



HAL
open science

Effet des facteurs environnementaux sur la nature des EPS, la capacité de sorption du cuivre et le potentiel de résilience de biofilms phototrophes simplifiés

Emilie Loustau

► **To cite this version:**

Emilie Loustau. Effet des facteurs environnementaux sur la nature des EPS, la capacité de sorption du cuivre et le potentiel de résilience de biofilms phototrophes simplifiés. Ingénierie de l'environnement. Université Paul Sabatier - Toulouse III, 2019. Français. NNT : 2019TOU30148 . tel-02879327

HAL Id: tel-02879327

<https://theses.hal.science/tel-02879327>

Submitted on 23 Jun 2020

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.



THÈSE

En vue de l'obtention du

DOCTORAT DE L'UNIVERSITÉ DE TOULOUSE

Délivré par :

Université Toulouse 3 - Paul Sabatier

Présentée et soutenue par :

EMILIE LOUSTAU

le lundi 8 avril 2019

Titre :

Effet des facteurs environnementaux sur la nature des EPS, la capacité de sorption du cuivre et le potentiel de résilience de biofilms phototrophes simplifiés

École doctorale et discipline ou spécialité :

SDU2E (Sciences de l'Univers, de l'Environnement et de l'Espace) - Écologie fonctionnelle

Unité de recherche :

ECOLAB – Laboratoire d'Écologie Fonctionnelle et Environnement

Directeur/trice(s) de Thèse :

Elisabeth GIRBAL-NEUHAUSER, Professeur, Université Toulouse III – Paul Sabatier

Jean-Luc ROLS, Professeur, Université Toulouse III – Paul Sabatier

Jury :

Christine DUPUY, Professeur, Université de la Rochelle (Rapporteur)

Robert DURAN, Professeur, Université de Pau et des Pays de l'Adour (Rapporteur)

Joséphine LEFLAIVE, Maître de conférences HDR, Université Toulouse III – Paul Sabatier (Examinatrice)

Annick ORTALO-MAGNE, Maître de conférences, Université de Toulon (Examinatrice)

JE NE PERDS JAMAIS.

SOIT JE GAGNE,

SOIT J'APPRENDS.

NELSON MANDELA

**JE DEDIE CE MANUSCRIT A MON PAPA,
QUI A TOUJOURS CRU EN MOI,
ET ENVERS QUI,
JE N'AVAIS PAS LE DROIT DE BAISSER LES BRAS**

REMERCIEMENTS

Je tiens à remercier les nombreuses personnes qui se sont impliquées de près ou de loin dans cette aventure. Je souhaiterais tout d'abord exprimer toute ma gratitude à Franck Gilbert, directeur du Laboratoire EcoLab, pour m'avoir accueillie dans la bonne humeur. Merci également à Eric Tabacchi, responsable de l'équipe CIRCE, pour son soutien et sa bonne volonté à vouloir dynamiser l'équipe.

Un grand merci à mes directeurs de thèse, Jean-Luc Rols et Elisabeth Girbal-Neuhauser, de m'avoir fait confiance sur ce projet de recherche. Cette co-direction scientifiquement complémentaire m'a été d'une grande richesse dans l'évolution de mon travail. Je vous souhaite une longue et bénéfique collaboration pour la suite et je vous remercie une dernière fois pour vos accompagnements à la fois scientifique et humain, votre soutien, votre compréhension, vos encouragements et votre sincérité. Merci à toi Elisabeth de m'avoir aidée dans un domaine que je ne maîtrisais pas : tu m'as aidé à apprivoiser les terrains tortueux de la chromatographie. Jean-Luc, merci pour ta réactivité quelles que soient les périodes de l'année, ton soutien et ton écoute dans les moments difficiles.

Je souhaite également remercier les membres du jury : Christine Dupuy et Robert Duran pour avoir accepté d'être rapporteurs de mes travaux de thèse ; Annick Ortalo-Magné et Joséphine Leflaive pour avoir évalué mes travaux et avoir apporté des remarques constructives dans vos domaines de compétence respectifs.

Je tiens également à remercier les membres de l'équipe du LBAE d'Auch et tout particulièrement Claire-Emmanuel Marcato-Romain. Ta bonne humeur, ton énergie et ton investissement personnel dans mon travail m'ont permis de rapidement trouver mes marques dans votre laboratoire.

J'aimerais remercier Joséphine Leflaive pour ces nombreux conseils, que ce soit dans la mise en place des expérimentations ou l'analyse des résultats, mais également pour m'avoir fait confiance dans la réalisation des TDs. Je pense aussi à Jessica Ferriol pour ta bonne volonté, ton aide concernant les cultures d'algues, le matériel du laboratoire ou l'extraction de l'ADN. Tu as toujours été disponible quand j'avais besoin d'un coup de main. Bonne continuation !

De plus, j'ai eu la chance de participer à l'encadrement de stagiaires qui m'ont permis d'avancer dans mes travaux, merci beaucoup à eux. Léo, élève à l'INSA Toulouse à l'époque et conseiller par Frédéric Moulin de l'IMFT, merci pour tout ce que tu as pu me faire découvrir dans ce monde abstrait qu'est l'hydrodynamique. Claire, étudiante en Master 2 à l'UPS, et Quentin, élève à l'ENSAT, qui ont montré une curiosité et une volonté : merci à vous deux et bon courage pour la suite ! Sans oublier Shams, étudiante en Master 2 à l'UPS, qui a pu découvrir avec joie les cultures de biofilms monospécifiques et Vanina, étudiante en BTS, qui m'a bien aidée dans les extractions d'ADN, merci à vous tous et bon vent dans vos vies professionnelles !

Merci à Frédéric Julien, Didier Lambrigot, Sylvain Lamothe, Cyril Pouzac et Catherine Donati qui ont rendu ma vie quotidienne au laboratoire très sympathique. Merci pour vos rires, votre dynamisme et votre disponibilité ; je vous souhaite à tous de belles choses et une bonne continuation.

Je tiens à remercier Cécile, Marjorie, Doriane, Nicolas, Alice et Manon pour leur soutien, les longues discussions qu'on a pu avoir ! Cécile, je n'oublierai jamais nos pauses goûter quotidiennes **plus** ou moins longues et nos discussions ... scientifiques bien sûr ! J'espère te revoir bientôt dans notre sud-ouest. Merci à Régine pour m'avoir soutenue : tu as su me donner toute la force et le courage dont j'ai eu besoin pour continuer et surmonter les moments difficiles et pour m'avoir boostée quand il le fallait. Maintenant c'est fini, je ne viendrais plus me plaindre et discuter dans ton bureau, mais je trouverai bien d'autres moyens ne t'inquiètes pas ...

J'aimerais remercier et exprimer tout mon amour à mes parents et à mon frère qui m'ont toujours encouragée et soutenue. Une grosse pensée pour mon papa qui n'a malheureusement pas eu la chance de m'accompagner jusqu'à la fin, tu étais pourtant si fier de savoir ta fille en thèse ... Merci à ma maman pour tes bons petits plats et tes multiples attentions pendant la période de rédaction. Florian, je suis maintenant de retour dans notre région plus besoin de prévoir un déplacement toulousain pour partager un moment : on habite à coté !

Je garde le meilleur pour la fin, Ludovic qui partage ma vie depuis quelques années : tu es là depuis le début plus qu'un soutien, tu as su trouver les mots pour que je garde

confiance. J'espère que nos prochains projets auront autant de succès que celui de réaliser une thèse.

Enfin je finirai par un petit mot pour mon fidèle compagnon à quatre pattes qui a été présent à chaque minute de ma rédaction et les nombreuses fois où tu as posé tes pattes sur le clavier de mon ordinateur !

RESUME

Les biofilms phototrophes, principale signature trophique benthique des rivières à écoulement rapide, offrent un panel de services écologiques en lien avec les processus d'autoépuration (nitrates, pesticides, pollutions métalliques, etc.). Cependant, leur fonctionnement est fortement perturbé par les pressions anthropiques croissantes qu'ils subissent, notamment celles associées à la présence d'éléments traces métalliques (ETM) ou encore l'interruption séquentielle de l'écoulement de surface. Dans un contexte de changement global avéré, la réponse des communautés phototrophes est au centre des préoccupations pour la gestion de ces milieux, tant pour leur qualité chimique qu'écologique. L'objectif de ce travail de thèse est de comprendre les réponses physiologiques des microorganismes phototrophes benthiques à des facteurs d'environnement révélateurs de changements globaux (lumière, température, phosphore) ainsi qu'à l'application d'un multi-stress combinant l'exposition à des ETM (Cu et Zn, appliqués seuls ou en cocktail) suivie d'un assèchement prolongé du biofilm. Les réponses physiologiques sont centrées sur la biomasse, l'activité photosynthétique et la production d'EPS (substances polymériques extracellulaires), en abordant ces processus par l'aptitude de tolérance et de résilience des communautés. Le choix s'est porté sur trois espèces phototrophes benthiques, une cyanobactérie (*Phormidium autumnale*), une diatomée (*Nitzschia palea*) et une algue verte (*Uronema confervicolum*). Un système expérimental adapté à la culture en biofilm au sein de microcosmes à écoulement de surface libre (mini-canaux hydrauliques) a permis de contrôler l'ensemble des paramètres des expérimentations. La première étape a consisté à mettre au point une méthode d'extraction des EPS de la matrice de biofilm tout en préservant l'intégrité cellulaire des microorganismes phototrophes. L'analyse de la réponse physiologique de biofilms phototrophes mono-espèce face à une exposition au Cu et/ou au Zn a permis de montrer les différences de sensibilité des espèces phototrophes testées. Puis, la capacité de sorption du Cu par ces mêmes biofilms phototrophes s'est révélée être dépendante des facteurs environnementaux, via la modulation des EPS produites et de leur nature. Enfin, l'application d'un double-stress, conjuguant l'exposition au Cu suivie d'un assèchement du biofilm, permet également de mesurer des réponses de résilience lors de la remise en eau, elles-mêmes modulées par les facteurs environnementaux testés. Globalement, les biofilms phototrophes mono-espèce testés présentent des capacités de tolérance et de résilience différentes avec des réponses de modulation de la quantité et de la nature des EPS produites.

MOTS-CLES

Biofilm phototrophe, EPS, extraction, ETM, facteurs environnementaux, cours d'eau intermittent, tolérance, résilience.

ABSTRACT

Phototrophic biofilm, the main benthic signature of fast-flowing rivers, provide an important number of ecosystem services related to self-purification mechanisms (nitrates, pesticides, metal contaminations, etc.). However, their functioning is strongly disturbed by the increasing anthropogenic pressures, particularly by the presence of traces metals (TM) or the sequential interruption of surface flow. In the context of global change, the response of phototrophic communities should be considered for river management, in term of chemical and ecological properties. The aim of this thesis was to understand the physiological responses of benthic phototrophic microorganisms to environmental parameters involved in global change (light, temperature, phosphorus) as well as their response to a multi-stress combining the exposure of biofilms to TM (Cu and Zn, alone or in cocktail) by the prolonged drying of biofilm. Physiological responses of biofilm (biomass, photosynthetic activity and EPS production (extracellular polymeric substances)) were studied to analyze the tolerance and resilience capacities of communities. Three benthic phototrophic species were chosen: the cyanobacteria *Phormidium autumnale*, the diatom *Nitzschia palea* and the green algae *Uronema confervicolum*. Cultures of biofilm in free surface flow microcosms (hydraulic mini-channels) allowed to control all the experimental parameters. The first step was to develop a method for EPS extraction from the biofilm matrix while preserving the cell integrity of phototrophic microorganisms. Subsequently, the study of physiological responses of monospecific phototrophic biofilm exposed to Cu or/and Zn showed different sensitivities of phototrophic species. Then the sorption capacity of Cu by these species depended on environmental parameters, via the modulation of EPS production and composition. Finally, the double-stress characterised by Cu exposition followed by drying biofilm induced also resilience responses when rewetting, modulated by the environmental parameters. Overall, the monospecific phototrophic biofilms studied present different tolerance and resilience capacities by modifying the abundance and composition of EPS produced.

KEYWORDS:

Phototrophic biofilm, EPS, extraction, TM, environmental factors, non-permanent streams, tolerance, resilience

SOMMAIRE

RESUME / ABSTRACT

LISTES DES FIGURES / LISTE DES TABLEAUX

LISTE DES ABREVIATIONS

INTRODUCTION **1**

CHAPITRE I : ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE

1 BIOFILM PHOTOTROPHE D'EAU DOUCE, UN MODELE BIOLOGIQUE DYNAMIQUE ET DIVERSIFIE **7**

DEFINITION ET COMPOSITION 7

DYNAMIQUE DE COLONISATION DU BIOFILM 9

IMPORTANCE ECOLOGIQUE DES BIOFILMS DANS LES COURS D'EAU 11

2 LES SUBSTANCES POLYMERIQUES EXTRACELLULAIRE (EPS), UNE ARCHITECTURE COMPLEXE **12**

DEFINITION ET GENERALITES 12

PROTEINES ET POLYSACCHARIDES : COMPOSANTS MAJEURS DE LA MATRICE 15

1. *Les polysaccharides* 17

2. *Les protéines* 18

ROLE DES EPS 19

1. *Adhésion et colonisation du support* 19

2. *Cohésion et structure du biofilm* 21

3. *Barrière de protection et sorption de composés organiques et inorganiques* 23

4. *Photo-acclimatation et lutte contre la dessiccation* 24

5. *Source de nutriments* 25

6. *Echange d'informations génétiques* 26

CARACTERISATION DES EPS 26

1. *Méthodes d'extraction des EPS* 27

1.1 Extraction physique 28

1.2 Extraction chimique 29

1.3 Méthodes d'extraction combinées en séquentiel 32

2. *Contrôle de la lyse cellulaire* 32

3. *Méthodes de quantification des EPS* 33

3.1 Quantification des protéines par dosages colorimétriques 34

3.2 Quantification des polysaccharides par dosages colorimétriques 35

3 COMMUNAUTE MICROBIENNE ET COMPOSITION DES EPS AU SEIN D'UN BIOFILM : PHENOMENE DYNAMIQUE FONCTION DES PARAMETRES EXTERNES **36**

TEMPERATURE ET LUMIERE 37

CONDITIONS HYDRODYNAMIQUES	40
DISPONIBILITE EN NUTRIMENTS	42
ASSECHEMENT DES COURS D'EAU	43
PRESENCE DE POLLUANTS : L'EXEMPLE D'ELEMENTS TRACES METALLIQUES	48
1. <i>Le cuivre et le Zinc : deux oligoéléments présents dans l'environnement</i>	48
2. <i>Impact sur la communauté microbienne présente dans les milieux aquatiques</i>	49
2.1 A l'échelle de la communauté	50
2.2 A l'échelle de la cellule	53
2.3 A l'échelle moléculaire	56

CHAPITRE II : MATERIEL ET METHODES

1 MODELES BIOLOGIQUES	61
1.1 PRESENTATION DES SOUCHES PHOTOTROPHES UTILISEES	61
1.2 ENTRETIEN DES CULTURES ET MILIEUX DE CULTURE UTILISES	63
2 LES REACTEURS EXPERIMENTAUX	65
2.1 PRESENTATION ET DESCRIPTION GENERALE	65
2.2 CHOIX DES CONDITIONS ENVIRONNEMENTALES	67
2.2.1 <i>Source lumineuse</i>	67
2.2.2 <i>Conditions hydrodynamiques</i>	68
2.2.3 <i>Temps de mélange</i>	69
2.2.4 <i>Eau alimentant le dispositif</i>	70
2.2.5 <i>Nettoyage et entretien du dispositif</i>	70
3 STRATEGIES EXPERIMENTALES EN MICROCOSME	71
3.1 BIOFILMS PHOTOTROPHES EXPOSES AU CU ET AU ZN	71
3.1.1 <i>Objectif de l'expérience</i>	71
3.1.2 <i>Déroulement de l'expérimentation</i>	71
3.2 BIOFILMS PHOTOTROPHES EXPOSES A DIFFERENTS FACTEURS ENVIRONNEMENTAUX	74
3.2.1 <i>Objectifs de l'expérience</i>	74
3.2.2 <i>Déroulement de l'expérimentation</i>	74
4 ANALYSE DE LA REPONSE MICROBIENNE ET DE LA PRODUCTION D'EPS	76
4.1 OBSERVATION MICROSCOPIQUE DES BIOFILMS : CRYOMICROSCOPIE ELECTRONIQUE A BALAYAGE (CRYO-MEB)	76
4.2 MESURE DE LA BIOMASSE	78
4.3 MESURE DE L'ACTIVITE PHOTOSYNTHETIQUE	78
4.4 IDENTIFICATION ET CARACTERISATION DES EPS	79
4.4.1 <i>Extraction des EPS</i>	80
4.4.1.1 Protocoles d'extraction physique	81
4.4.1.2 Protocoles d'extraction chimique	81
4.4.2 <i>Méthodes de caractérisation des EPS</i>	83
4.4.2.1 Dosages colorimétriques	83

4.4.2.2	Chromatographie à exclusion stérique	84
4.4.2.3	Contrôle de la lyse cellulaire : quantification de la chlorophylle a	87
4.5	ANALYSE DE LA DIVERSITE BACTERIENNE	88
4.5.1	<i>Préparation des échantillons</i>	88
4.5.2	<i>Extraction de l'ADN génomique total</i>	88
4.5.3	<i>Amplification par PCR</i>	88
4.5.4	<i>ARISA</i>	89
4.6	DETERMINATION DE LA TENEUR EN CUIVRE ET EN ZINC DANS LA BIOMASSE PAR SPECTROMETRIE A EMISSION OPTIQUE COUPLEE A L'ICP (ICP-OES)	90
5	ANALYSES STATISTIQUES DES DONNEES	90
5.1	LES ANALYSES UNIVARIEES	90
5.2	LES INCERTITUDES	90

CHAPITRE III : OPTIMISATION D'UNE METHODE D'EXTRACTION DES EPS DE BIOFILMS PHOTOTROPHES

ABSTRACT	99
INTRODUCTION	101
EXPERIMENTAL PROCEDURES	104
RESULTS AND DISCUSSION	109
REFERENCES	120
SUPPLEMENTARY DATA	126

CHAPITRE IV : EFFETS D'UNE EXPOSITION METALLIQUE (CU ET ZN) SUR LA PHYSIOLOGIE DE BIOFILMS PHOTOTROPHES MONO-ESPECE

ABSTRACT	137
INTRODUCTION	139
MATERIAL AND METHODS	142
RESULTS	147
DISCUSSION	155
REFERENCES	120

**CHAPITRE V : EFFETS DE FACTEURS ENVIRONNEMENTAUX SUR LA REPONSE
PHYSIOLOGIQUE DE BIOFILMS PHOTOTROPHES MONO-ESPECE -
CONSEQUENCES SUR LEUR CAPACITE DE SORPTION DU CU**

INTRODUCTION	187
MATERIAL AND METHODS	189
RESULTS	193
DISCUSSION	204
REFERENCES	209

**CHAPITRE VI : IMPACTS DES FACTEURS ENVIRONNEMENTAUX SUR LA
RESILIENCE DE BIOFILMS PHOTOTROPHES MONO-ESPECE SOUMIS A UNE
DOUBLE PERTURBATION (EXPOSITION AU CU ET ASSECHEMENT)**

INTRODUCTION	227
MATERIAL AND METHODS	230
RESULTS	233
DISCUSSION	242
REFERENCES	246

CHAPITRE VII : CONCLUSIONS GENERALES ET PERSPECTIVES **251**

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES	273
------------------------------------	------------

LISTE DES FIGURES

Figure 1 Schéma général présentant les différentes contributions de cette thèse.	3
Figure 2 Représentation de la biodiversité au sein d'un biofilm benthique d'eau douce. D'après Battin <i>et al.</i> (2016)	8
Figure 3 Schéma illustrant les différentes étapes de la formation et du développement d'un biofilm phototrophe. D'après Bharti <i>et al.</i> (2017)	10
Figure 4 Observation sur une section transversale de la stratification des communautés microbiennes au sein d'un biofilm phototrophe. D'après Roeselers <i>et al.</i> (2008).....	11
Figure 5 Images obtenues en microscopie à force atomique du réseau fibrillaire formé par les EPS au sein d'un biofilm composé de la diatomée <i>Cylindrotheca closterium</i> (A) et des EPS liées à ces cellules (B). D'après Xiao and Zheng (2016).....	14
Figure 6 Représentation d'un biofilm phototrophe ayant colonisé un support. Trois catégories d'EPS sont représentées, les EPS solubles, les EPS faiblement liées (en jaune) et fortement liées (en orange) aux cellules algales. D'après Nielsen and Jahn (1999)	14
Figure 7 Photographie d'un biofilm benthique de rivière obtenue par microscopie confocale à balayage laser. Les algues sont colorées en bleu, les cyanobactéries en violet-blanc, les EPS en rouge et les acides nucléiques en vert (Kamjunke <i>et al.</i> (2015)).	16
Figure 8 Représentation de la matrice d'EPS à différentes échelles : vue d'ensemble d'un biofilm benthique (a.), principaux composants de la matrice répartis de façon non homogène (b.) et liaisons chimiques présentes au sein de la matrice et permettant la liaison des polymères entre eux (c.). D'après Flemming and Wingender (2010).....	22
Figure 9 Effet de la quantité des EPS sur la capacité de sorption du Cu et du Cd lors d'une exposition d'un biofilm composé d' <i>Aspergillus fumigatus</i> pendant 3 h à des concentrations respectivement égales à 5 et 7 mg L ⁻¹ (Yin <i>et al.</i> , 2011).	24
Figure 10 Photographie de la cyanobactérie <i>Nostoc commune</i> non exposée aux UV-B (A) et après 72 h d'exposition (B). D'après Ehling-Schulz <i>et al.</i> (1997)	25
Figure 11 Rapport Polysaccharides / Protéines des EPS extraites d'un biofilm composé d'algues vertes (<i>Platymonas subcordiformis</i>) par différentes méthodes d'extraction chimiques et physiques. D'après Ge <i>et al.</i> (2013)	31
Figure 12 Effet de l'intensité lumineuse sur la production primaire et la biomasse d'un biofilm complexe. Adaptée d'après Bengtsson <i>et al.</i> (2018).....	38

