université de BORDEAUX

THÈSE PRÉSENTÉE

POUR OBTENIR LE GRADE DE

DOCTEUR DE

L'UNIVERSITÉ DE BORDEAUX

ÉCOLE DOCTORALE DES SCIENCES CHIMIQUES

SPÉCIALITÉ CHIMIE ANALYTIQUE ET ENVIRONNEMENTALE

Par Nathalie COQUILLÉ

Influence de la matière organique dissoute naturelle et d'herbicides, seuls et combinés, sur des microalgues marines et d'eau douce

Sous la direction de :
Édith PARLANTI, Soizic MORIN et Sabine STACHOWSKI-HABERKORN

Soutenue le 04 Avril 2017

Membres du jury :

Mme BUDZINSKI Hélène	Directrice de recherche, Université de Bordeaux	Présidente
M. SABATER Sergi	Professeur, Université de Girone - ICRA	Rapporteur
M. CLAQUIN Pascal	Professeur, Université de Caen Basse Normandie	Rapporteur
Mme GOUTX Madeleine	Directrice de recherche, Université Aix-Marseille	Examinateur
Mme FARCY Emilie	Maître de Conférences, Université de Montpellier	Examinateur

UMR CNRS EPOC Environnements et Paléoenvironnements Océaniques et Continentaux
Irstea - Unité de Recherche Ecosystèmes Aquatiques et Changements Globaux
Ifremer - Unité Biogéochimie et Écotoxicologie

SOMMAIRE

Remerciements 7

Avant-propos 11

Valorisation scientifique 13

Table des illustrations 17

Liste des abréviations 24

Introduction générale 27

Chapitre 1 – Contexte général 33

1. Les microalgues 35

1.1. Définition 35

1.2. Les Bacillariophycées (Embranchement des Bacillariophytes) 35

1.3. Embranchement des Chlorophytes 36

1.4. Métabolisme des microalgues : la photosynthèse 36

1.5. Facteurs influençant le développement microalgal 38

1.6. Rôle dans les écosystèmes 42

1.7. Les microalgues, organismes modèles 43

2. La matière organique 44

2.1. Généralités 44

2.2. Origine de la MOD aquatique 44

2.3. Composition de la MOD 47

2.4. Rôle dans les écosystèmes 49

3. Les pesticides 52

3.1. Définition 52

3.2. Historique et utilisation 52

3.3. Facteurs de transfert des pesticides dans l'environnement aquatique 53

3.4. État des lieux de la contamination aquatique 56

3.5. Réglementation 60

3.6. Devenir et toxicité des pesticides dans l'environnement aquatique 62

3.7. Caractéristiques et toxicité des pesticides choisis vis-à-vis des microalgues 65

4. Objectifs de l'étude 71

Chapitre 2 – Matériels et Méthodes 73

1. Prélèvement et isolement de la matière organique dissoute (MOD) naturelle 75

1.1. Choix des sites 75

1.1. Prélèvement de la MOD naturelle 76

1.2. Isolement de la MOD naturelle 76

2. Matériel biologique 79

2.1. Espèces dulçaquicoles 79

2.2. Espèces marines 80

3. Préparation des solutions de pesticides 81

4. Principe des expérimentations 82

5. Analyses biologiques 86

5.1. Cytométrie en flux 86

5.2. Mesure de l'efficacité photosynthétique par fluorimétrie PAM 90

6. Caractérisation de l'environnement chimique 91

6.1. Dosage des pesticides 91

6.2. Dosage des sels nutritifs 92

6.3. Carbone organique dissous (COD) 93

6.4. Caractérisation de la MOD 94

7. Analyses statistiques 99

Chapitre 3 – Étude préliminaire n°1 101

1. Introduction 103

2. Article 1: Use of diatom motility features as endpoints of metolachlor toxicity 104

2.1. Introduction 106

2.2. Materials and methods 107

2.3. Results 110

2.4. Discussion 115

2.5. Conclusions and perspectives 119

3. Synthèse 121

Chapitre 4 – Étude préliminaire n°2 123

1. Introduction 125

2. Article 2: Microalgal sensitivity varies between a diuron-resistant strain and two wild strains when exposed to diuron and irgarol, alone and in mixtures 126
2.1. Introduction 128
2.2. Materials and methods 130
2.3. Results 134
2.4. Discussion 139
2.5. Conclusions 144
3. Synthèse 146
Chapitre 5 – Interactions entre les microalgues et la matière organique dissoute naturelle 147
1. Introduction 149
2. Article 3: Interactions between microalgae and natural dissolved organic matter 150
2.1. Introduction 152
2.2. Materials and methods 153
2.3. Results 161
2.4. Discussion 169
2.5. Conclusions 174
3. Synthèse 176
Chapitre 6 – Modulation de la toxicité des herbicides vis-à-vis de microalgues marines en présence de MOD 179
1. Introduction 181
2. Article 4: The influence of natural dissolved organic matter on herbicide toxicity to marine microalgae is species-dependent 182
2.1. Introduction 183
2.2. Materials and methods 185
2.3. Results 191
2.4. Discussion 200
2.5. Conclusions 207
3. Synthèse 208
Chapitre 7 – Devenir et toxicité des herbicides sur des microalgues d'eau douce en présence de MOD 211

1. Introduction 213
2. Article 5: Fate and effects of herbicides on the freshwater microalga *Sphaerellopsis* sp. 214
2.1. Introduction 215
2.2. Materials and methods 216
2.3. Results and discussion 218
3. Devenir et toxicité vis-à-vis de *Gomphonema gracile* 224
3.1. Concentrations d'exposition 224
3.1. Devenir et toxicité des herbicides 226
4. Synthèse 228
Chapitre 8 – Synthèse générale et perspective 231
1. Toxicité des herbicides étudiés 233
1.1. Variabilité interspécifique des réponses des microalgues vis-à-vis de l'exposition aux herbicides 235
1.2. Toxicité des herbicides seuls et en mélange 237
1.3. Descripteurs biologiques 238
2. Influence de la MOD sur les microalgues 239
3. La MOD: un facteur important de modulation de la toxicité des herbicides 241
3.1. Interactions MOD/pesticides 241
3.2. Influence de composants organiques dissous sur les microalgues 241
3.3. Système de détoxification 242
4. Modifications engendrées par les microorganismes sur leur environnement chimique 243
4.1. Modifications qualitatives et quantitatives de la MOD 243
4.2. Devenir des pesticides 243
5. Perspectives 245
5.1. À l'échelle de l'espèce 245
5.2. À l'échelle des communautés 247
Bibliographie 249
Annexes 277
Résumé 282
Abstract 282

Remerciements

Parce qu'une thèse est loin d'être une « aventure » que l'on fait seule, le temps est venu pour moi de remercier l'ensemble des personnes ayant participé, de près ou de loin, aux expérimentations et m'ayant accompagnée un bout ou tout au long de ce chemin. Je m'excuse d'avance et remercie toutes les personnes que j'aurais pu oublier…

Je tiens tout d'abord à remercier les financeurs de ces travaux de thèse. Un grand merci donc au LabEx COTE et à Irstea Bordeaux.

Je remercie Pascal CLAQUIN et Sergi SABATER d'avoir accepté d'être les rapporteurs de cette thèse. Merci également aux autres membres du jury Madeleine GOUTX, Émilie FARCY et Hélène BUDZINKI, en tant que présidente du jury, d'avoir accepté d'examiner ces travaux de thèse. Merci à vous pour les questions, remarques et échanges lors de ma soutenance.

Mes remerciements vont ensuite aux membres de mon comité de thèse. Merci à Madeleine GOUTX, Jean-François GHIGLIONE, Dominique MUNARON et Vincent ROUBEIX pour tous ces échanges et surtout pour toutes vos questions et précieux conseils.

Je remercie Daniel POULAIN et Éric ROCHARD de m'avoir accueillie au sein des unités REBX et EABX d'Irstea Bordeaux. Je remercie également Antoine GRÉMARE de m'avoir accueillie au sein de l'unité EPOC de l'Université de Bordeaux et Thierry BURGEOT pour son accueil au sein de l'unité BE d'Ifremer Nantes.

Un très grand merci à Juliette ROSEBERY, chef de l'équipe CARMA d'Irstea, Hélène BUDZINSKI, chef de l'équipe LPTC de l'Université de Bordeaux et Farida AKCHA, chef du laboratoire d'Écotoxicologie d'Ifremer, pour leur accueil, leur gentillesse et les échanges que nous avons eus au cours de ces trois années et demie.

Je tiens ensuite à profondément remercier mes trois directrices de thèse : Soizic MORIN, Sabine STACHOWSKI-HABERKORN et Édith PARLANTI. Un simple paragraphe ne suffit pas pour vous dire à quel point je vous remercie pour tout ce que vous avez fait pour moi !! Cela n'a pas toujours été facile de se partager entre les trois labos qui sont sur deux sites géographiques, mais vous avez toujours été là ! Vous m'avez aidée à grandir (et oui !) et m'avez aidée et soutenue quand c'était plus que nécessaire (notamment une semaine avant le rendu du manuscrit…). MERCI pour votre confiance, votre patience, votre disponibilité, vos conseils et votre réactivité ! MERCI pour votre bonne humeur pendant et en dehors des manips, pour ces fous-rires, pour toutes les nombreuses discussions que nous avons eues !! Comment vous dire… Je vous dois énormément et ne peux résumer tout ça en quelques phrases… En tout cas, cela a été un pur plaisir de travailler avec vous, vous êtes EXCEPTIONNELLES !! J'espère vraiment de tout cœur que nous aurons l'occasion de retravailler ensemble !!

Cette thèse s'est déroulée entre trois laboratoires localisés sur deux villes, Bordeaux et Nantes. Je souhaite donc remercier toutes les personnes de ces équipes.

Tout d'abord à Bordeaux et plus spécifiquement à Irstea :

Soizic, un énorme merci pour tes conseils, ton aide, ces discussions autour d'un café ou d'une cigarette ;-) Merci pour ton soutien au quotidien (et surtout à la fin !) et lorsque des choses inexpliquées se sont passées au labo et ont fait se déformer mes filles… Merci également de m'avoir laissé « jouer » avec les diatomées et surtout de m'avoir laissé les filmer (ouhhh) pour mesurer à quel point elles surfent sur leur caca ☺ Bref mille mercissss !!

Merci à la « bande » lézard, Mélissa, Julie, Nina, Karine, Gaëlle, Seb, Marie W., Thibault, Thibaud et Cristina pour votre super bonne humeur, ces fous-rires inoubliables (non on n'entend pas que nous !), les pauses, les discussions, votre soutien et vos conseils ! Merci pour tout !

MERCI petit ninja (des bois et maintenant du lac ☺) pour tes apparitions impromptues à la fenêtre, pour THE carte et ta précieuse aide avec R (le logiciel démoniaque qui vous rend chauve/chèvre...) !

Merci Gwilherm et Sylvia pour votre aide pour les cultures, les commandes et votre gentillesse. Merci à vous, Jacky, Juliette, Jean-Claude et Jade pour votre aide pendant les manips, nos échanges et votre jovialité ! Merci Vincent, Christophe, Aurélien, François, Michel, Christian, Jennifer et Julie pour votre bonne humeur et ces nombreuses discussions (parfois endiablées, hein Michel). Et enfin merci à mes collègues de bureau, Laura, Sandrine, Caroline et Floriane, pour leur soutien et nos échanges/bavardages. Vous avez su aussi me supporter (faut quand même l'avouer ☺)! Bon courage les filles (Thibault tu es inclus dans « les filles » ☺) pour la fin de vos thèses, vous allez tout déchirer !!

Un très grand merci également au pôle chimie. Merci Nicolas de m'avoir « recueillie » pendant la dernière ligne droite de ma rédaction lorsque les travaux ont commencé. MERCI ma petite Mélissa pour ton soutien, tes attentions (quand j'étais un peu au bout du rouleau) et d'avoir pris soin de moi notamment à la fin… ☺ Merci Brigitte pour ta bonne humeur, ton soutien et toutes ces discussions ! Merci également Marion, Bertille et Betty d'avoir vérifié que j'étais toujours en vie le soir au labo ☺, pour le chocolat, votre soutien et pour nos bavardages ! Bon courage pour la suite de vos thèses, vous allez grave assurer les filles, j'en suis sûre !! Merci également à Aurélie, Kewin et Éloïse !

Je souhaite également remercier Cathy F. et Cathy R. pour nos fous-rires, nos discussions et leur aide ! Merci également à Maryse, Élodie pour leur aide et à Charlotte et Maria pour nos nombreuses discussions ☺.

Toujours à Bordeaux mais maintenant au LPTC :

Édith, un grand merci pour nos échanges, ton aide, tes conseils et avis ! La MOD n'a (presque) plus de secret pour moi grâce à toi ! Merci pour ta confiance, ton soutien (surtout à la fin !) et d'avoir supporté la proximité de ton bureau avec celui que j'occupais avec mon acolyte ;-) Bref, merci beaucoup !

Un très grand MERCI également à mon binôme de bureau et de chanson/danse... Jérémie. Merci pour ton soutien, nos bavardages et d'avoir été là pour les réparations ! Ô combien merci aussi pour ces chansons animées, les chats et le sinois ! Ce bureau n'aurait pas été le même sans toi ! Bon courage pour la suite et bon voyage en Amérique avec ton petit chat et bientôt ton petit chaton ☺.

Je remercie également Clara, Mahaut, Céline et tous les stagiaires pour nos conversations autour d'un café ☺.

Un très grand MERCI à Hélène pour son avis expert et son aide dans le choix des pesticides ! Merci également pour les conseils et tous les échanges que nous avons eus !

Merci Nathalie T., Aurélie, Lucas et Patrick pour votre aide pendant les manips, pour les analyses et pour votre jovialité !

Merci Vincent D., Justine, Laura F., Mathilde, Laurine, Caroline pour votre bonne humeur, votre soutien, nos échanges et rigolades ! Bon courage pour la fin, vous allez assurer, j'en suis sûre !!

Enfin, je remercie également les autres membres du LPTC, Marie-Hélène, Karyn, Nathalie G., Pierre L., Sylvie, Céline, Manu, Laurent, Thomas et à Claire et Adrien du LabEx pour leur jovialité et les pauses gâteaux.

Passons aux Nantais maintenant :

Sabine … que dire ? Cela fait maintenant déjà 5 ans et demi (!!!) que l'on se connaît et que j'ai eu le plaisir de travailler avec toi. Depuis le début tu as toujours été là et si j'ai pu faire cette thèse, c'est aussi grâce à toi ! Pour cela, déjà, un immense merci ! MERCI aussi pour ton professionnalisme, ta précision, ta pointillure (il n'existe pas de mot alors je l'invente rien que pour toi ! Et ça, ce n'est pas Jean-Claude qui le dit !! ☺), ton soutien, tes avis, ton aide… Et je ne peux terminer ce paragraphe sans te dire merci de m'avoir accueillie dans ton bureau, pour tous ces fous rires (mon dieu…), ces chansons (Steven et Europe n'ont qu'à bien se tenir !!), ces dessins inspirés, ces photos… Bref mille mercis !!

Après t'avoir dit tout cela, je ne peux faire autrement qu'embrayer sur Chouchounet, El-chouchounito ou FC quand vraiment il n'est pas « saze » ou qu'il nous abandonne à cause d'huîtres pas fraîches… Merci d'avoir été un super méga stagiaire !! Merci pour ton professionnalisme, tes conseils et avis, ton aide et soutien, toutes ces discussions parfois endiablées avec notre Seigneur. Merci également pour ces fous-rires, ta bonne humeur, ces chansons, ces dessins impromptus qui viennent quand on ne s'y attend pas (enfin si, quand-même un peu…). Bon courage à toi pour la fin de ta thèse tu vas déchirer à fond !!! En tout cas une chose est sûre, je ne pensais pas un jour pouvoir tomber sur deux personnes aussi … que moi (vous mettrez le mot que vous voulez hein ☺). Le bunker nous attend ☺ Merci à vous deux, ces quelques années n'auraient pas été les mêmes sans vous !!!

Un immense merci à toi aussi, Dom, pour ton aide pendant les manips ! Merci également pour ta bonne humeur, ces fous-rires (aaah Ginette…), tes mouchoirs, la farine... ☺

Merci Audrey pour ces rigolades, ta folie et d'avoir compris (subi ?) et parfois même chanté ces chansons d'un autre monde ! ☺

Un immense merci aussi à vous, Julien et Larissa, pour votre aide pour les manips ! Merci à vous et à Farida, Thierry et Rossana pour votre bonne humeur, votre soutien, vos conseils et toutes nos discussions ! Ça a été un pur plaisir d'être avec vous pendant toutes ces années !!

Je remercie également Tiphaine et Aourell pour leur jovialité, leurs suggestions et toutes nos conversations pendant et en dehors des restos !

Enfin, un peu plus loin que Nantes… Merci à toi Stéphane pour tes conseils, les sushis mais aussi pour ces fous-rires ! Je ne suis pas prête d'oublier Angers et Banyuls !!! Inoubliable et à refaire…

La thèse étant bien plus qu'un simple investissement professionnel, je ne peux finir ces remerciements sans remercier mes amis et ma famille...

Un très grand MERCI à la bande « portes ouvertes », Julie, Seb, Marie, Simon (et oui lui aussi était toujours de la partie !), Thibault, Nicolas, Mélissa, Renaud et Maély ! MERCI pour votre bonne humeur, les dégustations de bière, les soirées Carcassonne et votre soutien ! Je ne suis pas prête d'oublier nos escapades !!

Un immense MERCI à vous mes chicas Mélissa, Nina, Julie et Karine. MERCI d'avoir été là tout du long, de m'avoir soutenue, encouragée, boostée, aidée. Merci à Karine, Louis et Julie pour ces films inoubliables (Vive Limoges, les chats et les requins !) !! Merci pour ces fous-rires, ces stages de danse, ces sorties, ces

week-ends filles inoubliables (qui ne sont pas prêts de s'arrêter malgré la distance !!)… Bref, MERCI pour tout, vous êtes les meilleures (mais ça vous le savez ☺) !!

Un immense MERCI à ma famille d'adoption (et oui, frérot et moi avons signé…) !! MERCI Roger et Tante Ernest pour tout ce que vous avez fait pour moi… Roger tu as sauvé mon rendu pdf de thèse et pour cela Ô combien MERCI !! Merci également à mon frérot et ma Caro !! Merci à vous 4 pour tous ces week-ends, ces concerts et ces soirées endiablées. Merci pour la pâte à modeler, Cranium, Steven R., le sheriff, les stylos blancs... grâce à vous j'ai réveillé mon côté artistique !!

Un énorme MERCI à mes Biches. Quelle bouffée d'oxygène vous avez été toutes ces années d'avant et pendant thèse… Merci pour votre folie, nos soirées, nos week-ends et nos fous-rires ! MERCI d'avoir été là même si une très grande distance nous sépare maintenant pour certaines d'entre nous (promis je viendrai à Tahiti !!). Enfin MERCI à toi mon Bichon et toute ta famille, Jean-Louis, Bébé choux, Lenny, Titi et Christian, d'avoir toujours été là quand je rentrais sur Brest !

Enfin je finis cette longue prose pour dire un profond, immense et incommensurable MERCI à ma famille !! Merci à vous Mémé, Didier, Maju et Michmich d'avoir été là et d'avoir cru en moi !! Un milliard de MERCIS à mon Chouqu's et à ma sœur Valochon (🌴)!! Merci d'avoir toujours été mon sas de décompression, d'avoir été là, de m'avoir soutenue, encouragée, aidée… et la liste est encore très longue ! Merci pour votre immense folie (si je mettais moins, je ne serais pas crédible ☺) comparable à la mienne (quoique..) !! ☺ Et merci mon tisœur d'avoir pris soin de moi quand tu le pouvais, pour les relectures et surtout de m'avoir sauvé pour les schémas !!! Enfin, un milliard (et même plus) de MERCIS à vous Papa et Maman !! Vous avez toujours cru en nous, vous nous avez toujours soutenus, aidés, encouragés dans nos choix et ce indépendamment des sacrifices qu'ils ont engendré, la distance étant un parfait exemple… C'est vous qui avez éveillé cette passion pour la mer et avez fait ce que je suis ! MERCI pour tout ce que vous avez fait depuis toujours (y compris le super pot ☺)!! Que ferais-je sans vous 4 ?? Rien en fait, vous êtes tout pour moi ! Je vous aime !

Avant-propos

Cette thèse a été réalisée grâce au soutien financier de l'Agence Nationale de la Recherche (ANR) dans le cadre du programme Investissements d'Avenir, au sein du Laboratoire d'Excellence COTE (ANR-10-LABX-45) et les cinq derniers mois de la thèse grâce au soutien financier d'Irstea Bordeaux (UR EABX). Le financement du LabEx COTE a été obtenu dans le cadre du projet IMPACT, dans lequel s'inscrit cette thèse : « Influence de la qualité de la Matière organique dissoute sur la toxicité des Pesticides vis-à-vis des micro-Algues le long d'un ConTinuum eau douce – eau marine », coordonné par Soizic MORIN, chargée de recherche à Irstea Bordeaux.

Cette thèse a été codirigée par :

- Madame Édith PARLANTI, chargée de recherche au sein de l'équipe Physico et Toxico Chimie de l'environnement (LPTC) de l'UMR EPOC 5805 CNRS de l'Université de Bordeaux ;
- Madame Soizic MORIN, chargée de recherche au sein de l'équipe Contaminants Anthropiques et Réponses des Milieux Aquatiques (CARMA) de l'UR EABX d'Irstea Bordeaux ;
- Madame Sabine STACHOWSKI-HABERKORN, chargée de recherche au sein du Laboratoire d'Écotoxicologie (LEX) de l'unité Biogéochimie et Écotoxicologie d'Ifremer (Centre Atlantique).

Elle a ainsi été réalisée entre trois laboratoires rassemblant des connaissances sur :

- l'étude de la présence, des transports et transferts inter-compartiments, de la réactivité, des phénomènes de bioaccumulation et de biotransformation ainsi que de l'impact des contaminants organiques au niveau moléculaire (EPOC-LPTC – CNRS/Université de Bordeaux) ;
- la caractérisation du fonctionnement et des réponses des communautés végétales aquatiques (macrophytes, phytoplancton et phytobenthos) sous l'influence de diverses catégories d'altérations anthropiques en cours d'eau et plans d'eau (Équipe CARMA – Irstea Bordeaux) ;
- l'étude des conséquences de l'exposition à certaines familles de polluants chimiques (pesticides, HAP, PCB, microplastiques, éléments traces métalliques) sur les organismes marins (LEX – Ifremer Nantes).

La période passée au sein de chacun de ces trois laboratoires n'a pas été « linéaire » mais a été fonction : i) de la mise au point des marqueurs cytométriques et de la réalisation des expérimentations sur les espèces marines (Ifremer), ii) de l'isolement des espèces dulçaquicoles, de tests sur des marqueurs biologiques et de la réalisation des expérimentations sur les espèces dulçaquicoles (Irstea), et iii) des phases de concentration/dessalement et d'analyse de la matière organique dissoute mais également des pesticides (EPOC). Aussi, diverses périodes successives ont été passées au sein de chacun de ces laboratoires permettant ainsi d'avoir une vision approfondie de l'ensemble des compartiments étudiés au cours de ces travaux de recherche.

Valorisation scientifique

2 articles publiés dans des journaux de rang A

Dupraz V.*, **Coquillé N.*,** Ménard D., Sussarellu R., Haugarreau L., Stachowski-Haberkorn S., 2016. Microalgal sensitivity varies between a diuron-resistant strain and two wild strains when exposed to diuron and irgarol, alone and in mixtures. *Chemosphere*, 151: 241-252. * co-premiers auteurs

Coquillé N., Jan G., Moreira A., Morin S., 2015. Use of diatom motility features as endpoints of metolachlor toxicity. *Aquatic Toxicology*, 158: 202-210.

3 articles en préparation (dont un short paper)

Coquillé N., Éon M., Ménard D., Morin S., Stachowski-Haberkorn S., Parlanti E., Interactions between microalgae and natural dissolved organic matter. *En préparation.*

Coquillé N., Ménard D., Rouxel J., Dupraz V., Éon M., Budzinski H., Morin S., Parlanti É., Stachowski-Haberkorn S., The influence of natural dissolved organic matter on herbicide toxicity to marine microalgae is species-dependent. *En préparation.*

Coquillé N., Éon M., Budzinski H., Stachowski-Haberkorn S., Parlanti É., Morin S., Fate and effects of herbicides on the freshwater microalga *Sphaerellopsis* sp. *En préparation.*

10 Communications orales (dont 7 en 1er auteur et 5 présentées)

Coquillé N., Morin S. (2016, Août). Heritability of deformities in diatoms. 24th International Diatom Symposium, Québec, Canada.

Dupraz V., **Coquillé N.**, Ménard D., Sussarellu R., Haugarreau L., Stachowski-Haberkorn S. (2016, Mars). Effets du diuron et de l'irgarol chez deux souches de *Tetraselmis suecica* : la résistance au diuron s'accompagne-t-elle d'une résistance à l'irgarol ? 3èmes journées d'Écotoxicologie Microbienne, Valence, France.

Sussarellu R., Dupraz V., **Coquillé N.**, Akcha F., Budzinski H., Stachowski-Haberkorn S. (2016, Mars). Mécanisme moléculaires de l'adaptation de la microalgue marine *Tetraselmis suecica* au diuron : conséquences sur sa sensibilité à un mélange complexe de pesticides. 3èmes journées d'Écotoxicologie Microbienne, Valence, France.

Coquillé N., Stachowski-Haberkorn S., Morin S., Parlanti É., Ménard D., Rouxel J., Haugarreau L., Dupraz V., Eon M., Vedrenne J., Boutry S., Rosebery J., Ezzedine J., Grégoire J., Budzinski H., Tapie N., Pardon P., Chevance-Demars L. (2016, Mars). La toxicité des herbicides vis-à-vis de microalgues est-elle influencée par la matière organique dissoute (MOD) naturelle ? 3èmes journées d'Écotoxicologie Microbienne, Valence, France.

Coquillé N., Morin S., Stachowski-Haberkorn S., Budzinski H., Parlanti E. (2015, Octobre). Influence of the dissolved organic matter on the toxicity of pesticides on microalgae along a freshwater - marine water continuum. LabEx Day, Bordeaux, France.

Morin S., Gwilherm J., Thorel E., **Coquillé N.** (2015, Septembre). Performances physiologiques d'une souche de diatomée tératogène. 34ème colloque de l'Association des Diatomistes de Langue Française (ADLaF), Bordeaux, France.

Coquillé N., Dupraz V., Ménard D., Morin S., Parlanti E., Stachowski-Haberkorn S. (2015, Septembre). Impact de deux antifouling, l'irgarol 1051 et le diuron sur la physiologie d'une diatomée marine *Chaetoceros calcitrans*. 34ème colloque de l'ADLaF, Bordeaux, France.

Coquillé N., Dupraz V., Ménard D., Sussarellu R., Haugarreau L., Morin S., Parlanti E., Stachowski-Haberkorn S. (2015, Juillet). Impact de deux antifouling, l'irgarol 1051 et le diuron sur la physiologie de deux souches de la microalgue marine *Tetraselmis suecica.* Société d'Écotoxicologie Fondamentale et Appliquée (SEFA), Bordeaux, France.

Coquillé N., Gandon A., Stachowski-Haberkorn S., Jan G., Parlanti É., Morin S. (2014, Octobre). Impact du métolachlore sur la physiologie et le comportement de la diatomée dulçaquicole *Gomphonema gracile*. 33ème colloque de l'ADLaF, Clermont-Ferrand, France.

Coquillé N., Gandon A., Stachowski-Haberkorn S., Jan G., Parlanti É., Morin S. (2014, Mai). Impact du métolachlore sur la physiologie et le comportement de la diatomée dulçaquicole *Gomphonema gracile.* Journées d'écotoxicologie microbienne, Banyuls-sur-Mer, France.

6 Communications par affiche dont 3 en 1er auteur

S. Stachowski-Haberkorn, **N. Coquillé**, D. Ménard, J. Rouxel, V. Dupraz, M. Éon, H. Budzinski, S. Morin, É. Parlanti (2017, Mai). What is the influence of natural dissolved organic matter on herbicide toxicity to two marine microalgae? SETAC Europe 27th Annual meeting, Bruxelles, Belgique.

N. Coquillé, S. Stachowski-Haberkorn, S. Morin, É. Parlanti, D. Ménard, J. Rouxel, L. Haugarreau, V. Dupraz, M. Eon, J. Vedrenne, S. Boutry, J. Rosebery, J. Ezzedine, JC. Grégoire, H. Budzinski, N. Tapie, P. Pardon, L. Chevance-Demars (2016, Mai). Is herbicide toxicity on

marine microalgae influenced by the natural Dissolved Organic Matter (DOM)? SETAC Europe 26th Annual meeting, Nantes, France.

N. Coquillé, D. Maurer, I. Auby, H. Budzinski, S. Stachowski-Haberkorn, S. Morin, É. Parlanti, J. Vedrenne, G. Jan, D. Ménard, V. Dupraz, L. Rigouin, L. Gouriou, F. d'Amico, M.P. Tournaire, C. Méteigner, M. Perrière-Rumèbe, A. Mounguengui, N. Tapie, L. Chevance-Demars, P. Pardon, E. Geneste (2015, Septembre). Communautés microalgales : effets de la matière organique dissoute et des pesticides sur l'activité photosynthétique et la composition taxonomique. ECODYN, Paris, France.

N. Coquillé, V. Dupraz, D. Ménard, R. Sussarellu, L. Haugarreau, S. Stachowski-Haberkorn (2015, Mai). Toxicity of two antifouling biocides, irgarol 1051 and diuron, on two marine phytoplankton species. SETAC Europe 25th Annual meeting, Barcelone, Espagne.

A. Gandon, **N. Coquillé**, G. Jan, N. Mazzella, S. Morin (2014, Juin). Toxicity assessment of metolachlor towards diatoms: combining physiological and behavioral endpoints. ISEAC, Lausanne, Suisse.

V. Dupraz, **N. Coquillé**, E. Parlanti, S. Morin, S. Stachowski-Haberkorn, Y. Guo, L. Haugarreau, D. Ménard, J. Rouxel, I. Auby, D. Maurer, C. Barbier-Méteignier, L. Rigouin, M. Rumebe, N. Mazzella, M. Eon, A. Moreira, G. Jan, H. Budzinski, P. Mazellier, N. Geneste, M. Devier, P. Pardon, K. Lemenach, S. Augagneur, L. Peluhet (2014, Mai). Effets de pesticides sur les microalgues du continuum eau douce - eau marine : influence de la matière organique dissoute naturelle. Journées d'écotoxicologie microbienne, Banyuls-sur-Mer, France.

Table des illustrations

Figures

Figure 1 : Interactions connues entre les microalgues, la matière organique dissoute et les pesticides. 30

Figure 2 : Cellule de la diatomée *Diploneis beyrichiana* dont le frustule est ouvert (Maurice Loir et Alain Couté©).... 35

Figure 3 : Schéma bilan de la photosynthèse incluant la phase claire (conversion de l'énergie lumineuse en énergie chimique) et la phase sombre (synthèse de carbone organique) (Matthieu Simon©). 37

Figure 4 : Spectre de la lumière visible. 38

Figure 5 : Réseaux trophiques aquatiques (la représentation choisie est valable pour l'eau douce et pour l'eau mer, les photos n'étant qu'illustratives, Coquillé©). 42

Figure 6 : Continuum de taille de la matière organique en milieu aquatique (D'après Docter *et al.*, 2015). 44

Figure 7 : Représentation schématique de l'origine de la MOD aquatique : une origine autochtone (au sein des réseaux trophiques) et une origine allochtone (provenant des écosystèmes terrestres et dont les phénomènes de transfert sont apparents). Note : la représentation des réseaux trophiques choisie ici est valable pour l'eau douce et pour l'eau mer (les photos n'étant qu'illustratives, Coquillé©). 46

Figure 8 : Schéma résumé et simplifié des processus d'humification (D'après Huguet, 2007, Rashid, 2012). 48

Figure 9 : Schéma bilan faisant état (i) des processus de transfert des pesticides (flèches rouges) et de la MOD allochtone (flèches bleues) dans l'environnement aquatique, (ii) de la production de MOD autochtone et (iii) des réseaux trophiques aquatiques (Coquillé©). 55

Figure 10 : Nombre de pesticides quantifiés dans les cours d'eau en 2013 (Source : agences et offices de l'eau ; SOeS, 2015). 56

Figure 11 : Pesticides les plus quantifiés dans les cours d'eau de métropole en 2013 (Source: agences de l'eau; SOeS, 2015). 57

Figure 12 : Localisation du Bassin d'Arcachon (Géoportail). 57

Figure 13 : Évolution des concentrations en pesticides au sein de la Leyre (A) et dans le Bassin d'Arcachon à la station de Grand Banc (à proximité de la sortie – B) (REPAR, 2015). 58

Figure 14 : Empreinte de contamination à la station de Grand Banc dans le Bassin d'Arcachon (Tapie *et al.*, 2016). Les éléments encadrés correspondent aux molécules mères herbicides (rose) et algicides (bleu). 59

Figure 15 : Suivi de la contamination de 33 pesticides dans la Leyre entre mars 2010 et 2011 (Fauvelle, 2012). 59

Figure 16 : Localisation des sites de prélèvement d'eau dans le ruisseau de Rebec (A) et dans le Bassin d'Arcachon à la station de Grand Banc (B). 75

Figure 17 : Première étape d'isolement de la MOD naturelle par filtration sur 0,45 µm. 76

Figure 18 : Principe du phénomène d'osmose et d'osmose inverse (Huguet, 2007). 77

Figure 19 : Schéma du pilote d'osmose TIA (rétentat = ce qui est retenu par la membrane, c'est-à-dire la matière organique et les sels ; perméat = ce qui passe au travers de la membrane, de l'eau). 77

Figure 20 : Représentation schématique du principe de l'électrodialyse. A et C correspondent respectivement aux membranes anioniques et cationiques. Elles sont au nombre de 10 pour les anioniques et 12 pour les cationiques (D'après Huguet (2007)). 78

Figure 21 : Schéma du pilote d'électrodialyse (concentrat = cuve vers laquelle vont migrer les sels ; diluat = cuve contenant l'échantillon à dessaler ; électrodat = cuve contenant l'électrolyte). 79

Figure 22 : Frustule de *Gomphonema gracile* (- Coste©). 80

Figure 23 : Cellules de *Sphaerellopsis* sp. isolées (Laplace-Treyture©). 80

Figure 24 : Cellule de *Chaetoceros calcitrans* (Stachowski-Haberkorn©). 81

Figure 25 : Cellule de Tetraselmis suecica (CCMP©). 81

Figure 26 : Représentation schématique des expérimentations réalisées. Jf correspond au jour 7 pour *Gomphonema gracile*, au jour 14 pour *Sphaerellopsis* sp. et au jour 6 pour les deux espèces marines. 85

Figure 27 : Représentation schématique du principe de fonctionnement d'un cytomètre en flux. 86

Figure 28 : Représentation schématique du side scatter (en haut à droite) et du forward scatter (en bas à droite) en fonction de la taille d'une particule. 87

Figure 29 : Cytogramme utilisé pour dénombrer les cellules - Exemple de la condition témoin sans MOD pour *T. suecica* au jour final. 88

Figure 30 : Cellule de *T. suecica* marquée au Bodipy$^{505/515}$ (Microscope à épifluorescence - Dupraz©). 89

Figure 31 : Spectre d'absorption typique sur lequel sont indiquées les pentes spectrales utilisées dans le calcul de l'indice S_R. 95

Figure 32 : Diagramme de Perrin-Jablonski (Huguet, 2007). 96

Figure 33 : Exemple de spectre de fluorescence 3D obtenu avec un échantillon contenant de la MOD marine du Bassin d'Arcachon sur lequel sont représentées les principales bandes de fluorescence observées. 98

Figure 34 : Délimitation des domaines H et L permettant le calcul de l'indice HIX sur le spectre d'émission typique pour une longueur d'onde d'excitation de 254 nm (d'après Zsolnay *et al.*, 1999). 99

Figure 35: a) Diatom live cell density, b) distribution of cell size classes (error bars not provided for clarity; statistical groups refer to differences in the largest class size: >34µm) versus time as a function of metolachlor exposure (values are mean±standard error, n=4 for controls and n=3 replicates for each metolachlor concentration). White bars represent C0, light grey bars: C1, dark grey bars: C2 and black bars: C3. Different letters indicate between-treatment *post hoc* differences. 111

Figure 36: Chlorophyll-*a* fluorescence derived parameters versus time and as a function of metolachlor exposure (values are mean±standard error, n=4 for controls and n=3 replicates for each metolachlor concentration): a) chlorophyll-*a* fluorescence, b) effective quantum yield. Bar colors are the same as in Figure 1. Different letters indicate between-treatment *post hoc* differences. 111

Figure 37: Behavioral endpoints versus time for different metolachlor exposure levels (values are mean±standard error, n=4 for controls and n=3 replicates for each metolachlor concentration): a) percentage of cells in associations, b) percentage of motile cells, c) average path velocity, c) curvilinear velocity, d) straight line velocity and e) linearity. Bar colors are the same as in Figure 35. Different letters indicate between-treatment *post hoc* differences. 112

Figure 38: Correlation circle of variables analyzed by Multiple Factor Analysis for quantitative and qualitative data, performed for all samples. Variables related to physiology: Chlorophyll fluorescence (Chl-*a*), effective photosynthetic yield (ΔF/Fm') and ATP content (ATP); to behavior: percentage of cells in associations (% Associations) and of motile cells (% Motile), and motility parameters (VAP, VCL, VSL, LIN); to population dynamics: diatom live cell density (Density), mean cell length (Length), percentage of cells longer than 34µm (% Larger), growth rate (GR) and presence or absence of sexual reproduction (Reproduction). 113

Figure 39: Exposure in the EUs: Mean (±standard error) metolachlor concentrations analyzed over the experiment (n=4 for controls and n=3 for each metolachlor concentration). White bars represent C0, light grey bars: C1, dark grey bars: C2, black bars: C3, and dashed bars: abiotic EUs. bdl: below detection limit; nm: not measured. 114

Figure 40 : Supplementary information: Individual trajectories of *G. gracile*: projection of 250 video frames from a 10-s video from samples collected day 3. C0 to C3 indicate the treatment and r1 to r4 different replicates. Scale bar: 100 µm. 120

Figure 41 : Percentage variation of exposed samples of C. calcitrans (*C_wild*) compared with the control treatment without solvent (C) for: doubling time (T_D), photosynthetic efficiency (Φ'_M), relative ROS content ($FL1_{ROS}$) and relative lipid content ($FL1_{LIPIDS}$); after exposure to diuron (D) and irgarol (I), alone and in mixtures (means ± SE). Only significant effects are shown (ANOVA, $p < 0.05$). 134

Figure 42 : Percentage variation of exposed samples of *T. suecica* (*T_wild*) compared with the control treatment without solvent (C) for: doubling time (T_D), photosynthetic efficiency (Φ'_M), relative ROS content ($FL1_{ROS}$) and relative lipid content ($FL1_{LIPIDS}$); after exposure to diuron (D) and irgarol (I), alone and in mixtures (means ± SE). Only significant effects are shown (ANOVA, $p < 0.05$). 137

Figure 43 : Sequence alignments of the mRNA coding for the D1 protein in *T. suecica* wild and diuron-resistant strains. A: nucleotide sequences; B: translated protein sequences. Dots represent identities, dashes represent unidentified amino acids..... 138

Figure 44 : Percentage variation of exposed samples of *T. suecica (T_mutant)* compared with the control treatment without solvent (C) for: doubling time (T_D), photosynthetic efficiency (Φ'_M), relative ROS content ($FL1_{ROS}$) and relative lipid content ($FL1_{LIPIDS}$); after exposure to diuron (D) and irgarol (I), alone and in mixtures (means ± SE). Only significant effects are shown (ANOVA, $p < 0.05$). 139

Figure 45: Location of water sampling sites in the Rebec stream (Leyre River - A) and in Arcachon Bay at Grand Banc (B). 154

Figure 46: Excitation-emission matrix (EEM) spectra of freshwater (A) and marine (B) DOM before (a) and after (b) concentration and desalination. Note that there is a factor of 10 in scale between EEM spectra before and after concentration (fluorescence intensity in Raman unit). 155

Figure 47: Growth curves of *Gomphonema gracile* (A), *Sphaerellopsis* sp. (B), *Chaetoceros calcitrans* (C) and *Tetraselmis suecica* (D) in control (– ∘ –) and DOM-exposed (—●—) treatments. Note the different Y axes between B (a) and (b). All values are mean values (± standard error, SE; n = 4) and different letters indicate significant differences between treatments (ANOVA, $p < 0.05$). 162

Figure 48: Doubling time (T_D) (A), relative intracellular lipid content ($FL1_{Lipids}$ ratio) (B), operational yield (Φ'_M) (C), bacterial concentration (D) and bacteria number per algal cell (E) obtained on the last day of experiments for the four species in control (white bars) and DOM-exposed treatments (grey bars). All values are mean values (± standard error, SE; n = 4) and * indicates significant differences between treatments (t-test, * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$)..... 164

Figure 49: Evolution (Δ) of dissolved organic carbon concentration (DOC) (A) and fluorescence intensities of α' (B), α (C), β (D) and γ (E) fluorophores for all species in control and DOM exposed treatments. All values are mean variations over time, between final sampling date (± standard error, SE; n = 4) and day 0 (n = 1). * indicates significant differences between treatments (t-test, * $p < 0.05$) and the numeric value indicates the β error. 167

Figure 50: Herbicide concentrations in the highest treatments of irgarol (A), diuron (B) and S-metolachlor (C), singly and in mixture M2, in abiotic and biotic components on the first and last days. All values are mean values (± standard error, SE); n=2 for abiotic system without DOM (for each treatment, mean from two samples: the one from *C. calcitrans* experiment and the one from *T. suecica* experiment), n=4 for abiotic system with DOM (for each treatment, mean from four samples: two from *C. calcitrans* experiment and two from *T. suecica* experiment) and n=3 for biotic systems (triplicates for each species). † indicates significant differences between

biotic and abiotic conditions on day 0 and * indicates significant differences between day 0 and day 6 for a given treatment (t-test, * and † $p<0.05$). The numeric value indicates the β value. 193

Figure 51: Mean (± SE) concentrations of nitrates, orthophosphates and silicates on the first and last days of experiments for *C. calcitrans* (A, B and C) and *T. suecica* (D) in conditions without DOM (white bars) and with DOM (grey bars) (for NO_3^- and PO_4^- on the last day, n=4 for controls and n=3 for herbicide-exposed cultures; otherwise n=1). * and † indicate significant differences between controls and herbicide-exposed treatments for conditions without DOM and with DOM, respectively (t-test, * and † $p<0.05$). The value indicates the β value. 195

Figure 52: Percentage variation in biological endpoints (mean ± SE) of *C. calcitrans* cultures (A) and *T. suecica* cultures (B) exposed to herbicides, compared with respective controls (without and with DOM). Only significant effects (ANOVAs, $p<0.05$) on growth rate (μ), relative lipid content ($FL1_{Lipids}$) and photosynthetic efficiency (Φ'_M) after exposure to irgarol (I), diuron (D) and S-metolachlor (S), alone and in mixtures (M) are shown. Negative values correspond to an inhibition, while positive values indicate stimulation compared to the controls. 197

Figure 53: Evolution, over the experiments (Δ), of dissolved organic carbon concentration (DOC, in $pgC.cell^{-1}$; A and B), $SUVA_{254}$ (in $L.mgC^{-1}.m^{-1}$; C and D) and S_R (E and F) parameters for controls, I0.5 and M2 treatments in *C. calcitrans* (A, C and E) and *T. suecica* (B, D and F) cultures. All values are mean variations between day 6 (n = 4 for controls and n = 3 for I0.5 and M2, ± SE) and day 0 (n = 1). * and † indicates significant differences between controls and exposed cultures in treatments without DOM and with DOM addition, respectively (t-test, * and † $p < 0.05$). The values indicate the β risk. 199

Figure 54 : Herbicide concentrations measured in the highest treatments of irgarol (A), diuron (B) and S-metolachlor (C), singly and in mixture M2, in abiotic and biotic component on the first and last days of experiment. All values are mean values (± standard error, SE; n=2 for abiotic treatments and n=3 for Sphaerellopsis sp. cultures). * and † indicate significant differences between abiotic and biotic components on day 0 and between the first and last days for a given treatment, respectively (t-test, $p<0.05$). 219

Figure 55 : Concentrations en herbicides mesurées le premier et le dernier jour de l'expérience, dans les traitements aux concentrations maximales d'irgarol (A), de diuron (B) et de S-métolachlore (C), seuls et dans le mélange M2, dans le volet biotique et abiotique. (Moyenne ± erreur-type ; n=2 pour le volet abiotique et n=3 pour les cultures de G. gracile). * indique les différences significatives entre le volet biotique et abiotique au jour 0 et † indique les différences significatives entre le premier et le dernier jour pour un même traitement (t-test, * et † $p<0,05$)..... 225

Figure 56 : Taux de croissance μ (A), efficacité photosynthétique réelle Φ'_M (B), ratio $FL1_{Lipides}$ (C) et concentration bactérienne (D) au jour final (J7) pour les 9 traitements appliqués à *G. gracile* en présence de MOD naturelle. (Moyennes ± erreur-type, n=4 pour les témoins et n=3 pour les cultures exposées aux herbicides). La lettre a indique aucune différence significative entre les traitements (ANOVA $p>0,05$). 227

Figure 57 : Aspect du biofilm dans une culture témoin (A) et dans une culture exposée à 5 µg.L^{-1} de S-métolachlore (B). 228

Figure 58 : Cultures de *Sphaerellopsis* sp. avec et sans MOD naturelle au bout de 14 jours. 240

Tables

Table 1 : Sels nutritifs nécessaires à la croissance des microalgues (ainsi que leurs rôles) dans l'environnement naturel et artificiel. 41

Table 2 : Molécules constitutives de la MOD, classées selon leur famille et leurs propriétés acido-basiques et leur hydrophobicité (D'après Huguet, 2007, et Tipping, 2002). 47

Table 3 : Propriétés physico-chimiques des trois molécules étudiées ($T_{1/2}$: temps de demi-vie). 66

Table 4 : Effets de l'irgarol sur diverses espèces de microalgues (CE_{50} : concentration efficace causant une diminution de 50% du paramètre biologique étudié par rapport aux témoins). 68

Table 5 : Effets du diuron sur diverses espèces de microalgues (CE_{50} : concentration efficace causant une diminution de 50% du paramètre biologique étudié par rapport aux témoins). 69

Table 6 : Effets du (S-)métolachlore sur diverses espèces de microalgues (CE_{50} : concentration efficace causant une diminution de 50% du paramètre biologique étudié par rapport aux témoins ; met : métolachlore ; S-met : S-métolachlore). 70

Table 7 : Concentration et pourcentage de méthanol dans les solutions de travail utilisées pour la contamination des ballons lors des expérimentations. 82

Table 8 : Nombre de réplicats réalisés pour chaque traitement de chaque condition et de chaque volet. 83

Table 9 : Concentration en BODIPY$^{505/515}$ dans les solutions de travail et dans les échantillons marqués pour les quatre espèces de microalgues. 89

Table 10 : Limites de quantification moyennes des molécules étudiées obtenues au cours des différentes injections... 92

Table 11 : Principaux fluorophores des eaux naturelles (d'après Parlanti *et al.*, 2000). 98

Table 12 : Primers used for D1 protein coding sequence amplification end sequencing. 133

Table 13 : Effects of diuron and irgarol, singly and in mixtures, on *C. calcitrans* and *T. suecica* after six-day exposures. 135

Table 14: Mean (± SE) concentrations of nitrates (NO_3^-), orthophosphates (PO_4^-) and silicates (Si) on the first (Day 0) and last (Day f) days of experiments for the four species and the two treatments (n = 4 for NO_3^- and PO_4^- on the last day; otherwise n = 1). 165

Table 15: Evolution (Δ) of qualitative DOM descriptors between the last and first days of experiments. All values are mean variations over time, between final sampling date (n = 4 ± standard error) and day 0 (n = 1). * indicates significant differences between two treatments (t-test, * p < 0.05; ** p < 0.01; *** p < 0.001). The value in brackets indicates the β value. 168

Table 16: Growth rate (μ), relative intracellular lipid content ($FL1_{Lipids}$ ratio) and operational yield (Φ'_M) obtained on the last day of experiments for control cultures of *C. calcitrans* and *T. suecica* with and without DOM. All values are mean values (± SE; n = 4) and * indicates significant differences between treatments (t-test, * p < 0.05; ** p < 0.01; *** p < 0.001). The value in brackets indicates the β value. 198

Table 17: Evolution (Δ) of DOM fluorescence parameters (HIX: humification index and BIX: biological index) between the last and first days of experiments for controls, I0.5 and M2 treatments. All values are mean variations between day 6 (n = 4 for controls and n = 3 for I0.5 and M2 ± SE) and day 0 (n = 1).* indicates significant differences with their respective controls (t-test, * p < 0.05; ** p < 0.01). The value in brackets indicates the β risk. 200

Table 18: *Sphaerellopsis* sp. growth rate (μ), relative intracellular lipid content ($FL1_{Lipids}$ ratio), operational yield (Φ'_M), bacteria concentration and bacteria number per alga cell obtained at final day for the nine treatments in presence of natural DOM. All values are mean values (n=4 for control and n=3 for pesticide-exposed cultures) (± standard error, SE) and * indicate significant differences between controls and pesticide-exposed cultures for different parameters (ANOVA, p<0.05 followed by Tukey post-hoc test, p<0.05). 222

Table 19 : Récapitulatif des effets significatifs observés (pourcentage par rapport aux témoins ± SE) en présence des pesticides, de la MOD et des deux combinés sur les quatre espèces de microalgues. Les cases grises indiquent une absence d'effet, les cases bleues une diminution et les cases violettes une augmentation. 234

Liste des abréviations

1,2,4-DCPU	1-(2,4-dichlorophényl)urée
1,3,4-DCPU	1-(3,4-dichlorophényl)urée
3D	tridimentionnel
Φ'_M	efficacité photosynthétique réelle (efficacité photosynthétique opérationnelle)
ADN	acide désoxyribonucléique
AEAG	agence de l'eau Adour Garonne
AF4	fractionnement par couplage flux/force (asymmetrical flow field-flow fractionation)
ANOVA	analyse de variance
AOM	algal organic matter
ARN	acide ribonucléique
ATP	adénosine triphosphate
BIX	indice biologique
CE_{50}	concentration efficace causant une diminution de 50% du paramètre biologique étudié par rapport aux témoins
CO_2	dioxyde de carbone
COD/DOC	carbone organique dissous
DCE	directive cadre sur l'eau
DCPMU	1-(3,4-dichlorophényl)-3-méthylurée
DCSMM	directive cadre stratégie pour le milieu marin
DDT	dichloro-diphényle-trichloro-éthane
DMSO	diméthylsulfoxyde
EEM	matrice d'excitation-émission de fluorescence (excitation-emission matrice)
EPS	extracellular polymeric substance
FL	fluorescence
FSC	forward scatter
HIX	indice d'humification,
IBD	indice biologique diatomées
IHSS	international humic substances society
K_{DOC}	coefficient de distribution eau – carbone organique dissous
K_{OW}	coefficient de partage octanol-eau

LC-MS/MS	chromatographie en phase liquide couplée à un spectromètre de masse triple en tandem
LED	diode électroluminescente
MO	matière organique
MOD/DOM	matière organique dissoute
MOP	matière organique particulaire
MRM	multiple reactions monitoring
NADP	nicotinamide adénine dinucléotide phosphate
NCMA	national center for marine algae and microbiota
NPOC	non purgeable organic carbon
OCDE	organisation de coopérationet de développement économiques
PAM	pulse amplitude modulation
PAR	rayonnements photosynthétiquement actifs
PSII	photosystème II
REACH	registration evaluation authorization and restriction of chemicals
REPAR	réseau opérationnel de suivi et d'expertise sur les phytosanitaires et biocides au niveau du Bassin d'Arcachon et de ses bassins versants
SOeS	service de l'observatoire et des statistiques
S_R	rapport de pentes spectrales
SRNOM	Suwannee River natural organic matter
SSC	side scatter
$SUVA_{254}$	specific UV absorbance à 254 nm
UV	ultra-violet

Introduction générale

Les microalgues sont des organismes unicellulaires vivant librement dans la colonne d'eau (phytoplancton) ou fixés sur des substrats (phytobenthos, périphyton). Ce sont des organismes photosynthétiques, qualifiés de producteurs primaires, en raison de leur capacité à synthétiser de la matière organique à partir de lumière, de molécules d'eau et de dioxyde de carbone. Bien que représentant moins d'1% de la biomasse végétale de la planète (D'Elbée, 2016), les microalgues jouent un rôle fondamental sur Terre et dans les écosystèmes aquatiques. Elles sont en effet à l'origine de la production de près de 50% de l'oxygène consommé chaque année par les organismes vivant sur la planète (Carlowicz, 2011). Consommées par les organismes hétérotrophes, les microalgues se placent ainsi à la base des réseaux trophiques aquatiques (Amblard *et al.*, 1998, Mostajir *et al.*, 2012). Cependant, les microalgues peuvent être la cible indirecte de pesticides et particulièrement des herbicides en raison de leur proximité avec les végétaux supérieurs (photosynthèse). En effet, les écosystèmes terrestres, fluviaux et marins sont étroitement connectés, ce qui entraîne un transfert de matière chimique, dont des pesticides, par divers phénomènes (ruissellement, transport aérien, drainage, lessivage des sols, lixiviation), depuis les écosystèmes terrestres vers les rivières et la mer.

Les pollutions engendrées par les pesticides, essentiellement diffuses, sont très préoccupantes car largement répandues dans l'environnement, y compris dans des zones éloignées des sources comme les régions polaires (Khairy *et al.*, 2016, Ma *et al.*, 2016). En France, l'importance de la surface agricole utile (la plus grande d'Europe avec près de 29 millions d'hectares) principalement représentée par de l'agriculture et de la viticulture, génère une forte consommation de pesticides (66 659 tonnes en 2013 ; Ecophyto, 2015, Eurostat, 2013). En conséquence, une contamination généralisée des eaux de surface est documentée depuis de nombreuses années. Ainsi, en 2013, 92% des cours d'eau échantillonnés en métropole et dans les départements d'Outre-Mer étaient contaminés par les pesticides et dans près de 60% des cas par plus de dix molécules (SOeS, 2015). Ces molécules, présentes dans les rejets urbains et agricoles, peuvent causer des effets délétères sur les microalgues, parfois à des concentrations environnementales (Morin *et al.*, 2009, Roubeix *et al.*, 2012, Roubeix *et al.*, 2011a, Stachowski-Haberkorn *et al.*, 2008). Cependant, les microalgues sont également susceptibles d'influencer le transfert et le devenir de ces molécules via la bioaccumulation des molécules dans les cellules (Bi *et al.*, 2012) et la capacité de biodégradation de certaines espèces (Figure 1), comme démontré avec l'atrazine (Kabra *et al.*, 2014), le fluometuron (Zablotowicz *et al.*, 1998) ou l'isoproturon (Bi *et al.*, 2012).

Dans les hydrosystèmes, d'autres éléments comme la matière organique dissoute (MOD) peuvent interagir avec les microalgues et les pesticides (Figure 1). La MOD est un mélange complexe de molécules organiques, de taille inférieure à 0,45 µm, résultant de la dégradation des organismes vivants, de leur défécation, excrétion ou sécrétion. Elle représente près de 90% de la matière organique non vivante aussi bien dans les océans que dans les rivières (Duursma & Dawson, 1981, Wetzel, 2001). La présence de MOD peut affecter les microalgues via son impact sur la pénétration de la lumière dans la colonne d'eau (diminution de la zone euphotique (Kirk, 2010), protection contre les radiations UV (Tedetti & Sempéré, 2006)) mais également par l'apport de certaines molécules comme des vitamines (Croft *et al.*, 2006), des

composés azotés, phosphorés (Beardall & Raven, 2016), disponibles pour les microalgues. Certaines microalgues ont d'ailleurs la capacité de consommer directement, c'est-à-dire sans l'intervention préalable des bactéries, des composés simples comme le glucose (EL-Sheekh *et al.*, 2012, Perez-Garcia *et al.*, 2011) et d'autres plus complexes comme les substances humiques (Campbell *et al.*, 1997, Coste & Morin, 2008), présentes dans la MOD naturelle. Les composés de faible poids moléculaire sont consommés via des mécanismes d'adsorption, ou d'internalisation par le biais de pompes ou de canaux (Perez-Garcia *et al.*, 2011), quand des mécanismes très complexes permettent l'absorption des substances humiques (Campbell *et al.*, 1997). Cependant, les interactions entre la MOD naturelle prise dans son entièreté et les microalgues sont encore peu décrites et méritent des investigations plus poussées, étant donné l'importance de ces composants dans l'environnement aquatique et les interactions potentielles avec les pesticides.

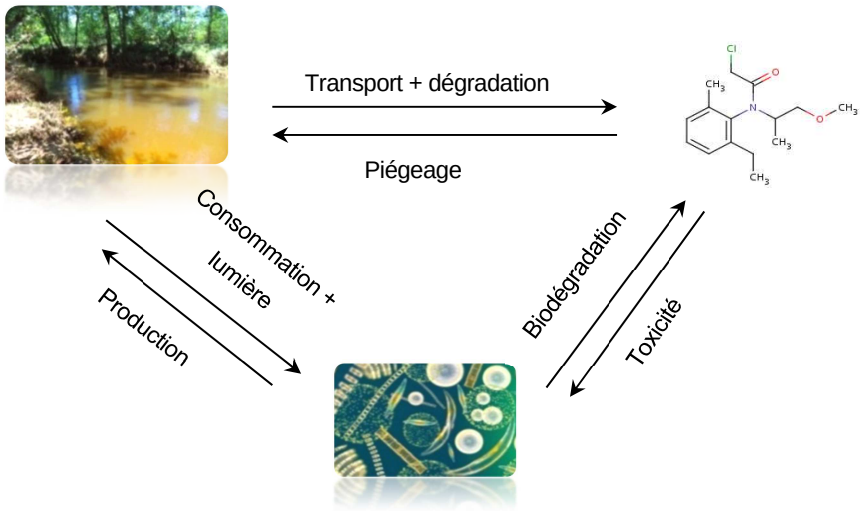


Figure 1 : Interactions connues entre les microalgues, la matière organique dissoute et les pesticides.

Les possibilités d'interactions entre la MOD et les pesticides sont multiples. En effet, les pesticides peuvent s'adsorber sur le carbone organique présent dans la matière organique, diminuant (dans les sols) ou favorisant (dans le milieu aquatique) ainsi leur transport (Gao *et al.*, 2012). Les substances humiques présentes dans la MOD jouent également un rôle prépondérant dans le devenir des pesticides puisqu'elles peuvent inhiber ou au contraire favoriser la photodégradation des molécules (McNeill & Canonica, 2016, Yuan *et al.*, 2016, Zeng *et al.*, 2002). D'autre part, l'interaction entre les pesticides les molécules organiques influence leur biodisponibilité et leur toxicité (Bejarano *et al.*, 2005b, Haitzer *et al.*, 1998). Cependant, hormis une étude recensée à ce jour (Zhang *et al.*, 2016b), peu d'informations sont disponibles dans la littérature scientifique sur l'influence de la MOD sur la toxicité des pesticides vis-à-vis des microalgues. Il est donc nécessaire de mettre en place des études dédiées afin d'élucider et de comprendre les phénomènes pouvant se produire dans l'environnement.

L'objectif principal de cette thèse, qui s'inscrit dans le projet IMPACT (Influence de la qualité de la Matière organique dissoute sur la toxicité des Pesticides vis-à-vis des microAlgues le long d'un ConTinuum eau douce – eau marine) du LabEx COTE (ANR-10-LABX-45), a donc eu pour but d'étudier, par des

expérimentations contrôlées en laboratoire, l'influence de la MOD naturelle sur la toxicité d'herbicides vis-à-vis de microalgues en cultures monospécifiques.

Ce manuscrit est composé de huit chapitres. Le premier chapitre est consacré à la présentation du contexte de l'étude. Il présente chaque élément étudié, à savoir, les microalgues, la MOD et les pesticides ainsi que l'état des connaissances actuelles sur leurs relations et interactions. Il se termine par une présentation plus détaillée des objectifs de ces travaux de thèse.

Le deuxième chapitre est consacré à la présentation des matériels et méthodes utilisés pour l'étude de l'influence de la MOD sur les microlagues et la toxicité des herbicides: la préparation de la MOD naturelle, les microalgues étudiées, la préparation des pesticides, les expérimentations réalisées ainsi que les analyses appliquées aux échantillons et le traitement des résultats.

Les chapitres 3 et 4, présentés sous la forme de publications scientifiques, sont consacrés à la présentation des deux études préliminaires réalisées en amont des expériementations avec MOD, mettant en œuvre les microalgues en présence des pesticides uniquement :

- une première étude préliminaire (Chapitre 3) visant à évaluer l'utilisation des caractéristiques de la mobilité des diatomées comme critère d'évaluation de la toxicité du métolachlore.
- une deuxième étude préliminaire (Chapitre 4) visant à évaluer les différences de sensibilité entre une souche de microalgues résistante au diuron et deux souches sauvages, lors d'une exposition au diuron et à l'irgarol, seuls et en mélange.

Les chapitres suivants, consacrés aux résultats obtenus sur l'influence de la MOD sur les micraolgues et la toxicité des herbicides, sont présentés sous la forme de publications scientifiques :

- le cinquième chapitre, est une étude de la relation microalgues (en conditions non axéniques)/MOD naturelle.
- le sixième chapitre vise à étudier l'influence de la MOD naturelle sur la toxicité d'herbicides, seuls et en mélange, vis-à-vis de microalgues marines.
- le septième chapitre concerne l'influence de la MOD sur la toxicité et le devenir des pesticides en présence de microalgues dulçaquicoles en conditions non axéniques.

Enfin, le huitième et dernier chapitre est une synthèse générale qui a pour but de discuter les principaux résultats acquis ainsi que les perspectives qui peuvent être données à ces travaux.

Chapitre 1 – Contexte général

Ce chapitre dresse l'état de l'art des connaissances actuelles sur les trois composants étudiés que sont les microalgues, la matière organique et les pesticides, ainsi que sur les interactions entre ces éléments. Le but de ce chapitre est de recontextualiser ces travaux de thèse ainsi que leurs objectifs, détaillés plus amplement à la fin.

1. Les microalgues

1.1. Définition

Les microalgues sont des organismes unicellulaires photosynthétiques eucaryotes dont la taille varie de moins d'un micromètre à plusieurs centaines de micromètres. Les microalgues, qui sont pour l'essentiel aquatiques, vivent soit libres dans la colonne d'eau (espèces planctoniques : phytoplancton) soit sur des substrats (espèces périphytiques : périphyton, benthiques : microphytobenthos) de nature variable (macrophytes, animaux, roches, sable, etc.). Le développement sur substrat est permis grâce à la sécrétion de substances polymérisées (= matière organique), également appelées EPS (Extracellular Polymeric Substances), composées notamment de polysaccharides, protéines, lipides (Pierre, 2010).

Parmi les classes phylogénétiques auxquelles appartiennent les microalgues, deux sont les plus représentées sur notre planète (en nombre d'espèces) : les Bacillariophycées et les Chlorophycées (Damien, 2013, Guiry, 2012, Roy *et al.*, 2011). Ces deux classes sont décrites brièvement ci-après étant donné que trois des quatre espèces de microalgues étudiées dans cette thèse en font partie. La classe d'appartenance de la quatrième espèce (Chlorodendrophycée) est également présentée.

1.2. Les Bacillariophycées (Embranchement des Bacillariophytes)

Les Bacillariophycées, également appelées diatomées, regrouperaient plus de 200 000 espèces tous milieux confondus (eaux douces, saumâtres et marines) et constituent la classe la mieux décrite à l'heure actuelle (Damien, 2013, Guiry, 2012). Les diatomées sont dotées d'une paroi siliceuse, appelée frustule, composée de deux valves imbriquées (l'hypovalve et l'épivalve) reliées par une bande (ou ceinture) appelée cingulum (Figure 2). Le frustule est recouvert de substances polymérisées plus ou moins épaisses, sécrétées par des pores fins appelés aréoles et présents sur chaque valve (Duke & Reimann, 1977). Cette sécrétion permet aux cellules de se mouvoir, d'excréter des déchets métaboliques, contribue à l'adhésion des organismes au substrat, permet la formation de colonies, et protègerait les cellules de la dessiccation (Chiovitti *et al.*, 2006, Hoagland *et al.*, 1993). La forme (centrique ou pennée) ainsi que l'ornementation du frustule sont utilisés comme critères principaux d'identification (Lavoie, 2008). Les pigments photosynthétiques

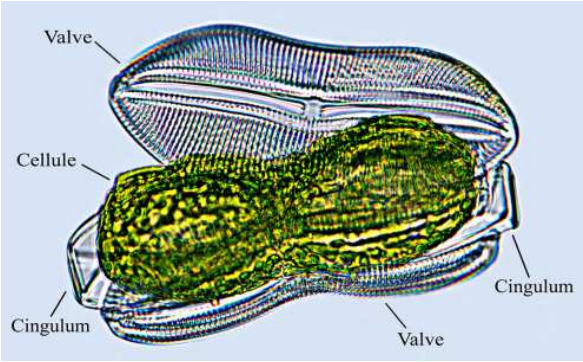


Figure 2 : Cellule de la diatomée *Diploneis beyrichiana* dont le frustule est ouvert (Maurice Loir et Alain Couté©).

sont majoritairement de la chlorophylle *a* et *c* et des carotènes (Jørgensen, 1977, Roy *et al.*, 2011). Les lipides de réserve contenus dans le cytoplasme des cellules sont notamment de la chrysolaminarine sous forme de gouttelettes d'huile (Roy *et al.*, 2011). Leur reproduction est principalement asexuée (division cellulaire) donnant lieu à deux cellules, l'une de taille identique à la cellule mère et l'autre de taille inférieure. Elles se reproduisent de façon sexuée une fois la taille minimale atteinte (pour la population).

1.3. Embranchement des Chlorophytes

1.3.1. Les Chlorophycées

Les Chlorophycées, également appelées algues vertes, constituent la seconde classe de microalgues la mieux décrite après les diatomées. Elles regrouperaient actuellement plus de 13 000 espèces tous milieux confondus, bien que majoritairement inféodées aux milieux dulçaquicoles (Damien, 2013, Guiry, 2012, Roy *et al.*, 2011). Les Chlorophycées peuvent, selon les espèces, être dotées de flagelles (au nombre de 2, 4 ou 8). Les pigments photosynthétiques sont essentiellement de la chlorophylle *a* et *b* et des caroténoïdes. Les réserves sont présentes sous la forme de grains d'amidon au sein des chloroplastes (Garon & Guéguen, 2014). Elles peuvent se reproduire par simple division cellulaire avec des cellules filles de taille identique dont le nombre peut aller de 2 à 2^{14} (Zachleder *et al.*, 2016), par reproduction sexuée, ou par sporulation en formant des zoospores (spores mobiles dotées de flagelles) ou autospores (spores non mobiles) (Chrétiennot-Dinet, 1990).

1.3.2. Les Chlorodendrophycées

La classe des Chlorodendrophycées est constituée d'espèces qui, il y a peu, appartenaient encore à la classe des Prasinophycées (Fučíková *et al.*, 2014). Elle regroupe à l'heure actuelle 46 espèces tous milieux confondus (Guiry & Guiry, 2017). Les Chlorodendrophycées sont des cellules non mobiles ou mobiles grâce à des flagelles (Chrétiennot-Dinet, 1990). Les pigments photosynthétiques sont essentiellement de la chlorophylle *a* et *b*, des caroténoïdes et des xanthophylles. Tout comme les Chlorophycées, elles stockent des réserves sous forme d'amidon au sein de leur chloroplaste unique (Chrétiennot-Dinet, 1990) mais surtout sous forme de gouttelettes lipidiques (Chirapart *et al.*, 2015). Elles semblent essentiellement se reproduire par division cellulaire (Chrétiennot-Dinet, 1990), peu de données étant disponibles pour cette classe à l'heure actuelle.

1.4. Métabolisme des microalgues : la photosynthèse

Les microalgues sont qualifiées de producteurs primaires. Ce sont des organismes photo-autotrophes qui synthétisent leur propre matière organique à partir de la réduction de dioxyde de carbone et d'une source d'énergie externe, les photons apportés par la lumière, via le processus de photosynthèse.

La photosynthèse se déroule au sein des chloroplastes, au niveau de la membrane des thylakoïdes (Figure 3), en deux étapes : la conversion de l'énergie lumineuse en énergie chimique (le Nicotinamide Adénine Dinucléotide Phosphate (NADP) et l'Adénosine TriPhosphate (ATP)) appelée réaction claire, suivie de la

fixation du carbone (réduction du carbone en glucides), appelée réaction sombre. L'équation globale de la photosynthèse est :

$$nCO_2 + nH_2O \rightarrow (CH_2O)_n + nO_2.$$

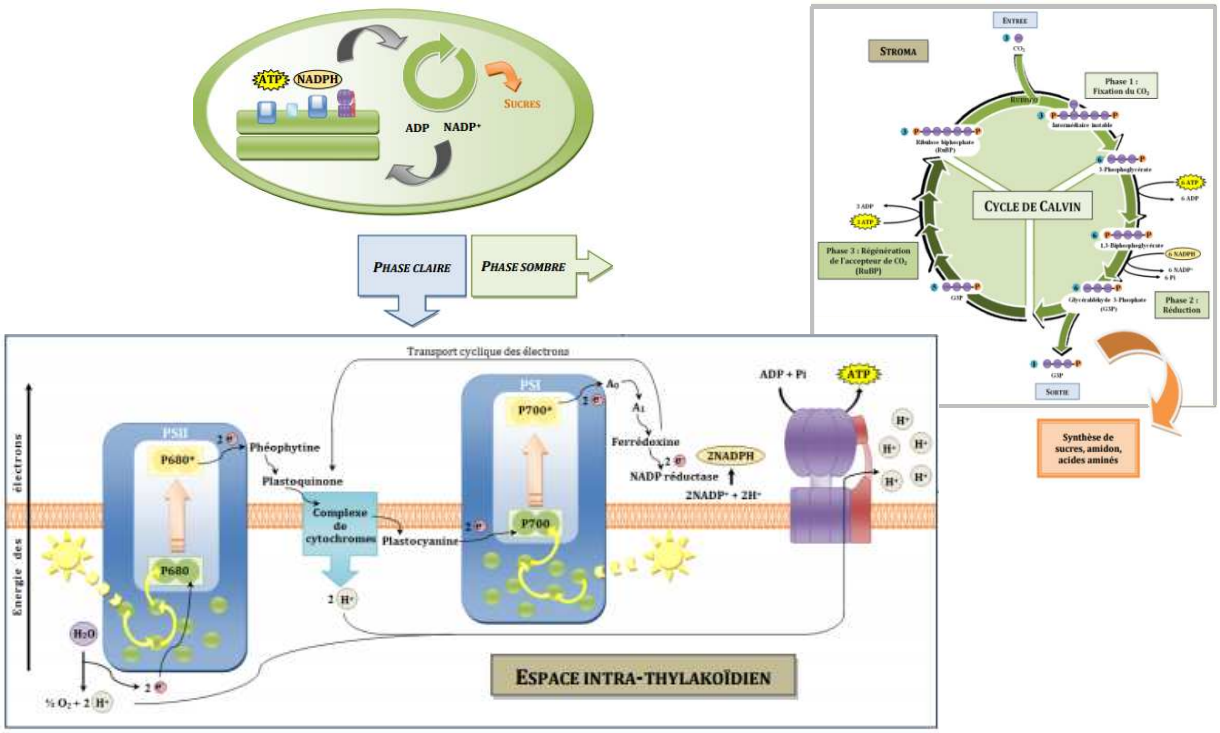


Figure 3 : Schéma bilan de la photosynthèse incluant la phase claire (conversion de l'énergie lumineuse en énergie chimique) et la phase sombre (synthèse de carbone organique) (Matthieu Simon©).

1.4.1. La réaction claire

L'énergie d'excitation (= photon) est captée par l'antenne collectrice du PSII et transportée jusqu'au centre réactionnel, appelé P680, qui passe à l'état excité (P680*) (Figure 3). Le P680* transmet un électron à la phéophytine (pigment), considérée comme l'accepteur primaire, et le P680* oxydé ($P680^+$) retourne à son état fondamental grâce aux électrons provenant de l'oxydation d'une molécule d'eau (= photolyse par le complexe d'émission de l'oxygène). L'électron transmis par le P680* est transporté par une chaîne de transporteurs d'électrons (quinones A et B, plastoquinone, complexe cytochrome b6f jusqu'à une plastocyanine (protéine)).

L'électron est alors transféré au centre réactionnel du PSI, appelé P700, qui est à son tour excité (P700*). L'électron émis par le P700* (en retournant à son état fondamental) est transporté par une chaîne de transporteurs d'électrons jusqu'à une ferrédoxine (protéine). Cette dernière transmet alors l'électron à une enzyme, la ferrédoxine $NADP^+$ oxydoréductase, qui réduit le $NADP^+$ en NADPH (Hopkins *et al.*, 2003, Karp *et al.*, 2010, Lance, 2013). Le PSI, disposant d'une antenne collectrice de photons, peut fonctionner indépendamment du PSII.

Parallèlement à cela, la production d'ions H^+ issue de la photolyse de l'eau et du transfert d'électrons au sein du cytochrome b6f, engendre un gradient de protons entre le stroma et le lumen favorable à l'activation de l'ATP synthase, qui induit la production d'ATP.

1.4.2. La réaction sombre

Cette dernière étape de la photosynthèse, beaucoup plus lente que la précédente (de l'ordre des secondes jusqu'aux heures), peut se réaliser à la lumière comme à l'obscurité et a pour but de convertir le dioxyde de carbone (CO_2) en carbone organique à partir du NADPH et de l'ATP générés lors de la réaction claire. Cette phase se déroule dans le stroma du chloroplaste (Figure 3), via le cycle de Calvin-Benson dont le bilan global est (Raven *et al.*, 2011) :

$6CO_2 + 18ATP + 12NADPH + H_2O \rightarrow$ 2 glycéraldéhyde-3-phosphate + 16 Pi + 18 ADP + 12 $NADP^+$.

1.5. Facteurs influençant le développement microalgal

Dans l'environnement naturel, les microalgues dépendent des conditions du milieu (paramètres physico-chimiques (pH, salinité, température, hydrodynamisme...) et qualité de l'eau en termes de pollutions), de la saison (processus de succession saisonnière) mais également du faciès et de la profondeur étudiés (Coste *et al.*, 2009, Guesdon *et al.*, 2016, Rolland, 2009). Néanmoins, que cela soit dans l'environnement naturel ou en milieu contrôlé (laboratoire), trois facteurs sont capitaux, à savoir la lumière pour leur survie (organismes photosynthétiques), la température et les sels nutritifs. Ces facteurs sont présentés ci-après.

1.5.1. La lumière

En tant qu'organismes photosynthétiques, les microalgues sont directement dépendantes de la lumière. Leur développement est conditionné à la fois par la quantité de lumière reçue, mais également par sa qualité (composition spectrale) et sa durée (photopériode) (Hopkins *et al.*, 2003).

Dans l'environnement naturel, sur la totalité de l'énergie solaire atteignant la Terre, seule la lumière visible est utilisable par les organismes photosynthétiques. Sa gamme de longueur d'onde, qui s'étend de 400 (violet) à 700 nm (rouge) correspond donc aux rayonnements photosynthétiquement actifs (PAR en anglais) (Figure 4). La quantité et la qualité de la lumière incidente qui arrive jusqu'aux eaux de surface varient selon la qualité de l'air (les particules peuvent diffuser et absorber les radiations), la couverture nuageuse, le moment de la journée et de l'année (Hopkins *et al.*, 2003, Kirk, 2010).

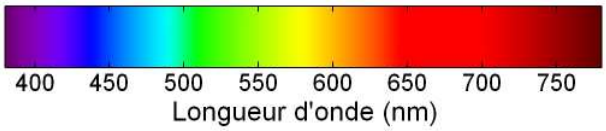


Figure 4 : Spectre de la lumière visible.

En milieu aquatique, la quantité de lumière reçue diminue avec la profondeur en raison de l'absorption de l'énergie lumineuse par les constituants de l'eau. Cette absorption a pour conséquence de modifier qualitativement le spectre lumineux (UV-Visible) à mesure que l'on s'éloigne de la surface, les molécules

d'eau absorbant principalement dans l'ultraviolet et l'infrarouge (D'Elbée, 2016). Les substances chimiques dissoutes et particulaires, organiques et minérales, jouent également un rôle important sur la pénétration du rayonnement dans l'eau. En effet, selon leurs propriétés optiques, elles conditionnent fortement la transparence de l'eau et par conséquent la profondeur de la zone photique (zone euphotique), qui correspond à la zone dans laquelle l'exposition lumineuse est suffisante à la photosynthèse (Kirk, 2010). La zone euphotique s'étend de quelques centimètres en zone très turbide jusqu'à 200 m de profondeur en zone oligotrophe (D'Elbée, 2016). En milieu contrôlé, il est toutefois difficile de reproduire la réalité environnementale : les dispositifs utilisés tendent plutôt à produire des conditions invariables dans le temps. Ainsi, la photopériode appliquée correspond généralement à la moyenne de ce qui peut être observé à une saison ou période de l'année particulière : par exemple la photopériode 16h:8h (jour:nuit) correspond à une période de jours longs. D'autre part, en raison de l'importance de la qualité du spectre sur le développement algal, la culture de microalgues est souvent réalisée sous un éclairage artificiel constitué par des tubes fluorescents ou des diodes électroluminescentes (LED) permettant de diffuser une lumière blanche de type "jour". Enfin, dans la majorité des cas, les variations (d'intensité et spectrales) engendrées par la saison, la qualité de l'air ou la couverture nuageuse ne sont pas prises en compte.

1.5.2. La température

La température affecte fortement la croissance des microalgues en raison de son influence sur la plupart des réactions biologiques catalysées par des enzymes aux optimums thermiques variables. L'amplitude des températures tolérées ainsi que l'optimum de croissance sont fonction de l'espèce considérée (Lavoie, 2008, Lowe, 1974).

En zones tempérées, les fluctuations saisonnières de la température atmosphérique se répercutent, avec une certaine inertie, sur la température de l'eau. Une augmentation de la température corrélée à une augmentation de l'ensoleillement, et associée à une concentration élevée en sels nutritifs (apports terrigènes ou reminéralisation des organismes morts comme après une efflorescence) permet le développement microalgal (Berg *et al.*, 2009, Faurie *et al.*, 2011, Lavoie, 2008).

En milieu contrôlé, la température appliquée doit donc tenir compte des conditions de développement optimal de l'espèce étudiée.

1.5.3. Les sels nutritifs

En plus de conditions de lumière et de température favorables, un certain nombre de nutriments sont nécessaires au développement des microalgues dans leur environnement : azote, phosphore, silice (pour les diatomées essentiellement), oligo-éléments (Table 1) et vitamines. En milieu naturel, divers facteurs interviennent dans la disponibilité de ces sels nutritifs, contrôlés essentiellement par les saisons et les phénomènes météorologiques. En effet, en raison de la continuité des écosystèmes, lors de phénomènes de fortes pluies et de crues, des apports terrestres permettent d'enrichir le milieu aquatique. Le type de sols (milieux naturels, urbanisés ou industrialisés) et notamment l'abondance et le type de végétation retrouvée le long des cours d'eau conditionnent aussi la concentration et le type de sels nutritifs apportés dans

l'environnement aquatique. En hiver, la forte turbulence des eaux permet de remettre en suspension et d'homogénéiser les nutriments dans la colonne d'eau. En période estivale (hors apports engendrés par les apports d'eau douce), la disponibilité des nutriments diminue en raison de la forte consommation lors des efflorescences printanières. Cette activité biologique participe également au recyclage des nutriments, via la reminéralisation effectuée par la boucle microbienne (développée dans la partie 1.6.2.).

Aussi, afin de pouvoir cultiver les microalgues en milieu contrôlé et en conditions optimales, des milieux de culture artificiels sont reconstitués et contiennent pour la plupart tous les éléments cités dans la Table 1 avec ou sans ajout de vitamines (B12 (cobalamine), B1 (thiamine), B7 (biotine)).

Table 1 : Sels nutritifs nécessaires à la croissance des microalgues (ainsi que leurs rôles) dans l'environnement naturel et artificiel.

Eléments	Rôle	Références
Azote (N)	Quatrième constituant le plus important après l'hydrogène, le carbone et l'oxygène. Elément essentiel au métabolisme cellulaire, c'est un constituant des acides aminés, protéines, acide nucléique, nucléotides, vitamines, chlorophylle, chromophores...	(Lavoie, 2008, Raven & Giordano, 2016, Taiz & Zeiger, 2006)
Phosphore (P)	Intervient dans de nombreuses fonctions physiologiques et dans la synthèse de nucléotides, phospholipides, coenzymes, sucres phosphatés et autres composés phosphorylés. C'est un constituant structural de nombreuses molécules (protéines, polysaccharides, ARN, ADN, ATP, lipides,...)	(Dyhrman, 2016, Lavoie, 2008, Taiz & Zeiger, 2006)
Silice (Si)	Elément constitutif du frustule des diatomées, il contribue également au maintien des propriétés mécaniques des parois cellulaires de nombreuses espèces de microalgues (rigidité, élasticité)	(Finkel, 2016, Lavoie, 2008, Taiz & Zeiger, 2006)
Sulfure (S)	Un des principaux constituants des cellules algales (quantité similaire au phosphore). C'est un élément rentrant dans la composition de nombreux composants fonctionnels et structurels (acide aminés, glutathion, vitamines, constituant de la paroi cellulaire,…)	(Giordano & Prioretti, 2016, Taiz & Zeiger, 2006)
Calcium (Ca)	Elément impliqué dans de nombreux processus biologiques (calcification, mobilité,…)	(Cooksey & Wigglesworth-Cooksey, 1995, Lavoie, 2008, Taiz & Zeiger, 2006, Taylor & Brownlee, 2016)
Potassium (K)	Cofacteurs de plus de 40 enzymes, il participe également au maintien de l'électroneutralité de la cellule	(Lavoie, 2008, Taiz & Zeiger, 2006)
Fer (Fe)	Intervient dans la synthèse de la chlorophylle, dans de nombreux processus cellulaire et réactions enzymatiques. C'est un constituant de nombreuses enzymes, de cytochromes et d'autres porphyrines.	(Lavoie, 2008, Marchetti & Maldonado, 2016, Taiz & Zeiger, 2006)
Manganèse (Mn)	Intervient dans l'activation de nombreuses enzymes et dans le maintien de la structure membranaire des chloroplastes. Il a également un rôle important dans la photosynthèse des microalgues car élément constitutif de la chlorophylle.	(Lavoie, 2008, Quigg, 2016, Taiz & Zeiger, 2006)
Cuivre (Cu)	Intervient comme catalyseur et dans le devenir de l'O_2 et la déshydrogénation de l'H_2O dans le lumen des thylakoïdes. C'est un constituant des plastocyanines, cytochrome oxydases, superoxyde dismutases.	(Lavoie, 2008, Quigg, 2016, Taiz & Zeiger, 2006)
Zinc (Zn)	Intervient dans la réplication et la polymérisation des acides nucléiques et est impliqué dans de nombreuses autres fonctions métaboliques. C'est un constituant des ADN et ARN polymérases.	(Lavoie, 2008, Quigg, 2016, Taiz & Zeiger, 2006)
Molybdène (Mo)	Rôle essentiel dans la réduction et l'absorption de l'azote.	(Lavoie, 2008, Quigg, 2016, Taiz & Zeiger, 2006)
Cobalt (Co)	Intervient dans les réactions de transfert de l'oxygène et hydrogène. Composant de la vitamine B12.	(Lavoie, 2008, Quigg, 2016, Taiz & Zeiger, 2006)

1.6. Rôle dans les écosystèmes

1.6.1. Production d'oxygène

Les microalgues sont des organismes photosynthétiques, synthétisant de l'oxygène et des sucres à partir de dioxyde de carbone et de molécules d'eau (section 1.4.). Bien que représentant moins d'1% de la biomasse végétale de la planète (D'Elbée, 2016), les microalgues sont, avec les cyanobactéries, à l'origine de la production de près de 50% de l'oxygène de notre planète (Carlowicz, 2011). Elles sont également responsables de près de 50% de la fixation et de la conversion du carbone atmosphérique (inorganique) en carbone organique (Beardall & Raven, 2016, Kumar & Häder, 2012, Mollo & Noury, 2013).

1.6.2. La base des réseaux trophiques aquatiques

Les microalgues sont des producteurs primaires, capables de produire leur propre matière organique à partir de matière inorganique. Elles sont donc à la base des réseaux trophiques aquatiques et soutiennent le développement des organismes hétérotrophes qui les consomment, jusqu'aux grands prédateurs (Amblard *et al.*, 1998, Mostajir *et al.*, 2012). Ceux-ci, n'ayant pas la capacité de synthétiser leur propre matière organique à partir de sources inorganiques, sont quant à eux qualifiés de consommateurs (Mollo & Noury, 2013, Wetzel, 2001) (Figure 5).

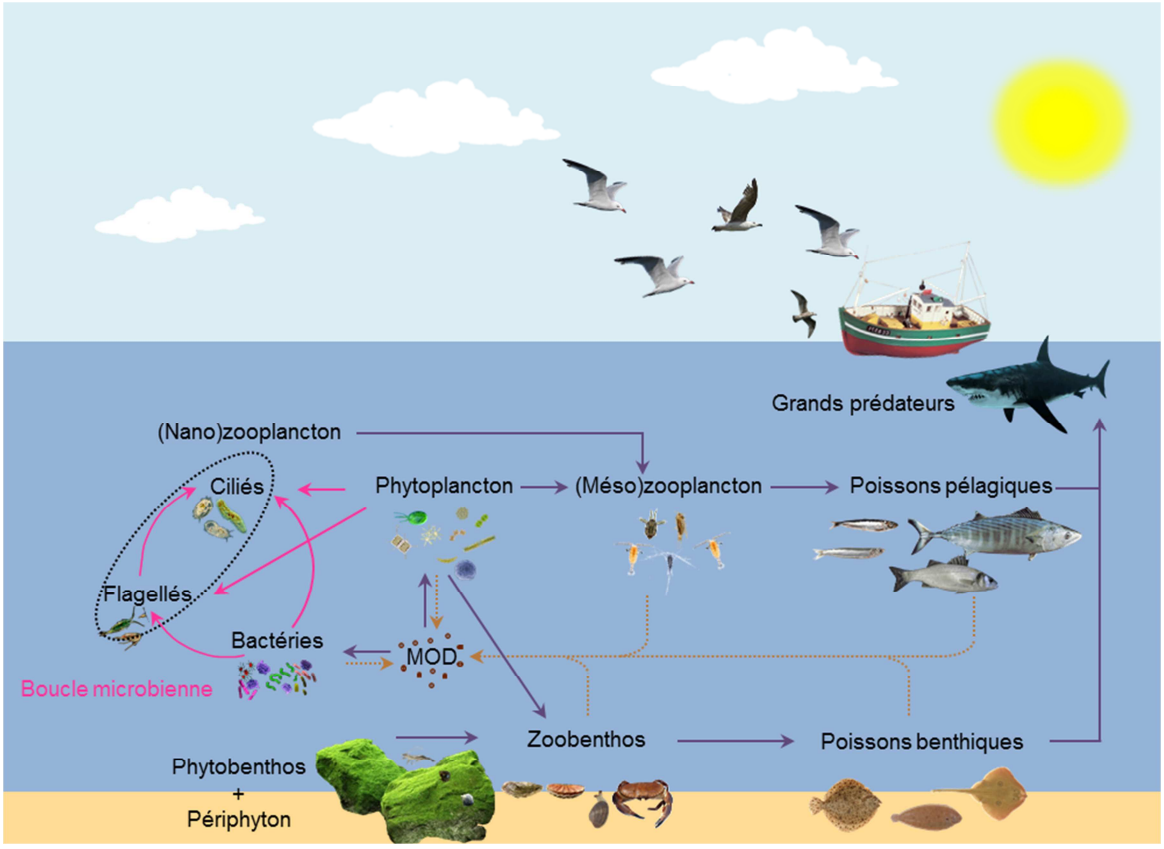


Figure 5 : Réseaux trophiques aquatiques (la représentation choisie est valable pour l'eau douce et pour l'eau mer, les photos n'étant qu'illustratives, Coquillé©).

Par ailleurs, les microalgues contribuent au réseau microbien ou boucle microbienne (Figure 5), qui est principalement basé sur la décomposition et la consommation des microalgues, et sur les exsudats des cellules vivantes (Mostajir *et al.*, 2012). La boucle microbienne fait intervenir les microorganismes hétérotrophes comme les bactéries, flagellés, amibes et ciliés (Azam *et al.*, 1983), qui sont également consommés par le zooplancton ou les brouteurs. Le couplage de la boucle microbienne avec les réseaux trophiques est une importante voie de transfert d'énergie entre les producteurs primaires et les niveaux trophiques supérieurs (Findlay & Sinsabaugh, 2003). La boucle microbienne, par la reminéralisation des éléments nutritifs sous une forme dissoute, assure ainsi le renouvellement des nutriments nécessaires à la croissance des microalgues. On estime que de 10 à 50% de la production primaire totale sont consommés par la boucle microbienne (Azam *et al.*, 1983, Lévêque & Mounolou, 2008).

Les microalgues ainsi que leurs sécrétions constituent donc un véritable réservoir de matière organique soutenant l'ensemble des réseaux trophiques.

1.7. Les microalgues, organismes modèles

Étant à la base des réseaux trophiques, les microalgues sont exploitées en aquaculture afin de nourrir les stades larvaires des mollusques bivalves et de crustacés, certains juvéniles de poissons, et les stades adultes de divers organismes de type copépodes, mollusques (Muller-Feuga *et al.*, 2007b). Elles sont aussi exploitées dans d'autres domaines comme la nutrition humaine comme complément alimentaire (exemple : spiruline) ou colorant naturel, la cosmétique et la pharmaceutique (Spolaore *et al.*, 2006). Les microalgues servent également dans le domaine bioénergétique (biocarburant) en raison de leur teneur riche en lipides (Mata *et al.*, 2010).

Ces organismes unicellulaires, dont certaines espèces sont cultivées couramment en laboratoire, présentent ainsi des avantages pour leur étude en conditions contrôlées : disponibilité permanente de nombreuses espèces en culture via les souchothèques, temps de génération court, organismes peu contraignants, elles sont utilisées comme organismes modèles dans le domaine de l'écotoxicologie. Elles font l'objet de tests standardisés dont les résultats (concentration causant l'inhibition de 50% de la croissance, CE_{50}) sont utilisés dans les procédures d'autorisation de mise sur le marché (AMM) des substances chimiques (REACh, cf. partie 3.5.1.). En effet, leur facilité de culture permet de réaliser des tests rapides d'évaluation de l'impact toxique de molécules (Stachowski-Haberkorn, 2008). L'intérêt de ces bioessais sur cultures monospécifiques, est aussi de pouvoir tester des substances en mélange, ou encore l'influence d'autres éléments et paramètres physico-chimiques. C'est par exemple le cas de l'étude de Zhang *et al.* (2016b) qui a montré qu'en conditions expérimentales, la toxicité de divers chlorobenzènes était modulée par la présence de matière organique dissoute naturelle, composante environnementale majeure.

2. La matière organique

2.1. Généralités

La matière organique peut être divisée en deux types : la matière organique vivante et non vivante. Les éléments de synthèse comme les composés chimiques organiques manufacturés seront exclus de cette définition.

La matière organique vivante regroupe l'ensemble des organismes vivants. Chaque maillon trophique représente en effet de la matière organique directement consommable par le maillon supérieur (Figure 5).

