



HAL
open science

Développement d'un réseau trophique microbien standardisé pour l'évaluation de l'impact des contaminants sur les écosystèmes dulçaquicoles

Anne Vicente

► To cite this version:

Anne Vicente. Développement d'un réseau trophique microbien standardisé pour l'évaluation de l'impact des contaminants sur les écosystèmes dulçaquicoles. Biochimie, Biologie Moléculaire. Université de Lorraine, 2019. Français. NNT : 2019LORR0355 . tel-03184406

HAL Id: tel-03184406

<https://hal.univ-lorraine.fr/tel-03184406v1>

Submitted on 2 Nov 2022

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

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



AVERTISSEMENT

Ce document est le fruit d'un long travail approuvé par le jury de soutenance et mis à disposition de l'ensemble de la communauté universitaire élargie.

Il est soumis à la propriété intellectuelle de l'auteur. Ceci implique une obligation de citation et de référencement lors de l'utilisation de ce document.

D'autre part, toute contrefaçon, plagiat, reproduction illicite encourt une poursuite pénale.

Contact : ddoc-theses-contact@univ-lorraine.fr

LIENS

Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 122. 4

Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 335.2- L 335.10

http://www.cfcopies.com/V2/leg/leg_droi.php

<http://www.culture.gouv.fr/culture/infos-pratiques/droits/protection.htm>



Laboratoire Interdisciplinaire des
Environnements Continentaux
LIEC – CNRS UMR 7360



Université de Lorraine
Ecole doctorale SIRENa - Sciences et
Ingénierie des Ressources Naturelles

THESE

Pour l'obtention du titre de :

DOCTEUR DE L'UNIVERSITE DE LORRAINE

Mention : Ecotoxicologie, Biodiversité, Ecosystèmes

Soutenue publiquement par

Anne VICENTE

Le 16 octobre 2019

Développement d'un réseau trophique microbien standardisé pour l'évaluation de l'impact des contaminants sur les écosystèmes dulçaquicoles

Membres du jury

Directrice de thèse **Pascale BAUDA**, Pr, Université de Lorraine

Co-directeur de thèse **Christophe PAGNOUT**, MCF, Université de Lorraine

Rapporteure **Catherine SANTAELLA**, CR HDR, Université Aix-Marseille II

Rapporteur **Stéphane PESCE**, DR, Irstea Lyon-Villeurbanne

Examinatrice **Cécile BERNARD**, Pr, MNHN Paris

Examineur **Michael DANGER**, MCF HDR, Université de Lorraine



Ministère de l'Enseignement supérieur,
de la Recherche et de l'Innovation



Remerciements

Le moment est venu de clôturer ces travaux de thèse et de mettre un point final à ce doctorat. Non sans un petit pincement au cœur, non sans repenser à tout ce que cela m'a permis de vivre et à toutes les personnes qui ont gravité autour de moi durant cette période. Il y a les personnes que l'on rencontre, et il y a les personnes qui ont toujours été là. Le savant mélange des deux a rendu ces dernières années inoubliables. A toutes ces personnes, **MERCI**.

A commencer par mes directeurs de thèse, Pascale Bauda et Christophe Pagnout : **Pascale**, merci d'avoir pris du temps pour des réunions régulières malgré ta fonction de co-directrice du laboratoire les 2 premières années. Merci pour ta réactivité et merci d'avoir apporté ton expérience à ma thèse. **Christophe**, merci pour ton sens de l'humour, ton optimisme, ta disponibilité et ton soutien. Merci de m'avoir appris l'importance de se constituer un réseau et de m'avoir donné les moyens de le faire dès le début de ma thèse notamment en m'intégrant au COST nano et en m'incitant à intégrer des réseaux comme EcotoxicoMic. J'ai réellement apprécié de travailler avec toi. *MERCI à tous les deux d'avoir accepté mes innombrables activités doctorales hors thèse. Je ne vous remercierai jamais assez pour votre confiance, votre soutien et pour m'avoir permis de vivre pleinement mon doctorat.*

Je tiens également à remercier **les membres de mon comité de pilotage** pour le temps que vous m'avez consacré ainsi que pour vos précieux conseils. **Bénédicte Sohm, Elisabeth Gross, Christophe Leboulanger, Yann Sivry et Marc Bouvy** : **MERCI** à tous pour votre implication et votre soutien qui a été sincèrement apprécié !

Je souhaite également adresser mes remerciements aux membres de **mon jury** qui ont accepté d'évaluer ce travail de thèse et de faire le déplacement lors de ma soutenance : **MERCI** à **Catherine Santaella, Cécile Bernard, Michael Danger et Stéphane Pesce**.

Merci **aux financeurs**, au **Ministère de l'Enseignement Supérieur, de la Recherche et de l'Innovation** pour avoir financé ma bourse de thèse et donc mon salaire durant ces 3 années et merci à la **Région Grand Est** pour son soutien financier sans quoi ces travaux auraient difficilement pu voir le jour.

Un grand merci à **la direction du laboratoire**, pour m'avoir fourni un environnement de travail agréable ainsi que tout le matériel nécessaire pour la réalisation de la thèse dans de bonnes conditions.

Un immense merci et une pensée toute particulière à **Marie-Andrée D.**, partie en retraite depuis, qui aura été un pilier à mon arrivée au labo et une personne très importante pour moi. Et je ne dis pas cela car j'espère un jour regoûter tes bons chocolats !

En tant que doctorants, on passe inévitablement un nombre incalculable d'heures au labo, mais quand on est bien entourés, on ne compte pas. **Merci aux doctorants du labo**, pour certains devenus docteurs entre temps : **Jenn, Pierre, Stéphane, Marine, Carole**, les kiwis explorateurs (**Mael & Faufau**). **Eve, Papo** : Merci de nous avoir accueillis chez vous au Portugal les amigos ! Hâte de revoir vos bouilles et celle du mini vous (je souhaite également remanger un jour les « chaussons » de Papo) <3

Drina et **Milie**, mes colloc' de bureau, mes partenaires de course, de défis sportifs, de GoT, de soirées étoilées, de randos, de sorties champignons, de bonnes bouffes entres copains et j'en passe. **Imad** pour avoir survécu à un bureau de filles et pour les séances psychologie du vendredi soir ! **Kewin**, mon binôme de travail du soir durant un temps, avec une passion commune pour la médiation des sciences et les beignets de courgettes apéri-cube. Un jour je te battrai à Just Dance avec la danse du homard. Mon **Cre**, partenaire de festoch & petits concerts dans les bars, la soirée tortue Ninja traîne encore sur ma « to do list ». Merci pour tout, tu es une personne en adamantium (c'est tellement plus badass que l'or !). **Nico A.** pour les apéroparc, pour avoir été mon chauffeur quand j'avais la cheville en vrac et pour la complicité naturelle que l'on a toujours eue :). **Vanessa** pour nos soirées jeux de société et randos & ton aide précieuse pour l'organisation de l'Anim.Sci du labo. **Manu** même si tu me piquais quotidiennement mon « repose coude », que tu aimes vivre dans le noir et à 32°C, j'ai été ravie de t'avoir en collègue de bureau (répète après moi, « MESSE », pas METZ). **David** (Chaltboobs), mon collègue délégué doc et bénévole PoS, toujours prêt à filer un coup de main, c'est toujours un plaisir de travailler avec toi ! **Nico G.**, partenaire Pint of Science « PoS », je ne te remercierais jamais assez d'avoir lancé l'idée d'importer ce festival qui a sans nul doute provoqué un tournant dans ma vie professionnelle. **Vincent B.** qui mérite une médaille pour avoir volé au secours de la noob en stats que je suis ! **Alice & Louise** merci à toutes les deux pour les bons moments partagés !

Et dans un labo, il y a un grand nombre de personnes qui gravitent autour des doctorants, Post-docs, stagiaires, DESU, MCF, techniciens, Pr., assistants ingénieurs, ingénieurs, CR, chargés d'enseignements etc. avec qui j'ai eu la chance de travailler/échanger, merci :

Phlaïaque, ma **Ju'**, un PETIT bout de femme que j'adore (même le matin), ça m'a fait du bien de voir arriver quelqu'un qui avait aussi envie de s'impliquer dans la vie du labo, de l'animer et de créer une ambiance conviviale. Pour nos soirées à faire des livres de thèse / de départ à la retraite (avec des ciseaux de gaucher), nos sessions potins, pour la playlist sympa & les heures à se raconter nos galères et nos fous rires, MERCI pour tout meuf <3. **Camillou R.**, pour les reines du shopping version « trouvons une robe pour un mariage à Ju », nos restos - *d'étudiantes-* (j'ai ma carte les gars !) chez notre petit italien, les parties de jeux de société et les bons moments de rigolade ! **Marc R.**, stagiaire, DESU, et maintenant doctorant, avec le même grain de folie que moi, prêt à me suivre dans des challenges à la noix, qui a subi mes jeux de mots pourris, jeune padawan d'organisation de PoS devenu jedi au Havre, on se reverra dans la #scicom (Kiki veut revenir au Havre). **Quentin B.**, mon petit rouquin que j'ai appris à connaître principalement grâce aux escapades hors labo à Budapest, dans les Vosges et jusqu'au Portugal. Abonnée à la Gazette je maintiens mon abonnement post-thèse ! (Je te répète que c'est une poire de Prélèvement !). **Eva D.**, pour tous les bons moments. **Philippe R.**, il y a les gens avec qui on travaille et ceux avec qui on aime travailler. Tu fais sans nul doute partie de la deuxième catégorie ! J'ai découvert quelqu'un de passionné et de passionnant, un bricoleur avec la tête dans les étoiles. Merci pour tout ! Merci à **Davide V.** pour la co-organisation de l'Anim.Sci du labo, c'est un véritable plaisir de travailler & de discuter avec toi. Merci pour ton soutien, tes conseils, pour tous les articles que tu as partagé avec moi ainsi que pour l'ouverture d'esprit dont tu fais preuve, Grazie mille ! **Armand M.** qui a pris le temps et qui a réussi à me guérir en partie de mon aversion pour les statistiques. Je me suis surprise plusieurs fois à sourire lors de nos entretiens car je comprenais des concepts, de base certes, mais qui me paraissaient à l'époque insurmontables. Armand, merci pour votre pédagogie et votre disponibilité. **Béné S.**, bien que sur tous les fronts, tu as toujours répondu présente lorsque j'avais besoin de toi. Un immense merci pour ton aide ! **Vincent F.** merci pour tes conseils avisés et nos discussions, je te souhaite le meilleur pour la suite et j'espère recroiser ton jumeau au détour d'un drive de Mc Do ! **Vincent A.**, pour tes « mails saisonniers » qui m'ont collé le sourire en période de rédaction. **Etienne M.**, pour ta disponibilité, ton aide et ta gentillesse. **Jean-François P.** pour m'avoir construit tous les dispositifs imaginés spécialement pour mes manips ! **Paule V.**, j'ai été ravie de partager

l'imprimante de mon bureau avec vous, ce qui nous aura permis d'avoir des échanges plus qu'intéressants autour de l'écotoxicologie ! **Laetitia M.**, merci d'avoir pris le relais de l'Anim.Sci. **Albin M.** (patate !) pour m'avoir montré comment venir à bout d'un rubik's cube. **Larissa**, merci de m'avoir fait pratiquer mon anglais, de nous avoir ramené des petites spécialités brésiliennes faites maison au bureau et de m'avoir invitée chez toi pour me présenter à ton adorable famille. Merci à **Solène** pour nos discussions et sa philosophie d'enseignement.

Mathieu H. (binôme stage M1) ; **Loïc** ; **Morgane K.** ; **Léa** ; **Antoine** ; **Philippe W.** ; **Danièle P.** ; **Clément B.** ; **Muriel B.** (Ma mumu) ; **Maximilien B.** ; **Allison H.** ; **Chantal F.** - **Cycy** (ma championne de pâtissière) – **Jo** (on se souviendra longtemps du souci auditif ayant donné lieu à un fou rire monumental sur la pisse de « noir »)

Marie L-J. (colloc' de bureau en été 2018) ; **Florence M-D.** (altruiste sans limite) et **Mic D.** (travailleur acharné aux qualités humaines admirables) ; **Pascal P.** (toujours prêt à répondre à mes questions & à m'ouvrir mon autoclave trop serré !! merci pour tes précieux conseils. Je pense n'avoir jamais vu un MCF autant à la paillasse) ; **Elise B.** (pour ta pédagogie avec les stats) ; **Sylvie C.** (merci pour l'opportunité de présenter le doctorat à des L3, M1 et M2) ; **Floriane L.** ; **Romain C.** ; **Oliv** ; **Kahina** ; **Ana** ; **Joey** ; **Jerem J.** ; **Vincent R.** ; **Delphine A.** ; **Carole L.** ; **Vincent D.** ; **Baba C.** ; **PUP** ; **François G.** ; **Sandrine D.** ; **Simon D.** ; **Jean-François F.** ; **Jean-François M.** ; **Fabien T.** ; **Martin L.** et j'en oublie sûrement, merci pour tout ce que nous avons pu partager !

Mes pensées vont aussi **aux membres de l'équipe EMMA** dont je faisais partie et aux collègues LIEC des autres sites avec qui j'ai eu la chance de travailler, d'échanger ou simplement de partager des moments de vie : **Kevin B** ; **Elise V** ; **Erwin H** ; **Axel L** ; **Clothilde J** ; **Romain P** ; **Celine C.** ; **Audrey B.** ; **Manuel P.** : merci !

A **mes supers stagiaires** que je n'oublierai jamais et que je remercie très sincèrement : **Floriane Kuntzler** pour un stage de L3, ma première stagiaire qui en a passé des heures sous microscope : merci ! **Mégane Noyer**, à mes côtés pour un stage de M2, ma jeune padawan, originaire d'une contrée où on mange des p'tits bouts de viande, des champis farcis, des ardoises violettes et un truc dont le nom ressemble fortement à un objet de rite SM. Merci pour ces 6 mois, je n'aurais loupé ta soutenance de master pour rien au monde... même pas pour un réveil loupé et un train raté :p. **Yoann Menard**, mon jeune padawan, merci pour ton

investissement et ta détermination ! J'ai toujours une bouteille de rouge qui attend sagement d'être partagée avec toi ! Je te souhaite le meilleur pour la suite.

*Un laboratoire ne tournerait pas sans **personnel administratif et technique/informatique** qui nous épaulent grandement dans nos démarches : **Maryline G.** qui s'est énormément investie dans la vie au labo & les différents événements ainsi que pour les anecdotes qu'elle a pu nous raconter, **Romuald** pour avoir pris son relais avec efficacité et bienveillance, **Catherine** pour mes nombreuses commandes et requêtes, **Christine A.** que j'aurais bien embêté avec ma convention Labo / Entreprise. Je terminerai ici avec une pensée à **Nathalie** partie trop tôt qui me réservait mes salles pour les réunions même de dernière minute. Nos supers informaticiens : **Sébastien F.** et **Yann W.** qui ont toujours répondu présents et avec le sourire pour la visio des animations scientifiques, pour nos ordis, et pour le cytomètre en flux qui nous en aura fait voir de toutes les couleurs. **Nathalie N.** pour ton sourire, pour avoir quotidiennement aéré et nettoyé avec un produit qui sent terriblement bon ma salle de manip. Pour ça mais également pour tout le reste, MERCI ma Nath.*

*Car le doctorat c'est bien plus qu'une thèse dans un laboratoire, merci à **toutes les personnes rencontrées dans mes activités annexes** :*

Aux personnes rencontrées grâce aux différentes actions du COST nano : lors de la formation cryo-TEM à Lecce 2016 et particulièrement **Allan P.** avec qui j'avais pas mal échangé et que j'avais eu la chance de recroiser. Aux personnes rencontrées lors de la formation MISTRAMO au CIEP à sèvres (**Coralie, Catherine, Alexis**). Aux personnes de l'ED RP2E (devenue SiRENa) notamment **Stéphane D.** et **Christine F.** que j'ai bien souvent sollicitées et qui ont toujours été présentes et disponibles ! A mes collègues délégués docs : **Marie R., Emérence, Julien, Victoire, Marie V., Anne B., Mathilde, Mailie, Jeremie B, Marie D.** Mention à **Georges** du CS et à tous les doctorants des différents conseils avec qui j'ai eu la chance d'échanger, merci pour votre engagement ! **Pascale F-K**, merci pour les conseils avisés et nos discussions très intéressantes sur la médiation des sciences et les sciences participatives. Un immense merci aux personnes du **service CST de UL** avec qui j'ai eu l'honneur de collaborer : **Nicolas B., Etienne H., Catherine F.**, merci pour tout ! Et à bientôt pour finaliser un dernier petit projet pour la route :). A toutes les personnes que j'ai eu la chance de rencontrer en participant à l'organisation de Pint of Science en Lorraine et que je n'aurais pas déjà cités ailleurs : **Pauline S.**, coordinatrice à St. Dié, **Sandra K.**, merci à toutes les deux pour votre aide précieuse et à **Lee fou Messica** pour la collaboration avec l'espace

BMK. **Matthieu C.**, merci pour nos pauses « café » alors qu'aucun de nous deux n'en boit, nos échanges, je crois que je vais définitivement perdre mon statut de « doctorante préférée », mais pour la bonne cause cette fois-ci. Merci et à très vite *Mc* ! **Laura D.**, je n'oublie pas cette première proposition de collaboration pour TheConversation France, merci ! Merci également pour ton intervention PoS en 2018 et ton aide à la FDS ! Merci à **l'équipe AD'UL Team** : l'association des doctorants de l'UL, pour m'avoir accueillie en tant que « VP valorisation du doctorat », pour avoir aidé à porter le projet Pint of Science ces 3 dernières années et pour nos sorties escape game, VR et j'en passe. Merci pour tout les copains. **Cloé V.**, une belle rencontre et un beau projet en commun, merci ma directrice artistique ! (J'attends toujours les T-shirt de Tim made by Cloé -Evo Devo- ... ça y est tu l'as en tête ? C'est cadeau !). Les **collègues du label CPE/CDEFI** que j'ai été ravie de croiser sur les 2 ans de formations ponctuelles. Je pense notamment à **Lisa** et **Clem** avec qui je partage la même passion pour les sushis. Vous êtes typiquement le genre de personnes que je prends plaisir à côtoyer. Les personnes de **l'entreprise Crois/Sens** avec qui j'ai eu la chance de travailler & de collaborer : **Marc, Anne, Seb, Camille, Agathe, Benjamin, Jean-Yves, Sandrine, Elodie, Aurélie, Virginie et Estelle** merci pour votre accueil et pour tout ce que vous avez pu m'apporter ! **Vincent Q.** de la fondation NIT de l'UL pour le lien qu'il s'efforce de créer entre docteurs et entreprises, pour son enthousiasme et son soutien dans mon projet de valorisation du doctorat. Merci à **Natacha** et **Marie** de **l'Incubateur Lorrain** avec qui j'ai eu la chance d'échanger au cours de ma thèse pour évaluer le potentiel de valorisation de mes résultats de recherche ainsi qu'aux personnes de la SATT Grand Est pour leur temps. Un merci aux autres doctorants et conjoints de doctorants rencontrés via ma Vrinou et qui auront égayé quelques soirées de doctorat : **Binouche, Clapie, Benj, Anne, Ludo, Alexis**. Enfin, un grand merci à **l'ensemble des personnels, structures de l'UL** avec qui j'ai eu à interagir à un moment ou à un autre.

Chaque année de thèse aura été caractérisée par UNE rencontre d'un doc hors labo se soldant par une véritable amitié :

Eléa, tout a commencé en 2016 par un tweet : « obligée d'aller sur Strasbourg pour une soirée PoS, l'année prochaine je l'organise à Metz » ... Merci de m'avoir permis de me lancer dans cette aventure ! Une personne passionnée, une travailleuse acharnée avec le cœur sur la main, ne change jamais, « cœur sur toi ».

Maylis, une rencontre à Paris lors d'un séminaire en 2017, un débat participatif à Mirecourt, une aventure PoS sur Metz, des journées d'études sur Bordeaux, une escapade rando dans les alpes et tant de projets en commun. J'aime sincèrement discuter, rigoler & bien sûr travailler avec toi, espérons que nos projets communs se concrétisent !

Aimeric, ma belle rencontre de l'année 2018, un moi au masculin, une belle complicité, des délires, des activités pour nous changer du quotidien. Merci pour tout, vraiment !

Je finirai cette partie « doctorat » par un merci symbolique à **Alexandra Asanovna Elbakyan**, fondatrice du site [Sci-Hub](#), un grand pas vers la science ouverte et une grande aide durant ma thèse.

La dernière partie de ces remerciements revient tout naturellement à mes proches :

Julien, un petit mot car on a partagé 5 mois ensemble, merci. Et puisque je cite les personnes qui ont compté à un moment de ma vie durant mon doctorat, **Jo**, j'te pose là. **Maximilien**, on ne se voit que très occasionnellement mais j'apprécie toujours autant ta compagnie et ta personne ! Vivement qu'un nouveau lieu sympa ouvre ses portes entre Tours et La Rochelle. Mes amies de « Richemont » : **Hélène, Pauline, Caro, Alicia** que je suis ravie de revoir à chaque grand évènement ... heureusement que les mariages & bébés sont là pour nous réunir au moins une fois par an ! A mes amies que je ne vois pas très souvent mais qui comptent beaucoup : ma **Clairounette** & ma **Lupette**. A Eddy, mon **Neddynounet**, mon meilleur ami, mon partenaire de visionnage de films trop badass, super-héros et univers geek. Merci de m'avoir donné le super écran sur lequel j'ai rédigé ce manuscrit et offert les seaux à pop-corn collectors qui auront bien servi <3

A **mes amies d'enfance** qui ont toujours été présentes et aux côtés de qui je compte bien finir mes jours : **Gazou ; Pops ; Maria ; Lily ; Cha** : on sait mieux que n'importe qui que ni le temps, ni la distance ne peuvent mettre à mal notre amitié si chère à nos cœurs et indispensable à nos vies. Une pensée à vos hommes que j'apprécie tout autant, merci à eux de nous supporter malgré nos organisations foireuses & nos délires à la con. Love mon gang des inséparables.

Antoine, mon doudou, tu as fait irruption dans ma vie durant la période la plus compliquée et pourtant tout a toujours été si simple entre nous. Merci. Après ça je sais que je n'envisage plus ma vie sans toi à mes côtés. [*gruick gruick*] <3

A ma **Vrinouw** d'amour, mon binôme de toujours, mon ancienne colloc' avec qui je partage la même folie qui nous unit depuis le début. Quand je me rappelle notre rencontre en cours de Maths en 1^{ère} S, je ne peux m'empêcher d'avoir une petite pensée pour notre fameuse prof Mme B. et son « Vous ne ferez jamais rien de vos vies ». Tu es devenue comme une sœur, un membre de ma famille, j'espère que l'on ne cessera jamais de se tirer vers le haut. Je pourrais réécrire une thèse qui te serait dédiée, alors je vais plutôt clôturer ces quelques lignes par un « mot », notre « mot » : FOOOOORT !

Merci à toute ma famille et notamment à mon noyau familial : **mon papa, ma maman & mon p'tit frère**. Mes piliers, mon soutien à toute épreuve. Merci d'avoir placé les pierres qui m'ont permis de me hisser jusque-là. Sachez tous les trois que mon amour pour vous va bien au-delà de tout ce qui peut être quantifiable et que je ne vous échangerai pour rien au monde (même pas contre un énorme bac de glace à la cannelle). Je vous aime.

Une pensée à Véga, ma louloute, ma chienne partie en début de 3^{ème} année de thèse à qui je rêverais de faire un dernier câlinou.

Malgré la longueur de ces remerciements mérités, j'ai sûrement dû oublier du monde. Alors merci à tous ceux qui ont contribué de près ou de loin à ce travail de thèse, à mon doctorat et à ces belles années de vie.

« **cœuuur** »

Sommaire

INTRODUCTION	1
CHAPITRE I	7
Contexte scientifique	7
I.1 L'écotoxicologie : une discipline au service de l'évaluation des risques	9
I.1.1 Historique et présentation	9
I.1.2 Evaluation de la toxicité des contaminants	10
I.1.3 Bioaccumulation et transfert trophique des contaminants	13
I.1.4 Les approches multi-espèces : compromis entre réalisme environnemental et complexité expérimentale	16
I.1.5 L'écotoxicologie microbienne : une discipline en plein essor	23
I.2 Ecologie des écosystèmes dulçaquicoles microbiens de la colonne d'eau : importance de la boucle microbienne	29
I.3 Objectifs historiques et actuels de la thèse	34
I.4 Références	36
CHAPITRE II	49
Impacts des NP-ZNO contenues dans les filtres solaires sur un producteur primaire	49
II.1 Abstract	53
II.2 Introduction	54
II.3 Materials and Methods	55
II.4 Results and discussion	60
II.5 Conclusion	72
II.6 References	74
SII SUPPLEMENTARY INFORMATION	81
CHAPITRE III	85
Démarche scientifique de développement et mise en œuvre d'un réseau trophique microbien modèle	85
III.1 Introduction, cahier des charges et démarche générale	89
III.2 Matériel et méthodes de la conception et de l'optimisation du réseau	90
III.2.1 Conception du réseau	90
III.2.2 Optimisation du réseau	95
III.3 Résultats et discussion	106

III.4 Conclusion et mise en œuvre finale	118
III.5 Références	121
ANNEXE	125
CHAPITRE IV.....	127
Fonctionnement du réseau trophique microbien modèle.....	127
IV.1 Abstract	131
IV.2 Introduction.....	132
IV.3 Materials and Methods	133
IV.4 Results and discussion.....	138
IV.5 Conclusion	149
IV.6 References.....	150
SIV SUPPLEMENTARY INFORMATION	157
CHAPITRE V.....	159
Utilisation du réseau trophique microbien pour la réalisation de tests d'écotoxicité	159
V.1 Abstract	163
V.2 Introduction.....	164
V.3 Materials and methods	165
V.4 Results	168
V.5 Discussion	176
V.6 Conclusion	179
V.7 References.....	181
CONCLUSION & PERSPECTIVES.....	193
VI.1 Conclusion	195
VI.2 Perspectives.....	198
VI.3 Références.....	201

INTRODUCTION

Les eaux douces (lacs, rivières, eaux souterraines, de pluie, et des glaciers) représenteraient moins de 3% de l'eau disponible sur Terre (Carpenter et al. 1992). Malgré l'apparente faible représentativité de ces hydrosystèmes, ils renferment une part importante de la biodiversité. Ils abriteraient plus de 10 000 espèces de poissons, soit près de 40 % de la diversité connue pour cette super-classe, ainsi qu'un quart de la diversité des vertébrés (Dudgeon et al. 2006). De plus, les zones humides participent entre autres au piégeage des nutriments provenant des sols, et de manière générale, leur présence permettrait une plus grande diversité biologique (Hansson et al. 2005). De ce fait, la préservation de ces écosystèmes est primordiale.

L'énergie des écosystèmes dulçaquicoles provient principalement de la photosynthèse nécessitant de la lumière, du carbone inorganique (CO₂) et des substances inorganiques dissoutes. Cette énergie est intégrée dans les écosystèmes aquatiques grâce aux organismes autotrophes se positionnant à la base des chaînes alimentaires et assurant la production primaire, comme le plancton végétal, les algues benthiques et les macrophytes, puis est transférée au niveau trophique supérieur via les consommateurs primaires (brouteurs, filtreurs, détritivores). Ces derniers sont ensuite consommés par des consommateurs secondaires et au sommet de la chaîne trophique sont positionnés les top-prédateurs. Le compartiment bactérien intègre ces réseaux à deux niveaux en tant que producteur primaire (cyanobactéries) et en tant que décomposeurs, assurant une contribution indispensable aux principaux cycles biogéochimiques.

Les écosystèmes dulçaquicoles subissent actuellement une forte pression et sont soumis à diverses contaminations, naturelles ou anthropiques, susceptibles de perturber leur fonctionnement. Les contaminants peuvent être regroupés selon différentes classes : les contaminants biologiques (parasites, pathogènes, toxines excrétées par certains micro-organismes), chimiques (hydrocarbures, pesticides, métaux, médicaments et cosmétiques, et autres substances générées par l'homme) ainsi que des contaminations émergentes telles que celles dues aux rejets dans l'environnement de nanomatériaux (nanoparticules, nanoplastiques).

Afin de structurer la politique publique de l'eau en France, une loi sur l'eau et les milieux aquatiques (LEMA) a vu le jour en 2006 avec pour objectif de protéger cette ressource. Au niveau de l'Union européenne, la réglementation REACH (Registration, Evaluation, Authorisation and Restriction of Chemicals), qui comme son nom l'indique, a pour objectif d'enregistrer, d'évaluer, d'autoriser ou de restreindre l'utilisation de substances

synthétisées par l'Homme, a été définie en juin 2007. En effet, la déclaration de ces substances auprès de l'ECHA (Agence Européenne des Produits Chimiques) doit être effectuée si les quantités produites ou importées (depuis un pays situé à l'extérieur de l'UE) dépassent 1 tonne par an. Cette réglementation, en responsabilisant les entreprises, vise à réduire les risques associés à la production et à l'emploi de ces substances chimiques. A cette même époque, la commission européenne a également établi une législation qui implique le contrôle d'une large gamme de contaminants organiques et inorganiques dans les eaux de surface (European Commission, 2008).

Un certain nombre de tests de toxicité et d'écotoxicité ont donc été développés pour évaluer la dangerosité de ces composés. Ils permettent notamment de déterminer des concentrations seuils telle que la « Predicted No Effect Concentration » (PNEC) qui est une valeur définissant le seuil en dessous duquel une substance est considérée comme non toxique pour l'environnement. Elle est déterminée en utilisant des données de toxicité, le plus couramment basées sur la CL50 (Concentration Létale 50), concentration provoquant 50% de mortalité, acquises sur différents (micro)organismes (e.g. bactéries, algues, daphnies, poissons) et qui est requise par la Directive 67/548/EEC pour toute nouvelle substance.

L'évaluation des risques environnementaux (ERE) est indispensable pour préserver au mieux les milieux naturels ainsi qu'indirectement la santé humaine. A l'heure actuelle, cette ERE repose majoritairement sur des protocoles normalisés permettant de mesurer les effets directs d'un contaminant sur un organisme modèle. Les effets indirects liés à la complexité des milieux aquatiques naturels incluant – entre autre – les interactions entre les espèces, les effets sur la structure des communautés, sur la production et le recyclage des nutriments, la bioaccumulation des contaminants le long de la chaîne alimentaire ainsi que le comportement du polluant au sein d'un écosystème ne sont généralement pas considérés.

Des données se rapprochant de la réalité environnementale doivent donc être produites et utilisées pour permettre une évaluation du risque plus pertinente. Ainsi, des approches en systèmes plus complexes (e.g. mésocosmes, tests multi-espèces, environnements reconstitués) ont été développées. Toutefois, leurs dimensionnements et/ou leur complexité sont souvent limitants pour une exploitation statistique probante, ainsi que pour envisager leur utilisation en routine.

C'est dans ce contexte que s'inscrivent ces travaux de thèse dont l'objectif principal est de développer un réseau trophique microbien modèle de faible dimensionnement,

permettant d'évaluer la toxicité des contaminants sur plusieurs niveaux trophiques et d'accéder à des indicateurs fonctionnels pertinents dans un souci de réalisme environnemental supérieur à celui des tests mono-spécifiques précédemment développés. Ces travaux pourraient ainsi conduire à un outil d'évaluation plus réaliste du risque environnemental.

CHAPITRE I

Contexte scientifique

I Contexte scientifique

I.1 L'écotoxicologie : une discipline au service de l'évaluation des risques

I.1.1 Historique et présentation

L'écotoxicologie est une discipline qui a vu le jour à la suite de diverses catastrophes écologiques ayant mené à des problèmes de santé publique. C'est en 1969 que Jean-Michel Jouany, René Truhaut et leurs collègues adoptent le terme d'« écotoxicologie », discipline qu'ils définissent alors comme « une branche de la toxicologie qui s'intéresse à l'étude des effets toxiques causés par des polluants naturels ou synthétiques aux constituants des écosystèmes, que sont les animaux (humains compris), les espèces végétales et les microbes, dans un contexte intégré. » Les principaux acteurs ont rapidement pris conscience que l'écotoxicologie était une discipline à part entière et qu'il fallait repreciser sa définition initiale pour mieux la différencier de la toxicologie. En 1977, François Ramade définissait alors l'écotoxicologie comme étant « l'étude des modalités de contamination de l'environnement par les agents polluants naturels ou artificiels produits par l'activité humaine ainsi que de leurs mécanismes d'action et effets sur les êtres vivants qui peuplent la biosphère ». Ainsi, les expérimentations réalisées reposaient à cette époque majoritairement sur les principes de toxicologie classique, appliqués à l'environnement, mais négligeant bien souvent le contexte écologique.

Par ailleurs, l'augmentation des activités humaines conduit inévitablement à un accroissement des rejets de polluants dans les milieux naturels. Les différents compartiments de l'environnement (air, eau, sol) sont alors continuellement exposés à divers xénobiotiques. Comme présenté dans la **figure I.1**, le compartiment aquatique est quant à lui considéré comme le réceptacle ultime des contaminations environnementales provenant de sources multiples de contaminations. Celles-ci peuvent être ponctuelles comme par exemple le déversement des effluents de stations d'épuration, réceptacles des eaux résiduaires urbaines et industrielles, ou diffuses comme le ruissellement des eaux agricoles et urbaines, ainsi que les retombées atmosphériques (Bedding et al. 1982).

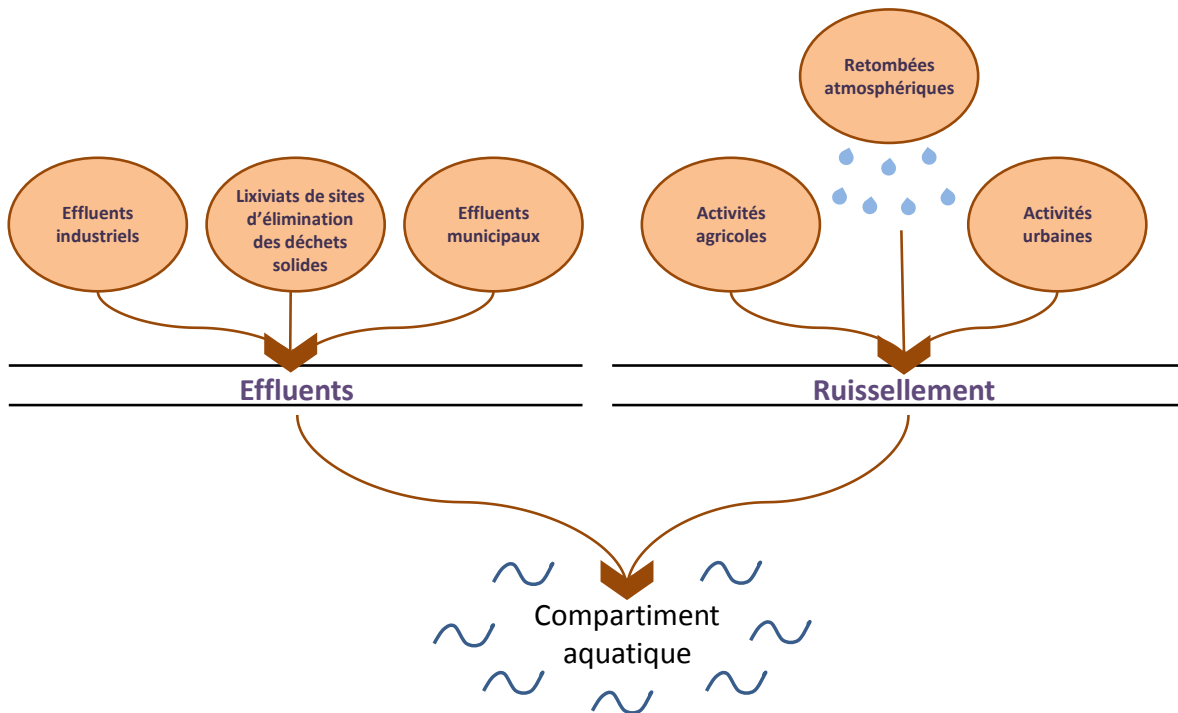


Figure I.1 : *Représentation schématique des diverses pollutions réceptionnées par le compartiment aquatique (d'après les informations de Bedding et al. 1982).*

Les principaux objectifs de l'évaluation des risques environnementaux sont relatifs à la protection des communautés écologiques du compartiment aquatique ainsi qu'à la santé humaine (Geissen et al. 2015).

I.1.2 Evaluation de la toxicité des contaminants

La durée et la dose d'exposition sont deux paramètres fondamentaux qui rentrent en compte dans la détermination de la toxicité d'un contaminant. En effet, si une exposition est de courte durée et à de fortes concentrations, la toxicité sera dite aiguë. En revanche, si la concentration en contaminant est plus faible mais que l'exposition s'étend sur du long terme, on parlera alors de toxicité chronique (**Figure I.2**). La biodisponibilité d'un contaminant est également un paramètre crucial faisant référence à la fraction du composé susceptible d'interagir avec les organismes et donc d'avoir un impact sur ces derniers (IRSTEA ISTE Editions, 2018). Suivant les conditions d'exposition, un contaminant est plus ou moins biodisponible pour les (micro)organismes et pourrait alors présenter une toxicité différente.

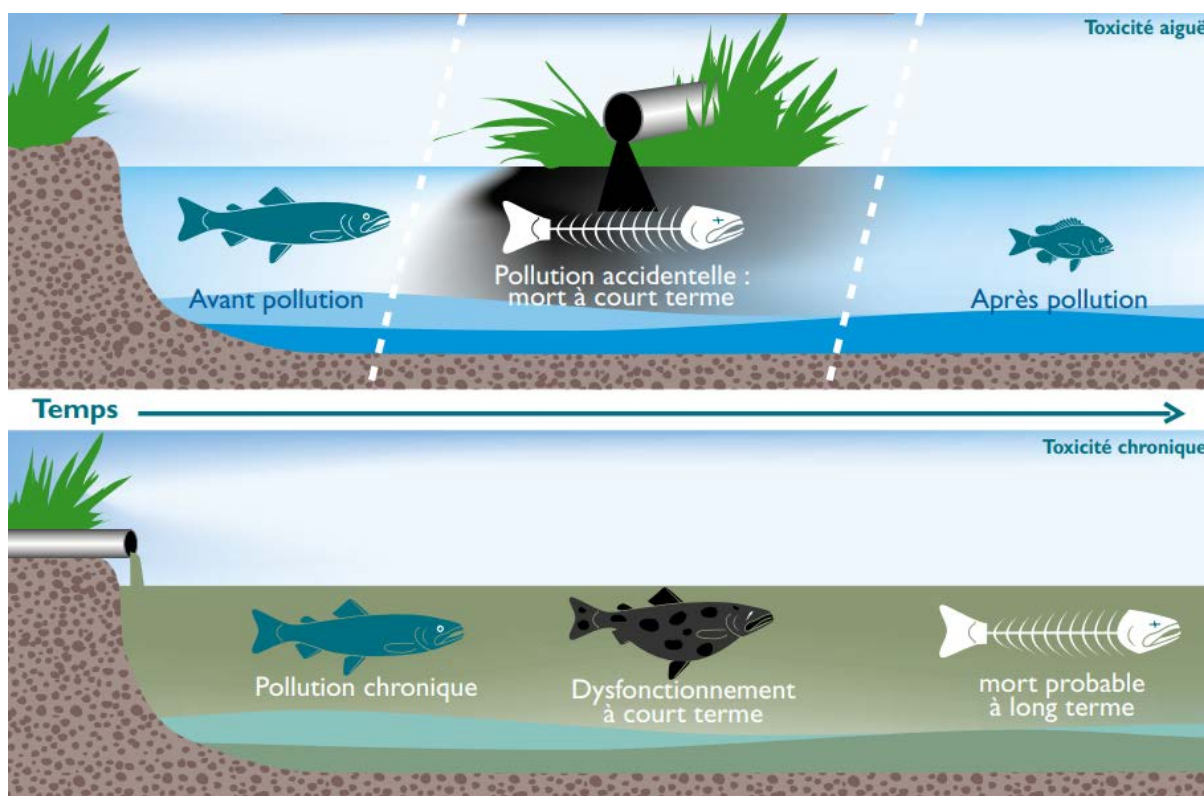


Figure I.2 : *Différence entre une toxicité aiguë et une toxicité chronique. Illustration tirée du guide technique n°7 de l'Agence de l'Eau Rhône-Méditerranée-Corse « Pollution toxique et écotoxicologie : notions de base » (2002).*

Au-delà du type de toxicité étudié (aiguë ou chronique), le choix des critères de toxicité analysés est également décisif. De nos jours, la majorité des tests écotoxicologiques utilisés en évaluation des risques appréhendent les effets directs des pollutions sur le taux de reproduction, la croissance, la survie sur des organismes de référence (Snape et al. 2004). Sont alors déterminées des valeurs de références telles que la « No Observed Effect Concentration » (NOEC), la concentration la plus forte à laquelle aucun effet n'est observé pour un paramètre donné, la « Low Observed Effect Concentration » (LOEC), la plus faible concentration à laquelle un effet a été observé ou encore la « Concentration effective 50% » (CE50), correspondant à la concentration induisant 50% d'effets sur le paramètre considéré. Ces valeurs de référence, obtenues à l'aide de test d'écotoxicité normalisés (**Tableau I.1**), sont ensuite utilisées pour établir des seuils de rejet des contaminants dans l'environnement.

Tableau I.1 : Liste des principaux tests d'écotoxicité aquatiques normalisés pour l'évaluation d'une toxicité aiguë ou chronique.

Type de toxicité	Norme	organisme test	Durée du test	valeur de référence	paramètre considéré
aiguë	ISO 6341:2012	<i>Daphnia magna</i>	24 h ou 48 h	CE ₅₀	mobilité des daphnies
	ISO 11348:2009	<i>Vibrio fischeri</i>	5, 15, 30 min	CE ₅₀	luminescence
	ISO 7346-2:1996	<i>Brachydanio rerio</i>		CL ₅₀	mortalité
chronique	ISO 10706:2000	<i>Daphnia magna</i>	21 jours	CE _x NOEC LOEC	reproduction
	ISO 8692:2012	<i>Pseudokirchneriella subcapitata</i>	72 h	CE _x NOEC LOEC	inhibition de la croissance
	ISO 19827:2016	<i>Brachionus calyciflorus</i>	48h	CE _x NOEC LOEC	inhibition de la croissance

Toutefois, la question de l'existence d'une concentration seuil dans les systèmes naturels a été soulevée dès les années 1992 (Cairns 1992). Ce dernier s'inquiétait de la réelle pertinence de définir des concentrations seuils sur des organismes sortis de leur contexte écologique. En effet, les données de toxicité acquises à l'aide de tests monospécifiques ne peuvent être extrapolées au niveau des communautés et de l'écosystème (Preston 2002, Kimball et Levin, 1985). Les organismes d'un même écosystème étant interconnectés (Namba 2015), les effets relevés sur une espèce aquatique isolée ne reflètent pas l'impact potentiel d'un contaminant dans un contexte intégré (Landi et al. 2018, Preston 2002). Les potentiels effets indirects liés à l'introduction d'un contaminant/xénobiotique dans un système prédateurs, consommateurs, ressources selon plusieurs cas de figure sont illustrés dans la **figure I.3**.

Il a par exemple été mis en évidence que lorsque la population de brouteurs diminue suite à une contamination, celle des producteurs primaires va à l'inverse avoir tendance à augmenter (Fleeger et al. 2003). Ainsi, en affectant directement une population d'un réseau, une pollution donnée pourrait en réalité impacter indirectement la stabilité générale de tout un écosystème. Les tests monospécifiques utilisés dans l'évaluation des risques ne tiennent certes pas compte de ces interactions, mais ils permettent néanmoins de produire des données de toxicité importantes. En l'absence d'alternative immédiate, beaucoup reconnaissent l'intérêt de ces valeurs de référence dans la prise de décision (Preston 2002, Cairns 1992). Cependant, d'autres propriétés, telles que la capacité à se bio-accumuler le long des chaînes alimentaires et le transfert trophique des contaminants, sont aussi déterminantes pour en appréhender l'impact environnemental.

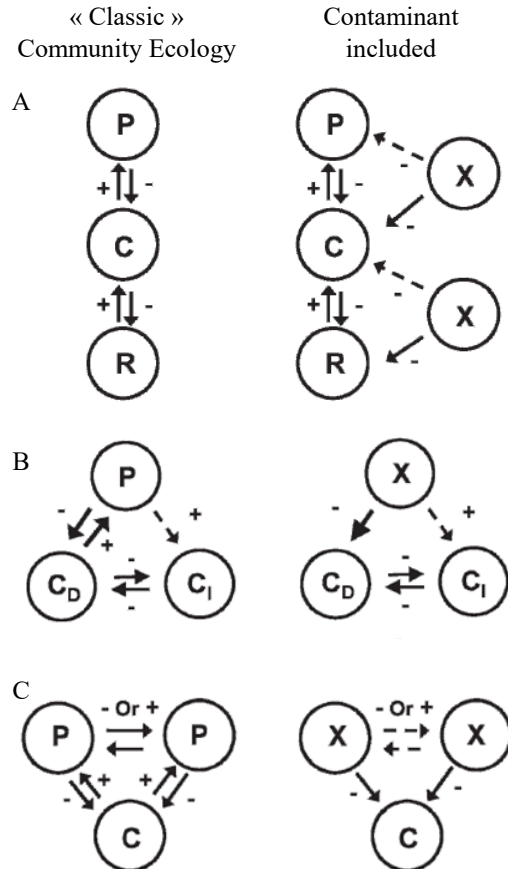


Figure I.3 : *Modules d'interaction entre espèces décrivant les supposés effets indirects des xénobiotiques par rapport à un scénario classique d'écologie des communautés. Dans ces modules d'interaction, les interactions modulées par la densité peuvent être remplacées par les interactions modulées par les traits de manière à obtenir l'analogie des effets indirects liés aux traits : interactions tri-trophique où les contaminants peuvent avoir des effets directs et indirects à trois niveaux trophiques différents avec des effets dont les directions peuvent s'alterner avec les niveaux trophiques inhérents (A). Prédation dominante : impacts des contaminants sur les espèces concurrentes dominantes (C_D) permettent aux espèces moins compétitives (C_I) de persister, ce qui peut mener à une augmentation de la biodiversité (B). Prédateurs multiples : les contaminants peuvent interagir de manière additive, synergique ou antagoniste entre eux, tout comme dans le cas de la prédation intragilde (C). Prédateurs, consommateurs, ressources et xénobiotiques sont représentés par les lettres P, C, R, et X, respectivement. Les lignes en pointillés représentent les effets indirects et les lignes continues les effets directs. Les effets positifs ainsi que les effets négatifs sont représentés par + et -, respectivement. (tiré de Clements et Rohr 2009).*

I.1.3 Bioaccumulation et transfert trophique des contaminants

En complément des études relatives à la toxicité des contaminants, de plus en plus d'auteurs s'intéressent à l'évaluation de l'accumulation d'un contaminant dans les organismes, ainsi qu'à sa capacité à se transférer d'un maillon trophique à un autre le long de

la chaîne alimentaire (**Figure I.4, A**). En effet, parmi les productions scientifiques de ces 20 dernières années, 40% des études répertoriées avec les mots-clés « transfert trophic contaminants » et 42% avec « bioaccumulation contaminants » ont été produites ces 5 dernières années (**Figure I.4, B**).

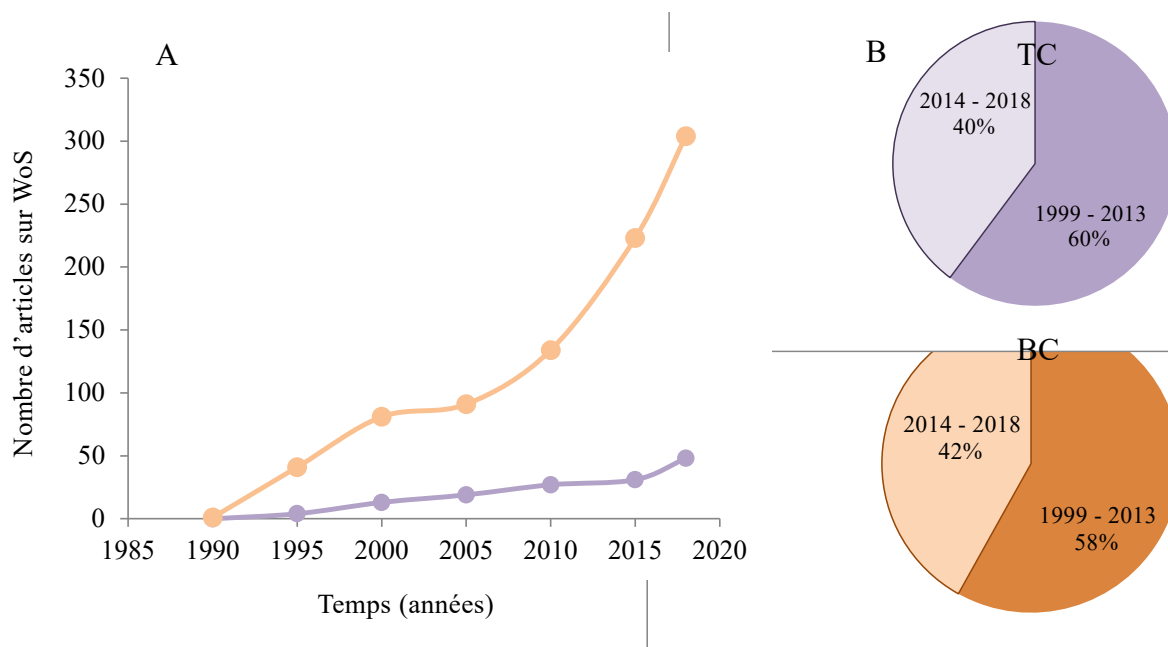


Figure I.4 : *Nombre de résultats (publications) par année (A) affichés par le moteur de recherche Web of Science (WoS), suite à une recherche avec les mots-clés « transfert trophic contaminants » (TC : violet) et « bioaccumulation contaminants » (BC : orange). Répartition du % d'articles référencés sur WoS selon différentes plages de temps (B) pour les mots-clés TC et BC.*

Alors que la bioaccumulation est définie par l'accumulation d'un contaminant dans les organismes en considérant toutes les voies d'exposition, qu'elles soient directes via le milieu ou liées à l'ingestion de nourriture contaminée, la bioconcentration fait référence à l'accumulation d'un contaminant dans un organisme par absorption directe via le milieu environnant (l'exposition via la nourriture n'est ici pas prise en compte).

Le processus par lequel la concentration d'un contaminant devient plus importante lorsque l'on passe à un niveau trophique supérieur est appelé bioamplification ou biomagnification (Bour et al. 2015, Hou et al. 2013).

Les premières études de bioaccumulation ont fait leur apparition dans les années 1970 avec notamment le cas de l'accumulation du méthylmercure (MeHg) dans les poissons (Wobeser et al. 1970). En effet, le mercure inorganique, une fois rejeté dans l'environnement aquatique, est transformé en méthylmercure (Fischer et al. 1995, Jensen et Jernelöv 1969). Sous cette forme, il affiche une biodisponibilité accrue et donc une capacité à s'accumuler à

travers les chaînes trophiques (Morel et al. 1998). La **figure I.5** montre l'augmentation de la concentration en MeHg d'un niveau trophique à un autre et met ainsi en évidence le potentiel de biomagnification de ce contaminant.

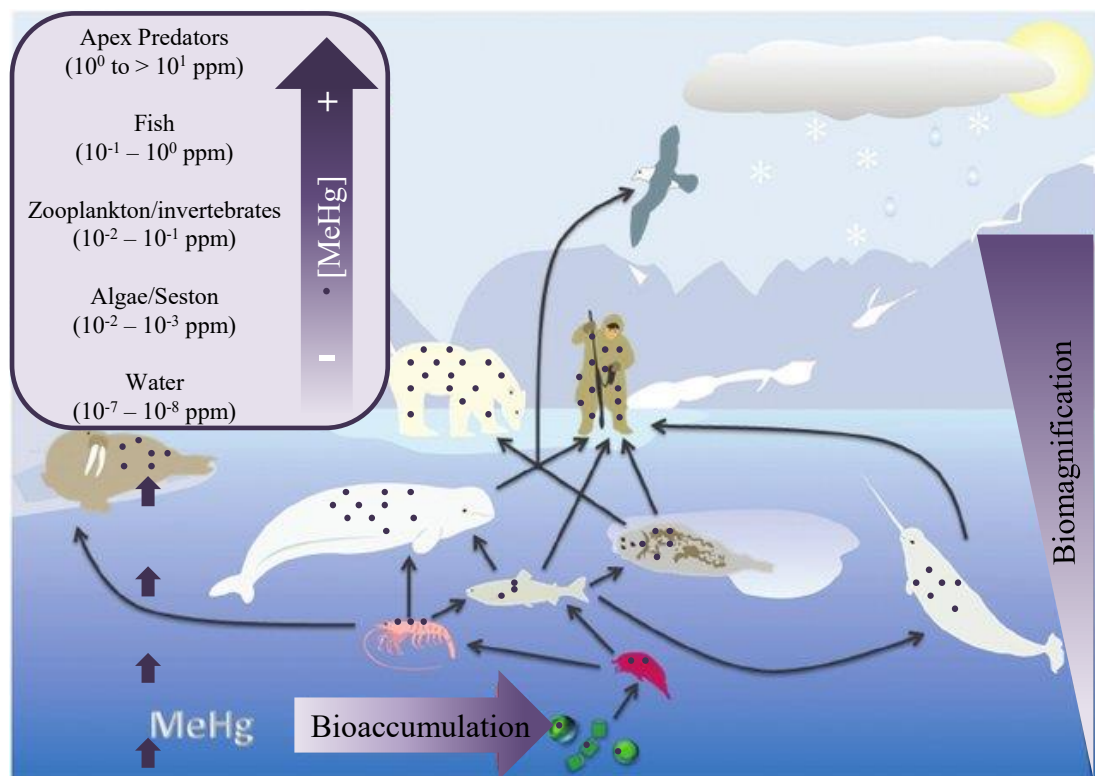


Figure I.5 : *Bioaccumulation et biomagnification du méthylmercure (MeHg) dans un réseau trophique typique des milieux marins en Arctique. L'encadré en haut à gauche présente les gammes de concentration en méthylmercure dans le compartiment abiotique aquatique ainsi que dans les différents groupes d'organismes, du niveau d'organisation le plus bas aux top prédateurs. Les points violets représentent schématiquement l'augmentation de la concentration en MeHg dans le réseau trophique considéré. (Schéma modifié de Lehnherr 2014)*

Les concentrations retrouvées dans les top-prédateurs peuvent être jusqu'à 10 000 fois plus importantes que celles mesurées à la base de la chaîne alimentaire dans les microorganismes. La bioaccumulation du méthylmercure, a également été largement documentée et ces études auront permis de se rendre compte de l'importance de la voie trophique comme source de contamination (Mason et al. 2000, Redmayne et al. 2000, Watras et al. 1998, Hill et al. 1996, Mason et al. 1995, Ponce et Bloom 1991, Ribeyre et al. 1980). Ainsi, l'ensemble des voies de contamination possibles devrait être considéré pour l'évaluation des risques environnementaux.

De par les différentes interactions abiotiques et biotiques, les contaminants peuvent avoir des effets directs ou indirects sur les écosystèmes. De nouvelles approches ont été développées ces dernières années pour mieux évaluer le risque environnemental. Parmi elles, des approches multi-espèces qui permettent d'étudier les effets des contaminants en tenant compte de la complexité écologique d'un écosystème.

I.1.4 Les approches multi-espèces : compromis entre réalisme environnemental et complexité expérimentale

Les stratégies d'évaluation de l'impact d'un contaminant sur les écosystèmes sont nombreuses et les protocoles expérimentaux se doivent d'être adaptés aux paramètres à mesurer. Comme présenté dans la **figure I.6**, il s'agit bien souvent de réaliser un compromis entre simplicité-reproductibilité d'un côté et complexité-représentativité de l'autre. Les tests monospécifiques s'intéressent à l'écotoxicité de contaminants donnés. Ils présentent les avantages d'être rapides, simples, reproductibles et économiques mais en revanche, ont une faible pertinence écologique ne permettant pas d'évaluer l'impact des contaminants sur les relations trophiques, ni sur le fonctionnement des écosystèmes. A l'opposé, les mesures *in-situ* permettent de décrire l'état d'un écosystème et d'appréhender leur perturbation. Néanmoins, ces mesures ne semblent pas adaptées pour identifier les causes de la perturbation (Geffard et al. 2010). En effet, sans contrôle ou maîtrise des conditions d'exposition les interprétations de résultats peuvent être délicates.

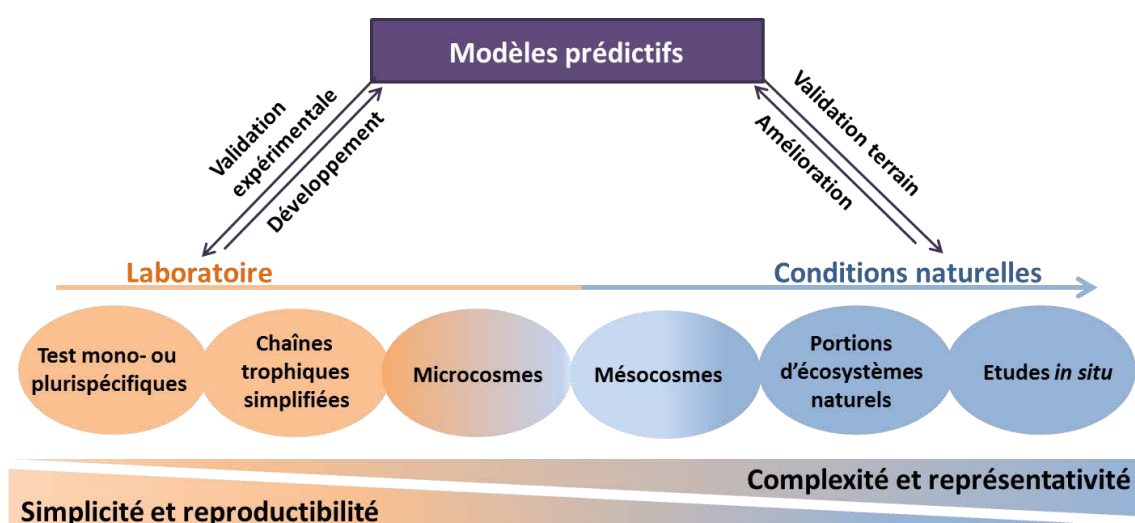


Figure I.6 : Schéma des différents outils existants pour évaluer l'impact de contaminants sur l'environnement (modifié d'après Caquet 2012)

Comme présenté dans le paragraphe I.2, l'approche standard en évaluation du risque environnemental consiste à employer des tests monospécifiques pour produire des valeurs de référence. Mais bien que ces tests apportent des premières informations de toxicité très intéressantes, il est nécessaire qu'elles soient plus systématiquement associées à des tests à la complexité écologique renforcée (Relyea et Hoverman 2006). Une des approches prometteuse semble être l'utilisation des connaissances acquises en écologie des communautés (diversité, abondance des espèces, force des interactions, liens trophiques, activités etc.) pour prédire les effets des contaminants sur l'environnement et apporter un peu plus d'« éco-» à l'écotoxicologie (Rohr et al. 2006). En effet, la plupart des modèles théoriques du fondement de l'écologie ont été développés suite à l'étude des communautés (Clements et Rohr 2009). Ainsi, bon nombre de ces modèles théoriques pourraient avoir des applications potentielles en écotoxicologie (**Tableau I.2**).

Tableau I.2 : *Avancées théoriques majeures en écologie des communautés et leur applications potentielles en écotoxicologie (d'après Clements et Rohr 2009). ERA = Environmental Risk Assessment.*

Community paradigm	Ecotoxicological applications
Food-web theory	Contaminant transport models
Trophic cascade hypothesis	Biomagnification
Ecological gradients	Biomonitoring
Information theory	Application of diversity indices
Habitat template model	Species traits
Theory of island biogeography	Community resilience
Ecological succession	Restoration ecology
Competitive exclusion principle	Indirect effects of contaminants
Predator-prey theory	Pollution-induced community tolerance (PICT)
Disturbance theory	Community conditioning hypothesis
Hierarchy theory	Endpoint selection in ecological risk assessment
Intermediate disturbance hypothesis	Subsidy-stress gradients
Environmental stress gradients	Hormesis in toxicology
ecological thresholds	Contaminant-induced shifts in stable states
Species richness and ecosystem function	Measurement and assessment endpoints in ERA
	Valuation of ecosystem services

Ces connaissances permettent de complexifier les approches en intégrant des communautés et en appréhendant les divers effets des contaminants sur les écosystèmes. Parmi ces approches, la méthode PICT (Pollution-induced community tolerance) et les approches multi-espèces en micro- et mésocosmes.

Développée dans les années 1988, la méthode PICT permet de caractériser l'état d'un écosystème aquatique soumis à une pollution (Blanck et Wängberg 1988). En effet, la méthode PICT considère des communautés naturelles et repose sur le principe que les espèces les plus sensibles d'une communauté sont les premières à disparaître suite à une contamination et que seules les espèces les plus résistantes vont subsister (principe en **figure I.7**). Ainsi, la tolérance générale de la communauté sera augmentée après une exposition à une pollution. Le niveau de tolérance d'une communauté face à une pollution témoignerait alors du niveau de contamination de son environnement (Bérard et al . 2002).

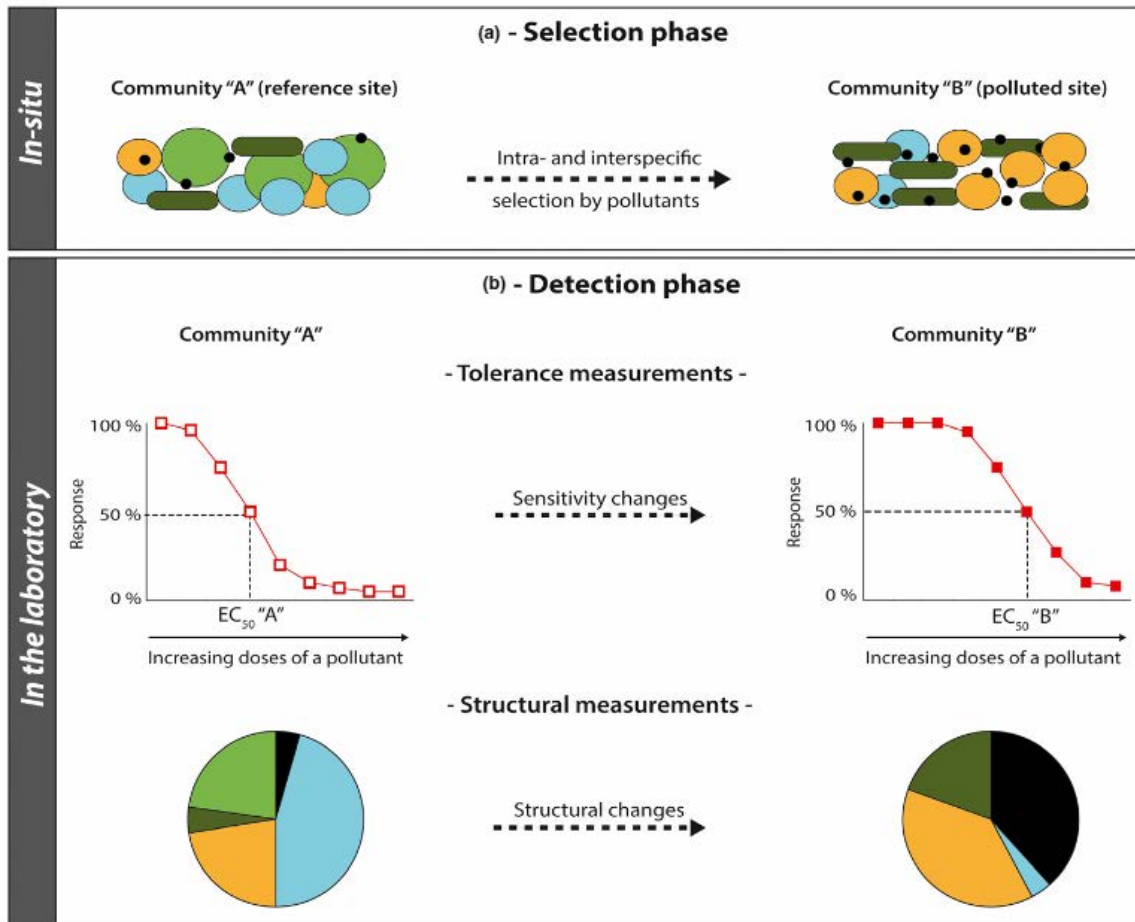


Figure I.7 : Les deux phases de l'approche PICT : la sélection (a) et la détection (b). Durant la phase de sélection, des sélections inter- et intraspécifiques ont lieu suite à l'exposition à des polluants conduisant à la restructuration de la communauté par extinction des espèces les plus sensibles et par prédominance des espèces tolérantes lorsque l'exposition atteint des niveaux critiques durant une période suffisante. Dans la phase de détection, la tolérance des communautés est quantifiée au laboratoire. Les réponses des paramètres fonctionnels dans les bioessais à court terme en présence de concentrations croissantes du polluant d'intérêt sont mesurées, permettant d'établir les courbes concentration-réponses pour la communauté de référence et la communauté provenant du site pollué. La tolérance est ensuite exprimée sous la forme de concentration efficace (EC_x). La différence entre les valeurs d' EC_x obtenues pour les deux types de communauté permet la quantification de la « PICT ». En parallèle des mesures de tolérance, la composition des deux communautés est étudiée et comparée pour confirmer l'hypothèse de la sélection intra- et interspécifique (tirée de Tlili et al. 2016).

Les approches en micro- et mésocosmes se positionnent à l'interface entre les tests monospécifiques et les mesures *in-situ* (**Figure I.6**). A ce titre, elles représentent un bon compromis entre réalisme environnemental et complexité expérimentale. Il est d'ailleurs possible d'observer ces dernières années, un intérêt croissant de la communauté scientifique pour les études concernant les micro- et mésocosmes d'eau douce, comme le montre la **figure I.8, A**. Ainsi, parmi les productions scientifiques de ces 20 dernières années, environ 2/3 de celles retrouvées avec les mots-clés « microcosm* freshwater » et 3/4 de celles retrouvées avec « mésocosm* freshwater » ont été produites entre 2009 et 2018 inclus (**Figure I.8, B**). Ces systèmes permettent d'avoir accès à des paramètres non accessibles à l'aide de tests monospécifiques (effets sur les communautés, transfert trophique des contaminants, interactions abiotiques, devenir des contaminants au sein de différents compartiments). Des exemples de microcosmes et mésocosmes sont présentés dans les **tableaux I.3** et **I.4** respectivement.

