new inoculum (river biofilm) was collected for each metal exposure experiment: in October 08 for the Cd experiment, November 08 for the Ni experiment and in February 09 for the Zn experiment. Aliquots of the three river biofilms were also centrifuged and stored at -80°C for ARISA fingerprinting (see below).

Periphyton colonization in indoor aquaria

The medium used to cultivate periphyton in the microcosms was Valvert mineral water (Valvert, France) enriched with nutrients. Nutrients (N, P, Si) were added as $\text{Ca}(\text{H}_2\text{PO}_4)_2$, $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ and Na_2SiO_3 at concentrations of 20 mg/L NO_3^- , 1 mg/L PO_4^{3-} and 32 mg/L SiO_2 , which were close to natural nutrient concentrations measured in the Rémarde river at the inoculum sampling site. Valvert mineral water was chosen for the medium so that physico-chemical parameters were similar to those from the Rémarde river (Table S2).

In each experiment, periphyton grew on the immersed LDPE membranes at 20°C, under continuous water mixing conditions using water pumps (Eheim Compact 300, 300 L/h) and a light regime of 13h/11h light/dark cycle using neon lamps (Sylvania, Gro-Lux, F14W-GRO-T8) during three weeks. The medium was changed weekly during the three weeks of colonization.

Metal exposure of biofilms in microcosms

At the beginning of each experiment, a stock solution of metal was prepared by adding CdNO_3 , NiSO_4 or ZnSO_4 to distilled water for respectively the Cd, Ni and Zn experiments. Prior to the beginning of the experiments, indoor plastic aquaria and 140 cm² LDPE membranes (14 membranes per aquarium) were rinsed with 10% HNO_3 , then twice with distilled water, and finally left to equilibrate for 24h with the cultivation medium spiked with metals to limit adsorption of metals on the containers' walls.

Periphyton was exposed to each metal in separate experiments (Cd, Ni and Zn) for three weeks. In each experiment, two metal concentrations ("low metal" and "high metal") were tested with one control (aquaria filled with metal-free medium), with one replicate microcosm per treatment. Periphyton was exposed to Cd at 0.3 and 3 µg/L, Ni at 5 and 50 µg/L and Zn at 20 and 200 µg/L in the Cd, Ni and Zn experiments respectively. Metal concentrations in the aquaria were measured daily in aliquots of 5 mL of aquaria water: the decrease in metal concentration, mainly due to metal absorption by periphyton, was corrected by adding stock solutions of metal as required ($\leq 100\mu\text{L}$ per aquarium).

Laboratory analyses

Water samples were collected daily from the aquaria for measurement of physico-chemical parameters and metal concentrations. Metal concentrations were measured daily on 5-mL samples acidified to 1% HNO_3 (suprapure, Merck) by graphite furnace Atomic Absorption Spectrometry (AAS) for the Cd and Ni experiments (StectrAA 220Z, GTA 110Z, Varian Inc.,

USA), flame AAS for the Zn experiment (SpectrAA 220FS, Varian Inc., USA). Validity of the method was checked daily with a certified reference material (EP-L-2, SCP Science). Mean standard deviations from the certified values were 2.5 % (Cd), 2.3% (Ni), and 10% (Zn).

General biofilm parameters

After three-weeks of biofilm growth, the colonized membranes were scraped in a known volume of mineral water (Montdore, Grand Barbier, France) as in (Fechner et al. 2010a) to form a single sample per aquarium which was homogenized by magnetic stirring. Aliquots of biofilm suspension were assigned to various analyses in terms of biomass, metal accumulation and tolerance acquisition. Periphyton dry weight (DW), ash-free dry weight (AFDW) and chlorophyll *a* concentration were determined as in Fechner et al. (2010b). To perform ARISA, aliquots of 50 mL of each periphyton suspension (biofilms from the microcosms at the end of the three experiments and river biofilm at the beginning of each experiment) were centrifuged for 15 minutes at 10 000 g, and 4°C. Supernatants were discarded and pellets were frozen and stored at -80°C for further use. Metal accumulated in the biofilms was measured according to Meylan *et al.* (2004). Aliquots of biofilm suspensions (approximately 20 mL) were filtered on 0.45 µm PES filters (47 mm diameter, Sartorius Biolab Products, Sartorius Stedim Biotech, Germany) previously washed by immersion in 10% HNO₃ (suprapure, Merck, France) for 48h and then rinsed twice with ultrapure water. For each biofilm, an aliquot of 20 mL was also washed with 4 mM EDTA (final concentration) for 10 minutes to remove metal adsorbed to cell walls and most of the inorganic complexes. Filters were then digested on a *DigiPREP* Jr. (SCP Science, France): 4ml HNO₃ (65% suprapur, Merck, France) were added to the filters in 50 mL tubes (SCP Science, France) which were heated to 100°C for 2h, then 2 ml H₂O₂ (suprapur, Merck, France) were added to the tubes which were again heated to 100°C for 2 hours. After dilution to 50 mL with milli-Q water, the metal concentrations of the samples were measured by AAS (Varian Inc., USA).

β-glucosidase short-term toxicity test

Biofilm metal tolerance was assessed by the means of a heterotrophic acute toxicity test using β-glucosidase activity (Fechner et al. 2010a). Briefly, biofilms were exposed for one hour to acute levels of metals (at least six concentrations of metal varying between 0.001 and 10 mM were tested in triplicates for each toxicity test). β-glucosidase activity of the metal-exposed biofilms was measured spectrofluorometrically using Methylumbelliferyl-β-D-glucopyranoside or MUF-GLU (Sigma-Aldrich). Fluorescence of 4-Methylumbelliferone (or MUF) was measured using

either a SAFAS SP 2000 Xenius spectrofluorimeter (Safas SA, Monaco, France) (excitation: 348 nm and emission: 448 nm) for the Cd experiment, or an LB 941 Tristar Ti fluorescence microplate reader (Berthold Technologies, Bad Wildbad, Germany) (excitation/emission filters: 355 and 460 nm) in the Ni and Zn experiments. Fluorescence measurements were converted into MUF concentrations by calibrating the spectrofluorimeter with a range of MUF solutions prepared in demineralised water. 50% effect concentrations (EC_{50}) and maximum inhibition levels were determined from the dose/effect curves which were obtained by plotting β -glucosidase activity (expressed as a MUF concentration) as a function of metal concentration and fitted to the Hill model (Hill 1910) by non-linear regression. The general form of the curve fitted on the data is:

$$F(x) = (p_{\max} - p_0) \frac{x^H}{x^H + EC_{50}^H} + p_0$$

where x is the metal concentration, p_0 is the effect observed without toxicant, $p_{\max}$ is the predicted effect when the toxicant concentration is infinite and $F(x)$ is a probability law. H is the Hill number (slope of the toxicity curve) and EC_{50} the median effect concentration. Each parameter (p_0 , $p_{\max}$, EC_{50} and H) was adjusted for the calculation. Confidence intervals around the fitted parameters were estimated using a Bootstrap method. The dose/effect curves can also be represented as an augmentation of the percentage of inhibition of the MUF fluorescence signal of the control with the metal concentration.

Community tolerance to metal was assessed by calculation of a normalized EC_{50} value by dividing the EC_{50} value by the Total Suspended Solids (TSS) concentration of the periphyton suspension used for toxicity testing (Fechner et al. 2010a) and the maximum inhibition level was calculated with the adjusted parameters p_0 and $p_{\max}$.

In the Cd, Ni and Zn experiments, the tolerance levels of the microcosms' biofilms to respectively Cd, Ni and Zn were assessed. In the Zn experiment, the biofilms which had been exposed to Zn were also subjected to toxicity tests performed with Cd, to find out whether Zn-exposed biofilms also acquired tolerance to Cd.

Metal exposure levels during the toxicity tests were checked by adding 40 μ L of each metal stock solution to 3.96 mL of Montdore mineral water. Samples were acidified to 1 % HNO_3 (suprapure, Merck, France) and analyzed by flame AAS (Varian Inc., USA).

ARISA fingerprinting of periphyton

DNA was extracted from the thawed biofilm pellets (river biofilms and biofilms from the microcosms) using the Power Soil DNA Isolation Kit (Mobio Laboratories, Inc., Carlsbad, US) according to the manufacturer's instructions. DNA amplification and ARISA fingerprinting were performed as in Fechner et al. (2010b). Briefly, primers ITSF/ITSReub (Cardinale et al. 2004) were used for amplification of bacterial 16S-23S ITS and primers 2234C/3126T (Ranjard et al. 2001) were used for amplification of eukaryotic ITS1-5.8S-ITS2 regions. PCR-amplified ITS fragments were separated on an electrophoresis Bioanalyzer (2100 Electrophoresis Bioanalyzer, Agilent Technologies, Santa Clara, CA) and fluorescence data was converted into electrophoregrams using 2100 Expert software (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, US). Comparisons between ARISA fingerprints (either bacterial or eukaryotic) were made using the Jaccard index as a % of similarity (Legendre and Legendre 1998) between two fingerprints from the same experiment using the 2100 Expert software (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, US):

$$D(i,j) = a/(a+b+c),$$

where a = number of fragments contained in both samples, b = number of fragments contained in sample i but not j, c = number of fragments contained in sample j but not i.

To include the maximum number of peaks while excluding background fluorescence, only peaks with a fluorescence value superior to 20 [FU = Fluorescence Units] were considered for calculation of the Jaccard indexes. ARISA fragment lengths differing by more than 3 bp were considered distinct.

Electrophoregrams in ASCII formats were also imported into the StatFingerprints program (Michelland et al. 2009). ARISA profiles were aligned and the area under each curve was normalized to 1 before calculation of the Shannon-Weaver indexes, to assess community diversity using the area under peaks.

Results

Metal exposure in the microcosms

Metal concentrations in the microcosms' media were measured daily before and after spiking to readjust metal exposure levels. Mean metal concentrations which are given in Table S3 were close to the expected values, for instance 0.14 µg/L before spiking and 0.37 µg/L for the low metal

treatment in the Cd experiment (expected value 0.3 µg/L) and 1.11 before spiking and 2.07 µg/L after spiking for the high metal treatment in the same experiment (expected value 3 µg/L). Accumulation of metals by the exposed biofilms had to be compensated for every day, especially for low metal treatments. Levels of total and intracellular metal accumulated in the biofilms, shown in Figure SI1, confirm that biofilms accumulated metal during exposure. Cd and Ni concentrations in the control microcosms were always below the detection level for the Cd and Ni experiments respectively. As regards the Zn experiment, Zn could be detected in the control microcosm, with a mean of 1.3 µg/L corresponding to the Zn concentration initially detected in Valvert water.

Periphyton characterization: biomass descriptors

Variations of biofilm parameters (dry weight or DW, chlorophyll *a* or Ch *a* concentrations and mean β-glucosidase activities) were observed with increasing metal exposure (Table 1). Mean DW decrease reached 39, 27 and 90 % respectively in the Cd, Ni and Zn experiments for the high metal exposed biofilms, but was low for the low metal treatment biofilms. Ch *a* concentrations decreased only for the high metal treatments in both the Cd and Zn experiments. Heterotrophic activity (β-glucosidase) decreased with metal exposure in the Cd and Zn experiments. In the Ni experiment, heterotrophic activity decreased for the low metal treatment.

β-glucosidase toxicity tests: metal tolerance measurements and maximum inhibition levels

Dose/effect curves of biofilms from the microcosms are given in Figure 1. Table 2 summarizes the values of EC₅₀ and the maximum percentages of inhibition of β-glucosidase activity calculated from the dose/effect curves. In the Cd experiment, increase of the normalized EC₅₀ value was significant for both metal treatments (high and low), which had similar community tolerance levels (confidence intervals overlap). In the Ni experiment, a significant decrease of the normalized EC₅₀ value was observed for the low metal treatment, and the normalized EC₅₀ value increased markedly for the high metal treatment. In the Zn experiment, the increase of community tolerance to both Cd and Zn was significant for the high metal treatment, and tolerance levels of both the control and low metal treatments were similar.

A small but significant decrease of the maximum % inhibition levels was observed for both Cd-exposed biofilms. In the Ni experiment, maximum % inhibition levels also decreased for the Ni-exposed biofilms but not significantly (confidence intervals overlap). Maximum % inhibition

levels decreased drastically for the high metal treatment in the Zn experiment with both Zn and Cd, and remained unchanged for the low metal treatment.

Evolution of community structures with ARISA fingerprints

ARISA profiles are given in Figure 2. Variations of ARISA profiles with metal exposure could be detected for both bacterial and eukaryotic communities. Bacterial ARISA profiles showed a decrease of the number of fluorescence peaks with increasing metal exposure for all experiments (typically 5 or 6 major peaks for the control biofilms and 2 to 5 major peaks for the metal-exposed biofilms). Those visual observations of the ARISA fingerprints are confirmed by the Shannon-Weaver indexes (Table 3). Shannon-Weaver indexes computed with bacterial ARISA profiles of the control biofilms were always higher than for metal-exposed communities. They also varied between metal exposure levels.

Eukaryotic ARISA profiles also showed an evolution of eukaryotic diversity with metal exposure. In all experiments, the number of peaks and the Shannon-Weaver indexes are higher for the high metal treatments than for the other biofilms.

ARISA fingerprints of the microcosms' biofilms can also be compared to the fingerprints obtained with the river biofilm (inoculum from the Rémarde river collected *in situ* at the beginning of each experiment). With both bacterial and eukaryotic ARISA profiles, Shannon-Weaver indexes are higher for the Rémarde biofilm used as inoculum in each experiment, except for the eukaryotic profiles in the Ni experiment.

Jaccard indexes are shown in Table 4. Percentages of similarity were higher between the control and low metal treatment biofilms for both bacterial and eukaryotic communities in the Ni and Zn experiments, whereas the control and high metal treatment biofilms had the highest % of similarity in the Cd experiment (bacterial and eukaryotic communities).

Discussion

Increase of community tolerance and decrease of the maximum inhibition level of heterotrophic activity with metal exposure

The β -glucosidase toxicity test proved to be an efficient tool to detect metal-induced tolerance of the heterotrophic component of biofilms, as a significant increase of the normalized EC₅₀ values

was observed at concentrations of 0.3 µg/L for Cd (and 3 µg/L Cd), 50 µg/L for Ni, and 200 µg/L for Zn (Figure 1 and Table 2), when compared to the corresponding control biofilms. Another striking result is the impossibility to completely inhibit the heterotrophic activity of the metal-exposed biofilms even at high metal concentrations (Figure 1 and Table 2). Occurrence of such a maximum inhibition level (inferior to 100%) with the β-glucosidase toxicity test had already been observed in former experiments on natural periphyton from a metal-contaminated urban area (see for example Fechner et al. (2010a)). In this study, maximum inhibition levels decreased as community tolerance increased. It thus appears as an interesting feature of the biofilms' sensitivity to metals and could be an indicator of either the presence of metal-resistant species or of a particular composition of the biofilm matrix which would induce protection of part of the community during the test. It therefore constitutes an important part of the biological response to metal exposure and indicates metal-induced modifications of community structure as well as the joint increase of community tolerance (measured as an increase in EC₅₀ value).

Community descriptors and ARISA fingerprints

The evolution of general biofilm parameters (dry weight, algal biomass and heterotrophic activity) globally reflects the effects of metal exposure, but does not always totally coincide with PICT measurements. Indeed, joint effects of metal exposure were observed on both tolerance levels and periphyton biomass parameters for the high metal treatments in the Cd and Zn experiments. According to Blanck *et al.* (2002; 1988), a relationship between induced tolerance and changes in the communities (usually biomass parameters) should preferably be obtained to conclude on a PICT effect. However, biomass descriptors are rough indicators of community structure that do not necessarily allow detection of subtle variations in community structure. Indeed PICT effects might derive from adaptation or selection processes which do not necessarily involve a decrease of biomass. It is therefore even more interesting to relate tolerance acquisition to modifications of fingerprints.

ARISA fingerprints are most useful for enlightening changes in the structures of both bacterial and eukaryotic communities with metal exposure. ARISA fingerprints in this study revealed a decrease of bacterial diversity in all experiments, with distinct effects for each exposure level. They also revealed that eukaryotes were affected by metal exposure, but not necessarily in terms of a decline of community diversity as observed for bacterial communities. Increased eukaryotic diversity of metal-exposed periphyton has already been observed: for instance, in the study by

Serra *et al.* (2009), control communities were dominated by a pioneer diatom species, which was affected by Cu exposure, which lead to an increase of diversity in the Cu-exposed communities. In some cases, for instance for the low metal treatment biofilms in the Ni and Zn experiments, ARISA profiles revealed changes in community structure whereas no increase of tolerance (expressed as normalized EC₅₀) could be detected on those communities. ARISA therefore provides a complementary approach to the detection of tolerance acquisition with a PICT methodology. Moreover, ARISA provides insight into modifications of community structure that are not necessarily detected using classical biomass descriptors as can be observed for Ni-exposed biofilms for which variations of both DW and Ch *a* are low whereas the Jaccard and Shannon-Weaver indexes reveal deep changes in both bacterial and eukaryotic communities.

Co-tolerance and implication for the use of the PICT method under multi-metallic exposure

This study shows that co-tolerance mechanisms affect the heterotrophic component of biofilms, and can be detected using the β -glucosidase toxicity test. Occurrence of co-tolerance or multi-tolerance is common for both algal and bacterial species (Gustavson and Wängberg 1995; Paulsson *et al.* 2000). Soldo & Behra (2000) have observed co-tolerance to Ni, Ag and Zn in Cu-exposed biofilms using a photosynthetic toxicity test. Co-tolerance can be related to diverse mechanisms (Gustavson *et al.* 1999), for instance mucilage production, which is a non-specific defense means, and thus likely to affect tolerance to several metals (Soldo and Behra 2000).

Co-tolerance phenomenons might render proper identification of the exact selection pressure difficult (Blanck *et al.* 2009; 1988). Application of the same methodology to natural *in situ* samples exposed to complex multi-metallic contaminations that are typical of urban areas is thus likely to lead to complicated tolerance patterns. In field studies, biofilm metal tolerance levels could therefore be considered as an early-warning response to a global multi-metallic urban contamination, without trying to affect a given metal tolerance level to exposure to that same exact metal..

Towards field evaluation of PICT effects with the β -glucosidase toxicity test

In the present study, metal exposure levels were close to realistic exposure levels observed in common urban rivers. In particular, in each experiment, the low metal treatment was within the range of observed total metal concentrations in typical urban rivers (Bourgeault *et al.* 2010; Tusseau-Vuillemin *et al.* 2007) and the high metal treatment was chosen one order of magnitude higher. In most studies, metal exposure levels on periphyton grown in microcosms or other

aquaria systems usually tend to be higher. For instance, Ivorra et al. (2000; 2002) exposed biofilms to Zn concentrations of 1000 to 3000 µg/L and Cd concentrations of 64 to 100 µg/L, and Morin et al. (2008) exposed biofilms to Cd concentrations of 10 and 100 µg/L. PICT effects are not always easily detected in indoor aquaria experiments at low metal concentrations and with realistic exposure lengths: Paulsson et al. (2000) exposed periphyton to Zn from 3 µg/L to 2 mg/L and observed an increase of tolerance at exposure concentrations higher than 600 µg/L. PICT sometimes even prove to be undetectable for periphyton, for instance after a 20 days exposure to Cu at concentrations varying from 1 to 15 µg/L (Gustavson and Wängberg 1995). Yet, in the present study, subtle metal-induced community changes at low and realistic exposure levels were successfully detected with a simple experimental setup. The toxicity test used to assess heterotrophic community tolerance combined with the ARISA technique is therefore appropriate to detect the biological response of biofilms exposed to environmental metal contamination levels.

Biofilm inoculum was collected in a small river in the Seine river basin (Rémarde river). It is obvious that laboratory-grown biofilms are different from the original periphyton collected *in situ*. In particular, laboratory biofilms are usually much less complex communities as observed by Serra *et al.* (2009), and confirmed in this study by comparison of Shannon diversity indexes from the Rémarde biofilms and the microcosms' biofilms. Therefore, more subtle or even different biological responses might be expected in field studies using the same PICT methodology on *in situ*-exposed periphyton (for instance tolerance acquisition of the heterotrophic communities might be observed at lower exposure levels than in the present study). The present study was indeed designed to validate the use of the β-glucosidase toxicity test to assess tolerance acquisition of periphyton exposed to environmental metal concentrations. These microcosm experiments showed that the PICT methodology developed allows to detect tolerance acquisition at realistic exposure levels, which means it can be further used in field studies.

Conclusion

The aim of this study was to find out whether the short-term toxicity test based on a measure of heterotrophic activity was sensitive enough to detect community tolerance acquisition on periphyton under realistic metal exposure. Tolerance acquisition was indeed measured for Cd, Ni and Zn with the β-glucosidase toxicity test under controlled conditions at low exposure levels. With Cd and Zn, maximum % inhibition levels inferior to 100% appeared jointly with the

increase of EC₅₀ values. With Ni, maximum % inhibition level, which was lower than 100% for the control, further decreased with metal exposure. These results indicate that both the increase of EC₅₀ values and the decrease of the maximum inhibition levels can be used to assess the biological response of periphyton to metal exposure. Bacterial and eukaryotic ARISA profiles confirmed that periphyton communities were impacted by metal exposure. In particular, a decrease of bacterial diversity was observed on fingerprints corresponding to metal-exposed biofilms. Combining the β -glucosidase toxicity test with periphyton biomass descriptors and the ARISA fingerprinting technique will thus help to examine the complex biological response of natural biofilms exposed to subtle urban multi-contamination *in situ*.

Acknowledgements

This study was supported by ONEMA (Office National de l'Eau et des Milieux Aquatiques). We are grateful to Aurélie Germain for her valuable help in the laboratory and to Julien Guieu for editing the English version of the manuscript.

References

- Admiraal W, Tubbing DMJ (1991) Extracellular enzyme activity associated with suspended matter in the River Rhine. *Freshwater Biology* 26:507-517.
- Blanck H (2002) A Critical Review of Procedures and Approaches Used for Assessing Pollution-Induced Community Tolerance (PICT) in Biotic Communities. *Human and Ecological Risk Assessment* 8:1003-1034.
- Blanck H, Admiraal W, Cleven RFMJ, Guasch H, Hoop MAGTvd, Ivorra N, Nyström B, Paulsson M, Petterson RP, Sabater S and others (2003) Variability in Zinc Tolerance, Measured as Incorporation of Radio-Labeled Carbon Dioxide and Thymidine, in Periphyton Communities Sampled from 15 European River Stretches. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology* 44(1):17-29.
- Blanck H, Dahl B (1996) Pollution-induced community tolerance (PICT) in marine periphyton in a gradient of tri-n-butyltin (TBT) contamination. *Aquatic Toxicology* 35(1):59-77.
- Blanck H, Eriksson KM, Grönvall F, Dahl B, Guijarro KM, Birgersson G, Kylin H (2009) A retrospective analysis of contamination and periphyton PICT patterns for the antifoulant irgarol 1051, around a small marina on the Swedish west coast. *Marine Pollution Bulletin* 58(2):230-237.
- Blanck H, Wängberg S-A, Molander S (1988) Pollution-Induced Community Tolerance - a new ecotoxicological tool. In: Cairns JJ, Pratt JR (eds) *Functional Testing of Aquatic Biota for Estimating Hazards of Chemicals*. American Society for Testing and Materials, Philadelphia, PA, USA, pp 219-30
- Bourgeault A, Gourlay-Francé C, Vincent-Hubert F, Palais F, Geffard A, Biagianti-Risbourg S, Pain-Devin S, Tusseau-Vuillemin MH (2010) Lessons from a transplantation of zebra mussels into a small urban river: An integrated ecotoxicological assessment. *Environmental Toxicology* 25(5):468-478.
- Burns A, Ryder DS (2001) Potential for biofilms as biological indicators in Australian riverine systems. *Ecological Management & Restoration* 2(1):53-64.
- Cardinale M, Brusetti L, Quatrini P, Borin S, Puglia AM, Rizzi A, Zanardini E, Sorlini C, Corselli C, Daffonchio D (2004) Comparison of Different Primer Sets for Use in Automated Ribosomal Intergenic Spacer Analysis of Complex Bacterial Communities. *Appl. Environ. Microbiol.* 70(10):6147-6156.
- Chrost RJ (1991) *Microbial Enzymes in Aquatic Environments*. Springer-Verlag, editor
- Clements WH, Rohr JR (2009) Community responses to contaminants: using basic ecological principles to predict ecotoxicological effects *Environmental Toxicology and Chemistry* 28(9):1789-1800.
- Dorigo U, Bérard A, Bouchez A, Rimet F, Montuelle B (2010) Transplantation of Microbenthic Algal Assemblages to Assess Structural and Functional Recovery After Diuron Exposure. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*.
- Fechner LC, Gourlay-Francé C, Uher E, Tusseau-Vuillemin MH (2010a) Adapting an enzymatic toxicity test to allow comparative evaluation of natural freshwater biofilms' tolerance to metals. *Ecotoxicology* 19(7):1302-1311.
- Fechner LC, Vincent-Hubert F, Gaubert P, Bouchez T, Gourlay-Francé C, Tusseau-Vuillemin MH (2010b) Combined eukaryotic and bacterial community fingerprinting of natural freshwater biofilms using Automated Ribosomal Intergenic Spacer Analysis. doi: 10.1111/j.1574-6941.2010.00968.x.
- Gustavson K, Petersen S, Pedersen B, Stuer-Lauridsen F, Wängberg S-A (1999) Pollution-Induced Community Tolerance (PICT) in coastal phytoplankton communities exposure to copper. *Hydrobiologia* 416:125-138.
- Gustavson K, Wängberg S-A (1995) Tolerance induction and succession in microalgae communities exposed to copper and atrazine. *Aquatic Toxicology* 32(4):283-302.