La matière organique non vivante résulte de la décomposition des organismes vivants, de leur défécation, excrétion ou sécrétion. Il s'agit donc d'un mélange hétérogène et complexe d'éléments, en constante évolution. Dans les milieux aquatiques, la matière organique peut ainsi être sous forme particulaire (MOP) ou dissoute (MOD). Le seuil de coupure généralement admis pour discriminer la MOD de la MOP par filtration est de 0,45 µm. Selon cette définition, la dénomination MOD au sens large englobe donc la matière organique colloïdale et la matière organique dissoute (Figure 6).

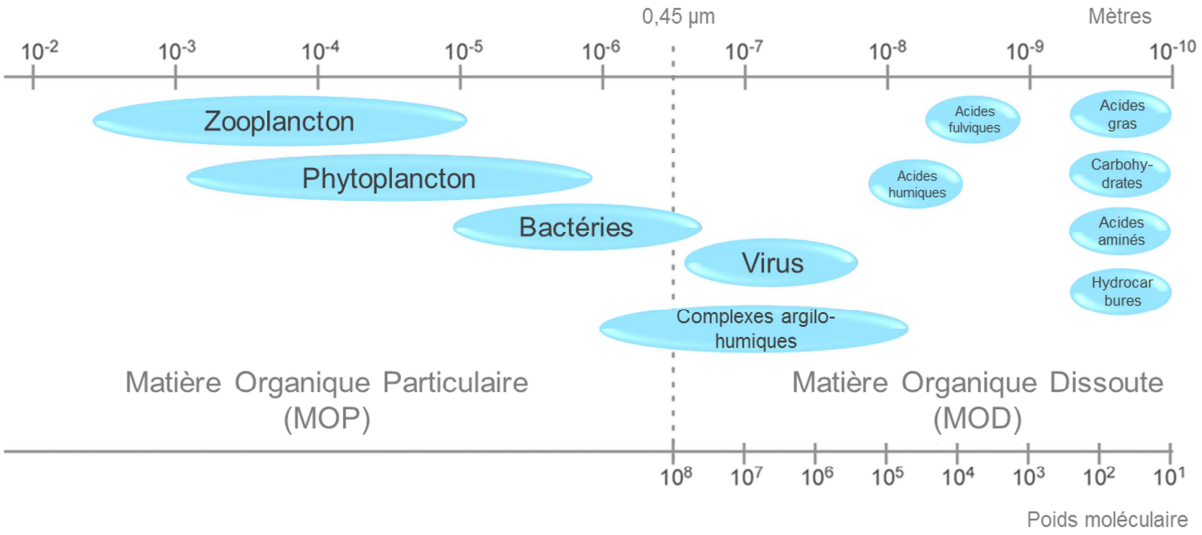


Figure 6 : Continuum de taille de la matière organique en milieu aquatique (D'après Docter *et al.*, 2015).

Dans les milieux aquatiques, la matière organique est présente majoritairement sous forme dissoute (Findlay & Sinsabaugh, 2003). Dans les océans, on estime par exemple que la matière organique totale sous forme dissoute à 89% et à 9% sous forme particulaire (non vivante), le reste étant de la matière vivante (Duursma & Dawson, 1981). Dans les rivières, on estime également que la proportion de MOD (90%) est très largement supérieure à la fraction particulaire (10%) (Wetzel, 2001). Dans la suite de ce manuscrit, nous nous focaliserons plus particulièrement sur la MOD.

2.2. Origine de la MOD aquatique

Dans les milieux aquatiques, la MOD naturelle peut avoir deux origines : une origine allochtone, c'est-à-dire provenant d'un autre écosystème, et une origine autochtone, c'est-à-dire produite au sein de

l'écosystème étudié. La part représentée par chacun de ces deux types de MOD dépend du système aquatique considéré et de la saison. En effet, dans les cours d'eau, la MOD a essentiellement une signature d'origine allochtone, en raison de sa forte proximité et de sa connexion directe avec les écosystèmes terrestres. La MOD terrestre transite dans les cours d'eau proches par des phénomènes de ruissellement, drainage, lessivage des sols (Figure 7). La MOD terrestre est plus réfractaire (= plus difficilement dégradable ou utilisable par les organismes vivants) que la MOD autochtone aquatique. En effet, quand un organisme meurt, après les premiers stades de décomposition lors desquels la matière labile est consommée, des processus de polymérisation, polycondensation, polyaddition (= processus dits d'humification) se mettent en place. Ces processus ont pour conséquence de générer des molécules plus complexes et plus difficilement dégradables par les organismes tels que les bactéries. La MOD terrigène retrouvée dans les milieux aquatiques, ayant subi la majeure partie de ces processus de dégradation dans les sols, est donc plus réfractaire que la MOD autochtone aquatique (Pernet-Coudrier, 2008, Thurman, 1985).

Dans les zones de transition entre les écosystèmes terrestres, fluviaux et marins, comme les estuaires et les zones côtières sous influence continentale, la MOD est un mélange de matière allochtone et autochtone. La MOD océanique a, quant à elle, une origine essentiellement autochtone : elle est majoritairement produite par les microalgues, par leur excrétion et surtout leur décomposition par les bactéries (Findlay & Sinsabaugh, 2003). La part représentée par chacune des origines est également fonction de la saison (température, lumière) et notamment du régime hydrologique (Aoki *et al.*, 2004, Biber *et al.*, 1996, Guéguen *et al.*, 2006). Dans les zones côtières ou dans les eaux estuariennes, en période hivernale ou après de fortes pluies, la part allochtone est majoritaire. À l'inverse, au printemps, en été et au début de l'automne, compte tenu de la forte productivité biologique de ces milieux (efflorescences phytoplanctoniques), une signature majoritairement autochtone est retrouvée (Minor *et al.*, 2006, Vacher, 2004).

Au niveau quantitatif, les concentrations en carbone organique dans les cours d'eau sont systématiquement supérieures aux eaux marines, qui présentent typiquement les valeurs les plus basses des eaux naturelles (avec les eaux souterraines et l'eau de pluie) (Huguet, 2007, Pernet-Coudrier, 2008).

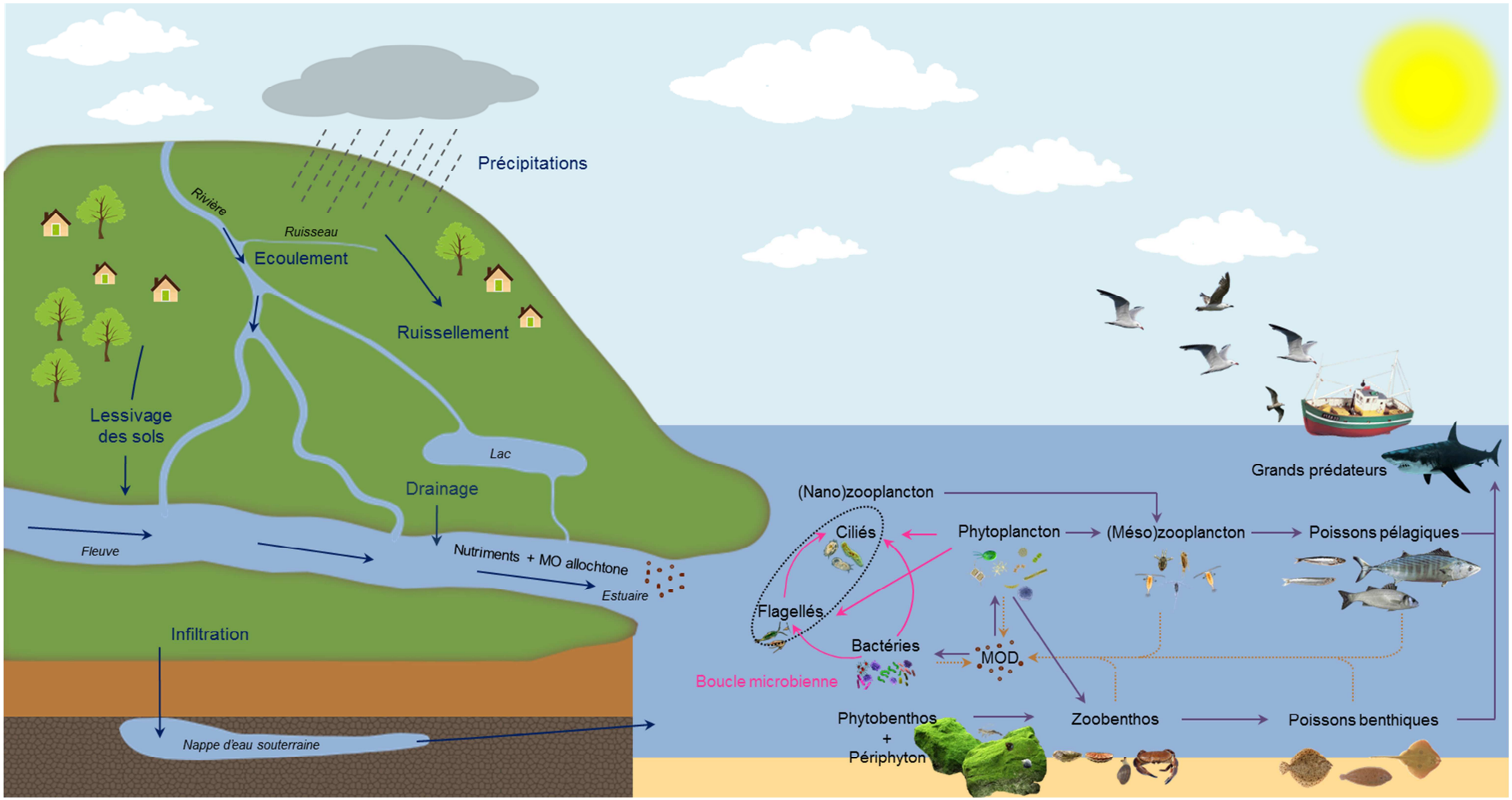


Figure 7 : Représentation schématique de l'origine de la MOD aquatique : une origine autochtone (au sein des réseaux trophiques) et une origine allochtone (provenant des écosystèmes terrestres et dont les phénomènes de transfert sont apparents). Note : la représentation des réseaux trophiques choisie ici est valable pour l'eau douce et pour l'eau mer (les photos n'étant qu'illustratives, Coquillé©).

2.3. Composition de la MOD

En plus de son origine et des facteurs saisonniers, d'autres processus influencent la composition de la MOD : des processus biologiques (biodégradation, consommation, excrétion) et chimiques (photodégradation, polymérisation, polycondensation, polyaddition) (Aiken, 2014b, Imai *et al.*, 2001, Vacher, 2004). La MOD est un mélange hétérogène de molécules et macromolécules organiques naturelles provenant de la dégradation de matériel biologique d'origine animale ou végétale. Une grande partie des molécules qui la composent ne sont pas identifiées structurellement à l'heure actuelle (Dittmar & Stubbins, 2014).

Les molécules qui composent la MOD sont de type basiques, acides ou neutres et peuvent-être divisées en trois fractions (Rodier *et al.*, 2016) :

– la fraction hydrophobe : molécules adsorbées sur une résine de type XAD-8 (hydrophobe) selon le protocole de l'IHSS (International Humic Substances Society) ;

– la fraction transphilique : molécules non retenues sur une résine XAD-8 mais retenues sur une résine XAD-4 (plus hydrophile que la résine XAD-8) ;

– la fraction hydrophile : molécules non retenues sur les résines XAD-8 et XAD-4.

La fraction hydrophobe correspond aux substances humiques et les deux autres fractions correspondent aux substances dites non-humiques (Table 2).

Table 2 : Molécules constitutives de la MOD, classées selon leur famille et leurs propriétés acido-basiques et leur hydrophobicité (D'après Huguet, 2007, et Tipping, 2002).

	Fraction hydrophobe	Fraction hydrophile
Acides	Acide fulvique	Acides hydrophiles
	Acide humique	Acides carboxyliques simples
	Complexes substances humiques/carbohydrates	Carbohydrates oxydés avec des groupements COOH
	Acides aromatiques simples	Protéines
	Polyphénols oxydés	Acides aminés
	Acides gras à longue chaîne	Adénosine di- et tri-phosphates
	Tannins	Inositol et autres sucres phosphatés
	Flavonoïdes	
	Polyphénols	
	Vanilline	
	Protéines	
	Phospholipides	
Neutres	Hydrocarbures	Sucres neutres simples
	Chlorophylle	Polysaccharides
	Caroténoïdes	Alcools
	Phospholipides	Cétones
	Substances humiques de faible acidité	Ethers
	Protéines	Protéines
	Alcools	Acides aminés
	Cétones	Urée
	Esters	
Bases	Peptides	Sucres aminés
	Protéines	Pyrimidines
		Purines
		Acides aminés
		Peptides
		Protéines
		Amines de faible masse molaire

Les substances non-humiques sont constituées à la fois de molécules simples et complexes, provenant essentiellement de l'excrétion et de la décomposition des organismes vivants. Les molécules simples facilement biodégradables ou assimilables par les organismes, sont de type protéines, polysaccharides, acides nucléiques, sucres (glucose, xylose, galactose, arabinose), acides gras ou encore acides aminés (Findlay & Sinsabaugh, 2003). La fraction dite transphilique est caractérisée par des pigments, des protéines, des alcools, des polyphénols oxydés (Thurman, 1985, Tipping, 2002) mais proviennent également de réactions de polymérisation, de condensation, d'addition (complexes de substances humiques/carbohydrates) (Table 2). Les processus d'humification, encore mal compris, sont résumés dans la Figure 8.

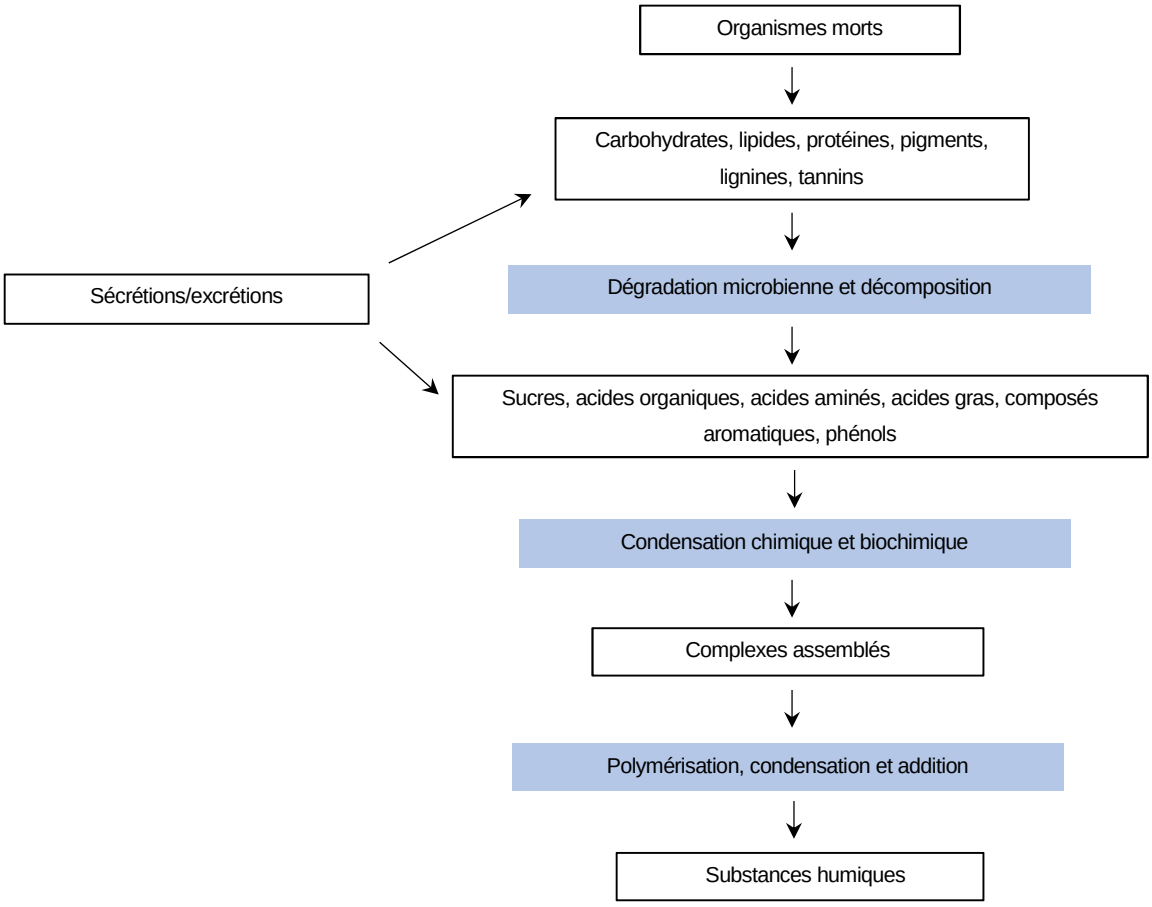


Figure 8 : Schéma résumé et simplifié des processus d'humification (D'après Huguet, 2007, Rashid, 2012).

Les substances humiques sont des macromolécules complexes dont la structure correspond à un assemblage de groupements aromatiques et aliphatiques liés par des liaisons covalentes (Hansen *et al.*, 2016, Jones & Bryan, 1998). Dans les milieux aquatiques, les substances humiques sont divisées en deux catégories, définies selon leur solubilité :

– les acides fulviques, solubles quel que soit le pH ;

– les acides humiques, solubles uniquement à un pH supérieur à 2.

Ces substances, qui sont généralement réfractaires aux divers processus de biodégradation mais particulièrement sensibles à la photodégradation (del Vecchio & Blough, 2006), sont de couleur jaune à

marron/noir et font partie des molécules qui fluorescent (Jones & Bryan, 1998, Thurman, 1985, Tipping, 2002).

Comme cité plus haut, la photodégradation a un impact direct sur la composition de la MOD : diminution du caractère aromatique de la MOD et de la taille des molécules, diminution de l'intensité de fluorescence et de l'absorbance, apparition de molécules réactives (de type peroxyde d'hydrogène, oxygène singulet) (Del Vecchio & Blough, 2002, Helms *et al.*, 2013, Hudson *et al.*, 2007, McNeill & Canonica, 2016).

Compte tenu de la complexité et de la variabilité de la MOD, aucune technique analytique à l'heure actuelle ne permet d'appréhender sa composition exacte ainsi que ses caractéristiques globales. Aussi, il est nécessaire de mettre en œuvre des approches analytiques complémentaires pour caractériser la MOD naturelle. D'un point de vue quantitatif, la concentration de la MOD est typiquement estimée via la mesure de la concentration en carbone organique dissous (COD) puisqu'on estime que la MOD contient 50 à 60% de carbone organique (Dittmar & Stubbins, 2014). Les caractéristiques qualitatives sont quant à elles classiquement évaluées via des techniques rapides spectroscopiques (spectrofluorescence, UV-visible) (Dittmar & Stubbins, 2014). Ces dernières permettent de travailler avec de faibles volumes et donnent des informations globales sur la composition de la MOD colorée et fluorescente (De Perre, 2009).

2.4. Rôle dans les écosystèmes

2.4.1. Cycles biogéochimiques

Compte tenu de sa composition résultant de la dégradation physique, chimique et biologique des organismes vivants, la MOD intervient dans le cycle biogéochimique de nombreux éléments indispensables à la vie aquatique. C'est notamment le cas du carbone, composant majoritaire de la MOD (environ 60%) (Dittmar & Stubbins, 2014). En effet, on estime que dans les océans, il y aurait 700 Gt C organique, autant que dans l'atmosphère sous forme de CO_2 principalement (750 Gt C) (Bauer & Bianchi, 2011). La MOD intervient également dans le cycle de l'azote, du phosphore et de certains éléments traces métalliques (fer, manganèse, cuivre) (Findlay & Sinsabaugh, 2003), et donc dans le fonctionnement des réseaux trophiques (cf. parties 1.2.3 et 1.3.2.; Azam *et al.*, 1983, Mostajir *et al.*, 2012).

2.4.2. Influence sur les microorganismes

Dans l'environnement, les microorganismes comme les microalgues et les bactéries sont influencés par la présence de MOD dans le milieu.

La MOD peut affecter les microalgues de façon indirecte via son impact sur la pénétration de la lumière dans la colonne d'eau. En effet, une forte concentration en matière organique dissoute diminue la profondeur de la zone euphotique qui conditionne le développement microalgal et donc la productivité de l'écosystème en question (Karlsson *et al.*, 2009, Kirk, 2010). Les matières organiques dissoutes colorées jouent un rôle prépondérant dans les variations d'absorption du rayonnement solaire. En effet, ces substances absorbent fortement dans la zone PAR (longueurs d'onde entre 400 et 700 nm) et plus spécifiquement dans le bleu (~440 nm) qui correspond également aux longueurs d'onde d'absorption

maximale de la chlorophylle *a*. La présence de matière organique limite donc la disponibilité de la lumière pour les microalgues (Nelson *et al.*, 1998, Siegel *et al.*, 2002).

Cependant, les substances colorées de la MOD peuvent également jouer un rôle positif sur les organismes aquatiques en les protégeant des radiations UV. En effet, il a été démontré que le pourcentage d'atténuation des rayonnements UVA (315-400 nm) et UVB (280-315 nm) dans la colonne d'eau était positivement relié à la concentration en MOD colorée (voir la revue de Tedetti & Sempéré, 2006). Les radiations UV engendrent un stress oxydatif dans les cellules, causant des dommages cellulaires et moléculaires à l'ADN, au niveau des chloroplastes, des photosystèmes, etc. (Pessoa, 2012). L'atténuation du rayonnement UV liée aux substances colorées peut ainsi s'accompagner d'une diminution des dommages à l'ADN observés sur des organismes planctoniques (voir la revue de Tedetti & Sempéré, 2006).

La MOD affecte également les microorganismes de façon directe via sa consommation. En effet, la MOD, dont se nourrissent principalement les bactéries (Dittmar & Stubbins, 2014), est à la base de la boucle microbienne (Azam *et al.*, 1983). Les bactéries, qui sont des organismes osmotrophes (Nagata, 2008), « consomment » les molécules de faible poids moléculaire en tout premier lieu. La matière polymérisée est transformée par les bactéries en petites molécules labiles grâce à des enzymes extracellulaires relarguées dans le milieu, qui hydrolysent les composés (Nagata, 2008). En plus d'alimenter les bactéries, cette hydrolyse permet de mettre à disposition des microalgues un certain nombre de composés inorganiques et organiques comme les vitamines, qui sont indispensables à leur développement et qu'elles sont incapables de synthétiser pour certaines espèces. C'est le cas notamment des vitamines B1 (thiamine), B7 (biotine) ou B12 (cobalamine) (Croft *et al.*, 2006). On estime par exemple que la croissance de 25% des espèces de microalgues dépendrait de la consommation de vitamine B12, rendue disponible dans le milieu grâce aux bactéries (Croft *et al.*, 2005, Droop, 2007). D'autres molécules organiques servent de source d'azote, de phosphore et de fer (Beardall & Raven, 2016, Perez-Garcia *et al.*, 2011). Outre ces éléments, des études réalisées en conditions contrôlées de laboratoire ont montré que plusieurs espèces de microalgues dulçaquicoles et marines pouvaient consommer des molécules « simples » : des sucres comme le glucose (Cheirsilp & Torpee, 2012, EL-Sheekh *et al.*, 2012, Liu *et al.*, 2009) ou le sucrose (Bhatnagar *et al.*, 2011, Sharma *et al.*, 2016), de l'acétate (Alkhamis & Qin, 2013, Laliberté & de la Noüe, 1993, Sharma *et al.*, 2016), du glycérol (Liu *et al.*, 2009, Sharma *et al.*, 2016) ou de l'urée (Choochote *et al.*, 2010, Li *et al.*, 2008). Dans les études citées, la croissance des microalgues est systématiquement stimulée en présence de ces molécules. Des molécules plus complexes comme les substances humiques peuvent également être consommées (Campbell *et al.*, 1997, Gagnon *et al.*, 2005, Millour, 2011, Sánchez-Marín & Beiras, 2011). Cependant aucune étude n'a, à notre connaissance, visé à considérer la MOD naturelle prise dans son intégralité et toute sa complexité, dans des expérimentations avec des microalgues.

Enfin, à ces impacts positifs de la MOD sur la croissance des microalgues peuvent s'ajouter des effets potentiellement négatifs, en raison des liens étroits existant entre la MOD naturelle et les polluants tels que les pesticides.

2.4.3. Transport et biodisponibilité des polluants – Cas des pesticides

Dans l'environnement aquatique, la MOD joue un rôle prépondérant dans le transport, le devenir et la biodisponibilité des polluants dont les pesticides (Bejarano *et al.*, 2005a).

La MOD peut affecter le transport des contaminants. En effet, selon les propriétés de la molécule du pesticide considéré et notamment son affinité pour le carbone organique (représentée par la constante K_{DOC}), elle peut s'adsorber aux molécules constitutives de la MOD via diverses liaisons comme les liaisons de Van der Waals (Gao *et al.*, 2012). Cette adsorption conditionne la mobilité du pesticide selon le milieu : diminution de la mobilité dans les sols et sédiments et mobilité favorisée en phase aqueuse (Gao *et al.*, 2012). Les molécules peuvent ainsi plus facilement transiter dans le milieu aquatique.

Dans l'environnement aquatique, certains composants de la MOD comme les substances colorées jouent un rôle prépondérant dans le devenir des pesticides. Elles peuvent à la fois stimuler et freiner leur dégradation naturelle (Canonica, 2009). En effet, ces substances colorées absorbent fortement dans le violet et l'ultraviolet, longueurs d'onde qui participent également à la dégradation naturelle des pesticides (Mahmoud & Loutfy, 2012). Aussi, dans l'environnement, les substances humiques captent une partie des photons, atténuant ainsi l'impact direct des photons sur les molécules de pesticides et donc leur photodégradation (Canonica, 2009, Zeng *et al.*, 2002). Cette diminution de la photodégradation est fonction du pesticide et de la concentration en substances humiques (Zeng *et al.*, 2002). Cependant, l'énergie absorbée par les substances humiques est immédiatement convertie, ce qui provoque la libération de chaleur et la formation de composés très réactifs (radical hydroxyle, oxygène singulet, peroxyde d'hydrogène, molécules excitées à l'état de triplet) appelés photosensibilisateurs. Cela peut initier des réactions chimiques avec des pesticides, y compris avec ceux difficilement dégradables (Canonica, 2009, McNeill & Canonica, 2016). De nombreuses études ont ainsi montré une dégradation beaucoup plus importante de pesticides en présence de MOD : c'est par exemple le cas du métolachlore (Trouts, 2008), du triclocarban (Trouts, 2008), de l'atrazine (Minero *et al.*, 1992, Zeng *et al.*, 2002) et de l'isoproturon (Yuan *et al.*, 2016). Yuan *et al.* (2016) ont également observé une photodégradation de l'isoproturon en conditions lumineuses, photodégradation devenue réversible par passage à l'obscurité et en présence de MOD (cétones aromatiques et acides fulviques de référence), le phénomène étant température- et pH-dépendant. Ces résultats soulignent donc le rôle important que peut avoir la MOD sur le devenir des pesticides dans l'environnement.

La présence de MOD dans le milieu peut également influencer la biodisponibilité et la toxicité des pesticides. En effet, plusieurs études réalisées sur des animaux ont montré que la présence de MOD modifiait la biodisponibilité et notamment la bioaccumulation des pesticides selon la molécule étudiée, l'organisme et la concentration de MOD (Haitzer *et al.*, 1998). Bejarano *et al.* (2005b) ont par exemple montré que, quelle que soit la fraction de MOD considérée (fractions naturelles marines <0,45 µm et <3 kDa, acides humiques et fulviques commerciaux), l'accumulation du chlorpyrifos dans le bivalve marin *Mercenaria mercenaria* Linnaeus diminuait comparativement au milieu exempt de MOD. Bejarano *et al.* (2005a) ont montré que la présence de MOD naturelle augmentait la toxicité du fipronil et diminuait la

toxicité du chlorpyrifos et du chlorothalonil vis-à-vis du copépode estuarien *Amphiascus tenuiremis*. Carmosini *et al.* (2016) ont montré une diminution de la mortalité, du développement et du taux d'éclosion en présence de carbone organique dissous pour le poisson zèbre *Danio rerio* exposé à du triclosan. Concernant les microalgues, seule l'étude de Zhang *et al.* (2016b), à notre connaissance, porte sur des pesticides combinés à de la MOD naturelle (SRNOM (Suwannee River natural organic matter), IHSS) vis-à-vis d'une microalgue dulçaquicole cultivée en milieu non axénique, *Chlorella pyrenoidosa*. Ces auteurs ont montré que la présence de MOD avait augmenté la toxicité du monochlorobenzène et du 1,2-dichlorobenzène, alors qu'elle avait diminué la toxicité du pentachlorobenzène et de l'hexachlorobenzène et n'avait pas changé celle du 1,2,3-trichlorobenzène et du 1,2,3,4-tétrachlorobenzène. Aucune étude n'a donc visé à évaluer la toxicité de la combinaison de pesticides et de MOD naturelle sur des microalgues dulçaquicoles et marines en culture.

3. Les pesticides

3.1. Définition

Les pesticides (de l'anglais "pest" signifiant nuisible et du latin "caedere" signifiant frapper, abattre, tuer) sont des substances ou mélanges de substances chimiques destinés à repousser, contrôler ou détruire tout organisme considéré comme nuisible (FAO, 2003, Union Européenne, 1998). Selon leur cible, on distingue les herbicides, les fongicides, les insecticides, les bactéricides, etc.

3.2. Historique et utilisation

L'utilisation de pesticides est très ancienne puisque l'on recense dans les écrits de Pline l'Ancien et Homère (Antiquité) l'utilisation du soufre et de l'arsenic comme moyen de lutte contre les nuisibles en agriculture (Calvet, 2005). Cependant c'est surtout au cours des XIXème et XXème siècles que les propriétés des pesticides ont été mises en évidence donnant lieu à des développements considérables : de graves épidémies (phylloxéra, mildiou, doryphores, rouilles, oïdium) ont touché les productions agricoles indispensables à la consommation des populations (céréales, pommes de terre, vigne). Au cours du XXème siècle, l'utilisation des pesticides a connu un véritable essor avec l'apparition des produits de synthèse (Calvet, 2005). C'est en 1939 que Muller et Weissman de la Société Ciba-Geigy ont découvert les propriétés insecticides du produit organophosphoré de synthèse, le dichloro-diphényle-trichloro-éthane (DDT). Cette découverte a conduit au développement des pesticides à base d'hydrocarbures chlorés et de composés organophosphorés pendant la Seconde Guerre Mondiale (Boland *et al.*, 2004). Aussi, cette période marque un véritable tournant dans le mode de production agricole, à tel point qu'on la qualifie de « Révolution Verte » en raison des changements profonds opérés : production intensive à rendement élevé, protection de la qualité des produits alimentaires, main d'œuvre plus réduite, mécanisation, le tout grâce à l'utilisation et l'accroissement de l'arsenal chimique que constituent les pesticides (Boland *et al.*, 2004, Calvet, 2005). À l'heure actuelle, de nombreux pesticides existent et couvrent un très large panel

d'organismes ciblés (végétaux, bactéries, acariens, arachnides, mammifères, rongeurs, nématodes, etc.) au moyen de divers mécanismes d'action (inhibition d'enzymes, de mécanismes cellulaires comme la photosynthèse, la production de lipides, de caroténoïdes, d'acides aminés, inhibition de la chaîne respiratoire, etc. (Belles, 2012)). Cette évolution du nombre de produits mis sur le marché est liée à la synthèse de substances de plus en plus efficaces, conduisant à une diminution des quantités appliquées (Calvet, 2005).

En Europe, les substances utilisées sont regroupées en deux catégories, qui définissent la réglementation qui s'y applique ainsi que leurs usages : les phytosanitaires et les biocides. Les produits phytosanitaires, également appelés produits phytopharmaceutiques, sont destinés à protéger les végétaux ou les produits végétaux contre les organismes nuisibles. Ils sont essentiellement utilisés dans le domaine agricole, mais également dans les zones non agricoles comme les espaces publics (voiries, espaces verts), ou le long des lignes de chemins de fer (Règlement n°1107/2009, Union Européenne). Les biocides sont quant à eux destinés à tous les autres usages : sanitaire (désinfectants), protection des matériaux (bois, fibres, matériaux de construction, produits antisalissures), répulsifs, piscicides, insecticides, etc. (Règlement n°528/2012, Union Européenne).

En Europe et en 2013 (données les plus récentes), les pays en tête de l'utilisation de substances actives sont l'Espagne avec 69 587 tonnes suivie par la France avec 66 659 tonnes. La troisième position est occupée par l'Italie avec 49 011 tonnes. Cependant, la France est au premier rang par la surface agricole utile (29 millions d'hectares) suivie de l'Espagne (24 millions d'hectares) et de l'Allemagne (17 millions d'hectares). Aussi, en considérant la consommation par unité de surface agricole, la France est au 9ème rang européen avec 2,3 kg.ha^{-1} (Ecophyto, 2015, Eurostat, 2013). La surface agricole utile de notre pays est essentiellement exploitée pour la production de céréales, de betteraves sucrières, d'oléagineux, de pommes de terre mais également par des vignes et arbres fruitiers (Ecophyto, 2015).

Les molécules ainsi épandues, transitent vers les hydrosystèmes en raison de la continuité des écosystèmes. Elles sont constamment retrouvées dans l'environnement y compris dans des endroits inattendus comme dans les régions polaires (Khairy *et al.*, 2016, Ma *et al.*, 2016), et constituent à l'heure actuelle des pollutions diffuses considérées comme très préoccupantes (Aubertot *et al.*, 2005).

3.3. Facteurs de transfert des pesticides dans l'environnement aquatique

La contamination des systèmes aquatiques par les pesticides se fait majoritairement de façon diffuse, par leur transfert vers les eaux via une multitude de processus et facteurs qui dépendent :

– des propriétés intrinsèques des molécules : leur caractère dispersif (processus de sorption et désorption, volatilité, caractère hydrophile, affinité pour le carbone organique dissous) et leur caractère dégradable (temps de demi-vie) (Alix *et al.*, 2005, Aubertot *et al.*, 2005, Gao *et al.*, 2012, Lundberg *et al.*, 1995) ;

– du mode d'application : une molécule épandue par voie aérienne, sous forme de granulés ou de peinture (antifouling) pourra plus facilement contaminer le milieu aquatique qu'une substance injectée (Aubertot *et al.*, 2005, Van Der Werf, 1997) ;

– des conditions climatiques pendant et après l'application : la présence de vent fort, de brouillard, de pluie, ou de très fortes températures (évaporation) favorise la dispersion des pesticides. Après application, les conditions météorologiques vont affecter le transport dans l'environnement aquatique par des phénomènes de volatilisation, drainage, ruissellement, lessivage des sols, lixiviation, érosion des sols (Figure 9) (Aubertot *et al.*, 2005, Van Der Werf, 1997) ;

– de la "vulnérabilité" du milieu : la nature du sol (caractéristiques géologiques et pédologiques qui vont conditionner l'adsorption et la désorption des molécules), sa pente, les systèmes de culture (Alix *et al.*, 2005, Aubertot *et al.*, 2005, Gao *et al.*, 2012, Van Der Werf, 1997) ;

– de la structuration du paysage : la présence de zones d'habitation, de zones tampons, de champs agricoles, de communautés urbaines, le type de cours d'eau et sa proximité avec tous les éléments cités précédemment (Alix *et al.*, 2005).

Tous ces éléments vont fortement influencer le type de molécules retrouvées dans l'environnement aquatique ainsi que leurs concentrations du fait de la continuité des écosystèmes. Le milieu marin côtier représente ainsi le réceptacle ultime de ces molécules (Rajasekaran *et al.*, 2005) (Figure 9). On estime à l'heure actuelle que 80% de la pollution marine est d'origine terrestre (Colas & Pappalardo, 2011).

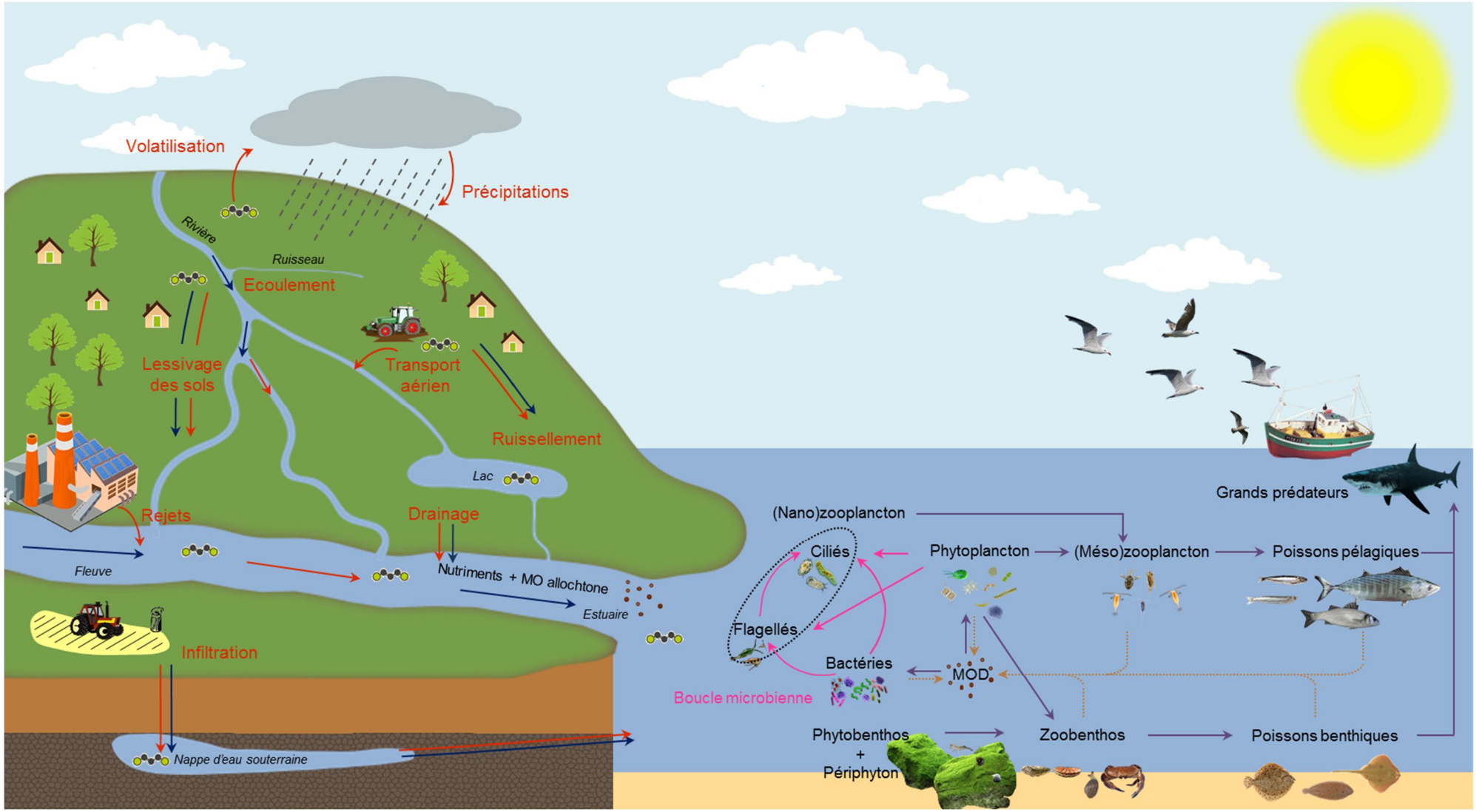


Figure 9 : Schéma bilan faisant état (i) des processus de transfert des pesticides (flèches rouges) et de la MOD allochtone (flèches bleues) dans l'environnement aquatique, (ii) de la production de MOD autochtone et (iii) des réseaux trophiques aquatiques (Coquillé©).

3.4. État des lieux de la contamination aquatique

3.4.1. En France

La contamination des cours d'eau en France est suivie depuis plusieurs années maintenant. Ce suivi a montré que des pesticides, essentiellement des herbicides, étaient présents dans la quasi-totalité de ceux-ci (SOeS, 2015).

En 2013 et en France métropolitaine, sur les 2826 points de surveillance de la qualité des cours d'eau, 93% contenaient au moins un pesticide sur les 664 molécules recherchées (Figure 10). Les rares endroits non contaminés étaient retrouvés dans les zones montagneuses ou dans les zones où l'agriculture était peu intensive.

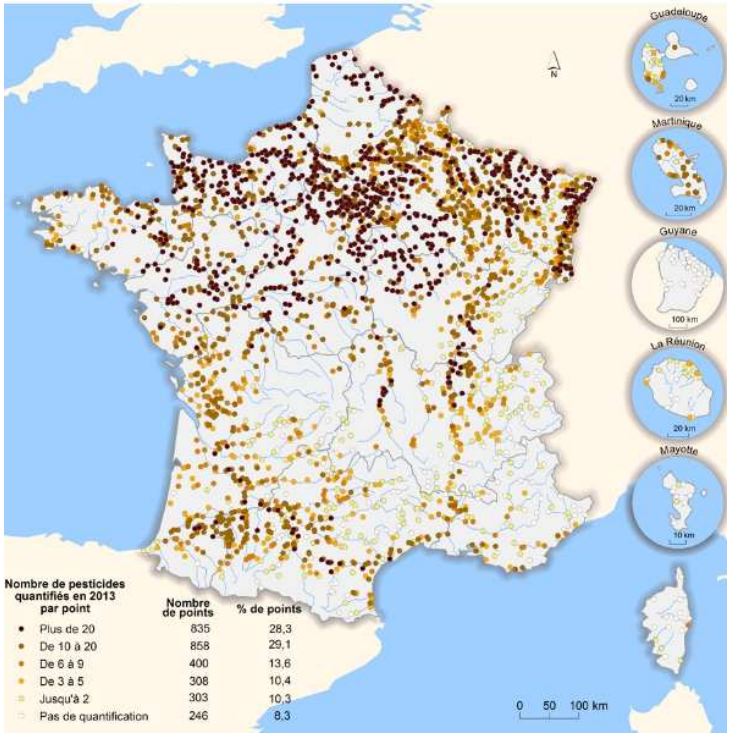


Figure 10 : Nombre de pesticides quantifiés dans les cours d'eau en 2013 (Source : agences et offices de l'eau ; SOeS, 2015).

Dans près de 60% des cours d'eau contaminés, au moins dix pesticides différents ont été retrouvés, essentiellement des herbicides (en France métropolitaine, les départements d'Outre-Mer étant surtout contaminés par des insecticides) (Figure 11).

Cette contamination des eaux reflète d'une part l'usage largement répandu de certaines molécules comme le glyphosate ou le S-métolachlore, d'autre part la persistance de molécules interdites en agriculture depuis de nombreuses années comme l'atrazine et le diuron (interdites depuis 2003 et 2008, respectivement).

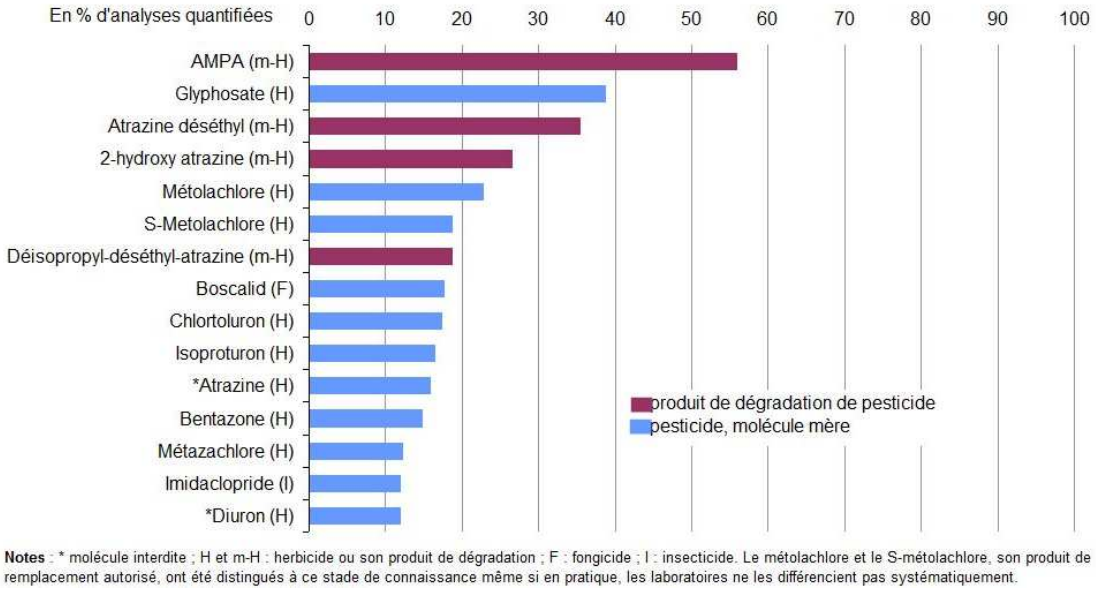


Figure 11 : Pesticides les plus quantifiés dans les cours d'eau de métropole en 2013 (Source: agences de l'eau; SOeS, 2015).

3.4.2. Cas de la Leyre et du Bassin d'Arcachon

Le travail présenté dans ce manuscrit porte sur l'utilisation de matière organique dissoute naturelle provenant d'une zone d'étude spécifique : le Bassin d'Arcachon et son principal tributaire, la Leyre.

Le Bassin d'Arcachon (Figure 12) est une lagune de 180 km² peu profonde et soumise à l'influence des marées dont l'amplitude varie de 1,1 m à 4,9 m (Canton *et al.*, 2012, Dagens, 2012). Le temps de renouvellement du Bassin est estimé à respectivement 12,8 et 15,9 jours en saison hivernale et estivale (Plus *et al.*, 2006).

Figure 12 : Localisation du Bassin d'Arcachon (Géoportail).

Chaque année, le Bassin d'Arcachon est l'exutoire de près de 1250 millions de m^3 d'eau douce (Fauvelle, 2012), alimenté par une surface totale de bassin versant de plus de 3000 km^2 (Canton *et al.*, 2012). Ces apports d'eau douce sont dominés par la Leyre, principal tributaire représentant environ 78% des apports totaux, le reste étant attribuable à 15 autres petits cours d'eau (Canton *et al.*, 2012).

De nombreuses activités faisant usage de produits phytosanitaires y sont identifiées : les pratiques agricoles (9,3% de la surface totale du bassin versant, dont 71,2% pour la culture du maïs et 15% pour la culture légumière), la sylviculture, les pratiques non agricoles comme l'entretien des espaces verts, des voiries, des réseaux ferroviaires et des jardins (Dagens, 2012). Ces pratiques, qui s'ajoutent aux activités nautiques (professionnelles et récréatives) dans le Bassin, sont à l'origine d'une contamination chimique des eaux, mise en évidence au moyen de réseaux de surveillance. Ainsi, le réseau de surveillance REPAR (Réseau opérationnel de suivi et d'expertise sur les phytosanitaires et biocides au niveau du Bassin d'Arcachon et de ses bassins versants) a démontré qu'au cours de l'année, deux pics de contamination dans les cours d'eau et le Bassin d'Arcachon sont généralement observés : un pic printanier et un pic hivernal (REPAR, 2015).

Le pic printanier correspond à la période d'épandage des pesticides. Le pic hivernal est quant à lui lié à la conjonction de deux éléments : le type de sol et la faible profondeur de la nappe d'eau souterraine. En effet, les Landes sont caractérisées par un sol sableux très filtrant. En hiver, cette nappe, qui s'est chargée en pesticides accumulés dans les sols, devient affleurante. Cette eau chargée est alors drainée par les cours d'eau jusqu'au Bassin d'Arcachon. Ce pic hivernal de pollution est généralement plus important que celui du printemps (REPAR, 2015).

Depuis la mise en place du REPAR en 2010, les molécules les plus retrouvées au sein de la Leyre et du Bassin d'Arcachon sont principalement des herbicides (Figure 13) et notamment le métolachlore (R- ou S- en raison de l'impossibilité de différencier les isomères par la technique analytique mise en œuvre) et ses métabolites ESA et OA témoignant de son importante utilisation (Figure 14) (REPAR, 2015, Tapie *et al.*, 2016).

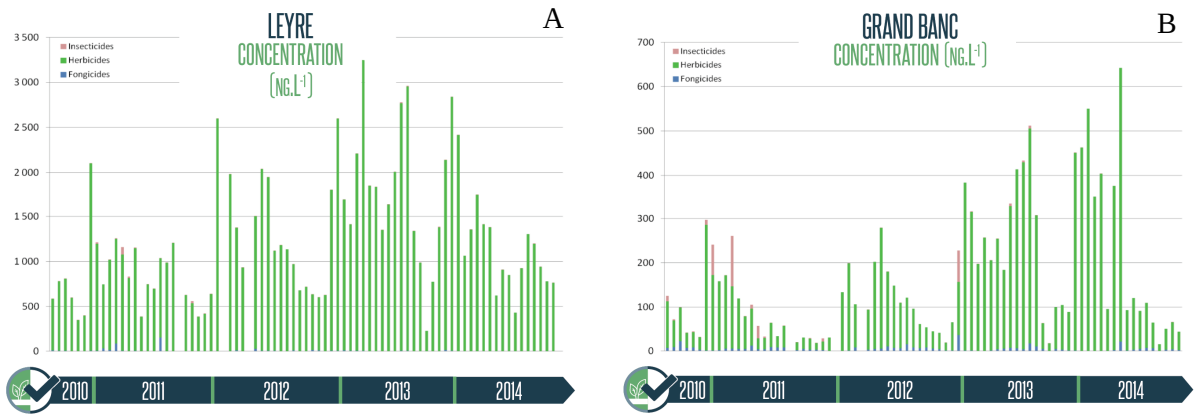


Figure 13 : Évolution des concentrations en pesticides au sein de la Leyre (A) et dans le Bassin d'Arcachon à la station de Grand Banc (à proximité de la sortie – B) (REPAR, 2015).

Après le métolachlore, d'autres molécules de type herbicide et algicide ont une forte empreinte de contamination au sein du Bassin d'Arcachon : l'acétochlore, l'irgarol et le diuron (Figure 14).

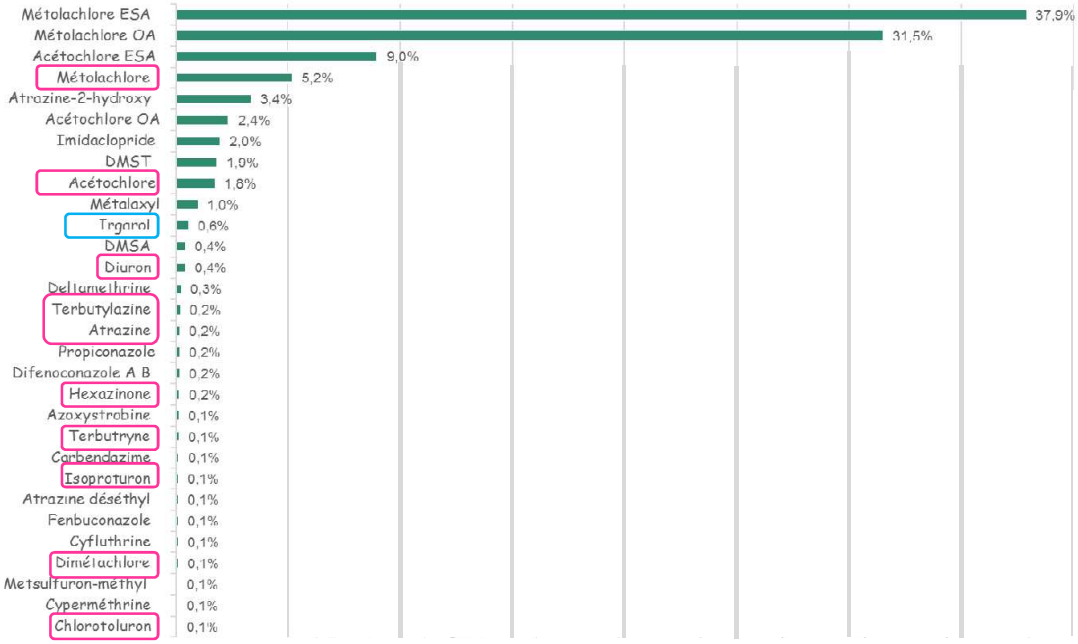


Figure 14 : Empreinte de contamination à la station de Grand Banc dans le Bassin d'Arcachon (Tapie *et al.*, 2016). Les éléments encadrés correspondent aux molécules mères herbicides (rose) et algicides (bleu).

Concernant la Leyre, les données d'empreinte de contamination disponibles, moins récentes, montrent une contamination chronique par le métolachlore, l'azoxystrobine, et l'acétochlore, et une contamination plus ponctuelle par le diuron (Figure 15).

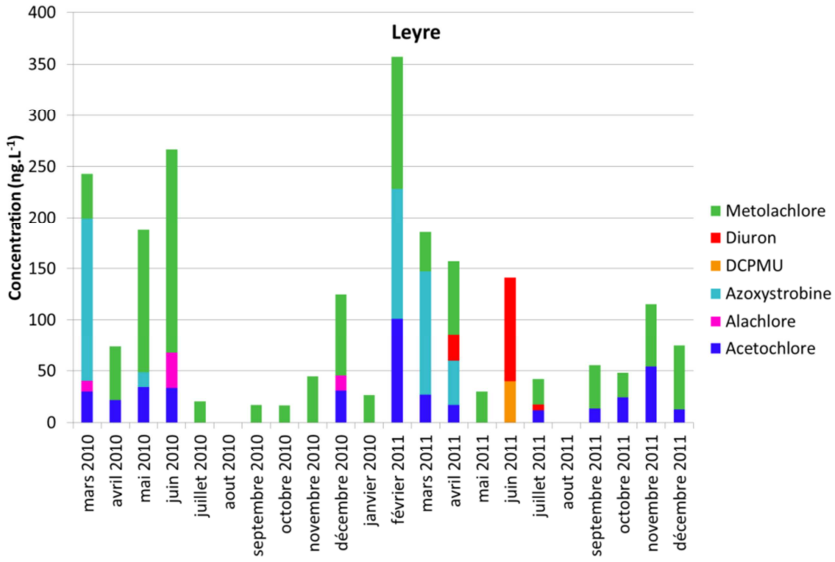


Figure 15 : Suivi de la contamination de 33 pesticides dans la Leyre entre mars 2010 et 2011 (Fauvelle, 2012).

Le constat de la contamination de la Leyre et du Bassin d'Arcachon par des pesticides et algicides a ainsi guidé le choix des molécules à considérer dans ces travaux de thèse.

La prise de conscience de la contamination généralisée des eaux ainsi que les risques associés à cette contamination pour les écosystèmes et l'homme, a engendré la mise en place d'une réglementation à différents niveaux.

3.5. Réglementation

Les pesticides sont ainsi des molécules retrouvées dans les environnements aquatiques et dont le nombre ne cesse de s'accroître. Or, compte tenu (i) des concentrations et du nombre parfois élevé de molécules retrouvées dans les écosystèmes aquatiques, (ii) de la multitude de sources à l'origine des contaminations (agricole, domestique, industrielle, urbaine) mais également (iii) des impacts délétères que peuvent avoir ces molécules sur les organismes vivants non cibles, un cadre réglementaire de plus en plus contraignant a été mis en place au fil des années.

La réglementation qui concerne les pesticides s'effectue à deux niveaux : au niveau des substances chimiques elles-mêmes (REACh, plan Ecophyto) et au niveau de la protection des masses d'eau et des écosystèmes aquatiques (Directive Cadre sur l'Eau : DCE et Directive Cadre Stratégie pour le Milieu Marin : DCSMM).

Ces deux types de réglementations ont pour but de contrôler la mise sur le marché des substances (REACh), de réguler l'utilisation de ces molécules (plan Ecophyto) afin de limiter les concentrations retrouvées dans l'environnement et ainsi limiter les effets sur les organismes (DCSMM).

3.5.1. Réglementation visant à encadrer la vente et l'utilisation des substances chimiques

Au niveau européen, le règlement REACh (Registration Evaluation Authorization and Restriction of Chemicals, Règlement n°1907/2006) a été mis en place en 2007 et vise à encadrer la mise sur le marché de substances chimiques dont les pesticides (produits phytosanitaires et biocides). L'objectif de ce règlement est d'améliorer la protection de l'environnement et de la santé humaine contre les risques liés aux substances chimiques tout en maintenant et renforçant la compétitivité de l'industrie chimique européenne. Il s'adresse aux industriels, qui doivent enregistrer les substances qu'ils fabriquent ou importent et fournir la preuve que l'utilisation de la substance en question peut se faire sans risque pour la santé humaine ou pour l'environnement. L'autorisation ou la restriction de mise sur le marché incombe à des comités d'experts de l'Agence Européenne des Produits Chimiques (European Chemicals Agency, ECHA).

Au niveau national, le plan Ecophyto 2018, initié en 2008, avait pour objectif de réduire de 50% l'usage des produits phytosanitaires dans un délai de 10 ans en cohérence avec les impératifs économiques et techniques de production (en qualité et en quantité). Son champ d'action ne se limite pas à la sphère agricole, puisqu'un axe spécifique du plan concerne également les zones non agricoles. Le but n'ayant pas été atteint, un second plan Ecophyto (Ecophyto II) a été mis en place en 2015. Son objectif de réduction de 50% de l'usage des pesticides est réaffirmé et divisé en deux phases : une réduction de 25% d'ici 2020 et une réduction de 50% d'ici 2025 grâce à différents dispositifs tels que la loi de transition énergétique pour

la croissance verte (Loi n°2015-992 du 15 août 2015). Cette loi interdit, à compter du 1er janvier 2017, l'usage des produits phytosanitaires par l'État, les collectivités locales et les établissements publics pour l'entretien des espaces verts, voiries, forêts et promenades. Cette loi interdit également, à compter du 1er janvier 2019, la commercialisation et la détention de produits phytosanitaires à usage non professionnel (jardiniers amateurs).

3.5.2. Réglementation visant à protéger les masses d'eau et les écosystèmes

La Directive Cadre sur l'Eau (DCE, 2000/60/CE) est une directive européenne fixant un cadre de gestion dont le but était d'atteindre ou maintenir, avant 2015, un bon état écologique et chimique des masses d'eaux souterraines et superficielles (eaux s'arrêtant à 1 mille nautique de la ligne de base servant à la mesure de la largeur des Eaux territoriales). Cette directive donne ainsi une priorité à la protection de l'environnement et à une utilisation durable de l'eau, via la préservation et la restauration de l'état des masses d'eaux. L'état chimique des masses d'eau est évalué via la mesure des concentrations de substances prioritaires et la comparaison par rapport à une norme de qualité environnementale (NQE). Cette liste de substances prioritaires est composée de 45 molécules de pesticides, métaux et hydrocarbures (Annexe 1). Le but n'ayant pas été atteint en 2015, un report sous la forme d'un second plan de gestion a été mis en œuvre (2016-2021) afin d'atteindre les objectifs environnementaux au plus tard en 2027.

La Directive Cadre Stratégie pour le Milieu Marin (DCSMM, 2008/56/CE) est une directive européenne fixant un cadre d'action dont le but est de réduire les impacts des activités humaines sur le milieu marin. Dans ce but, une stratégie de gestion a été élaborée afin d'atteindre ou maintenir, d'ici 2020, le bon état écologique des côtes de l'ensemble des pays européens, hors estuaires et à la limite de la Zone Économique Exclusive (ZEE), située à environ 370 km au large. Le bon état écologique est défini selon onze descripteurs, dont le descripteur 8 concerne directement les niveaux de concentrations en contaminants (dont les pesticides) à ne pas dépasser. Cette directive, basée sur une approche écosystémique, vise à promouvoir l'utilisation durable des eaux marines tout en préservant les écosystèmes. En raison de son champ d'applicabilité, elle est en lien direct avec d'autres directives comme la DCE ou les directives Habitats/Faune/Flore (92/43/CEE) et Oiseaux (2009/147/CE).

La mise en place et l'application de la réglementation sont alimentées par les connaissances issues des travaux de recherche et programmes de surveillance sur lesquels l'effort doit être maintenu. Cela concerne en particulier une meilleure connaissance du devenir et des effets des molécules dispersées dans l'environnement.

3.6. Devenir et toxicité des pesticides dans l'environnement aquatique

Dans l'environnement aquatique, les pesticides peuvent avoir des devenirs différents. Ils peuvent en effet être dégradés via des processus abiotiques et biotiques, engendrant la formation de métabolites et/ou la minéralisation des molécules, et/ou être bioaccumulés dans les organismes. Leur devenir va impacter leur toxicité vis-à-vis des organismes aquatiques.

3.6.1. Dégradation

3.6.1.1. Dégradation abiotique

L'hydrolyse, l'oxydation ainsi que la photolyse sont les principaux processus de dégradation abiotique des pesticides (Wolfe *et al.*, 1990).

L'hydrolyse est une réaction chimique entre les pesticides et les molécules d'eau. Cette réaction, température- et pH-dépendante, est fonction de la structure chimique et des groupements fonctionnels de la molécule (Gao *et al.*, 2012).

L'oxydation des pesticides est fonction de nombreux facteurs environnementaux comme le taux d'oxygène, le pH, la concentration en métaux, le contenu en matière organique. Ces éléments peuvent en effet catalyser la réaction (Gao *et al.*, 2012).

La photolyse est une voie importante de dégradation des pesticides, notamment par le biais des radiations UV. La présence de MOD dans le milieu peut stimuler ou freiner la dégradation des pesticides (voir section 2.4.3. et Canonica, 2009). Les propriétés physico-chimiques des molécules (solubilité dans l'eau, affinité avec des molécules organiques, ionisation, volatilisation) peuvent également influencer la photodégradation des pesticides (Burrows *et al.*, 2002, Calvet, 2005).

3.6.1.2. Dégradation biotique (ou biodégradation)

La dégradation biotique est due à l'action des organismes vivants (végétaux, animaux, microorganismes). C'est un processus majoritaire permettant de transformer les pesticides, jusqu'à leur minéralisation pour certaines molécules : elles passent d'un état organique à un état inorganique. C'est la seule voie permettant la disparition complète de la molécule dans l'environnement (Calvet, 2005).

Bien que de nombreux organismes soient capables de dégrader, ce processus est essentiellement assuré par des bactéries et des champignons en raison de leur diversité et notamment de la multiplicité des conditions de développement (Calvet, 2005). La biodégradation dépend de nombreux facteurs : les paramètres physico-chimiques, l'état du pesticide (qui doit être à l'état dissous pour les microorganismes), sa biodisponibilité et l'équipement enzymatique dont disposent les cellules.

La dégradation peut se faire par quatre voies (Bollag & Liu, 1990) :

– le métabolisme dit de routine : utilisation du pesticide comme source d'énergie pour la croissance grâce aux enzymes dont dispose l'organisme ;

– le co-métabolisme : transformations chimiques des pesticides via une molécule (ou un ensemble de molécules) qui favorise/permet la dégradation ;

– la conjugaison : réactions chimiques entre pesticides ou avec d'autres molécules, qui sont catalysées par des enzymes extracellulaires ;

– les effets liés à l'activité des micro-organismes : consommation d'oxygène, production de composés organiques, modulation du pH qui vont agir directement sur la dégradation des pesticides (facilitation ou inhibition).

Un autre paramètre est également capital pour la dégradation des pesticides : la biodisponibilité (ou capacité d'interagir) de la molécule pour les organismes. La biodisponibilité est fonction de l'organisme étudié (physiologie), du pesticide, de son devenir dans l'environnement, c'est-à-dire de sa dégradation mais également de la présence de matière organique et notamment de la fraction dissoute. Les pesticides peuvent s'adsorber sur les molécules de MOD : cette complexation a pour conséquence de moduler leur dégradation (Canonica, 2009), leur bioaccumulation et leur toxicité (Alix *et al.*, 2005).

3.6.2. Devenir et effets dans les organismes aquatiques

Une fois passé les barrières biologiques (membranes), les pesticides peuvent être bioaccumulés, biotransformés et/ou induire des effets délétères sur les organismes aquatiques dont les microalgues.

3.6.2.1. Bioaccumulation et biotransformation

La bioaccumulation peut se faire via la consommation de nourriture contaminée ou directement par divers phénomènes comme la diffusion passive, la filtration, la diffusion facilitée (via un canal) ou via un transporteur (Amiard, 2011). Plusieurs facteurs influencent ce transport : la physico-chimie, le degré de lipophilie de la molécule pesticide. Le potentiel de bioaccumulation d'une molécule est évalué via le coefficient de partage octanol/eau (K_{ow}) en raison de la polarité proche de l'octanol avec les membranes lipidiques. Si le Log K_{ow} est inférieur à 1,5, la substance est polaire et peu bioaccumulable et si le Log K_{ow} est supérieur à 3, la substance est apolaire et bioaccumulable (Amiard, 2011). Les pesticides, qui couvrent une gamme de Log K_{ow} entre 1,0 et 8,0, ne sont donc pas tous bioaccumulables (Calvet, 2005).

La biotransformation est un processus qui permet la conversion de la molécule-mère en métabolite. Ce processus a pour but de détoxifier l'organisme. Une multitude de transformations chimiques, essentiellement causées par des enzymes (cytochromes P450, catalase, glutathion S-transférase), peuvent avoir lieu. La nature de ces transformations, ainsi que l'intensité de détoxification, sont fonction de la molécule mais également de l'organisme (Amiard, 2011).

3.6.2.2. Étude des effets des pesticides

L'exposition directe des organismes aux pesticides peut engendrer des effets divers selon le type de pesticide, la concentration, la durée d'exposition, l'organisme, sa sensibilité et notamment ses capacités de détoxification. En effet, les pesticides aux modes d'action variés peuvent agir selon plusieurs types de réactions (Stenersen, 2004) :

– inhibition d'activités enzymatiques ;

– perturbation de signaux chimiques via le blocage de récepteurs ;

– génération de molécules très réactives provoquant la dégradation de composants cellulaires ;

– altération des gradients de pH (qui se font au travers des membranes) nécessaires à la production d'énergie dans les mitochondries et les chloroplastes ;

– perturbation de la structure physique des membranes cellulaires.

Pour évaluer l'impact toxique de pesticides sur les organismes, différentes échelles peuvent être considérées : des communautés, populations, à l'individu, son métabolisme et les mécanismes cellulaires, jusqu'à l'échelle moléculaire (génomique, transcriptomique). Aussi, dans les tests standardisés avec des microalgues comme celui de l'OCDE (2011), les effets sont évalués à l'échelle de la population sur le taux de croissance.

Depuis de nombreuses années, les effets des pesticides sont étudiés sur les microalgues à divers niveaux de complexité (population, communautés, pesticides seuls et en mélange), que ce soit pour fournir des données de toxicologie classiques (comme celles exigées dans le cadre des autorisations de mise sur le marché) ou dans le but d'évaluer plus précisément les conséquences d'expositions en conditions environnementales.

De très nombreuses études ont porté sur l'influence de molécules seules sur des espèces dulçaquicoles et marines (Bérard *et al.*, 2003, Ma *et al.*, 2003, Ma *et al.*, 2006). Les impacts sont généralement évalués sur la croissance mais également sur la photosynthèse, cible de nombreux herbicides (près de 50% ; Stenersen, 2004). Ma *et al.* (2006) ont par exemple démontré que parmi 40 herbicides comprenant neuf modes d'action différents, testés sur la microalgue *Raphidocelis subcapitata*, les molécules les plus toxiques étaient l'atrazine, l'amétrine, le diuron, l'isoproturon et la simazine. Parmi les neuf paramètres biologiques étudiés, les plus sensibles étaient les processus photosynthétiques, la division cellulaire et la synthèse des lipides. La toxicité des pesticides est aussi influencée par la présence d'autres contaminants : ainsi, les pesticides en mélange peuvent donner lieu à des effets synergiques, additifs, antagonistes (Cedergreen *et al.*, 2007, Faust *et al.*, 1993, 1994). L'acquisition de données de toxicité individuelle des molécules considérées devrait donc, dans la mesure du possible, s'accompagner d'études intégrant les effets de mélange, pour mieux comprendre les phénomènes intervenant en milieu naturel (Altenburger *et al.*, 2004). Le réalisme environnemental peut également être amélioré en considérant les communautés naturelles de microalgues (Bérard & Benninghoff, 2001, Hartgers *et al.*, 1998, Kim Tiam *et al.*, 2016, Roubeix *et al.*, 2011a). Par exemple, Knauert *et al.* (2008) ont observé qu'une communauté phytoplanctonique d'eau douce exposée aux herbicides atrazine, isoproturon et diuron, seuls et en mélange, montrait une diminution des impacts toxiques au cours du temps (exposition de 5 semaines). Ce résultat peut traduire une diminution des concentrations de pesticides et/ou une acquisition de tolérance correspondant à une restructuration de la communauté (remplacement des taxons sensibles par des taxons tolérants). L'augmentation du niveau de complexité des expérimentations (considérant notamment les communautés et/ou les mélanges de molécules) au profit du réalisme environnemental s'accompagne *a fortiori* d'une difficulté d'interprétation des résultats et de compréhension des mécanismes du fait des interactions

multiples entre les différents compartiments. Aussi, la simplification des systèmes par la mise en œuvre d'expérimentations en laboratoire est complémentaire pour mieux appréhender les mécanismes en jeu.

3.7. Caractéristiques et toxicité des pesticides choisis vis-à-vis des microalgues

3.7.1. Caractéristiques des molécules sélectionnées

Trois molécules ont été choisies, à partir des données de contamination du Bassin d'Arcachon et de la Leyre, en fonction des critères suivants :

– molécules herbicides et/ou algicides de familles chimiques différentes ;

– molécules les plus concentrées et/ou les plus fréquemment détectées.

Il a donc été décidé de sélectionner :

– l'herbicide S-métolachlore (2-Chloro-N-(2-ethyl-6-methylphenyl)-N-[(1S)-2-methoxy-1-methylethyl]acétamide ; famille des chloroacétamides), isomère du métolachlore autorisé sur le marché (le R- étant interdit) et présent de façon chronique dans la Leyre et le Bassin d'Arcachon ;

– l'herbicide et algicide diuron (1-(3,4 dichlorophenyl)-3,3dimethylurée ; famille des phénylurées), interdit en usage agricole et biocide depuis 2008 (Directive biocide 98/8/CE et arrêté du 21/08/2008) mais toujours utilisé comme antimousse en traitement de façades, relevé de façon plus ponctuelle dans la Leyre et le Bassin d'Arcachon ;

– l'algicide irgarol (2-methylthio-4-tertbutylamino-6-cyclopropylamino-s-triazine ; famille des triazines), interdit depuis 2016 par la Commission Européenne (Décision d'exécution n°2016/107 de la Commission du 27/01/16) mais encore très utilisé dans le monde comme biocide dans les peintures antisalissures sur les bateaux. Il est ponctuellement retrouvé dans le Bassin d'Arcachon.

Les caractéristiques des trois molécules sont présentées dans le Table 3.

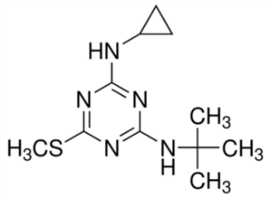
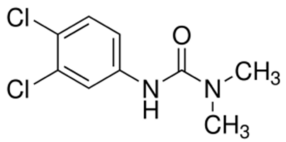
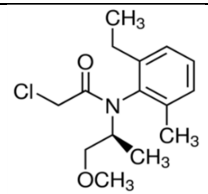
Les principaux produits de dégradation connus sont :

– diuron : DCPMU (1-(3,4-dichlorophényl)-3-methylurée), 1,2,4-DCPU (1-(2,4-dichlorophényl)urée), 1,3,4-DCPU (1-(3,4-dichlorophényl)urée), DCA (dichloroanilide) (Giacomazzi & Cochet, 2004) ;

– irgarol : métabolite M1 (2-méthylthio-4-tert-butylamino-6-amino-s-triazine) (Liu *et al.*, 1997, Okamura *et al.*, 2000b) ;

– S-métolachlore : métolachlore OA (acide [(2-éthyl-6-méthylphenyl)(2-méthoxy-1-méthyléthyl)amino]oxo acétique), métolachlore ESA (acide 2-[(2-éthyl-6-méthylphényl)(2-méthoxy-1-méthyléthyl)amino]-2-oxo-éthane sulfonique) (Rivard, 2003).

Table 3 : Propriétés physico-chimiques des trois molécules étudiées ($T_{1/2}$: temps de demi-vie).

Composé	Famille	Numéro CAS	Structure chimique	Poids moléculaire (uma)	Solubilité dans l'eau ($mg.L^{-1}$)	Log K_{ow}	$T_{1/2}$ par hydrolyse dans l'eau stérilisée	$T_{1/2}$ par photolyse dans l'eau stérilisée	Références
Irgarol	Triazines	28159-98-0		253,4	9	4,0	Très stable	36 à 148 jours	(INERIS, 2012, Tetko *et al.*, 2005)
Diuron	Phénylurées	330-54-1		233,1	35	2,9	Très stable	43-2180 jours	(INERIS, 2007, Tetko *et al.*, 2005)
S-métolachlore	Chloroacétamides	51218-45-2		283,8	530	3,4	Très stable	>30 jours	(Rivard, 2003, Tetko *et al.*, 2005)

3.7.2. Toxicité des trois substances vis-à-vis des microalgues

L'irgarol et le diuron, bien qu'appartenant à deux familles différentes, ciblent tous deux la photosynthèse. En effet, ils inhibent le transport d'électrons entre les quinones A et B du photosystème II (cf. partie 1.4.1 pour le détail de la photosynthèse) (Jones & Kerswell, 2003, Nimbal *et al.*, 1996). Le S-métolachlore inhibe quant à lui les élongases localisées au niveau du réticulum endoplasmique et des mitochondries qui interviennent dans la synthèse des acides gras à longue chaîne (Fuerst, 1987, Götz & Böger, 2004, Vallotton *et al.*, 2008). Cette inhibition entraîne notamment un déséquilibre dans la composition des acides gras des membranes, conduisant à une perte de rigidité et de perméabilité des parois (Böger, 2003, Schmalfuß *et al.*, 1998).

Les diverses études écotoxicologiques réalisées avec des cultures monospécifiques de microalgues et avec ces trois molécules ont montré que la toxicité était fonction de l'espèce étudiée mais également de la molécule. Une partie des résultats disponibles dans la bibliographie ont été synthétisés sous forme de tableaux (Table 4 pour l'irgarol, Table 5 pour le diuron et Table 6 pour le S-métolachlore).

Pour l'irgarol, la concentration causant l'inhibition de 50% de la croissance (CE_{50}) était comprise entre 0,116 $\mu g.L^{-1}$ pour la chlorodendrophycée *Tetraselmis* sp. et 2,3 $\mu g.L^{-1}$ pour la chlorophycée *Selenastrum capricornutum* (Table 4), démontrant la très forte toxicité de cette molécule à de faibles concentrations. Pour le diuron, la CE_{50} pour la croissance est globalement plus élevée d'un ordre de grandeur que pour l'irgarol au regard des données disponibles : de 0,7 $\mu g.L^{-1}$ pour la chlorophycée *Raphidocelis subcapitata* à près de 27 $\mu g.L^{-1}$ pour la diatomée *Navicula forcipata* (Table 5). Enfin, pour le S-métolachlore, la plage des CE_{50} pour la croissance couvre une gamme allant de 68 $\mu g.L^{-1}$ pour *Chlorella pyrenoidosa* à près de 21 280 $\mu g.L^{-1}$ pour *Tetraselmis suecica*. Ainsi, la toxicité des trois molécules peut être ordonnée de la façon suivante : irgarol > diuron > S-métolachlore. D'autre part, les études ont montré que la sensibilité des paramètres biologiques étudiés était fonction de l'espèce de microalgue. En effet, Buma *et al.* (2009) ont ainsi montré que suite à une exposition à de l'irgarol, la photosynthèse était plus inhibée que la croissance pour *Fibrocapsa japonica*, contrairement à *Tetraselmis* sp. (croissance plus inhibée que la photosynthèse) (Table 4).

Table 4 : Effets de l'irgarol sur diverses espèces de microalgues (CE_{50} : concentration efficace causant une diminution de 50% du paramètre biologique étudié par rapport aux témoins).

Espèces microalgales	Milieu de vie	Paramètre	Concentration ($\mu g.L^{-1}$)	Références
Selenastrum capricornutum	dulçaquicole	CE_{50} croissance (72h)	1,6	(Okamura *et al.*, 2003)
		CE_{50} croissance (72h)	2,3	(Okamura *et al.*, 2000a)
Fibrocapsa japonica	marine	CE_{50} croissance (72h) CE_{50} photosynthèse (72h)	0,618 0,110	(Buma *et al.*, 2009)
Tetraselmis sp.		CE_{50} croissance (72h) CE_{50} photosynthèse (72h)	0,116 0,230	(Buma *et al.*, 2009)
Skeletonema costatum		CE_{50} croissance (96h)	0,57	(Bao *et al.*, 2011)
Thalassiosira pseudonana		CE_{50} croissance (96h)	0,38	(Bao *et al.*, 2011)
Dunaliella tertiolecta		CE_{50} croissance (96h)	1,1	(Gatidou & Thomaidis, 2007)
Navicula forcipata		CE_{50} croissance (96h)	0,6	(Gatidou & Thomaidis, 2007)
Emiliania huxleyi		CE_{50} croissance (72h) CE_{50} photosynthèse (72h)	0,406 0,604	(Buma *et al.*, 2009)
		CE_{50} croissance (72h)	0,25	(Devilla *et al.*, 2005)

Table 5 : Effets du diuron sur diverses espèces de microalgues (CE_{50} : concentration efficace causant une diminution de 50% du paramètre biologique étudié par rapport aux témoins).

Espèces microalgales	Milieu de vie	Paramètre	Concentration ($\mu g.L^{-1}$)	Références
Emiliania huxleyi	marine	CE_{50} croissance (72h)	2,26	(Devilla *et al.*, 2005)
Navicula forcipata		CE_{50} croissance (96h)	27	(Gatidou & Thomaidis, 2007)
Dunaliella tertiolecta		CE_{50} croissance (96h)	5,9	(Gatidou & Thomaidis, 2007)
Skeletonema costatum		CE_{50} croissance (96h)	5,9	(Bao *et al.*, 2011)
Thalassiosira pseudonana		CE_{50} croissance (96h)	4,3	(Bao *et al.*, 2011)
Raphidocelis subcapitata	dulçaquicole	CE_{50} croissance (96h)	0,7	(Ma *et al.*, 2006)
Selenastrum capricornutum		CE_{50} croissance (72h)	6,6	(Okamura *et al.*, 2003)
Chlorella vulgaris		CE_{50} croissance (96h)	4,3	(Ma *et al.*, 2002)

Table 6 : Effets du (S-)métolachlore sur diverses espèces de microalgues (CE_{50} : concentration efficace causant une diminution de 50% du paramètre biologique étudié par rapport aux témoins ; met : métolachlore ; S-met : S-métolachlore).

Espèces microalgales	Milieu de vie	Paramètre	Concentration ($\mu g.L^{-1}$)	Références
Selenastrum capricornutum (met)	dulçaquicole	CE_{50} croissance (96h)	84	(Fairchild *et al.*, 1998)
Chlorella vulgaris (met)		CE_{50} croissance (96h)	203	(Fairchild *et al.*, 1998)
Chlamydomonas reinhardi (met)		CE_{50} croissance (96h)	1 138	(Fairchild *et al.*, 1998)
Scenedesmus quadricauda (met)		CE_{50} croissance (96h)	>3 000	(Fairchild *et al.*, 1998)
Microcystis sp. (met)		CE_{50} croissance (96h)	>3 000	(Fairchild *et al.*, 1998)
Anabaena flosque (met)		CE_{50} croissance (96h)	>3 000	(Fairchild *et al.*, 1998)
Raphidocelis subcapitata (met)		CE_{50} croissance (96h)	5 508	(Ma *et al.*, 2006)
Chlorella pyrenoidosa (S-met)		CE_{50} croissance (96h)	68	(Liu & Xiong, 2009)
Scenedesmus vacuolatus (S-met)		CE_{50} croissance (48h)	2 300	(Vallotton *et al.*, 2008)
Tetraselmis suecica (met)	marine	CE_{50} croissance (72h)	21 280	(Ebenezer & Ki, 2013)
Ditylum brightwellii (met)		CE_{50} croissance (72h)	423	(Ebenezer & Ki, 2013)
Prorocentrum minimum (met)		CE_{50} croissance (72h)	73	(Ebenezer & Ki, 2013)

Cependant, des études comme celle de DeLorenzo *et al.* (2013) et Knauer *et al.* (2007) ont également montré que la toxicité des herbicides étudiés était fonction de paramètres physico-chimiques tels que la température, la salinité et la teneur de carbone noir (matière organique représentant environ 10% du carbone organique total dans les sédiments ; Knauer *et al.*, 2007). DeLorenzo *et al.* (2013) ont observé qu'une augmentation de température ne modifiait pas la toxicité du diuron (concentration testée de 10 $\mu g.L^{-1}$) et de l'irgarol (concentration testée de 10 $\mu g.L^{-1}$) sur la croissance de *Dunaliella terciolecta*, contrairement à l'augmentation de salinité, qui exacerbait l'impact toxique du diuron. En revanche, le couplage des deux augmentait fortement la toxicité des herbicides. Knauer *et al.* (2007) ont mis en évidence une diminution de 10% de la toxicité du diuron à la concentration de 5 $\mu g.L^{-1}$ vis-à-vis de la photosynthèse de la microalgue *Pseudokirchneriella subcapitata*, en présence de carbone noir, une partie du diuron s'étant adsorbée dessus. Ces deux études illustrent ainsi l'influence de facteurs environnementaux susceptibles de modifier la toxicité des herbicides et notamment la matière organique présente dans l'environnement. Ce volet est encore trop peu étudié étant donné l'influence exercée par les composantes du milieu aquatique sur les interactions entre les microalgues et les pesticides.

D'autre part, dans un souci de réalisme environnemental, il est également pertinent de travailler à des doses environnementales et avec des mélanges de pesticides, en raison des interactions possibles entre molécules (Cedergreen, 2014, Cedergreen *et al.*, 2007, Gatidou & Thomaidis, 2007). Fernandez-Alba *et al.* (2002) ont par exemple observé que les effets de l'irgarol et du diuron en mélange sur de la croissance de la microalgue *Selenastrum capricornutum* étaient synergiques, c'est-à-dire que l'effet observé était plus important que la somme des effets de chaque molécule prise individuellement.

4. Objectifs de l'étude

Dans ce contexte, les objectifs de ce travail ont donc été :

– d'évaluer dans quelle mesure la MOD naturelle peut influencer des microalgues dulçaquicoles et marines en conditions non axéniques ;

– d'évaluer, sur ces microalgues, la toxicité de trois pesticides (le diuron, l'irgarol et le S-métolachlore) présents seuls et en mélange, à des concentrations réalistes du point de vue environnemental ;

– d'évaluer si la présence de MOD naturelle peut moduler cette toxicité.

Pour répondre à ces objectifs de travail, la réalisation de deux études préliminaires, mettant en œuvre les microalgues en présence des pesticides uniquement a été nécessaire pour tester (i) la réponse de nouveaux paramètres biologiques comme la mobilité des diatomées et (ii) pour évaluer la toxicité de l'irgarol et du diuron seuls et en mélange sur une partie des espèces étudiées (marines). Ces deux études, qui ont fait l'objet de publications, sont présentées dans les Chapitres 3 et 4 du manuscrit.

La suite des recherches se sont centrées sur quatre espèces de microalgues en cultures non axéniques : deux espèces d'eau douce (*Gomphonema gracile* (diatomée) et *Sphaerellopsis* sp. (chlorophyte)) et deux espèces d'eau de mer (*Chaetoceros calcitrans* (diatomée) et *Tetraselmis suecica* (chlorophyte)) et les effets ont été évalués sur la croissance, l'efficacité photosynthétique et la quantité relative de lipides intracellulaires. Les

cultures étant non axéniques (non exemptes de bactéries), la concentration bactérienne a également été évaluée. Afin d'essayer de comprendre au mieux les effets biologiques observés et les interactions entre les trois composantes (microalgues, MOD et pesticides), une caractérisation de l'environnement chimique a également été réalisée : mesure des concentrations en pesticides, en sels nutritifs et en carbone organique dissous mais également diverses mesures optiques renseignant sur certaines caractéristiques de la MOD.

Chapitre 2 – Matériels et Méthodes

Dans ce chapitre sont présentés les objets d'étude utilisés pour répondre aux objectifs généraux de la thèse, les matériels et méthodes des études préliminaires n'y sont donc pas présentés, ces derniers étant présents dans les Chapitres 3 et 4. Ce chapitre présente donc la matière organique dissoute (MOD) naturelle (son prélèvement et son isolement), les quatre espèces de microalgues étudiées ainsi que la préparation des molécules (irgarol, diuron et S-métolachlore). S'en suit le principe des expérimentions réalisées pour évaluer l'influence de la MOD sur la toxicité des herbicides vis-à-vis des quatre espèces. L'ensemble des analyses biologiques et chimiques avec le principe des techniques utilisées y est ensuite détaillé. Enfin, les analyses statistiques appliquées aux données obtenues sont présentées.

1. Prélèvement et isolement de la matière organique dissoute (MOD) naturelle

1.1. Choix des sites

Pour réaliser les expositions des cultures de microalgues à de la MOD naturelle caractéristique de leur milieu de vie, la MOD a été prélevée à partir de deux sites : le ruisseau de Rebec (pour les expériences avec les microalgues dulçaquicoles) et la station de Grand Banc dans le Bassin d'Arcachon (pour les expériences avec les microalgues marines) (Figure 16).

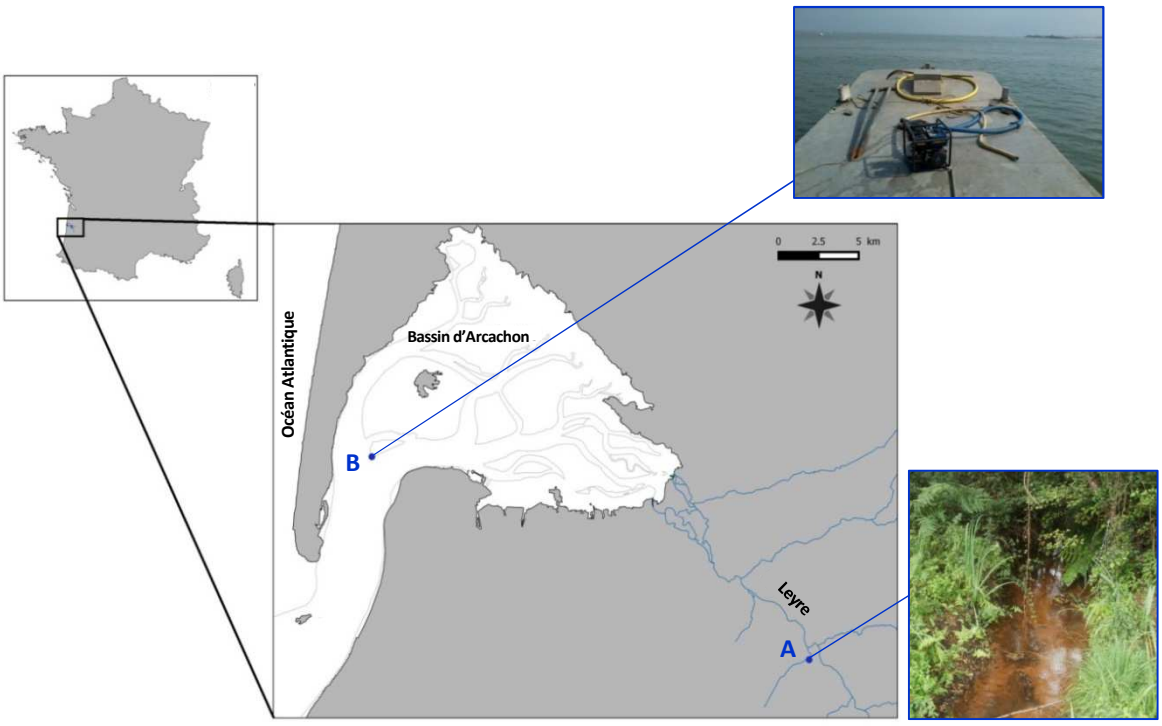


Figure 16 : Localisation des sites de prélèvement d'eau dans le ruisseau de Rebec (A) et dans le Bassin d'Arcachon à la station de Grand Banc (B).

Le ruisseau de Rebec est un petit tributaire de la Leyre long de 4,1 km traversant à la fois des forêts et des milieux semi-naturels (sur 83,5% de son trajet) ainsi que des territoires agricoles (sur 13,5% de son trajet)

(Sandre, 2017). Ce ruisseau a été choisi car il se jette dans la Leyre qui est le principal tributaire du Bassin d'Arcachon, et parce qu'il draine un bassin versant peu agricole, limitant ainsi les apports de contamination chimique. La station de prélèvement est située dans la partie aval du ruisseau, à 700 m du point de confluence avec la Leyre.

La station de Grand Banc est suivie historiquement (phytoplancton et chimie) par le Réseau REPAR (Réseau opérationnel de suivi et d'expertise sur les phytosanitaires et biocides au niveau du Bassin d'Arcachon et de ses bassins versants). Cette station du réseau de surveillance est la plus proche de la sortie du Bassin et donc la plus soumise aux apports océaniques. Elle a été choisie afin d'avoir le maximum des influences océaniques et de minimiser l'influence des apports fluviaux.

1.1. Prélèvement de la MOD naturelle

Afin de pouvoir isoler et concentrer la MOD naturelle, des prélèvements d'eau ont été réalisés par pompage au niveau des deux stations sélectionnées. Les échantillons d'eau ont été conditionnés dans des bidons de 20 L préalablement lavés avec du RBS 50, détergent alcalin et chloré permettant de retirer toute trace de contamination organique, abondamment rincés à l'eau du robinet puis à l'eau ultrapure (Milli-Q, Millipore).

Un volume de 91 L d'eau de mer a été prélevé le 16 mars 2015 dans le bassin d'Arcachon au niveau de la station Grand Banc (coordonnées : 44°39'59.898"N - 1°12'45.88"O) (Figure 16). L'eau a été collectée à 1,50 m de profondeur à marée haute afin de limiter au maximum l'influence des apports en eau douce. Le coefficient de marée était de 53.

Un volume de 97 L d'eau douce a été prélevé le 13 avril 2015 dans le ruisseau de Rebec (coordonnées : 44°35'16.962"N - 0°56'2.239"O) (Figure 16).

1.2. Isolement de la MOD naturelle

Les échantillons d'eau contenaient initialement la matière organique vivante et non vivante, sous forme particulaire (MOP) et dissoute (MOD). Afin d'éliminer la MOP, les échantillons d'eau douce et marine ont été filtrés immédiatement après le retour au laboratoire à l'aide de cartouches filtrantes Whatman Polycap^{TM} 75TF en Teflon de porosité de 0,45 µm (Figure 17). Chaque cartouche filtrante utilisée a nécessité un conditionnement préalable avant utilisation : 0,4 L de méthanol (qualité Ultra Gradient HPLC, Baker, France) suivi de 5 L d'eau ultrapure (Milli-Q, Millipore) et de 1 L d'eau échantillonnée ont été passés au travers de chaque filtre. L'eau contenant la MOD

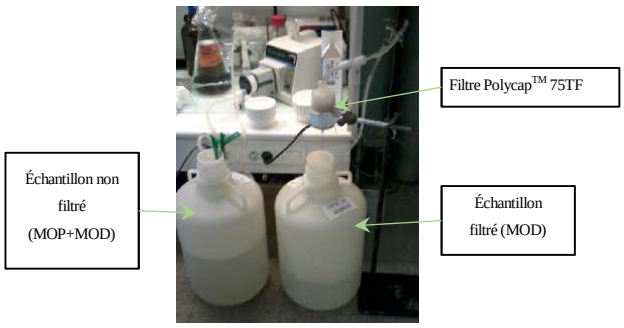


Figure 17 : Première étape d'isolement de la MOD naturelle par filtration sur 0,45 µm.

utilisée pour réaliser les expérimentations avec les cultures de microalgues a ensuite été dessalée (pour la MOD marine) et/ou concentrée environ 10 fois. Ces procédures sont détaillées dans les parties suivantes.