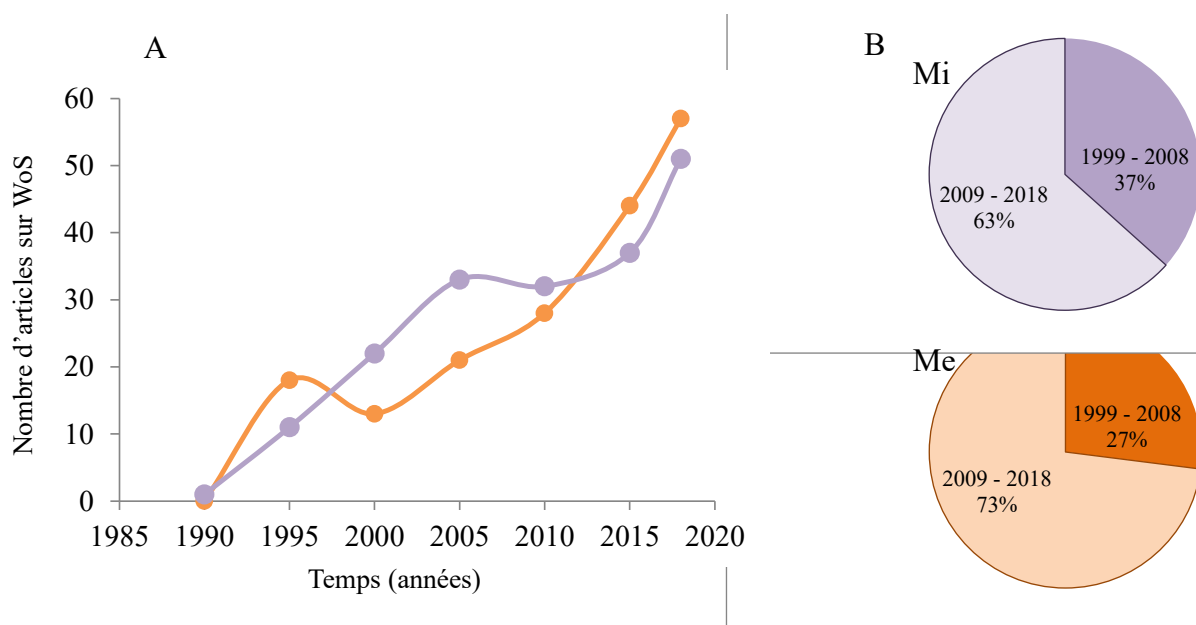


Figure I.8 : *Nombre de résultats (publications) par année (A) affichés par le moteur de recherche Web of Science (WoS) par année, suite à une recherche avec les mots-clés « microcosm* freshwater » (Mi : violet) et « mesocosm* freshwater » (Me : orange). Répartition du % d'articles référencés sur WoS selon différentes plages de temps (B) pour les mots-clés Mi et Me.*

Tableau I.3 : *Exemples de dispositifs d'études en microcosmes d'eaux douces. Le terme « microcosme » correspond à la dénomination utilisée par les auteurs.*

Spatial scale		Temporal scale		Organizational scale			Medium	Replication per treatment	Ref.
Container	Volume (liters)	Before exp. (days)	Exp. (days)	FC	MC	OC			
15 L glass tanks 45*45*45 cm	10	1	180		X		Lake water	3	Kumar et al. 2017
1 L glass graduated cylinders	0.5		28	X			sterilized synthetic medium	6	Duguma et al. 2017
6 L cylindrical containers (18 cm inner diameter)	3.5	21	4		X		Lake water	3	Miao et al. 2017
	0.2		28		X		mineral base medium	3	Fazi et al. 2016
175 mL glass vials (bottom area 28 cm ²)	0.14	8	16		X		Lake water	3	Widenfalk et al. 2004
5.7 L glass dual-walls reactor	2	9	30		X		River water	6	Montuelle et al. 1997
PVC tank (D: 172 cm; h: 78 cm)	400	14	28		X	X	Tap water	4	Sumon et al. 2018
glass aquarium (110*110*70 cm)	600		120	X				4	Traas et al., 1998
	600		77	X					De Laender et al., 2011

* FC = Food Chain ; MC = Microbial Communities ; OC = Other communities ; exp. = experimentation

Tableau I.4 : *Exemples de dispositifs d'études en mésocosmes d'eaux douces. Le terme « mésocosme » correspond à la dénomination utilisée par les auteurs.*

Spatial scale		Temporal scale		Organizational scale			Medium	Replication per treatment	NSA	Ref.
container	Volume (liters)	Before exp. (days)	Exp. (days)	FC	MC	OC				
artificial stream mesocosms (0.5*0.6 *2.2 m)	500	14	14		X		River water	3		Grun et al. 2018
rectangular boxes (1.2 *0.81*3.7 m)	400	240	300		X		Well water			Moore et al. 2016
glass tanks (75*20*60 cm)	56	14	28	X	X		Volvic water	3		Bour et al. 2015
pondmesocosms 1.5 m diameter*1 m depth	1050		360			X	Natural water	3	12	Van derLinden et al. 2019
40*0.5*0.5m	> 5000	60	21		X	X	River water	2	16	Cailleaud et al. 2019
rectangular fibreglass tank (4.5 m long by 1 m wide)	1267		93			X	Ponds water		20	Finnegan et al. 2018
channel (20 m long and 1 m in width)	10 000	210	540		X	X	Tap water		12	Joachim et al. 2017
1.1 m lengths*0.733 m diameter	440	10	390		X		Pond water	8		Riera and Cohen, 2016
cylindrical (1.2 m diameter*1.2m high)	1100		78	X			Lake water (sterilized)	3		Jovanovic et al., 2016
flow-through stream (40 *0.5*0.5 m, 10 m ³)	> 5000	21	90			X	River water	2	16	Bayona et al., 2015
550-liter resin tanks	450	13	37	X			Bedrock well water	2	12	Pickhardt et al., 2005

* FC = Food Chain ; MC = Microbial Communities ; OC = Other communities ; exp. = experimentation ; NS = Number of Systems Available

Pour les études en microcosmes, les volumes d'échantillons peuvent aller de la centaine de millilitres à quelques centaines de litres. Les temps d'exposition vont de 4 jours à 180 jours avec des périodes d'acclimatation, ou de mise en place pré-exposition qui vont de 1 jour à 21 jours. Les répétitions par traitement sont au maximum de 6. Les eaux utilisées proviennent, pour les $\frac{3}{4}$ des études considérées, du milieu naturel (lac, rivière). Les milieux de synthèse ne semblent pas être privilégiés. De plus, il y a autant de contenants différents que d'expérimentations. Dans les études en microcosmes, certaines considèrent les communautés (microbiennes, macro-invertébrés, zooplancton) et d'autres les chaînes trophiques.

Les études en mésocosmes, dont la dénomination sous ce terme a été déterminée par les auteurs, utilisent des systèmes de tailles plus importantes, avec des contenants allant de la simple cuve à des systèmes expérimentaux pouvant s'apparenter à des rivières artificielles. Les volumes d'échantillon varient de 56 L à 10 000 L et sont en moyenne plus importants que ceux retrouvés dans les études en microcosmes. Les temps d'exposition sont également en moyenne plus longs, allant de 14 jours à 540 jours, avec des périodes de mise en place et/ou de stabilisation de 14 jours à 240 jours. La phase de pré-expérimentation est donc plus fastidieuse dans le cas d'études en mésocosmes par rapport à celles réalisées en microcosmes. Tout comme pour les études en microcosmes, les études en mésocosmes semblent s'intéresser aux communautés et/ou aux relations trophiques, mais une seule étude (Bour et al. 2015) sur celles répertoriées dans le **tabelaue I.4** traite de ces deux aspects à la fois. Les milieux proviennent de diverses sources naturelles et aucun milieu de synthèse n'est utilisé. En moyenne on compte 2 à 3 répétitions par traitement mais une étude en présente tout de même 8 (Riera et Cohen 2016).

En somme, que cela concerne les études en microcosmes ou en mésocosmes, les volumes d'exposition restent en moyenne assez importants et les conditionnements sont parfois complexes, souvent spécifiques, possiblement onéreux et parfois peu de systèmes sont disponibles pour multiplier les variables. Ces points limitent fortement le nombre de variables testées et le nombre de réplicats possibles. De plus, bien que les études d'écotoxicité sur les communautés microbiennes aquatiques soient relativement nombreuses, celles qui permettent d'appréhender à la fois l'impact de contaminants sur des communautés microbiennes et d'intégrer les relations trophiques, la biomagnification et les effets directs et indirects des contaminants, sont rares. Or, les microorganismes positionnés à la base des chaînes alimentaires, et acteurs des cycles biogéochimiques, constituent un compartiment essentiel à considérer pour documenter l'impact environnemental des contaminants.

I.1.5 L'écotoxicologie microbienne : une discipline en plein essor

C'est à la communauté scientifique française que nous devons la structuration d'un réseau d'écotoxicologie microbienne. Cette récente discipline est une branche de l'écotoxicologie qui s'intéresse aux conséquences écologiques de diverses pollutions à l'égard des microorganismes (bactéries, microalgues, levures, champignons, protozoaires, protistes) et de leurs fonctions dans l'environnement. Elle vise aussi à étudier le rôle des microorganismes dans la dynamique des polluants (Ghiglione et al. 2016). L'écotoxicologie microbienne fait donc appel à la complémentarité intrinsèque des disciplines telles que l'écologie microbienne, de la toxicologie microbienne mais aussi de la physico-chimie de l'environnement (**Figure I.9**).

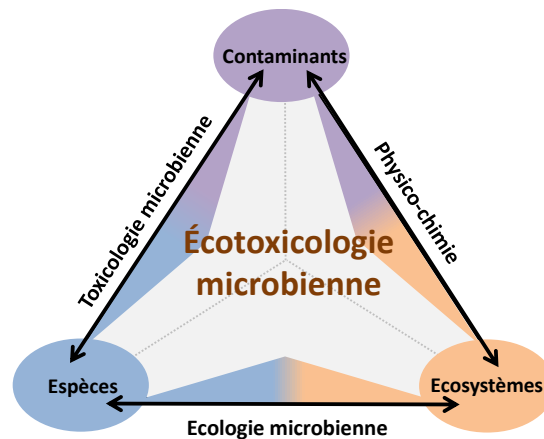


Figure I.9 : Représentation schématique de la pluridisciplinarité de l'écotoxicologie microbienne (Modifié de Ghiglione et al. 2016)

Dans une des premières publications entièrement dédiée à l'écotoxicologie microbienne, Ghiglione et al. (2014) s'étonnaient de ne voir aucun journal ni aucun congrès dédiés à cette discipline contrairement à l'écologie microbienne et à la toxicologie microbienne. En France, un Réseau Thématique Pluridisciplinaire (RTP) d'écotoxicologie microbienne a ainsi été fondé en avril 2015 pour 3 ans, initiative notamment soutenue par les instituts INEE et INSU du CNRS. Le principal objectif du RTP EcotoxicoMic est de fédérer la communauté tout en permettant d'améliorer la visibilité de cette discipline (http://www.ecotoxicomic.fr/fr_FR/rtp-ecotoxicomic/).

Depuis, Le réseau EcotoxicoMic n'est plus labellisé RTP mais conserve un cadre officiel en étant porté par la Fondation Rovaltain, partenaire historique du réseau. De plus l'initiative s'internationalise avec la création d'un site Web international, de l'organisation de congrès

internationaux dédiés à l'écotoxicologie microbienne et la sortie du livre « Microbial Ecotoxicology » (Cravo-Laureau et al. 2017). Appréhender l'impact des contaminants au niveau des écosystèmes microbiens reste un des enjeux majeurs de notre temps. Dans ce sens, de nouveaux outils se développent afin d'établir un lien entre les effets écologiques observés et les mécanismes d'action des contaminants.

I.1.6 L'avènement des approches -omiques

Les techniques -omiques sont devenues plus efficaces et moins onéreuses (Van Aggelen et al. 2010), ce qui a permis leur expansion à l'écotoxicologie. Les techniques -omiques les plus utilisées sont la transcriptomique, la protéomique et la métabolomique. Alors que la première fait référence à l'étude des transcrits d'un organisme, la seconde permet d'en étudier les protéines et la dernière ses métabolites primaires et secondaires (Garcia-Reyero et Perkins 2011). Ces techniques permettent alors la caractérisation et la quantification de toutes les molécules biologiques associées à la structure, la fonction et la dynamique du/des organismes (Zhang et al. 2018). Elles permettent d'accéder chacune à une seule des étapes qui mènent de l'ADN aux métabolites (**Figure I.10**).

La technologie d'hybridation à très petite échelle sous forme de puce à ADN ou microarray a permis de faire progresser les recherches en génomique et en transcriptomique. Cette technologie est d'ailleurs la plus couramment utilisée pour identifier les acides nucléiques alors que la spectrométrie de masse semble être privilégiée en protéomique et en métabolomique (Horgan et Kenny 2011). Un de leurs atouts majeurs est d'autoriser l'acquisition simultanée de milliers de réponses moléculaires au sein d'un seul et même organisme, permettant de mieux comprendre le statut physiologique de ce dernier (Simmons et al. 2015). Le terme « écotoxicogénomique » est alors proposé pour faire référence à l'utilisation de la transcriptomique, de la protéomique et de la métabolomique en écotoxicologie (Snape et al. 2004).

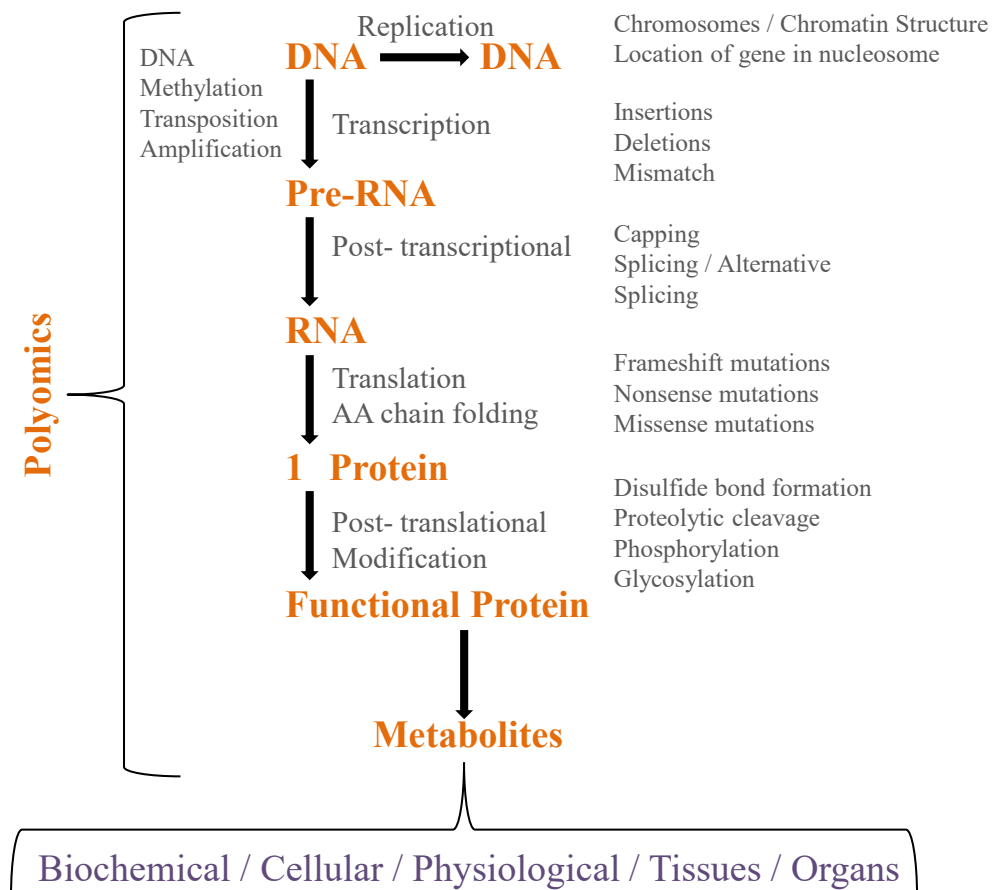


Figure I.10 : *Etapes mécanistiques des composants moléculaires des –omiques (reproduit d’après Borgert 2007)*

Au vu des possibilités qu’offrent ces nouvelles technologies, de nombreuses reviews recensent leurs avantages et leurs limites, tout en émettant des recommandations quant à leur utilisation en évaluation des risques environnementaux (**Figure I.11**). Ainsi, l’utilisation des outils –omiques devrait entre autre permettre de mesurer rapidement les signaux provenant de cellules, tissus et plus généralement d’organismes après une exposition à une pollution (Hubal 2009). Ils pourraient également permettre une étude plus approfondie des voies de toxicité, être utilisés sur des organismes qui ne sont pas des organismes de référence et dans des conditions non contrôlées (Calzolari et al. 2007). Ils peuvent être utilisés pour confirmer des phénomènes d’adaptation en démontrant des shifts spécifiques dans la fréquence des allèles exprimés qui seraient corrélés à une pollution mais également pour caractériser le profil du transcriptome relatif à une contamination ainsi qu’appréhender leurs modes d’action pour mieux en prédire les impacts (Kimberly and Salice 2015).

a. Benefits, applications and issues	b. Limitations	c. Recommendations
to rapidly measure signals from cells, tissues, and organisms following exposure to chemicals	the lack of studies (and genomic information)	characterize biologically relevant environmental exposures
to examine toxicity pathways in a depth and breadth that has not been possible before	studies performed in a laboratory setting	improve experimental designs
may be used with nonmodel bioindicator organisms	determine whether the change is adverse or normal to regain homeostasis	international collaborations to accelerate the application of those techniques
no need of a priori knowledge of the conditions	certain chemicals have similar effects	enhanced interdisciplinary training and communication
to assess adaptation in relation to a stressor	variability in data sets	the development of robust and user friendly interfaces for data mining
to characterize toxicant specific gene transcriptome patterns	responses in organisms are not necessarily correlated	the standardization of data collection and analysis
assess modes of action of toxicants (individual chemical or complex mixtures)	any single omic approach may not be sufficient to characterize the complexity of ecosystems	the development of toxicogenomic databases with cross links to existing informations
to increase our understanding to better predicted adverse impacts		link mechanism-based molecular events to impacts on individuals to populations
to categorize chemicals by their omic profiles		to use combined -omics methodologies
to develop new molecular biomarkers		

Figure I.11 : *Avantages, utilisations, limites et recommandations de l'utilisation des outils – omiques en écotoxicologie (d'après les reviews de Le et al. 2016, Kimberly et Salice 2015, Abril et al. 2011, Pina et Barata 2011, Hubal 2009, Van Aggelen et al. 2010, Borgert 2007, Calzolari et al. 2007).*

Le point sur lequel beaucoup d'auteurs ont insisté est celui du développement de nouveaux biomarqueurs à l'aide des outils –omiques qui semble être une piste prometteuse pour l'évaluation des risques environnementaux (Le et al. 2016, Abril et al. 2011, Pina et Barata 2011, Calzolari et al. 2007). En effet, les biomarqueurs sont des outils pouvant permettre d'évaluer rapidement la santé des organismes en mesurant des paramètres biochimiques, physiologiques ou histologiques qui renseigneraient sur le degré de dysfonctionnement suite à une contamination (Huggett et al. 2018). Ils peuvent être à la fois des indicateurs d'exposition ou d'effet mais ce type d'approche reste encore très peu inscrite dans les protocoles nationaux et internationaux d'évaluation des risques (Forbes et al. 2006).

D'autre part, plusieurs limites ont également été soulignées parmi lesquelles le manque d'organismes totalement séquencés disponibles dans les bases de données (Pina et Barata 2011), la variabilité parfois importante dans les jeux de données (Van Aggelen et al. 2009) et la difficulté à définir si les modifications observées pour un organisme sont néfastes ou simplement normales pour un retour à l'homéostasie (Calzolari et al. 2007).

De plus, les études de génomique, protéomique et métabolomique sont presque toujours conduites dans des conditions contrôlées de laboratoire qui sont bien différentes de celles rencontrées dans la nature, et intègrent trop peu les cinétiques de réponses. Pour finir, aucune des approches -omiques à elle seule ne semble permettre de caractériser la complexité d'un système biologique (Abril et al. 2011). En effet, les technologies -omiques permettent d'accéder chacune à une seule des étapes qui mènent de l'ADN aux métabolites (**Figure I.10**). Or, les différents événements ayant lieu pour la synthèse de chaque macromolécule (ADN, ARN, protéines, métabolites), pourraient être eux-même impactés par la présence d'un contaminant. Il a donc été recommandé de coupler la transcriptomique, la protéomique et la métabolomique pour produire des données de « polyomique » (Borgert 2007). Rapprocher ainsi les données produites par l'ensemble de ces techniques permettrait de mieux appréhender les mécanismes de toxicité d'un contaminant.

Ces techniques sont par ailleurs déjà largement employées en écotoxicologie depuis plus de 10 ans. Les modèles d'étude sur lesquels ces méthodes sont utilisées vont des micro-organismes (**Tableau I.5, a** : algues, cyanobactéries), jusqu'aux mammifères (**Tableau I.5, c** : souris, Homme) en passant par les microcrustacés et les poissons (**Tableau I.5, b**). La transcriptomique, la protéomique et la métabolomique sont aussi fortement utilisées pour étudier l'impact de pollutions sur les plantes (Ruotolo et al. 2018, **Tableau I.5, d**). Les contaminants considérés sont tout aussi bien organiques qu'inorganiques.

Dans la pratique, les études -omiques sont utilisées pour mettre en avant les impacts précoces de contaminants sur les processus biologiques conduisant pour certains, à une toxicité chronique, et plus généralement pour déceler une dérégulation fine entraînée par la présence d'une pollution. Elles cherchent également bien souvent à définir des biomarqueurs utilisables en évaluation des risques ce qui avait été précédemment cité comme un enjeu majeur de l'emploi de ces techniques pour l'évaluation des risques environnementaux (**Tableau I.5**).

Tableau I.5 : Exemples d'utilisation des méthodes -omiques en écotoxicologie. [1] Vicente et al. 2019, [2] Taylor et al. 2015, [3] Poynton et al 2011, [4] Caixia 2016, [5] Zhang et al. 2013, [6] Smith et al. 2005, [7] Marmiroli et al. 2014.

Tested contaminants	Tested (micro)organisms	"-omics" methods used	aim of the use of -omics methods	Ref.
a. ZnO ENMs	<i>Synechococcus elongatus</i>	transcriptomic (microarray analysis)	early impacts on biological process	[1]
ceria NPs	<i>Chlamydomonas reinhardtii</i>	unbiased transcriptomics and metabolomics approaches	to investigate the potential toxicity of the tested contaminant	[2]
b. heavy metal (Cd)	<i>Daphnia magna</i>	whole-body transcriptome	to reveal early processes leading to chronic toxicity	[3]
metalloid (arsenic) dioxine TCDD	<i>Danio rerio</i>	proteomic and metabolomic profiles	understanding the toxicity of environmental toxicants and discovering new biomarkers	[4]
c. wastewater effluents	male mice	transcriptomic (microarray analysis) and metabolomic profiling (RMN)	to provided a systemic view of the toxic effects of the contaminant at the molecular level	[5]
benzene	Humans	array-based technologies	to examine genetic variation in different pathways and to find biomarkers of susceptibility to the contaminant hematotoxicity	[6]
d. CdS QDs	<i>Arabidopsis thaliana</i>	transcriptomic approach	to identify the genetic basis of two mutant lines of the tested organism tolerance	[7]

Il devient alors possible d'appréhender les processus cellulaires mis en place par les organismes pour répondre à un stress et imaginer les mettre en relation avec des observations écologiques réalisées à des niveaux d'organisation supérieurs. En effet, comme présenté dans la **figure I.12**, les données mécanistiques seules présentent une valeur écologique très limitée. Différentes reviews sur le sujet soulignent justement que l'information obtenue à l'aide des outils -omiques prend tout son sens lorsque ces résultats sont couplés à des mesures de paramètres écotoxicologiques classiques (Kimberly and Salice 2015, Calzolari et al. 2007, Snape et al. 2004) qui, si réalisées à l'échelle d'un écosystème, ont une valeur écologique certaine.

Pour une utilisation en évaluation des risques, les données obtenues à l'aide de ces nouveaux outils se doivent donc d'être associées à des études plus intégratives qui considèrent le fonctionnement d'un écosystème. Ainsi pour étudier spécifiquement l'impact de divers contaminants sur les écosystèmes dulçaquicoles microbiens, une connaissance certaine de leur fonctionnement est indispensable.

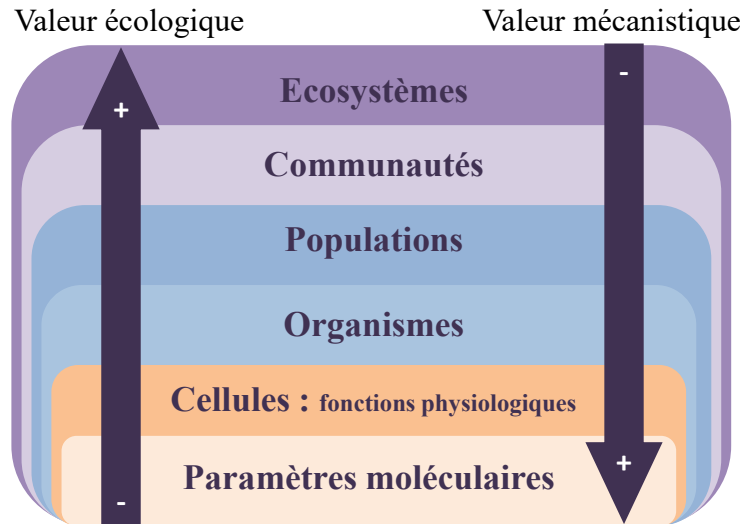


Figure I.12 : *Cadre conceptuel de l'écotoxicogénomique (adapté de Snape et al. 2004)*

I.2 Ecologie des écosystèmes dulçaquicoles microbiens de la colonne d'eau : importance de la boucle microbienne

Le concept de « boucle microbienne » a été initié en 1974 par Pomeroy, qui a mis en avant l'importance du rôle joué par les bactéries au sein des écosystèmes aquatiques (Pomeroy 1974). Les producteurs primaires sont à l'origine de la production des milieux aquatiques. Le phytoplancton synthétise de la matière organique à partir de minéraux en présence de lumière. Une importante partie de cette production est transformée en matière organique dissoute (MOD) par le biais de rejets extracellulaires provenant d'algues ou de cyanobactéries. Cette MOD peut alors être utilisée par les bactéries hétérotrophes (Tranvik 1992) qui produisent à leur tour de la matière organique particulaire MOP (Jacquet, 2005). Dans certains écosystèmes dulçaquicoles, la production des bactéries hétérotrophes en période sèche (printemps, $4,5 \text{ g C m}^{-2} \text{ d}^{-1}$) ou en période humide (été, $7.5 \text{ g C m}^{-2} \text{ d}^{-1}$) surpasse la production primaire ($1.1 \text{ g C m}^{-2} \text{ d}^{-1}$ et $0.1 \text{ g C m}^{-2} \text{ d}^{-1}$ respectivement) (**Figure I.13**).

La production du phytoplancton pourrait alors n'être dans certains cas qu'une petite partie de la source de carbone organique dissous supportant la production bactérienne (Pollard et Ducklow 2011).

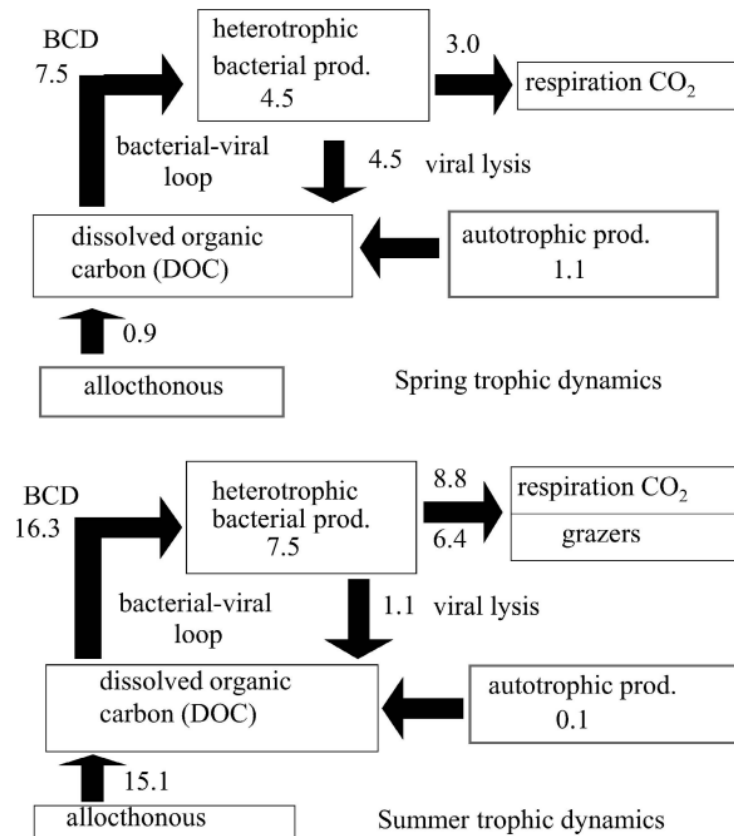


Figure I.13 : Relations trophiques du Bremer. *prod* = production. DOC (en anglais) pour carbone organique dissous (en français) et BCD pour demande bactérienne en carbone. Les unités sont exprimées en $g\ C\ m^{-2}\ d^{-1}$. Il est considéré ici que la totalité de la production primaire entre dans la ressource commune de carbone organique dissous à travers les saisons. Les intrants allochtones ont été ajustés de manière à équilibrer la ressource de DOC. La profondeur moyenne de l'eau était de 3 m (Tiré de Pollard et Ducklow 2011).

Par ailleurs, il a été montré que les biofilms bactériens seraient fortement impliqués dans la production et la dégradation de matière organique, la dégradation de polluants environnementaux ainsi que dans les cycles biogéochimiques tels que celui du carbone et de l'azote (Davey et O'toole 2000). Ces biofilms constituent la source principale de nourriture pour les protozoaires de la plupart des écosystèmes aquatiques (Huws et al. 2005). En effet, au sein de la boucle microbienne, les bactéries seraient principalement consommées par des protistes hétérotrophes tels que les flagellés hétérotrophes et les ciliés (Jacquet 2005). Il semblerait que lorsque les conditions sont favorables au développement des ciliés, ces derniers représenteraient la première cause de mortalité bactérienne (Iriberry et al. 1995).

Dans les réseaux trophiques microbiens, les protozoaires jouent un rôle central (Gilbert et al. 1998) par la prédation et le contrôle des bactéries et par le recyclage des nutriments limitant la croissance des algues (Amblard et al. 1995). Par ailleurs, lorsque les

conditions ne seraient plus favorables aux protozoaires, le taux de prédation sur les bactéries diminuerait et la lyse virale deviendrait alors le paramètre majeur contrôlant l'abondance bactérienne (Iriberry et al. 1995). Dans un écosystème dulçaquicole, entre $10 \cdot 10^9$ et $98 \cdot 10^9$ phages/l/jour pourraient être produits (Peduzzi et Schiemer 2004). Ces mêmes auteurs ont relevé que la fréquence des bactéries infectées par des phages et l'abondance des virus était directement corrélée à l'abondance et à la production bactérienne. Ainsi l'abondance virale pourrait être linéairement corrélée au nombre de bactéries. Ces derniers interviennent donc dans la libération de la MOD via la lyse virale et participe à la régulation de l'abondance bactérienne (Jacquet 2005). Comme présenté dans la **figure I.14**, le phytoplancton forme avec la boucle microbienne un réseau trophique microbien complété par l'intégration des virus au système.

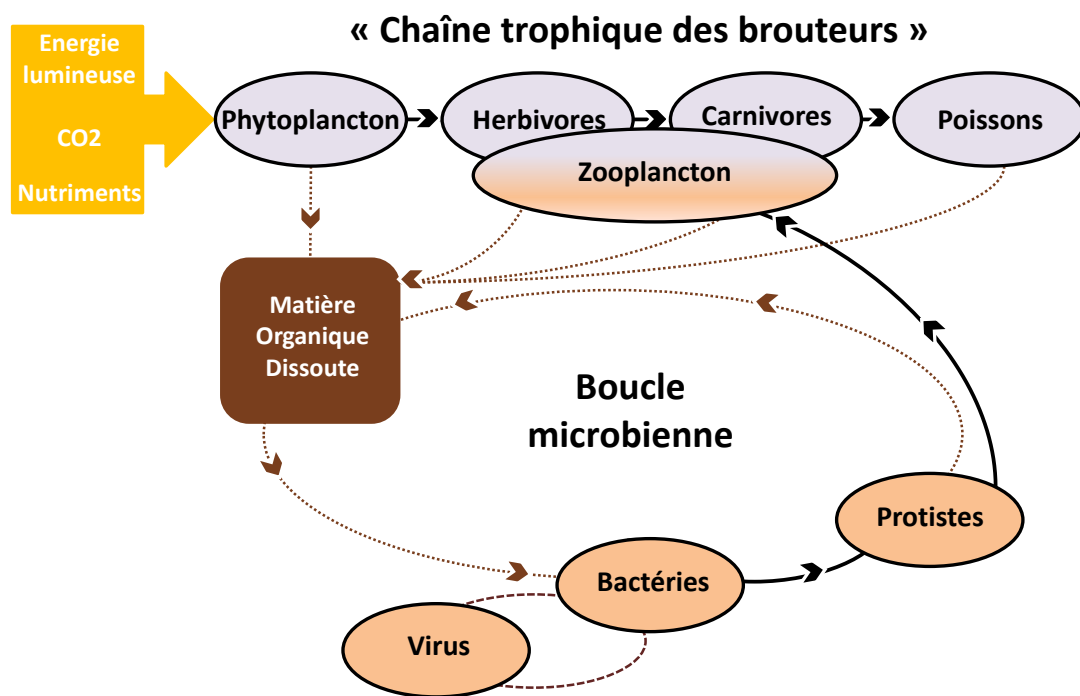


Figure I.14 : Schéma simplifié de la boucle microbienne et de la place qu'elle occupe au sein de la chaîne alimentaire dite « des brouteurs ». Les flèches brunes en pointillés représentent les voies de la matière organique, les flèches noires la voie trophique. Les groupes d'organismes en orange représentent les micro-organismes et ceux en bleus les organismes supérieurs. Le zooplancton permet de faire le lien entre les deux. Schéma réalisé grâce aux informations de Mostajir (2013) et basé sur les schémas de Okuda et al. (2014) Caron et Fuhrman (2015).

Le zooplancton, qui est un plancton animal regroupant les microcrustacés et les rotifères, peut acquérir le carbone par broutage direct sur les bactéries ou sur les protistes (Kluyver et al. 2012). Les rotifères et les microcrustacés établissent le lien trophique entre la

boucle microbienne et les organismes supérieurs formant ainsi un maillon important entre la production microbienne et le reste de la chaîne alimentaire (Agasild et al. 2012). Ainsi, le cycle des nutriments dans la colonne d'eau est généralement contrôlé par les interactions entre les virus, les bactéries, le phytoplancton et le zooplancton qui régulent les ratios C:N:P (Li et al. 2011). Les interactions trophiques dans les niveaux inférieurs conditionnent alors les transferts d'énergie et de nutriments aux organismes de niveaux trophiques supérieurs (Saleem and Moe 2014, **Figure I.15**).

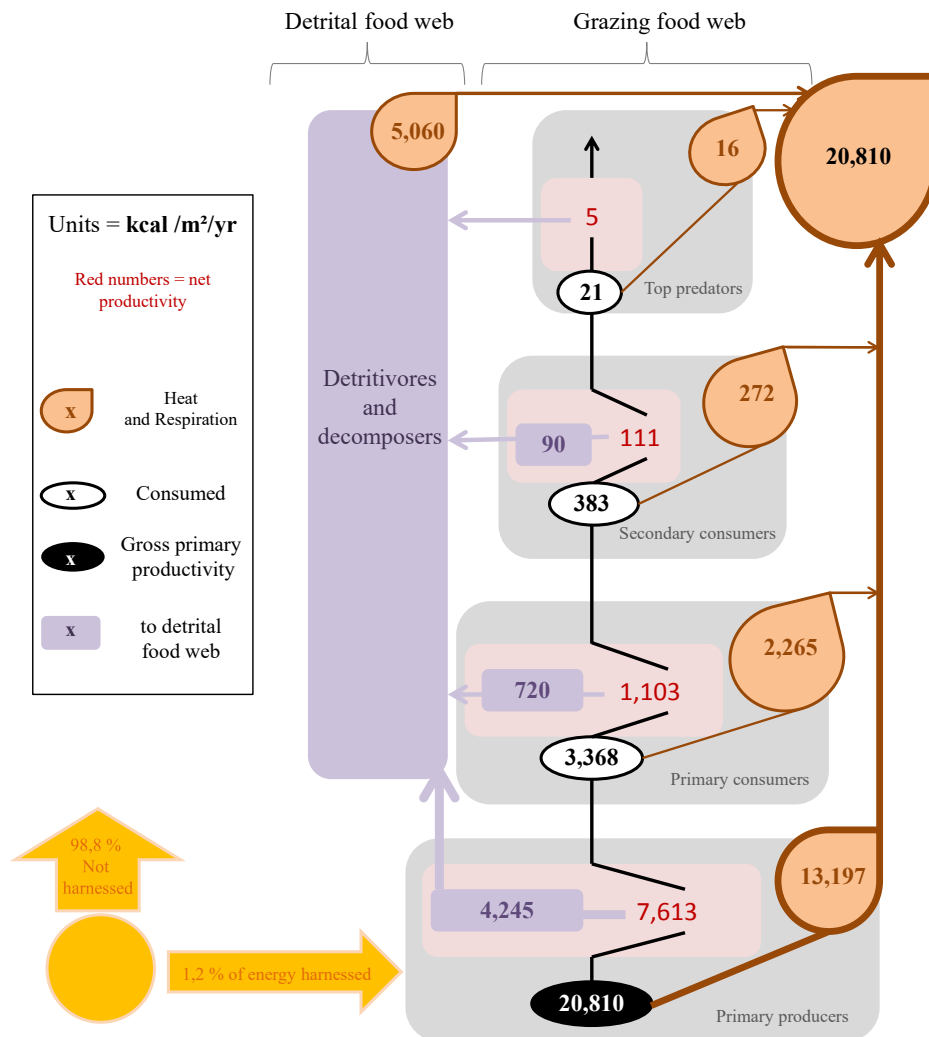


Figure I.15 : Flux d'énergie dans les écosystèmes aquatiques (d'après le schéma de Russell et al. (2013), basé sur les travaux de Odum (1957) réalisés dans la communauté de Silver Springs en Floride)

Sur les 20 810 kcal/m²/an intégrés au réseau trophique par les producteurs primaires, 13 197 kcal/m²/an sont utilisés par ces derniers et vont être perdus à travers la respiration et sous forme de chaleur dès le premier niveau. La production primaire nette est donc de 7 613

kcal/m²/an dont 4 245 kcal/m²/an sont utilisés par les détritivores et les décomposeurs. Il reste alors 3 368 kcal/m²/an de disponible pour le niveau trophique supérieur. Cette énergie va alors pouvoir être utilisée par les consommateurs primaires, puis par les maillons supérieurs. Dans sa review, Preston (2002) rappelle que le niveau trophique le plus bas est rarement en interaction directe avec le niveau trophique le plus haut d'un écosystème. La perte d'énergie d'un niveau trophique à l'autre est environ de 90%, du niveau le plus bas vers le niveau suivant. L'amplitude de l'énergie perdue dans ce transfert est donc fonction du nombre et de la diversité des intermédiaires entre les deux extrêmes et dépend fortement des interactions trophiques ayant lieu dans les niveaux inférieurs. De plus, comme représenté dans la **figure I16**, la boucle microbienne est constituée de microorganismes (bactéries, protozoaires) présentant une production annuelle par unité de biomasse bien plus importante que les invertébrés, les poissons ou les mammifères.

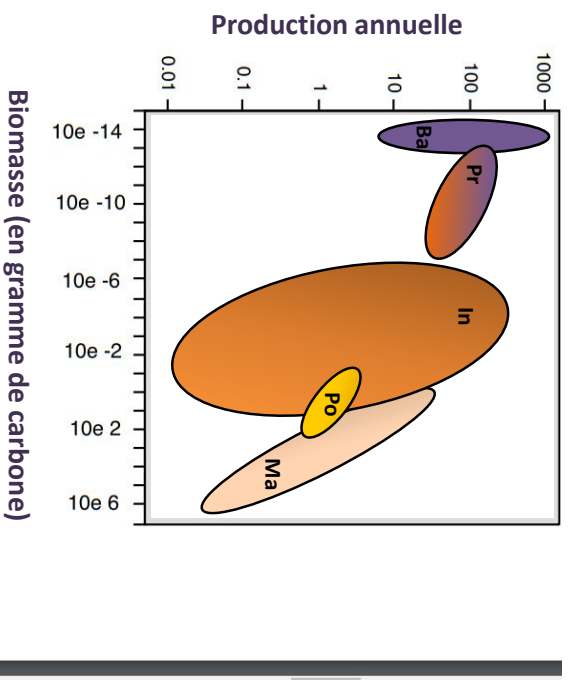


Figure I.16 : *Production annuelle par unité de biomasse chez les bactéries (Ba), les protozoaires (Pr), les invertébrés (In), les poissons (Po) et les mammifères (Ma). (Reproduit de Pomeroy, 2001).*

En effet, les bactéries ainsi que les protistes dépassent de loin tous les organismes pluricellulaires hétérotrophes en terme d'abondance, d'activité métabolique et génétique ainsi que de diversité biochimique (Pomeroy et al. 2007), soulignant une fois encore l'importance de la boucle microbienne.

Il ressort alors de cette analyse de la littérature, un manque de dispositifs expérimentaux contrôlés multi-espèces intégrant des relations trophiques et des communautés permettant d'obtenir un panel de mesures assez larges et pertinentes pour extrapoler des

données de laboratoire en vue d'une ERE plus réaliste. D'autre part, l'importance fonctionnelle du compartiment microbien et notamment de la boucle microbienne soulignent l'intérêt d'étudier l'impact des contaminants dans les premiers niveaux trophiques. De plus, les microorganismes peuvent également être responsables du transfert trophique des contaminants vers les organismes supérieurs. L'évaluation de l'impact des pollutions aquatiques (effets directs, interactions biotiques et abiotiques, transfert trophique) dans les niveaux trophiques inférieurs apparaît alors comme indispensable et c'est dans cette démarche que viennent s'inscrire ces travaux de thèse.

I.3 Objectifs historiques et actuels de la thèse

L'objectif initial du travail de thèse était l'évaluation de l'impact de filtres solaires nanoparticulaires sur un réseau trophique microbien. Ce travail devait comprendre (i) le développement d'un réseau trophique microbien modèle, (ii) l'exposition de ce réseau à des nanoparticules de ZnO communément introduites dans les crèmes solaires (iii) l'évaluation des effets et des facteurs de bioaccumulation de ces NP sur les différents (micro)organismes, et parallèlement à cela, l'utilisation d'approches -omiques pour appréhender les mécanismes d'action de ces filtres solaires sur les producteurs primaires.

Ces objectifs ont évolué au cours du temps face aux difficultés rencontrées lors du développement du réseau trophique modèle. Ils ont donc été reconsidérés et la majeure partie de cette thèse a donc été dédiée au développement et à la caractérisation du réseau, dont les résultats seront présentés dans les chapitres 3 et 4, respectivement. Afin de mieux évaluer les interconnexions entre les différents (micro)organismes et la pertinence de ce réseau dans un contexte d'évaluation du risque, celui-ci a été exposé à des contaminants métalliques et les résultats de ces recherches seront présentés dans le chapitre 5.

Parallèlement à cela, des travaux visant à comprendre les effets des filtres solaires nanoparticulaires ont pu être réalisés sur la cyanobactérie modèle *Synechococcus elongatus*. Ils avaient pour but d'identifier les mécanismes d'action des NP-ZnO manufacturées grâce à la combinaison de différentes approches expérimentales comprenant une analyse transcriptomique (puces ADN) couplées à des approches plus traditionnelles (cytométrie de flux, spectrophotométrie) ainsi qu'à des outils plus innovants en matière d'imagerie

(microscopie hyperspectrale). Ces travaux ont été publiés dans le journal *Environmental Science and Pollution Research* en avril 2019 et sont présentés dans le chapitre 2.

I.4 Références

A

- Abril Nieves, Julia Ruiz-Laguna, Inmaculada Osuna-Jiménez, Amalia Vioque-Fernández, Ricardo Fernández-Cisnal, Eduardo Chicano-Gálvez, José Alhama, Juan López-Barea, et Carmen Pueyo. « Omic Approaches in Environmental Issues ». *Journal of Toxicology and Environmental Health, Part A* 74, n° 15-16 (août 2011): 1001-19. <https://doi.org/10.1080/15287394.2011.582259>.
- Agasild Helen, Priit Zingel, et Tiina Nõges. « Live Labeling Technique Reveals Contrasting Role of Crustacean Predation on Microbial Loop in Two Large Shallow Lakes ». *Hydrobiologia* 684, n° 1 (mars 2012): 177-87. <https://doi.org/10.1007/s10750-011-0981-0>.
- Amblard Christian, Jean-François Carrias, Gilles Bourdier, et Nadine Maurin. « The Microbial Loop in a Humic Lake: Seasonal and Vertical Variations in the Structure of the Different Communities ». *Hydrobiologia* 300-301, n° 1 (mars 1995): 71-84. <https://doi.org/10.1007/BF00024449>.

B

- Bayona Yannick, Marc Roucaute, Kevin Cailleaud, Laurent Lagadic, Anne Bassères, et Thierry Caquet. « Effect of Thiram and of a Hydrocarbon Mixture on Freshwater Macroinvertebrate Communities in Outdoor Stream and Pond Mesocosms: I. Study Design, Chemicals Fate and Structural Responses ». *Ecotoxicology* 24, n° 9 (novembre 2015): 1976-95. <https://doi.org/10.1007/s10646-015-1534-5>.
- Bedding N.D., A.E. McIntyre, R. Perry, et J.N. Lester. « Organic Contaminants in the Aquatic Environment I. Sources and Occurrence ». *Science of The Total Environment* 25, n° 2 (octobre 1982): 143-67. [https://doi.org/10.1016/0048-9697\(82\)90083-3](https://doi.org/10.1016/0048-9697(82)90083-3).
- Bérard A., U. Dorigo, J. F. Humbert, C. Leboulanger, et F. Seguin. « La méthode PICT (Pollution-Induced Community Tolerance) appliquée aux communautés algales : intérêt comme outil de diagnose et d'évaluation du risque écotoxicologique en milieu aquatique ». *Annales de Limnologie - International Journal of Limnology* 38, n° 3 (septembre 2002): 247-61. <https://doi.org/10.1051/limn/2002020>.
- Blanck Hans, et Sten-Åke Wängberg. « Induced Community Tolerance in Marine Periphyton Established under Arsenate Stress ». *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences* 45, n° 10 (octobre 1988): 1816-19. <https://doi.org/10.1139/f88-213>.

- Borgert C. « Predicting Interactions from Mechanistic Information: Can Omic Data Validate Theories? » *Toxicology and Applied Pharmacology* 223, n° 2 (1 septembre 2007): 114-20. <https://doi.org/10.1016/j.taap.2007.01.002>.
- Bour Agathe, Florence Mouchet, Stéphanie Cadarsi, Jérôme Silvestre, Laurent Verneuil, David Baqué, Eric Chauvet, et al. « Toxicity of CeO₂ Nanoparticles on a Freshwater Experimental Trophic Chain: A Study in Environmentally Relevant Conditions through the Use of Mesocosms ». *Nanotoxicology*, 7 juillet 2015, 1-11. <https://doi.org/10.3109/17435390.2015.1053422>.
- Bour Agathe, Florence Mouchet, Jérôme Silvestre, Laury Gauthier, et Eric Pinelli. « Environmentally Relevant Approaches to Assess Nanoparticles Ecotoxicity: A Review ». *Journal of Hazardous Materials* 283 (février 2015): 764-77. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2014.10.021>.

C

- Cailleaud Kevin, Anne Bassères, Clémentine Gelber, Jaap F. Postma, Anneke T.M. ter Schure, Pim E.G. Leonards, Aaron D. Redman, Graham F. Whale, Mike J. Spence, et Markus Hjort. « Investigating Predictive Tools for Refinery Effluent Hazard Assessment Using Stream Mesocosms ». *Environmental Toxicology and Chemistry* 38, n° 3 (mars 2019): 650-59. <https://doi.org/10.1002/etc.4338>.
- Cairns John. « The Threshold Problem in Ecotoxicology ». *Ecotoxicology* 1, n° 1 (septembre 1992): 3-16. <https://doi.org/10.1007/BF00702652>.
- Caixia Li (2016-01-21). omic analyses of molecular toxicity of arsenic and 2,3,7,8-tetrachlorodibenodioxin (tcdd) in zebrafish. scholarbank@nus repository.
- Calzolari Luigi, Wilhelm Ansorge, Edward Calabrese, Nancy Denslow, Peter Part, et Teresa Lettieri. « Transcriptomics and Proteomics. Applications to Ecotoxicology ». *Comparative Biochemistry and Physiology Part D: Genomics and Proteomics* 2, n° 3 (septembre 2007): 245-49. <https://doi.org/10.1016/j.cbd.2007.04.007>.
- Caquet T. (Auteur de correspondance) (2012). Evaluation des risques et écotoxicologie : le cas des pesticides. *Innovations Agronomiques*, 23, 29-54. <https://prodinra.inra.fr/record/188320>
- Caron David A., et Jed A. Fuhrman. « Heterotrophic Planktonic Microbes: Virus, Bacteria, Archaea, and Protozoa ». In *Manual of Environmental Microbiology, 4th Edition*, édité par Suresh D. Pillai, Cindy H. Nakatsu, Robert V. Miller, et Marylynn V. Yates,

4.2.2-1 - 4.2.2-34. American Society of Microbiology, 2015.
<http://www.asmscience.org/content/book/10.1128/9781555818821.ch4.2.2>.

Carpenter Stephen R., Stuart G. Fisher, Nancy B. Grimm, et James F. Kitchell. « Global Change and Freshwater Ecosystems ». *Annual Review of Ecology and Systematics* 23, n° 1 (novembre 1992): 119-39. <https://doi.org/10.1146/annurev.es.23.110192.001003>.

Clements William H., et Jason R. Rohr. « COMMUNITY RESPONSES TO CONTAMINANTS: USING BASIC ECOLOGICAL PRINCIPLES TO PREDICT ECOTOXICOLOGICAL EFFECTS ». *Environmental Toxicology and Chemistry* 28, n° 9 (2009): 1789. <https://doi.org/10.1897/09-140.1>.

Cravo-Laureau Cristiana, Christine Cagnon, Béatrice Lauga, et Robert Duran, éd. *Microbial Ecotoxicology*. Cham: Springer International Publishing, 2017.
<http://link.springer.com/10.1007/978-3-319-61795-4>.

D

Davey M. E., et G. A. O'toole. « Microbial Biofilms: From Ecology to Molecular Genetics ». *Microbiology and Molecular Biology Reviews* 64, n° 4 (1 décembre 2000): 847-67. <https://doi.org/10.1128/MMBR.64.4.847-867.2000>.

De Laender F., P.J. Van den Brink, et C.R. Janssen. « Functional Redundancy and Food Web Functioning in Linuron-Exposed Ecosystems ». *Environmental Pollution* 159, n° 10 (octobre 2011): 3009-17. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2011.04.048>.

Dudgeon David, Angela H. Arthington, Mark O. Gessner, Zen-Ichiro Kawabata, Duncan J. Knowler, Christian Lévêque, Robert J. Naiman, et al. « Freshwater Biodiversity: Importance, Threats, Status and Conservation Challenges ». *Biological Reviews* 81, n° 02 (mai 2006): 163. <https://doi.org/10.1017/S1464793105006950>.

Duguma Dagne, Sara L. Ortiz, Youjian Lin, P. Chris Wilson, et William E. Walton. « Effects of a Larval Mosquito Biopesticide and *Culex* Larvae on a Freshwater Nanophytoplankton (*Selenastrum Capricornatum*) under Axenic Conditions ». *Journal of Vector Ecology* 42, n° 1 (juin 2017): 51-59. <https://doi.org/10.1111/jvec.12239>.

E

European Commission, 2008. Priority Substances Daughter Directive-directive 2008/105/EC of the European Parliament and of the Council of 16 December 2008 on Environmental Quality Standards in the Field of Water Policy

F

- Fazi Stefano, Simona Crognale, Barbara Casentini, Stefano Amalfitano, Francesca Lotti, et Simona Rossetti. « The Arsenite Oxidation Potential of Native Microbial Communities from Arsenic-Rich Freshwaters ». *Microbial Ecology* 72, n° 1 (juillet 2016): 25-35. <https://doi.org/10.1007/s00248-016-0768-y>.
- Finnegan Meaghean C., Simon Emburey, Udo Hommen, Leilan R. Baxter, Paul F. Hoekstra, Mark L. Hanson, Helen Thompson, et Mick Hamer. « A Freshwater Mesocosm Study into the Effects of the Neonicotinoid Insecticide Thiamethoxam at Multiple Trophic Levels ». *Environmental Pollution* 242 (novembre 2018): 1444-57. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2018.07.096>.
- Fischer Ralf G., Spyridon. Rapsomanikis, Meinrat O. Andreae, et Franco. Baldi. « Bioaccumulation of Methylmercury and Transformation of Inorganic Mercury by Macrofungi ». *Environmental Science & Technology* 29, n° 4 (avril 1995): 993-99. <https://doi.org/10.1021/es00004a020>.
- Fleeger John W., Kevin R. Carman, et Roger M. Nisbet. « Indirect Effects of Contaminants in Aquatic Ecosystems ». *Science of The Total Environment* 317, n° 1-3 (décembre 2003): 207-33. [https://doi.org/10.1016/S0048-9697\(03\)00141-4](https://doi.org/10.1016/S0048-9697(03)00141-4).
- Forbes Valery E., Annemette Palmqvist, et Lis Bach. « The use and misuse of biomarkers in ecotoxicology ». *Environmental Toxicology and Chemistry* 25, n° 1 (2006): 272. <https://doi.org/10.1897/05-257R.1>.

G

- Garcia-Reyero Natàlia, et Edward J. Perkins. « Systems Biology: Leading the Revolution in Ecotoxicology ». *Environmental Toxicology and Chemistry* 30, n° 2 (février 2011): 265-73. <https://doi.org/10.1002/etc.401>.
- Geffard Olivier, Benoit Ferrari, Arnaud Chaumot, Bernard Montuelle. « Intérêt des approches expérimentales *in situ* dans l'évaluation de la qualité des milieux aquatiques ». *Sciences Eaux & Territoires* n°1 (2010) : pages 20 à 25.
- Geissen Violette, Hans Mol, Erwin Klumpp, Günter Umlauf, Marti Nadal, Martine van der Ploeg, Sjoerd E.A.T.M. van de Zee, et Coen J. Ritsema. « Emerging Pollutants in the Environment: A Challenge for Water Resource Management ». *International Soil and Water Conservation Research* 3, n° 1 (mars 2015): 57-65. <https://doi.org/10.1016/j.iswcr.2015.03.002>.

- Ghiglione Jean-François, Fabrice Martin-Laurent, et Stéphane Pesce. « Microbial Ecotoxicology: An Emerging Discipline Facing Contemporary Environmental Threats ». *Environmental Science and Pollution Research* 23, n° 5 (mars 2016): 3981-83. <https://doi.org/10.1007/s11356-015-5763-1>.
- Ghiglione Jean-François, Fabrice Martin-Laurent, Sabine Stachowski-Haberkorn, Stéphane Pesce, et Stéphane Vuilleumier. « The Coming of Age of Microbial Ecotoxicology: Report on the First Two Meetings in France ». *Environmental Science and Pollution Research* 21, n° 24 (décembre 2014): 14241-45. <https://doi.org/10.1007/s11356-014-3390-x>.
- Gilbert D., C. Amblard, G. Bourdier, et A.-J. Francez. « The Microbial Loop at the Surface of a Peatland: Structure, Function, and Impact of Nutrient Input ». *Microbial Ecology* 35, n° 1 (1 janvier 1998): 83-93. <https://doi.org/10.1007/s002489900062>.
- Grün Alexandra Y., Constantin B. App, Andreas Breidenbach, Jutta Meier, George Metreveli, Gabriele E. Schaumann, et Werner Manz. « Effects of Low Dose Silver Nanoparticle Treatment on the Structure and Community Composition of Bacterial Freshwater Biofilms ». Édité par Amitava Mukherjee. *PLOS ONE* 13, n° 6 (14 juin 2018): e0199132. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0199132>.

H

- Hansson Lars-Anders, Christer Bronmark, P Anders Nilsson, et Kajsa Abjornsson. « Conflicting Demands on Wetland Ecosystem Services: Nutrient Retention, Biodiversity or Both? » *Freshwater Biology* 50, n° 4 (avril 2005): 705-14. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2427.2005.01352.x>.
- Hill W R, A J Stewart, et G E Napolitano. « Mercury Speciation and Bioaccumulation in Lotic Primary Producers and Primary Consumers ». *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences* 53, n° 4 (avril 1996): 812-19. <https://doi.org/10.1139/f95-231>.
- Horgan Richard P, et Louise C Kenny. « ‘Omic’ Technologies: Genomics, Transcriptomics, Proteomics and Metabolomics: The Obstetrician & Gynaecologist ». *The Obstetrician & Gynaecologist* 13, n° 3 (juillet 2011): 189-95. <https://doi.org/10.1576/toag.13.3.189.27672>.
- Hou Wen-Che, Paul Westerhoff, et Jonathan D. Posner. « Biological Accumulation of Engineered Nanomaterials: A Review of Current Knowledge ». *Environ. Sci.: Processes Impacts* 15, n° 1 (2013): 103-22. <https://doi.org/10.1039/C2EM30686G>.
- Hubal Elaine A. Cohen. « Biologically Relevant Exposure Science for 21st Century Toxicity Testing ». *Toxicological Sciences* 111, n° 2 (octobre 2009): 226-32. <https://doi.org/10.1093/toxsci/kfp159>.

Huggett Robert J., Richard A. Klmerle, Paul M. Mehrle, et Harold L. Bergman. *Biomarkers: Biochemical, Physiological, and Histological Markers of Anthropogenic Stress*. Édité par Dr. C.H. Ward, Dr. B.T. Walton, et Dr. T.W. LaPoint. 1^{re} éd. CRC Press, 2018. <https://www.taylorfrancis.com/books/9781351078726>.

Huws S.A., A.J. McBain, et P. Gilbert. « Protozoan Grazing and Its Impact upon Population Dynamics in Biofilm Communities ». *Journal of Applied Microbiology* 98, n° 1 (janvier 2005): 238-44. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2004.02449.x>.

I

Iriberry Juan, Begona Ayo, Esther Santamaria, Isabel Barcina, et Luis Egea. « Influence of Bacterial Density and Water Temperature on the Grazing Activity of Two Freshwater Ciliates ». *Freshwater Biology* 33, n° 2 (avril 1995): 223-31. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2427.1995.tb01163.x>.

ISTE Editions "Biodisponibles - Une histoire entre le vivant et son exposome - Volume 3" 226 pages - Janvier 2018

J

Jacquet S. « Impact des apports en nutriments sur le réseau trophique planctonique du lagon sud-ouest de Nouvelle-Calédonie ». Biodiversity and Ecology. Université Pierre et Marie Curie – Paris VI, 2005. French. <tel-00962269>

Jensen S. et A. Jernelöv. « Biological Methylation of Mercury in Aquatic Organisms ». *Nature* 223, n° 5207 (août 1969): 753-54. <https://doi.org/10.1038/223753a0>.

Joachim Sandrine Hélène Roussel, Jean-Marc Bonzom, Eric Thybaud, Christopher A. Mebane, Paul Van den Brink, et Laury Gauthier. « A Long-Term Copper Exposure in a Freshwater Ecosystem Using Lotic Mesocosms: Invertebrate Community Responses: Effects of Copper on Aquatic Invertebrates ». *Environmental Toxicology and Chemistry* 36, n° 10 (octobre 2017): 2698-2714. <https://doi.org/10.1002/etc.3822>.

Jovanović Boris Gizem Bezirci, Ali Serhan Çağan, Jan Coppens, Eti E. Levi, Zehra Oluz, Eylül Tuncel, Hatice Duran, et Meryem Beklioğlu. « Food Web Effects of Titanium Dioxide Nanoparticles in an Outdoor Freshwater Mesocosm Experiment ». *Nanotoxicology* 10, n° 7 (8 août 2016): 902-12. <https://doi.org/10.3109/17435390.2016.1140242>.

K

- Kimball Kenneth D., et Simon A. Levin. « Limitations of Laboratory Bioassays: The Need for Ecosystem-Level Testing ». *BioScience* 35, n° 3 (mars 1985): 165-71. <https://doi.org/10.2307/1309866>.
- Kimberly David A., et Christopher J. Salice. « Evolutionary Responses to Climate Change and Contaminants: Evidence and Experimental Approaches ». *Current Zoology* 61, n° 4 (1 août 2015): 690-701. <https://doi.org/10.1093/czoolo/61.4.690>.
- Kluijver Anna de, Jinlei Yu, Marco Houtekamer, Jack J. Middelburg, et Zhengwen Liu. « Cyanobacteria as a Carbon Source for Zooplankton in Eutrophic Lake Taihu, China, Measured by ¹³ C Labeling and Fatty Acid Biomarkers ». *Limnology and Oceanography* 57, n° 4 (juillet 2012): 1245-54. <https://doi.org/10.4319/lo.2012.57.4.1245>.
- Kumar Deepak, Abhinav Parashar, Natarajan Chandrasekaran, et Amitava Mukherjee. « The Stability and Fate of Synthesized Zero-Valent Iron Nanoparticles in Freshwater Microcosm System ». *3 Biotech* 7, n° 3 (juillet 2017). <https://doi.org/10.1007/s13205-017-0869-4>.

L

- Landi Pietro, Henintsoa O. Minoarivelo, Åke Brännström, Cang Hui, et Ulf Dieckmann. « Complexity and Stability of Ecological Networks: A Review of the Theory ». *Population Ecology* 60, n° 4 (octobre 2018): 319-45. <https://doi.org/10.1007/s10144-018-0628-3>.
- Lehnherr Igor. « Methylmercury Biogeochemistry: A Review with Special Reference to Arctic Aquatic Ecosystems ». *Environmental Reviews* 22, n° 3 (septembre 2014): 229-43. <https://doi.org/10.1139/er-2013-0059>.
- Le Quynh-Anh Vu, Simranjeet Singh Sekhon, Lyon Lee, Jung Ho Ko, et Jiho Min. « Daphnia in Water Quality Biomonitoring - “omic” Approaches ». *Toxicology and Environmental Health Sciences* 8, n° 1 (mars 2016): 1-6. <https://doi.org/10.1007/s13530-016-0255-3>.
- Li Y., Gal, G., Waite, A., & Hipsey, M. (2011). Microbial loop processes shape the food web stoichiometry in Lake Kinneret. In *MODSIM2011 19th International Congress on Modelling and Simulation* (Vol. 1, pp. 3726-3732). Australia: Modelling and Simulation Society of Australia and New Zealand Inc.

M

- Marmiroli M., L. Pagano, M. L. Savo Sardaro, M. Villani, et N. Marmiroli. « Genome-Wide Approach in *Arabidopsis Thaliana* to Assess the Toxicity of Cadmium Sulfide Quantum

- Dots ». *Environmental Science & Technology* 48, n° 10 (20 mai 2014): 5902-9. <https://doi.org/10.1021/es404958r>.
- Mason R. P., J.-M. Laporte, et S. Andres. « Factors Controlling the Bioaccumulation of Mercury, Methylmercury, Arsenic, Selenium, and Cadmium by Freshwater Invertebrates and Fish ». *Archives of Environmental Contamination and Toxicology* 38, n° 3 (1 avril 2000): 283-97. <https://doi.org/10.1007/s002449910038>.
- Mason R. P., J. R. Reinfelder, et F. M. M. Morel. « Bioaccumulation of Mercury and Methylmercury ». *Water, Air, & Soil Pollution* 80, n° 1-4 (février 1995): 915-21. <https://doi.org/10.1007/BF01189744>.
- Miao Lingzhan, Chao Wang, Jun Hou, Peifang Wang, Yanhui Ao, Yi Li, Yu Yao, et al. « Influence of Silver Nanoparticles on Benthic Oxygen Consumption of Microbial Communities in Freshwater Sediments Determined by Microelectrodes ». *Environmental Pollution* 224 (mai 2017): 771-78. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2017.01.017>.
- Montuelle B., X. Latour, B. Volat, et M. Blafont. « Use of a 6-Steps Microcosm for Studying a Wastewater Discharge in a Freshwater Ecosystem: A Multidisciplinary Study ». *Water, Air, & Soil Pollution* 99, n° 1-4 (octobre 1997): 661-69. <https://doi.org/10.1007/BF02406905>.
- Moore Joe D., John P. Stegemeier, Kyle Bibby, Stella M. Marinakos, Gregory V. Lowry, et Kelvin B. Gregory. « Impacts of Pristine and Transformed Ag and Cu Engineered Nanomaterials on Surficial Sediment Microbial Communities Appear Short-Lived ». *Environmental Science & Technology* 50, n° 5 (mars 2016): 2641-51. <https://doi.org/10.1021/acs.est.5b05054>.
- Morel François M. M., Anne M. L. Kraepiel, et Marc Amyot. « THE CHEMICAL CYCLE AND BIOACCUMULATION OF MERCURY ». *Annual Review of Ecology and Systematics* 29, n° 1 (novembre 1998): 543-66. <https://doi.org/10.1146/annurev.ecolsys.29.1.543>.
- Mostajir Behzad, Christian Amblard, Evelyne Buffan-Dubau, Rutger de Wit, Robert Lensi, et al. « Les réseaux trophiques microbiens des milieux aquatiques et terrestres. » J.C. Bertrand et al. Presses Universitaires de Pau et des Pays de l'Adour, pp.28, 2012. fhal-00848692f

N

- Namba Toshiyuki. « Multi-Faceted Approaches toward Unravelling Complex Ecological Networks ». *Population Ecology* 57, n° 1 (janvier 2015): 3-19. <https://doi.org/10.1007/s10144-015-0482-5>.

O

- Odum Howard T. « Trophic Structure and Productivity of Silver Springs, Florida ». *Ecological Monographs* 27, n° 1 (février 1957): 55-112. <https://doi.org/10.2307/1948571>.
- Okuda Noboru, Katsutoshi Watanabe, Kayoko Fukumori, Shin-ichi Nakano, et Takefumi Nakazawa. « Biodiversity Researches on Microbial Loop in Aquatic Systems ». In *Biodiversity in Aquatic Systems and Environments*, par Noboru Okuda, Katsutoshi Watanabe, Kayoko Fukumori, Shin-ichi Nakano, et Takefumi Nakazawa, 51-67. Tokyo: Springer Japan, 2014. http://link.springer.com/10.1007/978-4-431-54150-9_3.