- Hill AV (1910) The possible effects of the aggregation of the molecules of haemoglobin on its dissociation curves. *Journal of Physiology* 40:iv-vii.
- Ivorra N, Bremer S, Guasch H, Kraak MHS, Admiraal W (2000) Differences in the sensitivity of benthic microalgae to Zn and Cd regarding biofilm development and exposure history. *Environmental Toxicology and Chemistry* 19(5):1332-1339.
- Ivorra N, Hettelaar J, Kraak MHS, Sabater S, Admiraal W (2002) Responses of biofilms to combined nutrient and metal exposure. *Environmental Toxicology and Chemistry* 21(3):626-632.
- Legendre P, Legendre L (1998) *Numerical Ecology*. Elsevier Science B.V., Amsterdam, The Netherlands
- Meylan S, Behra R, Sigg L (2004) Influence of Metal Speciation in Natural Freshwater on Bioaccumulation of Copper and Zinc in Periphyton: A Microcosm Study. *Environ. Sci. Technol.* 38(11):3104-3111.
- Michelland RJ, Dejean S, Combes S, Fortun-Lamothe L, Cauquil L (2009) StatFingerprints: a friendly graphical interface program for processing and analysis of microbial fingerprint profiles. *Molecular Ecology Resources* 9(5):1359-1363.
- Morin S, Duong T, Herlory O, Feurtet-Mazel A, Coste M (2008) Cadmium Toxicity and Bioaccumulation in Freshwater Biofilms. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology* 54(2):173-186.
- Paulsson M, Nystrom B, Blanck H (2000) Long-term toxicity of zinc to bacteria and algae in periphyton communities from the river Gota Alv, based on a microcosm study. *Aquatic Toxicology* 47(3-4):243-257.
- Ranjard L, Poly F, Lata JC, Mougél C, Thioulouse J, Nazaret S (2001) Characterization of Bacterial and Fungal Soil Communities by Automated Ribosomal Intergenic Spacer Analysis Fingerprints: Biological and Methodological Variability. *Appl. Environ. Microbiol.* 67(10):4479-4487.
- Sabater S, Guasch H, Ricart M, Romaní A, Vidal G, Klünder C, Schmitt-Jansen M (2007) Monitoring the effect of chemicals on biological communities. The biofilm as an interface. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 387(4):1425-1434.
- Serra A, Corcoll N, Guasch H (2009) Copper accumulation and toxicity in fluvial periphyton: The influence of exposure history. *Chemosphere* 74(5):633-641.
- Serra A, Guasch H, Admiraal W, Van Der Geest HG, Van Beusekom SAM (2010) Influence of phosphorus on copper sensitivity of fluvial periphyton: The role of chemical, physiological and community-related factors. *Ecotoxicology* 19(4):770-780.
- Soldo D, Behra R (2000) Long-term effects of copper on the structure of freshwater periphyton communities and their tolerance to copper, zinc, nickel and silver. *Aquatic Toxicology* 47(3-4):181-189.
- Thévenot DR, Moilleron R, Lestel L, Gromaire M-C, Rocher V, Cambier P, Bonté P, Colin J-L, de Pontevès C, Meybeck M (2007) Critical budget of metal sources and pathways in the Seine River basin (1994-2003) for Cd, Cr, Cu, Hg, Ni, Pb and Zn. *Science of The Total Environment* 375(1-3):180-203.
- Tusseau-Vuillemin M-H, Gourlay C, Lorgeoux C, Mouchel J-M, Buzier R, Gilbin R, Seidel J-L, Elbaz-Poulichet F (2007) Dissolved and bioavailable contaminants in the Seine river basin. *Science of The Total Environment* 375(1-3):244-256.

Figure 1. Dose/effect curves from the toxicity tests performed with the measure of β -glucosidase activity on control, low metal and high metal treatment biofilms for the Cd, Ni (a), and Zn experiments (b: both Zn and Cd were tested in the Zn experiment).

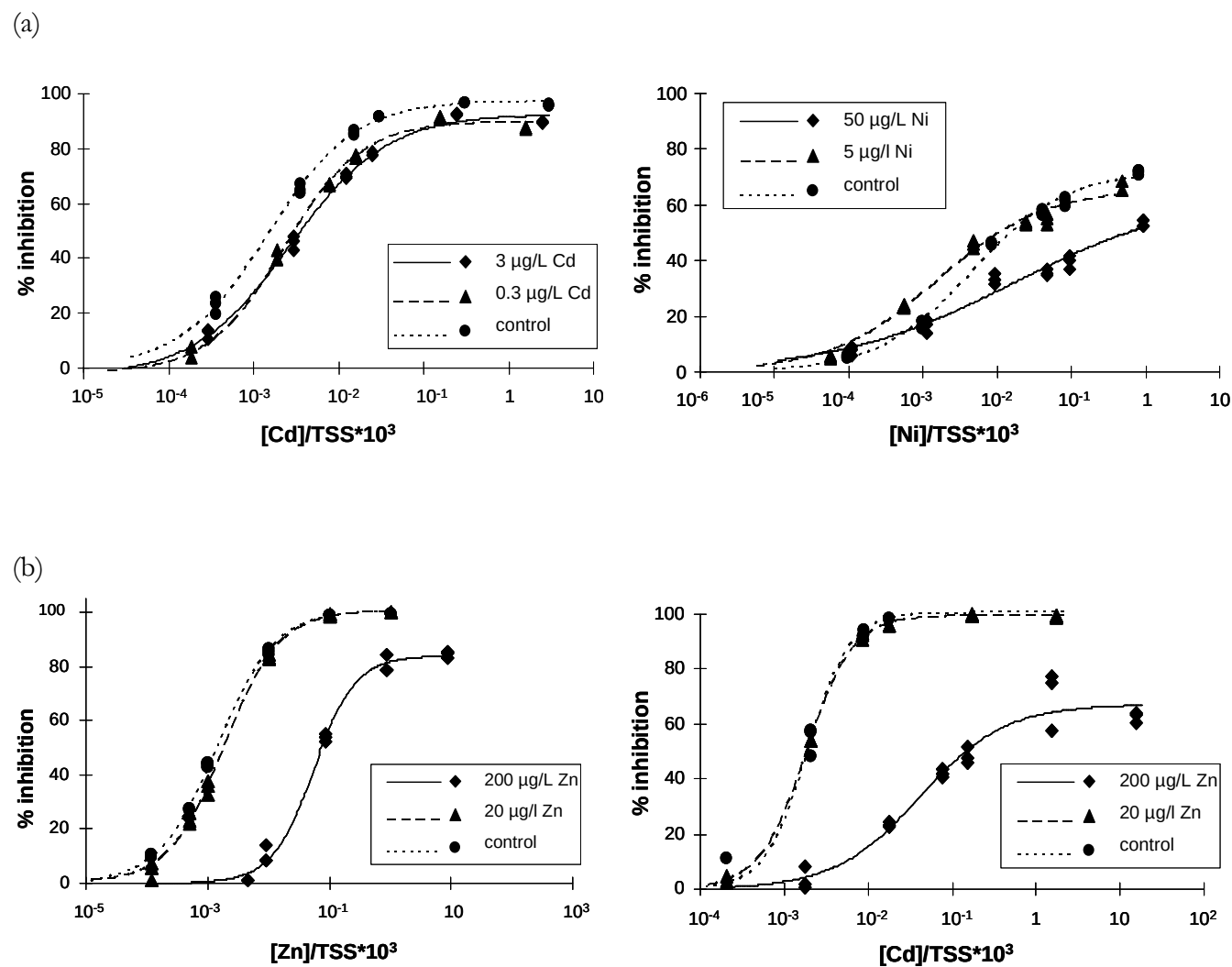
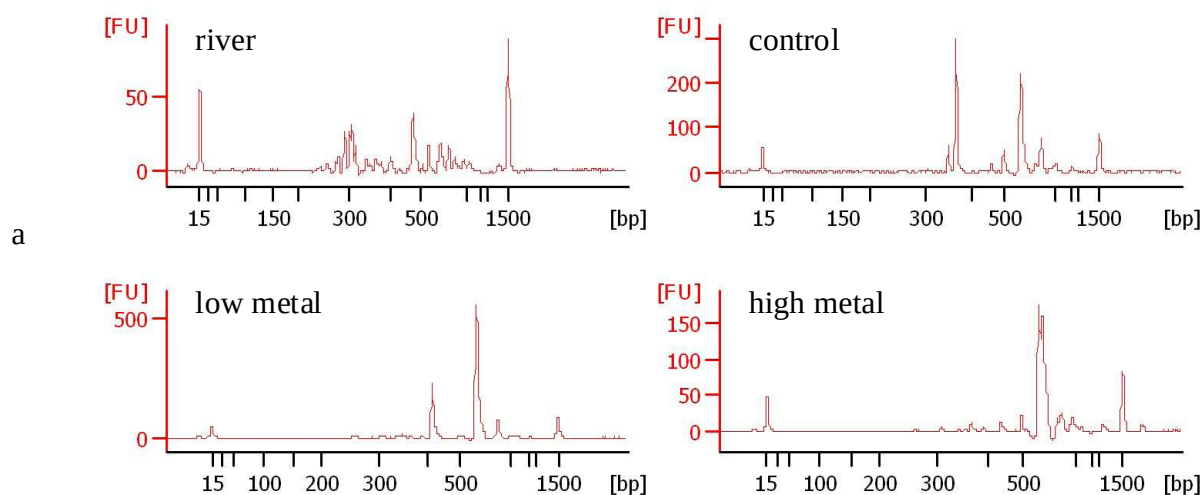
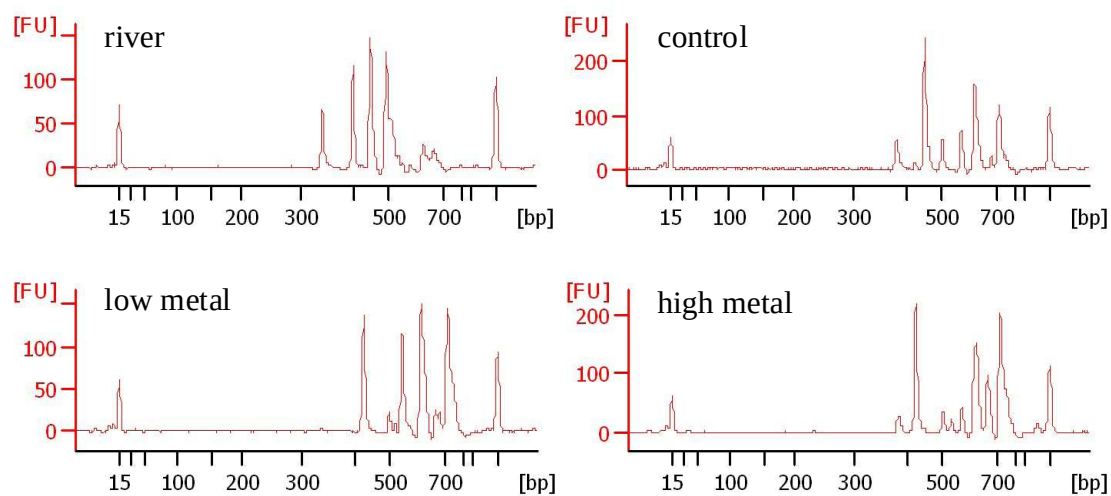


Figure 2. Bacterial and eukaryotic ARISA fingerprints of biofilms (control, low metal treatment, and corresponding Rémarde river biofilms) for a) the Cd, b) the Ni and c) the Zn experiment. In each electrophoregram (ARISA profile), the first and last fluorescence peaks correspond to a fluorescent ladder (15 and 1500 bp) co-migrated with the sample.

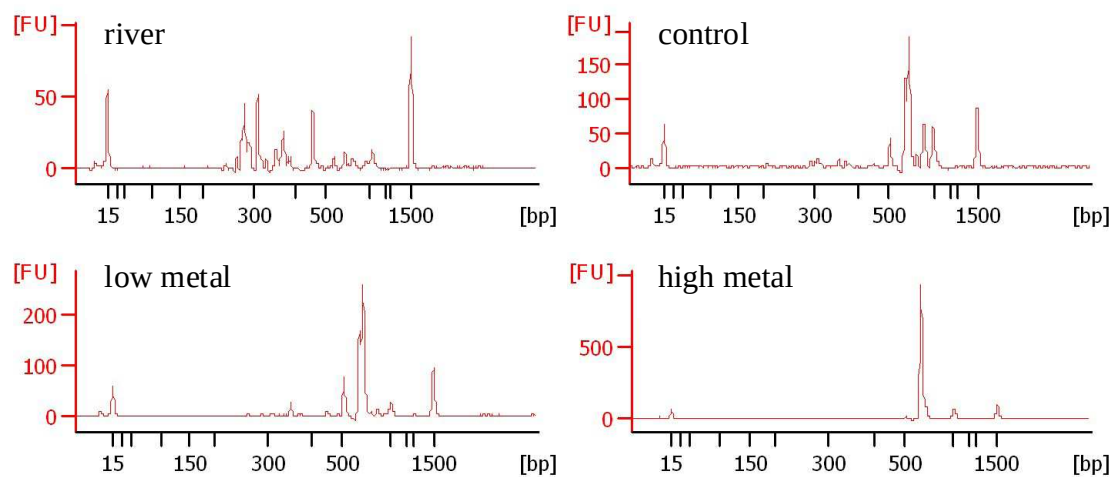


Bacterial ARISA: Cd experiment

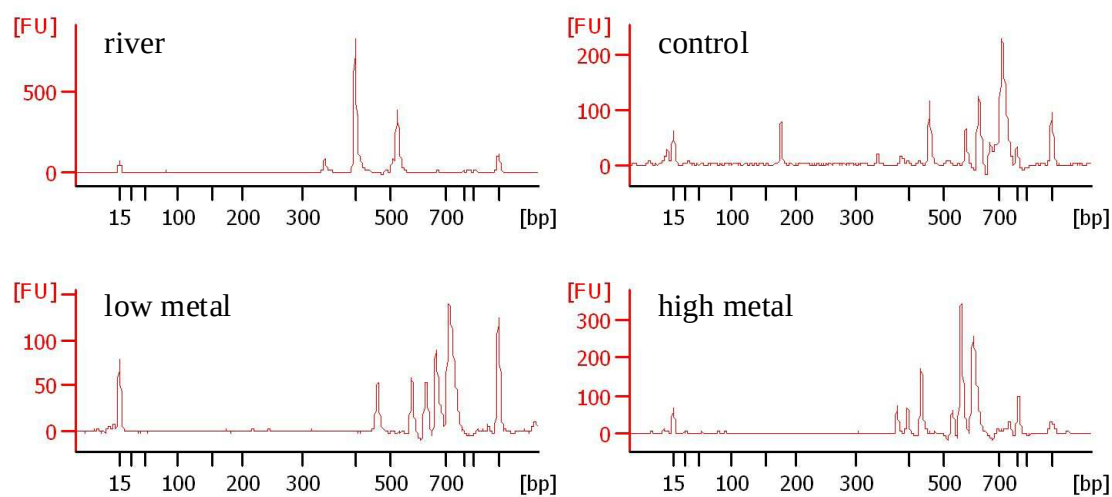


Eukaryotic ARISA: Cd experiment

b

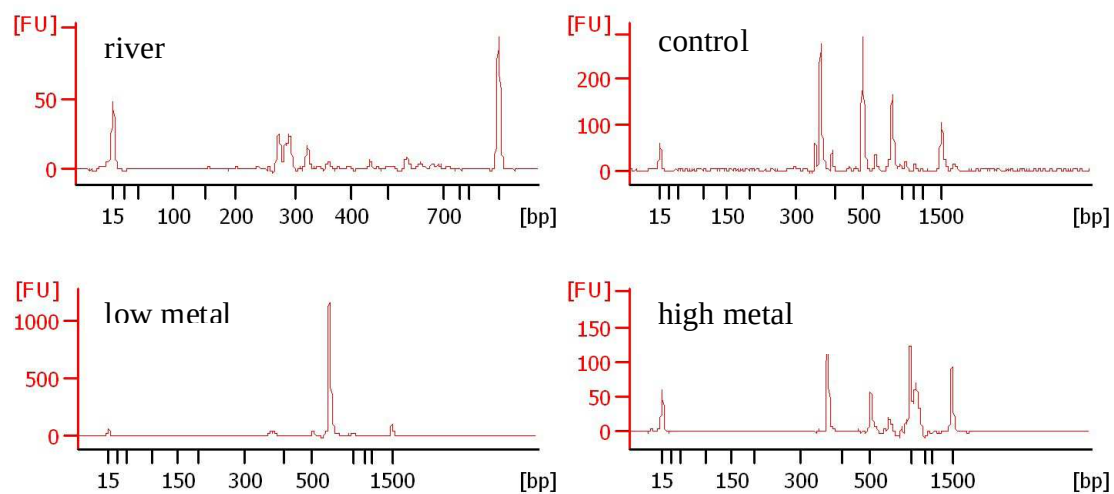


Bacterial ARISA: Ni experiment



Eukaryotic ARISA: Ni experiment

c



Bacterial ARISA: Zn experiment

Table 1. Impact of Cd, Ni and Zn on biofilm parameters (Dry Weight, chlorophyll *a* concentration - Ch *a* - and β -glucosidase activity). Metal-induced variations of each biofilm parameter are expressed as percentages of the value corresponding to the control biofilm for that parameter. A * indicates a significant decrease from the value corresponding to the control biofilm. Statistical differences between the three biofilms (control, low and high metal treatments) from each experiment were assessed using a non-parametric test (Kruskal-Wallis followed by the Dunn test for pairwise comparisons of means) as few replicates were measured (n= 2 for DW values and n = 3 for β -glucosidase activity. No statistical analysis of the Ch *a* concentrations was performed as n = 1 for that parameter).

experiment	metal treatment	DW	Ch <i>a</i>	β -glucosidase activity
Cd	low	88,5	113	86.3
	high	60.9 *	46	32.1 *
Ni	low	96,0	176	63.0 *
	high	73.1	111	89.5
Zn	low	106,7	118	35,7
	high	10.2 *	13	0.7 *

Table 2. Normalized EC_{50} values and maximum inhibition levels of the β -glucosidase activity calculated from the dose/effect curves, with their 95% confidence intervals.

Experiment	Metal treatment	normalized EC_{50} in $mg_{\text{metal}}/g_{\text{TSS}}$ (95% confidence interval)	% maximum inhibition level (95% confidence interval)
Cd experiment	Control	1.17 (0.85-1.49)	97 (96.2-97.9)
	Low metal	1.93 (1.56-2.30)	90.2 (88.2-92.2)
	High metal	2.21 (1.64-2.78)	92.3 (91.3-94.7)
Ni experiment	Control	4.75 (3.35-6.15)	68 (65.2-71.2)
	Low metal	1.45 (0.74-2.15)	62.2 (59.0-66.8)
	High metal	19.21 (6.4-128.07)	63.2 (53.8-84.7)
Zn experiment	Zn Control	1.32 (1.15-1.49)	100.2 (99.2-101.1)
	Zn Low metal	1.69 (1.20-2.18)	100.6 (99.4-102.2)
	Zn High metal	46.26 (36.96-55.56)	84.8 (83.5-86.6)
	Cd Control	1.56 (1.32-1.80)	100.4 (99.3-101.8)
	Cd Low metal	1.50 (1.36-1.64)	99.1 (98.7-99.5)
	Cd High metal	37.60 (16.24-58.97)	67.4 (62.3-74.3)

Table 3. Shannon-Weaver indexes computed from the ARISA profiles of control, low and high metal treatment biofilms from the Cd, Ni and Zn experiments.

biofilm	Cd experiment		Ni experiment		Zn experiment	
	bacteria	eukaryotes	bacteria	eukaryotes	bacteria	eukaryotes
Rémarde	3.4	2.6	3.8	1.0	3.2	2.0
control	2.0	1.7	2.4	1.6	2.5	1.6
low metal	1.0	1.7	1.5	1.2	1.0	1.5
high metal	1.5	1.8	0.8	2.0	2.5	1.7

Table 4. % of similarity between ARISA profiles of biofilms from the same microcosm experiment as determined by the Jaccard index. In bold letters, the highest % of similarity is shown in each experiment for either bacterial or eukaryotic communities.

% of similarity	Cd experiment		Ni experiment		Zn experiment	
	bacteria	eukaryotes	bacteria	eukaryotes	bacteria	eukaryotes
control/low	28,6%	7,7%	42,9%	57,1%	37,5%	42,9%
control/high	42,9%	25,0%	0,0%	0,0%	25,0%	22,2%
low/high	40,0%	25,0%	16,7%	0,0%	28,6%	30,0%

Supporting information

Table S1. Concentrations of dissolved metal concentrations in the river Rémarde. Water samples were collected each time biofilms were sampled or LDPE membranes immersed in the river to collect biofilm inoculum for the microcosm experiments (4 sampling dates).

Metals in the Rémarde river	Cd	Cr	Co	Cu	Mn	Ni	Pb	Zn
Dissolved metals (µg/L)	0,007	< LD	0,316	0,842	41,422	1,587	0,057	3,668
	0,010	< LD	0,302	0,548	36,240	1,455	0,080	5,718
	0,006	0,112	0,299	0,778	2,060	0,084	0,052	8,319
	0,002	0,176	0,418	1,701	70,100	2,244	0,092	4,027

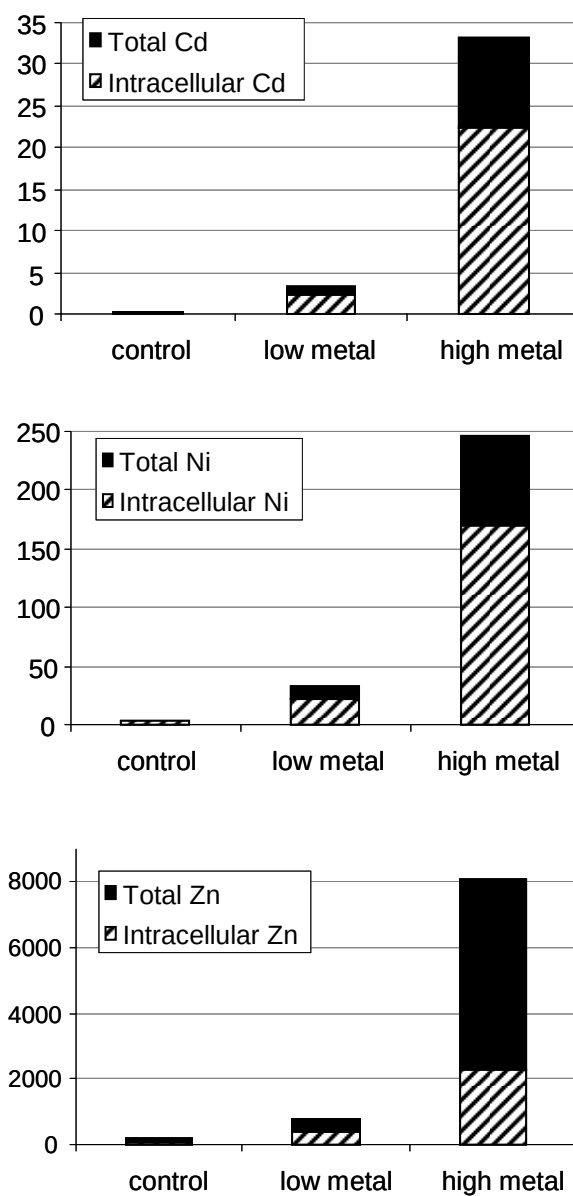
Table S2. Selected chemical parameters of water samples collected *in situ* at the biofilm sampling site (Rémarde) at the beginning of each experiment, and in Valvert mineral water. Values of ion concentrations are expressed in mg/L. (nd =not determined)

Sample	date/day	Ca ²⁺	Mg ²⁺	Na ⁺	(SO ₄) ²⁻	Cl ⁻	NO ₃ ⁻	SiO ₂	(PO ₄) ³⁻
Valvert	August 08	72,6	2,2	3,0	15,7	4,3	0	nd	nd
Rémarde	1 st Oct. 08	86,7	7,3	22,1	36,8	35,8	17,2	35,76	nd
	12 th Nov. 08	86,0	6,1	18,8	42,2	31,8	12,1	22,3	nd
	10 th Feb. 09	62,7	6,5	15,4	30,5	28,2	23,5	nd	nd

Table S3. Mean metal concentrations (and standard errors) measured daily in aliquots of microcosms' water before and after spiking to readjust metal exposure level.

microcosm	Cd experiment		Ni experiment		Zn experiment	
	before spiking	After spiking	before spiking	after spiking	before spiking	after spiking
low metal	0.14 ($\pm$ 0.16)	0.37 ($\pm$ 0.22)	3.26 ($\pm$ 1.07)	4.68 ($\pm$ 0.59)	9.44 ($\pm$ 5.11)	15.12 ($\pm$ 4.28)
high metal	1.11 ($\pm$ 0.5)	2.07 ($\pm$ 0.61)	43.07 ($\pm$ 8.29)	49.62 ($\pm$ 3.73)	171.0 ($\pm$ 26.56)	192. 25 ($\pm$ 20.53)

Figure SI1. Concentrations of Cd, Ni and Zn as total or intracellular metal accumulated within periphyton from the three microcosm experiments. Proportions of intracellular metal concentrations are shown with hatched bars. Concentrations are expressed in μg metal/g of biofilm dry weight.



Chapitre 5.

Applications in situ

Application de la méthodologie PICT dans un gradient de pollution urbaine multi-métallique

Concentrations métalliques sur les sites de Marnay, Bougival et Triel

Métal (µg/L)		Marnay	Bougival	Triel
Cu	total	1.025 (± 0.065)	3.411 (±1.161)	2.248 (± 0.473)
	dissous	0.634 (± 0.108)	1.512 (± 0.333)	1.473 (± 0.101)
	labile	0.088 (± 0.014)	0.242 (± 0.053)	0.290 (± 0.025)
Cd	total	0.026 (0.001)	0.063 (± 0.025)	0.042 (± 0.007)
	dissous	0 (± 0)	0.008 (± 0.007)	0.015 (± 0.003)
	labile	0.001 (± 0)	0.004 (± 0.002)	0.0042 (± 0)
Ni	total	1.591 (± 0.205)	2.114 (± 0.362)	2.462 (± 0.304)
	dissous	1.295 (± 0.596)	1.772 (± 0.490)	2.291 (± 0.106)
	labile	0.155 (± 0.025)	0.326 (± 0.107)	0.624 (± 0.049)
Pb	total	0.452 (± 0.104)	1.730 (± 0.648)	0.944 (± 0.167)
	dissous	0.024 (± 0.041)	0.242 (± 0.012)	0.228 (± 0.088)
	labile	0.009 (± 0.002)	0.050 (± 0.020)	0.015 (± 0.003)
Zn	total	6.350 (± 1.871)	13.833 (± 6.019)	10.944 (± 1.124)
	dissous	2.319 (0.435)	6.510 (± 3.114)	8.018 (± 1.368)
	labile	0.353 (± 0.165)	2.023 (± 0.557)	2.880 (± 0.234)
Cr	total	0.495 (± 0.115)	1.605 (± 1.321)	0.705 (± 0.097)
	dissous	0 (± 0)	0.085 (0.147)	0.141 (± 0.122)
	labile	0.013 (± 0.002)	0.020 (± 0.005)	0.021 (± 0.005)
Co	total	0.194 (± 0.001)	0.337 (± 0.073)	0.428 (± 0.072)
	dissous	0.111 (± 0.042)	0.208 (± 0.035)	0.328 (± 0.047)
	labile	0.008 (± 0.003)	0.021 (± 0.005)	0.033 (± 0.003)
Mn	total	6.668 (± 0.482)	24.076 (± 2.252)	28.977 (± 5.010)
	dissous	2.429 (± 0.597)	13.864 (± 3.341)	21.793 (± 5.214)
	labile	0.599 (± 0.128)	4.330 (± 0.933)	5.751 (± 0.564)
Ag	total	0.015 (± 0.067)	0.072 (± 0.051)	0.070 (± 0.067)
	dissous	0.001 (± 0.001)	0.008 (± 0.011)	0.018 (± 0.023)
Sb	total	0.193 (± 0.164)	0.220 (± 0.014)	0.264 (± 0.085)
	dissous	0.303 (± 0.300)	0.310 (± 0.007)	0.345 (± 0.014)

Tableau 33 : Moyennes (et écarts-types) des concentrations en métaux totaux, dissous et labiles (µg/L) sur les trois sites de Marnay, Bougival et Triel pendant la période correspondant à l'expérience.