1.2.1. Concentration de la MOD

Les MOD dulçaquicole et marine ont été concentrées par osmose inverse, à l'aide d'un pilote (TIA) équipé d'une membrane FILMTEC^{TM} SW30-2540 (conçue pour dessaler l'eau de mer). Cette technique repose sur la réversibilité du phénomène d'osmose. En effet, lorsque deux solutions de concentrations différentes sont séparées par une membrane semi-perméable, les molécules d'eau vont passer au travers de la membrane de la solution diluée vers la solution concentrée afin d'équilibrer les concentrations de part et d'autre : c'est le phénomène d'osmose. Une pression supérieure à la pression osmotique (correspondant à la pression nécessaire sur la solution concentrée pour que le flux d'eau s'annule) doit être appliquée pour inverser ce flux osmotique, le flux d'eau va ainsi être dirigé de la solution concentrée vers la solution diluée : c'est le phénomène d'osmose inverse (Figure 18).

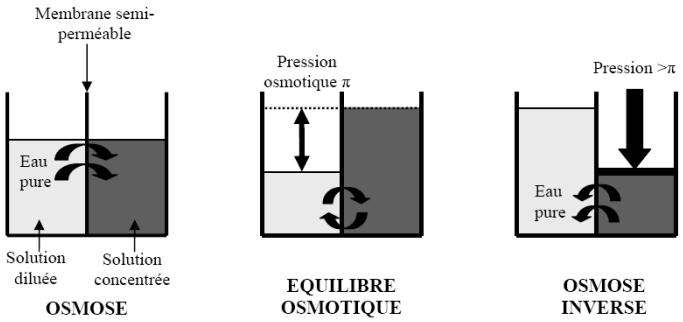


Figure 18 : Principe du phénomène d'osmose et d'osmose inverse (Huguet, 2007).

Appliqué à nos échantillons, ce principe permet de concentrer la MOD via l'élimination des molécules d'eau. Le schéma du pilote utilisé est présenté dans la Figure 19. Il est important de préciser que plusieurs cycles de nettoyage ainsi que des contrôles de propreté (par spectrofluorimétrie) et de qualité ont été réalisés avant la concentration. De la même façon au cours du processus de concentration des échantillons, différents paramètres ont été suivis : la température, la pression, le pH et la salinité afin d'éviter toute modification de l'échantillon.

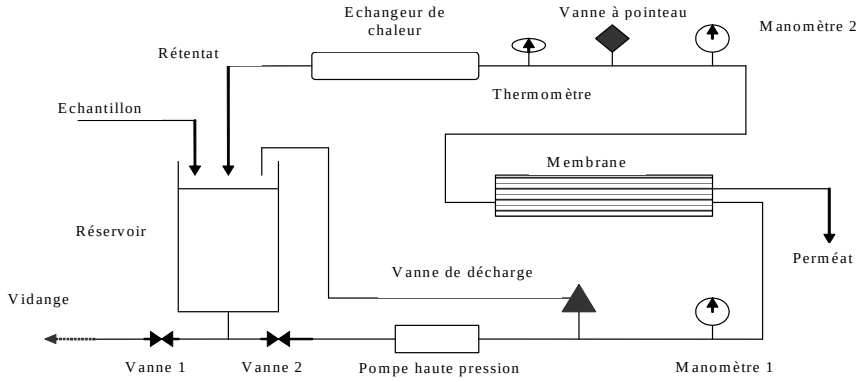


Figure 19 : Schéma du pilote d'osmose TIA (rétentat = ce qui est retenu par la membrane, c'est-à-dire la matière organique et les sels ; perméat = ce qui passe au travers de la membrane, de l'eau).

D'autre part, la concentration des échantillons provoquant une augmentation de température, ceux-ci ont été refroidis au cours du processus (refroidisseur LAUDA WK1200). Les échantillons d'eau douce (96 L) et d'eau de mer (90 L) contenant la MOD ont été concentrés jusqu'à un volume final de respectivement 9,6 et 9,5 L ; soit un facteur de concentration de 10 pour l'eau douce et de 9,5 pour l'eau de mer. La température maximale atteinte n'a pas excédé 14°C pour l'eau douce et 23°C pour l'eau de mer.

1.2.2. Dessalement de la MOD

En raison de la concentration simultanée des sels lors de l'étape d'osmose inverse, la MOD marine a du être dessalée. Le dessalement a été effectué, avant et après concentration, à l'aide d'un pilote d'électrodialyse (pilote EUR2B-10P, Eurodia). Cette technique séparative est basée sur le transfert sélectif d'ions (= diffusion) à travers des membranes sous l'effet d'un champ électrique. Un empilement de deux types de membranes homopolaires a été utilisé : les membranes échangeuses d'anions (dites anioniques, permettant le passage des anions (comme Cl^-) et au nombre de 10) et les membranes échangeuses de cations (dites cationiques, permettant le passage des cations (par exemple Na^+) et au nombre de 12) (Neosepta, Tokuyama Corporation, Japon). Le principe est présenté dans la Figure 20.

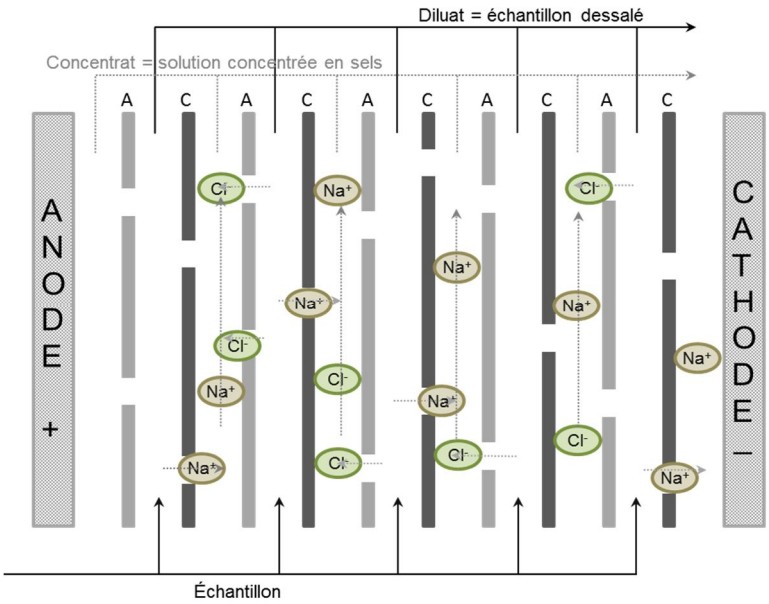


Figure 20 : Représentation schématique du principe de l'électrodialyse. A et C correspondent respectivement aux membranes anioniques et cationiques. Elles sont au nombre de 10 pour les anioniques et 12 pour les cationiques (D'après Huguet (2007)).

Appliqué à nos échantillons, ce principe permet de dessaler la MOD via l'élimination des sels. Le schéma du pilote utilisé est présenté dans la Figure 21. Il est important de préciser, tout comme pour l'osmose inverse, que plusieurs cycles de nettoyage ainsi que des contrôles de propreté (par spectrofluorimétrie) et qualité ont été réalisés avant le dessalement. De la même façon au cours du processus de dessalement des échantillons, différents paramètres ont été suivis : la température (qui augmente au cours du processus), la salinité, la tension, l'intensité et le pH afin d'éviter toute modification de l'échantillon.

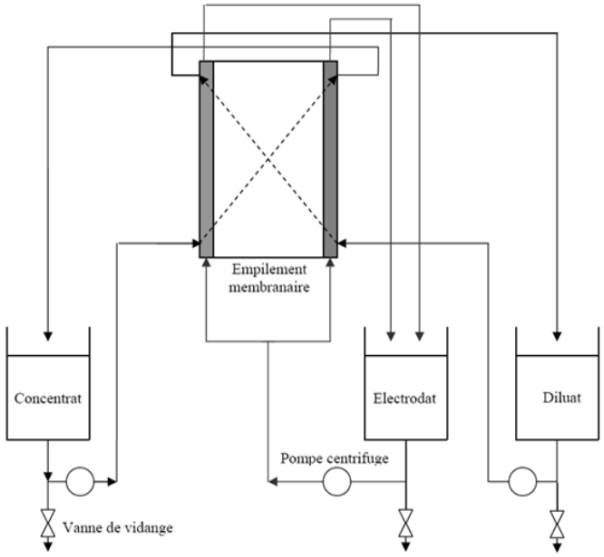


Figure 21 : Schéma du pilote d'électrodialyse (concentrat = cuve vers laquelle vont migrer les sels ; diluat = cuve contenant l'échantillon à dessaler ; électrodat = cuve contenant l'électrolyte).

La température maximale atteinte au cours du processus de dessalement était de 24°C. La salinité de l'échantillon avant et après concentration était de 33 (salinité du milieu de culture utilisé ensuite pour les expérimentations).

La qualité de la MOD a été vérifiée par fluorescence 3D (détaillée dans la partie 6.4.2.) avant et après dessalement et concentration.

2. Matériel biologique

Pour chaque milieu d'étude, deux espèces ont été choisies :

– *Gomphonema gracile* (diatomée) et *Sphaerellopsis* sp. (chlorophyte) pour le milieu dulçaquicole ;

– *Chaetoceros calcitrans* (diatomée) et *Tetraselmis suecica* (chlorophyte) pour le milieu marin.

2.1. Espèces dulçaquicoles

Les deux espèces dulçaquicoles *Gomphonema gracile* et *Sphaerellopsis* sp. ont été isolées par micro-manipulation sous microscope inversé à partir d'un échantillon de biofilm naturel prélevé dans le ruisseau de Rebec en décembre 2013. Ces deux espèces, non axéniques, ont été cultivées en milieu Dauta stérile (Dauta, 1982) (Annexe 2) dans une armoire de culture thermostatée (610 XAP, LMS LTD®, UK) à 17°C sous une intensité lumineuse de 67 ± 0 µmol.m^{-2}.s^{-1} avec un cycle jour:nuit de 16h:8h. Pour *Sphaerellopsis* sp., des tests préliminaires de vitesse de croissance ont également été effectués avec du milieu de culture WC (Guillard & Lorenzen, 1972), couramment utilisé pour la culture de microalgues d'eau douce. Les résultats n'étant pas meilleurs que ceux obtenus avec le milieu Dauta, il a été décidé de ne pas poursuivre avec ce milieu de culture.

2.1.1. Gomphonema gracile Ehrenberg, 1838

Gomphonema gracile (Figure 22) est une diatomée benthique pennée appartenant à la famille des Gomphonematacées. Les cellules possèdent des valves hétéropolaires et striées avec un stigma dans l'aire centrale. Les valves ont une longueur et une largeur variant respectivement de 20 à 80 µm et de 4,5 à 9 µm (Reichardt, 2015). Les cellules de *G. gracile* peuvent être mobiles ou fixées au substrat par un pédoncule et vivre seules ou regroupées au sein d'une matrice. Cette espèce peuple préférentiellement les eaux légèrement acides. Elle est considérée comme très sensible à divers types de pollution (selon son profil écologique dans l'IBD ; Coste *et al.*, 2009) et est retrouvée dans de nombreuses zones du monde (Germain, 1981, Verma & Nautiyal, 2016, Villeneuve & Pienitz, 1998).

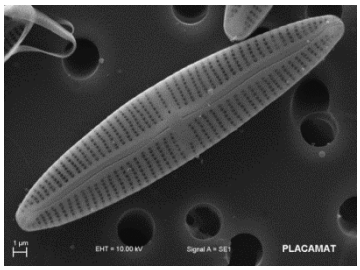


Figure 22 : Frustule de *Gomphonema gracile* (- Coste©).

2.1.2. Sphaerellopsis sp. Korshikov, 1925

Compte-tenu des modifications engendrées par la mise en culture des cellules ainsi que des descriptions très proches des espèces du genre *Sphaerellopsis*, le taxon cultivé n'a pas pu être définitivement identifié jusqu'au niveau de l'espèce (Figure 23). En effet, il peut s'agir de l'espèce *Sphaerellopsis fluviatilis* (F. Stein) Pascher 1927 ou de l'espèce *Sphaerellopsis gloeocystiformis* (O. Dill) Gerloff 1940, très proche morphologiquement (Pente Cost, 2011). Dans la suite de cette étude, afin d'éviter toute confusion, celle-ci sera nommée *Sphaerellopsis* sp.

Figure 23 : Cellules de *Sphaerellopsis* sp. isolées (Laplace-Treyture©).

Il s'agit d'une chlorophyte appartenant à la famille des Chlamydomonadacées. Les cellules ellipsoïdes à paroi hyaline sont caractérisées par leurs chloroplastes en forme de coupe et par la présence de deux flagelles de taille identique. Les cellules ont une largeur comprise entre 10 et 20 µm et une longueur comprise entre 14 et 30 µm. Le genre *Sphaerellopsis* est retrouvé dans les eaux européennes ainsi que dans les eaux nord-américaines (Nakada & Nozaki, 2015, Pente Cost, 2011).

2.2. Espèces marines

Les cultures non axéniques de *Chaetoceros calcitrans* (CCMP 1315) et *Tetraselmis suecica* (CCMP 904) proviennent du Provasoli–Guillard National Center for Marine Algae and Microbiota (NCMA). Elles ont été cultivées dans une armoire de culture thermostatée (ST5+, POL-EKO-Aparatura®, Poland) à 17°C et sous une intensité lumineuse de 106 ± 0 µmol.m^{-2}.s^{-1} avec un cycle jour:nuit de 16h:8h. Les deux espèces ont été maintenues dans du milieu de culture stérile, le milieu f/2 pour *T. suecica* et f/2+Si pour *C.*

calcitrans (Guillard, 1975, Guillard & Ryther, 1962) (Annexe 3). Ces milieux de culture sont fabriqués à partir d'eau de mer naturelle provenant de la pointe de la Varde près de Saint-Malo, filtrée sur 0,22 µm et autoclavée, à laquelle sont ajoutés les différents éléments stériles (Annexe 3).

2.2.1. Chaetoceros calcitrans (Paulsen) Takano, 1968

Chaetoceros calcitrans (Figure 24) est une diatomée planctonique appartenant à la famille des Chaetocerotacées. Les cellules portent sur chaque valve une paire d'expansions siliceuses latérales munies d'épines, appelées soies. La taille des cellules est généralement comprise entre 5 et 10 µm (Ricard, 1987, Robert *et al.*, 2004). Cette espèce est couramment retrouvée dans de nombreuses mers tempérées du globe. Elle est utilisée en écloserie comme algue fourrage pour les larves de mollusques et de crevettes en raison de ses qualités nutritionnelles (riche en lipides de type cholestérol) (Muller-Feuga *et al.*, 2007b, Robert *et al.*, 2004).

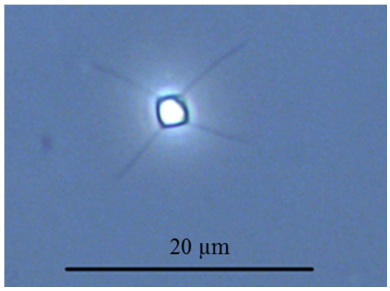


Figure 24 : Cellule de *Chaetoceros calcitrans* (Stachowski-Haberkorn©).

2.2.2. Tetraselmis suecica (Kylin) Butcher, 1959

Tetraselmis suecica (Figure 25) est une chlorophyte planctonique appartenant à la famille des Chlorodendracées. Les cellules sont ovoïdes à paroi lisse et sont caractérisées par la présence de quatre flagelles égaux (Chrétiennot-Dinet, 1990).

Les cellules ont une taille généralement comprise entre 9 et 11 µm (Robert *et al.*, 2004). Cette espèce est ubiquiste en milieu côtier tempéré. Elle est très largement utilisée en écloserie comme fourrage pour de nombreux organismes aquatiques (copépodes, crevettes, mollusques) en raison de sa forte productivité et de sa teneur riche en lipides et notamment en acides gras poly-insaturés (Muller-Feuga *et al.*, 2007a, Muller-Feuga *et al.*, 2007b, Støttrup, 2007). Ces derniers font qu'elle est également étudiée pour la production de biocarburant.

Figure 25 : Cellule de Tetraselmis suecica (CCMP©).

3. Préparation des solutions de pesticides

Pour chaque pesticide, une solution mère de 500 mg.L^{-1} a été préparée à partir de méthanol pur et de molécules sous forme de poudre pure à plus de 98,4% pour l'irgarol (Pestanal®) et le S-métolachlore (Pestanal®) et à plus de 98% pour le diuron. Ces trois molécules ont été achetées chez Sigma Aldrich (Seelze, Allemagne).

À partir de ces trois solutions mères, quatre solutions de travail ont été réalisées pour chaque molécule dans de l'eau Milli-Q ultrapure stérile (Table 7) :

Table 7 : Concentration et pourcentage de méthanol dans les solutions de travail utilisées pour la contamination des ballons lors des expérimentations.

	Irgarol et Diuron				S-métolachlore			
Concentration ($mg.L^{-1}$)	0,002	0,02	0,006	0,06	0,02	0,2	0,06	0,6
Pourcentage de méthanol	0,0004	0,004	0,0012	0,012	0,004	0,04	0,012	0,12

4. Principe des expérimentations

Quatre expériences indépendantes ont été réalisées (une par espèce). La durée de ces expérimentations a été fonction de la cinétique de croissance de chaque espèce de microalgue. Ainsi, les expériences ont duré sept jours pour *G. gracile*, 14 jours pour *Sphaerellopsis* sp. et six jours pour les deux espèces marines. Ces expérimentations ont été réalisées dans des ballons en verre borosilicaté préalablement calcinés à 450°C pendant 6 heures et autoclavés 20 minutes à 121°C. Pour l'ensemble des expériences, le volume expérimental était de 60 mL.

Pour chaque expérience, les influences seules et croisées de la MOD et des pesticides ont été testées sur les cultures de microalgues (Figure 26). Pour ce faire, la moitié des ballons a été remplie avec du milieu de culture (Dauta pour les espèces d'eau douce, f/2 pour *T. suecica* et f/2-Si pour *C. calcitrans*) : condition sans MOD. La seconde moitié des ballons a été remplie avec du milieu de culture et de la MOD concentrée : condition avec MOD. Dans ce dernier cas, l'enrichissement du milieu de culture en sels nutritifs a été ajusté en considérant l'ajout de MOD comme un facteur de dilution, de façon à ce que la concentration finale en nutriments soit la même que dans la condition sans MOD. Le volume de MOD ajouté a été calculé de façon à avoir une concentration finale égale à deux fois la concentration environnementale au moment du prélèvement, ce qui correspond à des niveaux communément retrouvés dans l'environnement d'étude (données issues des suivis de 2008 à 2012 des projets Région Aquitaine OSQUAR et OSQUAR 2). Les concentrations finales de MOD dans les ballons étaient ainsi de 12,9 $mgC.L^{-1}$ pour les espèces dulçaquicoles (pour une concentration environnementale de 6,5 $mgC.L^{-1}$ au moment du prélèvement) et de 2,2 $mgC.L^{-1}$ pour les espèces marines (pour une concentration environnementale de 1,1 $mgC.L^{-1}$ au moment du prélèvement).

Au sein de chacune de ces deux conditions (avec et sans MOD), neufs traitements « pesticides » ont été appliqués :

– un traitement témoin (sans pesticides ajoutés)

– deux traitements irgarol aux concentrations de 0,05 (I0,05) et 0,5 (I0,5) $\mu g.L^{-1}$

– deux traitements diuron aux concentrations de 0,05 (D0,05) et 0,5 (D0,5) $\mu g.L^{-1}$

– deux traitements S-métolachlore aux concentrations de 0,5 (S0,5) et 5 (S5) $\mu g.L^{-1}$

– deux traitements « mélange » composés des concentrations minimales de chaque pesticide pour le premier mélange (M1 = I0,05 + D0,05 + S0,5) et des concentrations maximales de chaque pesticide pour le second mélange (M2 = I0,5 + D0,5 + S5).

Le nombre de réplicats par traitement, conditions et expérimentations est indiqué dans le Table 8.

Table 8 : Nombre de réplicats réalisés pour chaque traitement de chaque condition et de chaque volet.

Volets	Conditions	Traitements	Nombre de réplicats
Biotique	Sans MOD	Témoins	4
		Cultures exposées aux pesticides	3 par concentration
	Avec MOD	Témoins	4
		Cultures exposées aux pesticides	3 par concentration
Abiotique	Sans MOD	Témoins	1
		Ballons avec pesticides	1 par concentration
	Avec MOD	Témoins	2
		Ballons avec pesticides	2 par concentration

Le pourcentage maximal en méthanol est de 0,0012%. Cette concentration, qui est 700 fois plus basse que celle recommandée pour les tests avec microalgues (Abou-Waly, 2000), a été testée au préalable sur les espèces marines (Dupraz *et al.*, 2016) sans qu'une toxicité ne soit détectée sur les paramètres physiologiques étudiés.

L'ensemble des conditions et traitements a été inoculé, pour chaque espèce, avec une culture mère en phase exponentielle de croissance à une concentration initiale en microalgues de 2 000 cellules.mL^{-1} pour les espèces dulçaquicoles et de 20 000 cellules.mL^{-1} pour les espèces marines au premier jour des expérimentations. Cela correspond au volet biotique (Figure 26). En parallèle, les mêmes conditions et traitements ont été appliqués dans un environnement abiotique, c'est-à-dire contenant les différents composants à l'exception des microalgues et des bactéries associées. Le premier jour de chaque expérimentation, un ballon supplémentaire a été réalisé pour chaque traitement de chaque condition. Ce ballon a été immédiatement échantillonné dans son intégralité pour les besoins des mesures chimiques initiales.

Au cours des quatre expérimentations, des prélèvements ont été effectués pour les analyses biologiques et chimiques.

Les paramètres biologiques suivis ont été :

– la croissance des microalgues, évaluée grâce à la mesure de la densité cellulaire effectuée tous les jours ouvrés ;

– le contenu relatif en lipides intracellulaires, évalué le dernier jour des expérimentations ;

– l'efficacité photosynthétique réelle, mesurée le dernier jour des expérimentations ;

– la concentration bactérienne au sein des cultures, mesurée le dernier jour des expérimentations.

Les paramètres chimiques suivis ont été :

– les concentrations en sels nutritifs (nitrates, orthophosphates et silicates), mesurées le premier jour sur le ballon supplémentaire et le dernier jour sur l'ensemble des traitements de chaque condition et de chaque volet (biotique et abiotique) ;

– les concentrations en pesticides, mesurées le premier et le dernier jour des expérimentations sur chaque réplicat des traitements témoins (biotiques et abiotiques avec et sans MOD) et des concentrations maximales en irgarol, diuron, S-métolachlore et du mélange ;

– les concentrations en carbone organique dissous (COD), mesurées le premier et le dernier jour dans les traitements témoins (biotiques et abiotiques avec et sans MOD) et les traitements pesticides pour lesquels un effet drastique a été observé sur les microalgues. Les analyses du premier jour ont été réalisées sur le ballon supplémentaire ;

– des paramètres optiques caractérisant la MOD, mesurés sur les mêmes traitements que le COD.

L'ensemble des analyses réalisées est détaillé dans les parties suivantes.

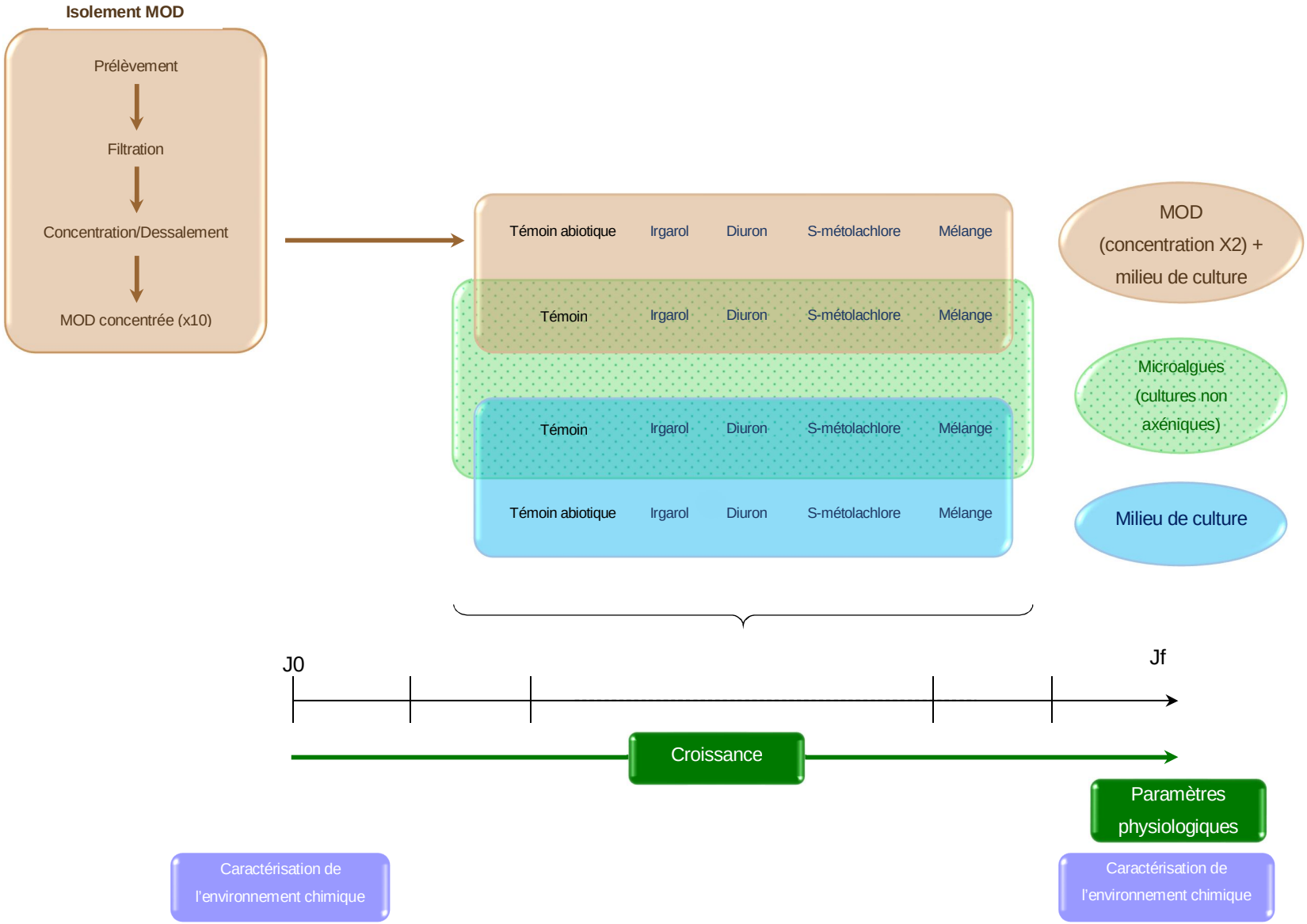


Figure 26 : Représentation schématique des expérimentations réalisées. Jf correspond au jour 7 pour *Gomphonema gracile*, au jour 14 pour *Sphaerellopsis* sp. et au jour 6 pour les deux espèces marines.

5. Analyses biologiques

5.1. Cytométrie en flux

Les mesures détaillées ci-après ont été réalisées avec un cytomètre en flux BD-Accuri C6 (Becton Dickinson Accuri™) équipé d'un laser bleu (488 nm) et d'un laser rouge (640 nm).

5.1.1. Principe

La cytométrie en flux est une technique rapide qui permet d'effectuer une analyse multiparamétrique de cellules individualisées en suspension (Ronot *et al.*, 2006). Les cellules issues de l'échantillon d'intérêt sont aspirées par le cytomètre et subissent alors une focalisation hydrodynamique au sein du système contenant également un liquide de gaine : dans notre cas, de l'eau ultrapure Milli-Q filtrée sur 0,22 µm et autoclavée. Les cellules défilent ensuite une par une devant une source d'excitation lumineuse constituée par un laser. Les cellules frappées par le laser émettent des signaux lumineux correspondant à de la diffusion lumineuse et à l'émission de fluorescence (Figure 27). Les signaux émis sont liés d'une part aux propriétés intrinsèques des cellules (taille, structure interne ou autofluorescence liée aux pigments dans le cas des microalgues), mais également aux propriétés induites par un marquage spécifique d'une structure ou fonction cellulaire grâce à l'utilisation de fluorochromes.

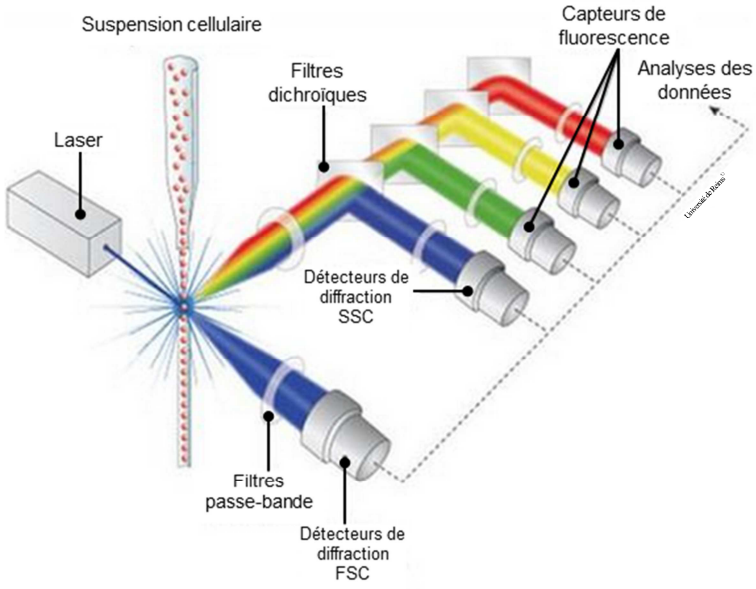


Figure 27 : Représentation schématique du principe de fonctionnement d'un cytomètre en flux.

Le forward scatter (FSC) correspond à la diffusion de la lumière aux petits angles, collectée dans l'axe du faisceau du laser. Il donne une indication de la taille relative d'une particule : plus celle-ci sera grande, plus le signal de FSC sera important (Figure 28).

Le side scatter (SSC) correspond à la diffusion de la lumière aux grands angles, collectée à 90° par rapport au faisceau du laser. Il permet de renseigner sur la structure interne d'une cellule (complexité, granularité ou encore granulosité) : plus une particule sera complexe et plus le signal de SSC sera important (Figure 28).

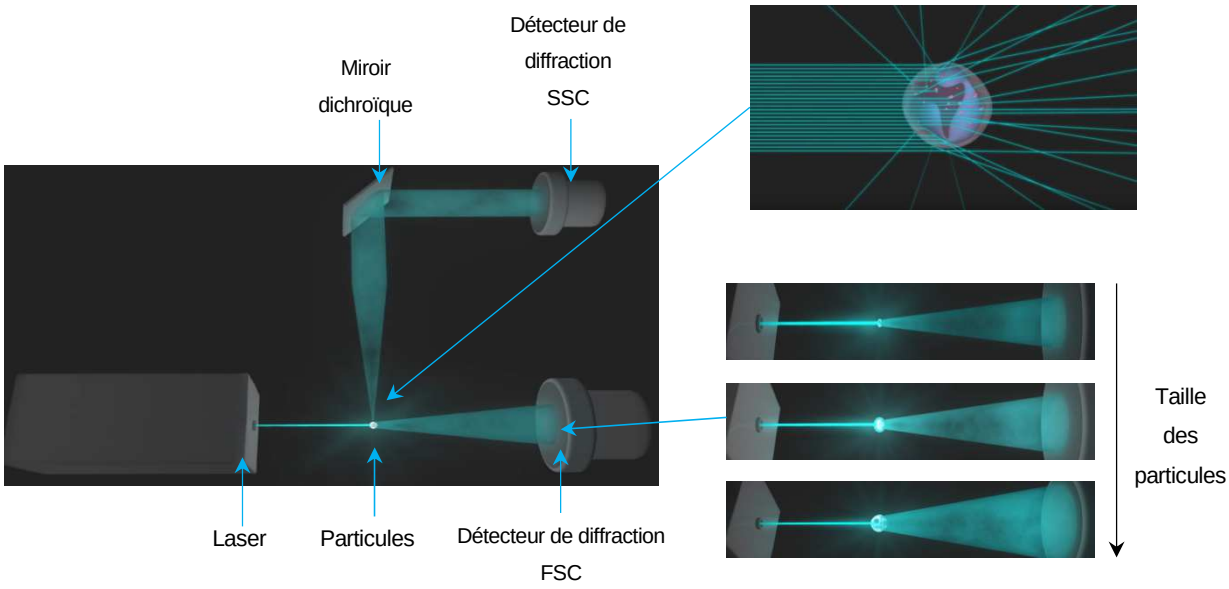


Figure 28 : Représentation schématique du side scatter (en haut à droite) et du forward scatter (en bas à droite) en fonction de la taille d'une particule.

Les signaux de fluorescence émis par les cellules peuvent être liés à leur contenu pigmentaire (autofluorescence) ou résulter d'un marquage par fluorochrome(s). Les fluorochromes sont des molécules qui vont se lier sur un site de fixation particulier, comme les lipides membranaires, l'ADN, ou encore certaines espèces réactives de l'oxygène. Ils peuvent fluorescer naturellement, fluorescer après la liaison au site de fixation, ou après avoir été activés/clivés par une enzyme. Quel que soit le mode d'activation, le principe est que le fluorochrome activé émet une fluorescence lorsqu'il est excité par le laser. À chaque fluorochrome correspond un spectre d'excitation et d'émission. Les signaux de fluorescence émis par les cellules sont collectés simultanément et séparés grâce à des systèmes de miroirs dichroïques et des filtres sélectifs permettant de détecter, dans notre cas, la fluorescence verte (FL1 : 530 ± 15 nm), la fluorescence jaune-orange (FL2 : 585 ± 20 nm émise par la phycoérythrine par exemple) et la fluorescence rouge (FL3 : >670 nm et FL4 : 675 ± 12,5 nm, émise par la chlorophylle par exemple) (Figure 27).

5.1.2. Paramètres mesurés

L'ensemble des paramètres mesurés pour chaque espèce au cours des diverses expérimentations, excepté la croissance, a nécessité la réalisation de tests préliminaires. Ces tests ont permis de sélectionner la concentration et la durée de marquage optimale pour chaque fluorochrome et chaque espèce. Cette mise au point n'est pas détaillée dans la suite du manuscrit.

5.1.2.1. Croissance

La croissance a été évaluée à partir des mesures de densité cellulaire, pour lesquelles des échantillons de 300 µL de chaque culture ont été prélevés et fixés au glutaraldéhyde (concentration finale dans les échantillons de 0,25% ; Acros organics, Geel, Belgique). Ce fixateur offre une bonne qualité de fixation car il préserve les structures fines des cellules (Marie *et al.*, 2005). Une fois le glutaraldéhyde ajouté, les tubes ont été vortexés et incubés à l'obscurité et à température ambiante durant 15 minutes. Les échantillons ont ensuite été analysés pour les cultures marines et congelés à -80°C jusqu'à analyse pour les cultures d'eau douce.

Pour *G. gracile* et *T. suecica*, les cellules ont été dénombrées à partir des populations visualisées sur des cytogrammes représentant la fluorescence verte (FL1) en fonction de la fluorescence dans le rouge lointain (FL4) (Figure 29). Les cellules de *Sphaerellopsis* sp. ont été dénombrées à partir des populations visualisées sur des cytogrammes représentant la fluorescence en FL1 en fonction de la fluorescence rouge (FL3). *C. calcitrans* a été dénombrée à partir des populations visualisées sur des cytogrammes représentant le SSC en fonction de la fluorescence en FL3.

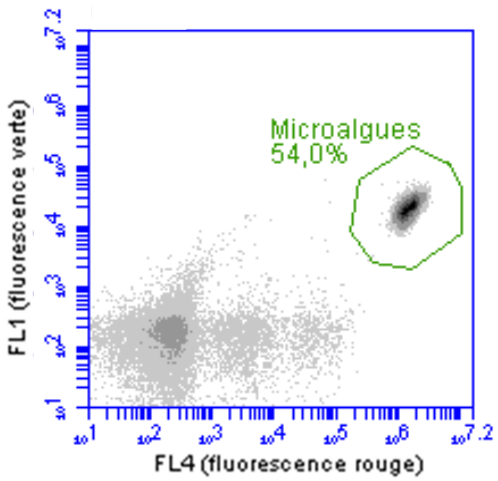


Figure 29 : Cytogramme utilisé pour dénombrer les cellules - Exemple de la condition témoin sans MOD pour *T. suecica* au jour final.

Les courbes de croissance des microalgues ont généralement pour équation :

$N_t = N_0 e^{\mu t}$ où : – N_0 = la densité cellulaire au jour initial (cellules.mL^{-1})
– Nt = la densité cellulaire au temps t (cellules.mL^{-1})
– µ = le taux de croissance (h^{-1})
– t = le temps de l'expérimentation (h)

Deux paramètres ont été calculés à partir des courbes de croissance : le taux de croissance moyen et le temps de doublement.

Afin d'extraire plus facilement le taux de croissance, les données doivent être linéarisées. Pour ce faire, une transformation de type logarithme népérien (Ln) est appliquée aux concentrations cellulaires. Une droite de régression linéaire est alors appliquée au nuage de points. Cette droite a pour équation :

$$Ln(N_t) = \mu t + Ln(N_0)$$

Le taux de croissance, qui représente le coefficient directeur de cette droite, a donc pour équation :

$$\mu = \frac{[Ln(N_t) - Ln(N_0)]}{t}$$

Le temps de doublement de la population (T_D), également appelé temps de génération ou temps de division, a pour équation :

$$T_D = \frac{Ln(2)}{\mu}$$

Les données présentées dans le manuscrit sont exprimées en h^{-1} pour le taux de croissance et en h pour le temps de doublement.

5.1.2.2. Contenu relatif en lipides intracellulaires

Le contenu relatif en lipides intracellulaires ($FL1_{Lipides}$) a été estimé le dernier jour des expérimentations grâce à l'utilisation d'un fluorochrome, le BODIPY$^{505/515}$ (Life Technologies®, Carlsbad, CA, USA). Ce fluorochrome, qui fluoresce dans le vert (FL1), passe au travers des membranes par diffusion en raison de son caractère très lipophile (haut coefficient de partage huile/eau; Cooper *et al.*, 2010). Il est utilisé pour marquer un large éventail de lipides : acides gras, phospholipides (Govender *et al.*, 2012). Il permet également de visualiser les gouttelettes lipidiques des microalgues par microscopie à épifluorescence (Cooper *et al.*, 2010) (Figure 30). Le protocole de marquage appliqué ici a été adapté de celui de Brennan *et al.* (2012).

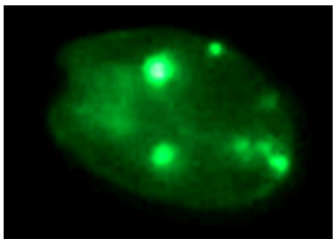


Figure 30 : Cellule de *T. suecica* marquée au Bodipy$^{505/515}$ (Microscope à épifluorescence - Dupraz©).

Pour chaque espèce, une solution de travail de BOPIDY$^{505/515}$ a été préparée à partir d'une solution mère à 5000 $mg.L^{-1}$ diluée dans du diméthylsulfoxyde (DMSO) pur (Sigma Aldrich, Saint-Louis, USA). Les concentrations des solutions de travail sont présentées dans le Table 9.

Table 9 : Concentration en BODIPY$^{505/515}$ dans les solutions de travail et dans les échantillons marqués pour les quatre espèces de microalgues.

		G. gracile	*Sphaerellopsis* sp.	*C. calcitrans*	*T. suecica*
Solution de travail	Concentration ($mg.L^{-1}$)	6	6	3	4
Dans chaque échantillon marqué	Concentration ($\mu g.L^{-1}$)	60	60	75	120
	% DMSO	1	1	2,5	2,5

Pour chaque culture, des échantillons de 200 µL ont été prélevés et des billes fluorescentes de 2 µm de diamètre en polystyrène ont été ajoutées à raison de 1 µL par échantillon (Flow Check™ High Intensity Alignment Grade Particles 2.00 µm, Polysciences Inc., Warrington, PA, USA). Les échantillons ont ensuite été marqués à l'aide des solutions de travail aux concentrations finales présentées dans le Table 9.

Après ajout du fluorochrome, les échantillons ont été incubés à l'obscurité et à température ambiante durant 3 minutes pour les espèces dulçaquicoles, 5 minutes pour *C. calcitrans* et 6 minutes pour *T. suecica*.

Afin de s'affranchir d'éventuels biais sur la fluorescence, liés soit à des variations dues au laser du cytomètre, soit à l'influence des différents composés (herbicides, MOD) sur la fluorescence native des cellules, les valeurs de FL1 des cellules marquées ont été corrigées par :

- les valeurs de FL1 des cellules non marquées
- les valeurs de FL1 des billes dans les échantillons marqués et non marqués.

La formule de normalisation est la suivante :

$$FL1_{Lipides} = \frac{\frac{FL1_{microalgues\ marquées}}{FL1_{billes\ marquées}}}{\frac{FL1_{microalgues\ non\ marquées}}{FL1_{billes\ non\ marquées}}}$$

5.1.2.3. Concentration bactérienne

Les cultures des quatre espèces étant non axéniques, la concentration en bactéries naturellement présentes dans les cultures a été mesurée le dernier jour des expérimentations grâce à l'utilisation du fluorochrome SYBR® Green I (Molecular Probes Inc., Eugene, OR, USA). Cette molécule, qui a une forte affinité pour la double hélice d'ADN, s'intercale entre les paires de bases. Elle possède une faible affinité pour l'ADN simple brin et pour l'ARN (Marie *et al.*, 1997, Noble & Fuhrman, 1998). Ce fluorochrome émet une fluorescence verte quand il est lié. Le protocole de marquage suivi est identique à celui de Marie *et al.* (1997).

Pour chaque espèce, 200 µL de chaque culture ont été marqués à l'aide d'une solution de travail de SYBR® Green I (concentration à 100X dans de l'eau Milli-Q) préparée à partir d'une solution commerciale (concentration à 10 000X dans du DMSO). Les échantillons marqués (concentration finale de 1X) ont été incubés à l'obscurité et à température ambiante durant 15 minutes. Les cellules ont été dénombrées et visualisées à partir de cytogrammes représentant la fluorescence verte (FL1) en fonction de la fluorescence rouge (FL4).

5.2. Mesure de l'efficacité photosynthétique par fluorimétrie PAM

Les premières étapes de la photosynthèse sont caractérisées par la captation d'un photon par l'antenne collectrice (cf photosynthèse chapitre 1 partie 1.1.3.1). Le photon est transporté par résonance jusqu'au photosystème II où les molécules de chlorophylle *a* passent dans un état excité et instable. L'énergie accumulée peut être convertie en énergie chimique (voie photochimique) ou être dissipée sous forme de chaleur ou de fluorescence.

Ces trois voies de dissipation d'énergie étant en compétition, la fluorescence permet de renseigner sur l'état des réactions photosynthétiques et plus spécifiquement sur l'état des cellules étant donné le lien étroit entre le transport d'électrons et le métabolisme des cellules végétales (Juneau, 2007). La technique de mesure de l'activité photosynthétique par fluorimétrie PAM est basée sur cette compétition entre processus. Elle

consiste à appliquer une lumière modulée (correspondant à une fréquence donnée) qui engendre une réémission de fluorescence modulée par les cellules. Afin d'évaluer l'efficacité du transfert d'électrons sous une condition de lumière donnée, les cellules de microalgues adaptées à cette lumière (dite actinique) sont soumises à un pulse lumineux puissant et de courte durée (3000 µmol de photons.m^{-2}.s^{-1}) (Herlory, 2005). Ce pulse permet de bloquer la voie photochimique de conversion de l'énergie lumineuse par saturation des photosystèmes en photons, privilégiant ainsi la dissipation de l'énergie sous forme de fluorescence qui est alors maximale. L'efficacité de conversion de l'énergie lumineuse en énergie chimique par les centres réactionnels ouverts est estimée grâce au rendement quantique effectif du photosystème II. Ce paramètre, également appelé efficacité photosynthétique réelle ou yield opérationnel (Φ'_M ou Φ_{PSII} dans la littérature) est défini de la façon suivante :

$$\Phi'_M = \frac{(F'_M - F)}{F'_M}$$

Où : – F'_M représente la fluorescence maximale mesurée suite au pulse saturant ;

– F représente le niveau de fluorescence minimal, constant sous lumière actinique.

Pour cette étude, le Φ'_M de chaque culture a été mesuré le dernier jour des expérimentations à l'aide d'un fluorimètre PHYTO-PAM (Heinz Walz, GmbH, Allemagne) pour les espèces dulçaquicoles et d'un fluorimètre Aquapen-C AP-C 100 (Photon System Instruments®, Drasov, République Tchèque) pour les espèces marines.

Pour les espèces dulçaquicoles, dix mesures ont été réalisées sur le fond de chaque ballon (grâce à un système sur mesure fait maison, assurant une distance capteur-culture fixe), après homogénéisation par agitation et après avoir vérifié l'absence notable d'amas. Ces dix mesures ont été moyennées pour chaque culture.

Pour les espèces marines, après homogénéisation par agitation manuelle, trois mesures ont été réalisées dans des cuves à usage unique en plastique de section carrée de 1 cm de côté contenant 2 mL de culture diluée au demi dans du milieu de culture, pour éviter la saturation de l'appareil. Les trois mesures ont été moyennées pour chaque culture.

6. Caractérisation de l'environnement chimique

La caractérisation de l'environnement chimique a été réalisée sur des échantillons filtrés sur des entonnoirs de filtration à usage unique dotés d'un filtre de 0,45 µm en polyéthersulfone (PES; VWR, USA) préalablement rincé avec de l'eau ultrapure (0,7 L).

6.1. Dosage des pesticides

Les concentrations en pesticides ont été dosées le premier et le dernier jour des expérimentations dans tous les réplicats des témoins biotiques et abiotiques (c'est-à-dire sans pesticides ajoutés) et dans les traitements correspondant aux concentrations les plus élevées en pesticides, soit I0,5, D0,5, S5 et M2.

Les analyses ont été réalisées par chromatographie en phase liquide (Infinity 1290, Agilent Technologies, USA) couplée à un spectromètre de masse triple quadripôle (Série 6460, Agilent Technologies, USA). Cette technique est également appelée LC-MS/MS. Pour cela, des échantillons filtrés de 100 µL de chaque culture ont été dilués 10 fois dans de l'eau ultrapure (Milli-Q, Millipore), puis 40 µL ont été injectés directement après ajout des étalons internes appropriés (irgarol-D9, diuron-D6 et métolachlore-D6). La séparation a été réalisée à l'aide d'une colonne Kinetex C18 thermostatée à 35°C et d'un gradient de solvants A et B, correspondant à une solution de 5 mM d'acétate d'ammonium (Fluka, France) et de 0,1% d'acide acétique (Baker, France) dilué dans de l'eau ultrapure (Millipore, Milli-Q) pour le solvant A et à du méthanol pur (qualité HPLC, Baker, France) pour le solvant B. La vitesse de flux était de 0,5 $mL.min^{-1}$. L'analyse des trois pesticides et de leurs métabolites (uniquement pour le diuron et le S-métolachlore) a été réalisée en mode MRM (multiple reactions monitoring) et l'ionisation a été réalisée avec une source électrospray ESI+ (Agilent Jet Stream).

Les moyennes des limites de quantification obtenues au cours des différentes injections sont données dans le Table 10.

Table 10 : Limites de quantification moyennes des molécules étudiées obtenues au cours des différentes injections.

Molécules	Nom chimique IUPAC	Limites de quantification ($ng.L^{-1}$)
Irgarol	2-methylthio-4-tertbutylamino-6-cyclopropylamino-s-triazine	0,24 ± 0,07
Diuron	1-(3,4 dichlorophenyl)-3,3 dimethylurée	1,19 ± 0,18
DCPMU	1-(3,4-Dichlorophényl)-3-méthylurée	4,43 ± 0,70
1,2,4-DCPU	1-(2,4-dichlorophényl)urée	5,29 ± 0,83
1,3,4-DCPU	1-(3,4-dichlorophényl)urée	4,26 ± 1,76
S-métolachlore	2-Chloro-N-(2-ethyl-6-methylphenyl)-N-[(1S)-2-methoxy-1-methylethyl]acétamide	1,11 ± 0,18
Métolachlore ESA	acide 2-[(2-éthyl-6-méthylphényl) (2-méthoxy-1-méthyléthyl)amino]-2-oxo-éthanesulfonique	3,13 ± 1,40
Métolachlore OA	acide [(2-éthyl-6-méthylphenyl)(2-méthoxy-1-méthyléthyl)amino]oxo-acétique	1,23 ± 0,13

6.2. Dosage des sels nutritifs

Les nitrates, orthophosphates et silicates (uniquement pour les diatomées) ont été dosés par le laboratoire de chimie d'Irstea Bordeaux dans l'ensemble des conditions et traitements réalisés et détaillés dans la partie 4.

6.2.1. Nitrates et orthophosphates

L'analyse des nitrates et orthophosphates a été réalisée sur des échantillons de 15 mL filtrés et dilués avec de l'eau déminéralisée (France Eau) avant injection. Les échantillons d'eau douce ont été dilués au demi et ceux d'eau de mer au vingtième. Les analyses ont été réalisées par chromatographie ionique avec suppression chimique (COMPACT 881 IC Pro, Metrohm, Suisse) équipée d'un détecteur de conductivité (850 IC, Metrohm). La séparation a été réalisée avec une pré-colonne Metrosep A Supp 4/5 Guard/4.0 suivie par une colonne échangeuse d'anions Metrosep A Supp 5 – 250/4.0. L'éluant utilisé était une solution de 3,2 mM de carbonate de sodium (Na_2CO_3) et 1 mM de bicarbonate de sodium ($NaHCO_3$) et la suppression chimique était une solution de 100 mM d'acide sulfurique (H_2SO_4). Les limites de quantification pour les nitrates étaient de 0,010 $mg.L^{-1}$ et de 0,005 $mg.L^{-1}$ pour les orthophosphates.

6.2.2. Silicates

L'analyse des silicates solubles n'a été réalisée que sur les échantillons provenant des expérimentations avec les diatomées *G. gracile* (pour l'eau douce) et *C. calcitrans* (pour l'eau de mer). Pour le premier jour des expérimentations, l'analyse a été faite sur un échantillon de 20 mL provenant du ballon supplémentaire. Pour le dernier jour, 5 mL de chaque réplicat d'un même traitement ont été rassemblés pour l'analyse. Les dosages ont été réalisés par méthode colorimétrique selon la norme AFNOR NF T90-007 (AFNOR, 2001) avec un spectrophotomètre Shimadzu UV-1800 (Shimadzu Inc., Kyoto, Japon) et la limite de quantification était de 0,05 $mg.L^{-1}$.

6.3. Carbone organique dissous (COD)

Les dosages des concentrations de COD ont été réalisés pour tous les témoins biotiques et abiotiques (sans pesticides), et pour les traitements pesticides qui ont eu un effet important sur les microalgues. Ces dosages ont été réalisés le premier et le dernier jour des expérimentations avec un analyseur de carbone organique total Shimadzu (TOC-V CSN, Japon) équipé d'un passeur d'échantillons (ASI-V, Shimadzu), en mode NPOC (Non Purgeable Organic Carbon). Le carbone organique non purgeable (NPOC) correspond au carbone organique restant en phase aqueuse après purge par un gaz. Il est assimilable au COD pour les échantillons ne contenant pas de carbone organique volatil.

Pour ce faire, 10 mL d'échantillons filtrés de chaque culture ont tout d'abord été acidifiés avec une solution d'acide chlorhydrique (HCl, Suprapur Merck, Darmstadt, Allemagne) à 2 M (concentration finale 0,5%). Chaque échantillon a ensuite été purgé, avant injection, durant 6 minutes avec de l'air synthétique de haute pureté (LINDE, Air Synthétique Zero Monitoring 5.0) afin d'éliminer le carbone inorganique présent dans l'échantillon. L'injection est faite dans un tube à combustion, contenant des billes de catalyseur de platine, chauffé à 680°C. La quantité de dioxyde de carbone produite par l'oxydation catalytique à haute température du carbone organique dissous, est ensuite mesurée par un détecteur Infra Rouge Non Dispersif (NDIR). La surface du pic généré par le signal reçu par le NDIR, est proportionnelle à la concentration de carbone dans l'échantillon. Cette concentration de COD est calculée grâce aux courbes de calibration

réalisées à partir de solutions de phtalate de potassium ($C_6H_4(COOK)(COOH)$) (Shimadzu, Kyoto, Japon), elles-mêmes validées par analyse d'eaux de référence certifiées (ANALAB, Environnement Canada, Burlington, Canada).

Pour chaque échantillon, la concentration en COD correspond à la moyenne de trois à quatre mesures ayant un coefficient de variation inférieur à 2%. De plus, pour chaque série d'analyses, au moins deux échantillons de référence certifiés (CRM) sont dosés, en début et fin de séquence, afin de s'assurer de la qualité des mesures et de valider les résultats.

6.4. Caractérisation de la MOD

La caractérisation de la MOD a été effectuée le premier et le dernier jour des expérimentations sur les mêmes conditions que pour les analyses de COD : les témoins biotiques et abiotiques (sans pesticides), et les traitements pesticides qui ont eu un effet important sur les microalgues. Cette caractérisation a été effectuée par spectroscopie d'absorbance UV-Visible et de fluorescence.

6.4.1. Spectrophotométrie UV-Visible

Le principe de cette méthode repose sur le fait que seules les molécules fortement conjuguées absorbent une partie du rayonnement lumineux (Di Benedetto & Breuil, 2007, Skoog *et al.*, 2003). La quantité de lumière absorbée, essentiellement dans l'UV et le visible, est fonction de la composition atomique et principalement des liaisons entre atomes. En effet, une molécule comportant des chromophores où les atomes sont liés par une ou plusieurs double-liaisons absorbe, contrairement aux molécules composées de liaisons simples (Skoog *et al.*, 2003).

L'absorption est directement liée à la concentration des molécules absorbantes d'après la loi de Beer-Lambert :

$$A = \varepsilon_\lambda \ell c$$

Où : – A correspond à l'absorbance pour une longueur d'onde λ (sans unité) ;

– ε_λ correspond au coefficient d'extinction molaire (en $L.mol^{-1}.cm^{-1}$) ;

– ℓ correspond à la longueur du trajet optique parcouru (en cm) ;

– c correspond à la concentration en $mol.L^{-1}$ des molécules qui absorbent à la longueur d'onde λ.

L'absorbance peut également être déterminée grâce à une autre expression de la loi de Beer-Lambert. Cette équation est la suivante :

$$A = \log(\frac{I_0}{I})$$

Où : – I_0 correspond à l'intensité de la lumière incidente ;

– I correspond à l'intensité de la lumière transmise.

À partir des spectres d'absorption réalisés pour chaque échantillon, deux paramètres couramment utilisés ont été calculés : le rapport de pentes spectrales, également appelé S_R et l'indice $SUVA_{254}$.

L'indice S_R ou rapport de pentes spectrales est un paramètre utilisé comme proxy de la variation du poids moléculaire moyen de la MOD contenue dans l'échantillon. Il est calculé de la façon suivante (Helms *et al.*, 2008) (Figure 31) :

$$S_R = \frac{S_{275-295}}{S_{350-400}}$$

Où : – $S_{275\text{-}295}$ correspond à la pente du spectre d'absorption calculée entre 275 et 295 nm ;

– $S_{350\text{-}400}$ correspond à la pente du spectre d'absorption calculée entre 350 et 400 nm.

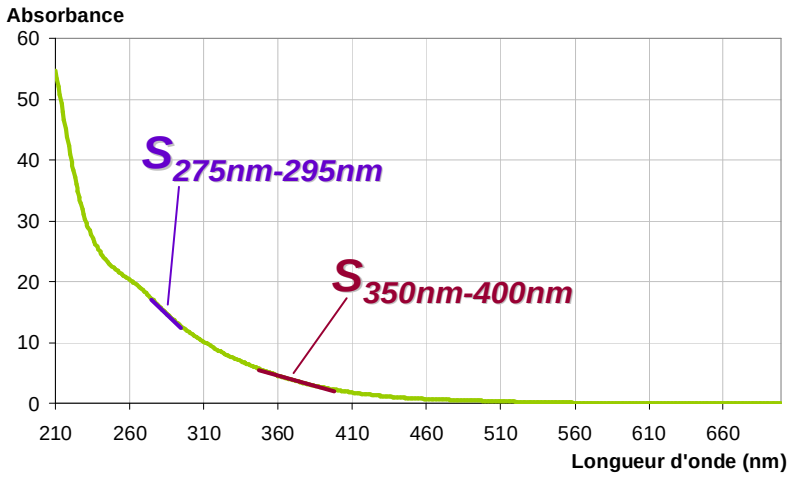


Figure 31 : Spectre d'absorption typique sur lequel sont indiquées les pentes spectrales utilisées dans le calcul de l'indice S_R.

Helms *et al.* (2008) ont montré que cet indice était inversement corrélé au poids moléculaire moyen (diminution du poids moléculaire moyen = augmentation du S_R).

L'indice $SUVA_{254}$ (Specific UV Absorbance à 254 nm) fournit des informations sur le caractère aromatique de la MOD. Cet indice est supposé augmenter avec l'aromaticité, l'hydrophobicité et le poids moléculaire de la matière organique (Labanowski, 2004). Une augmentation de ce paramètre traduit une augmentation du caractère aromatique global de la MOD présente dans les cultures. Il est calculé de la façon suivante (Weishaar *et al.*, 2003) :

$$SUVA_{254} = \frac{Abs_{254}}{[COD]} x100$$

Où : – Abs_{254} représente l'absorbance à 254 nm ;

– [COD] représente la concentration en carbone organique dissous (en $mg.L^{-1}$).

L'appareil utilisé est un spectrophotomètre UV-Visible (JASCO V-560, France) équipé d'une lampe à décharge au deutérium (pour l'émission entre 190 et 350 nm) et d'une lampe à filament de tungstène (pour l'émission entre 330 et 900 nm). L'échantillon est placé dans une cuve en quartz de 1 cm de trajet optique (Hellma, Müllheim, Allemagne). L'acquisition des spectres a été réalisée de 210 à 700 nm, avec un pas de

1 nm et une vitesse de balayage de 200 $nm.min^{-1}$. Aux spectres des échantillons est systématiquement soustrait le spectre d'absorption de l'eau ultrapure (Milli-Q, Millipore), réalisé au préalable dans la même cuve afin de retirer la part d'absorption liée à l'eau et à la cuve elle-même.

6.4.2. Spectrofluorimétrie

L'énergie absorbée par les molécules provoque leur passage à un état excité. Cet état excité est thermodynamiquement instable (Figure 32). Aussi, l'énergie absorbée doit être restituée afin que les molécules puissent revenir à leur état fondamental. Cette restitution peut s'effectuer sous forme d'émission de chaleur (relaxation non rayonnante pouvant se faire sous forme de conversion interne, de relaxation vibrationnelle, etc.) ou sous forme d'émission de photons (relaxation sous forme de fluorescence). Sur la totalité des chromophores contenus dans la MOD, seuls les fluorophores (comme les cycles aromatiques) réémettent de la lumière (Aiken, 2014a, Reynolds, 2014) ; les autres restituent l'énergie sous forme de chaleur. Le rayonnement réémis par les molécules disposant de fluorophores possède une énergie inférieure au rayonnement d'excitation. Pour faire passer une molécule d'un état d'énergie basal à un état excité, il faut lui fournir une quantité d'énergie équivalente à la différence entre ces deux niveaux. Toutefois l'énergie émise est toujours plus faible que celle d'excitation puisqu'il y a des pertes au sein de la molécule. La longueur d'onde du rayonnement émis est donc toujours supérieure à celle d'excitation (Reynolds, 2014, Skoog *et al.*, 2003). L'étude par fluorescence de la MOD apporte des informations qualitatives et semi-quantitatives (composition relative) sur le type de molécules fluorescentes présentes.

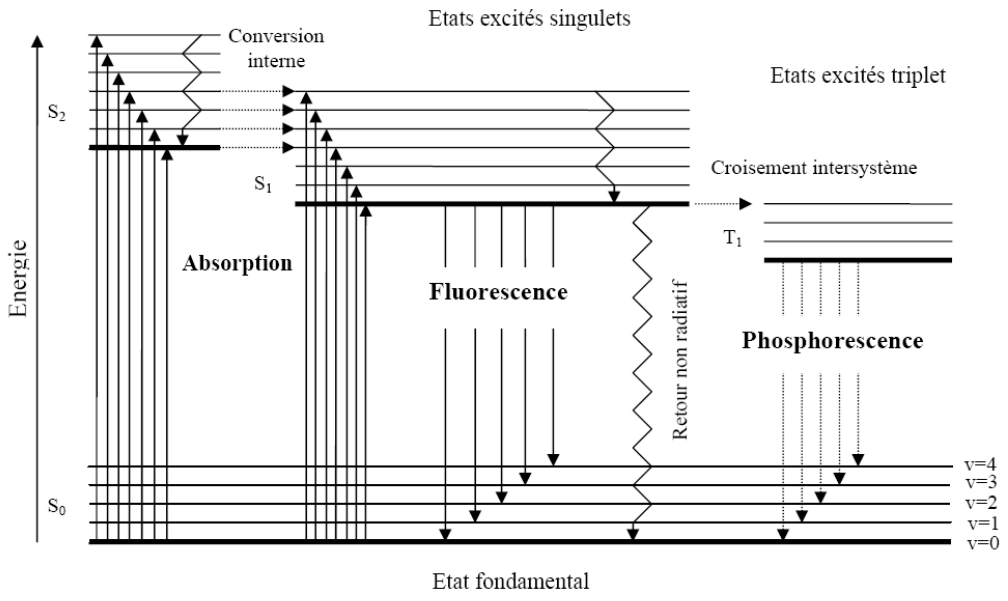


Figure 32 : Diagramme de Perrin-Jablonski (Huguet, 2007).

Les analyses des échantillons ont été réalisées à l'aide d'un spectrofluorimètre Fluorolog FL3-22 (Horiba Jobin-Yvon, France) équipé d'une lampe à arc Xenon (de 450 W) et de double monochromateurs à l'excitation et à l'émission. Les échantillons contenus dans une cuve en quartz de 1 cm de trajet optique

(Hellma, Müllheim, Allemagne), étaient thermostatés à 20°C dans le compartiment échantillon. Les analyses de fluorescence ont été réalisées dans des conditions de faible absorbance (absorbance <0,1 au maximum d'absorbance, ici 250 nm) afin d'éviter les effets de filtre interne et d'être dans un domaine de linéarité entre intensité de fluorescence et concentration.

La fluorescence tridimensionnelle, ou matrice d'excitation-émission de fluorescence (EEM en anglais), a été largement appliquée à l'étude de la MOD dans les eaux naturelles (Coble *et al.*, 2014, Findlay & Sinsabaugh, 2003). Les matrices de fluorescence sont en fait des cartes de fluorescence de l'ensemble des fluorophores d'un mélange. Elles permettent de caractériser plusieurs composés dans un mélange. Elles renseignent ainsi sur les sources, la composition, le degré de dégradation/transformation et la réactivité de la MOD (Moncada, 2004, REPAR, 2015, Tapie *et al.*, 2016).

Les spectres de fluorescence 3D sont composés de 17 spectres d'émission acquis de 260 à 700 nm (avec un incrément de 1 nm et un temps d'intégration de 0,5 sec) pour des longueurs d'onde d'excitation allant de 250 à 410 nm (avec un incrément de 10 nm). L'acquisition des matrices de fluorescence est réalisée en mode S/R (S = « sample », R = « reference » correspondant à l'énergie de la lampe mesurée par une photodiode de référence) afin de s'affranchir des variations d'énergie de la lampe. À chacun de ces spectres a été soustrait le spectre de fluorescence 3D d'un blanc enregistré quotidiennement avec de l'eau ultrapure Milli-Q dans la même cuve que celle utilisée pour les échantillons. Cette soustraction a pour but d'éliminer les biais liés à la cuve elle-même et d'éliminer les diffusions Rayleigh et Raman liées aux phénomènes de diffusion de la lumière dans l'eau Milli-Q.

Sur les spectres de fluorescence, on observe en effet des pics étroits dus aux phénomènes de diffusion. La diffusion Rayleigh est due à l'interaction entre des photons et des molécules d'eau. C'est une diffusion élastique, c'est-à-dire qu'elle se produit sans modification de l'énergie des photons. Les bandes résultantes sont observées à la longueur d'onde d'excitation. La diffusion Raman résulte aussi de l'interaction photons/molécules d'eau. C'est une diffusion non élastique, c'est-à-dire qu'une partie de l'énergie des photons est perdue. La longueur d'onde de diffusion Raman est supérieure à la longueur d'onde d'excitation.

Une correction instrumentale est ensuite réalisée afin de s'affranchir des biais liés à l'appareillage (Huguet *et al.*, 2009b). L'ensemble des spectres 3D acquis a été converti en unités Raman (voir la publication de Huguet *et al.* (2009b) pour le détail de la normalisation par la bande Raman de l'eau Milli-Q).

La Figure 33 montre les principaux pics de fluorescence observés pour les eaux naturelles. Les caractéristiques de ces composants en termes de composition et de longueurs d'onde d'excitation et d'émission sont données dans le Table 11.

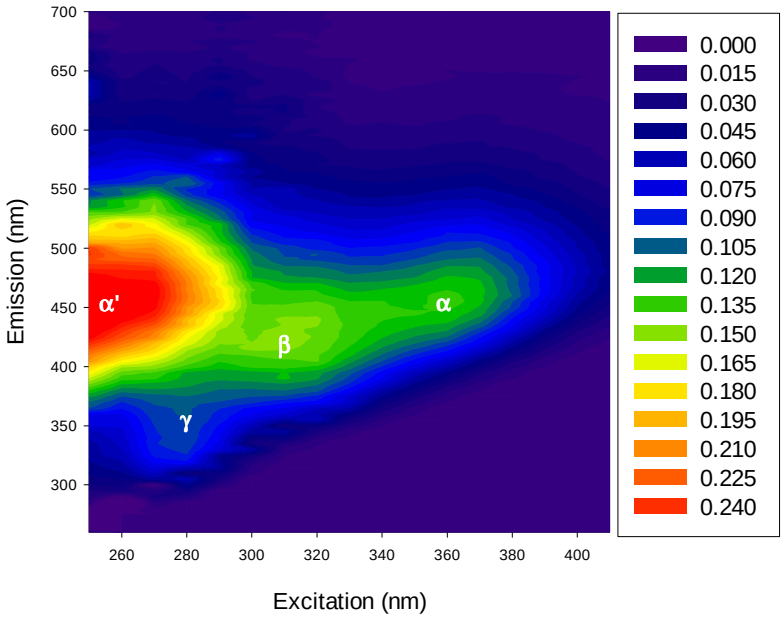


Figure 33 : Exemple de spectre de fluorescence 3D obtenu avec un échantillon contenant de la MOD marine du Bassin d'Arcachon sur lequel sont représentées les principales bandes de fluorescence observées.

Table 11 : Principaux fluorophores des eaux naturelles (d'après Parlanti *et al.*, 2000).

	Type de composés	Longueur d'onde d'excitation (nm)	Longueur d'onde d'émission (nm)
α'	Substances de type humique (acides humiques et fulviques) + matériel récent	250 – 260	380 – 480
α	Substances de type humique	340 – 370	420 – 480
β	Production récente de matériel	310 – 320	380 – 420
γ	Composés de type protéique + activité microbienne et bactérienne	270 – 280	300 – 350

Deux autres paramètres peuvent également être calculés à partir de ces spectres : les indices HIX et BIX. L'indice HIX ou indice d'humification, lié au caractère aromatique de la molécule, permet d'estimer le degré d'évolution dans le processus d'humification de la MOD (Zsolnay *et al.*, 1999). Il est calculé en faisant le rapport de deux aires (H et L) du spectre d'émission enregistré pour une longueur d'onde d'excitation de 254 nm (Figure 34) :

$$HIX = \frac{H}{L}$$

Où: – H correspond à l'aire sous la courbe entre les intensités émises allant de 435 à 480 nm ;

– L correspond à l'aire sous la courbe entre les intensités émises allant de 300 à 345 nm.

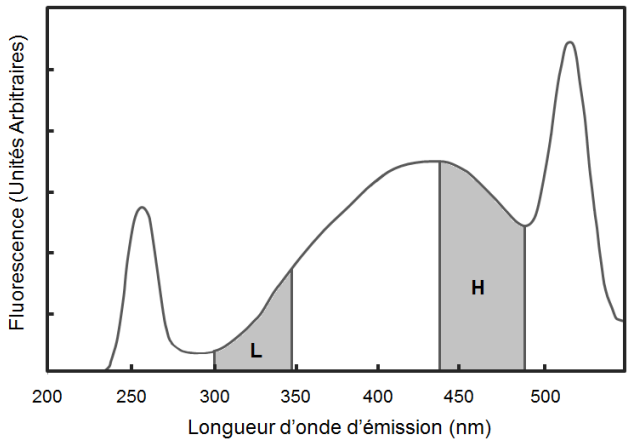


Figure 34 : Délimitation des domaines H et L permettant le calcul de l'indice HIX sur le spectre d'émission typique pour une longueur d'onde d'excitation de 254 nm (d'après Zsolnay *et al.*, 1999).

Une augmentation de HIX traduit une augmentation du caractère aromatique des molécules (déplacement du spectre vers les grandes longueurs d'onde) reflétant des phénomènes de condensation, de polymérisation des molécules et donc un degré de maturation plus important de la MOD.

L'indice BIX, également appelé indice biologique, est un indicateur de production autotrophe, autrement dit de contribution autochtone récente (Huguet *et al.*, 2009b). Il correspond au ratio entre l'intensité émise à 380 nm (correspondant au maximum d'émission du fluorophore β) et l'intensité émise à 430 nm (correspondant au maximum d'émission du fluorophore α) pour une longueur d'onde d'excitation de 310 nm. Plus il augmente, plus la contribution de la bande β et donc la production autochtone de MOD, est importante.

7. Analyses statistiques

Différentes analyses statistiques ont été réalisées pour la description et l'interprétation des résultats. Elles sont explicitées de façon plus précise dans chacune des parties « matériels et méthodes » des articles qui constituent les chapitres 5, 6 et 7.

Pour les résultats biologiques, des analyses de variance (ANOVA) à un ou deux facteurs (selon les données exploitées) ont été réalisées sur les différents paramètres afin de détecter l'existence de différences significatives entre les traitements expérimentaux. Ces analyses ont été réalisées après avoir vérifié l'homogénéité des variances (homoscédasticité) grâce au test de Levene. Le cas échéant, des tests *a posteriori* de Tukey ou Newmann-Keuls (selon l'étude considérée) ont été appliqués pour identifier les différences significatives entre les témoins et les cultures exposées aux pesticides (avec une p-valeur $<0,05$ considérée comme statistiquement différente).

Concernant les concentrations en pesticides, deux comparaisons ont été réalisées : une comparaison au jour initial entre les ballons biotiques et abiotiques, et une comparaison entre le jour initial (t0) et le jour final (tf) pour un même traitement.

Pour une partie des paramètres de caractérisation de la MOD (COD et indices S_R, $SUVA_{254}$, HIX et BIX), la valeur initiale a été soustraite à la valeur finale afin de retirer la part de variation due à l'ajout de MOD dans les ballons le premier jour des expérimentations. Cette soustraction a notamment permis de comparer les conditions avec et sans MOD.

Pour les sels nutritifs ainsi que pour les fluorophores de la MOD, la comparaison a été effectuée sur les valeurs obtenues au jour final. Pour l'ensemble de ces analyses chimiques, les comparaisons ont été effectuées avec un test t ou un test de Welch (avec une p-valeur <0,05 considérée comme statistiquement différente), après avoir vérifié l'homoscédasticité avec un test F de Fisher.

Pour l'ensemble du jeu de données, biologiques et chimiques, lorsque les résultats des analyses statistiques n'étaient pas significatifs et que les données semblaient malgré tout indiquer une tendance, l'erreur de type II également appelée erreur statistique bêta a été calculée. Cette erreur correspond à la probabilité (risque) d'accepter l'hypothèse nulle alors qu'elle est fausse, c'est-à-dire le pourcentage de chances de ne pas voir la différence alors qu'il y en a une.

L'ensemble des analyses statistiques a été réalisé avec le logiciel R version 3.2.2. (Ihaka & Gentleman, 1996). Les graphiques ont été réalisés avec le logiciel SigmaPlot® version 12.0 (Systat Software Inc., USA).

Chapitre 3 – Étude préliminaire n°1

1. Introduction

Cette première étude préliminaire a eu pour but d'évaluer l'impact du métolachlore sur la diatomée dulçaquicole *Gomphonema gracile* par la mesure de divers paramètres liés à : i) la dynamique de population (croissance, distribution des classes de taille), ii) la physiologie des cellules (contenu en chlorophylle *a*, mesure de l'efficacité photosynthétique et quantité d'ATP), et iii) leur comportement (pourcentage de cellules mobiles, vitesse de déplacement, linéarité de la trajectoire et pourcentage de cellules associées).

Les cellules ont été exposées durant sept jours à trois concentrations de métolachlore (1, 10 et 100 $\mu g.L^{-1}$) à une température de 20°C selon un cycle jour:nuit de 12h:12h. Le nombre de réplicats par traitement était de quatre pour les témoins (sans pesticides) et de trois pour chaque concentration étudiée. Les paramètres biologiques ont été évalués aux jours 0, 1, 3, 4 et 7.

2. Article 1: Use of diatom motility features as endpoints of metolachlor toxicity

Nathalie Coquillé[1,2,3], Gwilherm Jan[1], Aurélie Moreira[1], Soizic Morin[1,*]

[1] Irstea, UR EABX, 50 avenue de Verdun, 33612 Cestas cedex, France

[2] Université de Bordeaux, UMR EPOC 5805 CNRS, Laboratoire de Physico Toxico Chimie de l'environnement, 351 Cours de la Libération, CS 10004, 33405 Talence Cedex

[3] Ifremer, Laboratoire d'écotoxicologie, rue de l'île d'Yeu, BP 21105, 44311 Nantes cedex 03

* Corresponding author: telephone: +33557892726, email: soizic.morin@irstea.fr

Aquatic Toxicology 158 (2015) 202–210

Abstract

Many recent ecotoxicological studies suggest a relationship between freshwater contamination and increasing abundances of motile diatoms (potentially able to move). The capacity to escape would present advantages to species in polluted environments. However, actual motility as a response to toxicants had not been described and required experimental validation.

We designed a specific experiment to assess how a field-isolated diatom (*Gomphonema gracile*) distributes energy to *in situ* resistance (increased population growth or photosynthesis) and escape (behavioral changes), when exposed to increasing concentrations of the herbicide metolachlor.

We report here the dose-time dependent responses of *G. gracile* populations. They coped with low contamination by resisting *in situ*, with early hormetic responses highlighted by stimulation of chlorophyll-*a* fluorescence. At a higher dose, harmful impacts were observed on growth after a few days, but an earlier behavioral response suggested that higher motility (percentage of motile individuals and mean distance crossed) could be involved in escape.

Our findings bring new arguments to support the implementation of real measurements instead of motility traits in toxicity assessment. Specifically, motion descriptors have been used as early-warning indicators of contamination in our study. Further works should address the reliability of these endpoints in more complex conditions (interspecific variability, behavior in the field).

Keywords

Diatoms; physiology; behavior; pesticide exposure; motility; CASA

2.1. Introduction

Motility has been described in many pennate diatoms (e.g. Bertrand, 1999, Harper, 1977), and migration plays a role in photoregulation, described as a major behavioral response in intertidal environments (Ni Longphuirt *et al.*, 2006, Serôdio *et al.*, 2012). Freshwater diatom motility, also observed in response to light intensity (Cohn, 2001, Cohn *et al.*, 2004), may be affected by environmental factors other than light (Cohn & Disparti, 1994, Cohn *et al.*, 2003). The decrease in the speed of the diatom *Craticula cuspidata* has been proposed to assess toxicity of sediment elutriates (Cohn & McGuire, 2000). Ahmed and Häder (2010) demonstrated inhibition of the percentage of motile cells and of upward swimming in *Euglena gracilis* exposed to heavy metals. When dealing with community ecotoxicology, the motility trait is preferred to the effective behavioral descriptors in toxicity assessment, and is calculated based on the structural composition (and more specifically, growth forms) of communities and ability of some species to move (i.e. species belonging to the "motile guild", as defined by Passy, 2007). Indeed, the structure of the biofilm is made up of very diverse species, with various growth forms controlling its thickness. The layers of cells closest to the substrates are dominated by prostrate tightly attached diatoms. Other diatom growth forms (clumps, filaments) compose a complex three-dimensional structure. Species not fixed have the ability to move within the biofilm matrix. According to Roubeix *et al.* (2011b) or Paule *et al.* (2013) the abundance of potentially motile taxa is expected to increase with toxic contamination. Indeed, the motile species are assumed to be able to control their refuge within the biofilm (Larras *et al.*, 2012), or regulate the balance between access to environmental resources (light, nutrients) and exposure stress (Fore & Grafe, 2002, Laviale *et al.*, 2009). But, the real motility response to toxicants has been, to date, overlooked and requires experimental validation.

A toxicant entering the cell generates a dramatic accumulation of reactive oxygen species (ROS) in the cytosol (Wang *et al.*, 2004). Excess ROS are cytotoxic and have different cellular targets (nucleus, mitochondria and chloroplasts). Adverse effects in diatoms are most often: damage to the photosynthetic apparatus (Knauert & Knauer, 2008) affecting D1 protein resulting in photoinhibition (Cartaxana *et al.*, 2013); damage to the electron transfer chain in mitochondria, causing a decrease in ATP production (Stohs & Bagchi, 1995); damage to DNA affecting vegetative growth (Stohs & Bagchi, 1995). The way to cope with sublethal contamination would rather be linked to temporary physiological adaptation: low concentrations of toxicants promote hormesis (compensatory stimulation), as a mechanism to counteract the stress induced by the toxicant. In microalgae, an increase in chlorophyll-*a* synthesis ("greening effect") can be observed (e.g. Tlili *et al.*, 2011) as a short term response to maintain an efficient photosynthetic processes. In contrast, exposure to higher doses may provoke more overwhelming responses (even death). The capacity to escape may thus constitute a serious advantage for cells experiencing contamination.

Metolachlor [2-chloro-N -(2-ethyl-6-methylphenyl)-N-(2-methoxy-1-methylethyl) acetamide] is a pre-emergent and early post-emergent chloroacetanilide herbicide widely used in agriculture and detected at high concentrations in rivers in particular during the field application period and after rainfall (e.g. Liu &

Xiong, 2009, Roubeix *et al.*, 2012). It inhibits growth by suppressing synthesis of chlorophyll, proteins, fatty acids and lipids, isoprenoids, and flavonoids (Fuerst, 1987, Rivard, 2003). Assessing metolachlor toxicity is challenging, because current diatom indicators of toxic impact (mainly growth and photosynthesis) fail to properly assess metolachlor toxicity, except when it is at extremely high concentrations (Debenest *et al.*, 2009, Roubeix *et al.*, 2012, Roubeix *et al.*, 2011a).

We designed a specific experiment to determine behavior changes (motility parameters) of a pennate diatom isolated in the field (*Gomphonema gracile* Ehrenberg) when exposed to three environmentally realistic concentrations of metolachlor. In our experiment, we hypothesized that physiology and behavior would be modified by exposure to metolachlor. More specifically, we expected the responses to preferentially be *in situ* resistance at low doses (increased reproduction or photosynthetic processes) and escape (increased motility) at higher concentrations. Over a certain level of exposure, and thus stress for the organisms, impacts on population dynamics (reproduction and mortality) were also expected to occur. A delay before the detection of an impact, and the potential non-linearity of the dose-response relationships, could complicate toxicity assessment. Here we aimed to determine whether motility parameters, obtained with a rapid method commonly used in animal biology (an ImageJ plug-in), would provide a finer assessment of metolachlor toxicity earlier than commonly used descriptors.

2.2. Materials and methods

2.2.1. Gomphonema gracile

Gomphonema gracile Ehrenberg (1838) is a benthic species preferentially found in slightly acidic waters (Germain, 1981). Its length and width range from 20 to 100µm and from 4 to 11µm, respectively (Krammer & Lange-Bertalot, 1986). This species is considered to be very sensitive to various types of pollution (according to the Indice de Polluosensensibilité Spécifique: Coste in Cemagref, 1982). It is a pennate diatom and has a bidirectional movement, like most raphid species (Cohn, 2001).

The specimen used was from a field sample (December 2013) collected from an upstream section of the river Leyre, the main tributary of Arcachon Bay (South West France) by micromanipulation under the inverted microscope, and cultured in Dauta medium (Dauta, 1982). The culture was incubated in a chamber with a light/dark cycle of 12 h:12 h at a mean temperature of 20 °C. The culture was regularly (every 1-2 weeks) transplanted into freshly prepared medium. Diatom length in our cultures was mainly in the range of 20-40µm. The effective quantum yield (see Section 2.2.3.1) of the culture was periodically checked prior to the experiment and found to be stable over time (0.36±0.00, n=70).

2.2.2. Experimental design

Thirteen experimental units (EUs) of 40 mL (final volume) were filled with culture medium autoclaved at 121°C for 21 minutes and with the culture of *G. gracile*, at an initial cell concentration of around 30 000 cell.mL^{-1}. Four EUs were used as control replicates (named C0), and the three concentrations of increasing

exposure (C1, C2 and C3) were performed in triplicate. The cultures in exponential growth phase were exposed by pouring metolachlor in solution (racemic metolachlor at 100 $mg.L^{-1}$, 99.5% purity, Dr. Ehrenstorfer, Germany) into the EUs to reach the following nominal concentrations: 1, 10 and 100 $\mu g.L^{-1}$ (i.e. 4 nM, 35 nM, 352 nM). Three additional experimental units, used as abiotic positive controls, were filled with culture medium contaminated with the highest concentration of metolachlor. The three concentrations correspond to (i) environmentally realistic exposure concentrations (1 $\mu g.L^{-1}$) in the Leyre watershed (Roubeix *et al.*, 2012) or other rivers of the area (Fauvelle *et al.*, 2014), and (ii) for the higher ones, concentrations of the same order of magnitude as those used in other ecotoxicological studies (Debenest *et al.*, 2009, Roubeix *et al.*, 2011a). The cultures were thus exposed to these four treatments over 7 days, during which samples were taken for chemical and biological measurements.

2.2.3. Biological endpoints

Biological endpoints were determined on day 0 (d0, immediately after contamination), d1, d2, d3, d4 and d7. First, measurements of yield and chlorophyll-*a* fluorescence were performed directly on the intact biofilms (in their benthic "form"). Then the cultures were gently shaken to homogenously suspend the cells before sampling aliquots for the other endpoints measured: 20 µL were used for the motility measurements and image acquisition; 375 µL were preserved with a 25 µL drop of formalin solution for growth and mortality analyses; 300 µL were immediately frozen for further ATP content determination.

2.2.3.1. Chlorophyll-a fluorescence derived parameters

Measurements were performed on the intact biofilms, using a PHYTO-PAM (Heinz Walz, GmbH) equipped with an emitter-detector unit (PHYTO-EDF). Using a home-made system for reproducible direct measurements on bottom of the EUs, ten randomly selected benthic measurements of the effective quantum yield (ΔF/Fm') and chlorophyll-*a* content estimated by chlorophyll-*a* fluorescence (Chl-*a*) were performed to account for the patchy pattern of benthic settlement (especially in the initial phase of colonization). The median of 10 values per sample was then used for statistical analyses.

2.2.3.2. Motility

The motility parameters (percentage of motile cells, velocity) were determined using the ImageJ plug-in, CASA (Computer-assisted sperm analysis). This plug-in, initially developed to measure the motility of human spermatozoa, was adapted to animal biology (zebrafish sperm) by Wilson-Leedy and Ingermann (2007) and is commonly used to analyze the movement of trochophore larvae, sea bass spermatozoa, etc. It allows a quick measurement of different motility parameters, characterizing the general state of the cells.

The measurement conditions as well as the CASA plug-in were specifically adapted to *Gomphonema gracile*. Briefly, a 20 µL drop of sample was carefully deposited onto a microscope slide and, after 2-3 min, video acquisition (Archimed™, Microvision Instruments) was performed. Cell motion variables, calculated from 260 frames and corresponding to 10 s of film, were: VAP (velocity average path), VCL (velocity curvilinear), VSL (velocity straight line) and LIN (linearity, LIN=VSL/VAP). The measurement of these

parameters (automatized in the CASA plug-in) allows the characterization of the different velocity types and, for the LIN parameter, describes the curvature of the trajectory (Rurangwa *et al.*, 2004).

2.2.3.3. Population dynamics

The enumeration of live and dead diatoms was carried out at a x400 magnification (Olympus BX51 upright microscope, UK) using a Nageotte counting cell chamber (see Morin *et al.*, 2010 for details). Solitary cells were also distinguished from those forming associations in the counts. Growth rates were calculated from live cell densities during the whole experiment, following Morin *et al.* (2008).

In diatoms, population growth is dominated by cell division, leading to a reduction in the size of the daughter cells (Round *et al.*, 1990); larger cell sizes are only recovered after sexual reproduction. *Gomphonema* species are known to undergo sexual reproduction (Drebes, 1977, Rose & Cox, 2013). Thus, a shift in cell distribution towards smaller cell classes would reflect vegetative-dominated reproduction, whereas larger sizes could indicate sexual reproduction (but seeRose & Cox, 2013)). Reproduction mode (vegetative vs. sexual) was assessed by measuring cell lengths (10 values per replicate) throughout the experiment. Length data were discretized into size classes using Huntsberger's formula (Huntsberger, 1961):

$$1 + 3.32 \times log_{10}(n)$$, where *n* corresponds to data numbers

An optimal number of six size classes was obtained. Size class limits were selected in order to respect homogeneity of data distributions, and interval classes of the same width were fixed. We assumed that an increase in the number of larger cells (>34µm) between two sampling dates was related to sexual reproduction.

2.2.3.4. ATP content

The cellular ATP content was measured from 300 µL of the cultures, in microwells using the PerkinElmer ATPlite™ kit according to the manufacturer's instructions. Luminescence measurements were performed with a Synergy HT multi-mode microplate reader (Biotek®).

2.2.4. Metolachlor concentrations

One milliliter of water was collected in all EUs 30 min after contamination (d0), and on d4 and d7, for dissolved metolachlor analysis in order to assess actual exposure throughout the experiment. Samples were filtered through syringe filters in regenerated cellulose (Spartan® 13 mm diameter, pore size 0.45 µm, Whatman®) and stored frozen until HPLC-ESI-MS/MS analysis (API 2000® triple quadrupole mass spectrometer, Applied Biosystems/MDS SCIEX). As the quantification limit was of 1 $\mu g.L^{-1}$, samples from C0 and C1 were preconcentrated 5-fold (evaporation of the 1-mL sample using a RapidVap system and reconstitution of the residue in a 90/10, v/v mixture of ultrapure water and acetonitrile), and C3 prediluted 5-fold prior to analysis.

At the end of the experiment, the replicate *Gomphonema gracile* suspensions of each treatment were pooled to get enough fresh material for measurement of total metolachlor bioaccumulation. Samples

filtered through GF/F filters (47 mm glass microfiber filters, pore size 0.45 µm, Whatman®) were then extracted by ASE (Dionex®, Accelerated Solvent Extractor 200) and stored frozen until HPLC-ESI-MS/MS analysis.

2.2.5. Statistical analyses

Undetectable metolachlor concentrations were replaced by half the value of the detection limit according to Helsel (1990) to determine statistical differences between exposure conditions.

Repeated-measures ANOVAs and Newman-Keuls *post-hoc* tests were run in Statistica 10 (StatSoft, Inc, Tulsa, OK, USA) to detect differences between samples, with a significance level of $p<0.05$. Correlated variables were identified using Multiple Factor Analysis for a mixture of qualitative and quantitative variables (MFAmix) inside the groups of endpoints (related respectively to population dynamics, physiology and behavior). MFAmix is an extension of Principal Component Analysis (PCA) handling heterogeneous (quantitative and categorical) variables. First, PCA for mixed data (PCAmix) are computed for each group of endpoints (population dynamics, physiology and behavior), using the set of quantitative and qualitative variables measured. Then, the three PCAmix are given the same weight (normalized) to remove the influence of datasets of different sizes on the final inertia. Finally, the normalized matrices are combined into a common representation of the different data. The map of observations or variables plotted reflects the similarities between the observations. The analysis was performed in the R environment, using the package PCAmixdata (Chavent *et al.*, 2014).

2.3. Results

2.3.1. Control units

2.3.1.1. Population dynamics

From d0 to d4, the diatom cell density increased significantly from 31 168 ± 2538 cell.mL^{-1} on d0 to 162 389 ± 10 030 cell.mL^{-1} on d4 (Figure 35a), with an average growth rate of 0.41±0.03 divisions/day. Simultaneously, the percentage of dead diatoms decreased continuously from d0 (4.29±0.66%) to d4 (0.09±0.07%). On d7, mortality increased (0.38±0.10%) and growth rate clearly decreased (0.31±0.03 divisions/day between d4 and d7) indicating that the cultures were no longer in exponential growth.

The distribution of size classes is shown in Figure 35b. From d0 to d2, the proportion of the highest size (>34 µm) class decreased. At the same time, the proportion of intermediate classes (32-34, 30-32 and 28-30 µm) increased indicating that vegetative reproduction dominated. On d3, the proportion of highest size class increased suggesting sexual reproduction.

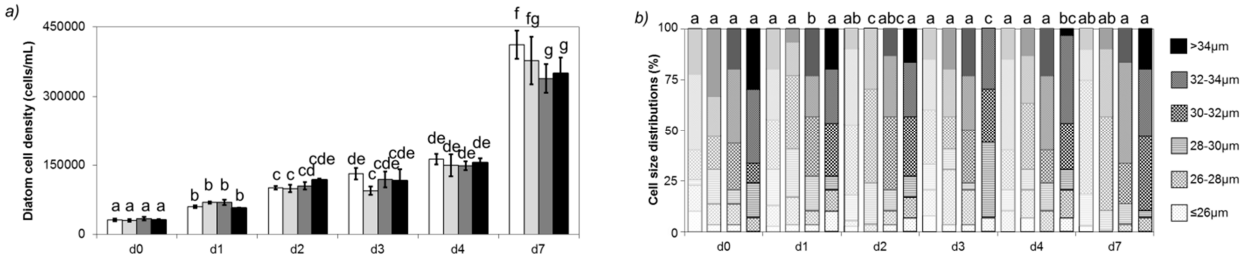


Figure 35: a) Diatom live cell density, b) distribution of cell size classes (error bars not provided for clarity; statistical groups refer to differences in the largest class size: >34µm) versus time as a function of metolachlor exposure (values are mean±standard error, n=4 for controls and n=3 replicates for each metolachlor concentration). White bars represent C0, light grey bars: C1, dark grey bars: C2 and black bars: C3. Different letters indicate between-treatment *post hoc* differences.

2.3.1.2. Physiology

The chlorophyll-*a* content measurements increased over the duration of the experiment (Figure 36a), following the cell growth (Figure 35a). The effective quantum yield (ΔF/Fm') of the C0 cultures (Figure 36b) did not change significantly during the seven days, and perfectly matched the values measured over the weeks preceding the experiment (0.36±0.00, n=70). This confirms that our experimental conditions did not significantly impact yield. ATP content decreased over time (not shown).