Figure 13 Différentes stratégies utilisées par les microorganismes benthiques pour faire face à la dessiccation. D’après Roux-Barthès (2014).....	44
Figure 14 Observation en microscopie confocale (A à D) ou en microscopie électronique à balayage (E, F) de cellules d’algues vertes (<i>K. crenulatum</i>) présentes au sein d’un biofilm immergé (A, E) et après 1 jour (B) ou 7 jours (F) d’assèchement. Coloration, en rouge, des mitochondries présentes dans les cellules algales d’un biofilm immergé (C) ou après 1 jour d’assèchement (D). D’après Holzinger <i>et al.</i> (2011) et Karsten and Holzinger (2012) ...	47
Figure 15 Réponse des microorganismes phototrophes à une augmentation de la concentration d’élément trace métallique dans le milieu aquatique. D’après Simkiss and Taylor (1989)	51
Figure 16 Représentation schématique de l’architecture des communautés de diatomées développées sur un substrat vierge après 4 semaines de colonisation en présence ou en absence de pollution métallique (Zn et Cd). D’après Gold (2002).....	52
Figure 17 Frustules de diatomées déformées par la présence de Cd et Zn dans le milieu. D’après Morin and Coste (2006b)	53
Figure 18 Images obtenues en microscopie confocale à balayage laser de biofilms phototrophes non exposés (a) et exposés pendant 5 jours à 100 µM de Cu (b) ou 1 mM de Zn (c). Les EPS sont colorées en rouge avec la <i>Canavalia ensiformis</i> , les bactéries en vert et les microalgues en bleu. D’après García-Meza <i>et al.</i> (2005).....	55
Figure 19 Image en microscopie optique (a à c) et en cryo-microscopie à balayage (d à i) des trois espèces de microorganismes phototrophes utilisées : la diatomée <i>N. palea</i> (a, d et e), la cyanobactérie <i>P. autumnale</i> (b, f et g) et l’algue verte filamenteuse <i>U. confervicolum</i> (c, h et i).	62
Figure 20 Représentation en 3D des différentes parties qui composent le dispositif expérimental : réservoirs de mise en charge (A), dispositif d’éclairage (B), trois groupes de 4 mini-canaux (C), réservoirs inférieurs (D), pompe de recircularisation (E), vanne manuelle d’alimentation (F), boîtier d’alimentation électrique (G).....	66
Figure 21 Photographie en vue de dessus des canaux : les rangées de 80 coupons sont séparées par des parois transparentes.	67
Figure 22 Variation du temps de mélange nécessaire pour obtenir 90 % de la valeur maximale en fonction du débit.	69
Figure 23 Concept expérimental dans les trois modules. Chaque module est composé de trois lots de quatre canaux.....	72

Figure 24 Plan de chaque expérimentation réalisée en microcosmes contenant 7 conditions expérimentales différentes : microcosmes contrôle (coupons colonisés en absence de métaux), Cu20 (exposés à 20 $\mu\text{g L}^{-1}$ de Cu), Cu200 (exposés à 200 $\mu\text{g L}^{-1}$ de Cu), Zn60 (exposés à 60 $\mu\text{g L}^{-1}$ de Zn), Zn600 (exposés à 600 $\mu\text{g L}^{-1}$ de Zn), Cu20Zn60 (exposés à 20 $\mu\text{g L}^{-1}$ de Cu et 60 $\mu\text{g L}^{-1}$ de Zn) et microcosme Cu200Zn600 (exposés à 200 $\mu\text{g L}^{-1}$ de Cu et 600 $\mu\text{g L}^{-1}$ de Zn).....	73
Figure 25 Plan de chaque expérimentation réalisée en microcosme contenant 7 conditions expérimentales différentes : les mentions « L » et « l » indiquent un biofilm qui s'est développé avec une intensité lumineuse respective de 70 et 30 $\mu\text{mol s}^{-1} \text{m}^{-2}$. Les mentions « T » et « t » indiquent les températures auxquelles le biofilm s'est développé, soit 22°C et 19°C. Les mentions P165, P100 et P50 indiquent un biofilm qui s'est développé avec une concentration en P égale à 8,71, 5,23 et 2,61 mg L^{-1}	75
Figure 26 Photographie du Microscope Electronique à Balayage à effet de champ (a) (Quanta 250 FEG FEI) équipé d'un module de cryopréparation (b) (Quorum PP3000T).....	77
Figure 27 Emission de fluorescence mesurée par le PhytoPAM (a) en fonction des conditions de lumière émise au travers de la fibre optique et reçue par le photosystème II des cellules phototrophes (b). Modifiée d'après Roux-Barthès (2014).....	79
Figure 28 Méthodes d'extraction des EPS produites par les trois espèces de microorganismes phototrophes utilisées au cours des différentes expérimentations. S-X représente le surnageant post-centrifugation correspondant à la technique X appliquée. S-CER = S-CER1 + S-CER2.	82
Figure 29 Système de chromatographie liquide Akta Purifier 10 couplé à un spectrophotomètre UV (a) et relié à un collecteur de fractions ainsi qu'à un fluorimètre (b).....	86
Figure 30 Relation entre la taille des protéines et le volume d'élution après le passage dans les colonnes Superdex peptide 10/300 GL et Superdex 200 10/300 GL permettant l'obtention de la droite de calibration.....	87
Figure 31 Schéma récapitulatif de l'expérience réalisée en microcosme pendant 46 jours. Avant le Temps0, les biofilms mono-espèce en suspension ont été inoculés dans les modules pour leur permettre de coloniser les coupons en place.....	218
Figure 32 Représentation schématique des effets d'une contamination par les ETM (600 $\mu\text{g L}^{-1}$ de Zn ou 200 $\mu\text{g L}^{-1}$ de Cu) sur la physiologie des populations d'organismes phototrophes après deux semaines d'exposition.....	259
Figure 33 Proposition de deux mécanismes de réponse des biofilms phototrophes à une variation des facteurs environnements en lien avec la quantité d'EPS produites (matrice	

composée de TB-EPS ① ou de LB-EPS ②) et ses conséquences sur la capacité de sorption du Cu (après 18 jours de croissance du biofilm).	265
Figure 34 Représentation schématique des conséquences des changements globaux et des contaminations métalliques sur la physiologie des biofilms phototrophes et leurs impacts sur la qualité des cours d'eau.	267

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1 Fonctions contrôlées par les différents composants des EPS. D'après Flemming and Wingender (2010).	20
Tableau 2 Modes d'action des différentes méthodes permettant l'extraction des EPS qui composent la matrice d'un biofilm phototrophe.	30
Tableau 3 Méthodes de dosage colorimétrique employées dans la littérature pour quantifier les protéines présentes dans les extraits d'EPS.	34
Tableau 4 Composition chimique des milieux de culture Combo et BG11.....	64

LISTE DES ABREVIATIONS

ADN	Acide DésoxyriboNucléique
ARN	Acide RiboNucléique
ARISA	<i>Automated ribosomal intergenic spacer analysis</i>
ATP	Adénosine-TriPhosphate
BCA	Acide bicinchonique
BSA	<i>Bovine Serum Albumin</i>
CER	Résine échangeuse de cation ou <i>Cation Exchange Resin</i>
Chl a	Chlorophylle a
CI50	Concentration inhibitrice médiane ou <i>Half maximum inhibitory concentration</i>
CLSM	Microscopie confocale à balayage laser ou <i>Confocal laser scanning microscopy</i>
COT ou TOC	Carbone Organique Total ou <i>Total Organic Carbon</i>
Cryo-MEB	Cryo-microscopie électronique à balayage
DCE	Directive Cadre sur l'Eau
DO ou OD	Densité Optique ou <i>Optical Density</i>
EDTA	ÉthylèneDiamineTétraAcétique
EPS	Substances polymériques extracellulaires ou <i>Extracellular Polymeric Substances</i>
ETM	Elément Trace Métallique
Fm	Fluorescence Maximale
Glc	Glucose
ICP	Plasma à Couplage Inductif ou <i>Inductive Coupling Plasma</i>
LB-EPS	EPS faiblement liées ou <i>Loosely Bound EPS</i>
MS	Matière Sèche (mg)

NGS	Séquençage de nouvelle génération ou <i>Next Generation Sequencing</i>
NQE	Norme de Qualité Environnementale
OES	Spectrométrie à Emission optique ou <i>Optical Emission Spectroscopy</i>
OTU	Unité taxonomique opérationnelle ou <i>Operational Taxonomic Unity</i>
PBS	Tampon Phosphate Salin ou <i>Phosphate Buffer Salin</i>
PCR	Réaction en Chaîne par Polymérase ou <i>Polymerase Chain Reaction</i>
PMMA	Poly(Methyl-MethAcrylate)
POM-C	PolyOxyMethylene
PSII	Photosystème II
PICT	<i>Pollution-Induced Community Tolerance</i>
PN	Protéine
PS	Polysaccharide
ReD	Nombre de Reynolds
R_h⁺	Rayon hydraulique
ROS	Espèce Réactive à l'Oxygène ou <i>Reactive Oxygen Species</i>
RSDE	Rédaction des substances dangereuses dans l'eau
SEC	Chromatographie d'exclusion stérique ou <i>Size Exclusion Chromatography</i>
TAE	Tris-Acétate-EDTA
TB-EPS	EPS fortement liées ou <i>Tightly Bound EPS</i>
TPM	Tour Par Minute
UV	Ultra-violet

INTRODUCTION





La directive-cadre sur l'eau (DCE), adoptée le 23 octobre 2000 par le Parlement européen, impose aux Etats membres la reconquête ou la préservation du bon état chimique et écologique des masses d'eau. Ce programme ambitieux a montré ses limites, notamment celle de satisfaire ces obligations à un horizon de 15 ans, repoussant à 2027 la plupart des objectifs. Les actions de surveillance des écosystèmes aquatiques qui en découlent ne prennent que trop peu en compte la production primaire benthique. Cette production primaire résulte de la croissance de microorganismes phototrophes benthiques fixés sur les surfaces immergées dès lors que les vitesses de courant sont suffisantes pour lessiver continuellement la fraction planctonique vers l'aval. Ces microorganismes sont organisés au sein d'un biofilm dont la principale composante organique est un ensemble de substances polymériques extracellulaires (EPS) qu'ils sécrètent et qui constituent la matrice du biofilm. Ces EPS, essentiellement des protéines et des polysaccharides, jouent plusieurs rôles : celui d'éléments de structure participant à l'architecture du biofilm et à l'isolement des microorganismes par rapport à la colonne d'eau, celui de réserve en substrats organiques et activités enzymatiques pour le recyclage des éléments nutritifs ou encore un rôle de sorption de polluants organiques (pesticides) ou inorganiques (éléments traces métalliques - ETM). La capacité d'autoépuration d'un cours d'eau est donc largement dépendante de la nature des EPS et des interactions qu'elles peuvent développer avec les polluants venant de la colonne d'eau.

Les services écologiques rendus par les biofilms phototrophes sont menacés par des pressions anthropiques dans le cadre des changements globaux. La réponse de ce maillon trophique aux facteurs environnementaux qui y sont associés (lumière, température, nutriments, pollutions métalliques, etc.) est relativement bien documentée par la littérature scientifique. Toutefois, trop peu d'études se sont focalisées sur la conséquence de ces facteurs sur la quantité et la nature des EPS, ainsi que sur la réponse physiologique et fonctionnelle du biofilm. Pourtant, au vu des nombreux rôles écologiques attribués aux biofilms phototrophes et de l'importance des EPS dans un biofilm, ces conséquences peuvent avoir des répercussions importantes sur la qualité chimique des cours d'eau. En France, de nombreux cours d'eau sont impactés une partie de l'année par l'intermittence de l'écoulement en surface et/ou par la présence de pollutions métalliques, notamment sous la forme de cocktails. Une des problématiques actuelles de l'écotoxicologie aquatique concerne l'évaluation de l'impact des polluants dans le cadre de combinaisons multi-stress, notamment amplifié par l'assèchement progressif du lit du cours d'eau.

L'objectif principal de ce travail de thèse est de comprendre comment les changements globaux et l'augmentation de l'anthropisation peuvent affecter les écosystèmes aquatiques et plus particulièrement les composants d'un biofilm phototrophes (microorganismes et EPS associées). Afin de mieux appréhender les processus complexes régissant les réponses physiologiques et métaboliques des biofilms phototrophes naturels, nous avons fait le choix de travailler sur des biofilms phototrophes mono-espèce, en sélectionnant des microorganismes phototrophes représentatifs des espèces benthiques. En l'occurrence, nous avons sélectionné une cyanobactérie (*Phormidium autumnale*), une diatomée (*Nitzschia palea*) et une algue verte (*Uronema confervicolum*). L'ensemble des expérimentations est réalisé en mini-canaux hydrauliques, dans lesquels les conditions environnementales sont maîtrisées.

Ce manuscrit de thèse présente les différents travaux réalisés afin de comprendre les réponses physiologiques des microorganismes phototrophes à des facteurs environnementaux révélateurs de changements globaux (lumière, température, concentration en P) ainsi qu'à l'application d'un multi-stress combinant l'exposition à un cocktail d'ETM (Cu et Zn) ou encore l'exposition au Cu suivi d'un assèchement prolongé du biofilm (**Figure 1**). Après une étude bibliographique sur le sujet (Chapitre I), une présentation des différentes expérimentations et techniques mobilisées lors des travaux est proposée (Chapitre II), de sorte à faciliter la lecture des articles ou projets d'articles proposés comme chapitres de résultats. Puis nous présentons un protocole permettant l'extraction d'une fraction représentative des EPS présentes dans la matrice des différents biofilms phototrophes (Chapitre III), recherchant le meilleur compromis entre la quantité d'EPS extraites et le maintien de l'intégrité des cellules phototrophes. Diverses méthodes physiques et chimiques couramment utilisées pour extraire les EPS de biofilms bactériens ont été évaluées pour leur efficacité à extraire les protéines et les polysaccharides de la matrice. Certaines de ces méthodes pouvant être délétères pour les cellules phototrophes, nous avons proposé une méthodologie permettant le contrôle de la lyse cellulaire. Ceci a permis d'éliminer les traitements susceptibles d'engendrer une contamination de la fraction EPS par d'éventuels composés intracellulaires libérés.

Le chapitre IV présente l'impact d'ETM (Cu et Zn seuls ou en cocktails) à des concentrations proches de celles retrouvées au sein d'écosystèmes aquatiques pollués par des activités anthropiques (activités minières ou agriculture) tout en contrôlant et en maintenant constants la température, la vitesse d'écoulement et la luminosité. En effet, la réalisation de cette expérimentation en microcosme en utilisant des réacteurs composés de mini-canaux hydrauliques a permis de mimer un cours d'eau avec un contrôle précis de ces paramètres. Dans

un premier temps, nous avons défini les conséquences d'une exposition à ces polluants sur la biomasse du biofilm et son activité photosynthétique. Ensuite, nous avons caractérisé la réponse des différents microorganismes phototrophes face à ce stress, au travers de la quantité, la nature et la diversité des EPS extraites des biofilms.

Le chapitre V présente l'évaluation de l'influence des facteurs environnementaux (lumière, température, concentration en P dans le milieu) sur la réponse des biofilms phototrophes et leur impact sur la capacité de sorption du Cu après 4 jours d'exposition. Au cours de cette étude, le milieu environnemental est plus complexe que le chapitre précédent avec la présence de multi-stress induits par la modification des facteurs environnementaux.

Le chapitre VI décrit l'influence des facteurs environnementaux sur la résilience des biofilms phototrophes suite à une exposition au Cu pendant 4 jours suivi d'une période d'assèchement (arrêt de l'eau en circulation) pendant deux semaines. La résilience des microorganismes phototrophes a été étudiée au travers de l'analyse de l'impact de ces perturbations sur l'activité photosynthétique et des EPS extraites (quantité et qualité).

Enfin, la conclusion de ce travail (Chapitre VII) reprendra les principaux résultats et les perspectives qui en découlent.

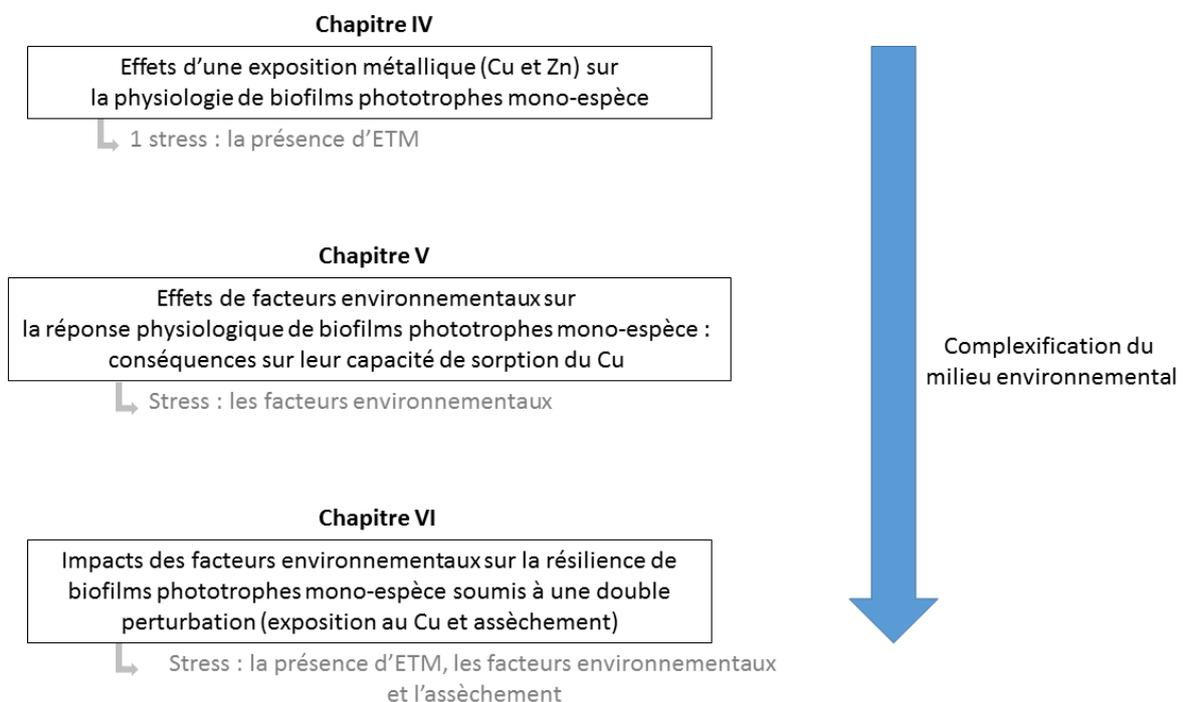


Figure 1 Schéma général présentant les différentes contributions de cette thèse.

CHAPITRE I

ÉTUDE BIBLIOGRAPHIQUE

1 Biofilm phototrophe d'eau douce, un modèle biologique dynamique et diversifié

Définition et composition

Introduit dans la littérature scientifique par Geesey *et al.* en 1978, les biofilms phototrophes sont tout d'abord décrits comme des agrégats complexes de bactéries, d'algues, de protozoaires, de champignons et de méiobenthos. Ces agrégats, lorsqu'ils sont exposés aux flux dynamiques d'un cours d'eau, génèrent des biofilms complexes ayant une importance considérable au sein d'un écosystème aquatique (Battin *et al.*, 2003b). Les biofilms phototrophes sont donc des communautés microbiennes mixtes, qui se développent sur des surfaces exposées à la lumière et comprenant des microorganismes phototrophes et hétérotrophes, stabilisées dans une matrice mucilagineuse composée essentiellement de biopolymères, communément nommée substances polymériques extracellulaires (EPS).

Avec une épaisseur qui peut varier de quelques micromètres à plusieurs centimètres, les biofilms sont majoritairement retrouvés sous forme de biofilms gélatineux de couleur brun-verdâtre (Buhmann *et al.*, 2012). Ils se développent à la surface de galets immergés, on parle alors de biofilm épilithique ; au contraire les termes de biofilm épiphytique ou épipelon seront attribués à des biofilms colonisant respectivement des végétaux (macrophytes, lentilles d'eau, etc.) ou la surface des sédiments.