Niveaux de tolérance et maxima d'inhibition des biofilms de Marnay, Bougival et Triel

Métal	Réponse	Marnay	Bougival	Triel
Cu	EC ₅₀ /MES	0.54 (± 0.12)	2.16 (± 0.27)	3.65 (± 2.49)
	% max	96.32 (95.79-96.89)	95.84 (94.35-97.63)	73.96 (67.76-80.40)
Cd	EC ₅₀ /MES	0.47 (± 0.04)	2.13 (± 0.33)	1.84 (± 0.22)
	% max	100.62 (99.72-101.48)	93.54 (91.75-95.79)	98.42 (97.59-99.25)
Ni	EC ₅₀ /MES	3.17 (± 0.46)	14.63 (± 5.45)	16.69 (± 179.97)
	% max	79.10 (77.18-81.11)	54.94 (49.98-59.98)	44.58 (38.48-68.25)
Pb	EC ₅₀ /MES	27.12 (± 4.33)	80.36 (± 5.17)	170.85 (± 42.60)
	% max	92.79 (91.02-94.48)	92.15 (91.75-92.45)	89.93 (88.37-91.71)
Zn	EC ₅₀ /MES	1.12 (± 0.21)	2.10 (± 0.54)	4.11 (± 0.55)
	% max	95.95 (94.55-97.37)	87.56 (82.87-90.93)	95.15 (91.92-98.56)

Tableau 34 : EC₅₀ normalisées et maxima d'inhibition de l'activité β -glucosidase obtenus avec le test de toxicité β -glucosidase sur les biofilms prélevés à j 28 (Cu), 35 (Cd, et Zn) et 42 (Ni et Pb).

En utilisant des valeurs moyennées sur la période correspondant à l'expérience pour chaque site, on peut inclure les concentrations en phosphates et en silice, mesurées une seule fois (en juillet 2009).

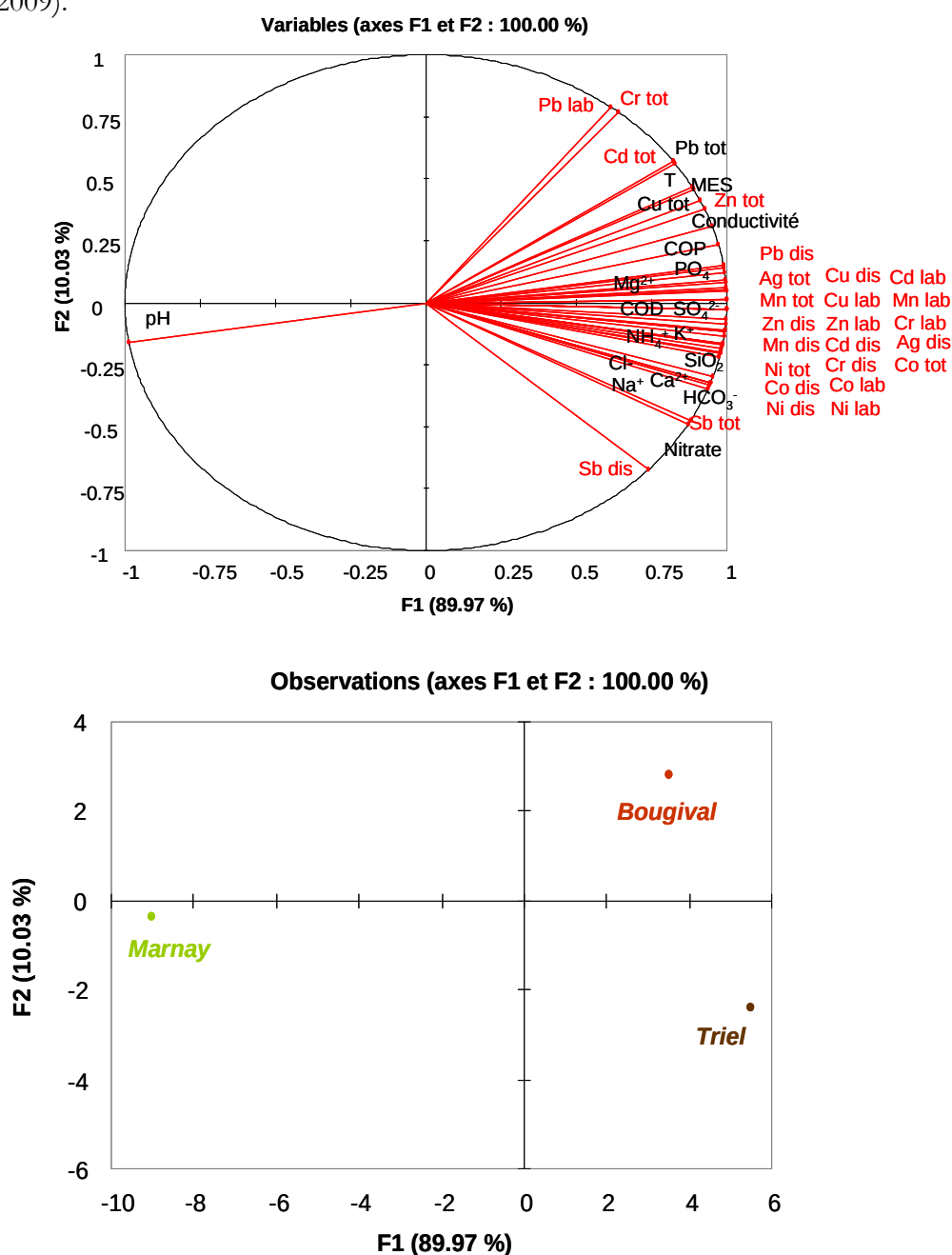


Figure 82 : Cercle des corrélations sur les deux premières composantes principales et représentation des différents sites (Marnay = M, Bougival = B et Triel = T) dans le plan formé par les deux premières composantes principales obtenus par ACP des paramètres environnementaux (concentrations métalliques et paramètres physico-chimiques moyennées sur les trois prélèvements de mai à juillet 2009). Les données ont été log-transformées puis normalisées avant ACP.

Régression PLS entre les paramètres environnementaux sur les trois sites (moyennes des trois prélèvements, en X) et les caractéristiques des biofilms (en Y) : niveaux de tolérance exprimés en EC_{50} normalisées, et descripteurs des communautés (DW, AFDW, concentration en chlorophylle *a* et ratio C/N).

La régression (sur données log-transformées puis normalisées) génère un modèle à une seule composante et de qualité satisfaisante (Tableau 35). La valeur relativement basse³⁴ du Q^2 cumulé (total) est due au faible nombre de données – 3 sites – utilisés pour construire le modèle.

	EC_{50} Cu	EC_{50} Cd	EC_{50} Ni	EC_{50} Pb	EC_{50} Zn	DW	AFDW	Ch <i>a</i>	C/N	Total
Q^2	0.97	0.88	0.97	0.87	0.75	-0.27	-0.54	-0.79	0.49	0.37
R^2Y	0.99	0.94	0.99	0.93	0.86	0.29	0.15	0.00	0.71	0.65

Tableau 35 : Tableau des différents paramètres du modèle linéaire obtenu par régression PLS des données environnementales et paramètres des biofilms de Marnay, Bougival et Triel.

On remarque que le modèle décrit bien les niveaux de tolérance aux métaux des trois biofilms et moins bien les autres paramètres des biofilms. Les données environnementales sont aussi bien décrites : $R^2X = 0.9$.

Les coefficients VIP associées aux variables environnementales révèlent que les paramètres les moins importants dans le modèle sont certains paramètres physico-chimiques de l'eau (conductivité, température) ainsi que les concentrations en métaux totaux (Cu, Zn, Pb, Cd, Cr) ainsi que le Pb labile et le Sb dissous (Figure 83).

³⁴ En général, on considère qu'une réponse y_k est bien modélisée par h composantes si $Q^2_{kh} \geq 0.5$ (Tenenhaus, 1998). Dans ce modèle les tolérances sont bien modélisées, les autres paramètres biologiques beaucoup moins, d'où un Q^2 total pas grès élevé.

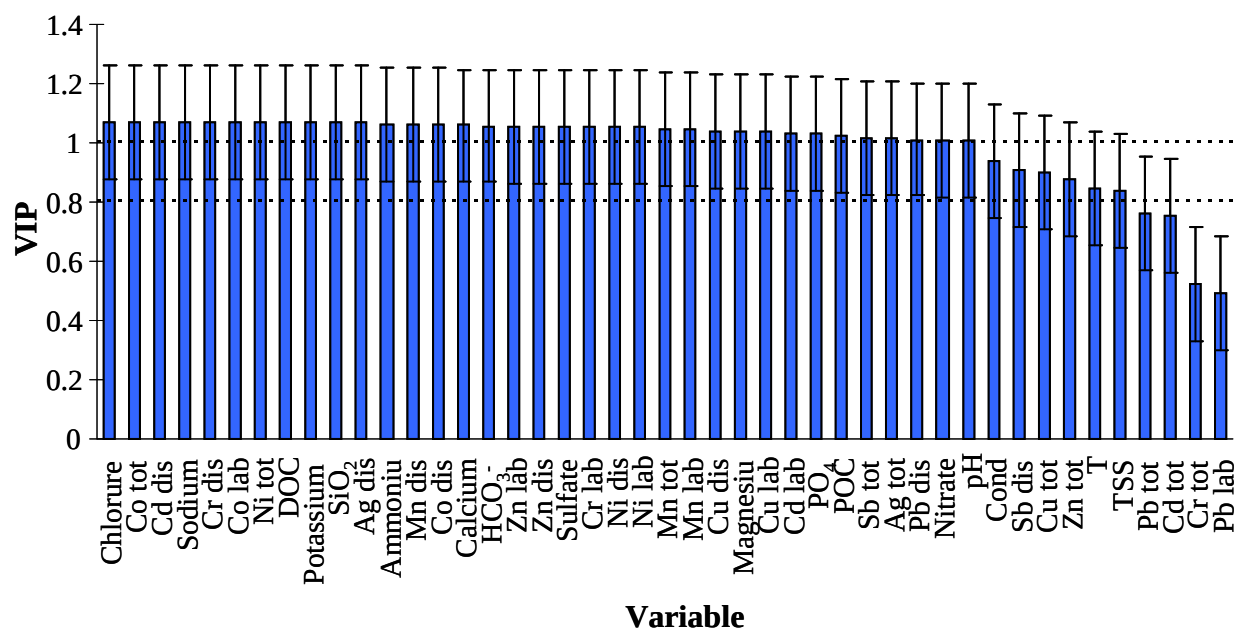


Figure 83 : Coefficients VIP(et intervalles de confiance à 95%) associés aux différentes variables environnementales utilisées pour la régression PLS.

On retrouve ainsi, avec la régression PLS, les résultats obtenus avec la RDA : les paramètres environnementaux sont très corrélés et il n'est pas possible de distinguer l'influence des concentrations métalliques de celle des variables physico-chimiques de l'eau pour expliquer les niveaux de tolérance des biofilms des trois sites. Cependant, les niveaux de tolérance sont bien corrélées au gradient de contamination métallique, et parmi les concentrations en métaux, les concentrations en métaux dissous et labiles sont celles qui ont une influence prépondérante pour le Cu, Cd et Zn.

Régression PLS entre d'une part les paramètres environnementaux sur les trois sites (moyennes des trois prélèvements) et les descripteurs des communautés (DW, AFDW, concentration en chlorophylle *a* et ratio C/N) en X et d'autre part les niveaux de tolérance aux métaux (en Y).

La régression (sur données log-transformées puis normalisées) génère un modèle à une seule composante et de très bonne qualité avec des valeurs cumulées de Q^2 , R^2X et R^2Y respectivement égales à 0.894, 0.848 et 0.944.

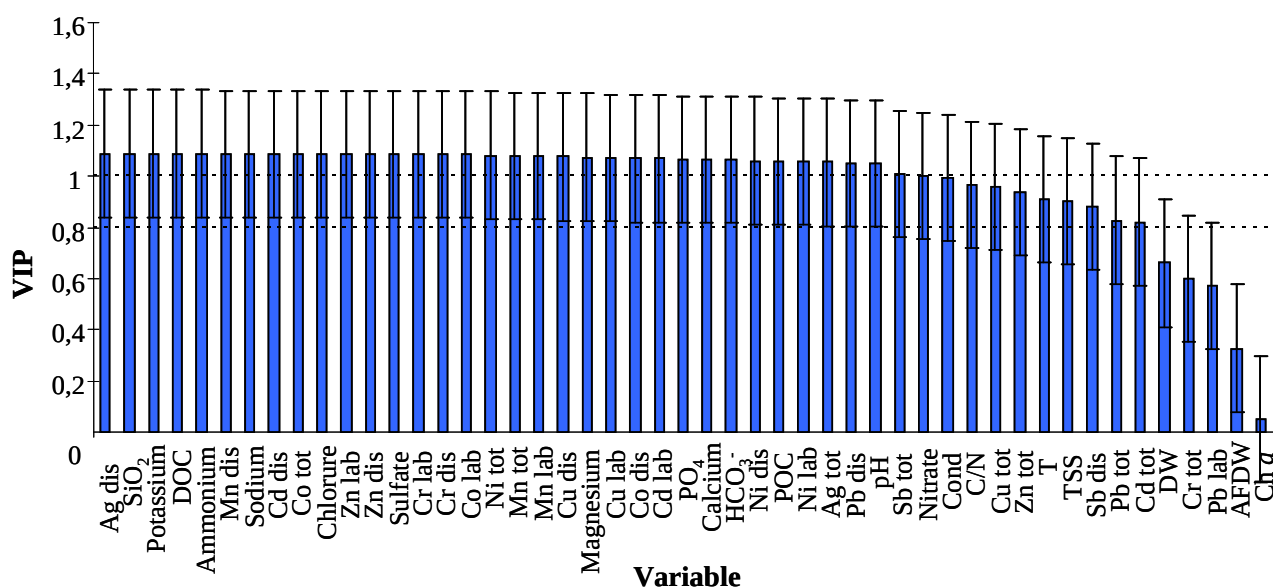


Figure 84 : Coefficients VIP(et intervalles de confiance à 95%) associés aux différentes variables environnementales utilisées pour la régression PLS.

Les VIP des variables (Figure 84) permettent de les classer par ordre décroissant d'importance dans le modèle de régression ; on retrouve comme dans le cas précédent, les concentrations en métaux totaux : cuivre, zinc, plomb, cadmium et chrome, ainsi que le plomb labile et l'antimoine dissous dans les variables d'importance faible ($VIP < 1$) ainsi que la conductivité, la température et la concentration en MES de l'eau. Par ailleurs, les paramètres descripteurs des biofilms apparaissent aussi dans les variables de VIP les plus faibles, ce qui confirme l'absence de corrélation observée par RDA entre ces paramètres descripteurs et les niveaux de tolérance mesurés.

Article en préparation pour *Environmental Science & Technology*

***In situ* evidence of PICT effects at Environmental Quality Standards
exposure concentrations**

Lise C. Fechner^{12*}, Catherine Gourlay-Francé¹², Adeline Bourgeault¹², Marie-Hélène Tusseau-Vuillemin³

¹Cemagref- Unité de Recherche Hydrosystèmes et Bioprocédés
Parc de Tourvoie, BP 44 , F 92163 Antony Cedex, France

²FIRE
FR-3020, 4 place Jussieu 75005, Paris, France

³IFREMER
Technopolis 40,155 rue Jean-Jacques Rousseau, 92138 Issy-Les-Moulineaux, France

ABSTRACT

The study was designed as a first attempt to study the impact of a multi-metallic urban gradient on metal tolerance of fluvial biofilms using β -glucosidase activity as an endpoint in short-term toxicity tests. Biofilms were collected on three sites located along an urban contamination gradient in the same river and their tolerance levels to Cu, Cd, Zn, Ni and Pb were evaluated. Metal contamination increased upstream to downstream the river and the effects of urbanization were obvious on physico-chemical parameters like POC, DOC or nutrient concentrations. Yet contamination levels in the water remained low when compared to Environmental Quality Standards from the European Water Framework Directive. However, metal tolerance of periphyton increased along the multi-metallic contamination gradient. Multivariate analysis revealed that tolerance was positively correlated to the metal concentrations in the river and suggested a close relationship between tolerance and dissolved and labile metal concentrations in the river. It also revealed that the multi-metallic gradient was also correlated to the physico-chemical gradient. Therefore metal tolerance levels of periphyton have to be interpreted in relation to the whole urban gradient and not solely metal exposure. Those results support the fact the biofilm tolerance is a sensitive biological response to low, environmental multi-metallic exposures.

KEYWORDS: metal tolerance, freshwater biofilm, beta-glucosidase, multi-metallic exposure

Introduction

Over the past decades, human activities in urban areas have contributed to the increase of chemical contamination of aquatic ecosystems (1). Urban pollution, in rivers which have not been submitted to mining activities, can best be described as a mixture of contaminants at low, even sublethal levels in the water (2). Among urban contaminants, metals are an important group to take into account when trying to assess the impact of urban contaminations: indeed urban sewers, road and roof run-offs are major metal contamination sources (3).

It is difficult to evaluate the long-term biological consequences of diffuse urban metallic pollution as it does not engender easily-detectable biological responses *in situ* (4,5). Indeed, the distinction between changes induced by chemicals and those due to other causes is not always clear: for instance, endpoints used to evaluate toxicity are likely to vary due to environmental and/or biological variability (6-8). Assessment of the impacts of urban contaminants in the field therefore requires the use of efficient tools to link biological impairment to chemical contamination.

The PICT (Pollution-Induced Community Tolerance) approach was proposed as an efficient ecotoxicological tool to relate tolerance acquisition at the community level to exposure to a toxicant (7,9). It relies on the assumption that sensitive components of the exposed community (species, genotypes or phenotypes) will be replaced by more tolerant ones during exposure, thus leading to an increase of the global community tolerance. Tolerance development can be measured as a shift in the Effect Concentration (usually the EC_{50} value) that is obtained with a short-term toxicity test based on a physiological endpoint. In particular, the PICT approach was proposed as a tool to bring to light causative links between toxicants and their effects (tolerance levels), due to its ability to discriminate between selection pressures (10), although co-tolerance phenomena might confound interpretation of the results (9).

Biofilms (or periphyton) are complex, natural assemblages of micro-organisms that develop on submerged substrata. They typically consist of bacteria, micro-algae, protozoa and fungi embedded in a polymeric matrix. These micro-organisms have short-generation time and respond quickly to disturbances. They can thus be regarded as early-warning indicators for the detection of the effects of toxicants (8). Moreover, biofilms provide a community-level perspective on

biological responses, which is more ecologically relevant, to assess the impacts of contaminants, than data obtained from single-species tests (11-13). The PICT methodology has been used on periphyton collected *in situ* to link tolerance levels to river contamination for instance with herbicides (14), with photosynthetic activity as endpoint in toxicity tests, or with Zn, with both photosynthetic activity and bacterial activity, measured as thymidine incorporation, as endpoints (15).

In urban fluvial ecosystems, heterotrophic communities are likely to play an important ecological role. It is therefore most interesting to study the effects of urban metals on the heterotrophic component of biofilms in terms of tolerance acquisition as in the study by Fechner *et al.* (16) in which biofilms were exposed to urban metals at realistic exposure levels in indoor aquaria.

The objective of our study is to detect pollution-induced effects on fluvial biofilms collected in a typical urban river, under chronic, multi-metallic exposure at low, environmental concentrations. A recently-developed short-term toxicity test (16,17) was used to detect differences in Cu, Cd, Ni, Pb and Zn tolerance levels of the heterotrophic component of fluvial biofilms collected *in situ*.

Materials and Methods

Study sites

Biofilms were collected on three sites located along the Seine river (North of France). Site 1 is located approximately 200 km upstream from Paris (Strahler: 6, median annual flow 50 m³/s) and sites 2 (Strahler: 7, mean annual flow 184 m³/s) and 3 (Strahler: 8, mean annual flow 340 m³/s) are both located downstream Paris. In particular, site 3 is located downstream the effluent of the discharge from the sewer treatment plant Seine-Aval (nominal capacity 8 10⁶ inhabitants, flow 24 m³/s). Site 1 was chosen in a non-urbanized area which was not affected by the urban area of Paris, whereas sites 2 and 3 were chosen as representative of two types of major impact of the urban area of Paris: the diffuse anthropogenic pressure of the area (both sites 2 and 3) and the Seine Aval sewer treatment plant (site 3 only). Total, dissolved and labile metal concentrations, as well as 15 physico-chemical parameters of the river at the three sites were monitored monthly over one year (18). Each labile metal concentration corresponds to three diffusive gradients in thin films (DGT) (19) immersed in the river during one month (20). Only the data collected over

the period corresponding to this study (three samplings from May to July 2009) were used here. P-PO₄ and SiO₂ concentrations were measured once (July 2009) with the Ascorbic Acid Method and the Silicomolybdate Method respectively.

Collection of periphytic communities

Biofilms were collected on Low Density PolyEthylene (LDPE) plastic membranes that were vertically attached to plastic crates as in Fechner et al. (17). At day 0 of the study, LDPE membranes were immersed in the water. Colonized membranes were collected after 28, 35 and 42 days of colonization and put in 250 mL glass-bottles which were carried back to the laboratory in a cooler within the day. They were then hand-scraped to remove periphyton and make biofilm suspensions in Montdore mineral water (Grand Barbier, Mont-Dore, France) (17). Aliquots of the suspensions were then assigned to various analyses for periphyton characterization or tolerance measurements.

Biofilm characterization

At each sampling date, biofilms' dry weight (DW), ash-free dry weight (AFDW), and chlorophyll *a* (Ch *a*) concentrations were measured as in Fechner et al. (21). C/N ratios were calculated from the particulate organic carbon and nitrogen (POC and PON) concentrations in the biofilm suspensions. POC and PON were determined from biofilm pellets (centrifugation: 2000g, 15 minutes), after acidic digestion (HCl, 10%), with a carbon analyzer (VarioELIII, Elementar, Germany). Concentrations of total and intracellular metals were measured on the biofilms collected on day 35 as in Fechner et al. (16) and analyzed with an Inductively-Coupled Plasma-Mass Spectrophotometer (ICP-MS, ThermoFisher Scientific). The accuracy and the precision of the measuring device were regularly controlled with certified reference natural water samples (NIST 1640).

To obtain bacterial and eukaryotic ARISA fingerprints of the communities, aliquots (50 mL) of biofilm suspensions were centrifuged for 15 minutes at 10 000 g, and 4°C. Supernatants were discarded and pellets were frozen and stored at -80°C for further use.

Automated Ribosomal Intergenic Spacer Analysis (ARISA) fingerprinting of biofilms

Both eukaryotic and bacterial ARISA were performed on biofilms from the three sites at each sampling date as in Fechner et al. (21). Briefly, DNA was extracted from biofilm pellets using the Power Soil DNA Isolation Kit (Mobio Laboratories, Inc., Carlsbad, US). Amplification of

bacterial 16S-23S ITS was performed by PCR using primers ITSF/ITSReub (22) and amplification of eukaryotic ITS1-5.8S-ITS2 regions was performed using primers 2234C/3126T (set euk) (23) and ARAlg18S/ITS4 (21) (set diat). Amplicons were separated on an electrophoresis Bioanalyzer (2100 Electrophoresis Bioanalyzer, Agilent Technologies, Santa Clara, CA) and fluorescence data was converted into electrophoregrams using 2100 Expert software (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, US). Electrophoregrams in ASCII formats were also imported into the StatFingerprints program and processed as in Fechner et al. (21). To visualize similarities in community structure in 2D, non-metric multidimensional scaling (MDS) (24) was performed using the Euclidian distances between ARISA profiles.

Tolerance measurements

Metal tolerance of the heterotrophic communities was measured using the normalized EC_{50} values obtained with the toxicity test (16,17). Briefly, biofilms were exposed for one hour to acute levels of metals (at least six concentrations of metal varying between 0.001 and 10 mM were tested in triplicates for each toxicity test). β -glucosidase activity of the metal-exposed biofilms was measured using Methylumbelliferyl- β -D-lucopyranoside (Sigma-Aldrich): fluorescence of methylumbelliferone (MUF) was measured on a LB 941 Tristar Ti fluorescence microplate reader (Berthold Technologies, Bad Wildbad, Germany) (excitation/emission filters: 355 and 460 nm). Fluorescence measurements were converted into MUF concentrations by calibrating the spectrofluorimeter with a range of MUF solutions. 50% effect concentrations (EC_{50}) and maximum inhibition levels were determined as in Fechner et al. (17) from the dose/effect curves which were obtained by plotting β -glucosidase activity (expressed as a MUF concentration) as a function of metal concentration and fitted to the Hill model (25) by non-linear regression. The general form of the curve fitted on the data is:

$$F(x) = (p_{\max} - p_0) \frac{x^H}{x^H + EC_{50}^H} + p_0$$

where x is the metal concentration, p_0 is the effect observed without toxicant, $p_{\max}$ is the predicted effect when the toxicant concentration is infinite and $F(x)$ is a probability law. H is the Hill number (slope of the toxicity curve) and EC_{50} the median effect concentration. Each parameter (p_0 , $p_{\max}$, EC_{50} and H) was adjusted for the calculation. Confidence intervals around the fitted parameters were estimated using a Bootstrap method. The dose/effect curves can also be represented as an augmentation of the percentage of inhibition of the MUF fluorescence signal of the control with the metal concentration.

Community tolerance was assessed by calculation of a normalized EC_{50} value to obtain reliable and comparable community tolerance levels (17). Cu tolerance levels were measured on the three biofilms collected on day 28, Cd and Zn tolerance levels on the three biofilms collected on day 35, and Ni and Pb tolerance levels on the three biofilms collected on day 42 (Figure 1).