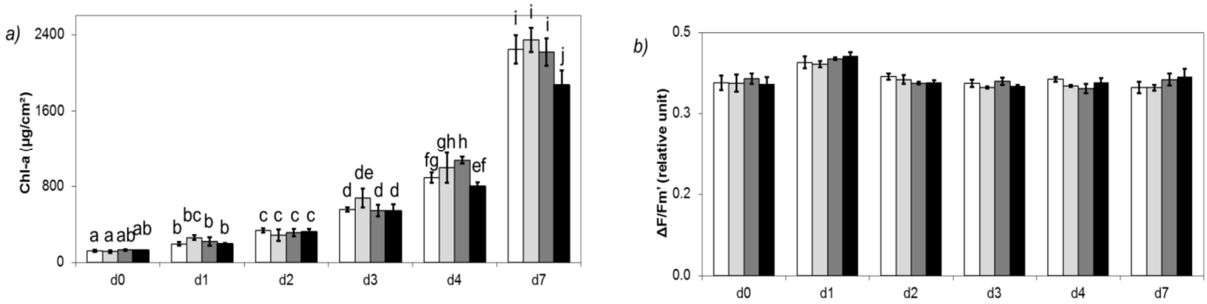


Figure 36: Chlorophyll-*a* fluorescence derived parameters versus time and as a function of metolachlor exposure (values are mean±standard error, n=4 for controls and n=3 replicates for each metolachlor concentration): a) chlorophyll-*a* fluorescence, b) effective quantum yield. Bar colors are the same as in Figure 1. Different letters indicate between-treatment *post hoc* differences.

2.3.1.3. Behavior

The percentage of motile cells (Figure 37b) decreased in the first days of the experiment. From d3, the number of motile cells increased significantly. This temporal pattern was inversely correlated with the clumping of individuals giving small scattered aggregation patterns (Figure 37a): an increase from d0 to d3 (highest percentage of cells in associations) followed by a significant decrease until d7. Motility was noted in 43±5% of the cells on d0 falling to 15±1% on d3, while larger numbers of ribbon- to star-shaped associations (4-7 cells in the first days, then 8-10 cells) were noted. The abundance of cell clumps peaked

on d3 (20±3% of the total number of cells), then they tended to disaggregate from day 4 (smaller clumps) and/or disintegrate on d7, potentially indicating biofilm senescence. Conversely, the percentage of motile cells increased to 72±3% at this date, confirming population decay.

Whatever the velocity measurement considered, the values significantly increased from d0 to d2, then stabilized until d7 (Figure 37c, 37d and 37e). On d0, velocities were of 5.81±0.17 µm.s^{-1} (VAP), 6.68±0.42 µm.s^{-1} (VCL) and 4.30±0.26 µm.s^{-1} (VSL), and reached 8.50±0.20 µm.s^{-1} (VAP), 9.08±0.18 µm.s^{-1} (VCL) and 7.48±0.28 µm.s^{-1} (VSL) on d2. The LIN parameter was on average 0.86±0.02 over the 7-day experiment (Figure 37f), indicating a constant trajectory (relatively linear) of the cells (illustrated in Supplementary material: Figure 40).

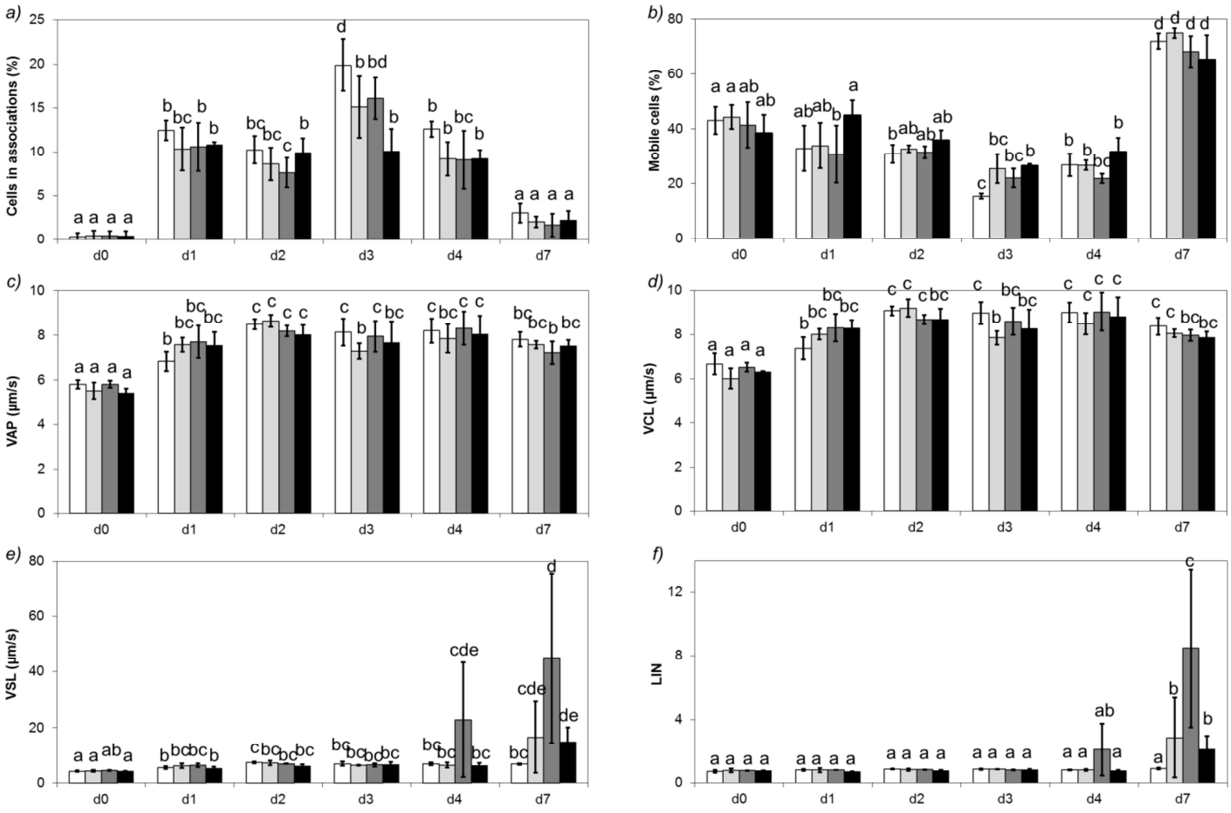


Figure 37: Behavioral endpoints versus time for different metolachlor exposure levels (values are mean±standard error, n=4 for controls and n=3 replicates for each metolachlor concentration): a) percentage of cells in associations, b) percentage of motile cells, c) average path velocity, c) curvilinear velocity, d) straight line velocity and e) linearity. Bar colors are the same as in Figure 35. Different letters indicate between-treatment *post hoc* differences.

2.3.1.4. Correlations between physiological, behavioral and populational descriptors

The two common parameters used to estimate periphytic biomass, cell density and chlorophyll-*a* fluorescence, were well correlated (R^2 =0.94, p<0.0001; also see Figure 38). Both increased with time, highlighting the exponential growth of the cultures. Growth rates were inversely correlated with average diatom length and percentage of larger cells (Figure 38), highlighting the key role of vegetative

reproduction in the exponential growth. The decrease in ATP content over time, simultaneous with exponential cell growth (R^2 =0.45, p<0.0001), and the negative correlation with sexual reproduction (Figure 38), also expressed culture growth and ageing.

In contrast to these unidirectional trajectories, behavioral descriptors provided complementary information about the structural evolution of the cultures under control conditions. Indeed, we observed that increasing aggregation of cells was inversely correlated with the percentage of motile cells (R^2 =0.46, p<0.0001). The velocity parameters (VAP, VCL and VSL) were well correlated, with a positive relationship between VAP and VCL (R^2=0.93, p<0.0001), as well as with VSL due to the constant linearity value of the trajectories over time (LIN=VSL/VAP).

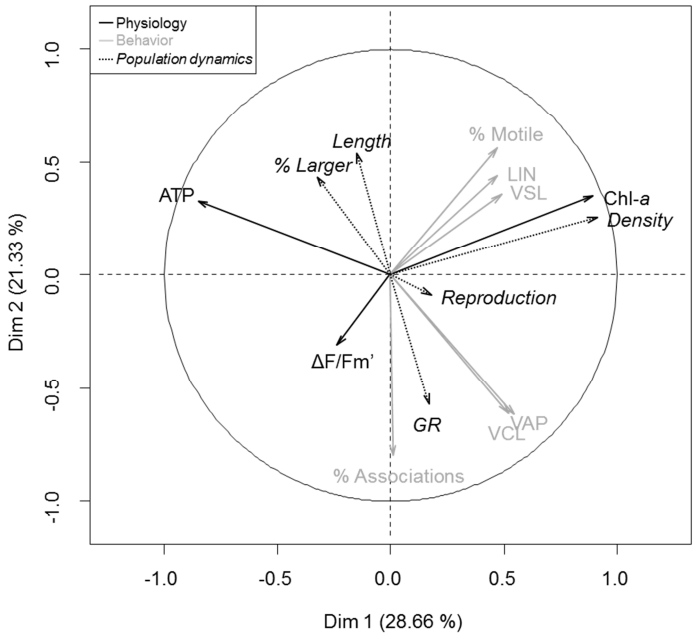


Figure 38: Correlation circle of variables analyzed by Multiple Factor Analysis for quantitative and qualitative data, performed for all samples. Variables related to physiology: Chlorophyll fluorescence (Chl-*a*), effective photosynthetic yield (ΔF/Fm') and ATP content (ATP); to behavior: percentage of cells in associations (% Associations) and of motile cells (% Motile), and motility parameters (VAP, VCL, VSL, LIN); to population dynamics: diatom live cell density (Density), mean cell length (Length), percentage of cells longer than 34µm (% Larger), growth rate (GR) and presence or absence of sexual reproduction (Reproduction).

2.3.2. Metolachlor-contaminated units

2.3.2.1. Chemical concentrations

Metolachlor concentrations measured in the EUs containing *G. gracile* were close to the nominal concentrations: the anticipated gradient of exposure of our cultures was respected (Figure 39). Concentrations were below quantification limits in C0, and 1.1±0.2 µg.L^{-1} in C1, 9.1±0.5 µg.L^{-1} in C2 and 45.5±6.6 µg.L^{-1} in C3 over the 7-day experiment. Metolachlor concentrations in the abiotic EUs (highest

concentration) on d0 and d7 did not differ from those measured in C3 at the same sampling dates (Figure 39). Concentrations decreased slightly over time in all treatments (although this was not statistically significant).

Final biomass collected on the filters for bioaccumulation measurements was quite high (18±2 mg lyophilized weight), but no metolachlor was quantified in the biota, even at the highest concentration (C3).

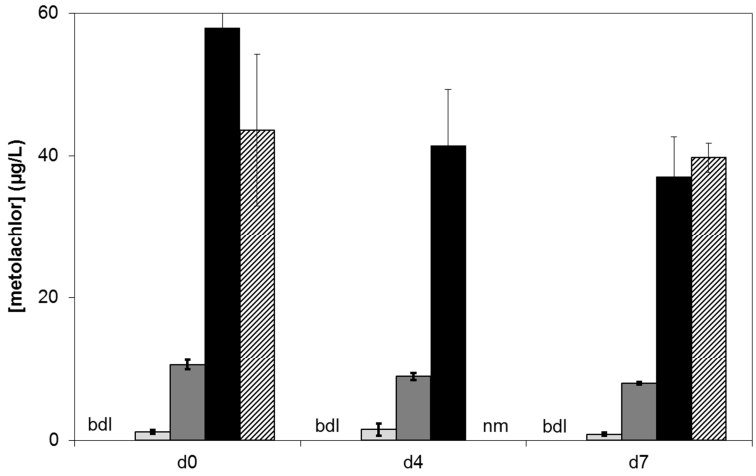


Figure 39: Exposure in the EUs: Mean (±standard error) metolachlor concentrations analyzed over the experiment (n=4 for controls and n=3 for each metolachlor concentration). White bars represent C0, light grey bars: C1, dark grey bars: C2, black bars: C3, and dashed bars: abiotic EUs. bdl: below detection limit; nm: not measured.

2.3.2.2. Population dynamics

Exponential growth was globally similar between controls and treatments (Figure 35a) from d0 to d4. On d7, however, diatom cell numbers were significantly lower at the highest exposure concentrations than in the controls (Figure 35a), with densities of 338 660±21 950 cells.mL^{-1} in C2 and 349 468±24389 cells.mL^{-1} in C3 (compared to 411 563±26 394 cells.mL^{-1} in the controls). The distribution of size classes in C1 and C2 treatment was similar to that of the controls (Figure 35b). Sexual reproduction (recovery of larger cell sizes) was however delayed with highest exposure (in C3), happening 1-2 days later than with the other treatments.

2.3.2.3. Physiology

Chl–*a* increased over time in all EUs (Figure 36a), but was significantly inhibited at high doses (in C3 on d7), whereas a slight stimulation of fluorescence was observable earlier (d1, d3) at lower doses. The effective quantum yield (ΔF/Fm') did not differ significantly from the controls, whatever the exposure concentration (Figure 36b). ATP production was not significantly impaired by the concentrations of metolachlor used and was not different from that of the controls (not shown), suggesting that overall metabolism was maintained.

2.3.2.4. Behavior

A significant increase in the percentage of motile cells with metolachlor exposure was measured on d3 (Figure 37a). Motility was significantly higher for all treatments (60±11%) compared to the controls. At the same sampling date, cell associations were also impacted (Figure 37b): on d3 cells grew in less aggregated patterns than in the controls, especially for C3 where the percentage of diatoms forming associations was always lower than in C0.

The VAP and VCL were still well correlated (R^2 =0.96, p<0.0001 for the contaminated EUs; Figure 38) and no significant effect of metolachlor was observed on these parameters (Figure 37c and 37d). Conversely, the VSL of motile diatoms tended to increase with time, and was significantly higher in C2 from d4 (Figure 37e). The LIN parameter increased slightly in C2 from day 4, and significantly higher LIN was measured on day 7 in all treatments compared to C0, indicating a more linear, although jerkier movement (observation not quantified). Linearity particularly increased in C2 at the last date (Figure 37f).

2.3.2.5. Correlations between physiological, behavioral and populational descriptors

Figure 38 provides an overview of the correlations between physiological, behavioral and populational descriptors in this experiment. Cell densities and Chl–*a* were still well correlated (R^2 =0.89, p<0.0001), although some discrepancies were observed in comparison to the controls: chlorophyll-*a* fluorescence was enhanced at lower doses, and decreased with the highest concentration of exposure at the end of the experiment. Metolachlor effects were mostly highlighted by motility parameters, driving correlations (see Figure 38, top-right corner) between higher percentages of motile cells and a more linear trajectory (p<0.0001).

2.4. Discussion

In ecotoxicology studies, the parameters commonly used to assess the impact of a molecule on microalgae are generally growth and photosynthesis, because of rapidity and ease of measurement. Based on the sole use of these two endpoints, toxicity can be underestimated, especially in the case of toxicants not directly targeting photosynthesis. This may explain the high effective concentrations (EC_{50}s) of metolachlor (inhibitor of fatty acids and lipids synthesis; Fuerst, 1987) found in the literature. Toxicity values based on photosynthesis and growth are of the order of milligrams per liter (Juneau *et al.*, 2001, Ma *et al.*, 2006, Thakkar *et al.*, 2013). There is an urgent need to develop complementary toxicity endpoints. This work is thus topical, as the use of motility endpoints provides an image of the general state of cells, assessing toxicity on (an)other metabolic target(s). Moreover, it is quickly and easily quantifiable. Motility is characterized via the quantification of different parameters (velocity values: VAP, VCL, VSL; linearity; percentage of motile cells). For approximately 40 years (Rupert & Dagmar, 2014), motility has been commonly used in animal biology as a quality indicator of human sperm, and as an endpoint of toxicity. More recently, motility endpoints were successfully used with for example fish and bivalve sperm, trochophore larvae, thanks to the CASA system (Wilson-Leedy & Ingermann, 2007). Wilson-Leedy and

Ingermann made this method of motility assessment more accessible, by developing an easy-to-use plug-in implemented in the freeware ImageJ. In the present study, we aimed to demonstrate its applicability to algae, and to determine the motility parameters of *Gomphonema gracile*, a diatom chosen because of its high sensitivity to pollutants and its presence in the environment studied, the Leyre River.

2.4.1. Control conditions

Under control conditions, the five motility parameters assessed showed different patterns of change during the experiment. Indeed, the VAP, VSL and VCL velocities increased the first days (d0 to d2) then stagnated. In contrast, the LIN parameter describing the cell trajectory directly, did not depend on the age of the culture. Changes in motility were consistent with other parameters related to population dynamics (growth rate, class size distribution), physiology (chlorophyll-*a* content, effective quantum yield, ATP content) and behavior (percentage of cells in association). Indeed, our results indicated an increase in cell velocity (VAP, VSL and VCL) in the first three days, corresponding with decreasing ATP content (Figure 38), thus revealing higher energy consumption for motility purposes (e.g. see Bertrand, 1999). Besides, the initial decrease (from d0 to d3) in the percentage of motile cells showed that exponential growth during the first days of the experiment coincided with the formation of diatom associations (Vieira *et al.*, 2008), as a consequence of the natural development of *Gomphonema gracile* populations. *Gomphonema gracile* cells were mainly solitary, as expected for highly motile species (Hudon & Legendre, 1987). On the first days, clusters started to form in the culture, with increasing aggregation of cells. In another study performed with shaken cultures of *Nitzschia angularis* and *Thalassiosira weissflogii*, Crocker and Passow (1995) also observed cell aggregates within 6 hours. As cells aggregated, lower numbers of motile individuals were predictably found. Population density and cell proximity increased the likelihood of sexual reproduction (Mann, 2011), and the cell aggregations observed may have favored sexuality, as observed through the recovery of larger cell sizes in the 2-3 first days. Then *Gomphonema* associations tended to disaggregate from day 4 (smaller clumps) and/or started to senesce on d7, with aging of the populations. At the same time, increasing numbers of motile diatoms were recorded. Decreased cell aggregation in the stationary growth phase was also suggested by Decho (1990). The kinetics of cell clustering depend on the species considered (Crocker & Passow, 1995), but discernable patterns were observed in our *Gomphonema* cultures. The cells quite quickly formed loose aggregates during their first stage of exponential growth, which then became denser. Aggregation is involved in diatom sinking, and here it may have contributed to forming the benthic mats observed on the bottoms of the EUs. Then, with population senescence and/or crowding, the search for more favorable conditions would be allowed by disaggregation and increased motility.

2.4.2. Diatom responses to metolachlor exposure

Besides the validation of the motility evaluation method, this study aimed to characterize the toxicity of metolachlor on a whole set of parameters and to demonstrate the interest of increasing the number of

endpoints, in order to properly assess the toxicity of any type of molecule with various modes of action, in particular those not targeting photosynthesis directly.

2.4.2.1. Metolachlor exposure

Although metolachlor concentrations in the EUs clearly fitted a gradient, the highest dose prepared only reached half its nominal concentration. Several hypotheses may explain this loss of dissolved metolachlor, including: bioaccumulation in the diatom cells, degradation and adsorption on the UE walls. The first two were refuted by the analysis of diatom biomass (no metolachlor detected) and in the water of the abiotic EUs (no breakdown products quantified, data not shown). Moreover, dissolved metolachlor concentrations were similar in C3 (i.e. with diatom cultures) and in the abiotic EUs, supporting the hypothesis of rapid adsorption onto the EU walls (within the 30 first minutes).

Even at the highest concentration, no metolachlor was quantified in biofilms, tending to disprove the conclusion of Larras *et al.* (2013) that hydrophobicity of substances alone can be used to predict benthic diatom exposure through bioaccumulation. Indeed, their statement was based i) on the relationships obtained in biofilms by Headley *et al.* (1998) between short-term sorption capacity of organic contaminants and their hydrophobicity, and ii) on their experimental results highlighting greater sensitivity towards hydrophobic substances (irgarol, metolachlor, terbutryn) of benthic diatoms, compared to planktonic forms. They came to the conclusion that this sensitivity should be explained by sorption in the biofilm matrix (Larras *et al.*, 2013). In the case of metolachlor, our results demonstrate that low bioaccumulation is to be expected, and that sorption processes are determined by properties other than hydrophobicity of the compound. Here, exposure, and subsequent toxicity, relied more on dissolved metolachlor concentrations.

2.4.2.2. Time-dose dependent impacts on diatoms

As expected, very few endpoints highlighted metolachlor effects on population growth and physiology. Indeed, there was no significantly diverging trend over the experiment in most of these parameters, except for chlorophyll-*a* fluorescence, and a slight (although above the 5% α-level) impact on cell association. ATP production was not significantly impaired by the concentrations of metolachlor used (not shown), suggesting that overall metabolism was maintained. Growth and effective quantum yield were globally similar between controls and treatments (Figure 35a, 36b), as were VAP and VCL (Figure 37c-d). However, certain parameters were affected by metolachlor exposure. A time effect was almost always observed, and the impact of treatment was visible only at certain times of exposure, suggesting that population responses did not follow unidirectional trajectories but rather followed time-dependent patterns, with possible successive shifts in strategies.

The effects on chlorophyll-*a* content were clearly dose-dependent: a slight stimulation of fluorescence was observable at low doses, whereas it was significantly inhibited at the highest concentration (Figure 36a). These results stress that coping with sublethal contaminations requires optimal allocation of energy to specific processes, to counterbalance the impacts of the toxicants. This phenomenon is known as hormesis (Calabrese, 2005). Biofilm stimulation of chlorophyll fluorescence has been shown to occur broadly with

low dose exposure (e.g. Ricart *et al.*, 2009, Tlili *et al.*, 2011, Tlili *et al.*, 2008), for diverse classes of chemicals. This consistent compensatory response suggests that extra allocation of resources to fluorescence may be sufficient to maintain photosynthetic activity, without affecting the total number of cells, in slightly impacted environments. Indeed, the cultures displayed dose-time dependent hormetic responses: the "greening effect" was recorded earlier in C1 (d1, d3) than C2 (on d4). Fluorescence stimulation in C1 and C2 suggested that diatoms were able to implement the same tolerance mechanisms, at timescales depending on the intensity of the stress. As time progressed, fluorescence levels returned to control values. In contrast, the inhibition on the last days of experiment in C3 indicated deleterious impacts for the culture, converging with the conclusions of Debenest *et al.* (2009) that diatoms are sensitive to chronic metolachlor exposure from 30 $\mu g.L^{-1}$.

The highest concentration (C3) of exposure impacted the size class distribution, the percentage of cells in associations and the percentage of motile cells on day 3. Other works have also demonstrated that toxicants can effect the distribution of cell sizes in diatom populations (decrease in average cell size with metal exposure; Luís *et al.*, 2011) and particularly delayed sexual reproduction (later recovery of larger cell sizes). The percentage of cells forming associations was lower in the treatments than in the controls (Figure 37a), suggesting that toxicant exposure may also affect the normal structure of the biofilm. Previous works showed that pesticides, including chloroacetanilides, modify the 3-D structure of more complex (multispecies) biofilms by reducing biofilm thickness and the distribution of the life forms present (e.g. Roubeix *et al.*, 2012, Roubeix *et al.*, 2011a regarding metolachlor). The lower numbers of aggregated cells in C3 indicated that changes could also occur at the population level, contributing to alterations in the overall biofilm architecture. Despite the fact that association in colonies could help the diatoms limit the influence of toxicants, by reducing the cell surface exposed or thanks to the concomitant increase in exopolymeric substance production (Crocker & Passow, 1995), cell aggregation is likely to make each cell lose its motility, thus its potential to escape the contaminant. Here, it can be noted that, contrary to the observations made by Cohn and McGuire (2000) or Ahmed and Häder (2010), the percentage of motile cells did not decrease, nor increase, with metolachlor exposure, meaning that only a given proportion of individuals within the population would be able to escape a contaminant.

Finally, the VSL velocity and the LIN parameter were found to be the most sensitive. Indeed, VSL tended to increase with time, and was higher in C2 from d4 (Figure 37e). Cell trajectory was still curvilinear in metolachlor-exposed EUs, but on d7 all treatments had significantly higher LIN than C0 indicating a more linear movement which could enable the diatoms to cover larger distances. Motile pennate diatoms thus regulated their motility depending on exposure to metolachlor, with higher velocity and lower trajectory curvature. Active gliding in diatoms is related to the cell's ability to secrete extracellular polymeric substances (Cohn, 2001). On the other hand, excretion of polymeric substances is also involved in resistance mechanisms: by binding the toxicant extracellularly, they contribute to limiting the entrance into the cells and thus lessen toxicity (Pereira *et al.*, 2011). Higher motility (increased VSL and a more linear trajectory) in the metolachlor-exposed EUs with respect to controls could thus highlight both increased

escape behavior against toxicants and higher excretion induced by exposure. Escape behavior could be controlled by the ROS generated by the toxicant in the cell. Indeed, Laviale *et al.* (2011) recently suggested ROS-controlled migration in marine diatoms, i.e. ROS acting as signaling molecules to generate movement.

2.5. Conclusions and perspectives

The cost of coping with toxicants for the organisms may not always be highlighted by the effect descriptors used so far. In microalgal ecotoxicological studies, fluorescence measurements are widely used, given the fact that most of the toxicants target any of the components of the photosynthetic chain, directly or indirectly.

However, harmful impacts on fluorescence and to a lesser extent on cell density were observable here only at the highest concentration tested and at the end of the experiment, whereas other endpoints responded earlier and/or at lower concentrations, such as motility-related ones. The results of our experiments showed that, at low-dose exposure, energy was allocated to resist *in situ* (increased fluorescence), whereas increased motility at higher doses tended to indicate an escape behavior.

The generalizability of these behavioral responses should now be confirmed for diverse contaminants (with different modes of action). Motility endpoints would provide valuable perspectives for the assessment of pollutant impacts not targeting photosynthesis directly, given the fact that the use photosynthesis inhibitors is increasingly restricted (Commission, 2012), calling for new reliable toxicity indicators other than photosynthesis-based ones.

Diatom motility, and more generally behavior, in response to perturbations has been overlooked in freshwater environments. Here, we demonstrate the relevance of this kind of response, even if further investigations are still needed for a better assessment of the value of diatom behavioral measurements. The species considered may obviously be a major source of variability, as well as its origin. Moreover, the extrapolation of these motility measurements will also require determining the degree of correlation between laboratory observations and behavior in the field.

Acknowledgements

N.C. thanks Marc Suquet for explaining the movement measuring technique in microalgae. Samuel Brown is acknowledged for proofreading the manuscript.

This study has been carried out with financial support from the French National Research Agency (ANR) in the frame of the Investments for the future Programme, within the Cluster of Excellence COTE (ANR-10-LABX-45).

Supplementary material

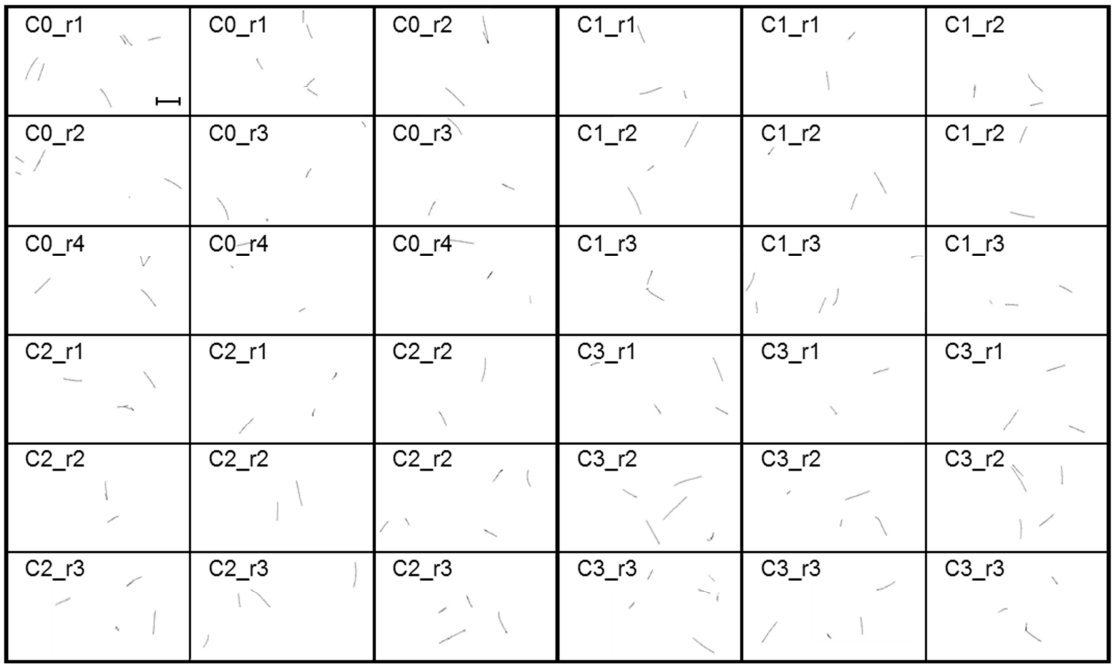


Figure 40 : Supplementary information: Individual trajectories of *G. gracile*: projection of 250 video frames from a 10-s video from samples collected day 3. C0 to C3 indicate the treatment and r1 to r4 different replicates. Scale bar: 100 µm.

3. Synthèse

Les résultats de cette étude ont permis de mettre en avant des effets biologiques « relativement précoces » (au jour 3) à la concentration maximale sur le pourcentage de cellules mobiles, le pourcentage de cellules associées et sur la distribution des classes de taille. Une augmentation du pourcentage de cellules mobiles inversement corrélé avec le pourcentage de cellules associées a été observée. L'augmentation de la proportion de grandes cellules (contraire au mode de reproduction asexuée typique des cellules causant une diminution de taille) à la concentration 100 $\mu g.L^{-1}$ suggère une mise en place de la reproduction sexuée non visible dans les autres conditions, où elle a été mise en place plus tardivement (1 à 2 jours après). Les résultats ont également permis de montrer qu'au jour final, les paramètres affectés à diverses concentrations étaient : la densité cellulaire, le contenu en chlorophylle *a*, la vitesse de déplacement appelée VSL (velocity straight line soit la vitesse en ligne droite) et sur la linéarité du mouvement (LIN).

Les résultats obtenus sur la mobilité montrent une augmentation de la linéarité de la trajectoire corrélée avec l'augmentation de la vitesse de déplacement linéaire. Le LIN a été affecté par l'ensemble des concentrations testées, y compris la concentration de 1 $\mu g.L^{-1}$, traduisant des effets sublétaux du métolachlore à une concentration très basse (par rapport aux données de la bibliographie) non visibles sur les autres paramètres biologiques. En effet, la VSL a été augmentée par les deux plus fortes concentrations (10 et 100 $\mu g.L^{-1}$) et la densité cellulaire et le contenu en chlorophylle *a* ont été significativement plus faibles après exposition aux concentrations de 10 et 100 $\mu g.L^{-1}$, et 100 $\mu g.L^{-1}$, respectivement.

Les résultats de cette étude ont donc montré une sensibilité beaucoup plus grande des paramètres liés à la mobilité des cellules par rapport aux autres descripteurs couramment utilisés comme l'efficacité photosynthétique (aucun effet sur ce paramètre aux concentrations testées) et la croissance. Chez les diatomées pennées, le mouvement est permis par la capacité des cellules à sécréter des substances extracellulaires polymérisées (Cohn, 2001) également impliquées dans la résistance aux toxiques (qui peuvent se lier à ces substances ; Pereira *et al.*, 2011). Ce comportement échappatoire pourrait résulter de la présence d'espèces réactives de l'oxygène comme stipulé par Ezequiel *et al.* (2015). La mesure du comportement de mobilité est relativement chronophage pendant les expérimentations (5 minutes de préparation et d'acquisition vidéo par échantillon immédiatement après le prélèvement, puis 5 min de traitement pour chaque vidéo) mais ne nécessite que du matériel courant dans les laboratoires (microscope et caméra). La mobilité est effet très utilisée dans le domaine animal comme critère de qualité de larves et de spermatozoïdes : compte tenu de la sensibilité de ce descripteur, il serait intéressant de poursuivre les recherches pour évaluer son potentiel comme indicateur de toxicité sur les microalgues, complémentaire des descripteurs classiques tels que la croissance et la photosynthèse.

Lors des expérimentations présentées dans les chapitres 5, 6 et 7 du manuscrit visant à évaluer l'influence de la MOD sur les microalgues et la toxicité des herbicides, la mobilité des cellules n'a toutefois pu être

mesurée en raison du temps nécessaire aux prélèvements, aux filtrations et aux analyses des autres paramètres biologiques et chimiques.

Chapitre 4 – Étude préliminaire n°2

1. Introduction

Cette deuxième étude préliminaire a eu pour but d'évaluer l'impact de l'irgarol et du diuron seuls et en mélange, sur la diatomée marine *Chaetoceros calcitrans* et la chlorodrendrale marine *Tetraselmis suecica* sur le temps de doublement (division), l'efficacité photosynthétique, le contenu relatif en lipides intracellulaires et en espèces réactives de l'oxygène.

Les cellules des trois souches ont été exposées durant six jours à trois concentrations de chaque pesticide (0,05, 0,1 et 0,5 $\mu g.L^{-1}$ pour l'irgarol (I) et 0,5, 1 et 5 $\mu g.L^{-1}$ pour le diuron (D)) et à quatre mélanges binaires (M1 : D5+I0,5 ; M2 : D5+I0,1 ; M3 : D1+I0,5 ; M4 : D1+I0,1). Les expérimentations ont été conduites à une température de 17°C et suivant un cycle jour:nuit de 16h:8h. Le nombre de réplicats par traitement était de quatre pour les témoins (sans pesticides) et de trois pour chaque modalité testée. Le comptage des cellules a été effectué quotidiennement et les trois paramètres ont été mesurés le dernier jour des expérimentations.

2. Article 2: Microalgal sensitivity varies between a diuron-resistant strain and two wild strains when exposed to diuron and irgarol, alone and in mixtures

Valentin Dupraz[1,†], Nathalie Coquillé[1,2,3,4†], Dominique Ménard[1], Rossana Sussarellu[1], Larissa Haugarreau[1], Sabine Stachowski-Haberkorn[1,*]

[1] Ifremer, Laboratoire d'Écotoxicologie, rue de l'île d'Yeu, BP 21105, F-44311 Nantes cedex 03, France

[2] Irstea, UR EABX, Centre de Bordeaux, 50 avenue de Verdun, F-33612 Cestas cedex, France

[3] Université de Bordeaux, UMR 5805, EPOC, Laboratoire de Physico Toxico Chimie de l'environnement, 351 Cours de la Libération, CS 10004, F-33405 Talence Cedex, France

[4] CNRS, UMR 5805, EPOC, Laboratoire de Physico Toxico Chimie de l'environnement, 351 Cours de la Libération, CS 10004, F-33405 Talence Cedex, France

[*] Corresponding author. E-mail address: Sabine.Stachowski.Haberkorn@ifremer.fr

[†] These first authors contributed equally to this article

Chemosphere 151 (2016) 241-252

Abstract

A wild strain of *C. calcitrans* and wild and diuron-resistant strains of *T. suecica*, were exposed to the PSII inhibitor herbicides diuron and irgarol, individually and in mixtures. The effects of three concentrations of diuron and irgarol and four binary mixtures were evaluated on doubling time, relative reactive oxygen species and lipid content by flow cytometry, and on photosynthetic efficiency by pulse amplitude modulated fluorescence.

In both wild strains, significant effects were observed for each molecule at the highest concentration tested: at irgarol 0.5 µg.L^{-1}, *C. calcitrans* was shown to be more sensitive than *T. suecica* (+ 52% and + 19% in doubling time, respectively), whereas at diuron 5 µg.L^{-1}, *T. suecica* was more affected (+ 125% in doubling time) than *C. calcitrans* (+ 21%). Overall, irgarol had a higher toxicity at a lower concentration than diuron (no effect at diuron 0.5 µg.L^{-1}) for both wild strains. The strongest mixture (irgarol 0.5 µg.L^{-1} + diuron 5 µg.L^{-1}) increased doubling time by 356% for *T. suecica*, thus showing amplified effects when the two compounds were mixed.

Sequencing of the diuron-resistant strain demonstrated a single mutation in the *psbA* gene coding sequence. Although resistance of this strain to diuron was confirmed with no effect at the highest diuron concentration, no resistance to irgarol was shown. In addition, the mutant strain exposed to the strongest mixture showed a 3.5-fold increase in doubling time compared with irgarol alone, thereby supporting the hypothesis of a biochemical interaction between these two compounds.

Keywords

Microalgae; Herbicides; Antifouling; Irgarol; Diuron; Diuron resistance

2.1. Introduction

Irgarol (2-methylthio-4-tertbutylamino-6-cyclopropylamino-s-triazine) and diuron (1-(3,4 dichlorophenyl)-3,3 dimethyl urea) are two biocides commonly used in copper-based antifouling paints to replace TBT (Tributyltin) (Manzo *et al.*, 2006). Diuron has also been used as an herbicide in agriculture. The use of diuron as a biocide and herbicide was prohibited in France in 2008 (Directive biocide 98/8/CE and Arrêté du 21/08/2008). However, its persistence in the environment means that it is still found in rivers and coastal waters. In the Water Framework Directive (2000/60/EC), diuron, and later irgarol (Directive 2013/39/UE), were included in the list of "48 priority pollutants to be monitored in European waters", which will lead to their progressive prohibition over the next 20 years. While diuron is no longer used in most European countries, it is still of great concern in other countries, such as in Australia where it is known to be harmful to the Great Barrier Reef (Holmes, 2012, Lewis *et al.*, 2009). In contrast, irgarol is still widely used in antifouling paints all around the world despite reports of high toxicity in some studies from the U.K. (Chesworth *et al.*, 2004, Thomas *et al.*, 2001), where its use in antifouling paints has been prohibited. Along the French coasts, average irgarol concentrations from 10 to 40 $ng.L^{-1}$ were found in Arcachon Bay, while concentrations up to 0.1 $\mu g.L^{-1}$ were reported in Arcachon port (Auby & Maurer, 2004). More recently, irgarol concentrations up to 0.186 $\mu g.L^{-1}$ were reported in Vilaine Bay (Caquet *et al.*, 2013). In Singaporean coastal waters, irgarol concentrations in the range of 3 to 4 $\mu g.L^{-1}$ have been reported (Basheer *et al.*, 2002). As for diuron, concentrations from 11 to 33 $ng.L^{-1}$ were reported in Mediterranean coastal waters (Munaron *et al.*, 2012), and 0.268 $\mu g.L^{-1}$ in Vilaine Bay (Caquet *et al.*, 2013). The highest concentrations reported in European rivers and ground waters have been 0.279 $\mu g.L^{-1}$ and 0.864 $\mu g.L^{-1}$, respectively (Loos *et al.*, 2009, Loos *et al.*, 2010). In addition, diuron and irgarol have been measured at maximal concentrations of 2.583 and 0.824 $\mu g.L^{-1}$, respectively, in careening areas of several ports (Cozic & Durand, 2013).

Irgarol, a triazine, and diuron, a phenylurea, both act as photosystem II (PSII) inhibitors: their binding action on the D1 protein in PSII prevents electron transfer between quinones Q_A and Q_B, impeding Hill's reaction (Jones & Kerswell, 2003, Nimbal *et al.*, 1996). As PSII structure is very well conserved among plants and microalgae, numerous non-target organisms could suffer deleterious effects if environmental pollution occurs (Readman *et al.*, 1993).

Effects on phytoplankton have been recorded in a number of studies. Koutsaftis and Aoyama (2006) reported 72 h IC_{50} values of 1.1 $\mu g.L^{-1}$ and 36 $\mu g.L^{-1}$ for irgarol and diuron respectively, on the growth of the microalga *Chaetoceros gracilis*. Nyström *et al.* (2002) established that irgarol concentrations ranging from 441 to 647 $ng.L^{-1}$ were responsible for 50% photosynthesis inhibition in Lake Geneva phytoplankton. Larras *et al.* (2013) assessed the sensitivity of benthic diatoms to diuron and irgarol under both planktonic and benthic conditions. They established EC_{50}, values of 4.27 and 10.07 $\mu g.L^{-1}$ for planktonic conditions and 9.50 and 0.070 $\mu g.L^{-1}$ for benthic conditions, for diuron and irgarol, respectively, based on the 96 h growth rate of the population. Devilla *et al.* (2005) established EC_{50} values based on 72 h cell number

inhibition of 2.26 and 0.25 µg.L^{-1} for diuron and irgarol, respectively, on the microalga *E. huxleyi.* For diuron, tropical estuarine microalgae species *Navicula sp*. and *N. pyriformis* showed EC_{50} values of 7.8 and 8 µg.L^{-1}, respectively, based on 72 h growth rate (Magnusson *et al.*, 2008). In another study, Magnusson *et al.* (2010) found diuron IC_{50} values of 2.6, 2.01, 2.71 and 4.4 µg.L^{-1} for *Navicula sp*., *N. pyriformis, P. tricornutum* and *C. closterium,* respectively, based on photosynthetic efficiency.

In the environment, organisms are exposed to cocktails of chemicals, it is thus of interest to study the effects induced by mixtures of contaminants. Fernandez-Alba *et al.* (2002) showed that a mixture of irgarol and diuron resulted in a synergistic interaction impacting three different organisms, including a microalga. Gatidou and Thomaidis (2007) showed that the harmful effects of interactions between irgarol and its metabolites were additive on phytoplankton, while the interaction between diuron and its metabolites was shown to be synergistic. Recently, Cedergreen (2014) reviewed the main interactions resulting from different types of pollutants: metals, pesticides and antifouling agents, revealing that synergistic interaction often occurred with antifouling mixtures.

Following chronic exposure to many different chemicals, genetic variants resistant to certain types of molecules might arise in some species. It was demonstrated that PSII inhibitor resistance was mainly due to a mutation in the gene sequence coding for the D1 protein (Erickson *et al.*, 1989, Oettmeier, 1999). However, according to the literature available, such mutations were not involved in resistance to irgarol (Eriksson *et al.*, 2009). Cells resistant to contaminants arise randomly by rare spontaneous pre-selective mutation during replication (Costas *et al.*, 2001, López-Rodas *et al.*, 2001). In the case of environmental pollution, such mutants would allow a population to become resistant (Carrera-Martinez *et al.*, 2011, López-Rodas *et al.*, 2009, Romero-Lopez *et al.*, 2012). In the particular case of diuron resistance, it has been demonstrated that diuron itself was not responsible for the first appearance of resistant cells (López-Rodas *et al.*, 2001).

The microalgae used in this study were the chlorophyte *Tetraselmis suecica* and the diatom *Chaetoceros calcitrans*. In addition to their use in aquaculture, both of these species are encountered in the temperate coastal waters of the East Atlantic. The testing of species from two different phyla enabled us to cover a broader range of potential responses to pesticide exposure. Furthermore, two different strains of *T. suecica* were used in this study: (i) a "wild" strain and (ii) a diuron-resistant strain (Stachowski-Haberkorn *et al.*, 2013).

In order to understand to what extent environmental contamination with herbicides can affect microalgal populations, this study aimed:

1. To evaluate the toxicity of diuron and irgarol separately and to explore the effects of binary mixtures, on four physiological endpoints, using two species of microalgae.

2. To identify the mutation responsible for diuron resistance in the mutant strain of *T. suecica*.

3. To investigate the effects on the mutant strain of irgarol and of binary mixtures of both herbicides.

To answer these questions, the impacts of irgarol and diuron (individually and in mixtures) were assessed on three strains of two marine phytoplankton species. The genetic basis of the resistance to diuron was investigated and effects of the herbicides were measured on four parameters. Growth, measured by doubling time (T_D), is a parameter obviously related to the survival process in microalgae. Two other parameters related to the physiological status of the strains are expected to vary because of photosynthesis inhibition caused by diuron and irgarol: the photosynthetic efficiency (ϕ'_M) and the relative reactive oxygen species (ROS; $FL1_{ROS}$) content. Since the two phytoplankton species are commonly used in aquaculture, the relative lipid content ($FL1_{Lipids}$) was also measured, as it is related to the nutritive quality of the cells.

One major interest of the present study is that, to our knowledge, no ecotoxicological studies have yet established the effects of herbicide mixtures toward both wild and resistant strains of the same phytoplankton species.

2.2. Materials and methods

2.2.1. Chemical / toxicant preparation

Irgarol (Irgarol Pestanal® ≥ 98.4%) and diuron (> 98%) were purchased from Sigma Aldrich. Stock solutions of irgarol (500 $mg.L^{-1}$) and diuron (500 $mg.L^{-1}$) were then prepared in pure methanol. These solutions were diluted, using sterile ultra-pure water to make working solutions of 0.02 $mg.L^{-1}$ (0.004% methanol) and 0.06 $mg.L^{-1}$ (0.012% methanol) for irgarol; and 0.1 $mg.L^{-1}$ (0.02% methanol) and 1 $mg.L^{-1}$ (0.2% methanol) for diuron.

2.2.2. Microalgal cultures

The marine microalgae *Tetraselmis suecica* (CCMP 904) ("wild" strain: *T_wild*) and *Chaetoceros calcitrans* (CCMP 1315) ("wild" strain: *C_wild*) were obtained from the Provasoli–Guillard National Center for Marine Algae and Microbiota (NCMA). A *Tetraselmis suecica* strain resistant to diuron (diuron-resistant mutant: *T_mutant*) was obtained from wild strain CCMP 904 after experiments performed by Stachowski-Haberkorn *et al.* (2013).

Microalgal cultures were maintained in sterile f/2 and f/2-silica medium (Guillard, 1975, Guillard & Ryther, 1962) at 17 ± 1°C, in a thermostatic chamber ST5+ (POL-EKO-Aparatura®, Poland) at 105 $\mu mol.m^{-2}.s^{-1}$ (Quantometer Li-Cor Li-250 equipped with a spherical sensor), with a dark:light cycle of 8:16 h. Cultures were grown in 100 mL round borosilicate sterile glass flasks previously heated to 450°C for 6 h and autoclaved 20 min at 121°C.

For exposure experiments, cultures were grown in 60 mL sterile f/2 medium for *T. suecica* and f/2-Si medium for *C. calcitrans*: cultures were inoculated using stock cultures in exponential growth phase. The initial concentrations of cells were 20,000 $cell.mL^{-1}$ for each species at the beginning of exposure.

2.2.3. Exposure experiments

Six-day exposure experiments were run. Preliminary experiments performed with each biocide separately showed that above 0.5 $\mu g.L^{-1}$ irgarol or 5 $\mu g.L^{-1}$ diuron, no algal growth was observed for at least one of the three strains. Each strain was therefore exposed to each biocide singly (irgarol: 0.05 (I0.05), 0.1 (I0.1) and 0.5 (I0.5) $\mu g.L^{-1}$; diuron: 0.5 (D0.5), 1 (D1) and 5 (D5) $\mu g.L^{-1}$) and to four binary mixtures of irgarol and diuron: M(D5+I0.5), M(D5+I0.1), M(D1+I0.5) and M(D1+I0.1). All concentrations are expressed as nominal concentrations. Only the two highest concentrations of each biocide were tested in the mixtures, as no effects were expected with the lowest concentrations. Two control treatments were included in the experiments. Control cultures (C) contained only microalgae and culture medium; solvent-control cultures (C_S) contained microalgae, culture medium and the highest methanol concentration corresponding to either M(D5+I0.5) (0.0011% methanol) or diuron 5 $\mu g.L^{-1}$ (0.001% methanol), which are more than 700 fold lower than the maximum methanol concentration recommended for algal bioassays (Abou-Waly, 2000). Five independent experiments were run in order to expose the three strains to all the treatments. Cultures were carried out in triplicate (exposed conditions) or in quadruplicate (control conditions). Every day, 500 µL of each culture were sampled to measure cell concentrations. On the last day (day 6), when control cultures reached the end of exponential growth, a further 1400 µL were sampled in each culture to assess the effects of exposures on different physiological endpoints: photosystem II effective quantum yield (1000 µL), relative intracellular ROS content (200 µL) and relative intracellular lipid content (200 µL).

2.2.4. Microalgal analysis using flow cytometry

Samples were run on an Accuri C6 flow cytometer (Becton Dickinson Accuri™) equipped with a blue (488 nm) and a red (640 nm) laser. Preliminary experiments made it possible to select the optimal protocol (staining duration and concentration) for each fluorescent dye and species.

2.2.4.1. Doubling time measurement

In order to measure the cell density daily in each culture, 500 µL were sampled and fixed using glutaraldehyde (final concentration 0.25%). Tubes were mixed and left for 15 minutes at room temperature in the dark before analysis. Preliminary experiments made it possible to choose the parameters best suited to discriminate the species: cells of *T. suecica* strains were counted on a FL1 (green fluorescence, 530/30 nm) vs. FL4 (red fluorescence, 675/25 nm, chlorophyll-related) cytogram. Cells of *C. calcitrans* were counted on a SSC (Side Scatter) vs. FL3 (red fluorescence, > 670 nm) cytogram.

Observation of culture samples by microscopy confirmed that *C. calcitrans* did not produce chains of cells under these experimental conditions. Counts were available directly in the BD Accuri™ C6 software, including the analyzed volume.

For each culture, growth parameters were calculated as follows: the growth rate (μ, $hours^{-1}$) was the slope of the regression line from the plot of Ln ($cell.mL^{-1}$) on time (hours). The doubling time (T_D, hours) was calculated as: $T_D = Ln(2)/\mu$.

2.2.4.2. Reactive oxygen species (ROS)

The fluorescent dye 2',7'–dichlorodihydrofluorescein diacetate (H_2DCFDA) was used to check for effects of irgarol, diuron and their mixtures on intracellular ROS production (Molecular probes, Eugene, OR, USA). H_2DCFDA is a non-polar dye which can enter the cells: in presence of H_2O_2, ROO• or $ONOO^-$, acetate groups are cleaved and oxidized by intracellular esterases, resulting in the conversion from non-fluorescent H_2DCFDA to highly fluorescent 2',7'-dichlrofluorescein (DCF). This fluorescent compound can be measured by green fluorescence (FL1, 530/30 nm). The following protocol was adapted from Stachowski-Haberkorn *et al.* (2013): a stock solution of 100 mM H_2DCFDA in dimethyl sulfoxide (DMSO) was used to make a 2 mM working solution in phosphate-buffered saline (137 mM NaCl; 2.7 mM KCl, pH 7.4, 2% final DMSO concentration in the working solution). Preliminary experiments were carried out to determine the optimal H_2DCFDA concentration and incubation time to use for *T. suecica* and *C. calcitrans* cultures, using cultures exposed to 1 mM or 100 µM H_2O_2 (final concentration) as a positive control. In the present experiment, H_2DCFDA was used at a final concentration of 80 µM (0.08% DMSO) in fresh 200 µL samples. Samples were incubated in the dark at room temperature for 30 min before analysis.

2.2.4.3. Relative intracellular lipid content

The relative intracellular lipid content was estimated by the use of a green lipophilic fluorochrome: 4,4-difluoro-1,3,5,7-tetramethyl-4-bora-3a,4a-diaza-s-indacene (BODIPY$^{505/515}$ Life Technologies®, Carlsbad, CA, USA). This fluorescent compound is accumulated in the intracellular lipid bodies (which are morphologically diverse) by a diffusion mechanism and subsequent trapping. This dye easily crosses cell and organelle membranes due to its high oil/water partition coefficient (Akimoto & Mimuro, 2007, Cooper *et al.*, 2010). BODIPY$^{505/515}$ can be measured by green fluorescence (FL1, 530/30 nm). The following protocol was adapted from Brennan *et al.* (2012): a working solution of 12 µg.L^{-1} was prepared from a 5000 mg.L^{-1} stock solution in pure DMSO. BODIPY was used at 0.075 µg.L^{-1} final concentration (0.6% DMSO) for *C. calcitrans* and 0.12 µg.L^{-1} final concentration (1.0% DMSO) for *T. suecica* in fresh 200 µL samples. Before analysis, samples were incubated in the dark at room temperature for 6 and 5 minutes for *C. calcitrans* and *T. suecica*, respectively.

2.2.5. Photosystem II effective quantum yield

Photosystem II effective quantum yield (operational yield = ϕ'_M) was measured by Pulse Amplitude Modulated (PAM) fluorescence using an Aquapen-C AP-C 100 fluorometer (Photon system Instruments®, Drasov, Czech Republic). Measurements were made on 2 mL of diluted cultures (1:2 dilution in culture medium) in light adapted conditions (light intensity of the culture chamber). Three measurements were performed for each culture and a mean taken of these values.

2.2.6. D1 protein mRNA sequencing

Triplicate 50-mL cultures of *T_wild* and *T_mutant* were grown in control conditions for six days in order to extract total RNA. Cells were centrifuged at 4500 g for 10 min, washed in sterile f/2 medium and re-centrifuged prior to adding 1.5 mL Trizol (Ambion, Life Technologies). Total RNA was extracted according to the Trizol manufacturer's instructions. RNA concentrations were determined using an ND-1000 spectrophotometer (Thermo Scientific, Waltham MA, USA) at 260 nm. RNA integrity was assessed on an Agilent bioanalyzer using RNA 6000 Nano kits (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA), according to the manufacturer's instructions. Reverse transcription was carried out with the High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Applied Biosystems, Life Technologies), according to manufacturer's instructions, on 2 µg total RNA. Primers (Table 12) were designed on the *T. suecica* D1 protein complete CDS (Genbank DQ173249) using Primer-BLAST NCBI tools. The protein was divided into two regions (A and B) in order to obtain PCR products between 500 and 600 bp. For each *T. suecica* strain and primer pair, PCR reactions were performed in triplicate using NEBNext High Fidelity 2X Master mix (New England Biolabs, Ipswich, MA USA) on 3 µL cDNA with 25 µM of primers. The thermal cycler was programmed, according to manufacturer's instructions, as follows: 98°C for 30 seconds for initial denaturation; 15 cycles at 98°C for 10 seconds, 65°C for 30 seconds and 72°C for 30 seconds; then 72°C for 5 min for the final extension. PCR products were purified with USB ExoSAP-IT PCR Product Cleanup (Affymetryx, Santa Clara, CA, USA) and sequenced in a facility with a Sanger ABI 3730xl (Applied Biosystems, Life Technologies), using the primers in Table 12. Sequences were aligned with Clustal W implemented in MEGA 6 software (Tamura *et al.*, 2013).

Table 12 : Primers used for D1 protein coding sequence amplification end sequencing.

	Sequence (5'->3')	**Product length (bp)**
D1 A Fw	GCTAACTCAATGTGGGCTCG	498
D1 A Rv	ACCTAAAGGCATACCATCAGAGA	
D1 B Fw	ACCCAATCGGTCAAGGTTCA	578
D1 B Rv	AGCGTTTACAGATGGAGCTTCT	

2.2.7. Statistical analysis

One-way ANOVAs were performed on each strain/chemical combination to check for significant differences in growth, yield, relative intracellular ROS level and lipid content between control and exposed cultures. A p-value < 0.05 was considered statistically significant. When significant differences were observed, a multiple range Newman–Keuls test was used to compare means. All statistical analyses were performed using Statistica (StatSoft, Inc., version 10).

2.3. Results

Neither methanol concentration showed a significant effect on the studied parameters (data not shown) compared with the control without solvent, whatever the species and strain. The results obtained for each species/strain are therefore presented without the solvent-controls. In Table 13, results are expressed as mean values (± standard-error, SE) of raw data. In all the figures, results are shown as the percentage of variation of exposed samples compared with the control without solvent (C).

2.3.1. Chaetoceros calcitrans

2.3.1.1. Toxicity of single herbicides

Among the three concentrations of diuron tested, only the highest (D5) showed significant effects on the four parameters measured (Table 13), namely: doubling time T_D, photosynthetic efficiency ϕ'_M, reactive oxygen species-related relative fluorescence $FL1_{ROS}$ and lipid-related relative fluorescence $FL1_{Lipids}$. In the D5-exposed cultures, while T_D increased by 21 ± 2.2% ($p = 0.0002$) compared to the control, the three other parameters decreased (Figure 41).

Like diuron, irgarol showed no significant effect at the two lowest concentrations (Table 13). At 0.5 µg.L^{-1}, a significant increase of T_D was demonstrated (+52 ± 3.1%, $p = 0.0002$); significant decreases were noticed in ϕ'_M and $FL1_{ROS}$, although no significant effect was found on $FL1_{Lipids}$ (Table 13).

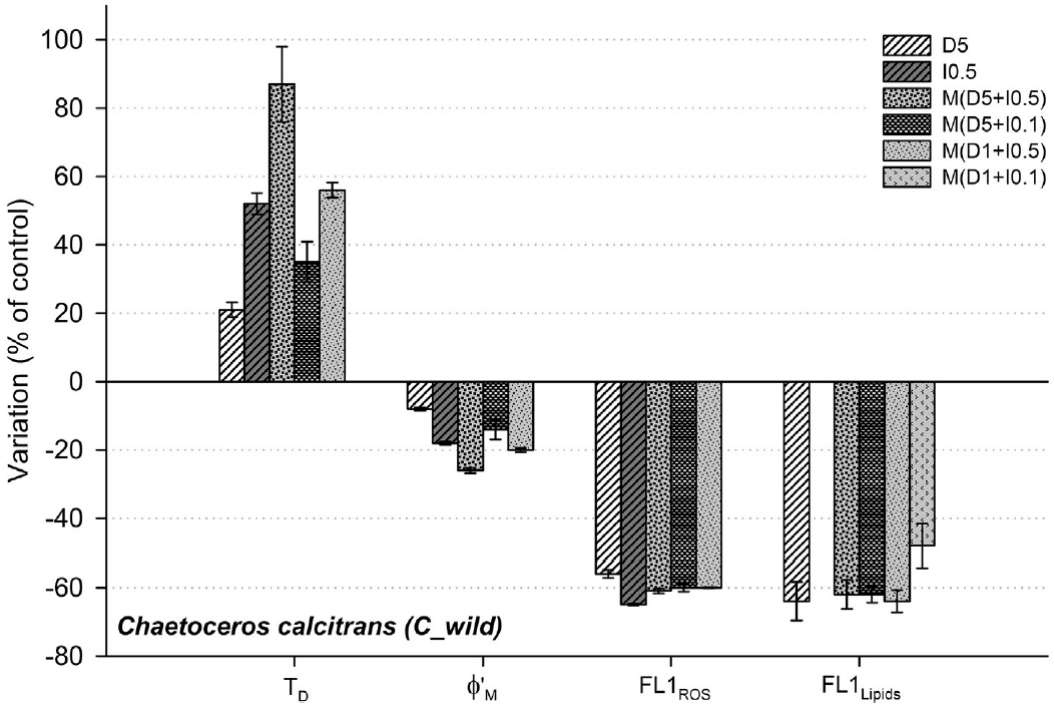


Figure 41 : Percentage variation of exposed samples of C. calcitrans (*C_wild*) compared with the control treatment without solvent (C) for: doubling time (T_D), photosynthetic efficiency (Φ'_M), relative ROS content ($FL1_{ROS}$) and relative lipid content ($FL1_{LIPIDS}$); after exposure to diuron (D) and irgarol (I), alone and in mixtures (means ± SE). Only significant effects are shown (ANOVA, $p < 0.05$).

Table 13 : Effects of diuron and irgarol, singly and in mixtures, on *C. calcitrans* and *T. suecica* after six-day exposures.

	Diuron (µg.L^{-1})					Irgarol (µg.L^{-1})					Mixtures				
		T_D (h^{-1})	ϕ'_M	$FL1_{ROS}$ (10^3 a.u.)	$FL1_{Lipids}$ (10^3 a.u.)		T_D (h^{-1})	ϕ'_M	$FL1_{ROS}$ (10^3 a.u.)	$FL1_{Lipids}$ (10^3 a.u.)		T_D (h^{-1})	ϕ'_M	$FL1_{ROS}$ (10^3 a.u.)	$FL1_{Lipids}$ (10^3 a.u.)
C_wild	C	18.2 ± 0.1 a	0.74 ± 0.002 a	1.61 ± 0.05 a	371 ± 20 a	C	16.7 ± 0.1 a	0.74 ± 0.003 a	1.89 ± 0.17 a	420 ± 46 a	C	18.2 ± 0.1 a	0.74 ± 0.002 a	1.61 ± 0.05 a	371 ± 20 a
	D0.5	18.3 ± 0.1 a	0.73 ± 0.013 a	1.63 ± 0.22 a	381 ± 103 a	I0.05	16.9 ± 0.3 a	0.73 ± 0.004 a	1.36 ± 0.29 ab	376 ± 38 a	M(D5+I0.5)	34.0 ± 2.0 b	0.55 ± 0.006 d	0.62 ± 0.01 b	142 ± 16 b
	D1	18.1 ± 0.1 a	0.73 ± 0.009 a	1.79 ± 0.23 a	468 ± 70 a	I0.1	17.1 ± 0.2 a	0.73 ± 0.001 a	1.50 ± 0.31 ab	322 ± 3 a	M(D5+I0.1)	24.5 ± 1.1 d	0.64 ± 0.02 b	0.64 ± 0.02 b	142 ± 9 b
	D5	22.1 ± 0.4 b	0.68 ± 0.003 b	0.71 ± 0.02 b	133 ± 21 b	I0.5	25.5 ± 0.5 b	0.6 ± 0.004 b	0.66 ± 0.01 b	328 ± 20 a	M(D1+I0.5)	28.5 ± 0.4 c	0.59 ± 0.004 c	0.64 ± 0.00 b	134 ± 12 b
											M(D1+I0.1)	18.6 ± 0.2 a	0.74 ± 0.002 a	1.66 ± 0.21 a	193 ± 24 b
T_wild	C	24.4 ± 0.1 a	0.75 ± 0.004 a	16.60 ± 0.34 a	791 ± 24 a	C	27.3 ± 0.5 a	0.76 ± 0.004 a	17.70 ± 0.10 a	749 ± 32 a	C	27.3 ± 0.5 a	0.76 ± 0.004 a	17.70 ± 0.10 a	749 ± 32 a
	D0.5	25.4 ± 0.4 a	0.73 ± 0.01 a	16.50 ± 0.12 a	687 ± 43 b	I0.05	27.3 ± 0.2 a	0.78 ± 0.002 b	15.80 ± 0.42 b	726 ± 11 a	M(D5+I0.5)	124.2 ± 9.5 d	0.54 ± 0.009 d	34.50 ± 1.40 c	475 ± 19 c
	D1	26.2 ± 0.5 a	0.72 ± 0.008 a	18.30 ± 0.70 b	662 ± 27 b	I0.1	26.2 ± 0.2 a	0.77 ± 0.001 ab	16.60 ± 0.53 ab	763 ± 23 a	M(D5+I0.1)	68.1 ± 2.4 c	0.58 ± 0.004 c	31.70 ± 1.00 bc	479 ± 25 c
	D5	54.8 ± 5.9 b	0.56 ± 0.013 b	23.70 ± 0.30 c	493 ± 15 c	I0.5	32.5 ± 0.5 b	0.75 ± 0.005 c	25.60 ± 0.82 c	594 ± 10 b	M(D1+I0.5)	49.3 ± 0.6 b	0.65 ± 0.004 b	29.40 ± 0.77 b	489 ± 6 c
											M(D1+I0.1)	28.8 ± 0.8 a	0.75 ± 0.003 a	19.60 ± 2.40 a	622 ± 40 b
T_mutant	C	29.2 ± 0.3 a	0.76 ± 0.003 a	14.10 ± 0.53 a	885 ± 20 a	C	29.2 ± 0.3 a	0.76 ± 0.003 a	14.10 ± 0.53 a	885 ± 20 a	C	29.2 ± 0.3 a	0.76 ± 0.003 a	14.10 ± 0.53 a	885 ± 20 a
	D0.5	29.2 ± 0.3 a	0.75 ± 0.004 ab	14.50 ± 0.56 a	901 ± 17 a	I0.05	28.8 ± 0.4 a	0.74 ± 0.005 b	14.60 ± 0.27 a	851 ± 26 a	M(D5+I0.5)	48.3 ± 2.0 c	0.65 ± 0.005 d	24.00 ± 1.10 c	738 ± 17 b
	D1	28.7 ± 1.0 a	0.75 ± 0.003 ab	14.20 ± 0.29 a	928 ± 9 a	I0.1	28.4 ± 0.3 a	0.75 ± 0.004 a	14.80 ± 0.26 a	873 ± 15 a	M(D5+I0.1)	29.1 ± 0.5 a	0.73 ± 0.007 b	15.40 ± 0.17 a	931 ± 23 a
	D5	28.6 ± 0.1 a	0.74 ± 0.002 b	15.30 ± 0.41 a	884 ± 12 a	I0.5	34.6 ± 1.0 b	0.70 ± 0.005 c	17.00 ± 0.71 b	751 ± 25 b	M(D1+I0.5)	37.4 ± 0.8 b	0.70 ± 0.004 c	18.80 ± 0.34 b	786 ± 41 b
											M(D1+I0.1)	28.6 ± 0.2 a	0.74 ± 0.002 b	14.60 ± 0.34 a	897 ± 10 a

All values are mean values (± standard-error, SE) of raw data
a, b, c, d indicate significant differences between treatments (ANOVA, $p < 0.05$ followed by Newman-Keuls post-hoc test, $p < 0.05$)
T_D: doubling time; Φ'_M: photosystem II effective quantum yield; $FL1_{ROS}$: intracellular ROS relative content; $FL1_{LIPIDS}$: intracellular lipid relative content
C_wild: *C. calcitrans* wild strain; *T_wild*: *T. suecica* wild strain; *T_mutant*: *T. suecica* mutant strain; C: Control treatment without solvent

2.3.1.2. Toxicity of herbicide mixtures

The four mixtures used in this study significantly affected *C. calcitrans* for at least one parameter out of the four measured (Table 13, Figure 41). Indeed, while M(D1+I0.1) induced only a single significant decrease in $FL1_{Lipids}$, the three other mixtures had significant effects on all parameters. M(D5+I0.5) and M(D1+I0.5), induced greater effects on T_D and ϕ'_M than M(D5+I0.1): T_D was increased by 87 ± 11% ($p = 0.0002$) and by 56 ± 2.2% ($p = 0.0003$) when the cultures were exposed to M(D5+I0.5) and M(D1+I0.5), respectively. The increase induced by M(D5+I0.1) was lower (+35 ± 5.9%, $p = 0.0021$). In the same way, these three mixtures caused significant decreases in ϕ'_M from -26 ± 0.8% ($p = 0.0002$), to -14 ± 2.9% ($p = 0.0002$) (Figure 41). $FL1_{ROS}$ and $FL1_{Lipids}$ were affected to nearly the same extent by the three mixtures, with decreases around 60% ($p = 0.0002$ for all concentrations and both parameters).

2.3.2. *Tetraselmis suecica*

2.3.2.1. Wild strain

2.3.2.1.1. Toxicity of single herbicides

Among the three diuron concentrations tested, only the highest (D5) significantly affected all parameters, the greatest effect being on T_D (+125 ± 24.3%, $p = 0.0003$) (Table 13 and Figure 42). At 1 µg.L^{-1}, diuron induced a significant increase in $FL1_{ROS}$ by 10 ± 4.2% ($p = 0.019$) and a significant decrease in $FL1_{Lipids}$ by 16 ± 3.4% ($p = 0.028$), when no effect was detected on T_D or ϕ'_M. At 0.5 µg.L^{-1} diuron (Table 13), only a significant decrease in $FL1_{Lipids}$ was demonstrated (Figure 42).

After exposure to irgarol 0.5 µg.L^{-1}, significant effects were shown on the four parameters (Table 13 and Figure 42). T_D and $FL1_{ROS}$ were increased (+19 ± 2% for T_D, $p = 0.0002$), while ϕ'_M and $FL1_{Lipids}$ were decreased (Figure 42). With irgarol 0.05 µg.L^{-1}, slight significant effects were noticed on ϕ'_M, which was mildly stimulated, and $FL1_{ROS}$, which was lower than the control.

2.3.2.1.2. Toxicity of herbicide mixtures

Among the four mixtures tested in this study, three induced significant deleterious effects on all parameters measured (Table 13). The most concentrated mixture, M(D5+I0.5), led to a 356 ± 35% ($p = 0.0002$) increase in T_D, as well as a 95 ± 8% ($p = 0.0002$) increase in $FL1_{ROS}$ (Figure 42). The ϕ'_M and $FL1_{Lipids}$ decreased significantly by 29 ± 1.2% ($p = 0.0002$) and 37 ± 2.6% ($p = 0.0003$), respectively.

While the increase in T_D was more than two-fold lower for M(D5+I0.1) (150 ± 8.9%, $p = 0.0003$) and four-fold lower for M(D1+I0.5) (81 ± 2.2%, $p = 0.008$), the effects on $FL1_{Lipids}$ remained at the same level as for M(D5+I0.5) (around -35%, $p = 0.0003$ for both) (Figure 42). The toxicity gradient was also observed in ϕ'_M with a 23 ± 0.6% ($p = 0.0002$) decrease for M(D5+I0.1) and a 15 ± 0.5% ($p = 0.0002$) decrease for M(D1+I0.5), which was half the decrease observed for M(D5+I0.5). $FL1_{ROS}$ also showed the same toxicity

gradient between mixtures, with 79 ± 5.8% (p = 0.0002) and 66 ± 4.4% (p = 0.0003) increases for M(D5+I0.1) and M(D1+I0.5), respectively.

Finally, the least toxic mixture, M(D1+I0.1), was only responsible for a slight but significant decrease in $FL1_{Lipids}$ (Figure 42).

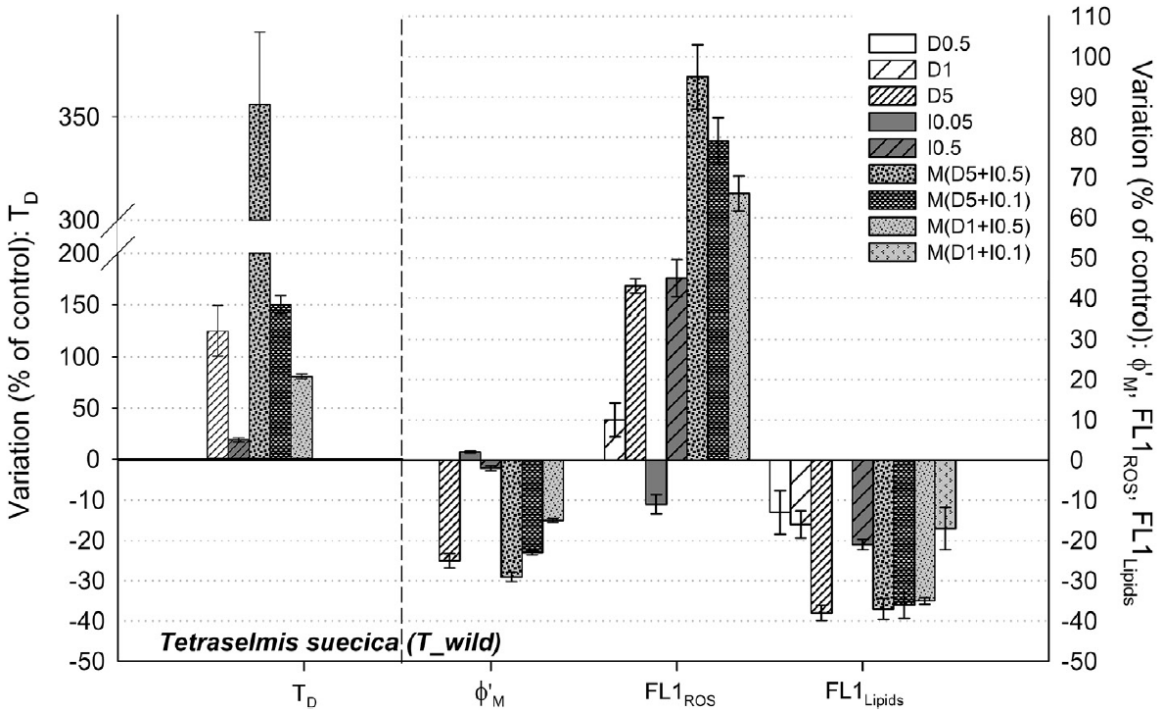


Figure 42 : Percentage variation of exposed samples of *T. suecica* (*T_wild*) compared with the control treatment without solvent (C) for: doubling time (T_D), photosynthetic efficiency (Φ'_M), relative ROS content ($FL1_{ROS}$) and relative lipid content ($FL1_{LIPIDS}$); after exposure to diuron (D) and irgarol (I), alone and in mixtures (means ± SE). Only significant effects are shown (ANOVA, $p < 0.05$).

2.3.2.2. Diuron-resistant strain

2.3.2.2.1. D1 protein mRNA sequencing

The sequence alignment in the resistant strain revealed a mutation from G to A in the quinone binding domain (amplified with primer pair B) at position 661 of the CDS (Figure 43A). This mutation corresponded to a change in the codons from GTA to ATA, leading to a switch in the amino acid sequence from Valine (V) to Isoleucine (I) at position 221 of the protein (Figure 43B). No other mutations were observed in the sequenced samples.

2.3.2.2.2. Toxicity of single herbicides

Diuron exposure did not show any significant effect on the mutant strain at the three concentrations tested (Table 13), except a slight decrease of ϕ'_M at 5 µg.L^{-1} (Figure 44).

Irgarol exposure induced significant effects on the mutant strain, in particular at the highest concentration tested (0.5 µg.L^{-1}): T_D and $FL1_{ROS}$ increased significantly (+19 ± 3.4% for T_D, $p = 0.0002$), whereas ϕ'_M and $FL1_{Lipids}$ decreased significantly (Figure 44). A slight but significant decrease of ϕ'_M was obtained with the lowest concentration of irgarol (0.05 µg.L^{-1}).

A

```
DQ173249 cds  603   AGGTGTTGCTGGTGTATTTGGTGGTTCATTATTCTCAGCTATGCACGGTTCATTAGTAAC  662
T_wild        57    ..........................................................  116
T_wild        52    ..........................................................  111
T_wild        59    ..........................................................  118
T_wild        120   ..........................................................  179
T_wild        120   ..........................................................  179
T_wild        79    ..........................................................  138
T_mutant      57    ..........................................................  116
T_mutant      55    ..........................................................  114
T_mutant      64    ..........................................................  123
T_mutant      119   ..........................................................  178
T_mutant      120   ..........................................................  179
T_mutant      120   ..........................................................  179
```

B

```
DQ173249 cds  186  VFQAEHNILMHPFHMLGVAGVFGGSLFSAMHGSLVTSSLIRETTENESANAGYKFGQEEE  245
T_wild        3    ..........-...................................................  61
T_wild        25   ..........................................................  84
T_wild        1    ..........---...................................................  57
T_wild        25   ..........................................................  84
T_wild        3    ..........................................................  62
T_wild        11   ..........................................................  70
T_mutant      2    ..............................I...........................  61
T_mutant      24   ..............................I...........................  83
T_mutant      2    ..............................I...........................  61
T_mutant      25   ..............................I...........................  84
T_mutant      3    ..............................I...........................  62
T_mutant      25   ..............................I...........................  84
```

Figure 43 : Sequence alignments of the mRNA coding for the D1 protein in *T. suecica* wild and diuron-resistant strains. A: nucleotide sequences; B: translated protein sequences. Dots represent identities, dashes represent unidentified amino acids.

2.3.2.2.3. Toxicity of herbicide mixtures

The four mixtures tested did not impact the mutant strain in the same way. On the one hand, M(D5+I0.5) and M(D1+I0.5) significantly affected all parameters tested (Table 13). M(D5+I0.5) was the most toxic mixture, which induced an increase of T_D and $FL1_{ROS}$ by 66 ± 6.7% ($p = 0.0002$) and 70 ± 7.9% ($p = 0.0002$), respectively, while ϕ'_M and $FL1_{Lipids}$ decreased (Figure 44). In comparison, M(D1+I0.5) exposure resulted in lower toxicity, with an increase in T_D by 28 ± 2.8% ($p = 0.0002$). $FL1_{ROS}$ and ϕ'_M also indicated lower effects of M(D1+I0.5).

On the other hand, the two other mixtures did not cause strong deleterious effects on this strain, as the only significant effect was a slightly lower photosynthetic efficiency with M(D5+I0.1) and M(D1+I0.1) (Figure 44). No significant effect was detected on growth, $FL1_{ROS}$ or $FL1_{Lipids}$ (Table 13) with these two mixtures.

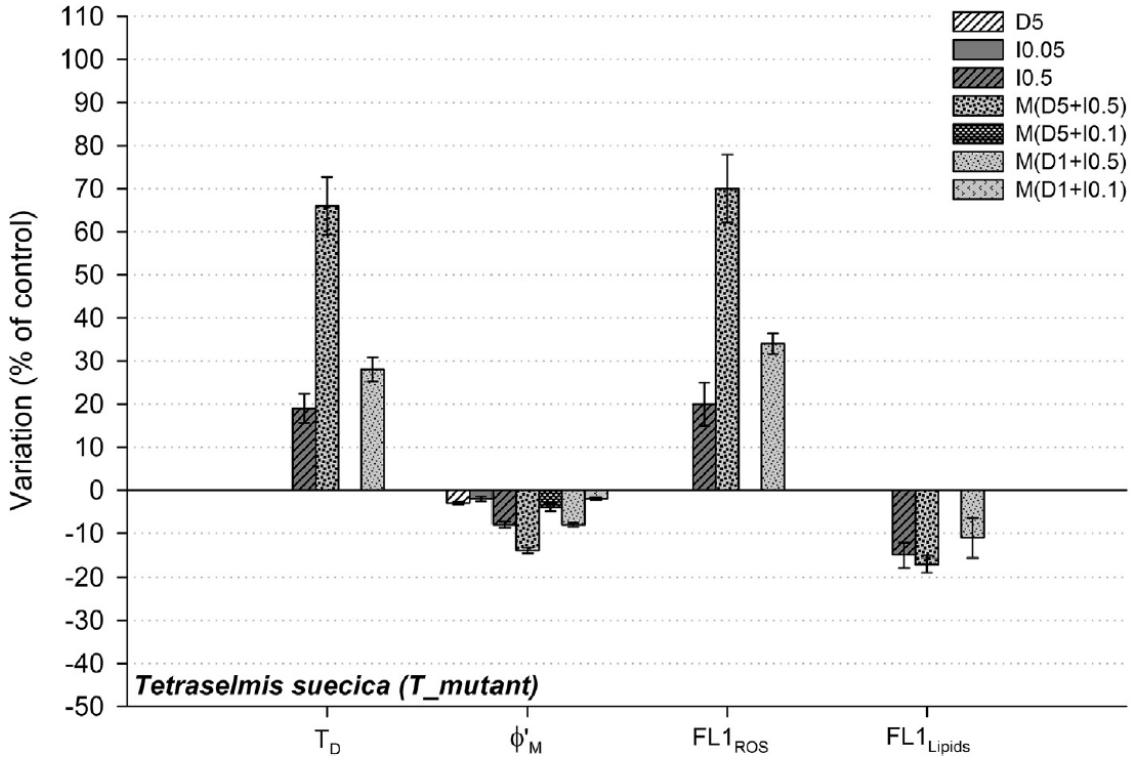


Figure 44 : Percentage variation of exposed samples of *T. suecica (T_mutant)* compared with the control treatment without solvent (C) for: doubling time (T_D), photosynthetic efficiency (Φ'_M), relative ROS content ($FL1_{ROS}$) and relative lipid content ($FL1_{LIPIDS}$); after exposure to diuron (D) and irgarol (I), alone and in mixtures (means ± SE). Only significant effects are shown (ANOVA, $p < 0.05$).

2.4. Discussion

2.4.1. Herbicide toxicity towards the two wild strains

The two microalga species were not affected in the same way by the exposure to the herbicides. *Chaetoceros calcitrans*, when exposed to irgarol 0.5 µg.L^{-1}, showed an increase in T_D that was 2.5-fold higher than that for *Tetraselmis suecica*, highlighting a higher sensitivity of the diatom to irgarol. This increase corresponded to a 144 h growth rate inhibition of 34.3 ± 1.3% for *C. calcitrans* and 16.1 ± 1.4% for *T. suecica* (data not shown), showing that for both species, 144 h EC_{50} would be higher than 0.5 µg.L^{-1}. Exposure to diuron 5 µg.L^{-1} resulted in a six-fold higher increase in T_D for *T. suecica* compared with the diatom, corresponding to 144 h growth rate inhibition of 17.5 ± 1.6% for *C. calcitrans* and 54.5 ± 4.8% for *T. suecica*, the latter being close to the EC_{50}. In comparison, EC_{50} based on 72 h growth rate for *Navicula sp* and *N. pyriformis* exposed to diuron were 7.8 and 8 µg.L^{-1} (Magnusson *et al.*, 2008). Buma *et al.* (2009) determined irgarol EC_{50} (based on 72 h growth rate) from 0.46 ± 0.09 to 2.44 ± 0.68 µg.L^{-1} for four marine microalga species. Devilla *et al.* (2005) reported 72 h EC_{50} of 0.25 µg.L^{-1} irgarol and 2.26 µg.L^{-1} diuron on the growth of the microalga *Emiliania huxleyi*, while 96 h EC_{50} of 0.57 µg.L^{-1} irgarol and 5.9 µg.L^{-1} diuron

were measured on the growth of the diatom *Skeletonema costatum* (Bao *et al.*, 2011). Our results are thus in agreement with the data available in the literature.

Diuron and irgarol both target photosystem II on which microalgae rely for photosynthesis to produce their organic matter and to divide. Photosynthesis inhibition consequently induces growth inhibition, as shown by these results. Furthermore, other side effects occur due to the action of such molecules on photosystem II. Harmful free radicals such as hydrogen peroxide are produced when the photochemical pathway is blocked (Fuerst & Norman, 1991, Oettmeier, 1992) as it could be by PSII inhibitors. The two molecules tested in the present study were thus particularly expected to induce oxidative stress in the exposed cells. When looking at ROS intracellular levels expressed by $FL1_{ROS}$ for each wild strain, the response induced on $FL1_{ROS}$ by either diuron or irgarol at the highest concentration (5 $\mu g.L^{-1}$ and 0.5 $\mu g.L^{-1}$, respectively) was in the same range: a decrease of about 60% for the diatom and an increase of about 40% for the chlorophyte. Unlike *T. suecica*, in which $FL1_{ROS}$ was enhanced, indicating an increase of intracellular reactive oxygen species content, the significant decrease of about 60% observed in $FL1_{ROS}$ for the diatom indicates a decrease of intracellular ROS content. Preliminary experiments made it possible to validate the use of H_2DCFDA with this species, using hydrogen peroxide (1 mM and 100 µM) as a positive control, and showing an increase in $FL1_{ROS}$ (data not shown). Diatoms possess an effective antioxidant system against photo-inhibition and photo-oxidation: it has been demonstrated that fucoxanthin, which is a major carotenoid pigment in diatoms (Pennington *et al.*, 1988), has a very effective ROS scavenging activity (Sachindra *et al.*, 2007, Xia *et al.*, 2013). As a consequence, the decrease of ROS content observed with *C. calcitrans* in the present study could be due to the high ROS scavenging activity of fucoxanthin. Another hypothesis, which could be related to the last, is that the biocides trigger a ROS scavenging system involving enzymes such as SOD and CAT through their inhibition of photosynthesis. Thus, it would be interesting to quantify the fucoxanthin within diatom cells and measure enzymatic activities of SOD and CAT to test these hypotheses.

When herbicide exposure inhibits photosynthesis, ATP production is compromised, impairing biochemical pathways such as lipid synthesis. $BODIPY^{505/515}$ was used to measure the relative lipid content in microalgal cells. $BODIPY^{505/515}$ stains neutral lipids, which correspond to oil droplets that accumulate inside cells over time (Hu *et al.*, 2008). *T. suecica* was affected at all diuron concentrations tested, even the lowest (0.5 $\mu g.L^{-1}$ diuron). For *C. calcitrans*, $FL1_{Lipids}$ decrease was two-fold greater than for the cholorophyte at the highest concentration (5 $\mu g.L^{-1}$ diuron), but no significant effects were observed at lower concentrations. These results indicate that diuron induced greater effects than irgarol on relative lipid content in both strains. It could be interesting to make further studies on this lipid decrease, to determine and quantify which lipid classes are impacted. This would provide information about the effects of such herbicides on the nutritive quality of these species, since they are commonly used in aquaculture.

Considering growth as the most integrative parameter, *C. calcitrans* appeared to be more sensitive to irgarol than *T. suecica*, which had a higher sensitivity to diuron. However, the concentrations used to assess diuron toxicity were ten-fold higher than the concentrations used to test irgarol, thus illustrating how irgarol

has a higher absolute toxicity than diuron, whatever the microalgal species. Several studies already reported higher toxicity of irgarol toward microalgae in comparison with diuron (Devilla *et al.*, 2005, Gatidou & Thomaidis, 2007). The higher toxicity of irgarol seems likely due to its higher affinity for the Q_B niche and a higher toxicokinetic (Chesworth *et al.*, 2004).

Regarding the effects on the coastal water microalgae *T. suecica* and the diatom *P. tricornutum*, Huertas *et al.* (2010) demonstrated that the chlorophyte *T. suecica* was more tolerant of simazine (a triazine) than the diatom. Another study found the triazine atrazine to be more toxic to the chlorophytes than to diatoms (Seguin *et al.*, 2001). From the data available in literature, it is still unclear whether diatoms are more sensitive to triazine than other microalgae, since this sensitivity can vary depending on the herbicide (Suresh Kumar *et al.*, 2014) and the diatom species (Larras *et al.*, 2014). Moreover, following a study from Weiner *et al.* (2004), the sensitivity of microalgae could vary depending on the herbicide uptake, which is itself related to intrinsic properties of the species, like biovolume or surface area.

2.4.2. Toxicity of single herbicides vs. mixtures in the two wild strains

The sensitivity of these species to the mixtures followed the same trend as the single molecules. Although M(D5+I0.5) was the most toxic mixture for both species, the increase in doubling-time was four-fold higher for *T. suecica* than for *C. calcitrans*. When looking at the increase in doubling-time, it appeared that *T_wild* was more sensitive to mixtures containing diuron 5 $\mu g.L^{-1}$. On the contrary, *C. calcitrans* was more affected by mixtures containing irgarol 0.5 $\mu g.L^{-1}$. These results corroborate the effects obtained with the single molecules. Impacts on ϕ'_M were within the same range for both species and revealed a similar level of toxicity than T_D for M(D5+I0.5), M(D5+I0.1) and M(D1+I0.5). The decrease in $FL1_{Lipids}$ was almost two-fold higher for the diatom. An interesting pattern was obtained for $FL1_{Lipids}$ in both species, as the same decrease was caused by the three strongest mixtures (about 60% for the diatom and 35% for the chlorophyte). There might be a threshold beyond which $FL1_{Lipids}$ cannot decrease further, corresponding to the lowest concentration of oil droplets allowed by the cell and/or to the background fluorescence value obtained with $BODIPY^{505/515}$ for each species. As shown by the single-herbicide exposures, $FL1_{ROS}$ results were the opposite between the two species: a threshold was shown in the diatom responses, with the same decrease in $FL1_{ROS}$ for M(D5+I0.5), M(D5+I0.1) and M(D1+I0.5). In contrast, *T. suecica* showed an increasing gradient in the $FL1_{ROS}$ from M(D1+I0.5) (about 66%) to M(D5+I0.5) (almost 100%), thus indicating an enhanced ROS production in the exposed cells, which is consistent with the results observed on T_D and ϕ'_M.

When comparing the toxicity of single herbicides and mixtures, M(D1+I0.5) was significantly more toxic than irgarol 0.5 $\mu g.L^{-1}$ to *T_wild*. The only difference between these two treatments was the addition of 1 $\mu g.L^{-1}$ diuron to M(D1+I0.5), which itself was not harmful to the *T. suecica* wild strain. Finally, when M(D5+I0.5) toxicity was compared with added single-herbicide toxicities, it showed a higher toxicity on T_D than the two biocides together, while the impact on ϕ'_M, $FL1_{ROS}$ and $FL1_{Lipids}$ remained nearly the same

as for single-herbicide exposures. For the diatom *C. calcitrans*, M(D5+I0.5) was as toxic as the added toxicity of the two single biocides on T_D and ϕ'_M.

When looking at the percentage of variation of doubling time in comparison with the control, the effects of M(D5+I0.5) and M(D1+I0.5) were stronger than a simple addition on the chlorophyte: the added effect of D5 ($125 \pm 24.3\%$ increase in T_D) and I0.5 ($19 \pm 2\%$ increase in T_D) should be around 144% increase in doubling time, when M(D5+I0.5) was responsible for a $356 \pm 35\%$ increase. Similarly, the summed effects of D1 (no significant effects on T_D) and I0.5 ($19 \pm 2\%$ increase in T_D) should be around 19%, while M(D1+I0.5) was responsible for a $81 \pm 2.2\%$ increase. These results might thus indicate a possible synergistic interaction between these two herbicides, as already reported elsewhere (Fernandez-Alba *et al.*, 2002, Koutsaftis & Aoyama, 2006). However, the use of a Concentration Addition (CA) model (Loewe & Muischnek, 1926) is required to prove the additive or synergistic interaction between the two biocides.

Considering the set of parameters, the toxicity of mixtures and single herbicides that induced significant effects on these two species can be ranked as follows:

C_wild: M(D5+I0.5) > M(D1+I0.5) ≈ I0.5 > M(D5+I0.1) > D5

T_wild: M(D5+I0.5) > M(D5+I0.1) ≈ D5 ≥ M(D1+I0.5) > I0.5

When mixed together at the highest concentrations tested, these two herbicides show a higher toxicity than the sum of single toxicities for *T. suecica* and it is very likely that other molecules from the same family or with a similar mode of action would further increase the toxicity of such mixtures (Cedergreen, 2014).

2.4.3. PsbA gene mutation: resistance to diuron and comparison with the wild strain

The appearance of species or strains resistant or tolerant to xenobiotics is an increasing problem (López-Rodas *et al.*, 2009, Marvá *et al.*, 2010) and illustrates the selective pressure exerted by pollutants on organisms. For example, in cases of severe pollution in an aquatic environment, the selection pressure exerted will permit the survival of resistant variants among the natural phytoplankton community. However, the surviving community will have a reduced genetic diversity that may not be sufficient to deal with other ecosystem disturbances, such as those expected with climate change for example. In addition, resistance to a pollutant is usually accompanied by diminished primary production (Lardans *et al.*, 1998) that could eventually impair the ecosystem productivity. Some microalga species show resistance to photosynthesis inhibitor herbicides: in the case of PSII inhibitors that specifically bind to D1 protein, the resistance was shown to be due to mutations in the *psbA* gene coding for this protein binding site (Erickson *et al.*, 1989, Erickson *et al.*, 1985, Galloway & Mets, 1984). In the present study, the mutation found in the diuron-resistant strain of *T. suecica* was caused by a single nucleotide modification in the *psbA* sequence, and resulted in a change from V to I, as already reported (Erickson *et al.*, 1985). The additional methyl group in Isoleucine could prevent the binding of diuron to the D1 protein by steric blockage (Wildner Günter *et al.*, 1990). This particular mutation was previously shown to confer a resistance to diuron in

Chlamydomonas reinhardtii (Oettmeier, 1999). Some authors demonstrated that adaptation of microalgae to herbicides might be the result of pre-selective mutations (López-Rodas *et al.*, 2001, Marvá *et al.*, 2010).

In order to assess whether the mutation could affect strain response to another PSII inhibitor, both *T. suecica* strains were exposed to diuron and irgarol. Unlike *T_wild*, which was heavily affected by diuron 5 $\mu g.L^{-1}$ exposure (125% increase in T_D), *T_mutant* was not affected by diuron, regardless of the concentration used. Even though exposure to irgarol 0.5 $\mu g.L^{-1}$ induced an increase of 19% of T_D in both *T_wild* and *T_mutant*, the effects on $FL1_{ROS}$ and $FL1_{Lipids}$ in *T_mutant* were lower compared with *T_wild*. The lower effects on ROS and lipids in *T_mutant* might be a side-effect of the mutation. The triazine irgarol significantly impacted all studied parameters at the highest concentration in the mutant strain, implying that the mutation did not prevent its toxic action, i.e. it did not prevent irgarol from binding to the D1 protein. The two herbicides share the same mode of action, inhibiting electron transfer between Q_A to Q_B by reversely-binding on the Q_B binding site on the D1 protein (Giardi & Pace, 2005, Tischer & Strotmann, 1977). One reason why the mutation prevents diuron but not irgarol from binding to the D1 protein could be that the two molecules do not necessarily have the same toxicological behavior (Borgert *et al.*, 2004, Gramatica *et al.*, 2001) because they come from different chemical families (phenylureas for diuron and triazines for irgarol). Indeed, the two classes of compounds are structurally different, as demonstrated by Gramatica *et al.* (2001), and their binding niches therefore differ slightly (Geissbühler *et al.*, 1975, Ohad *et al.*, 1990).