Le développement des méthodes moléculaires, notamment le séquençage nouvelle génération (NGS) permet de définir la complexité de la diversité microbienne présente dans un biofilm benthique (**Figure 2**). Battin *et al.* (2016) ont décrit les biofilms présents dans les cours d'eau comme « une jungle microbienne », où les trois domaines du vivant sont représentés par la présence de diatomées et algues vertes, bactéries dont cyanobactéries, champignons, larves d'insectes, brouteurs ciliés et flagellés, archées, etc.

Les diatomées et les cyanobactéries qui possèdent une plasticité phénotypique importante sont les composants majoritaires d'un biofilm et peuvent être décrits comme les fondations d'un biofilm : elles permettent la structuration de la communauté et facilitent l'implantation et la croissance d'autres microorganismes (Bengtsson *et al.*, 2018). Le rôle dans la structuration du biofilm de ces deux organismes phototrophes peut être comparé à celui des arbres dans une

forêt qui représentent le siège d'une biodiversité importante et d'une tolérance face à la variabilité climatique (Ellison *et al.*, 2005 ; Lowman and Rinker, 2004).

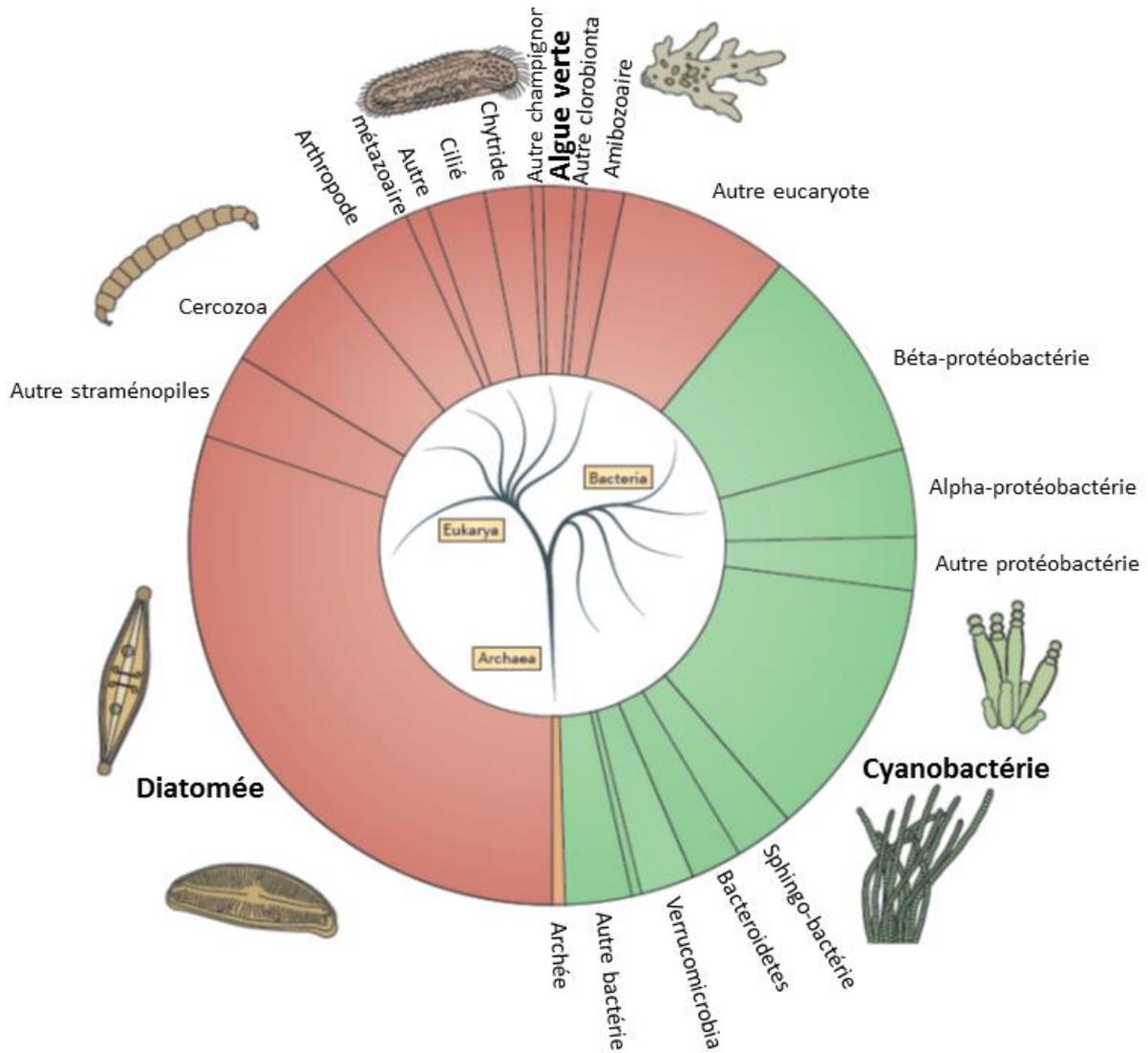


Figure 2 Représentation de la biodiversité au sein d'un biofilm benthique d'eau douce. D'après Battin *et al.* (2016)

Les ciliés, les flagellés et les nématodes représentent les principaux consommateurs des biofilms phototrophes (Dopheide *et al.*, 2008 ; Hakenkamp and Morin, 2000) : leurs activités en tant que brouteurs modifient la structure physique et la composition de la communauté (Böhme *et al.*, 2009 ; Lawrence *et al.*, 2002 ; Wey *et al.*, 2012). De manière indirecte, ils ont donc une influence sur le cycle du carbone (Risse-Buhl *et al.*, 2012). Ces consommateurs primaires peuvent également avoir des effets positifs sur la physiologie des algues : réduction du stress oxydant, augmentation de la production primaire, augmentation de la capacité d'assimilation du phosphore (Guasch *et al.*, 2016).

Dynamique de colonisation du biofilm

De manière générale, la formation et le développement d'un biofilm phototrophe suit cinq étapes principales (**Figure 3**). Dans un premier temps, le dépôt d'une couche de matières organiques et de bactéries initie le développement du biofilm (Roeselers *et al.*, 2007). Ensuite, ce sont les diatomées, espèces pionnières d'un biofilm phototrophe, qui ont la capacité à venir se fixer et former des micro-colonies en forme de chaînes emmêlées conférant une structure physique au biofilm benthique naissant (Celler *et al.*, 2014). Les cellules vont proliférer pour recouvrir la surface colonisée, puis le biofilm va se développer : l'architecture tridimensionnelle se complexifie avec l'apparition de nouvelles espèces pour former à maturité un biofilm dont l'épaisseur est fonction de la nature des espèces présentes dans le milieu, du type de substrat colonisé et des conditions environnementales. Les microorganismes composant le biofilm vont sécréter des EPS, ce qui va permettre le maintien de l'intégrité structurale du biofilm et jouer un rôle de barrière de protection (Flemming and Wingender, 2010). Les bactéries peuvent être fixées sur les cellules algales ou être libres dans la phycosphère ; cette proximité spatiale permet une communication efficace, qui se fait notamment à travers la sécrétion de molécules signal (Bell and Mitchell, 1972). Au cours de la phase de croissance, des modifications de la communauté sont observées : la vitesse de croissance et la composition de la communauté microbienne sont fortement influencés par les facteurs environnementaux et la physico-chimie du milieu (Roeselers *et al.*, 2007). La dernière étape du développement d'un biofilm est la phase de dispersion, qui peut s'effectuer soit par érosion en surface suite à une modification de l'écoulement, soit par sénescence des couches profondes du biofilm. Certains microorganismes vont se détacher du biofilm leur permettant la migration vers un nouveau support à l'aval. Un

phénomène naturel de « mort programmée » de certaines cellules du biofilm a lieu pour permettre son bon développement (Bayles, 2007).

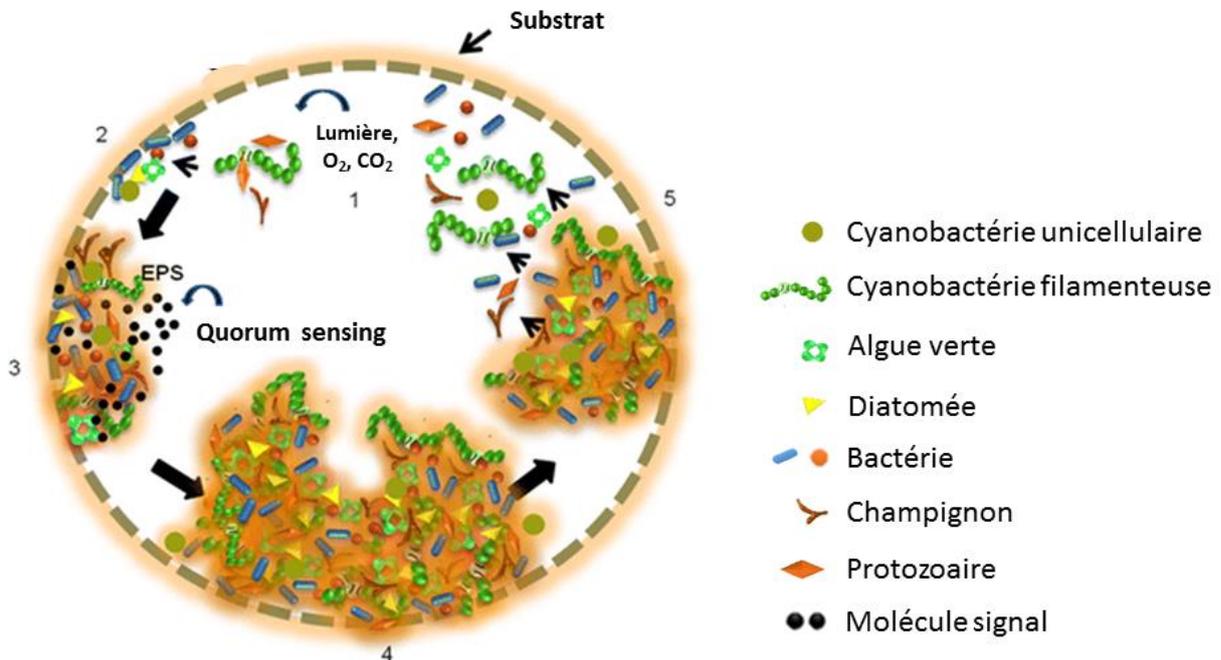


Figure 3 Schéma illustrant les différentes étapes de la formation et du développement d'un biofilm phototrophe. D'après Bharti *et al.* (2017)

Les biofilms phototrophes forment des agrégats épais au sein desquels se développent, en fonction du gradient d'oxydo-réduction, des strates avec différents groupes fonctionnels microbiens (Babauta *et al.*, 2014). Malgré le besoin en lumière, en oxygène et en nutriment des cellules algales présentes au sein du biofilm, leur diffusion à l'intérieur du biofilm est parfois difficile (Stewart and Franklin, 2008 ; Zhang *et al.*, 2013). A la surface, le biofilm est directement exposé à la lumière, il est donc dominé par des microorganismes phototrophes oxygéniques comprenant des cyanobactéries (Castenholz *et al.*, 2001) ainsi que des microalgues telles que les algues vertes et les diatomées. L'intensité lumineuse et la disponibilité en oxygène diminuent avec la profondeur, ce qui limite l'activité phototrophe oxygénique des microorganismes. Ainsi, les couches sous-jacentes sont majoritairement composées de phototrophes anoxygéniques tels que les bactéries sulfureuses, les *Chloroflexi*, ainsi que des protozoaires et des champignons (Roeselers *et al.*, 2007). Cette stratification des communautés au sein d'un biofilm phototrophe (**Figure 4**) se traduit par la mise en place de niches écologiques distinctes en fonction des niveaux trophiques, de la phase de maturation et des gradients verticaux (lumière, oxygène et nutriments).

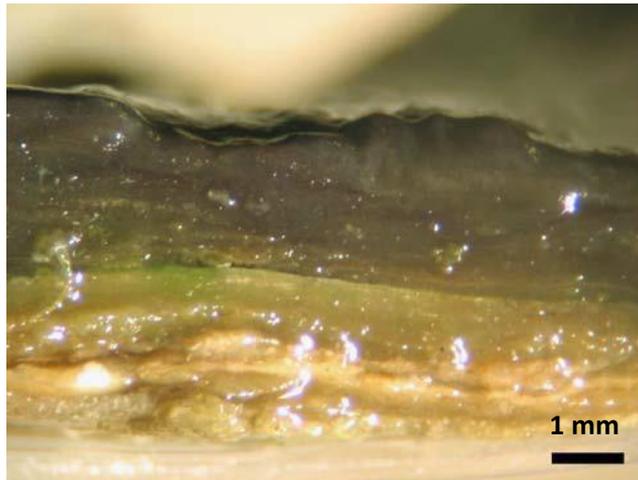


Figure 4 Observation sur une section transversale de la stratification des communautés microbiennes au sein d'un biofilm phototrophe. D'après Roeselers *et al.* (2008)

En revanche, en raison des limites dans les techniques de culture en laboratoire, et du concept de microorganismes non-cultivables qui en découle, il existe des lacunes dans la connaissance des interactions photo-autotrophes et hétérotrophes (Martínez-Alonso *et al.*, 2005)

Importance écologique des biofilms dans les cours d'eau

Les biofilms phototrophes constituent un compartiment essentiel au fonctionnement général et à la structure d'un écosystème lotique (Romani and Sabater, 2000 ; Woodruff *et al.*, 1999). Les microorganismes composant le biofilm phototrophe sont responsables de la production primaire, ils représentent ainsi la base du réseau trophique (Cahoon, 2014 ; Glud *et al.*, 2002). En rivière, la biomasse algale est proportionnelle à la production primaire (Dodds, 2006) ; les biofilms gouvernent donc de manière indirecte le maintien de la structure et du fonctionnement des populations dans un cours d'eau (Minshall, 1978). Cet assemblage microbien représente également une source de nourriture et de refuge pour de nombreux invertébrés (Cattaneo and Kalff, 1980 ; Kostel *et al.*, 1999 ; Muñoz *et al.*, 2001). Ils participent également au déroulement des cycles biogéochimiques du phosphore (Dodds, 2003) et de l'azote (Teissier and Torre, 2002).

La présence mutuelle d'organismes phototrophes et hétérotrophes au sein d'un biofilm permet la réalisation du cycle du carbone en autosuffisance, indépendamment des sources présentes dans le milieu environnant. D'une part, les diatomées, les cyanobactéries et les algues

vertes sécrètent des composés organiques (carbohydrates et acides aminés) disponibles et nécessaires pour le métabolisme des organismes hétérotrophes (Battin *et al.*, 2003a ; Ylla *et al.*, 2009). D'autre part, le dioxyde de carbone libéré par les hétérotrophes lors de la respiration est assimilé par les organismes phototrophes. De par la production primaire et leur implication dans le cycle des nutriments, les biofilms représentent les principaux producteurs énergétiques, ce qui confirme leur rôle primordial dans le fonctionnement des écosystèmes aquatiques (Battin *et al.*, 2003a).

Enfin, via les EPS, les biofilms phototrophes ont également la capacité à adsorber et/ou transformer des molécules telles que les métaux ou les pesticides (Li *et al.*, 2008 ; Paule *et al.*, 2015). Cette adsorption peut varier en fonction de l'âge du biofilm (Duong *et al.*, 2010) et des saisons (Duong *et al.*, 2008 ; Pokrovsky *et al.*, 2010). Les capacités de sorption des métaux sont spécifiques à chaque espèce d'algue (Gélabert *et al.*, 2007) et varient en fonction de la nature du métal considéré (Klimmek *et al.*, 2001). Le stockage des pesticides et des métaux par le biofilm phototrophe, premier maillon de la chaîne alimentaire, les rend assimilables pour les organismes de réseaux trophiques supérieurs et favorise donc leur bio-accumulation (Pinto *et al.*, 2003).

2 Les substances polymériques extracellulaire (EPS), une architecture complexe

Définition et généralités

Anciennement nommé glycocalyx, le terme EPS, signifiant « substances polymériques extracellulaires », a été défini par Geesey *et al.* (1978) comme étant un ensemble de substances, en majorité d'origine biologique, qui participe à la formation et au maintien de l'intégrité structurale du biofilm. En 1989, Characklis et Wilderer définissent les EPS comme étant des polymères organiques d'origine microbienne qui, au sein d'un biofilm, sont responsables de la cohésion des cellules entre elles et de leurs adhésions au support. Autrement dit, les EPS peuvent être considérées comme étant la colonne vertébrale d'un biofilm phototrophe : il s'agit d'un élément indispensable au développement d'un biofilm puisqu'elles assurent une intégrité structurale et fonctionnelle et sont essentielles de par leurs propriétés physico-chimiques et biologiques (Bharti *et al.*, 2017). Selon Flemming *et al.* (2007), si les biofilms peuvent être

décrits comme une “ville de microorganismes”, les EPS représentent alors les “maisons des cellules dans un biofilm”.

En fonction des conditions environnementales, ces polymères, sécrétés par les microorganismes, peuvent représenter « une réserve nutritive » pour les microorganismes en fonction des facteurs environnementaux mais peuvent également jouer un rôle enzymatique permettant, par exemple, l’hydrolyse de la matière organique. Une partie des EPS présente dans la matrice peut également provenir des produits de la lyse cellulaire ou de molécules sorbées du milieu environnant (Flemming *et al.*, 2007 ; Frølund *et al.*, 1996 ; Wingender *et al.*, 1999a). La synthèse des polymères par les algues vertes et les diatomées a lieu dans l’appareil de Golgi alors qu’elle est cytoplasmique chez les cyanobactéries (Domozych, 1999 ; Keidan *et al.*, 2006).

La matrice d’EPS est constituée de divers biopolymères qui peuvent être organisés sous forme d’hydrogel (polysaccharides), agrégés dans une matrice fibreuse (protéines fibreuses et amyloïdes) ou composés d’un mélange complexe de ces deux structures (Flemming, 2016) (**Figure 5**). Les EPS représentent de 50 à 90 % de la matière organique d’un biofilm (Wingender *et al.*, 1999a) mais bien que majoritaires dans un biofilm, leur quantité reste variable en fonction des espèces présentes et des conditions environnantes. En effet, la composition et la quantité d’EPS sont fortement dépendantes des facteurs environnementaux (Villanueva *et al.*, 2011), de l’âge du biofilm (Zhang *et al.*, 2011) et de la nature du support considéré (Rossi and De Philippis, 2015).

En raison de la grande diversité des polymères composant la matrice et des difficultés rencontrées pour les extraire et les caractériser, les EPS peuvent être qualifiées comme étant « la matière noire des biofilms » (Flemming *et al.*, 2007). Comme schématisé sur la **Figure 6**, selon la force d’agrégation et la localisation du polymère, deux catégories d’EPS peuvent être distinguées au sein d’une matrice: les EPS liées et les EPS solubles (Nielsen and Jahn, 1999).

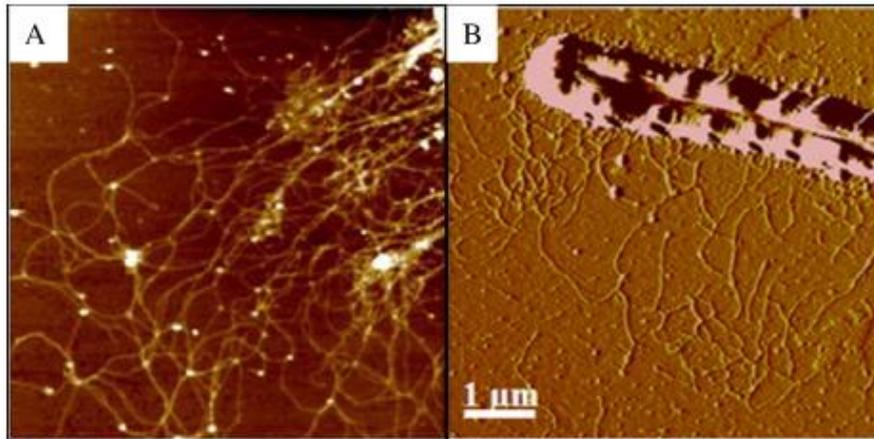


Figure 5 Images obtenues en microscopie à force atomique du réseau fibrillaire formé par les EPS au sein d'un biofilm composé de la diatomée *Cylindrotheca closterium* (A) et des EPS liées à ces cellules (B). D'après Xiao and Zheng (2016)

Parmi les EPS liées, une distinction peut être faite entre les EPS faiblement liées (loosely bound, LB-EPS) et fortement liées (tightly bound, TB-EPS). Selon Fang *et al.* (2014) qui ont caractérisé les EPS au sein de divers biofilms phototrophes, les EPS fortement liées représentent 60 % de la composition des EPS liées et sont présentes au pourtour de la cellule ; elles sont ancrées aux parois cellulaires. Au contraire les EPS faiblement liées, de densité plus faible que les TB-EPS, sont situées en périphérie du biofilm (Ding *et al.*, 2015). Au vu de leurs positions dans le biofilm, les EPS faiblement liées sont plus sensibles aux conditions environnementales (Zhang *et al.*, 2011).