Statistical analyses

The correlations between metal tolerance levels of the three biofilms to one metal and the corresponding metal concentration (either total, dissolved or labile) in the river were investigated by linear univariate regression analysis.

The influence of the environmental parameters (physico-chemical parameters and metal concentrations in the river) on biofilm tolerance levels and biofilm parameters were investigated using multivariate analysis.

Major correlations between environmental parameters (both physico-chemical parameters and metal concentrations) were first explored using Principal component analysis (PCA).

The effect of metal contamination on river biofilms' tolerance levels and parameters was further examined with a Redundancy Analysis (RDA) (26). The response matrix (Y variables) contained the normalized EC_{50} values and mean biofilm parameters and the explanatory matrix (X matrix) contained the mean total, dissolved and labile metal concentrations.

Before PCA and RDA analysis, all the data was log-transformed and normalized. The significance of the RDA analysis was tested with a Monte Carlo permutation test ($n = 1000$ permutations, $p < 0.0001$). All statistical analyses were performed using XLStat 2010 (Addinsoft, France).

Results

Environmental data upstream to downstream the river

Mean physico-chemical parameters of the river water at the three sites (Table SI1) during biofilm colonization *in situ* correspond to annual mean values reported elsewhere for those three sites (20). Except for calcium which remains stable and pH which tends to decrease upstream to downstream, all the parameters tend to increase from site 1 to both downstream sites. It is not always possible to distinguish both downstream sites according to the values of the physico-chemical parameters. The impact of urbanization is particularly clear for sites 2 and 3 with higher TSS, DOC, POC and nutrient concentrations (nitrate and phosphate).

Metal concentrations (Figure SI1) were always higher on the downstream sites by a factor ranging from 1.3 (total Ni) to 10.2 (total Pb). Mean total Cu, Cd, Pb, Zn and Cr as well as dissolved and labile Pb concentrations were higher at site 2 when compared to site 3, other mean metal concentrations were higher at site 3, even though the differences between both downstream sites were not statistically significant considering the standard deviations. Therefore a clear metallic gradient (between site 1 on the one hand and sites 2 and 3 on the other hand) was revealed upstream to downstream the Seine river.

PCA analysis revealed that all environmental parameters (metal concentrations and physico-chemical parameters) were positively correlated except for pH (Figure SI3). Indeed the majority of environmental parameters were tightly correlated to the first principal component, which accounted for 90% of the total variance. Sites 1, 2 and 3 are spread along the first axis on the PCA score plot, which represents the upstream/downstream contamination gradient.

Biofilm parameters

No gradient upstream to downstream the river was observed for DW, AFDW, Ch *a* and C/N ratios (Table 1). For instance, the biofilm from site 3 had the lowest DW and C/N ratio but the biofilm from site 2 had the highest Ch *a* and AFDW which makes inter-site comparisons of biofilms difficult based on these results.

Levels of metals accumulated within the biofilms reflect the increase of the multi-metallic exposure upstream to downstream the river as they are always smaller for the site 1 biofilm, except in the case of Ni and Cr (see details in Figure SI2). As observed in other studies (27,28), biofilm-accumulated metal concentrations are generally positively correlated with metal concentrations in the river water. Yet complex mechanisms of accumulation of metal to periphytic communities exposed *in situ* are still brought to light. For instance, biofilm-accumulated Ni concentrations do not correspond to the gradient of Ni exposure measured in the field. Moreover levels of Pb accumulated in the downstream biofilms (sites 2 and 3) tends to be higher than Cu, whereas Pb concentrations (either total, dissolved or labile metal) are smaller than Cu concentrations in the river at sites 2 and 3. Pb speciation in the presence of natural organic matter is indeed a complex phenomenon (29,30). These results suggest that biofilm-accumulated metal concentrations might not always reflect metal contamination *in situ*.

ARISA fingerprints of biofilm samples

MDS analysis of ARISA fingerprints are shown in Figure 2. Both eukaryotic and bacterial communities (Figure 2a and 2b) reflect differences upstream to downstream the river as ARISA fingerprints from both downstream sites are close together in the 2D plots. No clear pattern can be observed on eukaryotic fingerprints obtained using set diat for DNA amplification (Figure 2c), which is probably due to the high specificity of this PCR primer set resulting in a low number of fluorescence peaks on each fingerprint as discussed in Fechner et al. (21).

Metal tolerance and maximum inhibition levels

The dose/effect curves obtained from the toxicity tests are shown in Figure 3 (numerical data is given in Table SI2). Normalized EC_{50} values increase upstream to downstream the river and remain similar for both downstream sites for Cu, Cd and Ni. Metal tolerance levels of the three biofilms generally correlate well with *in situ* metal concentrations in the water (Table 2), except in the case of total Zn and Pb.

Moreover maximum inhibition levels of β -glucosidase activity, which were already identified as a response to metal exposure in a microcosm study (16) tend to decrease upstream to downstream.

Canonical analysis of biological responses and metal concentrations

RDA analysis was performed using only the metal concentrations as explanatory variables for more clarity (Figure 4). The first component accounted for 68.20 % of the total variance (only 31.8 % for the second component). The first axis reflects mostly the labile and dissolved metal contamination whereas axis 2 reflects mostly the total metal concentrations (total Pb, Cr, Cd, Zn Cu) and the labile Pb concentration. Sites 1, 2 and 3 are thus displayed from the left to the right of the first axis, according to the metallic gradient, with site 2 on the upper part of the plot as the total metal and labile lead concentrations are higher at this site. The plot also shows that tolerance values are positively correlated and suggests a close relationship between them and the dissolved and labile metal concentrations for metals like Cd, Cu and Zn. DGT-labile metal concentrations have indeed been shown to provide good estimations of bioavailable and thus toxic metal concentrations to various aquatic organisms with Cu or Cd (28,31,32). The RDA thus suggests that labile and dissolved metal concentrations provide a better estimation of the metal fraction inducing community tolerance for Cd, Cu and Zn than total metal concentrations in a

context of *in situ* multi-metallic exposure. Moreover, tolerance levels are not correlated to biofilm gross parameters (DW, AFDW, Ch *a* and C/N ratio).

Discussion

Sensitivity of tolerance measurements to assess multi-metallic exposure

RDA analysis revealed a positive correlation between metal tolerance of natural biofilms and the metallic contamination. Moreover no relationship was revealed between *in situ* urban contamination and the other biofilm parameters (DW, algal biomass, AFDW and C/N ratio), even though ARISA fingerprints revealed that both bacterial and eukaryotic communities were modified along the contamination gradient. Tolerance thus appears as a particularly sensitive biological variable to metallic contamination and thus, a good indicator of multi-metallic exposure.

Moreover, proper identification of the exact selection pressure is difficult due to co-tolerance. For instance, Blanck et al. (9) hypothesized that high Zn tolerance levels registered for periphyton from sites with low Zn exposure levels were probably related to co-tolerance phenomena. Indeed co-tolerance to metals is a well-known phenomenon in algal and bacterial species and has been brought to light for indoor-exposed periphyton (6). Fechner et al. (16) also showed that Zn-exposed communities became tolerant to both Zn and Cd with the β -glucosidase toxicity test. Co-tolerance is therefore likely to occur for *in-situ* exposed communities collected in an urban contamination gradient. In the present study, Zn exposure levels were similar for both downstream sites and yet Zn tolerance values increased from site 2 to site 3. This suggests that the high Zn tolerance level measured at site 3 could be the result of both Zn exposure and co-tolerance to other metals.

Identifying the causes of tolerance acquisition in situ

Multivariate analysis also shows that there is a positive correlation between biofilm tolerance and the majority of physico-chemical parameters. This is not totally surprising as many parameters are inter-dependent: for instance, urbanization induces a rise in both metal and nutrient concentrations. Therefore, the increase of biofilm tolerance along the river is probably related to the whole urban gradient, and not solely to metallic exposure. Indeed the PICT approach was designed to provide direct evidence that a community is disturbed by a specific pollutant (7), but there is evidence that linking tolerance to a toxic agent to exposure to the same

toxic agent is a delicate task. Variations of environmental parameters like light (33,34), pH (35), or nutrient concentrations (36) may modify periphyton tolerance levels. Studies reporting *in situ* tolerance levels of natural periphyton illustrate the difficulty to interpret biofilm tolerance in relation to environmental parameters. For instance, Blanck et al. (9) found that Zn contamination was one of the key variables inducing Zn-community tolerance for various biofilm samples, but the influence of other variables, either characterizing the biofilms or the physico-chemical state of the water at the sampling sites also appeared as important factors explaining Zn tolerance. Similarly, Pesce et al. (14) used RDA analysis to identify diuron as one of the main factors accounting for biofilm tolerance to diuron on two sites during a one-year survey. Other parameters (for instance water conductivity and temperature) were also highly correlated to diuron tolerance. In the present study, metallic contamination is highly correlated to biofilm tolerance but it is likewise difficult to estimate the relative importance of co-varying environmental parameters. ARISA profiles tend in the same way to discriminate the downstream sites from the upstream sites but it is not possible to distinguish the impact of metal concentrations from the impact of other environmental parameters on bacterial and eukaryotic community structure. Tolerance acquisition due to metal exposure was nevertheless already observed using the same methodology in microcosm experiments (16). It is thus probable that for *in situ* experiments tolerance acquisition shall be used to identify the global impact of urban pressure on communities and not to identify the disturbance caused by a specific toxic agent, as suggested by Blanck et al. (7).

Tolerance acquisition at low exposure levels

The toxicity test based on β -glucosidase activity had already proved to be efficient to detect tolerance acquisition of biofilms at environmental exposure levels in a microcosm study (16). Yet tolerance acquisition could not always be detected for the lowest exposure levels: for instance, communities exposed to 20 $\mu\text{g/L}$ of Zn did not acquire any tolerance to Zn, whereas, for communities exposed to 200 $\mu\text{g/L}$, a drastic increase of Zn community tolerance was observed. Contamination levels at downstream sites 2 and 3 did not reach such high exposure levels (the annual average total Zn concentration at site 2 was 17 $\mu\text{g/L}$ (20)). Therefore, it is noteworthy that an increase in metal tolerance along the Seine river can be actually detected. The higher sensitivity of natural periphyton (as opposed to laboratory-grown biofilms) could arise from a greater complexity of natural communities (37), a fact which is confirmed by calculation of the Shannon-Weaver diversity indexes (Figure S4) from the ARISA fingerprints and comparison with the diversity indexes obtained on microcosms' communities (16). It is also probably related to the

presence of a mixture of micropollutants (both metallic and organic) in the river. Indeed mixture toxicity can be observed even when the mixture components are present at low, non-significant effect concentrations (38). Increase of metal (Zn and Cd) tolerance of natural periphytic communities from human-impacted sites had already been observed, but communities were collected in areas in which metal concentrations were substantially higher than in the present study, usually due to mining activity, even at the upstream sites (13,39). Moreover, although the Seine river has long been subjected to metal contamination (3,40), mean concentrations of total urban metals in the water remain low when compared to reported Environmental Quality Standards concentrations for dissolved metal concentrations from the European Water Framework Directive (0.25, 7.2 and 20 µg/L for Cd, Pb and Ni respectively). Those results thus show that exposure to a mixture of contaminants at low levels has a significant impact on periphytic communities and that tolerance measurements at the community level are sensitive indicators of an urban disturbance. They also support the potential role of biofilms as sensitive indicators of urban pollution in aquatic ecosystems. To provide a more reliable evaluation of the impact of urban contamination on periphyton, a broader study at the watershed-scale is the next logical step.

ACKNOWLEDGMENT

This study was supported by ONEMA (Office National de l'Eau et des Milieux Aquatiques) and is part of the SISTEO project from the Ile-de-France Regional Council.

We also want to thank Emmanuelle Uher for her great help with metal analysis and Sophie Ayrault for providing access to the ICP-MS platform at the LSCE.

We also thank Aurélie Germain and François Versace for their valuable help in the field and in the laboratory, and Julien Guieu for editing the English version of the manuscript.

Metal concentrations and concentrations of physico-chemical parameters in the river water at the three sites as well as metal concentrations accumulated in the biofilms, tolerance and maximum inhibition levels calculated with the β -glucosidase toxicity test and Shannon-Weaver indexes calculated from the ARISA profiles can be found as supporting information.

REFERENCES

- (1) Meybeck, M. Global analysis of river systems: From Earth system controls to Anthropocene syndromes. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences* 2003, 358 (1440), 1935-1955.
- (2) Tusseau-Vuillemin, M.-H.; Gourlay, C.; Lorgeoux, C.; Mouchel, J.-M.; Buzier, R.; Gilbin, R.; Seidel, J.-L.; Elbaz-Poulichet, F. Dissolved and bioavailable contaminants in the Seine river basin. *Science of The Total Environment* 2007, 375 (1-3), 244-256.
- (3) Thévenot, D. R.; Moilleron, R.; Lestel, L.; Gromaire, M.-C.; Rocher, V.; Cambier, P.; Bonté, P.; Colin, J.-L.; de Pontevès, C.; Meybeck, M. Critical budget of metal sources and pathways in the Seine River basin (1994-2003) for Cd, Cr, Cu, Hg, Ni, Pb and Zn. *Science of The Total Environment* 2007, 375 (1-3), 180-203.
- (4) Beasley, G.; Kneale, P. E. Assessment of heavy metal and PAH contamination of urban streambed sediments on macroinvertebrates. *Water, Air, and Soil Pollution: Focus* 2004, 4 (2-3), 563-578.
- (5) Bourgeault, A.; Gourlay-Francé, C.; Vincent-Hubert, F.; Palais, F.; Geffard, A.; Biagianti-Risbourg, S.; Pain-Devin, S.; Tusseau-Vuillemin, M. H. Lessons from a transplantation of zebra mussels into a small urban river: An integrated ecotoxicological assessment. *Environmental Toxicology* 2010, In press. DOI: 10.1002/tox.20591.
- (6) Soldo, D.; Behra, R. Long-term effects of copper on the structure of freshwater periphyton communities and their tolerance to copper, zinc, nickel and silver. *Aquatic Toxicology* 2000, 47 (3-4), 181-189.
- (7) Blanck, H.; Wängberg, S.-A.; Molander, S. Pollution-Induced Community Tolerance - a new ecotoxicological tool. In *Functional Testing of Aquatic Biota for Estimating Hazards of Chemicals*; Cairns, J. J., Pratt, J. R., Eds.; American Society for Testing and Materials: Philadelphia, PA, USA, 1988; pp 219-230.
- (8) Sabater, S.; Guasch, H.; Ricart, M.; Romani, A.; Vidal, G.; Klünder, C.; Schmitt-Jansen, M. Monitoring the effect of chemicals on biological communities. The biofilm as an interface. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 2007, 387 (4), 1425-1434.
- (9) Blanck, H. A Critical Review of Procedures and Approaches Used for Assessing Pollution-Induced Community Tolerance (PICT) in Biotic Communities. *Human and Ecological Risk Assessment* 2002, 8, 1003-1034.
- (10) Blanck, H.; Eriksson, K. M.; Grönvall, F.; Dahl, B.; Guijarro, K. M.; Birgersson, G.; Kylin, H. A retrospective analysis of contamination and periphyton PICT patterns for the antifoulant irgarol 1051, around a small marina on the Swedish west coast. *Marine Pollution Bulletin* 2009, 58 (2), 230-237.
- (11) Clements, W. H.; Rohr, J. R. Community responses to contaminants: using basic ecological principles to predict ecotoxicological effects *Environmental Toxicology and Chemistry* 2009, 28 (9), 1789-1800.
- (12) McClellan, K.; Altenburger, R.; Schmitt-Jansen, M. Pollution-induced community tolerance as a measure of species interaction in toxicity assessment. *Journal of Applied Ecology* 2008, 45 (5), 1514-1522.
- (13) Lehmann, V.; Tubbing, G. M. J.; Admiraal, W. Induced Metal Tolerance in Microbenthic Communities from Three Lowland Rivers with Different Metal Loads. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology* 1999, 36 (4), 384-391.
- (14) Pesce, S.; Margoum, C.; Montuelle, B. In situ relationships between spatio-temporal variations in diuron concentrations and phototrophic biofilm tolerance in a contaminated river. *Water Research* 2010, 44 (6), 1941-1949.
- (15) Blanck, H.; Admiraal, W.; Cleven, R. F. M. J.; Guasch, H.; Hoop, M. A. G. T. v. d.; Ivorra, N.; Nyström, B.; Paulsson, M.; Petterson, R. P.; Sabater, S.; Tubbing, G. M. J. Variability in Zinc Tolerance, Measured as Incorporation of Radio-Labeled Carbon

- Dioxide and Thymidine, in Periphyton Communities Sampled from 15 European River Stretches. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology* 2003, 44 (1), 17-29.
- (16) Fechner, L.; Gourlay-Francé, C.; Tusseau-Vuillemin, M. H. Low exposure levels of urban metals induce heterotrophic community tolerance: a microcosm validation. Submitted. 2010.
 - (17) Fechner, L. C.; Gourlay-Francé, C.; Uher, E.; Tusseau-Vuillemin, M. H. Adapting an enzymatic toxicity test to allow comparative evaluation of natural freshwater biofilms' tolerance to metals. *Ecotoxicology* 2010, 19 (7), 1302-1311.
 - (18) Priadi, C.; Bourgeault, A.; Ayrault, S.; Gourlay-Francé, C.; Tusseau-Vuillemin, M. H. How does urbanization affect metal solid-solution partitioning? Dissolved – DGT – particulate fraction. in prep. 2010.
 - (19) Zhang, H.; Davison, W. Performance Characteristics of Diffusion Gradients in Thin Films for the in Situ Measurement of Trace Metals in Aqueous Solution. *Analytical Chemistry* 1995, 67, 3391 -3400.
 - (20) Priadi, C.; Ayrault, S.; Pacini, S.; Bonte, P. Urbanization impact of the Greater Paris Region on metal mobility in suspended sediments in the Seine River, France: Role of iron oxides in prep. 2010.
 - (21) Fechner, L. C.; Vincent-Hubert, F.; Gaubert, P.; Bouchez, T.; Gourlay-Francé, C.; Tusseau-Vuillemin, M. H. Combined eukaryotic and bacterial community fingerprinting of natural freshwater biofilms using Automated Ribosomal Intergenic Spacer Analysis. doi: 10.1111/j.1574-6941.2010.00968.x. 2010.
 - (22) Cardinale, M.; Brusetti, L.; Quatrini, P.; Borin, S.; Puglia, A. M.; Rizzi, A.; Zanardini, E.; Sorlini, C.; Corselli, C.; Daffonchio, D. Comparison of Different Primer Sets for Use in Automated Ribosomal Intergenic Spacer Analysis of Complex Bacterial Communities. *Appl. Environ. Microbiol.* 2004, 70 (10), 6147-6156.
 - (23) Ranjard, L.; Poly, F.; Lata, J. C.; Mougel, C.; Thioulouse, J.; Nazaret, S. Characterization of Bacterial and Fungal Soil Communities by Automated Ribosomal Intergenic Spacer Analysis Fingerprints: Biological and Methodological Variability. *Appl. Environ. Microbiol.* 2001, 67 (10), 4479-4487.
 - (24) Clarke, K. R. Non-parametric multivariate analyses of changes in community structure. *Australian Journal of Ecology* 1993, 18 (1), 117-143.
 - (25) Hill, A. V. The possible effects of the aggregation of the molecules of haemoglobin on its dissociation curves. *Journal of Physiology* 1910, 40, iv-vii.
 - (26) Legendre, P.; Legendre, L. *Numerical Ecology*; Elsevier Science B.V.: Amsterdam, The Netherlands, 1998.
 - (27) Bradac, P.; Wagner, B.; Kistler, D.; Traber, J.; Behra, R.; Sigg, L. Cadmium speciation and accumulation in periphyton in a small stream with dynamic concentration variations. *Environmental Pollution* 2010, 158 (3), 641-648.
 - (28) Guasch, H.; Leira, M.; Montuelle, B.; Geislinger, A.; Roulier, J. L.; TornÃ©s, E.; Serra, A. Use of multivariate analyses to investigate the contribution of metal pollution to diatom species composition: Search for the most appropriate cases and explanatory variables. *Hydrobiologia* 2009, 627 (1), 143-158.
 - (29) Slaveykova, V. I.; Wilkinson, K. J.; Ceresa, A.; Pretsch, E. Role of Fulvic Acid on Lead Bioaccumulation by *Chlorella kesslerii*. *Environ. Sci. Technol.* 2003, 37 (6), 1114-1121.
 - (30) Sánchez-Marín, P.; Santos-Echeandía, J.; Nieto-Cid, M.; Álvarez-Salgado, X. A.; Beiras, R. Effect of dissolved organic matter (DOM) of contrasting origins on Cu and Pb speciation and toxicity to *Paracentrotus lividus* larvae. *Aquatic Toxicology* 2010, 96 (2), 90-102.
 - (31) Ferreira, D.; Tousset, N.; Ridame, C.; line; Tusseau-Vuillemin, M.-H.; ne. More than inorganic copper is bioavailable to aquatic mosses at environmental relevant concentrations. *Environmental Toxicology and Chemistry* 2008, 27 (10), 2108-2116.

- (32) Tusseau-Vuillemin, M. H.; Gilbin, R.; Bakkaus, E.; Garric, J. Performance of diffusion gradient in thin films to evaluate the toxic fraction of copper to *Daphnia magna*. *Environmental Toxicology and Chemistry* 2004, 23 (9), 2154-2161.
- (33) Guasch, H.; Ivorra, N.; Lehmann, V.; Paulsson, M.; Real, M.; Sabater, S. Community composition and sensitivity of periphyton to atrazine in flowing waters: the role of environmental factors. *Journal of Applied Phycology* 1998, 10 (2), 203-213.
- (34) Guasch, H.; Sabater, S. Light history influences the sensitivity to atrazine in periphytic algae. *Journal of Phycology* 1998, 34 (2), 233-241.
- (35) Guasch, H.; Paulsson, M.; Sabater, S. Effect of copper on algal communities from oligotrophic calcareous streams. *Journal of Phycology* 2002, 38 (2), 241-248.
- (36) Serra, A.; Guasch, H.; Admiraal, W.; Van Der Geest, H. G.; Van Beusekom, S. A. M. Influence of phosphorus on copper sensitivity of fluvial periphyton: The role of chemical, physiological and community-related factors. *Ecotoxicology* 2010, 19 (4), 770-780.
- (37) Serra, A.; Corcoll, N.; Guasch, H. Copper accumulation and toxicity in fluvial periphyton: The influence of exposure history. *Chemosphere* 2009, 74 (5), 633-641.
- (38) Arrhenius, Å.; Grånlund, F.; Scholze, M.; Backhaus, T.; Blanck, H. Predictability of the mixture toxicity of 12 similarly acting congeneric inhibitors of photosystem II in marine periphyton and epipsammon communities. *Aquatic Toxicology* 2004, 68 (4), 351-367.
- (39) Admiraal, W.; Blanck, H.; Buckert-de Jong, M.; Guasch, H.; Ivorra, N.; Lehmann, V.; Nystrom, B. A. H.; Paulsson, M.; Sabater, S. Short-term toxicity of zinc to microbenthic algae and bacteria in a metal polluted stream. *Water Research* 1999, 33 (9), 1989-1996.
- (40) Meybeck, M.; Lestel, L.; Bonté, P.; Moilleron, R.; Colin, J. L.; Rousselot, O.; Hervé, D.; de Pontevès, C.; Grosbois, C.; Thévenot, D. R. Historical perspective of heavy metals contamination (Cd, Cr, Cu, Hg, Pb, Zn) in the Seine River basin (France) following a DPSIR approach (1950-2005). *Science of The Total Environment* 2007, 375 (1-3), 204-231.
- (41) Michelland, R. J.; Dejean, S.; Combes, S.; Fortun-Lamothe, L.; Cauquil, L. StatFingerprints: a friendly graphical interface program for processing and analysis of microbial fingerprint profiles. *Molecular Ecology Resources* 2009, 9 (5), 1359-1363.

Figure 1. Experimental design of the field study on the Seine river. Biofilms were collected at the three sites on three different dates after 28, 35 and 42 day of in situ colonization. Cu-tolerance was evaluated on the biofilms collected on day 28, Cd and Zn tolerance on the biofilms collected on day 35 and Ni and Zn tolerance on the biofilms collected on day 42.

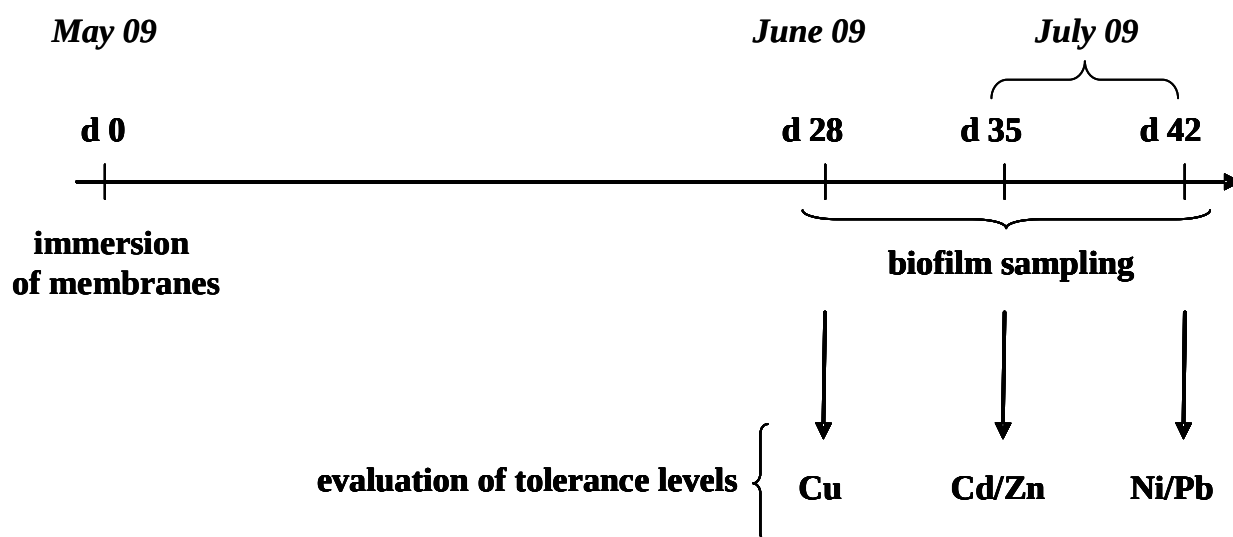


Figure 2. Non-metric multidimensional scaling plots derived from the Euclidian distances between ARISA fingerprints obtained using StatFingerprints (41). 2D stress is respectively 0.10, 0.10 and 0.07 for respectively a) bacterial ARISA; b) eukaryotic ARISA performed using set euk for PCR amplification and c) eukaryotic ARISA performed using set diat for PCR amplification. A stress value inferior to 0.1 corresponds to a good ordination (24). Samples collected on day 28 are referred to as "1", on day 35 as "2" and on day 42 as "3". Biofilms were collected in triplicates.