Recently, tolerance to irgarol in marine periphyton was found to be based not on amino acid substitution, but rather on increased D1 degradation (Eriksson *et al.*, 2009). This latter mechanism seems to be linked to the non-conserved amino acid region (PEST region) involved in regulating D1 protein degradation. In any case, in the present study, this region did not show any differences between the two *T. suecica* strains.

The effects of mixtures were also investigated to further examine the toxicity pattern obtained with the single molecules. As expected, the wild strain was a lot more sensitive to the mixtures M(D5+I0.5) and M(D5+I0.1) than the mutant strain. Regarding the wild strain, M(D5+I0.5) induced an increase in T_D that was nearly six-fold the increase observed in the mutant strain. Although M(D5+I0.1) induced no significant effect on *T_mutant*, it was responsible for a 150% increase of doubling-time in the wild strain. Similar impacts were expected on the mutant strain after irgarol 0.5 $\mu g.L^{-1}$, M(D5+I0.5) and M(D1+I0.5) exposures, because they all contained the same concentration of irgarol. In fact, after M(D5+I0.5) exposure, the increase in T_D of *T_mutant* was three-fold higher than with irgarol 0.5 $\mu g.L^{-1}$ alone. As observed to a higher extent in the wild strain, the strongest mixture resulted in amplified effects in the mutant strain as compared to single molecules. This implies that even if diuron alone was not toxic to the mutant strain, at 5 $\mu g.L^{-1}$ it seemed to somehow increase the toxicity of irgarol 0.5 $\mu g.L^{-1}$. This might be the result of a synergistic effect between these two compounds, but further investigations would be needed to prove this, using a wider range of concentrations in order to apply the CA model. As reviewed by Cedergreen (2014), binary mixtures of PSII inhibitor antifouling agents were mostly responsible for additive or synergistic effects on autotrophic organisms. The present results indicate such synergy also probably occurs with

resistant variants, confirming the existence of some interactions between these compounds that are not limited to the known mode of action. From the mutation revealed by sequencing, it is assumed that diuron cannot bind efficiently to the Q_B niche of the mutant strain. There could be chemical interactions between the two molecules: diuron might facilitate the binding of irgarol with its target. The mechanisms explaining such interactions between these PSII inhibitors remain to be demonstrated (Cedergreen, 2014).

To our knowledge, no other such experiments involving wild and mutant strains exposed to single herbicides and mixtures have yet been performed elsewhere.

On the one hand, the wild strain was obviously more sensitive to the mixtures containing 5 $\mu g.L^{-1}$ diuron: M(D5+I0.5) and M(D5+I0.1). On the other hand, due to its resistance to diuron, the mutant strain was more sensitive to mixtures containing 0.5 $\mu g.L^{-1}$ irgarol. Effects of mixtures and single herbicides can be ranked from the most toxic to the least toxic for the two strains as follows:

T_wild: M(D5+I0.5) > M(D5+I0.1) ≈ D5 ≥ M(D1+I0.5) > I0.5

T_mutant: M(D5+I0.5) > M(D1+I0.5) ≥ I0.5

This study demonstrates the great interest of comparing the responses of sensitive and resistant strains exposed to mixtures, in order to figure out what biochemical interactions could lead to an increased toxicity when substances are mixed, especially for resistant strains.

2.5. Conclusions

Significant effects were induced by exposure of two marine microalgal species to diuron 5 $\mu g.L^{-1}$ and irgarol 0.5 $\mu g.L^{-1}$, showing the higher toxicity of irgarol, which was harmful at a tenth the concentration of diuron. Wild strains of *C. calcitrans* and *T. suecica* did not have the same sensitivity towards the molecules (alone or in mixtures), the first being more sensitive to irgarol 0.5 $\mu g.L^{-1}$ and the second being more sensitive to diuron 5 $\mu g.L^{-1}$.

The mutation identified as a single nucleotide change in the *psbA* sequence of a *T. suecica* strain that was resistant to diuron was effective against diuron alone, but failed to confer resistance against irgarol exposure. Thus, unlike the wild strain, the mutant strain was more sensitive to irgarol. In addition, the exposure of the mutant strain to the mixture containing irgarol 0.5 $\mu g.L^{-1}$ and diuron 5 $\mu g.L^{-1}$, induced stronger effects on growth than irgarol alone. This study, involving a comparison between a wild and a mutant strain of the species *T. suecica* exposed to two PSII inhibitors, highlighted the fact that: i) a particular mutation was not effective to induce resistance to two molecules from different chemical families; ii) a mutant strain, despite its resistance to one of the molecules tested, could also be subjected to probable additive/synergistic effects; iii) biochemical interactions took place inside the cells between the two molecules, which were, at least for diuron, not directly linked to its binding to Q_B niche.

This study provides new insights into understanding how pollution in aquatic environment can affect unicellular primary producers, by comparing effects of single-herbicide and mixture exposure towards different species, including a mutant strain resistant to diuron. In addition to the identification of the mutation, further investigations on exposure of this mutant strain to pollutants (gene expression and,

epigenetic mechanisms) would help us to improve understanding of the mechanisms of microalgal adaptation to chronic contamination.

Acknowledgements

This study was carried out with financial support from the French National Research Agency (ANR) as part of the Investments for the Future program, within the Cluster of Excellence COTE (ANR-10-LABX-45). We also want to thank Julien Rouxel for his technical assistance and Hansy Haberkorn for his helpful discussions and suggestions during preparation of the manuscript. We thank Helen McCombie for the English correction. We also thank four anonymous reviewers for their comments, which helped us to improve the quality of this manuscript.

3. Synthèse

Pour les substances testées seules, les résultats ont montré une inhibition de la croissance, de l'efficacité photosynthétique et une diminution du contenu lipidique avec les concentrations maximales des deux molécules pour *C. calcitrans* : +20% pour le temps de division avec le diuron à 5 $\mu g.L^{-1}$ contre +50% pour l'irgarol dix fois moins concentré. *T. suecica* était beaucoup plus sensible au diuron que *C. calcitrans* puisque le temps de division a été largement augmenté à la concentration maximale de diuron (+125%). Cependant, pour les deux espèces à concentration d'exposition égale, l'irgarol a été nettement plus toxique que le diuron (+19% pour le temps de division de *T. suecica*).

Les résultats des mélanges ont montré pour *C. calcitrans* une diminution de l'ordre de 40% du contenu lipidique avec le mélange M4, alors que les molécules seules n'ont eu aucun effet. Les effets observés sur la croissance et notamment avec le mélange M1 semblent correspondre à des effets de type additifs. Pour *T. suecica*, les mélanges M1 et M3 ont montré des impacts largement plus toxiques que les molécules seules. Par exemple, le temps de division a été augmenté d'environ 350% (mélange M1) contre 125% pour le diuron et +19% l'irgarol pris seuls.

Les résultats de cette étude ont donc permis de montrer i) une toxicité accrue de l'irgarol par rapport au diuron) concentration équivalente, conformément aux informations disponibles dans la littérature, et ii) que les mélanges (M1 et M4) provoquaient des effets toxiques plus importants que les molécules seules, conditionnant le choix du type de mélange à utiliser pour les expérimentations avec MOD.

D'autre part ces résultats ont également permis (i) d'apporter des informations de base sur la toxicité des molécules choisies (notamment en mélange) et la sensibilité des deux espèces marines considérées et (ii) de déterminer, en complément de l'étude préliminaire n°1, les concentrations d'exposition (choisies pour être environnementales) pour la suite des expérimentations présentées dans les chapitres suivants du manuscrit.

Chapitre 5 – Interactions entre les microalgues et la matière organique dissoute naturelle

1. Introduction

La matière organique dissoute représente une composante majoritaire de l'environnement aquatique. Il a été démontré qu'elle pouvait influencer la croissance des microalgues, via son impact sur la pénétration de la lumière dans la colonne d'eau : diminution du développement des microalgues benthiques et planctoniques (Karlsson *et al.*, 2009) et protection vis-à-vis des rayonnements UV (Tedetti & Sempéré, 2006).

La MOD peut également affecter les microalgues via la consommation des molécules qui la composent, directement ou indirectement par le biais des bactéries. Dans l'environnement aquatique, les bactéries qui consomment des molécules de faible poids moléculaires, transforment la matière polymérisée en petites molécules labiles via l'excrétion d'enzymes extracellulaires (Nagata, 2008). Cette libération d'hydrolases permet également de rendre disponibles des molécules organiques de type vitamines (B12, B1 ou B7) pour les espèces de microalgues incapables de les synthétiser (Croft *et al.*, 2005, Croft *et al.*, 2006, Droop, 2007). D'autres études réalisées en cultures non axéniques ont également montré que des substances organiques comme l'acétate, le glucose ou le glycérol pouvaient stimuler la croissance de certaines espèces de microalgues (EL-Sheekh *et al.*, 2012, Liu *et al.*, 2009, Sharma *et al.*, 2016). Or, ces substances sont des molécules constitutives de la MOD naturelle (Findlay & Sinsabaugh, 2003). Ainsi, il paraît indispensable d'investiguer l'influence que peut avoir la MOD naturelle sur les microalgues.

D'autre part, il est admis que les microalgues jouent un rôle prépondérant dans la production de MOD par leur sécrétion, leur excrétion et leur décomposition par les bactéries dans l'environnement aquatique (Bertilsson & Jones, 2003), et que cette production est fonction du stade physiologique (Leloup *et al.*, 2013). Or, aucune étude n'a visé à évaluer dans quelle mesure les microalgues peuvent influencer les changements de composition et de concentration de la MOD naturelle.

Ce chapitre s'attache donc à appréhender les interactions possibles entre la MOD et quatre espèces de microalgues avec leurs bactéries associées (cultures non axéniques). Pour ce faire, deux espèces de microalgues d'eau douce et deux espèces de microalgues marines ont été exposées en conditions contrôlées de laboratoire à de la MOD extraite de l'environnement. La mesure de paramètres physiologiques (croissance, efficacité photosynthétique et quantité relative en lipides) a été couplée à la caractérisation de l'environnement biologique (mesure des concentrations bactériennes) et chimique, via des mesures des concentrations en sels nutritifs, en carbone organique dissous et des analyses d'absorbance UV-Visible et de fluorescence.

Ce chapitre est présenté sous la forme d'une publication qui sera prochainement soumis.

2. Article 3: Interactions between microalgae and natural dissolved organic matter

Nathalie Coquillé[1,2,3,4], Mélissa Éon[1], Dominique Ménard[2], Soizic Morin[1], Sabine Stachowski-Haberkorn[2], Édith Parlanti[3,4]

[1] Irstea, UR EABX, Centre de Bordeaux, 50 avenue de Verdun, F-33612 Cestas cedex, France

[2] Ifremer, Laboratoire d'Écotoxicologie, rue de l'île d'Yeu, BP 21105, F-44311 Nantes cedex 03, France

[3] Univ. Bordeaux, UMR 5805 CNRS, EPOC, LPTC, 351 Cours de la Libération, CS 10004, F-33405 Talence Cedex, France

[4] CNRS, UMR 5805, EPOC, LPTC, 351 Cours de la Libération, CS 10004, F-33405 Talence Cedex, France

En préparation

Abstract

Dissolved organic matter (DOM) is a complex and heterogeneous mixture of organic molecules (size <0.45 µm). For the first time, the influence of natural DOM on non-axenic microalgal cultures was studied, using DOM collected from freshwater and marine environments. The effects were assessed on growth, photosynthetic efficiency and intracellular lipid content of four species (*Sphaerellopsis* sp., *Gomphonema gracile, Chaetoceros calcitrans* and *Tetraselmis suecica*). The cellular density of bacteria naturally inhabiting the cultures was also assessed at the end of exposure. Microalgae growth was significantly enhanced by the addition of DOM, with gradual responses, from outstanding to slight stimulations depending on the species: +30,000% for *Sphaerellopsis* sp., +104% for *G. gracile*, +80% for *C. calcitrans* and +14% for *T. suecica*, respectively. No difference between conditions was observed on bacteria concentration for *T. suecica* and *G. gracile*, contrarily to the two other species, where an increase of bacteria concentrations in cultures with DOM was observed, related to microalgae growth. Nonetheless, the bacteria per microalga ratio was not different for *C. calcitrans* (equal to 1) and decreased for *Sphaerellopsis* sp. (160 without DOM vs. 3 with DOM). At the same time, the relative lipid content decreased in the condition with DOM for *Sphaerellopsis* sp. and *C. calcitrans*, but not for *G. gracile* and *T. suecica*. The characterization of chemical environment showed a decrease of the average molecular weight and aromaticity of DOM for all species. The results also showed (i) a decrease of DOM humic-like substances in the culture containing *Sphaerellopsis* sp. and its associated bacteria, (ii) an increase of all chromophores for both marine species and (iii) a decrease of all chromophores for *G. gracile*. On the other hand, the dissolved organic carbon concentrations and the DOM optical indices studied also showed that microalgae, in presence of their associated bacteria, by their metabolic excretion and consumption (directly or indirectly), drastically changed the characteristics of DOM (concentration and composition) originating from marine and freshwater environments. This study proved that (i) natural DOM addition can induce a stimulation of photoautotrophic organisms, directly or indirectly via associated bacteria initially inhabiting the cultures and that (ii) microalgae, together with their associated bacteria, can actively contribute to DOM changes in the environment.

Keywords

Microalgae; Dissolved organic matter; DOM; Freshwater; Marine water; Production; Transformation

2.1. Introduction

Dissolved organic matter (DOM) is a complex and heterogeneous mixture of organic molecules passed through a 0.45 µm filter. DOM results from: environmental processes (drainage, erosion or runoff), biological processes (decomposition of terrestrial and/or aquatic organisms, their excretions, secretions, transformation of these molecules into new organic molecules by microorganisms and their free enzymes (Saunders 1957)) or physicochemical processes (e.g. photodegradation).

DOM is thus a mixture of aromatic and aliphatic hydrocarbon structures that have attached functional groups (*e.g.* amide, carboxyl, hydroxyl, ketone), of autochthonous origin, derived from in situ photosynthetic activity and processed microbially, and allochthonous inputs that are rich in humic substances and largely derived from terrestrial environments (Blough & Del Vecchio, 2002, Ogawa & Tanoue, 2003). Properties and concentrations of DOM vary greatly with seasons and among locations (Canuel & Hardison, 2016, Steinberg *et al.*, 2006). DOM contains a wide range of molecules varying in size, molecular weight and functionality, making them difficult to characterize using traditional chemical techniques. Their composition and reactivity in aquatic ecosystems thus still remain poorly understood. However, optical techniques, including UV-Visible spectrometry and fluorescence excitation-emission matrix (EEM) spectroscopy, have been largely used to identify DOM sources, dynamics and chemical nature (Canuel & Hardison, 2016, Fellman *et al.*, 2010, Helms *et al.*, 2008, Hudson *et al.*, 2007, Jaffé *et al.*, 2008, Stedmon *et al.*, 2011).

DOM has been classified in the literature in different categories defined operationally on the basis of their properties: (i) “non-humic” and “humic (humic and fulvic acids)” substances by fractionating with XAD-8 resin (Thurman & Malcolm, 1981); (ii) “hydrophobic”, “transphilic”, “hydrophilic”, “acidic”, “basic”, and “neutral” categories based on polarity and isolated with two serial resin (XAD-8 and XAD-4) columns (Leenheer & Croué, 2003); (iii) according to biological availability, *e.g.* labile, semi-labile and recalcitrant DOM (Minor *et al.*, 2014); (iv) size classes (Benner & Amon, 2015); (v) optical properties (Coble, 2007).

DOM plays a key role in aquatic biogeochemical and ecological processes (Ahlgren & Merino, 1991, Downing *et al.*, 2009). It influences the penetration of light in the water column, the transport and bioavailability of pollutants as metals or pesticides (Downing *et al.*, 2009, Hansen *et al.*, 2016). In addition, it is established that DOM supports aquatic food webs (McMeans *et al.*, 2015, Taipale *et al.*, 2016). For example, in the ocean, it is the main mediator of energy flux from autotrophic organisms like microalgae to microbial-type heterotrophic organisms (Dittmar & Stubbins, 2014).

Microalgae, as primary producers, are the basis of aquatic food webs (Wetzel, 2001). Karlsson *et al.* (2009) showed that, in the environment, microalgae can be negatively affected by high turbidity and/or a high concentration of colored DOM. Conversely, these compounds can play a protective role against UV-radiations (see Tedetti & Sempéré, 2006's review). DOM also affects positively microalgae through its consumption, directly or via bacteria intervention and more specifically their extracellular enzymes. Indeed, in natural environment as well as controlled laboratory conditions, bacteria participate in the bioavailability of various compounds such as vitamins (necessary for the development of microalgae), that some species are

unable to synthesize (Croft *et al.*, 2005, Croft *et al.*, 2006). Windler *et al.* (2014) also showed the crucial importance of the bacteria presence in cultures of three freshwater diatoms (*Achnanthidium minutissimum*, *Cymbella affiniformis* and *Nitzschia palea*) for the development of cellular size and their morphology (morphological aberrations of frustule microstructures, simplification and deformation of frustule). Under controlled conditions, Liu *et al.* (2009) also showed a growth increase of the diatom *Phaeodactylum tricornutum* in non-axenic cultures with the addition of diverse organic compounds such as glucose or acetate. Campbell *et al.* (1997) and Millour (2011) also demonstrated the microalgae ability to adsorb humic substances, using the freshwater chlorophyte *Chlorella pyrenoidosa*, the marine haptophyte *Isochrysis galbana* and the ochrophyte *Nannochloropsis oculata*, in axenic environment. However, to our knowledge, no study has explored the influence of natural DOM complex mixture on microalgae.

On the other hand, as microalgae are involved in DOM production, metabolism or cell death also lead to changes in DOM characteristics. Indeed, in natural aquatic environments, DOM is enriched with autochthonously-produced organic components during phytoplankton blooms, due to the formation and degradation of dissolved organic carbon by microalgae (Meon & Kirchman, 2001). Under controlled conditions, microalgae naturally excrete compounds (such as carbohydrates, lipids), nature of which depends on the phase of the cellular cycle and on the species considered (Henderson *et al.*, 2008, Leloup *et al.*, 2013). These secretions (namely algal organic matter, AOM) and in particular the cellular decomposition by bacteria, strongly participate to DOM formation in the aquatic environment (Bertilsson & Jones, 2003). However, no study has until now measured the general impact of freshwater and marine microalgae with their associated bacteria (which modify the AOM through their consumption and their own secretions ; Romera-Castillo *et al.*, 2011) on the changes of composition and concentration of natural aquatic DOM. Therefore, this study aimed:

– to investigate the influence of natural DOM on four species of microalgae in non-axenic conditions;

– to evaluate to what extent the microorganisms (microalgae and their associated bacteria) induce quantitative and qualitative changes in the natural DOM studied.

To answer these questions, four non-axenic microalgae species (two freshwater and two marine species) were exposed to natural DOM extracted from riverine and marine waters. The influence of DOM was evaluated on the growth of microalgae and on two physiological parameters (photosynthetic efficiency and relative lipid content). On the other hand, the bacteria concentration and chemical environment (nutrient concentration, dissolved organic carbon concentration (DOC) and DOM optical properties) were also characterized over the experiments.

2.2. Materials and methods

2.2.1. Sampling and concentration of natural DOM

In order to concentrate DOM, 97 and 91 L of natural water samples were collected (pumped) during spring 2015 in Rebec stream (small tributary of Leyre River 44°35'16.962"N - 0°56'2.239"O) for freshwater and in Arcachon Bay at site Grand Banc for marine water (44°39'59.898"N - 1°12'45.88"O), respectively (Figure

45). The Leyre River is the main tributary of the Arcachon Bay (South West of France), with a mean discharge about 20 $m^3.s^{-1}$, representing 77% of the freshwater inputs into the bay. The marine water was collected at 1.50 m depth at high tide to avoid influence of freshwater inputs.

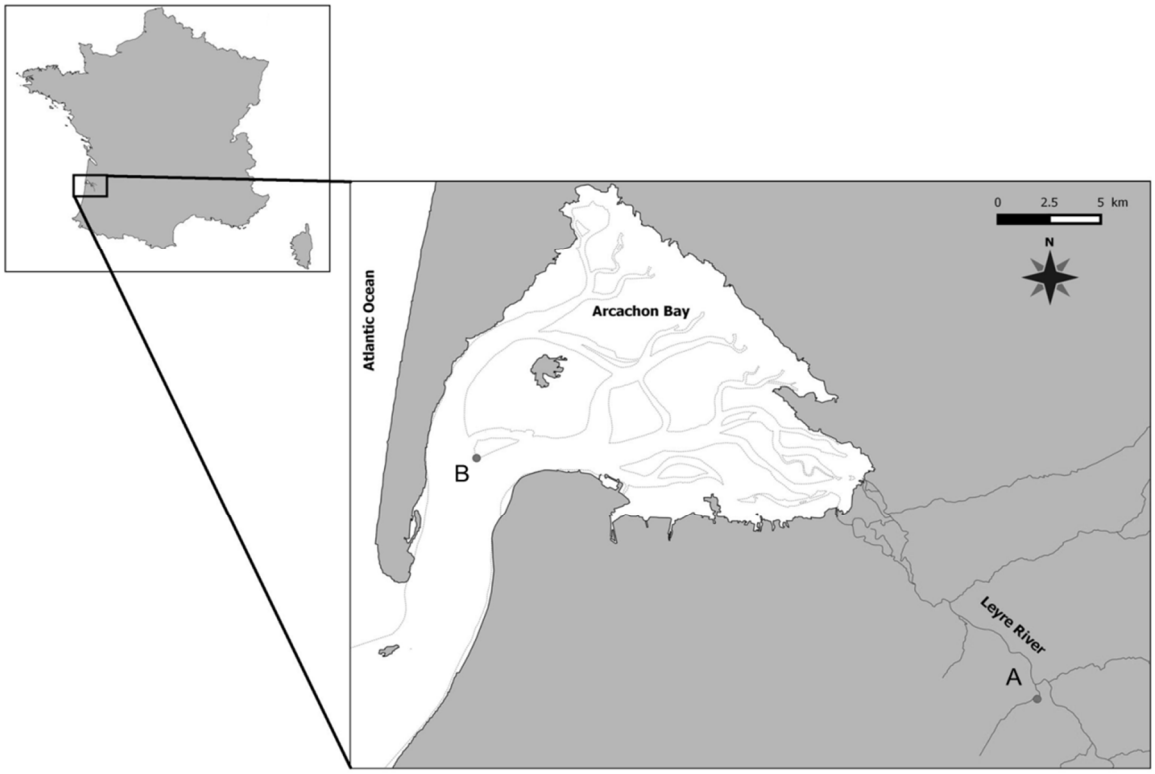


Figure 45: Location of water sampling sites in the Rebec stream (Leyre River - A) and in Arcachon Bay at Grand Banc (B).

Water samples were filtered, immediately after returning to the laboratory, through 0.45 µm Teflon filter cartridges (Whatman, Polycap™ 75TF) to remove particulate organic matter. All filters were pre-cleaned with methanol (Ultra Gradient HPLC, JT. Baker) (0.4 L) then rinsed firstly with 5 L of ultrapure water (Millipore, Milli-Q) and secondly with sample water (1 L). In order to obtain the concentrated DOM, 96 L of 0.45 µm filtered freshwater were concentrated ten times by reverse osmosis (RO; TIA pilot equipped with a FILMTEC™ SW30 - 2540 membrane) until a final volume of 9.6 L. For marine DOM, 90 L of 0.45 µm filtered marine water were first desalted by electrodialysis (ED; EURODIA Aqualyzer pilot EUR2B-10P equipped with Neosepta AMX/CMX membranes from Tokuyama Corporation (Japan)). The desalted water was then concentrated by reverse osmosis about ten times until a final volume of 9.5 L and finally desalted again to reach a salinity of 33 (corresponding to the salinity of f/2 culture medium used to grow marine microalgae). The sample temperature was controlled during the steps of both concentration (RO) and desalination (ED), in order to minimize any loss of molecules and possible modifications of DOM. The maximum temperatures reached during the RO and ED proceedings did not exceed 14°C for the freshwater sample and 24°C for the marine water sample. Moreover, DOM quality was checked by excitation-emission-matrix (EEM) fluorescence spectroscopy before and after concentration and desalination (Figure 46). Only

slight differences of spectra were observed, pointing out that no selective loss nor modification of fluorescent organic compounds occurred during RO/ED proceedings. The concentrated and desalted final samples were thus representative of the original ones. More details on the protocols and on the RO and ED systems used can be found in Huguet (2007) and Huguet *et al.* (2009a).

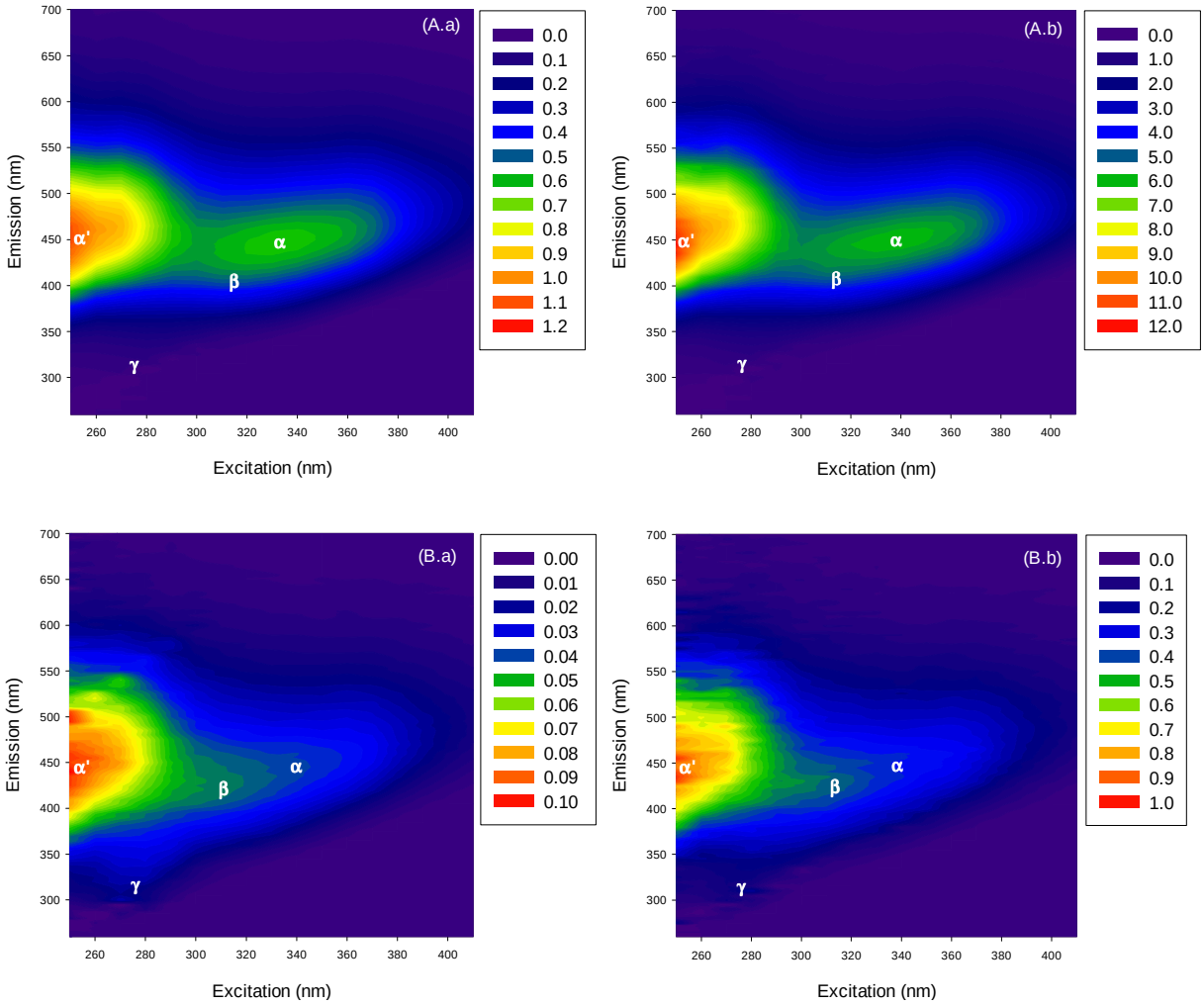


Figure 46: Excitation-emission matrix (EEM) spectra of freshwater (A) and marine (B) DOM before (a) and after (b) concentration and desalination. Note that there is a factor of 10 in scale between EEM spectra before and after concentration (fluorescence intensity in Raman unit).

2.2.2. Microalgal cultures

The freshwater species, *Gomphonema gracile* (Bacillariophyta) and *Sphaerellopsis* sp. (Chlorophyta), were isolated from a natural biofilm sample collected in December 2013 in the Rebec stream, at the same place than DOM sampling (Figure 45). The two species were first isolated separately following micromanipulation under the inverted microscope and then cultured in sterile Dauta medium (Dauta, 1982) at 17°C in a thermostatic chamber 610 XAP (LMS LTD®, UK) at 67 ± 0 µmol.m^{-2}.s^{-1} with a dark:light cycle of 8:16 h. Cultures were non axenic.

Non axenic cultures of the marine microalgae *Tetraselmis suecica* (CCMP 904, Chlorophyta) and *Chaetoceros calcitrans* (CCMP 1315, Bacillariophya) were previously obtained from the Provasoli–Guillard National Center for Marine Algae and Microbiota (NCMA). Microalgal cultures were maintained in sterile f/2 (for *T. suecica*) and f/2-silica medium (for *C. calcitrans*) (Guillard, 1975, Guillard & Ryther, 1962) at 17°C, in a thermostatic chamber ST5+ (POL-EKO-Aparatura®, Poland) at 17°C, in a thermostatic chamber ST5+ (POL-EKO-Aparatura®, Poland) at 106 ± 0 µmol.m^{-2}.s^{-1} with a dark:light cycle of 8:16 h.

All cultures were grown in 100-mL round borosilicate sterile glass flasks previously heated to 450°C for 6 h and autoclaved 20 min at 121°C. For the experiments, cultures (60 mL volume) were inoculated using stock cultures in exponential growth phase. At the beginning of experiments, cultures were inoculated at 2,000 cell.mL^{-1} for the freshwater species and 20,000 cell.mL^{-1} for the marine species, respectively. These inoculation concentrations were chosen based on growth kinetics of each species in its culture medium determined during previous experiments.

2.2.3. Experimental design

Experiment durations were set according to the growth kinetics of each species: fourteen days for *Sphaerellopsis* sp., seven days for *G. gracile* and six days for the two marine species. Four independent experiments were run (one per species), each including four treatments: two "biotic" treatments with microalgae and associated bacteria in culture flasks, and two treatments without any microorganism, namely "abiotic" treatments. These were: biotic control treatment (algae and associated bacteria in culture medium, in quadruplicate), biotic exposed treatment (algae and associated bacteria in culture medium + DOM, in quadruplicate), abiotic control treatment (culture medium only, one replicate) and abiotic exposed treatment (culture medium + DOM, in duplicate). In exposed treatments, concentrated DOM, as obtained following the protocols described in section 2.2.1., was added to the flasks to reach a final concentration of twice the initial environmental concentration. This stands in the range of environmental concentrations observed in the studied areas (projets Région Aquitaine OSQUAR et OSQUAR 2) and corresponds to: 2.2 mgC.L^{-1} for marine species (initial DOC concentration of 1.1 mgC.L^{-1} in the marine water sample) and 12.9 mgC.L^{-1} for freshwater species (initial DOC concentration of 6.5 mgC.L^{-1} in the freshwater sample). To avoid any bias due to DOM addition, nutrient concentrations (nitrates, phosphates, silica, vitamins and trace elements) were adjusted in the culture media to obtain the same final concentrations in all treatments (with or without DOM addition). Freshwater species were exposed to natural DOM isolated from Rebec, when marine species were exposed to natural DOM isolated from Grand Banc.

During each experiment, samples were taken for biological and chemical measurements. The biological parameters monitored were: cell density of microalgae (measured throughout the experiments), photosystem II effective quantum yield (measured on the last day), relative intracellular lipid content (measured on the last day) and bacterial concentration (measured on the last day). The chemical parameters monitored were: nutrient concentrations, dissolved organic carbon (DOC) concentrations and DOM optical properties. They were measured on the first and last days of each experiment as described in the following sections.

2.2.4. Biological parameters

2.2.4.1. Measurements by flow cytometry

Culture samples were analyzed on an Accuri C6 flow cytometer (Becton Dickinson Accuri™) equipped with a blue (488 nm) and a red (640 nm) laser. Preliminary tests allowed to select the optimal staining duration and concentration for each fluorescent dye and species.

2.2.4.1.1. Microalgal cell density and doubling time

For cell density measurements, 300 µL were sampled from all the cultures and fixed using glutaraldehyde (final concentration 0.25%; Fisher Scientific). Tubes were mixed and left for 15 minutes at room temperature in the dark before analysis for marine species or frozen (-80°C) until analysis for freshwater species. Counts were performed on a FL1 (green fluorescence, 530/30 nm) versus FL4 (red fluorescence, 675/25 nm) cytogram for *G. gracile* and *T. suecica*, on a FL1 versus FL3 (red fluorescence, >670 nm) cytogram for *Sphaerellopsis* sp. and on a side scatter (SSC) versus FL3 cytogram for *C. calcitrans* (Dupraz *et al.*, 2016).
For each species, the cell density was monitored all along the experiments and the average doubling time (T_D, hours) was calculated based on the whole growth curve using the formula: $T_D = \ln(2)/\mu$, where μ is the growth rate (h^{-1}) corresponding to the slope of regression line from $\ln(cell.mL^{-1})$ vs time (h).

2.2.4.1.2. Relative intracellular lipid content

The relative intracellular lipid content ($FL1_{Lipids}$) was estimated on the last day of experiments by the use of a green lipophilic fluorochrome: 4,4-difluoro-1,3,5,7-tetramethyl-4-bora-3a,4a-diaza-s-indacene ($BODIPY^{505/515}$ Life Technologies®, Carlsbad, CA, USA). This dye is accumulated in the intracellular lipid bodies (which are morphologically diverse) by a diffusion mechanism and subsequent trapping. This dye easily crosses cell and organelle membranes due to its high oil/water partition coefficient (Akimoto & Mimuro, 2007, Cooper *et al.*, 2010). $BODIPY^{505/515}$ can be measured by green fluorescence (FL1, 530/30 nm). The following protocol was adapted from Brennan *et al.* (2012).
Working solutions of $BODIPY^{505/515}$ were prepared from a stock solution at 5,000 $mg.L^{-1}$ in pure dimethylsulfoxide (DMSO; Sigma Aldrich). For each culture, 200 µL samples were stained with a $BODIPY^{505/515}$ working solution at 6 $mg.L^{-1}$ for freshwater species, 3 $mg.L^{-1}$ for *C. calcitrans* and 4.8 $mg.L^{-1}$ for *T. suecica* leading to final $BODIPY^{505/515}$ concentrations of 60 $\mu g.L^{-1}$ for freshwater species (1% DMSO), 75 $\mu g.L^{-1}$ for *C. calcitrans* (2.5% DMSO) and 120 $\mu g.L^{-1}$ for *T. suecica* (2.5% DMSO). Stained samples were incubated at room temperature in the dark during 3 minutes for *G. gracile* and *Sphaerellopsis* sp., 5 minutes for *C. calcitrans* and 6 minutes for *T. suecica* (optimal incubation time for species-dependent staining). FL1 values of microalgal cells (unstained cells and cells stained with BODIPY) were normalized using FL1 values of 2 µm-fluorescent polystyrene microspheres (Flow Check™ High Intensity Alignment Grade Particles 2.00 µm, Polysciences Inc., Warrington, PA, USA), added in all samples. The normalization is resumed with the formula:

$$FL1_{Lipids} = (FL1_{stained\ microalgae} / FL1_{stained\ microsphere})/(FL1_{unstained\ microalgae} / FL1_{unstained\ microsphere})$$

2.2.4.1.3. Bacterial concentration

The bacterial concentration in cultures was estimated on the last day of experiments using the fluorochrome SYBR® Green I (Molecular Probes Inc., Eugene, OR, USA). SYBR® Green I, which intercalates between base pairs, has a strong binding affinity for double-stranded DNA. This fluorescent dye, which is optimally excited at 495 nm, emits green fluorescence only when it is bound and is measured by green fluorescence (FL1, 530/30 nm). Following the protocol of Marie *et al.* (1997), 200 µL samples were stained with a SYBR® Green I working solution (100X diluted in sterile Milli-Q water) prepared from a commercial solution (10,000X in DMSO). Stained samples (1X) were incubated at room temperature in the dark during 15 minutes for all species.

2.2.4.2. Photosystem II effective quantum yield - Photosynthesis

The photosystem II (PSII) effective quantum yield (=operational PSII quantum yield, Φ'_M) was measured on the last day of experiments by Pulse-Amplitude Modulated (PAM) fluorescence using a PHYTO-PAM (Heinz Walz, GmbH) equipped with an emitter-detector unit (PHYTO-EDF) for the freshwater species and an Aquapen-C AP-C 100 fluorometer (Photon system Instruments®, Drasov, Czech Republic) for the marine species, respectively.

For freshwater species, measurements were realized using a home-made device for reproducible direct measurements on the bottom of the flasks. Ten measurements were made after homogenization of each culture by agitation and after checking that cells were not stuck on the bottom. For marine species, measurements were made in 1-cm wide cuvettes using 2 mL of algal cultures diluted (1:2) in culture medium. Three measurements were performed for each culture. For each culture, the mean of ten or three Φ'_M values, depending on the species, was calculated. In order to avoid any bias induced by the different absolute values of measurements obtained using two devices for freshwater and marine species, Φ'_M results for exposed cultures were expressed in percentage of their respective control cultures.

2.2.5. Chemical analyses

All chemical analyses were performed on samples filtered on the first and last day of each experiment. Fifty-five millilitre samples were filtered using sterile filtration funnels containing a 0.45-µm PES (polyethersulfone) filter (VWR, USA), previously rinsed with ultrapure water (0.7 L). On the first day of each experiment, one additional flask was prepared for each of the four treatments in addition to the replicates, in order to provide sufficient volume for these analyses. This additional flask was immediately entirely sampled.

2.2.5.1. Nutrient analyses

For nitrate and orthophosphate analyses, 15 mL (out of 55 mL) of the filtered culture samples were diluted with ultrapure water (1:2 for freshwater and 1:20 for marine samples) before injection. These analyses were performed by ionic chromatography with chemical suppression (COMPACT 881 IC Pro, Metrohm,

Switzerland) equipped with a Metrohm 850 IC Conductivity Detector. The separation was performed with a Metrosep A Supp 4/5 Guard/4.0 pre-column followed by a Metrosep A sup 5 - 250/4.0 anion exchange column. The eluent was a solution of 3.2 mM Na_2CO_3 and 1 mM $NaHCO_3$, and the chemical suppressor was a solution of 100 mM H_2SO_4. Quantification limits were 0.010 $mg.L^{-1}$ for nitrates and 0.005 $mg.L^{-1}$ for orthophosphates.

For silicate analysis, 20 mL were sampled from the additional flask of each treatment on the first day, and 5 mL per quadruplicate of each treatment were pooled on the last day of experiment. Soluble silicate concentrations were determined by colorimetric method with a Shimadzu UV-1800 spectrophotometer (Shimadzu Inc., Kyoto, Japan) according to the French standard NF T90-007 (AFNOR, 2001). The quantification limit was 0.05 $mg.L^{-1}$. Silicates were only analyzed in samples from experiments with diatoms (*G. gracile* and *C. calcitrans*).

2.2.5.2. DOM characterization

After filtration through 0.45-µm, all samples were stored at 4°C in the dark until DOM analyses. To characterize the DOMs from freshwater and marine water as well as their evolution over time in the experiments, DOC concentrations were determined and optical analyses (absorbance and fluorescence) were performed. Furthermore, to compare the evolution of each parameter in time between the treatments with and without DOM, the results for each parameter were expressed as the difference between the last and the first day of experiments.

2.2.5.2.1. Dissolved organic carbon (DOC)

For DOC concentration measurements, 10 mL samples of filtered cultures were acidified with 2 M hydrochloric acid then sparged during 6 minutes with high purity air before injection. DOC concentrations were determined using a Total Organic Carbon analyzer (Shimadzu TOC-V CSN, Japan), calibrated with solutions of potassium hydrogen phthalate ($C_6H_4(COOK)(COOH)$) and run in non purgeable organic carbon (NPOC) mode. The DOC concentration result is the mean of the three to four injections most satisfying in terms of variation coefficient (<2%). At least two natural water certified reference materials (CRMs - Environment Canada purchased by ANALAB) were systematically analyzed within each samples series in order to validate DOC measurements. The measured values for MISSISSIPI-03 River Water lot 1010 and CRANBERRY-05 Lake Water lot 0411, respectively 6.42 ± 0.58 $mg.L^{-1}$ and 3.76 ± 0.08 $mg.L^{-1}$, were within the range expected for these natural water CRMs (6.31 ± 0.71 $mg.L^{-1}$ and 3.60 ± 0.51 $mg.L^{-1}$ respectively).

2.2.5.2.2. Absorbance analyses

Four millilitre samples of filtered cultures were used for absorbance measurements. All absorbance measurements were made using a 1-cm path length fused silica cell (Hellma) and a Jasco V-560 spectrophotometer (JASCO, France) equipped with deuterium and tungsten iodine lamps. The light absorbing properties of DOM were studied via two optical indices: the Specific UV Absorbance ($SUVA_{254}$) and the

spectral Slope Ratio (S_R). The $SUVA_{254}$ ($L.mg.C^{-1}.m^{-1}$) index provides information on the aromatic character of DOM (Weishaar *et al.*, 2003); it is calculated as the ratio between UV absorbance at 254 nm and DOC concentration ($mg.L^{-1}$). The S_R parameter, used as a proxy for molecular weight, corresponds to the ratio between the spectral slopes of the 275–295 nm region and the 350–400 nm region of the absorbance spectrum (Helms *et al.*, 2008).

2.2.5.2.3. Excitation-emission matrix (EEM) spectroscopy analyses

Four millilitre samples of filtered cultures were used for fluorescence measurements. The spectra were acquired using a 1-cm path length quartz cuvette (Hellma) and a Fluorolog FL3-22 fluorometer (Horiba Jobin Yvon, France) equipped with a xenon lamp (450 W) and a double monochromator at both excitation and emission sides. The excitation-emission matrix (EEM) spectra were composed of seventeen emission spectra acquired from 260 to 700 nm (with an increment of 1 nm and an integration time of 0.5 second) with excitation wavelengths in the range of 250 to 410 nm (with an increment of 10 nm). Each spectrum obtained was corrected by subtracting an ultrapure water blank spectrum to eliminate water Rayleigh and Raman scattering peaks. Spectra were also corrected instrumentally as detailed in Huguet *et al.* (2009b). EEM spectra allowed obtaining the intensity values of the observed fluorescence peaks: α' (maximum excitation wavelength (λ_{ex}) in the 250–260 nm region and maximum emission wavelength (λ_{em}) in the 380–480 nm region), α (λ_{ex} = 340–370 nm and λ_{em} = 420–480 nm), β (λ_{ex} = 310–320 nm and λ_{em} = 380–420 nm) and γ (λ_{ex} = 270–280 nm and λ_{em} = 300–350 nm) (Parlanti *et al.*, 2000). The fluorescence intensities were expressed in Raman units (RU). Two additional parameters were calculated from EEMs fluorescence spectra : HIX (or humification index) and BIX (or biological index). The HIX index, used to characterize DOM humification in Zsolnay *et al.* (1999), was calculated as the ratio of the area from emission wavelengths 435 to 480 nm divided by the area from 300 to 345 nm for an excitation wavelength of 250 nm. The BIX index (Huguet *et al.*, 2009b) is an indicator of autotrophic productivity (= recent autochthonous contribution); it was calculated as the ratio of emission intensity at 380 nm divided by emission intensity at 430 nm for an excitation wavelength of 310 nm.

2.2.6. Statistical analyses

For microalgal growth curves, two-way ANOVAs were performed on each species to detect significant differences in the cell densities over time between biotic treatments (with a *p*-value < 0.05 considered as statistically significant). When significant differences were detected, a Newman-Keuls post-hoc test was performed.

For each parameter at the end of experiment, the biotic exposed treatments were compared to biotic control treatments using Student's t-test or Welch's t-test (with a *p*-value <0.05 considered as statistically significant) after having checked the homoscedasticity with Fisher's F-test. When the result was not significant although data suggested a trend, the type II error β was calculated, corresponding to the probability to wrongly accept

the null hypothesis. All statistical analyses were performed with R 3.2.2. (Ihaka & Gentleman, 1996) and all graphs were performed with SigmaPlot® 12.0 software (Systat Software Inc., USA).

2.3. Results

2.3.1. DOM influence on cultures

2.3.1.1. Microalgal growth

Growth curves of control cultures showed differences among the four species, the freshwater ones (Figure 47A-B) showing a lower growth than marine species (Figure 47C-D). Indeed, cell concentration of *Sphaerellopsis* sp. barely increased during the experiment from about 1,200 cell.mL^{-1} to about 10,000 ± 1,000 cell.mL^{-1} in 14 days (Figure 47B-b). *Gomphonema gracile* cultures reached the beginning of exponential growth phase at the end of experiment (day 7), with a final cell concentration of 53,000 ± 18,000 cell.mL^{-1} (Figure 47A). On the contrary, the two marine species exhibited a well-marked exponential growth with final concentrations (day 6) around 3,000,000 ± 50,000 cell.mL^{-1} for *Chaetoceros calcitrans* (Figure 47C) and 700,000 ± 20,000 cell.mL^{-1} for *Tetraselmis suecica* (Figure 47D).

When DOM was added to the culture medium, the results showed faster growth with significant differences in exponential growth for the four species: from day 3 for *C. calcitrans*, from day 4 for *T. suecica* and from day 6 for the freshwater species (*G. gracile* and *Sphaerellopsis* sp.) (Figure 47). As compared to control cultures, exposed cultures reached final cell densities significantly higher: initial cell densities were multiplied by 29 (vs 18 in controls) for *G. gracile*, by 32 (vs 30 in controls) for *T. suecica* and by 243 (vs 135 in controls) for *C. calcitrans*. For *Sphaerellopsis* sp., the DOM addition induced a particularly outstanding increase of cell density of more than 2,000 fold (Figure 47B-a), compared to the weak growth observed in controls (12 fold).

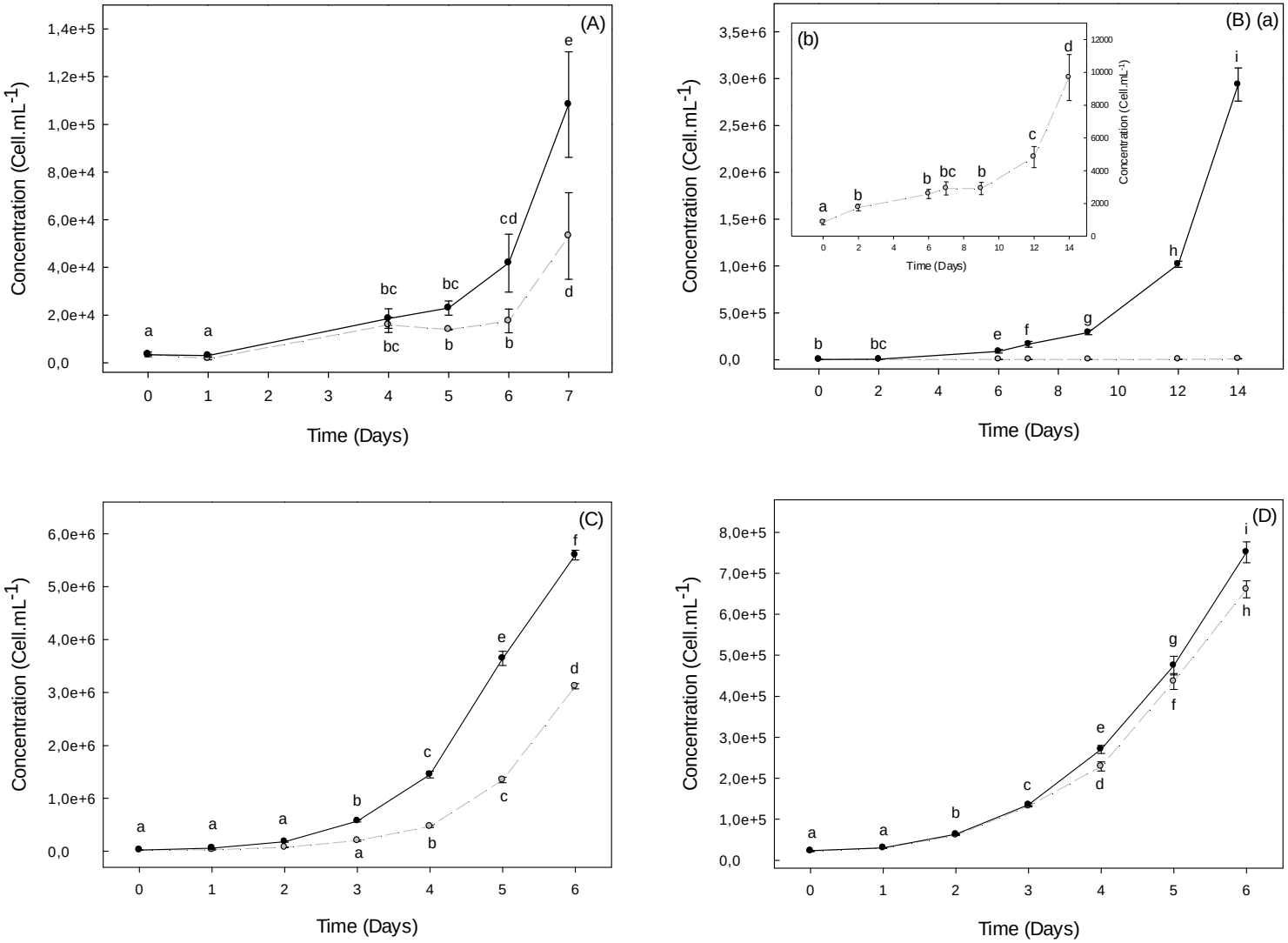


Figure 47: Growth curves of *Gomphonema gracile* (A), *Sphaerellopsis* sp. (B), *Chaetoceros calcitrans* (C) and *Tetraselmis suecica* (D) in control (—○—) and DOM-exposed (—●—) treatments. Note the different Y axes between B (a) and (b). All values are mean values (± standard error, SE; n = 4) and different letters indicate significant differences between treatments (ANOVA, $p < 0.05$).

Consequently, DOM significant influence on growth was also observed on average doubling times calculated from the complete growth curves of *C. calcitrans* and *Sphaerellopsis* sp. (Figure 48A). Indeed, for these species T_D was 2 h and 90 h lower, respectively, in the DOM exposed cultures as compared to controls. For the two other species *G. gracile* and *T. suecica*, no significant difference was detected on average T_D (*p*-value = 0.23 and 0.29, respectively) but the β values were very high (0.80 for *G. gracile* and 0.82 for *T. suecica*, respectively).

2.3.1.2. Microalgal physiology

Concerning the relative intracellular lipid content measured on the last day of experiments, the $FL1_{Lipids}$ ratio was very heterogeneous between species in control cultures. The species can be classified according to their lipid relative content: *C. calcitrans* > *T. suecica* > *G. gracile* > *Sphaerellopsis* sp. With addition of DOM to the cultures, the $FL1_{Lipids}$ ratio was significantly different compared to controls for *Sphaerellopsis* sp. and *C. calcitrans*, with lower values (Figure 48B). In contrast, no significant difference was detected between treatments on the $FL1_{Lipids}$ ratios of *G. gracile* and *T. suecica*, but cultures containing DOM tended to exhibit slightly higher $FL1_{Lipids}$ ratio values. For those species, high β values (0.84) were found.

The photosynthetic efficiency Φ'_M was not significantly different between treatments for *G. gracile*, *C. calcitrans* and *T. suecica* (Figure 48C). For *Sphaerellopsis* sp., there was a significant decrease of Φ'_M (-17%) when DOM was added to the cultures as compared to the controls.

2.3.1.3. Bacterial concentration

At the end of the experiments, bacteria concentrations in controls, as determined in the cultures using SYBR Green I, were the highest in cultures of *G. gracile* (4.0×10^6 cells.mL^{-1} vs 1 to 2×10^6 cells.mL^{-1} for the three other species) (Figure 48D). When DOM was added, no significant change was observed in bacterial concentration for *G. gracile* and *T. suecica*, when a slight increase occurred in *C. calcitrans* (2.9×10^6 cells.mL^{-1}) and a huge one in *Sphaerellopsis* sp. (9.7×10^6 cells.mL^{-1}). However, when the bacterial concentration is divided by microalgae concentration (Figure 48E), the sole significant difference observed between conditions with and without DOM was in *Sphaerellopsis* sp.: the bacteria number per algae cell decreased from 165 ± 13 bacteria.cell^{-1} down to 3 ± 0 bacteria.cell^{-1}.

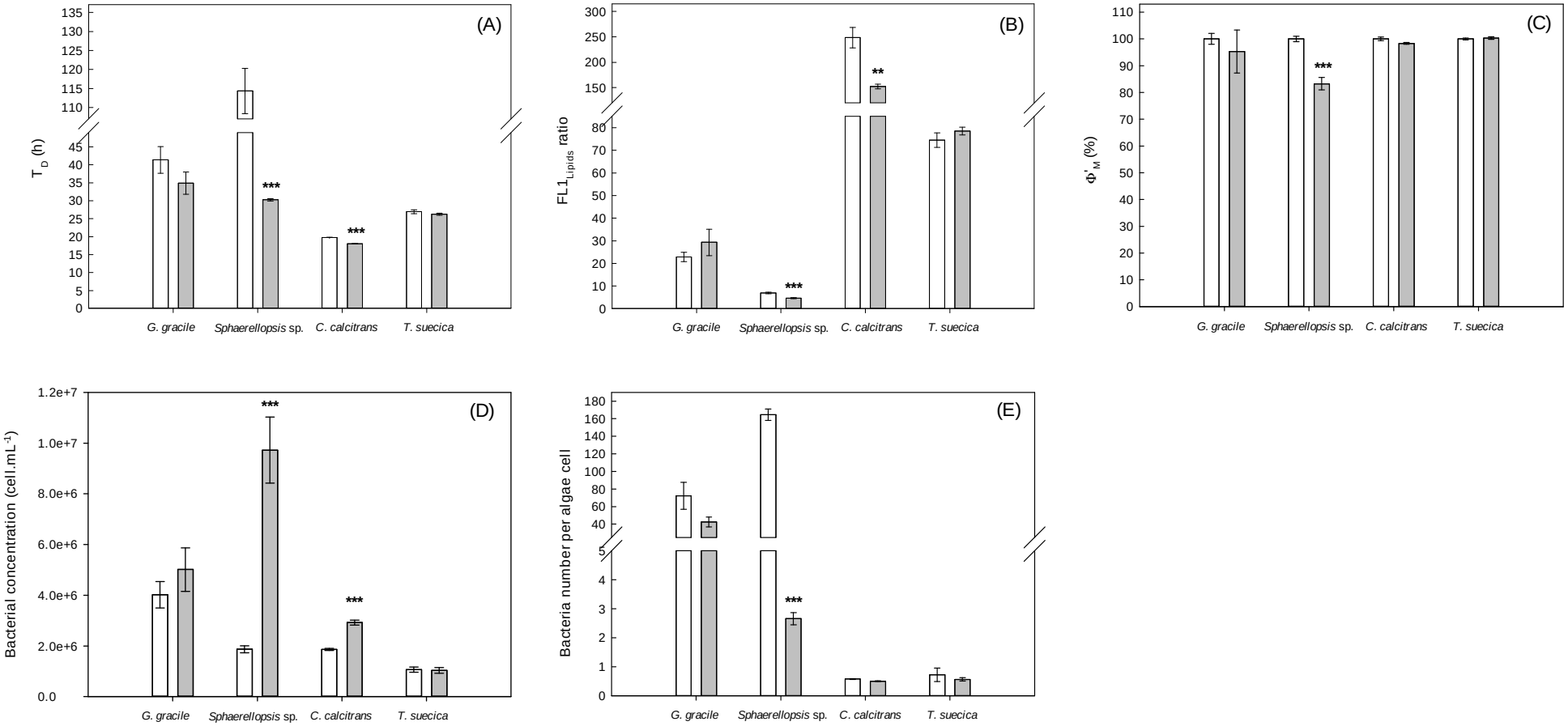


Figure 48: Doubling time (T_D) (A), relative intracellular lipid content ($FL1_{Lipids}$ ratio) (B), operational yield (Φ'_M) (C), bacterial concentration (D) and bacteria number per algal cell (E) obtained on the last day of experiments for the four species in control (white bars) and DOM-exposed treatments (grey bars). All values are mean values (± standard error, SE; n = 4) and * indicates significant differences between treatments (t-test, * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$).

2.3.2. Evolution of the chemical environment during experiments

2.3.2.1. Nutrient concentrations

On the first day of experiments, nutrient concentrations were in the same range between treatments (Table 14), except for silicate concentration in *G. gracile* cultures where the concentration in exposed cultures was 1.6 fold the concentration of control treatment.

For *G. gracile*, the nutrient concentration decrease during the experiment was quite similar for both treatments (-14% of nitrate concentration and -73% of orthophosphate concentration in control and exposed cultures) and the silicates were almost entirely consumed in the control treatment at the end of the experiment (-95%) (Table 14). For *Sphaerellopsis* sp., the nitrate and orthophosphate concentrations decreased in the exposed treatment by about 55% and 98% respectively, with a total consumption of the latter, whereas no change was observed in concentrations over time for the control treatment. For *C. calcitrans*, in cultures exposed to DOM, the nitrate and orthophosphate concentration decreases were more important compared to control cultures (-38% vs -21% of nitrate concentration and -90% vs. -52% of orthophosphate concentration) and orthophosphates were almost entirely consumed in the exposed cultures; the silicate concentration decrease was around 50% for both treatments. Finally, for *T. suecica* species where no orthophosphate data are available, nitrates were almost entirely consumed (90%).

Table 14: Mean (± SE) concentrations of nitrates (NO_3^-), orthophosphates (PO_4^-) and silicates (Si) on the first (Day 0) and last (Day f) days of experiments for the four species and the two treatments (n = 4 for NO_3^- and PO_4^- on the last day; otherwise n = 1).

		Nitrates – NO_3^- ($mg.L^{-1}$)		Orthophosphates – PO_4^- ($mg.L^{-1}$)		Silicates – Si ($mg.L^{-1}$)	
		Day 0	Day f	Day 0	Day f	Day 0	Day f
Gomphonema gracile	Control	175.6	148.3 ± 3.9	8.1	3.0 ± 0.3	28.2	1.8
	Exposed	161.0	142.6 ± 4.3	8.1	1.5 ± 1.1	45.7	16.3
Sphaerellopsis sp.	Control	175.6	178.9 ± 0.9	8.1	11.1 ± 0.1		-
	Exposed	161.0	72.1 ± 4.5	8.1	0.2 ± 0.1		-
Chaetoceros calcitrans	Control	65.0	50.6 ± 6.5	1.8	0.9 ± 0.3	22.6	11.0
	Exposed	58.5	34.0 ± 0.4	1.5	0.2 ± 0.2	22.0	11.8
Tetraselmis suecica	Control	65.0	8.8 ± 2.3		-		-
	Exposed	58.5	4.4 ± 0.9		-		-

2.3.2.2. Modifications of DOM

2.3.2.2.1. Quantitative evolution – DOC concentrations

DOC concentrations in the control cultures increased for all species during the experiments, as shown by the positive values in Figure 49A. In cultures exposed to DOM, DOC also increased between the first and

last days. This increase of DOC was significantly different from the control treatment only in the cultures of the two chlorophytes (*Sphaerellopsis* sp. and *T. suecica).* In the culture of *C.* calcitrans, ΔDOC was not detected as statistically different in DOM exposed cultures but the β value was high (0.68).

2.3.2.2.2. Absorbance indices

Between the first and last days of experiments, $SUVA_{254}$ of control cultures decreased for three out of four species: *G. gracile, C. calcitrans* and *T. suecica* (Table 15). In *Sphaerellopsis* sp. cultures, this index related to DOM aromaticity did not evolve during the experiment. In the exposed treatments, the $SUVA_{254}$ decreased over experiment duration for all species. Significant differences in $\Delta SUVA_{254}$ between treatments were highlighted in cultures of *G. gracile* and *T. suecica* (lower decrease over time in exposed treatments) and for *Sphaerellopsis* sp., with negative values of $\Delta SUVA_{254}$ in the cultures exposed to DOM.
The S_R index, used as a proxy of molecular weight, showed different patterns of changes between freshwater and marine control cultures: it decreased over time in the *G. gracile* and Sphaerellopsis sp. cultures, whereas it increased over time in *C. calcitrans* and *T. suecica* cultures (Table 15). In DOM exposed cultures, the ΔS_R was statistically different from the controls except for *C. calcitrans*. Indeed, for *G. gracile* cultures the decrease was less important than for the control treatment and the ΔS_R of *Sphaerellopsis* sp. cultures even increased over time whereas it decreased in control treatment. In *C. calcitrans* cultures, no significant difference was found between treatments (p-value = 0.065), however the increase over time in S_R tended to be higher with DOM than without (β error = 0.42). Finally, in *T. suecica* cultures, S_R increased during the experiment with DOM as well, but significantly less than without DOM.

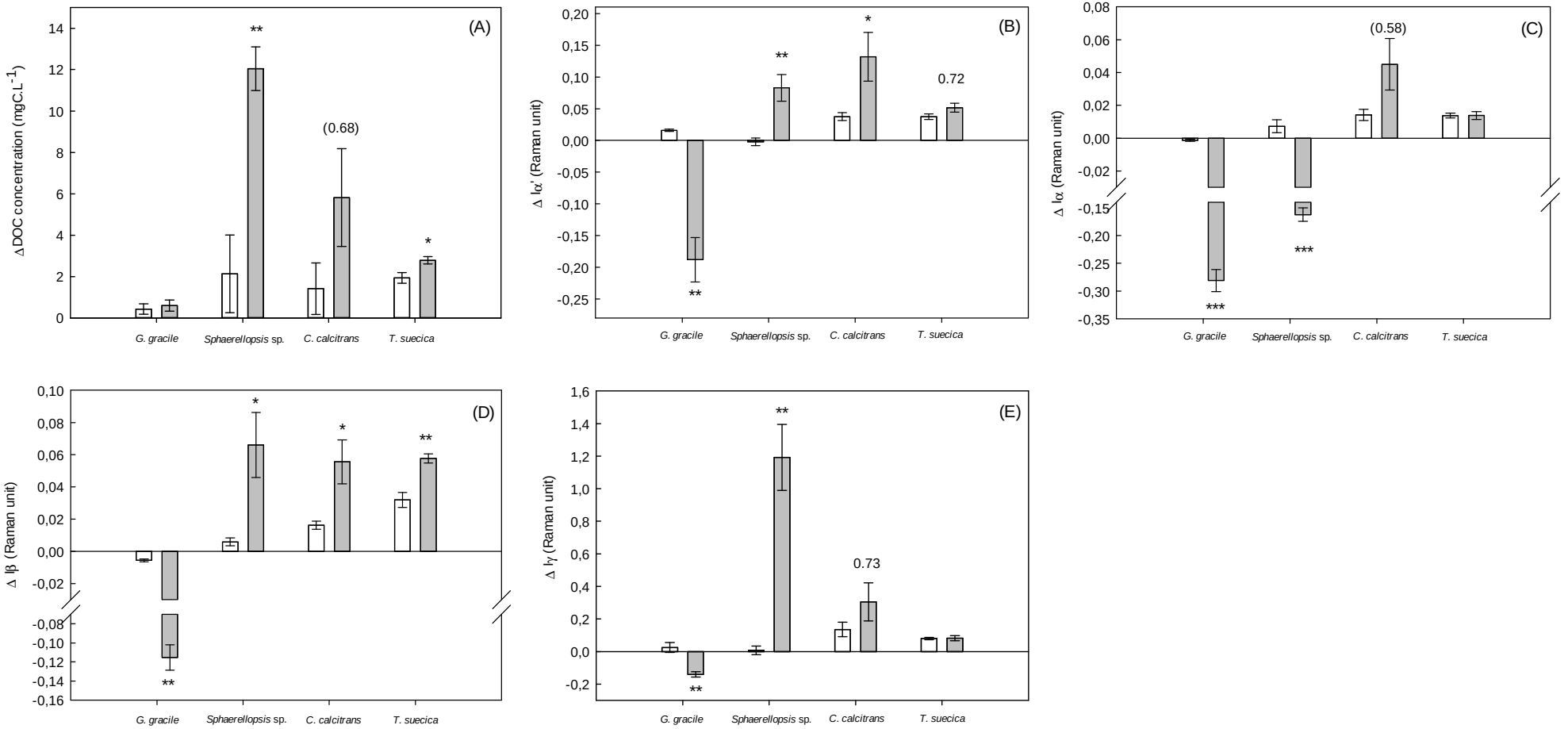


Figure 49: Evolution (Δ) of dissolved organic carbon concentration (DOC) (A) and fluorescence intensities of α' (B), α (C), β (D) and γ (E) fluorophores for all species in control and DOM exposed treatments. All values are mean variations over time, between final sampling date (± standard error, SE; n = 4) and day 0 (n = 1). * indicates significant differences between treatments (t-test, * $p < 0.05$) and the numeric value indicates the β error.

Table 15: Evolution (Δ) of qualitative DOM descriptors between the last and first days of experiments. All values are mean variations over time, between final sampling date (n = 4 ± standard error) and day 0 (n = 1). * indicates significant differences between two treatments (t-test, * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$). The value in brackets indicates the β value.

		Gomphonema gracile		*Sphaerellopsis* sp.		*Chaetoceros calcitrans*		*Tetraselmis suecica*	
		Control	Exposed	Control	Exposed	Control	Exposed	Control	Exposed
Absorbance indices	$\Delta SUVA_{254}$ ($L.mgC^{-1}.m^{-1}$)	-2.37 ± 0.52	-0.24 ± 0.05 *	0.34 ± 0.50	-1.43 ± 0.09 *	-1.08 ± 0.43	-1.09 ± 0.62	-2.55 ± 0.03	-2.06 ± 0.10 **
	ΔS_R	-0.21 ± 0.04	-0.02 ± 0.00 *	-2.11 ± 0.23	0.10 ± 0.04 **	0.77 ± 0.08	1.50 ± 0.35 (0.42)	0.78 ± 0.20	0.19 ± 0.07 *
Fluorescence parameters	ΔHIX	0.25 ± 0.13	-0.39 ± 1.00	0.27 ± 0.09	-4.77 ± 0.48 **	-0.37 ± 0.15	-0.76 ± 0.40	-1.11 ± 0.06	-0.54 ± 0.10 **
	ΔBIX	-0.01 ± 0.02	0.03 ± 0.01	0.19 ± 0.06	0.06 ± 0.00	0.11 ± 0.01	0.10 ± 0.03	-0.04 ± 0.05	0.00 ± 0.01

2.3.2.2.3. Fluorescence analyses

The α' fluorophore, associated with humic-like substances (mixture of fulvic and humic acids) and with recent organic matter, increased over time in control treatment for *G. gracile* and for two marine species (Figure 49B). In exposed cultures, α' fluorescence intensity (Iα') decreased for *G. gracile* and increased with time for the three other species (-8% for *G. gracile*, +4% for *Sphaerellopsis* sp., +61% for *C. calcitrans* and +21% for *T. suecica*, respectively). This ΔIα' was significantly different compared to controls except for *T. suecica*, where the type II error β values were high (0.72).

The α fluorophore, characteristic of humic-like substances, and the β fluorophore, associated with recent production of biological material, decreased over time in control cultures of *G. gracile* when they increased in control cultures of the three other species (Figure 49C and D). In cultures exposed to DOM, α intensity decreased when β intensity increased for *Sphaerellopsis* sp. For *G. gracile*, intensity of the two fluorophores decreased significantly more than in the controls during the experiment. For marine cultures, although α fluorophore intensity increased between the first and last days of experiments, no significant difference between treatments was observed (high error β value, of 0.58, for *C. calcitrans*). Finally, the β fluorophore intensity increased significantly for exposed cultures in comparison with controls during the experiments for both marine species.

The intensity of fluorophore γ, characteristic of protein-like compounds and bacterial/microbial activity, did not evolve over time in controls for freshwater species cultures and increased in controls for marine species cultures (+489% for *C. calcitrans* cultures and +291% for *T. suecica* cultures, respectively) (Figure 49E). With natural DOM addition to cultures, a significant decrease was observed in *G. gracile* cultures. In *Sphaerellopsis* sp. cultures, a significant increase (+113%) was obtained during the experiment, compared to the controls. For both marine species, γ fluorescence intensity increased over time similarly to control treatments, although β value was high (0.73) for *C. calcitrans* cultures.

The humification index (HIX) increased during the experiments without DOM in freshwater cultures, and decreased in marine cultures (Table 15). With DOM addition, HIX was stable over time in *G. gracile* cultures, while it decreased in the other species cultures. Significant differences between treatments were found in *Sphaerellopsis* sp. cultures, due to inverse variations in HIX, and in *T. suecica* cultures where the decrease in HIX was halved in the presence of DOM compared to the controls. Finally, the biological index (BIX) was stable over time in G. gracile and T. suecica cultures without DOM (Table 15), whereas it increased for the two other species. With DOM, the patterns were similar and no significant difference in ΔBIX was found between treatments.

2.4. Discussion

The aim of this study was to investigate the responses of four non axenic cultures of microalgae, *Gomphonema gracile*, *Sphaerellopsis* sp., *Chaetoceros calcitrans* and *Tetraselmis suecica*, exposed to dissolved organic matter (DOM) from their natural environment. Diverse biological parameters were assessed, namely growth, relative intracellular lipid content, and operational photosynthetic efficiency of

microalgae together with bacteria counts in the cultures. Parameters linked to their chemical environment were also monitored to characterize the changes induced by DOM added to the cultures.

2.4.1. Microalgal growth stimulation in the presence of natural DOM

The marine species grew very well during the six-day exposure, as shown by the control treatments where the initial cell densities were multiplied by 135 for *C. calcitrans* and 30 for *T. suecica*, respectively. These results, together with nutrient concentrations, demonstrated that the f/2 culture medium was not limiting and attest the validity of the treatment without DOM used as controls. The growth of marine species was faster than the freshwater species growth. Indeed, *G. gracile* cultures barely reached the beginning of exponential growth phase at the end of experiment (day 7). Therefore, it would have been interesting to continue the experiment for a few additional days, although the silicate concentration was already low at the end of experiment. Finally, growth results of *Sphaerellopsis* sp. seemed to demonstrate that cultures were in a compromised physiological state (maintaining the cell rather than an efficient growth). The hypothesis, which may explain these results, is that the culture medium used (Dauta) does not contain all the nutrients essential to the cellular division of this species. Due to the lack of culturing data for this species in the literature, preliminary tests were also carried out with the WC medium (Guillard & Lorenzen, 1972) currently used for freshwater microalgal cultures. Growth results being similar between both media, this species was maintained in unexpected non-optimal conditions. Finally, the relative lipid content in the controls showed that species had very heterogeneous lipid levels, that can be classified as follows: *C. calcitrans* > *T. suecica* > *G. gracile* > *Sphaerellopsis* sp.. Brown (1991) already observed such results, with a lipid percentage of dry weight of 16% for *C. calcitrans* and 10% for *T. suecica*, respectively. For the freshwater species, no bibliographic data were available. The fact that the lipid content was higher for the marine species compared to freshwater species can not be generalized. Indeed, many studies showed that lipid content is species-dependent (see review in Amaro *et al.*, 2012).

At the end of experiments among control cultures, bacteria concentrations were the highest in *G. gracile*, at least twice compared to the other species; when bacteria concentrations were divided by algal cell concentrations, the highest ratio was found in *Sphaerellopsis* sp. cultures, the marine cultures still exhibiting the lowest ratios. In the case of diatoms, this difference between freshwater and marine species may be explained by the fact that the freshwater benthic diatom *G. gracile* secretes large amounts of exudates (personal observations and Coquillé *et al.*, 2015), compared to marine species. Indeed, a strong production of exudates promotes the fixation and development of bacteria, as also demonstrated by Arzul *et al.* (2002) for dinoflagellates. For *Sphaerellopsis* sp., a combination of two factors would explain the higher number of bacteria per algae: first, algal cell densities were very low, explaining the high bacteria/cell ratio in the control cultures; second, this species produces mucus that was observed under the microscope, likely providing nutrients for bacteria and promoting their development (Romera-Castillo *et al.*, 2011). In any case, as both freshwater species were isolated from a natural biofilm, the high amount of bacteria inhabiting these cultures is nor outstanding nor surprising.

The evolution of cultures under DOM exposure showed that microalgae were positively influenced by the presence of DOM in their environment. Indeed, the cellular division of the four species studied was stimulated: a final cellular concentration increase of 14% for *T. suecica*, 80% for *C. calcitrans*, 104% for *G. gracile*, and 30,000% for *Sphaerellopsis* sp. was observed at the end of experiments. Particularly, the latter exhibited an outstanding stimulation: these results would therefore demonstrate that optimal growth of this species requires nutrients that are not provided by the Dauta culture medium used in the control treatment. Nutrient analyses on the first days showed that DOM effects on growth were not due to a greater quantity of nitrates, phosphates or silicates brought by DOM addition. In the same time, bacteria concentrations in the cultures were significantly enhanced with DOM for *Sphaerellopsis* sp. and *C. calcitrans*. However, considering the bacteria/cell ratio, no difference was detected for *G. gracile* anymore, neither in the two marine species (ratio equal to 1) when a significant decrease was observed for *Sphaerellopsis* sp. (from 165 to 3 bacteria.cell^{-1}). These results confirm that DOM addition to the cultures did not introduce high amounts of bacteria nor induce an outstanding increase of bacteria naturally inhabiting the cultures. The bacteria are known to play a role in the algal growth and survival and vice versa (Amin *et al.*, 2015, Kim *et al.*, 2014, Ramanan *et al.*, 2016, Windler *et al.*, 2014). Indeed, bacteria, which are heterotrophic organisms, degrade and transform the organic matter into small molecules useable by microalgae (Croft *et al.*, 2005, Croft *et al.*, 2006, Droop, 2007). At the same time, the extracellular products released by algae provide a source of carbon and energy for bacteria (Larsson & Hagström, 1979, Maurin *et al.*, 1997, Romera-Castillo *et al.*, 2011). On the other hand, several studies have shown the microalgae ability to use relatively simple molecules such as sugars (glucose, Liu *et al.*, 2009), acetate (Laliberté & de la Noüe, 1993), but also more complex molecules such as humic substances (Campbell et al. 1997). More generally, the results obtained on the four species are in agreement with the observations made on several species from various phyla as: *Scenedesmus obliquus* (Chlorophyta) exposed to different glucose concentrations (EL-Sheekh et al. 2012) for freshwater microalgae, and *Phaeodactylum tricornutum* (Bacillariophyta) exposed to 100 nM of glucose, acetate and glycerol (Liu et al. 2009), *Isochrysis galbana* (Chlorophyta) exposed to 12 mM of glucose, acetate and glycerol (Alkhamis & Qin 2013) and *Alexandrium tamarense* (Dinoflagellata) exposed to different concentrations of humic substances (Gagnon et al. 2005) for marine microalgae. In the four studies cited, the growth of microalgae (in non-axenic conditions) was stimulated in presence of organic carbon substances mentioned, which are possible DOM components (Findlay & Sinsabaugh 2003). In axenic conditions, Bollman and Robinson (1977) previously demonstrated, by kinetics of assimilation, the ability of *Chlorella* sp. and *Chlamydomonas segnis* to directly consume acetate, lactate, glycolate. These substances can be internalized in microalgae through numerous mechanisms via pumps, channels, enzymes, etc. (Perez-Garcia et al. 2011b) but also phenomena as sorption (ad/absorption), diffusion and osmosis. However, our results do not make it possible to discriminate between direct effects of DOM on microalgae via consumption or indirect ones through bacterial metabolism, as bacteria are able to grow on DOM.

On the other hand, the effects obtained on the relative lipid content and the operational photosynthetic efficiency, are somewhat related to growth results, a parameter directly linked to survival and development of cells. *Sphaerellopsis* sp. and *C. calcitrans*, the species most stimulated when exposed to DOM, exhibited a decrease of about 30% in their relative lipid content: it can be assumed that stimulated cells would be less subjected to accumulate energy stock as lipids. Piorreck and Pohl (1984) showed that total lipid content was different during growth and was function of species; for example, they observed an increase over time for *Scenedesmus obliquus* and *Chlorella vulgaris*, a decrease for *Anacystis nidulans* and variations over time for *Microcystis aeruginosa*.

The addition of natural DOM to the cultures also decreased the photosynthetic efficiency of *Sphaerellopsis* sp. (17%), whereas no significant difference was observed for the three other species indicating that their phototrophic metabolism was not substantially modified. For *Sphaerellopsis* sp., our results are in agreement with those of Liu et al. (2009) and Heifetz et al. (2000): they showed that, in mixotrophic and non-axenic conditions realized using glucose, glycerol and acetate, *Phaeodactylum tricornutum* and *Chlamydomonas reinhardtii* exhibited a decrease in photosynthetic efficiency, whereas their growth was boosted by these molecules. These authors observed a transitory decrease of Φ'_M, which resulted from the stimulation of the respiration caused by organic carbon consumption. Therefore, we hypothesize that the decrease of Φ'_M in *Sphaerellopsis* sp. could also be linked to enhanced respiration, but specific measurements of O_2 consumption are needed to prove it.

2.4.2. Changes in DOM in the presence of microorganisms

2.4.2.1. Putative consumption by microorganisms

In the control cultures where no DOM was added, humic-like, recent biological and protein-like material related fluorophores (α, α', β and γ) increased over the experiment for marine species. For *Sphaerellopsis* sp., no variation was observed on α' and γ intensities, and a small increase was observed on the two other fluorophores. For *G. gracile*, whereas α and γ did not evolve over experiment, α' increased and β decreased. When cultures were exposed to natural DOM, intensities of the four fluorophores also increased over time for marine species. These intensity increases (corresponding to an increase of relative concentration) were not proportional to DOC increase, contrarily to the controls. For *Sphaerellopsis* sp., a drastic decrease for α intensity and an increase of γ, α' and β intensities (not proportional to DOC increase for α' and β) were observed. For *G. gracile*, all fluorophores decreased over experiment.

As no such evolution was observed in abiotic components (data not shown), the various observations made for the four species (decreases and differences between fluorophores and DOC increase) were probably directly linked to the presence of microalgae and associated bacteria, revealing consumption (directly and/or indirectly) and/or biotic degradation to different types of compounds. The consumption of various elements was perhaps due to microalgae and/or bacteria, via enzymes excretion such as proteases, polysaccharidases, and glucosidases (for bacteria; De La Rocha & Passow, 2014, Droop, 2007) or adsorption of molecules such as humic substances (for microalgae ; Campbell *et al.*, 1997). For *G. gracile*,

not only consumption could explain these results, but also the presence of EPS-type substances synthesized by the microalgae, which could alter or impede the excitation sites of fluorescent molecules. However, due to the lack of data in literature, further analyses are necessary to conclude.

2.4.2.2. Production by microorganisms

Natural DOM addition to the cultures strongly influenced the four species. Consumption and/or degradation of DOM substances by bacteria and/or microalgae caused the modification of the chemical environment of the cells. However, the cells themselves (microalgae and bacteria) also contributed to modify this chemical environment, by excreting self-produced molecules. This excretion was assessed through various parameters measured during the experiments: DOC, fluorescence intensities and $SUVA_{254}$, S_R, HIX and BIX indices.

DOC concentration increased during the experiment in the two treatments for all species. This organic carbon production is related to the microalgae and bacteria growth and especially to cell excretion. Indeed, several authors (e.g. Pivokonsky *et al.*, 2006, Schartau *et al.*, 2007; in non-axenic cultures and in mesocosms); showed that during the exponential growth phase (corresponding to the end of the experiment for the four species) with very low cell mortality, DOC production was mainly due to microalgae metabolism. This organic matter, also named algal extracellular organic matter, includes exudates and/or extracellular polymeric substances (EPS). The latter are produced by diatoms and some other microalgae, and participate to the formation of microbial aggregates (biofilm type, Geesey, 1982). This excretion was also highlighted by the increase of the α', γ and β fluorescence intensity over the experiment in the cultures that grew the best, i.e. in both treatments for the two marine species and in the exposed treatment for *Sphaerellopsis* sp.. These fluorophores are indeed associated to humic-like substances and to recent organic matter for α' and associated to protein-like compounds for γ. The fluorophore β produced from a recent algal and/or bacteria activity (Determann *et al.*, 1998) corresponds to a labile fraction of DOM. In the same way, an increase of α' and α fluorophore intensities (corresponding to humic-like substances and more precisely to a mixture of fulvic and humic acids) was also observed for both marine species over experiments. This increase of α intensity (and hence quantity) usually correspond to more refractory macromolecules formed by condensation or polymerization processes from molecules such as fatty acids (Castillo *et al.*, 2010, Findlay & Sinsabaugh, 2003, Harvey *et al.*, 1983, Romera-Castillo *et al.*, 2011).

The increase of the BIX index (=biological index) revealed recent DOM production from autochthonous origin as shown by Huguet *et al.* (2009b). It was observed in both treatments for *Sphaerellopsis* sp. and *C. calcitrans*. For the two other species, no change was observed between the last and first days, although the cellular concentration increased. One hypothesis to explain this absence of changes may be related to the fact that in *G. gracile* and *T. suecica* cultures, non-fluorescent organic molecules were excreted either by microalga, bacteria or both.

During the experiments, changes in the aromaticity of DOM for all cultures whatever the treatment were highlighted by decreasing HIX and $SUVA_{254}$ values (which are correlated to DOM aromaticity according to Weishaar *et al.*, 2003). This corroborates the findings of Henderson *et al.* (2008), who observed that

DOM was less aromatic and more hydrophilic in exponential growth phase of *Chlorella vulgaris*, *Microcystis aeruginosa* and *Asterionella formosa* species cultivated in non-axenic environment, due to the increase of small and simple molecules excreted (generally hydrophilic and with a low molecular weight). Potential changes in molecular weight and aromaticity of marine and freshwater DOMs during the experiments were evaluated through the S_R and HIX parameters. S_R was found to increase in the two treatments for marine species, and with DOM addition for *Sphaerellopsis* sp, meaning that the average molecular weight of the cell (microalgae and/or bacteria) exudates was low. For *Sphaerellopsis* sp. control cultures, $SUVA_{254}$, S_R and HIX results showed an increase in average molecular weight and in DOM aromaticity. These results confirm that cells and their associated bacteria did not excrete sufficiently to substantially modify DOM, in accordance with the conclusions drawn in 2.4.1., which were that cultures were in a maintain state rather than growth. In contrast for *G. gracile*, S_R and $SUVA_{254}$ decreased simultaneously between the first and last day in both treatments, expressing a release of substances with higher molecular weight and less aromatic or more aliphatic properties. This apparent contradiction between the S_R and $SUVA_{254}$ results is likely explained by the properties of the substances excreted by *G. gracile* and/or the associated bacteria, in quantity and/or composition. Huguet *et al.* (2010) also showed that the most aromatic molecules were not necessarily the biggest ones. Therefore, more in-depth analyses of DOM elemental composition would be necessary to conclude.

2.5. Conclusions

The aim of this study was to assess how natural DOM interacts with microalgae and the associated bacteria. The results showed:

– the ability of freshwater and marine microalgae to use the surrounding molecules brought by natural DOM and/or derived from their degradation by the bacteria associated with cultures, favouring an increase of their growth rate;

– the diminution of humic-like substances (linked to a direct or indirect use) for *Sphaerellopsis* sp.;

– major changes in the DOM characteristics from marine water and freshwater caused by metabolic excretion and direct or indirect consumption of all species with their associated bacteria.

Therefore, this study proves that microalgae and their associated bacteria are major players of DOM modifications (concentration and composition) through their consumption and production. It also highlights DOM influence on photoautotrophs (and not only on heterotrophs), confirming the key role of DOM in aquatic ecosystems.

Acknowledgements

This study has been carried out with financial support from the French National Research Agency (ANR) in the frame of the Investments for the future Programme, within the Cluster of Excellence COTE (ANR-10-LABX-45).

We would like to thank Julien Rouxel, Larissa Haugarreau, Valentin Dupraz of Ifremer team, Jacky Vedrenne, Juliette Rosebery, Jean-Claude Grégoire, Jade Ezzedine of Irstea team for their help in sampling,

filtration and measurements during the different experiments. The authors also thank Julie Guéguen (Irstea) for her help with R software.

3. Synthèse

Le but de ce chapitre était d'évaluer, en conditions axéniques, (i) l'influence de la MOD naturelle sur quatre espèces de microalgues et (ii) dans quelle mesure les microalgues avec leur bactéries associées induisent des changements quantitatifs et qualitatifs de la MOD.

Les résultats des expositions ont montré que la présence de MOD avait fortement stimulé la division cellulaire des quatre espèces de microalgues : +14% pour *T. suecica*, +80% pour *C. calcitrans*, +104% pour *G. gracile* et +30 000% pour *Sphaerellopsis* sp. La croissance de *Sphaerellopsis* sp., exacerbée en présence de MOD, nous a indiqué que le milieu de culture utilisé jusque-là n'était pas optimal pour cette espèce. Les analyses des concentrations en sels nutritifs ont permis d'écarter un possible lien entre l'augmentation de la croissance des quatre espèces de microalgues et une quantité plus importante de sels nutritifs (nitrates, phosphates et silicates) apportés par l'ajout de MOD.

D'autre part, les analyses des concentrations bactériennes ont permis de mettre en avant que l'ajout de MOD non stérile n'avait pas engendré de développement intempestif des bactéries. En effet, bien que la concentration bactérienne ait été supérieure en présence de MOD pour deux des quatre espèces (*C. calcitrans* et *Sphaerellopsis* sp.), le ratio bactéries/microalgues s'est vu inchangé dans les cultures de *C. calcitra*ns (1 bactérie.cellule^{-1}) et a diminué pour *Sphaerellopsis* sp. (3 bactéries.cellule^{-1}, contre 165 sans MOD). Cette présence de bactéries n'a pas permis d'identifier la cause de la stimulation de croissance, en raison du lien étroit entre les bactéries et les microalgues (Amin *et al.*, 2015, Ramanan *et al.*, 2016, Windler *et al.*, 2014). En effet, les bactéries décomposent la matière organique (cellules mortes et substances excrétées) via la libération d'enzymes extracellulaires. Leur métabolisme met ainsi à disposition des microalgues des composants inorganiques et organiques (comme les vitamines) nécessaires à leur croissance (Croft *et al.*, 2005, Croft *et al.*, 2006, Droop, 2007). Aussi, même si des études ont déjà démontré la capacité des microalgues à consommer des molécules de type glucose ou substances humiques (Campbell *et al.*, 1997, Sharma *et al.*, 2016), nous ne pouvons conclure quant à une consommation directe ou indirecte des microalgues. Des expérimentations incluant un volet axénique seraient nécessaires pour déterminer plus précisément la part de consommation éventuellement imputable aux microalgues.

La caractérisation de l'environnement chimique a permis de montrer une diminution de la proportion du fluorophore α (correspondant à des substances humiques) au cours du temps dans la culture de *Sphaerellopsis* sp. en présence de MOD, pouvant être assimilée à de la consommation directe ou indirecte (via les bactéries). Pour les autres fluorophores (α', β et γ) étant donné qu'ils ont augmenté au cours du temps dans les cultures marines, nous ne pouvons déterminer s'il y a eu consommation de ces composés. En effet, les microalgues et leurs bactéries associées ont modifié les caractéristiques des MODs dulçaquicole et marine via leur excrétion. La quantité de carbone organique dissous a ainsi fortement augmenté au cours des expérimentations. Cette augmentation a été liée, pour *T. suecica*, *C. calcitrans* et *Sphaerellopsis* sp., à une diminution du poids moléculaire moyen et de l'aromaticité globale de la MOD. Concernant la diatomée *G. gracile*, la diminution de l'intensité de l'ensemble des fluorophores et de

l'aromaticité, combinée à l'augmentation du COD et du poids moléculaire moyen pourraient peut être expliqués par un rôle de la matrice EPS, qui pourrait altérer ou empêcher l'excitation des sites des molécules fluorescentes. Aussi, des recherches plus poussées sur la variabilité de la composition des EPS et de leur impact sur les analyses effectuées devraient être réalisées.

Chapitre 6 – Modulation de la toxicité des herbicides vis-à-vis de microalgues marines en présence de MOD

1. Introduction

Comme démontré dans le précédent chapitre, la MOD naturelle influence la croissance des microalgues, que ce soit directement ou indirectement via le métabolisme des bactéries associées aux cellules en conditions non axéniques. Dans l'environnement aquatique, en plus de la MOD, les microalgues sont également en contact direct avec d'autres éléments susceptibles de les impacter comme les pesticides. Ces molécules, dont la France est le second consommateur européen (Ecophyto, 2015, Eurostat, 2013), vont par divers phénomènes comme le lessivage des sols, le drainage, le transport aérien, se retrouver dans les cours d'eau présents à proximité et transiter jusqu'aux estuaires et zones côtières sous influence estuarienne. Aussi, dans l'environnement, la MOD est connue pour favoriser leur transport (Gao *et al.*, 2012), stimuler ou freiner leur dégradation naturelle (Canonica, 2009) et augmenter ou diminuer leur biodisponibilité (Haitzer *et al.*, 1998). Zhang *et al.* (2016b) ont également montré que la présence de MOD commerciale modulait la toxicité des chlorobenzènes vis-à-vis de la microalgue d'eau douce *Chlorella pyrenoidosa*. Aucune étude connue à ce jour n'a visé à évaluer l'influence de la MOD sur la toxicité de pesticides vis-à-vis des microalgues marines.

L'objectif de ce chapitre est donc de fournir des pistes sur l'influence de la MOD naturelle sur la toxicité des pesticides, seuls, en mélange et à dose environnementale, vis-à-vis de deux espèces marines retrouvées dans nos eaux côtières *Chaetoceros calcitrans* (diatomée) et *Tetraselmis suecica* (chlorophyte). Les données du réseau de surveillance REPAR (réseau opérationnel de suivi et d'expertise sur les phytosanitaires et biocides au niveau du Bassin d'Arcachon et de ses bassins versants) ont permis de sélectionner : le S-métolachlore, le diuron et l'irgarol. Ce sont les molécules les plus retrouvées en termes de fréquence et de concentration dans le Bassin d'Arcachon qui est la zone de prélèvement de la MOD naturelle. Au moyen de cultures monospécifiques non axéniques, la toxicité de ces molécules a été évaluée en l'absence et en présence de MOD naturelle. Les effets ont été évalués sur trois paramètres biologiques à savoir la croissance, l'efficacité photosynthétique (cible de l'irgarol et du diuron : quinone B du photosystème II, Jones & Kerswell, 2003, Nimbal *et al.*, 1996) et la quantité relative en lipides intracellulaires (cible du S-métolachlore : élongases intervenant dans la synthèse d'acide gras à longues chaînes; Fuerst, 1987, Götz & Böger, 2004, Vallotton *et al.*, 2008). Le suivi de ces paramètres biologiques a été couplé à la caractérisation de l'environnement chimique, via des mesures des concentrations en pesticides, en sels nutritifs, en carbone organique dissous, et des analyses d'absorbance UV-Visible et de fluorescence pour caractériser la MOD.

Ce chapitre est présenté sous la forme d'une publication qui sera soumise prochainement.