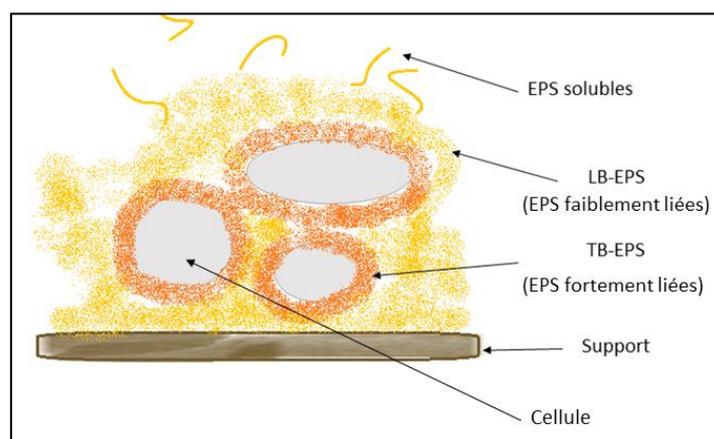


Figure 6 Représentation d'un biofilm phototrophe ayant colonisé un support. Trois catégories d'EPS sont représentées, les EPS solubles, les EPS faiblement liées (en jaune) et fortement liées (en orange) aux cellules algales. D'après Nielsen and Jahn (1999)

Protéines et polysaccharides : composants majeurs de la matrice

La première étude scientifique concernant les composants de la matrice d'un biofilm, réalisée par Costerton *et al.* en 1978, considère les polysaccharides comme seuls constituants de la matrice. Selon Flemming *et al.* (2007), la composition des EPS ne se résume pas qu'à un assemblage de polysaccharides. En effet, elles sont également constituées d'une grande variété de protéines (enzymatique ou de structure), de glycoprotéines, de glycolipides (Neu, 1996 ; Takeda *et al.*, 1998) et, dans certains cas, d'une quantité d'ADN extracellulaire non négligeable (Frølund *et al.*, 1996). Cependant, les travaux qui s'intéressent à l'ADN extracellulaire sont récents et ils concernent essentiellement des biofilms hétérotrophes pour lesquels la sécrétion d'ADN par les bactéries et son implication dans l'agrégation de la matrice ont été démontrées (Das *et al.*, 2013; Randrianjatovo-Gbalou *et al.*, 2017).

En utilisant la microscopie confocale à balayage laser, Kamjunke *et al.* (2015) ont pu révéler la structure complexe d'un biofilm benthique (**Figure 7**). Cette technique permet par une différence de coloration, d'observer les différents composants de la matrice (acides nucléiques et polysaccharides) ainsi que les microorganismes composants le biofilm (cyanobactérie et algues). La matrice d'EPS n'est pas un gel amorphe mais représente un réel environnement structuré avec des composants et des zones distinctes.

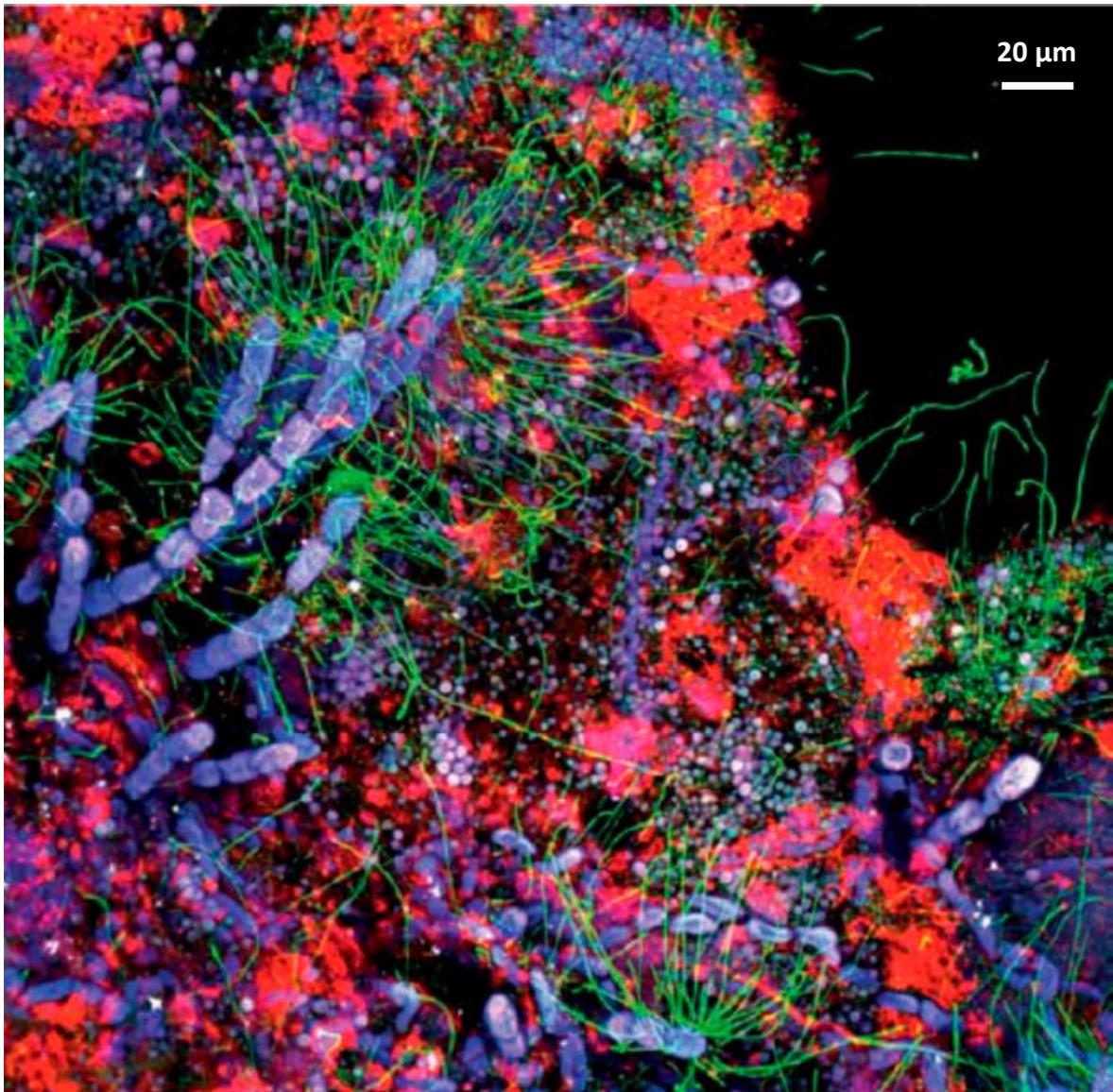


Figure 7 Photographie d'un biofilm benthique de rivière obtenue par microscopie confocale à balayage laser. Les algues sont colorées en bleu, les cyanobactéries en violet-blanc, les EPS en rouge et les acides nucléiques en vert (Kamjunke *et al.* (2015)).

1. Les polysaccharides

Les polysaccharides sont des composants majeurs de la matrice (Flemming and Wingender, 2010) qui peuvent atteindre des poids moléculaires allant jusqu'à plusieurs millions de daltons. Ce poids moléculaire élevé et leur caractère très polaire leur confèrent des propriétés d'hydrogel pouvant expliquer l'aspect visqueux du biofilm.

Le fucose, le rhamnose, l'arabinose, le galactose, le glucose, le mannose et le xylose sont les monosaccharides les plus fréquemment retrouvés dans les EPS composant un biofilm phototrophe (Xiao and Zheng, 2016). Le glucose et le galactose sont cependant les monomères les plus abondants (Li *et al.*, 2001 ; Pereira *et al.*, 2009). Ces monomères sont organisés en unités répétées pour former, *in fine*, une structure complexe de longs polymères linéaires ou ramifiés. Grâce à la microscopie électronique, plusieurs études ont permis de visualiser les polysaccharides sous forme de fines chaînes en contact avec la paroi cellulaire et formant un réseau complexe.

Les polysaccharides sécrétés par les micro-algues sont très variés : la proportion et la nature des monomères qui les composent peuvent varier de manière significative en fonction des groupes microbiens présents au sein du biofilm mais également au sein d'une même famille (Hanlon *et al.*, 2006). Par exemple, les biofilms composés de cyanobactéries *Spirulina platensis* et *Mastigocladus laminosus* contiennent des polysaccharides composés d'unités répétées de 15 monomères (Gloaguen *et al.*, 1999 ; Mouhim *et al.*, 1993), alors que des unités répétées de 8 monomères ont été retrouvées dans des polysaccharides sécrétés par *Cyanospira capsulata* (Garozzo *et al.*, 1998). Les cyanobactéries ont la particularité de produire des polymères composés de groupements sulfates et d'acides uroniques leur conférant un caractère anionique et collant. De même, les pentoses (xylose, arabinose et ribose) sont des monosaccharides fréquemment retrouvés dans les EPS sécrétés par les cyanobactéries mais rarement présents dans ceux sécrétés par d'autres microorganismes (Rossi and De Philippis, 2015). Une différence dans la composition des polysaccharides contenus dans les EPS liées et solubles peut être observée. En effet, les polysaccharides analysés dans les EPS solubles d'un biofilm de diatomées benthiques (*Cylindrotheca closterium* et *Nitzschia sp*) sont majoritairement composées de galactose et d'acide glucuronique. Au contraire, le glucose est le monomère le plus retrouvé dans la fraction d'EPS liées (De Brouwer *et al.*, 2002b). Cette différence moléculaire dans la composition des EPS liées ou solubles laisse sous-entendre des fonctions différentes de ces deux catégories d'EPS. Les conditions environnementales sont des facteurs

qui influencent également leur composition, ce qui suggère que les micro-algues et les bactéries présentes au sein du biofilm ont une plasticité de biosynthèse importante.

2. Les protéines

Les EPS produites par les micro-algues sont également constituées de protéines. En condition optimale de croissance, les cellules algales sécrètent des polypeptides de bas poids moléculaires (Newell *et al.*, 1972). Ces protéines, liées aux polysaccharides et aux autres composants de la matrice participent à la stabilité d'un réseau au sein de la matrice. Les EPS sont également composées de protéines de surface qui participent à la phase initiale d'adhésion de la cellule sur un support. Du fait de leur caractère hydrophobe, elles favorisent l'attache des cellules à des surfaces hydrophobes ainsi que les liaisons à d'autres polymères.

Les EPS sont composées d'un large spectre d'enzymes qui ont été sécrétées par les microorganismes présents au sein de la matrice. La fonction principale des enzymes extracellulaires est en lien avec l'acquisition d'azote et de carbone nécessaire à la croissance et à la reproduction des communautés microbiennes (Chróst, 1990). Elles sont donc impliquées dans la dégradation de biopolymères, notamment les polysaccharides, les protéines et les acides nucléiques. De ce fait, les enzymes protéolytiques et les glycanases sont les plus étudiées dans le cadre des biofilms phototrophes. De plus, certaines enzymes peuvent être impliquées dans la dégradation des polymères afin de favoriser le détachement de certains microorganismes phototrophes ou hétérotrophes. Enfin, les biofilms phototrophes ont, grâce aux activités des enzymes extracellulaires, la capacité de dégrader ou modifier des substances organiques, des polluants ou des polymères synthétiques présents dans la colonne d'eau (Shimao, 2001).

La composition, la structure et les fonctions des protéines au sein de la matrice d'EPS de biofilms phototrophes sont très peu étudiées et donc mal connues. Par conséquent, peu d'informations sont disponibles concernant les interactions entre les protéines et les polysaccharides ainsi que leurs interactions avec la surface des cellules algales.

Rôle des EPS

Cette partie est composée d'un tableau synthétisant les différents rôles fondamentaux de la matrice d'EPS (**Tableau 1**). Chaque rôle est ensuite détaillé dans les différentes sous-parties.

La matrice d'EPS, d'apparence gélatineuse, joue un rôle fondamental pour le maintien du biofilm et la vie des organismes au sein du biofilm. Elle est impliquée dans l'adhésion des cellules sur un support et entre cellules, le maintien et la cohésion du biofilm, l'augmentation de la résistance du biofilm contre un stress environnemental et la protection du biofilm contre la prédation (Costerton *et al.*, 1995). Les EPS produites créent donc un micro-environnement favorable pour les cellules algales, les cyanobactéries et les bactéries. Du fait de leur diversités dynamiques et fonctionnelles, les EPS ont fait des biofilms une forme de vie omniprésente sur Terre.

1. Adhésion et colonisation du support

L'adhésion des microorganismes à un support constitue la première étape de formation d'un biofilm phototrophe et lui permet une meilleure résistance à de nombreuses contraintes extérieures. Ce sont les EPS, sécrétées par les microorganismes, qui initient et assurent l'adhésion cellulaire à un support nécessaire au développement du biofilm (Flemming and Wingender, 2010 ; Parker, 2013). La production des EPS est fonction du support sur lequel le biofilm se développe (Shen *et al.*, 2015). Une étude réalisée par Becker (1996) a montré que la production d'EPS par une espèce de diatomée, *Amphora coffeaeformis*, est d'autant plus importante que les tensions superficielles à l'interface entre le biofilm et le support sont élevées. Les adhésines sont des protéines qui forment des ex-croissances à la surface de la membrane externe des bactéries leurs permettant de s'agréger entre elles mais également de se coller à un support solide ou à un polymère (Klemm and Schembri, 2004). Les différents polysaccharides sécrétés par les cellules agissent comme une « colle » moléculaire, permettant à la fois une adhésion des cellules à un support mais également entre elles (Limoli *et al.*, 2015). Les polysaccharides peuvent être composés de monomères chargés positivement ou négativement qui contribuent à l'adhésion des cellules (Xiao and Zheng, 2016). De plus, la présence de désoxyoses (fucose ou de rhamnose) confère un caractère hydrophobe au polymère qui modifie sa capacité à adhérer à une surface solide (Neu and Marshall, 1990 ; Vieira *et al.*, 2008).

Tableau 1 Fonctions contrôlées par les différents composants des EPS. D'après Flemming and Wingender (2010).

Fonction des EPS	Rôle et bénéfice pour les microorganismes présents au sein du biofilm	Composants concernés
Adhésion au support	Premières étapes de la colonisation des surfaces biotiques et abiotiques par les cellules phototrophes, à long terme fixation du biofilm aux surfaces	Polysaccharides, protéines et ADN
Structure et cohésion du biofilm	Liaison entre les cellules Structure tridimensionnelle formant un réseau de polymères hydratés Renforcement mécanique du biofilm (formation de ponts cationiques multivalents ou interactions hydrophobes)	Polysaccharides neutres et chargés, protéines, ADN environnemental (ADNe)
Barrière protectrice	Résistance et tolérance des organismes face à des perturbations environnementales (limitation des dommages cellulaires induits par les UV ou suite à un stress thermique) Protection contre certains brouteurs	Polysaccharides, protéines, ADNe
Rétention d'eau	Maintien d'un micro-environnement hydraté, permet une tolérance à la dessiccation dans des environnements pauvres en eau	Polysaccharides hydrophiles et protéines
Activité enzymatique	Digestion de particules et macromolécules exogènes en nutriments utilisables par les cellules Dégradation des EPS de structure permettant la libération des cellules	Protéines liées aux cellules ou extracellulaires
Source de nutriment et d'énergie	Source de C, N et P Source de C et d'énergie en cas de limitation en nutriments pour les hétérotrophes	Tous les composants
Sorption de composés organiques ou d'ions inorganiques	Accumulation de xénobiotiques et d'ions métalliques toxiques (détoxification) Accumulation de nutriments issus de la colonne d'eau Ressources en nutriments	Polysaccharides chargés ou hydrophobes, protéines
Information génétique	Transfert de gènes horizontaux entre les cellules	ADNe

L'ADN joue également un rôle dans la formation des biofilms en influençant l'adhésion des cellules sur des supports abiotiques *via* des interactions électrostatiques ou acido-basiques (Tang *et al.*, 2013). En effet, il a été montré que l'ajout d'une enzyme dégradant l'ADN pendant la croissance de *Pseudomonas aeruginosa* empêchait la formation d'un biofilm (Whitchurch *et al.*, 2002).

2. Cohésion et structure du biofilm

La cohésion du biofilm est un mécanisme indispensable à la formation et au maintien d'un biofilm dans un écoulement. Les polysaccharides, les protéines et l'ADN présents au sein de la matrice jouent un rôle primordial dans la cohésion. Comme montré sur la **Figure 7**, la mise en place d'un phénomène de réticulation confère une architecture en 3D au biofilm.

Différentes interactions chimiques permettent également de consolider les agrégats en maintenant la structure biologique agrégée (**Figure 8**). Entre les protéines et les sucres présents dans la matrice, des interactions ioniques peuvent être présentes (Sheng *et al.*, 2010). De par la présence des charges négatives conférées par les fonctions acides portées par certains composants de la matrice tels que les sucres uroniques et les protéines, les EPS peuvent être liées entre elles par la formation de ponts cationiques divalents. En effet, des cations bivalents tels que Ca^{2+} et Mg^{2+} sont présents au sein de la matrice et sont impliqués dans des liaisons entre les différents composants de la matrice entraînant la formation d'un gel qui joue un rôle important dans la structure et la stabilité des EPS face aux contraintes extérieures (Sabra *et al.*, 2000). Au sein de la matrice, la mise en place de liaisons hydrophobes ou hydrogènes peut également avoir lieu entre les différents polymères. Par exemple, les liaisons hydrogènes permettent l'association de polymères de glucose pour former la cellulose qui, de par sa structure fibreuse, favorise la stabilité de la matrice dans le cas de biofilm à salmonelles (Solano *et al.*, 2002). Les interactions hydrophobes semblent jouer un rôle important au sein des biofilms qui se développent dans un milieu lotique. Les polymères apolaires vont être amenés à se regrouper dans des régions spécifiques de la matrice pour former des micelles conférant une stabilité au biofilm. D'autre part, les flagelles, les pili et les *fimbriae* d'origine bactérienne peuvent également jouer un rôle non négligeable dans le maintien de la stabilité de la matrice (Zogaj *et al.*, 2001).

L'ADN extracellulaire participe également à la solidification du biofilm en formant un réseau très dense visible en microscopie (**Figure 7**). La formation et le maintien des

communautés au sein d'un biofilm phototrophe dépendent donc fortement de la quantité et de la qualité des EPS produites par les communautés phototrophes et hétérotrophes.

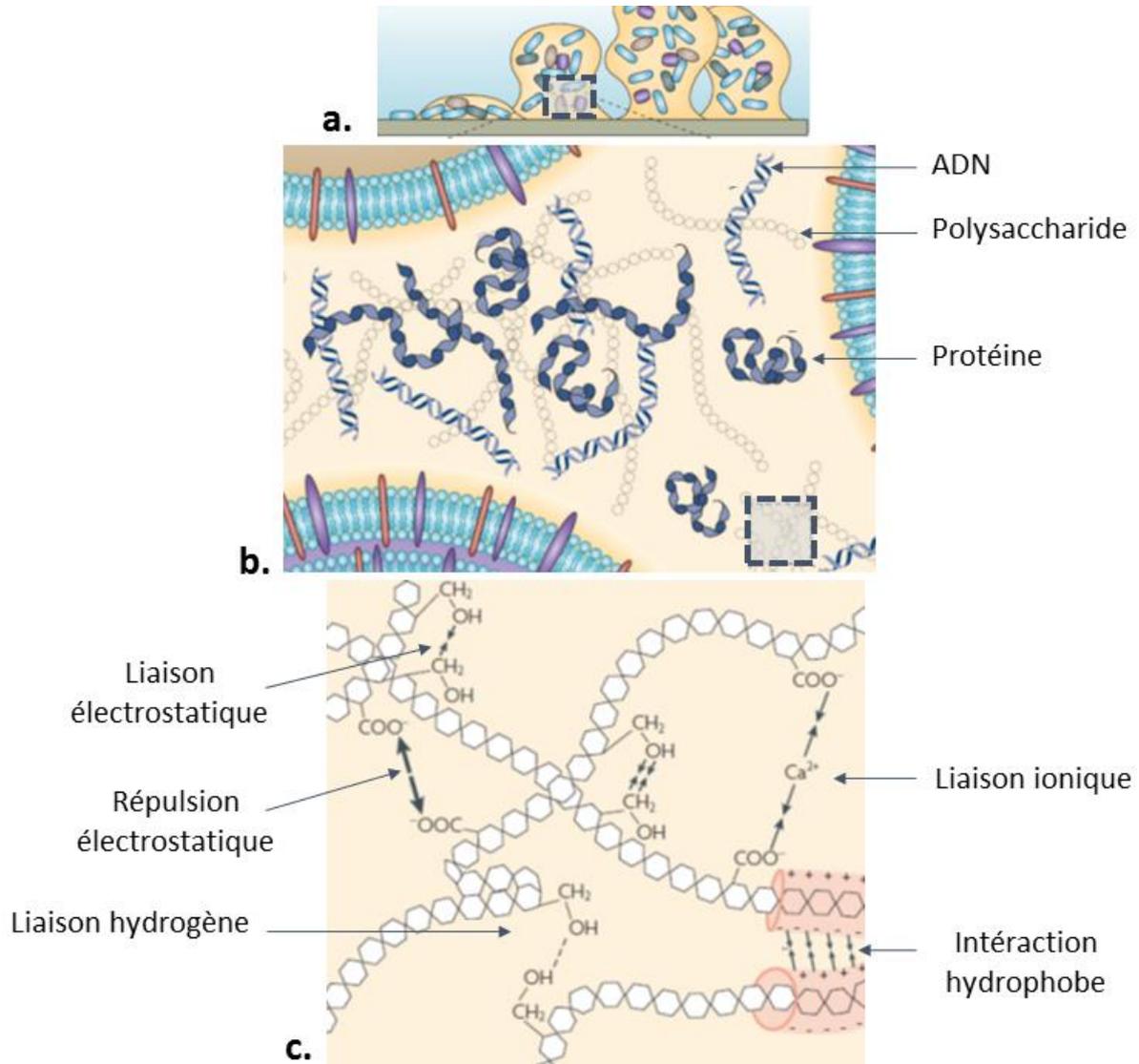


Figure 8 Représentation de la matrice d'EPS à différentes échelles : vue d'ensemble d'un biofilm benthique (a.), principaux composants de la matrice répartis de façon non homogène (b.) et liaisons chimiques présentes au sein de la matrice et permettant la liaison des polymères entre eux (c.). D'après Flemming and Wingender (2010)

3. Barrière de protection et sorption de composés organiques et inorganiques

Les EPS jouent un rôle protecteur indispensable à la survie des cellules algales. Elles peuvent être considérées comme une barrière physique créant une limite entre les cellules et l'environnement extérieur qui permet de protéger les cellules de substances toxiques qui pourraient être présentes dans la colonne d'eau. Par exemple, Teitzel and Parsek (2003) ont observé que les cellules des biofilms étaient entre 2 à 600 fois plus résistantes aux stress engendrés par les métaux lourds que les cellules en culture libre. En réponse à une modification de la quantité de polluants dans le milieu, les communautés phototrophes modulent la quantité d'EPS produites ; il s'agit d'un mécanisme de réponse suite aux stress causés par l'exposition. Par exemple, García-Meza *et al.* (2005) et Miao *et al.* (2017) ont observé une augmentation de la quantité des EPS produites par un biofilm phototrophe suite à une exposition à des nanoparticules métalliques. Les EPS sont donc considérées comme étant une barrière de protection, cependant si la quantité de polluant provenant du milieu extérieur est trop importante, la matrice d'EPS ne pourra que limiter cette toxicité (Sutherland, 2001a).