P

- Peduzzi Peter, et Fritz Schiemer. « Bacteria and Viruses in the Water Column of Tropical Freshwater Reservoirs ». *Environmental Microbiology* 6, n° 7 (juillet 2004): 707-15. <https://doi.org/10.1111/j.1462-2920.2004.00602.x>.
- Pickhardt Paul C., Carol L. Folt, Celia Y. Chen, Bjoern Klaue, et Joel D. Blum. « Impacts of Zooplankton Composition and Algal Enrichment on the Accumulation of Mercury in an Experimental Freshwater Food Web ». *Science of The Total Environment* 339, n° 1-3 (mars 2005): 89-101. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2004.07.025>.
- Piña Benjamin, et Carlos Barata. « A Genomic and Ecotoxicological Perspective of DNA Array Studies in Aquatic Environmental Risk Assessment ». *Aquatic Toxicology* 105, n° 3-4 (octobre 2011): 40-49. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2011.06.006>.
- Pollard Peter C., et Hugh Ducklow. « Ultrahigh Bacterial Production in a Eutrophic Subtropical Australian River: Does Viral Lysis Short-Circuit the Microbial Loop? ». *Limnology and Oceanography* 56, n° 3 (mai 2011): 1115-29. <https://doi.org/10.4319/lo.2011.56.3.1115>.
- Pomeroy Lawrence R. « Caught in the Food Web: Complexity Made Simple? ». *Scientia Marina* 65, n° S2 (30 décembre 2001): 31-40. <https://doi.org/10.3989/scimar.2001.65s231>.
- . « The Ocean's Food Web, A Changing Paradigm ». *BioScience* 24, n° 9 (septembre 1974): 499-504. <https://doi.org/10.2307/1296885>.
- Pomeroy Lawrence, Peter leB. Williams, Farooq Azam, et John Hobbie. « The Microbial Loop ». *Oceanography* 20, n° 2 (1 juin 2007): 28-33. <https://doi.org/10.5670/oceanog.2007.45>.
- Ponce R. A., et N. S. Bloom. « Effect of pH on the Bioaccumulation of Low Level, Dissolved Methylmercury by Rainbow Trout (*Oncorhynchus Mykiss*) ». *Water Air & Soil Pollution* 56, n° 1 (avril 1991): 631-40. <https://doi.org/10.1007/BF00342305>.

- Poynton Helen C., Nadine S. Taylor, Joshua Hicks, Kimberly Colson, Sarah Chan, Candace Clark, Leona Scanlan, Alexandre V. Loguinov, Chris Vulpe, et Mark R. Viant. « Metabolomics of Microliter Hemolymph Samples Enables an Improved Understanding of the Combined Metabolic and Transcriptional Responses of *Daphnia Magna* to Cadmium ». *Environmental Science & Technology* 45, n° 8 (15 avril 2011): 3710-17. <https://doi.org/10.1021/es1037222>.
- Preston Benjamin L. « Indirect Effects in Aquatic Ecotoxicology: Implications for Ecological Risk Assessment ». *Environmental Management* 29, n° 3 (1 mars 2002): 311-23. <https://doi.org/10.1007/s00267-001-0023-1>.

R

- Ramade F., 1977. *Écotoxicologie*, Collection d'écologie ; 9. Masson, Paris ; New York. ISBN 10: 2225455309 / ISBN 13: 9782225455308
- Redmayne Amanda C, Jonathan P Kim, Gerard P Closs, et Keith A Hunter. « Methyl Mercury Bioaccumulation in Long-Finned Eels, *Anguilla Dieffenbachii*, from Three Rivers in Otago, New Zealand ». *Science of The Total Environment* 262, n° 1-2 (30 octobre 2000): 37-47. [https://doi.org/10.1016/S0048-9697\(00\)00534-9](https://doi.org/10.1016/S0048-9697(00)00534-9).
- Relyea Rick, et Jason Hoverman. « Assessing the Ecology in Ecotoxicology: A Review and Synthesis in Freshwater Systems: The Ecology of Ecotoxicology ». *Ecology Letters* 9, n° 10 (octobre 2006): 1157-71. <https://doi.org/10.1111/j.1461-0248.2006.00966.x>.
- Ribeyre F., A. Delarche, et A. Boudou. « Transfer of Methylmercury in an Experimental Freshwater Trophic Chain— Temperature Effects ». *Environmental Pollution Series B, Chemical and Physical* 1, n° 4 (octobre 1980): 259-68. [https://doi.org/10.1016/0143-148X\(80\)90002-6](https://doi.org/10.1016/0143-148X(80)90002-6).
- Riera Steven F., et Risa A. Cohen. « Alkyl Polyglucoside Compound Influences Freshwater Plankton Community Structure in Floating Field Mesocosms ». *Ecotoxicology* 25, n° 8 (octobre 2016): 1458-67. <https://doi.org/10.1007/s10646-016-1697-8>.
- Rohr Jason R., Jacob L. Kerby, et Andrew Sih. « Community Ecology as a Framework for Predicting Contaminant Effects ». *Trends in Ecology & Evolution* 21, n° 11 (novembre 2006): 606-13. <https://doi.org/10.1016/j.tree.2006.07.002>.
- Ruotolo Roberta, Elena Maestri, Luca Pagano, Marta Marmiroli, Jason C. White, et Nelson Marmiroli. « Plant Response to Metal-Containing Engineered Nanomaterials: An Omics-Based Perspective ». *Environmental Science & Technology* 52, n° 5 (6 mars 2018): 2451-67. <https://doi.org/10.1021/acs.est.7b04121>.

Russell P. J., S. L. Wolfe, P. E. Hertz, C. Starr, and B. McMillan. 2013. Biology: the dynamic science. Brooks Cole, Belmont, CA. Chapter 54 p. 1236-1237

S

Saleem Muhammad, et Luke A. Moe. « Multitrophic Microbial Interactions for Eco- and Agro-Biotechnological Processes: Theory and Practice ». *Trends in Biotechnology* 32, n° 10 (octobre 2014): 529-37. <https://doi.org/10.1016/j.tibtech.2014.08.002>.

Simmons Denina B.D., Jonathan P. Benskin, John R. Cosgrove, Bernard P. Duncker, Drew R. Ekman, Christopher J. Martyniuk, et James P. Sherry. « Omics for Aquatic Ecotoxicology: Control of Extraneous Variability to Enhance the Analysis of Environmental Effects: Variability of Omics Data in Aquatic Ecotoxicology ». *Environmental Toxicology and Chemistry* 34, n° 8 (août 2015): 1693-1704. <https://doi.org/10.1002/etc.3002>.

Smith Martyn T., Roel Vermeulen, Guilan Li, Luoping Zhang, Qing Lan, Alan E. Hubbard, Matthew S. Forrest, et al. « Use of ‘Omic’ Technologies to Study Humans Exposed to Benzene ». *Chemico-Biological Interactions* 153-54 (mai 2005): 123-27. <https://doi.org/10.1016/j.cbi.2005.03.017>.

Snape Jason R., Steve J. Maund, Daniel B. Pickford, et Thomas H. Hutchinson. « Ecotoxicogenomics: The Challenge of Integrating Genomics into Aquatic and Terrestrial Ecotoxicology ». *Aquatic Toxicology* 67, n° 2 (avril 2004): 143-54. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2003.11.011>.

Sumon Kizar Ahmed, Afifat Khanam Ritika, Edwin T.H.M. Peeters, Harunur Rashid, Roel H. Bosma, Md. Shahidur Rahman, Mst. Kaniz Fatema, et Paul J. Van den Brink. « Effects of Imidacloprid on the Ecology of Sub-Tropical Freshwater Microcosms ». *Environmental Pollution* 236 (mai 2018): 432-41. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2018.01.102>.

T

Taylor Nadine S., Ruth Merrifield, Tim D. Williams, J. Kevin Chipman, Jamie R. Lead, et Mark R. Viant. « Molecular Toxicity of Cerium Oxide Nanoparticles to the Freshwater Alga *Chlamydomonas Reinhardtii* Is Associated with Supra-Environmental Exposure Concentrations ». *Nanotoxicology*, 5 mars 2015, 1-10. <https://doi.org/10.3109/17435390.2014.1002868>.

Tlili Ahmed, Annette Berard, Hans Blanck, Agnes Bouchez, Fernanda Cássio, Karl Martin Eriksson, Soizic Morin, et al. « Pollution-Induced Community Tolerance (PICT): Towards an

Ecologically Relevant Risk Assessment of Chemicals in Aquatic Systems ». *Freshwater Biology* 61, n° 12 (décembre 2016): 2141-51. <https://doi.org/10.1111/fwb.12558>.

Traas Theo P., Jan H. Janse, Tom Aldenberg, and Theo C.M. Brock. « A food web model for fate and direct and indirect effects of Dursban ® 4E (active ingredient chlorpyrifos) in freshwater microcosms ». *Aquatic Ecology*, (février 1998) 179-190.

Tranvik Lars J. « Allochthonous Dissolved Organic Matter as an Energy Source for Pelagic Bacteria and the Concept of the Microbial Loop ». *Hydrobiologia* 229, n° 1 (février 1992): 107-14. <https://doi.org/10.1007/BF00006994>.

V

Van Aggelen, Graham Gerald T. Ankley, William S. Baldwin, Daniel W. Bearden, William H. Benson, J. Kevin Chipman, Tim W. Collette, et al. « Integrating Omic Technologies into Aquatic Ecological Risk Assessment and Environmental Monitoring: Hurdles, Achievements, and Future Outlook ». *Environmental Health Perspectives* 118, n° 1 (janvier 2010): 1-5. <https://doi.org/10.1289/ehp.0900985>.

Van der Linden P., C. Shinn, M. Moreira-Santos, J. Oehlmann, R. Ribeiro, et R. Müller. « Aquatic Mesocosms Exposed to a Fungicide in Warm and Cold Temperate European Climate Zones: Long-Term Macroinvertebrate Response ». *Science of The Total Environment* 681 (septembre 2019): 133-42. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2019.05.112>.

Vicente Anne, Bénédicte Sohm, Justine Flayac, Philippe Rousselle, Pascale Bauda, et Christophe Pagnout. « Toxicity Mechanisms of ZnO UV-Filters Used in Sunscreens toward the Model Cyanobacteria *Synechococcus Elongatus* PCC 7942 ». *Environmental Science and Pollution Research*, 3 juin 2019. <https://doi.org/10.1007/s11356-019-05057-6>.

W

Watras C.J., R.C. Back, S. Halvorsen, R.J.M. Hudson, K.A. Morrison, et S.P. Wentz. « Bioaccumulation of Mercury in Pelagic Freshwater Food Webs ». *Science of The Total Environment* 219, n° 2-3 (août 1998): 183-208. [https://doi.org/10.1016/S0048-9697\(98\)00228-9](https://doi.org/10.1016/S0048-9697(98)00228-9).

Widenfalk Anneli, Jonas M. Svensson, et Willem Goedkoop. « EFFECTS OF THE PESTICIDES CAPTAN, DELTAMETHRIN, ISOPROTURON, AND PIRIMICARB ON THE MICROBIAL COMMUNITY OF A FRESHWATER SEDIMENT ». *Environmental Toxicology and Chemistry* 23, n° 8 (2004): 1920. <https://doi.org/10.1897/03-345>.

Wobeser G., N. O. Nielsen, R. H. Dunlop, et F. M. Atton. « Mercury Concentrations in Tissues of Fish from the Saskatchewan River ». *Journal of the Fisheries Research Board of Canada* 27, n° 4 (avril 1970): 830-34. <https://doi.org/10.1139/f70-089>.

Z

Zhang Xiaowei, Pu Xia, Pingping Wang, Jianghu Yang, et Donald J. Baird. « Omics Advances in Ecotoxicology ». *Environmental Science & Technology* 52, n° 7 (3 avril 2018): 3842-51. <https://doi.org/10.1021/acs.est.7b06494>.

Zhang Yan, Kailong Huang, Yongfeng Deng, Yanping Zhao, Bing Wu, Ke Xu, et Hongqiang Ren. « Evaluation of the Toxic Effects of Municipal Wastewater Effluent on Mice Using Omic Approaches ». *Environmental Science & Technology* 47, n° 16 (20 août 2013): 9470-77. <https://doi.org/10.1021/es401615y>.

CHAPITRE II

**Impacts des NP-ZNO contenues dans les
filtres solaires sur un producteur primaire**

Chapitre II : Impacts des NP-ZNO contenues dans les filtres solaires sur un producteur primaire

Cette étude a été réalisée dans le cadre de l'ANR P2N - Mesonnet (2011 – 2015) qui avait pour ambition de comprendre et de documenter le transfert, les transformations potentielles et l'écotoxicité de nanoparticules manufacturées dans les milieux et les organismes vivants.

Les NP-ZnO peuvent être introduites dans les crèmes solaires dites « minérales », par opposition aux crèmes solaires « chimiques ». Ces produits solaires sont présentés comme plus respectueux de l'environnement mais encore trop peu d'études ont été réalisées pour conclure à leur innocuité vis-à-vis des écosystèmes aquatiques. Ces composés seraient principalement rejetés dans le compartiment aquatique via les eaux résiduaires urbaines et industrielles après traitement en station d'épuration ou directement par le biais des activités récréatives comme la baignade. Etudier les mécanismes de toxicité des NP-ZnO sur un producteur primaire permet d'une part, de compléter les études menées dans le cadre de l'ANR P2N – Mesonnet, et d'autre part, d'appréhender l'utilisation des outils –omiques pour l'évaluation des risques environnementaux.

Les mécanismes d'action des NP-ZnO manufacturées ont alors été appréhendés sur la cyanobactérie modèle *Synechococcus elongatus* PCC 7942 grâce à une analyse transcriptomique réalisée à l'aide de puces ADN. Des approches plus traditionnelles (cytométrie de flux, spectrophotométrie) ainsi que des outils innovants en matière d'imagerie (microscopie hyperspectrale) ont été utilisés pour compléter les données obtenues par transcriptomique. Cette étude a mis en évidence une forte dérégulation des gènes impliqués dans la photosynthèse conjointement à une augmentation de la peroxydation des lipides et une diminution de l'activité réductase, ainsi qu'une perte de l'intégrité membranaire des cellules exposées. De plus, la concentration en ATP s'est révélée être deux fois plus faible dans le cas des échantillons exposés. Il a été mis en évidence que les effets observés après exposition aux NP-ZnO étaient très proches de ceux obtenus sur les échantillons exposés au ZnCl₂. Cette étude a permis de constater que les NP-ZnO présentent une rapide dissolution dans nos conditions ce qui porte à croire que le Zn labile serait majoritairement responsable des effets observés.

II Toxicity mechanisms of ZnO UV-filters used in sunscreens toward the model cyanobacteria *Synechococcus elongatus* PCC 7942

Vicente et al., 2019 : DOI: [10.1007/s11356-019-05057-6](https://doi.org/10.1007/s11356-019-05057-6) – Manuscrit publié dans Environmental Science and Pollution Research

Anne Vicente ¹, Bénédicte Sohm ¹, Justine Flayac ², Philippe Rousselle ¹, Pascale Bauda ^{1,2}, Christophe Pagnout ^{1,2}

¹Université de Lorraine, LIEC (Laboratoire Interdisciplinaire des Environnements Continentaux), UMR7360, Metz F-57070, France.

²CNRS, LIEC, UMR7360, Campus Bridoux, Metz F-57070, France

II.1 Abstract

Zinc oxide (ZnO) nanoparticles are commonly used in sunscreens for their UV-filtering properties. Their growing use can lead to their release into ecosystems, raising question about their toxicity. Effects of these engineered nanomaterials (ENMs) on cyanobacteria, which are important primary producers involved in many biogeochemical cycles, are unknown. In this study we investigated by several complementary approaches the toxicological effects of two marketed ZnO-ENMs (coated and uncoated) on the model cyanobacteria *Synechococcus elongatus* PCC 7942. It was shown that despite the rapid adsorption of ENMs on cell surface, toxicity is mainly due to labile Zn released by ENMs. Zn dissipates cell membrane potential necessary for both photosynthesis and respiration, and induces oxidative stress leading to lipid peroxidation and DNA damages. It lead to global down regulation of photosystems, oxidative phosphorylation, and transcription/translation machineries. This also translates into significant decrease of intracellular ATP content and cell growth inhibition. However, there is no major loss of pigments and even rather an increase in exposed cells compared to controls. A proposed way to reduce the environmental impact of Zn would be the improvement of the coating stability to prevent solubility of ZnO-ENMs.

Keywords: cyanobacteria - zinc oxide - nanomaterial - sunscreen - transcriptomic

II.2 Introduction

UV filters are commonly used in sunscreens and other personal care products to reduce the amount of UV light penetrating the skin. In the last 10 years, several studies have highlighted the toxicity of chemical UV-filters on human health and aquatic ecosystems (Downs et al. 2014, Krause et al. 2012, Danovaro et al. 2008), leading to an increased use of mineral UV-filters such as titanium dioxide (TiO₂) and zinc oxide (ZnO) nanoparticles. Responding to a booming market, mineral filters are safer and more effective than their chemical equivalents, stable in sunlight, and hypoallergenic (Gulson et al. 2010, Zvyagin et al. 2008). The important use of these engineered nanomaterials (ENMs) inevitably lead to their release in freshwater and seawater ecosystems during recreational activities and through urban wastewater. Adverse effects of TiO₂ and ZnO nanoparticles (NP-TiO₂ and NP-ZnO) have been reported for many aquatic organisms such as microorganisms, invertebrates and fish (Blaise et al. 2008). However, few studies have been conducted on cyanobacteria, which are ubiquitous and have fundamental functions in ecosystems as primary producers and nitrogen fixers (Singh et al. 2015, Hagström et al. 1988). On heterotrophic bacteria, mechanisms of action of NP-TiO₂ and NP-ZnO involve oxidative stress (Peng et al. 2017), especially in the presence of light, and/or osmotic stress due to membrane alteration following adsorption of nanoparticles onto the cell surface (Sohm et al. 2015). Nanoparticles are shown to collapse the membrane potential, restraining ATPase activities and reducing intracellular ATP levels (Sohm et al. 2015, Cui et al., 2012). On photosynthetic microorganisms, such as algae, nanoparticles induce oxidative stress leading to decreased photosynthetic efficiency and, as a result, a drop of the intracellular ATP content (Polonini et al. 2015, Pereira et al. 2014, Dewez and Oukarroum 2012, Rodea-Palomares et al. 2012).

In a context of risk assessment, these ecotoxicological studies bring essential data on the toxicity levels of nanoparticles as well as on their mechanisms of action, but they lack of environmental relevance in contaminants used. Indeed, most of research done so far has been performed on laboratory-synthesized nanoparticles that can be very different from ENMs massively produced by industry, and therefore found in environment. As an example, TiO₂-ENMs incorporated into sunscreens are often coated with an Al(OH)₃ layer to shield against harmful effects of hydroxyl radicals and/or with an hydrophobic silane/siloxane layer to enhance their dispersion (Labille et al. 2010, Nohynek et al. 2007). These coatings can confer

new surface properties to ENMs leading to different interactions with organisms and, as a consequence, unsuspected toxicological effects (Labille et al. 2010).

In the aforementioned framework, we investigated the toxicological effects of two ZnO engineered nanomaterials (ZnO-ENMs) commonly used as UV-filters in sunscreens (*i.e.* the silane coated Z-COTE HP1® and the uncoated Z-COTE®) on *Synechococcus elongatus* PCC 7942 using several complementary experimental approaches. *Synechococcus elongatus* is a freshwater cyanobacteria found in many aquatic ecosystems. Strain PCC 7942 is a well-characterized microorganism previously used as a model for study of circadian clock mechanisms. Its complete genome was sequenced (Holtman et al. 2005, Chen et al. 2008) and a DNA microarray was previously designed and tested by Vijayan et al. (2009). This DNA microarray was used in the current study to analyze the global molecular response of cells exposed to ENMs and ZnCl₂ (ionic control) and thus, try to better understand action mechanisms of these contaminants.

II.3 Materials and Methods

II.3.1 Characterization of ENMs

Size distribution and electrophoretic mobility of ENMs in suspension were determined by dynamic light scattering (DLS, Zetasizer NanoZS, Malvern Instruments) at 50 mg/L for stock suspensions and 5 mg/L for behavioral studies in test media. Dissolution kinetics of ZnO-ENMs were determined in test medium (US EPA, Very Soft Water) at different times in conditions used in toxicity tests (20°C, 100 rpm. continuous light). Dissolved Zn was determined by atomic absorption spectroscopy (AAS) (Perkin Elmer AAnalyst-100 Flame AA - detection limit of 1 µg/L; standard curve interval in the range of 0 to 250 µg/L) after centrifugation (30 min, 6500 × g) on 3-kDa porosity membranes (Amicon® ultra-4 centrifugal filter devices) and acidification by adding 1% HNO₃.

II.3.2 Preparation of ENM suspensions and ZnCl₂ solutions

Uncoated and coated ZnO-ENMs used in this study are marketed by BASF industry (BASF SE, Ludwigshafen, Germany) under the names Z-COTE® and Z-COTE® HP1, respectively. These nanomaterial powders were previously fully characterized by supplier and by several authors (Lewicka et al. 2011, Osmond-McLeod et al. 2014, Wiench et al. 2009) for their primary particle size distribution and shape using the Transmission Electron Microscopy

(TEM), their specific surface area using the Brunauer-Emmett-Teller (BET) gas-adsorption technique, and their elemental composition using energy dispersive X-ray spectroscopy (EDS) and Inductively Coupled Plasma Optical Emission Spectroscopy (ICP-OES). Their characteristics are summarized in **Supporting Information (Table SII-1, Figure SII-1)**.

As recommended in the PROSPECT Dispersion Protocol (2010), hydrophobic silane coated Z-COTE HP1 was prepared by weighing 5 mg powder in a 15 mL tube (Falcon) and wetting with 500 μ L 96% ethanol. This step was essential to achieve ENM dispersion in media. The 10 g/L suspension of ENMs was probe-sonicated for 1 min on ice (Sonics Vibra-cell 750 W, Sonics & Materials, frequency 20 kHz, 3 mm micro tip, amplitude 40%). A 100- μ L sample was dispersed in 19.9 mL deionized water for a 50 mg/L stock suspension. This stock suspension was then sonicated for 20 s as previously described. The uncoated Z-COTE was prepared as mentioned above, except that the final step of sonication on the 50 mg/L stock suspension was not performed. Ionic stock solution of Zinc was prepared by diluting ZnCl_2 in deionized water at a final concentration of 10 g/L ZnCl_2 . A 100- μ L sample was added to 19.8 mL deionized water supplemented with 100 μ L 96% ethanol for a 50 mg/L suspension. Solvent control solution was prepared by adding 100 μ L of 96% ethanol to 19.9 mL deionized water. All suspensions/solutions were prepared immediately before use.

II.3.3 Exposure of cyanobacteria and toxicity assessment

Synechococcus elongatus PCC 7942 (ATCC 33912) cells were grown in BG11 medium (Sigma-Aldrich) under constant temperature (20°C), rotary agitation (100 rpm) with circadian period (16:8). Cells in exponential phase of growth ($\text{OD}_{730\text{nm}} = 0.24$) were harvested by centrifugation ($7500 \times g$, 6 min) and washed once with sterile EPA Very Soft Water (pH measured at 6.4 ± 0.3) (US EPA, 2002). Cell suspension was then adjusted to $\text{OD}_{730\text{nm}} 0.27$ (10^7 cells/mL). For growth inhibition toxicity experiments, cell suspension was diluted at 1:50 in BG11 medium, and a volume of 31.5 mL was transferred in 125 mL Pyrex Erlenmeyer flasks. ENMs, ZnCl_2 and ethanol 96% (carrier solvent) prepared as previously described were added at final concentrations of 0, 1, 5, 10 mg/L and final volumes of suspensions were adjusted to 35 mL. Three replicates were prepared for each condition. Cells were exposed at 20 °C under 100 rpm agitation and continuous light. After 72 h incubation, $\text{OD}_{730\text{nm}}$ were measured. For all other analyses (*i.e.* flow cytometry, spectrophotometry, Cytoviva, microarray and ATP cell content), experiments were performed similarly at the unique

concentration of 5 mg/L. Four independent replicates were performed for microarray analysis, and three for other experiments.

II.3.4 Flow cytometry analyzes

At different time exposure, 100 μ L of cell suspensions were sampled and centrifuged at 8 000 \times g for 5 min. Cell pellets were washed and resuspended in PBS buffer (137 mM NaCl, 2.7 mM KCl, 10 mM Na₂HPO₄, 1.8 mM KH₂PO₄; pH 7.4). Flow cytometric analyses were performed using fluorescent dyes such as DiBAC₄(3) (Sigma-Aldrich, Germany) to investigate contaminant effects on membrane depolarization, SYTOX Green (ThermoFisher Scientific, France) for membrane permeability, RedoxSensor Green (ThermoFisher Scientific, France) for reductase activity and BODIPY (ThermoFisher Scientific, France) for lipid peroxidation. For that purpose, cells (1×10^7 cells/mL) in PBS were incubated with 5 μ g/mL of probe for 20 min. Samples were analyzed on a flow cytometer (BD AccuriTM C6, BD Biosciences) equipped with a laser emitting at 488 nm. At least 15,000 events were acquired for each sample. Fluorescence of DiBAC₄(3), SYTOX Green, RedoxSensor Green and Bodipy were collected with a bandpass filter at 533 nm. Chlorophyll with a longpass filter above 670 nm.

II.3.5 Spectrophotometry measurements

At different time of exposure, 1 mL of cell suspensions were sampled and analyzed by spectrophotometry. Optical measurements were performed within the spectral region from 400 to 730 nm at 5 nm intervals with the use of spectrophotometer (Analytic Jena, Specord 205).

II.3.6 CytoViva imaging

After 1 h exposure, 2 μ L of cells exposed to Z-COTE and Z-COTE HP1 were dropped onto a clean glass slide and a cover glass slip was put on it to form a thin layer of liquid. Samples were imaged at 100-fold magnification using an Olympus BX43 optical microscope coupled with a CytoViva dark-field microscope equipped with an hyperspectral imaging system (CytoViva-Hyperspectral Imaging Systems, Auburn, AL, USA). Spectral signatures of each ENM were identified by comparing spectrum in exposed samples to those in control (unexposed samples). Spectral libraries with specific spectra were created for each ENM and used for mapping Z-COTE and Z-COTE HP1 in exposed samples.

II.3.7 Cell ATP content analysis

Cyanobacteria cells (10^8 cells) exposed 5 h to ENMs and ZnCl_2 were harvested by centrifugation ($8000 \times g$; 5 min) and resuspended in 1 mL dilution buffer provided in the ATP Bioluminescence Assay Kits HSII (Sigma-Aldrich, Germany). Samples were heated 10 min at 100°C to inactivate enzymes capable of consuming ATP. Cells were then lysed using a French press at 1.38 Kbar and centrifuged ($8000 \times g$; 5 min) to remove cellular waste. ATP concentration was determined using ATP Bioluminescence Assay Kits HSII (Roche) as recommended by the manufacturer.

II.3.8 Transcriptome analysis

II.3.8.1 Preparation of RNA extract

After 5 h exposure, 15 mL of cells (at least $1.5 \cdot 10^8$ cells) from control and exposed samples (Z-COTE, Z-COTE HP1, ZnCl_2) were harvested by centrifugation ($7500 \times g$, 6 min). Pellets were immediately transferred 20 min into liquid nitrogen and then stored at -80°C before RNA extraction. Extractions were performed with TRIzol® (Thermo Fisher) and chloroform after four rounds of freezing/heating at 70°C in TRIzol for cell lysis. RNA was then precipitated with isopropanol, treated with DNase I (Sigma Aldrich, France) to remove DNA contaminations, and cleaned with the RNeasy kit (Qiagen, France). RNA quantity and purity were verified by optical density measurements (OD 260 nm; OD ratio 260/280 and 260/230) and RNA integrity was checked using a Bioanalyseur 2100 (Agilent, CA, USA). These RNA preparations were used for both microarrays and reverse transcription quantitative PCR (RT-qPCR).

II.3.8.2 Microarray analysis

Microarray hybridization and analysis were previously described in Sohm et al. (2015). Briefly, Cy3-labeled cRNA was prepared with low Input Quick Amp WT labeling kits (Agilent, CA, USA) and purified using RNeasy mini spin columns (Qiagen, France). Quantification and measurement of incorporation level of Cy3 was conducted using a NanoDrop ND-1000 (Thermo Scientific, DE, USA) and 825 ng cRNA was used (specific activity > 15 pmol Cy3/ μg cRNA). Labeled cRNA was fragmented and hybridized in the presence of GE Hybridization Buffer HI-RPM (Agilent) to an Agilent custom design microarray (8×15 K slide format, design ID: 020846 from Vijayan et al. 2009) for 17 h at 60°C in a rotation oven (Agilent). Slides were washed successively for 1 min each in GE

wash buffer 1 and 2 (Agilent) and then dried by centrifugation. For each condition, gene expression was determined using four biological replicates hybridized on two slides.

Microarrays were scanned with GenePix 4100 A (Molecular Devices, CA, USA) and background was defined using the local features background median method (GenePix Pro 7 software, Molecular Device). Lowess normalization was applied in R (version 3.3.0) with the LIMMA software package (version 2.16.5) (Bolstad et al. 2003, Smyth et al. 2005). Spots with an expression three-fold lower than the normalized mean background values were filtered out. Four probes for each gene were spotted on arrays. Mean signal of the four probes was calculated. Differentially expressed genes (DEGs) were identified using CARMAweb 1.5 software (Rainer et al. 2006). Data were \log_2 transformed and P-values for DEGs were calculated using a moderated *t*-test (Smyth 2004) and corrected using the Benjamini-Hochberg method (Benjamini 1995) for testing multiple hypotheses. Only genes with corrected p-value $P_{BH \text{ value}} \leq 0.05$ and fold-change $FC_{\log_2} \geq \pm 1$ ($FC \geq \pm 2$) were considered significantly upregulated or downregulated. The data in this publication were deposited in NCBI Gene Expression Omnibus (Edgar et al. 2002) and are accessible through GEO Series accession number GSE102914.

Lists of deregulated genes obtained following the microarray experiment were analyzed as described in Sohm et al. (2015). Two categories of gene ontology (biological processes (BP) and cellular components (CC)), and KEGG pathways were used for pathway analysis using the DAVID Gene Functional Classification Tool (version 6.7 on <https://david.ncifcrf.gov/>). EASE score was set below 0.05 and count threshold was established at 2.0.

II.3.8.3 RT-qPCR analysis

RT-qPCR was performed on 10 genes with different levels of expression. Genes and primers are listed in **Supporting Information Table SII-2**. Primers were designed using Primer3Plus (Untergasser et al., 2007). The cDNA was synthesized using 250 ng RNA, 2.5 μ M random hexamer primers, and SuperScript® III reverse transcriptase according to the manufacturer's instructions (Invitrogen, France). The qPCR reaction was conducted with 12.5 ng cDNA per reaction, 250 nM primers and Fast SYBR® green master mix (Applied Biosystem®, CA, USA) in 20 μ L reaction mixture. Cycling conditions were 20 s at 95°C followed by 40 cycles of 3 s at 95°C and 30 s at 60°C. Specificity of amplification was checked using melting curves generated at the end of reactions and amplicon sizes were verified on agarose gels. Primer

efficiency was set between 90–110%. All PCR amplifications were performed on four biological replicates using the StepOnePlus RT-PCR system (Applied Biosystems®). Gene expression levels were analyzed using the relative quantification method ($\Delta\Delta Ct$) (Livak and Schmittgen 2001). As normalization against multiple reference genes gives more accurate results (Andersen et al. 2004, Vandesompele et al. 2002), geometric means of *rpoC1* and *rplQ* genes were used for normalization. These genes were used as endogenous controls as they are invariant in our microarray data and *rpoC1* has been used as a reference gene (Paz-Yepes et al., 2013). The final treated/control ratio was calculated based on mean ΔCt of biological replicates, and pooled standard deviation based on ΔCt standard deviation of the two reference genes and gene of interest.

II.4 Results and discussion

II.4.1 Characterization of ENM suspensions and behavior in exposure medium

ENMs used in this study were previously fully characterized by several authors (Lewicka et al. 2011, Osmond-McLeod 2014, Wiench et al. 2009). Their characteristics are presented in **Supporting Information Table SII-1 and Figure SII-1**. DLS analyses allowed determination of hydrodynamic size and electrophoretic mobility of ENMs in stock suspensions. These are 517 nm and $+1.17 \mu\text{m}\cdot\text{cm}\cdot\text{V}^{-1}\cdot\text{s}^{-1}$ for Z-COTE and 583 nm and $-1.56 \mu\text{m}\cdot\text{cm}\cdot\text{V}^{-1}\cdot\text{s}^{-1}$ for and Z-COTE HP1. Zinc measurements in fresh stock suspensions after centrifugation on 3-kDa porosity membranes revealed that 8.9 % ($\pm 1.55\%$) of Z-COTE and 3.5 % ($\pm 0.97\%$) of Z-COTE HP1 are under labile Zn form. Behavior analysis of ENMs in exposure medium (**Figure II.1**) highlighted a fast dissolution dynamic of Z-COTE with 30.2 % ($\pm 0.8\%$) labile Zn released after 5 min and an almost complete dissolution after 1 h (78.6 % $\pm 1.9\%$). Z-COTE HP1 presents a slower dissolution dynamic with 19.6 % ($\pm 0.7\%$) labile Zn released after 5 min and 59.3 % ($\pm 6.9\%$) after 5 h.

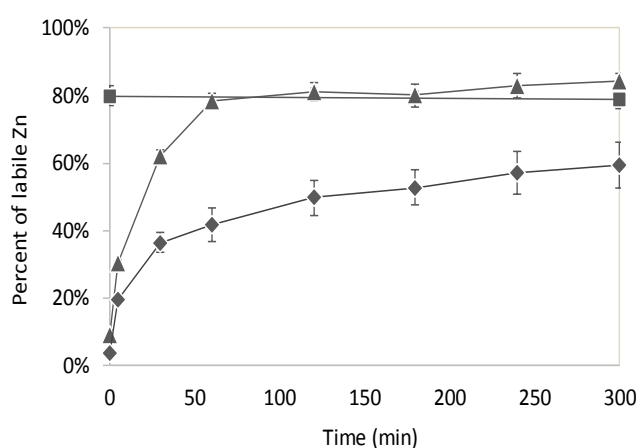


Figure II.1 : Percentage of labile Zn in exposure medium at different times. Z-COTE (triangle), Z-COTE HP1 (diamond), ZnCl₂ (square).

These results are in good agreement with those obtained by several authors showing the rapid dissolution of ZnO nanoparticles in aqueous media Franklin et al. (2007) and the effect of coating agents on their aggregation and solubility (Yin et al. 2014, Yung et al. 2017).

II.4.2 Toxicity assessment of ENMs and ZnCl₂

Effects of ENMs and ZnCl₂ on growth inhibition of *Synechococcus elongatus* were assessed at different concentrations (0, 1, 5 and 10 mg/L) after 72 h exposure (**Figure II.2, A**). Significant effects were observed with Z-COTE and Z-COTE HP1 at 1, 5 and 10 mg/L and with ZnCl₂ at 5 and 10 mg/L. Ethanol used as carrying solvent in ENMs and ZnCl₂ preparations has no noticeable effect compared to controls without contaminant. Based on these results, the concentration of 5 mg/L of ENMs and ZnCl₂ was chosen for all other experiments. Results obtained by flow cytometry after 1 h, 5 h and 24 h exposure to 5 mg/L of contaminants revealed that ZnCl₂ impacts cell membrane potential (24 h), induces loss of membrane integrity/permeability (24 h), an increase in cell lipid peroxidation (1, 5, 24 h) and decreased reductase activity (5 h and 24 h) (**Figure II.2, B-E**). Except for the membrane integrity/permeability, ENMs present the same adverse effects, with a lesser extent, after 24 h exposure.

Effects of ENMs and ZnCl₂ were also assessed on cell pigmentation. *Synechococcus elongatus* PCC 7942 contain several photosynthetic pigments such as chlorophyll *a* (450 and 685 nm), carotenoids (490 nm), and phycobiliproteins (phycocyanin and allophycocyanin, 630 nm) (**Figure II.2, H**). Due to interferences of ENMs with absorbance readings <500 nm (**Figure II.2, H**), effects of contaminants were only assessed on phycobiliproteins at 630 nm and chlorophyll *a* at 685 nm. After data normalization to DO_{730 nm} (cell density), results shows significant increase of pigment concentration in cells exposed to ENMs (5 h and 24 h) and ZnCl₂ (1, 5, 24 h) compared to the control (**Figure II.2, F-G**).

As membrane potential is a crucial element for cell energy production (by both photosynthesis and oxidative phosphorylation), we also investigated the intracellular ATP content in exposed cells. **Figure II.2, I** shows that cells exposed to ENMs and ZnCl₂ exhibit lower ATP contents (~1.2 pmol/mL) compared to unexposed cells (2.45 pmol/mL).

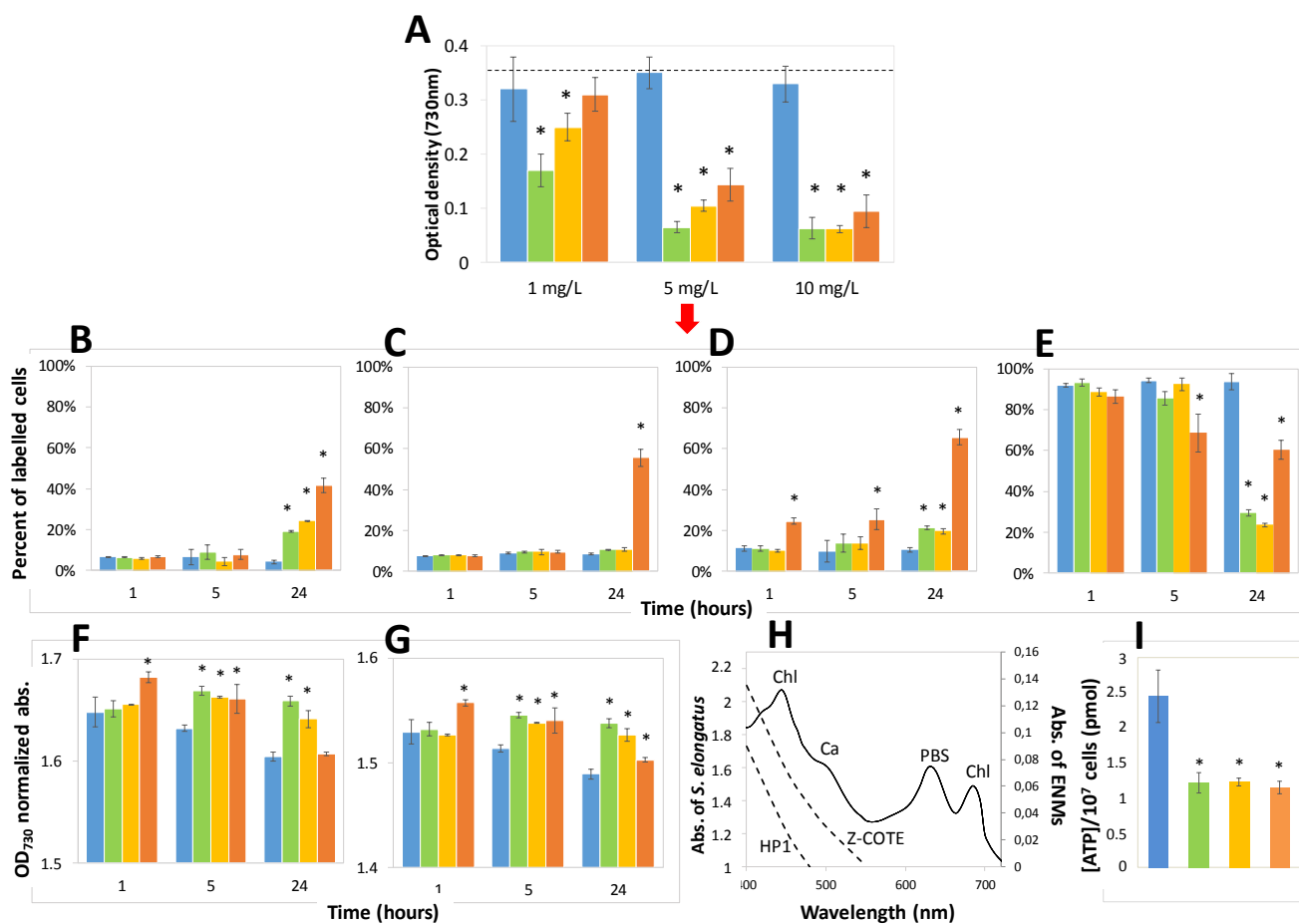


Figure II.2 : Effects of ENMs and ZnCl₂ on (A) cell growth inhibition of *S. elongatus* PCC 7942 at different concentrations after 72 h exposure and at 5 mg/L on (B) membrane potential (DiBAC₄(3)), (C) membrane permeability (SYTOX Green), (D) lipid peroxidation (BODIPY), (E) reductase activity (RedoxSensor Green), (F) phycobilisome pigments (630 nm) and (G) chlorophyll a (685 nm) after 1h, 5h and 24h exposure. (H) Visible spectra of *S. elongatus* PCC 7942 and ENMs. (I) Intracellular ATP contents after 5h exposure to 5mg/L of ENMs and ZnCl₂. Blue: Control with ethanol 96% (carrying solvent), green: Z-COTE, yellow: Z-COTE HP1 and red: ZnCl₂. Values are means of three independent replicates and comparisons were made using one-way ANOVA with a Tukey's post-test (*p < 0.05). In (A) the dot line represents results obtained for the control without ethanol. Chl: Chlorophyll a; Ca: Carotenoid; PBS: phycobilisome.

Globally, both ENMs and ZnCl₂ present close toxicological profiles, which is not really surprising given the dissolution rate of ENMs previously observed. Despite the rapid adsorption of both ENMs on cyanobacterial cell surface after exposure (**Figure II.3**), it seems that the nano-form induces weak adverse effects compared to the labile Zn they release. Moreover, toxicity levels of both ENMs are close, suggesting that the protective role

commonly assigned to the NP coating (Osmond McLeod 2014, Yung et al. 2017) is not significant in our study.

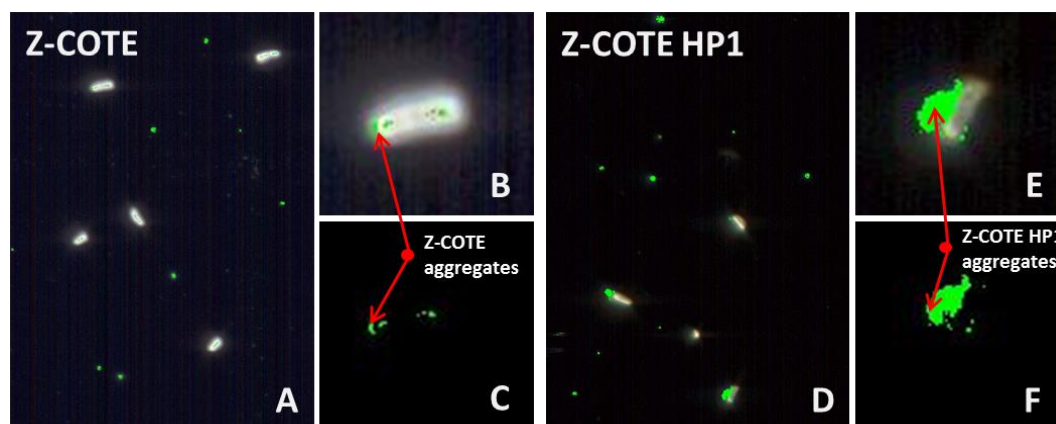


Figure II.3 : *CytoViva hyperspectral imaging of cyanobacterial cells exposed 1 h to 5 mg/L Z-COTE and Z-COTE HP1. (A) Z-COTE exposure with background; (B) zoom on a cyanobacterial cell exposed to Z-COTE; (C) Same image as (B) without background; (D) Z-COTE HP1 exposure with background; (E) zoom on a cyanobacterial cell exposed to Z-COTE HP1; (F) Same image as (E) without background.*

Several studies previously performed to better understand the physiological responses of cyanobacteria to Zinc stress have shown that this metal provokes decrease in pigment contents and in photosystem activity, with the consequent inhibition of growth (De Magalhães et al. 2004, Chaloub et al. 2005, Okmen et al. 2011). However, the mechanism of action leading to these effects remains poorly understood.

II.4.3 Transcriptomic analysis

The microarrays used in this study targeted 2712 genes. After filtering the background noise and data normalization, 2113 genes were analyzed. Of these 2113 genes, 1035 were found deregulated in cyanobacterial cells exposed to Z-COTE (272 upregulated and 763 downregulated), 986 in cells exposed to Z-COTE HP1 (270 upregulated and 716 downregulated), and 1006 in cells exposed to $ZnCl_2$ (264 upregulated and 742 downregulated) ($FC_{\log_2} \geq \pm 1$; p value < 0.05) (**Supporting Information Table SII-3**). Complementary experiments were performed on 10 selected genes by RT-qPCR to validate microarray data. High correlation between data obtained from both approaches (Pearson correlation of 0.96) was obtained (**Supporting Information Figures SII-2 and SII-3**) which reinforced the microarray data quality.

Deeper gene analysis shows that 894 deregulated genes are common to the three contaminants and that only 30 genes are specific to the cell response to both ENMs (**Figure II.4**). 47 genes were found deregulated exclusively by exposure to Z-COTE and 40 by exposure to Z-COTE HP1. The cell response similarities between both ENMs and ZnCl₂ are consistent with the behavior of ENMs in exposure medium and attest that, despite the adsorption of ENMs on cell surface previously shown (**Figure II.3**), toxicological effects are mainly due to labile Zn released.

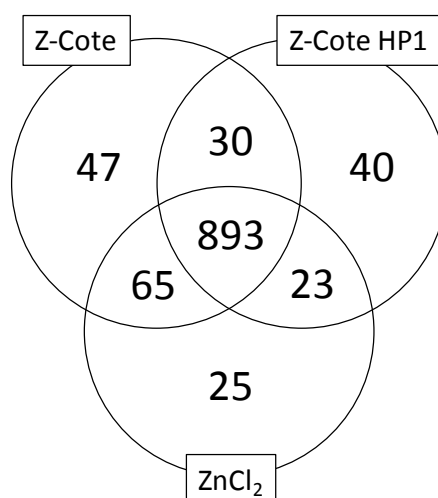


Figure II.4 : *Number of significantly deregulated genes ($P_{BH\ value} \leq 0.05$, $FC_{log2} \geq \pm 1$) after 5 h exposure to 5 mg/L Z-COTE, Z-COTE HP1, or ZnCl₂.*

DAVID analysis, which integrates biological knowledge bases and analytic tools to extract biological meaning from large gene lists (Huang et al., 2008), was performed on deregulated gene lists. 15-20% were recognized and categorized (p-value < 0.05) in 16 KEGG pathways, 9 Cellular Component (CC), and 17 Biological Process (BP) terms (**Table II.1**).

Table II.1 : Functional annotation chart of significantly deregulated genes (up and down, $P_{BH} \text{ value} \leq 0.05$, $FC_{log2} \geq \pm 1$) after 5 h exposure to Z-COTE, Z-COTE HP1 or ZnCl₂. Count: number of annotated genes included in output.

Terms	Z-COTE			Z-COTE HP1			ZnCl ₂		
	Count	p-Value (Ease score <0.05)	Fold Enrichment	Count	p-Value (Ease score <0.05)	Fold Enrichment	Count	p-Value (Ease score <0.05)	Fold Enrichment
KEGG Pathway									
Photosynthesis (antenna proteins)	12	8,3E-06	4.2	13	2,3E-07	5	12	4,4E-06	4.5
Pyruvate metabolism	13	9,0E-05	3.3	12	2,0E-04	3.4	13	4,7E-05	3.5
Two-component system	23	6,8E-08	3.2	21	4,0E-07	3.3	23	2,0E-08	3.4
Oxidative phosphorylation	25	6,4E-08	3.1	23	2,8E-07	3.1	23	5,3E-07	3
Photosynthesis	26	1,5E-05	2.4	23	1,0E-04	2.3	24	5,7E-05	2.3
Cysteine and methionine metabolism	10	3,6E-02	2.1	10	2,0E-02	2.3	10	2,5E-02	2.2
Purine metabolism	18	2,8E-03	2.1	17	2,6E-03	2.2	17	3,8E-03	2.1
Glycolysis/Gluconeogenesis				9	4,4E-02	2.1	10	1,9E-02	2.3
Porphyrin and chlorophyll metabolism	16	6,0E-03	2	14	1,6E-02	2	14	2,2E-02	1.9
Pyrimidine metabolism	13	3,1E-02	1.9	12	3,7E-02	1.9	12	4,6E-02	1.8
Fatty acid biosynthesis	6	2,0E-02	3.4						
DNA replication	7	2,5E-02	2.8						
Nitrogen metabolism	7	3,5E-02	2.6				7	2,6E-02	2.8
Arginine and proline metabolism	10	3,6E-02	2.1				10	2,5E-02	2.2
Mismatch repair / Homologous recombination	8	4,8E-02	2.2						
Selenoamino acid metabolism							7	3,7E-02	2.6
Genes from the list that are in the Kegg Patway output	299/1071			274/1022			299/1053		
Biological Process									
ATP synthesis coupled proton transport	9	6,9E-03	2.9	9	4,2E-03	3.1	9	5,1E-03	3
Transcription initiation (DNA-templated transcription)	9	1,4E-02	2.6	9	9,0E-03	2.8	9	1,1E-02	2.7
Oxidative phosphorylation	13	4,2E-02	1.8	14	9,5E-03	2.1	13	3,0E-02	1.9
Transcription, DNA-dependent	11	4,9E-02	1.9	11	3,0E-02	2.1	11	3,6E-02	2
Nucleoside triphosphate biosynthetic process				10	3,4E-02	2.1	10	4,0E-02	2.1
ATP biosynthetic process				9	4,6E-02	2.1			
RNA biosynthetic process				11	3,7E-02	2	11	4,4E-02	1.9
Protein complex assembly	12	3,1E-02	2	11	4,4E-02	1.9	13	8,0E-03	2.2
Regulation of transcription	52	8,0E-06	1.8	48	2,4E-05	1.8	50	1,0E-05	1.8
Regulation of transcription, DNA-dependent	48	1,1E-05	1.8	44	4,0E-05	1.8	46	1,5E-05	1.8
Transcription	27	1,7E-03	1.8	25	2,9E-03	1.8	27	8,0E-04	1.9
Two-component signal transduction system (phosphorelay)	27	1,2E-03	1.9	24	4,5E-03	1.8	25	3,0E-03	1.8
Photosynthesis	38	4,9E-03	1.5	37	2,3E-03	1.6	35	1,3E-02	1.5
Phosphorylation				24	3,1E-02	1.5			
Macromolecular complex assembly	12	3,7E-02	1.9				13	1,0E-02	2.2
Macromolecular complex subunit organization							14	2,2E-02	1.9
Ribonucleotide biosynthetic process							15	3,9E-02	1.7
Genes from the list that are in the BP output	257/1071			256/1022			267/1053		
Cellular Component									
Proton-transporting ATP synthase complex	9	5,9E-03	2.9	9	2,7E-03	3.2	9	3,3E-03	3.1
Phycobilisome	13	2,1E-03	2.5	13	6,8E-04	2.8	13	9,3E-04	2.7
Photosystem I	9	2,3E-02	2.3	9	1,1E-02	2.6	9	1,4E-02	2.6
Thylakoid membrane	15	1,7E-03	2.3	14	1,7E-03	2.4	14	2,3E-03	2.4
Organelle membrane	15	1,7E-03	2.3	14	1,7E-03	2.4	14	2,3E-03	2.4
Thylakoid part	17	3,6E-03	2	17	9,3E-04	2.3	16	4,0E-03	2.1
Light-harvesting complex	13	4,2E-02	1.8	13	1,7E-02	2	13	2,2E-02	1.9
Photosynthetic membrane	28	2,6E-03	1.7	28	3,2E-04	1.9	27	1,4E-03	1.8
Thylakoid	46	1,2E-05	1.7	43	5,2E-06	1.8	42	3,9E-05	1.7
Genes from the list that are in the CC output	196/1071			189/1022			199/1053		

This analysis showed that for ENMs and ZnCl₂, the most enriched BP terms and KEGG pathways are related to energy production (photosynthesis, oxidative phosphorylation, glycolysis/gluconeogenesis) and DNA metabolic processes in cell, including DNA replication, transcription and repair. The CC terms indicated that Z-COTE, Z-COTE HP1 and ZnCl₂ exposure mostly affect the cellular envelope (both thylakoid and cytoplasmic membranes), which are the place of both photosynthesis and respiration. Different terms classified by DAVID software are discussed in more detail below.

II.4.3.1 Photosynthesis and oxidative phosphorylation

In cyanobacteria, the thylakoid membranes are the major sites of both photosynthesis and respiratory electron transport (**Figure II.5**) (for review see Vermaas 2001, Lea-Smith et al. 2016). This proximity allows electrons to switch from a pathway to another (Liu et al. 2012 and 2013). Some electron transport components (cyt $_{b6f}$, PQ and PC) are functionally shared by both pathways (Vermaas 2001, Pescheck et al. 2004) ensuring highly efficient electron flow in the cell (Liu 2016).

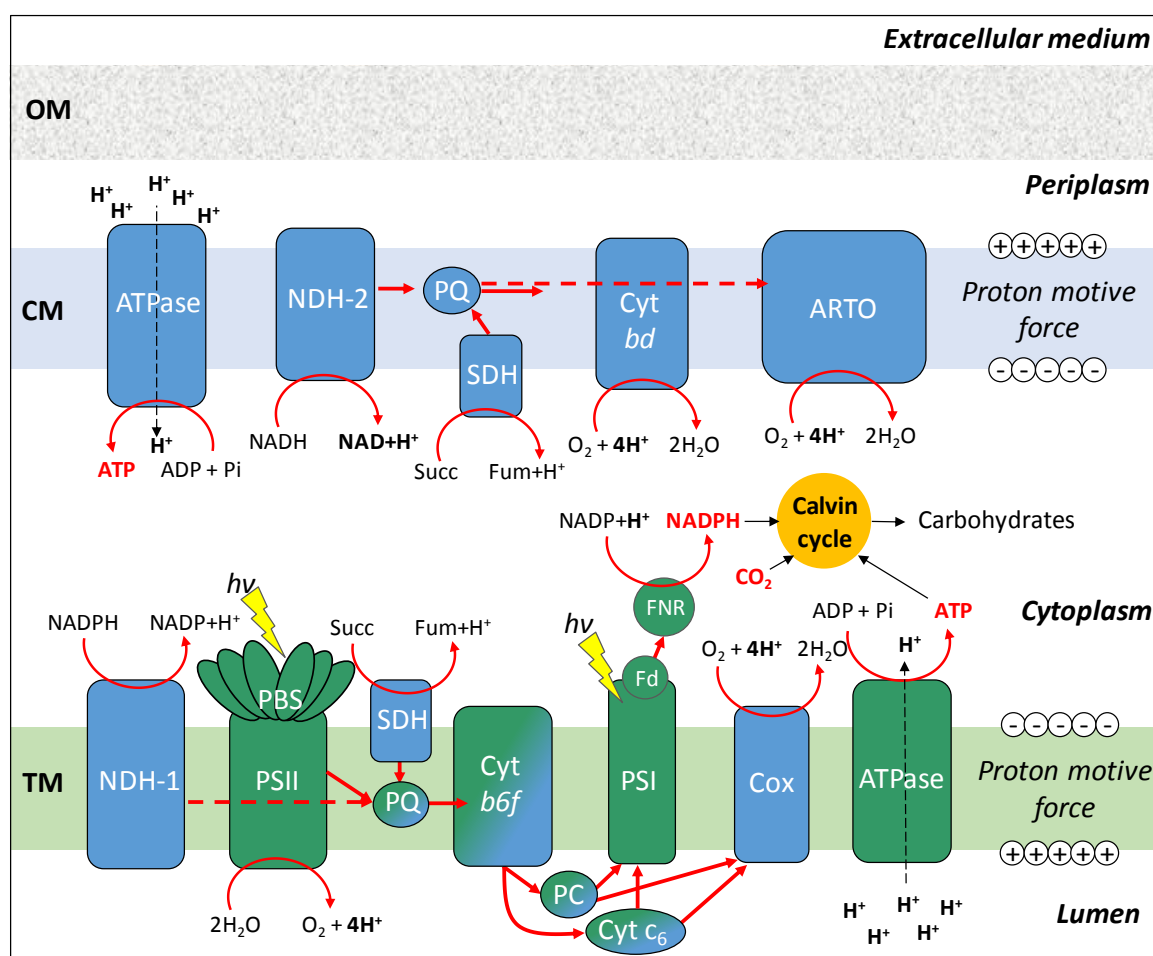


Figure II.5 : Schematic representation of photosynthetic (green) and respiratory (blue) electron transfer chains in thylakoid and cytoplasmic membranes. PSI and PSII: photosystem I and II; PBS: phycobilisome; PQ: plastoquinone; PC: plastocyanin; Fd: ferredoxin; FNR: ferredoxin-reductase; Cyt c_6 : cytochrome c_6 ; NDH-1 and NDH-2: NAD(P)H dehydrogenase 1 and 2; SDH: succinate dehydrogenase; Cyt b_6f : cytochrome b_6f complex; Cox: cytochrome c oxidase; ARTO: alternative respiratory terminal oxidase; Cyt bd : cytochrome bd -quinol oxidase. (inspired from Vermaas 2001, Lea-Smith et al. 2016)

In presence of light, the electron flow is higher in photosynthesis than in the respiratory chain, but at low light intensity or in darkness, this phenomenon is reversed (Vermaas 2001).

During photosynthesis, light is harvested by phycobilisomes (PBSs), a complex attached to the outer surface of thylakoid membranes, and chlorophyll-based photosystems (PSI and PSII) embedded in the thylakoid membranes. PBSs are giant supramolecular complexes (up to 3000-7000 KDa) that contains phycobiliproteins such as phycocyanin (PC) and allophycocyanin (AP). PBSs supply excitation to photosystem II that oxidizes water to oxygen and protons and reduces plastoquinone (PQ). Electrons are then transported from the PQ pool to the cytochrome *b6f* complex (Cyt *b6f*) and from there to plastocyanin (PC), a soluble electron carrier on the luminal side of the thylakoid membrane, which in turn reduces PSI (Vermaas 2001). Electron is then transferred from PSI through ferredoxin (Fd) to the ferredoxin-NADP⁺ reductase (FNR), leading to conversion of NADP⁺ to NADPH on the PSI cytoplasmic side. NADP⁺ can be used as a cofactor for carbon fixation in the Calvin cycle. The proton motive force generated by photosynthesis is essential for ATP synthase activity that translocate protons through the thylakoid membrane. In a same way, this proton motive force is necessary for ATP production during cell respiration. This pathway is unclear in cyanobacteria (Vermaas 2001) and it seems that type I NADPH dehydrogenase (NDH-1), succinate dehydrogenase (SDH) and possibly one of the type II NADPH dehydrogenase (NDH-2) may participate in PQ pool reduction (Ermakova et al. 2016). In *Synechocystis* sp. PCC 6803 it was shown that the main respiratory electron transport activity into the PQ pool involves SDH (Cooley et al. 2000). As for photosynthesis, electrons are transported from the PQ pool to the cytochrome *b6f* complex and from there to plastocyanin (PC) and cytochrome *c*₆ (Cyt *c*₆). Finally, the cytochrome *c* oxidase (Cox) complex accepts electrons from both PC and Cyt *c*₆ and contributes to the proton motive force necessary to the ATP synthase activity. An alternative respiratory electron transport chain is also localized in the cytoplasmic membrane (**Figure II.5**). It is likely that this pathway consists of electrons donated to PQ by NDH-2 and/or SDH, followed by electron transfer to bd-quinol oxidase (cyt *bd*) and/or alternative respiratory terminal oxidase (ARTO) (Lea Smith et al. 2016). ATP synthase is also present (Huang et al. 2002, Pisareva et al. 2007), suggesting that the membrane potential is formed.

Deeper analysis of our transcriptomic data revealed that both ENMs and ZnCl₂ induce down-regulation of genes encoding all major AP (*apcA*, *apcB*, *apcC*, *apcD*, *apcE*, *apcF*) and PC (*cpcA*, *cpcB*, *cpcC*, *cpcD*, *cpcE*, *cpcG*) components, suggesting a probable slowdown of the PBS synthesis (**Supporting Information Tables SII-3 and SII-4**). Several genes encoding components of the PSII (*psbO*, *psbX*, *psbY*, *psb27*, *psb28*) and PSI are also found

downregulated (*psaC*, *psaD*, *psaE*, *psaF*, *psaJ*, *psaK*, *psaL*). Genes encoding the PSI seems to be more affected than those encoding the PSII (FC_{\log_2} between -2.45 and -4.42 for PSI and between -1.06 and -2.84 for PSII). Note that gene *nblA* which is responsible for the degradation of the phycobilisome (*synpcc7942_2127*) is meanwhile highly upregulated (FC_{\log_2} between 3.94 and 4.19) (**Supporting Information Table SII-3**). Other genes encoding some constituents of the photosynthesis process, such as Cyt c_6 (*petJ*), Fd (*petF*), FNR (*petH*), *cytb_f* (*petD* and *petC*) and those encoding the ATP synthase (genes encoding α , β , γ , δ and a, b, c from the F1 and F0 ATPase complex, respectively) involved in both photosynthesis and respiration, are also found downregulated. Expression of those encoding PC (*petE*, *synpcc7942_1088*) and PQ (*synpcc7942_1344*) are not significantly affected by the contaminant exposure (**Supporting Information Table SII-3**). Genes encoding several other components of the respiratory chain are also found deregulated, such as those encoding the NDH-1 complex (*ndhA*, *ndhD*, , *ndhF*, *ndhH*, *ndhI*, *ndhJ*, *ndhM*, *ndhN*, *hoxU*), Cox (*coxA*, *coxB*, *coxC*, *cox15*, *cyoE*) and the Cyt bd (*cydA*) (**Supporting Information Tables SII-3 and SII-4**).

ATP and NADPH generated by the photosynthetic complex are used by the Calvin cycle to fix CO_2 and produce carbohydrates. These carbohydrates will be converted by series of reactions into pyruvate *via* the glycolysis pathway and will generate various intermediates and molecules that will function as substrates in additional pathways, such as gluconeogenesis, pentose phosphate pathway, fatty acid metabolism, and the TCA. Glycolysis, gluconeogenesis and fatty acid biosynthesis pathways previously categorized by the DAVID analysis (**Table II.1**) are also found severely deregulated in cells exposed to ENMs and $ZnCl_2$.

II.4.3.2 DNA metabolic processes

Microarray data show an effect of ENMs and $ZnCl_2$ on DNA replication and homologous recombination. Several genes encoding subunits of DNA polymerase III, which is the primary enzyme responsible for replication, are found downregulated in presence of contaminants, such as those encoding the alpha (*synpcc7942_2199*; FC_{\log_2} between -2.15 and -2.17) and beta (*synpcc7942_0001*; FC_{\log_2} between -1.30 and -1.55) subunits (**Supporting Information Table SII-3**). The alpha subunit is responsible for the DNA polymerase activity. At the opposite gene encoding delta (*synpcc7942_0405*) and epsilon (exonuclease activity) (*synpcc7942_0251*) subunits are upregulated (FC_{\log_2} between 1.93 and 2.49 , and between 2.0

and 2.18, respectively). Gene encoding the DNA polymerase I (Pol I) (synpcc7942_0194) and single-strand binding protein (synpcc7942_0301) involved in *replication as well as DNA recombination and repair* are also found downregulated (FC_{\log_2} between -1.21 and -1.27 , and between -1.98 and -2.09 , respectively). This is also the case for *recA* (synpcc7942_0348) (FC_{\log_2} between -1.61 and -1.82) that encodes protein involved in the *SOS* response.

At the opposite, other DNA repair mechanisms, such as mismatch repair (MMR) and base excision repair (BER) are rather induced in exposed cells. Gene *mutL* (synpcc7942_1780) (FC_{\log_2} between 1.86 and 2.16) encodes a protein key of the MMR mechanism that mediates protein-protein interactions during mismatch recognition, strand discrimination, and strand removal (Guarné 2012). Gene encoding the DNA adenine methylase (synpcc7942_1790), known to instruct MMR repair and require *mut* gene products, as well as the excision/resynthesis machinery (*e.g.* DNA polymerase III holoenzyme, DNA ligase, single-stranded DNA binding protein, and single-stranded DNA exonucleases) (Fishel 1998) is also upregulated (FC_{\log_2} between 1.52 and 1.82). For the BER mechanism, the DNA-3-methyladenine glycosylase (synpcc7942_0669) that recognizes a variety of base lesions and initiates the process of BER for damaged DNA (David et al. 2007), and the endonuclease III (synpcc7942_0447), that targets damaged pyrimidines, are both upregulated (FC_{\log_2} between 1.05 and 1.11, and between 1.01 and 1.19, respectively).

Regarding the impact of ENMs and $ZnCl_2$ on transcription regulation revealed by the GO Biological Process category, numerous deregulated genes encoding sigma factor have been identified (**Supporting Information Table SII-3**). Genes *sigF* (Synpcc7942_1784) and *sigC* (synpcc7942_1849) are among the most downregulated genes of the microarray (FC_{\log_2} between -5.17 and -5.36 , and between -4.42 and -4.68 , respectively). Genes *sigA* (Synpcc7942_1557), *sigB* ((Synpcc7942_1746) are also downregulated, whereas *sigD* (Synpcc7942_0642) is the only one to be upregulated (FC_{\log_2} between 2.66 and 3.06). Gene *sigA* is known to encode the primary sigma factor (Group 1) essential for cell viability and responsible for the transcription of genes expressed during the exponential-growth phase (Tuominen et al. 2003, Imamura and Asayama 2009). Gene *sigA* is generally rapidly downregulated in stress conditions like heat or high salinity. Genes *sigB*, *sigC* and *sigD* encode sigma factor from the Group 2 with unclear function. Some of them might be involved in the adaptation of cyanobacteria to the long-term starvation of nitrogen, carbon, or sulfur (Tuominen et al. 2003). In *S. elongatus* PCC 7942 it has been shown that these sigma factors

affect the settings of the circadian clock (Nair et al. 2002). Gene *sigF* encodes sigma factor belonging to the group 3 involved in the transcription of specific regulons expressed for survival under stress conditions (Tuominen et al. 2003, Imamura and Asayama 2009).

II.4.3.3 Oxidative stress

Oxidative stress has not been categorized by DAVID analysis but is known as an important toxicity feature of both Zn (Shilpi et al. 2015) and ZnO nanomaterials (For review see Peng et al. 2017). Zn acts as a co-factor for important enzymes that contribute to the proper functioning of the antioxidant defense system, but it can also act as a pro-oxidant when its concentration is in excess (Shilpi et al. 2015). ZnO-NPs can also induce release of reactive oxygen species (ROS). Due to photocatalytic properties of these ENMs, ROS generation can be greatly increased in presence of light (Yang and Ma 2014), but can also be significantly reduced by coating agent such as the triethoxycaprylylsilane (Yin et al. 2014). Cyanobacteria have developed various enzymatic (*e.g.* catalases, superoxide dismutases and peroxidases) and non-enzymatic (*e.g.* carotenoids, vitamins) defense mechanisms against ROS (For review see Latifi et al. 2009). A central element of the antioxidant defense systems in cyanobacterial cells is represented by peroxiredoxins (Prx), which are part of the antioxidant defense system and the dithiol–disulfide redox regulatory network of cyanobacterial cells (Schmitt et al. 2014). When the level of oxidant is greater than the level of antioxidant production, cells have to face a variety of ROS-related damages (Latifi et al. 2009). In addition to peroxiredoxins, other enzymes (*e.g.* thioredoxins, glutaredoxins) are required for the regulation of the thiol-redox state (Latifi et al. 2009).