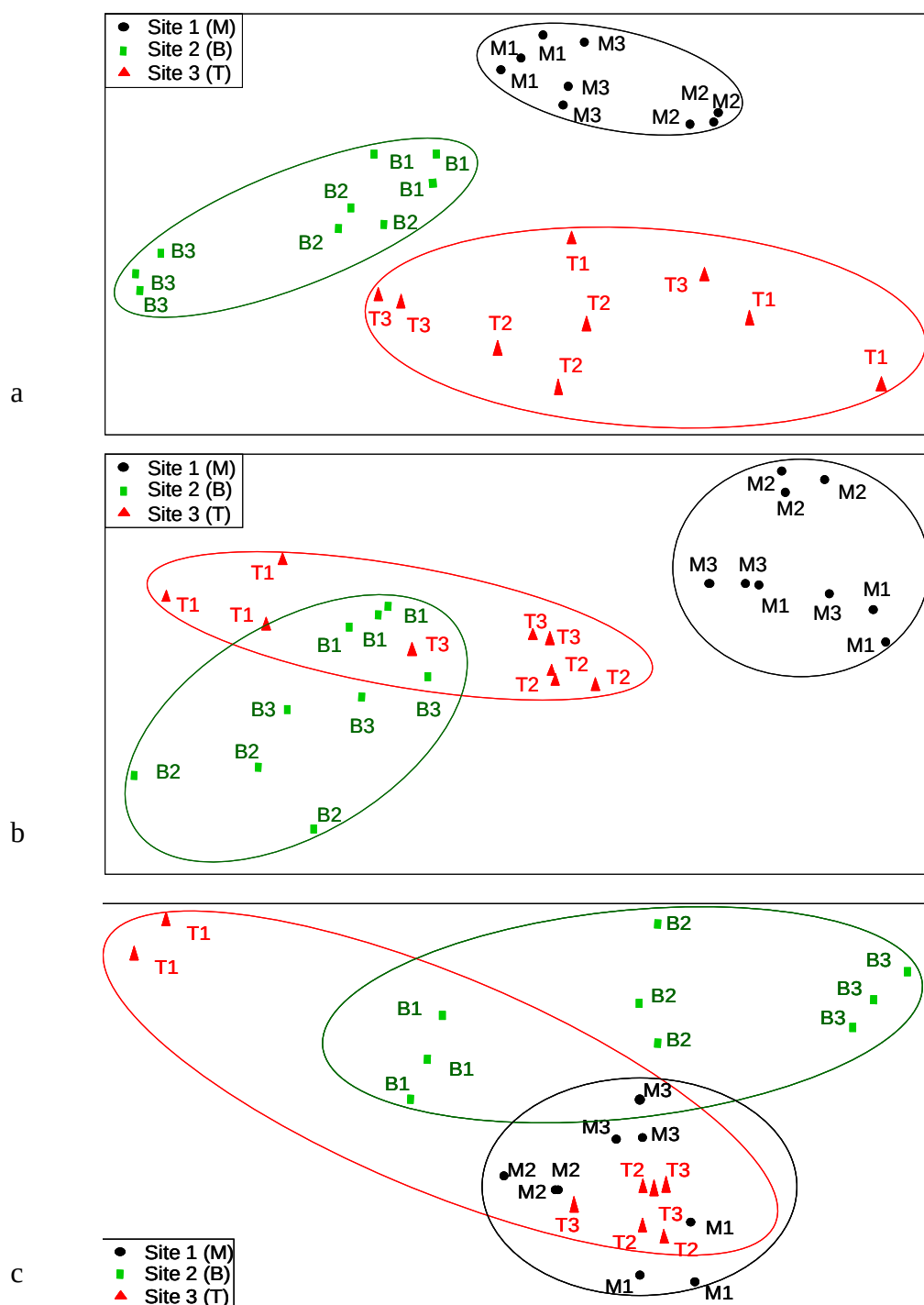
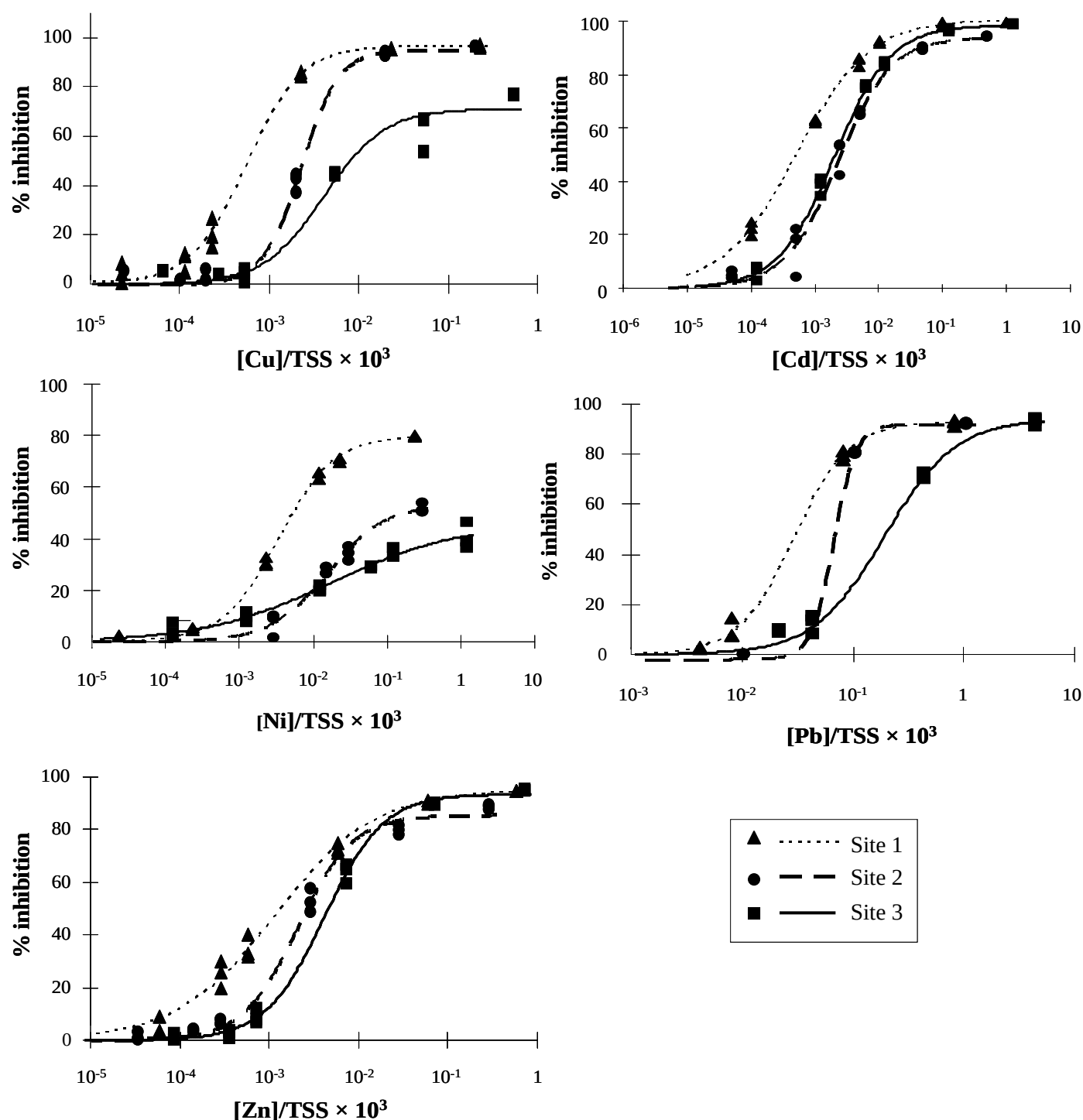


Figure 3. Dose/effect curves obtained with the β -glucosidase toxicity tests performed on the biofilms collected at the three sites with Cu, Cd, Ni, Pb and Zn. Dose/effect curves are represented as % inhibition of β -glucosidase activity as a function of TSS-normalized metal concentrations during the test as in Fechner et al. (17). % inhibition values are shown as $\blacktriangle$ for the biofilms collected at site 1 (dotted line), as $\bullet$ for the biofilm collected at site 2 (dashed line) and as $\blacksquare$ for the biofilm collected at site 3 (full line).



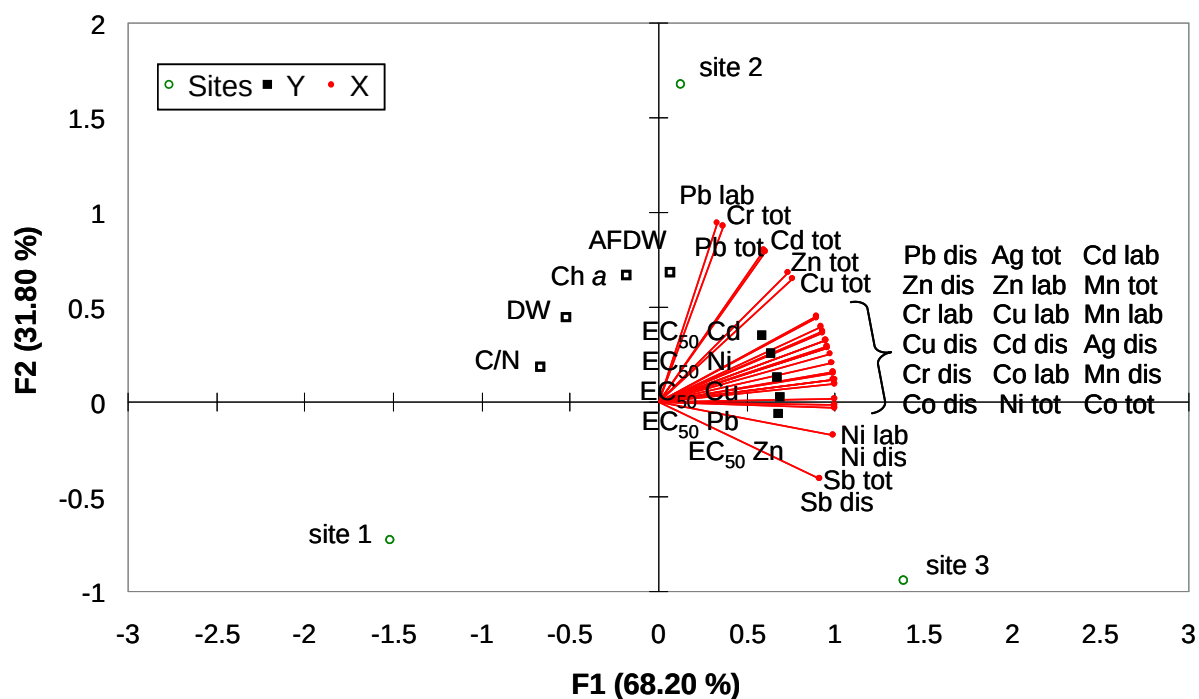


Table 1. Mean values and corresponding standard deviations (SD) of dry weights (DW), ash-free dry weights (AFDW), chlorophyll a (Ch a) concentrations and C/N ratios corresponding to the biofilms collected on the three sites (n=9 as each parameter was measured in triplicate at each sampling date). * indicate significant statistical differences between sampling sites (Kruskal Wallis and Dunn tests, $p < 0.05$).

biofilm parameters	sites	over the three sampling dates	
		mean	σ
DW (mg/cm ²)	1	3.60	1.03
	2	4.18	0.77
	3	1.23 *	0.31
AFDW (mg/cm ²)	1	0.61	0.16
	2	1.59 *	0.27
	3	0.63	0.18
Ch a (mg/m ²)	1	32.85	14.40
	2	79.80 *	27.25
	3	21.15	9.30
C/N ratio	1	6.93	0.25
	2	6.52	0.30
	3	5.76 *	0.18

Table 2. Pearson correlation coefficients between the biofilms' tolerance levels to one metal and the total, dissolved or DGT-labile concentrations of the same metal.

metal	metal fraction		
	total	dissolved	labile
Cu	0.58	0.89	0.98
Cd	0.91	0.77	0.97
Ni	0.96	0.92	0.86
Pb	0.24	0.75	-0.03
Zn	0.44	0.90	0.93

Mesure de l'acquisition/disparition de la tolérance de communautés transposées

Données utilisées pour caractériser les sites de l'expérience de transposition

	Cu			Cd			Ni			Pb		
	total	dissous	labile	total	dissous	labile	Total	dissous	labile	total	dissous	labile
janvier	3.410	0.963	0.134	0.056	0.001	0.001	3.684	1.750	0.273	2.134	0.045	0.038
septembre	4.985	0.892	0.186	0.040	0.010	0.002	1.881	1.105	0.220	1.386	0.103	0.081
moyenne	4.197	0.928	0.160	0.048	0.005	0.001	2.783	1.427	0.246	1.760	0.074	0.060

	Zn			Cr			Co			Mn		
	total	dissous	labile	total	dissous	labile	Total	dissous	labile	total	dissous	labile
janvier	29.436	3.367	1.437	2.982	0.100	0.038	0.850	0.250	0.021	42.192	5.682	7.140
septembre	8.363	3.005	2.045	0.894	0.032	0.097	0.274	0.137	0.023	20.464	6.957	4.272
moyenne	18.900	3.186	1.741	1.938	0.066	0.068	0.562	0.193	0.022	31.328	6.319	5.706

Tableau 37 : Concentrations en métaux totaux, dissous et labiles, mesurées sur le site de Saint-Maurice en janvier et en septembre 2009 (dans les deux cas, les concentrations correspondent à des moyennes sur trois prélèvements ponctuels sur trois semaines pour les métaux totaux et dissous, et à la moyenne de trois réplicats de DGT immergées dans la rivière pendant trois semaines pour les labiles. Une moyenne de ces deux valeurs a été utilisée pour les analyses multivariées des données de l'expérience de transposition.

	Cu			Cd			Ni			Pb		
	total	dissous	labile	total	dissous	labile	total	dissous	labile	total	dissous	labile
t15	2.766	1.449	0.334	0.054	0.014	0.004	2.235	1.793	0.564	1.936	0.165	0.018
t30	2.657	1.284	0.348	0.051	0.013	0.005	2.369	1.644	0.623	1.592	0.190	0.026

	Zn			Cr			Co			Mn		
	total	dissous	labile	total	dissous	labile	total	dissous	labile	total	dissous	labile
t15	13.525	4.533	2.416	0.919	0.513	0.026	0.376	0.279	0.029	28.070	22.061	4.710
t30	11.990	4.314	2.391	0.823	0.513	0.029	0.382	0.245	0.029	26.945	18.718	4.578

Tableau 36 : Concentrations en métaux totaux, dissous et labiles sur le site de Triel utilisées pour les analyses multivariées de l'expérience de transposition. Les concentrations utilisées à t15 (12/08/09) correspondent à un prélèvement ponctuel le 19/08/09 et les concentrations utilisées à t30 correspondent à une moyenne des prélèvements du 19/08/09 et 29/09/09 (campagne annuelle sur le site de Triel).

	Cu			Cd			Ni			Pb		
	total	dissous	labile	total	dissous	labile	total	dissous	labile	total	dissous	labile
t0	1.074	0.459	0.058	0.025	<LQ	0.000	1.363	0.609	0.095	0.556	<LQ	0.005
t15	0.781	0.415	0.104	0.023	<LQ	0.001	1.075	0.798	0.135	0.357	<LQ	0.006
t30	0.699	0.341	0.088	0.020	0.000	0.001	0.987	0.653	0.126	0.341	0.000	0.005

	Zn			Cr			Co			Mn		
	total	dissous	labile	total	dissous	labile	total	dissous	labile	total	dissous	labile
t0	8.438	1.819	0.365	0.614	<LQ	0.018	0.194	0.132	0.004	7.130	2.453	0.361
t15	3.777	1.235	0.274	0.296	<LQ	0.020	0.131	0.139	0.006	4.504	3.014	0.406
t30	3.311	1.235	0.195	0.295	0.000	0.018	0.124	0.101	0.005	4.232	2.417	0.343

Tableau 38 : Concentrations en métaux totaux, dissous et labiles sur le site de Marnay utilisées pour les analyses multivariées de l'expérience de transposition. Les concentrations utilisées à t0 (29/07/09) correspondent à un prélèvement ponctuel le 22/07/09, les concentrations utilisées à t15 correspondent à un prélèvement ponctuel le 19/08/09, et les concentrations utilisées à t30 correspondent à une moyenne des prélèvements du 19/08/09 et 29/09/09 (campagne annuelle sur le site de Marnay).

Site	date	HCO ₃ ⁻	Na ⁺	K ⁺	Mg ²⁺	Ca ²⁺	Cl ⁻	SO ₄ ²⁻	N-NH ₄	N-NO ₂	P-PO ₄	N-NO ₃	SiO ₂
Marnay	t0	201	6.3	1.6	4.5	73.5	12.1	14.3	0.01	0.01	0.15	2.93	6.45
	t15	171	5.7	1.7	4.0	66.1	11.5	14.2	nd	0.08	0.14	2.48	3.9
	t30	214	5.5	1.6	3.9	63.4	11.2	14.1	nd	0.03	0.14	2.23	3.5
St Maurice	t0	223	11.5	3.4	10.0	77.3	21.5	34.6	0.1	0.06	0.175	2.435	9.7
	t15	226	11.6	3.1	9.9	81.4	21.7	36.0	nd	0.06	0.17	2.74	10.7
	t30	220	11.5	3.7	10.1	73.2	21.3	33.2	0.1	0.06	0.18	2.13	8.7
Triel	t0	177	19.8	5.0	8.2	88.5	35.9	45.1	nd	0.01	0.21	5.66	13.15
	t15	195	20.0	5.3	8.3	89.4	36.7	47.4	nd	0.01	0.24	5.88	12.7
	t30	220	20.5	5.4	8.5	87.2	38.6	48.1	0.71	0.02	0.23	4.62	10.8

Tableau 39 : Concentrations des différents paramètres physico-chimiques de l'eau sur les sites de Marnay, Saint-Maurice et Triel à t0, t15 et t30 jours de l'expérience de transposition. Les valeurs correspondant à t0 sur le site de Saint-Maurice sont une moyenne des prélèvements à t15 et à t30.

Régression PLS entre les variables environnementales et les variables associées aux biofilms (tolérances au cuivre et paramètres descripteurs des biofilms)

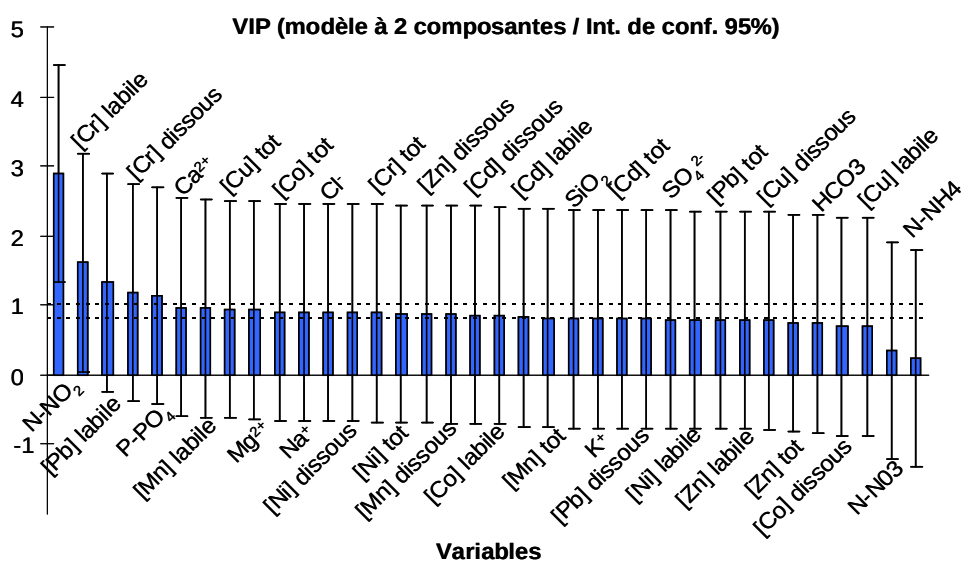


Figure 85 : Coefficients VIP et intervalles de confiance à 95% pour les 36 variables explicatives

Application de la méthodologie PICT à l'échelle d'un bassin versant

Paramètres environnementaux caractérisant les treize sites (exprimées en mg/L pour les anions/cations)

Sites	TAC	Na ⁺	K ⁺	Mg ²⁺	Ca ²⁺	Cl ⁻	SO ₄ ²⁻	conductivité
Montereau/Yonne	168.77	7.04	2.07	2.93	64.28	13.15	11.06	699.33
Souppes	233.83	12.37	3.22	2.79	92.74	27.97	16.18	553.33
Ballancourt	239.93	11.12	3.22	5.59	93.16	24.63	18.05	943.67
StGermain	213.50	19.42	5.05	8.60	84.31	37.23	38.37	574.67
Torcy	197.23	14.56	2.42	9.19	69.83	19.90	28.73	1178.33
StMaurice	201.30	16.12	2.77	9.59	71.79	22.48	34.34	1386.67
Pont	280.60	31.09	5.45	10.24	102.54	41.36	48.82	1158.67
Bernes	278.57	32.42	5.05	10.21	100.66	41.21	52.29	631.33
Nesles	307.03	17.42	2.20	20.36	107.05	34.12	51.01	670.33
Poses	211.47	21.28	5.48	8.28	85.53	56.71	68.25	1494.33
Bouchevilliers	250.10	25.84	7.90	6.55	97.74	60.75	81.54	1952.67
Achy	278.57	7.78	2.00	3.64	86.53	21.99	9.15	802.67
Rochy	284.67	31.18	3.80	4.73	97.06	47.03	81.00	599.67

Sites	NO ₃ ⁻	P-PO ₄	N-NO ₂ ⁻	N-NH ₄ ⁺	COD	MES	T (°C)	pH
Montereau/Yonne	11.65	0.15	0.02	nd	2.25	4.65	21.69	7.71
Souppes	22.54	0.14	0.04	nd	2.46	4.22	18.78	7.74
Ballancourt	27.46	0.15	0.08	nd	2.04	11.97	16.32	7.70
StGermain	21.04	0.29	0.04	0.04	3.80	16.86	16.08	7.71
Torcy	7.93	0.16	0.05	0.06	2.84	9.53	17.49	7.89
StMaurice	8.77	0.17	0.06	0.04	2.77	13.24	17.72	7.85
Pont	18.25	0.17	0.04	0.09	3.04	13.41	16.76	7.93
Bernes	18.69	0.18	0.04	0.06	3.10	8.34	15.71	7.99
Nesles	29.80	0.16	0.06	nd	2.53	20.63	12.60	8.00
Poses	25.69	0.24	nd	0.02	5.89	12.26	11.66	7.58
Bouchevilliers	16.03	0.22	0.01	0.01	10.63	34.54	9.06	7.76
Achy	27.59	0.19	0.02	0.06	2.66	10.58	9.69	7.86
Rochy	21.74	0.18	0.08	0.11	4.24	18.74	10.33	7.83

Concentrations métalliques mesurées sur les treize sites

Sites	Cd	Cr	Co	Cu	Mn	Ni	Pb	Zn
Montereau/Yonne	0.0009	0.0157	0.0065	0.1052	3.2160	0.1170	0.0244	0.9231
Souppes	0.0013	0.0142	0.0023	0.0873	1.8068	0.1565	0.0315	0.4920
Ballancourt	0.0025	0.0274	0.0100	0.0996	2.6745	0.1019	0.1332	1.0809
StGermain	0.0022	0.0359	0.0444	0.3001	14.0159	0.2855	0.1279	1.8962
Torcy	0.0018	0.0762	0.0277	0.2424	8.2336	0.5767	0.0469	0.8548
StMaurice	0.0017	0.0969	0.0229	0.1861	4.2717	0.2197	0.0808	2.0452
Pont	0.0030	0.0921	0.0333	0.1884	11.7774	0.4484	0.0428	1.6563
Bernes	0.0049	0.1778	0.0384	0.2477	7.5524	0.3619	0.0877	2.1033
Nesles	0.0016	0.1244	0.0313	0.1790	6.0921	0.1649	0.0346	1.0835
Poses	0.0092	0.0223	0.0323	0.3841	5.3617	0.5033	0.0161	2.9385
Bouchevilliers	0.0020	0.0451	0.0997	0.1027	25.9395	0.5693	0.0264	1.0323
Achy	0.0011	0.0717	0.0290	0.0497	5.3400	0.0944	0.0361	0.2151
Rochy	0.0023	0.5066	0.1316	0.1721	12.1325	0.2670	0.1073	8.7826

Tableau 40 : Concentrations en métaux labiles ($\mu\text{g/L}$) mesurées sur les treize sites.

Sites	Cd	Cr	Co	Cu	Mn	Ni	Pb
Montereau/Yonne	0.007	0.276	0.118	0.750	7.606	0.795	0.112
Souppes	0.007	0.284	0.130	0.642	5.930	0.893	0.060
Ballancourt	0.006	0.328	0.115	0.497	6.882	0.821	0.148
StGermain	0.013	0.313	0.238	1.402	25.299	1.229	0.187
Torcy	0.011	0.042	0.128	0.894	10.157	0.979	0.065
StMaurice	0.010	0.032	0.137	0.892	6.957	1.105	0.103
Pont	0.010	0.126	0.178	0.837	17.839	1.352	0.061
Bernes	0.013	0.170	0.183	0.951	14.877	1.352	0.120
Nesles	0.007	0.146	0.103	0.368	11.832	0.695	0.065
Poses	0.036	0.233	0.289	1.868	12.596	2.298	0.214
Bouchevilliers	0.019	0.145	0.398	1.049	49.836	2.369	0.070
Achy	0.003	0.487	0.145	0.442	7.451	1.193	0.046
Rochy	0.016	1.482	0.530	0.917	15.781	1.486	0.113

Tableau 41 : Concentrations en métaux dissous ($\mu\text{g/L}$) mesurées sur les treize sites.