Les EPS sont impliquées dans divers processus biologiques comme par exemple, la complexation de métaux dissous ou de composés tels que les sulfates. Le rôle des biofilms dans la rétention des polluants de la colonne d'eau a largement été décrit dans la littérature. La plupart des études, réalisées en conditions contrôlées, s'intéressent à l'accumulation des polluants (métaux ou pesticides principalement) par les biofilms. Les cellules sécrètent des polymères qui vont jouer le rôle de « molécules ligands » pouvant adsorber des cations permettant une augmentation de la viscosité de la matrice et donc une meilleure résistance des biofilms face aux contraintes extérieures (Wei *et al.*, 2016; Yin *et al.*, 2011). En effet, du fait de la présence de monomères chargés négativement, les EPS présentent une forte affinité pour des molécules chargées positivement telles que les métaux lourds : la quantité de cations sorbés par le biofilm est de ce fait fortement dépendante de la quantité d'EPS (**Figure 9**).

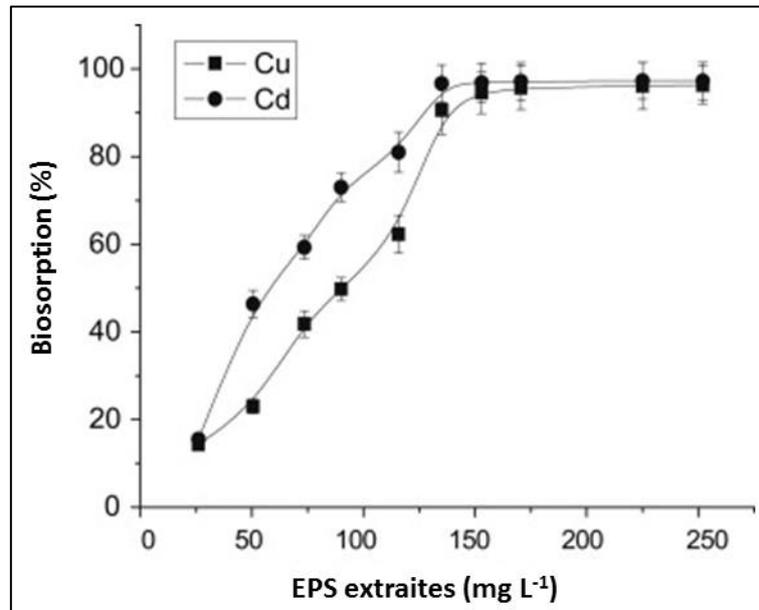


Figure 9 Effet de la quantité des EPS sur la capacité de sorption du Cu et du Cd lors d'une exposition d'un biofilm composé d'*Aspergillus fumigatus* pendant 3 h à des concentrations respectivement égales à 5 et 7 mg L⁻¹ (Yin *et al.*, 2011).

4. Photo-acclimatation et lutte contre la dessiccation

En plus du rôle de barrière physique, la matrice d'EPS joue un rôle protecteur contre la dessiccation et l'irradiation UV des biofilms dans les milieux naturels (Rossi *et al.*, 2012). En effet, l'ensoleillement et la faible disponibilité d'eau sont des paramètres régulièrement apparentés lorsqu'on évoque les changements globaux au sein d'un écosystème. Face à un stress hydrique, les EPS sont impliquées dans le maintien de l'hydratation du biofilm grâce au caractère hydrophile de certains polymères qui créent un gel hydraté autour des cellules et régulent l'absorption d'eau et les pertes hydriques (Pereira *et al.*, 2009). Le caractère hydrophile de certaines EPS est rendu possible par la présence de monomères composés de groupements sulfates (Sutherland, 2001b ; Wingender *et al.*, 1999a). Les molécules d'eau peuvent former des liaisons hydrogènes avec les polymères hydrophiles permettant à la matrice d'être majoritairement composée d'eau (Mayer *et al.*, 1999). De ce fait, l'hydratation de la matrice est également renforcée par la présence de polysaccharides amphiphiles puisqu'ils possèdent eux aussi un groupe hydrophile permettant une liaison hydrogène avec une molécule d'eau.

Si le mécanisme des EPS dans la lutte contre la dessiccation n'est pas clairement décrit, Tamaru *et al.* (2005) ont néanmoins observé une baisse plus importante de la viabilité cellulaire et de l'activité photosynthétique pour des cellules *Nostoc commune* isolées en comparaison à des cellules au sein d'un biofilm suite à une période d'assèchement. Knowles et Castenholz (2008)

ont également montré que les cyanobactéries ont une meilleure tolérance au stress hydrique lorsqu'elles se développent dans un biofilm. Cette capacité à lutter contre les périodes d'assèchement des cours d'eau permet le maintien de l'intégrité structurelle et fonctionnelle du biofilm. Cependant, un prolongement de l'assèchement se traduit par une rupture des liaisons hydrogènes et une libération de l'eau dans le milieu.

De plus, en créant un micro-environnement hydraté, les EPS limitent les dommages cellulaires induits par les rayonnements solaires. Lorsque la cyanobactérie *N. commune* est exposée à des UV-B pendant 72 h, elle produit une quantité d'EPS plus importante (**Figure 10**). Enfin, les EPS peuvent également être impliquées dans le phénomène de motilité du biofilm pour favoriser la photo-acclimatation. Par exemple, suite à un dépôt ou un mélange de sédiments dans un environnement aquatique, certaines cellules phototrophes telles que les cyanobactéries sont capables de regagner la zone euphotique (Montoya, 2009).

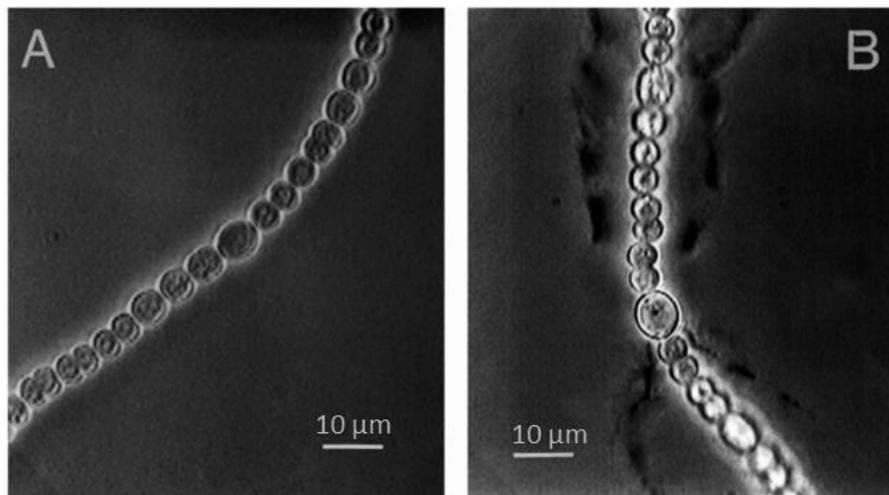


Figure 10 Photographie de la cyanobactérie *Nostoc commune* non exposée aux UV-B (A) et après 72 h d'exposition (B). D'après Ehling-Schulz *et al.* (1997)

5. Source de nutriments

Les EPS sont des biopolymères naturels polyvalents capables de protéger les cellules contre la déshydratation et les substances toxiques, mais peuvent également servir de puits d'énergie et de carbone (Xiao et Zheng, 2016). Elles ont la capacité de retenir et d'accumuler des ressources nutritives importantes. Une augmentation de la production d'EPS par un biofilm composé de *Penium margaritaceum* peut être corrélée à une augmentation de la concentration en nitrate de sodium présent dans le milieu (Domozych, 2007).

La matrice peut conserver et concentrer les enzymes libérées par les microorganismes. Les enzymes présentes au sein de la matrice permettent, de par leurs activités métaboliques, une meilleure résistance des biofilms face aux fluctuations de la quantité de matière organique disponible dans l'environnement (Sinsabaugh *et al.*, 1991). Les enzymes hydrolytiques permettent la digestion de polymères présents sous forme dissoute, colloïdale ou solide pour les rendre disponibles pour les cellules (Flemming and Wingender, 2010). En effet, les polymères sont réduits en molécules de plus faible poids moléculaire pouvant être assimilées et métabolisées par les microorganismes. Cette matrice crée donc un micro-environnement favorable permettant le développement et la croissance des cellules algales présentes dans le biofilm.

6. Echange d'informations génétiques

De manière générale, l'échange horizontal de matériel génétique entre microorganismes au sein d'un biofilm est continu. En effet, il existe des transferts de plasmides au sein d'une matrice d'EPS dans les biofilms de rivière. Ces transferts permettent de faciliter l'adaptation des communautés face aux pressions extérieures en favorisant un changement phénotypique plus rapide ; les EPS permettent ainsi une meilleure protection des microorganismes.

Caractérisation des EPS

Malgré l'importance physiologique et écologique des EPS, leur synthèse est un processus complexe et peu connu : la quantité d'information liée à la sécrétion et aux fonctions spécifiques des divers polymères composant la matrice d'un biofilm est à ce jour limitée.

La caractérisation des EPS peut être réalisée par l'intermédiaire de la microscopie qui représente une méthode *in situ* non destructrice utilisant des sondes fluorescentes qui ciblent les différents polymères (protéines, polysaccharides, ADN) ou *in vitro* après un protocole d'extraction des polymères de la matrice. L'objectif de ce chapitre est de proposer une revue des méthodes de caractérisation des EPS en se focalisant sur les méthodes *in vitro* qui sont les plus utilisées aujourd'hui (Azeredo *et al.*, 2017).

1. Méthodes d'extraction des EPS

Pour étudier précisément la composition des EPS, il est nécessaire de rompre les liaisons établies entre les polymères de la matrice ainsi que de séparer les polymères des cellules : il s'agit de la phase d'extraction. Elle repose sur l'utilisation de méthodes physiques ou chimiques, voire une combinaison des deux, dans le but de déstructurer la matrice en modifiant les interactions plus ou moins fortes liant les polymères entre eux ou aux cellules dans la matrice. Ces différents protocoles permettent d'extraire les EPS faiblement et fortement liés. Dans la littérature, il existe un nombre important de méthodes utilisées pour extraire les EPS, la majorité étant réalisée sur des floccs de boues activées ou des biofilms bactériens en dépollution (Pellicer-Nàcher *et al.*, 2013; Sheng *et al.*, 2010). Du fait de la composition microbienne et de la structure différente des biofilms de rivière ou de station d'épuration, il n'est pas possible d'utiliser les mêmes protocoles d'extraction. En effet, lors de l'extraction des EPS, il est indispensable de préserver l'intégrité des cellules pour ne pas contaminer l'échantillon avec du matériel intracellulaire. Or les techniques d'extraction utilisées pour les agrégats de boues activées ou les boues granulaires sont trop puissantes et induisent un fort taux de lyse cellulaire lorsqu'elles sont appliquées à des biofilms phototrophes (Verneuil *et al.*, 2015).

Le choix du protocole d'extraction doit être réfléchi : la quantité et la nature des polymères extraits dépendent de la méthode d'extraction utilisée (Nielsen *et al.*, 1997 ; Takahashi *et al.*, 2010 ; Wingender *et al.*, 1999b). De plus l'utilisation de certaines techniques à base de solvants ou d'extractants chimiques peut, par la suite, limiter et compliquer les analyses post-extraction des polymères (Guo *et al.*, 2016). Ce choix sera également fonction de la composition (biofilm mono-espèce ou complexe) et de l'épaisseur du biofilm. Pour toutes ces raisons, il semble difficile d'établir un protocole universel permettant l'extraction des EPS d'un biofilm phototrophe.

Ce chapitre a pour but d'énumérer et de décrire les différentes techniques déjà utilisées dans la littérature pour extraire les EPS de biofilm phototrophe. Pour cela, les différentes méthodes ainsi que leur mode d'action sont synthétisés dans le **Tableau 2** et décrits dans les sous-parties en distinguant les méthodes d'extraction physiques, chimiques ou combinées.

1..1 Extraction physique

Les méthodes d'extraction physiques résultent de l'application d'une contrainte présentant suffisamment d'énergie pour rompre les interactions cellules-EPS et EPS-EPS. Ces méthodes présentent plusieurs limites : elles permettent la déstructuration du biofilm sans pour autant garantir un rendement d'extraction important. En effet, l'efficacité de la méthode est dépendante de l'intensité de la force mécanique appliquée, de la localisation et du degré d'agrégation du biofilm. De plus, contrairement aux méthodes d'extraction chimiques, les protocoles d'extraction physiques ne permettent pas de cibler une catégorie de liaison ou de type d'EPS.

Après chaque étape d'extraction, la centrifugation à des vitesses comprises entre 2000 et 5000 g permet de récupérer les EPS solubles dans la fraction liquide imprégnant le biofilm (Wingender *et al.*, 1999a). A des vitesses supérieures à 15 000 g, la centrifugation pourrait rompre les liaisons faibles entre les molécules et être utilisée comme technique d'extraction d'EPS liées.

La sonication utilise les ondes sonores (ultrasons) dont la fréquence d'audition est supérieure à 20 kHz. Les phénomènes de cavitation engendrés par ces ultrasons peuvent rompre les liaisons chimiques entre les EPS mais également les liaisons entre les EPS et la paroi cellulaire (Wang *et al.*, 2006 ; Zhang *et al.*, 2007). En amont, il est cependant nécessaire de réaliser des tests permettant de vérifier l'influence de l'intensité et du temps d'action des ultrasons pour préserver l'intégrité des cellules (Ras *et al.*, 2008b). La sonication est une méthode très utilisée pour extraire les EPS de boues activées, mais cette méthode semble être difficile à appliquer à des biofilms phototrophes au vu du taux de lyse engendré (Ge *et al.*, 2013 ; Verneuil *et al.*, 2015). Le fait de chauffer l'échantillon en contact avec de l'eau distillée à 30°C pendant 1 h peut également permettre l'extraction des EPS présents dans la matrice (Stal and De Brouwer, 2003) ; le taux de lyse induit reste l'inconvénient majeur de cette méthode. Néanmoins, de récentes études concernant l'extraction des EPS produites par des biofilms phototrophes sont réalisées en utilisant de l'eau distillée à une température de 55 °C pendant 30 min (Gonçalves *et al.*, 2018 ; Santos *et al.*, 2013).

Frølund *et al.* (1996) ont été les premiers à mettre au point une méthode d'extraction d'EPS de boues activées utilisant la résine échangeuse de cation (CER). Le protocole a ensuite été adapté à l'extraction d'EPS de biofilm phototrophe, et constitue l'une des méthodes les plus utilisées. Takahashi *et al.* (2010) ont comparé le rendement d'extraction de six méthodes d'extraction

d'un biofilm composé de diatomées (*Navicula jeffreyi*) et ont décrit la CER comme étant le protocole le plus adapté. Cette conclusion est en accord avec Ge *et al.* (2013) qui ont comparé l'efficacité de cinq méthodes pour extraire les EPS sécrétées par une algue verte (*Platymonas subcordiformis*). Sheng *et al.* (2010) et Flemming et Wingender (2010) définissent la CER comme étant la méthode d'extraction des EPS la plus efficace ; de plus, elle évite la contamination chimique et la modification des propriétés des EPS extraites.

1.2 Extraction chimique

L'acide éthylène diamine tétra-acétique (EDTA) est utilisé dans certaines études sur les EPS de biofilm phototrophe (Allen *et al.*, 2016 ; Verneuil *et al.*, 2015). L'EDTA, comme la CER, complexe les cations divalents de type Ca^{2+} et Mg^{2+} et va ainsi rompre les ponts cationiques entre les polymères de la matrice.

L'utilisation de détergents non ioniques tels que le Tween 20 (Ras *et al.*, 2011 ; Verneuil *et al.*, 2015) permet de déstructurer la matrice en modifiant les interactions hydrophobes présentes entre les différents polymères.

Le formamide (CH_3NO) et le formaldéhyde (CH_2O) sont uniquement utilisés en combinaison avec d'autres méthodes d'extraction. Bien que leur rendement d'extraction soit faible, ces solvants représentent des agents de protection pour les cellules (Fang *et al.*, 2014 ; Pan *et al.*, 2010). Le mécanisme d'action de ces molécules n'est en revanche pas connu.

Tableau 2 Modes d'action des différentes méthodes permettant l'extraction des EPS qui composent la matrice d'un biofilm phototrophe.

Désignation	Protocole	Mode d'action	Références
Méthodes d'extraction physiques			
Centrifugation	5000 g à 4°C, 15 min 2500 g, 15 min	Sépare par gravité les cellules et les EPS faiblement liées de la phase soluble	Fang <i>et al.</i> (2014) Xu <i>et al.</i> (2013)
Sonication	200 W, 3 min 100 W, 3 min		Ge <i>et al.</i> (2013) Pierre <i>et al.</i> (2014)
Broyage		Destruction mécanique des liaisons faibles entre EPS par cisaillement	
Résine échangeuse de cation (CER)	70 g g ⁻¹ VSS, 1 h à 4°C, 600 tpm Dowex, 1 h à 4°C 50 g L ⁻¹ , 1 h à 4°C 50 g g ⁻¹ MS, 1 h à 4°C	Retient les composés chargés positivement (cations divalents) et permet la rupture des ponts ioniques	Fang <i>et al.</i> (2014) Pierre <i>et al.</i> (2014) Ge <i>et al.</i> (2013) Takahashi <i>et al.</i> (2010)
Chauffage	1 h à 30°C	Dissolution des EPS par rupture des liaisons faibles	De Brouwer <i>et al.</i> (2002) Stal and De Brouwer (2003)
Méthodes d'extraction chimiques			
NaCl	1 M, 1 h à 20°C 0,05 %, 30 min à 60°C	Modifie les interactions ioniques et favorise la solubilisation des polymères polaires chargés	Staats <i>et al.</i> (2000) Xu <i>et al.</i> (2013)
Tween 20	0,25 %, 1 h à 20°C	Perturbe les interactions hydrophobes et favorise la solubilisation des polymères apolaires	Verneuil <i>et al.</i> (2015)
EDTA	1 à 2 %, 5 h à 20°C 0,3 M, 1 h à 4°C	Complexé les cations divalents et permet la rupture des ponts ioniques	Ge <i>et al.</i> (2013) Verneuil <i>et al.</i> (2015) Allen <i>et al.</i> (2016)
Formamide	0,06 mL de formamide 37 % dans 1 mL, 1 h à 4°C	Augmente le rendement d'extraction des LB-EPS et limite la lyse cellulaire	Fang <i>et al.</i> (2014)
NaOH	1 M, 3 h à 4°C	Perturbe les liaisons électrostatiques et favorise la solubilisation des polymères polaires et anioniques	Pan <i>et al.</i> (2010)
Formaldéhyde	0,42 mL de formaldéhyde à 36,5 %, 3 h à 4°C	Limite la lyse cellulaire	Pan <i>et al.</i> (2010)

Il est clair que les méthodes chimiques sont plus sélectives que les méthodes physiques car selon la nature de l'extractant utilisé, elles vont permettre l'extraction préférentielle de polymères présentant des propriétés physico-chimiques données. Par exemple, les méthodes par CER et EDTA extraient des EPS qui sont liées par des interactions ioniques au sein de la matrice. Au contraire, la méthode au Tween 20 permet une sélection des EPS liées par des liaisons hydrophobes. Cette sélectivité des méthodes d'extraction sur les EPS extraites peut expliquer que certaines de ces méthodes peuvent être spécifiques des polysaccharides ou des protéines, ce qui se traduit par un rapport polysaccharides / protéines (PS/PN) différent dans les extraits d'EPS (**Figure 11**). Toutefois, compte-tenu de la diversité chimique des EPS présentes dans une matrice, cette sélectivité des méthodes est parfois difficile à interpréter : en effet, comme illustré sur la **Figure 11**, alors que la CER et l'EDTA ont le même mode d'action, il semble que la CER favorise l'extraction des protéines en comparaison de l'EDTA (Ge *et al.*, 2013). Jahn et Nielsen (1995) ont également montré que l'utilisation de la CER permet une extraction efficace des protéines présentes au sein de la matrice. De même, après l'extraction des EPS par un protocole utilisant successivement le Tween et l'EDTA, une majorité de protéines ont été extraites d'un biofilm composé de la diatomée *N. palea* (Verneuil *et al.*, 2015). Ces données tendraient donc à remettre en cause le fait que les polysaccharides soient les composants majoritaires des EPS d'un biofilm phototrophe.