Targeted analysis of our microarray data revealed that several genes encoding ROS-scavenging enzymes are significantly deregulated during exposure to ENMs and ZnCl₂ (**Supporting Information Tables SII-3 and SII-5**). Genes encoding catalase-peroxidase (Synpcc7942_1656), thioredoxin (Synpcc7942_1830) and a glutaredoxin-related protein (Synpcc7942_1145) are downregulated, whereas those encoding glutathione peroxidase (Synpcc7942_1214), glutaredoxin GrxC (Synpcc7942_2323), rubrerythrin (Synpcc7942_1649) and superoxide dismutase (Synpcc7942_0801) are found upregulated. Some slight differences are observed between contaminants such as gene Synpcc7942_2449 encoding a peroxidase only deregulated by Z-COTE and the superoxide dismutase that is found upregulated by both ENMs. The superoxide dismutase is the major scavenger of O₂^{·-}

which has been shown as one of the three types of ROS (*i.e.* $^1\text{O}_2$, $\cdot\text{OH}$, and $\text{O}_2\cdot^-$) generated by ZnO-NPs in water/mineral medium (Li et al. 2014). The unexpected generation of $\text{O}_2\cdot^-$ was also previously demonstrated by Li et al. (2012) and should be due to their n-type semiconductor properties (Peng et al. 2017).

Production of ROS by ENMs and ZnCl_2 is consistent with our previous data. Indeed, ROS can adversely affect many cellular functions by damaging cell components (*e.g.* nucleic acids and photosystems), inhibiting DNA replication, oxidizing proteins, and causing lipid peroxidation. Lipid peroxidation caused by ROS is considered as the most cellular damaging process that occurs in every living organism (Shilpi et al. 2015).

II.4.3.4 Zinc homeostasis

Zinc is an important cofactor of numerous enzymes but it can also be toxic for cells at elevated concentrations by interfering with biological pathways (Alhasawi et al. 2014). In cyanobacteria the most important and abundant enzymes for CO_2 fixation is the carbonic anhydrase, a zinc metalloenzyme that catalyzes the CO_2 hydration to bicarbonate (Smith and Ferry 2000, Napolitano et al. 2012). Zinc homeostasis is therefore an important process in microorganisms achieved through the balance of active uptake and efflux by specific membrane transporters, and proteins mediating the handling of intracellular zinc (Hantke 2005, Blindauer 2008, Barnett et al. 2012). The zinc-specific high affinity ABC transporter ZnuABC has been identified in *Synechocystis* sp. PCC 6803 for the active uptake of zinc from the periplasm (Cavet et al. 2003). Metal ions diffusing freely through porins in the outer membrane (Barnett et al. 2012). In order to control excess Zn, some cyanobacteria, such as *Synechocystis* sp. PCC 6803, use a zinc-specific efflux pump to transport ionic Zn from the cytoplasm to the periplasmic space (Thelwell et al. 1998). Some other cyanobacteria, such as *S. elongatus* PCC7942, have the SmtA class II metallothionein that binds Zn and other metal ions to detoxify the cytoplasm (Morby et al. 1993, Turner and Robinson 1995). Expression of this metallothionein is regulated by the zinc-responsive transcriptional repressor SmtB belonging to the ArsR superfamily of prokaryotic metalloregulatory transcription factors (Morby et al. 1993). In the absence of heavy metal ions, the transcription of *smtA* is repressed through the binding of SmtB to the promoter region of *smtA* located between genes *smtA* and *smtB*. In the presence of heavy metal ions, the complex formation between SmtB and its target DNA sequence is inhibited and transcription of *smtA* is induced (Morita et al. 2012). Our microarray analysis revealed down regulation of *smtB* (Synpcc7942_1291) ($\text{FC}_{\log 2}$ between –

1.45 and -1.55) in cells exposed to both ENMs and ZnCl₂ (**Supporting Information Table SII-3**). Surprisingly, gene *smtA* (Synpcc7942_1290) encoding the metallothionein was not found upregulated in exposed cells. However, this gene is the most abundantly expressed in our microarray data (control and exposed cells), suggesting that SmtA is already highly produced by cells even without contaminant. This can be explained by the initial Zn concentration (7.65 μM) present in BG11 medium used for cell growth. Presence of other metals in BG11 micronutrient solution (Fe, Cu, Bo, Co, Mn, Mo) can also induce the metallothionein synthesis. Indeed, previous studies have shown that the *smtA* promoter of *Synechococcus* PCC 7942 is inducible by Zn, Cd, Cu, Cr, Co, Ni, Pb, Hg and Ag (Huckle et al., 1993; Martin-Betancor et al., 2015). These metals caused increased abundance of *smtA* transcript in the presence of 1–5 μM metal (Huckle et al. 1993).

II.5 Conclusion

The present paper examines the adverse effects of two ZnO ENMs (coated and uncoated) commonly used as UV-filter in cosmetics and sunscreens, and ZnCl₂ as ionic control, on the cyanobacteria *Synechococcus elongatus* PCC7942. It was shown that despite the adsorption of ENMs on cell surfaces, main observed effects are mainly due to labile Zn they rapidly release in the medium. The use of several complementary techniques allowed the proposition of a Zn mechanism of action that can be described as follow: Zn dissipates the cell membrane potential necessary for both photosynthesis and respiration, and induces oxidative stress leading to lipid peroxidation and DNA damages. It lead to global down regulation of photosystems, oxidative phosphorylation, and transcription/translation machineries. This also translates into a significant decrease of the intracellular ATP content and by cell growth inhibition. However, it seems that there is no major loss of pigments and even rather an increase in exposed cells compared to the control.

Given the variety of anthropogenic sources of zinc release in the environment, including mine drainage and industrial processes, this element is a major contaminant of freshwater ecosystems. It was designated by the U.S. EPA as a priority pollutant. The growing use of ZnO-NPs in a broad range of skin care products will lead to an increased concentration of Zn in wastewater effluents and ultimately in the environment. The problem will be the same in bathing area due to the extensive use of ZnO-NPs in sunscreens. Studies have shown that labile Zn released by ZnO-NPs is a key factor of toxicity in aquatic (micro)organisms. Therefore, an interesting alternative to limit the environmental impact could be the improvement of the coating stability to prevent their solubility.

Acknowledgements

The authors thank the ANR (Agence Nationale pour la Recherche) for funding the project (ANR P2N Mesonnet).

II.6 References

A

- Alhasawi A, Auger C, Appanna VP, Chahma M, Appanna VD (2014) *Zinc toxicity and ATP production in Pseudomonas fluorescens*. J Appl Microbiol 117:65–73.
- Andersen CL, Jensen JL, Orntoft TF (2004) Normalization of real-time quantitative reverse transcription-PCR data: a model-based variance estimation approach to identify genes suited for normalization, applied to bladder and colon cancer data sets. Cancer Res 64:5245–5250.

B

- Barnett JP, Millard A, Ksibe AZ, Scanlan DJ, Schmid R, Blindauer CA (2012) Mining genomes of marine cyanobacteria for elements of zinc homeostasis. Front Microbiol 3:142.
- Benjamini YHY (1995) Controlling the false discovery rate: a practical and powerful approach to multiple testing. J Royal Stat Soc 57:289–300.
- Blaise C, Gagné F, Féraud JF, Eullaffroy P (2008) Ecotoxicity of selected nano-materials to aquatic organisms. Environ Toxicol 23:591–598.
- Blindauer CA (2008) Zinc-handling in cyanobacteria: an update. Chem Biodivers 5:1990–2013.
- Bolstad BM, Irizarry RA, Astrand M, Speed TP (2003) A comparison of normalization methods for high density oligonucleotide array data based on variance and bias. Bioinformatics 19:185–193.

C

- Cavet JS, Borrelly GPM, Robinson NJ (2003) Zn, Cu and Co in cyanobacteria: selective control of metal availability. FEMS Microbiol Rev 27:165–181.
- Chaloub RM, Magalhães CCP, Dos Santos CP (2005) Early toxic effects of Zinc on PSII of *Synechocystis aquatilis f. aquatilis* (cyanophyceae). J Phycol 41:1162–1168.
- Chen Y, Kay Holtman C, Magnuson RD, Youderian PA, Golden SS (2008) The complete sequence and functional analysis of pANL, the large plasmid of the unicellular freshwater cyanobacterium *Synechococcus elongatus* PCC 7942. Plasmid 59:176–192.
- Cooley JW, Howitt CA, Vermaas WF (2000) Succinate:quinol oxidoreductases in the cyanobacterium *Synechocystis* sp. strain PCC 6803: presence and function in metabolism and electron transport. J Bacteriol 182:714–722.
- Cui Y, Zhao Y, Tian Y, Zhang W, Lü X, Jiang X (2012) The molecular mechanism of action of bactericidal gold nanoparticles on *Escherichia coli*. Biomaterials 33:2327–2333.

D

- Danovaro R, Bongiorno L, Corinaldesi C, Giovannelli D, Damiani E, Astolfi P, Greci L, Pusceddu A (2008) Sunscreens cause coral bleaching by promoting viral infections. *Environ Health Persp* 116:441–447.
- David SS, O’Shea VL, Kundu S (2007) Base-excision repair of oxidative DNA damage. *Nature* 447:941–950.
- De Magalhães CCP, Cardoso D, Dos Santos CP, Chaloub RM (2004) Physiological and photosynthetic responses of *Synechocystis aquatilis f. aquatilis* (Cyanophyceae) to elevated levels of zinc. *J Phycol* 40:496–504.
- Dewez D, Oukarroum A (2012) Silver nanoparticles toxicity effect on photosystem II photochemistry of the green alga *Chlamydomonas reinhardtii* treated in light and dark conditions. *Toxicol Environ Chem* 94:1536–1546.
- Downs CA, Kramarsky-Winter E, Fauth JE, Segal R, Bronstein O, Jeger R, Lichtenfeld Y, Woodley CM, Pennington P, Kushmaro A, Loya Y (2014) Toxicological effects of the sunscreen UV filter, benzophenone-2, on planulae and in vitro cells of the coral, *Stylophora pistillata*. *Ecotoxicology* 23:175–191.

E

- Edgar R, Domrachev M, Lash AE (2002) Gene Expression Omnibus: NCBI gene expression and hybridization array data repository. *Nucleic Acids Res* 30:207–210.
- Ermakova M, Huokko T, **Richaud P**, Bersanini L, Howe CJ, Lea-Smith DJ, Peltier G, Allahverdiyeva Y (2016) Distinguishing the roles of thylakoid respiratory terminal oxidases in the cyanobacterium *Synechocystis sp.* PCC 6803. *Plant Physiol* 171:1307–1319.

F

- Fishel R (1998) Mismatch repair, molecular switches, and signal transduction. *Genes Dev* 12:2096–2101.
- Franklin NM, Rogers NJ, Apte SC, Batley GE, Gadd GE, Casey PS (2007) Comparative toxicity of nanoparticulate ZnO, bulk ZnO, and ZnCl₂ to a freshwater microalga (*Pseudokirchneriella subcapitata*): The importance of particle solubility. *Environ Sci Technol* 41:8484–8490.

G

- Guarné A (2012) The functions of MutL in mismatch repair: the power of multitasking. *Prog Mol Biol Transl* 110:41–70.
- Gulson B, McCall M, Korsch M, Gomez L, Casey P, Oytam Y, Taylor A, McCulloch M, Trotter J, Kinsley L, Greenoak G (2010) Small amounts of zinc from zinc oxide particles in sunscreens applied outdoors are absorbed through human skin. *Toxicol Sci* 118:140–149.

H

- Hagström A, Azam F, Andersson A, Wikner J, Rassoulzadegan F (1988) Microbial loop in an oligotrophic pelagic marine ecosystem: possible roles of cyanobacteria and nanoflagellates in the organic fluxes. *Mar ecol* 49:171–178.
- Hantke K (2005) Bacterial zinc uptake and regulators. *Curr Opin Microbiol* 8:196–202.
- Holtman CK (2005) High-Throughput Functional Analysis of the *Synechococcus elongatus* PCC 7942 Genome. *DNA Res* 12:103–115.
- Huang F, Parmryd I, Nilsson F, Persson AL, Pakrasi HB, Andersson B, Norling B (2002) Proteomics of *Synechocystis* sp. strain PCC 6803: identification of plasma membrane proteins. *Mol. Cell. Proteomics* 1:956–966.
- Huang DW, Sherman BT, Lempicki RA (2008) Systematic and integrative analysis of large gene lists using DAVID bioinformatics resources. *Nat Protoc* 4:44–57.
- Huckle JW, Morby AP, Turner JS, Robinson NJ (1993) Isolation of a prokaryotic metallothionein locus and analysis of transcriptional control by trace metal ions. *Mol Microbiol* 7:177–187.

I

- Imamura S, Asayama M (2009) Sigma factors for cyanobacterial transcription. *Gene Regul Syst Bio* 3:65–87.

K

- Krause M, Klit A, Blomberg Jensen M, Søbørg T, Frederiksen H, Schlumpf M, Lichtensteiger W, Skakkebaek NE, Drzewiecki KT (2012) Sunscreens: are they beneficial for health? An overview of endocrine disrupting properties of UV-filters: Sunscreens and their adverse effects. *Int J Androl* 35:424–436.

L

- Labille J, Feng J, Botta C, Borschneck D, Sammut M, Cabie M, Auffan M, Rose J, Bottero J-Y (2010) Aging of TiO₂ nanocomposites used in sunscreen. Dispersion and fate of the degradation products in aqueous environment. *Environ Pollut* 158:3482–3489.
- Latifi A, Ruiz M, Zhang C-C (2009) Oxidative stress in cyanobacteria. *FEMS Microbiol Rev* 33:258–278.
- Lea-Smith DJ, Bombelli P, Vasudevan R, Howe CJ (2016) Photosynthetic, respiratory and extracellular electron transport pathways in cyanobacteria. *BBA-Bioenergetics* 1857:247–255.
- Lewicka ZA, Benedetto AF, Benoit DN, Yu WW, Fortner JD, Colvin VL (2011) The structure, composition, and dimensions of TiO₂ and ZnO nanomaterials in commercial sunscreens. *J Nanopart Res* 13:3607–3617.
- Li Y, Zhang W, Niu J, Chen Y (2012) Mechanism of photogenerated reactive oxygen species and correlation with the antibacterial properties of engineered metal-oxide nanoparticles. *ACS Nano* 6:5164–5173.
- Li Y, Niu J, Zhang W, Zhang L, Shang E (2014) Influence of aqueous media on the ROS-mediated toxicity of ZnO nanoparticles toward green fluorescent protein-expressing *Escherichia coli* under UV-365 irradiation. *Langmuir* 30:2852–2862.
- Liu LN, Bryan SJ, Huang F, Yu J, Nixon PJ, Rich PR, Mullineaux CW (2012) Control of electron transport routes through redox-regulated redistribution of respiratory complexes. *Proc Natl Acad Sci USA* 109:11431–11436.
- Liu LN, Zhang H, Niedzwiedzki DM, Prado M, He G, Gross ML, Blankenship RE (2013) Phycobilisomes supply excitations to both photosystems in a megacomplex in cyanobacteria. *Science* 342:1104–1107.
- Liu LN (2016) Distribution and dynamics of electron transport complexes in cyanobacterial thylakoid membranes. *Biochem Biophys Acta* 1857:256–265.
- Livak KJ, Schmittgen TD (2001) Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2⁻ $\Delta\Delta$ CT method. *Methods* 25:402–408.

M

- Martin-Betancor K, Rodea-Palomares I, Munoz-Martin MA, Leganes F, Fernandez-Pinas F (2015) Construction of a self-luminescent cyanobacterial bioreporter that detects a broad range of bioavailable heavy metals in aquatic environments. *Front Microbiol* 6:186.

Morby AP, Turner JS, Huckle JW, Robinson NJ (1993) SmtB is a metal-dependent repressor of the cyanobacterial metallothionein gene *smtA*: identification of a Zn inhibited DNA-protein complex. *Nucleic Acids Res* 21:921–925.

Morita EH, Kawamoto S, Abe S, Nishiyama Y, Ikegami T, Hayashi H (2012) Comparative study of the different mechanisms for zinc ion stress sensing in two cyanobacterial strains, *Synechococcus* sp. PCC 7942 and *Synechocystis* sp. PCC 6803. *Biophysics* 8:103–109.

N

Nair U, Ditty JL, Min H, Golden SS (2002) Roles for sigma factors in global circadian regulation of the cyanobacterial genome. *J Bacteriol* 184:3530–3538.

Napolitano M, Rubio MA, Santamaría-Gómez J, Olmedo-Verd E, Robinson NJ, Luque I (2012) Characterization of the response to zinc deficiency in the cyanobacterium *Anabaena* sp. strain PCC 7120. *J Bacteriol* 194:2426–2436.

Nohynek GJ, Lademann J, Ribaud C, Roberts MS (2007) Grey Goo on the Skin? Nanotechnology, Cosmetic and Sunscreen Safety. *Crit Rev Toxicol* 37:251–277.

O

Okmen G, Bozanta E, Ugur A, Ceyhan N (2011) Zinc effect on chlorophyll a, total carbohydrate, total protein contents and biomass of cyanobacterial species. *J Appl Biol Sci* 5:67–73.

Osmond McLeod MJ (2014) Surface coatings protect against the in vitro toxicity of zinc oxide nanoparticles in human hepatic stellate cells. *J Nanomed Nanotechnol* 05 doi:10.4172/2157-7439.1000232.

P

Paz-Yepes J, Brahamsha B, Palenik B (2013) Role of a Microcin-C-like biosynthetic gene cluster in allelopathic interactions in marine *Synechococcus*. *Proc Natl Acad Sci USA* 110:12030–12035.

Peng C, Zhang W, Gao H, Li Y, Tong X, Li K, Zhu X, Wang Y, Chen Y (2017) Behavior and potential impacts of metal-based engineered nanoparticles in aquatic environments. *Nanomaterials* 7:21.

Pereira MM, Mouton L, Yéprémian C, Couté A, Lo J, Marconcini JM, Ladeira LO, Raposo NR, Brandão HM, Brayner R (2014) Ecotoxicological effects of carbon nanotubes and cellulose nanofibers in *Chlorella vulgaris*. *J Nanobiotechnol* 12:15.

Peschek GA, Obinger C, Paumann M (2004) The respiratory chain of blue-green algae (cyanobacteria). *Physiol Plantarum* 120:358–369.

Pisareva T, Shumskaya M, Maddalo G, Ilag L, Norling B (2007) Proteomics of *Synechocystis* sp. PCC 6803. Identification of novel integral plasma membrane proteins. *FEBS J* 274:791–804.

Polonini HC, Brandão HM, Raposo NRB, Brandão MAF, Mouton L, Couté A, Yéprémian C, Sivry Y, Brayner R (2015) Size-dependent ecotoxicity of barium titanate particles: the case of *Chlorella vulgaris* green algae. *Ecotoxicology* 24:938–948.

PROSPEcT (2010) Ecotoxicology test protocols for representative nanomaterials in support of the OECD sponsorship programme.

R

Rainer J, Sanchez-Cabo F, Stocker G, Sturm A, Trajanoski Z (2006) CARMAweb: comprehensive R- and bioconductor-based web service for microarray data analysis. *Nucleic Acids Res* 34:W498–W503.

Rodea-Palomares I, Gonzalo S, Santiago-Morales J, Leganés F, García-Calvo E, Rosal R, Fernández-Piñas F (2012) An insight into the mechanisms of nanocerium toxicity in aquatic photosynthetic organisms. *Aquat Toxicol* 122–123:133–143.

S

Schmitt F-J, Renger G, Friedrich T, Kreslavski VD, Zharmukhamedov SK, Los DA, Kuznetsov VV, Allakhverdiev SI (2014) Reactive oxygen species: Re-evaluation of generation, monitoring and role in stress-signaling in phototrophic organisms. *BBA-Bioenergetics* 1837:835–848.

Shilpi G, Shilpi S, Sunita S (2015) Tolerance against heavy metal toxicity in cyanobacteria: role of antioxidant defense system. *Int J Pharm Pharm Sci* 7:9–16.

Singh NK, Sonani RR, Rastogi RP, Madamwar D (2015) The phycobilisomes: an early requisite for efficient photosynthesis in cyanobacteria. *EXCLI J* 14:268–289.

Smith K.S., Ferry J.G., 2000. Prokaryotic carbonic anhydrases. *FEMS Microbiol. Rev.*, 24, 335–366.

Smyth GK (2004) Linear models and empirical bayes methods for assessing differential expression in microarray experiments. *Stat Appl Genet Mol Biol* 3:1–25.

Sohm B, Immel F, Bauda P, Pagnout C (2015) Insight into the primary mode of action of TiO₂ nanoparticles on *Escherichia coli* in the dark. *Proteomics* 15:98–113.

T

- Thelwell C, Robinson NJ, Turner-Cavet JS (1998) An SmtB-like repressor from *Synechocystis* PCC 6803 regulates a zinc exporter. *Proc Natl Acad Sci USA* 95:10728–10733.
- Tuominen I, Tyystjärvi E, Tyystjärvi T (2003) Expression of primary sigma factor (PSF) and PSF-like sigma factors in the cyanobacterium *Synechocystis* sp. strain PCC 6803. *J Bacteriol* 185:1116–1119.
- Turner JS, Robinson NJ (1995) Cyanobacterial metallothioneins: biochemistry and molecular genetics. *J Ind Microbiol* 14:119–125.

U – V

- Untergasser A, Nijveen H, Rao X, Bisseling T, Geurts R, Leunissen JAM (2007) Primer3Plus, an enhanced web interface to Primer3. *Nucleic Acids Res* 35:W71–W74.
- Vandesompele J, De Preter K, Pattyn F, Poppe B, Van Roy N, De Paepe A, Speleman F (2002) Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes. *Genome Biol* 3:0034.
- Vermaas WF (2001) Photosynthesis and respiration in cyanobacteria. *Encyclopedia of Life Sciences* (Nature Publishing Group, London), 245–251.
- Vijayan V, Zuzow R, O’Shea EK (2009) Oscillations in supercoiling drive circadian gene expression in cyanobacteria. *Proc Natl Acad Sci USA* 106:22564–22568.

W - Y - Z

- Wiench K, Wohlleben W, Hisgen V, Radke K, Salinas E, Zok S, Landsiedel R (2009) Acute and chronic effects of nano- and non-nano-scale TiO₂ and ZnO particles on mobility and reproduction of the freshwater invertebrate *Daphnia magna*. *Chemosphere* 76:1356–1365.
- Yang Q, Ma Y (2014) Irradiation-enhanced cytotoxicity of zinc oxide nanoparticles. *Int J Toxicol* 33:187–203.
- Yin H, Casey PS, McCall MJ (2014) Surface modifications of ZnO nanoparticles and their cytotoxicity. *J Nanosci Nanotechnol* 10:7565–7570.
- Yung MMN, Fougères P-A, Leung YH, Liu F, Djurišić AB, Giesy JP, Leung KMY (2017) Physicochemical characteristics and toxicity of surface-modified zinc oxide nanoparticles to freshwater and marine microalgae. *Sci Rep* 7:15909.
- Zvyagin AV, Zhao X, Gierden A, Sanchez W, Ross JA, Roberts MS (2008) Imaging of zinc oxide nanoparticle penetration in human skin in vitro and in vivo. *J Biomed Opt* 13:064031.

SII SUPPLEMENTARY INFORMATION

Toxicity mechanisms of ZnO UV-filters used in sunscreens toward the model cyanobacteria *Synechococcus elongatus* PCC 7942

Table SII.1 : *Physical and chemical characteristics of nanomaterials used in this study.*

	Z-COTE	Z-COTE HP1
Coating	None	Triethoxycaprylylsilane
CAS number	1314-13-2	1314-13-2, 2943-75-1
Appearance	Hydrophilic powder	Hydrophobic powder
ZnO content (%)	99.7	> 99
Primary particle size (nm)	$44 \pm 2 \times 73 \pm 4$	$28 \pm 2 \times 96 \pm 6$
Specific surface area (BET, m ² /g)	13 ± 2	14.9 ± 0.5

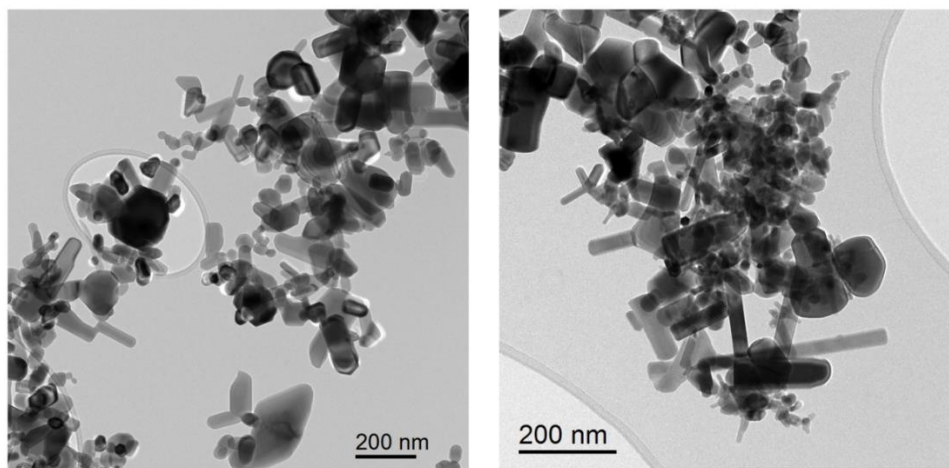


Figure SII.1 : *Transmission electron microscopy scans showing the morphologies of Z-COTE[®] (left) and Z-COTE[®] HP1 (right) used in this study.*

Table SII.2 : *Primers used in this study for RT-qPCR.*

	Gene name	Forward primer	Reverse primer	Length (pb)
Synpcc7942_0240	apcD	AGCCAGGTAATCCTCAAAGC	TTTTCTCGCTGTCGCTCAG	133
Synpcc7942_2030	cpcG	CAACCTTCGGTCCAGTTTC	TGAACCTTCATAGCCTTGG	150
Synpcc7942_0245	GAP1	TGATCGCTTGGTACGACAAC	CTCAACGCTCCGCATATAAC	77
Synpcc7942_0321	glnB	TCCGTTCAAACCTGGACGAAG	GCACTTCTGAAACCGTCATC	74
Synpcc7942_0001	DNA pol III	CACGGACATTCAGATTACAG	AATCGGCATCACCAAGTAGG	94
Synpcc7942_0251	DpoIII	AATCTGCCCTTTGACTACCG	AGAGTTGGCGTGACATTTGC	112
Synpcc7942_2601	COX15	CCACTTGGCTTTTGATAGGG	AAGCGATGAAACCACTCCAG	145
Synpcc7942_1439	ndhD	CAGATTCCCAAATCAGTGG	TCGGTAAAGCCCAAGAACAC	140
Synpcc7942_1259	arsA	GGAATTGGATGCTCTGATGG	CGCACGAGGCTAAAGATTTTC	150
Synpcc7942_1218	kaiA	TCTGTGAGTCTGGCGAAATG	AGCTGTTCTTTGGCTGGTTC	196
Synpcc7942_1523	rpoC1	AGGTATTGAGGTTGGCATCG	TGACATTCAGCACCATCCAC	200
Synpcc7942_2208	rplQ	TACGGTTACGACCACCAAAG	GCTCAAACAGCAAGTGAACC	149

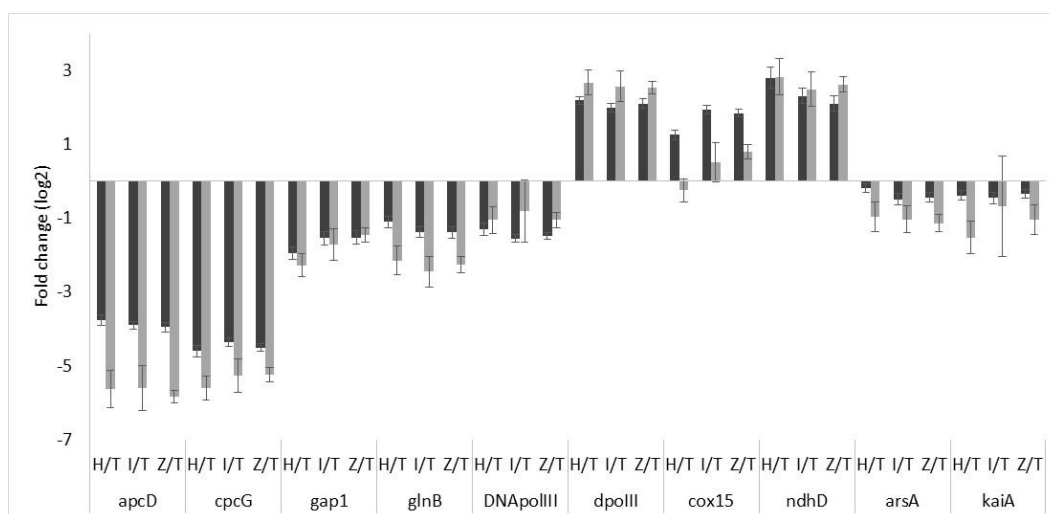


Figure SI.2 : *Expression level of 10 genes analysed by quantitative RT-PCR (light grey) and microarray (dark grey). Data are represented as ratio of mean \pm SD (n=4 per group). Gene names and ratio concerned are on the x-axis and fold-change (log2) are represented in y-axis.*

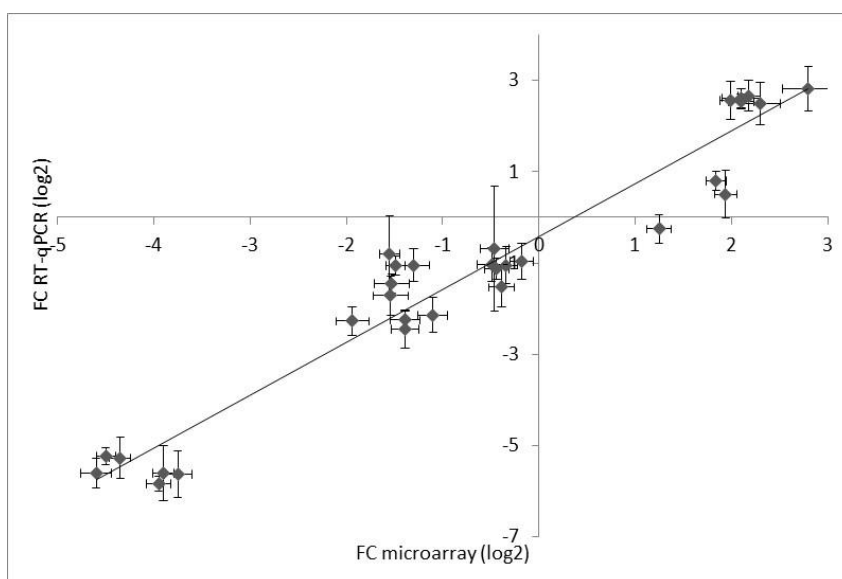


Figure SII.3 : Scatterplot of 10 differentially expressed genes (FC (log₂)) from the microarray analysis (x-axis) against those from the RT-qPCR analysis (y-axis). Pearson correlation coefficient obtained between both analyses is 0.96.

Table SII.3 : List of deregulated genes involved in oxidative stress (red: downregulated; green: upregulated).

Gene product	Gene symbol	Z-COTE		Z-COTE HP1		ZnCl ₂	
		FC(log ₂)	p-value	FC(log ₂)	p-value	FC(log ₂)	p-value
Catalase/oxidase HPI (EC 1.11.1.6)	Synpcc7942_1656	-3.97	1,78E-11	-4.12	8,00E-12	-4.01	1,00E-11
Thioredoxin	Synpcc7942_1830	-2.94	3,85E-12	-2.64	5,01E-12	-2.63	1,69E-11
Glutaredoxin-related protein	Synpcc7942_1145	-1.96	1,09E-09	-1.94	9,60E-10	-2.04	5,81E-10
Peroxidase (EC 1.11.1.7)	Synpcc7942_2449	-1.40	2,96E-08	-0.53	1,15E-03	-0.92	2,02E-06
Glutathione peroxidase (putative)	Synpcc7942_0437	0.22	4,18E-02	0.35	7,51E-03	0.19	6,73E-02
Thioredoxin peroxidase	Synpcc7942_2309	-0.02	8,12E-01	0.53	5,82E-05	0.11	2,96E-01
Superoxide dismutase (EC 1.15.1.1)	Synpcc7942_0801	1.02	1,16E-06	1.02	5,38E-08	0.84	1,34E-05
Rubrythrin	Synpcc7942_1649	1.70	3,52E-08	1.03	9,72E-06	1.3	1,06E-06
Glutaredoxin. GrxC	Synpcc7942_2323	1.54	6,82E-10	1.48	3,85E-09	1.28	1,60E-08
Glutathione peroxidase (EC 1.11.1.12; EC 1.11.1.9)	Synpcc7942_1214	1.74	1,15E-08	1.98	4,12E-09	1.76	9,80E-09

Table SII.4 : List of significantly deregulated genes ($FC_{log_2} \geq 1$; p -value < 0.05) involved in photosynthesis and oxidative phosphorylation (red: downregulated; green: upregulated).

Gene product	Gene symbol	Gene name	Z-COTE		Z-COTE HP1		ZnCl ₂	
			FC(log ₂)	p-value	FC(log ₂)	p-value	FC(log ₂)	p-value
Allophycocyanin (AP)								
allophycocyanin alpha chain	Synpcc7942_0327	<i>apcA</i>	-4.06	4,40E-14	-3.43	2,80E-11	-3.86	6,46E-14
allophycocyanin, beta subunit	Synpcc7942_0326	<i>apcB</i>	-4.6	1,92E-13	-3.76	3,81E-12	-4.25	1,28E-13
Lc 7.8 apoprotein (core components of the phycobilisomes)	Synpcc7942_0325	<i>apcC</i>	-3.53	6,96E-12	-3.44	1,07E-11	-3.43	4,05E-12
hypothetical protein	Synpcc7942_0240	<i>apcD</i>	-3.95	4,13E-13	-3.75	1,07E-12	-3.92	1,36E-13
phycobilisome core-membrane linker polypeptide	Synpcc7942_0328	<i>apcE</i>	-3.35	3,50E-11	-3.24	1,25E-10	-3.29	1,93E-11
allophycocyanin, beta subunit	Synpcc7942_2158	<i>apcF</i>	-3.96	5,76E-14	-3.64	1,23E-13	-3.87	2,05E-13
Phycocyanin (PC)								
phycocyanin, alpha subunit	Synpcc7942_1053	<i>cpcA</i>	-3.21	9,41E-13	-2.94	1,84E-11	-2.70	7,22E-12
phycocyanin, beta subunit	Synpcc7942_1052	<i>cpcB</i>	-3.80	2,29E-13	-3.38	1,80E-11	-3.38	1,80E-11
phycobilisome rod linker polypeptide	Synpcc7942_1049	<i>cpcC</i>	-1.39	7,30E-07	-1.46	8,23E-03	-1.27	2,30E-06
phycocyanin linker protein 9K	Synpcc7942_1051	<i>cpcD</i>	-1.37	1,98E-07	-2.10	2,86E-09	-1.26	3,55E-07
PBS lyase HEAT-like repeat	Synpcc7942_1054	<i>cpcE</i>	-1.52	9,37E-06	-1.57	4,76E-06	-1.52	4,90E-06
phycobilisome rod-core linker polypeptide	Synpcc7942_2030	<i>cpcG</i>	-4.50	3,77E-14	-4.63	2,12E-13	-4.35	3,73E-14
Photosystem II (PSII)								
photosystem II manganese-stabilizing polypeptide	Synpcc7942_0294	<i>psbO</i>	-1.91	2,31E-09	-1.77	9,57E-10	-1.90	3,31E-10
photosystem II PsbX protein	Synpcc7942_2016	<i>psbX</i>	-2.72	3,87E-11	-2.65	2,18E-10	-2.78	2,13E-11
photosystem II PsbY protein	Synpcc7942_1962	<i>psbY</i>	-2.07	2,10E-10	-1.50	1,10E-08	-1.96	1,41E-10
photosystem II 11 kD protein	Synpcc7942_0343	<i>psb27</i>	-1.06	1,98E-07	-0.82	3,18E-06	-1.08	7,48E-08
photosystem II reaction center W protein	Synpcc7942_1679	<i>psb28</i>	-2.84	9,86E-10	-2.68	6,18E-10	-2.83	2,04E-10
Photosystem I (PSI)								
photosystem I iron-sulfurcenter	Synpcc7942_0535	<i>psaC</i>	-2.97	7,00E-13	-2.45	1,24E-11	-2.77	2,00E-12
photosystem I reaction center subunit II	Synpcc7942_1002	<i>psaD</i>	-3.42	5,24E-12	-3.21	2,32E-11	-3.17	3,91E-12
photosystem I subunit IV psaE	Synpcc7942_1322	<i>psaE</i>	-3.47	4,53E-13	-3.64	2,20E-13	-3.44	1,06E-13
photosystem I reaction center subunit III precursor	Synpcc7942_1250	<i>psaF</i>	-3.68	9,54E-11	-3.80	2,09E-13	-3.69	7,56E-14
photosystem I reaction center subunit IX	Synpcc7942_1249	<i>psaJ</i>	-2.73	1,08E-11	-2.81	4,47E-11	-2.54	2,00E-11
photosystem I reaction center subunit X	Synpcc7942_0407	<i>psaK</i>	-4.37	4,21E-14	-4.42	7,56E-15	-4.26	1,11E-14
photosystem I reaction center	Synpcc7942_0920	<i>psaK</i>	-3.81	3,61E-14	-3.74	1,27E-13	-3.69	3,66E-14
hypothetical protein	Synpcc7942_2342	<i>psaL</i>	-3.49	2,43E-12	-3.65	8,65E-13	-3.62	3,43E-13
Cytochrome b6f (Cyt b6f)								
cytochrome b6-f complex subunit 4	Synpcc7942_2332	<i>petD</i>	-1.02	4,07E-07	-0.29	8,37E-03	-0.68	1,29E-05
cytochrome b6-f complex iron-sulfur subunit(EC:1.10.99.1)	Synpcc7942_1232	<i>petC</i>	-1.20	1,75E-08	-0.30	1,01E-02	-0.72	1,31E-05
Ferredoxin (Fd)								
Ferredoxin (2Fe-2S)	Synpcc7942_1499	<i>petF</i>	-1.72	1,21E-09	-1.49	1,17E-09	-1.59	2,32E-09
Ferredoxin reductase (FNR)								
ferredoxin-NADP oxidoreductase	Synpcc7942_0978	<i>petH</i>	-1.09	1,19E-06	-0.48	1,71E-03	-1.03	2,22E-06
Cytochrome c6 (Cyt c6)								
cytochrome C6 soluble cytochrome f	Synpcc7942_0239	<i>petJ</i>	-1.75	1,86E-08	-1.63	6,19E-09	-1.50	1,80E-08
F-type ATPase								
ATP synthase F1, beta subunit(EC:3.6.3.15)	Synpcc7942_2315	<i>beta</i>	-1.98	8,18E-09	-1.78	4,40E-08	-1.92	5,37E-09
ATP synthase F1, alpha subunit(EC:3.6.3.15)	Synpcc7942_0336	<i>alpha</i>	-2.36	4,58E-08	-2.44	5,65E-08	-2.31	3,48E-08
ATP synthase F1, gamma subunit(EC:3.6.3.15)	Synpcc7942_0337	<i>gamma</i>	-1.95	4,27E-08	-1.30	4,35E-02	-1.90	8,37E-09
ATP synthase F1, delta subunit	Synpcc7942_0335	<i>delta</i>	-2.54	2,24E-09	-2.52	2,07E-09	-2.52	1,90E-09
ATP synthase F0, C subunit	Synpcc7942_0332	<i>c</i>	-2.57	6,95E-10	-2.52	3,70E-09	-2.39	2,26E-09
ATP synthase F0, A subunit	Synpcc7942_0331	<i>a</i>	-2.51	3,35E-10	-2.38	4,23E-10	-2.29	6,95E-10
FOF1-type ATP synthase subunit b-like	Synpcc7942_0334	<i>b</i>	-2.60	4,24E-11	-2.42	1,67E-10	-2.52	2,48E-11
NADH dehydrogenase (NDH)								
NADH dehydrogenase subunit 1	Synpcc7942_1343	<i>ndhA</i>	-0.85	1,03E-06	-1.01	6,40E-07	-0.92	3,89E-07
proton-translocating NADH-quinone oxidoreductase, chain M(EC:1.6.99.5)	Synpcc7942_1439	<i>ndhD</i>	2.10	6,25E-09	2.80	2,30E-09	2.31	1,66E-09
proton-translocating NADH-quinone oxidoreductase, chain M(EC:1.6.99.5)	Synpcc7942_1976	<i>ndhD</i>	-1.96	6,90E-10	-1.82	3,99E-09	-1.87	3,39E-09
NAD(P)H dehydrogenase, subunit NdhF3 family(EC:1.6.99.5)	Synpcc7942_2091	<i>ndhF</i>	1.45	4,75E-08	1.10	9,02E-06	1.42	2,28E-08
NADH dehydrogenase (ubiquinone)(EC:1.6.5.3)	Synpcc7942_1743	<i>ndhH</i>	-1.38	9,89E-08	-1.46	1,66E-08	-1.38	2,50E-08
NADH-plastoquinone oxidoreductase, I subunit NADH-quinone oxidoreductase	Synpcc7942_1344	<i>ndhI</i>	1.13	4,77E-07	0.83	1,18E-05	0.73	2,90E-05
NADH dehydrogenase I subunit J	Synpcc7942_1182	<i>ndhJ</i>	-1.01	2,21E-06	-0.79	3,41E-05	-0.99	3,35E-06
NADH dehydrogenase I subunit M	Synpcc7942_1982	<i>ndhM</i>	-3.26	8,38E-10	-3.11	9,16E-10	-3.22	3,21E-10
NADH dehydrogenase I subunit N	Synpcc7942_2234	<i>ndhN</i>	1.33	7,03E-08	0.89	1,33E-05	1.11	1,55E-06
NAD-reducing hydrogenase gamma subunit	Synpcc7942_2557	<i>hoxU</i>	-1.68	2,14E-07	-1.73	7,01E-08	-1.65	2,12E-07
Cytochrome c oxidase(Cox)								
protoheme IX farnesyltransferase	Synpcc7942_2600	<i>cyoE</i>	1.25	1,84E-07	0.76	1,90E-05	1.43	2,77E-08
cytochrome c oxidase subunit II	Synpcc7942_2602	<i>coxB</i>	-2.00	1,80E-08	-2.42	1,87E-09	-1.93	1,97E-08
putative cytochrome aa3 controlling protein	Synpcc7942_2601	<i>cox15</i>	1.84	5,62E-10	1.25	6,58E-08	1.95	3,70E-10
Cytochrome-c oxidase(EC:1.9.3.1)	Synpcc7942_2603	<i>coxA</i>	-1.03	2,22E-05	-1.46	4,86E-07	-0.74	1,41E-04
cytochrome c oxidase subunit III	Synpcc7942_2604	<i>coxC</i>	-0.85	1,17E-04	-1.38	3,75E-07	-0.62	1,38E-03
Cytochrome bd-quinol oxidase (Cyt bd)								
cytochrome oxidase d subunit I	Synpcc7942_1767	<i>cydA</i>	0.89	4,20E-06	0.99	7,40E-07	1.17	2,78E-08

CHAPITRE III

Démarche scientifique de développement et mise en œuvre d'un réseau trophique microbien modèle

III Démarche scientifique de développement et mise en œuvre d'un réseau trophique microbien modèle

Dans le chapitre précédent (**Chapitre II**) nous avons vu que les outils –omiques peuvent être pertinents pour appréhender et comprendre les mécanismes d'action des contaminants. Néanmoins, pour une utilisation en évaluation des risques, les données obtenues à l'aide de ces nouveaux outils se doivent d'être complétées par des études plus intégratives qui considèrent le fonctionnement d'un écosystème (**Chapitre I.1.2**).

Nous avons alors souhaité développer un réseau trophique microbien modèle pouvant être utilisé en routine pour la réalisation de tests ecotoxicologiques. Cependant, un test écotoxicologique se doit de respecter au mieux la règle des 5R (en anglais) introduite par Calow en 1993, soit la : fiabilité (Reliability), répétabilité (Repeatability), reproductibilité (Reproducibility), robustesse (Robustness) et le réalisme, la pertinence et la représentativité (Relevance). Les principaux objectifs ont donc été de développer un réseau trophique fonctionnel et représentatif des eaux douces, de maîtriser un certain nombre de paramètres pour tendre vers une standardisation et d'adapter des méthodes d'analyse à une utilisation sur de faibles volumes.

Nous avons ainsi développé un test d'écotoxicité sur un réseau trophique microbien modèle, recoupant à la fois les avantages des tests monospécifiques (rapidité, peu coûteux sur les plans temporels et financiers) et ceux des approches micro- et mésocosmes proposant des scénarios plus en accord avec la réalité environnementale et permettant d'appréhender les effets directs et indirects (i.e. les interactions biotiques et abiotiques ainsi que le transfert trophique et la biomagnification) des contaminants sur le compartiment microbien. (**Chapitre I1.3**).

III Démarche scientifique de développement et mise en œuvre d'un réseau trophique microbien modèle

III.1 Introduction, cahier des charges et démarche générale

Le principal objectif est de développer un réseau trophique microbien modèle permettant d'évaluer l'impact de divers contaminants sur les écosystèmes dulçaquicoles. Pour cela, le système doit préférentiellement être conditionné en faible volume pour faciliter le nombre de répétitions, être reproductible et représentatif des conditions naturelles. Pour ce faire il doit être composé de plusieurs maillons trophiques auxquels seront associés une boucle microbienne. Les dynamiques de population ainsi que l'évolution physico-chimique du milieu doivent pouvoir être analysés. Enfin, pour l'évaluation d'une toxicité chronique et d'une éventuelle bio-augmentation des contaminants, le système devra pouvoir se maintenir sur le long terme, et ce sans renouvellement de milieu.

Le réseau trophique a initialement été construit sur la base des données présentes dans la littérature et de la disponibilité des différents organismes dans les banques. Des expérimentations ont été réalisées dans le but d'améliorer la survie/reproduction des organismes dans le milieu d'exposition, ainsi que leurs différentes interactions. La viabilité du système a été appréhendée grâce au suivi de la dynamique de population des rotifères, à l'analyse physico-chimique du milieu (accumulation des nitrites notamment), et de par des observations macro- et microscopiques (mobilité et taille des organismes, développement d'un biofilm, turbidité, etc.). Lorsque les résultats obtenus suite à la modification d'un paramètre suggéraient en effet une amélioration du système, le paramètre était alors validé et utilisé pour les tests subséquents. C'est à partir de fin février 2018 que nous avons fixé les conditions de mise en œuvre. La **figure III.1** présente l'évolution temporelle de la phase d'optimisation du réseau.

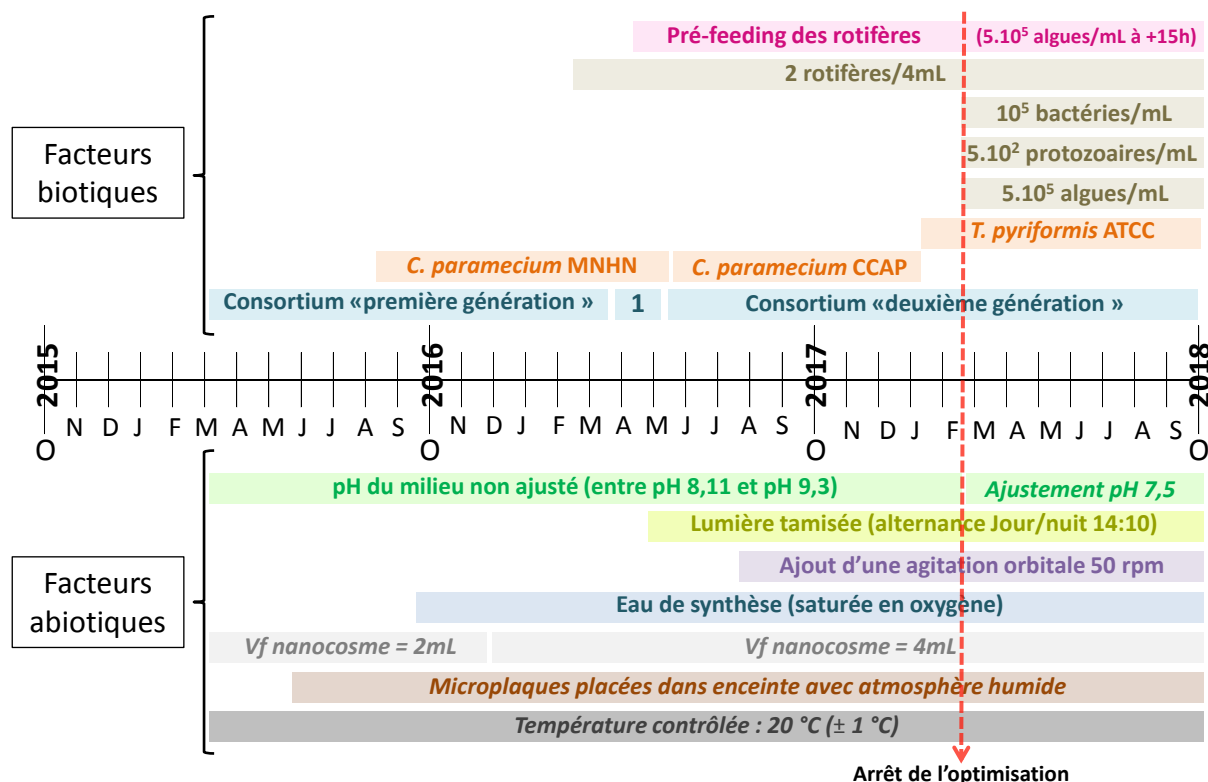


Figure III.1 : *Axe chronologique présentant l'historique des phases importantes de développement du réseau trophique microbien standardisé. Vf = volume final ; algues = Chlorella vulgaris, rotifères = Brachionus calyciflorus ; les protozoaires = Tetrahymena pyriformis et Chilomonas paramecium. La représentation de ce qui est appelé « nanocosme » est présentée en figure III.4.*

Ainsi, un nombre important d'expérimentations, ont conduit au réseau trophique microbien modèle tel qu'il a été utilisé pour réaliser des tests de fonctionnement et d'écotoxicité qui seront présentés respectivement dans les chapitres 3 et 4. Les expérimentations les plus décisives pour le développement du réseau sont présentées ci-dessous.

III.2 Matériel et méthodes de la conception et de l'optimisation du réseau

III.2.1 Conception du réseau

III.2.1.1 Les organismes

Pour espérer développer un réseau trophique fonctionnel et autonome, nous avons pensé un écosystème miniature composé de rotifères (consommateurs primaires et secondaires) se nourrissant à la fois d'algues (producteurs primaires apportant la matière organique au

système) et de protozoaires. Les protozoaires, associés à un consortium microbien nitrifiant formeraient une boucle microbienne qui assurerait le recyclage des nutriments.

Alors que les bactéries nitrifiantes prendraient en charge les déchets azotés pour permettre au système d'évoluer sans renouvellement de milieu durant plusieurs jours, les protozoaires assureraient le lien trophique entre les bactéries et les métazoaires. Ces derniers représentant une ressource nutritive essentielle pour les organismes aquatiques supérieurs (**Figure III.2**).

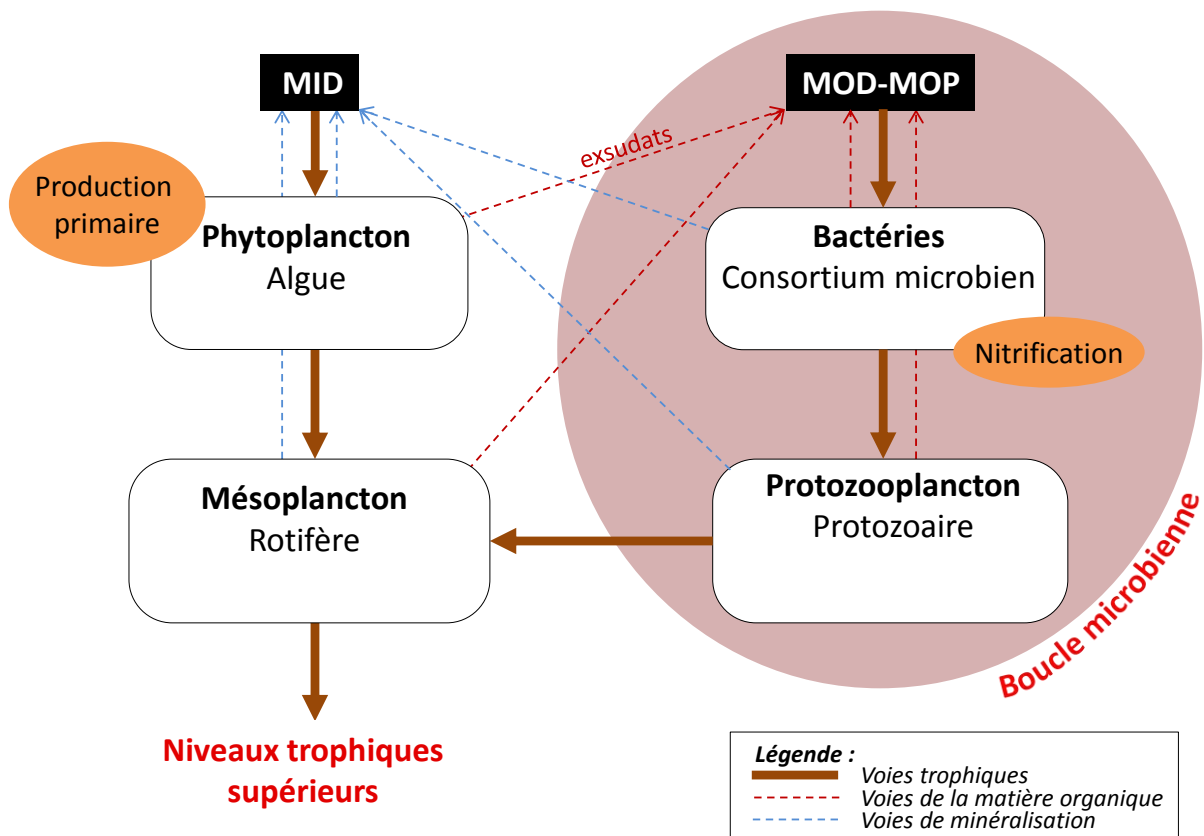


Figure III.2 : Schéma théorique du réseau trophique microbien modèle. MID = matière inorganique dissoute ; MOD = matière organique dissoute ; MOP = matière organique particulaire.

De plus, nous avons souhaité que la sélection des modèles d'étude soit, autant que possible, en adéquation avec l'environnement considéré pour que le réseau trophique soit représentatif d'un écosystème aquatique dulçaquicole.

Nous avons alors sélectionné *Chlorella vulgaris*, dont l'espèce a été décrite comme étant un des acteurs importants de la production primaire dans les écosystèmes aquatiques d'eau douce (Krienitz et al. 2015) et qui, de plus, est connue pour être consommée par le rotifère *Brachionus calyciflorus* (Hettiarachchi et al. 1995). Ce même rotifère se nourrit également

des protozoaires *Tetrahymena pyriformis* et *Chilomonas paramecium*, les premiers étant une espèce de ciliés bactérivores et le second une espèce de flagellés hétérotrophes (Mohr et Adrian 2002).

De plus, les bactéries hétérotrophes représenteraient environ 8% de la nourriture de la méiofaune dont les rotifères font partie (Mostajir et al. 2012). Les différents maillons formeraient ainsi un réseau trophique microbien.

Par ailleurs, *Brachionus calyciflorus*, anciennement nommé *Brachionus pallas* est un rotifère largement répandu dans les eaux douces (Girling et al. 2000). Les protozoaires pourraient représenter quant à eux plus de 32% de la biomasse zooplanctonique des lacs (Pace et Orcutt 1981). Les Chlorelles et les communautés bactériennes jouent un rôle majeur dans le cycle de l'azote ainsi que dans la production et la dégradation de matière organique (Davey and O'toole 2000). Les organismes sélectionnés sont donc ubiquitaires et fortement impliqués dans le fonctionnement des milieux aquatiques dulçaquicoles. Il est, en outre, possible de se les procurer et de les cultiver au laboratoire relativement facilement.

III.2.1.2 Le milieu de synthèse

La mise au point du réseau trophique a nécessité l'élaboration d'un milieu de synthèse adapté à la survie ainsi qu'à la croissance des différents organismes. Les rotifères étant à priori les organismes les plus exigeants, le milieu de base choisi pour cette étude a été de l'eau EPA Moderately Hard Water (USEPA 2002, 96 mg/l NaHCO₃, 60 mg/l CaSO₄2H₂O, 60 mg/l MgSO₄, 4 mg/l KCl) communément utilisée pour la croissance de ces organismes dans le cas des bioessais normalisés (RotoxKit).

Par la suite, nos résultats ont révélé que les protozoaires *T pyriformis* semblaient eux aussi assez exigeants vis-à-vis de la composition du milieu. D'après la littérature, ces organismes ont en effet besoin de la présence de phosphates biodisponibles dans le milieu pour croître (Mar et al. 2017, Akpor et Momba 2010). Aussi, les observations microscopiques réalisées au laboratoire montrent que dans un milieu supplémenté en phosphates (concentrations testées entre 0.2 mg/l et 20 mg/l), les protozoaires présentent une forme allongée (« forme de poire »), synonyme d'un bon état physiologique (**Figure III.3, a.**). En revanche, les protozoaires placés dans un milieu dépourvu de phosphates (eau EPA non supplémentée) ne se maintiennent pas et présentent une forme arrondie, synonyme d'un mauvais état physiologique (**Figure III.3, b.**). Le protozoaire *T. pyriformis* est, de fait, connu pour changer

de forme et s'arrondir lorsque qu'il fait face à un stress (Brailovskaya et al. 2007, Sauvart 1999).

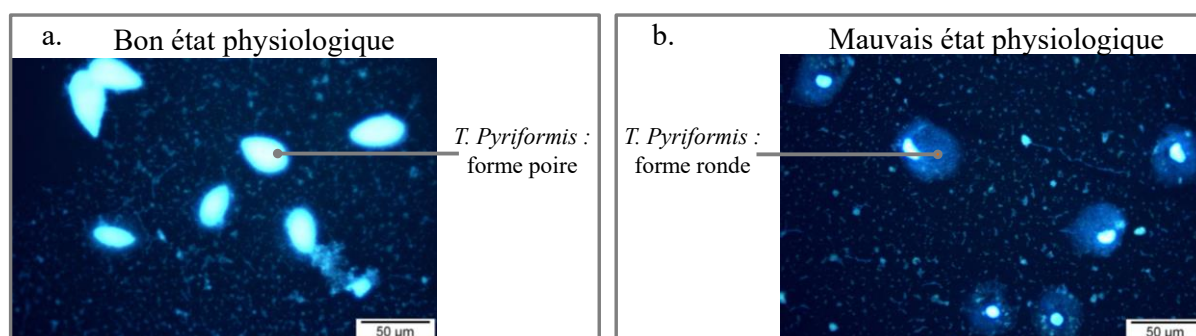


Figure III.3 : *Observations microscopiques des protozoaires T. pyriformis ayant évolué 3 jours dans une eau EPA supplémentée en oligo-éléments et nourris avec un consortium bactérien en présence (a.) et en absence (b.) de phosphate (20 mg/l de KH₂PO₄). Les photos ont été réalisées au microscope à fluorescence après marquage des organismes au DAPI.*

Dans un souci de réalisme, les concentrations en phosphate et en azote apportées au milieu ont principalement été déterminées en se basant sur des mesures effectuées sur divers cours d'eau douce des Vosges (mesures réalisées au laboratoire, données non présentées dans ce manuscrit). La base d'eau EPA a donc été supplémentée avec 1 mg/l de KH₂PO₄ (soit 0,2 mg/L de phosphore) et 25 mg/L de NaNO₃ (soit 4 mg/l d'azote), le tout additionné d'une solution d'oligoéléments. Ces concentrations sont également dans la gamme des valeurs de la littérature qui reportent une concentration en PO₄³⁻ allant de 0.06 mg/l à 0.53 mg/l et de NO₃⁻ allant de 0.3 mg/l à 10.2 mg/l dans des rivières naturelles de Grèce (Simeonov et al. 2003).

Le milieu est bullé avec de l'air filtré à travers du coton cardé durant la nuit précédant son utilisation dans une pièce à 20 °C. Le pH du milieu d'essai est ensuite ajusté à pH 7.5 à l'aide d'acide chlorhydrique et d'hydroxyde de sodium juste avant son utilisation. La composition de ce milieu, ultérieurement nommé *eau de synthèse*, est présenté ci-dessous en **Table III.1** et sa préparation est détaillée en **Annexe SIII.1**.

Table III.1 : Composition de l'eau de synthèse

Composé	Concentration en mg/L
NaHCO ₃	96
CaSO ₄ .2H ₂ O	60
MgSO ₄	60
KCl	4
KH ₂ PO ₄	1
NaNO ₃	25
H ₃ BO ₃	2.859
MnCl ₂ .4H ₂ O	0.361
LiCl	0.306
RbCl	0.071
NaBr	0.016
Na ₂ MoO ₄ .2H ₂ O	0.063
CuCl ₂ .2H ₂ O	0.017
ZnCl ₂	0.013
CaCl ₂ .6H ₂ O	0.01
KI	0.00325
Na ₂ SeO ₃	0.00219
NH ₄ VO ₃	0.000575
FeSO ₄ .7H ₂ O	1

III.2.1.3 Les conditions abiotiques du système

La température et la luminosité peuvent influencer grandement sur la croissance des organismes. Dans un souci de standardisation, notre réseau a été systématiquement placé dans une pièce climatisée à 20°C ± 1 °C. La source lumineuse est apportée par des néons présentant un spectre proche de celui de la lumière du jour (Sylvania, ES Standard Daylight F 36W/10). L'intensité est limitée à 160 lux en photopériode 14/10 afin d'éviter une lumière directe trop importante, néfaste pour la croissance et la survie de *T. pyriformis* (Brailovskaya et al. 2007, Epel et Krauss 1966), et une croissance trop importante des algues.

Le réseau a été développé en volume de 4 ml (microplaques 12 puits) afin d'autoriser les différentes mesures physicochimiques, tout en permettant la multiplication des réplicats et des variables lors des tests écotoxicologiques. Pour limiter l'évaporation du milieu lors des différentes expérimentations, les microplaques ont été disposées dans une enceinte hermétique en plexiglass (50*50*10 cm) à l'intérieur de laquelle une atmosphère humide a été créée

grâce à l'ajout de 2 récipients contenant au minimum 10 ml d'eau durant toute la durée des tests. Une enceinte peut ainsi contenir jusqu'à 18 microplaques de 12 puits, soit 216 répliquats biologiques sur une surface de 0,25 m² (1 puits = 1 répliquat biologique) (**Figure III.4**).

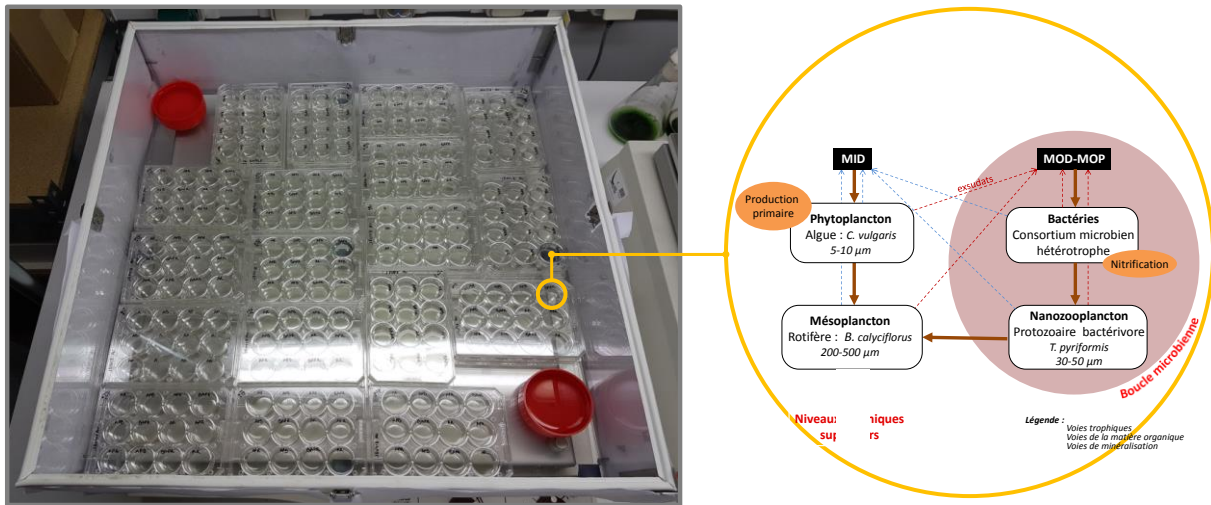


Figure III.4 : *Photo de l'enceinte contenant les 18 microplaques et représentation schématique de ce qui est appelé par la suite « répliquat biologique » ou « nanocosme », qui équivaut à un puits contenant le réseau trophique microbien modèle.*

Le réseau trophique microbien modèle étant développé dans un but d'évaluation de la toxicité de contaminants, l'ajout d'une agitation permet l'homogénéisation du milieu, limitant ainsi la stratification dans les puits et la variabilité dans les analyses. La vitesse d'agitation orbitale est de 50 rpm pour un volume de 4 ml permettant une légère agitation du milieu sans débordement. De plus, les plaques étaient déplacées dans la boîte hermétique quotidiennement afin de limiter l'impact des variations d'agitation, de température et de lumière propre à chaque position.

III.2.2 Optimisation du réseau

III.2.2.1 Obtention d'un consortium microbien nitrifiant

Un premier consortium bactérien dit « de première génération » a été récupéré à partir des filtres en mousse de l'aquarium du Muséum Aquarium de Nancy en janvier 2016. En effet, ces filtres possèdent une grande diversité de microorganismes dont certains sont nitrifiants. Ce consortium est conservé à -80°C dans du glycérol 10% à une concentration de 10¹⁰ cellules/ml.

L'obtention du consortium microbien nitrifiant dit « de deuxième génération » a ensuite été réalisée en deux étapes : une première étape de production à partir du consortium « de première génération » suivie d'une étape de récupération et de conditionnement pour le stockage sur le long terme. Pour l'oxygénation du milieu, des cannes en verre ont été découpées de façon à toucher le fond du ballon tout en dépassant de 5cm du col du ballon. Du coton cardé a été placé sur 1cm à une extrémité de la canne. Tout le matériel utilisé a été autoclavé.

Un volume de 3 L d'eau de synthèse a ensuite été ajouté dans chacun des 3 ballons de 6 L, additionné d'une source d'azote organique introduite sous la forme de 10g de crevette cuite préalablement conservée à -80°C et de 300 µl de consortium de première génération. Le volume de 300 µl de consortium de première génération provient d'un aliquot différent pour l'inoculation de chacun des 3 ballons. Les ballons ont été refermés avec un bouchon composé de coton cardé entouré d'une gaze. Une boutonnière a été réalisée dans ces bouchons pour y faire passer une canne de verre dont l'extrémité cotonnée est orientée vers le haut. Les ballons ont ensuite été emballés dans de l'aluminium pour empêcher le développement éventuel d'algues et ont été placés dans une pièce climatisée à 20 °C. Un tuyau souple en silicone a permis de raccorder un bulleur à la canne correspondante. Le dispositif est présenté dans la (Figure III.5 1, 2). Les 3 ballons ont ainsi été placés sous bullage continu durant 31 jours avec prélèvements réguliers d'échantillons pour réaliser des dosages d'ions nitrates, nitrites et ammoniums.