Sites	Cd	Cr	Co	Cu	Mn	Ni	Pb	Zn
Montereau/Yonne	0.031	0.551	0.152	7.052	16.413	1.167	1.086	6.714
Souppes	0.023	0.069	0.141	1.606	11.241	1.242	0.484	2.690
Ballancourt	0.028	0.295	0.130	3.527	17.922	1.064	1.735	7.210
StGermain	0.047	1.301	0.434	6.082	42.487	2.008	2.585	16.011
Torcy	0.032	0.493	0.207	3.090	17.111	1.652	0.658	4.397
StMaurice	0.040	0.894	0.274	4.985	20.464	1.881	1.386	8.363
Pont	0.040	0.962	0.386	6.432	35.294	2.631	1.104	11.165
Bernes	0.039	0.642	0.313	4.760	27.798	2.323	1.152	7.627
Nesles	0.040	1.141	0.320	3.456	27.655	1.899	0.890	5.837
Poses	0.088	1.753	0.670	4.591	31.621	3.409	3.419	26.143
Bouchevilliers	0.058	1.230	1.006	2.659	111.016	3.495	1.406	15.317
Achy	0.041	0.872	0.252	0.875	12.910	1.748	0.512	4.892
Rochy	0.073	6.116	0.876	2.846	39.417	2.362	2.008	60.030

Tableau 42 : Concentrations en métaux totaux ($\mu\text{g/L}$) mesurées sur les treize sites

ACP sur les données environnementales des treize sites étudiés

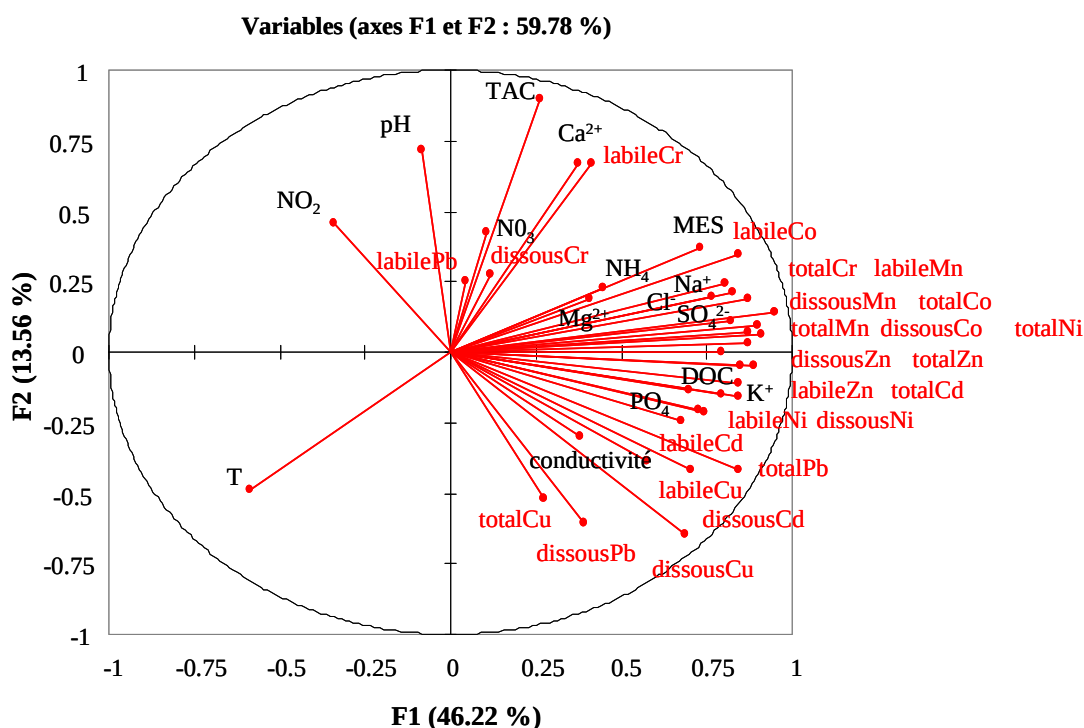


Figure 86 : Cercle des corrélations (deux premières composantes) obtenu par ACP des paramètres environnementaux des treize sites.

Formules de calcul des critères CCU

Les formules de calcul des critères utilisés pour le calcul du CCU correspondant à chaque site sont disponibles sur le site de l'US EPA (2009) : le critère CCC (Cumulative Chronic Criterion) en métal dissous ($\mu\text{g/L}$) correspondant à chaque métal se calcule de la manière suivante :

$$\text{CCC} = \text{CF} \times \exp(\text{mC} \times \ln([\text{dureté}]) + \text{bC}), \text{ où mC et bC figurent dans le Tableau 43.}$$

Agent chimique	mC	bC	Facteur de conversion (CF)
Cd	0.7409	-4.719	$1.101672 \times (\ln([\text{dureté}]) \times 0.04838)$
Cu	0.8545	-1.702	0.96
Pb	1.273	-4.705	$1.46203 \times (\ln([\text{dureté}]) \times 0.145712)$
Ni	0.846	0.0584	0.997
Zn	0.8473	0.884	0.86

Tableau 43 : Paramètres pour calculer les critères, en métaux dissous, dépendant de la dureté de l'eau. D'après US EPA (2009).

La dureté de l'eau est exprimée en $\text{mg CaCO}_3/\text{L}$. On la calcule selon la formule suivante : $2.497 \times [\text{Ca}^{2+}] + 4.116 \times [\text{Mg}^{2+}]$, où les concentrations en cations sont exprimées en mg/L .

Niveaux de tolérance au zinc et au cadmium et maxima d'inhibition mesurés sur les treize sites

Sites	tol Cd	tol Zn	% inhibition Cd	% inhibition Zn
Montereau/Yonne	8.15	16.48	76.43	74.81
Souppes	3.99	6.45	93.30	89.25
Ballancourt	3.59	9.19	84.98	77.80
St Germain	3.64	9.00	76.17	73.63
Torcy	2.04	4.10	96.00	93.85
St Maurice	2.18	4.20	95.47	88.72
Pont	1.39	2.05	94.60	87.50
Bernes sur Oise	2.30	4.60	89.78	86.30
Nesles sur Oise	4.38	2.80	78.65	81.33
Poses	4.68	10.39	75.44	69.30
Bouchevilliers	4.21	4.51	77.20	76.74
Achy	3.69	3.66	92.16	86.23
Rochy	4.99	3.77	73.74	68.17

Tableau 44 : Niveaux de tolérance (EC_{50} normalisées exprimées en $\text{mg}_{\text{méta}}/\text{g}_{\text{MES}}$) et maxima d'inhibition obtenus avec le test β -glucosidase sur les treize sites.

Références bibliographiques

- Admiraal, W., Blanck, H., Buckert-de Jong, M., Guasch, H., Ivorra, N., Lehmann, V., Nystrom, B. A. H., Paulsson, M., and Sabater, S. (1999). Short-term toxicity of zinc to microbenthic algae and bacteria in a metal polluted stream. *Water Research* **33**, 1989-1996.
- Admiraal, W., and Tubbing, D. M. J. (1991). Extracellular enzyme activity associated with suspended matter in the River Rhine. *Freshwater Biology* **26**, 507-517.
- Aloi, J. E. (1990). A Critical Review of Recent Freshwater Periphyton Field Methods. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences* **47**, 656-70.
- Álvarez, I., and Wendel, J. F. (2003). Ribosomal ITS sequences and plant phylogenetic inference. *Molecular Phylogenetics and Evolution* **29**, 417-434.
- Amann, R. I., Ludwig, W., and Schleifer, K. H. (1995). Phylogenetic identification and in situ detection of individual microbial cells without cultivation. *Microbiological Reviews* **59**, 143-169.
- Arar, E., and Collins, G. B. (1997). Method 445.0 In Vitro Determination of Chlorophyll a and Pheophytin a in Marine and Freshwater Algae by Fluorescence. *Environmental Protection Agency*.
- Arias, C. R., Abernathy, J. W., and Liu, Z. (2006). Combined use of 16S ribosomal DNA and automated ribosomal intergenic spacer analysis to study the bacterial community in catfish ponds. *Letters in Applied Microbiology* **43**, 287-292.
- Arrhenius, Å., Grönvall, F., Scholze, M., Backhaus, T., and Blanck, H. (2004). Predictability of the mixture toxicity of 12 similarly acting congeneric inhibitors of photosystem II in marine periphyton and epipsammon communities. *Aquatic Toxicology* **68**, 351-367.
- Austin, A., Lang, S., and Pomeroy, M. (1981). Simple methods for sampling periphyton with observations on sampler design criteria. *Hydrobiologia* **85**, 33-47.
- Azam, F., Fenchel, T., Field, J. G., Gray, J. S., Meyer-Reil, L. A., and Thingstad, F. (1983). The Ecological Role of Water-Column Microbes in the Sea. *Marine Ecology - Progress Series* **10**, 257-63.
- Azim, M. E., and Asaeda, T. (2005). Periphyton Structure, Diversity and Colonization. In *Periphyton: Ecology, Exploitation and Management* (M. E. Azim, M. C. J. Verdegem, A. A. van Dam and M. C. M. Beveridge, eds.). CABI, Cambridge, MA, USA.
- Azim, M. E., Beveridge, M. C. M., van Dam, A. A., and Verdegem, M. C. J. (2005). Periphyton and Aquatic Production: an Introduction. In *Periphyton: Ecology, Exploitation, and Management* (M. E. Azim, M. C. M. Beveridge, A. A. van Dam and M. C. J. Verdegem, eds.), pp. 1-13. CABI Publishing, Cambridge, MA, USA.
- Barranguet, C., Beusekom, S. A. M. v., Veuger, B., Neu, T. R., Manders, E. M. M., Sinke, J. J., and Admiraal, W. (2004). Studying undisturbed autotrophic biofilms: still a technical challenge. *Aquatic Microbial Ecology* **34**, 1-9.

- Barranguet, C., Charantoni, E., Plans, M., and Admiraal, W. (2000). Short-term response of monospecific and natural algal biofilms to copper exposure. *European Journal of Phycology* **35**, 397 - 406.
- Barranguet, C., Plans, M., Van der Grinten, E., Sinke, J. J., and Admiraal, W. (2002). Development of photosynthetic biofilms affected by dissolved and sorbed copper in a eutrophic river *Environmental Toxicology and Chemistry* **21**, 1955-1965.
- Batley, G. E., Apte, S. C., and Stauber, J. L. (1999). Acceptability of aquatic toxicity data for the derivation of water quality guidelines for metals. *Marine and Freshwater Research* **50**, 729-738.
- Behnke, A., Friedl, T., Chepurinov, V. A., and Mann, D. G. (2004). Reproductive compatibility and rDNA sequence analyses in the *Sellaphora pupula* species complex (Bacillariophyta) *Journal of Phycology* **40**, 193-208.
- Behra, R., Landwehrjohann, R., Vogel, K., Wagner, B., and Sigg, L. (2002). Copper and zinc content of periphyton from two rivers as a function of dissolved metal concentration. *Aquatic Sciences - Research Across Boundaries* **64**, 300-306.
- Bent, S. J., and Forney, L. J. (2008). The tragedy of the uncommon: Understanding limitations in the analysis of microbial diversity. *ISME Journal* **2**, 689-695.
- Bérard, A., Becker-Van Slooten, K., Mercier, I., Nystrom, B., Dorigo, U., Grandjean, D., Druart, J.-C., and Leboulanger, C. (2001). Effets de l'Irgarol 1051 sur les communautés algales: approches expérimentales et *in situ* pour évaluer la sensibilité, la destruction et la tolérance induite par l'herbicide antifouling. *Journal de Recherche Océanographique* **26**, 67-8.
- Bérard, A., and Benninghoff, C. (2001). Pollution-induced community tolerance (PICT) and seasonal variations in the sensitivity of phytoplankton to atrazine in nanocosms. *Chemosphere* **45**, 427-437.
- Bérard, A., Dorigo, U., Humbert, J. F., Leboulanger, C., and Seguin, F. (2002). La méthode PICT (Pollution-Induced Community Tolerance) appliquée aux communautés algales: intérêt comme outil de diagnose et d'évaluation du risque écotoxicologique en milieu aquatique. *Annales de Limnologie* **38**.
- Bérard, A., Dorigo, U., Mercier, I., Becker-van Slooten, K., Grandjean, D., and Leboulanger, C. (2003). Comparison of the ecotoxicological impact of the triazines Irgarol 1051 and atrazine on microalgal cultures and natural microalgal communities in Lake Geneva. *Chemosphere* **53**, 935-944.
- Bérard, A., Pelte, T., and Druart, J.-C. (1999). Seasonal variations in the sensitivity of Lake Geneva phytoplankton community structure to atrazine. *Archiv Fur Hydrobiologie* **145**, 277-295.
- Bérard, A., Pelte, T., Menthon, E., Druart, J. C., and Bourrain, X. (1998). Caractérisation du phytoplancton de deux systèmes limniques vis-à-vis d'un herbicide inhibiteur de la photosynthèse. La méthode PICT (Pollution-Induced Community Tolerance): application et signification. *Annales de Limnologie* **34**, 269-282.
- Beszteri, B., Ács, É., and Medlin, L. K. (2005). Ribosomal DNA Sequence Variation among Sympatric Strains of the *Cyclotella meneghiniana* Complex (Bacillariophyceae) Reveals Cryptic Diversity. *Protist* **156**, 317-333.

- Biggs, B. J. F. (2000). New Zealand Periphyton Guideline: Detecting, Monitoring and Managing Enrichment of Streams, p. 121. Ministry for the Environment of New Zealand.
- Biggs, B. J. F., and Close, M. E. (1989). Periphyton biomass dynamics in gravel bed rivers: the relative effects of flows and nutrients. *Freshwater Biology* **22**, 209-231.
- Biggs, B. J. F., and Thomsen, H. A. (1995). Disturbance of stream periphyton by perturbations in shear stress: time to structural failure and differences in community resistance *Journal of Phycology* **31**, 233-241.
- Blanck, H. (2002). A Critical Review of Procedures and Approaches Used for Assessing Pollution-Induced Community Tolerance (PICT) in Biotic Communities. *Human and Ecological Risk Assessment* **8**, 1003-1034.
- Blanck, H., Admiraal, W., Cleven, R. F. M. J., Guasch, H., Hoop, M. A. G. T. v. d., Ivorra, N., Nyström, B., Paulsson, M., Petterson, R. P., Sabater, S., and Tubbing, G. M. J. (2003). Variability in Zinc Tolerance, Measured as Incorporation of Radio-Labeled Carbon Dioxide and Thymidine, in Periphyton Communities Sampled from 15 European River Stretches. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology* **44**, 17-29.
- Blanck, H., and Dahl, B. (1996). Pollution-induced community tolerance (PICT) in marine periphyton in a gradient of tri-n-butyltin (TBT) contamination. *Aquatic Toxicology* **35**, 59-77.
- Blanck, H., and Dahl, B. (1998). Recovery of marine periphyton communities around a swedish marina after the ban of TBT use in antifouling paint. *Marine Pollution Bulletin* **36**, 437-442.
- Blanck, H., and Wängberg, S.-A. (1988). Validity of an Ecotoxicological Test System: short-term and long-term effects of arsenate on marine periphyton communities in laboratory systems. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences* **45**, 1807-1815.
- Blanck, H., Wängberg, S.-A., and Molander, S. (1988). Pollution-Induced Community Tolerance - a new ecotoxicological tool. In Functional Testing of Aquatic Biota for Estimating Hazards of Chemicals (J. J. Cairns and J. R. Pratt, eds.), pp. 219-30. American Society for Testing and Materials, Philadelphia, PA, USA.
- Boenigk, J., Wiedlroither, A., and Pfandl, K. (2005). Heavy metal toxicity and bioavailability of dissolved nutrients to a bacterivorous flagellate are linked to suspended particle physical properties. *Aquatic Toxicology* **71**, 249-259.
- Boivin, M.-E. Y., Massieux, B., Breure, A. M., Greve, G. D., Rutgers, M., and Admiraal, W. (2006). Functional recovery of biofilm bacterial communities after copper exposure. *Environmental Pollution* **140**, 239-246.
- Boivin, M.-E. Y., Massieux, B., Breure, A. M., van den Ende, F. P., Greve, G. D., Rutgers, M., and Admiraal, W. (2005). Effects of copper and temperature on aquatic bacterial communities. *Aquatic Toxicology* **71**, 345-356.
- Booij, K., Smedes, F., and van Weerlee, E. M. (2002). Spiking of performance reference compounds in low density polyethylene and silicone passive water samplers. *Chemosphere* **46**, 1157-1161.

- Borneman, J., and Triplett, E. W. (1997). Molecular microbial diversity in soils from eastern Amazonia: evidence for unusual microorganisms and microbial population shifts associated with deforestation. *Appl. Environ. Microbiol.* **63**, 2647-2653.
- Bouletreau, S., Garabetian, F., Sauvage, S., and Sanchez-Perez, J.-M. (2006). Assessing the importance of a self-generated detachment process in river biofilm models. *Freshwater Biology* **51**, 901-912.
- Bourgeault, A. (2010). Bioaccumulation par *Dreissena polymorpha* : quel reflet de la contamination chimique du milieu ? Expérimentation - Observation - Modélisation. In Cemagref Antony HBAN, Vol. Ph D. Université Pierre et Marie Curie, Paris.
- Bourgeault, A., Gourlay-Francé, C., Vincent-Hubert, F., Palais, F., Geffard, A., Biagianti-Risbourg, S., Pain-Devin, S., and Tusseau-Vuillemin, M. H. (2010). Lessons from a transplantation of zebra mussels into a small urban river: An integrated ecotoxicological assessment. *Environmental Toxicology* **25**, 468-478.
- Bradac, P., Wagner, B., Kistler, D., Traber, J., Behra, R., and Sigg, L. (2010). Cadmium speciation and accumulation in periphyton in a small stream with dynamic concentration variations. *Environmental Pollution* **158**, 641-648.
- Brown, M. V., Schwalbach, M. S., Hewson, I., and Fuhrman, J. A. (2005). Coupling 16S-ITS rDNA clone libraries and automated ribosomal intergenic spacer analysis to show marine microbial diversity: development and application to a time series. *Environmental Microbiology* **7**, 1466-1479.
- Brown, S. E., and Goulder, R. (1996). Extracellular-enzyme activity in trout-farm effluents and a recipient river. *Aquaculture Research* **27**, 895-901.
- Brummer, I. H. M., Felske, A., and Wagner-Dobler, I. (2003). Diversity and Seasonal Variability of Beta-Proteobacteria in Biofilms of Polluted Rivers: Analysis by Temperature Gradient Gel Electrophoresis and Cloning. *Appl. Environ. Microbiol.* **69**, 4463-4473.
- Brummer, I. H. M., Felske, A. D. M., and Wagner-Dobler, I. (2004). Diversity and Seasonal Changes of Uncultured Planctomycetales in River Biofilms. *Appl. Environ. Microbiol.* **70**, 5094-5101.
- Buckley, D. H., and Schmidt, T. M. (2001). The structure of microbial communities in soil and the lasting impact of cultivation. *Microbial Ecology* **42**, 11-21.
- Burns, A., and Ryder, D. S. (2001). Potential for biofilms as biological indicators in Australian riverine systems. *Ecological Management & Restoration* **2**, 53-64.
- Campbell, P. G. C. (1995). Interactions between Trace Metals and Aquatic Organisms: A Critique of the Free-ion Activity Model. In Metal Speciation and Bioavailability in Aquatic Systems (A. Tessier and D. R. Turner, eds.), pp. 45-102. John Wiley & Sons Ltd, Chichester.
- Cardinale, M., Brusetti, L., Quatrini, P., Borin, S., Puglia, A. M., Rizzi, A., Zanardini, E., Sorlini, C., Corselli, C., and Daffonchio, D. (2004). Comparison of Different Primer Sets for Use in Automated Ribosomal Intergenic Spacer Analysis of Complex Bacterial Communities. *Appl. Environ. Microbiol.* **70**, 6147-6156.

- Carlson, G., and Silverstein, J. (1998). Effect of molecular size and charge on biofilm sorption of organic matter. *Water Research* **32**, 1580-1592.
- Chandler, D. P., Fredrickson, J. K., and Brockman, F. J. (1997). Effect of PCR template concentration on the composition and distribution of total community 16S rDNA clone libraries. *Molecular Ecology* **6**, 475-482.
- Chappell, K. R., and Goulder, R. (1994). Enzymes as river pollutants and the response of native epilithic extracellular-enzyme activity. *Environmental Pollution* **86**, 161-169.
- Cherif, H., Ouzari, H., Marzorati, M., Brusetti, L., Jedidi, N., Hassen, A., and Daffonchio, D. (2007). Bacterial community diversity assessment in municipal solid waste compost amended soil using DGGE and ARISA fingerprinting methods. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*.
- Chrost, R. J. (1989). Characterisation and significance of β -glucosidase activity in lake water. *Limnology and Oceanography* **34**, 660-72.
- Chrost, R. J. (1991a). Environmental Control of the Synthesis and Activity of Aquatic Microbial Ectoenzymes. In *Microbial Enzymes in Aquatic Environments* (R. J. Chrost, ed., pp. 29-59. Springer-Verlag, New-York, USA.
- Chrost, R. J. (1991b). *Microbial Enzymes in Aquatic Environments*.
- Chrost, R. J. (1992). Significance of bacterial ectoenzymes in aquatic environments. *Hydrobiologia* **243/44**, 61-70.
- Chrost, R. J., and Overboeck, J. (1990). Substrate ectoenzyme interaction : significance of Beta-D-glucosidase activity for glucose metabolism by aquatic bacteria. *Ergebnisse der Limnologie* **34**, 93-8.
- Clarke, K. R. (1993). Non-parametric multivariate analyses of changes in community structure. *Australian Journal of Ecology* **18**, 117-143.
- Clausen, B., and Biggs, B. (1997). Relationships between benthic biota and hydrological indices in New Zealand streams. *Freshwater Biology* **38**, 327-342.
- Clements, W. H., Carlisle, D. M., Lazorchak, J. M., and Johnson, P. C. (2000). Heavy Metals Structure Benthic Communities in Colorado Mountain Streams. *Ecological Applications* **10**, 626-638.
- Clements, W. H., and Rohr, J. R. (2009). Community responses to contaminants: using basic ecological principles to predict ecotoxicological effects *Environmental Toxicology and Chemistry* **28**, 1789-1800.
- Cleveland, L., Little, E. E., Petty, J. D., Johnson, B. T., Lebo, J. A., Orazio, C. E., Dionne, J., and Crockett, A. (1997). Toxicological and chemical screening of Antarctica sediments: Use of whole sediment toxicity tests, Microtox, Mutatox and semipermeable membrane devices (SPMDs). *Marine Pollution Bulletin* **34**, 194-202.
- Coleman, A. W. (2003). ITS2 is a double-edged tool for eukaryote evolutionary comparisons. *Trends in Genetics* **19**, 370-375.
- Cooke, W. B. (1956). Colonization of artificial bare areas by microorganisms. *Botanical Review* **22**, 613-8.

- Costerton, J. W., Lewandowski, Z., Debeer, D., Caldwell, D., Korber, D., and James, G. (1994). Biofilms, the Customized Microniche. *Journal of Bacteriology* **176**, 2137-42.
- Costerton, J. W., Lewandowski, Z., and Lappin-Scott, H. M. (1995). Microbial biofilms. *Annual Reviews of Microbiology* **49**, 711-45.
- Crosby, L. D., and Criddle, C. S. (2003). Understanding bias in microbial community analysis techniques due to rrn operon copy number heterogeneity. *BioTechniques* **34**, 790-802.
- Cullings, K. W., and Vogler, D. R. (1998). A 5.8S nuclear ribosomal RNA gene sequence database: applications to ecology and evolution. *Molecular Ecology* **7**, 919-923.
- Dahl, B., and Blanck, H. (1996a). Pollution-induced community tolerance (PICT) in periphyton communities established under tri-n-butyltin (TBT) stress in marine microcosms. *Aquatic Toxicology* **34**, 305-325.
- Dahl, B., and Blanck, H. (1996b). Toxic effects of the antifouling agent irgarol 1051 on periphyton communities in coastal water microcosms. *Marine Pollution Bulletin* **32**, 342-350.
- Danovaro, R., Luna, G. M., Dell'Anno, A., and Pietrangeli, B. (2006). Comparison of Two Fingerprinting Techniques, Terminal Restriction Fragment Length Polymorphism and Automated Ribosomal Intergenic Spacer Analysis, for Determination of Bacterial Diversity in Aquatic Environments. *Appl. Environ. Microbiol.* **72**, 5982-5989.
- Davey, M. E., and O'Toole, G. A. (2000). Microbial Biofilms: from Ecology to Molecular Genetics. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **64**, 847-867.
- De Schamphelaere, K. A. C., and Janssen, C. R. (2006). Bioavailability models for predicting copper toxicity to freshwater green microalgae as a function of water chemistry. *Environmental Science and Technology* **40**, 4514-4522.
- Decho, A. W. (2000). Microbial biofilms in intertidal systems: an overview. *Continental Shelf Research* **20**, 1257-73.
- Demoling, L. A., and Baath, E. (2008a). The use of leucine incorporation to determine the toxicity of phenols to bacterial communities extracted from soil. *Applied Soil Ecology* **38**, 34-41.
- Demoling, L. A., and Baath, E. (2008b). Use of Pollution-Induced Community Tolerance of the bacterial community to detect phenol toxicity in soil. *Environmental Toxicology and Chemistry* **27**, 334-340.
- Demoling, L. A., Bååth, E., Greve, G., Wouterse, M., and Schmitt, H. (2009). Effects of sulfamethoxazole on soil microbial communities after adding substrate. *Soil Biology and Biochemistry* **41**, 840-848.
- Detenbeck, N. E., Hermanutz, R., Allen, K., and Swift, M. C. (1996). Fate and effects of the herbicide atrazine in flow-through wetland mesocosms. *Environmental Toxicology and Chemistry* **15**, 937-946.
- Dignac, M.-F., Urbain, V., Rybacki, D., Bruchet, A., Snidaro, D., and Scribe, P. (1998). Chemical description of extracellular polymers: implication on activated sludge floc structure. *Water Science and Technology* **38**, 45-53.