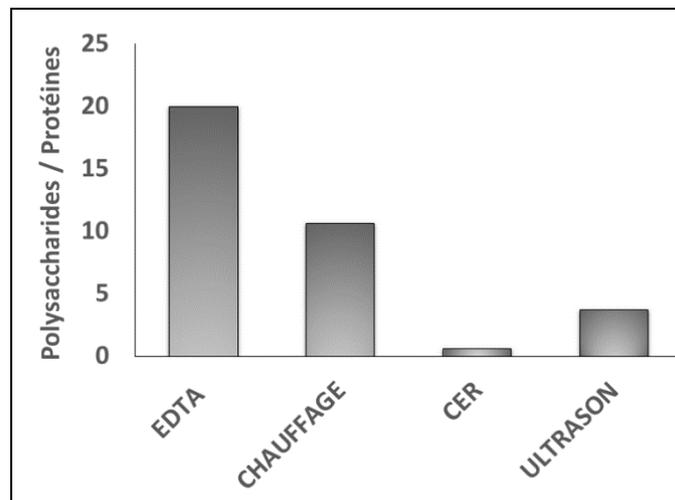


Figure 11 Rapport Polysaccharides / Protéines des EPS extraites d'un biofilm composé d'algues vertes (*Platymonas subcordiformis*) par différentes méthodes d'extraction chimiques et physiques. D'après Ge *et al.* (2013)

Au vu des différences dans les mécanismes d'action des méthodes d'extraction physiques et chimiques, il peut être intéressant de combiner plusieurs méthodes afin d'augmenter la quantité des EPS extraites permettant ainsi une meilleure appréhension de la diversité moléculaire et des propriétés physico-chimiques des EPS. Dans un premier temps, l'application d'une méthode physique peut être réalisée sur le biofilm pour détacher les EPS faiblement liées sans détruire les cellules mais permettant une déstructuration de la matrice et facilitant ainsi la pénétration des agents chimiques au sein de la matrice. Une ou plusieurs méthodes chimiques peuvent ensuite être appliquées de façon séquentielle afin de cibler différents types d'EPS (polaires, apolaires, chargées, etc.).

1.3 Méthodes d'extraction combinées en séquentiel

Quelle que soit la nature du biofilm étudié, l'association de techniques d'extraction physiques et chimiques sur un même échantillon est de plus en plus utilisée pour augmenter l'efficacité d'extraction des EPS. L'effet bénéfique de la combinaison des méthodes a été étudié pour l'extraction des EPS présents au sein d'agrégats de boues activées (Adav and Lee, 2008 ; Liu and Fang, 2002; Ras *et al.*, 2008b).

Verneuil *et al.* (2015) ont adapté une combinaison de méthodes mise au point pour des biofilms d'épuration (autotrophes et hétérotrophes) (Ras *et al.*, 2011) afin d'extraire les EPS de biofilms composés d'une espèce de diatomée (*N. palea*) ; ils appliquent de manière successive un traitement au Tween 20 puis à l'EDTA sur des échantillons préalablement débarrassés des EPS solubles. Fang *et al.* (2014) ont quant à eux, utilisé la CER, mais en appliquant un prétraitement au formamide, pour extraire les EPS de biofilms phototrophes principalement composés de diatomées et d'algues vertes.

2. Contrôle de la lyse cellulaire

Lors d'une extraction des EPS, il faut être vigilant sur le maintien de l'intégrité des parois cellulaires dans le but d'éviter la contamination des EPS extraites par du matériel intracellulaire. Dans la plupart des études, l'évaluation du degré de lyse cellulaire est réalisée par quantification de l'ADN ou de l'ATP dans les extraits ou bien par mesure de l'activité de la Glucose-6-phosphate déshydrogénase (enzyme intracellulaire). La méthode la plus couramment utilisée est la quantification de l'ADN présent dans l'extrait obtenu : une forte teneur en ADN indique une contamination importante des extraits par du matériel intracellulaire

(Ge *et al.*, 2013). Cependant, l'ADN étant naturellement présent dans les EPS (Randrianjatovo-Gbalou *et al.*, 2017), il est nécessaire d'avoir une idée de sa quantité dans la matrice (Liu and Fang, 2002). De plus, le niveau de contamination de l'ADN résultant des dommages cellulaires est incertain. Le dosage de la glucose-6-phosphate déshydrogénase est également utilisé par certains auteurs pour évaluer la lyse des membranes cellulaires (Ras *et al.*, 2008b ; Wingender *et al.*, 2001). Cependant, comme toute enzyme, elle peut être dénaturée dans le cas de fortes températures ou de milieux basiques (McSwain *et al.*, 2005) induisant une sous-estimation du résultat final. De plus, certains extractants chimiques utilisés (formaldéhyde ou acide) peuvent inactiver l'enzyme (Guo *et al.*, 2014). Un dosage de l'ATP dans les extraits est également utilisé dans le contrôle de la lyse cellulaire (Takahashi *et al.*, 2010). L'ATP étant une molécule à courte durée de vie (rapidement biodégradée), elle ne permet pas une mesure fiable de la lyse cellulaire. Récemment, Guo *et al.* (2014) ont démontré que le dosage du N-acétylglucosamine (sucre présent dans la paroi de certaines algues et des bactéries) est une méthode efficace dans l'évaluation de l'intégrité des parois cellulaires suite à diverses méthodes d'extraction des EPS de boues activées.

Ainsi, il existe actuellement plusieurs méthodes permettant le contrôle de la contamination des extraits d'EPS par du matériel intracellulaire. Cependant, la détection de ces différents éléments dans les fractions extraites n'est pas obligatoirement un signe de lyse cellulaire ayant eu lieu au cours de la méthode d'extraction. De plus, la vérification de la lyse cellulaire des extraits obtenus n'est pas systématiquement réalisée par tous les auteurs. Il est donc important de développer une nouvelle méthode permettant une évaluation efficace des dommages cellulaires causés au cours du protocole d'extraction des EPS de biofilms phototrophes.

3. Méthodes de quantification des EPS

Comme cela est le cas pour l'extraction, les méthodes de quantification des EPS extraites sont diverses, ce qui complique la comparaison des résultats obtenus. De plus, en fonction des études, la quantité de protéines ou de polysaccharides extraite peut être exprimée en mg L^{-1} , en mg mg^{-1} de MS, en mg COT mL^{-1} , ce qui complique la comparaison des résultats obtenus.

3.1 Quantification des protéines par dosages colorimétriques

La quantification des protéines présentes dans les extraits d'EPS est principalement effectuée par des méthodes colorimétriques *in vitro*. En effet, la réaction chimique entre les protéines et le réactif (qui diffère en fonction de la méthode de dosage utilisée) produit une coloration dont l'intensité est proportionnelle à la concentration des protéines à doser. Quelle que soit la méthode (**Tableau 3**), une gamme est généralement réalisée avec l'albumine sérum bovin (BSA) utilisée comme étalon et les protéines dosées sont donc quantifiées en g ou mg d'équivalent BSA.

Tableau 3 Méthodes de dosage colorimétrique employées dans la littérature pour quantifier les protéines présentes dans les extraits d'EPS.

Méthode	Réactifs utilisés	Références
BCA	Acide bicinchonique	Smith <i>et al.</i> , 1985
Bradford	Bleu de Coomassie	Bradford, 1976
Lowry	Biuret	Lowry <i>et al.</i> , 1951
Lowry modifié	Biuret	Frølund <i>et al.</i> , 1996

La **méthode BCA** (*BiCinchoninic Acid assay*) est un dosage colorimétrique basé sur la réduction Cu (II) en Cu (I) par les protéines en milieu basique. L'acide bicinchonique interagit de manière spécifique avec le Cu (I), visible par la formation d'un complexe de couleur pourpre ayant une absorption à 560 nm (Smith *et al.* 1985).

La **méthode de Bradford** est basée sur la complexation du bleu de Coomassie avec des acides aminés basiques (arginine, histidine, lysine) et les résidus hydrophobes des acides aminés présents sur la chaîne des protéines (Bradford, 1976). Un des inconvénients de cette technique est qu'elle ne permet pas la quantification des peptides et des protéines de faibles poids moléculaires (inférieur à 3000 Da).

La **méthode de Lowry**, nommée réaction de Biuret, est quant à elle plus sensible et permet de mettre en évidence de petits peptides et en particulier les acides aminés aromatiques (tyrosine, tryptophane). Pour cela, les protéines extraites forment, en milieu basique, un complexe bleu-violet avec les ions Cu²⁺ (Waterborg and Matthews, 1984). Cependant, la fiabilité de cette technique est faible au vu des possibles interférences avec les substances

humiques, les lipides et les détergents : une surestimation de la quantité de protéines est donc fréquente. La méthode de Lowry modifiée distingue le dosage des acides humiques et des protéines et permet donc une meilleure sensibilité de la méthode (Frølund *et al.*, 1996).

Ces différentes méthodes de quantification étant relatives, les concentrations en protéines sont exprimées par rapport à une protéine étalon. La précision des méthodes peut être différente en fonction des solvants utilisés lors de l'extraction, du réactif utilisé lors du dosage ainsi que des protéines ciblées. Un biais peut donc être présent lorsque l'on compare des concentrations en protéines obtenues lorsque les solvants ou les réactifs sont différents (Ras *et al.*, 2008a).

3.2 Quantification des polysaccharides par dosages colorimétriques

La quantification des sucres totaux est basée sur un dosage colorimétrique des monomères obtenus après hydrolyse des polysaccharides en milieu acide. Le phénol (Dubois *et al.*, 1956) et l'anthrone (Dreywood, 1946) sont les réactifs les plus utilisés. La méthode à l'anthrone décrite par Dreywood (1946) permet un dosage des sucres totaux qui possèdent des fonctions carbonyles (C=O). La réaction entre l'anthrone et les sucres se traduit par l'apparition d'une couleur verte dont l'intensité, proportionnelle à la concentration, est mesurée à 620 nm. Récemment, Rondel *et al.* (2013) ont mis au point une technique de dosage à l'anthrone permettant la quantification des acides uroniques et des sucres neutres de façon simultanée, sans interférence des protéines. La méthode à l'anthrone a cependant tendance à sous-estimer les pentoses alors qu'elle quantifie correctement les hexoses (Koehler, 1952). La méthode de Dubois (Dubois *et al.*, 1956) est également une technique de dosage de référence des polysaccharides. Elle est basée sur la transformation des sucres en dérivés du furfural et sur la combinaison de ces dérivés avec le phénol. Cette réaction conduit à la coloration du milieu en rose-saumon dont l'intensité est proportionnelle à la concentration en polysaccharides. Quelle que soit la méthode, une gamme est généralement réalisée avec du glucose utilisé comme étalon et les polysaccharides sont quantifiés en g ou mg d'équivalent glucose.

3 Communauté microbienne et composition des EPS au sein d'un biofilm : phénomène dynamique fonction des paramètres externes

Une modification des facteurs environnementaux crée une perturbation au sein de l'écosystème aquatique qui engendre un stress pour les communautés algales et les cyanobactéries présentes au sein du biofilm. Battin *et al.* (2016) ont décrit le biofilm phototrophe présent dans une rivière comme « une peau microbienne dynamique » influencée par les facteurs chimiques et physiques environnants. Leur très grande diversité structurelle et fonctionnelle leur confère un avantage adaptatif en cas de stress permettant une meilleure stabilité à une modification des conditions environnementales. Les facteurs de stress peuvent cependant modifier la densité des espèces phototrophes et donc la quantité de « carbone vivant » contenu dans la colonne d'eau. Une étude de la biomasse représente donc un indicateur de la dynamique de la matière organique en réponse aux modifications favorables ou défavorables du milieu. Les conditions environnementales peuvent également jouer un rôle important dans la distribution et la composition des EPS produites par les biofilms phototrophes (Fang *et al.*, 2014). Il est même possible que l'excrétion des EPS représente une réponse physiologique face aux fluctuations des conditions environnementales. Les communautés microbiennes sont sujettes à des modifications pouvant entraîner une perturbation du fonctionnement global de l'écosystème.

En réponse à une perturbation, les effets (direct, indirect) du stress sur une communauté dépendent de la sensibilité des organismes et de la stabilité de la communauté. La résistance est généralement décrite comme la capacité d'une communauté à rester inchangée alors qu'elle est soumise à une perturbation (Pimm, 1984). La résilience quant à elle est souvent associée à la « capacité des microorganismes à récupérer » (Song *et al.*, 2015). Ainsi, la résilience peut être définie comme la vitesse de retour à la composition initiale de la communauté (Allison and Martiny, 2008). Cela s'accorde avec la métaphore de l'élastique qui subit une déformation et revient *in fine* à l'état initial (Song *et al.*, 2015).

Température et lumière

Dans un écosystème aquatique, la lumière joue un rôle fondamental dans la structure, la croissance et l'activité fonctionnelle des microorganismes présents au sein d'un biofilm (Battisti *et al.*, 2016 ; Sabater *et al.*, 2002 ; Stevenson *et al.*, 1996). En effet, les micro-algues et les cyanobactéries étant des microorganismes photo-autotrophes, la lumière représente la principale source énergétique nécessaire à la production primaire et la croissance du biofilm. Ainsi, en utilisant la chlorophylle *a* (chl *a*) comme estimateur de la biomasse, Di Pippo *et al.* (2012) ont confirmé le rôle essentiel de la lumière et définissent une valeur minimale du rayonnement photosynthétiquement actif de $60 \mu\text{mol s}^{-1} \text{m}^{-2}$ nécessaire à la croissance d'un biofilm composé de cyanobactéries et d'algues vertes dans un bioréacteur. Cordoba-Castro *et al.* (2012) ont quant à eux testé l'effet de trois intensités lumineuses (80, 130 et $180 \mu\text{mol s}^{-1} \text{m}^{-2}$) sur la croissance de l'algue verte *Scenedesmus obliquus* et ont obtenu une vitesse de croissance maximale pour la plus forte intensité lumineuse. De la même manière, Bengtsson *et al.* (2018) ont observé une biomasse et une production primaire du biofilm plus faibles lorsque le biofilm est exposé à l'intensité lumineuse la plus faible (**Figure 12**). Cette différence de biomasse est visible à l'œil nu sur les coupons servant de support au développement du biofilm. Par des analyses de métatranscriptomique, Bengtsson *et al.* (2018) ont montré que l'effet d'une modification de l'intensité lumineuse induit un changement plus conséquent dans la composition des microorganismes phototrophes que des bactéries et des consommateurs. Cependant, en réponse à une variation de luminosité, ils n'observent pas de différence significative dans la proportion des taxons majoritaires au sein de la communauté phototrophe.

Pour résister à de fortes valeurs d'irradiation, les cellules algales mettent en place différents mécanismes de défense afin de limiter les effets délétères de la photo-inhibition. Par exemple, Davis (1972) a observé la présence de pigments caroténoïdes au niveau du cytoplasme dans le but de protéger les chloroplastes des rayonnements UV en cas d'émersion du biofilm. Au cours d'une expérimentation, Pichrtová *et al.* (2013) ont observé une augmentation significative de la teneur en composés phénoliques produits par l'algue verte *Zygnema* suite à une exposition aux UV. Ils ont conclu qu'il s'agissait d'un moyen de protection des cellules algales en réponse au stress. Enfin, la migration verticale est également une stratégie adoptée par les micro-algues ou les cyanobactéries (Lütz *et al.*, 1997 ; Sundbäck *et al.*, 1997). Les

cellules algales vont optimiser leur position dans la communauté, pour cela elles vont migrer vers l'intérieur du biofilm et éviter la surface en contact avec le milieu environnant.

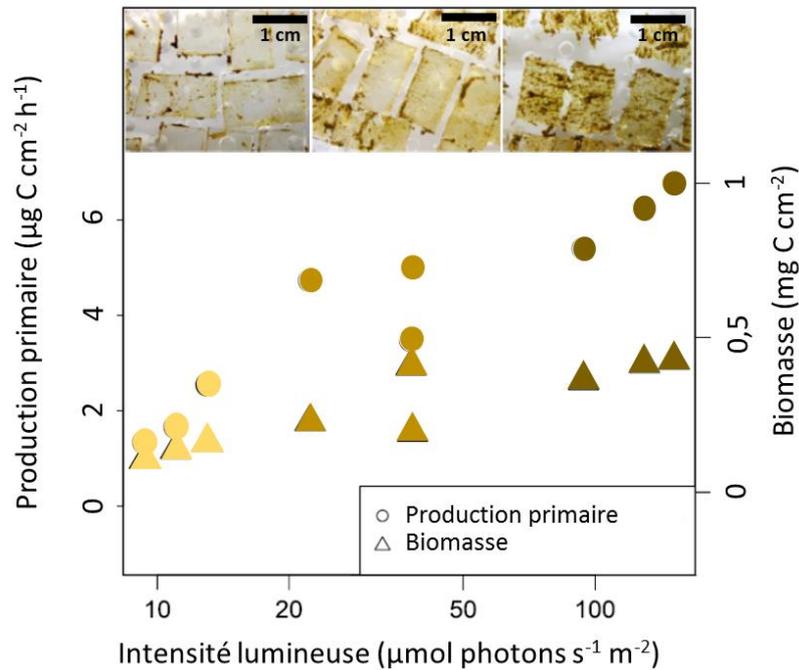


Figure 12 Effet de l'intensité lumineuse sur la production primaire et la biomasse d'un biofilm complexe. Adaptée d'après Bengtsson *et al.* (2018).

La température représente un facteur environnemental clé pour le développement et la reproduction des micro-algues et des cyanobactéries au sein d'un biofilm. En conséquence du réchauffement climatique, les microorganismes phototrophes sont sujets à des perturbations thermiques (étiage prolongé) induisant un stress cellulaire important. Après un réchauffement de l'eau circulante, une augmentation de la biomasse algale a été décrite (DeNicola, 1996). Villanueva *et al.* (2011) ont également observé une vitesse de croissance plus importante pour des biofilms cultivés à des températures plus élevées. Une augmentation de la température de l'eau de rivière pourrait donc favoriser la recolonisation du biofilm suite à une perturbation. Staehr et Sand-Jensen (2006), qui ont étudié l'influence d'une augmentation de la température de l'eau de 2, 4 et 6°C sur l'activité fonctionnelle du biofilm, ont observé une augmentation de la production primaire lorsque la température augmente. Villanueva *et al.* (2011) ont évalué les conséquences d'une augmentation de 3°C de l'eau de rivière (température initiale de 12°C) sur la croissance et l'activité fonctionnelle des microorganismes. Contrairement à Staehr et Sand-Jensen (2006), ils ont observé que la production primaire et la biomasse ne sont pas significativement différentes à 12°C qu'à 15°C même si la famille de microorganismes

phototrophes majoritaires varie. En effet, Di Pippo *et al.* (2012) ont observé que la température de l'eau influence significativement la structure et la diversité des biofilms de rivière, avec une modification des espèces dominantes lorsque la température augmente (température de 20 et 30°C). Dans un biofilm composé de cyanobactéries et d'algues vertes, ils ont noté une prédominance des algues vertes à 20°C ; au contraire les cyanobactéries sont les espèces majoritaires à 30°C. Lambert *et al.* (2016) ont évalué l'influence de la température sur les facultés que possède un biofilm phototrophe à faire face à une exposition au cuivre et ont observé une proportion d'algues vertes moins importante au sein d'un biofilm phototrophe lorsque la température augmente. Concernant les communautés bactériennes, Boulêtreau *et al.* (2014) ont observé une variation structurelle de la communauté des bactéries dénitrifiantes qui se traduit par une modification de leurs activités suite à une augmentation de la température de 2,5 °C (température initiale de 17°C).

Si les effets d'une perturbation sur la structure et l'activité fonctionnelle des communautés phototrophes sont relativement bien appréhendés, le nombre d'études qui s'intéresse aux effets de ces variations sur la production des EPS reste assez limité même si cette réponse semble être spécifique aux espèces présentes au sein du biofilm. En effet, Nicolaus *et al.* (1999) ont observé qu'une augmentation de la température engendre une diminution de la production d'EPS par la cyanobactérie *Spirula sp.* Au contraire, une augmentation de la température n'a pas modifié de façon significative la quantité d'EPS produite par *Nostoc species* (Otero and Vincenzini, 2004).