2. Article 4: The influence of natural dissolved organic matter on herbicide toxicity to marine microalgae is species-dependent

Nathalie Coquillé[1,2,3,4], Dominique Ménard[2], Julien Rouxel[2], Valentin Dupraz[2], Mélissa Éon[1], Hélène Budzinski[3,4], Soizic Morin[1], Édith Parlanti[3,4], Sabine Stachowski-Haberkorn[2]

[1] Irstea, UR EABX, Centre de Bordeaux, 50 avenue de Verdun, F-33612 Cestas cedex, France

[2] Ifremer, Laboratoire d'Écotoxicologie, rue de l'île d'Yeu, BP 21105, F-44311 Nantes cedex 03, France

[3] Univ. Bordeaux, UMR 5805 CNRS, EPOC, LPTC, 351 Cours de la Libération, CS 10004, F-33405 Talence Cedex, France

[4] CNRS, UMR 5805, EPOC, LPTC, 351 Cours de la Libération, CS 10004, F-33405 Talence Cedex, France

En préparation

Keywords

Microalgae; Herbicides; Natural dissolved organic matter; DOM; Toxicity; Interactions

2.1. Introduction

Pesticides are used to control, destroy and prevent pests and diseases in agriculture (FAO, 2003) when biocides (such as antifouling paints) are toxic products used to kill and control different life-forms (e.g. algae, viruses, animals) (Directive n°98/8/CE, European Union, 1998). These molecules are transferred to nearby rivers by natural phenomena such as soil leaching, runoff, drainage, (Mai *et al.*, 2013), down to estuaries and coastal areas, which play key ecological roles. Indeed, they fulfil many services and functions, both economic (tourism, fishing, aquaculture) and biological (areas of refuge, reproduction, spawning, nursery) (Boehlert & Mundy, 1988, Dauvin *et al.*, 2002). Their importance relies on their ecotone position (transition zone) between terrestrial, fluvial and marine ecosystems.

Coastal and estuarine areas are the ultimate receptacle of anthropogenic and natural inputs, including pesticides and also organic matter from continental ecosystems and rivers (Mitra & Zaman, 2016, Rajasekaran *et al.*, 2005). The terrestrial organic matter inputs (namely allochthonous), composed of particulate (>0.45 µm) and dissolved matter (<0.45 µm), favour biological production. Indeed, organic matter, being mainly dissolved in aquatic ecosystems (Findlay & Sinsabaugh, 2003), constitutes a significant source of organic nutrients (composed of phosphorus, nitrogen, silica among others) essential for coastal and estuarine phytoplanktonic blooms (Gailhard, 2003, Hansell & Carlson, 2014). In addition to terrigenous dissolved organic matter (DOM) inputs, estuarine and coastal environments are also the place where a strong production of autochthonous DOM occurs. Indeed, in temperate latitudes during spring (at the end of phytoplanktonic blooms), summer and autumn, microalgal excretion together with decomposition of dead microalgae by bacteria, are the main sources of autochthonous DOM production (Findlay & Sinsabaugh, 2003). Therefore, production, degradation and fate of DOM are tightly linked to microorganisms including phytoplankton in coastal environments.

Phytoplankton play a key role in marine ecosystems. As primary producers, they synthesize organic carbon through photosynthesis (Hall & Rao, 1999) and are thus at the basis of aquatic food webs (Wetzel, 2001). These planktonic organisms, whose development relies directly on their environment quality, are sensitive to key parameters such as temperature, light and nutrient availability. They could be negatively affected by a high concentration of coloured organic matter due to the decrease of light penetration in the water column (Karlsson *et al.*, 2009), but also by pesticides and more specifically by herbicides due to their mode of action (especially inhibition of photosynthesis; Pesce *et al.*, 2009).

Coastal areas, estuaries and bays such as Arcachon Bay (South-West of France) have been contaminated by diverse pesticides, especially herbicides due to the importance of agriculture in the watershed (Fauvelle, 2012, SOeS, 2015). S-metolachlor (chloroacetanilide), one of the herbicides that are the most applied to corn and other crops (Sjollema *et al.*, 2014), is the fourth most detected molecule in surface waters of French streams (SOeS, 2015). In the Arcachon Bay, contamination footprint showed that together with its metabolites (ESA and OA), S-metolachlor is the most frequently found molecule, and at the highest concentrations (peak concentration of 0.526 $\mu g.L^{-1}$) (REPAR, 2015, Tapie *et al.*, 2016). Its widespread

occurrence in waters raises questions about its toxicity toward aquatic organisms. Despite its mode of action based on inhibition of the synthesis of fatty acids and lipids (Fuerst, 1987, Schmalfuß *et al.*, 1998) and suspected to induce toxic effects on microalgae, most of studies showed toxic effects in the $mg.L^{-1}$ range. For example, Ebenezer and Ki (2013) measured a 50% decrease of chlorophyll *a* levels with 0.423 $mg.L^{-1}$ and 21.3 $mg.L^{-1}$ metolachlor for the marine diatom *Ditylum brightwellii* and the marine chlorophyte *Tetraselmis suecica*, respectively. Thakkar *et al.* (2013) showed a decrease of growth (-9%) and chlorophyll *a* fluorescence (-35%) in the chlorophyte *Dunaliella tertiolecta* after exposure to 5.0 $mg.L^{-1}$ metolachlor. However, some sublethal effects were demonstrated at lower concentrations: Roubeix et al. (2011) observed a significant increase in the quantity of deformed frustules of the microalga *Surirella angusta* (around 20‰) at 5 $\mu g.L^{-1}$ S-metolachlor.

Nautical activities (recreational and fishing) are also at the origin of pollutions caused by biocides used as antifouling coating on boats (Fauvelle, 2012, REPAR, 2015) such as diuron and irgarol. Diuron is a phenylurea, used as antifoam and previously used in agriculture and antifouling paints in France (Directive biocide 98/8/CE and Arrêté du 21/08/2008) and irgarol is a triazine, used in antifouling paints and prohibited in European Union since 2016 (Commission implementing decision n°2016/107 of 27/01/2016). Even though concentrations in the environment, including Arcachon Bay, for these two substances are usually in the $ng.L^{-1}$ range, (Munaron *et al.*, 2012, REPAR, 2015, Tapie *et al.*, 2016), Caquet *et al.* (2013) found irgarol up to of 1 $\mu g.L^{-1}$ in the estuary of the Vilaine River in France when Cozic and Durand (2013) measured maximal irgarol and diuron concentrations of 0.82 $\mu g.L^{-1}$ and 2.58 $\mu g.L^{-1}$, respectively, in careening areas of several French ports. Both substances inhibit the photosynthesis, preventing electron transfer between quinones Q_A and Q_B by fixing on the D1 protein in the photosystem II (PSII) (Jones & Kerswell, 2003, Nimbal *et al.*, 1996). Their strong toxicity to microalgae has been documented for several species: Gatidou and Thomaidis (2007) obtained a 96h-EC_{50} for growth (concentration which inhibits growth by 50% after 96h) of 0.6 $\mu g.L^{-1}$ irgarol for the marine diatom *Navicula forcipata* and 5.9 $\mu g.L^{-1}$ diuron for the marine chlorophyte *Dunaliella tertiolecta*. Buma *et al.* (2009) obtained a 72h-EC_{50} for growth and effective quantum yield of 0.116 and 0.230 $\mu g.L^{-1}$ irgarol for the marine chlorophyte *Tetraselmis* sp., when Bao *et al.* (2011) obtained a 96h-EC_{50} for growth of 0.57 $\mu g.L^{-1}$ irgarol and 5.9 $\mu g.L^{-1}$ diuron for the marine diatom *Skeletonema costatum*.

In the environment, other components, like DOM, can influence pesticides, microalgae, and their relationships. Indeed, DOM is well known to influence the transport, fate, bioavailability, biodegradation and toxicity of pesticides in the aquatic environment (Bejarano *et al.*, 2005a). Several studies performed on animals have shown that pesticide toxicity can be increased or decreased with DOM presence, depending on the molecules and organisms tested (see review in Haitzer *et al.*, 1998). For example, Bejarano *et al.* (2005a) showed that a natural DOM concentration around 12 $mgC.L^{-1}$ increased the toxicity of fipronil to the estuarine copepod *Amphiascus tenuiremis* when it decreased the toxicity of chlorpyrifos and chlorothalonil. In the same way, Zhang *et al.* (2016b) showed an increase of monochlorobenzene and 1,2-dichlorobenzene toxicity and a decrease of pentachlorobenzene and hexachlorobenzene toxicity on growth

of the freshwater microalga *Chlorella pyrenoidosa* with Suwannee River Natural Organic Matter (SRNOM - reference material of the International Humic Substances Society (IHSS)) addition (around 10 mgC.L^{-1}). However, to our knowledge, no other study has focused on the cross-impact of herbicides and natural DOM on microalgae. Therefore, this study aimed:

– to evaluate the influence of three herbicides (diuron, irgarol and S-metolachlor), singly and in ternary mixtures, to two marine microalgae;

– to investigate the influence of natural DOM on herbicide toxicity.

Two marine microalgae species (*Chaetoceros calcitrans* and *Tetraselmis suecica*) were exposed during six days to the three herbicides singly and in mixtures, with and without natural DOM concentrated from marine water. The effects were evaluated on growth, photosynthetic efficiency and relative intracellular lipid content. At the same time, the chemical environment (herbicide and nutrient concentrations, dissolved organic carbon concentration (DOC) and DOM optical properties) was also characterized to evaluate the changes during experiments.

2.2. Materials and methods

2.2.1. Chemical preparation

Irgarol (Pestanal®≥ 98.4%; 2-(tert-Butylamino)-4-(cyclopropylamino)-6-(methylthio)-s-triazine), diuron (>98%; 3-(3,4-dichlorophenyl)-1,1-dimethylurea), and S-metolachlor (Pestanal®≥98.4%; 2-chloro-N-(2-ethyl-6-methylphenyl)-N-[(1S)-2-methoxy-1-methylethyl]acetamide), were purchased from Sigma Aldrich. Stock solutions of each (500 mg.L^{-1}) were prepared in pure methanol and diluted in sterile ultrapure water to make working solutions of 0.002 (0.0004% methanol), 0.02 (0.004% methanol), 0.006 (0.0012% methanol) and 0.06 mg.L^{-1} (0.012% methanol) for irgarol and diuron, and 0.02 (0.004% methanol), 0.2 (0.04% methanol), 0.06 (0.012% methanol) and 0.6 mg.L^{-1} (0.12% methanol) for S-metolachlor.

2.2.2. Natural DOM sample

In order to control the DOM concentration in exposure systems, which did not correspond to the environmental concentration at the time of DOM sampling, DOM was concentrated.

For DOM concentration, 91 L of natural seawater were pumped during spring 2015 in Arcachon Bay (France) at Grand Banc site at 1.50 m depth at high tide to avoid influence of freshwater inputs. Immediately after returning to the laboratory, seawater was filtered through 0.45-µm Teflon filter cartridges (Whatman, Polycap™ 75TF) to remove particulate organic matter. All filters were pre-cleaned with methanol (0.4 L) then rinsed firstly with 5 L of ultrapure water (Milli-Q, Millipore) and secondly with the water sample (1 L). The 0.45-µm filtered seawater was first desalted by electrodialysis (ED; EURODIA Aqualyzer pilot EUR2B-10P equipped with Neosepta AMX/CMX membranes from Tokuyama Corporation, Japan). The desalted water was then concentrated by reverse osmosis (RO; TIA pilot

equipped with FILMTEC™ SW30-2540 membrane) about ten times until a final volume of 9.5 L and finally desalted again to reach a salinity of 33 (corresponding to the salinity of f/2 culture medium (Guillard, 1975, Guillard & Ryther, 1962) used to grow marine microalgae). During the steps of concentration (RO) and desalination (ED), the sample temperature was controlled in order to minimize any possible changes of DOM. The maximum temperature reached during the diverse procedures did not exceed 24°C. DOM quality was checked by excitation-emission-matrix (EEM) fluorescence before and after concentration and desalination. Only slight differences of spectra were observed, pointing out that no selective loss nor modification of fluorescent organic compounds occurred during RO/ED proceedings (data not shown). The concentrated and desalted final samples were thus representative of the original ones. More details on the protocols and on the systems used can be found in Huguet (2007) and Huguet *et al.* (2009a). Finally, the concentrations of the three herbicides studied were also measured before and after DOM concentration to verify the absence of high herbicide concentrations in the seawater sample. Details on the pesticide measurement protocol are available in section 2.2.6.2.

2.2.3. Microalgal cultures

The microalgae *Tetraselmis suecica* (CCMP 904, Chlorophyta) and *Chaetoceros calcitrans* (CCMP 1315, Bacillariophyta) were obtained from the Provasoli–Guillard National Center for Marine Algae and Microbiota (NCMA). Microalgal cultures were maintained in sterile f/2 (for *T. suecica*) and f/2-silica medium (for *C. calcitrans*) (Guillard, 1975, Guillard & Ryther, 1962) at 17°C, in a thermostatic chamber ST5+ (POL-EKO-Aparatura®, Poland) at 106 ± 0 µmol.m^{-2}.s^{-1} with a dark:light cycle of 8:16 h. Cultures were non-axenic.

All cultures were grown in 100-mL round borosilicate sterile glass flasks previously heated to 450°C for 6 h and autoclaved 20 minutes at 121°C. For the experiments, cultures (60 mL volume) were inoculated at 20,000 cell.mL^{-1} using stock cultures in exponential growth phase.

2.2.4. Experimental design

Two independent experiments were run during six days (one per species), each composed by a biotic and an abiotic component. For each experiment, the crossed influence of DOM (two conditions) and pesticides (nine treatments per condition including a control) was tested on microalgae, as follows. Half of the flasks was filled with culture medium when the other half was filled with culture medium and DOM added at twice the environmental concentration. Nutrient enrichment was adjusted in both conditions (with and without DOM) to obtain the same final concentrations in all flasks. Each condition (culture medium and culture medium + DOM) included a control treatment (no pesticide) in quadruplicate plus eight pesticide treatments in triplicate: irgarol at 0.05 (I0.05) and 0.5 (I0.5) µg.L^{-1}, diuron at 0.05 (D0.05) and 0.5 (D0.5) µg.L^{-1}, S-metolachlor at 0.5 (S0.5) and 5 (S5) µg.L^{-1} and their mixtures: M1 (I0.05+D0.05+S0.5) and M2 (I0.5+D0.5+S5). The highest methanol concentration reached in the flasks (for M2 treatment) was 0.0012%. This concentration was already shown as not harmful for these two species (Dupraz *et al.*, 2016).

The abiotic component, i.e. no microalgae were added to the flasks, was composed by the same treatments and conditions than biotic component. The number of replicates was only one replicate for each treatment in the condition "culture medium" and duplicates for each treatment in the condition "culture medium + DOM".

During each experiment, samples were taken for biological and chemical analyses. The biological parameters monitored were: cell density (measured daily throughout the experiments), photosystem II effective quantum yield (measured on the last day) and relative intracellular lipid content (measured on the last day). The chemical parameters monitored were: nutrient concentrations, herbicide concentrations, dissolved organic carbon (DOC) concentrations and DOM optical properties. They were measured on the first and last days of each experiment. The protocols are described in the following sections.

2.2.5. Biological parameters

2.2.5.1. Measurements by flow cytometry

Culture samples were analyzed on an Accuri C6 flow cytometer (Becton Dickinson Accuri™) equipped with a blue (488 nm) and a red (640 nm) laser, as described in Dupraz *et al.* (2016).

2.2.5.1.1. Growth rate

To measure the cell density, 300 µL from all the cultures were daily sampled and fixed using glutaraldehyde (final concentration 0.25%). Tubes were mixed and left for 15 minutes at room temperature in the dark before analysis. Cells were counted on a side scatter (SSC) versus FL3 (red fluorescence, >670 nm) cytogram for *C. calcitrans* and a FL1 (green fluorescence, 530/30 nm) versus FL4 (red fluorescence, 675/25 nm) cytogram for *T. suecica* (Dupraz *et al.*, 2016). For each culture, the average growth rate (µ, h^{-1}), corresponding to the slope of regression line from ln(cell.mL^{-1}) vs time (h), was calculated.

2.2.5.1.2. Relative intracellular lipid content

The relative intracellular lipid content ($FL1_{Lipids}$) was estimated on the last day of experiments by the use of the green lipophilic fluorochrome BODIPY$^{505/515}$ (Life Technologies®, Carlsbad, CA, USA), following the protocol used by Dupraz *et al.* (2016). Briefly, for each culture, 200-µL samples were stained with a BODIPY$^{505/515}$ working solution at 3 mg.L^{-1} for *C. calcitrans* and 4.8 mg.L^{-1} for *T. suecica* leading to final BODIPY concentrations of 75 µg.L^{-1} (2.5% DMSO) and 120 µg.L^{-1} (2.5% DMSO), respectively. Stained samples were incubated at room temperature in the dark during 5 minutes for *C. calcitrans* and 6 minutes for *T. suecica*. FL1 values of cells (unstained cells and cells stained with BODIPY) were normalized using FL1 values of 2 µm-fluorescent polystyrene microspheres (Flow Check™ High Intensity Alignment Grade Particles 2.00 µm, Polysciences Inc., Warrington, PA, USA), added in all samples prior to analysis. The normalization is resumed with the formula:

$$FL1_{Lipids} = (FL1_{stained\ microalgae}/FL1_{stained\ microsphere})/(FL1_{unstained\ microalgae}/FL1_{unstained\ microsphere})$$

2.2.5.2. Photosystem II effective quantum yield - Photosynthesis

The PSII effective quantum yield (operational PSII quantum yield, Φ'_M) was measured on the last day of experiments by Pulse-Amplitude Modulated (PAM) fluorescence using an Aquapen-C AP-C 100 fluorometer (Photon System Instruments®, Drasov, Czech Republic). Measurements were made in 1-cm wide cuvettes using 2 mL of microalgal cultures diluted (1:2) in culture medium. Three Φ'_M measurements, which were averaged, were performed for each culture.

2.2.6. Chemical analyses

Nutrient analyses were performed for all conditions and treatments. Pesticides were analyzed in all control (no pesticide added) replicates, including abiotic flasks, and in the highest concentrations tested (I0.5, D0.5, S5 and M2). DOM was characterized in all biotic and abiotic control (no pesticide) replicates and in the pesticide treatments that significantly impacted the microalgae.

Chemical analyses were performed on the first and last days of each experiment, on filtered samples. 55-mL samples were filtered using sterile filtration funnels containing a 0.45-µm PES (polyethersulfone) filter (VWR, USA), previously rinsed with ultrapure water (0.7 L). On the first day of each experiment, one additional flask was prepared for each treatment in addition to the replicates, in order to provide sufficient volume for analyses of nutrients and DOM characterization. This additional flask was immediately entirely sampled.

2.2.6.1. Nutrient analyses

For nitrate and orthophosphate analyses, 15 mL (out of 55 mL) of the filtered culture samples were diluted 20-fold with ultrapure water before injection. Analyses were performed by ionic chromatography with chemical suppression (COMPACT 881 IC Pro, Metrohm, Switzerland) equipped with a Metrohm 850 IC Conductivity Detector. The separation was performed with a Metrosep A Supp 4/5 Guard/4.0 pre-column followed by a Metrosep A sup 5 -250/4.0 anion exchange column. The eluent was a solution of 3.2 mM Na_2CO_3 and 1 mM $NaHCO_3$, and the chemical suppressor was a solution of 10 mM H_2SO_4. Quantification limits were 0.010 $mg.L^{-1}$ for nitrates and 0.005 $mg.L^{-1}$ for orthophosphates.

For silicate analysis, 20 mL were sampled from the additional flask of each treatment on the first day, and 5 mL per quadruplicate of each treatment were pooled on the last day of experiments. Soluble silicate concentrations were determined by colorimetric method with a Shimadzu UV-1800 spectrophotometer (Shimadzu Inc., Kyoto, Japan) according to the French standard NF T90-007 (AFNOR, 2001). The quantification limit was 0.05 $mg.L^{-1}$. Silicates were only analyzed in samples from the experiment with *C. calcitrans*.

2.2.6.2. Pesticide analyses

One hundred microlitres of filtered culture samples were diluted 10-fold using ultrapure water. 40 µL of diluted samples were directly analyzed by liquid chromatography (1290 Infinity system from Agilent Technologies, USA) coupled to tandem mass spectrometer (6460 triple quadrupole LC/MS system from Agilent Technologies, USA) and after adding internal standards (irgarol-D9, diuron-D6, metolachlor-D6). The separation was performed using a Kinetex C18 column and using a gradient of solvent A (solution of 5 mM acetate ammonium and 0.1% acetic acid diluted in water ultrapure) and B (pure methanol) with a flow rate of 0.5 $mL.min^{-1}$. Analyses of the three pesticides and their metabolites (only for diuron and S-metolachlor) were performed in MRM (multiple reactions monitoring) mode. Quantification limits were 0.24 $ng.L^{-1}$ for irgarol, 1.19 $ng.L^{-1}$ for diuron, 4.43 $ng.L^{-1}$ for DCPMU (1-(3,4-dichlorophenyl)-3-methylurea), 5.29 $ng.L^{-1}$ for 1,2,4-DCPU (1-(2,4-dichlorophenyl)urea), 4.26 $ng.L^{-1}$ for 1,3,4-DCPU (1-(3,4-dichlorophenyl)urea), 1.11 $ng.L^{-1}$ for S-metolachlor, 1.23 ng L^{-1} for metolachlor OA ([(2-ethyl-6-methylphenyl)(1-methoxy-2-propanyl)amino](oxo)acetic acid) and 3.13 $ng.L^{-1}$ for metolachlor ESA (2-[(2-ethyl-6-methylphenyl) (2-methoxy-1-methylethyl)amino]-2-oxo-ethanesulfonic acid).

2.2.6.3. DOM characterization

After filtration through 0.45 µm, all experimental samples were stored at 4°C in the dark until DOM analyses. To characterize the DOM evolution over time in control cultures and cultures exposed to I0.5 and M2, DOC concentrations were determined and optical analyses (absorbance and fluorescence) were performed. In order to compare the evolution of each parameter over time between the different conditions (with and without DOM), results were expressed as the variation between the last and the first days of experiments ($value_{last\ day}$ - $value_{first\ day}$).

2.2.6.3.1. Dissolved organic carbon (DOC)

The DOC concentrations were determined using a Total Organic Carbon analyzer (Shimadzu TOC-V CSN, Japan), calibrated with solutions of potassium hydrogen phthalate ($C_6H_4(COOK)(COOH)$) and run in non purgeable organic carbon (NPOC) mode. Ten millilitres of filtered culture samples were acidified with 2 M hydrochloric acid then sparged during 6 minutes with high purity (5.0) synthetic air (LINDE, France). The DOC concentration result is the mean of the three to four injections most satisfying in terms of variation coefficient (<2%). At least two certified reference waters (Environment Canada purchased by ANALAB) were systematically analyzed within each sample series in order to validate DOC measurements. Results of concentration variations during the experiment were expressed per microalgal cell.

2.2.6.3.2. Absorbance analyses

Four-millilitre samples of filtered cultures were used for absorbance measurements performed with a Jasco V-560 spectrophotometer (JASCO, France) equipped with deuterium and tungsten iodine lamps. Samples

were placed in a 1-cm path length fused silica cell (Hellma). The light absorbing properties of DOM were studied via two optical indices: the Specific UV Absorbance ($SUVA_{254}$) and the spectral Slope Ratio (S_R). The $SUVA_{254}$ ($L.mg.C^{-1}.m^{-1}$) index provides information on the aromatic character of DOM (Weishaar *et al.*, 2003); it is calculated as the ratio between UV absorbance at 254 nm and DOC concentration ($mg.L^{-1}$). The S_R parameter, used as a proxy for molecular weight variation, corresponds to the ratio between the spectral slopes of the 275–295 nm region and the 350–400 nm region of the absorbance spectrum (Helms *et al.*, 2008).

2.2.6.3.3. EEM spectroscopy analyses

Four-millilitre samples of filtered cultures were used, after absorbance, for fluorescence measurement. The EEM spectra were recorded using a Fluorolog FL3-22 fluorometer (Horiba Jobin Yvon, France) equipped with a xenon lamp (450 W) and a double monochromator at both the excitation and the emission sides. Samples were contained in a 1-cm path length quartz cuvette (Hellma), thermostated at 20°C. The EEM spectra were composed of seventeen emission spectra acquired from 260 to 700 nm (with an increment of 1 nm and an integration time of 0.5 second) with excitation wavelengths in the range of 250 to 410 nm (with an increment of 10 nm). Each spectrum obtained was corrected by subtracting an ultrapure water blank spectrum to eliminate water Rayleigh and Raman scattering peaks. Spectra were also corrected instrumentally as previously detailed Huguet *et al.* (2009b). EEM spectra allowed the characterization of DOM and its evolution during the experiments. Two fluorescence parameters were more particularly monitored in this work: HIX (or humification index) and BIX (or biological index). The HIX index, used to characterize DOM humification and related to aromaticity (Zsolnay *et al.*, 1999), was calculated as the ratio of the area from emission wavelength 435 to 480 nm divided by the area from emission wavelength 300 to 345 nm for an excitation wavelength of 250 nm. The BIX index (Huguet *et al.*, 2009b) is an indicator of recent autochthonous production of DOM; it was calculated as the ratio of emission intensity at 380 nm divided by emission intensity at 430 nm for an excitation wavelength of 310 nm.

2.2.7. Statistical analyses

For each experiment, one-way ANOVAs were performed on each condition (with and without DOM) to detect significant differences in growth rate, $FL1_{Lipids}$ ratio and photosynthetic efficiency between control and herbicide-exposed cultures (with a p-value <0.05 considered as statistically significant). When significant differences were detected, a Tukey post-hoc test was performed.

Evolution of nutrient and pesticide concentrations over time were assessed with Student's t-test or Welch's t-test (with a p-value <0.05 considered as statistically significant) after having checked the homoscedasticity with Fisher's F-test. The DOM characterization results of herbicide-exposed conditions were compared to control conditions with the same statistical tests used for nutrients and pesticides.

When the result was not significant although data suggested a trend, the type II error β was calculated, corresponding to the probability to wrongly accept the null hypothesis. All statistical analyses were

performed with R 3.2.2. (Ihaka & Gentleman, 1996) and all graphs were performed with SigmaPlot® 12.0 software (Systat Software Inc., USA).

2.3. Results

2.3.1. Herbicide concentrations

Chemical analysis of the concentrated DOM sample showed the absence of irgarol, diuron and its metabolites, and the presence of S-metolachlor (concentration of 9.7 ng.L^{-1} in the extract, corresponding to 1.94 ng.L^{-1} in the "culture medium + DOM" flasks). S-metolachlor metabolites were also quantified: 793 ng.L^{-1} for ESA and 393 ng.L^{-1} for OA in DOM extract, corresponding to expected concentrations around 160 ng.L^{-1} and 80 ng.L^{-1}, respectively, in the "culture medium + DOM" flasks.

On the first day of experiments, irgarol, diuron and S-metolachlor were not found in controls (biotic and abiotic, data not shown), but ESA and OA metabolites were detected in all conditions and treatments containing DOM (around 150 ng.L^{-1} for ESA and 127 ng.L^{-1} for OA, data not shown). In abiotic components with and without DOM, the measured concentrations of the three herbicides, singly and mixed, were in the same range in the highest pesticide treatments: between 480 and 565 ng.L^{-1} for irgarol (Figure 50A) compared with the theoretical concentration of 500 ng.L^{-1}, between 515 and 645 ng.L^{-1} for diuron (Figure 50B), slightly above the theoretical concentration of 500 ng.L^{-1}, and between 4680 and 4930 ng.L^{-1} for S-metolachlor (Figure 50C), close to the theoretical concentration of 5000 ng.L^{-1}. In the flasks with microalgae, the measured concentrations of the three herbicides at day 0 were significantly lower than concentrations in abiotic flasks. Irgarol concentrations were between 240 and 290 ng.L^{-1} in I0.5 and M2 of both conditions for *C. calcitrans* (Figure 50A). For *T. suecica* cultures without DOM, irgarol concentrations were 116 ± 2 ng.L^{-1} in I0.5 and 212 ± 1 ng.L^{-1} in M2, and around 183 ng.L^{-1} with DOM. For diuron, concentrations were quite similar and ranged from 320 to 430 ng.L^{-1} for the two species in both treatments, with and without DOM (Figure 50B). No diuron metabolites were detected at day 0. S-metolachlor concentrations were similar between conditions with and without DOM for S5 and M2: around 3000 ng.L^{-1} for *C. calcitrans* and 2260 ng.L^{-1} for *T. suecica*. ESA and OA metabolites were detected in cultures where DOM was added, at concentrations in the same range than for controls (around 155 ng.L^{-1} for ESA metabolite and 130 ng.L^{-1} for OA metabolite, data not shown) and remained similar until the end of experiment.

A significant decrease of concentrations of the three herbicides was observed over time in the abiotic component for the condition without DOM: around -37% for irgarol, -25% for diuron and -15% for S-metolachlor in treatments with single molecules. In the abiotic component with DOM, whereas a decrease of -22% over time was observed for irgarol singly and mixed, no significant difference was observed for diuron and S-metolachlor between the first and last days. In flasks containing microalgae, no concentration variations over time were observed for irgarol except in I0.5 with *C. calcitrans* cultures containing DOM (-49%). Diuron concentrations did not significantly evolve over time for both conditions in *C. calcitrans*

cultures while for *T. suecica*, a decrease around -59% was observed only in D0.5 with and without DOM, but not in mixture. No diuron metabolites were detected at the end of experiments. Finally, for both species no loss in S-metolachlor concentration was observed over time in S5 but a significant increase of the concentration was shown during the experiment for M2 (concentration at the end of experiments around 4270 $ng.L^{-1}$). No S-metolachlor metabolites were detected over the experiment in abiotic and biotic conditions without DOM.

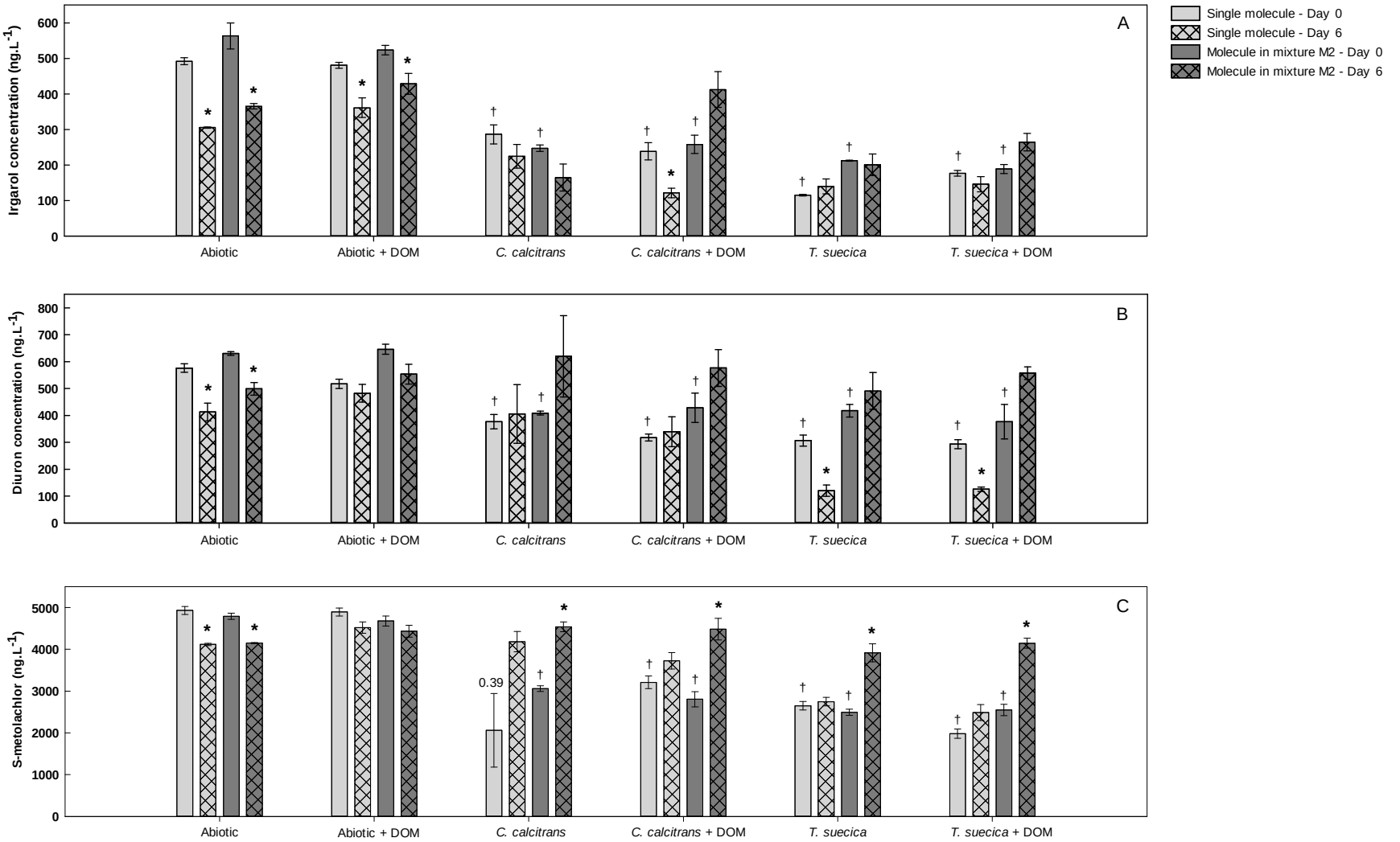


Figure 50: Herbicide concentrations in the highest treatments of irgarol (A), diuron (B) and S-metolachlor (C), singly and in mixture M2, in abiotic and biotic components on the first and last days. All values are mean values (± standard error, SE); n=2 for abiotic system without DOM (for each treatment, mean from two samples: the one from *C. calcitrans* experiment and the one from *T. suecica* experiment), n=4 for abiotic system with DOM (for each treatment, mean from four samples: two from *C. calcitrans* experiment and two from *T. suecica* experiment) and n=3 for biotic systems (triplicates for each species). † indicates significant differences between biotic and abiotic conditions on day 0 and * indicates significant differences between day 0 and day 6 for a given treatment (t-test, * and † $p<0.05$). The numeric value indicates the β value.

2.3.2. Nutrients

On the first day of experiments, nutrient concentrations in conditions with and without DOM were in the same range: around 60 $mg.L^{-1}$ nitrates, around 1.6 $mg.L^{-1}$ orthophosphates and 22 $mg.L^{-1}$ silicates (Figure 51). Due to conservation problems, no orthophosphate data are available for *T. suecica*.

Nutrient concentrations were similar and stable over time in the abiotic component (data not shown). In *C. calcitrans* cultures at the end of experiment, nitrate (Figure 51A) and orthophosphate (Figure 51B) concentrations decreased more in the control flasks with than without DOM addition. In *C. calcitrans* cultures exposed to pesticides without DOM, no significant difference was detected between controls and herbicide-exposed cultures at the end, while for I0.5 and M2 no decrease over time was observed (β risk= 0.63 for I0.5 and 0.76 for M2). In cultures with DOM, nitrate decrease over time was the same than in the controls except for I0.05 (-26% vs. -42% in controls compared to the first day), I0.5 and M2 (where no decrease was observed over time). For orthophosphates, no significant difference with controls was observed in the condition without DOM. In the condition with DOM, orthophosphates were almost entirely consumed except for I0.5 and M2 (no variations over time). For the silicates, the decrease was similar between controls with and without DOM (around 50%) (Figure 51C). In the condition without DOM, this decrease seemed lower under pesticide exposure especially for I0.5 and M2, compared to the controls. With DOM addition, no difference with controls was observed after 7 days (-63% vs. -50% for controls), except for M2, where no decrease occurred over the experiment duration.

In *T. suecica* cultures, a striking decrease in nitrates over time was observed in almost all cultures, with and without DOM (around -91% and -85% in controls, respectively), except for those exposed to I0.5 (-17% without DOM and no decrease with DOM), D0.05 with DOM (-87%), D0.5 (-72% without DOM and -65% with DOM), M1 with DOM (-77%) and M2 (-55% without DOM and no decrease with DOM) (Figure 51D).

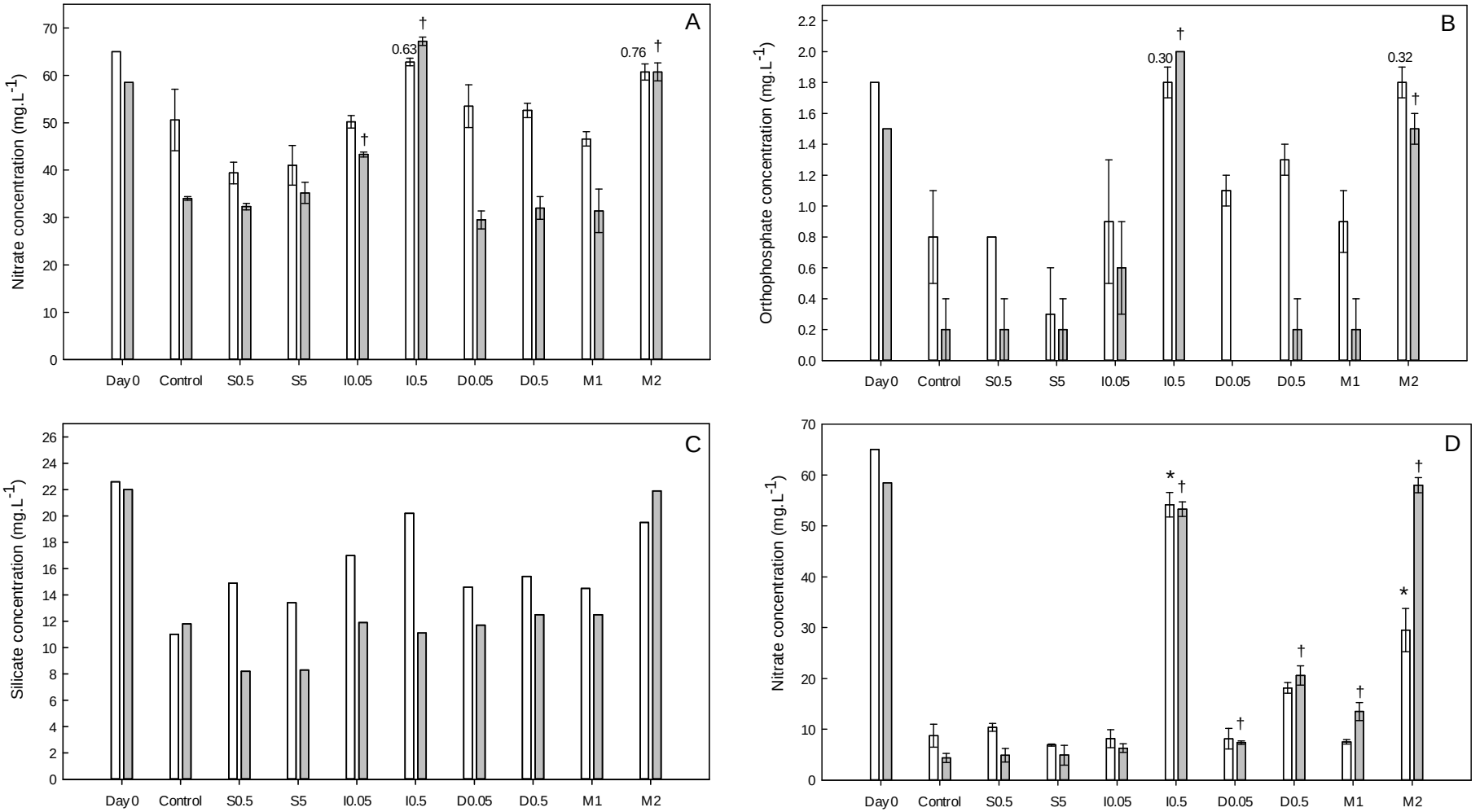


Figure 51: Mean (± SE) concentrations of nitrates, orthophosphates and silicates on the first and last days of experiments for *C. calcitrans* (A, B and C) and *T. suecica* (D) in conditions without DOM (white bars) and with DOM (grey bars) (for NO_3^- and PO_4^- on the last day, n=4 for controls and n=3 for herbicide-exposed cultures; otherwise n=1). * and † indicate significant differences between controls and herbicide-exposed treatments for conditions without DOM and with DOM, respectively (t-test, * and † $p<0.05$). The value indicates the β value.

2.3.3. Pesticide effects on microalgae

2.3.3.1. Pesticide effects without DOM addition

Among concentrations and mixtures tested, only I0.5 and M2 had significant and similar effects on all physiological parameters studied on *C. calcitrans*: an inhibition of growth rate (about -56%), a decrease in the ratio of relative lipid content (-50%) and an inhibition of photosynthetic efficiency (-28%) (Figure 52A). Effects were also observed on μ (-11.3 ± 3.9%) and on the $FL1_{Lipids}$ ratio (+28.6 ± 14.7%) in cultures exposed to I0.05. Likewise for *T. suecica* (Figure 52B), I0.5 and M2 treatments showed significant decreases for μ (-56.4 ± 0.9% and -62.6 ± 1.0%, respectively), $FL1_{Lipids}$ ratio (-32.0 ± 1.8% and -25.7 ± 2.5%, respectively) and Φ'_M (-22.0 ± 0.4% and -28.0 ± 0.4%, respectively). A slight decrease of Φ'_M was also observed with D0.5 (-2.7 ± 0.4%).

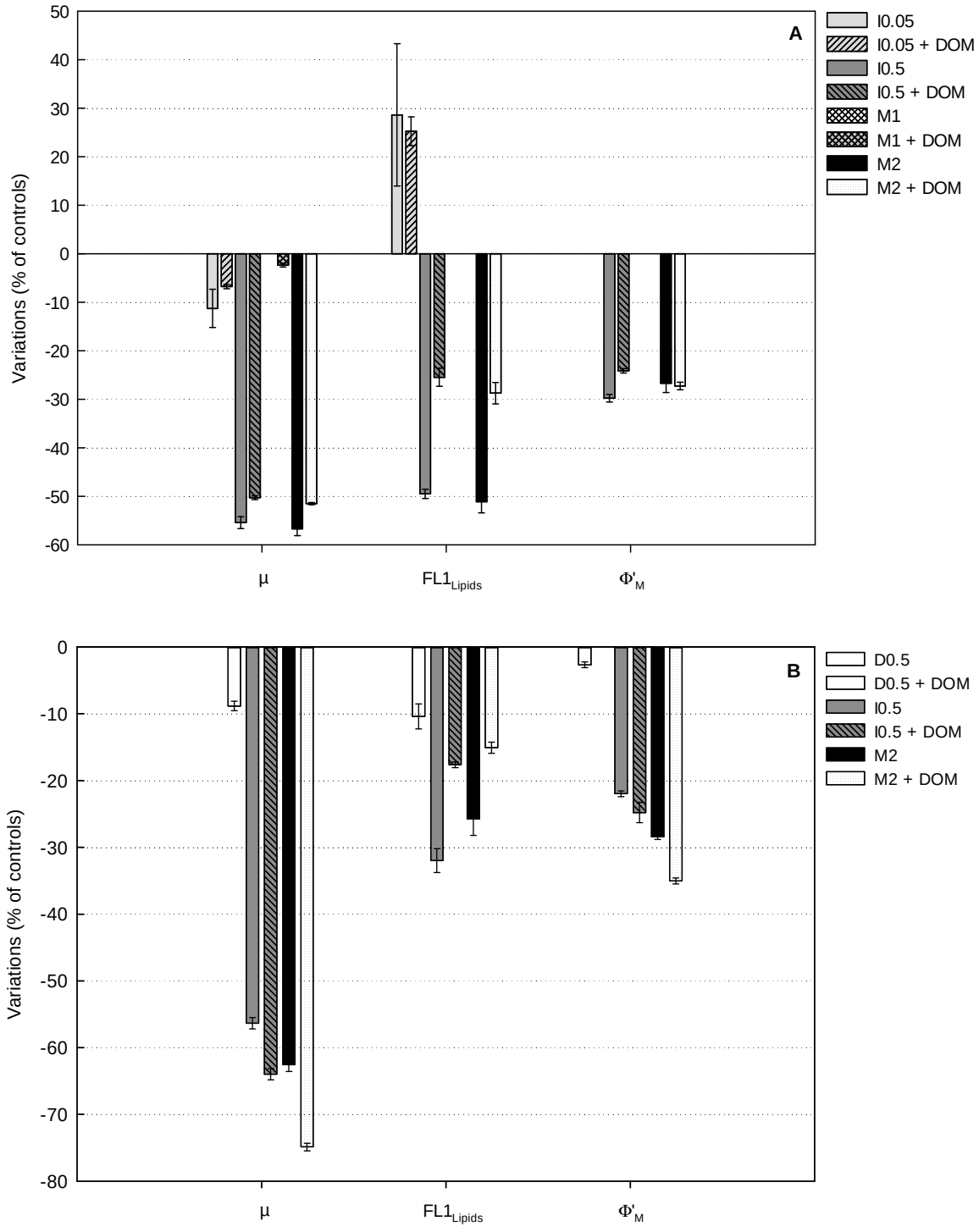


Figure 52: Percentage variation in biological endpoints (mean ± SE) of *C. calcitrans* cultures (A) and *T. suecica* cultures (B) exposed to herbicides, compared with respective controls (without and with DOM). Only significant effects (ANOVAs, $p<0.05$) on growth rate (μ), relative lipid content ($FL1_{Lipids}$) and photosynthetic efficiency (Φ'_M) after exposure to irgarol (I), diuron (D) and S-metolachlor (S), alone and in mixtures (M) are shown. Negative values correspond to an inhibition, while positive values indicate stimulation compared to the controls.

2.3.3.2. Pesticide effects with natural DOM addition

DOM addition to the control cultures of *C. calcitrans* increased significantly μ (+9.6 ± 0.5%) and decreased $FL1_{Lipids}$ ratio (-38.6 ± 1.8%) and Φ'_M (-1.7 ± 0.3%), compared to the controls without DOM (Table 16). For *T. suecica*, only the $FL1_{Lipids}$ ratio tended to increase with DOM (high β = 0.84).

Table 16: Growth rate (μ), relative intracellular lipid content ($FL1_{Lipids}$ ratio) and operational yield (Φ'_M) obtained on the last day of experiments for control cultures of *C. calcitrans* and *T. suecica* with and without DOM. All values are mean values (± SE; n = 4) and * indicates significant differences between treatments (t-test, * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$). The value in brackets indicates the β value.

	Chaetoceros calcitrans		*Tetraselmis suecica*	
	Without DOM	With DOM	Without DOM	With DOM
μ (h^{-1})	0.035 ± 0.000	0.038 ± 0.000 ***	0.026 ± 0.001	0.026 ± 0.000
$FL1_{Lipids}$ ratio	248 ± 20	153 ± 5 **	75 ± 3	79 ± 2 (0.84)
Φ'_M	0.76 ± 0.01	0.74 ± 0.00 (0.78)	0.78 ± 0.00	0.78 ± 0.00

Exposure to irgarol, or to mixture M2, significantly inhibited the growth (μ) of *C. calcitrans* with DOM: -50.3 ± 0.4% at I0.5 and -51.5 ± 0.2% with M2 (Figure 52A). $FL1_{Lipids}$ ratio was significantly enhanced in I0.05 treatment (+25.2 ± 3.0%), when it decreased with I0.5 and M2 (around -27% for both); Φ'_M was significantly affected in I0.5 treatment (-24.1 ± 0.4%) and M2 (-27.3 ± 0.8%). For *T. suecica* with DOM, μ and $FL1_{Lipids}$ ratio decreased significantly with the highest concentrations of diuron, irgarol and mixture. Algal growth inhibition was -9% for D0.5, and reached -64% with I0.5 and -75% with M2. Likewise, the $FL1_{Lipids}$ ratio was significantly impacted: -10% with D0.5, -18% with I0.5 and -15% with M2 (Figure 52B). Φ'_M decreased significantly with I0.5 (-24.8 ± 1.5%) and M2 (-35.0 ± 0.4%) exposure.

2.3.4. DOM characterization in the treatments with drastic effects on microalgae

For both microalgal species, the exposure to the highest concentrations of irgarol (I0.5) and mixture (M2), which induced significant inhibition of the three biological parameters studied, were subsequently selected for DOM characterization.

First, the DOC concentration variation was measured over the experiments. In *C. calcitrans* (Figure 53A) and *T. suecica* controls (Figure 53B) of both conditions (with and without DOM), ΔDOC concentration per algal cell increased in the same way during the experiments. Under pesticide exposures without DOM, ΔDOC was significantly higher than in the controls for I0.5 treatment (+18.5 $pgC.cell^{-1}$ for *C. calcitrans* and +10.8 $pgC.cell^{-1}$ for *T. suecica*); a similar trend was observed for M2, although statistical tests were not significant (β risk = 0.77 for *C. calcitrans* and 0.33 for *T. suecica*). No such significant increase was

demonstrated after DOM addition in *C. calcitrans* exposed to I0.5 and M2. For *T. suecica*, ΔDOC was not statistically different from the controls for I0.5 exposure, whereas a high and significant increase of ΔDOC concentration per cells was found for M2 exposure (+31.8 ngC.cell^{-1}).

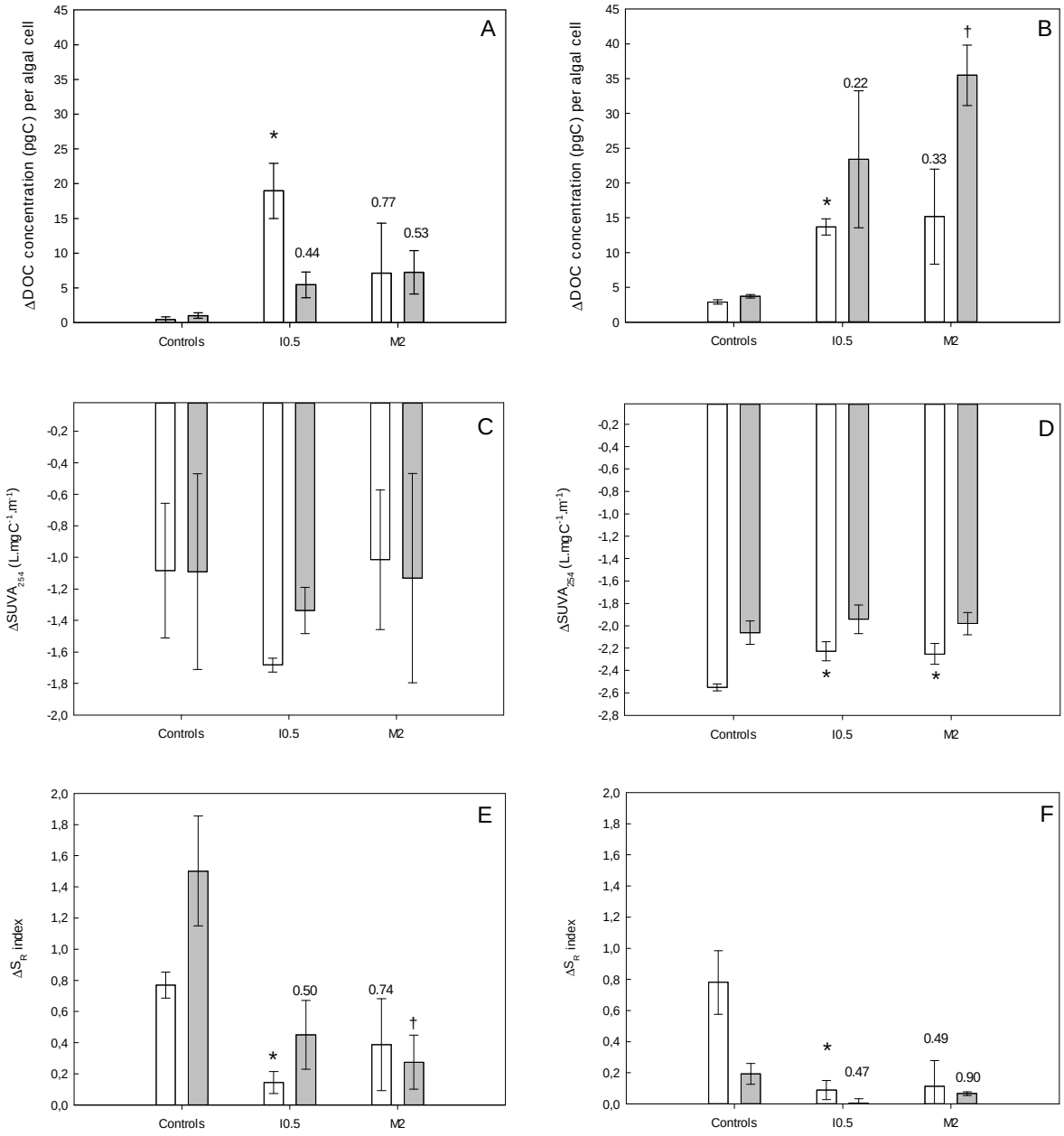


Figure 53: Evolution, over the experiments (Δ), of dissolved organic carbon concentration (DOC, in pgC.cell^{-1}; A and B), $SUVA_{254}$ (in L.mgC^{-1}.m^{-1}; C and D) and S_R (E and F) parameters for controls, I0.5 and M2 treatments in *C. calcitrans* (A, C and E) and *T. suecica* (B, D and F) cultures. All values are mean variations between day 6 (n = 4 for controls and n = 3 for I0.5 and M2, ± SE) and day 0 (n = 1). * and † indicates significant differences between controls and exposed cultures in treatments without DOM and with DOM addition, respectively (t-test, * and † $p < 0.05$). The values indicate the β risk.

The $SUVA_{254}$ index decreased between the first and last day of experiments in all cultures (controls and exposed to I0.5 and M2) for both microalgal species (Figure 53C and D). With or without DOM, pesticide exposure did not impact the $\Delta SUVA_{254}$ in *C. calcitrans* cultures. In *T. suecica* cultures without DOM and exposed to I0.5 and M2, $\Delta SUVA_{254}$ was significantly reduced (to about -2.24 $L.mgC^{-1}.m^{-1}$ as compared to the controls: -2.55 ± 0.03 $L.mgC^{-1}.m^{-1}$). No significant difference was observed in $\Delta SUVA_{254}$ between herbicide-exposed cultures and controls in condition where DOM was added.

The S_R index increased during experiment in all treatments for both species (Figure 53E and F). Without DOM, ΔS_R increase was significantly lower with irgarol exposure (I0.5) for both species: -81% of the control value for *C. calcitrans* and -88% for *T. suecica*; no significant difference was observed with M2 although a similar trend can be suspected (β risk = 0.74 and 0.49 for *C. calcitrans* and *T. suecica*, respectively). With DOM addition, S_R differed significantly only for *C. calcitrans* under M2 exposure.

The HIX index (humification index) decreased during the experiment in all treatments without DOM, and no significant difference was observed between control and pesticide-exposed cultures (high β errors for M2 treatments: 0.81 for *C. calcitrans* and 0.86 for *T. suecica*) (Table 17). With DOM in the cultures, this index also decreased in the controls over time for both species, while it increased significantly (positive ΔHIX values) in *C. calcitrans* cultures exposed to M2 and in *T. suecica* exposed to I0.5 and M2 treatments. Finally, BIX index (biological index) increased for all *C. calcitrans* treatments with and without DOM, with no difference between controls and pesticide-exposed cultures, when no variation occurred over time in *T. suecica* cultures, whatever the condition and treatment.

Table 17: Evolution (Δ) of DOM fluorescence parameters (HIX: humification index and BIX: biological index) between the last and first days of experiments for controls, I0.5 and M2 treatments. All values are mean variations between day 6 (n = 4 for controls and n = 3 for I0.5 and M2 ± SE) and day 0 (n = 1).* indicates significant differences with their respective controls (t-test, * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$). The value in brackets indicates the β risk.

		Chaetoceros calcitrans		*Tetraselmis suecica*	
		Without DOM	With DOM	Without DOM	With DOM
Δ HIX	Controls	-0.37 ± 0.15	-0.76 ± 0.40	-1.11 ± 0.06	-0.54 ± 0.10
	I0.5	-0.37 ± 0.06	-0.55 ± 0.26 (0.95)	-1.07 ± 0.08	0.44 ± 0.17 **
	M2	-0.62 ± 0.11 (0.81)	0.66 ± 0.14 *	-1.01 ± 0.06 (0.86)	0.58 ± 0.23 **
Δ BIX	Controls	0.11 ± 0.01	0.10 ± 0.03	-0.04 ± 0.05	0.01 ± 0.01
	I0.5	0.10 ± 0.01	0.06 ± 0.01 (0.65)	-0.02 ± 0.01	0.01 ± 0.00
	M2	0.08 ± 0.01 (0.70)	0.06 ± 0.01 (0.65)	-0.03 ± 0.01	0.01 ± 0.00

2.4. Discussion

The aim of this study was to investigate the influence of natural DOM on the toxicity of three herbicides, irgarol, diuron and S-metolachlor, singly and in mixtures, to two marine microalgae, *Chaetoceros calcitrans* and *Tetraselmis suecica*. The effects were assessed on growth, intracellular lipid content and

operational photosynthetic yield. At the same time, chemical parameters were also monitored to characterize pesticide exposures and DOM.

2.4.1. Pesticide concentrations

Pesticides analyses on concentrated DOM, which showed an absence of irgarol and diuron (+metabolites) and a presence of S-metolachlor and its metabolites (ESA and OA), were in accordance with the results of parent-molecule analyses realised on water sample (before the concentration and desalination), where only S-metolachlor was found (2.8 $ng.L^{-1}$). These results were also in accordance with literature, which showed that chemical footprint in Arcachon Bay was dominated by S-metolachlor and its metabolites due to the agricultural practices in the watershed (Dagens, 2012, REPAR, 2015, Tapie *et al.*, 2016). On the other hand, due to previously reported occurrence of various molecules in the sampling area (such as acetochlor, not analysed in this study ; REPAR, 2015), we can not exclude their presence in our concentrated DOM sample.

In the experiments, pesticide analyses were performed on samples from maximal concentration treatments on the first and last days of experiments. Results showed that measured concentrations were in accordance with nominal ones in abiotic experiments with and without DOM. Inversely, concentrations measured in flasks containing microalgae of both conditions with and without DOM were lower than expected: around -38% for diuron, -46% for S-metolachlor, and -50% (*C. calcitrans*) to -67% (*T. suecica*) for irgarol compared to concentrations in abiotic experiments. Two hypotheses can explain these results: an almost instantaneous adsorption of the molecules on the cell wall of microalgae and/or a very fast internalization into cells. Indeed, these three substances have high log K_{ow}: 2.9 for diuron, 3.4 for S-metolachlor and 4.0 for irgarol (Belles, 2012, Tetko *et al.*, 2005). This parameter, namely octanol/water partition coefficient, is the measurement of differential solubility of a given molecule in octanol and water. Cell walls are composed of lipids (phospholipids, lipoproteins and free fatty acids), polarity of which is similar to octanol. For this reason, log K_{ow} is used to assess the lipophilic character (affinity with cell walls) of molecules (Amiard, 2011). Based on their log K_{ow}, the three molecules studied can be considered as nonpolar, lipophilic and bioaccumulative. The cell-wall affinity of these three molecules can thus be classified as follows: diuron < S-metolachlor < irgarol and seems to correspond well with the differences observed between abiotic and biotic flasks. The variation observed for irgarol between the two species can be explained by the different composition of cell wall. Indeed, the cell wall of the chlorophyte *T. suecica* is a smooth surface rich in lipids in direct contact with the environment (Chrétiennot-Dinet, 1990), suggesting a higher affinity of irgarol for these cells, on the contrary to *C. calcitrans*: this diatom has a cell wall (namely frustule) essentially composed of silicate and covered of organic coating (Round *et al.*, 2007, Tesson & Hildebrand, 2013) for which irgarol would have a lower affinity. This adsorption on the cells could also be combined with a fast internalization of the molecules into the cells. Indeed, Nestler *et al.* (2012) showed that an inhibition of Φ_{PSII} took place only 1-2 minutes after addition of diuron to *Chlamydomonas reinhardtii* cultures, suggesting a very rapid internalization of the molecule. Given the lapse of time between addition of herbicides to the cultures, sampling and filtration (up to 2-3 hours), we can hypothesize

that diuron molecules could have been, at least partly, internalized. No quantitative estimate of loss due to this phenomenon can be given, but Chaumet *et al.* (2016) showed that the equilibrium between diuron concentrations internalized into cells (in biofilms) and in the water can be reached within 2 hours. For the two other molecules, there are no data available in the literature to verify this hypothesis of very fast internalization.

At the end of experiments, losses over time were observed for all molecules in abiotic component without DOM. It could be due to adsorption of compounds on walls of borosilicate glass flasks or/and to their volatilisation in the headspace of flasks. In the abiotic component with DOM, no variations were observed for diuron and S-metolachlor concentrations compared with initial concentrations. The pesticide analyses were performed on total dissolved fraction, including the part of pesticides possibly adsorbed or bound to DOM. Given the results, it seemed therefore that pesticides and DOM were rather associated, what prevented their adsorption on glass walls (higher affinity of pesticides for DOM components) or their volatilization. Losses of irgarol over time were also observed in condition with DOM, although to a lesser extent than in the condition without DOM (-21% with DOM vs. -36% without DOM). In the same way, interaction with DOM could have occurred and probably limited adsorption and volatilization but less efficiently compared to diuron and S-metolachlor. As no metabolites were found at the end of experiments for the latter (except S-metolachlor metabolites brought by natural DOM), the losses were probably also due to an abiotic degradation of parent-compounds (photodegradation and/or hydrolyse). As for irgarol, although metabolites were not analysed, its decrease with DOM could result from a photodegradation of this molecule: several studies showed that irgarol degradation under sunlight was more rapid than for diuron (Okamura, 2002) and was catalysed/promoted by humic-type substances (= photosensitizer; Okamura & Sugiyama, 2004, Sakkas *et al.*, 2002).

In the biotic flasks, the sole decreases in diuron concentrations over the experiments were measured in the D0.5 treatment applied to *T. suecica* in conditions with and without DOM. Diuron losses were not due to biodegradation (metabolites not detected) or photodegradation (decrease only for single molecule and this species). Diuron molecules were thus probably on or inside the cells, corresponding to the continuation of the adsorption/internalization phenomenon already noticed on the first day, and amplified with the growing number of cells. This decrease was not shown in *T. suecica* cultures exposed to M2: it can be assumed that diuron molecules in mixture M2 would be less bioavailable for microalga cells, or outcompeted by the other herbicides for adsorption. Or, the strong growth inhibition induced by mixture M2 prevented the continuation of the adsorption/internalization phenomenon observed from the first day. No such diuron decrease over time was observed in *C. calcitrans* cultures, perhaps due to a lower affinity for the diatom frustule (and/or its organic coating; Round *et al.*, 2007, Tesson & Hildebrand, 2013) leading to an adsorption equilibrium reached from the beginning of experiment. DOM did not exert any influence on diuron concentrations in cultures.

As for irgarol, the sole decrease was shown in I0.5 treatment with DOM in *C. calcitrans* cultures. Irgarol metabolites were not analysed, consequently it cannot be excluded that a degradation of irgarol occurred

over the experiment, possibly promoted by DOM. Another hypothesis would be an interaction between irgarol and DOM in I0.5 treatment, favouring an adsorption/internalization together with a lower toxicity due to changes in irgarol availability: in this case, DOM would play a protective role against irgarol toxicity. Surprisingly, no such decrease was observed in mixture M2 where other herbicides could compete with irgarol for complexation with DOM and/or adsorption. However, there are no data available in the literature to validate or not these hypotheses.

Finally, whereas no variation of S-metolachlor concentrations was observed in the single molecule treatments for both species, with and without DOM, an increase of concentration over time was obtained in all mixture treatments, reaching +57% of the S-metolachlor concentration added at day 0 in the flasks (concentration similar to abiotic flasks). As shown by the results from day 0 compared to the abiotic flasks, a fast adsorption/internalization of S-metolachlor occurred in the cultures of the two species. In S5 treatment, with no growth impairment, concentrations did not evolve significantly during the experiment. However when growth was strongly inhibited in treatment M2, the increased concentration probably revealed desorption from cell walls, independently from DOM addition. It can be supposed that irgarol effects induced changes in structure, composition or permeability of cell walls that would diminish S-metolachlor affinity. However, no data are available in the literature to confirm this hypothesis.

2.4.2. Herbicide toxicity without natural DOM addition

For all cultures, nutrient analyses performed on the first and last days of experiments showed that nitrates, orthophosphates and silicates were not limiting for algal growth. When a strong inhibition occurred, as with treatments I0.5 and M2, no variation was observed over time in nitrate and orthophosphate concentrations, meaning almost no consumption, as expected.

Exposure to 0.5 $\mu g.L^{-1}$ irgarol induced a very strong toxicity on the two species, compared to diuron which induced almost no effects at the same concentration, as already related in Dupraz et al. (2016). This stronger toxicity of irgarol on microalgae, whereas both herbicides share the same metabolic target (protein D1 of the photosystem II), was shown in other studies as well (Devilla *et al.*, 2005, Gatidou & Thomaidis, 2007). It is likely due to a higher affinity of irgarol for Q_B niche on the D1 protein (Chesworth *et al.*, 2004). Given that no significant effects were detected with D0.5 and S5 treatments, the effects observed on *C. calcitrans* after exposure to the mixture M2, which were similar than with I0.5, were thus probably attributable to irgarol. For *T. suecica*, toxic effects were a bit stronger on growth and photosynthesis with M2 treatment compared to I0.5 (-63 ± 1% vs. -56 ± 1%) and (-28 ± 0% vs. -22 ± 0%) respectively. This could probably be due to an interaction between molecules which increased the toxicity, as already observed with the same substances by Dupraz *et al.* (2016). However, this assumption remains to be demonstrated by specific experiments devoted to the study of mixtures (Cedergreen *et al.*, 2007). Despite the sublethal effects previously detected by Roubeix *et al.* (2011a) as deformed frustules in the freshwater diatom *Surirella angusta* after a 5 $\mu g.L^{-1}$ exposure to S-metolachlor (20‰ for exposed cells vs. around 0‰ for controls) and by Coquillé *et al.* (2015) on linearity of movement for freshwater diatom *G. gracile* after a 1 $\mu g.L^{-1}$ exposure to S-metolachlor (increase of linearity compared to controls), no effects of S-metolachlor

were shown in the present study, even on the relative lipid content. Indeed, effects were somehow expected due to its mode of action that targets elongases involved in the synthesis of fatty acids and lipids (Fuerst, 1987). Our results are in line with literature (Juneau *et al.*, 2001, Ma *et al.*, 2006, Thakkar *et al.*, 2013) and show no toxicity at these environmental concentrations.

In addition to drastic physiological effects of I0.5 and mixture M2, other effects on microalgae were also deduced from analyses of autochthonous DOM produced in the cultures where no natural DOM was added. Indeed, the increase in the culture medium, over time, of dissolved carbon quantity per cells exposed to I0.5 was higher than for controls: +370 ± 40% for *T. suecica* and around +4000 ± 900% for *C. calcitrans*. Usually in the literature, it is admitted that such DOC increase in microalgae cultures can be linked to either excretion of cells or their death (Findlay & Sinsabaugh, 2003). In the present study, analysis of cultures by flow cytometry indicated a very slow growth rather than cell-death. This increase of DOC can thus be linked to cell excretion with no modification of aromaticity for *C. calcitrans*, based on $\Delta SUVA_{254}$ results which did not differ compared to controls. For *T. suecica* however, decrease of $\Delta SUVA_{254}$ was lower in I0.5 and M2 exposed cells: microalgae exposed to these treatments might have (i) excreted more aromatic molecules than controls; and/or (ii) secreted/excreted less non-aromatic molecules than controls; (iii) secreted/excreted molecules, which were more easily transformed (e.g. condensation, polymerization), thus forming more aromatic molecules. In the three cases, the differential excretion or secretion between controls and herbicide-exposed cultures could reflect stress effects. Indeed, several studies showed that the composition of excreted substances (protein, lipids, sugars,) could vary depending on microalgal species, growth phase and physico-chemical conditions (de Brouwer *et al.*, 2003, Hellebust, 1965, Urbani *et al.*, 2012, Zhang *et al.*, 2016a) including metal contaminations (Herzi, 2013, Taylor *et al.*, 2016). In the case of *T. suecica* exposed to I0.5 and M2, this enhanced excretion associated with a very low growth remains to be explained but it could result from ageing of cells between each doubling, detoxification mechanisms and/or cell impairments.

Neither results of autochthonous DOM production index BIX, nor those of HIX, related to humification/aromaticity, showed differences between treatments for both species. Controls and exposed cells have probably excreted fluorescent molecules similar in quantity and type and/or have undergone processes such as polymerization, polycondensation or polyaddition leading to the formation of similar fluorescent molecules. The increase in S_R (inversely correlated to average molecular weight) in control cultures of both species during the experiments reflected a decrease of molecular weight of molecules present in autochthonous DOM. In I0.5 treatment for both species, S_R also increased over time but significantly less than in the controls, suggesting the types of molecules excreted being different. These variations of excretion by microalgae cells exposed to pesticides were also observed by Bester *et al.* (1995). In Bester *et al.* (1995)'s study (to our knowledge, the only one identified until now), the authors obtained a positive correlation between the increase of amino acid excretion, dissolved organic phosphorus and nitrogen concentrations, and the increase of atrazine concentration in mesocosms containing four species of marine diatoms (*Thalassiosira punctigera*, *Thalassiosira rotula*, *Nitzschia pungens* and *Skeletonema*

costatum) and one prymnesiophyte (*Phaeocystis globosa*). At the same time, they observed a decrease of primary production during growth phase. They hypothesized this increase of excretion being linked to the stress exerted by atrazine, resulting either in cell wall damages (causing losses) or cell lysis. In the present study, this latter hypothesis being excluded, the differential excretion (quantity and quality) of cells could potentially be linked to stress caused by irgarol. However, to rule on the possible reason for this excretion, analyses on composition of excreted substances and on cell wall, cell mechanisms (metabolic wastes, detoxification of cells, cell damages among others) would be necessary.

2.4.3. Modulation of herbicide toxicity in the presence of natural DOM

DOM addition to the culture media on the first day of experiments did not modify nutrient concentrations (nitrates, orthophosphates and silicates) in the cultures. Similarly to condition without DOM, the absence of variations or the lower consumption of nutrients over time was observed in treatments where algae growth was inhibited.

DOM addition to the cultures boosted *C. calcitrans* growth (+10% for average growth rate in controls) when no significant effect was shown on *T. suecica* average growth rate, although final cellular concentration was significantly enhanced with DOM: 751,500 ± 25,500 cell.mL^{-1} vs. 660,500 ± 20,700 cell.mL^{-1} respectively. Therefore, it can be assumed that microalgae used/consumed molecules i) present in the natural DOM or ii) molecules resulting from bacteria metabolism on DOM, as the cultures were non axenic. Indeed, bacteria release extracellular enzymes (hydrolases), which hydrolyse polymeric matter (Nagata, 2008). This hydrolysis provides organic compounds such as vitamins that some organisms like microalgae are unable to synthesize (Croft *et al.*, 2005, Croft *et al.*, 2006, Droop, 2007). Other studies also demonstrated microalgae growth in non-axenic conditions being boosted through the direct consumption of organic molecules such as sugars (as glucose; EL-Sheekh *et al.*, 2012), humic acids (Gagnon *et al.*, 2005), that are components of natural DOM (Benner, 2003, Kujawinski, 2011). In order to provide deeper insights on the quantity and type of molecules available and consumed by microalgae, experiments in axenic environment (without bacteria) and more in-depth analyses of DOM composition at the beginning and at the end of experiments are required.

With DOM addition, biological results of herbicide-exposed cultures showed, for *C. calcitrans*, a slight but significant decrease of the effect induced by I0.5 and M2 compared to condition without DOM on growth rate and $FL1_{Lipids}$ ratio. Contrarily for *T. suecica*, DOM addition exacerbated the toxicity of pesticides: in D0.5 where no effect was found on growth rate or $FL1_{Lipids}$ ratio without DOM, an inhibition appeared (around -10% for both parameters) with natural DOM addition. For I0.5 and M2, DOM addition resulted in a more pronounced toxicity on growth rate and photosynthetic efficiency. These variations of herbicide toxicity between conditions with and without DOM were not due to differences in exposure concentrations that were similar. Changes induced by organic matter in toxicity of organic chemicals towards microalgae were also observed by Zhang *et al.* (2016b), which are to our knowledge the only authors having published a study that combined microalgae, natural organic matter and contaminants. These authors showed that the presence of natural organic matter from Suwannee River (IHSS) increased acute toxicity of

monochlorobenzene and 1,2-dichlorobenzene, when it decreased toxicity of pentachlorobenzene and hexachlorobenzene on the growth of the freshwater microalga *Chlorella pyrenoidosa*. The authors linked these toxicity variations to complex relationships between organic matter and chlorine substitutions of chlorobenzenes promoting or inhibiting their passage into the cells. In our study, three hypotheses could perhaps explain our results. The first hypothesis is that herbicides could be adsorbed on or bound to specific substances of DOM such as humic substances (Campbell *et al.*, 1997, Millour, 2011, Vigneault, 2000), less consumed/used in diatom cultures than in chlorophyte cultures (by microalgae and/or bacteria). The second hypothesis could be linked to the difference in the nature and composition of cell walls. Indeed, the cell wall of chlorophytes is in direct contact with herbicides and DOM substances contrary to diatoms, which have siliceous walls (frustule) covered of organic coating (Round *et al.*, 2007, Tesson & Hildebrand, 2013) that could exert a protecting role. Indeed, this organic coating has maybe favoured the adsorption of irgarol linked to organic molecules on the cell wall (that would explain the higher decrease of irgarol concentration) but inhibited the internalization, on the contrary to *T. suecica*. Parent *et al.* (1996) showed that fulvic acids increased the membrane permeability of *Chlorella pyrenoidosa* (Chlorophyte). Therefore, we hypothesize that this phenomenon of increased membrane permeability, which would facilitate the passage of herbicides (glued to the wall in our condition without DOM), could have happened for *T. suecica* and not for *C. calcitrans* or to a lesser extent. Measurements of membrane permeability (Parent *et al.*, 1996) and the determination of the partition of herbicides free and bound to DOM (log K_{DOC}), would be necessary to answer this. Finally, the third hypothesis concerns the decrease of herbicide effects, especially for irgarol, on *C. calcitrans* in the presence of DOM. Our hypothesis is that this species could consume DOM constituents directly or indirectly (through the bacteria action) as additional source of energy (such as carbon, glucose, vitamin) and would allocate a part of this energy (not available without DOM) to detoxify. Indeed, microalgae have an enzymatic equipment such as cytochrome P450 (Mthakathi *et al.*, 2015, Thies *et al.*, 1996) or antioxidant enzymes (e.g. superoxide dismutase, catalase; Liu *et al.*, 2017), and can synthesize protective substances (such as carotenoids; Demmig-Adams, 1990, Rowan, 1989). To confirm this last hypothesis, complementary analyses are necessary, such as measurement of enzymatic activity in conditions with and without DOM (Liu *et al.*, 2017).

The toxicity induced by I0.5 and M2 was accompanied by a strong increase of carbon quantity per cells produced over time compared to controls (up to +855% for *T. suecica* exposed to M2). This carbon increase, as observed by Bester *et al.* (1995), likely corresponded to excretion or secretion of cells, reflecting stress or wall damages, rather than cell death. It was not accompanied by a variation of DOM aromaticity (no significant difference in the $\Delta SUVA_{254}$ nor in HIX between controls and herbicide-exposed cultures). It can be assumed that microalgae in controls and treatments I0.5 and M2 secreted the same proportion of aromatic and fluorescent molecules. On the other hand, this increase of carbon was accompanied by a modification of average molecular weight (S_R) and DOM humification/aromaticity (HIX), contrary to the conditions without DOM. Indeed, the decrease in average molecular weight seemed lower in I0.5 and M2 than in controls, and DOM aromaticity increased over time for *T. suecica* exposed to

I0.5 and M2 and for *C. calcitrans* exposed to mixture M2, while it decreased in the controls. These results could be explained by an excretion/secretion of more humified molecules having a higher molecular weight than in controls. Complementary analyses on the nature of excreted molecules would be necessary to validate these hypotheses.

2.5. Conclusions

The aim of this study was to investigate the influence of natural DOM on the toxicity of three herbicides, singly and in mixtures (irgarol, diuron and S-metolachlor), to two marine microalgae, *Chaetoceros calcitrans* and *Tetraselmis suecica*. The concentrations (herbicides and DOM) tested in this study were representative of those found in natural environments under anthropogenic pressure. Results showed that for both species, irgarol was the most toxic on growth, relative intracellular lipid content, and operational photosynthetic efficiency, and that the differential excretion in terms of composition and quantity of dissolved organic carbon, compared to controls, could be related to this toxicity. They also showed that (i) microalgae were likely able to use molecules present in natural DOM directly or indirectly (made available in non-axenic conditions by bacteria metabolism), (ii) DOM addition to the cultures did modulate herbicide toxicity, and (iii) this toxicity modulation was species-dependent: the toxicity decreased for the diatom, whereas it increased for the chlorophyte. Therefore, this study confirms the major role of DOM on the marine microalgae studied and on herbicide toxicity, highlighting the importance to consider DOM as a possible major factor implied in toxicity modulation in the environment.

Acknowledgements

This study has been carried out with financial support from the French National Research Agency (ANR) in the frame of the Investments for the future Programme, within the Cluster of Excellence COTE (ANR-10-LABX-45).

We would like to thank Larissa Haugarreau (Ifremer) for her help in sampling and filtration during the two experiments. The authors thank Patrick Pardon for his help in pesticides analyses. Finally, the authors also thank Julie Guéguen (Irstea) for her help with the R software.

3. Synthèse

Le but de ce chapitre était d'évaluer (i) les effets de l'irgarol, du diuron et du S-métolachlore, seuls, en mélange et à dose environnementale vis-à-vis de deux espèces marines (*Chaetoceros calcitrans* (diatomée) et *Tetraselmis suecica* (chlorophyte)) et (ii) d'investiguer l'influence de la MOD naturelle sur cette toxicité.

Les mesures de croissance, d'efficacité photosynthétique et du contenu relatif en lipides ont permis de montrer que la molécule la plus toxique vis-à-vis des microalgues testées était l'irgarol. En effet, une forte inhibition des trois paramètres a été provoquée chez les deux espèces par la concentration de 0,5 $\mu g.L^{-1}$. À concentration égale et bien qu'ayant la même cible métabolique, le diuron n'a pas été toxique sur les paramètres étudiés. Cette plus faible toxicité du diuron a également été observée lors de l'étude préliminaire disponible dans le Chapitre 4. Concernant le S-métolachlore, malgré l'absence d'effet significatif sur les paramètres étudiées (résultat peu surprenant au vu des données disponibles sur sa toxicité dans la littérature), nous ne pouvons exclure qu'il ait affecté les espèces étudiées. En effet, lors de l'étude préliminaire sur *G. gracile* (Chapitre 3), une modification de la linéarité du mouvement a été observée après exposition à 1 $\mu g.L^{-1}$ de métolachlore. Roubeix *et al.* (2011a) ont également observé une augmentation du pourcentage de frustules déformés chez la diatomée *Surirella angusta* exposée à 5 $\mu g.L^{-1}$ de S-métolachlore. Aussi, il aurait été intéressant d'évaluer à d'autres paramètres comme la mobilité ou le pourcentage de cellules déformées. Concernant les mélanges, seul celui composé des concentrations maximales de chaque molécule (M2) s'est avéré toxique sur les paramètres étudiés. Cette toxicité du mélange était similaire à celle de l'irgarol à 0,5 $\mu g.L^{-1}$ pour *C. calcitrans* alors qu'elle était plus élevée pour *T. suecica*, suggérant un probable effet synergique des molécules, qui reste à démontrer. Ces effets toxiques se sont également répercutés sur les caractéristiques de la MOD. En effet, une plus forte production de carbone organique dissous par les cellules et/ou les bactéries a été observée pour les cultures exposées à I0,5 et M2.

L'ajout de MOD naturelle aux cultures a influé sur la toxicité des herbicides différemment selon l'espèce. En effet, une diminution de la toxicité a été observée pour les paramètres biologiques de *C. calcitrans* ; à l'inverse, cette toxicité a été augmentée pour *T. suecica* exposée à l'irgarol mais également au diuron (inhibition de la croissance et de l'efficacité photosynthétique en présence de MOD à 0,5 $\mu g.L^{-1}$ de diuron, alors qu'aucun effet significatif n'avait été détecté en l'absence de MOD pour ce traitement). Cette modulation de toxicité s'est également reflétée sur la concentration en carbone organique dissous (diminution pour *C. calcitrans* et augmentation pour *T. suecica*) : les cellules exposées de *C. calcitrans* ont moins excrété en présence de MOD que sans MOD, et inversement pour *T. suecica*. Cette modulation de toxicité pourrait être expliquée par :

– une modification de la biodisponibilité des pesticides (liés à des molécules organiques plus ou moins utilisables par les microalgues) ;

– une composition différente des parois cellulaires : frustule recouvert d'un revêtement organique pour la diatomée et paroi nue pour la chlorophyte ;

– une capacité de détoxification des microalgues (pour *C. calcitrans)* augmentée en présence de MOD grâce à la présence de sources d'énergie supplémentaires (composés organiques ou inorganiques rendus éventuellement disponibles par l'action des bactéries).

L'étude présentée dans ce chapitre a montré pour la première fois le rôle majeur de la MOD naturelle sur la modulation de la toxicité des herbicides.

Chapitre 7 – Devenir et toxicité des herbicides sur des microalgues d'eau douce en présence de MOD

1. Introduction

Dans l'environnement aquatique, la MOD peut interagir avec les contaminants chimiques tels que les pesticides. En effet, elle affecte leur transport, leur devenir (dégradation inhibée ou favorisée), leur biodisponibilité mais également leur toxicité comme démontré dans le chapitre précédent avec des microalgues marines (modulation de toxicité espèce-dépendante).

Cependant, le devenir des pesticides est également gouverné par des processus faisant intervenir la composante biotique. Ainsi, les microorganismes comme les bactéries et les microalgues sont l'objet de phénomènes de biosorption (mécanismes passifs tels que l'adsorption, l'absorption, ou encore la complexation avec les surfaces comme les parois cellulaires), de bioaccumulation et de métabolisation des molécules (Priyadarshani *et al.*, 2012). En effet, les microalgues, cibles indirectes des pesticides, sont dans certains cas capables de bioaccumuler (Okay *et al.*, 2000, Weiner *et al.*, 2004) mais également de biodégrader certaines molécules (Petroutsos *et al.*, 2008, Subashchandrabose *et al.*, 2013, Suresh & Ravishankar, 2004, Thies *et al.*, 1996). Dans le cas de la biodégradation, elle peut être mise en œuvre par le biais d'une source de carbone organique annexe (co-métabolisme) comme l'acétate (Xiong *et al.*, 2017). Ces phénomènes sont fonction de l'espèce (taille de la cellule) mais également de la molécule considérée et de sa concentration (Amiard, 2011).

L'objectif de ce chapitre est d'évaluer, en présence de MOD, la toxicité des trois herbicides étudiés, seuls et en mélange, sur deux souches de microalgues d'eau douce en cultures non axéniques. L'influence des microalgues et de leurs bactéries associées sur le devenir de ces herbicides est également appréhendée.

Le chapitre est constitué de trois parties. La première partie est présentée sous la forme d'une publication courte (short paper), soumise prochainement, portant sur la chlorophyte *Sphaerellopsis* sp.. La deuxième partie présente des résultats complémentaires obtenus sur l'espèce *Gomphonema gracile* (diatomée). Enfin, la troisième partie est une synthèse des résultats présentés dans ce chapitre.

2. Article 5: Fate and effects of herbicides on the freshwater microalga *Sphaerellopsis* sp.

Nathalie Coquillé[1,2,3,4], Mélissa Éon[1], Hélène Budzinski[3,4], Sabine Stachowski-Haberkorn[2], Édith Parlanti[3,4], Soizic Morin[1]

[1] Irstea, UR EABX, Centre de Bordeaux, 50 avenue de Verdun, F-33612 Cestas cedex, France

[2] Ifremer, Laboratoire d'Écotoxicologie, rue de l'île d'Yeu, BP 21105, F-44311 Nantes cedex 03, France

[3] Univ. Bordeaux, UMR 5805 CNRS, EPOC, LPTC, 351 Cours de la Libération, CS 10004, F-33405 Talence Cedex, France

[4] CNRS, UMR 5805, EPOC, LPTC, 351 Cours de la Libération, CS 10004, F-33405 Talence Cedex, France

En préparation

Keywords

Microalgae; Dissolved Organic Matter; Irgarol; Diuron; DCPMU; S-metolachlor; Degradation

2.1. Introduction

Microalgae are at the basis of aquatic food webs due to their capacity to produce organic carbon from light energy (= photosynthesis) (Wetzel, 2001). In the environment, microalgae can be targeted by herbicides, which transit in aquatic systems by runoff, aerial transport, diffusion, drainage, etc.

In Southwest France, coastal rivers such as the tributaries of Arcachon Bay are contaminated by diverse herbicides used for the protection of surrounding crops, and biocides used as antifouling coatings on boats. Among them, diuron, irgarol and S-metolachlor are frequently detected in the area, especially the latter (Fauvelle, 2012). Diuron (phenylurea) and irgarol (triazine) are inhibitors of photosynthesis, whereas S-metolachlor (chloroacetamide) inhibits the synthesis of fatty acids. These three herbicides have been shown to exert toxicity on microalgae, but not at the same concentration ranges. For example, Okamura *et al.* (2003) determined 96h-EC_{50} of 1.6 $\mu g.L^{-1}$ irgarol, and 6.6 $\mu g.L^{-1}$ diuron, based on the growth of the freshwater chlorophyte *Selenastrum capricornutum*, when the value obtained by Fairchild *et al.* (1998) on the same species for metolachlor was around 84 $\mu g.L^{-1}$.

Microalgae can thus be indirect targets, but some of them have the ability to biodegrade pesticides. Indeed, Bi *et al.* (2012) observed a decrease of growth and photosynthetic effective quantum yield in the chlorophyte *Chlamydomonas reinhardtii* exposed to increasing concentrations of isoproturon; at the same time, the authors measured a decrease of isoproturon concentration in the culture medium, together with an increase of isoproturon intracellular concentration, and an increase of biodegradation with higher concentrations. Kabra *et al.* (2014) also observed a decrease in the growth and chlorophyll *a* content of C*hlamydomonas mexicana* with increasing atrazine concentrations (0 to 100 $\mu g.L^{-1}$) over time. At the same time, a decrease of bioaccumulation and an increase of biodegradation were shown over time. These capacities of microalgae to biodegrade pesticides originate from some well-known enzymatic systems (cytochrome P450, glutathione S-transferase (GST), etc. ; Torres *et al.*, 2008, Zablotowicz *et al.*, 1998).

However in the environment, other components such as dissolved organic matter (DOM) may influence the fate, bioavailability, bioaccumulation and toxicity of pesticides (Bejarano *et al.*, 2005a). DOM is a complex and heterogeneous mixture of organic molecules (<0.45 µm) of various aquatic and terrestrial origins resulting from decomposition of living organisms, their defecation, secretion and excretion. In the environment, DOM can decrease or increase the abiotic degradation of pesticides (Canonica, 2009, McNeill & Canonica, 2016). It can also modify their toxicity. For example, Knauer *et al.* (2007) observed a decrease of photosynthesis (around 10%) with 5 $\mu g.L^{-1}$ diuron and black carbon (a part of organic carbon) added to *Pseudokirchneriella subcapitata* cultures. Zhang *et al.* (2016b) demonstrated a modulation of chlorobenzene toxicity with DOM addition (Suwannee River Natural Organic Matter (purchased by the International Humic Substances Society - IHSS)) in the freshwater microalgae *Chlorella pyrenoidosa*. However, no study has until now explored the influence of natural DOM, which is a major component in aquatic environments, on the possible interactions between pesticides and microalgae.

Therefore, this study aimed to evaluate the toxicity of irgarol, diuron and S-metolachlor, singly and in mixtures, in presence of DOM isolated from the environment, on growth, photosynthetic efficiency and relative intracellular lipid content of the freshwater chlorophyte *Sphaerellopsis* sp.

2.2. Materials and methods

2.2.1. Biological material and culture conditions

The microalga *Sphaerellopsis* sp. (Chlorophyta) was isolated from a natural biofilm sample collected in December 2013 in Rebec stream (Southwest France), a small tributary (with limited pollutant inputs) of Leyre River, itself the principal tributary of Arcachon Bay. The species was isolated by micromanipulation under the inverted microscope and cultured in the laboratory in sterile Dauta medium (Dauta, 1982), in non-axenic conditions, at 17°C, in a thermostatic chamber 610 XAP (LMS LTD®, UK) with a dark:light cycle of 8:16 h (average light: 67 ± 0 µmol.m^{-2}.s^{-1}).

The growth of *Sphaerellopsis* sp. is optimal with natural DOM addition to the culture medium. Natural DOM was collected in spring 2015 in Rebec stream, at the origin site of the species. Stream water (96 L) was pumped, filtered onto 0.45-µm Teflon filter cartridges (Whatman, Polycap™ 75TF), and DOM was concentrated ten times by reverse osmosis (TIA pilot equipped with FILMTEC™ SW30-2540 membrane), as described in Huguet (2007). In the experiment, *Sphaerellopsis* sp. was grown in sterile Dauta medium with the concentrated DOM added at twice the environmental concentration.

2.2.2. Experimental design

The experiment lasted fourteen days and was performed in 100-mL round borosilicate sterile glass flasks previously heated to 450°C for 6 h and autoclaved 20 min at 121°C. Glass flasks were inoculated at 2,000 cell.mL^{-1} using stock cultures in exponential growth phase (total volume of 60 mL). Nine treatments (with DOM added in culture medium) were run: a control treatment (no pesticide) plus 8 pesticide treatments: irgarol at 0.05 (I0.05) and 0.5 (I0.5) µg.L^{-1}, diuron at 0.05 (D0.05) and 0.5 (D0.5) µg.L^{-1}, S-metolachlor at 0.5 (S0.5) and 5 (S5) µg.L^{-1} and their mixtures: M1 (I0.05+D0.05+S0.5) and M2 (I0.5+D0.5+S5). Stock solutions (500 mg.L^{-1}) of Irgarol Pestanal® (≥ 98.4%), diuron (> 98%) and S-metolachlor Pestanal® (≥ 98.4%), purchased from Sigma Aldrich, were prepared in pure methanol and diluted in sterile ultrapure water. The highest methanol concentration reached in the flasks, 0.0012% in M2, is far below the maximum concentration recommended for algal bioassays (Abou-Waly, 2000). Controls were carried out in quadruplicate and herbicide-exposed cultures in triplicate. All treatments were also carried out without microalgae (abiotic component), in duplicate.

During the experiment, samples were taken for pesticide and biological analyses, as described in the following sections.

2.2.3. Pesticide analyses

Pesticides were analyzed in all controls, including abiotic ones, and in the highest concentrations tested (I0.5, D0.5, S5 and M2) on the first and last days of experiment, on filtered samples (0.45-µm polyethersulfone filter, VWR, USA). Filtered culture samples (100µL) were diluted ten-fold using ultrapure water and 40 µL of the diluted samples were directly analyzed by liquid chromatography (1290 Infinity system, Agilent Technologies, USA) coupled to tandem mass spectrometer (6460 triple quadrupole LC/MS system, Agilent Technologies, USA), after adding internal standards. The separation was performed using a Kinetex C18 column and using a gradient of 5 mM ammonium acetate with 0.1% acetic acid in ultrapure water and pure methanol as mobile phases, with a flow rate of 0.5 $mL.min^{-1}$. Analyses of pesticides and their metabolites (for diuron and S-metolachlor) were performed in multiple reaction monitoring mode. Quantification limits were 0.24 $ng.L^{-1}$ for irgarol, 1.19 $ng.L^{-1}$ for diuron, 4.43 $ng.L^{-1}$ for DCPMU, 5.29 $ng.L^{-1}$ for 1,2,4-DCPU, 4.26 $ng.L^{-1}$ for 1,3,4-DCPU, 1.11 $ng.L^{-1}$ for S-metolachlor, and 1.23 ng L^{-1} and 3.13 $ng.L^{-1}$ for metolachlor OA and ESA.