- Donlan, R. M. (2002). Biofilms: Microbial Life on Surfaces. *Emerging Infectious Diseases* **8**.
- Dorigo, U., Bourrain, X., Berard, A., and Leboulanger, C. (2004). Seasonal changes in the sensitivity of river microalgae to atrazine and isoproturon along a contamination gradient. *The Science of The Total Environment* **318**, 101-114.
- Dorigo, U., Fontvieille, D., and Humbert, J.-F. (2006). Spatial variability in the abundance and composition of the free-living bacterioplankton community in the pelagic zone of Lake Bourget (France). *FEMS Microbiology Ecology* **58**, 109-119.
- Dorigo, U., Leboulanger, C., Bérard, A., Bouchez, A., Humbert, J. F., and Montuelle, B. (2007). Lotic biofilm community structure and pesticide tolerance along a contamination gradient in a vineyard area. *Aquatic Microbial Ecology* **50**, 91-102.
- Dorigo, U., Volatier, L., and Humbert, J.-F. (2005). Molecular approaches to the assessment of biodiversity in aquatic microbial communities. *Water Research* **39**, 2207-2218.
- Duggleby, R. G. (1981). A nonlinear regression program for small computers. *Analytical Biochemistry* **110**, 9-18.
- Duong, T. T., Morin, S., Herlory, O., Feurtet-Mazel, A., Coste, M., and Boudou, A. (2008). Seasonal effects of cadmium accumulation in periphytic diatom communities of freshwater biofilms. *Aquatic Toxicology* **90**, 19-28.
- Elbaz-Poulitchet, F., Seidel, J. L., Casiot, C., and Tusseau-Vuillemin, M. H. (2006). Short-term variability of dissolved trace element concentrations in the Marne and Seine Rivers near Paris. *Science of the Total Environment* **367**, 278-287.
- EPA, U. S. (2009). National Recommended Water Quality Criteria. Office of Water, Office of Science and Technology, <http://www.epa.gov/ost/criteria/wqctable>.
- Eriksson, L., Johansson, E., Kettaneh-Wold, N., Trygg, J., Wikström, C., and Wold, S. (2006). *Multi- and Megavariate Data Analysis*. Umetrics Academy, Umeå, Sweden.
- Espeland, E. M., and Wetzel, R. G. (2001). Complexation, Stabilization, and UV Photolysis of Extracellular and Surface-Bound Glucosidase and Alkaline Phosphatase: Implications for Biofilm Microbiota. *Microbial Ecology* **V42**, 572-585.
- Even, S., Billen, G., Bacq, N., Th   ry, S., Ruelland, D., Garnier, J., Cugier, P., Poulin, M., Blanc, S., Lamy, F., and Paffoni, C. (2007). New tools for modelling water quality of hydrosystems: An application in the Seine River basin in the frame of the Water Framework Directive. *Science of the Total Environment* **375**, 274-291.
- Fechner, L. C. (2007). Rapport de master : La méthode PICT adaptée    la problématique des rejets urbains. Mise au point méthodologique d'un test d'activité bactérienne. In HBAN, Cemagref centre d'Antony, Vol. Master Sciences et G  nie de l'Environnement.
- Ferreira, D., Tousset, N., Ridame, C., line, Tusseau-Vuillemin, M.-H., and ne (2008). More than inorganic copper is bioavailable to aquatic mosses at environmentalaly relevant concentrations. *Environmental Toxicology and Chemistry* **27**, 2108-2116.

- Fisher, M. M., and Triplett, E. W. (1999). Automated Approach for Ribosomal Intergenic Spacer Analysis of Microbial Diversity and Its Application to Freshwater Bacterial Communities. *Appl. Environ. Microbiol.* **65**, 4630-4636.
- Flipo, N., Even, S., Poulin, M., Tusseau-Vuillemin, M. H., Ameziane, T., and Dauta, A. (2004). Biogeochemical modelling at the river scale: Plankton and periphyton dynamics: Grand Morin case study, France. *Ecological Modelling* **176**, 333-347.
- Flipo, N., Rabouille, C., Poulin, M., Even, S., Tusseau-Vuillemin, M. H., and Lalande, M. (2007). Primary production in headwater streams of the Seine basin: The Grand Morin river case study. *Science of the Total Environment* **375**, 98-109.
- Francoeur, S., Schaecher, M., Neely, R., and Kuehn, K. (2006). Periphytic Photosynthetic Stimulation of Extracellular Enzyme Activity in Aquatic Microbial Communities Associated with Decaying Typha Litter. *Microbial Ecology* **52**, 662-669.
- Frey, J. C., Angert, E. R., and Pell, A. N. (2006). Assessment of biases associated with profiling simple, model communities using terminal-restriction fragment length polymorphism-based analyses. *Journal of Microbiological Methods* **67**, 9-19.
- Frolund, B., Griebe, T., and Nielsen, P. H. (1995). Enzymatic activity in the activated-sludge floc matrix. *Applied Microbiology and Biotechnology* **43**, 755-61.
- Fukushi, K., Kato, S., Antsuki, T., and Omura, T. (2001). Isolation of copper-binding proteins from activated sludge culture. *Water Science and Technology* **44**, 453-9.
- Gadd, G. M., and Griffiths, A. J. (1977). Microorganisms and heavy metal toxicity. *Microbial Ecology* **4**, 303-317.
- García-Martínez, J., Acinas, S. G., Antón, A. I., and Rodríguez-Valera, F. (1999). Use of the 16S-23S ribosomal genes spacer region in studies of prokaryotic diversity. *Journal of Microbiological Methods* **36**, 55-64.
- Garnier, J., Billen, G., Even, S., Etcheber, H., and Servais, P. (2008). Organic matter dynamics and budgets in the turbidity maximum zone of the Seine Estuary (France). *Estuarine, Coastal and Shelf Science* **77**, 150-162.
- Geesey, G. G., Mutch, R., and Costerton, J. W. (1978). Sessile bacteria: An important component of the microbial population in small mountain streams. *Limnology and Oceanography* **23**, 1214-23.
- Geesey, G. G., Stupy, M. W., and Bremer, P. J. (1992). The dynamics of biofilms. *International Biodeterioration & Biodegradation* **30**, 135-154.
- Geiger, G., Brandl, H., Furrer, G., and Schulin, R. (1998). The effect of copper on the activity of cellulase and [beta]-glucosidase in the presence of montmorillonite or Al-montmorillonite. *Soil Biology and Biochemistry* **30**, 1537-1544.
- Geislinger, A., Bonnineau, C., Faggiano, L., Guasch, H., LÃ³pez-Doval, J. C., Proia, L., Ricart, M., Ricciardi, F., RomanÃ-, A., Rotter, S., MuÃ±oz, I., Schmitt-Jansen, M., and Sabater, S. (2009). The relevance of the community approach linking chemical and biological analyses in pollution assessment. *TrAC - Trends in Analytical Chemistry* **28**, 619-626.

- Gilbert, P., Das, J., and Foley, I. (1997). Biofilm susceptibility to antimicrobials. *Advances in dental research* **11**, 160-167.
- Gold, C., Feurtet-Mazel, A., Coste, M., and Boudou, A. (2002). Field transfer of periphytic diatom communities to assess short-term structural effects of metals (Cd, Zn) in rivers. *Water Research* **36**, 3654–3664.
- Gray, B. R., Hill, W. R., and Stewart, A. J. (2001). Effects of development time, biomass and ferromanganese oxides on nickel sorption by stream periphyton. *Environmental Pollution* **112**, 61-71.
- Guasch, H., Admiraal, W., and Sabater, S. (2003). Contrasting effects of organic and inorganic toxicants on freshwater periphyton. *Aquatic Toxicology* **64**, 165-175.
- Guasch, H., Ivorra, N., Lehmann, V., Paulsson, M., Real, M., and Sabater, S. (1998). Community composition and sensitivity of periphyton to atrazine in flowing waters: the role of environmental factors. *Journal of Applied Phycology* **10**, 203-213.
- Guasch, H., Leira, M., Montuelle, B., Geislinger, A., Roulier, J. L., TornÃ©s, E., and Serra, A. (2009). Use of multivariate analyses to investigate the contribution of metal pollution to diatom species composition: Search for the most appropriate cases and explanatory variables. *Hydrobiologia* **627**, 143-158.
- Guasch, H., Muñoz, I., Rosés, N., and Sabater, S. (1997). Changes in atrazine toxicity throughout succession of stream periphyton communities. *Journal of Applied Phycology* **9**, 137-146.
- Guasch, H., Paulsson, M., and Sabater, S. (2002). Effect of copper on algal communities from oligotrophic calcareous streams. *Journal of Phycology* **38**, 241-248.
- Guasch, H., and Sabater, S. (1998). Light history influences the sensitivity to atrazine in periphytic algae. *Journal of Phycology* **34**, 233-241.
- Guibaud, G., Comte, S., Bordas, F., Dupuy, S., and Baudu, M. (2005). Comparison of the complexation potential of extracellular polymeric substances (EPS), extracted from activated sludges and produced by pure bacteria strains, for cadmium, lead and nickel. *Chemosphere* **59**, 629-638.
- Guibaud, G., Tixier, N., Bouju, A., and Baudu, M. (2003). Relation between extracellular polymers' composition and its ability to complex Cd, Cu and Pb. *Chemosphere* **52**, 1701-1710.
- Guibaud, G., van Hullebusch, E., and Bordas, F. (2006). Lead and cadmium biosorption by extracellular polymeric substances (EPS) extracted from activated sludges: pH-sorption edge tests and mathematical equilibrium modelling. *Chemosphere* **64**, 1955-1962.
- Gustavson, K., Petersen, S., Pedersen, B., Stuer-Lauridsen, F., and Wängberg, S.-A. (1999). Pollution-Induced Community Tolerance (PICT) in coastal phytoplankton communities exposure to copper. *Hydrobiologia* **416**, 125-138.
- Gustavson, K., and Wängberg, S.-A. (1995). Tolerance induction and succession in microalgae communities exposed to copper and atrazine. *Aquatic Toxicology* **32**, 283-302.
- Hansen, M. C., Tolker-Nielsen, T., Givskov, M., and Molin, S. (1998). Biased 16S rDNA PCR amplification caused by interference from DNA flanking the template region. *FEMS Microbiology Ecology* **26**, 141-149.

- Harrison, J. J., Ceri, H., Stremick, C. A., and Turner, R. J. (2004). Biofilm susceptibility to metal toxicity. *Environmental Microbiology* **6**, 1220-1227.
- Harrison, J. J., Ceri, H., and Turner, R. J. (2007). Multimetal resistance and tolerance in microbial biofilms. *Nature Reviews Microbiology* **5**, 928-938.
- Haugland, R. P. (2002). *The handbook of fluorescent probes and research products*.
- Head, I. M., Saunders, J. R., and Pickup, R. W. (1998). Microbial evolution, diversity, and ecology: A decade of ribosomal RNA analysis of uncultivated microorganisms. *Microbial Ecology* **35**, 1-21.
- Herloy, O. (2005). Etude du biofilm microalgal des vasières intertidales : dynamique spatio-temporelle à micro-échelle et performances photosynthétiques. Université de la Rochelle, Discipline : Océanographie biologique et environnement marin.
- Hernandez-Raquet, G., Budzinski, H., Caumette, P., Dabert, P., Le Menach, K., Muyzer, G., and Duran, R. (2006). Molecular diversity studies of bacterial communities of oil polluted microbial mats from the Etang de Berre (France). *FEMS Microbiology Ecology* **58**, 550-562.
- Hewson, I., and Fuhrman, J. A. (2004). Richness and diversity of bacterioplankton species along an estuarine gradient in Moreton Bay, Australia. *Applied and Environmental Microbiology* **70**, 3425-3433.
- Hewson, I., Steele, J. A., Capone, D. G., and Fuhrman, J. A. (2006). Remarkable heterogeneity in meso- and bathypelagic bacterioplankton assemblage composition. *Limnology and Oceanography* **51**, 1274-1283.
- Hickey, C. W., and Golding, L. A. (2002). Response of macroinvertebrates to copper and zinc in a stream mesocosm. *Environmental Toxicology and Chemistry* **21**, 1854-1863.
- Hill, A. V. (1910). The possible effects of the aggregation of the molecules of haemoglobin on its dissociation curves. *Journal of Physiology* **40**, iv-vii.
- Hill, T., C. J., Walsh, K., A., Harris, J., A., and Moffett, B., F. (2003). Using ecological diversity measures with bacterial communities. *FEMS Microbiology Ecology* **43**, 1-11.
- Hirst, H., Jänttner, I., and Ormerod, S. J. (2002). Comparing the responses of diatoms and macroinvertebrates to metals in upland streams of Wales and Cornwall. *Freshwater Biology* **47**, 1752-1765.
- Hjorth, M., Dahllof, I., and Forbes, V. E. (2006). Effects on the function of three trophic levels in marine plankton communities under stress from the antifouling compound zinc pyrithione. *Aquatic Toxicology* **77**, 105-115.
- Hoppe, H.-G. (1983). Significance of exoenzymatic activities in the ecology of brackish water: measurements by means of methylumbelliferyl-substrates. *Marine Ecology - Progress Series* **11**, 299-308.
- Hubálek, Z. (2003). Protectants used in the cryopreservation of microorganisms. *Cryobiology* **46**, 205-229.

- Huckins, J. N., Tubergen, M. W., and Manuweera, G. K. (1990). Semipermeable membrane devices containing model lipid: A new approach to monitoring the bioavailability of lipophilic contaminants and estimating their bioconcentration potential. *Chemosphere* **20**, 533-552.
- Ivorra, N., Barranguet, C., Jonker, M., Kraak, M. H. S., and Admiraal, W. (2002a). Metal-induced tolerance in the freshwater microbenthic diatom *Gomphonema parvulum*. *Environmental Pollution* **116**, 147-157.
- Ivorra, N., Bremer, S., Guasch, H., Kraak, M. H. S., and Admiraal, W. (2000). Differences in the sensitivity of benthic microalgae to Zn and Cd regarding biofilm development and exposure history. *Environmental Toxicology and Chemistry* **19**, 1332-1339.
- Ivorra, N., Hettelaar, J., Kraak, M. H. S., Sabater, S., and Admiraal, W. (2002b). Responses of biofilms to combined nutrient and metal exposure. *Environmental Toxicology and Chemistry* **21**, 626-632.
- Jensen, M. A., Webster, J. A., and Straus, N. (1993). Rapid identification of bacteria on the basis of polymerase chain reaction-amplified ribosomal DNA spacer polymorphisms. *Applied and Environmental Microbiology* **59**, 945-952.
- Johnson, B. T., Petty, J. D., Huckins, J. N., Lee, K., and Gauthier, J. (2004). Hazard assessment of a simulated oil spill on intertidal areas of the St. Lawrence river with SPMD-TOX. *Environmental Toxicology* **19**, 329-335.
- Jones, S. E., Shade, A. L., McMahon, K. D., and Kent, A. D. (2007). Comparison of Primer Sets for Use in Automated Ribosomal Intergenic Spacer Analysis of Aquatic Bacterial Communities: an Ecological Perspective. *Appl. Environ. Microbiol.* **73**, 659-662.
- Kirchman, D. L., and Rich, J. H. (1997). Regulation of Bacterial Growth Rates by Dissolved Organic Carbon and Temperature in the Equatorial Pacific Ocean. *Microbial Ecology* **33**, 11-20.
- Klamer, H. J. C., Villerius, L. A., Roelsma, J., DeMaagd, P. G. J., and Opperhuizen, A. (1997). Genotoxicity testing using the Mutatox(TM) assay: Evaluation of benzo[a]pyrene as a positive control. *Environmental Toxicology and Chemistry* **16**, 857-861.
- Knauer, K., Leimgruber, A., Hommen, U., and Knauert, S. (2010). Co-tolerance of phytoplankton communities to photosynthesis II inhibitors. *Aquatic Toxicology* **96**, 256-263.
- Knight, A. W., and Bottorf, R. L. (1981). The Importance of Riparian Vegetation to Stream Ecosystems. In California Riparian Systems Conference, University of California.
- Kučera, T., Horáková, H., and Šonská, A. (2008). Toxic metal ions in photoautotrophic organisms. *Photosynthetica* **46**, 481-489.
- Lamberti, G. A. (1996). The Role of Periphyton in Benthic Food Webs. In *Agal Ecology Freshwater Benthic Ecosystems* (R. J. Stevenson, M. L. Bothwell and R. L. Lowe, eds.). Academix Press, San Diego.
- Lamelas, C., Wilkinson, K. J., and Slaveykova, V. I. (2005). Influence of the Composition of Natural Organic Matter on Pb Bioavailability to Microalgae. *Environ. Sci. Technol.* **39**, 6109-6116.
- Lappin-Scott, H. M., and Bass, C. (2001). Biofilm formation: Attachment, growth, and detachment of microbes from surfaces. *American Journal of Infection Control* **29**, 250-251.

- Larena, I., Salazar, O., González, V., Julián, M. C., and Rubio, V. (1999). Design of a primer for ribosomal DNA internal transcribed spacer with enhanced specificity for ascomycetes. *Journal of Biotechnology* **75**, 187-194.
- Larsen, D. K., Wagner, I., Gustavson, K., Forbes, V. E., and Lund, T. (2003). Long-term effect of Sea-Nine on natural coastal phytoplankton communities assessed by pollution induced community tolerance. *Aquatic Toxicology* **62**, 35-44.
- Lear, G., Anderson, M. J., Smith, J. P., Boxen, K., and Lewis, G. D. (2008). Spatial and temporal heterogeneity of the bacterial communities in stream epilithic biofilms. *FEMS Microbiology Ecology* **65**, 463-473.
- Lear, G., Dong, Y., and Lewis, G. (2010). Comparison of methods for the extraction of DNA from stream epilithic biofilms. *Antonie van Leeuwenhoek, International Journal of General and Molecular Microbiology*, 1-5.
- Lear, G., and Lewis, G. D. (2009a). Impact of catchment land use on bacterial communities within stream biofilms. *Ecological Indicators* **9**, 848-855.
- Lear, G., and Lewis, G. D. (2009b). NESTED AUTOMATED RIBOSOMAL INTERGENIC SPACER ANALYSIS: A RAPID AND ACCURATE METHOD FOR COMPARISON OF BACTERIAL COMMUNITY COMPOSITION. *Journal of Rapid Methods & Automation in Microbiology* **17**, 257-270.
- Lear, G., Niyogi, D., Harding, J., Dong, Y., and Lewis, G. (2009). Biofilm bacterial community structure in streams affected by acid mine drainage. *Applied and Environmental Microbiology* **75**, 3455-3460.
- Lebo, J. A., Almeida, F. V., Cranor, W. L., Petty, J. D., Huckins, J. N., Rastall, A., Alvarez, D. A., Mogensen, B. B., and Johnson, B. T. (2004). Purification of triolein for use in semipermeable membrane devices (SPMDs). *Chemosphere* **54**, 1217-1224.
- Lehmann, V., Tubbing, G. M. J., and Admiraal, W. (1999). Induced Metal Tolerance in Microbenthic Communities from Three Lowland Rivers with Different Metal Loads. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology* **36**, 384-391.
- Lester, J. N. (1983). Significance and behaviour of heavy metals in waste water treatment processes I. Sewage treatment and effluent discharge. *The Science of The Total Environment* **30**, 1-44.
- Leuko, S., Goh, F., Allen, M., Burns, B., Walter, M., and Neilan, B. (2007). Analysis of intergenic spacer region length polymorphisms to investigate the halophilic archaeal diversity of stromatolites and microbial mats. *Extremophiles* **11**, 203-210.
- Li, Y., and Chrost, R. J. (2006). Microbial enzymatic activities in aerobic activated sludge model reactors. *Enzyme and Microbial Technology* **39**, 568-572.
- Lock, K., and Janssen, C. R. (2005). Influence of soil zinc concentrations on zinc sensitivity and functional diversity of microbial communities. *Environmental Pollution* **136**, 275-281.
- Lock, M. A. (1993). Attached microbial communities in rivers. In *Aquatic Microbiology* (T. E. Ford, ed. Blackwell Scientific Publications, Boston, Massachusetts, USA.

- Loisel, P., Harmand, J., Zemb, O., Latrille, E., Lobry, C., Delgenès, J. P., and Godon, J. J. (2006). Denaturing gradient electrophoresis (DGE) and single-strand conformation polymorphism (SSCP) molecular fingerprintings revisited by simulation and used as a tool to measure microbial diversity. *Environmental Microbiology* **8**, 720-731.
- Lorgeoux, C. (2008). Développement d'échantillonneurs passifs pour les composés organiques hydrophobes. Conservatoire National des Arts et Métiers, Paris.
- Lowe, R. L., and Pan, Y. (1996). Benthic Algal Communities as Biological Monitors. In *Algal Ecology: Freshwater Benthic Ecosystems* (R. J. Stevenson, M. L. Bothwell and R. L. Lowe, eds.), pp. 705-739. Academic Press, San Diego.
- Lucey, W. P., Austin, A., and Deniseger, J. (1987). Concept and design of a substrata container for sampling periphyton. *Water Research* **21**, 395-402.
- Ludwig, W., Strunk, O., Westram, R., Richter, L., Meier, H., Yadhukumar, Buchner, A., Lai, T., Steppi, S., Jobb, G., Forster, W., Brettske, I., Gerber, S., Ginhart, A. W., Gross, O., Grumann, S., Hermann, S., Jost, R., König, A., Liss, T., Lussmann, R., May, M., Nonhoff, B., Reichel, B., Strehlow, R., Stamatakis, A., Stuckmann, N., Vilbig, A., Lenke, M., Ludwig, T., Bode, A., and Schleifer, K.-H. (2004). ARB: a software environment for sequence data. *Nucl. Acids Res.* **32**, 1363-1371.
- Luna, G. M., Dell'Anno, A., and Danovaro, R. (2006). DNA extraction procedure: a critical issue for bacterial diversity assessment in marine sediments. *Environmental Microbiology* **8**, 308-320.
- Madigou, E. (2002). Mémoire de thèse : Influence du statut trophique de cours d'eau sur les fonctionnalités microbiennes des biofilms (épipsammon et épilithon). In *Ecologie Microbienne*, Vol. Doctorat. Université Claude-Bernard Lyon 1, Lyon.
- Maier, M., Maier, D., and Lloyd, B. J. (2000). The role of biofilms in the mobilisation of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons (PAHs) from the coal-tar lining of water pipes. In *Water Science and Technology*, Vol. 41, pp. 279-285.
- Marchetti, A., Lundholm, N., Kotaki, Y., Hubbard, K., Harrison, P. J., and Virginia Armbrust, E. (2008). Identification and assessment of domoic acid production in oceanic *Pseudo-nitzschia* (Bacillariophyceae) from iron-limited waters in the northeast subarctic Pacific. *Journal of Phycology* **44**, 650-661.
- Maron, D., Katzenellenbogen, J., and Ames, B. N. (1981). Compatibility of organic solvents with the Salmonella/microsome test. *Mutat Res* **88**, 343-50.
- Maron, P.-A., Mougel, C., Siblot, S., Abbas, H., Lemanceau, P., and Ranjard, L. (2007). Protein Extraction and Fingerprinting Optimization of Bacterial Communities in Natural Environment. *Microbial Ecology* **53**, 426-434.
- Martin, K., and Rygielwicz, P. (2005). Fungal-specific PCR primers developed for analysis of the ITS region of environmental DNA extracts. *BMC Microbiology* **5**, 28.
- Massieux, B., Boivin, M. E., Van Den Ende, F. P., Langenskiold, J., Marvan, P., Barranguet, C., Admiraal, W., Laanbroek, H. J., and Zwart, G. (2004). Analysis of structural and physiological profiles to assess the effects of Cu on biofilm microbial communities. *Appl Environ Microbiol* **70**, 4512-21.

- McClellan, K., Altenburger, R., and Schmitt-Jansen, M. (2008). Pollution-induced community tolerance as a measure of species interaction in toxicity assessment. *Journal of Applied Ecology* **45**, 1514-1522.
- McMahon, R., Hunter, R. D., and Russell-Hunter, W. D. (1974). Variation in aufwuchs at six freshwater habitats in terms of carbon biomass and of carbon: Nitrogen ratio. *Hydrobiologia* **45**, 391-404.
- Meybeck, M. (2003). Global analysis of river systems: From Earth system controls to Anthropocene syndromes. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences* **358**, 1935-1955.
- Meybeck, M., Lestel, L., Bonté, P., Moilleron, R., Colin, J. L., Rousselot, O., Hervé, D., de Pontevès, C., Grosbois, C., and Thévenot, D. R. (2007). Historical perspective of heavy metals contamination (Cd, Cr, Cu, Hg, Pb, Zn) in the Seine River basin (France) following a DPSIR approach (1950-2005). *Science of The Total Environment* **375**, 204-231.
- Michelland, R. J., Dejean, S., Combes, S., Fortun-Lamothe, L., and Cauquil, L. (2009). StatFingerprints: a friendly graphical interface program for processing and analysis of microbial fingerprint profiles. *Molecular Ecology Resources* **9**, 1359-1363.
- Millward, R. N., and Grant, A. (1995). Assessing the impact of copper on nematode communities from a chronically metal-enriched estuary using pollution-induced community tolerance. *Marine Pollution Bulletin* **30**, 701-706.
- Molander, S., and Blanck, H. (1992). Detection of pollution-induced community tolerance (PICT) in marine periphyton communities established under diuron exposure. *Aquatic Toxicology* **22**, 129-144.
- Moller, S., Pedersen, A. R., Poulsen, L. K., Arvin, E., and Molin, S. (1996). Activity and three-dimensional distribution of toluene-degrading *Pseudomonas putida* in a multispecies biofilm assessed by quantitative in situ hybridization and scanning confocal laser microscopy. *Appl. Environ. Microbiol.* **62**, 4632-4640.
- Montuelle, B., and Volat, B. (1993). Utilisation des activités exoenzymatiques microbiennes dans l'étude d'écosystèmes aquatiques. *Revue des Sciences de l'Eau* **6**, 251-68.
- Morel, F. M. (1983). *Principles of Aquatic Chemistry*. John Wiley & Sons, New York, NY, USA.
- Morin, S. (2006). Bioindication des effets de pollutions métalliques sur les communautés de diatomées benthiques
Approches *in situ* et expérimentales. In Sciences du vivant, Géosciences et Sciences de l'Environnement. Université Bordeaux 1, Bordeaux.
- Morin, S., Duong, T., Herlory, O., Feurtet-Mazel, A., and Coste, M. (2008a). Cadmium Toxicity and Bioaccumulation in Freshwater Biofilms. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology* **54**, 173-186.
- Morin, S., Duong, T. T., Dabrin, A., Coynel, A., Herlory, O., Baudrimont, M., Delmas, F., Durrieu, G., Schäfer, J., Winterton, P., Blanc, G., and Coste, M. (2008b). Long-term survey of heavy-metal pollution, biofilm contamination and diatom community structure in the Riou Mort watershed, South-West France. *Environmental Pollution* **151**, 532-542.