Au bout de 31 jours, le contenu des 3 ballons (Figure III.5, 3) a été filtré sur une maille de 500 µm et le filtrat a été récupéré dans des bouteilles de 1 L préalablement autoclavées.



Figure III.5 : *Photos des phases de production (1, 2) et de récupération (3) du consortium nitrifiant de seconde génération.*

Suite à cela, ces filtrats ont été re-filtrés à travers 32 couches de gaze superposées pour éliminer une importante partie des résidus de matières organiques et du biofilm de surface qui

obstruent rapidement les filtres de traille inférieure à 100 µm. Une dernière étape de filtration a été réalisée sur filtre 35 µm avec une aspiration de 30 mbar. Les filtrats ont ensuite été rassemblés, aliquotés à raison de 40 ml par tube Falcon de 50 ml et centrifugés à 8000 g durant 6 min à température ambiante. Les culots ont ensuite été rassemblés et soniqués 10 s 40% d'amplitude en continu à température ambiante pour disloquer les éventuels floes de bactéries. Un volume de glycérol 50% nécessaire pour obtenir une concentration finale de 10% de ce composé a ensuite été ajouté. Le consortium microbien ainsi préparé a alors été aliquoté à raison de 500 µl en tubes Eppendorf 1.5mL SafeLock et conservés à -80°C. La concentration en bactéries a été évaluée par cytométrie en flux à 10^8 cellules/ml.

Une caractérisation taxonomique du consortium sur la base des séquences d'ADNr 16S a été réalisée. Les ADN ont été extraits grâce au kit PowerSoil® DNA Isolation Kit (MoBio laboratories, Inc.). Les amplifications des ADNr 16S (région V1-V8) ainsi que le séquençage a été réalisé par la société GATC BioTech (Illumina HiSeq 2000).

III.2.2.2 Culture et préparation des différents maillons

a. Les algues

Chlorella vulgaris est maintenue en culture en condition axénique dans du milieu BG11 (Sigma Aldrich) à 20°C sous agitation et lumière continue. Une culture en fin de phase exponentielle est centrifugée 5 min à 5000 g puis le culot est remis en suspension dans de l'eau de synthèse. La concentration des cellules est alors évaluée à l'aide de la courbe étalon présentée en **figure III.6** après mesure spectrophotométrique de la DO_{680nm} .

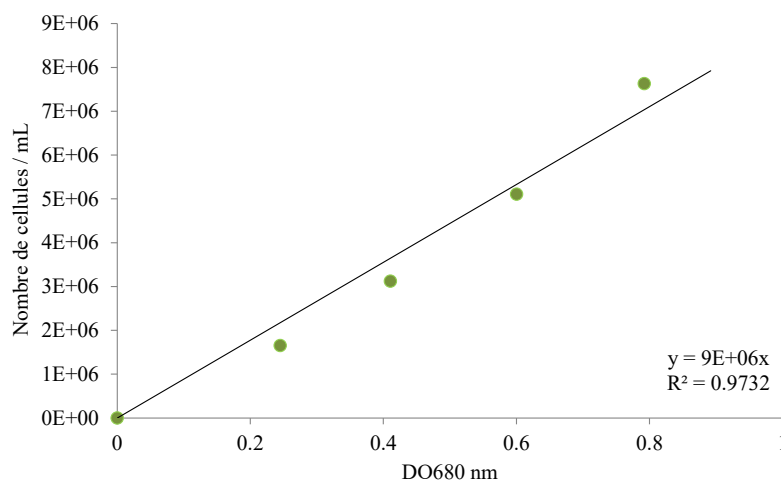


Figure III.6 : Courbe étalon des chlorelles (*C. vulgaris*) réalisée en cytométrie en flux.

b. *Le consortium bactérien*

Le ou les aliquots de consortium de « deuxième génération » conservés à -80°C sont décongelés à température ambiante. Une fois le consortium décongelé, une centrifugation de 5 min à 7000 g est réalisée. Le culot cellulaire est ensuite remis en suspension dans 500 µl d'eau de synthèse (volume final) puis dilué au 10^{ème} dans le même milieu afin d'obtenir une suspension de 10⁷ cellules/ml.

c. *Les protozoaires*

Deux espèces de protozoaires, *Tetrahymena pyriformis* et *Chilomonas paramecium* ont été testées de sorte à sélectionner celle qui répondait le mieux au cahier des charges.

Tetrahymena pyriformis (ATCC 30202) est maintenu en culture en condition axénique dans du milieu ATCC 357 (0,5% protéose peptone, 0,5% tryptone, 0,02% K₂HPO₄) à 20°C à l'abri de la lumière directe. Après 11 jours de croissance (±2 jours), le milieu de culture contenant les protozoaires est réparti à raison de 30 ml par tube Falcon de 50 ml puis centrifugé 7 min à 760 g à 20°C sur un rotor à angle fixe. Le surnageant est ensuite prélevé délicatement en prenant soin de garder 4 ml par tube. Un volume de 26 ml d'eau de synthèse y est ensuite ajouté pour laver les cellules. Une nouvelle étape de centrifugation est alors réalisée avec les mêmes paramètres que la précédente et le surnageant est à nouveau éliminé. Les 4 ml associés au culot dans chaque tube sont alors regroupés. La concentration en protozoaires, préalablement fixés avec du lugol 10% final, est évaluée à l'aide d'une cellule de Nageotte.

Les souches de *Chilomonas paramecium* utilisées proviennent du Muséum National d'Histoire Naturelle (MNHN, Paris) et du « Culture Collection of Algae and Protozoa » (CCAP, Ecosse). Les cultures ne sont pas axéniques et leur vitesse de croissance est lente. Des expérimentations, présentées dans la partie résultats et discussion, ont été menées dans le but d'augmenter la biomasse produite pour les tests et de limiter la quantité de bactéries introduite dans les réseaux trophiques.

d. *Les rotifères*

Brachionus calyciflorus (MicroBioTests Inc., Belgique) est acheté sous forme de kystes conservés à 4°C. L'éclosion est réalisée à 25°C dans 20 ml d'eau de synthèse sous exposition lumineuse (3000-4000 lux). Après 15h d'incubation, une concentration finale de 5.10⁵

chlorelles/ml sont ajoutées au milieu. Les néonates sont récupérés par pipetage 3 à 5 h après cet ajout.

III.2.2.3 Méthodes de dénombrement des organismes

a. Dénombrement sous loupe binoculaire

Le dénombrement sous loupe binoculaire est un comptage humain qui s'effectue sur un appareil équipé d'un rétro-éclairage. L'outil est réglé de façon à ce que le puit complet de 4 ml soit visible dans le champ d'observation. La colonne d'eau est ensuite balayée en modifiant la focale pour repérer les organismes et estimer leur nombre une première fois. Un second passage est effectué pour confirmer le premier comptage, suivi d'un troisième si nécessaire. Cette méthode est utilisée pour le comptage des rotifères.

b. Dénombrement par cellule de Nageotte

La cellule de Nageotte est un hématimètre composé d'un quadrillage (40 bandes de L : 10mm ; l : 0,25 mm ; H : 0,5 mm). Chaque bande après remplissage a un volume calibré de 1,25 μ l.

Un volume de 200 μ l d'échantillon est prélevé, dilué si nécessaire, et fixé avec du lugol 10%. Après 10 min d'incubation, la cellule de Nageotte est remplie avec l'échantillon fixé. Les lectures sont ensuite réalisées après 5 min de sédimentation sous microscope optique. Le comptage des organismes présents par bande est effectué sur au minimum 4 bandes. Si le nombre d'organismes dénombrés par bande est trop hétérogène ou trop faible, l'intégralité des bandes peut être lue. Cette méthode a été testée pour le comptage des protozoaires.

c. Coloration au DAPI et dénombrement sous microscope à fluorescence

Pour les dénombrements au microscope à fluorescence, les cellules ont été fixées en ajoutant 2% d'une solution de formaldéhyde (36 à 38,5%) et ont ensuite été conservées à 4°C sur une courte durée (inférieure à 48 h). Les cellules sont marquées 30 min à l'obscurité avec une concentration finale en DAPI de 2,5 μ g/ml puis filtrées sur des filtres en polycarbonate de 25 mm de diamètre et de 0,22 μ m de porosité (Isopore™ Membrane Filters, Millipore). Les filtres sont ensuite positionnés entre lame et lamelles et les cellules sont dénombrées au microscope à fluorescence (Olympus System Microscope Model BX41) muni d'un objectif \times 22 et d'un filtre UV. Une moyenne est effectuée sur la base d'un comptage du nombre de

cellules présentes sur 10 champs d'un même filtre. Le nombre de champs sur la surface utile du filtre est calculé en tenant compte du grossissement, du diamètre de l'oculaire et de celui du filtre utilisé :

$$\left(\pi \times \left(\frac{\text{surface utile du filtre}}{2} \right)^2 \right) / \left(\pi \times \left(\frac{\left(\frac{\text{oculaire}}{\text{grossissement}} \right)}{2} \right)^2 \right).$$

Le nombre de cellules au sein de l'échantillon de départ est alors obtenu en multipliant la moyenne des 10 champs par le nombre de champs possibles sur le filtre en tenant compte du volume initial d'échantillon filtré ainsi que de l'éventuelle dilution. Cette méthode a été testée pour le comptage des bactéries, des algues et des protozoaires.

d. Dénombrement par cytométrie en flux

Le cytomètre utilisé est un BD Accuri™ C6 (BD Biosciences) équipé d'un laser émettant à 488 nm. Le seuil est réglé à 10 000 sur Forward Scager (FSC) et l'acquisition est réalisée sur 50 µl avec une vitesse d'aspiration adaptée à la concentration de l'échantillon de façon à obtenir un passage d'environ 1000 particules / seconde. Le développement de cette méthode est détaillé ci-après.

Le dénombrement des algues et des bactéries par cytométrie en flux après marquage au Syto9 (sonde moléculaire S34854, 5µM final, 20 min, obscurité) est possible en délimitant des zones où ressortent spécifiquement chacun de ces deux organismes.

En effet, la **figure III.7 a.** présente un graphique en Forward Scager – Side Scager (FSC-SSC) qui permet de discriminer les particules en fonction de leur taille et de leur surface. Ainsi, la zone P2 correspond à celle où sortent les algues, et la zone P7 à celle où ressortent les bactéries. Les algues ont l'avantage de présenter une auto-fluorescence qui permet de les différencier des bactéries car elles ressortent à l'intérieur de la sélection M1 sur le graphique **c.** de la **figure III.7.** La chlorophylle a ici été collectée avec un filtre détectant les émissions de fluorescence au-delà de 670 nm. Ainsi, la concentration en algues est estimée à partir du nombre de particules détectées en M1 en tenant compte du volume d'échantillon analysé et des éventuelles dilutions.

Sur le **b.** de la **figure III.7**, la zone M11 correspond à celle où les particules marquées au Syto9 (marquage des particules organiques vivantes comme mortes) sont comptées. La concentration en bactéries est estimée dans la zone P7 (**Figure III.7, a.**) en tenant compte uniquement des particules qui ressortent en M11 et en soustrayant les particules qui ressortent en M1 (pour éliminer les algues).

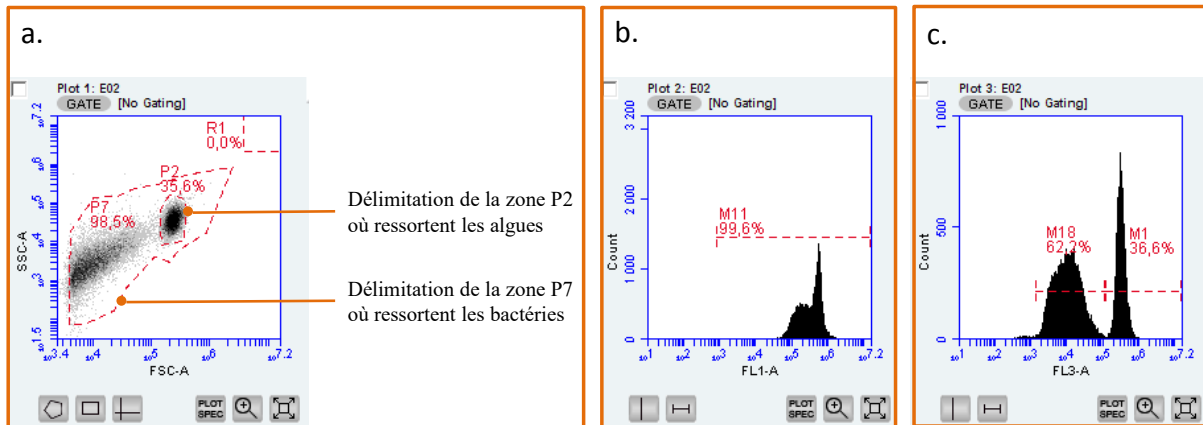


Figure III.7 : *Dénombrement des C. vulgaris et des bactéries en cytométrie en flux après marquage au Syto9. La zone P7 en a. délimite la zone où sont comptés les bactéries ; la zone P2 la zone où sont comptées les algues. Les organismes sont ici tous deux discriminés par leur taille et leur granulométrie (Forward Scager – Side Scager (FSC-SSC)). En b. l'indication M11 délimite la zone où ressortent les particules marquées au Syto9. En c. l'indication M1 délimite la zone où ressortent les algues.*

En ce qui concerne les protozoaires *T. pyriformis*, la délimitation de la zone où ressortent ces organismes est réalisée sur un volume de 50 μ l d'une suspension que l'on sait concentrée à environ 1.10^4 protozoaires/ml (concentration estimée en cellule de Nageotte) après marquage au Syto 9 (sonde moléculaire S34854, 5 μ M final, 20 min, obscurité), marquant l'intégralité des molécules organiques mortes comme vivantes. Les résultats sont observés en Forward Scager – Side Scager (FSC-SSC) sur le graphique a. de la **figure III.8** où la zone R1 dans laquelle ressortent les protozoaires a pu être délimitée.

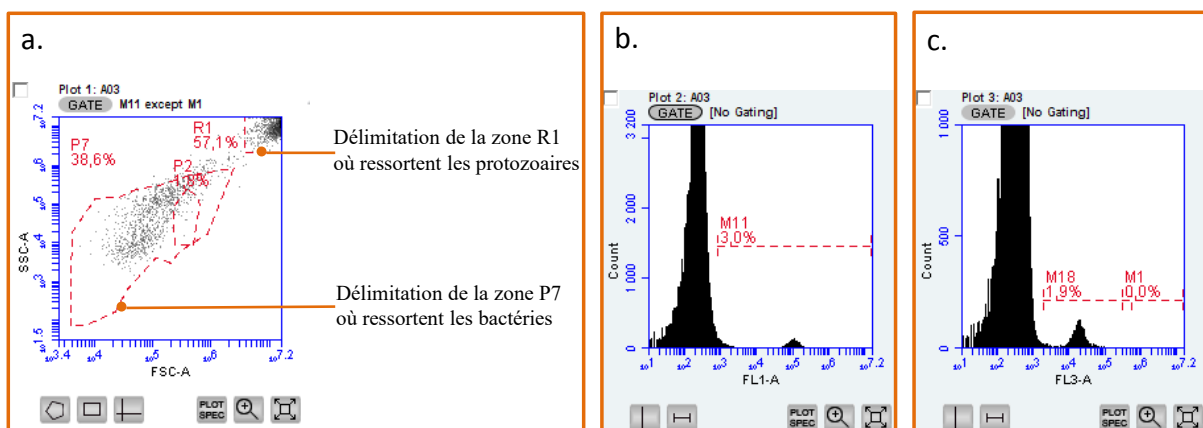


Figure III.8 : *Dénombrement des T.pyriformis en cytométrie en flux après marquage au Syto9 d'un échantillon concentré à 3.10^4 cellules / ml. En a. les particules sont discriminées par rapport à leur taille et à leur granulométrie en (FSC-SSC). En b., M11 délimite la zone où ressortent toutes les particules marquées au Syto9. En c. M1 délimite la zone où ressortent les organismes photosynthétiques.*

Pour vérifier que les particules dénombrées en R1 sont effectivement des protozoaires, nous avons par la suite comparé la concentration d'une suspension de protozoaires mesurée en cytométrie en flux en R1 à celle estimée à l'aide d'une cellule de Nageotte, méthode décrite ci-dessus, qui permet d'avoir un visuel sur les organismes. Les résultats nous ont montré que pour une concentration estimée à $9,2 \cdot 10^2$ et $8,8 \cdot 10^2$ protozoaires / ml en cytométrie en flux, une concentration de $1,0 \cdot 10^3$ et $1,3 \cdot 10^3$ protozoaires / ml était quant à elle estimée avec une cellule de Nageotte. Malgré une sous-estimation de la concentration en protozoaires en cytométrie en flux par rapport à la mesure réalisée en cellule de Nageotte, les valeurs restent tout de même assez proches et nous pouvons en effet considérer que la mesure de la concentration en protozoaires par cytométrie en flux sur des échantillons suffisamment concentrés est possible dans la zone R1.

Cette analyse a également permis de mettre en évidence la présence de « débris » cellulaires provenant des protozoaires qui émettent de la fluorescence, en absence de marquage, dans la zone P7 où sortent habituellement les bactéries, et qui induisent donc de faux positifs sur le comptage de ces dernières. En effet, sur le graphique **b.** de la **figure III.8**, nous avons déterminé une zone M11 où ressortent toutes les particules marquées au Syto9. La zone M1 déterminée sur le graphique **c.** de la **figure III.8** correspond à la zone où émettent les organismes photosynthétiques comme les algues. Les comptages représentés par des points dans la zone P7 sur le graphique en FSC-SSC (**Figure III.8 a.**) où seules les particules qui émettent en M11 sont considérées, en excluant les particules émettant en M1 (organismes photosynthétiques), représentent probablement bien des « débris cellulaires » de protozoaires.

Ce qui veut dire qu'en présence de protozoaires, des débris cellulaires provenant de ces organismes augmentent la concentration estimée en bactéries de manière non négligeable. En effet, il est possible d'observer dans la **figure III.9** ci-dessous, que l'échantillon sans marquage présente des particules qui émettent une auto-fluorescence dans la zone M11 (**Figure III.9, b.2**), que l'on retrouve sur le graphique FCS-SSC dans la zone P7 où sortent les bactéries (**Figure III.9, b.1**).

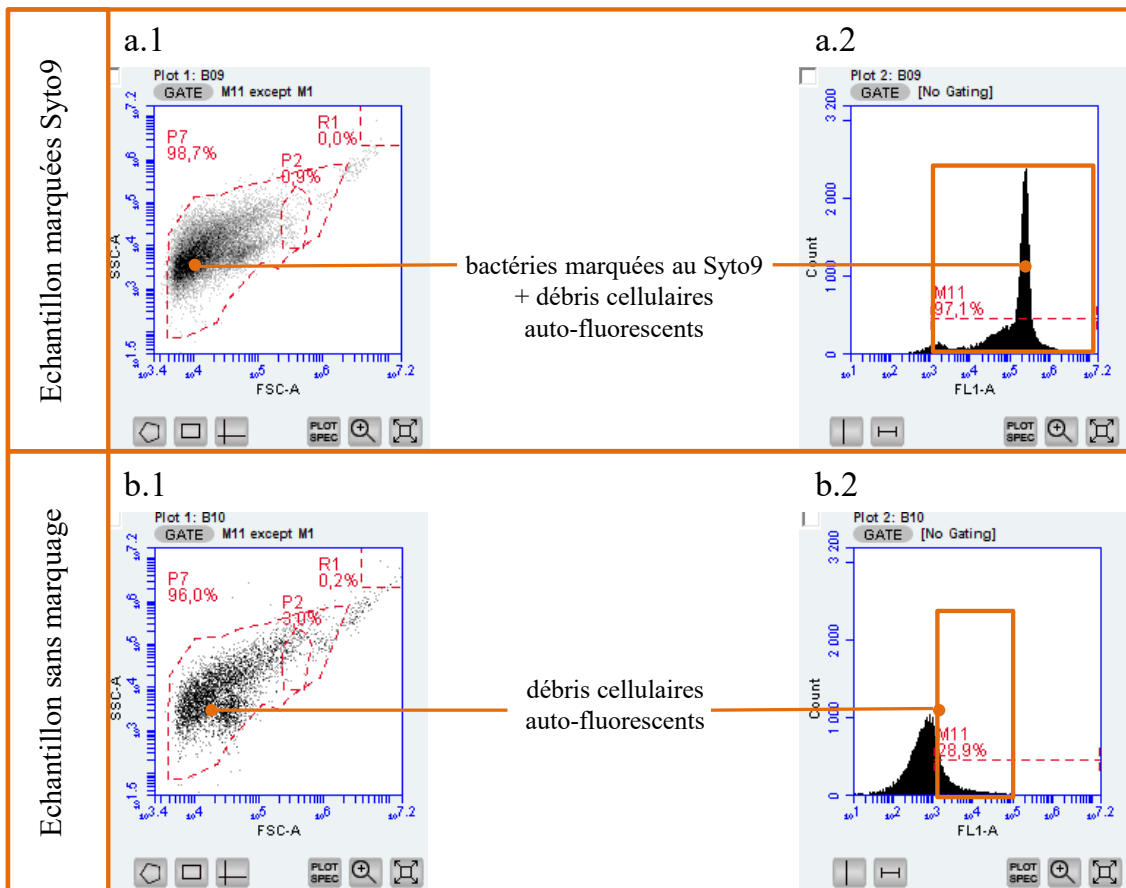


Figure III.9 : Profils cytométriques d'un même échantillon biologique marqué au Syto9 (a.1 ; a.2) et non marqué (b.1 ; b.2) contenant le réseau trophique microbien modèle complet ayant évolué durant 5 jours. En 1 les profils des échantillons discriminés en fonction de leur taille et de leur granulométrie ; en 2 M11 délimite la zone où les particules présentant une fluorescence ressortent.

Ces particules ne sont pas des bactéries. En effet, les bactéries ne possèdent pas d'autofluorescence (hormis pour les bactéries photosynthétiques, mais nous n'en avons pas détecté en FL3) et ne sont donc pas détectées en absence de marquage.

Il a donc été défini que pour estimer correctement la concentration en bactéries par cytométrie en flux, il était nécessaire de passer pour un même échantillon biologique un volume de 50 μ l marqué au Syto9 et un second volume de 50 μ l non marqué. Ainsi, par soustraction de la concentration de particules en P7 estimée dans les échantillons non marqués (**Figure III.9, b.1**) par rapport à celle estimée dans les échantillons marqués (**Figure III.9, a.1**), il est possible d'avoir une estimation réaliste de la concentration en bactéries en s'affranchissant des débris cellulaires auto-fluorescents de protozoaires.

Cette méthode a été testée pour le comptage des bactéries, des algues et des protozoaires.

III.2.2.4 Caractérisations physico-chimiques

a. Dosage des nitrates et phosphates

Les concentrations en ions nitrates et phosphates ont été évaluées par chromatographie ionique à l'aide de l'appareil Dionex™ ICS-1100 muni d'une colonne échangeuse d'anions de type IonPac® AS4A sur un volume d'échantillon de 800 µl préalablement centrifugé 5 min à 7000 g et dont le surnageant a été conservé à -20°C.

b. Dosages des ions ammoniums

Le dosage des ions ammoniums est réalisé conventionnellement par spectrophotométrie sur des volumes de 10 ml. Nous avons alors adapté la méthode à un volume final d'1 ml. Ainsi, un volume de 100 µl de réactif 1 (phénol 35 g/l et nitroprussiate de sodium 0,4 g/l), puis un volume de 100 µl de réactif 2 (hydroxyde de sodium 20 g/l, citrate trisodique 380 g/l et acide dichlorocyanurique 4 g/l) sont ajoutés successivement à l'échantillon à analyser. Les échantillons sont ensuite agités par retournements successifs puis placés à l'obscurité durant la nuit. Une gamme étalon est également réalisée simultanément. Les lectures sont réalisées au spectrophotomètre à $\lambda = 630$ nm.

c. Dosage des nitrites

Le dosage des nitrites s'effectue sur un volume de 1 ml d'échantillon filtré sur 0,22 µm grâce à l'addition de deux réactifs : l'acide sulfanilique et le N-(naphtyl-1)-éthylènediamine dichlorhydrate. Au bout d'une dizaine de minutes, l'ajout de ces deux réactifs permet l'apparition d'un colorant azoïque rouge-violet en présence de nitrites (réaction de Griess). Plus la concentration en nitrites est importante, plus la couleur sera intense. Il convient alors de réaliser une gamme étalon pour pouvoir rapprocher les valeurs de densité optique (DO) de chaque échantillon, à leur teneurs en nitrites. Les lectures sont réalisées au spectrophotomètre à $\lambda = 525$ nm.

d. Mesure du pH

Les mesures de pH ont été réalisées pour chaque puits sur échantillons frais, à l'aide d'un pH-mètre calibré le jour du lancement du test et vérifié à l'aide des standards avant chaque utilisation (pH-mètre Bioblock Scientific 93313, sonde HANNA HI1330). La micro-sonde utilisée a été sélectionnée pour sa capacité à mesurer des pH dans de faibles volumes sans agitation contrairement aux électrodes classiques.

e. Mesure de l'oxygène dissous

Il est possible de mesurer le pourcentage d'oxygène grâce à une microsonde à oxygène (Electrode de Clark, OX-100) reliée à un multimètre (Microsensor Multimeter 2.01, Unisense). Une référence interne couplée à un pico-ampèremètre permet la mesure des variations d'intensité électriques. Ces dernières sont corrélées au gradient d'oxygène et les valeurs s'affichent donc en mV. La calibration de l'appareil est réalisée avant chaque utilisation. La valeur pour un milieu saturé en O₂ est obtenue en plaçant la microsonde dans de l'eau distillée et bullée avec de l'air durant au moins 20 min à 20°C, tandis que la valeur correspondant à un pourcentage en oxygène nul est évaluée par la mesure du % en O₂ au sein d'une solution d'ascorbate de sodium concentrée à 20 g/l.

III.2.2.5 Analyse de la diversité bactérienne par DGGE

Pour extraire l'ADN dans le réseau trophique microbien modèle afin de l'amplifier par PCR, les cellules sont récupérées à partir de 1,5 ml d'échantillon prélevés dans les puits, centrifugés à 7000 g durant 10 min à 4 °C. Le culot obtenu est resuspendu dans 100 µl de tampon contenu dans les colonnes de lyse du kit PowerSoil® DNA Isolation Kit (MoBio laboratories, Inc.). L'extraction d'ADN est réalisée à l'aide de ce kit en suivant le protocole du fournisseur à l'exception de l'éluion de l'ADN qui est faite avec 60 µl de solution C6 pour concentrer l'ADN extrait, au lieu des 100 µl préconisés.

L'ADN génomique ainsi obtenu est utilisé pour amplifier la région correspondant au gène de l'ARNr 16S bactérien à l'aide des amorces 341 – FGC2 (5'-CGCCCGCCGCGCCCCGCGCCCGTCCCGCCGCCCCCGCCCGCCTACGGGAGGCAGCAG-3') possédant une extension riche en CG pour éviter l'entière dénaturation de l'ADN durant la DGGE et 907 – R (5'-CCGTCAATTCMTTGGAGTTT-3') (Invitrogen™). Les PCR ont été réalisées dans un volume final de 30 µl [3 µl tampon, 0,6 µl dNTP (10 mM chacun), 0,3 µl mix amorces (mix 10 µM chacune, Thermo Scientific), 1 µl Taq (Dream Taq 5U/µl, Thermo Scientific), eau ultra-pure qsp 30 µl] avec au maximum 20 ng d'échantillon d'ADN matrice à amplifier. L'appareil (Bio-Rad T100™ Thermal cycler) a été employé avec le programme suivant : étape de dénaturation [5 min à 95 °C], 30 cycles d'amplification [30 s à 95 °C, 30 s à 65 °C (-0,5 °C par cycle les 20 premiers cycles, puis les 10 derniers à 55 °C) et 45 s à 72 °C] suivis de 7 min à 72 °C.

Les DGGE ont été réalisées sur gels composés de 7 % d'acrylamide et présentant un gradient d'urée de 40-60 %. La migration est réalisée à 60 °C durant 16 h à 100 V (DCode™ Universal Mutation Detection System, Bio-Rad). La révélation du gel est réalisée en présence de 1/10 000 SYBR® GREEN I (Life Technologies) laissé au contact du gel durant au minimum 30 min. Le gel est ensuite observé au scanner à fluorescence FLA-9000 Starion de Fujifilm.

III.3 Résultats et discussion

III.3.1 Sélection des modèles d'étude et liens trophiques

La chaîne trophique composée de *Chlorella vulgaris* et de *Brachionus calyciflorus* est classiquement utilisée dans les tests d'écotoxicité normés tel que le Rotoxkit F « 24h acute » ou « 48h short-chronic » de MicroBioTests. L'introduction d'une boucle microbienne composée d'un protozoaire et d'un consortium microbien nitrifiant a été pensée de façon à apporter du réalisme et à éviter l'accumulation de déchets azotés dans le milieu, connus comme étant inhibiteurs de la croissance des rotifères (Liang et al. 2017, Chen et al. 2011, Schlüter and Groeneweg 1985). Néanmoins, la sélection du protozoaire et du consortium microbien a nécessité des phases d'optimisation.

En effet, nous avons constaté une importante variabilité au niveau de la dynamique de population des rotifères sur des tests lancés à des moments différents dans des conditions à priori identiques. Nous nous sommes donc intéressés aux paramètres que nous ne maîtrisons pas comme l'homogénéité du consortium bactérien et la pureté des protozoaires. Concernant le consortium provenant des filtres de l'aquarium de Nancy (consortium dit de « première génération »), les différents aliquots ne semblaient pas avoir une composition identique. En utilisant ce consortium, nous avons observé un développement de champignons qui survenait de manière aléatoire et un manque général d'homogénéité avec présence de résidus de matière organique non définie. De plus nous n'étions pas certains du pouvoir de nitrification de ce dernier car aucun test n'avait été réalisé sur ce sujet.

Il a donc été décidé de produire un consortium microbien dit de « deuxième génération » plus homogène, majoritairement composé de bactéries et aux propriétés nitrifiantes avérées.

III.3.1.1 Production d'un consortium microbien nitrifiant

A partir de ce consortium d'eau douce de « première génération », nous avons décidé d'en produire un de « seconde génération », aux capacités nitrifiantes avérées par enrichissement durant 31 jours en présence d'une source de matière organique riche en protéines.

Un suivi régulier des concentrations en ions ammonium, nitrites et nitrates a été réalisé sur les 31 jours de production pour nous assurer du pouvoir ammonifiant et nitrifiant du consortium. Ces résultats sont présentés en **figure III.10**.

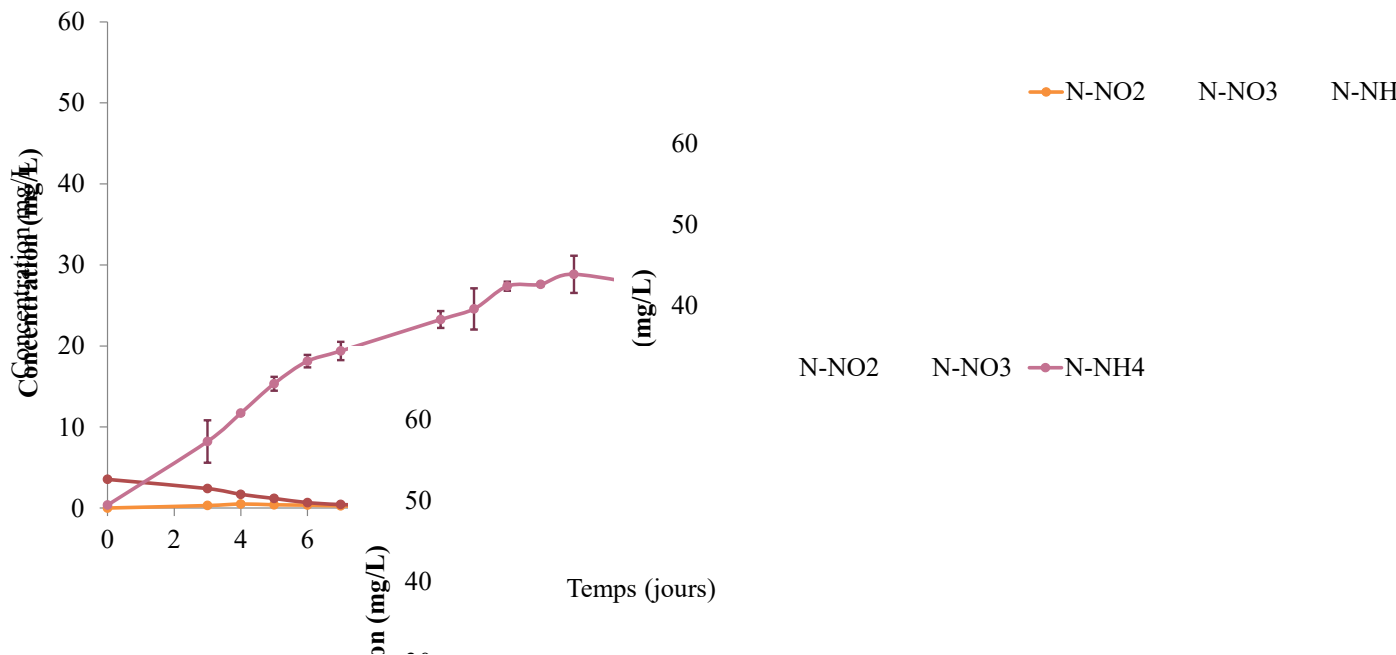


Figure III.10 : Evolution des concentrations en N-NO₃, N-NO₂ et N-NH₄ durant les 31 jours d'enrichissement. Les valeurs représentées correspondent aux valeurs moyennées des 3 ballons et les barres d'erreur correspondent aux écarts-types de ces valeurs. Les NO₃ et NO₂ ont été dosés par chromatographie ionique et les NH₄ par dosage spectrophotométrique.

Nous avons alors pu observer une augmentation rapide de la concentration en N-NH₄ durant les 14 premiers jours, couplé à une diminution de la concentration en N-NO₃. Les nitrites sont dosés à des concentrations inférieures à 0.5 mg/l de N-NO₂ durant cette période et apparaissent seulement à partir du 14^{ème} jour. Au bout du 20^{ème} jour, la concentration en N-NO₃ commence à réaugmenter alors que celle des N-NH₄ tend à diminuer. Ainsi, les ions ammonium sont produits dès les premiers jours suite à la dégradation de la matière organique (ammonification) présente dans le milieu. L'oxygénation maintenue à saturation par bullage du milieu permet alors aux microorganismes d'oxyder les ions ammoniums en nitrites (nitritation) à partir de 14 jours puis en nitrates (nitratation) à partir de 20 jours.

Ces résultats sont en accord avec la littérature (Canfield et al. 2010) et témoignent du pouvoir ammonifiant et nitrifiant de notre consortium permettant de recycler l'azote présent dans le système.

La caractérisation taxonomique du consortium a été réalisée par séquençage des ADNr 16S. Les résultats présentés **figure III.11** montrent que la communauté est dominée (abondances supérieures au seuil de 5%) par les genres *Azospirillum*, *Comamonas*, *Cytophaga*, *Flavobacterium* et *Rhodanobacter*. Le genre *Azospirillum* est connu pour évoluer en association avec les racines des plantes dans les sols. Il a été démontré que des espèces appartenant à ce genre sont capable de fixer l'azote (Kim et al. 2005, Bashan and Holguin 1997), de nitrifier et dénitrifier (Kundu et al. 1987). Les bactéries des genres *Comamonas* et *Rhodanobacter*, sont capables de dénitrification (Green et al. 2012, Gumaelius et al. 2001, Patureau et al. 1994). Les bactéries du groupe *Cytophaga* sont couramment retrouvées dans les rizosphères de certaines plantes et contribueraient au recyclage du carbone, de l'azote et du phosphate (Johansen and Binnerup 2002) ; elles seraient également fortement présentes dans les écosystèmes aquatiques (Kirchman 2002). Nous retrouvons également le genre *Flavobacterium*, dont certaines espèces de bactéries sont impliquées dans la minéralisation de la matière organique (Bernardet et al. 2006). Notons aussi la présence du genre *Nitrosomonas* (abondance de l'ordre de 1%) connu pour ses capacités nitrifiantes (Andersson and Hooper 1983, Kokufuta et al. 1988).

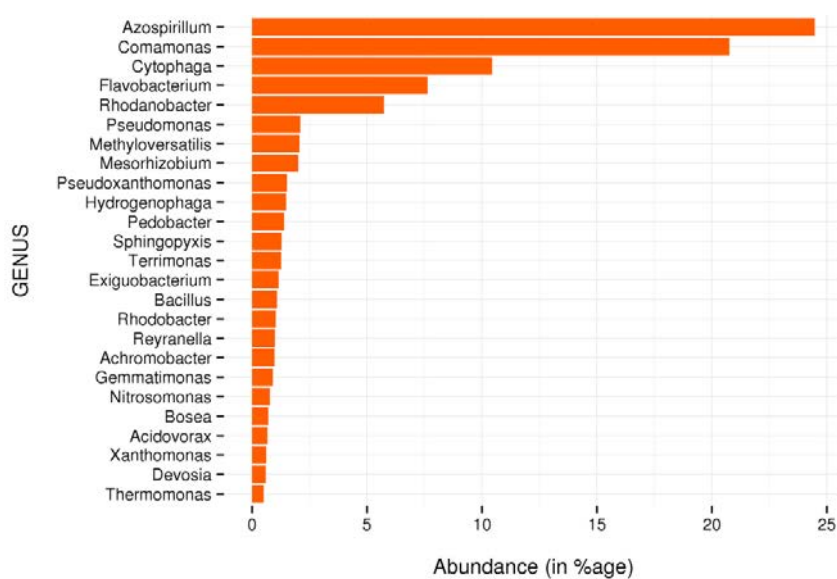


Figure III.11 : *Caractérisation taxonomique du consortium microbien de « deuxième génération » (abondance des Unité Taxonomiques Opérationnelles (OTU) (97% similarité) >0,5 %)*

Nous avons ainsi produit plus de 120 aliquots de 500 μ l contenant chacun 1.10^8 cellules/ml d'un consortium nitrifiant homogénéisé. Ce consortium microbien de « deuxième génération » a été utilisé pour la mise en place du réseau trophique microbien à compter de mai 2017.

III.3.1.2 Choix du protozoaire

Bien que la reproduction des rotifères serait dépendante de la consommation d'algues, les protozoaires *T. pyriformis* et *C. paramecium* sont tous deux consommés par le rotifère *B. calyciflorus* et pourraient en augmenter la survie (Mohr et Adrian 2002). Néanmoins, *C. paramecium* semble permettre une reproduction plus importante de *B. calyciflorus* par rapport à *T. pyriformis* en présence d'algues (Mohr et Adrian 2002). Nous avons donc initialement choisi d'intégrer *C. paramecium* au réseau trophique.

Nous disposions d'une première souche de *C. paramecium* provenant du Muséum National d'Histoire Naturelle (MNHN, Paris) qui contenait une proportion importante de bactéries et des microorganismes eucaryotes non identifiés. Nous avons alors acheté une nouvelle souche au « Culture Collection of Algae and Protozoa » (CCAP, Ecosse). Cette souche n'est pas cultivée en condition axénique mais d'après le fournisseur, contiendrait une faible concentration en bactéries. Pour la mise en place de nos nanocosmes, un important nombre de protozoaires flagellés est nécessaire (3.10^3 cellules/ml) et la croissance lente de *C. paramecium* reste un facteur limitant le nombre de répétitions. Ainsi, pour produire plus de biomasse de *C. paramecium*, nous avons voulu enrichir le milieu de culture en apportant plus de matière organique (principalement sous la forme de décoction de blé autoclavée). Dans ces conditions, la croissance des bactéries présentes initialement en faible quantité prenait le dessus sur celle des protozoaires. Lors de la mise en place des nanocosmes, cela conduisait à un ajout important et non maîtrisé de bactéries dont la culture était difficilement contrôlable et induisait donc de la variabilité dans les bioessais. Nous avons alors réalisé de nombreuses tentatives de purification de la culture de protozoaires par ajout d'antibiotiques à diverses concentrations (pénicilline (10 μ g/ml à 250 μ g/ml, streptomycine 10 μ g/ml à 250 μ g/ml et amphotéricine B 0,1 μ g/ml à 1,25 μ g/ml), ou par filtrations séquentielles (purification sur gradient de densité Nycodenz de 10 à 60 %).

Ces différents essais s'étant révélés infructueux, nous avons choisi en janvier 2018, d'utiliser *Tetrahymena pyriformis* dont nous maîtrisions la culture et la préparation.

T. pyriformis est cultivable facilement, de manière axénique, et permet d'obtenir une importante biomasse rapidement. En revanche, il s'est par la suite avéré difficile de maintenir cet organisme sur le moyen et long terme dans le réseau trophique. Il est possible que les conditions de croissance n'y soient pas optimales et/ou que la pression de prédation des rotifères y soit trop forte. Ainsi, dans toutes nos expérimentations impliquant *T. pyriformis*, un rapide déclin de la population de protozoaire était observé.

En perspective à ce travail il serait nécessaire de retravailler par la suite sur l'intégration d'un protozoaire différent dans le réseau.

III.3.1.3 Liens trophiques

Nous avons voulu vérifier la consommation de *C. vulgaris* et de *T. pyriformis* par *B. calyciflorus* par visualisation directe en microscopie à fluorescence (Figure III.12).

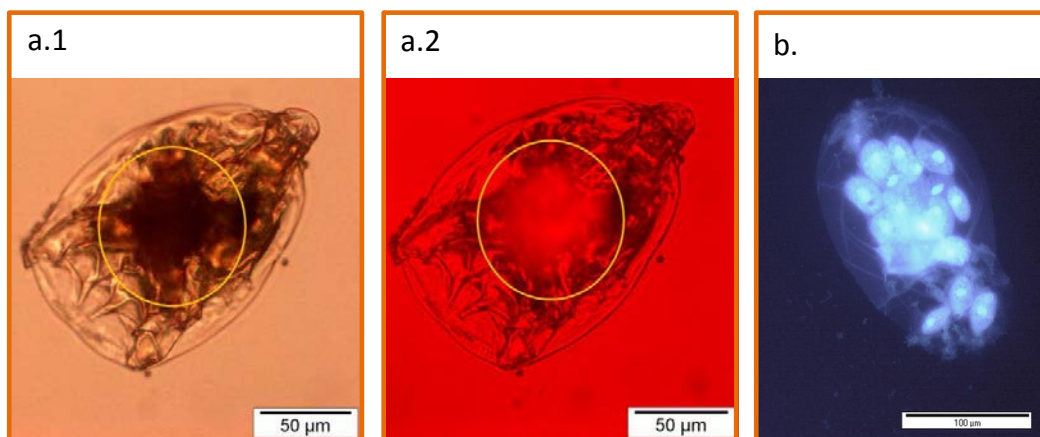


Figure III.12 : Photos de *Brachionus calyciflorus* ayant évolué 48 h en présence de 5.10^5 *Chlorella vulgaris*/ml après fixation au lugol 10 % final, réalisées au microscope à fluorescence sans filtre (a.1) et avec filtre chlorophylle (a.2). Photo d'un *B. calyciflorus* observé au microscope à fluorescence sous filtre UV après marquage au DAPI et ayant évolué 48 h en présence de 5.10^2 *Tetrahymena pyriformis* /mL (b.).

La masse noire retrouvée dans le tube digestif du rotifère (Figure III.11, a.1) correspond à l'accumulation d'algues *C. vulgaris* dans ce même organisme mise en évidence par l'émission de fluorescence avec filtre chlorophylle (Figure III.11, a.2). Il est également possible de dénombrer 15 à 20 protozoaires dans le tube digestif de *B. calyciflorus* (Figure III.11, b.).

D'après les résultats présentés en **Figure III.12**, les Chlorelles et les protozoaires sont donc bien consommés par les rotifères et témoignent des liens trophiques existants entre ces différents organismes. Dans le réseau trophique microbien modèle ainsi développé, les rotifères ont le rôle de « top prédateurs » et sont capables d'ingérer tous les organismes présents (bactéries, algues et protozoaires).

III.3.2 Rapports des organismes à introduire dans le réseau

Le réseau trophique microbien modèle se compose d'un consortium nitrifiant produit au laboratoire, de *Chlorella vulgaris*, de *Tetrahymena pyriformis* et de *Brachionus calyciflorus*. Il a fallu déterminer les concentrations en organismes à ajouter au nanocosme pour que celui-ci soit fonctionnel ; mais il fallait également que ces proportions soient réalistes en regard de ce qui est présent dans l'environnement (Mostajir et al. 2012) et que les différents organismes soutiennent la croissance des rotifères sur une durée permettant l'évaluation d'une toxicité chronique.

Les premières expérimentations réalisées avaient pour but d'estimer la quantité de microorganismes à ajouter à T0 dans le réseau pour que celui-ci se maintienne sur le long terme. En effet, une quantité trop faible ou trop élevée d'un organisme pourrait conduire au déclin rapide d'un autre (ressource trophique insuffisante, compétition, prédation). Par exemple, une quantité d'algues trop faible a un effet direct sur la reproduction et la survie des rotifères. A l'inverse, une concentration en algues trop élevée inhibe le développement du consortium microbien et engendre un déclin rapide des protozoaires (données reportées sur la base d'observations microscopiques). Pour ce faire, l'évolution des dynamiques de population des organismes dans les différentes conditions expérimentales ont été suivies de manière journalière sur une durée de 7 jours. Le détail des 4 conditions est présenté en **Table III.2**.

Table III.2 : *Concentrations en organismes introduits à T0 dans les différentes conditions.*

	1.	2.	3.	4.
<i>Chlorella vulgaris</i> (cells/mL)	1 10 ⁵	5 10 ⁵	1 10 ⁵	5 10 ⁵
<i>Bacteria consortium</i> (cells/mL)	1 10 ⁵	1 10 ⁵	1 10 ⁵	1 10 ⁵
<i>Tetrahymena pyriformis</i> (cells/mL)	5 10 ²	5 10 ²	1 10 ³	1 10 ³
<i>Brachionus calyciflorus</i> (nombre / puits de 4 mL)	2	2	2	2

Les dynamiques de population des bactéries dans le cas des différentes conditions testées sont similaires les premiers jours (**Figure III.13**). Ensuite, une concentration plus importante en bactéries est observée dans les conditions 2 et 4 par rapport aux conditions 1 et 3 (environ 0.5 log d'écart). Le fait d'ajouter plus de protozoaires dans le réseau (1000 protozoaires/ml dans les cas c et d contre 500 protozoaires/ml dans les cas a et b) ne semble pas influencer sur la dynamique de population des rotifères. À l'inverse, l'augmentation de la concentration initiale en algues (5.10⁵ cells/ml en b et d contre 1.10⁵ cells/ml en a et c) semble impacter positivement les dynamiques de population des rotifères qui atteignent en moyenne 25 rotifères/ puits de 4mL dans les cas b et d (**Figure III.13**) contre une dizaine au maximum par puits de 4 mL pour les cas a et c (**Figure III.13**). A noter que la méthode d'évaluation par cytométrie de la concentration en protozoaires n'était pas assez sensible. Les dynamiques de population des protozoaires étant sous le seuil de détection de l'appareil (< 100 cellules/ml en moins de 24h), elles ne sont pas représentées ici.

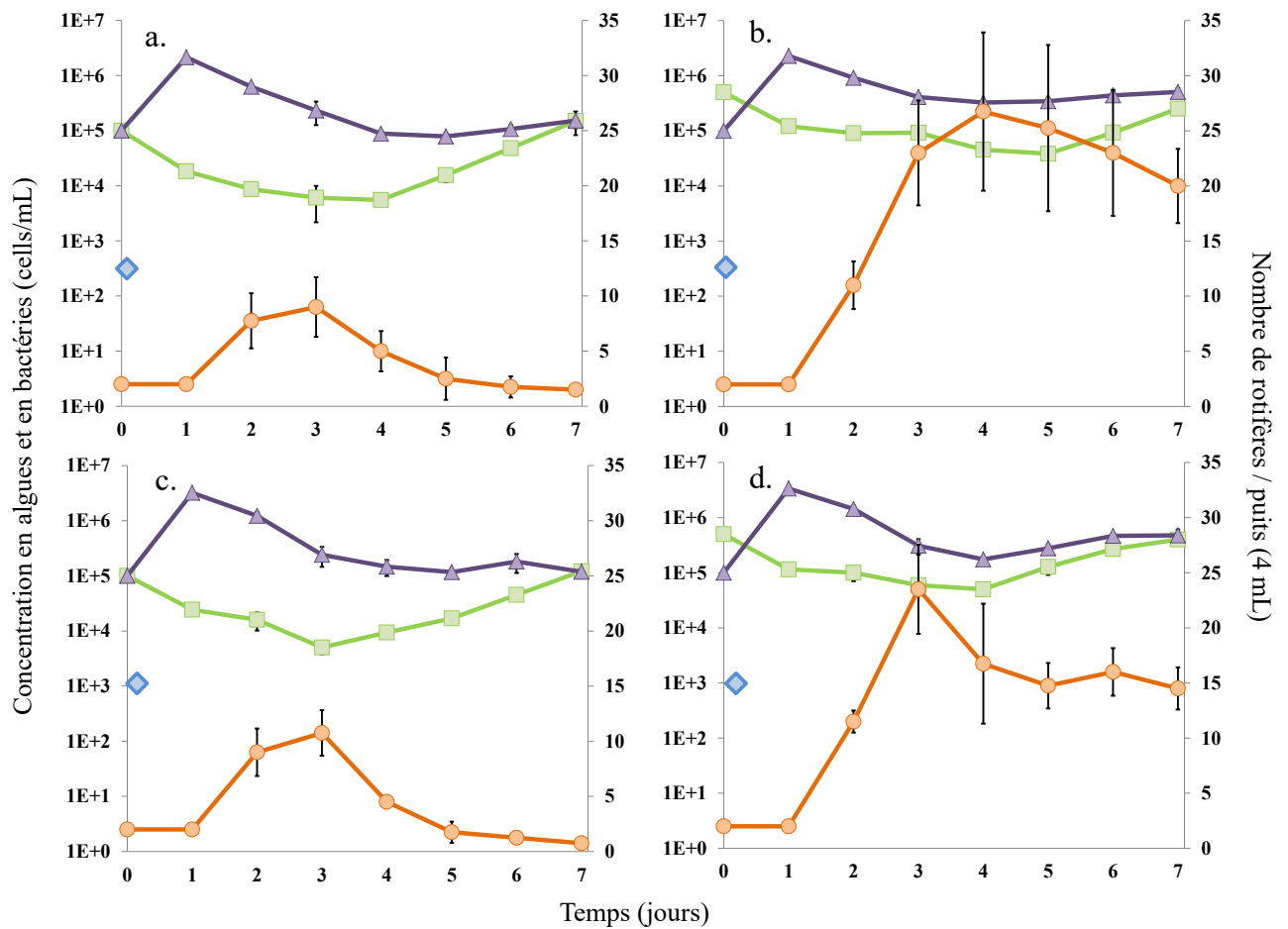


Figure III.13 : *Dynamique de population des algues (carrés verts), des bactéries (triangles violets) estimées en cytométrie en flux après marquage au Syto9, des rotifères (ronds oranges) dénombrés sous loupe binoculaire et correspondant aux paramètres de la condition 1 (a.), de la condition 2 (b.), de la condition 3 (c.) et de la condition 4 (d.) à chacun des 7 jours d'expérimentation. Les écart-types ont été calculés sur la base de 6 réplicats. Les losanges bleus indiquent la concentration en protozoaires introduite à T0.*

Les observations sous loupe binoculaire ont permis de mettre en évidence une plus faible reproduction des rotifères dans le cas des conditions a et c comparé aux conditions b et d. Les coefficients de variation présentés dans la **figure III.14** témoignent d'une variation globalement plus faible entre les différents réplicats dans les configurations b et d. De plus, la taille des rotifères était nettement inférieure, jusqu'à 2 fois plus petits, dans les conditions a et c et ces derniers étaient visiblement moins mobiles. Des rotifères morts sont observés au bout de 3 jours dans la condition d et seulement au bout de 5 jours dans la condition b.

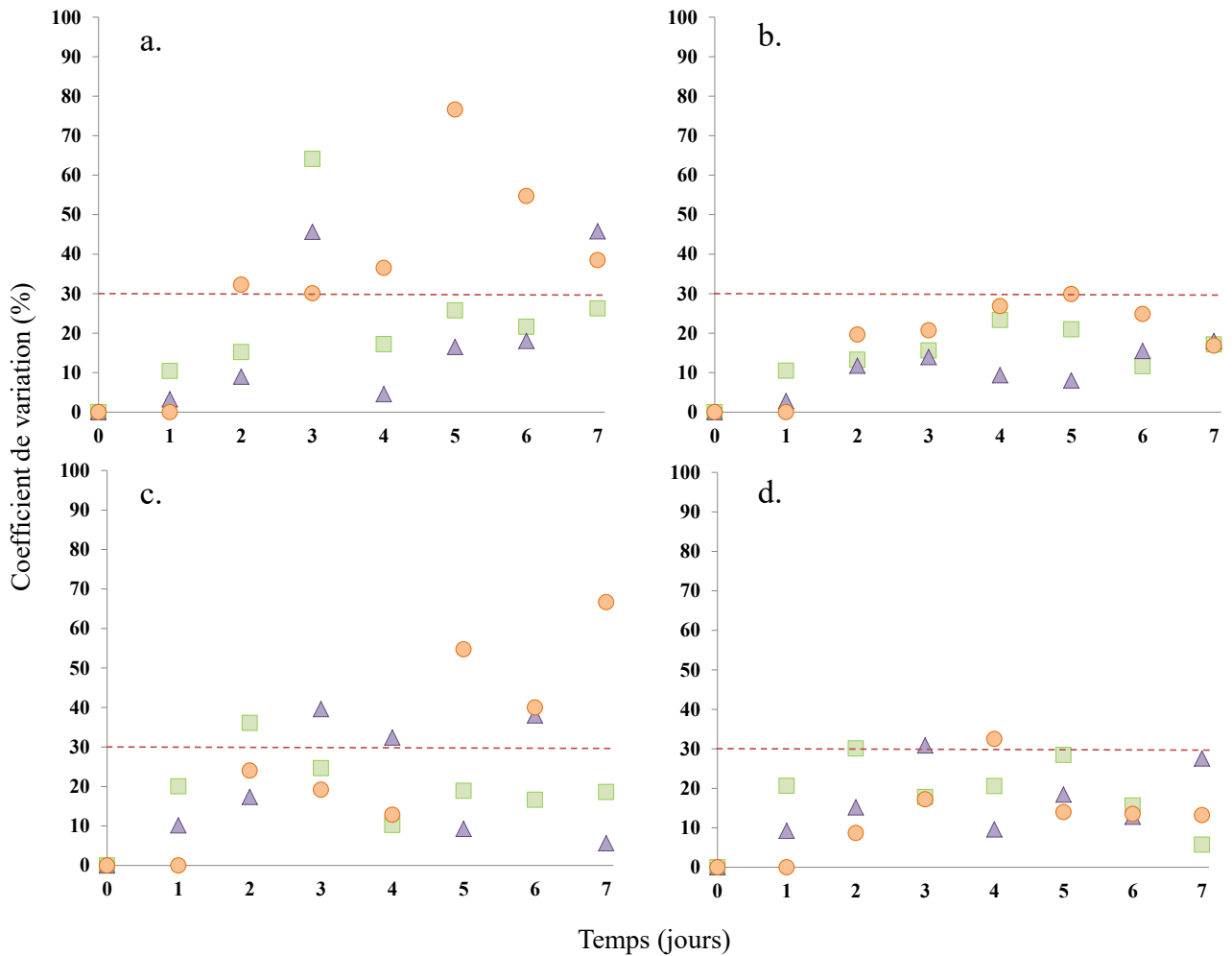


Figure III.14 : Coefficients de variation des algues (carrés verts), des bactéries (triangles violets) et des rotifères (ronds oranges) calculés sur la base de 6 réplicats et correspondant aux paramètres des conditions 1 (a.), 2 (b.), 3 (c.) et 4 (d.) à chacun des 7 jours d'expérimentation.

Sur la base de ces résultats, les paramètres de la condition b. ont donc été conservés pour les tests ultérieurs. Les concentrations initiales introduites en consortium, algues, protozoaires et rotifères seront donc à l'avenir respectivement de $1 \cdot 10^5$ cellules/ml, $5 \cdot 10^5$ cellules/mL, $5 \cdot 10^2$ cellules/ml et 2 organismes par puits (c'est à dire par nanocosme).

III.3.3 Sélection des méthodes d'analyse

L'utilisation de systèmes miniaturisés apporte de nombreux avantages mais pose le problème de la faisabilité de certaines méthodes d'analyse. L'optimisation des méthodes d'analyse pour une application à de petits volumes a donc été nécessaire. Dans un premier temps, nous avons défini les paramètres les plus pertinents à suivre pour évaluer l'impact d'un contaminant sur le fonctionnement du réseau trophique.

Dans un second temps, différentes méthodes d'analyse ont été testées pour permettre le suivi de ces paramètres et choisir ainsi les plus adaptées pour une utilisation en routine.

III.3.3.1 Suivi des dynamiques de population par communauté des organismes

Pour chaque organisme, il a fallu déterminer une méthode adaptée au suivi de sa dynamique. Alors que la méthode adoptée pour dénombrer les rotifères (comptage sous loupe binoculaire) s'est tout de suite avérée appropriée, il aura fallu tester différentes méthodes pour évaluer les dynamiques de la population algale, celles de la communauté bactérienne et celles des protozoaires afin de sélectionner celles qui semblaient les plus pertinentes.

a. Choix de la méthode pour l'évaluation de la dynamique de population des algues et de la communauté des bactéries

Le suivi de la dynamique de population algale et de la communauté bactérienne a dans un premier temps été effectué par dénombrement sous microscope à fluorescence après marquage au DAPI. Cette technique permet d'avoir un visuel sur les différents organismes et donc de les discriminer avec plus de certitude qu'en cytométrie en flux. De plus, il est possible avec un faible volume d'échantillon (100 μ l) d'évaluer la concentration en algues et en bactéries sur un seul et même filtre et donc de réaliser une seule préparation pour dénombrer les deux types d'organismes. Néanmoins cette technique est extrêmement laborieuse (environ 4 h d'analyses pour une série de 20 échantillons) ce qui n'est pas adapté à une utilisation en routine sur un grand nombre d'échantillons.

En revanche, la cytométrie en flux permet d'évaluer la concentration en algues et en bactéries sur un volume de 50 μ l dans un temps relativement court (20 échantillons en 30 min). C'est une technique rapide et moins fastidieuse. De plus, la marge d'erreur est plus faible que pour les comptages au DAPI du fait d'un comptage sur un plus grand nombre de cellules. Néanmoins, les contraintes de l'analyse en cytométrie en flux sont de préparer des échantillons marqués et non marqués pour le comptage des bactéries et de réaliser le dénombrement le jour même sur échantillon frais.

Ainsi, c'est cette deuxième technique qui a été retenue pour suivre la dynamique de population par communauté des algues et des bactéries en routine.

b. Choix de la méthode pour l'évaluation de la dynamique de population des protozoaires

Le suivi de la dynamique de population des protozoaires a initialement été réalisé, comme pour les algues et les bactéries, par dénombrement sous microscope à fluorescence après marquage au DAPI. Cette technique permet de suivre la dynamique de population des protozoaires sur les 7 jours. La fixation et conservation des échantillons à analyser étant possible, elle permet également de mieux échelonner les analyses dans le temps. Néanmoins, étant donné la faible concentration en protozoaires, elle nécessite un volume filtré minimum de 2 mL, soit la moitié du volume total de l'échantillon. Elle est donc efficace mais pas optimale pour des échantillons de 4 mL. De plus, comme mentionné précédemment, cette méthode est fastidieuse ce qui la rend inadaptée à des tests en routine.

La cytométrie en flux permet d'estimer la concentration en protozoaires de manière fiable, simple et rapide, mais uniquement dans les échantillons dont la concentration est supérieure à 10^3 protozoaires/mL. Cette méthode n'est donc pas assez sensible dans nos conditions d'expérimentation.

Le suivi de la dynamique de population des protozoaires par dénombrement à l'aide d'une cellule de Nageotte est plus sensible que la cytométrie en flux pour estimer les faibles concentrations que nous observions en *T. pyriformis* dans notre réseau.

Néanmoins, même en comptant l'intégralité des lignes de la cellule de Nageotte, le nombre de protozoaires présents ne permet pas une estimation fiable de la concentration au-delà du 3^{ème} jour. De plus cette méthode, bien que nécessitant un volume d'échantillon limité par rapport au DAPI (200µL), est fastidieuse et doit être réalisée préférentiellement de manière journalière sur échantillons frais.

Le dénombrement à l'aide de la cellule de Nageotte reste tout de même la technique la plus adaptée dont nous disposons actuellement compte tenu des éléments précédemment cités.

III.3.3.2 Mesure O₂ dissous

Cette méthode est extrêmement sensible et nécessite une acquisition en continu supérieure à 15 min pour se stabiliser et obtenir une moyenne fiable pour un seul échantillon. Un flux d'air en surface est également nécessaire pour homogénéiser le milieu.

Cette méthode a l'avantage d'être non destructrice pour les échantillons. Néanmoins, elle est chronophage et se réalise forcément sur échantillons frais. Son utilisation n'est pas réaliste en

routine sur un grand nombre d'échantillons mais elle peut être considérée pour des besoins spécifiques.

III.3.3.3 Diversité bactérienne

L'objectif était d'évaluer si nous étions capables d'extraire suffisamment d'ADN par puits pour réaliser une amplification PCR des ADNr 16S dans le but d'appréhender qualitativement la diversité bactérienne. L'intérêt par la suite serait de suivre l'évolution de cette diversité dans les réseaux trophiques au cours du temps en absence de contamination (fonctionnement), et la comparer avec la diversité retrouvée dans des échantillons contaminés (effets du toxique).

Nos travaux ont montré qu'il était possible d'extraire des quantités d'ADN suffisantes pour des amplifications PCR. Cependant, en raison des faibles concentrations obtenues (<2 ng), nous avons constaté qu'il était préférable de réaliser les PCR immédiatement après extraction, il n'est pas conseillé de les congeler pour réaliser les analyses ultérieurement. En effet, une étape de congélation peut engendrer une perte d'ADN, or, il convient de limiter au maximum cette perte lorsque les quantités s'avèrent déjà très faibles. Au-delà du risque de ne plus rien amplifier en PCR, il est aussi probable de perdre les séquences des espèces les moins représentées ce qui induirait une perte d'information.

Un exemple de résultats obtenus à l'aide de la méthode de PCR-DGGE pour évaluer la diversité bactérienne est présenté dans la **figure III.15**. Globalement, nous observons une diversité bactérienne assez faible (< 20 bandes). Les flèches violettes pointent un possible effet temps sur l'apparition ou la disparition d'une bande. Les flèches oranges pourraient montrer un effet de la contamination avec présence d'une bande dans les échantillons non exposés et absence dans les échantillons exposés, et inversement.

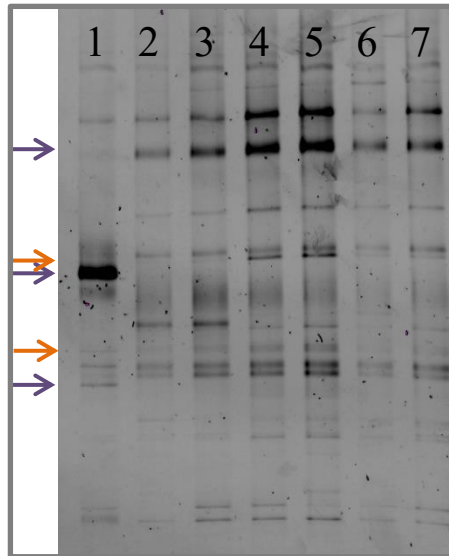


Figure III.15 : *Evaluation de la diversité bactérienne par PCR-DGGE après exposition du réseau trophique à différents contaminants. (1) 24 h sans contaminant ; (2 et 3) 72 h sans contaminant ; (4 et 5) exposition 48 h à 30 µg/l de ZnCl₂ après 24 h de stabilisation sans contaminant ; (6 et 7) exposition 48 h à 30 µg/l de ZnO après 24 h de stabilisation sans contaminant. Cette expérimentation a été réalisée à l'aide du consortium de première génération.*

Il nous serait donc possible d'avoir une empreinte de la communauté bactérienne composant le réseau trophique microbien à différents temps et exposé à divers contaminants. Notons que la PCR-DGGE n'est pas forcément la méthode la plus pertinente pour évaluer la biodiversité, l'objectif était plutôt de voir s'il nous était possible d'extraire suffisamment d'ADN pour réaliser une PCR afin d'appréhender la diversité taxonomique.

III.4 Conclusion et mise en œuvre finale

Grâce à cette phase de développement, les conditions pour la mise en œuvre des réseaux trophiques microbiens modèles ont pu être déterminées et les principales étapes sont résumées de façon schématique dans la **figure III.16**. Ainsi, les quatre maillons composant le réseau trophique microbien modèle (consortium microbien nitrifiant, *Chlorella vulgaris*, *Tetrahymena pyriformis* et *Brachionus calyciflorus*) sont placés en co-culture dans des microplaques de 12 puits contenant chacun un volume final de 4 ml.