2.2.4. Biological parameters

Culture samples were analyzed on an Accuri C6 flow cytometer (Becton Dickinson Accuri™) equipped with a blue (488 nm) and a red (640 nm) laser.

Cell density was measured in all the cultures, from 300 µL sampled every working day, fixed using glutaraldehyde (final concentration 0.25%), then frozen (-80°C) until analysis. Cells were counted on FL1 (green fluorescence, 530/30 nm) versus FL3 (red fluorescence, >670 nm) cytograms. For each culture, the average growth rate (μ, h^{-1}) was calculated, corresponding to the slope of regression line from ln($cell.mL^{-1}$) vs time (h).

The relative intracellular lipid content ($FL1_{Lipids}$) was estimated on the last day of experiment by the use of the green lipophilic fluorochrome $BODIPY^{505/515}$ (Life Technologies®, Carlsbad, CA, USA), following a protocol adapted from Brennan *et al.* (2012). Briefly, for each culture, 200 µL samples were stained (final $BODIPY^{505/515}$ concentration of 60 $\mu g.L^{-1}$, 1% DMSO) and incubated at room temperature in the dark during 3 minutes. FL1 values of cells (unstained and stained cells) were normalized using FL1 values of 2-µm fluorescent polystyrene microspheres (Flow Check™ High Intensity Alignment Grade Particles 2.00 µm, Polysciences Inc., Warrington, PA, USA), added in all samples, using the formula:

$$FL1_{Lipids} = (FL1_{stained\ microalgae}/FL1_{stained\ microsphere})/(FL1_{unstained\ microalgae}/FL1_{unstained\ microsphere})$$

The bacterial concentrations in cultures were determined on the last day of experiment by the use of the fluorochrome SYBR® Green I (Molecular Probes Inc., Eugene, OR, USA), following the protocol of Marie *et al.* (1997). Briefly, 200 µL samples were stained (final concentration of 1X) with a working solution at 100X diluted in sterile Milli-Q water then incubated during 15 minutes at room temperature in the dark. Cells were counted of FL1 versus FL4 (red fluorescence, 675/12.5 nm).

The PSII effective quantum yield (Φ'_M) was measured on the last day of experiment by Pulse-Amplitude Modulated (PAM) fluorescence using a PHYTO-PAM (Heinz Walz, GmbH, Germany) equipped with an emitter-detector unit (PHYTO-EDF). Measurements were performed using a homemade device for reproducible direct measurements on bottom of the flasks, after homogenization of cultures by agitation and after checking that cells were not stuck on the bottom. Final Φ'_M values resulted from the average of 10 measurements per culture.

2.2.5. Statistical analyses

One-way ANOVAs were performed on biotic treatments to detect significant differences between control and herbicide-exposed cultures (with a p-value <0.05 considered as statistically significant), followed by a Tukey post-hoc test when significant differences were detected. Evolution of herbicide concentrations over time was assessed with Student's t-test or Welch's t-test (p-value <0.05 considered as statistically significant) after having checked the homoscedasticity with Fisher's F-test. All statistical analyses were performed with R 3.2.2. (Ihaka & Gentleman, 1996).

2.3. Results and discussion

2.3.1. Herbicide exposure

Neither diuron nor irgarol were detected in the concentrated natural DOM sample used to enrich microalgae culture medium. S-metolachlor was quantified at 9 $ng.L^{-1}$ and its metabolites ESA and OA at 417 $ng.L^{-1}$ and 198 $ng.L^{-1}$, respectively (data not shown). These metabolites were consequently measured in all treatments, including controls (data not shown), at concentrations averaging 88 ± 12 $ng.L^{-1}$ (ESA) and 60 ± 4 $ng.L^{-1}$ (OA) (Figure 54C). The dilution factor (of five) together with the quantification limit of 1.11 $ng.L^{-1}$ explain why S-metolachlor was not quantified in treatments where no S-metolachlor was added. Herbicide concentrations measured on the first day in abiotic treatments matched the nominal concentrations: 504 ± 12 $ng.L^{-1}$ for irgarol (Figure 54A), 552 ± 25 $ng.L^{-1}$ for diuron (Figure 54B), and 4736 ± 32 $ng.L^{-1}$ for S-metolachlor (Figure 54C). However in the biotic systems on the first day, concentrations were significantly lower than those measured in the abiotic systems: about -53 ± 4 % for irgarol, -15 ± 10 % for diuron and -13 ± 3 % for S-metolachlor. These results suggest rapid adsorption of the molecules onto cell walls and/or internalization into cells. Based on their log K_{ow} values, these molecules are considered as non-polar substances, lipophilic and bioaccumulative (Tetko *et al.*, 2005), having a high affinity with phospholipids, lipoproteins and fatty acids of cell walls (Amiard, 2011). Moreover, Nestler *et al.* (2012) suggested that diuron could be internalized as fast as 1-2 minutes following its addition to cultures of the freshwater microalga *Chlamydomonas reinhardtii.* Therefore, the "lost" molecules of diuron could have been partly internalized into *Sphaerellopsis* sp. cells; for the two other molecules, no uptake kinetics data are available in the literature to support this hypothesis.

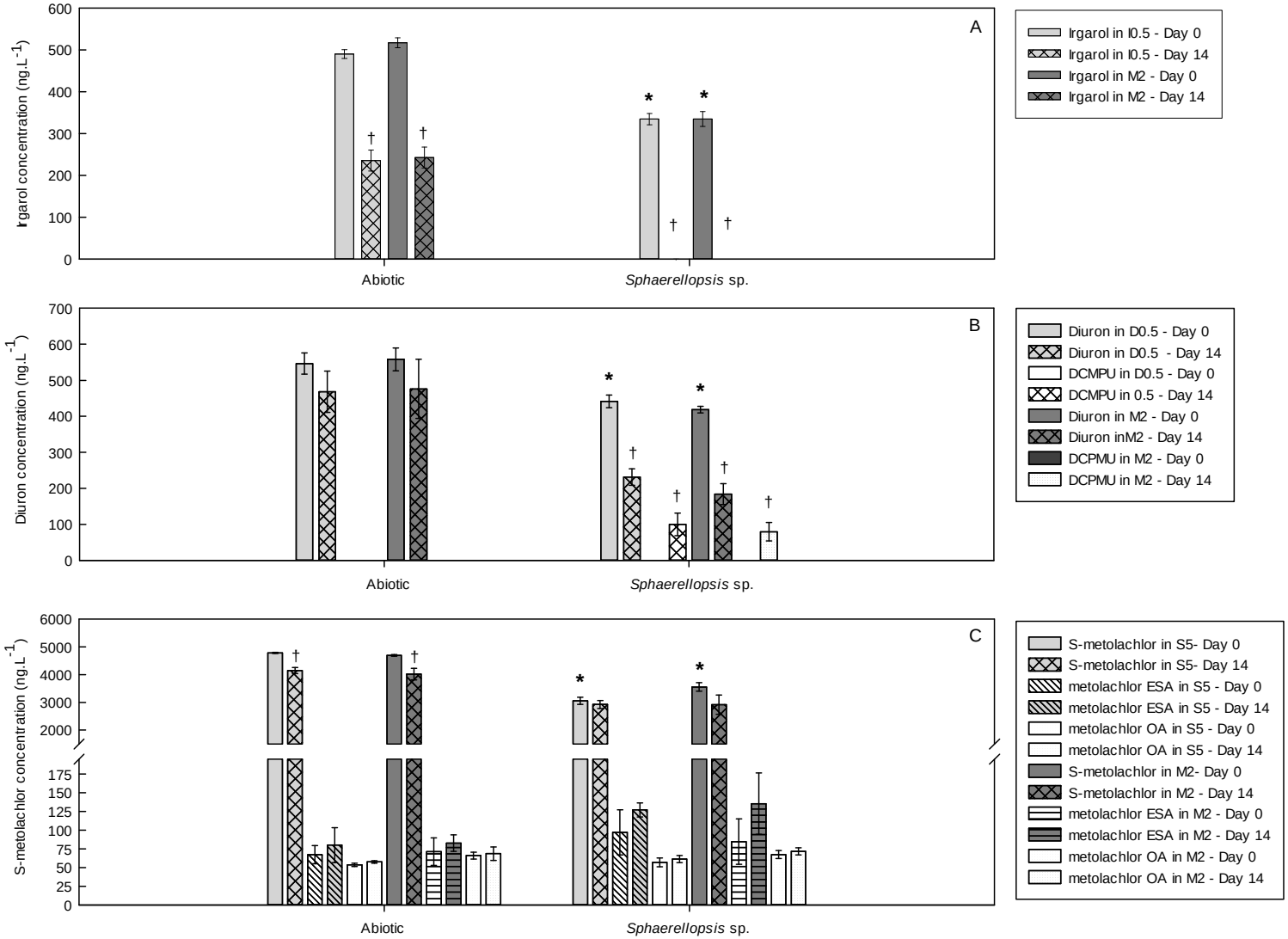


Figure 54 : Herbicide concentrations measured in the highest treatments of irgarol (A), diuron (B) and S-metolachlor (C), singly and in mixture M2, in abiotic and biotic component on the first and last days of experiment. All values are mean values (± standard error, SE; n=2 for abiotic treatments and n=3 for Sphaerellopsis sp. cultures). * and † indicate significant differences between abiotic and biotic components on day 0 and between the first and last days for a given treatment, respectively (t-test, $p<0.05$).

2.3.2. Effects and fate of herbicides

Cell concentrations in controls increased from 2,000 to 3,000,000 cell.mL^{-1} in 14 days, showing a classic exponential growth (data not shown). All biological results showed that herbicide exposure in presence of DOM did not induce any deleterious impact on *Sphaerellopsis* sp. under our experimental conditions (Table 18). Instead, the growth rate significantly increased in M2 treatment (0.026 h^{-1}) compared to controls (0.023 h^{-1}). This higher concentration of cells in M2 treatment was also observed with bacteria concentration (15.3 ± 0.7x10^{6} cells.mL^{-1} vs. 9.7 ± 1.3x10^{6} cells.mL^{-1} for controls). However, the bacteria per alga ratio was not different (around 3). Mean photosynthetic efficiency (all treatments included) was 0.39 and the $FL1_{Lipids}$ ratio averaged 4.47 ± 0.09. Given the literature available on the toxicity of irgarol and diuron at low concentrations, effects on growth and especially on photosynthesis were expected. On the contrary, this strain exhibits a very low sensitivity to these molecules. This low sensitivity of some species of microalgae (and thus the wide range of responses) is known, as showed by Larras *et al.* (2012). This could be linked to its exposure historic before being isolated from the environment, although the site is normally slightly polluted (Sandre, 2017), and/or to interactions having occurred between pesticides and DOM. Indeed, as evidenced by Zhang *et al.* (2016b), DOM can decrease the bioavailability of herbicides and consequently their toxicity: using natural DOM from Suwannee River (IHSS) added to the cultures, they found lower toxic-induced growth inhibition of *Chlorella pyrenoidosa* with highly chlorinated chlorobenzenes.

While concentrations of S-metolachlor and its metabolites were stable over time, a significant decrease in irgarol (around -100%) and diuron (around -52%) concentrations was observed at the end of the experiment, in single treatments and mixture M2 (Figure 54).

Irgarol almost disappeared at the end of experiment (0.27 ± 0.06 ng.L^{-1} in I0.5 and below the quantification limit in M2). Given the decrease observed in abiotic treatments over time (-54 ± 4%), a part of irgarol decrease in the cultures can be directly related to abiotic processes such as losses linked to adsorption on walls of flasks and/or evaporation in the headspace of flasks and/or hydrolysis and/or photodegradation possibly increased by DOM. Indeed, Sakkas *et al.* (2002) showed that humic substances promoted the photodegradation of irgarol in controlled conditions. It can thus be assumed that the decrease of the remaining 46%, was probably due to biological activity (microalgae and/or bacteria): photodegradation could have been catalyzed/promoted by the DOM together with the organic dissolved substances excreted by microorganisms. Indeed, the analyses of dissolved organic carbon showed an increase of DOC concentration over time in the biotic treatments (26.8 ± 0.8 mgC.L^{-1} vs 13.6 ± 0.2 mgC.L^{-1} averaged for all abiotic treatments). Irgarol decrease can also be linked to adsorption on cell walls or internalization into cells, given the lipophilic character of this molecule (Log K_{ow}=4.0) (Tetko *et al.*, 2005). A third hypothesis could be the biodegradation made by bacteria (INERIS, 2012) and/or microalgae, but irgarol metabolites were not analyzed in our study. To be conclusive about the organisms responsible for such degradation,

experiments in both axenic and non-axenic conditions would be necessary to conclude, although microalgal growth may perform worse under axenic conditions (Windler *et al.*, 2014). Another option would be to implement again the experiment with other algal species, in order to compare pesticide losses over time. In any case, to conclude about biodegradation, measurements of enzymatic activities (cytochrome P450) and concentrations of parent-molecule and its metabolites into the cells would also be necessary.

For diuron, no variation over time was observed in abiotic systems (472 $ng.L^{-1}$) but concentrations fell down to 232 ± 23 $ng.L^{-1}$ in D0.5 treatment and to 184 ± 29 $ng.L^{-1}$ in M2 treatment. This could be explained by adsorption on cell walls and/or internalization into cells (Log K_{ow}=2.9) (Tetko *et al.*, 2005). As for irgarol, a photodegradation or hydrolysis catalyzed/promoted by the excretion of microorganisms (humic substances) could also have occurred. A third hypothesis is the biodegradation. Indeed, DCPMU (1-(3,4-dichlorophenyl)-3-methylurea), one of diuron metabolites, appeared and was quantified in both D0.5 and M2 treatments (90 ± 19 $ng.L^{-1}$). These results suggest diuron degradation in presence of microalgae and/or bacteria associated to *Sphaerellopsis* sp. cultures, as no DCPMU was measured in abiotic treatments. DCPMU results from diuron's loss of a methyl group (Giacomazzi & Cochet, 2004). Biodegradation is usually performed by Gram positive and negative bacteria (Giacomazzi & Cochet, 2004), which are bacteria (both) cohabiting with algae (Ramanan *et al.*, 2016, Romera-Castillo *et al.*, 2011). Furthermore, scientific evidence of possible degradation of pesticides by microalgae can be found, for example, in Zablotowicz *et al.* (1998): they showed that four microalgae species were able to degrade fluometuron (phenylurea) by N-demethylation with cytochrome P450. However, as for irgarol, experiments in axenic environment and/or with other species, coupled to analyses of pesticides (diuron and its metabolites) and enzymatic activities known to participate in detoxification, are necessary to conclude.

Finally, we can not exclude a co-metabolic degradation (=microbial degradation mechanism without benefit for organism (energy) and in the presence through of another carbon source used for as growth; Sylvestre *et al.* (2004)) through organic substrate consumption by microalgae and/or bacteria naturally inhabiting the cultures, to explain the diuron degradation. In the case of our study, we can not conclude about this hypothesis. Experiments in axenic environment, including other, "simple" substrate (such as glucose, acetate) and compared to results obtained with DOM (more complex) could possibly provide new insights about this option.

To conclude, the present study showed no toxic effect of the herbicides diuron, irgarol and S-metolachlor, tested at environmental concentrations (Fauvelle, 2012, REPAR, 2015), on the freshwater microalga *Sphaerellopsis* sp.. It also suggests that *Sphaerellopsis* sp., cultured in non-axenic conditions, may be able, with its associated bacteria and in presence of natural DOM, to biodegrade diuron in freshwater environments.

Table 18: *Sphaerellopsis* sp. growth rate (μ), relative intracellular lipid content ($FL1_{Lipids}$ ratio), operational yield (Φ'_M), bacteria concentration and bacteria number per alga cell obtained at final day for the nine treatments in presence of natural DOM. All values are mean values (n=4 for control and n=3 for pesticide-exposed cultures) (± standard error, SE) and * indicate significant differences between controls and pesticide-exposed cultures for different parameters (ANOVA, $p<0.05$ followed by Tukey post-hoc test, $p<0.05$).

	Control	I0.05	I0.5	D0.05	D0.5	S0.5	S5	M1	M2
μ (h^{-1})	0.0229 ± 0.0003	0.0246 ± 0.0012	0.0235 ± 0.0003	0.0231 ± 0.0004	0.0226 ± 0.0003	0.0236 ± 0.0002	0.0233 ± 0.0001	0.0237 ± 0.0004	0.0255 ± 0.0003 *
$FL1_{Lipids}$ ratio	4.69 ± 0.21	4.32 ± 0.40	4.43 ± 0.19	4.23 ± 0.23	4.51 ± 0.35	4.26 ± 0.10	5.22 ± 0.40	4.18 ± 0.07	4.28 ± 0.26
Φ'_M	0.40 ± 0.01	0.38 ± 0.00	0.37 ± 0.00	0.39 ± 0.00	0.38 ± 0.01	0.39 ± 0.01	0.40 ± 0.00	0.40 ± 0.01	0.39 ± 0.01
Bacteria concentration (10^6 cells.mL^{-1})	9.7 ± 1.3	9.7 ± 0.6	11.1 ± 0.3	9.2 ± 0.4	9.7 ± 0.9	13.4 ± 2.6	12.4 ± 0.7	11.4 ± 1.0	15.3 ± 0.7 *
Bacteria per algae cell	3 ± 0	3 ± 1	4 ± 0	2 ± 0	3 ± 0	2 ± 0	3 ± 0	2 ± 0	3 ± 0

Acknowledgements

This study has been carried out with financial support from the French National Research Agency (ANR) in the frame of the Investments for the future Programme, within the Cluster of Excellence COTE (ANR-10-LABX-45).

We would like to thank Jacky Vedrenne (Irstea), Dominique Ménard (Ifremer), Nathalie Tapie, Aurélie Mounguengui and Lucas Chevance-Demars (Univ. Bordeaux - UMR EPOC 5805 CNRS) for their help in sampling, filtration and measurements during the experiment. The authors thank Patrick Pardon for his help in pesticide analyses. Finally, the authors also thank Julie Guéguen (Irstea) for her help with the R software.

3. Devenir et toxicité vis-à-vis de *Gomphonema gracile*

Gomphonema gracile, tout comme *Sphaerellopsis* sp., a été exposée aux trois herbicides (irgarol, diuron et S-métolachlore) seuls et en mélange avec de la MOD durant sept jours. Le principe de l'expérimentation, les prélèvements et les différentes analyses ont été réalisés comme décrit dans la partie 2.2.

3.1. Concentrations d'exposition

Dans l'ensemble des traitements des volets biotiques et abiotiques, les métabolites du S-métolachlore ont été quantifiés : 52 ± 7 ng.L^{-1} pour le métolachlore ESA et 59 ± 3 ng.L^{-1} pour le métolachlore OA (toutes conditions confondues). Comme expliqué dans la partie 2.3.1., ces métabolites proviennent de la MOD naturelle concentrée.

Dans le volet abiotique, les concentrations en pesticides mesurées au premier jour de l'expérimentation étaient relativement proches des concentrations nominales (mais sensiblement plus élevées pour le diuron) : 501 ± 10 ng.L^{-1} pour l'irgarol (Figure 55A), 621 ± 30 ng.L^{-1} pour le diuron (Figure 55B) et 4792 ± 69 ng.L^{-1} pour le S-métolachlore (Figure 55C). À l'inverse, pour le volet biotique, à l'exception de la condition D0,5, les concentrations étaient significativement plus faibles que dans le volet abiotique : de -55 ± 2% pour l'irgarol à -46 ± 3% pour le S-métolachlore et -21 ± 6% pour le diuron (tous traitements confondus). Le classement par ordre décroissant de ce pourcentage de perte, correspond au classement décroissant des log K_{ow} des molécules étudiées, à savoir : irgarol (4,0) > S-métolachlore (3,4) > diuron (2,9) (Tetko *et al.*, 2005). Le log K_{ow} correspond au coefficient de partage octanol-eau. L'octanol ayant une polarité très proche des lipides des cellules, le log K_{ow} est assimilé à l'affinité de la molécule étudiée pour les acides gras, phospholipides et lipoprotéines ; autrement dit, elle permet de juger du caractère lipophile et bioaccumulable de la substance étudiée (Amiard, 2011). Au vu des constantes de chacune des molécules étudiées, elles peuvent être considérées comme lipophiles et bioaccumulables. Aussi, les variations entre les concentrations abiotiques et biotiques suggèrent une rapide adsorption sur les cellules ou une internalisation (dans les 2h suivant la contamination, délai maximal entre l'exposition et le prélèvement du dernier ballon). Concernant le diuron, cette molécule a pu en partie être internalisée. En effet, Chaumet B. (données non publiées) a observé une accumulation de la molécule en moins de 15 minutes dans la fraction intracellulaire de biofilms d'eau douce. Nestler *et al.* (2012) ont également suggéré une internalisation très rapide (de l'ordre de la minute) pour cette même molécule en raison de l'inhibition de la photosynthèse de *Chlamydomonas reinhardtii* (chlorophyte dulçaquicole) observée juste après l'ajout de diuron dans le milieu. Pour les deux autres molécules, étant donné qu'aucune cinétique d'accumulation n'est disponible dans la littérature, nous ne pouvons conclure quant à leur possible internalisation.

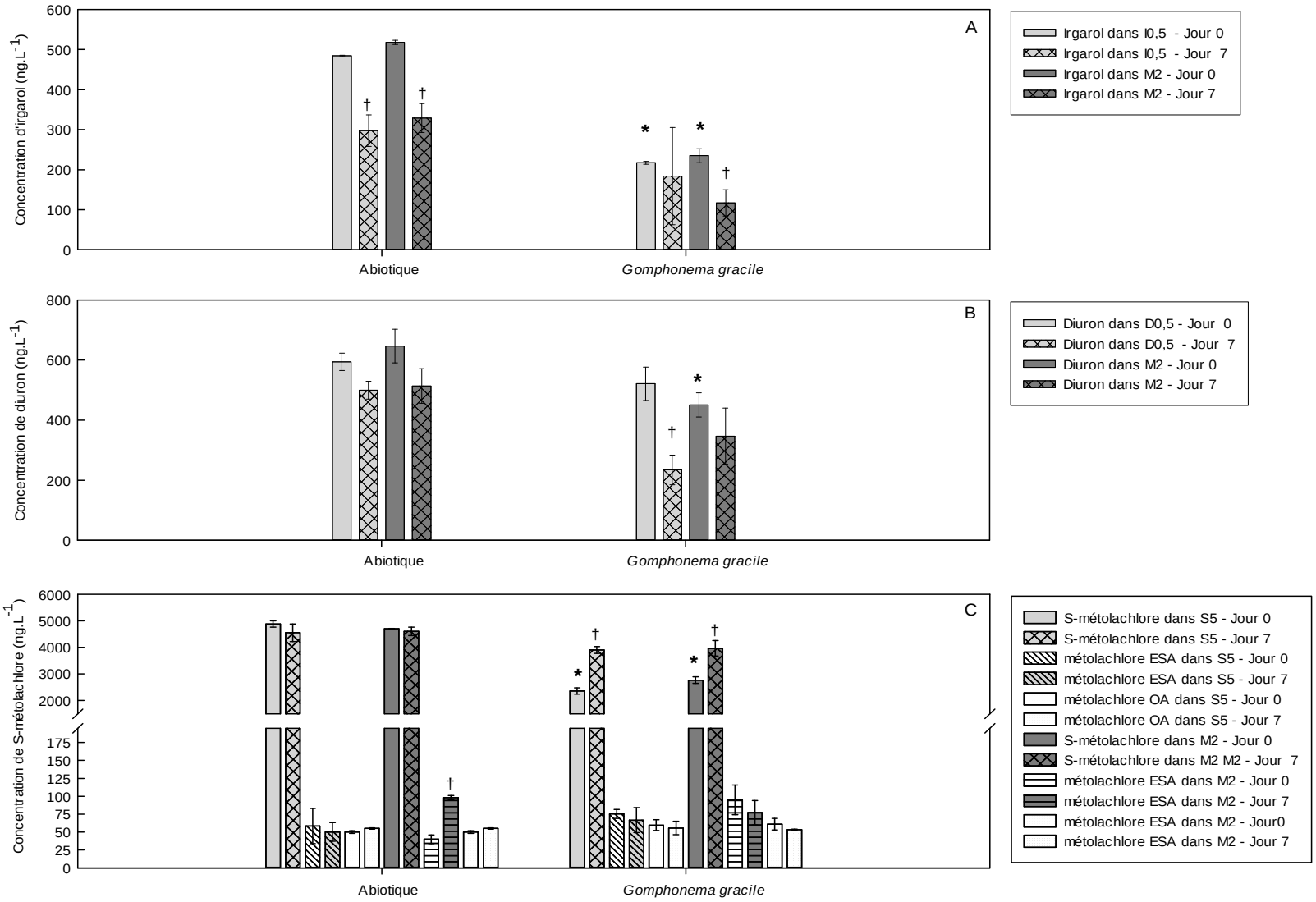


Figure 55 : Concentrations en herbicides mesurées le premier et le dernier jour de l'expérience, dans les traitements aux concentrations maximales d'irgarol (A), de diuron (B) et de S-métolachlore (C), seuls et dans le mélange M2, dans le volet biotique et abiotique. (Moyenne ± erreur-type ; n=2 pour le volet abiotique et n=3 pour les cultures de G. gracile). * indique les différences significatives entre le volet biotique et abiotique au jour 0 et † indique les différences significatives entre le premier et le dernier jour pour un même traitement (t-test, * et † $p<0,05$).

3.1. Devenir et toxicité des herbicides

Les dosages en herbicides effectués le dernier jour de l'expérimentation ont montré pour le volet abiotique : une diminution de l'ordre de 40% de la concentration en irgarol et aucune évolution au cours du temps pour le diuron et le S-métolachlore (Figure 55). Comme dans la section 2.3.2., cette diminution de l'irgarol pourrait être expliquée par plusieurs phénomènes : i) une adsorption sur les parois des ballons en verre borosilicaté ; ii) des pertes liées à la volatilisation des molécules dans l'espace de tête des ballons ; iii) une hydrolyse ; iv) une photodégradation de ce composé. Des expérimentations complémentaires en jouant sur le volume de l'espace de tête, la présence ou non de lumière, pourraient peut-être permettre d'identifier la cause de ces observations ou tout du moins exclure certains processus abiotiques.
Dans les ballons avec les microalgues, une diminution des concentrations en irgarol dans le traitement M2, en diuron dans le traitement D0,5 et une augmentation des concentrations de S-métolachlore dans les traitements S5 et M2 ont été observées. Plusieurs processus peuvent être à l'origine des diminutions mesurées : (photo-)dégradation de la molécule dans des conditions particulières, bioaccumulation, molécules « collées »/adsorbées sur la surface du biofilm, etc. Cependant, nos résultats ne nous permettent pas de conclure quant à ces phénomènes. Concernant l'augmentation de la concentration du S-métolachlore au cours du temps, il s'agit vraisemblablement d'un relargage/d'une désorption de la molécule. Ce phénomène reste encore inexpliqué, du fait de l'absence d'informations dans la littérature. Des analyses plus poussées de cinétique d'accumulation et d'adsorption de la molécule sur les parois cellulaires sont nécessaires pour conclure.

Les courbes de croissance tracées à partir des densités cellulaires (allant de 2 000 cellules.mL^{-1} à 100 000 cellules.mL^{-1}) ont montré une allure classique de courbe de croissance exponentielle. À partir de ces courbes de croissance, les taux de croissance ont été déterminés (Figure 56A). Les résultats ne montrent pas d'effet significatif sur ce paramètre pour les différents traitements. De la même façon, aucun effet significatif n'a été observé sur les autres paramètres biologiques. L'efficacité photosynthétique (Figure 56B) était de 0,34 ± 0,01, le ratio $FL1_{Lipides}$ était de 24,13 ± 1,18 (Figure 56C) et la concentration bactérienne était en moyenne de $5,76 \pm 0,31 \times 10^6$ cellules.mL^{-1} (Figure 56D).

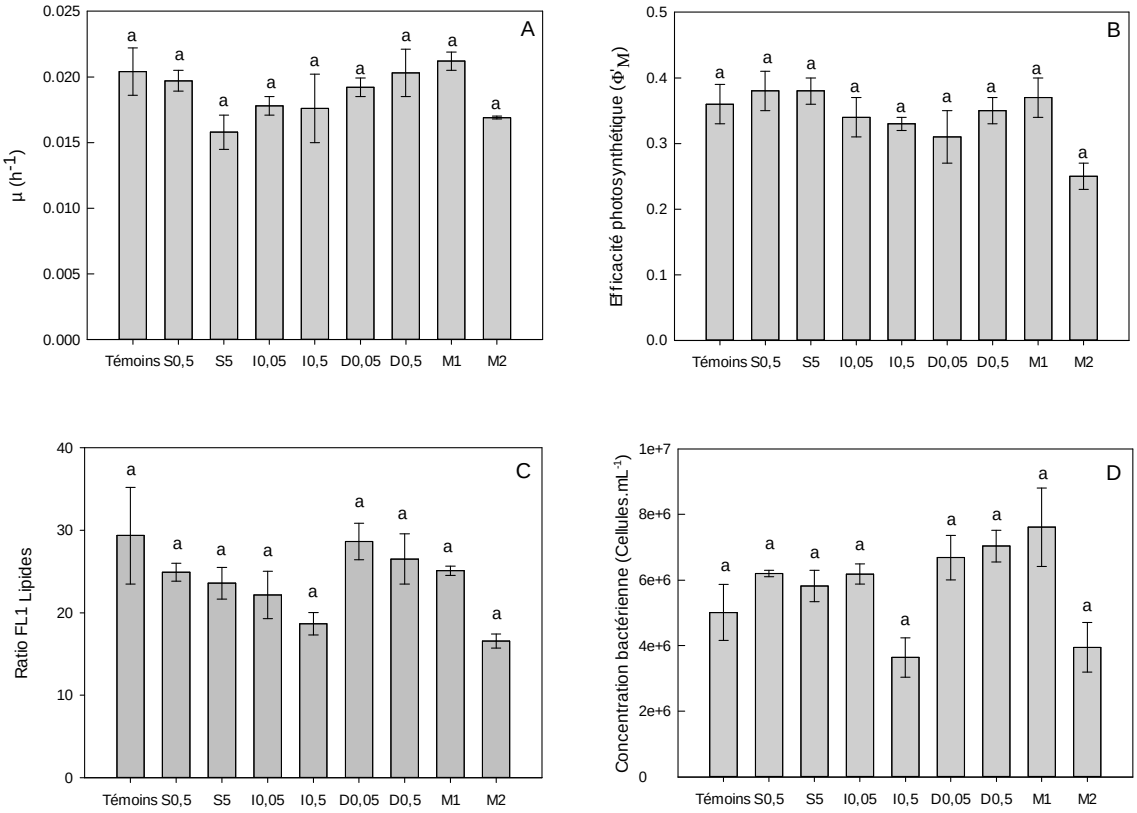


Figure 56 : Taux de croissance μ (A), efficacité photosynthétique réelle Φ'_M (B), ratio $FL1_{Lipides}$ (C) et concentration bactérienne (D) au jour final (J7) pour les 9 traitements appliqués à *G. gracile* en présence de MOD naturelle. (Moyennes ± erreur-type, n=4 pour les témoins et n=3 pour les cultures exposées aux herbicides). La lettre a indique aucune différence significative entre les traitements (ANOVA p>0,05).

D'après les données disponibles dans la bibliographie, l'absence d'effets du S-métolachlore sur les paramètres étudiés n'est pas surprenante. En effet, la toxicité vis-à-vis des microalgues (CE_{50}) est généralement de l'ordre de la centaine de $\mu g.L^{-1}$ voire du $mg.L^{-1}$ (Fairchild *et al.*, 1998, Liu & Xiong, 2009, Ma *et al.*, 2006, Vallotton *et al.*, 2008). Cependant, cela ne signifie pas que la molécule n'ait pas affecté cette espèce. En effet, lors de l'étude préliminaire (présentée dans le Chapitre 3) réalisée avec cette espèce exposée à trois concentrations de métolachlore (1, 10 et 100 $\mu g.L^{-1}$) et sans MOD, la linéarité du mouvement des microalgues était modifiée dès la concentration de 1 $\mu g.L^{-1}$. Roubeix *et al.* (2011a) ont également observé une augmentation significative de l'abondance de frustules déformés de *Surirella angusta* en présence de 5 $\mu g.L^{-1}$ de métolachlore (20‰ pour les cellules exposées contre 0‰ pour les témoins).

Concernant les deux autres molécules, bien que la sensibilité aux pesticides soit espèce-dépendante, les données disponibles dans la littérature montrent une toxicité à des concentrations largement inférieures à celle du S-métolachlore. Okamura et al (2003) ont par exemple obtenu une CE_{50} de 1,6 $\mu g.L^{-1}$ d'irgarol et de 6,6 $\mu g.L^{-1}$ de diuron sur le taux de croissance de la chlorophyte dulçaquicole *Selenastrum capricornutum* à 72h. Bao *et al.* (2011) ont déterminé une CE_{50} de 0,57 $\mu g.L^{-1}$ pour l'irgarol et de 5,9 $\mu g.L^{-}$

[1] pour le diuron sur le taux de croissance de la diatomée marine *Skeletonema costatum*, à 96h. L'espèce étudiée ici, *Gomphonema gracile*, est considérée comme très sensible à divers types de pollution (selon son profil écologique dans l'IBD ; Coste *et al.*, 2009). Aussi, il est d'autant plus surprenant de ne pas avoir observé d'effets sur cette espèce. L'hypothèse privilégiée quant à l'absence d'effets détectés de ces deux molécules, et notamment de l'irgarol, est que la présence de MOD ait modifié la biodisponibilité des pesticides. En effet, Zhang *et al.* (2016b) ont observé une modulation de la toxicité des chlorobenzènes en présence de MOD vis-à-vis de la chlorophyte dulçaquicole *Chlorella pyrenoidosa*. Enfin, lors des expérimentations, l'aspect du biofilm formé par cette espèce était foncièrement différent entre les cultures témoins et exposées (Figure 57). Ces différences d'aspect ne se sont nullement reflétées sur la mesure de carbone organique dissous et les analyses optiques réalisées pour caractériser la MOD (les données ne sont pas montrées en raison de l'absence totale de différence entre les cultures témoins et exposées). Aussi, nous pouvons nous demander si cette structuration différente du biofilm ne reflète pas un effet des pesticides et/ou une stratégie protectrice de la part des cellules (agrégation des cellules et enchâssement dans une matrice de type EPS pour limiter la surface cellulaire exposée, et/ou l'accumulation/internalisation). En effet, plusieurs études ont montré que la composition de ces exsudats était fonction de l'espèce, mais également du stade de croissance, de la composition du milieu de culture et de la présence de contaminants (de Brouwer *et al.*, 2003, Hellebust, 1965, Herzi, 2013, Taylor *et al.*, 2016, Urbani *et al.*, 2012, Zhang *et al.*, 2016a).

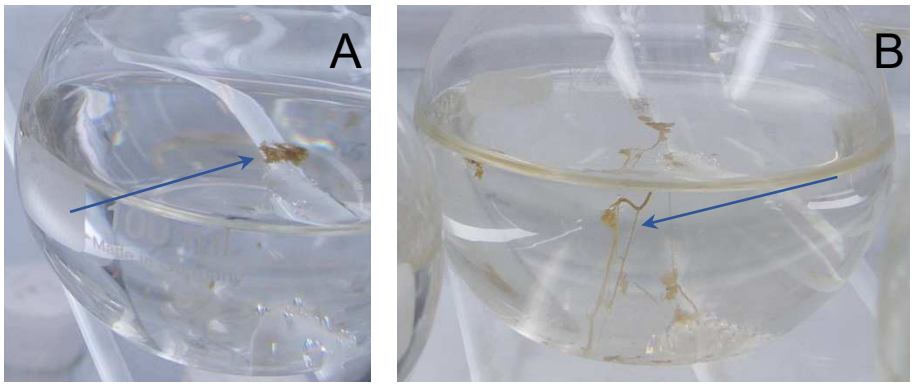


Figure 57 : Aspect du biofilm dans une culture témoin (A) et dans une culture exposée à 5 µg.L^{-1} de S-métolachlore (B).

Aussi, il serait intéressant pour de futurs travaux de prendre en considération d'autres paramètres biologiques pour l'évaluation de l'impact toxique comme la nature de la matrice d'exopolymères (composition) mais également la mobilité des cellules ou le pourcentage de frustules déformés.

4. Synthèse

Le but de ce chapitre était (i) d'évaluer, en présence de MOD, la toxicité des trois herbicides étudiés, seuls et en mélange sur deux souches de microalgues d'eau douce en cultures non axéniques et (ii) d'évaluer l'influence des microalgues et de leurs bactéries associées sur le devenir des herbicides.

Les résultats ont montré une absence totale de toxicité des trois molécules présentes seules et en mélange sur la croissance, le contenu relatif en lipides et l'efficacité photosynthétique réelle des deux souches de microalgues étudiées en présence de MOD.

Différentes hypothèses ont été émises pour expliquer ces résultats. La première hypothèse est que la microalgue *Sphaerellopsis* sp. possède une faible sensibilité aux trois pesticides testés (contrairement à *G. gracile* normalement qualifiée de très sensible). La seconde hypothèse est que la présence de la MOD aurait modifié la biodisponibilité des herbicides via leur liaison avec des composés organiques. La détermination des K_{DOC} et des cinétiques d'accumulation aurait permis de déterminer la part de pesticides libres/dissous et de déterminer si les molécules étaient entrées dans les cellules. La troisième hypothèse est que les paramètres biologiques choisis n'étaient pas été assez sensibles pour discriminer un effet des pesticides. Aussi, la mobilité et/ou le pourcentage de déformations du frustule auraient été des indicateurs supplémentaires intéressants à prendre en compte au vu de leur sensibilité démontrée par l'étude présentée dans le Chapitre 3 et par Roubeix *et al.* (2011a). Enfin, la dernière hypothèse concerne le rôle joué par la matrice EPS, dont l'aspect était foncièrement différent en présence des pesticides et en leur absence. C'est pourquoi, l'étude de sa composition aurait pu permettre de mettre en évidence des différences entre traitements.

D'autre part, les dosages de pesticides ont également permis de montrer que la présence de microorganismes (algues et bactéries associées) et de MOD avait influencé le devenir des molécules dès les premières heures d'exposition. En effet le pourcentage d'abattement a été plus important pour l'irgarol, suivi du S-métolachlore et du diuron pour les deux espèces, reflétant ainsi le classement décroissant des log K_{ow} des herbicides. Enfin, au jour final, alors que les concentrations en S-métolachlore dans les traitements de *G. gracile* ont augmenté (observation pour laquelle aucune explication ne peut être donnée), les concentrations dans les cultures de *Sphaerellopsis* sp. n'ont pas évolué. Les concentrations d'irgarol et de diuron n'ont évolué de la même façon pour *G. gracile*. Pour *Sphaerellopsis* sp., l'irgarol a totalement disparu, et une apparition de DCPMU conjointe à la diminution du diuron a été observée. Les hypothèses émises pour expliquer cette disparition sont : des processus abiotiques (photodégradation, hydrolyse, adsorption sur les parois des ballons, évaporation via l'espace de tête) couplés à des processus biologiques (adsorption sur les parois des cellules, internalisation et dégradation par les bactéries et/ou les microalgues). Concernant le diuron, en plus des processus abiotiques précédemment cités, une biodégradation de la molécule a été observée (biodégradation ou co-métabolisation par des molécules présentes dans la MOD, ou résultant de l'hydrolyse engendrée par les enzymes extracellulaires des bactéries). L'origine de cette biodégradation (microalgues et/ou bactéries) ne peut cependant par être déterminée avec les données actuelles. Aussi, des expérimentations similaires en conditions axéniques, et pour lesquelles d'autres paramètres biologiques seraient pris en considération, devraient être menées.

Chapitre 8 – Synthèse générale et perspective

Dans l'environnement, les microalgues sont la cible indirecte des pesticides et notamment des herbicides, molécules les plus largement retrouvées dans les eaux françaises (SOeS, 2015). Or ces molécules, qui sont présentes en mélanges (intérêt de considérer ces mélanges dans les études), interagissent également avec la matière organique dissoute (MOD), composante majoritaire dans l'environnement. Elle affecte en effet leur devenir, leur transport, leur biodisponibilité et leur toxicité vis-à-vis de certains animaux aquatiques (Bejarano *et al.*, 2005a). D'autre part, la MOD naturelle est également connue pour influencer le développement des microalgues en conditions naturelles (pénétration de la lumière dans l'eau (Karlsson *et al.*, 2009), protection contre les radiations UV (Tedetti & Sempéré, 2006)). Certaines études réalisées en conditions de laboratoire ont également montré que des molécules constitutives de la MOD pouvaient stimuler la croissance de certaines espèces de microalgues dulçaquicoles et marines (Gagnon *et al.*, 2005, Liu *et al.*, 2009). Cependant aucune étude n'a visé à décrire précisément les effets délétères ou avantageux que peut avoir la MOD naturelle sur les microalgues et dans quelle mesure sa présence influence la toxicité des herbicides vis-à-vis de ces organismes.

Ces travaux de thèse se sont inscrits au sein du projet IMPACT (ANR-10-LABX-45 - LabEx COTE). Ils ont eu pour objectif d'apporter des connaissances sur l'influence de trois herbicides (le S-métolachlore, le diuron et l'irgarol) retrouvés dans la zone d'étude (Leyre et Bassin d'Arcachon), sur quatre espèces de microalgues. Les microalgues ont été cultivées en conditions non axéniques et exposées aux herbicides seuls et en mélange, à dose environnementale. Ces travaux ont également exploré l'influence de la MOD naturelle sur ces quatre espèces et sur la toxicité et le devenir des trois herbicides. Les résultats des expérimentations ont été présentés dans les Chapitres 5, 6 et 7. Le but de ce dernier chapitre est donc de fournir un bilan global des résultats majeurs acquis et de proposer des perspectives à ces travaux de recherche.

1. Toxicité des herbicides étudiés

Les trois molécules choisies (le S-métolachlore, le diuron et l'irgarol) pour réaliser cette étude correspondent aux molécules essentiellement retrouvées dans la Leyre et le Bassin d'Arcachon (Figure 14 et 15 ; Fauvelle, 2012, REPAR, 2015, Tapie *et al.*, 2016). Les concentrations choisies pour cette étude se sont voulues être représentatives de ce qui peut être retrouvé dans l'environnement (pour le S-métolachlore : AEAG (2015), Fauvelle (2012), REPAR (2015) ; pour le diuron et l'irgarol : Caquet *et al.* (2013), Cozic and Durand (2013)) tout en se basant sur les résultats obtenus lors des deux études présentées dans les Chapitre 3 et 4.

Table 19 : Récapitulatif des effets significatifs observés (pourcentage par rapport aux témoins ± SE) en présence des pesticides, de la MOD et des deux combinés sur les quatre espèces de microalgues. Les cases grises indiquent une absence d'effet, les cases bleues une diminution et les cases violettes une augmentation.

Conditions	Concentration ($\mu g.L^{-1}$)	*Chaetoceros calcitrans*			*Tetraselmis suecica*			*Gomphonema gracile*			*Sphaerellopsis* sp.		
		µ	$FL1_{Lipides}$	Φ'_M	µ	$FL1_{Lipides}$	Φ'_M	µ	$FL1_{Lipides}$	Φ'_M	µ	$FL1_{Lipides}$	Φ'_M
Irgarol	0,05	-11 [4]	+29 [15]										-55 [3]
	0,5	-55 [1]	-50 [1]	-30 [1]	-56 [1]	-32 [2]	-22 [0]		-52 [1]	-45 [5]			-69 [2]
Diuron	0,05												-46 [7]
	0,5						-3 [0]						-55 [3]
S-métolachlore	0,5												-41 [4]
	5										-50 [19]		-50 [2]
Mélange	M1											+37 [9]	-45 [4]
	M2	-57 [1]	-51 [2]	-27 [2]	-63 [1]	-26 [2]	-28 [0]			-53 [3]			-55 [3]
T/T-mod	-	+10 [1]	-39 [2]								+275 [4]	-32 [3]	-17 [2]
Irgarol + MOD	0,05	-7 [0]	+25 [3]										
	0,5	-50 [0]	-25 [2]	-24 [0]	-64 [1]	-18 [0]	-25 [2]						
Diuron + MOD	0,05												
	0,5				-9 [1]	-10 [2]							
S-métolachlore + MOD	0,5												
	5												
Mélange + MOD	M1	-2 [0]											
	M2	-52 [0]	-29 [2]	-27 [1]	-75 [1]	-15 [1]	-35 [0]				+11 [1]		

1.1. Variabilité interspécifique des réponses des microalgues vis-à-vis de l'exposition aux herbicides

Avant de faire la synthèse des résultats acquis au cours de ces travaux de thèse, il est nécessaire de faire un aparté pour présenter brièvement les résultats acquis pour la condition sans MOD pour les microalgues d'eau douce et qui ne figurent pas dans le corps du manuscrit.

Les résultats acquis au cours des expérimentations réalisées avec la microalgue dulçaquicole *Gomphonema gracile* en l'absence de MOD ont permis de montrer que seul l'irgarol à la concentration de 0,5 $\mu g.L^{-1}$ et le mélange M2 avaient significativement diminué (Table 19) :

– l'efficacité photosynthétique (-45 ± 5%) et le contenu relatif en lipides (-52 ± 1%) pour l'irgarol seul;

– l'efficacité photosynthétique pour de mélange M2 (-53 ± 3%).

Aucun effet n'a donc été observé avec le S-métolachlore et le diuron. Aussi, bien que cette espèce soit catégorisée comme sensible (Coste *et al.*, 2009), il se peut que les concentrations testées ne soient pas assez élevées pour générer un effet sur les paramètres testés. Des mesures complémentaires sur d'autres paramètres comme la mobilité, l'aspect morphologique des cellules (frustules) et/ou avec une gamme de concentrations croissantes permettrait de déterminer plus précisément sa sensibilité aux molécules testées.

Concernant l'espèce *Sphaerellopsis* sp. exposée en l'absence de MOD, les résultats biologiques ont montré (Table 19) :

– une inhibition de 50 ± 19% de la croissance en présence de S-métolachlore à la concentration de 5 $\mu g.L^{-1}$;

– une augmentation de la quantité relative de lipides dans les cellules (+37 ± 9%) en présence du mélange M1 (I0,05+D0,05+S0,5) ;

– une inhibition de la photosynthèse de l'ordre de 50% pour l'ensemble des concentrations et molécules testées.

Cependant, la faible croissance de cette espèce dans le milieu de culture Dauta (Chapitre 5) qui ne semble pas optimal, témoigne plutôt d'un état physiologique de maintien dans le meilleur des cas. Des comparaisons avec d'autres milieux de culture (différents du milieu WC déjà testé) seraient nécessaires pour approfondir cet aspect.

Les résultats des expositions présentées dans le Chapitre 6 pour les espèces marines et ci-dessus pour les espèces d'eau douce ont montré que les quatre espèces de microalgues étudiées avaient été affectées par la présence d'herbicides à dose environnementale. Cependant, une variabilité dans le degré de sensibilité des microalgues a été obtenue (Table 19). En effet, les microalgues marines ont toutes deux présenté une forte

inhibition de croissance (environ 55%), d'efficacité photosynthétique (autour de 25%) et une diminution du contenu relatif en lipides (-50% pour *C. calcitrans* et -30% pour *T. suecica*) lors de l'exposition à 0,5 µg.L^{-1} d'irgarol et au mélange M2 (0,5 µg.L^{-1} d'irgarol, 0,5 µg.L^{-1} de diuron et 5 µg.L^{-1} de S-métolachlore). La diatomée marine a également été plus sensible à l'irgarol que la chlorophyte marine (effet à la concentration de 0,05 µg.L^{-1}). Les microalgues d'eau douce ont essentiellement présenté une inhibition de l'efficacité photosynthétique. L'espèce *Sphaerellopsis* sp. a par ailleurs été affectée par l'ensemble des concentrations et molécules testées. Cependant, ces effets étaient très certainement liés à son état de croissance suboptimale (Chapitre 5). Ainsi, les microalgues marines ont été globalement plus sensibles aux trois herbicides testés seuls et en mélange que les microalgues d'eau douce même si cela ne peut probablement pas être généralisé à toutes les espèces peuplant les deux milieux. Gatidou and Thomaidis (2007) ont par exemple montré que la chlorophyte marine *Navicula forcipata* était plus sensible à l'irgarol que la chlorophyte *Dunaliella tertiolecta* ($CE_{50\text{-}96h}$ sur la croissance de 0,6 et 1,1 µg.L^{-1}, respectivement) et qu'à l'inverse *Dunaliella tertiolecta* était plus sensible au diuron que *Navicula forcipata* ($CE_{50\text{-}96h}$ sur la croissance de respectivement 5,9 et 27 µg.L^{-1}). De la même façon, cette sensibilité plus grande des espèces marines par rapport aux espèces d'eau douce ne peut être généralisée tant la sensibilité de chaque espèce (voire entre populations) est variable. Par exemple, Ma *et al.* (2006) ont obtenu une $CE_{50\text{-}96h}$ de 0,7 µg.L^{-1} de diuron sur la croissance de la chlorophyte dulçaquicole *Raphidocelis subcapitata*, valeur nettement inférieure à celles obtenues par Gatidou and Thomaidis (2007), comme cité précédemment. Malgré cela, les quatre espèces de microalgues peuvent être classées de la façon suivante, selon leur sensibilité vis-à-vis des paramètres de croissance et d'efficacité photosynthétique :

T. suecica > *C. calcitrans* > *Sphaerellopsis* sp. > *G. gracile*

D'autre part, l'origine différente des souches de microalgues marines (centre Provasoli–Guillard National Center for Marine Algae and Microbiota (NCMA)) et des souches de microalgues dulçaquicoles (isolées du ruisseau de Rebec) peut également être sujette à questionnement. Le ruisseau de Rebec a été choisi en raison des milieux qu'il traverse : essentiellement des forêts et milieux semi-naturels (à 83,5%) et, dans une moindre mesure (13,5%) des territoires agricoles (Sandre, 2017), de façon à limiter les sources et l'importance de la contamination chimique. Les microalgues d'eau douce ont été cultivées au laboratoire depuis décembre 2013, à raison d'un repiquage toutes les semaines pour *G. gracile*, et toutes les deux semaines et demi pour *Sphaerellopsis* sp.. L'étude préliminaire n°1, présentée dans le Chapitre 3, a été réalisée début février 2014, et a montré des effets significatifs du métolachlore à 1 µg.L^{-1} sur la mobilité et à 10 µg.L^{-1} sur la croissance. Les expérimentations présentées dans le Chapitre 7 de ce manuscrit ont été réalisées en avril et mai 2015 soit 1 an et demi après l'isolement de la souche, mais cette fois en utilisant du S-métolachlore. La différence entre le métolachlore et le S-métolachlore réside dans le fait que le premier est composé des deux énantiomères (R et S). Le métolachlore étant interdit depuis décembre 2003 (avis JORF du 18 août 2002), il a été décidé de poursuivre les recherches avec le S-métolachlore.Aussi, il semblerait que le S-métolachlore soit plus toxique que la forme R pour certaines espèces de microalgues comme *Chlorella pyrenoidosa* ou *Scenedesmus obliquus* comme établi par respectivement Liu and Xiong (2009) et Liu *et al.* (2017). En effet ces auteurs ont démontré une toxicité plus importante du S-

métolachlore que du R-métolachlore. C'est pourquoi, il est également possible que *G. gracile* n'ait pas la même sensibilité au métolachlore testé lors de la première étude qu'au S-métolachlore. Il serait donc intéressant de faire un comparatif de toxicité entre ces deux composés sur les paramètres présentés dans le Chapitre 3.

1.2. Toxicité des herbicides seuls et en mélange

Malgré la sensibilité différentielle des espèces étudiées, les résultats présentés dans le cœur du manuscrit (Table 19 et Chapitre 6) ont permis de hiérarchiser la toxicité des trois herbicides seuls, de la façon suivante :

Irgarol > Diuron > S-métolachlore

Ce gradient de toxicité entre les molécules concorde avec les données disponibles dans la littérature (Bao *et al.*, 2011, Devilla *et al.*, 2005, Ma *et al.*, 2006, Okamura *et al.*, 2003) et l'étude préliminaire n°2 (Chapitre 4; pour l'irgarol et le diuron). Il peut être expliqué par :

– leur cible métabolique : photosynthèse pour le diuron et l'irgarol (Jones & Kerswell, 2003, Nimbal *et al.*, 1996), et synthèse des acides gras à longue chaîne pour le S-métolachlore (Fuerst, 1987). En effet, ces pesticides agissant sur la photosynthèse inhibent le transport d'électrons et donc la production directe d'énergie contrairement au S-métolachlore, qui inhibe des enzymes intervenant dans la synthèse des acides gras à longues chaînes. Aussi, le temps de réponse d'un organisme à ce type de contaminant est *a fortiori* plus long que pour ceux inhibant directement le transport d'électrons.

– le degré d'affinité de l'irgarol pour le site de fixation de la quinone Q_B sur la protéine D1 du photosystème II, supposé plus fort que celui du diuron (Chesworth *et al.*, 2004) ;

– le degré d'affinité pour les lipides polaires ($logK_{ow}$ de l'irgarol plus élevé que celui du S-métolachlore et du diuron) (Katagi, 2010). En effet, il est admis que la plupart des polluants exercent leur toxicité via leurs interactions avec les lipides contenus dans les parois cellulaires comme les phospholipides, les lipoprotéines ou les acides gras : ces interactions leur permettent ainsi de passer plus facilement au travers des membranes (Amiard, 2011).

Les résultats de l'étude préliminaire n°2 (Chapitre 4) ont permis de mettre en évidence une toxicité plus accrue vis-à-vis de la croissance des deux microalgues marines pour les mélanges irgarol(I)/diuron(D) (D5+I0,5) et (D1+I0,5) pour *T. suecica* comparativement aux molécules seules. Les résultats présentés dans le Chapitre 6 ont quant à eux permis de montrer que le mélange M1 des trois molécules aux concentrations minimales (I0,05 + D0,05 + S0,5) n'avait affecté aucun des paramètres biologiques mesurés, contrairement au mélange M2 des concentrations maximales (I0,5 + D0,5 + S5). En effet, alors que la toxicité du mélange M2 sur *C. calcitrans* était similaire à la toxicité obtenue avec la concentration maximale d'irgarol, elle était beaucoup plus marquée pour l'espèce *T. suecica* (sur la croissance et l'efficacité photosynthétique), ce qui pourrait témoigner d'un effet synergique du mélange des molécules aux concentrations testées. La variation de toxicité entre les molécules seules et les mélanges a déjà été

démontrée dans de nombreuses études (Cedergreen *et al.*, 2007, Faust *et al.*, 1993, 1994). Cedergreen *et al.* (2007) ont par ailleurs montré que le type d'interactions entre molécules (additivité, synergisme, antagonisme) était fonction de la composition du mélange mais également de la concentration de chacune des molécules et de l'organisme sur lequel sont effectués les tests. Dans notre cas, seules des expériences dédiées selon la méthodologie d'étude des effets de mélanges binaires dans un premier temps, puis ternaires dans un second temps, pourraient apporter des données suffisamment robustes pour qualifier précisément la nature des interactions entre ces molécules (additivité, synergie, antagonisme) : pour cela, différents ratios de mélanges des molécules doivent être testés sur les espèces considérées. Les résultats obtenus pourraient alors être confrontés aux modèles d'addition des concentrations (ou CA, Loewe & Muischnek, 1926) et d'indépendance d'action (ou IA, Bliss, 1939) qui permettent la prédiction des effets de mélange. Dans le cas d'une déviation des données par rapport aux modèles CA et IA, des modèles plus complexes incluant un (Hewlett, 1969) ou plusieurs (Vølund, 1992) paramètres d'interaction pourraient être utilisés pour qualifier la nature de l'interaction. Des interactions concentration/ratio-dépendantes pourraient également être mises en évidence (Jonker *et al.*, 2005).

Aussi, au vu des résultats acquis montrant une toxicité plus accrue du mélange et des informations disponibles dans la littérature, il est nécessaire de poursuivre l'effort de recherche sur les effets cocktails des pesticides afin de s'approcher au plus près du réalisme environnemental.

1.3. Descripteurs biologiques

Les trois descripteurs biologiques étudiés dans les Chapitres 5, 6 et 7 ne nous ont pas permis de détecter d'effets du S-métolachlore, du diuron, du mélange M1 et de la concentration minimale d'irgarol (hormis pour *C. calcitrans* et pour *Sphaerellopsis* sp. dont l'état physiologique relevait du maintien). Cependant, nous ne pouvons exclure des effets sub-létaux. En effet, Roubeix *et al.* (2012) ont observé une augmentation du pourcentage de déformation du frustule de la diatomée dulçaquicole *Surirella angusta* exposée à 5 $\mu g.L^{-1}$ de S-métolachlore (20‰ alors que proche de 0‰ pour les témoins). De plus, les résultats acquis lors de l'étude préliminaire n°1 (Chapitre 3) concernant l'influence du métolachlore sur *G. gracile*, ont démontré une augmentation de la linéarité du mouvement dès 1 $\mu g.L^{-1}$ et une diminution sur la croissance et une augmentation de la vitesse de déplacement à 10 $\mu g.L^{-1}$. La modification de la mobilité des cellules sous stress toxique pourrait résulter de la présence d'espèces réactives de l'oxygène (Ezequiel *et al.*, 2015) ou d'une modification des parois cellulaires (déformation du frustule) (Pandey & Bergey, 2016). Dans les expérimentations présentées dans le corps du manuscrit, les mesures de mobilité qui doivent être réalisées sur des cellules fraîchement prélevées des cultures, n'ont pu être effectuées en raison du temps nécessaire aux prélèvements pour les autres analyses biologiques et chimiques. En effet, la mesure de mobilité pour une culture demande environ 5 minutes uniquement pour la préparation de la lame et l'enregistrement du film, sans compter le temps de traitement de la vidéo par la suite, qui peut représenter jusqu'à 5 minutes par échantillon. Sachant que les expérimentations réalisées contenaient jusqu'à 56 cultures exposées simultanément (en ne comptant pas les ballons abiotiques), il était impossible

logistiquement de considérer ce paramètre supplémentaire. Néanmoins, l'intérêt que comporte l'étude du mouvement comme indicateur d'une toxicité sublétale nécessite des recherches plus approfondies sur ce descripteur.

D'autre part, il serait intéressant pour de futurs travaux d'aller plus loin aussi dans l'étude des effets sur les lipides. En effet, une diminution du contenu relatif lipidique a été observée en présence d'irgarol et du mélange M2 mais pas avec le S-métolachlore, qui cible pourtant les élongases intervenant dans la synthèse des acides gras à longues chaînes. Pandey and Bergey (2016) ont par ailleurs observé des changements du biovolume et du nombre de gouttelettes lipidiques ainsi qu'un changement de forme des chloroplastes lors d'une exposition métallique. Aussi, bien que les métaux aient des effets non semblables aux pesticides, il aurait tout de même été intéressant de s'intéresser à ces deux descripteurs au vu de la cible métabolique du S-métolachlore. Par ailleurs, l'étude des grandes classes d'acides gras pourrait également permettre d'identifier des effets des pesticides et notamment du S-métolachlore.

Enfin, il aurait également été intéressant de mesurer l'activité de diverses enzymes de détoxification du type cytochrome P450 (Mthakathi *et al.*, 2015, Thies *et al.*, 1996), des enzymes antioxydantes (superoxyde dismutase, catalase ; Liu *et al.*, 2017) ou de quantifier la synthèse de molécules connues pour protéger les cellules comme les caroténoïdes (Demmig-Adams, 1990, Rowan, 1989) afin de voir si l'absence d'effet était due à l'activation d'un système de détoxification particulièrement efficace.

2. Influence de la MOD sur les microalgues

Les expérimentations ont été réalisées sur des cultures non axéniques, en conditions contrôlées de laboratoire avec de la MOD naturelle. Les résultats ont démontré une augmentation de la densité cellulaire finale pour les quatre espèces et du taux de croissance pour deux espèces (*C. calcitrans* et *Sphaerellopsis* sp.) en présence de MOD. Cela témoigne, pour ces microalgues provenant de deux milieux différents, une exploitation directe ou indirecte (via les bactéries) des molécules organiques apportées par la MOD. En effet, la croissance a été légèrement stimulée pour *G. gracile* et *T. suecica*, à très largement stimulée pour *C. calcitrans* et *Sphaerellopsis* sp. (Chapitre 5 et Table 19). Les techniques analytiques mises en œuvre pour suivre l'évolution de la MOD (analyse du carbone organique dissous et des propriétés optiques), ont permis de déterminer que pour *Sphaerellopsis* sp., la spectaculaire stimulation de croissance observée était associée à une diminution quantitative des substances humiques (Table 19 et Figure 58).

Cependant, les cultures étaient non axéniques, c'est-à-dire non exemptes de bactéries. La concentration absolue de ces dernières était globalement plus élevée en présence de MOD, mais comme la croissance des microalgues était elle-même stimulée, le ratio bactéries/microalgues dans les cultures était plus faible (135 bactéries par cellules à 3 en présence de MOD pour les cultures de *Sphaerellopsis* sp.). Cette présence de bactéries ne peut être négligée du fait des interactions connues entre les microalgues et les bactéries. En effet, ces dernières « consomment » des molécules de faible poids moléculaire directement ou après hydrolyse de la matière polymérisée par la sécrétion d'enzymes extracellulaires (Nagata, 2008). Cette hydrolyse est connue pour participer à la mise à disposition de composés inorganiques et organiques

(comme des vitamines) pour les microalgues (Croft *et al.*, 2005, Droop, 2007). Aussi, les résultats acquis ne nous permettent pas à l'heure actuelle de déterminer si la diminution des substances humiques provient de l'action des bactéries, des microalgues ou des deux. En effet, plusieurs études ont démontré la capacité des microalgues à consommer des substances humiques via des phénomènes complexes de sorption (Campbell *et al.*, 1997, Millour, 2011, Vigneault, 2000).

Figure 58 : Cultures de *Sphaerellopsis* sp. avec et sans MOD naturelle au bout de 14 jours.

Pour les trois autres espèces, les techniques analytiques utilisées n'ont pas permis de déterminer de façon évidente si la stimulation de croissance était liée à une diminution des substances fluorescentes de la MOD en raison des modifications engendrées par l'excrétion de composés organiques dissous (carbone organique dissous, substances humiques et protéiques) par les des microalgues et bactéries . Tout comme pour *Sphaerellopsis* sp., la présence de bactéries associées aux cultures (et, dans une moindre mesure, apportées par la MOD en raison du seuil de coupure de 0,45 µm) ne nous permet pas de déterminer l'origine exacte de cette stimulation de croissance algale observée. Aussi, les futurs travaux de recherche visant à évaluer l'influence de la MOD naturelle sur les microalgues devraient intégrer les bactéries comme un facteur à part entière, en travaillant notamment avec (i) des cultures axéniques et non-axéniques et avec (ii) de la MOD filtrée sur 0,2 µm et sur 0,45 µm afin d'évaluer la part due aux bactéries apportées avec la MOD. D'autre part il serait intéressant de coupler ces recherches avec des investigations plus poussées sur la composition de la MOD et notamment le suivi des concentrations (dosages) de certaines molécules connues pour être constitutives de la MOD et pour influencer les microalgues comme le glucose ou l'acétate.

Cependant, travailler en conditions axéniques peut également engendrer de profondes modifications sur la croissance des microalgues, l'aspect des cellules (déformation des frustules, diminution de la taille), voire engendrer un retard de reproduction sexuée comme stipulé par Windler *et al.* (2014). C'est pourquoi le choix a été fait de travailler en conditions non axéniques dans ces travaux de recherche. Aussi, malgré la présence de ces bactéries nous empêchant de déterminer l'origine précise des effets observés, les résultats ont tout de même montré que la présence de MOD naturelle influençait positivement et fortement les microalgues étudiées. Cependant dans l'environnement, d'autres éléments susceptibles d'influencer

négativement les microalgues sont présents, c'est le cas notamment des pesticides. Aussi, l'un des objectifs de ces travaux de thèse a été d'évaluer l'influence de la MOD naturelle sur leur toxicité.

3. La MOD: un facteur important de modulation de la toxicité des herbicides

Les expérimentations réalisées avec les trois herbicides seuls et en mélange avec ajout de MOD naturelle ont montré, pour la première fois, que celle-ci pouvait significativement influencer la toxicité des herbicides de façon espèce-dépendante. En effet, les résultats obtenus sur la croissance, l'efficacité photosynthétique et le contenu relatif en lipides (Table 19 et Chapitres 6 et 7) en comparaison de ceux obtenus sans l'ajout de MOD dans le milieu de culture ont montré :

– une disparition complète des effets toxiques des herbicides seuls et en mélange chez les deux espèces dulçaquicoles sur l'ensemble des paramètres testés,

– une diminution de la toxicité de ces herbicides chez la diatomée marine *Chaetoceros calcitrans* vis-à-vis des trois paramètres biologiques,

– une augmentation de la toxicité de ces herbicides chez la chlorophyte marine, *Tetraselmis suecica* au regard des résultats de croissance et d'efficacité photosynthétique.

Cependant, les résultats acquis ne permettent pas d'identifier l'origine des effets observés. Aussi, diverses hypothèses constituant des pistes pour de futures recherches pourraient expliquer ces résultats. Elles sont détaillées ci-après.

3.1. Interactions MOD/pesticides

La première hypothèse émise pour tenter d'expliquer cette modulation de toxicité est que les pesticides (ou tout du moins une partie) se seraient liés à certaines molécules organiques présentes dans la MOD naturelle et/ou sur des molécules résultant de l'action des bactéries. Cette liaison favoriserait (pour *T. suecica*) ou diminuerait (pour les trois autres espèces) le passage des pesticides dans les cellules ou au travers de la matrice organique (EPS) dans laquelle vit *G. gracile*. Cependant, aucune étude n'est disponible à ce jour dans la littérature pour étayer cette hypothèse. Aussi, il aurait été intéressant d'intégrer des mesures de cinétique d'accumulation des trois herbicides dans les cellules et la matrice EPS en présence et en l'absence de MOD afin d'évaluer l'influence de la MOD sur la biodisponibilité des molécules. Enfin, des mesures de K_{DOC} auraient également permis de déterminer la part d'herbicides libres et liés à la MOD (Krop *et al.*, 2001), pouvant potentiellement expliquer les effets observés.

3.2. Influence de composants organiques dissous sur les microalgues

Outre la potentielle consommation directe ou indirecte des molécules organiques, la présence de ces molécules organiques pourrait modifier l'accessibilité des herbicides aux cellules via une action sur les

parois cellulaires. En effet, Parent *et al.* (1996) ont montré que les acides fulviques augmentaient la perméabilité membranaire des cellules de la chlorophyte *Chlorella pyrenoïdosa*. Aussi, nous émettons l'hypothèse que la présence de telles substances faciliterait le passage des herbicides (liés ou non à des molécules organiques) dans la cellule, provoquant ainsi l'augmentation de leur toxicité et notamment pour le diuron, l'irgarol et le mélange d'herbicides M2 vis-à-vis de la chlorophyte marine *T. suecica*. Cette hypothèse ne serait pas valide pour les diatomées en raison de leur frustule siliceux qui pourrait jouer un rôle de protection. Cependant, des analyses plus poussées sur la perméabilité membranaire (Parent *et al.*, 1996, Spiese *et al.*, 2016) et les interactions parois cellulaires/MOD/pesticides sont nécessaires pour tenter d'infirmer ou confirmer ces hypothèses sur la perméabilité et le potentiel rôle du frustule.
Quant à la chlorophyte *Sphaerellopsis* sp., elle présente peut-être naturellement une faible sensibilité aux herbicides testés (aucune donnée n'est disponible dans la littérature pour cette espèce).

3.3. Système de détoxification

En présence de MOD, trois des quatre espèces, *C. calcitrans*, *G. gracile* et *Sphaerellopsis* sp., ont présenté une diminution ou une disparition complète (pour les dulçaquicoles) des effets toxiques des herbicides seuls et en mélange qui avaient été observés en l'absence de MOD. Parmi ces trois espèces, *C. calcitrans* et *Sphaerellopsis* sp. ont eu leur croissance particulièrement stimulée en présence de MOD, augmentation liée à une consommation directe ou indirecte (via les bactéries) de molécules organiques (Table 19 et Chapitre 5). Or les microalgues disposent d'un système de détoxification puissant de type cytochrome P450, superoxyde dismutase, catalase (Liu *et al.*, 2017, Mthakathi *et al.*, 2015, Thies *et al.*, 1996). Aussi, nous émettons l'hypothèse que la présence de MOD a constitué une ressource énergétique (directe ou indirecte) supplémentaire pour les microalgues, leur permettant de se détoxifier plus « facilement » et/ou de façon plus efficace. C'est pourquoi il aurait été intéressant lors de ces expérimentations et dans le cadre de recherches futures, d'intégrer la mesure de diverses activités enzymatiques afin d'évaluer les capacités de détoxification des espèces.

Enfin, il est important de souligner que la diminution ou disparition des effets toxiques ne concerne que les trois paramètres biologiques étudiés (Chapitres 6 et 7). Aussi, les descripteurs suivis étaient peut-être insuffisamment sensibles pour détecter des effets sublétaux, qui auraient vraisemblablement pu être observés en ajoutant le suivi d'autres paramètres biologiques tels que la mobilité, l'étude des classes de lipides, le nombre et la taille des gouttelettes lipidiques, de la perméabilité membranaire, la mesure d'activités enzymatiques, et ce afin d'évaluer et de comprendre au mieux les effets des pesticides sur les microalgues et l'influence de la MOD sur cette toxicité.

4. Modifications engendrées par les microorganismes sur leur environnement chimique

Le dernier ensemble de résultats majeurs obtenus dans le cadre de ces travaux de recherche concerne les effets que les microorganismes (microalgues/bactéries) ont eu sur la MOD et les pesticides. En effet, le suivi chimique réalisé au cours des expérimentations a permis de démontrer qu'ils étaient capables d'engendrer de profondes modifications de ces deux composants.

4.1. Modifications qualitatives et quantitatives de la MOD

Le suivi de la concentration en carbone organique dissous lors des expérimentations a montré que les quatre espèces de microalgues et leurs bactéries associées avaient fortement excrété (Chapitres 5, 6 et 7). Les analyses optiques de la MOD, par spectrophotométrie UV-Visible et spectrofluorimétrie, nous ont permis de constater une diminution globale du caractère aromatique de la MOD dans les cultures des quatre espèces. Elles ont également permis de constater pour trois des quatre espèces (les deux espèces marines et *Sphaerellopsis* sp.) :

– une diminution du poids moléculaire moyen de la matière organique dissoute au cours du temps ;

– une augmentation de la quantité de substances fluorescentes de type humiques et protéiques.

Les résultats obtenus sur les cultures de *G. gracile* montrent une augmentation du poids moléculaire moyen et une diminution de la proportion de substances fluorescentes. Aussi au vu de ces résultats, nous pouvons nous demander si la matrice d'EPS, observée en microscopie optique, n'aurait pas fortement perturbé les analyses (molécules fluorescentes adsorbées à leur surface ou liaison(s) particulière(s) ayant engendré une perte lors de la filtration sur 0,45µm pour les analyses optiques et/ou leur interaction ayant rendu les sites excitables non disponibles).

Néanmoins, l'ensemble de ces résultats a souligné la profonde modification qualitative et quantitative de la MOD engendrée par les microorganismes. Cependant, ces analyses n'ont pas permis de discriminer les parts liées à la photodégradation, à l'excrétion des cellules (microalgues et bactéries), à la consommation directe ou à la modification des molécules (hydrolyse par enzymes extracellulaires) par les bactéries et/ou les microalgues. Aussi, pour de futures expérimentations, il paraît important de pouvoir découpler les bactéries des microalgues afin de pouvoir quantifier la part des modifications liées à chacun de ces organismes.

4.2. Devenir des pesticides

Les résultats acquis sur les pesticides ont permis de montrer que les microorganismes combinés ou non avec de la MOD avaient également fortement influencé le devenir des pesticides au cours des expérimentations.

Les analyses des concentrations en pesticides effectuées dans le cadre de ces travaux ont permis de souligner qu'une quantité non négligeable d'irgarol et de diuron (près de 50%) était probablement adsorbée sur les parois des cellules et/ou internalisée dans les cellules des quatre espèces dès les premières heures des expérimentations, en présence ou non de MOD dans le milieu. La rapide internalisation du diuron a été soulignée par Nestler *et al.* (2012) pour la microalgue *Chlamydomonas reinhardtii* (en moins de 2 minutes) et observée par Chaumet B., dont les travaux de thèse sont en cours, sur du biofilm (en moins de 15 minutes). Aussi, des recherches plus poussées devraient être menées sur l'internalisation du diuron en présence ou non de MOD. De la même façon, il pourrait être intéressant d'évaluer cette internalisation pour les deux autres molécules étudiées (l'irgarol et le S-métolachlore) dont aucune donnée de ce type n'est actuellement disponible. Ces données pourraient permettre de comprendre les variations de concentrations observées et de les relier ou non aux effets toxiques relevés sur les trois paramètres des quatre espèces.

D'autre part, les analyses réalisées lors des expérimentations avec l'espèce *Sphaerellopsis* sp. ont permis de mettre en évidence une apparition d'un des métabolites du diuron, le DCPMU, en présence de MOD naturelle. Cependant, les résultats de ces travaux n'ont pas permis d'identifier les organismes à l'origine de cette biotransformation étant donné la présence de bactéries (cultures non axéniques). Le diuron est biodégradé par des bactéries Gram +, Gram – et des champignons (Giacomazzi & Cochet, 2004). Cependant, de nombreuses études ont montré la capacité des microalgues à biodégrader les pesticides grâce à leur système enzymatique complexe (Torres *et al.*, 2008, Zablotowicz *et al.*, 1998). Aussi, il aurait fallu intégrer une condition axénique afin de pouvoir déterminer l'origine de cette biotransformation dans nos expérimentations. Il aurait également été pertinent de réaliser des mesures d'activités enzymatiques liées à la détoxification (cytochrome P450, glutathion S-transférase) et d'effectuer des dosages intracellulaires des pesticides et de leurs métabolites.

Concernant l'irgarol, un fort abattement des concentrations a été observé dans les cultures des deux espèces marines et celles de *G. gracile*, alors qu'une disparition complète de la molécule a été observée pour *Sphaerellopsis* sp. Au vu de la durée de l'expérimentation avec *Sphaerellopsis* sp. (14 jours) comparativement aux trois autres espèces (six jours pour les espèces marines et sept jours pour *G. gracile*), nous pouvons nous demander si, à durée égale, cette diminution de la concentration n'aurait pas été la même. D'autre part, il aurait été intéressant de doser le métabolite principal de l'irgarol, (métabolite M1 ; 2-méthylthio-4-tert-butylamino-6-amino-s-triazine) pour déterminer si la diminution de la molécule parent serait liée à l'apparition de ce métabolite. En effet, nous ne pouvons à l'heure actuelle statuer sur l'origine de ces observations, divers processus étant plausibles : l'internalisation, l'adsorption sur les parois cellulaires couplée ou non à la photodégradation, l'hydrolyse et/ou la biodégradation de la molécule (par les bactéries et/ou les microalgues). C'est pourquoi, il serait important pour de futurs travaux de recherche (i) de travailler en conditions axéniques et non-axéniques pour déterminer la part des effets liés aux microalgues et aux bactéries, (ii) de doser le métabolite de l'irgarol (dosage très rarement réalisé en particulier dans le suivi environnemental), et (iii) de réaliser des cinétiques d'accumulation avec et sans MOD dans les cellules et la matrice d'EPS.

L'ensemble de ces travaux exploratoires de thèse ont ainsi souligné le lien étroit entre ces trois composants que sont les microorganismes, la MOD naturelle et les pesticides. Néanmoins aucun patron "générique" de réponse n'ayant pu être établi pour les quatre espèces étudiées et cultivées en conditions non-axéniques, ces travaux soulignent également la complexité de leurs interactions et le fait que des recherches plus approfondies doivent être menées pour tenter de comprendre les phénomènes observés en conditions contrôlées et dans l'environnement.

5. Perspectives

Les nombreuses perspectives de recherche du point de vue biologique et chimique pouvant être données à ces travaux peuvent être abordées selon deux approches :

– une approche basée sur les espèces seules pour comprendre les mécanismes à l'échelle de la cellule/d'une espèce, en conditions contrôlées ;

– une approche basée sur les communautés naturelles en conditions contrôlées afin d'augmenter le réalisme environnemental.

5.1. À l'échelle de l'espèce

5.1.1. Détermination de l'influence de la MOD sur les microalgues

Dans les expérimentations de cette thèse, les cultures contenaient toutes des bactéries provenant à la fois des cultures mais également de la MOD puisque le seuil de coupure de filtration était de 0,45 µm. Aussi, afin de déterminer plus précisément la capacité des microalgues à utiliser directement des molécules organiques sans l'intervention de bactéries, il serait intéressant de réaliser des expérimentations en milieu contrôlé, en conditions axéniques et non axéniques et avec de la MOD filtrée sur 0,2 µm et sur 0,45 µm. Ces expérimentations comporteraient trois types de conditions :

– une condition autotrophe : (milieu de culture + microalgues) exposés à la lumière avec un cycle jour:nuit ;

– une condition mixotrophe : (milieu de culture + microalgues + MOD) exposés à la lumière avec un cycle jour:nuit ;

– une condition hétérotrophe : (milieu de culture + microalgues + MOD) gardés à l'obscurité pendant toute l'expérimentation.

Ces expérimentations permettraient ainsi de déterminer l'influence des bactéries associées aux cultures et apportées par la MOD. Il serait également intéressant de réaliser ces expérimentations avec de la MOD de différentes saisons de l'année et provenant de divers endroits afin d'évaluer dans quelle mesure les réponses des microalgues peuvent varier selon la composition de la MOD.

D'autre part, pour tenter d'identifier des molécules ou groupes de molécules pouvant être à l'origine de l'augmentation de croissance (si l'absence de bactéries n'empêche pas la croissance algale), il serait également intéressant de rajouter des analyses complémentaires sur la MOD telles que (i) du

fractionnement par AF4 (fractionnement par couplage flux/force) afin d'évaluer si certaines gammes de taille de molécules sont plus facilement utilisées ou (ii) des dosages de composants comme les sucres (individuels et/ou totaux) et les acides aminés (individuels et/ou totaux) par chromatographie (Amiard, 2011).

5.1.2. Effets des pesticides sans MOD

Compte-tenu des résultats observés sur la mobilité des cellules en présence de métolachlore dès 1 $\mu g.L^{-1}$, il serait intéressant de poursuivre l'effort de recherche sur ce paramètre couramment utilisé dans le domaine animal. Des tests pourraient être réalisés au cours desquels plusieurs paramètres pourraient être évalués comme la quantité d'ATP, la taille et la forme des cellules (déformation du frustule), la quantité d'espèces réactives de l'oxygène, la quantité de lipides (classes de lipides, nombre et taille des gouttelettes lipidiques). La mesure de ces nombreux paramètres pourrait peut-être permettre deles relier à la mobilité des cellules et ainsi potentiellement de pouvoir en faire un critère de « qualité » ou d'état physiologique des cellules simple à mettre en œuvre pour l'évaluation de l'impact toxique.
De plus, comme soulevé plusieurs fois au cours du manuscrit et lors de la synthèse générale, il serait important pour de futurs travaux de recherches sur l'évaluation de l'impact toxique d'intégrer la mesure d'activités enzymatiques liées à la détoxification des cellules (cytochrome P450, glutathion S-transférases). En effet, ces mesures pourraient permettre d'expliquer une diminution ou l'absence de toxicité observée pour le S-métolachlore ou le diuron.

D'autre part, compte-tenu des effets biologiques observés (inhibition des paramètres biologiques étudiés en présence d'irgarol et du mélange M2) et notamment des variations de concentrations en pesticides, il serait intéressant et important d'évaluer les cinétiques d'accumulation des pesticides dans les cellules mais également dans les EPS. Des expérimentations pour tenter de déterminer la vitesse d'accumulation du diuron (et prochainement d'autres molécules) au sein du biofilm (dans les EPS et les cellules) sont actuellement en cours de réalisation au sein de l'équipe CARMA d'Irstea Bordeaux (thèse de Betty Chaumet).

Enfin, les résultats des expérimentations réalisées avec les mélanges (irgarol/diuron et irgarol/diuron/S-métolachlore) ont permis de montrer une amplification des effets observés par rapport aux molécules seules vis-à-vis des microalgues marines (étude n°2 et Chapitre 6). Des expérimentations en cours au Laboratoire d'Écotoxicologie d'Ifremer Nantes (dans le cadre de la thèse de Valentin Dupraz) ont par ailleurs permis de montrer que les effets du mélange irgarol/diuron pouvaient être additifs ou synergiques selon l'espèce testée, le ratio de chaque molécule dans le mélange, et selon les concentrations appliquées. Aussi, au vu des résultats acquis et présentés dans ce manuscrit sur les deux espèces marines et des résultats disponibles dans la littérature et acquis à Ifremer, il est nécessaire de poursuivre l'effort de recherche sur les effets cocktails afin de comprendre les interactions et effets entre les molécules et les microalgues pouvant avoir lieu dans l'environnement.

5.1.3. Effets des pesticides avec MOD

Les résultats acquis au cours de ces travaux de thèse ont permis de montrer que l'influence de la MOD sur la toxicité des herbicides présents seuls et en mélange était fonction : de la molécule testée, du paramètre physiologique étudié mais également de l'espèce de microalgue étudiée. C'est pourquoi au vu des données acquises et de la représentativité de la MOD dans l'environnement, il semble important de poursuivre les efforts de recherche sur l'influence de la MOD sur la toxicité des pesticides. Cependant, pour de futurs travaux visant à évaluer l'impact toxique, il sera nécessaire d'élargir le panel de paramètres biologiques évalués (mobilité, enzymes de détoxification, lipides, perméabilité membranaire). D'autre part, il serait également important d'intégrer des mesures de K_{DOC} afin de déterminer la part dissoute libre des pesticides et la part liée à la MOD, conditionnant la biodisponibilité des pesticides.

Il semble par ailleurs pertinent de réaliser des expérimentations semblables à celles menées dans les travaux présentés en intégrant des conditions axéniques afin d'évaluer la part de responsabilité des bactéries sur les effets biologiques observés mais également sur les effets chimiques (apparition de DCPMU, disparition de l'irgarol).

Enfin, il serait intéressant de réaliser des expérimentations semblables à celles présentées avec de la MOD naturelle de diverses saisons et de divers endroits afin d'évaluer dans quelle mesure cette variation de composition peut influencer les réponses des microalgues.

5.2. À l'échelle des communautés

Cette étude avait pour but d'évaluer la toxicité d'herbicides seuls, en mélange et à dose environnementale vis-à-vis de monocultures algales en intégrant une composante majoritaire de l'environnement, la MOD. Aussi, pour aller plus loin dans ce réalisme environnemental, les communautés algales pourraient être à la base d'études visant à évaluer les effets de la MOD couplée aux pesticides. Divers paramètres pourraient être suivis comme l'efficacité photosynthétique globale (couramment utilisée dans les études en écotoxicologie en raison du lien existant entre la réponse et l'état physiologique de la communauté), les taxons composant cette communauté et ce dans le but de voir si une restructuration de la communauté se met en place, par remplacement des taxons sensibles au profit de taxons plus tolérants, les activités enzymatiques antioxydantes (marqueurs du stress oxydant pour le biofilm de rivière (Bonnineau *et al.*, 2013)), etc. Ces résultats pourront ainsi permettre de compléter les données disponibles dans la littérature sur la toxicité des pesticides dans l'environnement aquatique.

Bibliographie

Abou-Waly HF. 2000. Effect of organic solvents on growth of freshwater algae. *International Journal of Environmental Studies* 57: 411-18.

AEAG. 2015. Qualité des eaux et produits phytosanitaires sur le bassin Adour-Garonne - Situation 2013-2014, Agence de l'eau Adour-Garonne - Ministère du développement durable, 8 pp.

AFNOR. 2001. Water quality - Determination of soluble silicates - Molecular absorption spectrometric method - NF T 90-007.

Ahlgren G, Merino L. 1991. Lipid analysis of freshwater microalgae: a method study. *Archiv für Hydrobiologie* 121: 295-306.

Ahmed H, Häder D-P. 2010. Rapid ecotoxicological bioassay of nickel and cadmium using motility and photosynthetic parameters of *Euglena gracilis*. *Environmental and Experimental Botany* 69: 68-75.

Aiken G. 2014a. Fluorescence and dissolved organic matter: a chemist's perspective. In *Aquatic organic matter fluorescence*, ed. PG Coble, J Lead, A Baker, DM Reynolds, RGM Spencer, Cambridge University Press, pp. 35-74.

Aiken GR. 2014b. Dissolved organic matter in aquatic systems. In *Comprehensive Water Quality and Purification*, ed. S Ahuja, Elsevier, pp. 205-20.

Akimoto S, Mimuro M. 2007. Application of time-resolved polarization fluorescence spectroscopy in the femtosecond range to photosynthetic systems. *Photochemistry and Photobiology* 83: 163-70.

Alix A, Barriuso E, Bedos C, Bonicelli B, Caquet T, et al. 2005. Devenir et transfert des pesticides dans l'environnement et impacts biologiques. In *Pesticides, agriculture et environnement. Réduire l'utilisation des pesticides et limiter leurs impacts environnementaux. Rapport d'Expertise scientifique collective*, ed. V M., INRA et Cemagref (France). pp. 219.

Alkhamis Y, Qin JG. 2013. Cultivation of *Isochrysis galbana* in phototrophic, heterotrophic, and mixotrophic conditions. *BioMed Research International* 2013: 9.

Altenburger R, Walter H, Grote M. 2004. What contributes to the combined effect of a complex mixture? *Environmental Science & Technology* 38: 6353-62.

Amaro HM, Macedo ÂC, Malcata FX. 2012. Microalgae: an alternative as sustainable source of biofuels? *Energy* 44: 158-66.

Amblard C, Boisson J, Bourdier G, Fontvieille D, Gayte X, Sime-Ngando T. 1998. Ecologie microbienne en milieu aquatique: des virus aux protozoaires. *Revue des sciences de l'eau* 11: 145-62.

Amiard JC. 2011. *Les risques chimiques environnementaux: Méthodes d'évaluation et impacts sur les organismes*. Tec & doc-Lavoisier. pp. 782.

Amin SA, Hmelo LR, van Tol HM, Durham BP, Carlson LT, et al. 2015. Interaction and signalling between a cosmopolitan phytoplankton and associated bacteria. *Nature* 522: 98-101.

Aoki S, Fuse Y, Etsu Y. 2004. Determinations of humic substances and other dissolved organic matter and their effects on the increase of COD in Lake Biwa. *Analytical sciences* 20: 159-64.

Arzul G, Videau C, Bodennec G, Crassous M-P, Youenou A. 2002. Comparaison de l'hétérotrophie phytoplanctonique en laboratoire et in situ: efflorescence estivale en eau côtière et populations printanières en mer stratifiée, Ifremer, France, 37 pp.

Aubertot JN, Barbier JM, Carpentier A, Gril JN, Guichard L, et al. 2005. Pesticides, agriculture et environnement - Réduire l'utilisation des pesticides et en limiter les impacts environnementaux, synthèse du rapport d'expertise, INRA et Cemagref (France), 64 pp.

Auby I, Maurer D. 2004. Etude de la reproduction des huîtres creuses dans le Bassin d'Arcachon: rapport final, Ifremer, 327 pp.

Azam F, Fenchel T, Field J, Gray J, Meyer-Reil L, Thingstad F. 1983. The ecological role of water-column microbes in the sea. *Marine ecology progress series* 10: 257-63.

Bao VWW, Leung KMY, Qiu J-W, Lam MHW. 2011. Acute toxicities of five commonly used antifouling booster biocides to selected subtropical and cosmopolitan marine species. *Marine Pollution Bulletin* 62: 1147-51.

Basheer C, Tan KS, Lee HK. 2002. Organotin and Irgarol-1051 contamination in Singapore coastal waters. *Marine Pollution Bulletin* 44: 697-703.

Bauer JE, Bianchi TS. 2011. Dissolved organic carbon cycling and transformation. In *Treatise on estuarine and coastal science.* , ed. E Wolanski, D McLusky, Academic Press, Elsevier, pp. 7-67.

Beardall J, Raven JA. 2016. Carbon acquisition by microalgae. In *The Physiology of Microalgae*, ed. MA Borowitzka, J Beardall, JA Raven, Springer International Publishing, pp. 89-99.

Bejarano AC, Chandler GT, Decho AW. 2005a. Influence of natural dissolved organic matter (DOM) on acute and chronic toxicity of the pesticides chlorothalonil, chlorpyrifos and fipronil on the meiobenthic estuarine copepod *Amphiascus tenuiremis*. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* 321: 43-57.

Bejarano AC, Decho AW, Thomas Chandler G. 2005b. The role of various dissolved organic matter forms on chlorpyrifos bioavailability to the estuarine bivalve *Mercenaria mercenaria*. *Marine Environmental Research* 60: 111-30.

Belles A. 2012. Développement et applications environnementales des échantillonneurs passifs pour la surveillance des écosystèmes aquatiques. *PhD dissertation* thesis. Université de Bordeaux 1, France, 470 pp.

Benner R. 2003. Molecular indicators of the bioavailability of dissolved organic matter. In *Aquatic ecosystems: Interactivity of dissolved organic matter*, ed. SEG Findlay, RL Sinsabaugh, Academic Press, pp. 121-37.

Benner R, Amon RM. 2015. The size-reactivity continuum of major bioelements in the ocean. *Annual review of marine science* 7: 185-205.

Bérard A, Benninghoff C. 2001. Pollution-induced community tolerance (PICT) and seasonal variations in the sensitivity of phytoplankton to atrazine in nanocosms. *Chemosphere* 45: 427-37.

Bérard A, Dorigo U, Mercier I, Becker-van Slooten K, Grandjean D, 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: 935-44.

Berg LR, Raven PH, Hassenzahl DM. 2009. *Environnement*. De Boeck Supérieur. pp. 687.

Bertilsson S, Jones J. 2003. Supply of dissolved organic matter to aquatic ecosystems: autochthonous sources. In *Aquatic ecosystems: interactivity of dissolved organic matter*, ed. SEG Findlay, RL Sinsabaugh, Academic Press, pp. 3-24.

Bertrand J. 1999. Mouvements des diatomées VI. Les efforts pendant le déplacement apical. Mesures, analyses, relations : longueur, vitesse, force. *Cryptogamie Algologie* 20: 43-57.

Bester K, Hühnerfuss H, Brockmann U, Rick HJ. 1995. Biological effects of triazine herbicide contamination on marine phytoplankton. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology* 29: 277-83.

Bhatnagar A, Chinnasamy S, Singh M, Das KC. 2011. Renewable biomass production by mixotrophic algae in the presence of various carbon sources and wastewaters. *Applied Energy* 88: 3425-31.

Bi YF, Miao SS, Lu YC, Qiu CB, Zhou Y, Yang H. 2012. Phytotoxicity, bioaccumulation and degradation of isoproturon in green algae. *Journal of Hazardous Materials* 243: 242-49.

Biber MV, Gülaçar FO, Buffle J. 1996. Seasonal variations in principal groups of organic matter in a eutrophic lake using pyrolysis/GC/MS. *Environmental Science & Technology* 30: 3501-07.

Bliss C. 1939. The toxicity of poisons applied jointly. *Annals of applied biology* 26: 585-615.

Blough NV, Del Vecchio R. 2002. Chromophoric DOM in the coastal environment. In *Biogeochemistry of marine dissolved organic matter*, ed. DA Hansell, AR Carlson, Academic Press, pp. 509-46.

Boehlert GW, Mundy BC. *American Fisheries Society Symposium1988*, 3: 1-67.

Böger P. 2003. Mode of action for chloroacetamides and functionally related compounds. *Journal of Pesticide Science* 28: 324-29.

Boland J, Koomen I, van Lidth de Jeude J, Oudejans J. 2004. *Les pesticides: composition, utilisation et risques*. Agromisa. pp. 124.