- Muffang, C. (2008). Développement méthodologique d'un test d'activité photosynthétique sur population périphytonique prélevée en milieu urbain. Cemagref Antony, Unité de recherche HBAN, équipe EXPER.
- Muyssen, B. T. A., Brix, K. V., DeForest, D. K., and Janssen, C. R. (2004). Nickel essentiality and homeostasis in aquatic organisms. *Environmental Reviews* **12**, 113-131.
- Muyzer, G. (1999). DGGE/TGGE a method for identifying genes from natural ecosystems. *Current Opinion in Microbiology* **2**, 317-322.
- Nahmani, J., and Rossi, J.-P. (2003). Soil macroinvertebrates as indicators of pollution by heavy metals. *Comptes Rendus Biologies* **326**, 295-303.
- Newton, R. J., Kent, A. D., Triplett, E. W., and McMahon, K. D. (2006). Microbial community dynamics in a humic lake: differential persistence of common freshwater phylotypes. *Environmental Microbiology* **8**, 956-970.
- Nikolaev, Y. A., and Plakunov, V. K. (2007). Biofilm - "city of microbes" or an analogue of multicellular organisms? *Microbiology* **76**, 125-138.
- Niyogi, S., and Wood, C. M. (2004). Biotic Ligand Model, a Flexible Tool for Developing Site-Specific Water Quality Guidelines for Metals. *Environmental Science & Technology* **38**, 6177-6192.
- Nocker, A., Burr, M., and Camper, A. K. (2007). Genotypic microbial community profiling: A critical technical review. *Microbial Ecology* **54**, 276-289.
- Obst, U., and Schwartz, T. (2007). Microbial Characteristics of Water Distribution: Compiled Investigations in a German Drinking Water Distribution System. *Practice Periodical of Hazardous, Toxic, and Radioactive Waste Management* **11**, 78-82.
- Ogilvie, L. A., and Grant, A. (2008). Linking pollution induced community tolerance (PICT) and microbial community structure in chronically metal polluted estuarine sediments. *Marine Environmental Research* **65**, 187-198.
- Pamatmat, M. M. (1997). Non-photosynthetic oxygen production and non-respiratory oxygen uptake in the dark: a theory of oxygen dynamics in plankton communities. *Mar. Biol.* **129**, 735-746.
- Paule, A., Lyautey, É., Garabetian, F., and Rols, J.-L. (2009). Autogenic versus environmental control during development of river biofilm. *Ann. Limnol. - Int. J. Lim.* **45**, 1-10.
- Paulsson, M., Månsson, V., and Blanck, H. (2002). Effects of zinc on the phosphorus availability to periphyton communities from the river Göta Älv. *Aquatic Toxicology* **56**, 103-113.
- Paulsson, M., Nystrom, B., and Blanck, H. (2000). Long-term toxicity of zinc to bacteria and algae in periphyton communities from the river Göta Älv, based on a microcosm study. *Aquatic Toxicology* **47**, 243-257.
- Pistocchi, R., Mormile, M. A., Guerrini, F., Isani, G., and Boni, L. (2000). Increased production of extra- and intracellular metal-ligands in phytoplankton exposed to copper and cadmium. *Journal of Applied Phycology* **V12**, 469-477.

- Poirot, O., O'Toole, E., and Notredame, C. (2003). Tcoffee@igs: a web server for computing, evaluating and combining multiple sequence alignments. *Nucl. Acids Res.* **31**, 3503-3506.
- Pollard, A. I., and Yuan, L. (2006). Community Response Patterns: Evaluating Benthic Invertebrate Composition in Metal-Polluted Streams. *Ecological Applications* **16**, 645-655.
- Polz, M. F., and Cavanaugh, C. M. (1998). Bias in Template-to-Product Ratios in Multitemplate PCR. *Appl. Environ. Microbiol.* **64**, 3724-3730.
- Priadi, C., Ayrault, S., Pacini, S., and Bonte, P. (2010a). Urbanization impact of the Greater Paris Region on metal mobility in suspended sediments in the Seine River, France: Role of iron oxides *in prep.*
- Priadi, C., Bourgeault, A., Ayrault, S., Gourlay-Francé, C., and Tusseau-Vuillemin, M. H. (2010b). How does urbanization affect metal solid-solution partitioning? Dissolved – DGT – particulate fraction. *in prep.*
- Pruesse, E., Quast, C., Knittel, K., Fuchs, B. M., Ludwig, W., Peplies, J., and Glockner, F. O. (2007). SILVA: a comprehensive online resource for quality checked and aligned ribosomal RNA sequence data compatible with ARB. *Nucl. Acids Res.* **35**, 7188-7196.
- Qu, X., Mazéas, L., Vavilin, V. A., Epissard, J., Lemunier, M., Mouchel, J.-M., He, P.-j., and Bouchez, T. (2009). Combined monitoring of changes in $\delta^{13}\text{CH}_4$ and archaeal community structure during mesophilic methanization of municipal solid waste. *FEMS Microbiology Ecology* **68**, 236-245.
- Ramette, A. (2007). Multivariate analyses in microbial ecology. *FEMS Microbiology Ecology* **62**, 142-160.
- Ramette, A. (2009). Quantitative Community Fingerprinting Methods for Estimating the Abundance of Operational Taxonomic Units in Natural Microbial Communities. *Appl. Environ. Microbiol.* **75**, 2495-2505.
- Ranjard, L., Brothier, E., and Nazaret, S. (2000a). Sequencing Bands of Ribosomal Intergenic Spacer Analysis Fingerprints for Characterization and Microscale Distribution of Soil Bacterium Populations Responding to Mercury Spiking. *Appl. Environ. Microbiol.* **66**, 5334-5339.
- Ranjard, L., Nazaret, S., Gourbiere, F., Thioulouse, J., Linet, P., and Richaume, A. (2000b). A soil microscale study to reveal the heterogeneity of Hg(II) impact on indigenous bacteria by quantification of adapted phenotypes and analysis of community DNA fingerprints. *FEMS Microbiology Ecology* **31**, 107-115.
- Ranjard, L., Poly, F., Lata, J. C., Mougel, C., Thioulouse, J., and Nazaret, S. (2001). Characterization of Bacterial and Fungal Soil Communities by Automated Ribosomal Intergenic Spacer Analysis Fingerprints: Biological and Methodological Variability. *Appl. Environ. Microbiol.* **67**, 4479-4487.
- Ranjard, L., Poly, F., and Nazaret, S. (2000c). Monitoring complex bacterial communities using culture-independent molecular techniques: application to soil environment. *Research in Microbiology* **151**, 167-177.
- Riber, H. H., and Wetzel, R. G. (1987). Boundary-layer and internal diffusion effects on phosphorus fluxes in lake periphyton. *Limnology and Oceanography* **32**, 1181-94.

- Ricart, M., Barceló, D., Geislinger, A., Guasch, H., Alda, M. L. d., Romani, A. M., Vidal, G., Villagrana, M., and Sabater, S. (2009). Effects of low concentrations of the phenylurea herbicide diuron on biofilm algae and bacteria. *Chemosphere* **76**, 1392-1401.
- Ricciardi, F., Bonninau, C., Faggiano, L., Geislinger, A., Guasch, H., Lopez-Doval, J., Muñoz, I., Proia, L., Ricart, M., Roman, A., and Sabater, S. (2009). Is chemical contamination linked to the diversity of biological communities in rivers? *TrAC - Trends in Analytical Chemistry* **28**, 592-602.
- Rimet, F., Hème de Lacotte, M., Leboulanger, C., Druart, J.-C., and Bérard, A. (1999). Comparaison des effets de l'atrazine et du nicosulfuron sur les communautés phytoplanctoniques du Léman. *Archives Scientifiques de Genève* **52**, 111-122.
- Robbleto, E. A., Borneman, J., and Triplett, E. W. (1998). Effects of Bacterial Antibiotic Production on Rhizosphere Microbial Communities from a Culture-Independent Perspective. *Appl. Environ. Microbiol.* **64**, 5020-5022.
- Rogers, J., Dowsett, A. B., Dennis, P. J., Lee, J. V., and Keevil, C. W. (1994). Influence of Plumbing Materials on Biofilm Formation and Growth of *Legionella pneumophila* in Potable Water Systems. *Appl. Environ. Microbiol.* **60**, 1842-1851.
- Rogers, K. R., Harper, S. L., and Robertson, G. (2005). Screening for toxic industrial chemicals using semipermeable membrane devices with rapid toxicity assays. *Analytica Chimica Acta* **543**, 229-235.
- Romani, A., Fund, K., Artigas, J., Schwartz, T., Sabater, S., and Obst, U. (2008). Relevance of Polymeric Matrix Enzymes During Biofilm Formation. *Microbial Ecology* **56**, 427-436.
- Romani, A. M., Giorgi, A., Acuna, V., and Sabater, S. (2004a). The influence of substratum type and nutrient supply on biofilm organic matter utilization in streams. *Limnology and Oceanography* **49**, 1713-1721.
- Romani, A. M., Guasch, H., Munoz, I., Ruana, J., Vilalta, E., Schwartz, T., Emtiazi, F., and Sabater, S. (2004b). Biofilm structure and function and possible implications for riverine DOC dynamics. *Microbial Ecology* **47**, 316-328.
- Romani, A. M., and Sabater, S. (2000). Influence of algal biomass on extracellular enzyme activity in river biofilms. *Microbial Ecology* **40**, 16-24.
- Sabaliunas, D., Ellington, J., and Neuman, J. (1998a). Semipermeable membrane devices for monitoring pollutants and their effects in aquatic ecosystems of Lithuania. *Critical Reviews in Analytical Chemistry* **28**, 50-50.
- Sabaliunas, D., Ellington, J., and Sabaliuniene, I. (1999). Screening bioavailable hydrophobic toxicants in surface waters with semipermeable membrane devices: Role of inherent oleic acid in toxicity evaluations. *Ecotoxicology and Environmental Safety* **44**, 160-167.
- Sabaliunas, D., Lazutka, J., Sabaliuniene, I., and Sodergren, A. (1998b). Use of semipermeable membrane devices for studying effects of organic pollutants: Comparison of pesticide uptake by semipermeable membrane devices and mussels. *Environmental Toxicology and Chemistry* **17**, 1815-1824.

- Sabaliunas, D., Lazutka, J. R., and Sabaliuniene, I. (2000). Acute toxicity and genotoxicity of aquatic hydrophobic pollutants sampled with semipermeable membrane devices. *Environmental Pollution* **109**, 251-265.
- Sabaliunas, D., and Sodergren, A. (1997). Use of semi-permeable membrane devices to monitor pollutants in water and assess their effects: A laboratory test and field verification. *Environmental Pollution* **96**, 195-205.
- Sabater, S. (2000). Diatom communities as indicators of environmental stress in the Guadiamar River, S-W. Spain, following a major mine tailings spill. *Journal of Applied Phycology* **12**, 113-124.
- Sabater, S., and Admiraal, W. (2005). Periphyton as Biological Indicators in Managed Aquatic Ecosystems. In *Periphyton. Ecology, Exploitation and Management* (M. E. Azim, M. C. J. Verdegem, A. A. van Dam and M. C. M. Beveridge, eds.). CABI Publishing, Cambridge, MA, USA.
- Sabater, S., Buchaca, T., Cambra, J., Catalan, J., Guasch, H., Ivorra, N., Muñoz, I., Navarro, E., Real, M., and Romaní, A. (2003). STRUCTURE AND FUNCTION OF BENTHIC ALGAL COMMUNITIES IN AN EXTREMELY ACID RIVER. *Journal of Phycology* **39**, 481-489.
- Sabater, S., Guasch, H., Ricart, M., Romaní, A., Vidal, G., Klünder, C., and Schmitt-Jansen, M. (2007). Monitoring the effect of chemicals on biological communities. The biofilm as an interface. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* **387**, 1425-1434.
- Sabater, S., Guasch, H., Romaní, A., and Muñoz, I. (2002). The effect of biological factors on the efficiency of river biofilms in improving water quality. *Hydrobiologia* **469**, 149-156.
- Sánchez-Marín, P., Santos-Echeandía, J., Nieto-Cid, M., Álvarez-Salgado, X. A., and Beiras, R. (2010). Effect of dissolved organic matter (DOM) of contrasting origins on Cu and Pb speciation and toxicity to *Paracentrotus lividus* larvae. *Aquatic Toxicology* **96**, 90-102.
- Sanders, R. W., Porter, K. G., Bennett, S. J., and DeBiase, A. E. (1989). Seasonal patterns of bacterivory by flagellates, ciliates, rotifers, and cladocerans in a freshwater planktonic community. *Limnology and Oceanography* **34**, 673-87.
- Schloss, P. D., Hay, A. G., Wilson, D. B., and Walker, L. P. (2003). Tracking temporal changes of bacterial community fingerprints during the initial stages of composting. *FEMS Microbiology Ecology* **46**, 1-9.
- Schmitt-Jansen, M., and Altenburger, R. (2005). Toxic effects of isoproturon on periphyton communities - a microcosm study. *Estuarine, Coastal and Shelf Science* **62**, 539-545.
- Schmitt-Jansen, M., and Altenburger, R. (2008). Community-level microalgal toxicity assessment by multiwavelength-excitation PAM fluorometry. *Aquatic Toxicology* **86**, 49-58.
- Schmitt-Jansen, M., Veit, U., Dudel, G., and Altenburger, R. (2008). An ecological perspective in aquatic ecotoxicology: Approaches and challenges. *Basic and Applied Ecology* **9**, 337-345.
- Schmitt, H., Haapakangas, H., and van Beelen, P. (2005). Effects of antibiotics on soil microorganisms: time and nutrients influence pollution-induced community tolerance. *Soil Biology and Biochemistry* **37**, 1882-1892.

- Schwarzenbach, R. P., Escher, B. I., Fenner, K., Hofstetter, T. B., Johnson, C. A., von Gunten, U., and Wehrli, B. (2006). The Challenge of Micropollutants in Aquatic Systems. *Science* **313**, 1072-1077.
- Seguin, F., Le Bihan, F., Leboulanger, C., and Berard, A. (2002a). A risk assessment of pollution: induction of atrazine tolerance in phytoplankton communities in freshwater outdoor mesocosms, using chlorophyll fluorescence as an endpoint. *Water Research* **36**, 3227-3236.
- Seguin, F., Le Bihan, F., Leboulanger, C., and Berard, A. (2002b). A risk assessment of pollution: induction of atrazine tolerance in phytoplankton communities in freshwater outdoor mesocosms, using chlorophyll fluorescence as an endpoint. *Water Research* **36**, 3227-3236.
- Sequerra, J., Marmesse, R., Valla, G., Normand, P., Capellano, A., and Moiroud, A. (1997). Taxonomic position and intraspecific variability of the nodule forming *Penicillium nodositatum* inferred from RFLP analysis of the ribosomal intergenic spacer and Random Amplified Polymorphic DNA. *Mycological Research* **101**, 465-472.
- Serra, A., Corcoll, N., and Guasch, H. (2009a). Copper accumulation and toxicity in fluvial periphyton: The influence of exposure history. *Chemosphere* **74**, 633-641.
- Serra, A., and Guasch, H. (2009). Effects of chronic copper exposure on fluvial systems: Linking structural and physiological changes of fluvial biofilms with the in-stream copper retention. *Science of The Total Environment* **407**, 5274-5282.
- Serra, A., Guasch, H., Admiraal, W., Van Der Geest, H. G., and Van Beusekom, S. A. M. (2010). Influence of phosphorus on copper sensitivity of fluvial periphyton: The role of chemical, physiological and community-related factors. *Ecotoxicology* **19**, 770-780.
- Serra, A., Guasch, H., Marti, E., and Geislinger, A. (2009b). Measuring in-stream retention of copper by means of constant-rate additions. *Science of the Total Environment* **407**, 3847-3854.
- Servais, P., Anzil, A., and Ventresque, C. (1989). Simple method for determination of biodegradable dissolved organic carbon in water. *Applied and Environmental Microbiology* **55**, 2732-2734.
- Servais, P., Barillier, A., and Garnier, J. (1995). Determination of the biodegradable fraction of dissolved and particulate organic carbon in waters. *Annales de Limnologie* **31**, 75-80.
- Servais, P., Billen, G., Garnier, J., Idlafikh, Z., Mouchel, J. M., Seidl, M., and Meybeck, M. (1998). Carbone organique : origines et biodégradabilité. In *La Seine en son bassin : Fonctionnement écologique d'un système fluvial anthropisé* (M. Meybeck, G. de Marsily and E. Fustec, eds.). Elsevier.
- Sigee, D. C. (2005). *Freshwater Microbiology. Biodiversity and Dynamic Interactions of Microorganisms in the Aquatic Environment*. John Wiley & Sons, Chichester, UK.
- Sigler, W. V., Crivii, S., and Zeyer, J. (2002). Bacterial Succession in Glacial Forefield Soils Characterized by Community Structure, Activity and Opportunistic Growth Dynamics. *Microbial Ecology* **44**, 306-316.
- Sigler, W. V., and Zeyer, J. (2002). Microbial Diversity and Activity along the Forefields of Two Receding Glaciers. *Microbial Ecology* **43**, 397-407.

- Singh, R., Paul, D., and Jain, R. K. (2006). Biofilms: implications in bioremediation. *Trends in Microbiology* **14**, 389-397.
- Sinsabaugh, R. L., Findlay, S., Franchini, P., and Fischer, D. (1997). Enzymatic analysis of riverine bacterioplankton production. *Limnology and Oceanography* **42**, 29-38.
- Sinsabaugh, R. L., and Foreman, C. M. (2001). Activity profiles of bacterioplankton in a eutrophic river. *Freshwater Biology* **46**, 1239-1249.
- Sinsabaugh, R. L., Golladay, S. W., and Linkins, A. E. (1991). Comparison of epilithic and epixylic biofilm development in a boreal river. *Freshwater Biology* **25**, 179-187.
- Sládeček, V., and Sládečková, A. (1964). Determination of the periphyton production by means of the glass slide method. *Hydrobiologia* **V23**, 125-158.
- Slaveykova, V. I., Wilkinson, K. J., Ceresa, A., and Pretsch, E. (2003). Role of Fulvic Acid on Lead Bioaccumulation by *Chlorella kesslerii*. *Environ. Sci. Technol.* **37**, 1114-1121.
- Smoot, J. C., Langworthy, D. E., Levy, M., and Findlay, R. H. (1998). Periphyton growth on submerged artificial substrate as a predictor of phytoplankton response to nutrient enrichment. *Journal of Microbiological Methods* **32**, 11-19.
- Smucker, N., DeForest, J., and Vis, M. (2009). Different methods and storage duration affect measurements of epilithic extracellular enzyme activities in lotic biofilms. *Hydrobiologia* **636**, 153-162.
- Soldo, D., and Behra, R. (2000). Long-term effects of copper on the structure of freshwater periphyton communities and their tolerance to copper, zinc, nickel and silver. *Aquatic Toxicology* **47**, 181-189.
- Spiegelman, D., Whissel, G., and Greer, C. W. (2005). A survey of the methods for the characterization of microbial consortia and communities. *Canadian Journal of Microbiology* **51**, 355-86.
- Stevenson, R. J. (1983). Effects of Current and Conditions Simulating Autogenically Changing Microhabitats on Benthic Diatom Immigration. *Ecology* **64**, 1514-1524.
- Stevenson, R. J. (1996). An Introduction to Algal Ecology in Freshwater Benthic Habitats. In *Algal Ecology: Freshwater Benthic Habitats* (R. J. Stevenson, M. L. Bothwell and R. L. Lowe, eds.), pp. 321-340. Academic Press, San Diego.
- Sutherland, I. W. (2001a). The biofilm matrix - an immobilized but dynamic microbial environment. *Trends in Microbiology* **9**, 222-227.
- Sutherland, I. W. (2001b). Exopolysaccharides in biofilms, flocs and related structures. In *Water Science and Technology*, Vol. 43, pp. 77-86.
- Suzuki, M. T., and Giovannoni, S. J. (1996). Bias caused by template annealing in the amplification of mixtures of 16S rRNA genes by PCR. *Appl. Environ. Microbiol.* **62**, 625-630.
- Tamura, K., Dudley, J., Nei, M., and Kumar, S. (2007). MEGA4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) Software Version 4.0. *Mol Biol Evol* **24**, 1596-1599.

- Tenenhaus, M. (1998). *La régression PLS : théorie et pratique*. Editions TECHNIP, Paris.
- Thakuria, D., Schmidt, O., Mac Siúrtáin, M., Egan, D., and Doohan, F. M. (2008). Importance of DNA quality in comparative soil microbial community structure analyses. *Soil Biology and Biochemistry*.
- Thomas, S., Gaiser, E., and Tobias, F. (2006). Effects of shading on calcareous benthic periphyton in a short-hydroperiod oligotrophic wetland (Everglades, FL, USA). *Hydrobiologia* **569**, 209-221.
- Thouvenot, M., Billen, G., and Garnier, J. (2007). Modelling nutrient exchange at the sediment-water interface of river systems. *Journal of Hydrology* **341**, 55-78.
- Tien, C. J., Wu, W. H., Chuang, T. L., and Chen, C. S. (2009). Development of river biofilms on artificial substrates and their potential for biomonitoring water quality. *Chemosphere* **76**, 1288-1295.
- Tubbing, D. M. J., and Admiraal, W. (1991). Sensitivity of bacterioplankton in the Rhine River to various toxicants measured by thymidine incorporation and activity of exoenzymes. *Environmental Toxicology and Chemistry* **10**, 1161-1172.
- Tusseau-Vuillemin, M.-H., Gourlay, C., Lorgeoux, C., Mouchel, J.-M., Buzier, R., Gilbin, R., Seidel, J.-L., and Elbaz-Poulichet, F. (2007). Dissolved and bioavailable contaminants in the Seine river basin. *Science of The Total Environment* **375**, 244-256.
- Tusseau-Vuillemin, M. H., Gilbin, R., Bakkaus, E., and Garric, J. (2004). Performance of diffusion gradient in thin films to evaluate the toxic fraction of copper to *Daphnia magna*. *Environmental Toxicology and Chemistry* **23**, 2154-2161.
- Tusseau-Vuillemin, M. H., Mortier, L., and Herbaut, C. (1998). Modeling nitrate fluxes in an open coastal environment (Gulf of Lions): Transport versus biogeochemical processes. *Journal of Geophysical Research C: Oceans* **103**, 7693-7708.
- v. Wintzingerode, F., Gobel, U. B., and Stackebrandt, E. (1997). Determination of microbial diversity in environmental samples: pitfalls of PCR-based rRNA analysis. *FEMS Microbiology Reviews* **21**, 213-229.
- Valeur, B. (2002). *Molecular fluorescence: Principles and application*.
- Valeur, B. (2004). *Invitation à la fluorescence moléculaire*.
- Vannote, R. L., Minshall, G. W., Cummins, K. W., Sedell, J. R., and Cushing, C. E. (1980). The river continuum concept. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences* **37**, 130-137.
- Versace, F. (2009). La méthode PICT appliquée à la problématique des rejets urbains : Application in situ du test d'activité β -glucosidase du périphyton, Cemagref Antony, Unité de recherche HBAN, équipe BELCA.
- Vis, C., Hudon, C., Cattaneo, A., and Pinel-Alloul, B. (1998). Periphyton as an indicator of water quality in the St Lawrence River (Quebec, Canada). *Environmental Pollution* **101**, 13-24.
- Vu, B., Chen, M., Crawford, R. J., and Ivanova, E. P. (2009). Bacterial extracellular polysaccharides involved in biofilm formation. *Molecules* **14**, 2535-2554.

- Wang, W., Wang, W., Zhang, X., and Wang, D. (2002). Adsorption of p-chlorophenol by biofilm components. *Water Research* **36**, 551-560.
- Watanabe, T. (1985). Etude de la relation entre le périphyton et la qualité chimique de l'eau des rivières : utilisation des bioessais "in situ" (substrats artificiels) pour caractériser l'état de pollution des eaux. In *Hydrobiologie*, p. 127. Université Paul Sabatier de Toulouse (Sciences), Toulouse.
- Watkins, L., and Costerton, J. W. (1984). Growth and biocide resistance of bacterial biofilms in industrial systems. *Chemical Times and Trends* **7**, 35-40.
- Wellnitz, T. A., and Ward, J. V. (2000). Herbivory and irradiance shape periphytic architecture in a Swiss alpine stream. *Limnology and Oceanography* **45**, 64-75.
- Wetzel, R. G., and Likens, G. E. (1991). *Limnological Analyses*. Springer-Verlag, New York, NY, USA.
- White, T. J., Bruns, T., Lee, S., and Talor, J. (1990). Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In *PCR Protocols : A Guide to Methods and Applications* (M. A. Innes, D. H. Gelfand, J. J. Sninsky and T. J. White, eds.), pp. 315-22. Academic Press, New York, USA.
- Wimpenny, J., Manz, W., and Szewzyk, U. (2000). Heterogeneity in biofilms. *FEMS Microbiology Reviews* **24**, 661-671.
- Wimpenny, J. W. T. (2000). An overview of biofilms as functional communities. In *Community Structure and Co-operation in Biofilms* (D. G. Allison, P. Gilbert, H. M. Lapin-Scott and M. Wilson, eds.), pp. 1-24. Cambridge University Press, Cambridge, UK.
- Wimpenny, J. W. T., and Colasanti, R. (1997). A unifying hypothesis for the structure of microbial biofilms based on cellular automaton models. *FEMS Microbiology Ecology* **22**, 1-16.
- Wood, S. A., Rueckert, A., Cowan, D. A., and Cary, S. C. (2008). Sources of edaphic cyanobacterial diversity in the Dry Valleys of Eastern Antarctica. *ISME J* **2**, 308-320.
- Yannarell, A. C., Kent, A. D., Lauster, G. H., Kratz, T. K., and Triplett, E. W. (2003). Temporal Patterns in Bacterial Communities in Three Temperate Lakes of Different Trophic Status. *Microbial Ecology* **46**, 391-405.
- Yannarell, A. C., and Triplett, E. W. (2004). Within- and between-Lake Variability in the Composition of Bacterioplankton Communities: Investigations Using Multiple Spatial Scales. *Appl. Environ. Microbiol.* **70**, 214-223.
- Yannarell, A. C., and Triplett, E. W. (2005). Geographic and Environmental Sources of Variation in Lake Bacterial Community Composition. *Appl. Environ. Microbiol.* **71**, 227-239.
- Ylla, I., Borrego, C., M. Román, A., and Sabater, S. (2009). Availability of glucose and light modulates the structure and function of a microbial biofilm. *FEMS Microbiology Ecology* **69**, 27-42.
- Zevenhuizen, L. P. T. M., Dolfing, J., Eshuis, E. J., and Scholten-Koerselman, I. J. (1979). Inhibitory effects of copper on bacteria related to the free ion concentration. *Microbial Ecology* **5**, 139-146.

Zheng, T., Hong, H., Wang, F., Maskaoui, K., Su, J., and Tian, Y. (2002). The distribution characteristics of bacterial [beta]-glucosidase activity in Taiwan strait. *Marine Pollution Bulletin* **45**, 168-176.