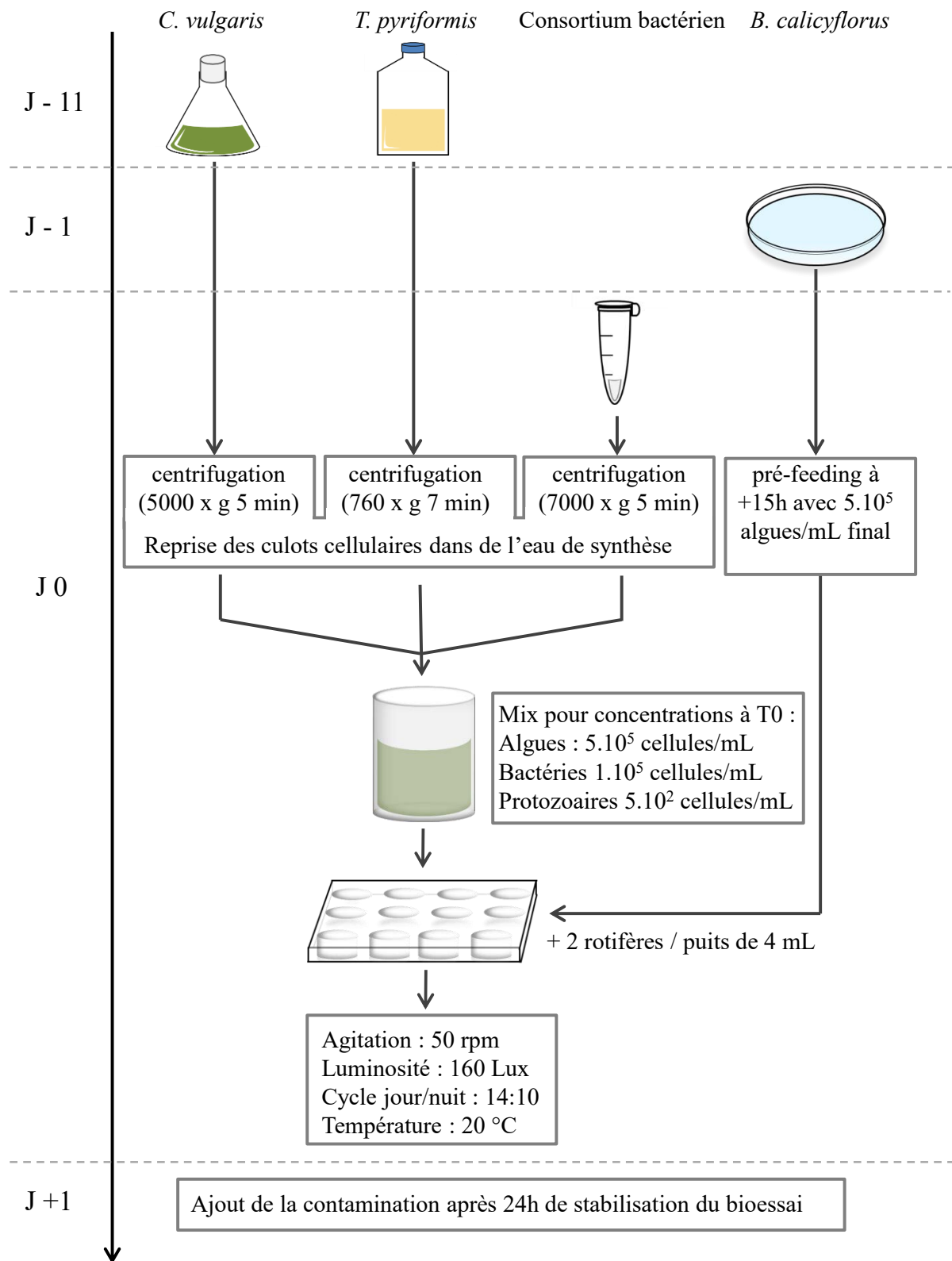


Figure III.16 : Schéma récapitulatif des principales étapes nécessaires à la préparation du réseau trophique modèle.

Des prélèvements par « sacrifice » de 6 puits sont réalisés quotidiennement. Des mesures de pH, des dynamiques de population des algues et de communauté des bactéries (cytométrie en flux) et de la dynamique de population des rotifères (comptage sous loupe binoculaire) sont réalisées sur échantillons frais le jour du prélèvement. Néanmoins, les protozoaires testés déclinent rapidement et ne sont plus détectés au-delà de quelques jours.

Pour chaque réplicat biologique, il est possible de réaliser un dosage des nitrates, des nitrites, des ions ammonium et des phosphates. Les volumes réservés à ces analyses peuvent être conservés à -20°C. Les autres méthodes présentées précédemment (diversité bactérienne, mesure de l'oxygène dissous) sont réalisables mais n'ont pas été sélectionnées pour une utilisation en routine.

Nous avons donc développé un réseau trophique microbien modèle composé d'organismes représentatifs d'un écosystème d'eau douce, en volume de 4 ml par puits permettant de multiplier les réplicats et les variables étudiées. La reproductibilité a été optimisée grâce à la maîtrise d'un certain nombre de paramètres biotiques et abiotiques et notamment grâce à la production d'un consortium microbien nitrifiant. Ce dernier permet, entre autre, d'apporter des nutriments au système et de retraiter les déchets azotés pouvant devenir toxiques pour les organismes. En effet, dans la majorité des tests chroniques réalisés en laboratoire, il convient de changer régulièrement de milieu pour que ces déchets azotés ne s'y accumulent pas. Le consortium microbien nitrifiant produit au laboratoire permet de réaliser nos tests sans renouvellement de milieu sur plusieurs jours et participe également à la redistribution des nutriments dans le nanocosme.

Les expérimentations visant à étudier le maintien du nanocosme sur le long terme, appréhender son fonctionnement et tester son utilisation pour des tests écotoxicologiques sont présentées dans les chapitres 4 et 5 ci-après.

III.5 Références

A

- Akpor Oghenerobor B., et Maggy N. B. Momba. « Relationship of Protozoan Biomass to Phosphate and Nitrate Removal from Activated Sludge Mixed Liquor ». *Biotechnology Journal* 5, n° 3 (mars 2010): 304-13. <https://doi.org/10.1002/biot.200900135>.
- Andersson Kristoffer K., et Alan B. Hooper. « O₂ and H₂O Are Each the Source of One O in NO₂⁻ Produced from NH₃ by *Nitrosomonas*: ¹⁵N-NMR Evidence ». *FEBS Letters* 164, n° 2 (12 décembre 1983): 236-40. [https://doi.org/10.1016/0014-5793\(83\)80292-0](https://doi.org/10.1016/0014-5793(83)80292-0).

B

- Bashan Yoav, et Gina Holguin. « *Azospirillum* – Plant Relationships: Environmental and Physiological Advances (1990–1996) ». *Canadian Journal of Microbiology* 43, n° 2 (février 1997): 103-21. <https://doi.org/10.1139/m97-015>.
- Bernardet Jean-François, et John P. Bowman. « The Genus *Flavobacterium* ». In *The Prokaryotes*, édité par Martin Dworkin, Stanley Falkow, Eugene Rosenberg, Karl-Heinz Schleifer, et Erko Stackebrandt, 481-531. New York, NY: Springer New York, 2006. http://link.springer.com/10.1007/0-387-30747-8_17.
- Brailovskaya I. V., T. A. Kudryavtseva, V. N. Larionov, E. A. Prikhod'ko, et E. N. Mokhova. « Changes in the Shape of Photodynamically Damaged *Tetrahymena Pyriformis* Cells ». *Doklady Biochemistry and Biophysics* 413, n° 1 (avril 2007): 72-75. <https://doi.org/10.1134/S1607672907020093>.

C

- Calow P, editor. Handbook of ecotoxicology. Oxford: Blackwell; 1993. 885 p.
- Canfield Donald E., Alexander N. Glazer, et Paul G. Falkowski. « The Evolution and Future of Earth's Nitrogen Cycle ». *Science* 330, n° 6001 (8 octobre 2010): 192-96. <https://doi.org/10.1126/science.1186120>.
- Chen Weimin, Hao Liu, Qingmin Zhang, et Shugui Dai. « Effects of Nitrite and Toxic *Microcystis Aeruginosa* PCC7806 on the Growth of Freshwater Rotifer *Brachionus Calyciflorus* ». *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology* 86, n° 3 (mars 2011): 263-67. <https://doi.org/10.1007/s00128-011-0208-0>.

D-E

- Davey M. E., et G. A. O'toole. « Microbial Biofilms: From Ecology to Molecular Genetics ». *Microbiology and Molecular Biology Reviews: MMBR* 64, n° 4 (décembre 2000): 847-67.
- Epel Bernard, et Robert W. Krauss. « The Inhibitory Effect of Light on Growth of Prototheca Zopfii Kruger ». *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biophysics Including Photosynthesis* 120, n° 1 (mai 1966): 73-83. [https://doi.org/10.1016/0926-6585\(66\)90278-0](https://doi.org/10.1016/0926-6585(66)90278-0).

G

- Girling A.E., D. Pascoe, C.R. Janssen, A. Peither, A. Wenzel, H. Schäfer, B. Neumeier, et al. « Development of Methods for Evaluating Toxicity to Freshwater Ecosystems ». *Ecotoxicology and Environmental Safety* 45, n° 2 (février 2000): 148-76. <https://doi.org/10.1006/eesa.1999.1847>.
- Green Stefan J., Om Prakash, Puja Jasrotia, Will A. Overholt, Erick Cardenas, Daniela Hubbard, James M. Tiedje, et al. « Denitrifying Bacteria from the Genus Rhodanobacter Dominate Bacterial Communities in the Highly Contaminated Subsurface of a Nuclear Legacy Waste Site ». *Applied and Environmental Microbiology* 78, n° 4 (15 février 2012): 1039-47. <https://doi.org/10.1128/AEM.06435-11>.
- Gumaelius L., G. Magnusson, B. Pettersson, et G. Dalhammar. « Comamonas Denitrificans Sp. Nov., an Efficient Denitrifying Bacterium Isolated from Activated Sludge ». *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 51, n° 3 (1 mai 2001): 999-1006. <https://doi.org/10.1099/00207713-51-3-999>.

H-J-K

- Hettiarachchi D.C, Hettiarachchi M. 1995. « The population structure and the effect of pH on growth characteristics of Brachionus calyciflorus amphiceros grown on freshwater Chlorella sp ». *J. Natn. Sci. Coun. Sri Lanka*. 23/4 : 143-151.
- Johansen J.E., et S.J. Binnerup. « Contribution of Cytophaga-like Bacteria to the Potential of Turnover of Carbon, Nitrogen, and Phosphorus by Bacteria in the Rhizosphere of Barley (Hordeum vulgare L.) ». *Microbial Ecology* 43, n° 3 (1 mai 2002): 298-306. <https://doi.org/10.1007/s00248-002-2006-z>.

- Kim Chungwoo, Mihály L Kecskés, Rosalind J Deaker, Kate Gilchrist, Peter B New, Ivan R Kennedy, Seunghwan Kim, et Tongmin Sa. « Wheat Root Colonization and Nitrogenase Activity by *Azospirillum* Isolates from Crop Plants in Korea ». *Canadian Journal of Microbiology* 51, n° 11 (novembre 2005): 948-56. <https://doi.org/10.1139/w05-052>.
- Kirchman David L. « The Ecology of Cytophaga–Flavobacteria in Aquatic Environments ». *FEMS Microbiology Ecology* 39, n° 2 (février 2002): 91-100. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6941.2002.tb00910.x>.
- Kokufuta Etsuo, Masato Shimohashi, et Isei Nakamura. « Simultaneously Occurring Nitrification and Denitrification under Oxygen Gradient by Polyelectrolyte Complex-coimmobilized *Nitrosomonas Europaea* and *Paracoccus Denitrificans* Cells ». *Biotechnology and Bioengineering* 31, n° 4 (mars 1988): 382-84. <https://doi.org/10.1002/bit.260310415>.
- Krienitz Lothar, Volker A.R. Huss, et Christina Bock. « Chlorella: 125 Years of the Green Survivalist ». *Trends in Plant Science* 20, n° 2 (février 2015): 67-69. <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2014.11.005>.
- Kundu B. S., K. R. Dadarwal, et P. Tauro. « Nitrification and Simultaneous Denitrification by *Azospirillum* *Brasilense* 12S ». *Journal of Biosciences* 12, n° 1 (mars 1987): 51-54. <https://doi.org/10.1007/BF02716953>.

L-M-N

- Liang Ye, Xinglan Chen, Xuxin Lu, Sichen Jin, Yuanqi Min, et Jiaxin Yang. « Combined Effects of Microcystin and Nitrite on the Growth, Lipid Peroxidation, and Antioxidant Responses of the Freshwater Rotifer *Brachionus Calyciflorus* ». *Aquatic Toxicology* 192 (novembre 2017): 78-88. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2017.09.013>.
- Mar Papa Daouda, Bouchra El Khalfi, Jose Roman Perez-Castiñeira, Aurelio Serrano, et Abdelaziz Soukri. « Cell Stress by Phosphate of Two Protozoa <i>Tetrahymena thermophile</i> and <i>Tetrahymena pyriformis</i> ». *Advances in Bioscience and Biotechnology* 08, n° 12 (2017): 451-62. <https://doi.org/10.4236/abb.2017.812033>.
- Mohr Silvia, et Rita Adrian. « Reproductive Success of the Rotifer *Brachionus Calyciflorus* Feeding on Ciliates and Flagellates of Different Trophic Modes ». *Freshwater Biology* 47, n° 10 (octobre 2002): 1832-39. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2427.2002.00929.x>.

Mostajir Behzad, Christian Amblard, Evelyne Buffan-Dubau, Rutger de Wit, Robert Lensi, et al.
« Les réseaux trophiques microbiens des milieux aquatiques et terrestres ». J.C. Bertrand et al.
Presses Universitaires de Pau et des Pays de l'Adour, pp.28, 2012. fihal-00848692f

P

Pace Michael L., et John D. Orcutt. « The Relative Importance of Protozoans, Rotifers, and Crustaceans in a Freshwater Zooplankton community1: Importance of Planktonic Protozoa ». *Limnology and Oceanography* 26, n° 5 (septembre 1981): 822-30. <https://doi.org/10.4319/lo.1981.26.5.0822>.

Patureau D., J. Davison, N. Bernet, et R. Moletta. « Denitrification under Various Aeration Conditions in Comamonas Sp., Strain SGLY2 ». *FEMS Microbiology Ecology* 14, n° 1 (avril 1994): 71-78. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6941.1994.tb00092.x>.

S

Sauvant M. P., D. Pepin, et E. Piccinni. « Tetrahymena Pyriformis: A Tool for Toxicological Studies. A Review ». *Chemosphere* 38, n° 7 (mars 1999): 1631-69.

Schlüter M., et J. Groeneweg. « The Inhibition by Ammonia of Population Growth of the Rotifer, Brachionus Rubens, in Continuous Culture ». *Aquaculture* 46, n° 3 (juin 1985): 215-20. [https://doi.org/10.1016/0044-8486\(85\)90207-8](https://doi.org/10.1016/0044-8486(85)90207-8).

Simeonov V., J.A. Stratis, C. Samara, G. Zachariadis, D. Voutsas, A. Anthemidis, M. Sofoniou, et Th. Kouimtzis. « Assessment of the Surface Water Quality in Northern Greece ». *Water Research* 37, n° 17 (octobre 2003): 4119-24. [https://doi.org/10.1016/S0043-1354\(03\)00398-1](https://doi.org/10.1016/S0043-1354(03)00398-1).

ANNEXE

Annexe SIII : Composition et préparation détaillée des solutions mères et de l'eau de synthèse

Préparation des solutions mères du milieu :

L'eau de synthèse est réalisée à partir de solutions mères concentrées. Les différents sels sont conditionnés séparément dans des bouteilles en verre, autoclavés, stockés à l'abri de la lumière et à une température de 20 °C. Elles sont ensuite utilisées de manière stérile et sont renouvelées tous les 6 mois.

- 9600 mg/l de NaHCO₃ (=100X)
- 1500 mg/l de CaSO₄•2H₂O (=25X)
- 6000 mg/l de MgSO₄ (=100X)
- 400 mg/l de KCl (=100X)
- 1000 mg/l de KH₂PO₄ (=1000X)
- 25 000 mg/l de NaNO₃ (=1000X)

Préparation de la solution mère d'oligo-éléments à partir de solutions stock :

	Solution stock mg/l	Solution mère mg/l
H ₃ BO ₃	57190	57,19
MnCl ₂ •4H ₂ O	7210	7,21
LiCl	6120	6,12
RbCl	1420	1,42
NaBr	320	0,32
Na ₂ MoO ₄ •2H ₂ O	1260	1,26
CuCl ₂ •2H ₂ O	335	0,335
ZnCl ₂	260	0,26
CaCl ₂ •6H ₂ O	200	0,2
KI	65	0,065
Na ₂ SeO ₃	43,8	0,0438
NH ₄ VO ₃	11,5	0,0115

Les solutions stock d'oligoéléments sont conditionnées séparément dans des bouteilles en verre. La solution mère est réalisée à partir des solutions stock en ajoutant les différents composés dans l'ordre mentionné ci-dessus à raison de 1ml / L. A noter que la solution stock de H₃BO₃ cristallise. Il est donc nécessaire de la placer 10 min à 60 °C puis de l'homogénéiser 5 min à l'aide d'un agitateur magnétique avant le prélèvement. Une fois l'ensemble des solutions ajouté, un volume de 5 ml de FeSO₄•7H₂O vient compléter et terminer la préparation de la solution mère d'oligo-éléments. Une fois les différents composés ajoutés, la solution mère est stérilisée par filtration sur 0,22 µm.

Préparation de l'eau de synthèse :

L'eau de synthèse est préparée stérilement sous hotte à flux laminaire à partir des solutions mères autoclavées. Pour réaliser 1 L de milieu, dans une bouteille autoclavée contenant 878 ml d'eau milliQ stérile, les volumes suivants de solution mère sont ajoutés en prenant soin de bien les homogénéiser au préalable :

- 10 ml de NaHCO_3 (100X)
- 40 ml de $\text{CaSO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (25X)
- 10 ml de MgSO_4 (100X)
- 10 ml de KCl (100X)

Fermer le bouchon et agiter vigoureusement pour homogénéiser.

- Ajouter ensuite 1 mL de KH_2PO_4 (1000X) puis 1 ml de NaNO_3 (1000X) et pour finir 50 ml de la solution mère d'oligoéléments.

Fermer le bouchon et agiter vigoureusement pour homogénéiser.

La composition finale de l'eau de synthèse est donc la suivante :

- 96 mg/l de NaHCO_3
- 60 mg/l de $\text{CaSO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$
- 60 mg/l de MgSO_4
- 4 mg/l de KCl (soit
- 1 mg/l de KH_2PO_4 (soit 0,2 mg/L de P)
- 25 mg/l de NaNO_3 (soit 4 mg/L de N)

+ oligoéléments : 2,8595 mg/l H_3BO_3 , 0,3605 mg/l $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$, 0,306 mg/l LiCl , 0,071 mg/l RbCl , 0,016 mg/l NaBr , 0,063 mg/l $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 0,01675 mg/l $\text{CuCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 0,013 mg/l ZnCl_2 , 0,01 mg/l $\text{CaCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, 0,00325 mg/l KI , 0,00219 mg/l Na_2SeO_3 , 0,000575 mg/l NH_4VO_3

+ 1 mg/l $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$

Le milieu est ensuite bullé durant la nuit précédant son utilisation dans une pièce à 20 °C. Le pH du milieu d'essai est ensuite ajusté à pH 7.5 à l'aide d'acide chlorhydrique et d'hydroxyde de sodium juste avant utilisation.

CHAPITRE IV

Fonctionnement du réseau trophique microbien modèle

IV. Fonctionnement du réseau trophique microbien modèle

Une fois le réseau trophique microbien développé, nous avons souhaité appréhender son fonctionnement général puis étudier plus spécifiquement le rôle des différents organismes. Il nous a également semblé intéressant de suivre l'évolution du nanocosme sur un temps long correspondant à plusieurs générations de rotifères. De plus, dans un but de standardisation, nous nous sommes attachés à évaluer la variabilité du système.

Une première expérimentation sur 28 jours a permis d'appréhender le fonctionnement général du réseau trophique et de constater que les déchets azotés sont pris en charge. Le système peut alors évoluer sur des temps longs sans renouvellement de milieu. Une seconde expérimentation sur des temps plus courts (7 jours) a permis de mettre en évidence le rôle joué par les différents maillons en appréhendant le fonctionnement de l'écosystème en l'absence du maillon concerné. Ainsi le consortium bactérien s'est révélé jouer le rôle nitrifiant escompté. De plus, la variabilité du système a été évaluée après 5 jours d'évolution du réseau trophique complet. L'analyse a porté sur la répétabilité des mesures de dynamique de population des organismes au sein d'un même nanocosme, sur les mesures de ces paramètres entre différents nanocosmes d'une même microplaque et sur des nanocosmes de microplaques différentes. La variabilité la plus importante pour les concentrations en algues, bactéries et rotifères a été retrouvée entre des nanocosmes de microplaques différentes. Ces travaux auront permis de mieux caractériser le réseau trophique microbien modèle et d'appréhender la variabilité du système.

IV. A model aquatic microbial trophic web as a new tool for risk assessment

-Draft manuscript-

Anne Vicente,¹ Pascale Bauda,^{1,2} Armand Maul,¹ Bénédicte Sohm,¹ Philippe Rousselle,¹ Christophe Pagnout,^{1,2}.

¹Université de Lorraine, LIEC (Laboratoire Interdisciplinaire des Environnements Continentaux), UMR7360, Metz F-57070, France.

²CNRS, LIEC, UMR7360, Campus Bridoux, Metz F-57070, France

IV.1 Abstract:

Single-species ecotoxicity tests are commonly used to assess impacts of contaminants on the environment. They allow the measurement of direct effects of pollutants on model organisms but without considering complexity of ecosystems. They are useful to provide data on the relative toxicity toward particular species but they are difficult to extrapolate in a framework of risk assessment. Within this context, we developed a microbial food web consisting in a simple trophic chain with rotifers (*Brachionus calyciflorus*) fed on algae (*Chlorella vulgaris*), with a microbial loop composed of a nitrifying microbial consortium and protozoa (*Tetrahymena pyriformis*). The whole system that evolves in 12-well microplates filled with 4 ml of synthetic freshwater is sustainable for at least 28 days. In the perspective of an ecologically realistic chronic ecotoxicity test, a test period of 7 days as been defined. Analysis of population dynamics and measurement of nitrites, nitrates, ammonium and phosphates were chosen to study the contribution of each biological component to the system. Coefficient of variance corresponding to each level (plate, well, replicate) in the three-stage process after 5 days for rotifers was 23.09%, 20.66% and 14.81%, respectively. This knowledge can be used in further test design to diminish result heterogeneity. The use of this microbial network in ecotoxicity testing should contribute to more realistic aquatic contamination risk assessment, especially at the microbial level.

Keywords : *trophic web, trophic transfer, microbial compartment, microbial ecotoxicology, aquatic microcosm, ecological risk assessment*

IV.2 Introduction

Ecotoxicological studies routinely focus on direct effects of contaminants on the reproduction rate, growth or survival of sentinel organisms. Such tests are time- and cost-effective and display low variability among replicates. However these data cannot be extrapolated to the ecosystem level and do not allow the assessment of indirect effects and trophic transfer of contaminants (Relyea and Hoverman 2006). Indirect effects were previously defined as effects that modify interactions between or among populations by indirectly affecting the population of one species by impacting another population (Preston 2002). Although direct effects of contaminants usually reduce organism abundance, indirect effects can both increase or reduce abundance (Fleeger et al. 2003).

More than three decades ago, it was assumed that tests on single species are useful and one of the only reliable means available to assess effects of contaminants, but the important need of developing tests at higher level of organization have already been raised (Cairns 1984). Later on, Scientific Committee on Health and Environmental Risks (SCHER) addressed the new challenges for risk assessment during an European commission and assumed the necessity of improving approaches by integrating complexity of ecosystems (Scientific Committee on Health and Environmental Risks 2013). To meet this expectation, impacts of contaminants can be studied using micro- and mesocosm approaches. These systems are environmentally more realistic and take interactions between species into account. While some of them are dealing with microbial communities (Miao et al. 2017, Fazi et al. 2016, Widenfalk et al. 2004), some others contain food chain (Duguma et al. 2017, Jovanovic et al. 2016, Traas et al. 1998) but we found only one study that consider both microbial communities and a food chain (Bour et al. 2015) and any with microbial loop.

Microorganisms are a crucial compartment to consider since they are on the basis of food chains and they play key roles in nutrient and biogeochemical cycles. While phytoplankton is a major actor of total photosynthesis (Enawgaw and Lemma 2018, Mugidde 1993, Pomeroy 1974, Talling 1965), heterotrophic bacterial communities ensure essential role in the cycling of nitrogen as well as in production and degradation of organic matter (Davey and O'toole 2000). Microbial loop consisting of protozoa which graze on bacteria allow nutrients to be reintroduced in ecosystems (Amblard et al. 1995) Developing systems that allow to assess the impacts of contaminants at microbial level in relevant environmental conditions appear then as a necessity. Thus, systems of intermediate complexity between single-species tests and micro- mésocosms could be a promising option.

Within this context, we developed a model aquatic microbial food web in a 4 ml volume sample. This bioassay consists in a trophic chain with the rotifer *Brachionus calyciflorus* fed on the microalgae *Chlorella vulgaris* (primary producers), combined with a microbial loop composed of a microbial nitrifying consortium and protozoa *Tetrahymena pyriformis*. Rotifers are sensitive organisms widely found in freshwater ecosystems as well as in all types of waterbodies (Segers 2008) and *Chlorella* sp. are unicellular green algae known to be high-performance primary producer in aquatic ecosystems (Krienitz et al. 2015). Heterotrophic bacteria use the dissolved organic matter (DOM) produced by algae to produce particular organic matter (POM) (Jacquet 2005, Davey et O'toole 2000, Tranvik 1992). Bacteria are mostly consumed by protozoa in the microbial loop and are both regulated by protozoa and bacteriophages (Jacquet 2005, Iriberry et al. 1995). These selected organisms are widely used in toxicity tests for years (Silva et al. 2009, Bogarets et al. 2001, Radix et al. 2000, Sauvant et al. 1999, Schlimme et al. 1999, Snell and Moffat 1992, Nilsson 1989, Shigeoka et al. 1988).

In the present study we describe running conditions of the model microbial trophic web and the role of each biological component in the system. We also assess the long term functioning to determine the sustainability of the dispositive. In the context of further use of the dispositive as an exotoxicity test, the variability characterizing each stage (i.e. plate, well, replicate) of population dynamics evaluation was determined. This approach may be useful i) to assess the variance, and subsequently the precision associated with a single assay, and ii) to develop an optimal experimental design, regarding the allocation of sampling effort to each level of the multistage process, in the sense that it minimizes the variance of the mean corresponding to a given experimental scheme.

IV.3 Materials and Methods

IV.3.1 Test medium

Synthetic water was prepared based on moderately hard water (US EPA): 1.14 mM NaHCO₃, 0.35 mM CaSO₄·H₂O, 0.5 mM MgSO₄, 0.054 mM KCl ; with 7.3 μM of KH₂PO₄ and 294 μM of NaNO₃ supplemented by 46.2 μM H₃BO₃, 1.8 μM MnCl₂·4H₂O, 7.2 μM LiCl, 0.53 μM RbCl, 1.55 μM NaBr, 0.26 μM Na₂MoO₄·2H₂O, 0.098 μM CuCl₂·2H₂O, 0.095 μM ZnCl₂, 0.046 μM CaCl₂·6H₂O, 0.02 μM KI, 0.019 μM Na₂SeO₃, 0.005 μM NH₄VO₃, X μM FeSO₄·7H₂O under sterile conditions. Air was bubbled in synthetic water overnight and pH was adjusted at pH 7.5 (± 0.1) before use.

IV.3.2 Culture and preparation of test organisms

IV.3.2.1 algae

Chlorella vulgaris cells were grown in BG11 medium (Sigma-Aldrich) under constant temperature (20°C), rotary agitation (100 rpm) with circadian period (14:10). Cells in exponential growth phase (DO 680nm < 0.55) were harvested by centrifugation (5000 × g, 5 min, 20 °C) and washed once with the same volume of synthetic water in the same conditions. Algae concentration was measured with flow cytometer.

IV.3.2.2 Nitrifying bacterial consortium

A nitrifying bacterial consortium was produced and characterized as described in Supporting Information SI-1. Aliquots containing 1.10^8 cells/ml were constituted and conserved at -80 °C in glycerol 10% (500 µl / aliquot). Before use, they are thawed at room temperature, harvested by centrifugation (7000 × g, 5 min, 20 °C) to remove glycerol and washed once with synthetic water. Dilution is made to prepare a 10^7 cells/ml suspension in synthetic water.

IV.3.2.3 Protozoa

Tetrahymena pyriformis was grown in ATCC 357 medium under axenic conditions and constant temperature (20°C), in the dark. Cells were harvested by centrifugation (760 × g, 7 min, 20 °C) and washed twice in synthetic water. Pellets were resuspended in 5 ml of synthetic water and cell concentration was determined under microscope using a Nageotte hemocytometer. At least 2 counting per sample were done and the mean was calculated.

IV.3.2.4 Rotifers

Brachionus calyciflorus cysts were provided by MicroBioTests Inc. (Belgium) and conserved at 4°C. Hatching procedure from protocol Rotokit F chronic was followed, except the replacement of requested medium (moderately hard water, US EPA) by synthetic water. Briefly, cysts were incubated on a plate covered by the lid under continuous light source of 3000 lux at 25°C for at least 18 hours.

IV.3.3 Microbial trophic web

A mix was prepared in synthetic water in order to obtain a final concentration of 5.10^5 algae/ml, 10^5 bacteria/ml from the nitrifying consortium and 5.10^2 protozoa/l. Each well of

polycarbonate 12-multiwells plate (4×3) was filled with 4 ml of this microorganism mix. Then, 2 rotifers/well were introduced within 2 h after hatching. Each well is thus composed of the microbial trophic web schematized in **figure IV.1**, where algae are primary producers consumed by rotifers in presence of a microbial loop in which some bacteria play a nitrifying role.

Multiwell plates were placed at 20 °C under orbital shaking (50 rpm) with day/night alternation (14:10, 160 lux). To minimize medium evaporation during experiment, multiwell plates were inserted in a Plexiglas hermetic box with wet atmosphere.

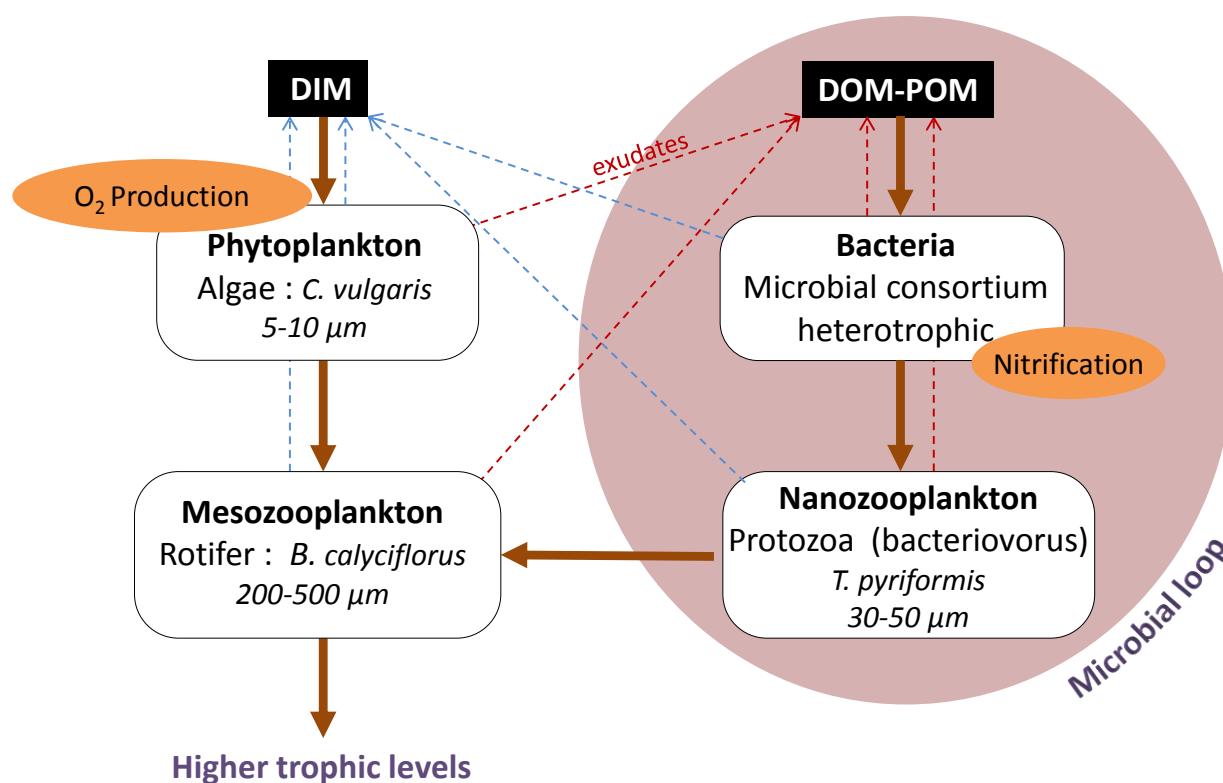


Figure IV.1 : Schematic representation of the model microbial trophic web used in this study. Brown large arrows represent trophic ways, dotted red lines are for organic matter way while dotted blue lines are for mineralization ways. All organisms are interconnected by trophic relations (predator-prey interactions) and functions they ensure in the ecosystem (O₂ production, nitrification, dissolved/particulate organic matter (DOM/POM) and dissolved inorganic matter (DIM) production and consumption).

IV.3.4 Analyses

IV.3.4.1 Sample recovery

After homogenization by pipetting (1000 μ l 20 times) in the center of the well, 80 μ l were taken for flow cytometry analysis performed immediately after recovering. Then, on a same well, a volume of 3 ml were centrifuged and supernatants were stored at -20 °C for NO_3^- , PO_4^{3-} , NO_2^- and NH_4^+ measurements done in the following days.

IV.3.4.2 Population dynamics

Number of rotifers per well were counted under binocular magnifier set in order to see the whole well.

Concentration of algae and bacteria were determined by flow cytometry analyses on a BD Accuri™ C6 (BD Biosciences) equipped with a laser emitting at 488 nm. Samples were analyzed by acquiring events on 50 μ l first without cells labeling and then on another 50 μ l of the same well labeled with Syto9 (molecular probe Sigma S34854, 5 μ M, 10 min in the dark) in order to discriminate false positive autofluorescent particles. Chlorophyll was collected with a longpass filter above 670 nm and protozoa were distinguished based on their forward and side scattering (FSC and SSC, respectively). Protozoa were observed under binocular magnifier every day and concentrations were determined under microscope using a Nageotte hemocytometer for the 28 days test. At least 2 counts per sample were done and the mean was calculated.

IV.3.4.3 Physico-chemical analysis

Concentrations in NO_3^- and PO_4^{3-} were measured by ionic chromatography (Dionex™ ICS-1100 with IonPac® AS4A) on 800 μ l. NO_2^- and NH_4^+ concentrations were estimated by molecular absorption spectrometry (quantification limit 0.01 mg/l, detection limit 0.003 mg/l, respectively). NO_2^- concentrations were measured at $\lambda = 525$ nm on 1ml after adding sulfanilic acid and *N-(1-Naphthyl)ethylenediamine dihydrochloride* and NH_4^+ concentrations were measured at $\lambda = 630$ nm on 1mL after the addition of 100 μ l of the first reagent (phenol 35 g/l, sodium nitroprusside 0.4 g/l) and 100 μ l of a second reagent (sodium hydroxide 20 g/l, trisodium citrate 380 g/l, dichlorocyanuric acid 4 g/l) at least 6 h in the dark.

Measurements of pH were done on each sample of 4 ml with an adapted probe for little volume (HANNA, HI 1330B).

IV.3.4.4. Statistical analysis

As the requirements of parametric testing were not always satisfied, non-parametric methods were employed for the statistical analyses on data of both population and ion concentration dynamics. Thus, Spearman's rank correlation coefficient was used to assess monotonic relationships between the variables taken two-by-two. The Mann Whitney Wilcoxon test (MWW) was used to compare the different trophic assemblies with the complete microbial trophic web day by day. More generally, the Friedman test was used to ascertain the significance of changes in population abundances or ion concentrations across measurement rounds for each treatment (i.e. design or day) as a mean to investigate the impact of each organism in the model microbial trophic web. Pairwise comparisons were utilized post-hoc by taking into account the multiple comparisons problem (i.e. requiring a stricter significance threshold for individual comparisons, so as to compensate for the number of tests being made). These comparisons were performed by means of the Wilcoxon signed-rank test (Wilcoxon S-R) to assess the significance of changes in population abundance or ion concentration between the five designs examined two-by-two.

To determine the variability characterizing each stage (i.e. plate, well, replicate), the concentration of each organism was assessed from the data obtained on 5 plates with 4 wells per plate and 6 measures per well. Given that this time the conditions were more favorable to the use of a parametric approach, a nested analysis of variance was performed on the log-transformed data, after testing for homogeneity of the variances by using the Cochran's C test, to assess the relative magnitudes of the sources of variation in the multistage process. To this end, the total variance in the nested design was partitioned into components associated with the variability characterizing each stage of the process. Seen another way, the technique yields a component of variance, and thereafter a coefficient of variation, expressing the variability among repeated measures at a given level of the three-stage process (i.e. plate, well, replicate). Statistical analyses were performed using R studio software.

IV.4 Results and discussion

IV.4.1 General functioning of the microbial trophic web

General functioning of the complete microbial trophic web was studied on 28 days (**Figure IV.2**) in order to assess stability and viability of the bioassay over time. Algal and bacterial population and community dynamics increased over time as observed in **figure IV.2, A** and confirmed by statistical analysis in **table IV.1** (Spearman, $P < 10^{-5}$, $P = 0.004$; $\rho = 0.90$, $\rho = 0.75$, respectively). Indeed, cell concentrations increased from $5 \cdot 10^5$ cells/ml for algae and $1 \cdot 10^5$ cells/ml for bacteria at day 0 to $5.7 \cdot 10^6$ cells/ml and $7.2 \cdot 10^5$ cells/ml at day 28, respectively. Protozoa rapidly decrease from 500 to less than 50 cells/ml and are not observed anymore after 14 days. This decrease has been observed every day under binocular magnifier and estimated with Nageotte hemocytometer. Due to the low number of organisms, often close to the detection limit, and the counting uncertainties, no statistical analyses have been performed on protozoa. However, we have observed that a single rotifer is able to have about 15 protozoa in his digestive tract (**Supplementary Information, SIV.2**). Indeed, *B. calyciflorus* is known to feed on *T. pyriformis* (Mohr and Adrian 2002) that may partly explain the decrease in protozoa population. Population dynamic of rotifers increase continually until day 7 and then oscillates between 1 and 24 rotifers per well until day 28. No correlation has been found between number of rotifers and time (Spearman's $\rho = -0.12$; $P = 0.69$) and neither with algae (Spearman's $\rho = -0.14$ $P = 0.62$) or bacteria (Spearman's $\rho = 0.23$; $P = 0.43$) concentrations. However, it does not mean that there is no interrelationship between rotifers, algae and bacteria. *Brachionus* spp. are known to be filter feeders and thus, they capture food particles that flow over, or through their filtering system (Jeschke et al., 2004). Thus, population dynamic of rotifer should have an impact on algae, bacteria and protozoa concentrations but showing statistical evidence of these complex interrelationships would assuredly require more abundant data.

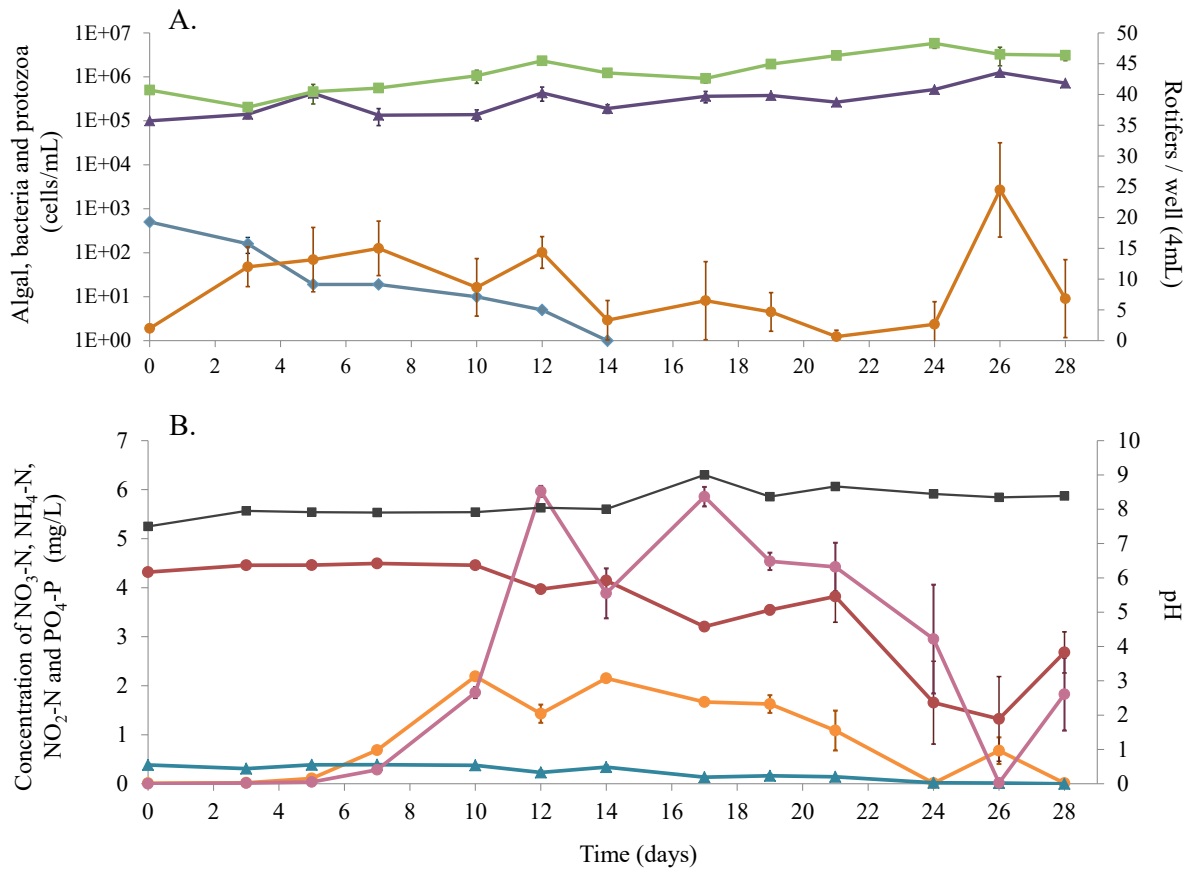


Figure IV.2 : Population dynamics of bacteria (purple triangle), algae (green square), protozoa (blue diamond) and rotifers (brown circle) in the complete microbial trophic web over 28 days (A). Values are means of 6 replicates. Concentration of NO₃-N (red circle), PO₄-P (blue triangle), NO₂-N (orange circle), NH₄-N (pink circle) and pH (grey square) over 28 days in the complete microbial trophic web (B). Values are means of 3 replicates.

Table IV.1 : Spearman's rank correlation coefficient (*rho*) and associated *P*-value calculated for each pair of variables in the 28 days experiment.

	Time	Algae	Bacteria	Rotifers	NO ₂	NO ₃	NH ₄	PO ₄
Algae	0.9066 P < 10⁻⁵							
Bacteria	0.7582 P=0.0040	0.7088 P=0.0088						
Rotifers	-0.1209 P=0.6961	-0.1484 P=0.6298	0.2363 P=0.4367					
NO ₂	-0.0275 P=0.9350	-0.0495 P=0.8775	-0.2363 P=0.4367	0.033 P=0.9206				
NO ₃	-0.8626 P=0.0002	-0.8132 P=0.0012	-0.7473 P=0.0048	0.2143 0.4819	0.1703 P=0.5785			
NH ₄	0.4011 P=0.1758	0.3956 P=0.1822	0.2473 P=0.4150	-0.2198 P=0.4704	0.6264 P=0.0253	-0.3022 P=0.3154		
PO ₄	-0.8846 P<10⁻⁵	-0.7802 P=0.0026	-0.7582 P=0.0040	0.1484 P=0.6298	0.1923 P=0.5292	0.9505 P<10⁻⁵	-0.3022 P=0.3154	
pH	0.8077 P=0.0014	0.6593 P=0.0171	0.5879 P=0.0381	-0.3352 P=0.2631	0.1154 P=0.7096	-0.8022 P=0.0016	0.6374 P=0.0223	-0.8571 P=0.0003

*Note that if the significance level is set at $\alpha = 0.01$, and in view of the total number of tests performed, the expected number of false statistically significant tests (i.e. mistakenly rejecting the null hypothesis, given that it is true) is less than 1. Hence, 13 out of the 36 tests displayed in **table IV.1** may be considered significant at $\alpha = 0.01$.

Physicochemical analyses in **figure IV.2, B** show a decrease in PO₄-P concentration over time and reach 0 mg/l at the end of the experiment (Spearman's rho= -0.88 ; P <10⁻⁵). NO₃-N concentrations also significantly decreased during the tested period (Spearman's rho= -0.86 ; P=0.0002).

Indeed, as shown in **table IV.1**, evolution of NO₃-N and PO₄-P concentrations are negatively correlated with population dynamics of algae and community dynamics of bacteria. While NO₃-N and PO₄-P concentrations decreased, algae and bacteria concentrations increased over time. NO₂-N and NH₄-N concentrations started to be detected at day 5 (0.1 mg/l) and day 7 (0.28 mg/l) respectively. They globally present the same evolution profile and tend to increase the first days and then decreased, and besides, the test on Spearman's rho is not markedly significant (Spearman's rho= 0.62 ; P= 0.0253).

Nitrogen, and to a lesser extent phosphate, are known to limit the production in aquatic environment as they are essential nutrients (Sakka et al. 1999). Thus, NO₃-N and PO₄-P, from the synthetic water, are mainly consumed by algae until resources are used up. At the same time, ammonium is produced from day 5 and is rapidly converted into nitrites who are

themselves converted into nitrates from day 26. This means that microbial consortium plays its nitrifying role well.

From day 12 to 24, the important measured concentration of $\text{NH}_4\text{-N}$ could explain the lower population dynamic of rotifers at this period. Indeed, a decrease in reproduction rate has been observed on *B. rubens* at concentrations between 3 and 5 mg $\text{NH}_3\text{-N}$ /l and they died within 2 days over 5 mg $\text{NH}_3\text{-N}$ /l (Schlüter and Groeneweg 1985). An amount of 5.96 mg $\text{NH}_4\text{-N}$ /l was detected in our test medium at day 12 and was coupled with an important decrease in population dynamics of rotifers (i.e. 14 rotifers/well to less than 5 rotifers/well) until day 24. At day 26, $\text{NH}_4\text{-N}$ concentrations decreased under 0.1 mg/l and rotifers increased at 24 organisms/well. Adverse effects of $\text{NH}_4\text{-N}$ on *B. calyciflorus* reproduction rate seem to be reversible when ammonia concentration in the medium decreases under an inhibition threshold. Our results show that $\text{NO}_2\text{-N}$ concentrations reach a peak of 2.19 mg/l. As concentrations of $\text{NO}_2\text{-N}$ under 8 mg/l (Liang et al. 2017) or 10 mg/l (Chen et al. 2011) appear to have no growth inhibitory effects on this rotifer species, $\text{NO}_2\text{-N}$ probably has no adverse effects at concentrations found in our experiment.

Globally, the pH initially adjusted at 7.5 increases during test duration and gain about 1 unit over the 28 days (Spearman's rho= 0.81 ; P= 0.0014). Moreover, statistical analysis reveals a possible positive correlation between pH and $\text{NH}_4\text{-N}$ concentrations but not at significance level of $\alpha = 0.01$ (Spearman's rho= 0.64 ; P= 0.0223) and a negative correlation between pH and $\text{NO}_3\text{-N}$ concentrations (Spearman's rho= -0.80, P= 0.0016) and between pH and $\text{PO}_4\text{-P}$ concentrations (Spearman's rho= -0.86 ; P= 0.0003). Although correlation does not imply causality, such modifications of N status could affect the pH of the surrounding environment (Villegas et al. 1996).

IV.4.2 Role of each organism in the microbial trophic web

To better understand the role of each organism in the model microbial trophic web, different trophic assemblies were constituted eliminating one biological component of the complete system. The complete trophic web was used as a reference for comparison. Moreover, In the perspective of further use of the model microbial network described in this paper to assess chronic toxicity, running period has been shortned to 7 days. Population dynamics of algae, bacteria, protozoa and rotifers in different trophic assemblies are presented in **figure IV.3** and ionic concentration of $\text{NO}_3\text{-N}$, $\text{NH}_4\text{-N}$, $\text{NO}_2\text{-N}$ and $\text{PO}_4\text{-P}$ in **figure IV.4**.

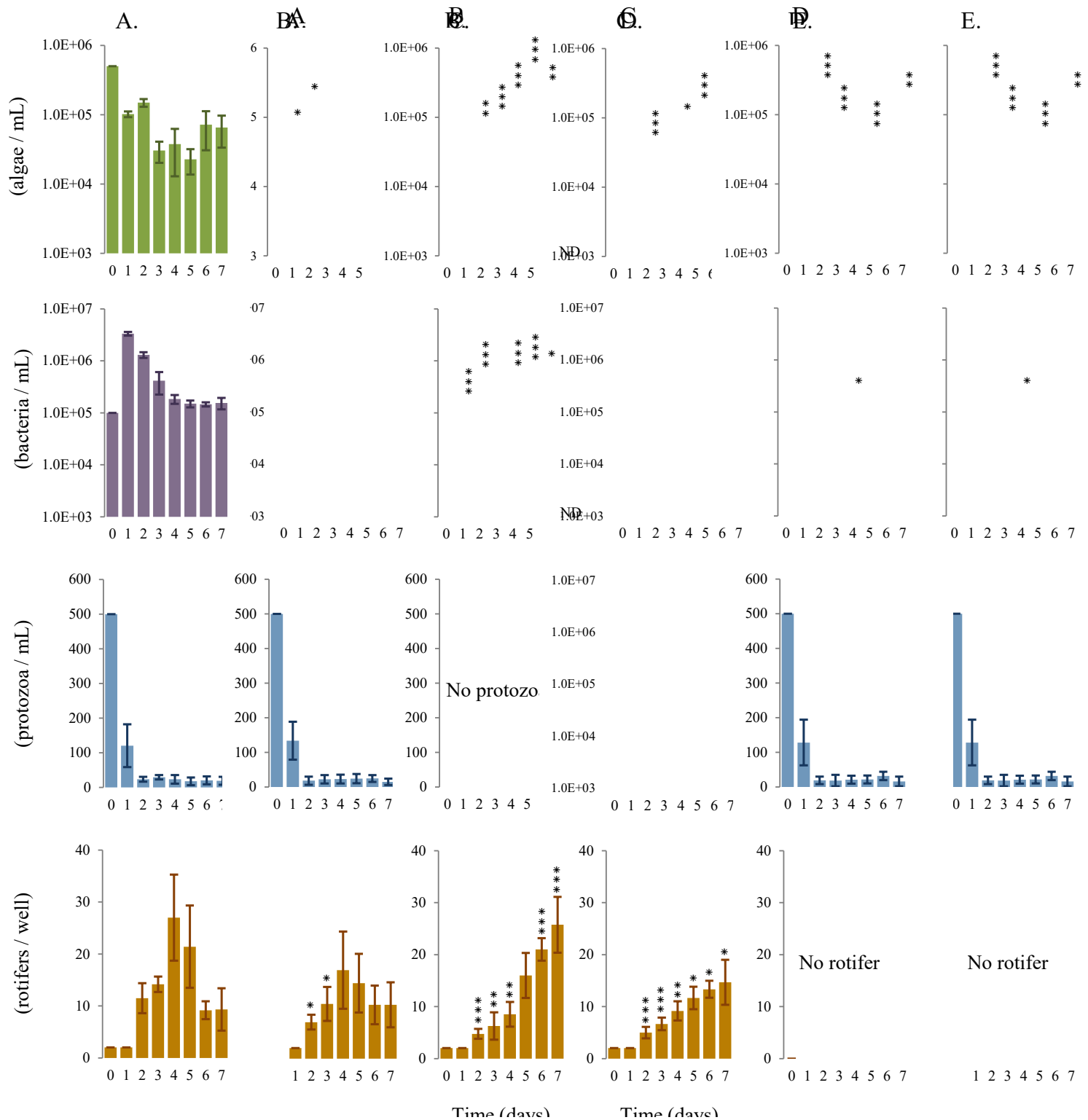


Figure IV.3 : Population dynamics of algae (green), bacteria (purple), protozoa (blue) and rotifers (brown) in complete microbial trophic web (A), in microbial trophic web without added nitrifying bacterial consortium (B), without microbial loop (C) and without rotifers (D) over 7 days with 6 replicates per condition. Black stars indicate significant differences ($\alpha = 0.05$ with $* \leq 0.05$; $** \leq 0.01$; $*** \leq 0.001$) between the complete microbial trophic web and the microbial trophic web without corresponding organism(s) day by day, assessed with MWW test

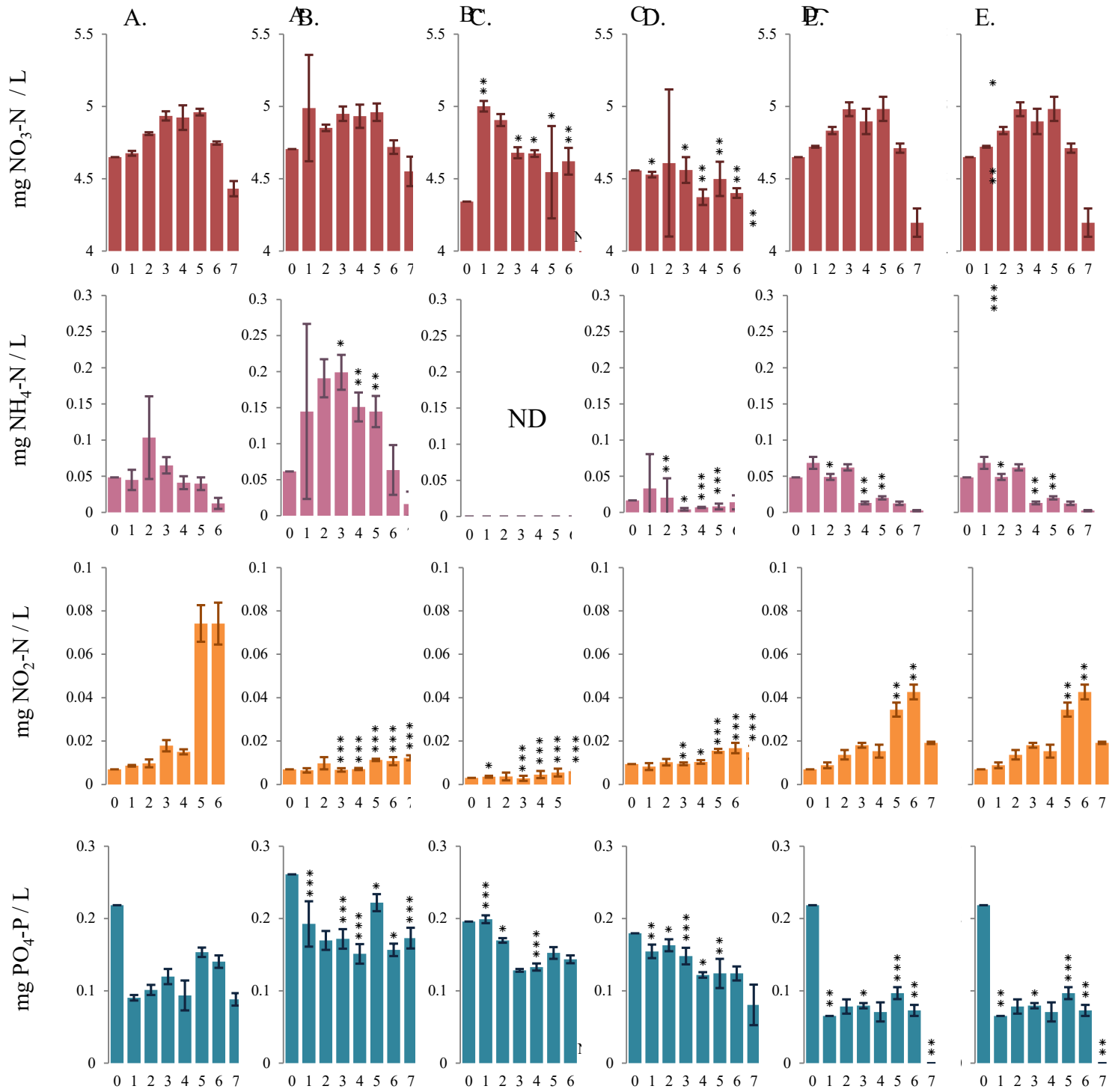


Figure IV.4 : Ionic concentration of NO₃-N (red), NH₄-N (pink), NO₂-N (orange) and PO₄-P (blue) over 7 days with 3 replicates in complete microbial trophic web (A), in microbial trophic web without added nitrifying bacterial consortium (B), without microbial loop (C) and without rotifers (D). Black stars indicate significant differences ($\alpha = 0.05$ with * ≤ 0.05 ; ** ≤ 0.01 ; *** ≤ 0.001) between the complete microbial trophic web and the microbial trophic web without corresponding organism(s) day by day, assessed with MWW test.

Protozoa population dynamics shown from day 2 to 7 (**Figure IV.3**) could not be measured by flow cytometer as concentrations were below the limit of detection (< 40 cells/ml). As a consequence, from day 2 to day 7, a dataset with 6 values between 0 and 40 for each day (corresponding to the 6 replicates) was automatically generated with R studio software. Thus, no statistical analyses have been performed for this organism.

Friedman tests have been performed for the population abundance and ion concentration dynamics data by considering both the designs (i.e. the different trophic assemblies) and the days as the treatments to be tested (**Table IV.2**). When the factors “designs” or “days” suggest a significant effect, pairwise comparisons were performed post-hoc by using Wilcoxon signed-rank test.

Table IV.2. *Friedman tests for the population abundance and ion concentration dynamics data by considering both the designs and the days as the treatments to be tested*

	Treatments: designs Blocks: days	Treatments: days Blocks: designs
Algae	5 treatments 6 blocks Q = 5.17 ; P = 0.2703	7 treatments 5 blocks Q = 15.41; P = 0.0173
Bacteria	3 treatments 6 blocks Q = 1.08 ; P = 0.5827	7 treatments 3 blocks Q = 7.50 ; P = 0.2771
Rotifers	4 treatments 7 blocks Q = 1.20 ; P = 0.7530	8 treatments 4 blocks Q = 20.75 ; P = 0.0042
NO ₃ -N	5 treatments 7 blocks Q = 14.97 ; P = 0.0048	7 treatments 5 blocks Q = 12.86 ; P = 0.0453
NH ₄ -N	4 treatments 8 blocks Q = 18.15 ; P = 0.0004	7 treatments 4 blocks Q = 11.89 ; P = 0.0645
NO ₂ -N	5 treatments 7 blocks Q = 21.57 ; P = 0.0002	7 treatments 5 blocks Q = 24.75 ; P = 0.0004
PO ₄ -P	5 treatments 7 blocks Q = 18.51 ; P = 0.0010	7 treatments 5 blocks Q = 16.56 ; P = 0.0110

*Note that the multiple comparisons problem has to be taken into account for the decision making. Thus, if the significance level is set at $\alpha = 0.01$, the expected number of false statistically significant tests in **table IV.2** is less than 1. Hence, if $\alpha = 0.01$, we may consider that 6 tests out of the 14 tests displayed in **table IV.2** are significant.

From the results in **table IV.2**, it appears that the factor “design” showed a significant effect ($P < 0.01$) for all the four ions considered, whereas the effect of the time was significant ($P < 0.01$) in 2 out of 7 cases, including rotifers and NO₂-N.

Accordingly, and regarding the designs, none of the pairwise comparisons associated with a given microorganism in the multiple testing procedure showed a significant difference among the designs considered (Wilcoxon S-R test). As for the ions, the concentration of each ion seems to be dependent on the design considered.

Thus, it seems that population or community dynamics are not significantly different over 7 days in the different tested trophic assemblies. On the contrary, ion concentrations over the tested period appear to be dependent of the considered trophic assembly. It may suggest that organisms evolve globally the same way in the five designs while nitrogen compounds and phosphate consumption present different profiles.

But these are general observations, and examining the profiles of the abundance and concentration diagrams in **figure IV.3** and 4 shows that in fact the “design” effect may express itself in the form of an interaction with the time. In other words, this means that, for a given organism or ion, the design considered may not have the same evolution with time. This will be commented in paragraphs below.

IV.4.2.1 Role of added nitrifying bacterial consortium

Added bacteria consist in a nitrifying consortium produced in our laboratory. Indeed, 16S rRNA analysis (**Supporting Information Figure SIV.1**) revealed the presence of *Nitrosomonas*, a well-known nitrifying bacteria species (Kokufuta et al. 1988, Andersson and Hooper 1983). Moreover, the main group observed in our bacterial consortium is *Azospirillum*, a genus first described in 1978 by Tarrand et al. (1978). Those species are Gram-negative rods generally found in association with roots in soil and are able to fix high rates of N₂ (Kim et al. 2005, Bashan and Holguin 1997). The second major genus is *Comamonas*, known to be denitrificans bacteria (Gumaelius et al. 2001, Patureau et al. 1994).

In absence of the nitrifying consortium, a less important number of rotifers was observed at day 2 and conversely a significant higher concentration in algae appear at day 3 (**Figure IV.3, B**). Apart from that, population dynamics of algae and rotifers seems to be similar in the complete trophic web and in the trophic web without added bacteria (Wilcoxon S-R test; P=0.1508 and P=0.1422, respectively). By contrast, physicochemical analysis presented in **figure IV.4, B** reveals significant differences (Wilcoxon S-R test; P= 0.0078, P=0.0360 and P=0.0078 for NH₄, NO₂ and PO₄, respectively) in absence of added bacteria. Indeed, from day 1 to 7, except for day 5, significant higher concentrations in PO₄-P were measured in samples with no bacteria consortium. From day 3 to 5, significant higher concentrations in NH₄-N

were measured in absence of the bacterial consortium and conversely, $\text{NO}_2\text{-N}$ concentrations were significantly lower from day 3 to 7. No significant change in $\text{NO}_3\text{-N}$ concentrations were observed between samples with and without the consortium (Wilcoxon S-R test ; $P=0.0781$). In the trophic web without added bacteria, NH_4^+ accumulates in test medium without being transformed into NO_2^- that could confirm the nitrifying role of our bacteria consortium. This nitrifying role is essential to limit ammonia accumulation in medium and thus, added bacteria play key roles to perform a test without medium renewing.

IV.4.2.2 Role of the microbial loop

The absence of the microbial loop produces effects on both algae and rotifer population dynamics (**Figure IV.3, D**). It seems to lead to a significant lower reproduction of rotifers in the first 5 days and significant lower concentration in algae at day 2. It can be supposed that in the first days, rotifers ingest more algae as they are the only nutrient source. Then, as number of rotifers is lower without protozoa and added bacteria compare to the daily concentration of rotifers in the complete microbial trophic web, algae might be less consumed and so exposed a higher concentration at day 4 and 5. Population dynamics of rotifers in samples without microbial loop increased continually until day 7 to reach on average 14 rotifers per well. The number of rotifers per well is significantly lower the first 5 days in bioassays without microbial loop, then a shift occur leading to a higher number of rotifers at day 6 and 7 in these samples. Without microbial loop, total abundance of food is lower what might lead to a decrease in reproduction rate of rotifers at first. Indeed, *B. calyciflorus* is able to modify its reproductive pattern depending on the available food concentration. When food is abundant, rotifers use energy to increase the number of offspring, whereas they tend to decrease eggs number at low food concentrations (Guisande and Mazuelos 1991). Moreover, food quantity has also an impact on rotifer lifespan. Greater length of pre-reproductive and post-reproductive periods have been observed when food concentration is limited and thus lifespan and survivorship of rotifers increased (Wallace and Snell 2010, Galindo and Guisande 1993).

While concentration observed for $\text{PO}_4\text{-P}$ is higher at days 1 to 4 in absence of microbial loop, $\text{NO}_2\text{-N}$, $\text{NO}_3\text{-N}$ and $\text{NH}_4\text{-N}$ concentrations exposed lower values along the experiment (Wilcoxon S-R test; $P= 0.0781$, $P=0.0078$ and $P=0.0234$ for NO_2^- , NO_3^- and NH_4^+ , respectively) in samples without protozoa and added bacteria (**Figure IV.4, D**). Significant

differences were measured from day 3 to 7 for NO₂-N, NO₃-N and from day 2 to 5 for NH₄-N.

Moreover, no NH₄⁺ and NO₂⁻ production was measured in absence of microbial loop that could confirm bacterial nitrifying consortium role in nutrients recycling.

IV.4.2.3 Role of rotifers

As observed in **figure IV.3, E**, bacterial community show the same population dynamics in presence or in absence of rotifers (Wilcoxon S-R test ; P= 0.2969). The absence of rotifers seems to only have effects on algae population dynamic (Wilcoxon S-R test ; P= 0.0225). Indeed, algal concentration is significantly higher at day 2, 3, 5 and 7 in samples in the absence of rotifers. *B. calyciflorus* is a primary consumer known to feed on *C. vulgaris* (Hettiarachchi et al. 1995, Sarma et al. 2001).

On one hand, physicochemical analysis (**Figure IV.4, E**) reveals no significant change in NO₃-N concentrations (Wilcoxon S-R test ; P=1) during the whole tested time between samples with or without rotifer. On the other hand, significant lower concentrations were measured for NH₄-N (day 4, 5), NO₂-N (day 5, 6) and PO₄-P (day 1, 3, 5, 6) with no rotifer. In absence of rotifer, it could have less organic matter to recycle and thus less NH₄⁺ and NO₂⁻ are produced. Moreover, as algae population is higher in trophic assembly without rotifers, they may consume more phosphate to grow.

IV.4.3 Variability in the system

Bioassays for risk assessment must be repeatable and produce reproducible results. Statistical analyses have been performed after five days of running of the complete microbial network to assess variability between (micro)organism concentrations in samples from different microplates (plate), between samples of the same plate (well) and measurement process (replicate) in the same well. Cochran's C test for homogeneity of variances was non-significant (P > 0.05) for each of the three organisms considered (i.e. algae, bacteria, rotifers). Thus, the hypothesis of equal variances among the groups of replicates was not rejected. Thereafter a nested ANOVA was carried out to test and assess the variability associated with each stage (i.e. plate, well, replicate) of the process. Each level of the three-stage sampling process showed a significant effect (F- test; P < 0.01 for all three stages and for each organism of the system) and thereby contributes to the increase in the variance. Thus, both the estimated

variance component and the corresponding coefficient of variance, which were derived from each hierarchical level, are displayed in **table IV.3** for each organism.

Table IV.3 : *Component of variance and associated coefficient of variance (% , bold) corresponding to i) each level in the three-stage process (plate, well, replicate) and ii) the mean calculated from n=6 observations by following three different hypothetical experimental designs (95% confidence limits for the mean are indicated in square brackets assuming that the estimated mean has been standardized as 100).*

Level	Algae	Bacteria	Rotifers	
i.	Plate	0.04798 53.82	0.00694 19.36	0.00979 23.09
	Well	0.00744 20.06	0.00306 12.8	0.00788 20.66
	Replicate	0.00479 16.03	0.0008 6.52	0.00409 14.81
ii.	Mean (n=6) 1 plate, 1 well, 6 replicates	0.05622 58.93 [34.30 - 291.56]	0.01013 23.49 [63.49 - 157.50]	0.01835 31.97 [54.26 - 184.29]
	Mean (n=6) 3 plates, 1 well, 2 replicates	0.01927 32.8 [53.45 - 187.10]	0.00347 13.62 [76.66 - 130.45]	0.00657 18.83 [69.36 - 144.17]
	Mean (n=6) 6 plates, 1 well, 1 replicate	0.01003 23.38 [63.64 - 157.14]	0.0018 9.79 [82.57 - 121.10]	0.00363 13.93 [76.19 - 131.25]

If the sources of variation, which are displayed in the upper part of **table IV.3**, appear to be globally of the same magnitude for each of the three organisms, it must be pointed out however that the variability characterizing the bacteria is slightly lower than the other two. The same hierarchical order in the sources of variation occurs for the three organisms, namely replicate, well and plate, in ascending order.