En modifiant la composition et la diversité des microorganismes qui composent le biofilm, la perturbation a un impact indirect sur la production et la composition des EPS. Di Pippo *et al.* (2012) ont évalué l'influence de la température et de la luminosité sur la réponse d'un biofilm phototrophe d'eau douce. Ils ont montré que l'intensité lumineuse et la température conditionnaient significativement la production de polysaccharides par les cyanobactéries (*Synechocystis species*) et les algues vertes (*Chlorococcum species*) composant le biofilm. Ils ont obtenu une quantité d'EPS extraites plus importante lorsque la température de l'eau augmente (température de 20 et 30°C), se traduisant par une teneur en acide uronique plus importante.

Indépendamment de la température, Di Pippo *et al.* (2012) ont montré qu'une diminution de l'irradiation de 120 à 60 $\mu\text{mol s}^{-1} \text{m}^{-2}$ induit une augmentation de la quantité des EPS extraites. Toutefois, plusieurs autres auteurs suggèrent qu'une intensité lumineuse élevée favorise la production des EPS par les micro-algues ou les cyanobactéries présentes au sein du

biofilm (Friedman *et al.*, 1991 ; Han *et al.*, 2015 ; Raungsomboon *et al.*, 2006 ; Trabelsi *et al.*, 2009). De même, Ge *et al.* (2014) ont observé une augmentation de la quantité des EPS produites par les espèces de cyanobactéries *Microcoleus vaginatus* et *Nostoc species* lorsque l'intensité lumineuse augmente de 40 à 80 $\mu\text{mol s}^{-1} \text{m}^{-2}$. En revanche, une modification de cette intensité lumineuse n'affecte pas significativement la composition des monomères composant les polysaccharides présents dans la matrice.

La durée des cycles nycthémeraux a également une influence sur la quantité de polymères présents au sein de la matrice. En effet, si les EPS solubles sont sécrétées quelle que soit l'intensité lumineuse perçue par le biofilm, les EPS liées sont produites uniquement en présence de lumière. Dayananda *et al.* (2007) ont observé une quantité des EPS extraites plus élevée lorsque la cyanobactérie *Botryococcus braunii* est exposée à une lumière continue et non intermittente (16 h d'éclairement et 8 h d'obscurité), mesurée par la méthode de Dubois suite à une extraction à l'éthanol. De même, Raungsomboon *et al.* (2006) ont noté que plus la période d'obscurité est longue moins la quantité des EPS produites par la cyanobactérie *G. gélatinosa* est importante. Enfin De Brouwer and Stal (2002a) ont observé une diminution de la quantité des EPS fortement liées lorsque les diatomées *Nitzschia species* et *Cylindrotheca closterium* sont placées à l'obscurité : ils ont estimé que 90 % des EPS liées sécrétées en présence de lumière sont dégradées pendant la période d'obscurité. Ces résultats confirment une précédente étude réalisée par Smith et Underwood (1998) qui décrivent les diatomées comme étant des organismes hétérotrophes lorsqu'elles sont placées à l'obscurité. Les EPS peuvent donc, en fonction des conditions d'éclairement, être utilisées comme substrats par les micro-algues et les cyanobactéries composant le biofilm (Zhang and Bishop, 2003).

Delattre *et al.* (2016) soulignent la difficulté d'appréhender les effets d'une perturbation de la luminosité ou de la température sur la quantité et la nature des EPS produites. Pour pallier ce manque, il est donc nécessaire de produire un effort de recherche afin d'évaluer la potentielle influence de ces paramètres sur les EPS sécrétées par les communautés microbiennes.

Conditions hydrodynamiques

La vitesse d'écoulement et les forces de cisaillement qui en résultent influencent la structure et le développement du biofilm ainsi que la nature et l'activité des microorganismes. La vitesse d'écoulement d'un cours d'eau a un effet sur la structure du biofilm dès la première étape d'accrétion en modifiant l'adhésion des cellules bactériennes sur le support qui représente

le « tapis microbien » conditionnant la croissance et l'adhésion de micro-algues. En effet, Lecuyer *et al.* (2011) ont observé qu'une augmentation des contraintes de cisaillement entraîne une diminution du nombre de bactéries adhérees sur une surface. Suite à des études réalisées par modélisation, Coundoul *et al.* (2015) ont conclu que les contraintes de cisaillement peuvent retarder de façon importante la formation et le développement de biofilms naturels sur de nouveaux supports. Les contraintes de cisaillement ont également un effet sur la phase d'érosion du biofilm : de fortes contraintes appliquées sur la surface du biofilm peuvent constituer un stress pour les cellules algales et les cyanobactéries (Fink *et al.*, 2015 ; Willkomm *et al.*, 2007). En effet, le temps de séjour des microorganismes sur le support augmente proportionnellement aux vitesses de cisaillement tant que l'on est en dessous de la valeur seuil critique d'érosion. Lorsque le seuil de contrainte est atteint, la probabilité de détachement du biofilm augmente (Mbaye, 2011).

Celmer *et al.* (2008) ont fait un lien entre la contrainte de cisaillement et la morphologie du biofilm. Les biofilms qui se développent dans des cours d'eau à faible vitesse d'écoulement ont plutôt tendance à avoir des structures peu denses mais épaisses. Au contraire, les biofilms qui subissent une forte vitesse d'écoulement présentent une cohésion entre les microorganismes plus importante et une épaisseur moindre. Besemer *et al.* (2007) ont également observé une modification de l'architecture des biofilms avec une variation des vitesses d'écoulement. En effet, les biofilms peuvent développer des structures en forme de « serpent » qui oscillent dans la colonne en présence de fortes contraintes de cisaillement. Ce sont des structures complexes qui permettent au biofilm d'augmenter son élasticité afin de limiter le détachement précoce du biofilm.

Les conditions hydrodynamiques déterminent le régime d'écoulement de l'eau et la structure du biofilm modulant ainsi l'accès aux nutriments présents dans la colonne. En effet, la diffusion des substrats au sein du biofilm peut être limitée lorsque le biofilm présente une structure dense et compacte. En contrepartie, une vitesse d'écoulement importante réduit l'épaisseur du biofilm, ce qui peut diminuer la couche limitante de diffusion. Cette limite de diffusion des nutriments au sein du biofilm peut expliquer le fait qu'un biofilm mature qui se développe dans des eaux avec une faible vitesse d'écoulement développe des structures filamenteuses afin d'augmenter la turbulence et la surface et donc faciliter l'accès aux nutriments pour les cellules du biofilm (Parvinzadeh *et al.*, 2015 ; Stewart, 2012).

Simoes *et al.* (2007) ont montré que les cellules d'un biofilm générées sous un écoulement turbulent ont une taille réduite, avec une diminution de leur activité métabolique. Au sein d'un

biofilm complexe, le compartiment hétérotrophe est moins sensible que les phototrophes aux contraintes de cisaillement (Schmidt *et al.*, 2018).

En conclusion, une vitesse d'écoulement intermédiaire semble constituer la condition de croissance optimale pour un biofilm phototrophe : apport en nutriments suffisant et forces de cisaillement modérées.

En ce qui concerne la production des EPS, Schmidt *et al.* (2018) ont montré que la sécrétion de polymères est une réponse physiologique des micro-algues ou des cyanobactéries suite à une modification des contraintes de cisaillement. Une augmentation des contraintes de cisaillement sur un biofilm jeune et fin diminue significativement la sécrétion des polysaccharides et des protéines. En revanche, les effets de ces contraintes sur la sécrétion des EPS par les cellules sont atténués dans un biofilm mature et plus épais. De même, Celmer *et al.* (2008) observent une proportion des polymères composant la matrice différente en fonction de l'épaisseur du biofilm. Ils ont montré qu'au sein de la matrice d'un biofilm fin, le rapport protéines / polysaccharides est plus important que pour un biofilm avec une épaisseur plus importante.

Disponibilité en nutriments

La quantité et la nature des nutriments disponibles dans la colonne d'eau déterminent la biomasse d'un biofilm mature. Villanueva *et al.* (2011) ont évalué l'influence d'une variation de la concentration d'azote et de phosphore dans le milieu sur la formation et la croissance d'un biofilm. En quantifiant la chl *a*, ils ont observé une biomasse des micro-algues et des cyanobactéries significativement inférieure à celle des biofilms qui se développent en présence de fortes concentrations en azote et phosphore, quel que soit le stade de maturité du biofilm. Au contraire, il n'y a pas de différence significative dans l'abondance des bactéries hétérotrophes présentes au sein du biofilm lorsque la concentration de ces éléments est modifiée.

L'abondance relative des groupes de microorganismes phototrophes peut être modulée en fonction de la concentration en phosphore et en azote présents dans le milieu. En effet, Villanueva *et al.* (2011) ont observé une augmentation de l'abondance relative des diatomées lorsque la concentration de ces éléments est plus importante. Cette augmentation modifie

également le groupe majoritaire : lorsque la concentration en azote et en phosphore est faible, les cyanobactéries représentent le groupe le plus abondant, certainement grâce à leur capacité à fixer le N₂, alors que ce sont les algues vertes qui sont majoritaires lorsque la concentration est augmentée.

Une modification dans la concentration des nutriments disponibles pour la croissance des micro-algues et des cyanobactéries peut modifier la nature et la quantité des EPS produites. Par exemple, Durmaz et Sanin (2001) ont étudié l'effet d'une modification du rapport azote / carbone (N/C) sur la composition des EPS sécrétées par la cyanobactérie *P. cruentum*. Ils ont observé une modification de la distribution des protéines et des polysaccharides en fonction des valeurs N/C : en réponse à un faible rapport (< 5), la sécrétion des polysaccharides augmente. Dans certains cas, la carence en nutriments stimule la sécrétion des EPS : elle est par conséquent proposée comme stratégie pour la culture des microorganismes phototrophes afin d'optimiser la productivité (Delattre *et al.*, 2016). Par exemple, Soanen *et al.* (2016) ont observé une sécrétion des EPS plus importante par *P. marinum* lorsque le milieu de culture est appauvri en azote. De plus, une carence en phosphore peut également créer un stress pour les micro-algues et les cyanobactéries qui se traduit par une production de polysaccharides plus importante comparée aux protéines. En effet, Austin *et al.* (2004) ont quantifié les polysaccharides et les protéines sécrétés par *Streptomyces platensis* suite à une carence en P et ont estimé que les polysaccharides représentaient 63 % du poids sec. Cependant la réponse au stress induit par une carence en P est spécifique à l'espèce. En effet, si de nombreux auteurs ont observé une augmentation de la sécrétion des EPS lors d'une diminution de la quantité de P dans le milieu, Fattom et Shilo (1984) n'ont noté aucune différence lors d'une étude réalisée sur *Phormidium species* alors que Lama *et al.* (1996) ont observé quant à eux une diminution de la quantité des EPS sécrétées par *Anabaena cylindrica*.

Assèchement des cours d'eau

L'assèchement est un phénomène naturel considéré comme une perturbation grave et fréquente (Lake, 2000 ; Larned *et al.*, 2010). En effet, en France de 25 à 40 % du réseau hydrographique est constitué de cours d'eau à fonctionnement intermittent (Snelder *et al.*, 2013). Dans un contexte de changement climatique et de fortes pressions anthropiques (agriculture, industrie, modifications de la continuité hydrologique), la fréquence et l'intensité

des périodes d'assèchement devraient s'amplifier dans les années à venir (Brooks, 2009 ; Sabater et Barceló, 2010). Arrivant de façon brutale ou progressive, ce manque d'eau induit un stress de dessiccation pour les organismes suite à leur émergence. Si les poissons et les macro-invertébrés peuvent se déplacer afin d'éviter ce stress, les organismes benthiques qui sont fixés à leur support sont contraints de développer des stratégies pour survivre et résister à une période d'assèchement. De plus, pour les micro-algues et les cyanobactéries, un écoulement de surface réduit ou absent peut induire des stress cumulatifs : une radiation UV plus importante, une osmolarité plus élevée, des températures extrêmes, des carences en nutriments, de fortes concentrations en polluants ainsi qu'une augmentation des pressions de broyage.

Différentes études ont montré que les biofilms développent différentes stratégies de résistance et de résilience pour faire face à une période d'assèchement. Ces stratégies d'adaptation peuvent se produire à l'échelle du biofilm mais également à l'échelle de l'individu ou de la cellule (**Figure 13**). En effet, Davis (1972) a recensé plus de 138 espèces d'algues vertes, 60 espèces de cyanobactéries et 36 espèces de diatomées résistantes à une période de dessiccation.

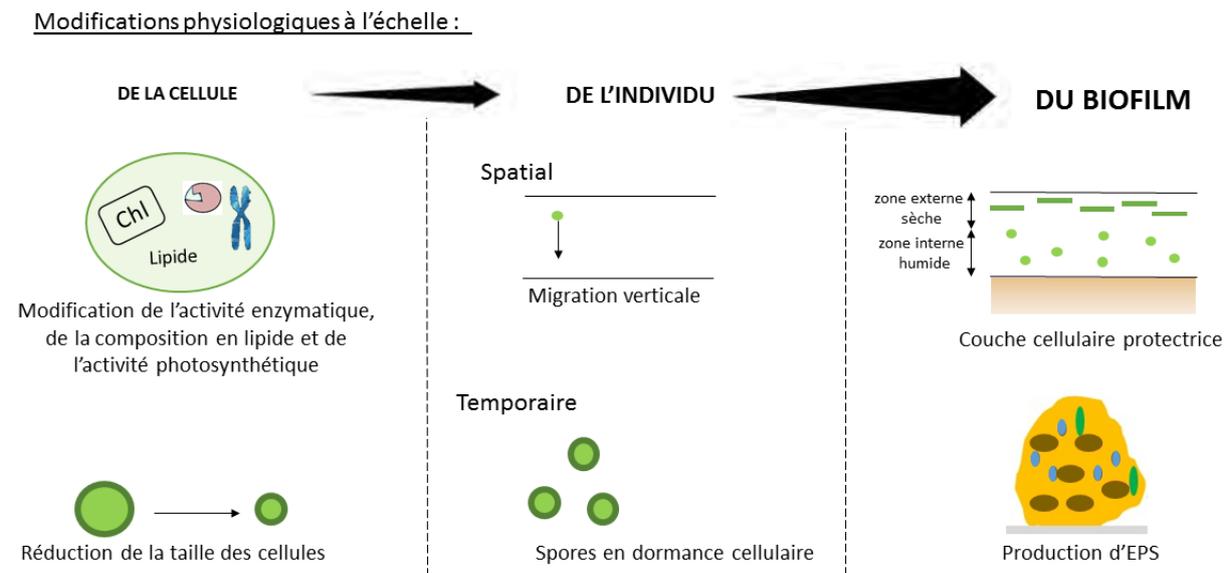


Figure 13 Différentes stratégies utilisées par les microorganismes benthiques pour faire face à la dessiccation. D'après Roux-Barthès (2014)

Peterson (1986) considère l'assèchement comme une pression de sélection pouvant entraîner une production ou une extinction de la biomasse de certaines espèces phototrophes. La durée de l'assèchement influence la structure des communautés au sein du biofilm. En effet, une étude réalisée sur des biofilms essentiellement composés de cyanobactéries filamenteuses

et d'une faible proportion de diatomées et d'algues vertes a montré que les modifications structurelles sont d'autant plus marquées que la durée de la perturbation est importante (Barthès *et al.*, 2015a). Après une courte période d'assèchement de 1 à 2 semaines et remise en eau, les cyanobactéries sont largement majoritaires même si une augmentation de la proportion de diatomées est observée. En revanche, lorsque la durée de la perturbation est de 8 semaines, les cyanobactéries ne représentent plus qu'une faible proportion de la communauté phototrophe majoritairement composée de diatomées. Une deuxième étude réalisée sur des biofilms prélevés au sein du delta Peace-Athabasca au Canada révèle une différence significative dans l'abondance de certaines espèces de diatomées en fonction des conditions hydrologiques (Connor *et al.*, 2018). En période de sécheresse, *Epithemia* représente 41 % de l'abondance relative d'un biofilm alors qu'elle représente seulement 1 % lorsque celui-ci est immergé.

Lorsque les conditions ne sont pas favorables à la croissance, les microorganismes phototrophes ont la possibilité de modifier leurs morphologie et leur métabolisme. Les cellules vont produire des spores en dormance cellulaire, appelés « *resting spores* » pour faire face à la dessiccation (Agrawal, 2009 ; Coleman, 1983 ; McQuoid et Hobson, 1996) ; cette stratégie d'adaptation se traduit par un arrêt temporaire de la croissance (Fogg, 2001). Bien que les algues marines représentent la majorité des études, la formation de spores a été décrite chez quelques espèces de diatomées d'eau douce (Hargraves, 1983 ; Lund, 1954). Souffreau *et al.* (2010) ont étudié la tolérance de 17 espèces de diatomées benthiques à la dessiccation et ont observé une meilleure tolérance des spores en dormance en comparaison à des cellules végétatives. Ces spores en dormance peuvent se maintenir pendant de nombreuses années dans des conditions défavorables de croissance (Stosch and Fecher, 1979). A l'échelle de l'individu, la migration verticale est la seconde stratégie mise en place par les micro-algues et les cyanobactéries pour faire face à la dessiccation (Hay *et al.*, 1993 ; Jesus *et al.*, 2006). Les cellules algales vont optimiser leur position dans la communauté, pour cela elles vont migrer vers l'intérieur du biofilm et éviter la surface en contact avec le milieu environnant.

Le mécanisme fonctionnel le plus sensible à la dessiccation est la photosynthèse. De ce fait, une régulation et un contrôle efficace de l'absorption de la lumière par l'appareil photosynthétique semble être indispensable afin de limiter les conséquences d'une période d'assèchement sur le biofilm. En condition de stress, les cellules des microorganismes phototrophes sont capables de diminuer de façon réversible leur activité photosynthétique (Hanelt, 1998). Le stress engendré suite à une dessiccation entraîne donc une cessation

temporaire de l'activité photosynthétique de la communauté phototrophe (Fogg, 2001 ; Karsten, 2012 ; Lunch *et al.*, 2013). En estimant le rendement quantique du photosystème II, Barthès *et al.* (2015b) observent un rebond de l'activité photosynthétique après 13 jours de remise en eau quelle que soit la durée de la perturbation. Cependant, dû à une modification de la structure des communautés phototrophes, le rendement est différent du rendement initial, avec une différence d'autant plus marquée que la durée de la perturbation est longue.

Pour faire face à la dessiccation et éviter la déshydratation, les algues vont utiliser une stratégie d'autoprotection en créant une couche cellulaire protectrice superficielle (Decho, 2000). L'algue verte *Klebsormidium crenulatum* forme des structures multicouches apparentées à des nattes sur la partie extérieure du biofilm (Holzinger *et al.*, 2011), ce qui permet de limiter la déperdition d'eau. De plus, les cellules algales et les cyanobactéries produisent des EPS pour former une matrice dense qui favorise la rétention d'humidité au sein de l'agrégat (Du *et al.*, 2010 ; Knowles et Castenholz, 2008). En effet, la sécrétion de polysaccharides de faibles poids moléculaires tels que le saccharose protège les membranes cellulaires des dommages potentiellement causés par la déshydratation (Santarius, 1973) et augmente la tolérance des microorganismes à faire face à la dessiccation (Yancey, 2005). En effet, lorsque la quantité d'eau est limitée, ces polysaccharides se lient aux autres composants de la matrice ainsi qu'aux membranes permettant un maintien de la structure de l'agrégat. Ces résultats indiquent que les cellules présentes au sein d'un biofilm ont une meilleure capacité de résistance à la dessiccation qu'une cellule isolée.

En réponse à un stress provoqué par une période d'assèchement, une modification de la taille des cellules a également été observée (Holzinger *et al.*, 2011). Par exemple, le diamètre des cellules de l'algue verte *K. crenulatum* diminue de 50 à 60 % suite à une période d'assèchement, ce qui provoque des altérations et un remaniement structurel du cytosol (**Figure 14**). De plus, les cellules algales sont capables d'augmenter l'activité anti-oxydante des enzymes en période d'assèchement. Par exemple, les activités de la catalase et de la superoxyde dismutase présentes au sein des cellules de la cyanobactérie *Tolypothrix scytonemoides* sont augmentées de 42 et 8 % en période d'assèchement (Rajendran *et al.*, 2007). Enfin, la composition des acides gras présents dans les cellules de *T. scytonemoides* est différente si ces cellules subissent ou non un stress hydrique (Rajendran *et al.*, 2007). Ces modifications sont réversibles, un retour à l'état initial peut avoir lieu à la fin de la perturbation.

La dessiccation entraîne un stress oxydatif (Scheibe and Beck, 2011) pour les cellules algales qui peut se traduire par la formation d'espèces réactives à l'oxygène (ROS, reactive oxygen species) induisant des dommages au niveau intracellulaire. Un stress hydrique peut donc créer des dommages cellulaires irréversibles, pouvant entraîner la dénaturation de certaines protéines, des cassures du double brin d'ADN ainsi que des dommages membranaires (Potts, 1994 ; Shirkey *et al.*, 2003).