Bollag J, Liu S. 1990. Biological transformation processes of pesticides. *Pesticides in the soil environment: processes, impacts, and modeling*: 169-211.

Bollman RC, Robinson GGC. 1977. The kinetics of organic acid uptake by three Chlorophyta in axenic culture. *Journal of Phycology* 13: 1-5.

Bonnineau C, Tlili A, Faggiano L, Montuelle B, Guasch H. 2013. The use of antioxidant enzymes in freshwater biofilms: temporal variability vs. toxicological responses. *Aquatic Toxicology* 136–137: 60-71.

Borgert CJ, Quill TF, McCarty LS, Mason AM. 2004. Can mode of action predict mixture toxicity for risk assessment? *Toxicology and Applied Pharmacology* 201: 85-96.

Brennan L, Blanco Fernández A, Mostaert AS, Owende P. 2012. Enhancement of BODIPY$^{505/515}$ lipid fluorescence method for applications in biofuel-directed microalgae production. *Journal of Microbiological Methods* 90: 137-43.

Brown MR. 1991. The amino-acid and sugar composition of 16 species of microalgae used in mariculture. *Journal of experimental marine biology and ecology* 145: 79-99.

Buma AGJ, Sjollema SB, van de Poll WH, Klamer HJC, Bakker JF. 2009. Impact of the antifouling agent Irgarol 1051 on marine phytoplankton species. *Journal of Sea Research* 61: 133-39.

Burrows HD, Canle L M, Santaballa JA, Steenken S. 2002. Reaction pathways and mechanisms of photodegradation of pesticides. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology* 67: 71-108.

Butcher RW. 1959. *An introductory account of the smaller algae of the British coastal waters. Part 1: introduction and chlorophyceae*. pp. 74.

Calabrese EJ. 2005. Paradigm lost, paradigm found: the re-emergence of hormesis as a fundamental dose response model in the toxicological sciences. *Environmental Pollution* 138: 378-411.

Calvet R. 2005. *Les pesticides dans le sol: conséquences agronomiques et environnementales*. Editions France Agricole. pp. 637.

Campbell PG, Twiss MR, Wilkinson KJ. 1997. Accumulation of natural organic matter on the surfaces of living cells: implications for the interaction of toxic solutes with aquatic biota. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences* 54: 2543-54.

Canonica S. 2009. Matière organique, lumière et dégradation des polluants. In *Eawag News*, pp. 16-18: L'institut de recherche de l'eau du domaine des EPF.

Canton M, Anschutz P, Coynel A, Polsenaere P, Auby I, Poirier D. 2012. Nutrient export to an Eastern Atlantic coastal zone: first modeling and nitrogen mass balance. *Biogeochemistry* 107: 361-77.

Canuel EA, Hardison AK. 2016. Sources, ages, and alteration of organic matter in estuaries. *Annual Review of Marine Science* 8: 409-34.

Caquet T, Roucaute M, Mazzella N, Delmas F, Madigou C, et al. 2013. Risk assessment of herbicides and booster biocides along estuarine continuums in the Bay of Vilaine area (Brittany, France). *Environmental Science and Pollution Research* 20: 651-66.

Carlowicz M. 2011. *As the Seasons Change, Will the Plankton?* R Simmon, NASA, Earth Observatory http://earthobservatory.nasa.gov/Features/OceanProductivity/printall.php.

Carmosini N, Grandstrand S, King-Heiden TC. 2016. Developmental toxicity of triclosan in the presence of dissolved organic carbon: moving beyond standard acute toxicity assays to understand ecotoxicological risk. *Zebrafish* 13: 424-31.

Carrera-Martinez D, Mateos-Sanz A, Lopez-Rodas V, Costas E. 2011. Adaptation of microalgae to a gradient of continuous petroleum contamination. *Aquatic Toxicology* 101: 342-50.

Cartaxana P, Domingues N, Cruz S, Jesus B, Laviale M, et al. 2013. Photoinhibition in benthic diatom assemblages under light stress. *Aquatic Microbial Ecology* 70: 87-92.

Castillo CR, Sarmento H, Álvarez-Salgado XA, Gasol JM, Marraséa C. 2010. Production of chromophoric dissolved organic matter by marine phytoplankton. *Limnology and Oceanography* 55: 446-54.

Cedergreen N. 2014. Quantifying synergy: a systematic review of mixture toxicity studies within environmental toxicology. *Plos One* 9: e96580.

Cedergreen N, Kudsk P, Mathiassen SK, Streibig JC. 2007. Combination effects of herbicides on plants and algae: do species and test systems matter? *Pest Management Science* 63: 282-95.

Cemagref. 1982. Etude des méthodes biologiques d'appécriation quantitative de la qualité des eaux, Rapport Q.E. Lyon A.F. – Bassin Rhône-Méditerranée-Corse, 218 pp.

Chaumet B, Bernard M, Moreira A, Morin S, Mazzella N. 2016. Diuron uptake by microbial biofilms. . In *9th European Conference on Pesticides and Related Organic Micropollutants in the Environment, 15th Symposium on Chemistry and Fate of Modern Pesticides*. Santiago de Compostella, Spain

Chavent M, Kuentz V, Labenne A, Liquet B, Saracco J. 2014. Multivariate analysis for a mixture of quantitative and qualitative data. R package version 2.1,.

Cheirsilp B, Torpee S. 2012. Enhanced growth and lipid production of microalgae under mixotrophic culture condition: Effect of light intensity, glucose concentration and fed-batch cultivation. *Bioresource Technology* 110: 510-16.

Chesworth JC, Donkin ME, Brown MT. 2004. The interactive effects of the antifouling herbicides irgarol 1051 and diuron on the seagrass *Zostera marina* (L.). *Aquatic Toxicology* 66: 293-305.

Chiovitti A, Dugdale TM, Wetherbee R. 2006. Diatom Adhesives: Molecular and Mechanical Properties. In *Biological Adhesives*, ed. AM Smith, JA Callow, Springer Berlin Heidelberg, pp. 79-103.

Chirapart A, Praiboon J, Ruanchuay R, Novota M. 2015. Source of marine biomass. In *Marine Bioenergy: Trends and Developments*, ed. SK Kim, CG Lee, CRC Press, pp. 15-44.

Choochote W, Paiboonsin K, Ruangpan S, Pharuang A. 2010. *Effects of urea and light intensity on the growth of Chlorella sp.* The 8th International Symposium on Biocontrol and Biotechnology, 127-34.

Chrétiennot-Dinet M. 1990. *Atlas du phytoplancton marin: chlorarachniophycées, chlorophycées, cryptophycées, euglenophycées, eustigmatophycées, prasinophycées, prymnésiophycées, rhodophycées et tribophycées*. Centre National de la Recherche Scientifique (CNRS), Paris. pp. 261.

Coble PG. 2007. Marine optical biogeochemistry: the chemistry of ocean color. *Chemical Reviews-Columbus* 107: 402-18.

Coble PG, Lead J, Baker A, Reynolds DM, Spencer RGM. 2014. *Aquatic organic matter fluorescence*. Cambridge University Press. pp. 418.

Cohn SA. 2001. Photo-stimulated effects on diatom motility. In *Photomovement*, Häder, D.-P. & M. Lebert, Elsevier Science B.V., pp. 375-401.

Cohn SA, Bahena M, Davis J, Ragland RL, Rauschenberg C, Smith B. 2004. Characterisation of the diatom photophobic response to high irradiance. *Diat. Res.* 19: 167-79.

Cohn SA, Disparti NC. 1994. Environmental factors influencing diatom cell motility. *Journal of Phycology* 30: 818-28.

Cohn SA, Farrell JF, Munro JD, Ragland RL, Weitzell RE, Wibisono BL. 2003. The effect of temperature and mixed species composition on diatom motility and adhesion. *Diat. Res.* 18: 225-43.

Cohn SA, McGuire JR. 2000. Using diatom motility as an indicator of environmental stress: effects of toxic sediment elutriates. *Diat. Res.* 15: 19-29.

Colas S, Pappalardo M. 2011. Pollutions et qualité du milieu marin In *Environnement littoral et marin*, ed. C Boitard, Commissariat général au développement durable - Service de l'observation et des statistiques (SOeS), pp. 103-28.

Commission E. 2012. Priority substances under the Water Framework Directive.

Cooksey KE, Wigglesworth-Cooksey B. 1995. Adhesion of bacteria and diatoms to surfaces in the sea : a review. *Aquatic microbial ecology* 9: 87-96.

Cooper MS, Hardin WR, Petersen TW, Cattolico RA. 2010. Visualizing "green oil" in live algal cells. *Journal of Bioscience and Bioengineering* 109: 198-201.

Coquillé N, Jan G, Moreira A, Morin S. 2015. Use of diatom motility features as endpoints of metolachlor toxicity. *Aquatic Toxicology* 158: 202-10.

Costas E, Carrillo E, Ferrero LM, Agrelo M, Garcia-Villada L, et al. 2001. Mutation of algae from sensitivity to resistance against environmental selective agents: the ecological genetics of *Dictyosphaerium chlorelloides* (Chlorophyceae) under lethal doses of 3-(3,4-dichlorophenyl)-1, 1-dimethylurea herbicide. *Phycologia* 40: 391-98.

Coste M, Boutry S, Tison-Rosebery J, Delmas F. 2009. Improvements of the Biological Diatom Index (BDI): Description and efficiency of the new version (BDI-2006). *Ecological Indicators* 9: 621-50.

Coste M, Morin S. 2008. Diatomées des Rivières Pilotes de Lacq - Evaluation des risques Xylène et Cadmium - Campagne 2007, Cemagref REBX Bordeaux, 26 pp.

Cozic V, Durand G. 2013. Mission d'étude pour réduire les impacts du carénage sur le milieu marin - Rapport phase 2 : Evaluer les équipements existants (cales et aires de carénage avec systèmes de traitement), IDHESA Bretagne Océane, 76 pp.

Crocker KM, Passow U. 1995. Differential aggregation of diatoms. *Marine ecology progress series* 117: 249-57.

Croft MT, Lawrence AD, Raux-Deery E, Warren MJ, Smith AG. 2005. Algae acquire vitamin B12 through a symbiotic relationship with bacteria. *Nature* 438: 90-93.

Croft MT, Warren MJ, Smith AG. 2006. Algae Need Their Vitamins. *Eukaryotic Cell* 5: 1175-83.

D'Elbée J. 2016. *Mémento de planctonologie marine*. Quae éditions. pp. 528.

Dagens N. 2012. Rapport d'étude - Les pratiques phytosanitaires agricoles et non agricoles sur le Bassin d'Arcachon, Réseau Pesticides Bassin d'Arcachon (REPAR), SIBA, 73 pp.

Damien A. 2013. *La biomasse énergie: Définitions, ressources et modes de transformation*. Dunod. pp. 288.

Dauta A. 1982. Conditions de développement du phytoplancton. Etude comparative du comportement de huit espèces en culture. I. Détermination des paramètres de croissance en fonction de la lumière et de la température. *Annls Limnol.* 18: 217-62.

Dauvin J-C, Costil K, Duhamel S, Hocdé R, Mouny P, et al, eds. 2002. *Patrimoine biologique et chaînes alimentaires*, Vols. 7. Ifremer/Quae. 48 pp.

de Brouwer JFC, de Deckere EMGT, Stal LJ. 2003. Distribution of extracellular carbohydrates in three intertidal mudflats in Western Europe. *Estuarine, Coastal and Shelf Science* 56: 313-24.

De La Rocha CL, Passow U. 2014. The Biological Pump. In *Treatise on Geochemistry (Second Edition)*, ed. KK Turekian, Elsevier, pp. 93-122.

De Perre C. 2009. Etude des interactions matière organique dissoute: contaminants organiques dans l'environnement aquatique. *PhD dissertation* thesis. Université de Bordeaux 1, France, 309 pp.

Debenest T, Pinelli E, Coste M, Silvestre J, Mazzella N, et al. 2009. Sensitivity of freshwater periphytic diatoms to agricultural herbicides. *Aquatic Toxicology* 93: 11-17.

Decho AW. 1990. Microbial exopolymer secretions in ocean environments: their role (s) in food webs and marine processes. *Oceanogr. Mar. Biol. Annu. Rev* 28: 73-153.

Del Vecchio R, Blough NV. 2002. Photobleaching of chromophoric dissolved organic matter in natural waters: kinetics and modeling. *Marine Chemistry* 78: 231-53.

del Vecchio R, Blough NV. 2006. Influence of ultraviolet radiation on the chromophoric dissolved organic matter in natural waters. In *Environmental UV Radiation: Impact on Ecosystems and Human Health and Predictive Models: Proceedings of the NATO Advanced Study Institute on Environmental UV Radiation: Impact on Ecosystems and Human Health and Predictive Models Pisa, Italy June 2001*, ed. F Ghetti, G Checcucci, JF Bornman, Springer Netherlands, pp. 203-16.

DeLorenzo ME, Danese LE, Baird TD. 2013. Influence of increasing temperature and salinity on herbicide toxicity in estuarine phytoplankton. *Environmental Toxicology* 28: 359-71.

Demmig-Adams B. 1990. Carotenoids and photoprotection in plants: a role for the xanthophyll zeaxanthin. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics* 1020: 1-24.

Determann S, Lobbes JM, Reuter R, Rullkötter J. 1998. Ultraviolet fluorescence excitation and emission spectroscopy of marine algae and bacteria. *Marine Chemistry* 62: 137-56.

Devilla A, Brown MT, Donkin M, Tarran GA, Aiken J, Readman JW. 2005. Impact of antifouling booster biocides on single microalgal species and on a natural marine phytoplankton community. *Marine Ecology Progress Series* 286: 1-12.

Di Benedetto D, Breuil P. 2007. *Spectrophotometrie d'absorption dans l'ultraviolet et le visible*. Techniques de l'ingénieur. pp. 19.

Dittmar T, Stubbins A. 2014. Dissolved organic matter in aquatic systems. In *Treatise on Geochemistry. Second Edition*, ed. B Birrer, P Falkowski, K Freeman, Elsevier, pp. 125-56.

Docter D, Westmeier D, Markiewicz M, Stolte S, Knauer SK, Stauber RH. 2015. The nanoparticle biomolecule corona: lessons learned - challenge accepted? *Chemical Society Reviews* 44: 6094-121.

Downing BD, Boss E, Bergamaschi BA, Fleck JA, Lionberger MA, et al. 2009. Quantifying fluxes and characterizing compositional changes of dissolved organic matter in aquatic systems in situ using combined acoustic and optical measurements. *Limnology and Oceanography: Methods* 7: 119-31.

Drebes G. 1977. Sexuality. In *The Biology of Diatoms. Bot. Monogr. 13.*, ed. D Werner, Blackwell Sci. Publ, pp. 250-83.

Droop MR. 2007. Vitamins, phytoplankton and bacteria: symbiosis or scavenging? *Journal of Plankton Research* 29: 107-13.

Duke EL, Reimann B. 1977. The ultrastructure of the diatom cell. In *The biology of diatoms*, Botanical monographs., pp. 65-109.

Dupraz V, Coquillé N, Ménard D, Sussarellu R, Haugarreau L, Stachowski-Haberkorn S. 2016. Microalgal sensitivity varies between a diuron-resistant strain and two wild strains when exposed to diuron and irgarol, alone and in mixtures. *Chemosphere* 151: 241-52.

Duursma EK, Dawson R. 1981. *Marine Organic Chemistry. Evolution, composition, interactions and chemistry of organic matter in seawater* Elsevier oceanography series. pp. 520.

Dyhrman ST. 2016. Nutrients and their acquisition: phosphorus physiology in microalgae. In *The Physiology of Microalgae*, ed. MA Borowitzka, J Beardall, JA Raven, Springer International Publishing, pp. 155-83.

Ebenezer V, Ki J-S. 2013. Quantification of toxic effects of the herbicide metolachlor on marine microalgae *Ditylum brightwellii* (Bacillariophyceae), *Prorocentrum minimum* (Dinophyceae), and *Tetraselmis suecica* (Chlorophyceae). *J Microbiol.* 51: 136-39.

Ecophyto. 2015. Plan Ecophyto II, Ministère de l'agriculture, de l'agroalimentaire et de la forêt, Ministère de l'écologie, de développement durable et de l'énergie, 66 pp.

EL-Sheekh MM, Bedaiwy MY, Osman ME, Ismail MM. 2012. Mixotrophic and heterotrophic growth of some microalgae using extract of fungal-treated wheat bran. *International journal of recycling of organic waste in agriculture* 1: 1-9.

Erickson JM, Pfister K, Rahire M, Togasaki RK, Mets L, Rochaix JD. 1989. Molecular and biophysical analysis of herbicide-resistant mutants of *Chlamydomonas reinhardtii*: structure-function relationship of the photosystem II D1 polypeptide. *The Plant Cell* 1: 361-71.

Erickson JM, Rahire M, Rochaix J-D, Mets L. 1985. Herbicide resistance and cross-resistance: changes at three distinct sites in the herbicide-binding protein. *Science* 228: 204.

Eriksson KM, Clarke AK, Franzen L-G, Kuylenstierna M, Martinez K, Blanck H. 2009. Community-level analysis of psbA gene sequences and irgarol tolerance in marine periphyton. *Applied and Environmental Microbiology* 75: 897-906.

European Union EU. 1998. Directive n°98/8/CE concerning the placing of biocidal products on the market. *Official Journal of the European Communities* 123: 1-63.

Eurostat. 2013. *Pesticide sales (from 2009 onwards) - Reg. 1185/2009*. Commission européenne

Ezequiel J, Laviale M, Frankenbach S, Cartaxana P, Serôdio J. 2015. Photoacclimation state determines the photobehaviour of motile microalgae: the case of a benthic diatom. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* 468: 11-20.

Fairchild JF, Ruessler DS, Carlson AR. 1998. Comparative sensitivity of five species of macrophytes and six species of algae to atrazine, metribuzin, alachlor, and metolachlor. *Environmental Toxicology and Chemistry* 17: 1830-34.

FAO. 2003. International code of conduct on the distribution and use of pesticides (revised version: adopted by the hundred and twenty-third session of the FAO Council in november 2002). Rome: Food Agriculture Organization (FAO) of the United Nations.

Faurie C, Ferra C, Médori P, Dévaux J, Hemptinne J-L. 2011. *Écologie approche scientifique et pratique*. Lavoisier. pp. 488.

Faust M, Altenburger R, Boedeker W, Grimme LH. 1993. Additive effects of herbicide combinations on aquatic non-target organisms. *Science of The Total Environment* 134: 941-52.

Faust M, Altenburger R, Boedeker W, Grimme LH. 1994. Algal toxicity of binary combinations of pesticides. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 53: 134-41.

Fauvelle V. 2012. Evaluation de la contamination en pesticides des tributaires du Bassin d'Arcachon et développement d'un échantillonneur passif spécifique des herbicides anioniques. *PhD dissertation* thesis. Université de Bordeaux 1, France, 257 pp.

Fauvelle V, Mazzella N, Morin S, Moreira S, Delest B, Budzinski H. 2014. Hydrophilic interaction liquid chromatography coupled with tandem mass spectrometry for acidic herbicides and metabolites analysis in fresh water. *Environmental Science and Pollution Research* 22: 3988-96.

Fellman JB, Hood E, Spencer RG. 2010. Fluorescence spectroscopy opens new windows into dissolved organic matter dynamics in freshwater ecosystems: A review. *Limnology and Oceanography* 55: 2452-62.

Fernandez-Alba AR, Piedra L, Mezcua M, Hernando MD. 2002. Toxicity of single and mixed contaminants in seawater measured with acute toxicity bioassays. *The Scientific World Journal* 2

Findlay S, Sinsabaugh RL. 2003. *Aquatic ecosystems: interactivity of dissolved organic matter*. 1st (ed), Academic Press, Elsevier Science. pp. 512.

Finkel ZV. 2016. Silicification in the Microalgae. In *The Physiology of Microalgae*, ed. MA Borowitzka, J Beardall, JA Raven, Springer International Publishing, pp. 289-300.

Fore LS, Grafe C. 2002. Using diatoms to assess the biological condition of large rivers in Idaho (U.S.A.). *Freshwater Biology* 47: 2015-37.

Fučíková K, Leliaert F, Cooper ED, Škaloud P, D'Hondt S, et al. 2014. New phylogenetic hypotheses for the core Chlorophyta based on chloroplast sequence data. *Frontiers in Ecology and Evolution* 2: 12.

Fuerst EP. 1987. Understanding the mode of action of the chloroacetamide and thiocarbamate herbicides. *Weed Technology* 1: 270-77.

Fuerst EP, Norman MA. 1991. Interactions of herbicides with photosynthetic electron transport. *Weed Science*: 458-64.

Gagnon R, Levasseur M, Weise AM, Fauchot J, Campbell PGC, et al. 2005. Growth stimulation of *Alexandrium tamarense* (Dinophyceae) by humic substances from the Manicouagan River (Eastern Canada). *Journal of Phycology* 41: 489-97.

Gailhard I. 2003. Analyse de la variabilité spatio-temporelle des populations microalgales côtières observées par le REseau de surveillance du PHYtoplancton et des phycotoxines (REPHY). *PhD dissertation* thesis. Université de la Méditerranée Aix-Marseille ll, France, 293 pp.

Galloway RE, Mets LJ. 1984. Atrazine, bromacil, and diuron resistance in *Chlamydomona*s: A single non-mendelian genetic locus controls the structure of the thylakoid binding site. *Plant Physiology* 74: 469-74.

Gao J, Wang Y, Gao B, Wu L, Chen H. 2012. Environmental fate and transport of pesticides. In *Pesticides*, ed. HS Rathore, LML Nollet, CRC Press, pp. 29-46.

Garon D, Guéguen JC. 2014. *Biodiversité et évolution du monde végétal*. EDP Sciences. pp. 272.

Gatidou G, Thomaidis NS. 2007. Evaluation of single and joint toxic effects of two antifouling biocides, their main metabolites and copper using phytoplankton bioassays. *Aquatic Toxicology* 85: 184-91.

Geesey G. 1982. Microbial exopolymers: Ecological and economic considerations. *ASM American Society for Microbiology News* 48: 9-14.

Geissbühler H, Martin H, Voss G. 1975. The substituted ureas. In *Herbicides: chemistry, degradation and mode of action*, ed. PC Kearney, DD Kaufman, Marcel Dekker, Inc., pp. 209-91.

Germain H. 1981. *Flore des diatomées, eaux douces et eaux saumâtres.* Societe nouvelle des editions Boubee. pp. 444.

Giacomazzi S, Cochet N. 2004. Environmental impact of diuron transformation: a review. *Chemosphere* 56: 1021-32.

Giardi MT, Pace E. 2005. Photosynthetic proteins for technological applications. *Trends in Biotechnology* 23: 257-63.

Giordano M, Prioretti L. 2016. Sulphur and algae: metabolism, ecology and evolution. In *The Physiology of Microalgae*, ed. MA Borowitzka, J Beardall, JA Raven, Springer International Publishing, pp. 185-209.

Götz T, Böger P. 2004. The very-long-chain fatty acid synthase is inhibited by chloroacetamides. *Zeitschrift für Naturforschung C* 59: 549-53.

Govender T, Ramanna L, Rawat I, Bux F. 2012. BODIPY staining, an alternative to the Nile Red fluorescence method for the evaluation of intracellular lipids in microalgae. *Bioresource Technology* 114: 507-11.

Gramatica P, Vighi M, Consolaro F, Todeschini R, Finizio A, Faust M. 2001. QSAR approach for the selection of congeneric compounds with a similar toxicological mode of action. *Chemosphere* 42: 873-83.

Guéguen C, Guo L, Wang D, Tanaka N, Hung C-C. 2006. Chemical characteristics and origin of dissolved organic matter in the Yukon River. *Biogeochemistry* 77: 139-55.

Guesdon S, Stachowski-Haberkorn S, Lambert C, Beker B, Brach-Papa C, et al. 2016. Effect of local hydroclimate on phytoplankton groups in the Charente estuary. *Estuarine, Coastal and Shelf Science* 181: 325-37.

Guillard RRL. 1975. Culture of phytoplankton for feeding marine invertebrates. In *Culture of marine invertebrate animals: proceedings -1st conference on culture of marine invertebrate animals greenport*, ed. WL Smith, MH Chanley, Springer US, pp. 29-60.

Guillard RRL, Lorenzen CJ. 1972. Yellow-green algae with Chlorophyllide c. *Journal of Phycology* 8: 10-14.

Guillard RRL, Ryther JH. 1962. Studies of marine planktonic diatoms. I. *Cyclotella nana Hustedt* and *Detonula confervace*a (Cleve) Gran. *Canadian Journal of Microbiology* 8: 229-39.

Guiry MD. 2012. How many species of algae are there? *Journal of Phycology* 48: 1057-63.

Guiry MD, Guiry GM. 2017. *AlgaeBase. World-wide electronic publication*. National University of Ireland http://www.algaebase.org.

Haitzer M, Höss S, Traunspurger W, Steinberg C. 1998. Effects of dissolved organic matter (DOM) on the bioconcentration of organic chemicals in aquatic organisms. *Chemosphere* 37: 1335-62.

Hall DO, Rao K. 1999. *Photosynthesis*. Cambridge University Press, 6 ed. pp. 214.

Hansell DA, Carlson CA. 2014. *Biogeochemistry of marine dissolved organic matter*. Academic Press. pp. 712.

Hansen AM, Kraus TEC, Pellerin BA, Fleck JA, Downing BD, Bergamaschi BA. 2016. Optical properties of dissolved organic matter (DOM): Effects of biological and photolytic degradation. *Limnology and Oceanography* 61: 1015-32.

Harper MA. 1977. Movements. In *The Biology of Diatoms. Bot. Monogr. 13.* , ed. D Werner, Blackwell Sci. Publ., pp. 224-49.

Hartgers EM, Aalderink GH, Van den Brink PJ, Gylstra R, Wiegman JWF, Brock TCM. 1998. Ecotoxicological threshold levels of a mixture of herbicides (atrazine, diuron and metolachlor) in freshwater microcosms. *Aquatic Ecology* 32: 135-52.

Harvey GR, Boran DA, Chesal LA, Tokar JM. 1983. The structure of marine fulvic and humic acids. *Marine Chemistry* 12: 119-32.

Headley JV, Gandrass J, Kuballa J, Peru KM, Gong Y. 1998. Rates of sorption and partitioning of contaminants in river biofilm. *Environmental Science & Technology* 32: 3968-73.

Hellebust JA. 1965. Excretion of some organic compounds by marine phytoplankton. *Limnology and Oceanography* 10: 192-206.

Helms JR, Stubbins A, Perdue EM, Green NW, Chen H, Mopper K. 2013. Photochemical bleaching of oceanic dissolved organic matter and its effect on absorption spectral slope and fluorescence. *Marine Chemistry* 155: 81-91.

Helms JR, Stubbins A, Ritchie JD, Minor EC, Kieber DJ, Mopper K. 2008. Absorption spectral slopes and slope ratios as indicators of molecular weight, source, and photobleaching of chromophoric dissolved organic matter. *Limnology and Oceanography* 53: 955-69.

Helsel DR. 1990. Less than obvious - statistical treatment of data below the detection limit. *Environmental Science & Technology* 24: 1766-74.

Henderson RK, Baker A, Parsons SA, Jefferson B. 2008. Characterisation of algogenic organic matter extracted from cyanobacteria, green algae and diatoms. *Water Research* 42: 3435-45.

Herlory O. 2005. Etude du biofilm microalgal des vasières intertidales : dynamique spatio-temporelle à micro-échelle et performances photosynthétiques. Université de la Rochelle, 240 pp.

Herzi F. 2013. Caractérisation chimique des exsudats du dinoflagellé marin toxique Alexandrium catenella et de la diatomée marine *Skeletonema costatum* et étude de la réponse protéomique d'*Alexandrium catenella* en conditions de stress métalliques. *PhD dissertation* thesis. Université de Toulon (France); Université de Carthage (Tunisie), 308 pp.

Hewlett P. 1969. Measurement of the potencies of drug mixtures. *Biometrics* 25: 477-87.

Hoagland KD, Rosowski JR, Gretz MR, Roemer SC. 1993. Diatom extracellular polymeric substances: function, fine structure, chemisty, and physiology. *Journal of Phycology* 29: 537-66.

Holmes G. 2012. Diuron and the Great Barrier Reef – A review of the latest science, WWF

Hopkins WG, Rambour S, Evrard CM. 2003. *Physiologie végétale*. De Boeck Supérieur. pp. 532.

Hu Q, Sommerfeld M, Jarvis E, Ghirardi M, Posewitz M, et al. 2008. Microalgal triacylglycerols as feedstocks for biofuel production: perspectives and advances. *The Plant Journal* 54: 621-39.

Hudon C, Legendre P. 1987. The ecological implications of growth forms in epibenthic diatoms. *Journal of Phycology* 23: 434-41.

Hudson N, Baker A, Reynolds D. 2007. Fluorescence analysis of dissolved organic matter in natural, waste and polluted waters - a review. *River Research and Applications* 23: 631-49.

Huertas IE, Rouco M, López-Rodas V, Costas E. 2010. Estimating the capability of different phytoplankton groups to adapt to contamination: herbicides will affect phytoplankton species differently. *New Phytologist* 188: 478-87.

Huguet A. 2007. Mise au point de procédés membranaires pour l'étude de la matière organique dissoute en milieux côtiers. *PhD dissertation* thesis. Université de Bordeaux 1, France, 313 pp.

Huguet A, Roux-de Balmann H, Parlanti E. 2009a. Fluorescence spectroscopy applied to the optimisation of a desalting step by electrodialysis for the characterisation of marine organic matter. *Journal of Membrane Science* 326: 186-96.

Huguet A, Vacher L, Relexans S, Saubusse S, Froidefond JM, Parlanti E. 2009b. Properties of fluorescent dissolved organic matter in the Gironde Estuary. *Organic Geochemistry* 40: 706-19.

Huguet A, Vacher L, Saubusse S, Etcheber H, Abril G, et al. 2010. New insights into the size distribution of fluorescent dissolved organic matter in estuarine waters. *Organic Geochemistry* 41: 595-610.

Huntsberger DV. 1961. *Elements of statistical inference*. pp.

Ihaka R, Gentleman R. 1996. R: a language for data analysis and graphics. *Journal of computational and graphical statistics* 5: 299-314.

Imai A, Fukushima T, Matsushige K, Hwan Kim Y. 2001. Fractionation and characterization of dissolved organic matter in a shallow eutrophic lake, its inflowing rivers, and other organic matter sources. *Water Research* 35: 4019-28.

INERIS. 2007. Données technico-économiques sur les substances chimiques en France : Diuron, INERIS, 35 pp.

INERIS. 2012. Données technico-économiques sur les substances chimiques en France : Cybutryne, INERIS, 32 pp.

Jaffé R, McKnight D, Maie N, Cory R, McDowell W, Campbell J. 2008. Spatial and temporal variations in DOM composition in ecosystems: The importance of long-term monitoring of optical properties. *Journal of Geophysical Research: Biogeosciences* 113: 15.

Jones MN, Bryan ND. 1998. Colloidal properties of humic substances. *Advances in Colloid and Interface Science* 78: 1-48.

Jones RJ, Kerswell AP. 2003. Phytotoxicity of photosystem II (PSII) herbicides to coral. *Marine Ecology Progress Series* 261: 149-59.

Jonker MJ, Svendsen C, Bedaux JJ, Bongers M, Kammenga JE. 2005. Significance testing of synergistic/antagonistic, dose level-dependent, or dose ratio-dependent effects in mixture dose-response analysis. *Environmental toxicology and chemistry* 24: 2701-13.

Jørgensen EG. 1977. Photosynthesis. In *The biology of diatoms*, Botanical monographs., pp. 150-68.

Juneau P. 2007. Introduction to the special issue on the use of chlorophyll fluorescence in ecotoxicology: The importance of fluorometric methods in ecotoxicological studies. *Toxicological & Environmental Chemistry* 89: 587-88.

Juneau P, Dewez D, Matsui S, Kim SG, Popovic R. 2001. Evaluation of different algal species sensitivity to mercury and metolachlor by PAM-fluorometry. *Chemosphere* 45: 589-98.

Kabra AN, Ji M-K, Choi J, Kim JR, Govindwar SP, Jeon B-H. 2014. Toxicity of atrazine and its bioaccumulation and biodegradation in a green microalga, *Chlamydomonas mexicana*. *Environmental Science and Pollution Research* 21: 12270-78.

Karlsson J, Bystrom P, Ask J, Ask P, Persson L, Jansson M. 2009. Light limitation of nutrient-poor lake ecosystems. *Nature* 460: 506-09.

Karp G, Bouharmont J, Masson PL. 2010. *Biologie cellulaire et moléculaire: Concepts and experiments*. De Boeck Supérieur. pp. 840.

Katagi T. 2010. Bioconcentration, bioaccumulation, and metabolism of pesticides in aquatic organisms. In *Reviews of Environmental Contamination and Toxicology*, ed. DM Whitacre, Springer New York, pp. 1-132.

Khairy MA, Luek JL, Dickhut R, Lohmann R. 2016. Levels, sources and chemical fate of persistent organic pollutants in the atmosphere and snow along the western Antarctic Peninsula. *Environmental Pollution* 216: 304-13.

Kim B-H, Ramanan R, Cho D-H, Oh H-M, Kim H-S. 2014. Role of Rhizobium, a plant growth promoting bacterium, in enhancing algal biomass through mutualistic interaction. *Biomass and Bioenergy* 69: 95-105.

Kim Tiam S, Fauvelle V, Morin S, Mazzella N. 2016. Improving toxicity assessment of pesticide mixtures: the use of polar passive sampling devices extracts in microalgae toxicity tests. *Frontiers in Microbiology* 7: 1388.

Kirk JTO. 2010. *Light and photosynthesis in aquatic ecosystems*. Cambridge University Press. pp. 662.

Knauer K, Sobek A, Bucheli TD. 2007. Reduced toxicity of diuron to the freshwater green alga Pseudokirchneriella subcapitata in the presence of black carbon. *Aquatic Toxicology* 83: 143-48.

Knauert S, Escher B, Singer H, Hollender J, Knauer K. 2008. Mixture toxicity of three photosystem II inhibitors (atrazine, isoproturon, and diuron) toward photosynthesis of freshwater phytoplankton studied in outdoor mesocosms. *Environmental Science & Technology* 42: 6424-30.

Knauert S, Knauer K. 2008. The role of reactive oxygen species in copper toxicity to two freshwater green algae. *Journal of Phycology* 44: 311-19.

Koutsaftis A, Aoyama I. 2006. The interactive effects of binary mixtures of three antifouling biocides and three heavy metals against the marine algae *Chaetoceros gracilis*. *Environmental Toxicology* 21: 432-39.

Krammer K, Lange-Bertalot H. 1986. *Bacillariophyceae. 1. Teil: Naviculaceae, In Ettl, H., Gerloff, J., Heynig, H. and Mollenhauer, D. (eds) Süsswasser flora von Mitteleuropa, Band 2/1*. Gustav Fischer Verlag: Stuttgart, New York, 876pp. . pp.

Krop HB, van Noort PCM, Govers HAJ. 2001. Determination and theoretical aspects of the equilibrium between dissolved organic matter and hydrophobic organic micropollutants in water (Kdoc). In *Reviews of Environmental Contamination and Toxicology: Continuation of Residue Reviews*, ed. GW Ware, Springer New York, pp. 1-122.

Kujawinski EB. 2011. The impact of microbial metabolism on marine dissolved organic matter. *Annual Review of Marine Science* 3: 567-99.

Kumar HD, Häder DP. 2012. *Global Aquatic and Atmospheric Environment*. Springer Science & Business Media. pp. 393.

Labanowski J. 2004. Matière organique naturelle et anthropique: vers une meilleure compréhension de sa réactivité et de sa caractérisation. *PhD dissertation* thesis. Université de Limoges, France, 209 pp.

Laliberté G, de la Noüe J. 1993. Auto-, hetero-, and mixotrophic growth of *Chlamydomonas humicola* (Chlorophyceae) on acetate. *Journal of Phycology* 29: 612-20.

Lance C. 2013. *Respiration et photosynthèse: Histoire et secrets d'une équation*. EDP Sciences. pp.

Lardans A, Förster B, Prásil O, Falkowski PG, Sobolev V, et al. 1998. Biophysical, biochemical, and physiological characterization of *Chlamydomonas reinhardtii* mutants with amino acid substitutions at the ala251 residue in the D1 protein that result in varying levels of photosynthetic competence. *Journal of Biological Chemistry* 273: 11082-91.

Larras F, Bouchez A, Rimet F, Montuelle B. 2012. Using bioassays and Species Sensitivity Distributions to assess herbicide toxicity towards benthic diatoms. *PLoS ONE* 7: e44458.

Larras F, Keck F, Montuelle B, Rimet F, Bouchez A. 2014. Linking diatom sensitivity to herbicides to phylogeny: a step forward for biomonitoring? *Environmental Science & Technology* 48: 1921-30.

Larras F, Montuelle B, Bouchez A. 2013. Assessment of toxicity thresholds in aquatic environments: Does benthic growth of diatoms affect their exposure and sensitivity to herbicides? *Science of the Total Environment* 463–464: 469-77.

Larsson U, Hagström A. 1979. Phytoplankton exudate release as an energy source for the growth of pelagic bacteria. *Marine Biology* 52: 199-206.

Laviale M, Ezequiel J, Serôdio J. 2011. *Réponse comportementale du microphytobenthos à une variation de l'éclairement: mise en évidence expériementale de la migration.* 30ème Colloque de l'ADLaF. Association des Diatomistes de Langue Française, Boulogne-sur-Mer pp. 39.

Laviale M, Prygiel J, Lemoine Y, Courseaux A, Créach A. 2009. Stream periphyton photoacclimation response in field conditions: Effect of community development and seasonal changes. *Journal of Phycology* 45: 1072-82.

Lavoie I. 2008. *Guide d'Identification des diatomées des rivières de l'est du Canada*. Presses de l'Université du Québec. pp. 241.

Leenheer JA, Croué J-P. 2003. Characterizing aquatic dissolved organic matter. *Environmental Science & Technology* 37: 18A-26A.

Leloup M, Nicolau R, Pallier V, Yéprémian C, Feuillade-Cathalifaud G. 2013. Organic matter produced by algae and cyanobacteria: Quantitative and qualitative characterization. *Journal of Environmental Sciences* 25: 1089-97.

Lévêque C, Mounolou JC. 2008. *Biodiversité: Dynamique biologique et conservation*. Dunod. pp. 272.

Lewis SE, Brodie JE, Bainbridge ZT, Rohde KW, Davis AM, et al. 2009. Herbicides: a new threat to the great barrier reef. *Environmental Pollution* 157: 2470-84.

Li Y, Horsman M, Wang B, Wu N, Lan CQ. 2008. Effects of nitrogen sources on cell growth and lipid accumulation of green alga Neochloris oleoabundans. *Applied Microbiology and Biotechnology* 81: 629-36.

Liu D, Maguire RJ, Lau YL, Pacepavicius GJ, Okamura H, Aoyama I. 1997. Transformation of the new antifouling compound Irgarol 1051 by *Phanerochaete chrysosporium*. *Water Research* 31: 2363-69.

Liu H, Xia Y, Cai W, Zhang Y, Zhang X, Du S. 2017. Enantioselective oxidative stress and oxidative damage caused by Rac- and S-metolachlor to *Scenedesmus obliquus*. *Chemosphere In-Press*

Liu H, Xiong M. 2009. Comparative toxicity of racemic metolachlor and S-metolachlor to *Chlorella pyrenoidosa*. *Aquatic Toxicology* 93: 100-06.

Liu X, Duan S, Li A, Xu N, Cai Z, Hu Z. 2009. Effects of organic carbon sources on growth, photosynthesis, and respiration of *Phaeodactylum tricornutum*. *Journal of Applied Phycology* 21: 239-46.

Loewe S, Muischnek H. 1926. Combinated effects I Announcement-Implements to the problem. *Naunyn-Schmiedebergs archiv für experimentelle pathologie une pharùakologie* 114: 313-26.

Loos R, Gawlik BM, Locoro G, Rimaviciute E, Contini S, Bidoglio G. 2009. EU-wide survey of polar organic persistent pollutants in European river waters. *Environmental Pollution* 157: 561-68.

Loos R, Locoro G, Comero S, Contini S, Schwesig D, et al. 2010. Pan-European survey on the occurrence of selected polar organic persistent pollutants in ground water. *Water Research* 44: 4115-26.

López-Rodas V, Agrelo M, Carrillo E, Ferrero L, Larrauri A, et al. 2001. Resistance of microalgae to modern water contaminants as the result of rare spontaneous mutations. *European Journal of Phycology* 36: 179-90.

López-Rodas V, Carrera-Martínez D, Salgado E, Mateos-Sanz A, Báez JC, Costas E. 2009. A fascinating example of microalgal adaptation to extreme crude oil contamination in a natural spill in Arroyo Minero, Río Negro, Argentina. *Anales de la Real Academia Nacional de Farmacia* 75: 883-99.

Lowe RL. 1974. *Environmental requirements and pollution tolerance of freshwater diatoms*. National Environmental Research Center. pp. 340.

Luís AT, Teixeira P, Almeida SFP, Matos JX, da Silva EF. 2011. Environmental impact of mining activities in the Lousal area (Portugal): Chemical and diatom characterization of metal-contaminated stream sediments and surface water of Corona stream. *Science of The Total Environment* 409: 4312-25.

Lundberg I, Kreuger J, Johnson A. 1995. *Pesticides et eaux de surface: Etude sur la situation concernant la pollution des eaux de surface par des résidus de pesticides dans les pays nordiques, en Allemagne et aux Pays-Bas, et les problèmes associés à la contamination par des pesticides*. Conseil de l'Europe. pp. 61.

Ma J, Hung H, Macdonald RW. 2016. The influence of global climate change on the environmental fate of persistent organic pollutants: A review with emphasis on the Northern Hemisphere and the Arctic as a receptor. *Global and Planetary Change* 146: 89-108.

Ma J, Lin F, Wang S, Xu L. 2003. Toxicity of 21 herbicides to the green alga *Scenedesmus quadricauda*. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 71: 0594-601.

Ma J, Wang S, Wang P, Ma L, Chen X, Xu R. 2006. Toxicity assessment of 40 herbicides to the green alga *Raphidocelis subcapitata*. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 63: 456-62.

Ma J, Xu L, Wang S, Zheng R, Jin S, et al. 2002. Toxicity of 40 Herbicides to the green alga *Chlorella vulgaris*. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 51: 128-32.

Magnusson M, Heimann K, Negri AP. 2008. Comparative effects of herbicides on photosynthesis and growth of tropical estuarine microalgae. *Marine Pollution Bulletin* 56: 1545-52.

Magnusson M, Heimann K, Quayle P, Negri AP. 2010. Additive toxicity of herbicide mixtures and comparative sensitivity of tropical benthic microalgae. *Marine Pollution Bulletin* 60: 1978-87.

Mahmoud MF, Loutfy N. 2012. Uses and environmental pollution of biocides. In *Pesticides: Evaluation of environmental pollution*, ed. HS Rathore, LML Nollet, pp. 3-28: CRC Press.

Mai H, Morin B, Pardon P, Gonzalez P, Budzinski H, Cachot J. 2013. Environmental concentrations of irgarol, diuron and S-metolachlor induce deleterious effects on gametes and embryos of the Pacific oyster, *Crassostrea gigas*. *Marine Environmental Research* 89: 1-8.

Mann DG. 2011. Size and Sex. In *The diatom world*, ed. J Seckbach, P Kociolek, Springer Netherlands, pp. 145-66.

Manzo S, Buono S, Cremisini C. 2006. Toxic effects of irgarol and diuron on sea urchin *Paracentrotus lividus* early development, fertilization, and offspring quality. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology* 51: 61-68.

Marchetti A, Maldonado MT. 2016. Iron. In *The Physiology of Microalgae*, ed. MA Borowitzka, J Beardall, JA Raven, Springer International Publishing, pp. 233-79.

Marie D, Partensky F, Jacquet S, Vaulot D. 1997. Enumeration and cell cycle analysis of natural populations of marine picoplankton by flow cytometry using the nucleic acid stain SYBR Green I. *Applied and Environmental Microbiology* 63: 186-93.

Marie D, Simon N, Vaulot D. 2005. Phytoplankton cell counting by flow cytometry. In *Algal culturing techniques*, ed. RA Andersen, Phycological society of America, Elsevier, pp. 253-67.

Marvá F, López-Rodas V, Rouco M, Navarro M, Toro FJ, et al. 2010. Adaptation of green microalgae to the herbicides simazine and diquat as result of pre-selective mutations. *Aquatic Toxicology* 96: 130-34.

Mata TM, Martins AA, Caetano NS. 2010. Microalgae for biodiesel production and other applications: a review. *Renewable and Sustainable Energy Reviews* 14: 217-32.

Maurin N, Amblard C, Bourdier G. 1997. Phytoplanktonic excretion and bacterial reassimilation in an oligomesotrophic lake: molecular weight fractionation. *Journal of Plankton Research* 19: 1045-68.

McMeans BC, Koussoroplis A-M, Arts MT, Kainz MJ. 2015. Terrestrial dissolved organic matter supports growth and reproduction of Daphnia magna when algae are limiting. *Journal of Plankton Research* 37: 1201-09.

McNeill K, Canonica S. 2016. Triplet state dissolved organic matter in aquatic photochemistry: reaction mechanisms, substrate scope, and photophysical properties. *Environmental Science: Processes & Impacts* 18: 1381-99.

Meon B, Kirchman DL. 2001. Dynamics and molecular composition of dissolved organic material during experimental phytoplankton blooms. *Marine Chemistry* 75: 185-99.

Millour M. 2011. Interactions entre la matière organique dissoute et les microalgues marines: rapprochement, adhésion et réaction, Université du Québec à Rimouski, Institut des sciences de la mer de Rimouski, 133 pp.

Minero C, Pramauro E, Pelizzetti E, Dolci M, Marchesini A. 1992. Photosensitized transformations of atrazine under simulated sunlight in aqueous humic acid solution. *Chemosphere* 24: 1597-606.

Minor EC, Simjouw J-P, Mulholland MR. 2006. Seasonal variations in dissolved organic carbon concentrations and characteristics in a shallow coastal bay. *Marine Chemistry* 101: 166-79.

Minor EC, Swenson MM, Mattson BM, Oyler AR. 2014. Structural characterization of dissolved organic matter: a review of current techniques for isolation and analysis. *Environmental Science: Processes & Impacts* 16: 2064-79.

Mitra A, Zaman S. 2016. *Basics of marine and estuarine ecology*. Springer, India. pp. 481.

Mollo P, Noury A. 2013. *Le Manuel du plancton*. Charles Léopold Mayer. pp. 198.

Moncada A. 2004. Environmental fate of diuron, Environmental Monitoring Branch, Department of Pesticide Regulation, 11 pp.

Morin S, Bottin M, Mazzella N, Macary F, Delmas F, et al. 2009. Linking diatom community structure to pesticide input as evaluated through a spatial contamination potential (Phytopixal): A case study in the Neste river system (South-West France). *Aquatic Toxicology* 94: 28-39.

Morin S, Coste M, Delmas F. 2008. A comparison of specific growth rates of periphytic diatoms of varying cell size under laboratory and field conditions. *Hydrobiologia* 614: 285-97.

Morin S, Proia L, Ricart M, Bonnineau C, Geiszinger A, et al. 2010. Effects of a bactericide on the structure and survival of benthic diatom communities. . *Vie Milieu* 60: 109-16.

Mostajir B, Amblard C, Buffan-Dubau E, De Wit R, Lensi R, Sime-Ngando T. 2012. *Les réseaux trophiques microbiens des milieux aquatiques et terrestres*. Presses Universitaires de Pau et des Pays de l'Adour. pp. 28.

Mthakathi NT, Kgosiemang IKR, Chen W, Mohlatsane ME, Mojahi TJ, et al. 2015. Cytochrome P450 monooxygenase analysis in free-living and symbiotic microalgae Coccomyxa sp. C-169 and Chlorella sp. NC64A. *Algae* 30: 233.

Muller-Feuga A, Moal J, Kaas R. 2007a. The microalgae of aquaculture. In *Live Feeds in Marine Aquaculture*, ed. JG Støttrup, LA McEvoy, Blackwell Science Ltd, pp. 206-52.

Muller-Feuga A, Robert R, Cahu C, Robin J, Divanach P. 2007b. Uses of microalgae in aquaculture. In *Live Feeds in Marine Aquaculture*, ed. JG Støttrup, LA McEvoy, Blackwell Science Ltd, pp. 253-99.

Munaron D, Tapie N, Budzinski H, Andral B, Gonzalez J-L. 2012. Pharmaceuticals, alkylphenols and pesticides in Mediterranean coastal waters: Results from a pilot survey using passive samplers. *Estuarine, Coastal and Shelf Science* 114: 82-92.

Nagata T. 2008. Organic matter-bacteria interactions in seawater. In *Microbial ecology of the oceans*, ed. DL Kirchman, Wiley-Blackwell, pp. 207-42.

Nakada T, Nozaki H. 2015. Flagellate green Algae. In *Freshwater Algae of North America: Ecology and Classification*, ed. JD Wehr, RG Sheath, JP Kociolek, Elsevier Science, pp. 265-315.

Nelson NB, Siegel DA, Michaels AF. 1998. Seasonal dynamics of colored dissolved material in the Sargasso Sea. *Deep Sea Research Part I: Oceanographic Research Papers* 45: 931-57.

Nestler H, Groh KJ, Schönenberger R, Behra R, Schirmer K, et al. 2012. Multiple-endpoint assay provides a detailed mechanistic view of responses to herbicide exposure in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Aquatic Toxicology* 110–111: 214-24.

Ni Longphuirt S, Leynaert A, Guarini J-M, Chauvaud L, Claquin P, et al. 2006. Discovery of microphytobenthos migration in the subtidal zone. *Marine Ecology Progress Series* 328: 143-54.

Nimbal CI, Yerkes CN, Weston LA, Weller SC. 1996. Herbicidal activity and site of action of the natural product sorgoleone. *Pesticide Biochemistry and Physiology* 54: 73-83.

Noble RT, Fuhrman JA. 1998. Use of SYBR Green I for rapid epifluorescence counts of marine viruses and bacteria. *Aquatic Microbial Ecology* 14: 113-18.

Nyström B, Becker-Van Slooten K, Bérard A, Grandjean D, Druart J-C, Leboulanger C. 2002. Toxic effects of Irgarol 1051 on phytoplankton and macrophytes in Lake Geneva. *Water Research* 36: 2020-28.

OCDE. 2011. *Essai n° 201: Algues d'eau douce et cyanobactéries, essai d'inhibition de la croissance*. OECD Publishing. pp. 27.

Oettmeier W. 1992. Herbicides of photosystem II. In *The photosystems: structure, function and molecular biology*, ed. J Barber, Elsevier, pp. 349-408.

Oettmeier W. 1999. Herbicide resistance and supersensitivity in photosystem II. *Cellular and Molecular Life Sciences CMLS* 55: 1255-77.

Ogawa H, Tanoue E. 2003. Dissolved organic matter in oceanic waters. *Journal of Oceanography* 59: 129-47.

Ohad N, Amir-Shapira D, Koike H, Inoue Y, Ohad I, Hirschberg J. 1990. Amino acid substitutions in the D1 protein of photosystem II affect QB-stabilization and accelerate turnover of D1. *Zeitschrift für Naturforschung C* 45: 402-07.

Okamura H. 2002. Photodegradation of the antifouling compounds irgarol 1051 and diuron released from a commercial antifouling paint. *Chemosphere* 48: 43-50.

Okamura H, Aoyama I, Liu D, Maguire RJ, Pacepavicius GJ, Lau YL. 2000a. Fate and ecotoxicity of the new antifouling compound Irgarol 1051 in the aquatic environment. *Water Research* 34: 3523-30.

Okamura H, Aoyama I, Takami T, Maruyama T, Suzuki Y, et al. 2000b. Phytotoxicity of the new antifouling compound irgarol 1051 and a major degradation product. *Marine Pollution Bulletin* 40: 754-63.

Okamura H, Nishida T, Ono Y, Shim WJ. 2003. Phytotoxic effects of antifouling compounds on nontarget plant species. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 71: 881-86.

Okamura H, Sugiyama Y. 2004. Photosensitized degradation of irgarol 1051 in water. *Chemosphere* 57: 739-43.

Okay OS, Donkin P, Peters LD, Livingstone DR. 2000. The role of algae (*Isochrysis galbana*) enrichment on the bioaccumulation of benzo[a]pyrene and its effects on the blue mussel *Mytilus edulis*. *Environmental Pollution* 110: 103-13.

Pandey LK, Bergey EA. 2016. Exploring the status of motility, lipid bodies, deformities and size reduction in periphytic diatom community from chronically metal (Cu, Zn) polluted waterbodies as a biomonitoring tool. *Science of The Total Environment* 550: 372-81.

Parent L, Twiss MR, Campbell PGC. 1996. Influences of natural dissolved organic matter on the interaction of aluminum with the microalga Chlorella: a test of the free-ion model of trace Metal toxicity. *Environmental Science & Technology* 30: 1713-20.

Parlanti E, Wörz K, Geoffroy L, Lamotte M. 2000. Dissolved organic matter fluorescence spectroscopy as a tool to estimate biological activity in a coastal zone submitted to anthropogenic inputs. *Organic Geochemistry* 31: 1765-81.

Passy SI. 2007. Diatom ecological guilds display distinct and predictable behavior along nutrient and disturbance gradients in running waters. *Aquatic Botany* 86: 171-78.

Paule A, Roubeix V, Lauga B, Duran R, Delmas F, et al. 2013. Changes in tolerance to herbicide toxicity throughout development stages of phototrophic biofilms. *Aquatic Toxicology* 144–145: 310-21.

Pennington F, Guillard RRL, Liaaen-Jensen S. 1988. Carotenoid distribution patterns in *Bacillariophyceae* (Diatoms). *Biochemical Systematics and Ecology* 16: 589-92.

Pente Cost A. 2011. Order Volvocales. In *The freshwater algal flora of the British isles: an identification guide to freshwater and terrestrial algae*, ed. DM John, BA Whitton, AJ Brook, Cambridge University Press, pp. 381-410.

Pereira S, Micheletti E, Zille A, Santos A, Moradas-Ferreira P, et al. 2011. Using extracellular polymeric substances (EPS)-producing cyanobacteria for the bioremediation of heavy metals: do cations compete for the EPS functional groups and also accumulate inside the cell? *Microbiology* 157: 451-58.

Perez-Garcia O, Escalante FME, de-Bashan LE, Bashan Y. 2011. Heterotrophic cultures of microalgae: metabolism and potential products. *Water Research* 45: 11-36.

Pernet-Coudrier B. 2008. Influence de la matière organique dissoute sur la spéciation et la biodisponibilité des métaux : cas de la Seine, un milieu sous forte pression urbaine. *PhD dissertation* thesis. Université de Paris-Est, France, 293 pp.

Pesce S, Batisson I, Bardot C, Fajon C, Portelli C, et al. 2009. Response of spring and summer riverine microbial communities following glyphosate exposure. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 72: 1905-12.

Pessoa MF. 2012. Harmful effects of UV radiation in Algae and aquatic macrophytes - A review. *Emirates Journal of Food & Agriculture (EJFA)* 24: 510-26.

Petroutsos D, Katapodis P, Samiotaki M, Panayotou G, Kekos D. 2008. Detoxification of 2,4-dichlorophenol by the marine microalga *Tetraselmis marina*. *Phytochemistry* 69: 707-14.

Pierre G. 2010. Biochemical characterization of algal exopolymers from Marennes-Oléron and study of the physico-chemical surface properties of microorganisms involved in their adhesion. *PhD dissertation* thesis. Université de La Rochelle, France, 323 pp.

Piorreck M, Pohl P. 1984. Formation of biomass, total protein, chlorophylls, lipids and fatty acids in green and blue-green algae during one growth phase. *Phytochemistry* 23: 217-23.

Pivokonsky M, Kloucek O, Pivokonska L. 2006. Evaluation of the production, composition and aluminum and iron complexation of algogenic organic matter. *Water Research* 40: 3045-52.

Plus M, Maurer D, Stanisiere J-Y, Dumas F. 2006. Caractérisation des composantes hydrodynamiques d'une lagune mésotidale, le Bassin d'Arcachon, Ifremer, 54 pp.

Priyadarshani I, Sahu D, Rath B. 2012. Microalgal bioremediation: current practices and perspectives. *Journal of Biochemical Technology* 3: 299-304.

Quigg A. 2016. Micronutrients. In *The Physiology of Microalgae*, ed. MA Borowitzka, J Beardall, JA Raven, Springer International Publishing, pp. 211-31.

Rajasekaran G, Murali K, Nagan S, Amoudhavally V, Santhaswaruban V. 2005. Contaminant transport modeling in marine clays. *Ocean Engineering* 32: 175-94.

Ramanan R, Kim B-H, Cho D-H, Oh H-M, Kim H-S. 2016. Algae–bacteria interactions: Evolution, ecology and emerging applications. *Biotechnology Advances* 34: 14-29.

Rashid MA. 2012. *Geochemistry of marine humic compounds*. Springer Science & Business Media. pp. 300.

Raven JA, Giordano M. 2016. Combined Nitrogen. In *The Physiology of Microalgae,* ed. MA Borowitzka, J Beardall, JA Raven, Springer International Publishing, pp. 143-54.

Raven PH, Johnson GB, Mason KA, Bouharmont J, Losos JB, et al. 2011. *Biologie*. De Boeck Supérieur. pp. 1406.

Readman JW, Kwong LLW, Grondin D, Bartocci J, Villeneuve JP, Mee LD. 1993. Coastal water contamination from a triazine herbicide used in antifouling paints. *Environmental Science & Technology* 27: 1940-42.

Reichardt E. 2015. *Gomphonema gracile* Ehrenberg sensu stricto et sensu auct. (Bacillariophyceae): A taxonomic revision. *Nova Hedwigia* 101: 367-93.

REPAR. 2015. Fiche de vie REPAR - quantifier, connaître, comprendre, susciter et partager, Réseau Pesticides Bassin d'Arcachon (REPAR), 96 pp.

Reynolds DM. 2014. The principles of fluorescence. In *Aquatic organic matter fluorescence*, ed. PG Coble, J Lead, A Baker, DM Reynolds, RGM Spencer, Cambridge University Press, pp. 3-34.

Ricard M. 1987. *Atlas du phytoplancton marin: Diatomophycées*. Éditions du centre national de la recherche scientifique. pp. 297.

Ricart M, Barceló D, Geiszinger A, Guasch H, Alda MLd, et al. 2009. Effects of low concentrations of the phenylurea herbicide diuron on biofilm algae and bacteria. *Chemosphere* 76: 1392-401.

Rivard L. 2003. Environmental fate of metolachlor. *Chemistry* 51218: 45-2.

Robert R, Chretiennot-Dinet M-J, Kaas R, Martin-Jezequel V, Moal J, et al. 2004. Amélioration des productions phytoplanctoniques en écloserie de mollusques : caractérisation des microalgues fourrage, Ifremer, CNRS, 144 pp.

Rodier J, Legube B, Merlet N. 2016. *L'analyse de l'eau*. Dunod. pp. 1600.

Rolland A. 2009. Dynamique et diversité du phytoplancton dans le réservoir Marne (Bassin versant de la Seine). *PhD dissertation* thesis. Université de Savoie, France 261 pp.

Romera-Castillo C, Sarmento H, Álvarez-Salgado XA, Gasol JM, Marrasé C. 2011. Net production and consumption of fluorescent colored dissolved organic matter by natural bacterial assemblages growing on marine phytoplankton exudates. *Applied and Environmental Microbiology* 77: 7490-98.

Romero-Lopez J, Lopez-Rodas V, Costas E. 2012. Estimating the capability of microalgae to physiological acclimatization and genetic adaptation to petroleum and diesel oil contamination. *Aquatic Toxicology* 124–125: 227-37.

Ronot X, Grunwald D, Mayol J-F, Boutonnat J, Maynadié M, Martet G. 2006. *La cytométrie en flux*. Lavoisier. pp. 457.

Rose DT, Cox EJ. 2013. Some diatom species do not show a gradual decrease in cell size as they reproduce. *Fundamental and Applied Limnology / Archiv f??r Hydrobiologie* 182: 117-22.

Roubeix V, Fauvelle V, Tison-Rosebery J, Mazzella N, Coste M, Delmas F. 2012. Assessing the impact of chloroacetanilide herbicides and their metabolites on periphyton in the Leyre River (SW France) via short term growth inhibition tests on autochthonous diatoms. *Journal of Environmental Monitoring* 14: 1655-63.

Roubeix V, Mazzella N, Méchin B, Coste M, Delmas F. 2011a. Impact of the herbicide metolachlor on river periphytic diatoms: experimental comparison of descriptors at different biological organization levels. *Annales de Limnologie - International Journal of Limnology* 47: 239-49.

Roubeix V, Mazzella N, Schouler L, Fauvelle V, Morin S, et al. 2011b. Variations of periphytic diatom sensitivity to the herbicide diuron and relation to species distribution in a contamination gradient: implications for biomonitoring. *Journal of Environmental Monitoring* 13: 1768-74.

Round FE, Crawford RM, Mann DG. 1990. *Diatoms: biology & morphology of the genera*. Cambridge University Press. pp.

Round FE, Crawford RM, Mann DG. 2007. *Diatoms: biology and morphology of the genera*. Cambridge University Press. pp. 747.

Rowan KS. 1989. *Photosynthetic pigments of algae*. Cambridge University Press. pp.

Roy S, Llewellyn CA, Egeland ES, Johnsen G. 2011. *Phytoplankton pigments: characterization, chemotaxonomy and applications in oceanography*. Cambridge University Press. pp. 890.

Rupert PA, Dagmar W. 2014. Computer-assisted sperm analysis (CASA): Capabilities and potential developments. *Theriogenology* 81: 5-17.

Rurangwa E, Kime DE, Ollevier F, Nash JP. 2004. The measurement of sperm motility and factors affecting sperm quality in cultured fish. *Aquaculture* 234: 1-28.

Sachindra NM, Sato E, Maeda H, Hosokawa M, Niwano Y, et al. 2007. Radical scavenging and singlet oxygen quenching activity of marine carotenoid fucoxanthin and its metabolites. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 55: 8516-22.

Sakkas VA, Lambropoulou DA, Albanis TA. 2002. Photochemical degradation study of irgarol 1051 in natural waters: influence of humic and fulvic substances on the reaction. *Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry* 147: 135-41.

Sánchez-Marín P, Beiras R. 2011. Adsorption of different types of dissolved organic matter to marine phytoplankton and implications for phytoplankton growth and Pb bioavailability. *Journal of Plankton Research* 33: 1396-409.

Sandre. 2017. *Fiche cours d'eau - Ruisseau de Rebec*. Eau de France http://services.sandre.eaufrance.fr/Courdo/Fiche/client/fiche_courdo.php?CdSandre=S2250660.

Schartau M, Engel A, Schröter J, Thoms S, Völker C, Wolf-Gladrow D. 2007. Modelling carbon overconsumption and the formation of extracellular particulate organic carbon. *Biogeosciences* 4: 433-54.

Schmalfuß J, Matthes B, Mayer P, Böger P. 1998. Chloroacetamide mode of action, I: Inhibition of very long chain fatty acid synthesis in *Scenedesmus acutus*. *Zeitschrift Fur Naturforschung C* 53: 995-1003.

Seguin F, Leboulanger C, Rimet F, Druart J, Bérard A. 2001. Effects of atrazine and nicosulfuron on phytoplankton in systems of increasing complexity. *Archives of environmental contamination and toxicology* 40: 198-208.

Serôdio J, Ezequiel J, Barnett A, Mouget JL, Méléder V, et al. 2012. Efficiency of photoprotection in microphytobenthos: role of vertical migration and the xanthophyll cycle against photoinhibition. *Aquatic Microbial Ecology* 67: 161-75.

Sharma AK, Sahoo PK, Singhal S, Patel A. 2016. Impact of various media and organic carbon sources on biofuel production potential from *Chlorella spp*. *3 Biotech* 6: 116.

Siegel DA, Maritorena S, Nelson NB, Hansell DA, Lorenzi-Kayser M. 2002. Global distribution and dynamics of colored dissolved and detrital organic materials. *Journal of Geophysical Research: Oceans* 107

Sjollema SB, MartínezGarcía G, van der Geest HG, Kraak MHS, Booij P, et al. 2014. Hazard and risk of herbicides for marine microalgae. *Environmental Pollution* 187: 106-11.

Skoog DA, Holler FJ, Nieman TA. 2003. *Principes d'analyse instrumentale*. De Boeck. pp. 956.

SOeS. 2015. Les pesticides dans les cours d'eau français en 2013, Commissariat général au développement durable - Service de l'observation et des statistiques, 12 pp.

Spiese CE, Le T, Zimmer RL, Kieber DJ. 2016. Dimethylsulfide membrane permeability, cellular concentrations and implications for physiological functions in marine algae. *Journal of Plankton Research* 38: 41-54.

Spolaore P, Joannis-Cassan C, Duran E, Isambert A. 2006. Commercial applications of microalgae. *Journal of Bioscience and Bioengineering* 101: 87-96.

Stachowski-Haberkorn S. 2008. Méthodes d'évaluation de l'impact de pesticides sur le phytoplancton marin et le naissain d'huître creuse. Université de Bretagne occidentale, 177 pp.

Stachowski-Haberkorn S, Becker B, Marie D, Haberkorn H, Coroller L, de la Broise D. 2008. Impact of Roundup on the marine microbial community, as shown by an in situ microcosm experiment. *Aquatic Toxicology* 89: 232-41.

Stachowski-Haberkorn S, Jérôme M, Rouxel J, Khelifi C, Rincé M, Burgeot T. 2013. Multigenerational exposure of the microalga *Tetraselmis suecica* to diuron leads to spontaneous long-term strain adaptation. *Aquatic Toxicology* 140–141: 380-88.

Stedmon C, Amon R, Rinehart A, Walker S. 2011. The supply and characteristics of colored dissolved organic matter (CDOM) in the Arctic Ocean: Pan Arctic trends and differences. *Marine Chemistry* 124: 108-18.

Steinberg CEW, Kamara S, Prokhotskaya VY, ManusadzIanas L, Karasyova TA, et al. 2006. Dissolved humic substances – ecological driving forces from the individual to the ecosystem level? *Freshwater Biology* 51: 1189-210.

Stenersen J. 2004. *Chemical pesticides mode of action and toxicology*. CRC Press. pp. 296.

Stohs SJ, Bagchi D. 1995. Oxidative mechanisms in the toxicity of metal ions. *Free radical biology and medicine* 18: 321-36.

Støttrup JG. 2007. Production and nutritional value of copepods. In *Live Feeds in Marine Aquaculture*, ed. JG Støttrup, LA McEvoy, Blackwell Science Ltd, pp. 145-205.

Subashchandrabose SR, Ramakrishnan B, Megharaj M, Venkateswarlu K, Naidu R. 2013. Mixotrophic cyanobacteria and microalgae as distinctive biological agents for organic pollutant degradation. *Environment International* 51: 59-72.

Suresh B, Ravishankar G. 2004. Phytoremediation—a novel and promising approach for environmental clean-up. *Critical reviews in biotechnology* 24: 97-124.

Suresh Kumar K, Dahms H-U, Lee J-S, Kim HC, Lee WC, Shin K-H. 2014. Algal photosynthetic responses to toxic metals and herbicides assessed by chlorophyll a fluorescence. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 104: 51-71.

Sylvestre M, Barriault D, Plante M-M, Simard C. 2004. La dépollution des POP : Les nouveaux outils de la biologie moléculaire à la rescousse des biotechnologies environnementales. In *Écotoxicologie moléculaire - Principes fondamentaux et perspectives de développement*, ed. É Pelletier, PGC Campbell, Presses de l'Université du Québec, pp. 109-60.

Taipale SJ, Galloway AWE, Aalto SL, Kahilainen KK, Strandberg U, Kankaala P. 2016. Terrestrial carbohydrates support freshwater zooplankton during phytoplankton deficiency. *Scientific Reports* 6: 30897.

Taiz, Zeiger. 2006. *Plant physiology*. Sinauer Associates. pp. 700.

Takano H. 1968. On the diatom *Chaetoceros calcitrans* (Paulsen) emend. and its dwarf form pumilus forma nov. *Bulletin of Tokai Regional Fisheries Research Laboratory* 100: 35-43.

Tamura K, Stecher G, Peterson D, Filipski A, Kumar S. 2013. MEGA6: molecular evolutionary genetics analysis version 6.0. *Molecular Biology and Evolution* 30: 2725-29.

Tapie N, Thévand A, Chevance-Demars L, Pardon P, Jeandenand S, Budzinski H. 2016. *Le REseau de Surveillance des Pesticides sur le Bassin d'Arcachon (REPAR).* 46e congrès du Groupe Français des Pesticides (GFP), Bordeaux pp. 1.

Taylor AR, Brownlee C. 2016. Calcification. In *The Physiology of Microalgae*, ed. MA Borowitzka, J Beardall, JA Raven, Springer International Publishing, pp. 301-18.

Taylor C, Matzke M, Kroll A, Read DS, Svendsen C, Crossley A. 2016. Toxic interactions of different silver forms with freshwater green algae and cyanobacteria and their effects on mechanistic endpoints and the production of extracellular polymeric substances. *Environmental Science: Nano* 3: 396-408.

Tedetti M, Sempéré R. 2006. Penetration of ultraviolet radiation in the marine environment. A review. *Photochemistry and Photobiology* 82: 389-97.

Tesson B, Hildebrand M. 2013. Characterization and localization of insoluble organic matrices associated with diatom cell walls: insight into their roles during cell wall formation. *PLoS ONE* 8: e61675.

Tetko IV, Gasteiger J, Todeschini R, Mauri A, Livingstone D, et al. 2005. Virtual computational chemistry laboratory – design and description. *Journal of Computer-Aided Molecular Design* 19: 453-63.

Thakkar M, Randhawa V, Wei L. 2013. Comparative responses of two species of marine phytoplankton to metolachlor exposure. *Aquatic Toxicology* 126: 198-206.

Thies F, Backhaus T, Bossmann B, Grimme LH. 1996. Xenobiotic biotransformation in unicellular green algae (involvement of cytochrome P450 in the activation and selectivity of the pyridazinone pro-herbicide metflurazon). *Plant Physiology* 112: 361-70.

Thomas KV, Fileman TW, Readman JW, Waldock MJ. 2001. Antifouling paint booster biocides in the UK coastal environment and potential risks of biological effects. *Marine Pollution Bulletin* 42: 677-88.

Thurman EM. 1985. *Organic geochemistry of natural waters*. Springer Netherlands. pp. 497.

Thurman EM, Malcolm RL. 1981. Preparative isolation of aquatic humic substances. *Environmental Science & Technology* 15: 463-66.

Tipping E. 2002. *Cation Binding by Humic Substances*. Cambridge University Press. pp. 444.

Tischer W, Strotmann H. 1977. Relationship between inhibitor binding by chloroplasts and inhibition of photosynthetic electron transport. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics* 460: 113-25.

Tlili A, Corcoll N, Bonet B, Morin S, Montuelle B, et al. 2011. In situ spatio-temporal changes in pollution-induced community tolerance to zinc in autotrophic and heterotrophic biofilm communities. *Ecotoxicology* 20: 1823-39.

Tlili A, Dorigo U, Montuelle B, Margoum C, Carluer N, et al. 2008. Responses of chronically contaminated biofilms to short pulses of diuron: An experimental study simulating flooding events in a small river. *Aquatic Toxicology* 87: 252-63.

Torres MA, Barros MP, Campos SCG, Pinto E, Rajamani S, et al. 2008. Biochemical biomarkers in algae and marine pollution: A review. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 71: 1-15.

Trouts TD. 2008. Photolysis of Metolachlor and Triclocarban Sensitized by Natural Water Constituents. The Ohio State University, 86 pp.

Union Européenne UE. 1998. Directive n°98/8/CE concernant la mise sur le marché des produits biocides. *Journal officiel des Communautés européennes* 123: 1-63.

Union Européenne UE. 2009. Règlement n° 1107/2009 concernant la mise sur le marché des produits phytopharmaceutiques et abrogeant les directives 79/117/CEE et 91/414/CEE. *Journal officiel de l'Union européenne* 309: 50.

Union Européenne UE. 2012. Règlement n° 528/2012 concernant la mise à disposition sur le marché et l'utilisation des produits biocides *Journal officiel de l'Union européenne* 167: 1-123.

Urbani R, Sist P, Pletikapić G, Mišić Radić T, Svetličić V, Žutić V. 2012. Diatom Polysaccharides: Extracellular Production, Isolation and Molecular Characterization. In *The Complex World of Polysaccharides*, 345-67.

Vacher L. 2004. Etude par fluorescence des propriétés de la matière organique dissoute dans les systèmes estuariens. Cas des estuaires de la Gironde et de la Seine. *PhD dissertation* thesis. Université de Bordeaux I, France, 255 pp.

Vallotton N, Moser D, Eggen RIL, Junghans M, Chèvre N. 2008. S-metolachlor pulse exposure on the alga Scenedesmus vacuolatus: Effects during exposure and the subsequent recovery. *Chemosphere* 73: 395-400.

Van Der Werf HMG. 1997. Evaluer l'impact des pesticides sur l'environnement. *Le Courrier de l'environnement de l'INRA* 31: 5-22.

Verma J, Nautiyal P. 2016. Pennate diatoms *Gomphonema* Ehrenberg from the Vindhya (Central Highland) and the Himalaya. *Phykos* 46: 17-20.

Vieira HAA, Ortolano PIC, Giroldo D, Oliveira MJD, Bittar TB, et al. 2008. Role of hydrophobic extracellular polysaccharide of Aulacoseira granulata (Bacillariophyceae) on aggregate formation in a turbulent and hypereutrophic reservoir. *Limnology and Oceanography* 53: 1887-99.

Vigneault B. 2000. Interactions des substances humiques dissoutes avec les algues unicellulaires: mécanismes et implications. *PhD dissertation* thesis. Université du Québec, Canada, 164 pp.

Villeneuve V, Pienitz R. 1998. Composition diatomifère de quatre sources thermales au Canada, en Islande et au Japon. *Diat. Res.* 13: 149-75.

Vølund A. 1992. *Dose response surface bioassay*. XVIth International Biometric Conference, Hamilton, New Zealand pp. 249.

Wang Y, Fang J, Leonard SS, Krishna Rao KM. 2004. Cadmium inhibits the electron transfer chain and induces reactive oxygen species. *Free Radical Biology and Medicine* 36: 1434-43.

Weiner JA, DeLorenzo ME, Fulton MH. 2004. Relationship between uptake capacity and differential toxicity of the herbicide atrazine in selected microalgal species. *Aquatic Toxicology* 68: 121-28.

Weishaar JL, Aiken GR, Bergamaschi BA, Fram MS, Fujii R, Mopper K. 2003. Evaluation of specific ultraviolet absorbance as an indicator of the chemical composition and reactivity of dissolved organic carbon. *Environmental Science & Technology* 37: 4702-08.

Wetzel RG. 2001. Limnology: lake and river ecosystems. 3rd (ed) Academic Press, Elsevier Science, pp. 1006.

Wildner Günter F, Heisterkamp U, Trebst A. 1990. Herbicide cross-resistance and mutations of the psbA gene in *Chlamydomonas reinhardtii*. In *Zeitschrift für Naturforschung C*, pp. 1142

Wilson-Leedy J, Ingermann R. 2007. Development of a novel CASA system based on open source software for characterization of zebrafish sperm motility parameters. *Theriogenology* 67: 661-72.

Windler M, Bova D, Kryvenda A, Straile D, Gruber A, Kroth PG. 2014. Influence of bacteria on cell size development and morphology of cultivated diatoms. *Phycological Research* 62: 269-81.

Wolfe NL, Mingelgrin U, Miller GC. 1990. Abiotic transformations in water, sediments, and soil. *Pesticides in the soil environment: processes, impacts, and modeling*.: 103-68.

Xia S, Wang K, Wan L, Li A, Hu Q, Zhang C. 2013. Production, characterization, and antioxidant activity of fucoxanthin from the marine diatom *Odontella aurita*. *Marine Drugs* 11: 2667-81.

Xiong J-Q, Kurade MB, Kim JR, Roh H-S, Jeon B-H. 2017. Ciprofloxacin toxicity and its co-metabolic removal by a freshwater microalga *Chlamydomonas mexicana*. *Journal of Hazardous Materials* 323, Part A: 212-19.

Yuan C, Chakraborty M, Canonica S, Weavers LK, Hadad CM, Chin Y-P. 2016. Isoproturon reappearance after photosensitized degradation in the presence of triplet ketones or fulvic acids. *Environmental Science & Technology* 50: 12250-57.

Zablotowicz RM, Schrader KK, Locke MA. 1998. Algal transformation of fluometuron and atrazine by N-dealkylation. *Journal of Environmental Science and Health, Part B* 33: 511-28.

Zachleder V, Bišová K, Vítová M. 2016. The cell cycle of microalgae. In *The physiology of microalgae*, ed. MA Borowitzka, J Beardall, JA Raven, Springer International Publishing, pp. 3-46.

Zeng K, Hwang H-m, Yuzuri H. 2002. Effect of dissolved humic substances on the photochemical degradation rate of 1-aminopyrene and atrazine. *International Journal of Molecular Sciences* 3: 1048-57.

Zhang N, Xu B, Qi F. 2016a. Effect of phosphate loading on the generation of extracellular organic matters of *Microcystis aeruginosa* and its derived disinfection by-products. *Water, Air, & Soil Pollution* 227: 264.

Zhang S, Lin D, Wu F. 2016b. The effect of natural organic matter on bioaccumulation and toxicity of chlorobenzenes to green algae. *Journal of Hazardous Materials* 311: 186-93.

Zsolnay A, Baigar E, Jimenez M, Steinweg B, Saccomandi F. 1999. Differentiating with fluorescence spectroscopy the sources of dissolved organic matter in soils subjected to drying. *Chemosphere* 38: 45-50.

Annexes

Annexe 1 – Liste des 45 substances prioritaires identifiées par la DCE.

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

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

(1) CAS: Chemical Abstracts Service.
(2) Numéro UE: Inventaire européen des produits chimiques commercialisés (Einecs) ou Liste européenne des substances chimiques notifiées (Elincs).
(3) Lorsque des groupes de substances ont été sélectionnés, sauf indication expresse, des représentants typiques de ce groupe sont définis aux fins de l'établissement des normes de qualité environnementale.
(4) Uniquement le tétrabromodiphényléther (nº CAS 40088-47-9), le pentabromodiphényléther (nº CAS 32534-81-9), l'hexabromodiphényléther (nº CAS 36483-60-0) et l'heptabromodiphényléther (nº CAS: 68928-80-3).
(5) Nonylphénol (nº CAS 25154-52-3; nº UE 246-672-0), y compris les isomères 4-nonylphénol (nº CAS 104-40-5; nº UE 203-199-4) et 4-nonylphénol (ramifié) (nº CAS 84852-15-3; nº UE 284-325-5).
(6) Octylphénol (nº CAS 1806-26-4; nº UE 217-302-5), y compris l'isomère 4-(1,1',3,3'- tétraméthylbutyl)-phénol (nº CAS 140-66-9; nº UE 205-426-2).
(7) Y compris le benzo(a)pyrène (nº CAS 50-32-8; nº UE 200-028-5), le benzo(b)fluoranthène (nº CAS 205-99-2; nº UE 205-911-9), le benzo(g,h,i)perylène (nº CAS 191-24-2; nº UE 205-883-8), le benzo(k)fluoranthène (nº CAS 207-08-9; nº UE 205-916-6) et l'indéno(1,2,3-cd)pyrène (nº CAS 193-39-5; nº UE 205-893-2), mais à l'exception de l'anthracène, du fluoranthène et du naphtalène, qui sont énumérés séparément.
(8) Y compris le tributylétain-cation (nº CAS: 36643-28-4).
(9) Se rapporte aux composés suivants:
sept dibenzo-p-dioxines polychlorées (PCDD): 2,3,7,8-T4CDD (nº CAS 1746-01-6), 1,2,3,7,8-P5CDD (nº CAS 40321-76-4), 1,2,3,4,7,8-H6CDD (nº CAS 39227-28-6), 1,2,3,6,7,8-H6CDD (nº CAS 57653-85-7), 1,2,3,7,8,9-H6CDD (nº CAS 19408-74-3), 1,2,3,4,6,7,8-H7CDD (nº CAS 35822-46-9), 1,2,3,4,6,7,8,9-O8CDD (nº CAS 3268-87-9);
dix dibenzofurannes polychlorés (PCDF): 2,3,7,8-T4CDF (CAS 51207-31-9), 1,2,3,7,8-P5CDF (CAS 57117-41-6), 2,3,4,7,8-P5CDF (CAS 57117-31-4), 1,2,3,4,7,8-H6CDF (CAS 70648-26-9), 1,2,3,6,7,8-H6CDF (CAS 57117-44-9), 1,2,3,7,8,9-H6CDF (CAS 72918-21-9), 2,3,4,6,7,8-H6CDF (CAS 60851-34-5), 1,2,3,4,6,7,8-H7CDF (CAS 67562-39-4), 1,2,3,4,7,8,9-H7CDF (CAS 55673-89-7), 1,2,3,4,6,7,8,9-O8CDF (CAS 39001-02-0)
douze biphényles polychlorés de type dioxine (PCB-TD): 3,3',4,4'-T4CB (PCB 77, nº CAS 32598-13-3), 3,3',4',5-T4CB (PCB 81, nº CAS 70362-50-4), 2,3,3',4,4'-P5CB (PCB 105, nº CAS 32598-14-4), 2,3,4,4',5-P5CB (PCB 114, nº CAS 74472-37-0), 2,3',4,4',5-P5CB (PCB 118, nº CAS 31508-00-6), 2,3',4,4',5'-P5CB (PCB 123, nº CAS 65510-44-3), 3,3',4,4',5-P5CB (PCB 126, nº CAS 57465-28-8), 2,3,3',4,4',5-H6CB (PCB 156, nº CAS 38380-08-4), 2,3,3',4,4',5'-H6CB (PCB 157, nº CAS 69782-90-7), 2,3',4,4',5,5'-H6CB (PCB 167, nº CAS 52663-72-6), 3,3',4,4',5,5'-H6CB (PCB 169, nº CAS 32774-16-6), 2,3,3',4,4',5,5'-H7CB (PCB 189, nº CAS 39635-31-9).
(10) Le nº CAS 52315-07-8 se rapporte à un mélange d'isomères de cyperméthrine, d'alpha-cyperméthrine (nº CAS 67375-30-8), de bêta-cyperméthrine (nº CAS 65731-84-2), de thêta-cyperméthrine (nº CAS 71697-59-1) et de zêta-cyperméthrine (nº CAS 52315-07-8).
(11) Se rapporte au 1,3,5,7,9,11-hexabromocyclododécane (nº CAS: 25637-99-4), le 1,2,5,6,9,10-hexabromocyclododécane (nº CAS 3194-55-6), l'α-hexabromocyclododécane (nº CAS: 134237-50-6), le β-Hexabromocyclododécane (nº CAS 134237-51-7) et le γ-hexabromocyclododécane (nº CAS 134237-52-8).».

Annexe 2 – Composition du milieu de culture Dauta (Dauta, 1982).

Pour 1 Litre de Dauta :

- 1 mL de $FeSO_4$, 7 H_2O à 1 $g.L^{-1}$
- 1 mL de $NaHCO_3$ à 50 $g.L^{-1}$
- 1 mL de Na_2CO_3 à 5 $g.L^{-1}$
- 1 mL de $MgSO_4$, 7 H_2O à 25 $g.L^{-1}$
- 1 mL de $Cacl_2$, 2 H_2O à 25 $g.L^{-1}$
- 3,6 mL de Na_2SiO_3, 9 H_2O à 28,42 $g.L^{-1}$ (correspondant à environ 10 $mg.L^{-1}$ de Si)
- 1 mL de solution d'oligoéléments contenant :
    - $ZnSO_4$, 7 H_2O à 20 $mg.L^{-1}$
    - $CuCl_2$, 2 H_2O à 20 $mg.L^{-1}$
    - $MnCl_2$, 4 H_2O à 400 $mg.L^{-1}$
    - $CoCl_2$, 2 H_2O à 10 $mg.L^{-1}$
    - H_3BO_3 à 1 $mg.L^{-1}$
    - Na_2MoO_4 à 35 $mg.L^{-1}$
- 1 mL de KNO_3 à 200 $g.L^{-1}$
- 1 mL de K_2HPO_4 à 25 $g.L^{-1}$
- Eau distillée (pour compléter jusqu'à 1 L)
- HCl (pour ajuster le pH entre 7,5 et 8 en toute fin de préparation)

Annexe 3 – Composition et préparation du milieu de culture f/2 (Guillard, 1975, Guillard & Ryther, 1962).

f/2 Medium

(Guillard and Ryther 1962, Guillard 1975)

This is a common and widely used general enriched seawater medium designed for growing coastal marine algae, especially diatoms. The concentration of the original formulation, termed "f Medium" (Guillard and Ryther 1962), has been reduced by half.

To prepare, begin with 950 mL of filtered natural seawater and add the following components. The trace element and vitamin solutions are provided below. Bring the final volume to 1 liter with filtered natural seawater. If the alga to be grown does not require silica, then it is recommended that the silica be omitted because it enhances precipitation. Autoclave.

Component	Stock Solution	Quantity	Molar Concentration in Final Medium
$NaNO_3$	75 g/L dH_2O	1 mL	8.82×10^{-4} M
NaH_2PO_4 H_2O	5 g/L dH_2O	1 mL	3.62×10^{-5} M
Na_2SiO_3 $9H_2O$	30 g/L dH_2O	1 mL	1.06×10^{-4} M
trace metal solution	(see recipe below)	1 mL	---
vitamin solution	(see recipe below)	0.5 mL	---

f/2 Trace Metal Solution

To prepare, begin with 950 mL of dH_2O, add the components and bring final volume to 1 liter with dH_2O. Autoclave. Note that the original medium (Guillard and Ryther 1962) used ferric sequestrene; we have substituted $Na_2EDTA \cdot 2H_2O$ and $FeCl_3 \cdot 6\ H_2O$.

PROVASOLI-GUILLARD
NCMA
National Center for Marine Algae and Microbiota
Culturing Diversity

Component	Primary Stock Solution	Quantity	Molar Concentration in Final Medium
$FeCl_3$ $6H_2O$	---	3.15 g	1.17×10^{-5} M
Na_2EDTA $2H_2O$	---	4.36 g	1.17×10^{-5} M
$CuSO_4$ $5H_2O$	9.8 g/L dH_2O	1 mL	3.93×10^{-8} M
Na_2MoO_4 $2H_2O$	6.3 g/L dH_2O	1 mL	2.60×10^{-8} M
$ZnSO4$ $7H_2O$	22.0 g/L dH_2O	1 mL	7.65×10^{-8} M
$CoCl_2$ $6H_2O$	10.0 g/L dH_2O	1 mL	4.20×10^{-8} M
$MnCl_2$ $4H_2O$	180.0 g/L dH_2O	1 mL	9.10×10^{-7} M

f/2 Vitamin Solution

First, prepare primary stock solutions. To prepare final vitamin solution, begin with 950 mL of dH_2O, dissolve the thiamine, add the amounts of the primary stocks as indicated in the quantity column below, and bring final volume to 1 liter with dH_2O. At the NCMA we autoclave to sterilize. Store in refrigerator or freezer.

Component	Primary Stock Solution	Quantity	Molar Concentration in Final Medium
thiamine HCl (vit. B_1)	---	200 mg	2.96×10^{-7} M
biotin (vit. H)	0.1 g/L dH_2O	10 mL	2.05×10^{-9} M
cyanocobalamin (vit. B_{12})	1.0 g/L dH_2O	1 mL	3.69×10^{-10} M

Guillard, R.R.L. 1975. Culture of phytoplankton for feeding marine invertebrates. pp 26-60. *In* Smith W.L. and Chanley M.H (Eds.) *Culture of Marine Invertebrate Animals*. Plenum Press, New York, USA.

Guillard, R.R.L. and Ryther, J.H. 1962. Studies of marine planktonic diatoms. I. *Cyclotella nana* Hustedt and *Detonula confervacea* Cleve. *Can. J. Microbiol.* **8:** 229-239.

Influence de la matière organique dissoute naturelle et d'herbicides, seuls et combinés, sur des microalgues marines et d'eau douce.

Résumé : Les microalgues, qui sont à la base des réseaux trophiques aquatiques, peuvent être la cible indirecte des herbicides provenant des usages agricoles et urbains. Elles sont également en interaction avec d'autres éléments de leur environnement comme la matière organique dissoute (MOD) naturelle, elle-même susceptible d'interagir avec les herbicides. Cette thèse a visé à étudier, en milieu contrôlé, l'influence de la MOD naturelle sur la toxicité d'herbicides vis-à-vis de microalgues en cultures monospécifiques non axéniques. Ont été considérés de la MOD naturelle d'eau douce et marine, trois herbicides (irgarol, diuron et S-métolachlore) seuls et en mélange, deux espèces de microalgues dulçaquicoles (*Gomphonema gracile* et *Sphaerellopsis* sp.) et deux espèces marines (*Chaetoceros calcitrans* et *Tetraselmis suecica*). Les effets ont été déterminés sur la croissance, l'efficacité photosynthétique et le contenu relatif en lipides des microalgues. En parallèle, l'environnement chimique a été caractérisé en suivant l'évolution de la composition et des propriétés de la MOD, ainsi que des concentrations d'herbicides et de leurs métabolites. Les résultats de ces travaux, qui considèrent pour la première fois la MOD naturelle dans sa globalité en interaction avec des microalgues et des herbicides, démontrent le rôle clé joué par la MOD sur (i) la stimulation de la croissance des quatre espèces de microalgues (et en retour la modification de la MOD par celles-ci), (ii) la modulation de la toxicité des herbicides et suggèrent (iii) la capacité de *Sphaerellopsis* sp. et/ou de ses bactéries associées de biodégrader le diuron.

Mots clés : Microalgues, Matière organique dissoute naturelle, MOD, Herbicides, Transformations chimiques, Toxicité.

Influence of natural dissolved organic matter and herbicides, singly and in mixtures, on marine and freshwater microalgae.

Abstract: Microalgae are at the basis of aquatic food webs and may be the indirect target of herbicides from agricultural and urban uses. They also interact with other compounds from their environment such as natural dissolved organic matter (DOM), which can itself interact with herbicides. This thesis aimed to study, in laboratory controlled conditions, the influence of natural DOM on herbicide toxicity to microalgae by using monospecific, non-axenic cultures. The experiments included: natural freshwater and marine DOM, three herbicides (irgarol, diuron and S-metolachlor) singly and in mixtures, two freshwater microalgae (*Gomphonema gracile* and *Sphaerellopsis* sp.) and two marine microalgae (*Chaetoceros calcitrans* and *Tetraselmis suecica*). Effects were evaluated on microalgae growth, photosynthetic efficiency and relative lipid content. At the same time, changes in chemical environment over the experiments were measured through DOM composition and properties, as well as the concentrations in herbicides and their metabolites. The results of this work, which consider for the first time natural DOM as a whole, interacting with microalgae, their associated bacteria and herbicides, demonstrate the key role played by DOM in (i) the growth stimulation of four microalgae (and in return the DOM changes induced by microalgae), (ii) the modulation of herbicide toxicity and suggest (iii) the ability of *Sphaerellopsis* sp. and/or its associated bacteria to biodegrade diuron in non-axenic conditions.

Keywords: Microalgae, Natural dissolved organic matter, DOM, Herbicides, Chemical transformations, Toxicity.

Unités de recherche

UR EABX, Irstea – 50 Avenue de Verdun, 33612 Cestas Cedex, France.
UMR EPOC 5805 CNRS, Université de Bordeaux – 351 Cours de la Libération, 33405 Talence Cedex, France.
UR BE, Ifremer – Rue de l'île d'Yeu, BP 21105, 44311 Nantes Cedex 03, France.