Note that, with variance components in hand, it is possible to assess the precision, in terms of the coefficient of variation, and eventually calculate a confidence interval for the mean produced by any experimental design. Moreover, this allows comparing the effectiveness of different replication schemes and, ultimately, determining the allocation of sampling resources to each level for decreasing the total variance within the frame of an optimal design. In this regard, note that examination of the range of the coefficients of variation of the mean, which are displayed in the last three lines of **table IV.3**, shows the advantage of increasing replication at the upper levels of the experimental design.

IV.5 Conclusion

In the microbial trophic web characterized in the present study, rotifers feed on both algae and protozoa, while protozoa feed on bacteria that corresponds to a four-component trophic food web. Physicochemical analysis reveals the role of bacteria in nutrient recycling.

The system should be sustainable for long term as suggested by our 28 days experiment. To be routinely used in the perspective of ecotoxicity evaluation, the test has to be long enough to assess chronic toxicity but short enough to be done quickly for both cost and efficiency reasons. A duration of 7 days seems to be a good deal in order to assess chronic exposure in a short time in controlled conditions. This microbial network is cost-effective in comparison with micro- and mesocosm approaches, rapid compared to the *Daphnia 21-day Chronic Assay*, allows high number of replicates with low variability (20,06 % ; 12,8 % and 20.66 % for algae, bacteria and rotifers respectively among replicate). It allows to apprehend impacts of contaminants on the microbial food web functioning and should be useful to investigate contaminant bioaccumulation/biomagnification at microbial level. Thus, the microbial network dispositive presented in this study could be an interesting tool for a better environmental risk assessment and could help to improve the understanding of possible contaminants effects to low biological levels.

Acknowledgements - The authors thank the Région Lorraine for their financial support and Mégane Noyer who contributed to the production of the microbial consortium during her 6 months internship.

IV.6 References

A

- Amblard Christian, Jean-François Carrias, Gilles Bourdier, et Nadine Maurin. « The Microbial Loop in a Humic Lake: Seasonal and Vertical Variations in the Structure of the Different Communities ». *Hydrobiologia* 300-301, n° 1 (mars 1995): 71-84. <https://doi.org/10.1007/BF00024449>.
- Andersson Kristoffer K., et Alan B. Hooper. « O₂ and H₂O Are Each the Source of One O in NO₂⁻ Produced from NH₃ by *Nitrosomonas*: ¹⁵N-NMR Evidence ». *FEBS Letters* 164, n° 2 (12 décembre 1983): 236-40. [https://doi.org/10.1016/0014-5793\(83\)80292-0](https://doi.org/10.1016/0014-5793(83)80292-0).

B

- Bashan Yoav, et Gina Holguin. « *Azospirillum* – Plant Relationships: Environmental and Physiological Advances (1990–1996) ». *Canadian Journal of Microbiology* 43, n° 2 (février 1997): 103-21. <https://doi.org/10.1139/m97-015>.
- Bogaerts P., J. Bohatier, et F. Bonnemoy. « Use of the Ciliated Protozoan *Tetrahymena Pyriformis* for the Assessment of Toxicity and Quantitative Structure–Activity Relationships of Xenobiotics: Comparison with the Microtox Test ». *Ecotoxicology and Environmental Safety* 49, n° 3 (juillet 2001): 293-301. <https://doi.org/10.1006/eesa.2001.2074>.
- Bour Agathe, Florence Mouchet, Stéphanie Cadarsi, Jérôme Silvestre, Laurent Verneuil, David Baqué, Eric Chauvet, et al. « Toxicity of CeO₂ Nanoparticles on a Freshwater Experimental Trophic Chain: A Study in Environmentally Relevant Conditions through the Use of Mesocosms ». *Nanotoxicology*, 7 juillet 2015, 1-11. <https://doi.org/10.3109/17435390.2015.1053422>.

C

- Cairns John. « Are Single Species Toxicity Tests Alone Adequate for Estimating Environmental Hazard? » *Environmental Monitoring and Assessment* 4, n° 3 (septembre 1984): 259-73. <https://doi.org/10.1007/BF00394145>.
- Chen Weimin, Hao Liu, Qingmin Zhang, et Shugui Dai. « Effects of Nitrite and Toxic *Microcystis Aeruginosa* PCC7806 on the Growth of Freshwater Rotifer *Brachionus Calyciflorus* ». *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology* 86, n° 3 (mars 2011): 263-67. <https://doi.org/10.1007/s00128-011-0208-0>.

D

- Davey M. E., et G. A. O'toole. « Microbial Biofilms: From Ecology to Molecular Genetics ». *Microbiology and Molecular Biology Reviews* 64, n° 4 (1 décembre 2000): 847-67. <https://doi.org/10.1128/MMBR.64.4.847-867.2000>.
- Duguma Dagne, Sara L. Ortiz, Youjian Lin, P. Chris Wilson, et William E. Walton. « Effects of a Larval Mosquito Biopesticide and *Culex* Larvae on a Freshwater Nanophytoplankton (*Selenastrum Capricornatum*) under Axenic Conditions ». *Journal of Vector Ecology* 42, n° 1 (juin 2017): 51-59. <https://doi.org/10.1111/jvec.12239>.

E-F

- Enawgaw Yirga, et Brook Lemma. « Ecological productivity of Lake Tinishu Abaya in relation to photosynthetic productivity and biomass of phytoplankton, Rift Valley, Ethiopia ». *MOJ Ecology & Environmental Sciences* 3, n° 4 (20 août 2018). <https://doi.org/10.15406/moj.es.2018.03.00101>.
- Fazi Stefano, Simona Crognale, Barbara Casentini, Stefano Amalfitano, Francesca Lotti, et Simona Rossetti. « The Arsenite Oxidation Potential of Native Microbial Communities from Arsenic-Rich Freshwaters ». *Microbial Ecology* 72, n° 1 (juillet 2016): 25-35. <https://doi.org/10.1007/s00248-016-0768-y>.
- Fleeger John W., Kevin R. Carman, et Roger M. Nisbet. « Indirect Effects of Contaminants in Aquatic Ecosystems ». *Science of The Total Environment* 317, n° 1-3 (décembre 2003): 207-33. [https://doi.org/10.1016/S0048-9697\(03\)00141-4](https://doi.org/10.1016/S0048-9697(03)00141-4).

G

- Galindo M.Dolores, et Cástor Guisande. « The Reproductive Biology of Mictic Females in *Brachionus Calyciflorus* Pallas ». *Journal of Plankton Research* 15, n° 7 (1993): 803-8. <https://doi.org/10.1093/plankt/15.7.803>.
- Guisande Cástor, et Narciso Mazuelos. « Reproductive Pattern of *Brachionus Calyciflorus* Pallas at Different Food Concentrations ». *Journal of Plankton Research* 13, n° 2 (1991): 279-86. <https://doi.org/10.1093/plankt/13.2.279>.
- Gumaelius L., G. Magnusson, B. Pettersson, et G. Dalhammar. « Comamonas Denitrificans Sp. Nov., an Efficient Denitrifying Bacterium Isolated from Activated Sludge ». *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 51, n° 3 (1 mai 2001): 999-1006. <https://doi.org/10.1099/00207713-51-3-999>.

H-I

- Hettiarachchi D.C, Hettiarachchi M. 1995. « The population structure and the effect of pH on growth characteristics of *Brachionus calyciflorus* amphiceros grown on freshwater *Chlorella* sp ». *J. Natn. Sci. Coun. Sri Lanka*. 23/4 : 143-151.
- Iriberry Juan, Begona Ayo, Esther Santamaria, Isabel Barcina, et Luis Egea. « Influence of Bacterial Density and Water Temperature on the Grazing Activity of Two Freshwater Ciliates ». *Freshwater Biology* 33, n° 2 (avril 1995): 223-31. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2427.1995.tb01163.x>.

J

- Jacquet S. « Impact des apports en nutriments sur le réseau trophique planctonique du lagon sud-ouest de Nouvelle-Calédonie ». Biodiversiy and Ecologie. Université Pierre et Marie Curie – Paris VI, 2005. French. <tel-00962269>
- Jeschke Jonathan M., Michael Kopp, et Ralph Tollrian. « Consumer-Food Systems: Why Type I Functional Responses Are Exclusive to Filter Feeders ». *Biological Reviews* 79, n° 2 (mai 2004): 337-49. <https://doi.org/10.1017/S1464793103006286>.
- Jovanović Boris, Gizem Bezirci, Ali Serhan Çağan, Jan Coppens, Eti E. Levi, Zehra Oluz, Eylül Tuncel, Hatice Duran, et Meryem Beklioğlu. « Food Web Effects of Titanium Dioxide Nanoparticles in an Outdoor Freshwater Mesocosm Experiment ». *Nanotoxicology* 10, n° 7 (8 août 2016): 902-12. <https://doi.org/10.3109/17435390.2016.1140242>.

K

- Kim Chungwoo, Mihály L Kecskés, Rosalind J Deaker, Kate Gilchrist, Peter B New, Ivan R Kennedy, Seunghwan Kim, et Tongmin Sa. « Wheat Root Colonization and Nitrogenase Activity by *Azospirillum* Isolates from Crop Plants in Korea ». *Canadian Journal of Microbiology* 51, n° 11 (novembre 2005): 948-56. <https://doi.org/10.1139/w05-052>.
- Kokufuta Etsuo, Masato Shimohashi, et Isei Nakamura. « Simultaneously Occurring Nitrification and Denitrification under Oxygen Gradient by Polyelectrolyte Complex-coimmobilized *Nitrosomonas Europaea* and *Paracoccus Denitrificans* Cells ». *Biotechnology and Bioengineering* 31, n° 4 (mars 1988): 382-84. <https://doi.org/10.1002/bit.260310415>.

Krienitz Lothar, Volker A.R. Huss, et Christina Bock. « Chlorella: 125 Years of the Green Survivalist ». *Trends in Plant Science* 20, n° 2 (février 2015): 67-69. <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2014.11.005>.

L-M

Liang Ye, Xinglan Chen, Xuxin Lu, Sichen Jin, Yuanqi Min, et Jiabin Yang. « Combined Effects of Microcystin and Nitrite on the Growth, Lipid Peroxidation, and Antioxidant Responses of the Freshwater Rotifer *Brachionus Calyciflorus* ». *Aquatic Toxicology* 192 (novembre 2017): 78-88. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2017.09.013>.

Miao Lingzhan, Chao Wang, Jun Hou, Peifang Wang, Yanhui Ao, Yi Li, Yu Yao, et al. « Influence of Silver Nanoparticles on Benthic Oxygen Consumption of Microbial Communities in Freshwater Sediments Determined by Microelectrodes ». *Environmental Pollution* 224 (mai 2017): 771-78. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2017.01.017>.

Mohr Silvia, et Rita Adrian. « Reproductive Success of the Rotifer *Brachionus Calyciflorus* Feeding on Ciliates and Flagellates of Different Trophic Modes ». *Freshwater Biology* 47, n° 10 (octobre 2002): 1832-39. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2427.2002.00929.x>.

Mugidde Rose. « The Increase in Phytoplankton Primary Productivity and Biomass in Lake Victoria (Uganda) ». *SIL Proceedings, 1922-2010* 25, n° 2 (décembre 1993): 846-49. <https://doi.org/10.1080/03680770.1992.11900264>.

N-P

Nilsson Jytte R. « Tetrahymena in Cytotoxicology: With Special Reference to Effects of Heavy Metals and Selected Drugs ». *European Journal of Protistology* 25, n° 1 (septembre 1989): 2-25. [https://doi.org/10.1016/S0932-4739\(89\)80074-4](https://doi.org/10.1016/S0932-4739(89)80074-4).

Patureau D., J. Davison, N. Bernet, et R. Moletta. « Denitrification under Various Aeration Conditions in *Comamonas* Sp., Strain SGLY2 ». *FEMS Microbiology Ecology* 14, n° 1 (avril 1994): 71-78. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6941.1994.tb00092.x>.

Pomeroy Lawrence R. « The Ocean's Food Web, A Changing Paradigm ». *BioScience* 24, n° 9 (septembre 1974): 499-504. <https://doi.org/10.2307/1296885>.

Preston Benjamin L. « Indirect Effects in Aquatic Ecotoxicology: Implications for Ecological Risk Assessment ». *Environmental Management* 29, n° 3 (1 mars 2002): 311-23. <https://doi.org/10.1007/s00267-001-0023-1>.

R

- Radix Pascal, Marc Léonard, Christos Papantoniou, Gilles Roman, Erwan Saouter, Sophie Gallotti-Schmitt, Hervé Thiébaud, et Paule Vasseur. « Comparison of Four Chronic Toxicity Tests Using Algae, Bacteria, and Invertebrates Assessed with Sixteen Chemicals ». *Ecotoxicology and Environmental Safety* 47, n° 2 (octobre 2000): 186-94. <https://doi.org/10.1006/eesa.2000.1966>.
- Relyea Rick, et Jason Hoverman. « Assessing the Ecology in Ecotoxicology: A Review and Synthesis in Freshwater Systems: The Ecology of Ecotoxicology ». *Ecology Letters* 9, n° 10 (octobre 2006): 1157-71. <https://doi.org/10.1111/j.1461-0248.2006.00966.x>.

S

- Sakka A, L Legendre, M Gosselin, B LeBlanc, B Delesalle, et Nm Price. « Nitrate, Phosphate, and Iron Limitation of the Phytoplankton Assemblage in the Lagoon of Takapoto Atoll (Tuamotu Archipelago, French Polynesia) ». *Aquatic Microbial Ecology* 19 (1999): 149-61. <https://doi.org/10.3354/ame019149>.
- Sarma S. S., P. S. Larios Jurado, et S. Nandini. « Effect of Three Food Types on the Population Growth of *Brachionus Calyciflorus* and *Brachionus Patulus* (Rotifera: Brachionidae) ». *Revista De Biologia Tropical* 49, n° 1 (mars 2001): 77-84.
- Sauvant N.P., D. Pepin, et E. Piccinni. « Tetrahymena Pyriformis: A Tool for Toxicological Studies. A Review ». *Chemosphere* 38, n° 7 (mars 1999): 1631-69. [https://doi.org/10.1016/S0045-6535\(98\)00381-6](https://doi.org/10.1016/S0045-6535(98)00381-6).
- Schlimme W., M. Marchiani, K. Hanselmann, et B. Jenni. « BACTOX, a Rapid Bioassay That Uses Protozoa to Assess the Toxicity of Bacteria ». *Applied and Environmental Microbiology* 65, n° 6 (juin 1999): 2754-57.
- Schlüter M., et J. Groeneweg. « The Inhibition by Ammonia of Population Growth of the Rotifer, *Brachionus Rubens*, in Continuous Culture ». *Aquaculture* 46, n° 3 (juin 1985): 215-20. [https://doi.org/10.1016/0044-8486\(85\)90207-8](https://doi.org/10.1016/0044-8486(85)90207-8).
- Segers H. « Global diversity of rotifers (Rotifera) in freshwater ». *Hydrobiologia* (2008) 595:49-59. <https://doi.org/10.1007/s10750-007-9003-7>.
- Shigeoka Tadayoshi, Yasuo Sato, Yuko Takeda, Kikuo Yoshida, et Fumio Yamauchi. « Acute Toxicity of Chlorophenols to Green Algae, *Selenastrum Capricornutum* and *Chlorella Vulgaris*, and Quantitative Structure-Activity Relationships ». *Environmental Toxicology and Chemistry* 7, n° 10 (octobre 1988): 847-54. <https://doi.org/10.1002/etc.5620071007>.

Silva Aurora, Sónia A. Figueiredo, M. Goreti Sales, et Cristina Delerue-Matos. « Ecotoxicity Tests Using the Green Algae *Chlorella vulgaris*—A Useful Tool in Hazardous Effluents Management ». *Journal of Hazardous Materials* 167, n° 1-3 (15 août 2009): 179-85. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2008.12.102>.

Snell Terry W., et Brian D. Moffat. « A 2-D life cycle test with the rotifer *Brachionus calyciflorus* ». *Environmental Toxicology and Chemistry* 11, n° 9 (1992): 1249. [https://doi.org/10.1897/1552-8618\(1992\)11\[1249:ADLCTW\]2.0.CO;2](https://doi.org/10.1897/1552-8618(1992)11[1249:ADLCTW]2.0.CO;2).

T

Talling, J. F. « The photosynthetic activity of phytoplankton in East African lakes ». *Internationale Revue der gesamten Hydrobiologie und Hydrographie* 50, n° 1 (1965): 1-32. <https://doi.org/10.1002/iroh.19650500102>.

Tarrand Jeffrey J., Noel R. Krieg, et Johanna Döbereiner. « A Taxonomic Study of the *Spirillum Lipoferum* Group, with Descriptions of a New Genus, *Azospirillum* Gen. Nov. and Two Species, *Azospirillum Lipoferum* (Beijerinck) Comb. Nov. and *Azospirillum Brasilense* Sp. Nov. ». *Canadian Journal of Microbiology* 24, n° 8 (août 1978): 967-80. <https://doi.org/10.1139/m78-160>.

Traas Theo P., Jan H. Janse, Tom Aldenberg, and Theo C.M. Brock. « A food web model for fate and direct and indirect effects of Dursban ® 4E (active ingredient chlorpyrifos) in freshwater microcosms ». *Aquatic Ecology*, (février 1998) 179-190.

Tranvik Lars J. « Allochthonous Dissolved Organic Matter as an Energy Source for Pelagic Bacteria and the Concept of the Microbial Loop ». *Hydrobiologia* 229, n° 1 (février 1992): 107-14. <https://doi.org/10.1007/BF00006994>.

V-W

Villegas J., R. D. Williams, L. Nantais, J. Archambault, et J. A. Fortin. « Effects of N source on pH and nutrient exchange of extramatrical mycelium in a mycorrhizal Ri T-DNA transformed root system ». *Mycorrhiza* 6, n° 4 (23 juillet 1996): 247-51.

Wallace Robert Lee, et Terry W. Snell. « Rotifera ». In *Ecology and Classification of North American Freshwater Invertebrates*, 173-235. Elsevier, 2010. <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/B978012374855300008X>.

<https://doi.org/10.1007/s005720050132>.

Widenfalk Anneli, Jonas M. Svensson, et Willem Goedkoop. « Effects of the pesticides captan, deltamethrin, isoproturon, and pirimicarb on the microbial community of a freshwater

sediment ». *Environmental Toxicology and Chemistry* 23, n° 8 (2004): 1920.
<https://doi.org/10.1897/03-345>.

SIV SUPPLEMENTARY INFORMATION

A model aquatic microbial trophic web as a new tool for risk assessment

SIV.1 Production and characterization of the nitrifying consortium

A consortium from the freshwater-aquarium filters of the Museum-Aquarium of Nancy (France) was used to produce our nitrifying consortium. Thereby, a volume of 3L of synthetic water, which composition is described in materials and methods, was introduced in 6L long-necked flask with 300 µl of the consortium and 10g of cooked shrimp. 3 identical replicates were made and they were placed in controlled conditions (in the dark to avoid algal development, with a continuous air-bubble, at 20°C). After 31 days, the content of the 3 flasks was first filtrated on 500 µm and then on 35 µm filters. The filtrates were centrifuged 6 min at 8000 g and pellet were retrieved and sonicated 10 s 40% amplitude in continuous mode at room temperature. Glycérol 10% (final concentration) was added and the nitrifying consortium was aliquoted and stored at -80 °C.

Taxonomic characterization of the nitrifying consortium was performed on bacterial 16S rDNA. DNA were extracted with PowerSoil® DNA Isolation Kit (MoBio laboratories, Inc.). 16S rDNA (V1-V8 region) amplification and sequencing were performed by GATC BioTech (Illumina HiSeq 2000) and results of bacterial diversity at GENUS level OTUs with >0.5% abundance are presented in **figure SVI.1**.

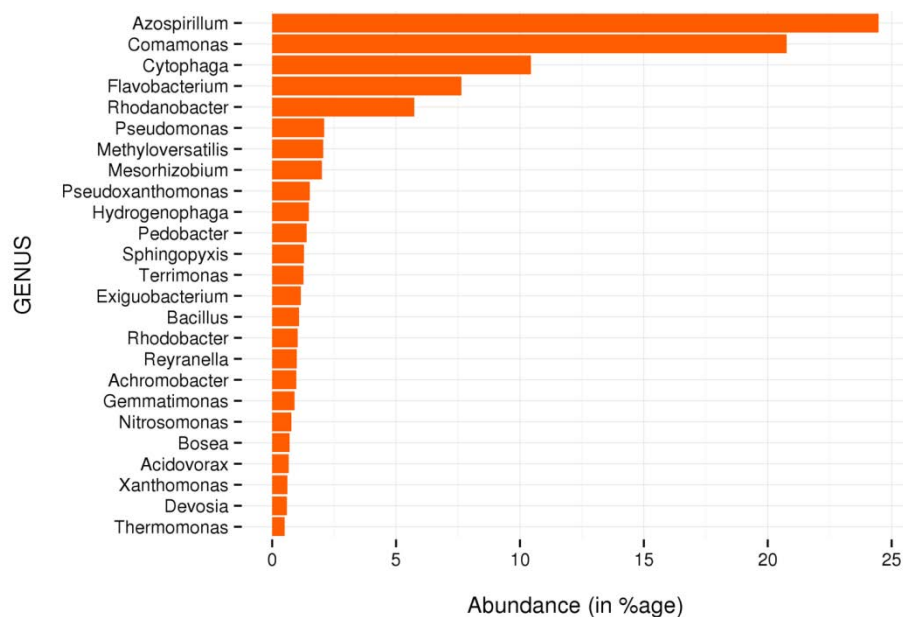


Figure SIV.1 : *Microbiome composition at GENUS level OTUs with >0.5% abundance is shown 16s_consortium.best_hits.min_similarity.97.00*

SIV.2 *T. pyriformis* consumption by *B. calyciflorus*

Consumption of *T. pyriformis* by *B. calyciflorus* was verified by microscopic observations after labelling with DAPI (2.5 µg/ml, 30min in the dark) and pictures are presented in **figure SIV.2**.

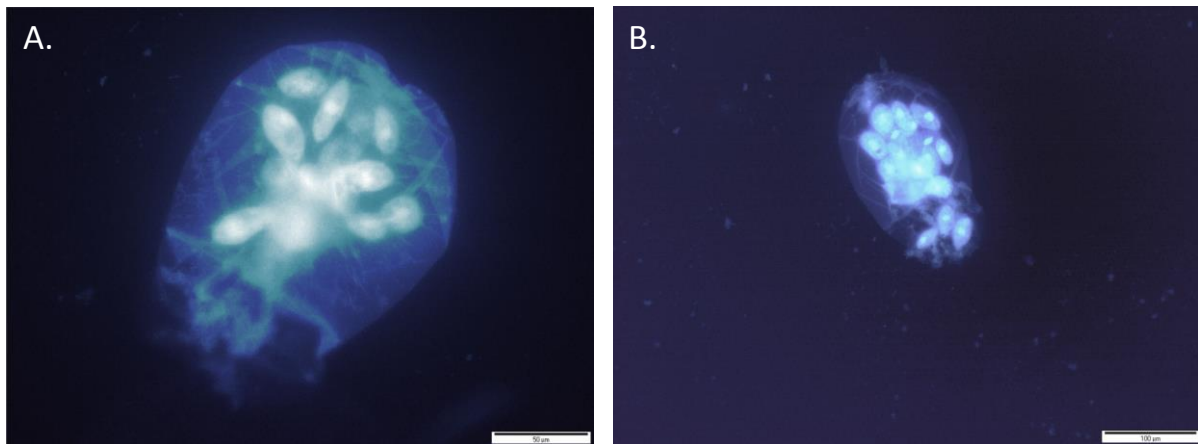


Figure SIV.2 : Pictures of two different rotifers *B. calyciflorus* after 48h of growth with $5 \cdot 10^2$ *T. pyriformis*/ml. Scale on pictures represent 50 µm (A.) and 100 µm (B.).

We observed about 15 *T. pyriformis* in a single *B. calyciflorus* digestive tract which confirms that this rotifer specie feeds on *T. pyriformis* in our conditions.

CHAPITRE V

Utilisation du réseau trophique microbien pour la réalisation de tests d'écotoxicité

V. Utilisation du réseau trophique microbien pour la réalisation de tests d'écotoxicité

Après avoir étudié le fonctionnement du réseau trophique et déterminé le rôle des différents organismes qui le composent (**Chapitre IV**), nous avons souhaité appréhender son utilisation pour des tests d'écotoxicité. Nous avons alors réalisé des expositions à 3 métaux lourds (cadmium, cuivre et zinc) dont les effets sur les organismes de référence sont bien documentés. De plus, nous avons souhaité déterminer un paramètre simple, rapide et peu coûteux qui pourrait refléter l'état du nanocosme, et pour finir, nous avons voulu appréhender la sensibilité du réseau trophique microbien modèle par rapport à un test ISO.

Cette étude nous a permis de constater qu'il est assez aisé de mettre en place un test d'écotoxicité à l'aide du réseau trophique microbien même si les prélèvements journaliers par sacrifice demandent de prévoir suffisamment de réplicats biologiques (environ 200 nanocosmes pour suivre la dynamique de population des différents organismes, les paramètres physico-chimiques du milieu et le dosage des métaux dans le cas de cette étude). Cependant, suivre la dynamique de population des rotifères semble être un paramètre pertinent pour appréhender la toxicité d'un contaminant sur le nanocosme. Cette mesure se réalise sur échantillon frais par comptage sous loupe binoculaire. La mesure est donc non destructrice, il n'y aurait donc plus de sacrifices journaliers ce qui permettrait de réduire considérablement le nombre de nanocosmes à prévoir par condition.

Le réseau trophique microbien modèle apparaît alors comme un outil prometteur pour l'évaluation des risques.

V. Impacts of heavy metals (Cd, Cu, Zn) on a model microbial trophic web

-Draft manuscript-

Anne Vicente, ^a Pascale Bauda, ^{a,b} Yoann Menard, ^a Bénédicte Sohm, ^a Maximilien Beuret, ^a Philippe Rousselle, ^a Christophe Pagnout, ^a.

^aUniversité de Lorraine, LIEC (Laboratoire Interdisciplinaire des Environnements Continentaux), UMR7360, Metz F-57070, France.

^bCNRS, LIEC, UMR7360, Campus Bridoux, Metz F-57070, France

V.1 Abstract

Living organisms in complex environmental systems do not respond to contaminants in the same manner as in normalized single-species toxicity test. Thus, environmental contaminant risk assessment should be based on more realistic exposure scenarios. In this context, a four-species microbial trophic web composed of a microbial nitrifying consortium, a primary producer *Chlorella vulgaris*, a primary consumer *Tetrahymena pyriformis* and as top predator *Brachionus calyciflorus*, has been used to assess impacts of Cd, Cu and Zn. Population dynamic of the rotifer *B. calyciflorus* has been found to be a suitable parameter to quickly assess the effects of contaminants on the microbial trophic web. Based on this parameter, NOEC values have been determined for Cd, Cu and Zn at 0.445 μM , 0.393 μM and 1.529 μM , respectively. The microbial trophic web test presented in this study has advantages of both single-species tests (rapid, allow high number of replicates, could be used to produce reference values) and microcosm studies (complex environmental context with trophic interactions among species). It allows the assessment of contaminant bioaccumulation, biomagnification through food chain and acute and chronic toxicity. It is proposed as a new tool for aquatic ecotoxicity evaluation.

Keywords : *aquatic microcosm, ecological risk assessment, toxicity, microbial loop, trophic web*

V.2 Introduction

Due to industrial activities, urbanization and some weather events (major storm, seasonal variations, big floods), contamination of aquatic environments by heavy metals is still an important concern (Vidal-Durà et al. 2018, Milačić et al. 2017, Hahn et al. 2016). While heavy metals as zinc and copper are needed in trace amount by many organisms, cadmium seems to have no useful role for living organisms (Bertin and Averbeck 2006, Sibley et al. 1994, Round 1973). In any cases, high concentrations of one of these three metals appear to have adverse effects on microorganisms and thus could negatively impact aquatic ecosystems. Those effects are well documented. Cadmium, copper and zinc appear to have adverse effects on the growth, photosynthesis, chlorophyll content, nitrogen fixation, respiration and mobility of algae (Oukarroum et al. 2012, Tripathi and Gaur 2006, Takamura et al. 1989, Stauber and Florence 1987, Trevors et al. 1986, Rai et al. 1981). These three heavy metals could also impact bacterial crucial ecological functions like the primary production of labile organic matter (Jackson et al. 2015) or the decomposition of organic matter. Moreover, cadmium and zinc reduce survivorship of *T. pyriformis* (Carter and Cameron 1973), while copper and zinc reduce its growth rate, lead to grazing inhibition and increase mortality (Nicolau et al. 1999). Cadmium at low concentration was found to reduce survivorship, population growth rate and reproductive parameters of *B. calyciflorus* (Gama-Flores et al. 2006, Sarma et al. 2006), such as zinc to a lesser extent (Couillard et al. 1989). Adverse effects of copper towards rotifers have been also highlighted on many parameters like resting eggs production (Preston and Snell 2001), swimming behavior (Charoy and Janssen 1999), enzymatic activity (Burbank and Snell 1994) feeding activities (Ferrando and Andreu 1993), mortality, sexual and asexual reproduction (Gama-flores et al. 2007, Girling et al. 2000, Janssen et al. 1994, Snell and Moffat 1992).

Removal of metals like Cd and Zn from aqueous solutions by algae were largely studied over years (Freitas et al. 2008, Vilar et al. 2006, Leusch et al. 1995). Indeed, they are effective organisms for metals uptake. Moreover, it has been shown that *Chlorella vulgaris* is able to accumulate cadmium and copper from the ambient water (Mylon et al. 2003). This could lead to heavy metals biomagnification through trophic chains (Croteau et al. 2005).

Although, effects of Cd, Cu and Zn have been well assessed on individual organisms for years (i.e. extent toxicity, toxicity mechanism, mode of toxicity), little is known about their impact in a more complex environmental context. It has been highlighted that species placed in

microcosm did not necessarily respond to contaminants in the same manner as in pure-culture toxicity test (Fuma et al. 2001). Indeed, it is well known that bioavailability and thus toxicity of a metal is related to its chemical form (speciation, solubility, complexation) (Nedrich et al. 2018). Bioavailability in the environment is often different than in laboratory settings due to a lot of factors (i.e. complexation, competition, sorption, precipitation) (Chapamn et al. 2003). As a result, more precise environmental risk assessment should be based on more realistic exposure scenarios and data.

Impacts of heavy metals on microbial compartment have been quit well assessed in microcosm (Olapade et Rasmussen 2019, Tomczyk et al. 2018, Van de Perre et al. 2018, Qian et al. 2017, Van de Perre et al. 2016, Ancion et al. 2010, Nayar et al. 2003, Scanferlato and John Cairns 1990). All these microcosms studies allow to produce important data but due to their sizing ranging from 200 ml to several liters it is difficult to consider them as a routinely used tool for risk assessment as dozens and sometimes hundreds of samples are needed. Moreover, these studies don't consider both microbial communities and trophic webs.

In the present study, impacts of cadmium, copper or zinc were assessed through a model aquatic microbial trophic web in a miniaturized format (4 ml). As described in a previous study, bioassays consists in rotifers (*Brachionus calyciflorus*) fed on algae (*Chlorella vulgaris* as primary producers), with a microbial loop (microbial consortium and *Tetrahymena pyriformis*) (Vicente et al. 2019 – in preparation). Population dynamics and physicochemical parameters were followed up to evaluate toxicity of the three heavy metals. Results obtained with the model trophic web were then compared with results achieved with normalized test NF ISO 20666:2008 to compare sensitivity of both tests. Finally, advantages of the microbial trophic web as a tool for risk assessment are presented.

V.3 Materials and methods

V.3.1 Test medium

Synthetic water was prepared based on moderately hard water (US EPA): 1.14 mM NaHCO₃, 0.35 mM CaSO₄.H₂O, 0.5 mM MgSO₄, 0.054 mM KCl ; with 7.3 μM of KH₂PO₄ and 294 μM of NaNO₃ supplemented by 46.2 μM H₃BO₃, 1.8 μM MnCl₂.4H₂O, 7.2 μM LiCl, 0.53 μM RbCl, 1.55 μM NaBr, 0.26 μM Na₂MoO₄.2H₂O, 0.098 μM CuCl₂.2H₂O, 0.095 μM ZnCl₂, 0.046 μM CaCl₂.6H₂O, 0.02 μM KI, 0.019 μM Na₂SeO₃ ,0.005 μM NH₄VO₃, X μM

FeSO₄·7H₂O under sterile conditions. Air was bubbled in synthetic water overnight and pH was adjusted at pH 7.5 (± 0.1) before use.

V.3.2 Contaminants

Salts used were CdCl₂, CuSO₄ and ZnCl₂ and values are given in terms of the element concentration (Cd, Cu, Zn). Dissolutions and dilutions were made in synthetic water. Contaminants were introduced in the microbial trophic web after 24 h of stabilization.

V.3.3 Culture and preparation of test organisms

V.3.3.1 algae

Chlorella vulgaris cells were grown in BG11 medium (Sigma-Aldrich, C3061-500ML) under constant temperature (20°C), rotary agitation (100 rpm) with circadian period (14:10). Cells in exponential growth phase (DO 680nm < 0.55) were harvested by centrifugation (5000 × g, 5 min, 20°C) and washed once with the same volume of synthetic water in the same conditions. Algae concentration was measured with flow cytometer.

V.3.3.2 Nitrifying bacterial consortium

A nitrifying bacterial consortium, produced in our laboratory and previously characterized (Vicente et al. - in preparation), was used. Aliquots containing 1.10⁸ cells/ml were constituted and conserved at -80 °C in glycerol 10%. Before use, they are thawed at room temperature, harvested by centrifugation (7000 × g, 5 min, 20 °C) to remove glycerol and washed once with synthetic water. Dilution is made to prepare a 10⁷ cells/mL suspension in synthetic water (as described in V.3.1 Test medium).

V.3.3.3 Protozoa

Tetrahymena pyriformis was grown in ATCC 357 medium under axenic conditions and constant temperature (20°C), in the dark. Cells were harvested by centrifugation (760 × g, 7 min, 20 °C) and washed twice in synthetic water. Pellets were resuspended in 5 ml of synthetic water and cell concentration was determined under microscope using a Nageotte hemocytometer. At least 2 counting per sample were done and the mean was calculated.

V.3.3.4 Rotifers

Brachionus calyciflorus cysts were provided by MicroBioTests Inc. (Belgium) and conserved at 4°C. Hatching procedure from protocol Rotokit F chronic was followed, except the

replacement of requested medium (moderately hard water, US EPA) by synthetic water. Briefly, cysts were incubated on a plate covered by the lid under continuous light source of 3000 lux at 25°C for at least 18 hours.

V.3.4 Microbial trophic web

A mix was prepared in synthetic water in order to obtain a final concentration of $5 \cdot 10^5$ algae/ml, 10^5 bacteria/mL from the nitrifying consortium and $5 \cdot 10^2$ protozoa/ml. Each well of polycarbonate 12-multiwells plate (4×3) was filled with 4 ml of this microorganism mix. Then, 2 rotifers/well were introduced within 2 h after hatching.

Multiwell plates were placed at 20 °C under orbital shaking (50 rpm) with day/night alternation (14:10, 160 lux). To minimize medium evaporation during experiment, multiwell plates were inserted in a Plexiglas hermetic box with wet atmosphere.

V.3.5 Analyses

V.3.5.1 Sample recovery

After homogenization by pipetting (1000 µl 20 times) in the center of the well, 80 µl were taken for flow cytometry analysis performed on fresh samples. Then, on a same well, a volume of 3 ml were centrifuged and supernatants were stored at -20 °C for NO_3^- , PO_4^{3-} , NO_2^- and NH_4^+ measurements.

Cd, Cu and Zn measurements were performed on other replications (wells), 2 ml of the total samples were recovered (medium + organisms), another 2 ml were centrifuged to remove pellet and both were stored at -20°C.

V.3.5.2 Population dynamics

Number of rotifers per well were counted under binocular magnifier set in order to see the whole well. Concentration of algae and bacteria were determined by flow cytometry analyses on a BD Accuri™ C6 (BD Biosciences) equipped with a laser emitting at 488 nm. Samples were analyzed by acquiring events on 50 µl labeled with Syto9 (molecular probe Sigma S34854, 5 µM, 10 min in the dark). Chlorophyll was collected with a longpass filter above 670 nm and protozoa was distinguished based on their forward and side scattering (FSC and SSC, respectively).

V.3.5.3 Physico-chemical analysis

Concentrations in NO_3^- and PO_4^{3-} were measured by ionic chromatography (Dionex™ ICS-1100 with IonPac® AS4A). NO_2^- concentrations were estimated by molecular absorption spectrometry (quantification limit 0.01 mg/l). Measurements were performed at $\lambda = 525$ nm on 1 ml after adding sulfanilic acid and *N*-(1-Naphthyl)ethylenediamine dihydrochloride.

Cd, Cu and Zn kinetics were assessed by measuring element concentrations in total samples (medium and organisms) and in supernatant (medium without organisms) by atomic absorption spectrometry (AAS) after 1% HNO_3 acidification.

V.3.5.4 Statistical analysis

Statistical analyses were performed using R software to compare results day by day to controls. As the requirements of parametric testing were not always satisfied, the Mann Whitney Wilcoxon test (MWW) was employed for all statistical analyses.

V.3.6 ISO test

Normalized NF ISO 20666 (January 2009) tests were performed to evaluate chronic toxicity of Cd, Cu and Zn on *Brachionus calyciflorus* within 48 h in order to compare with toxicity observed at the same time of exposure in the microbial trophic web.

V.4 Results

Cd, Cu and Zn toxicity effects on the population dynamics of *Brachionus calyciflorus* were first assessed over 120 h in the microbial trophic web, with a range of 4 concentrations for each metal (**Figure V.1**). In the control condition, rotifers grow from 24 h to 48 h, stabilized until 72 h and then their number decrease. With contaminants, results show a dose-response relationship as only higher concentrations reduce significantly rotifers reproduction. Indeed, population dynamics of *Brachionus calyciflorus* is significantly lower when rotifers were exposed to 4.45 μM of Cd from 24 h to the 120 h and after 72 h exposure to 0.889 μM of Cd (**Figure V.1, A**). Rotifer population dynamics is reduced from 24 h to 120 h after an exposure of 0.787 μM and 1.574 μM of Cu (**Figure V.1, B**). An exposition to 7.647 μM of Zn also led to a reduction in population dynamics of rotifers at 48 h and 96 h (**Figure V.1, C**).

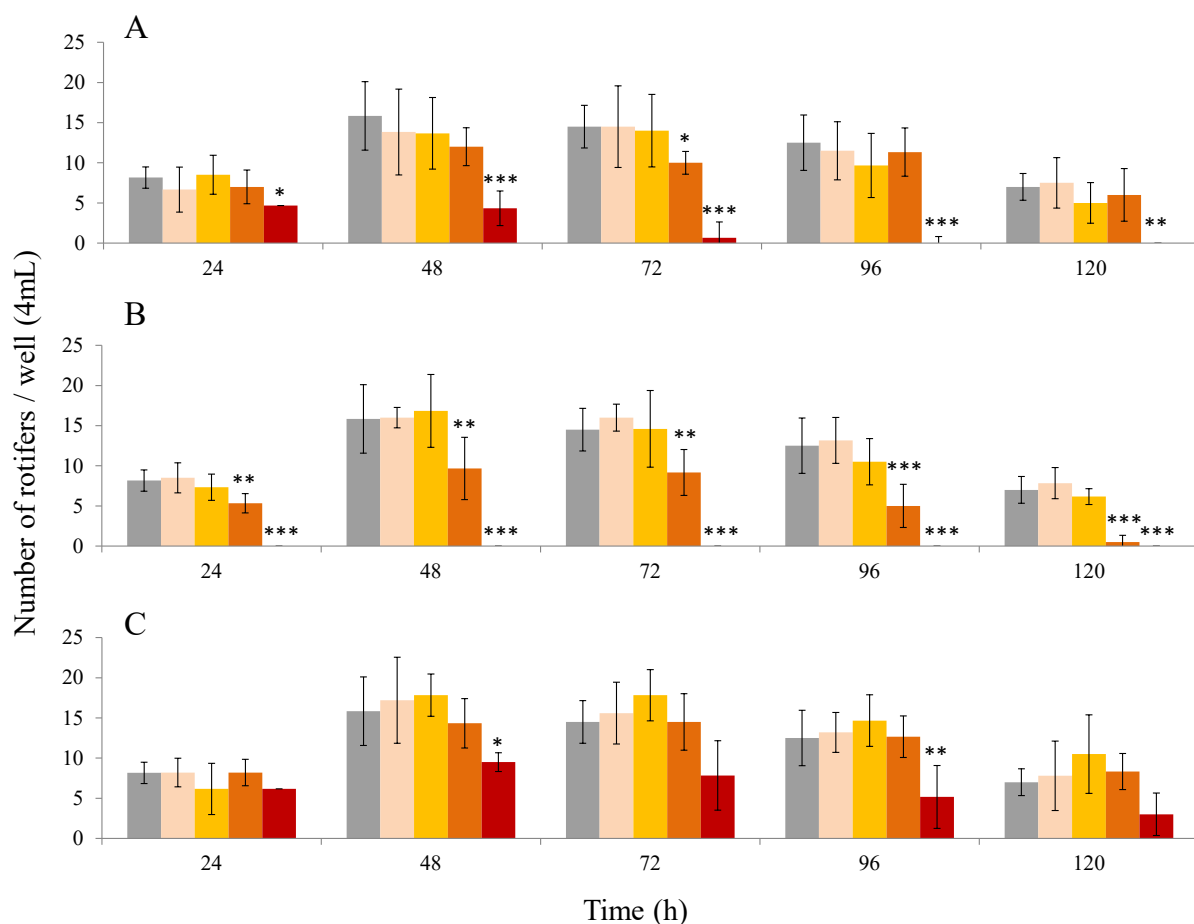


Figure V.1 : Population dynamic of rotifers in the microbial trophic web exposed to different metal concentrations. **A.** from light orange to red: 0.089 μM , 0.445 μM , 0.889 μM , 4.45 μM of Cd, **B.** from light orange to red : 0.157 μM , 0.393 μM , 0.787 μM , 1.574 μM of Cu. **C.** from light orange to red: 0.153 μM , 0.765 μM , 1.529 μM , 7.647 μM of Zn over 120 h. Grey blocks are controls. Values are means of six independent replicates. Statistical analysis were done so that different contaminant concentrations were compared to control for each days ($\alpha = 0.05$).

NOEC were determined as concentrations that do not show significant effect over 120 h on *Brachionus calyciflorus* reproduction. That means 0.445 μM , 0.393 μM and 1.529 μM for Cd, Cu and Zn, respectively.

Microbial trophic webs were then exposed to NOEC values previously determined for Cd (0.445 μM), Cu (0.393 μM) and Zn (1.529 μM). Indeed, as rotifers are the top predator of this little ecosystem, a change in their population dynamic would impact population dynamics of their prey (algae and protozoa). The objective is to assess if population dynamic of rotifers is sensitive enough to reflect effects of contaminants on the whole microbial trophic web and thus if it could be a suitable parameter to follow up.

Population dynamics of algae, bacteria and rotifers as well as physico-chemical parameters were evaluated every 24 h over 120 h to evaluate if major impacts occur on other parameters than the one used to determine NOEC values. Results are presented in **figure V.2** and **V.3** respectively.

In controls, algae concentrations decrease of about 1 log between 24 h and 48 h and then slowly rise again until 120 h (**Figure 2, green graphs, R, A, B, C**). Bacteria decrease at a lower rate than algae between 24 h and 48 h, then stabilize until 96 h before a slight increase during the last 24 h of the test period (**Figure V.2, violets graphs, R, A, B, C**). No significant effect of Cd, Cu or Zn is observed on rotifers population dynamics (**Figure V.2, brown graphs, A, B, C**). An only significant reduction in rotifer concentration was found after 48 h in rotifers exposed to Cu. Apart from that, this is in accordance with previous results since NOEC based on rotifer population dynamics values were used in the experiment

When exposed to Cd, algal population dynamic appear to be significantly lower after 96 h and 120 h exposure (**Figure V.2, green graph, A**) and population dynamics of bacteria is significantly lower after 120 h exposure (**Figure V.2, violet graph, A**)

On the opposite, algae concentrations in samples exposed to Cu are significantly higher at 24 h and 72 h (**Figure V.2, green graph, B**) and population dynamic of bacteria is higher after 24 h, 48 h of Cu exposure (**Figure V.2, violet graph, B**).

After a 120 h exposition to Zn, algae population dynamic appear to be significantly lower (**Figure V.2, green graph, C**) as well as population dynamic of bacteria at 96 h, while a higher concentration in bacteria compared to controls is observed at 24 h (**Figure V.2, violet graph, C**).

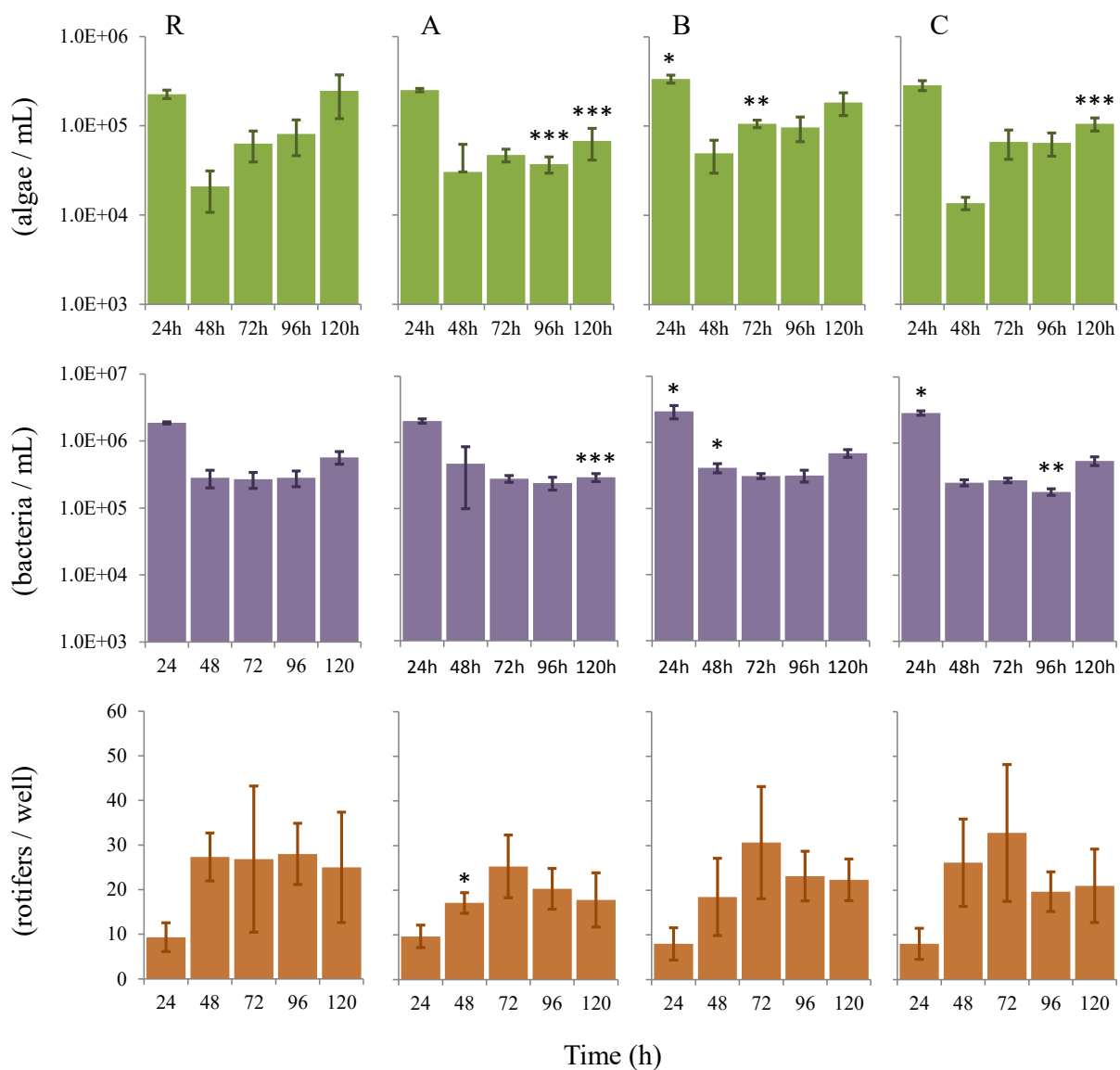


Figure V.2 : Population dynamic of algae (green), bacteria (violet) and rotifers (brown) in the microbial trophic web without contamination (R) and exposed to Cd (A), Cu (B) and Zn(C) over 120 h. Values are means of six independent replicates. Black stars indicate significant differences between controls (R) and exposed organisms (A, B, C) day by day, assessed with MWW test ($\alpha = 0.05$).

In order to assess if exposures to Cd, Cu and Zn at NOEC have effects on some essential nutrient cycles, N-NO₃, N-NO₂ and P-PO₄ were measured in the medium every 24 h during the whole test. Corresponding results are reported in **figure V.3**.

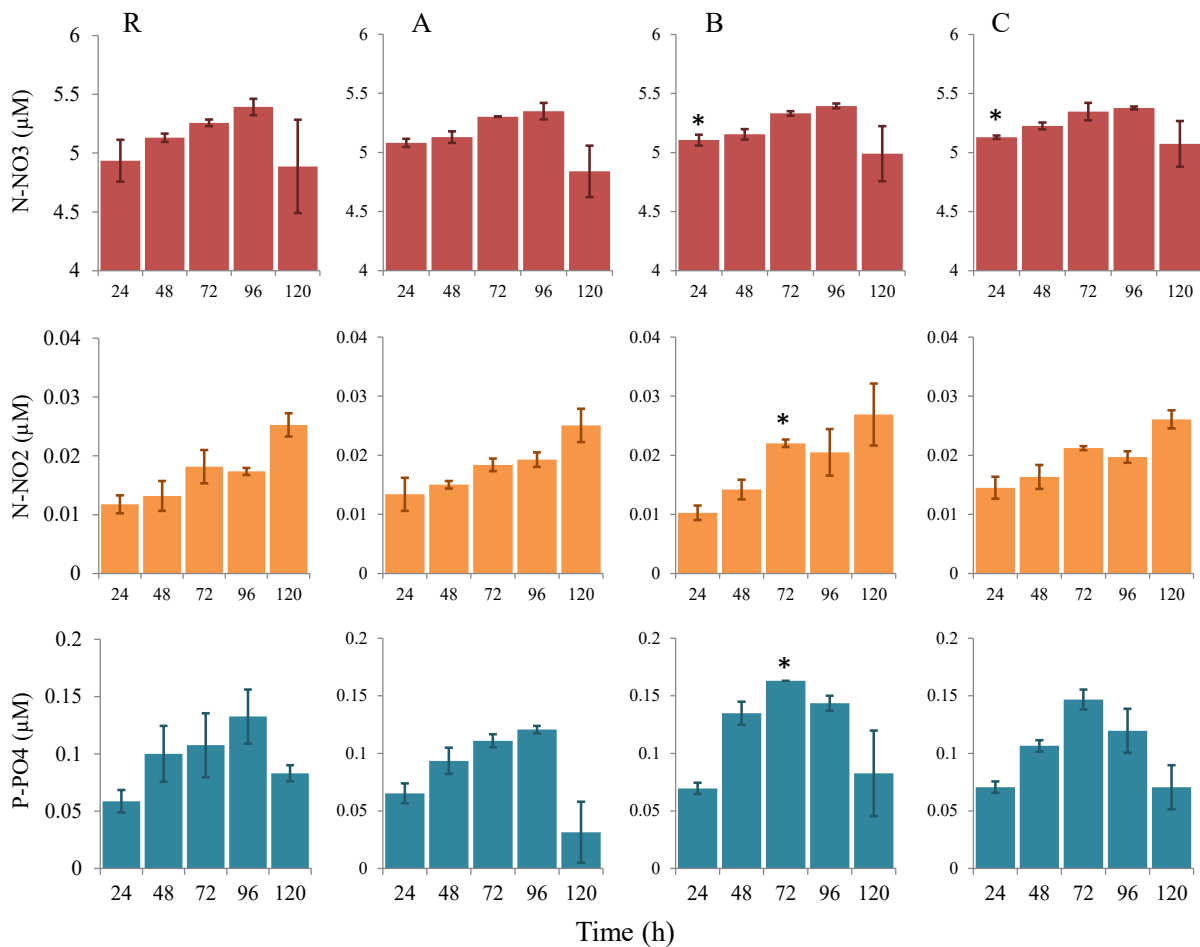


Figure V.3 : Measured concentrations of N-NO_3 (red), N-NO_2 (orange) and P-PO_4 (blue) in the microbial trophic web over 120 h in controls (R), samples exposed to Cd (A), Cu (B) and Zn (C). Values are means of three independent replicates. Black stars indicate significant differences between controls (R) and exposed organisms (A, B, C) day by day, assessed with MWW test ($\alpha = 0.05$).

No significant change in N-NO_3 , N-NO_2 and P-PO_4 concentrations were found with Cd exposure during the tested period. Significant higher concentrations in N-NO_3 are observed after an exposition of 24 h to Cu (**Figure V.3, red graph, B**) as well as higher significant concentration in P-PO_4 and N-NO_2 after a 72 h exposure to Cu (**Figure V.3, orange and blue graphs, B**). For Zn exposure, only a single significant difference is observed at 24 h with a higher concentration in N-NO_3 (**Figure V.3, red graph, C**).

Concentrations of Cd, Cu and Zn presented in **figure V.4** were measured in samples every 24 h over the whole test. In order to better understand where contaminants are distributed, metal analysis were realized on total samples (i.e. medium and organisms) and on supernatant (i.e. medium without organisms).

Differences between concentrations in total samples and in supernatant were calculated and reported as “Estimated concentrations” and represent concentrations that could be adsorbed or bioaccumulated (**Figure V.4, graphs in violet zone**).

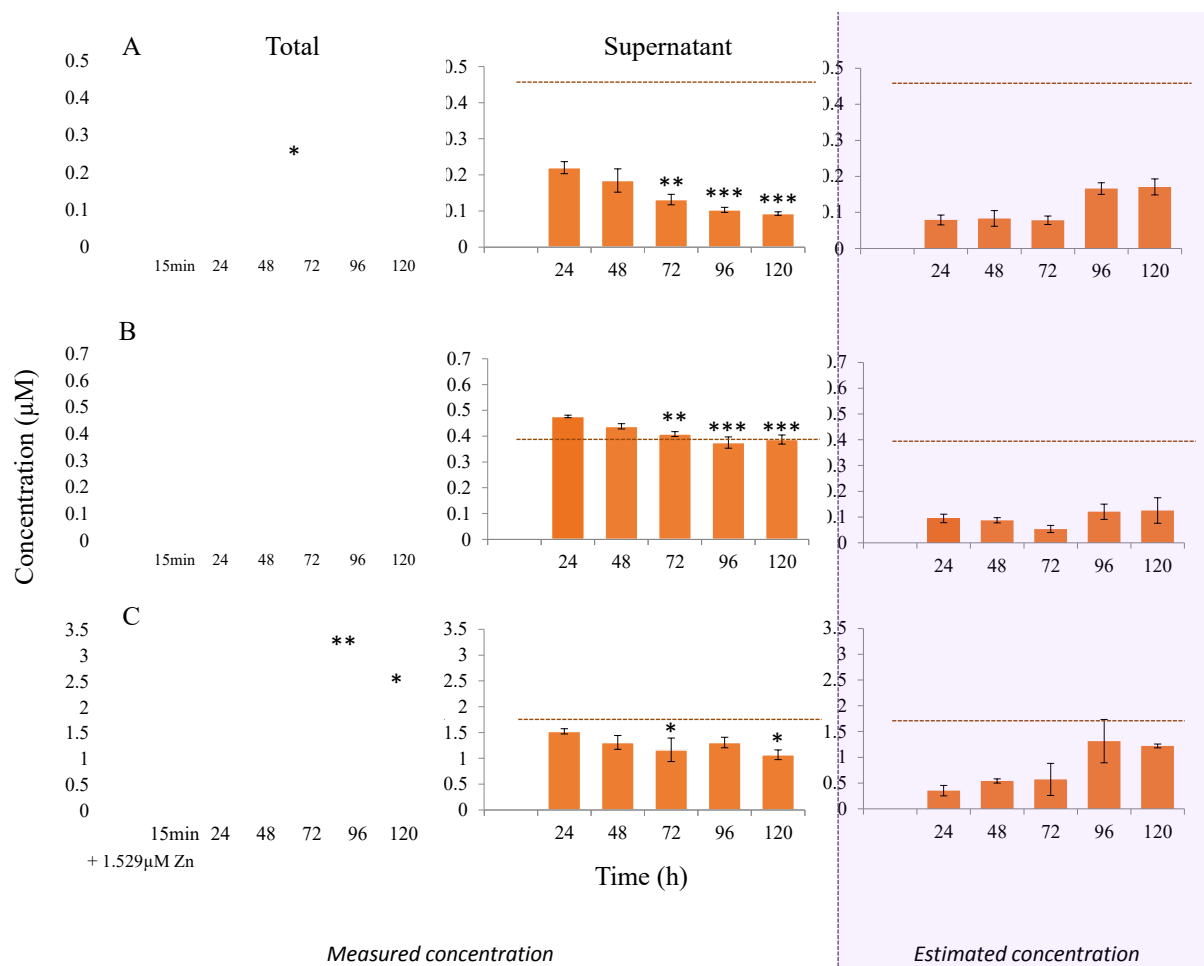


Figure V.4 : Measured concentrations in Cd (A), Cu (B) and Zn(C) in total samples (Total : medium and organisms) and in supernatant (Supernatant : medium without organisms). Theoretical introduced concentrations are represented by the brown dotted line. Estimated concentrations (graphs in violet zone) represent the difference between concentrations in total samples and in supernatant. Values are means of three independent replicates. MWW tests were used to compare each time to measurements done at 24 h for Cd, Cu and Zn ($\alpha = 0.05$).

During the whole experiment, measured concentrations of Cd in total sample were between 0.146 µM and 235 µM, which is lower than theoretical introduced concentration (0.445 µM). Adsorption on microwell plates may have occurred in the first hours after Cd addition as Cd is able to be adsorbed on plastic surfaces in river water (Holmes et al. 2014). Saturation may have been reached before 24 h which could explain lower concentrations found and why it then remained stable over time in the fraction named “Total” (medium + organisms).

Conversely, measured concentrations of Cu in total sample were between 0.068 μM to 0.177 μM higher than theoretical introduced concentration (0.393 μM). A concentration of 10 $\mu\text{g/l}$ (=0.99 μM) was measured in synthetic water without contaminants (data not shown) which could explain the difference.

Cd and Cu concentrations in total samples (**Figure V.4, “Total” A and B**) remain stable over time. On contrary, both concentrations in supernatant (**Figure V.4, “Supernatant” A and B**) decreased from the start to the end of the test. Concentrations are significantly lower from 72 h to 120 h for both Cd and Cu. Concentrations measured in supernatant significantly decreased from 0.219 μM at 24 h to 0.093 μM at 120 h for Cd and from 0.476 μM to 0.387 μM for Cu. Thus, estimated concentrations of both metals in pellet (**Figure V.4, “violet zone” B**) increased over time.

The first 72 h, Zn concentrations in total samples were found to be close to theoretical introduced concentrations. At the end of the test (96 h and 120 h), Zn concentrations were found to be significantly higher compared to concentrations at 24 h. It could not be due to microorganism lysis as this raise has been found in “total” samples (medium + organisms) and measurements have been done after 1% HNO_3 acidification. Zn contamination may have occurred during measurement. Concerning Zn concentrations in supernatant, not a clear significant decrease was observed as for Cd and Cu. Significant lower Zn concentrations were measured at 72 h and 120 h. However, estimated concentrations suggest an increase of bioaccumulated or biosorbed Zn over time (**Figure V.4, “violet zone” C**).

In order to compare the sensitivity of the microbial trophic web test with those of normalized test NF ISO 20666:2008, that consist in a 48 h chronic toxicity determination of *Brachionus calyciflorus* reproduction, both tests were performed on the same metal concentrations. Toxicity results were assessed at the same exposure time of ISO test (48 h) and in final time of microbial trophic web test (120 h). Results are presented in **figure V.5**.

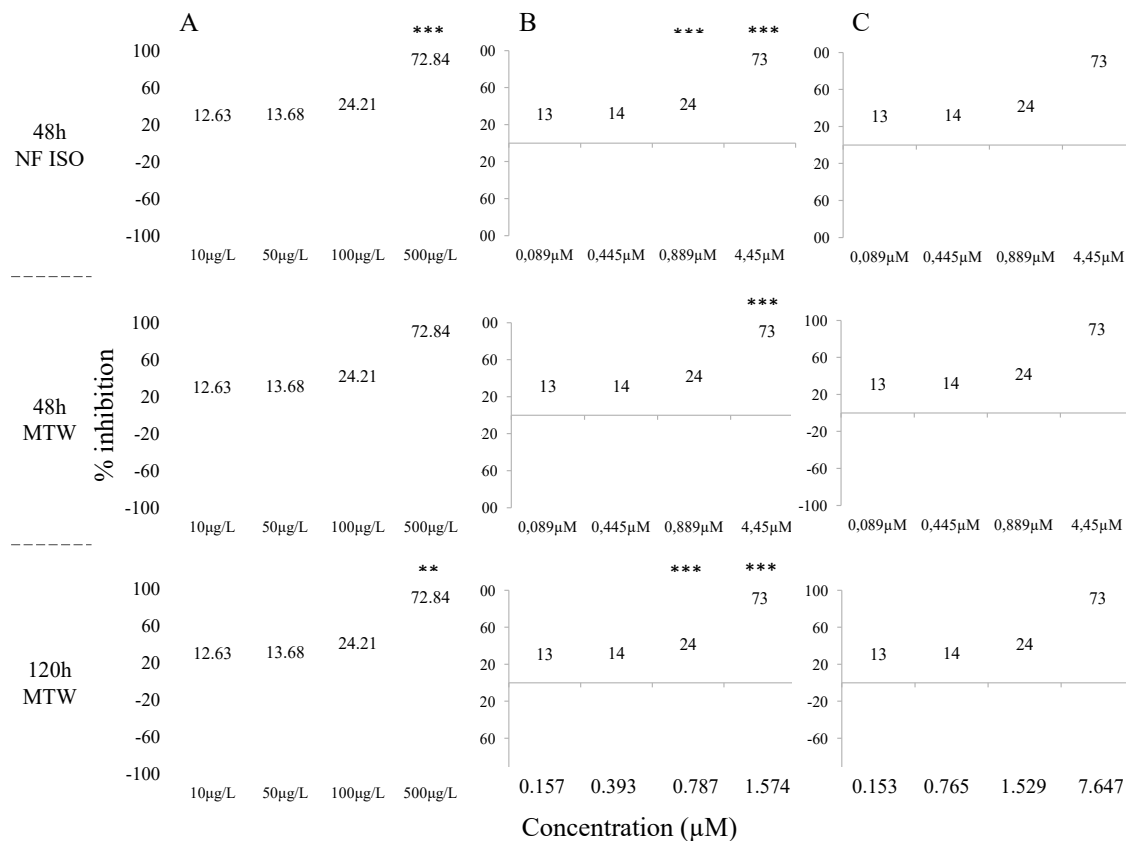


Figure V.5 : Inhibition percentage of *Brachionus calyciflorus* reproduction after 48 h exposure to Cd (A), Cu (B) and Zn (C) in normalized tests NF ISO 20666:2008 (48 h NF ISO), and after 48 h (48 h MTW) and 120 h (120 h MTW) exposure in the microbial trophic web (MTW). Values are means of six independent replicates. Data from exposed samples were compared with those from controls (unexposed samples) with MWW test ($\alpha = 0.05$). Standard deviations are not represented but they were taking into account for statistical analysis as they were performed on raw data.

Globally, results show a higher sensitivity of *Brachionus calyciflorus* towards the three metals tested in normalized tests. Indeed, significant effects on rotifer reproduction appear at 0.445 μM , 0.157 μM and 7.647 μM for Cd, Cu and Zn, respectively (Figure V.5, 48 h NF ISO, A, B, C). In microbial trophic web tests, both at 48 h or 120 h exposure, significant effects were observed at 4.45 μM for Cd and at 0.787 μM and 1.574 μM for Cu while no significant effect were recorded for Zn.

At low concentrations, Zn even seems to have positive effects on *B. calyciflorus* reproduction such as Cu in a lower extend.

V.5 Discussion

The aim of the present study was to evaluate the potential of the microbial trophic web to assess toxicity of contaminants. Nowadays, normalized ecotoxicity tests are mainly based on single-species toxicity tests which are important to provide reference values for environmental risk assessment. However, such data collected from a single organism level could not be extrapolated to the ecosystem level (Preston 2002). Meso- and microcosms approaches represent a good option to integrate ecosystems complexity, but our ability to multiply replications and variables as well as to determine reference values with those systems are limited. The miniaturized microbial trophic web used in the present study is a four-component microbial trophic web that evolved in 4 ml for 120 h without medium renewing. Heavy metal contaminations were chosen as their impacts on organisms are well documented. We collected EC₅₀ values of Cd, Cu and Zn from the literature on algae, bacteria and rotifers in single species tests in order to evaluate the microbial trophic web test sensitivity compared to these data, results are presented in **figure V.6**.

EC₅₀ values for Cd toward bacteria, algae and rotifers ranges from 1.9 μM to 942.9 μM , 0.55 μM to 3.03 μM and from 0.57 μM to 2.1 μM respectively (**Figure V.6, A**). Copper EC₅₀ values toward bacteria, algae and rotifers ranges from 0.47 μM to 59.7 μM , 0.02 μM to 1.07 μM and from 0.22 μM to 0.91 μM , respectively (**Figure V.6, B**). Zn toxicity was reported for bacteria, algae and rotifers from 9.8 μM to 244.6 μM , 1.3 μM to 2.76 μM and 0.3 μM to 16.8 μM , respectively (**Figure V.6, C**). In our study, first effects of Cd, Cu and Zn on *B. calyciflorus* population dynamics were observed at 0.889 μM , 0.787 μM and 7.647 μM , respectively. These concentrations are in the range of those reported in **figure V.6**.

Moreover, considering results in **figure V.6**, the order of toxicity level for bacteria is $\text{Cu} > \text{Zn} > \text{Cd}$, whereas it seems to be $\text{Cu} > \text{Cd} > \text{Zn}$ for algae and rotifers. In any case, Cu was found to be the most toxic metal tested and our study reveals that order of toxicity for rotifers in our conditions is $\text{Cu} > \text{Cd} > \text{Zn}$ and so the same as studies with single species tests.

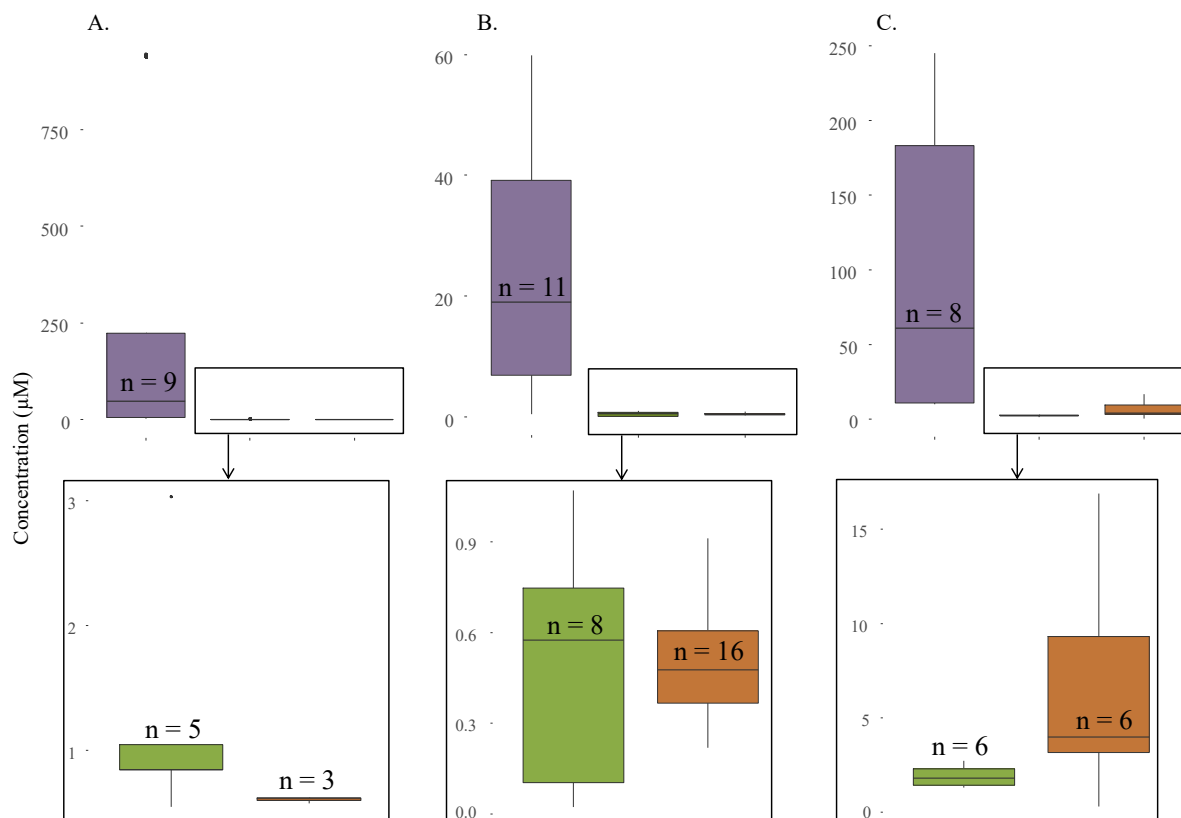


Figure V.6 : *EC50 (i.e. the Effect Concentration of toxicant that reduces of 50% the considered parameter) values of Cd (A), Cu (B) and Zn (C) on bacteria (purple boxplot), algae (green boxplot) and rotifers (brown boxplot) collected from the literature. “n” in the number of value used to do the boxplot. For bacteria, all parameters and all species were considered when only freshwater species and growth parameters after at min 24 h exposure were taking into account for algae and rotifers (only *B. calyciflorus*). References for : bacteria : , Ma and Wang 2013, Kurvet et al. 2011, Ivask et al. 2010, Heinlaan et al. 2008, Radix et al. 1999, Kong et al. 1995, Elnabarawy et al. 1988, Slabbert 1986, Greene et al. 1985, Miller et al. 1985 algae : Franklin et al. 2002, Yan and Pan 2002, Muysen and Janssen 2001, Franklin et al. 2000, Errecalde et al. 1998, Pardos et al. 1998, Chen and Lin 1997, Blaise et al. 1986 rotifers : Santos-Medrano and Rico-Martinez 2015, De Schamphelaere et Janssen 2010, Girling et al., 2000, Radix et al. 2000, Charoy and Janssen 1999, Radix et al. 1999, Charoy et al. 1995, Janssen et al. 1994b, Ferrando et al. 1993, Ferrando and Andreu 1993, Snell and Moffat 1992*

Based on the literature, Cd, Cu and Zn have been found to have a limited impact on bacteria while rotifers appear to be the most sensitive species to these heavy metals, except for Zn exposure.

As rotifers are top predator of the model microbial trophic web, they strongly impact population dynamics of organisms they feed on (e.g. mainly algae and protozoa).

If population dynamic of rotifers change due to contaminant exposure, it will conversely impact population dynamics of other organisms. The reverse is also true due to the interactivity between the different organisms. However, *B. calyciflorus* population dynamic integrates possible effects of contaminants on the whole food web and could to be a quick and suitable parameter to assess integrity of the microbial food web.

Measured concentrations of Cd, Cu and Zn in different water types range from $0.089 \cdot 10^{-3}$ μM to $0.008 \mu\text{M}$; from $0.011 \mu\text{M}$ to $1.01 \mu\text{M}$ and from $0.017 \mu\text{M}$ to $2.401 \mu\text{M}$, respectively (Jackson et al. 2015, Ma and Wang 2013, Simeonov et al. 2003). Copper and zinc could be found in some environments at concentrations higher than NOEC values determined in the present study ($0.393 \mu\text{M}$ and $1.529 \mu\text{M}$, respectively) and thus could have adverse effects on ecosystems stability.

Even if environmental concentrations of Cd appear to be lower than the defined NOEC, toxicity is not the only concern. Indeed, due to their small size, microorganisms have a high surface area-to-volume ratio which provide an important interacting surface with surrounding metals (Zouboulis et al. 2004). Thus, bacteria and algae may sorbe or bioconcentrate heavy metals and transfer them through the trophic web (Clément and Lamonica 2018, Freitas et al. 2008, Ginn and Fein 2008, Mylon et al. 2003). Estimated concentrations presented in **figure V.4** show an increase in Cd, Cu and Zn concentrations over time suggesting possible bioconcentration and/or biosorption of these three metals in organisms. But we cannot conclude that this increase is necessarily due to metal bioconcentration and/or biosorption. Indeed, for example for Cd, in the presence of phosphate and ferrous ions in medium, it is difficult to separate metal sorption from precipitation as cadmium salts can form colloidal hydroxides or coprecipitates with colloidal ferric hydroxide. These colloids may be found in the pellet after centrifugation (Trevors et al. 1986).

A normalized test which consist in evaluating *B. calyciflorus* population dynamic (NF ISO 20666:2008) was performed (**Figure V.5**) to compare ecotoxicity results with those of the microbial network . Results highlight higher sensibility of rotifers exposed to Cd, Cu and Zn in normalized tests than in microbial trophic web test. Major differences in protocols between ISO and microbial network tests may partly explain the differences observed in toxicity response. Indeed, the ISO test consists in one neonate rotifers added to 1 ml of USEPA Moderately Hard Water containing $2 \cdot 10^6$ algae/ml. Tests are performed in obscurity, without orbital shaking in 24-microwell plats.

Microbial trophic web tests represent a more complex scenario where 2 adult rotifers (24 h) are exposed to contaminants in 4 ml of synthetic water with $5 \cdot 10^5$ algae/ml, 10^5 nitrifying bacteria/ml and $5 \cdot 10^2$ protozoa/ml. Tests are performed with a day:night alternation (14:10; 160 lux) and with orbital shaking in 12-microwell plates. Thus, biological parameters, as well as physical ones, could explain the differences observed in test sensitivities.

Indeed, metal toxicity depends on many factors like cellular density conditioning the amount of bioavailable toxic per cell (Moreno-Garrido et al. 2000), pH (Heijerick et al. 2002, Franklin et al. 2000), water hardness, redox potential, temperature, aeration (Kong et al. 1995, Flemming and Trevors 1989), exposition time (Janssen et al. 1994), DOC nature and concentration (De Schamphelaere and Janssen 2010, Heijerick et al. 2005). On top of that, the difference between the life stage of rotifers when contaminations are added could be one of the most decisive factor that play on test sensitivity. Indeed, a recent study with *Brachionus* spp. reported that neonate were more sensitive than adult as the NOEC value for adult was ten times higher than the one of newborn rotifers (Park and al. 2017). However, microbial trophic web test is also performed on 120 h, that take several generation into account and ISO test was still more sensitive.

Positive effects were also observed on population dynamics of rotifers after Zn and Cu expositions at low concentrations. This hormesic effects have been previously reported in other studies (Xu et al. 2014, De Schamphelaere and Janssen 2010, Gama-flores et al. 2007). It often suggest that test medium was deficient in the concerned compound. Indeed, zinc is a cofactor in several enzymes and is essential for the growth of living organisms as well as Cu (Maret 2013, Siluvai et al. 2011, Truong-Tran et al. 2001, Maret 2000, Coleman 1998, Roberts et al. 1997, Vallee and Auld 1990).

V.6 Conclusion

Through this study, it has been shown that the miniaturized aquatic microbial trophic web could be used to assess the toxicity of contaminants in more realistic conditions than single species normalized ecotoxicity tests. Toxicity assessment of Cd, Cu and Zn in the microbial trophic web reveals a lower toxicity than in normalized test NF ISO 20666:2008. This suggest that normalized tests are more sensitive than the microbial trophic web considering population dynamics of rotifers. It confirms that results could be different depending on test

conditions. Indeed biotic interactions taking place in the network can diminish metal bioavailability and thus toxicity.

In that way, our test could provide acute and chronic toxicity data of various microorganisms with different functional role in ecosystems through a same study. Algal and rotifers population dynamics and bacterial community dynamic could be easily and routinely followed up as well as several physico-chemical parameters. Rotifers as top predators of this four-component microbial trophic web, seem to be the most sensitive organisms of the bioassay, which seems to be consistent with the literature. Thus, *B. calyciflorus* population dynamics seems to be a suitable parameter to quickly assess potential effects of contaminants on the microbial trophic web. The microbial trophic web could fit with the evaluation of bioaccumulation, biomagnification and trophic transfer of contaminants in the very first trophic levels.

Thus, developing this type of system could improve environmental risk assessment.

Acknowledgements - The authors thank the Région Lorraine for their financial support.

V.7 References

A

Ancion Pierre-Yves, Gavin Lear, et Gillian D. Lewis. « Three Common Metal Contaminants of Urban Runoff (Zn, Cu & Pb) Accumulate in Freshwater Biofilm and Modify Embedded Bacterial Communities ». *Environmental Pollution* 158, n° 8 (août 2010): 2738-45. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2010.04.013>.

B

Bertin G., et D. Averbeck. « Cadmium: Cellular Effects, Modifications of Biomolecules, Modulation of DNA Repair and Genotoxic Consequences (a Review) ». *Biochimie* 88, n° 11 (novembre 2006): 1549-59. <https://doi.org/10.1016/j.biochi.2006.10.001>.

Blaise C., R. Legault, N. Bermingham, R. Van Coillie, et P. Vasseur. « A Simple Microplate Algal Assay Technique for Aquatic Toxicity Assessment ». *Toxicity Assessment* 1, n° 3 (1986): 261-81. <https://doi.org/10.1002/tox.2540010302>.

Burbank Susan E., et Terry W. Snell. « Rapid Toxicity Assessment Using Esterase Biomarkers in *Brachionus Calyciflorus* (rotifera) ». *Environmental Toxicology & Water Quality* 9, n° 3 (août 1994): 171-78. <https://doi.org/10.1002/tox.2530090303>.

C

Carter J, et I Cameron. « Toxicity Bioassay of Heavy Metals in Water Using *Tetrahymena Pyriformis* ». *Water Research* 7, n° 7 (juillet 1973): 951-61. [https://doi.org/10.1016/0043-1354\(73\)90177-2](https://doi.org/10.1016/0043-1354(73)90177-2).

Chapman Peter M., Feiyue Wang, Colin R. Janssen, Richard R. Goulet, et Collins N. Kamunde. « Conducting Ecological Risk Assessments of Inorganic Metals and Metalloids: Current Status ». *Human and Ecological Risk Assessment: An International Journal* 9, n° 4 (juin 2003): 641-97. <https://doi.org/10.1080/713610004>.

Charoy Christine, et Colin R. Janssen. « The Swimming Behaviour of *Brachionus Calyciflorus* (rotifer) under Toxic Stress ». *Chemosphere* 38, n° 14 (juin 1999): 3247-60. [https://doi.org/10.1016/S0045-6535\(98\)00557-8](https://doi.org/10.1016/S0045-6535(98)00557-8).

Charoy C.P., C.R. Janssen, G. Persoone, et P. Clément. « The Swimming Behaviour of *Brachionus Calyciflorus* (rotifer) under Toxic Stress. I. The Use of Automated Trajectorymetry for Determining Sublethal Effects of Chemicals ». *Aquatic Toxicology* 32, n° 4 (juillet 1995): 271-82. [https://doi.org/10.1016/0166-445X\(94\)00098-B](https://doi.org/10.1016/0166-445X(94)00098-B).

Chen Chung-Yuan, et Kuo-Ching Lin. « Optimization and Performance Evaluation of the Continuous Algal Toxicity Test ». *Environmental Toxicology and Chemistry* 16, n° 7 (juillet 1997): 1337-44. <https://doi.org/10.1002/etc.5620160701>.

Clément Bernard, et Dominique Lamonica. « Fate, Toxicity and Bioconcentration of Cadmium on Pseudokirchneriella Subcapitata and Lemna Minor in Mid-Term Single Tests ». *Ecotoxicology* 27, n° 2 (mars 2018): 132-43. <https://doi.org/10.1007/s10646-017-1879-z>.

Coleman J. E. « Zinc Enzymes ». *Current Opinion in Chemical Biology* 2, n° 2 (avril 1998): 222-34.

Couillard Yves, Philippe Ross, et Bernadette Pinel-Alloul. « Acute Toxicity of Six Metals to the Rotifer Brachionus Calyciflorus, with Comparisons to Other Freshwater Organisms ». *Toxicity Assessment* 4, n° 4 (novembre 1989): 451-62. <https://doi.org/10.1002/tox.2540040405>.

Croteau Marie-Noële, Samuel N. Luoma, et A. Robin Stewart. « Trophic Transfer of Metals along Freshwater Food Webs: Evidence of Cadmium Biomagnification in Nature ». *Limnology and Oceanography* 50, n° 5 (septembre 2005): 1511-19. <https://doi.org/10.4319/lo.2005.50.5.1511>.

D

De Schampelaere Karel A.C., et Colin R. Janssen. « Cross-Phylum Extrapolation of the Daphnia Magna Chronic Biotic Ligand Model for Zinc to the Snail Lymnaea Stagnalis and the Rotifer Brachionus Calyciflorus ». *Science of The Total Environment* 408, n° 22 (octobre 2010): 5414-22. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2010.07.043>.

E

Elnabarawy M. T., R. R. Robideau, et S. A. Beach. « Comparison of Three Rapid Toxicity Test Procedures: Microtox,® Polytox,® and Activated Sludge Respiration Inhibition ». *Toxicity Assessment* 3, n° 4 (août 1988): 361-70. <https://doi.org/10.1002/tox.2540030402>.

Errecalde Olivier, Martin Seidl, et Peter G.C. Campbell. « Influence of a Low Molecular Weight Metabolite (citrate) on the Toxicity of Cadmium and Zinc to the Unicellular Green Alga Selenastrum Capricornutum: An Exception to the Free-Ion Model ». *Water Research* 32, n° 2 (février 1998): 419-29. [https://doi.org/10.1016/S0043-1354\(97\)00282-0](https://doi.org/10.1016/S0043-1354(97)00282-0).

F

- Ferrando M.D., et E. Andreu. « Feeding Behavior as an Index of Copper Stress in *Daphnia Magna* and *Brachionus Calyciflorus* ». *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Pharmacology, Toxicology and Endocrinology* 106, n° 2 (octobre 1993): 327-31. [https://doi.org/10.1016/0742-8413\(93\)90141-7](https://doi.org/10.1016/0742-8413(93)90141-7).
- Ferrando M.D., C.R. Janssen, E. Andreu, et G. Persoone. « Ecotoxicological Studies with the Freshwater Rotifer *Brachionus Calyciflorus* III. The Effects of Chemicals on the Feeding-Behavior ». *Ecotoxicology and Environmental Safety* 26, n° 1 (août 1993): 1-9. <https://doi.org/10.1006/eesa.1993.1035>.
- Flemming C. A., et J. T. Trevors. « Copper Toxicity and Chemistry in the Environment: A Review ». *Water, Air, and Soil Pollution* 44, n° 1-2 (mars 1989): 143-58. <https://doi.org/10.1007/BF00228784>.
- Franklin Natasha M., Jennifer L. Stauber, Richard P. Lim, et Peter Petocz. « Toxicity of Metal Mixtures to a Tropical Freshwater Alga (*Chlorella* Sp.): The Effect of Interactions between Copper, Cadmium, and Zinc on Metal Cell Binding and Uptake ». *Environmental Toxicology and Chemistry* 21, n° 11 (novembre 2002): 2412-22. <https://doi.org/10.1002/etc.5620211121>.
- Franklin Natasha M., Jennifer L. Stauber, Scott J. Markich, et Richard P. Lim. « pH-Dependent Toxicity of Copper and Uranium to a Tropical Freshwater Alga (*Chlorella* Sp.) ». *Aquatic Toxicology* 48, n° 2-3 (mars 2000): 275-89. [https://doi.org/10.1016/S0166-445X\(99\)00042-9](https://doi.org/10.1016/S0166-445X(99)00042-9).
- Freitas Olga M.M., Ramiro J.E. Martins, Cristina M. Delerue-Matos, et Rui A.R. Boaventura. « Removal of Cd(II), Zn(II) and Pb(II) from Aqueous Solutions by Brown Marine Macro Algae: Kinetic Modelling ». *Journal of Hazardous Materials* 153, n° 1-2 (mai 2008): 493-501. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2007.08.081>.
- Fuma S., H. Takeda, K. Miyamoto, K. Yanagisawa, Y. Inoue, N. Ishii, K. Sugai, C. Ishii, et Z. Kawabata. « Ecological Evaluation of Gadolinium Toxicity Compared with Other Heavy Metals Using an Aquatic Microcosm ». *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology* 66, n° 2 (février 2001): 231-38. <https://doi.org/10.1007/s0012800229>.

G

- Gama-Flores Jose Luis, Maria Elena Castellanos-Paez, S. S. S. Sarma, et S. Nandini. « Effect of Pulsed Exposure to Heavy Metals (copper and Cadmium) on Some Population

Variables of *Brachionus Calyciflorus* Pallas (Rotifera: Brachionidae: Monogononta) ». *Hydrobiologia* 593, n° 1 (28 août 2007): 201-8. <https://doi.org/10.1007/s10750-007-9042-0>.

Gama-Flores Jose Luis, S. S. S. Sarma, et S. Nandini. « Effect of Cadmium Level and Exposure Time on the Competition between Zooplankton Species *Moina Macrocopa* (Cladocera) and *Brachionus Calyciflorus* (Rotifera) ». *Journal of Environmental Science and Health, Part A* 41, n° 6 (juillet 2006): 1057-70. <https://doi.org/10.1080/10934520600620287>.

Ginn Brian R., et Jeremy B. Fein. « The Effect of Species Diversity on Metal Adsorption onto Bacteria ». *Geochimica et Cosmochimica Acta* 72, n° 16 (août 2008): 3939-48. <https://doi.org/10.1016/j.gca.2008.05.063>.

Girling A.E., D. Pascoe, C.R. Janssen, A. Peither, A. Wenzel, H. Schäfer, B. Neumeier, et al. « Development of Methods for Evaluating Toxicity to Freshwater Ecosystems ». *Ecotoxicology and Environmental Safety* 45, n° 2 (février 2000): 148-76. <https://doi.org/10.1006/eesa.1999.1847>.

Greene Joseph C., William E. Miller, Mary K. Debacon, Michael A. Long, et Cathy Lee Bartels. « A Comparison of Three Microbial Assay Procedures for Measuring Toxicity of Chemical Residues ». *Archives of Environmental Contamination and Toxicology* 14, n° 6 (novembre 1985): 659-67. <https://doi.org/10.1007/BF01055772>.

H

Hahn Jens, Christian Opp, Nina Zitzer, et Gabriela Laufenberg. « Impacts of River Impoundment on Dissolved Heavy Metals in Floodplain Soils of the Lahn River (Germany) ». *Environmental Earth Sciences* 75, n° 15 (août 2016). <https://doi.org/10.1007/s12665-016-5950-5>.

Heijerick D.G., K.A.C. De Schamphelaere, et C.R. Janssen. « Biotic Ligand Model Development Predicting Zn Toxicity to the Alga *Pseudokirchneriella Subcapitata*: Possibilities and Limitations ». *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology* 133, n° 1-2 (septembre 2002): 207-18. [https://doi.org/10.1016/S1532-0456\(02\)00077-7](https://doi.org/10.1016/S1532-0456(02)00077-7).

Heijerick D.G., Bossuyt B.T.A., De Schamphelaere K.A.C., Indeherberg M., Mingazzini M., et Janssen C.R. « Effect of Varying Physicochemistry of European Surface Waters on the

Copper Toxicity to the Green Alga *Pseudokirchneriella Subcapitata* ». *Ecotoxicology* 14, n° 6 (août 2005): 661-70. <https://doi.org/10.1007/s10646-005-0014-8>.

Heinlaan Margit, Angela Ivask, Irina Blinova, Henri-Charles Dubourguier, et Anne Kahru. « Toxicity of Nanosized and Bulk ZnO, CuO and TiO₂ to Bacteria *Vibrio Fischeri* and Crustaceans *Daphnia Magna* and *Thamnocephalus Platyurus* ». *Chemosphere* 71, n° 7 (avril 2008): 1308-16. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2007.11.047>.

Holmes Luke A., Andrew Turner, et Richard C. Thompson. « Interactions between Trace Metals and Plastic Production Pellets under Estuarine Conditions ». *Marine Chemistry* 167 (décembre 2014): 25-32. <https://doi.org/10.1016/j.marchem.2014.06.001>.

I-J

Ivask A., O. Bondarenko, N. Jepihhina, et A. Kahru. « Profiling of the Reactive Oxygen Species-Related Ecotoxicity of CuO, ZnO, TiO₂, Silver and Fullerene Nanoparticles Using a Set of Recombinant Luminescent *Escherichia Coli* Strains: Differentiating the Impact of Particles and Solubilised Metals ». *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 398, n° 2 (septembre 2010): 701-16. <https://doi.org/10.1007/s00216-010-3962-7>.

Jackson Togwell A., Sophia Vlaar, Nien Nguyen, Gary G. Leppard, et Turlough M. Finan. « Effects of Bioavailable Heavy Metal Species, Arsenic, and Acid Drainage from Mine Tailings on a Microbial Community Sampled Along a Pollution Gradient in a Freshwater Ecosystem ». *Geomicrobiology Journal* 32, n° 8 (14 septembre 2015): 724-50. <https://doi.org/10.1080/01490451.2014.969412>.

Janssen C.R., M.D. Ferrando, et G. Persoone. « Ecotoxicological Studies with the Freshwater Rotifer *Brachionus Calyciflorus* ». *Ecotoxicology and Environmental Safety* 28, n° 3 (août 1994): 244-55. <https://doi.org/10.1006/eesa.1994.1050>.

Janssen C.R., G. Persoone, et T.W. Snell. « Cyst-Based Toxicity Tests. VIII. Short-Chronic Toxicity Tests with the Freshwater Rotifer *Brachionus Calyciflorus* ». *Aquatic Toxicology* 28, n° 3-4 (avril 1994): 243-58. [https://doi.org/10.1016/0166-445X\(94\)90036-1](https://doi.org/10.1016/0166-445X(94)90036-1).

K

Kong In-Chul, Gabriel Bitton, Ben Koopman, et Keum-Hee Jung. « Heavy Metal Toxicity Testing in Environmental Samples ». In *Reviews of Environmental Contamination and Toxicology*, édité par George W. Ware, 142:119-47. New York, NY: Springer New York, 1995. http://link.springer.com/10.1007/978-1-4612-4252-9_5.

Kurvet Imbi, Angela Ivask, Olesja Bondarenko, Mariliis Sihtmäe, et Anne Kahru. « LuxCDABE—Transformed Constitutively Bioluminescent Escherichia Coli for Toxicity Screening: Comparison with Naturally Luminous Vibrio Fischeri ». *Sensors* 11, n° 8 (11 août 2011): 7865-78. <https://doi.org/10.3390/s110807865>.

L

Leusch Andreas, Zdenek R. Holan, et Bohumil Volesky. « Biosorption of Heavy Metals (Cd, Cu, Ni, Pb, Zn) by Chemically-Reinforced Biomass of Marine Algae ». *Journal of Chemical Technology AND Biotechnology* 62, n° 3 (mars 1995): 279-88. <https://doi.org/10.1002/jctb.280620311>.

M

Maret Wolfgang. « The Function of Zinc Metallothionein: A Link between Cellular Zinc and Redox State ». *The Journal of Nutrition* 130, n° 5 (1 mai 2000): 1455S - 1458S. <https://doi.org/10.1093/jn/130.5.1455S>.

———. « Zinc Biochemistry: From a Single Zinc Enzyme to a Key Element of Life ». *Advances in Nutrition* 4, n° 1 (1 janvier 2013): 82-91. <https://doi.org/10.3945/an.112.003038>.

Ma X. Y., et X. C. Wang. « Ecotoxicity Comparison of Organic Contaminants and Heavy Metals Using Vibrio-Qinghaiensis Sp.-Q67 ». *Water Science and Technology* 67, n° 10 (mai 2013): 2221-27. <https://doi.org/10.2166/wst.2013.113>.

Milačić Radmila, Tea Zuliani, Janja Vidmar, Primož Oprčkal, et Janez Ščančar. « Potentially Toxic Elements in Water and Sediments of the Sava River under Extreme Flow Events ». *Science of The Total Environment* 605-6 (décembre 2017): 894-905. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2017.06.260>.

Miller W. E., S. A. Peterson, J. C. Greene, et C. A. Callahan. « Comparative Toxicology of Laboratory Organisms for Assessing Hazardous Waste Sites1 ». *Journal of Environment Quality* 14, n° 4 (1985): 569. <https://doi.org/10.2134/jeq1985.00472425001400040019x>.

Moreno-Garrido I., L.M. Lubián, et A.M.V.M. Soares. « Influence of Cellular Density on Determination of EC50 in Microalgal Growth Inhibition Tests ». *Ecotoxicology and Environmental Safety* 47, n° 2 (octobre 2000): 112-16. <https://doi.org/10.1006/eesa.2000.1953>.

Muysen B.T.A., et C.R. Janssen. « Zinc Acclimation and Its Effect on the Zinc Tolerance of Raphidocelis Subcapitata and Chlorella Vulgaris in Laboratory Experiments ».

Chemosphere 45, n° 4-5 (novembre 2001): 507-14. [https://doi.org/10.1016/S0045-6535\(01\)00047-9](https://doi.org/10.1016/S0045-6535(01)00047-9).

Mylon Steven E., Benjamin S. Twining, Nicholas S. Fisher, et Gaboury Benoit. « Relating the Speciation of Cd, Cu, and Pb in Two Connecticut Rivers with Their Uptake in Algae ». *Environmental Science & Technology* 37, n° 7 (avril 2003): 1261-67. <https://doi.org/10.1021/es0259281>.

N

Nayar S, B.P.L Goh, L.M Chou, et S Reddy. « In Situ Microcosms to Study the Impact of Heavy Metals Resuspended by Dredging on Periphyton in a Tropical Estuary ». *Aquatic Toxicology* 64, n° 3 (août 2003): 293-306. [https://doi.org/10.1016/S0166-445X\(03\)00062-6](https://doi.org/10.1016/S0166-445X(03)00062-6).

Nedrich Sara M., Anthony Chappaz, Michelle L. Hudson, Steven S. Brown, et G. Allen Burton. « Biogeochemical Controls on the Speciation and Aquatic Toxicity of Vanadium and Other Metals in Sediments from a River Reservoir ». *Science of The Total Environment* 612 (janvier 2018): 313-20. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2017.08.141>.

Nicolau Ana, Manuel Mota, et Nelson Lima. « Physiological Responses of Tetrahymena Pyriformis to Copper, Zinc, Cycloheximide and Triton X-100 ». *FEMS Microbiology Ecology* 30, n° 3 (novembre 1999): 209-16. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6941.1999.tb00649.x>.

O

Olapade Ola A., et Lauren Rasmussen. « Effects of Iron and Copper Treatments on the Bacterioplankton Assemblages from Surface Waters along the North Branch of the Kalamazoo River, Michigan, USA ». *Journal of Basic Microbiology* 59, n° 4 (avril 2019): 385-91. <https://doi.org/10.1002/jobm.201800652>.

Oukarroum Abdallah, François Perreault, et Radovan Popovic. « Interactive Effects of Temperature and Copper on Photosystem II Photochemistry in *Chlorella Vulgaris* ». *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology* 110 (mai 2012): 9-14. <https://doi.org/10.1016/j.jphotobiol.2012.02.003>.

P

- Pardos M., Benninghoff, C., Thomas, R. L. « Photosynthetic and population growth response of the test alga *Selenastrum capricornutum* Printz to zin, cadmium and suspended sediment elutriates ». *Journal of Applied Phycology* 10: 145-151. (1998).
- Park Jun Chul, Jeonghoon Han, Min-Chul Lee, Hye-Min Kang, Chang-Bum Jeong, Dae-Sik Hwang, Minghua Wang, et Jae-Seong Lee. « Adverse Effects of BDE-47 on Life Cycle Parameters, Antioxidant System, and Activation of MAPK Signaling Pathway in the Rotifer *Brachionus Koreanus* ». *Aquatic Toxicology* 186 (mai 2017): 105-12. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2017.02.025>.
- Preston Benjamin L. « Indirect Effects in Aquatic Ecotoxicology: Implications for Ecological Risk Assessment ». *Environmental Management* 29, n° 3 (1 mars 2002): 311-23. <https://doi.org/10.1007/s00267-001-0023-1>.
- Preston B.L., et T.W. Snell. « Full Life-Cycle Toxicity Assessment Using Rotifer Resting Egg Production: Implications for Ecological Risk Assessment ». *Environmental Pollution* 114, n° 3 (octobre 2001): 399-406. [https://doi.org/10.1016/S0269-7491\(00\)00232-3](https://doi.org/10.1016/S0269-7491(00)00232-3).

Q-R

- Qian Jie, Qifang Ding, Annan Guo, Demin Zhang, et Kai Wang. « Alteration in Successional Trajectories of Bacterioplankton Communities in Response to Co-Exposure of Cadmium and Phenanthrene in Coastal Water Microcosms ». *Environmental Pollution* 221 (février 2017): 480-90. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2016.12.020>.
- Radix Pascal, Marc Léonard, Christos Papantoniou, Gilles Roman, Erwan Saouter, Sophie Gallotti-Schmitt, Hervé Thiébaud, et Paule Vasseur. « Comparison of Four Chronic Toxicity Tests Using Algae, Bacteria, and Invertebrates Assessed with Sixteen Chemicals ». *Ecotoxicology and Environmental Safety* 47, n° 2 (octobre 2000): 186-94. <https://doi.org/10.1006/eesa.2000.1966>.
- Radix Pascal, Marc Léonard, Christos Papantoniou, Gilles Roman, Erwan Saouter, Sophie Gallotti-Schmitt, Hervé Thiébaud, et Paule Vasseur. « Comparison of *Brachionus Calyciflorus* 2-D and Microtox® Chronic 22-H Tests with *Daphnia Magna* 21-D Test for the Chronic Toxicity Assessment of Chemicals: Comparison of Three Chronic Toxicity Tests ». *Environmental Toxicology and Chemistry* 18, n° 10 (octobre 1999): 2178-85. <https://doi.org/10.1002/etc.5620181009>.

- Rai L.C., J.P. Gaur, et H.D. Kumar. « Protective Effects of Certain Environmental Factors on the Toxicity of Zinc, Mercury, and Methylmercury to *Chlorella Vulgaris* ». *Environmental Research* 25, n° 2 (août 1981): 250-59. [https://doi.org/10.1016/0013-9351\(81\)90026-8](https://doi.org/10.1016/0013-9351(81)90026-8).
- Roberts Samantha B., Todd W. Lane, et Francois M. M. Morel. « Carbonic anhydrase in the marine diatom *thalassiosira weissflogii* (bacillariophyceae)1 ». *Journal of Phycology* 33, n° 5 (octobre 1997): 845-50. <https://doi.org/10.1111/j.0022-3646.1997.00845.x>.
- Round J. M. « Plasma Calcium, Magnesium, Phosphorus, and Alkaline Phosphatase Levels in Normal British Schoolchildren ». *BMJ* 3, n° 5872 (21 juillet 1973): 137-40. <https://doi.org/10.1136/bmj.3.5872.137>.

S

- Santos-Medrano G. E., Rico-Martinez, R. « Acute and chronic effects of five metals in a battery of freshwater planktonic organisms ». *Fresenius Environmental Bulletin*, PSPVolume 24 – N°12b (2015).
- Sarma S. S. S., Fernando MartíNez-Jerónimo, Teresa Ramírez-Pérez, et S. Nandini. « Effect of Cadmium and Chromium Toxicity on the Demography and Population Growth of *Brachionus Calyciflorus* and *Brachionus Patulus* (Rotifera) ». *Journal of Environmental Science and Health, Part A* 41, n° 4 (mai 2006): 543-58. <https://doi.org/10.1080/10934520600564311>.
- Scanferlato Vjera S., et Jr. John Cairns. « Effect of Sediment-Associated Copper on Ecological Structure and Function of Aquatic Microcosms ». *Aquatic Toxicology* 18, n° 1 (novembre 1990): 23-34. [https://doi.org/10.1016/0166-445X\(90\)90033-L](https://doi.org/10.1016/0166-445X(90)90033-L).
- Sibley T. H., G. Shott, et C. Chang. « Distribution and Toxicity of Copper in Freshwater Microcosms ». *SIL Proceedings, 1922-2010* 25, n° 3 (janvier 1994): 2008-12. <https://doi.org/10.1080/03680770.1992.11900548>.
- Siluvai Gnana S., Michiko Nakano, Mary Mayfield, et Ninian J. Blackburn. « The Essential Role of the Cu(II) State of Sco in the Maturation of the CuA Center of Cytochrome Oxidase: Evidence from H135Met and H135SeM Variants of the *Bacillus Subtilis* Sco ». *JBIC Journal of Biological Inorganic Chemistry* 16, n° 2 (février 2011): 285-97. <https://doi.org/10.1007/s00775-010-0725-z>.
- Simeonov V., J.A. Stratis, C. Samara, G. Zachariadis, D. Voutsas, A. Anthemidis, M. Sofoniou, et Th. Kouimtzis. « Assessment of the Surface Water Quality in Northern Greece ».

Water Research 37, n° 17 (octobre 2003): 4119-24. [https://doi.org/10.1016/S0043-1354\(03\)00398-1](https://doi.org/10.1016/S0043-1354(03)00398-1).

Slabbert J. L. « Improved Bacterial Growth Test for Rapid Water Toxicity Screening ». *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology* 37, n° 1 (décembre 1986): 565-69. <https://doi.org/10.1007/BF01607805>.

Snell Terry W., et Brian D. Moffat. « A 2-D life cycle test with the rotifer *Brachionus calyciflorus* ». *Environmental Toxicology and Chemistry* 11, n° 9 (1992): 1249. [https://doi.org/10.1897/1552-8618\(1992\)11\[1249:ADLCTW\]2.0.CO;2](https://doi.org/10.1897/1552-8618(1992)11[1249:ADLCTW]2.0.CO;2).

Stauber J. L., et T. M. Florence. « Mechanism of Toxicity of Ionic Copper and Copper Complexes to Algae ». *Marine Biology* 94, n° 4 (1987): 511-19. <https://doi.org/10.1007/BF00431397>.

T

Takamura Noriko, Fumie Kasai, et Makoto M. Watanabe. « Effects of Cu, Cd and Zn on Photosynthesis of Freshwater Benthic Algae ». *Journal of Applied Phycology* 1, n° 1 (avril 1989): 39-52. <https://doi.org/10.1007/BF00003534>.

Tomczyk Nathan J., Thomas B. Parr, Elmer Gray, Joseph Iburg, et Krista A. Capps. « Trophic Strategies Influence Metal Bioaccumulation in Detritus-Based, Aquatic Food Webs ». *Environmental Science & Technology*, 2 octobre 2018. <https://doi.org/10.1021/acs.est.8b04009>.

Trevors J. T., G. W. Stratton, et G. M. Gadd. « Cadmium Transport, Resistance, and Toxicity in Bacteria, Algae, and Fungi ». *Canadian Journal of Microbiology* 32, n° 6 (juin 1986): 447-64. <https://doi.org/10.1139/m86-085>.

Tripathi B. N., et J. P. Gaur. « Physiological Behavior of *Scenedesmus* Sp. during Exposure to Elevated Levels of Cu and Zn and after Withdrawal of Metal Stress ». *Protoplasma* 229, n° 1 (novembre 2006): 1-9. <https://doi.org/10.1007/s00709-006-0196-9>.

Truong-Tran A. Q., J. Carter, R. E. Ruffin, et P. D. Zalewski. « The Role of Zinc in Caspase Activation and Apoptotic Cell Death ». *Biometals: An International Journal on the Role of Metal Ions in Biology, Biochemistry, and Medicine* 14, n° 3-4 (décembre 2001): 315-30.

V

- Vallee Bert L., et David S. Auld. « Zinc Coordination, Function, and Structure of Zinc Enzymes and Other Proteins ». *Biochemistry* 29, n° 24 (19 juin 1990): 5647-59. <https://doi.org/10.1021/bi00476a001>.
- Van de Perre Dimitri, Ivo Roessink, Colin R. Janssen, Erik Smolders, Frederik De Laender, Paul J. Van den Brink, et Karel A.C. De Schamphelaere. « The Combined and Interactive Effects of Zinc, Temperature, and Phosphorus on the Structure and Functioning of a Freshwater Community: Interactive Effects of Zn, Temperature, and P on an Aquatic Ecosystem ». *Environmental Toxicology and Chemistry* 37, n° 9 (septembre 2018): 2413-27. <https://doi.org/10.1002/etc.4201>.
- Van de Perre Dimitri, Ivo Roessink, Colin R. Janssen, Erik Smolders, Tina Van Regenmortel, Jeroen Van Wichelen, Wim Vyverman, Paul J. Van den Brink, et Karel A.C. De Schamphelaere. « The Effects of Zinc on the Structure and Functioning of a Freshwater Community: A Microcosm Experiment: Aquatic Microcosm with Zn ». *Environmental Toxicology and Chemistry* 35, n° 11 (novembre 2016): 2698-2712. <https://doi.org/10.1002/etc.3435>.
- Vidal-Durà Andrea, Ian T. Burke, Douglas I. Stewart, et Robert J.G. Mortimer. « Reoxidation of Estuarine Sediments during Simulated Resuspension Events: Effects on Nutrient and Trace Metal Mobilisation ». *Estuarine, Coastal and Shelf Science* 207 (juillet 2018): 40-55. <https://doi.org/10.1016/j.ecss.2018.03.024>.
- Vilar Vítor J.P., Cidália M.S. Botelho, et Rui A.R. Boaventura. « Equilibrium and Kinetic Modelling of Cd(II) Biosorption by Algae Gelidium and Agar Extraction Algal Waste ». *Water Research* 40, n° 2 (janvier 2006): 291-302. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2005.11.008>.

X-Y-Z

- Xu Xiao-Ping, Yi-Long Xi, Lin Huang, et Xian-Ling Xiang. « The Life-Table Demographic Response of Freshwater Rotifer Brachionus Calyciflorus to Multi-Metal (Cu, Zn, Cd, Cr, and Mn) Mixture Interaction ». *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology* 93, n° 2 (août 2014): 165-70. <https://doi.org/10.1007/s00128-014-1281-y>.
- Yan Hai, et Gang Pan. « Toxicity and Bioaccumulation of Copper in Three Green Microalgal Species ». *Chemosphere* 49, n° 5 (novembre 2002): 471-76. [https://doi.org/10.1016/S0045-6535\(02\)00285-0](https://doi.org/10.1016/S0045-6535(02)00285-0).

Zouboulis A.I, M.X Loukidou, et K.A Matis. « Biosorption of Toxic Metals from Aqueous Solutions by Bacteria Strains Isolated from Metal-Polluted Soils ». *Process Biochemistry* 39, n° 8 (avril 2004): 909-16. [https://doi.org/10.1016/S0032-9592\(03\)00200-0](https://doi.org/10.1016/S0032-9592(03)00200-0).

CONCLUSION & PERSPECTIVES

VI. Conclusion et perspectives

VI.1 Conclusion

Les objectifs initiaux de ces travaux de thèse consistaient à évaluer l'impact des filtres solaires nanoparticulaires sur un réseau trophique microbien et sur divers (micro)organismes modèles, comme par exemple la cyanobactérie *Synechococcus elongatus*. La prise de conscience du potentiel du réseau trophique microbien en tant qu'outil pour l'évaluation des risques ainsi que la compréhension de sa complexité associée aux difficultés rencontrées lors de son développement nous ont conduit à redéfinir nos objectifs. La majeure partie de cette thèse a alors été dédiée au développement d'un réseau trophique microbien modèle ainsi qu'à sa standardisation et caractérisation.

Ainsi, les travaux concernant l'impact des NP-ZnO manufacturées contenus dans les filtres solaires sur *Synechococcus elongatus* ont permis d'identifier les mécanismes d'action de ce contaminant sur le producteur primaire. Il est alors apparu que le zinc dissiperait le potentiel membranaire des cellules nécessaire à la photosynthèse et à la respiration, induisant un stress oxydatif menant à la peroxydation des lipides et causant des dommages à l'ADN. Par ailleurs, la photosynthèse s'est avérée être la fonction biologique dont les gènes étaient les plus fortement dérégulés. Or, la production primaire est la principale voie d'intégration de l'énergie dans un écosystème. Ces résultats renforcent l'importance de considérer l'impact des contaminants sur des processus écosystémiques et non uniquement sur des organismes isolés pour une évaluation des risques plus pertinente.

Dans ce contexte, nous avons développé un réseau trophique microbien modèle composé de rotifères (*Brachionus calyciflorus*) se nourrissant à la fois d'algues (*Chlorella vulgaris*) et de protozoaires (*Tetrahymena pyriformis*). Les protozoaires, associés à un consortium microbien forment une boucle microbienne qui assure le lien trophique entre les bactéries et les métazoaires. Dans cet écosystème, il est admis que les algues assurent la production primaire et l'oxygénation du système. La caractérisation de ce réseau trophique nous a ensuite permis de mettre en évidence le rôle effectif joué par chaque organisme au sein du réseau. Les rotifères sont à la fois des consommateurs primaires et secondaires. En effet, ils filtrent tous les autres organismes du réseau mais seule la consommation des algues et des protozoaires a significativement impacté leur croissance. La boucle microbienne participe au recyclage des nutriments et notamment de l'azote grâce au rôle nitrifiant du consortium bactérien. Les rotifères sont les top prédateurs de ce réseau trophique et représentent une

ressource nutritive essentielle pour les organismes aquatiques supérieurs dans les écosystèmes dulçaquicoles. Ainsi, tous les organismes de ce réseau microbien sont interconnectés par des relations trophiques (proie-prédateur) et de par les fonctions qu'ils assurent au sein de l'écosystème (production d'oxygène, production primaire, nitrification, production et consommation de la matière organique et inorganique).

Le réseau trophique microbien modèle est conditionné en faible volume de 4 ml ce qui autorise un important nombre de répétitions sur une surface limitée. De nombreux paramètres tels que les dynamiques de population et des communautés bactériennes, ainsi que l'évolution physico-chimique du milieu (concentration en phosphates, nitrates, nitrites et ammonium et mesure de pH) peuvent être analysés de manière journalière. Le pourcentage d'oxygène dissout et la diversité bactérienne sont des mesures qui peuvent être envisageables dans le cas d'étude écotoxicologiques plus poussées. La **figure VI.1** reprend le schéma général du réseau trophique et des différents moyens analytiques.

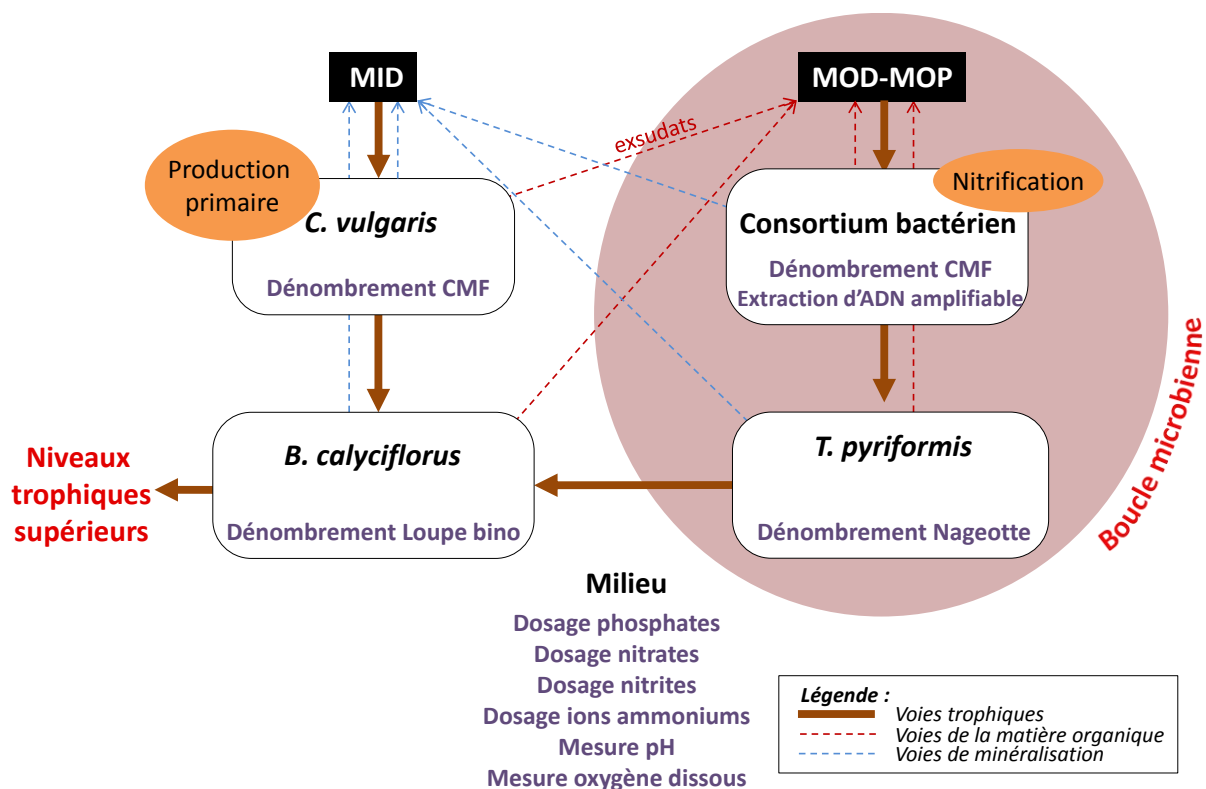


Figure VI.1 : Schéma général du réseau trophique microbien modèle reprenant les différents moyens analytiques testés (en violet) et utilisables dans nos conditions. MID = matière inorganique dissoute ; MOD = matière organique dissoute ; MOP = matière organique particulaire ; Loupe bino = loupe binoculaire ; CMF = cytométrie en flux.

Par ailleurs, un objectif clé a été de tendre vers un réseau modèle, ce qui implique une standardisation du dispositif et la maîtrise des conditions physico-chimiques sur la durée d'utilisation. La production d'un consortium microbien a été déterminante dans la standardisation en permettant un meilleur contrôle des bactéries introduites dans le système. A l'exception de ce consortium microbien produit au laboratoire, les organismes sont disponibles dans les collections et facilement cultivables en laboratoire. L'eau de synthèse est un milieu simple et défini et les paramètres tels que la température, le pH, la luminosité et l'agitation sont contrôlés.

Nous avons démontré que ce réseau trophique modèle pouvait se développer sur une période d'au moins 28 jours sans renouvellement de milieu. Néanmoins une durée d'observation de 7 jours a été définie pour l'utilisation en tant que test d'écotoxicité chronique, bien qu'une utilisation plus courte pourrait également permettre la détermination d'une toxicité aiguë. Durant ces travaux de thèse, nous avons testé ce réseau pour la réalisation de tests d'écotoxicité chronique. Pour se faire, des contaminants métalliques (cadmium, cuivre et zinc) dont les effets sont déjà bien documentés ont été sélectionnés. La dynamique de population des rotifères est un paramètre intégrateur de l'état du réseau trophique, pertinent et facile à suivre pour des décideurs. Nous avons également cherché à comparer la sensibilité du réseau par rapport aux approches normalisées. Les résultats obtenus nous ont permis de constater que la sensibilité du réseau est inférieure à celle du test *Brachionus* normalisé. Cette différence de sensibilité pourrait être attribuée au stade de vie des organismes exposés. Dans le réseau test, ce sont des organismes ayant déjà évolué durant 24h qui sont exposés alors que, dans la procédure des tests normalisés comme le NF ISO 20666 (Janvier 2009), les expositions sont réalisées sur des néonates. En effet, les néonates sont plus sensibles que les rotifères adultes (Park et al. 2017). Par ailleurs, il a été montré que les systèmes multi-espèces ne répondent pas de la même manière que les tests monospécifiques (Fuma et al. 2001). La biodisponibilité et la spéciation du contaminant sont d'autres paramètres pouvant influencer la toxicité (Nedrich et al. 2018). En effet, dans un système plus complexe, il est possible que certains paramètres comme par exemple la concentration en carbone organique dissous (COD) soit supérieure, ce qui diminuerait la biodisponibilité du contaminant et donc sa toxicité (De Schamphelaere and Janssen 2010, Heijerick et al. 2005). Ces hypothèses devraient être testées pour conclure à une sensibilité moindre du réseau par rapport aux tests normalisés.

Nos travaux permettent alors de dégager plusieurs axes d'amélioration du réseau qui sont développés dans la partie perspectives ci-dessous.

VI.2 Perspectives

VI.2.1 A court terme : optimisation du réseau

Tout d'abord, il faudrait très certainement reconsidérer l'espèce protozoaire introduite dans le réseau. En effet, *T. pyriformis* ne se maintient pas de manière satisfaisante sur les 7 jours de test dans nos conditions. La compétition avec les autres organismes, la pression de prédation trop forte sont peut-être des paramètres qui peuvent expliquer le rapide déclin de la population. Il devrait être possible de définir une espèce plus appropriée mais peu de souches pures sont actuellement disponibles dans les collections. Des protozoaires ont été isolés au LIEC par Pascal Poupin sur des échantillons d'eau provenant de cours d'eau vosgiens. Notre eau de synthèse ayant des caractéristiques physicochimiques proches de ces cours d'eau, il est raisonnable de penser que l'on puisse y trouver des espèces mieux adaptées que *T. pyriformis*.

Bien que la question de la pertinence écologique soit le point fort du réseau développé et que la répétabilité des mesures et des répétitions biologiques ait été quantifiée, la reproductibilité doit encore être mieux définie. Dans l'objectif d'une utilisation en routine en complément des tests normalisés, une des limites pourrait être la disponibilité du consortium microbien produit au laboratoire. En effet, les algues, les protozoaires et les rotifères sont disponibles dans les collections et il est possible de se les procurer facilement. Néanmoins concernant le consortium microbien, il faudrait passer à une production à plus grande échelle ou tester la reproductibilité de sa production dans d'autres laboratoires.

Le réseau tel qu'il a été développé dans des microplaques en plastique (polystyrène vierge de qualité cristal, sans traitement) permet d'étudier la toxicité des métaux, toutefois il pourrait s'avérer judicieux d'utiliser des microplaques en verre pour les contaminants organiques et limiter ainsi leur adsorption sur les parois. Dans le cas des pesticides par exemple, le verre adsorberait moins de 1% des principaux herbicides alors que 25 à 90% s'adsorbent sur le PVC (Sharom et Solomon 1981).

VI.2.2 A moyen terme : compléter les méthodes d'analyse

La majorité des tests standardisés évaluent la survie ou la reproduction asexuée des organismes testés (Preston and Snell 2001). Mais bon nombre d'autres paramètres de toxicité peuvent également être appréhendés. Par exemple, pour les rotifères, le comportement natatoire des organismes (Charoy and Janssen 1999, Charoy and al. 1995, Janssen and al. 1994), la production d'œufs de résistance (Preston and Snell 2001) et le taux d'ingestion (Juchelka and Snell 1995) semblent même être des paramètres pertinents et plus sensibles que la reproduction asexuée de ces organismes. Le suivi de ces paramètres chez les rotifères pourrait représenter une piste intéressante d'amélioration. De plus, en fonction de la problématique étudiée, certains paramètres plus spécifiques pourraient être suivis comme la structure et la diversité des communautés bactériennes ou bien encore, sur les différents organismes du réseau, l'expression ciblée ou sans a priori des gènes. A titre d'exemple, certains auteurs se sont intéressés à l'expression de gènes impliqués dans le stress oxydatif chez *Brachionus calyciflorus* (Yang et al. 2013), ce qui dans notre cas pourrait représenter un biomarqueur intéressant d'évaluation de la toxicité.

Enfin les effets relatifs au transfert trophique des contaminants seraient différents de ceux observés après exposition directe avec le milieu (Ates et al. 2015, Buffet et al. 2013, Jackson et al. 2012). Considérer et quantifier cet aspect permettrait d'appréhender le pouvoir de bioaccumulation et de biomagnification des contaminants. Des exemples de biomagnification de certains contaminants non dégradables comme les nanoparticules ont été mis en évidence sur le compartiment microbien (Gupta et al. 2017, Werlin et al. 2011, Holbrook et al. 2008). Le réseau trophique pourrait alors être utilisé pour étudier ces phénomènes de manière plus systématique.

VI.2.3 A long terme : élargir l'utilisation

Nous avons montré que le réseau trophique microbien pouvait se maintenir au minimum 28 jours, il serait alors possible de l'utiliser pour appréhender la toxicité de contaminants sur des temps plus longs en faisant varier les méthodes d'exposition (mixture, ajouts répétés). En effet, pour être plus réalistes, certains scénarios d'exposition devraient se présenter sous la forme d'expositions répétées dans le temps (Reinert et al. 2009, Ashauer et al. 2007). De plus, un contaminant est rarement retrouvé seul dans l'environnement mais le plus souvent associé à d'autres contaminants. Or, il a été montré que les mélanges de

contaminants pouvaient présenter des effets synergiques (Zhang et al 2017) ou antagonistes. Il pourrait alors être intéressant d'appréhender l'effet de contaminations multiples et répétées.

Pour aller plus loin dans la recherche de réalisme environnemental, l'ajout d'un sédiment pourrait être envisagé. En effet, les sédiments d'eau douce supportent des écosystèmes complexes formés par divers composés d'origines géologiques et biologiques où les communautés microbiennes benthiques assurent de nombreux services écosystémiques (décomposition, minéralisation) trop peu considérés dans l'évaluation des risques (Gerbersdorf et al. 2011).

De plus, de par le conditionnement en faibles volumes autorisant la multiplication des réplicats et des variables, le dispositif développé pourrait s'avérer être un outil pertinent à utiliser dans des études de modélisation qui nécessitent souvent des jeux de données importants.

Pour finir, nous sommes conscients que le volume de test actuel, bien que représentant un atout majeur de l'outil, reste limitant. En effet, il est possible que certaines des évolutions présentées ci-dessus nécessitent un dimensionnement supérieur. Il pourrait être intéressant d'évaluer si un changement d'échelle, en gardant les mêmes proportions en organismes ainsi que les mêmes conditions de test, serait envisageable pour répondre à des questions plus spécifiques.

VI.3 Références

A-B

- Ashauer Roman, Alistair B. A. Boxall, et Colin D. Brown. « New Ecotoxicological Model To Simulate Survival of Aquatic Invertebrates after Exposure to Fluctuating and Sequential Pulses of Pesticides ». *Environmental Science & Technology* 41, n° 4 (février 2007): 1480-86. <https://doi.org/10.1021/es061727b>.
- Ates Mehmet, Zikri Arslan, Veysel Demir, James Daniels, et Ibrahim O. Farah. « Accumulation and Toxicity of CuO and ZnO Nanoparticles through Waterborne and Dietary Exposure of Goldfish (*Carassius auratus*): Accumulation and Toxicity of CuO and ZnO NPs ». *Environmental Toxicology* 30, n° 1 (janvier 2015): 119-28. <https://doi.org/10.1002/tox.22002>.
- Buffet Pierre-Emmanuel, Jin-Fen Pan, Laurence Poirier, Claude Amiard-Triquet, Jean-Claude Amiard, Pierre Gaudin, Christine Risso-de Faverney, et al. « Biochemical and Behavioural Responses of the Endobenthic Bivalve *Scrobicularia Plana* to Silver Nanoparticles in Seawater and Microalgal Food ». *Ecotoxicology and Environmental Safety* 89 (mars 2013): 117-24. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2012.11.019>.

C-D

- Charoy Christine, et Colin R. Janssen. « The Swimming Behaviour of *Brachionus Calyciflorus* (rotifer) under Toxic Stress ». *Chemosphere* 38, n° 14 (juin 1999): 3247-60. [https://doi.org/10.1016/S0045-6535\(98\)00557-8](https://doi.org/10.1016/S0045-6535(98)00557-8).
- Charoy C.P., C.R. Janssen, G. Persoone, et P. Clément. « The Swimming Behaviour of *Brachionus Calyciflorus* (rotifer) under Toxic Stress. I. The Use of Automated Trajectorymetry for Determining Sublethal Effects of Chemicals ». *Aquatic Toxicology* 32, n° 4 (juillet 1995): 271-82. [https://doi.org/10.1016/0166-445X\(94\)00098-B](https://doi.org/10.1016/0166-445X(94)00098-B).
- De Schamphelaere Karel A.C., et Colin R. Janssen. « Cross-Phylum Extrapolation of the *Daphnia Magna* Chronic Biotic Ligand Model for Zinc to the Snail *Lymnaea Stagnalis* and the Rotifer *Brachionus Calyciflorus* ». *Science of The Total Environment* 408, n° 22 (octobre 2010): 5414-22. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2010.07.043>.

F-G-H

- Fuma S., H. Takeda, K. Miyamoto, K. Yanagisawa, Y. Inoue, N. Ishii, K. Sugai, C. Ishii, et Z. Kawabata. « Ecological Evaluation of Gadolinium Toxicity Compared with Other Heavy

Metals Using an Aquatic Microcosm ». *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology* 66, n° 2 (1 février 2001): 231-38. <https://doi.org/10.1007/s001280000229>.

Gerbersdorf Sabine Ulrike, Henner Hollert, Markus Brinkmann, Silke Wieprecht, Holger Schüttrumpf, et Werner Manz. « Anthropogenic Pollutants Affect Ecosystem Services of Freshwater Sediments: The Need for a “triad plus X” Approach ». *Journal of Soils and Sediments* 11, n° 6 (septembre 2011): 1099-1114. <https://doi.org/10.1007/s11368-011-0373-0>.

Gupta Govind S., Ashutosh Kumar, Violet A. Senapati, Alok K. Pandey, Rishi Shanker, et Alok Dhawan. « Laboratory Scale Microbial Food Chain To Study Bioaccumulation, Biomagnification, and Ecotoxicity of Cadmium Telluride Quantum Dots ». *Environmental Science & Technology* 51, n° 3 (7 février 2017): 1695-1706. <https://doi.org/10.1021/acs.est.6b03950>.

Heijerick D.G., Bossuyt B.T.A., De Schamphelaere K.A.C., Indeherberg M., Mingazzini M., et Janssen C.R. « Effect of Varying Physicochemistry of European Surface Waters on the Copper Toxicity to the Green Alga *Pseudokirchneriella Subcapitata* ». *Ecotoxicology* 14, n° 6 (août 2005): 661-70. <https://doi.org/10.1007/s10646-005-0014-8>.

Holbrook R. David, Karen E. Murphy, Jayne B. Morrow, et Ken D. Cole. « Trophic Transfer of Nanoparticles in a Simplified Invertebrate Food Web ». *Nature Nanotechnology* 3, n° 6 (juin 2008): 352-55. <https://doi.org/10.1038/nnano.2008.110>.

J-N

Jackson Brian P., Deenie Bugge, James F. Ranville, et Celia Y. Chen. « Bioavailability, Toxicity, and Bioaccumulation of Quantum Dot Nanoparticles to the Amphipod *Leptocheirus Plumulosus* ». *Environmental Science & Technology* 46, n° 10 (15 mai 2012): 5550-56. <https://doi.org/10.1021/es202864r>.

Janssen C.R., M.D. Ferrando, et G. Persoone. « Ecotoxicological Studies with the Freshwater Rotifer *Brachionus Calyciflorus* ». *Ecotoxicology and Environmental Safety* 28, n° 3 (août 1994): 244-55. <https://doi.org/10.1006/eesa.1994.1050>.

Juchelka C.M., et T.W. Snell. « Rapid Toxicity Assessment Using Ingestion Rate of Cladocerans and Ciliates ». *Archives of Environmental Contamination and Toxicology* 28, n° 4 (mai 1995). <https://doi.org/10.1007/BF00211634>.

Nedrich Sara M., Anthony Chappaz, Michelle L. Hudson, Steven S. Brown, et G. Allen Burton. « Biogeochemical Controls on the Speciation and Aquatic Toxicity of Vanadium and Other

Metals in Sediments from a River Reservoir ». *Science of The Total Environment* 612 (janvier 2018): 313-20. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2017.08.141>.

P-R-S

Park Jun Chul, Jeonghoon Han, Min-Chul Lee, Hye-Min Kang, Chang-Bum Jeong, Dae-Sik Hwang, Minghua Wang, et Jae-Seong Lee. « Adverse Effects of BDE-47 on Life Cycle Parameters, Antioxidant System, and Activation of MAPK Signaling Pathway in the Rotifer *Brachionus Koreanus* ». *Aquatic Toxicology* 186 (mai 2017): 105-12. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2017.02.025>.

Preston B. L., et T. W. Snell. « Full Life-Cycle Toxicity Assessment Using Rotifer Resting Egg Production: Implications for Ecological Risk Assessment ». *Environmental Pollution (Barking, Essex: 1987)* 114, n° 3 (2001): 399-406.

Reinert Kevin H., Jeffrey M. Giddings, et Laura Judd. « Effects Analysis of Time-Varying or Repeated Exposures in Aquatic Ecological Risk Assessment of Agrochemicals ». *Environmental Toxicology and Chemistry* 21, n° 9 (septembre 2002): 1977-92. <https://doi.org/10.1002/etc.5620210928>.

Sharom M. S., et K. R. Solomon. « Adsorption and Desorption of Permethrin and Other Pesticides on Glass and Plastic Materials Used in Bioassay Procedures ». *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences* 38, n° 2 (février 1981): 199-204. <https://doi.org/10.1139/f81-026>.

W-Y-Z

Werlin R., J. H. Priester, R. E. Mielke, S. Krämer, S. Jackson, P. K. Stoimenov, G. D. Stucky, G. N. Cherr, E. Orias, et P. A. Holden. « Biomagnification of Cadmium Selenide Quantum Dots in a Simple Experimental Microbial Food Chain ». *Nature Nanotechnology* 6, n° 1 (janvier 2011): 65-71. <https://doi.org/10.1038/nnano.2010.251>.

Yang Jianghua, Siming Dong, Qichen Jiang, Qin Si, Xuezhou Liu, et Jiaxin Yang. « Characterization and Expression of Cytoplasmic Copper/zinc Superoxide Dismutase (CuZn SOD) Gene under Temperature and Hydrogen Peroxide (H₂O₂) in Rotifer *Brachionus Calyciflorus* ». *Gene* 518, n° 2 (avril 2013): 388-96. <https://doi.org/10.1016/j.gene.2012.12.101>.

Zhang Jiayu, Lili Liu, Lei Ren, Weimin Feng, Peng Lv, Wei Wu, et Yanchun Yan. « The Single and Joint Toxicity Effects of Chlorpyrifos and Beta-Cypermethrin in Zebrafish (*Danio*

Rerio) Early Life Stages ». *Journal of Hazardous Materials* 334 (juillet 2017): 121-31.
<https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2017.03.055>.

Résumé thèse : Dans le cadre de l'évaluation du risque, des tests d'écotoxicité plus représentatifs de la réalité environnementale tenant compte de la complexité des écosystèmes doivent être développés. Malgré l'importance des microorganismes dans les écosystèmes et les processus fonctionnels associés, ceux-ci restent trop peu considérés dans les tests d'écotoxicité. Le principal objectif de cette thèse a donc été le développement d'un réseau trophique microbien modèle pour évaluer l'impact des contaminants sur les écosystèmes dulçaquicoles. Ce réseau est composé de rotifères (*Brachionus calyciflorus*, consommateurs primaires et secondaires) se nourrissant à la fois d'algues (*Chlorella vulgaris*, producteur primaire) et de protozoaires (*Tetrahymena pyriformis*, cilié bactérivore). Les protozoaires, associés à un consortium microbien nitrifiant produit au laboratoire, forment une boucle microbienne qui assure le lien trophique entre les bactéries et les métazoaires. Tous les organismes de ce réseau microbien sont en interaction les uns avec les autres de par des relations trophiques (proie-prédateur) et/ou de par les fonctions qu'ils assurent au sein de l'écosystème (production d'oxygène, production primaire, recyclage des nutriments). Le système est conditionné en volume de 4 ml et peut être suivi sur une durée d'au moins 28 jours sans renouvellement de milieu, permettant par exemple l'analyse de la résilience du système sur des temps longs. Afin d'évaluer au mieux les différents effets des polluants sur le réseau trophique, diverses méthodes analytiques ont été adaptées et testées sur ce système. Parmi elles, le suivi de la dynamique de population des rotifères s'est avéré être un paramètre probant pour évaluer de manière simple et rapide la réponse du réseau à des contaminants.

Mots-clés : *réseau trophique, transfert trophique, compartiment microbien, écotoxicologie microbienne, évaluation des risques*

Abstract : In the framework of risk assessment, more environmentally realistic ecotoxicity tests taking complexity of ecosystems into account must be developed. Despite the importance of microorganisms in ecosystems and in their associated functional processes, this compartment is not enough taken into account in ecotoxicity assessment. The main objective of this thesis was the development of a model microbial food web to evaluate impact of contaminants on freshwater ecosystems. This network is composed of rotifers (*Brachionus calyciflorus*, primary and secondary consumers) that feed on both algae (*Chlorella vulgaris*, primary producer) and protozoa (*Tetrahymena pyriformis*, bacterivorous ciliate). A nitrifying microbial consortium produced in the laboratory associated with protozoa constitute a microbial loop that ensure trophic links between bacteria and metazoans. Organisms of the microbial network are in interaction by trophic relationships (prey-predator) and/or by functions they ensure within the ecosystem (oxygen production, primary production, nutrient recycling). The system can evolve into 4 ml over at least 28 days without medium renewing and, for example can allow to analyze the resilience of the system over a long period of time. In order to better evaluate different effects of pollutants on the food web, various analytical methods have been adapted and tested on this system. Among them, monitoring rotifer population dynamics was found to be a suitable parameter to evaluate the response of the miniaturized ecosystem to contaminants in a simple and fast way.

Keywords : *trophic web, trophic transfer, microbial compartment, microbial ecotoxicology, ecological risk assessment*