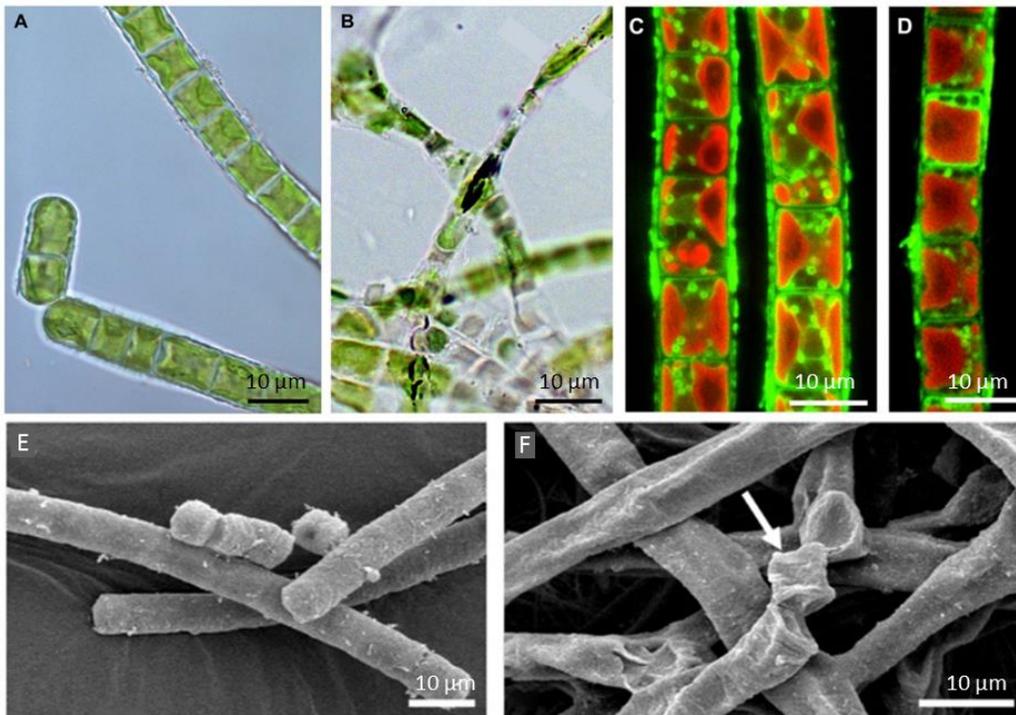


Figure 14 Observation en microscopie confocale (A à D) ou en microscopie électronique à balayage (E, F) de cellules d'algues vertes (*K. crenulatum*) présentes au sein d'un biofilm immergé (A, E) et après 1 jour (B) ou 7 jours (F) d'assèchement. Coloration, en rouge, des mitochondries présentes dans les cellules algales d'un biofilm immergé (C) ou après 1 jour d'assèchement (D). D'après Holzinger *et al.* (2011) et Karsten and Holzinger (2012)

Enfin, une fois la période d'assèchement terminée, les communautés phototrophes peuvent recoloniser le milieu lors de la remise en eau avec une efficacité variable. La durée de l'assèchement, les conditions de croissance (disponibilité en nutriments, contraintes de cisaillement, luminosité, etc.), les sources algales sont des facteurs qui ont une influence sur l'efficacité de recolonisation. En effet, la ré-immersion d'un biofilm peut provoquer le détachement d'une partie ou de la totalité du biofilm sec. Sachant que la recolonisation d'un support est rapide, la dérive et la repousse à partir d'un biofilm sec sont des mécanismes

importants dans le rebond d'un biofilm lors de la remise en eau (Robson *et al.*, 2008). Barthès *et al.* (2015a) observent un impact fort et durable de l'assèchement sur la composition des communautés même après une courte période d'assèchement (1 à 2 semaines).

Présence de polluants : l'exemple d'éléments traces métalliques

Le milieu aquatique est un environnement particulièrement impacté par la pollution métallique : les eaux usées, les effluents industriels et miniers ainsi que le lessivage agricole représentent autant de sources potentielles de contamination (Nriagu, 1979).

1. Le cuivre et le Zinc : deux oligoéléments présents dans l'environnement

Le cuivre et le zinc sont des métaux ubiquitaires dont la source peut aussi bien être naturelle qu'anthropique. Ce sont des oligo-éléments indispensables à la vie des cellules phototrophes en faible concentration, mais potentiellement toxiques lorsque la concentration devient plus importante. Ces 30 dernières années, en conséquence des activités anthropiques, plus d'un milliard de tonnes de métaux lourds ont été déversés dans l'environnement (Haferburg and Kothe, 2012). Ceci se rajoute aux activités minières et industrielles depuis la fin du XIX^{ème} siècle.

Les émissions naturelles de zinc dans l'environnement vont principalement avoir lieu suite à des éruptions volcaniques ou des feux de forêts. Les activités industrielles, les bâtiments urbains, le trafic routier ainsi que les activités agricoles (épandage de fumiers et de lisiers, traitement phytosanitaire des cultures) sont quant à eux responsables de la majorité des émissions anthropiques de zinc retrouvé dans l'environnement. D'après les données de la rédaction des Substances Dangereuses dans l'Eau (RSDE), près de 90 % des flux totaux de zinc proviennent des centrales thermiques permettant la production d'électricité. Le zinc est ensuite majoritairement retrouvé dans les sols et les eaux. Le zinc, au même titre que le cuivre, n'est pas cité dans la directive cadre sur l'eau n°2013/39/UE du 12 août 2013, il n'y a donc aucune norme de qualité environnementale (NQE).

Dans les milieux aquatiques, la dissolution du zinc et de ses composés dans les eaux n'est possible qu'à pH faible. Le zinc a la capacité de s'adsorber sur les matières en suspension présentes en milieu aqueux ; de ce fait, les sédiments d'eau douce représentent un lieu de stock

potentiel de zinc. Dans l'union européenne, les teneurs en zinc retrouvées dans les cours d'eau douces sont comprises entre 0,09 et 310 $\mu\text{g L}^{-1}$ (INERIS 2014).

Le cuivre est un élément très répandu naturellement dans l'environnement sous différentes formes ; il peut être présent à l'état natif mais majoritairement sous la forme de minerai. Les éruptions volcaniques, la décomposition des végétaux, les feux de forêts représentent les principales sources naturelles de cuivre dans l'environnement. Les apports de cuivre dans l'environnement sont majoritairement d'origine anthropique via les activités minières, industrielles (cuivre et bois) et agricoles (épandage de fumiers et de lisiers, traitement phytosanitaire des cultures viticoles et arboricoles, utilisation d'engrais minéraux) (Hogsden and Harding, 2012 ; Johnson and Hallberg, 2005). La contamination des eaux est majoritairement liée à l'érosion des sols par les cours d'eau (68 %) et à la contamination anthropique par le sulfate de cuivre (13 %) (INERIS 2014). Le cuivre sous la forme Cu^{2+} étant instable dans l'eau, il est dans la majeure partie des cas retrouvé complexé à des ligands organiques (groupements $-\text{NH}_2$, $-\text{SH}$ et $-\text{OH}$) ou des minéraux ou bien adsorbé sur des matières organiques.

Dans la plupart des pays européens, les teneurs en cuivre dans les cours d'eau varient entre 0,23 et 14,6 $\mu\text{g L}^{-1}$ (Salminen *et al.*, 2005). Cependant, dans des sites fortement pollués par des activités anthropiques, la concentration en cuivre présente dans les cours d'eau peut être nettement supérieure.

2. Impact sur la communauté microbienne présente dans les milieux aquatiques

En milieu aquatique, le Cu et le Zn peuvent être présents sous formes particulaire, colloïdale ou soluble. La toxicité de ces métaux dépend des facteurs physico-chimiques de la colonne d'eau (température, pH, dureté de l'eau, concentration en nutriments, etc.) qui conditionnent leur spéciation chimique et donc leur biodisponibilité.

Les études concernant les effets des métaux sur les microorganismes phototrophes ont été réalisées à l'échelle moléculaire, cellulaire ou au niveau de la communauté. Certains auteurs se sont intéressés aux conséquences de la toxicité des métaux sur la machinerie intracellulaire alors que d'autres ont évalué leurs effets sur la structure et la fonction des communautés.

Ce chapitre fera donc un état des connaissances des effets d'une perturbation métallique sur le biofilm et les cellules qui le composent ainsi que des différents mécanismes mis en place par les cellules pour limiter les effets engendrés par ce stress.

2.1 A l'échelle de la communauté

Plusieurs études ont été réalisées afin d'évaluer les effets de la présence d'une forte concentration métallique sur les populations de microorganismes phototrophes, à l'aide de cultures mono-espèce ou de biofilms complexes. Le stress induit suite à une modification de la concentration des métaux dans les cours d'eau se traduit par une modification structurelle et fonctionnelle de la communauté leur permettant une meilleure adaptation.

En faible quantité, les éléments traces métalliques sont indispensables au métabolisme cellulaire des êtres vivants, ils sont donc essentiels au développement et à la croissance. Une carence ou un excès de ces oligoéléments peuvent engendrer un stress physiologique chez les organismes phototrophes qui se traduit par un retard ou une inhibition de leur croissance (**Figure 15**). En effet, Cao *et al.* (2015) ont observé que de faibles concentrations en Zn^{2+} favorisent la croissance de l'algue verte *Cladophora* alors que, au contraire, une teneur en Zn supérieure à $250 \mu\text{g L}^{-1}$ provoque un retard de croissance. D'autre part, Serra et Guasch (2009) ont observé une réduction significative de la croissance des phototrophes suite à une exposition au Cu, entraînant une plus faible biomasse des micro-algues et des cyanobactéries au sein d'un biofilm exposé de façon chronique en comparaison à une communauté non exposée. Ces résultats sont confirmés par Gonçalves *et al.* (2018) qui ont étudié la réponse de la diatomée *Tabellaria flocculosa* suite à une exposition, pendant 96 h, à des concentrations en Cu similaires à celles retrouvées dans des cours d'eau contaminés. Ils ont montré que le stress provoqué par la présence de Cu à 6 et $10 \mu\text{g L}^{-1}$ induit une inhibition significative de la croissance de 50 à 70 % en comparaison à un biofilm contrôle non exposé. En fin d'expérimentation, soit après 35 jours d'incubation, Corcoll *et al.* (2011) n'observent pas d'arrêt de croissance des phototrophes lorsqu'ils se développent dans une eau contaminée en Zn à une concentration de $400 \mu\text{g L}^{-1}$. En revanche, en comparaison aux biofilms non exposés (considérés comme témoin), la valeur de la biomasse lorsque le plateau est atteint est 66 % plus faible pour un biofilm exposé à une forte concentration métallique.

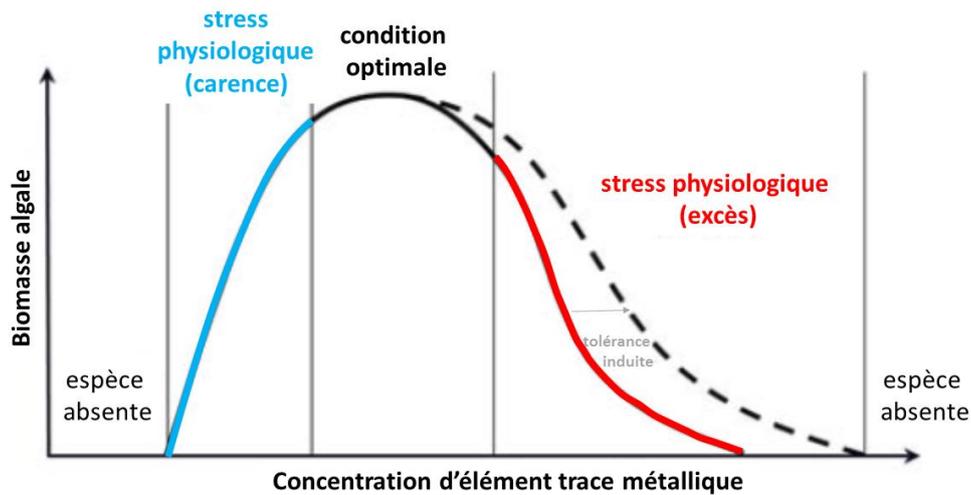


Figure 15 Réponse des microorganismes phototrophes à une augmentation de la concentration d'élément trace métallique dans le milieu aquatique. D'après Simkiss and Taylor (1989)

Une exposition à une pollution métallique provoque des modifications dans la composition de la communauté présente au sein du biofilm. Plusieurs auteurs ont démontré que les changements dans la composition de la communauté constitueraient un phénomène d'adaptation essentiel afin d'améliorer la tolérance aux métaux. En effet, García-Meza *et al.* (2005) ont observé un impact de l'ajout de Cu dans le milieu sur la diversité de la communauté. Suite au dopage en Cu, les algues vertes sont devenues la famille de microorganismes majoritaire ; au contraire, une importante diminution de l'abondance des cyanobactéries a été mise en évidence. Ce changement de l'abondance relative des taxons majoritaires avec un remplacement des espèces sensibles par des espèces plus tolérantes a également été décrit par Serra et Guasch (2009). Une exposition chronique au Cu entraîne le remplacement des diatomées (groupe d'algues majoritaire) par les algues vertes ; au contraire aucun changement dans la proportion des cyanobactéries présentes au sein de la communauté n'a été observé. L'ensemble de ces études reflète une meilleure tolérance des algues vertes à une exposition métallique comparée aux autres groupes d'organismes phototrophes.

Une communauté phototrophe précédemment exposée à une forte concentration en métaux présente une tolérance supérieure à celle d'une communauté qui n'a jamais été exposée (Soldo and Behra, 2000). Cette acclimatation des communautés préalablement exposées peut s'expliquer par le développement de mécanismes de tolérance ou par la sélection naturelle des

espèces au sein de la communauté. Ces résultats sont en accord avec le concept proposé par Blanck *et al.* (1988) selon lequel l'exposition chronique à un polluant augmente la tolérance de la communauté à cette perturbation (« *Pollution-Induced Community Tolerance* », PICT). Selon Blanck *et al.* (1988) cette augmentation de la tolérance est possible grâce au remplacement des génotypes d'organismes phototrophes sensibles par des génotypes plus résistants au sein d'une communauté.

L'évolution de la composition des espèces suite à des perturbations métalliques est couramment utilisée afin d'évaluer la qualité des cours d'eau (Da Silva *et al.*, 2009 ; Ivorra *et al.*, 2002 ; Luís *et al.*, 2014).

Lors d'une exposition aux métaux, une réduction de l'architecture en trois dimensions des communautés est visible dès la première phase de développement. En effet, Gold *et al.* (2003) ont observé une inhibition de la croissance des espèces filamenteuses qui se traduit par le développement d'un biofilm fin après 4 semaines de croissance dans un environnement en présence de métaux (**Figure 16**).

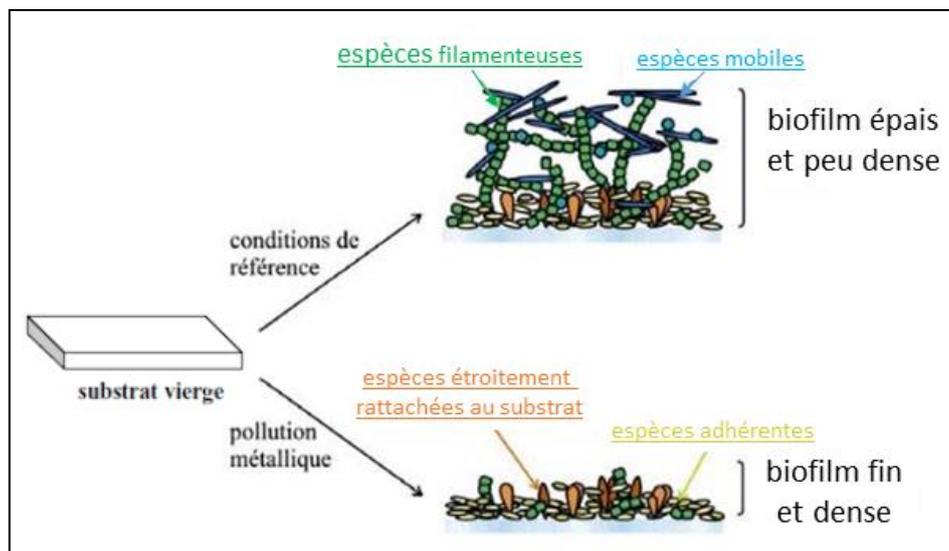


Figure 16 Représentation schématique de l'architecture des communautés de diatomées développées sur un substrat vierge après 4 semaines de colonisation en présence ou en absence de pollution métallique (Zn et Cd). D'après Gold (2002)

La toxicité des métaux est différente en fonction de l'architecture et l'âge du biofilm. En effet, Ivorra *et al.* (2000) ont observé qu'un biofilm jeune et fin était moins tolérant que des

biofilms plus âgés et épais. Une des explications possible à cette différence de sensibilité au stress métallique pourrait être en lien avec le rôle protecteur de la matrice composant le biofilm.

2.2 A l'échelle de la cellule

Il a été démontré par certaines études que la contamination des cours d'eau par les métaux peut conduire à des modifications de la morphologie des cellules. L'apparition de frustules déformées a été décrite dans plusieurs études de cours d'eau contaminés (Gold *et al.*, 2003 ; McFarland *et al.*, 1997 ; Morin and Coste, 2006b) (**Figure 17**). L'excès de métaux peut provoquer un dysfonctionnement dans la synthèse de la silice (De La Rocha *et al.*, 2000) se traduisant par une déformation structurelle du frustule ou des irrégularités dans l'alignement des stries. L'analyse de la déformation des frustules des diatomées est un indice utilisé dans les tests de bioindication des effets de pollution.

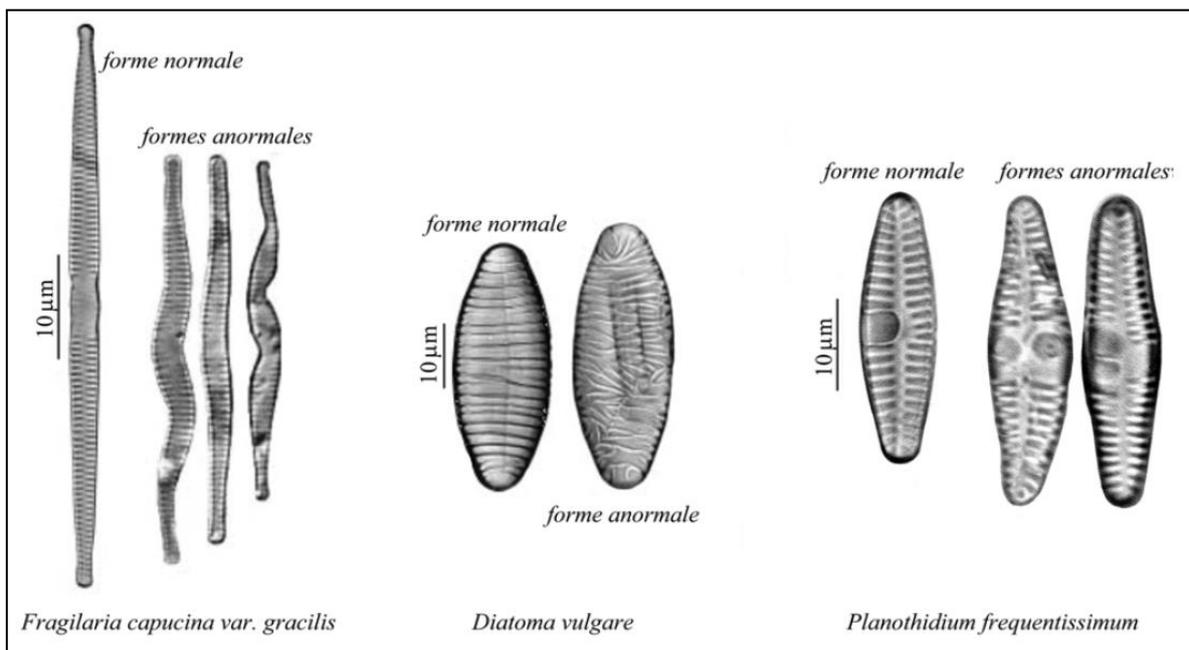


Figure 17 Frustules de diatomées déformées par la présence de Cd et Zn dans le milieu. D'après Morin and Coste (2006b)

Dao et Beardall (2016) ont comparé les effets d'une exposition métallique sur deux espèces d'algues vertes et ont observé que les espèces de petites tailles (*Chlorella species*) étaient plus tolérantes que les espèces de tailles plus importantes (*Scenedesmus acutus*). Proportionnellement au volume intracellulaire, les espèces de petites tailles présentent une quantité de sites de fixation des métaux plus importante que des cellules de tailles plus

importantes. La taille des cellules et les déformations cellulaires pourraient donc être de bons indicateurs de pollutions métalliques dans les cours d'eau.

Des altérations de l'activité photosynthétique ont été observées suite à une exposition des espèces phototrophes à de fortes concentrations métalliques (Guanzon *et al.*, 1994). Le rendement quantique maximal du photosystème II (PSII), spécifique à chaque espèce, est un bon indicateur de la sensibilité de l'organisme phototrophe et du stress induit par la présence de métaux dans le milieu. Après 35 jours d'exposition des biofilms à une concentration en Zn de 400 $\mu\text{g L}^{-1}$, Corcoll *et al.* (2011) ont observé une réduction du rendement du PSII ajoutée à une réduction de la biomasse phototrophe et une modification de la composition au sein de la communauté. Au contraire, malgré de fortes concentrations en Cu, Serra et Guasch (2009) ont observé un rendement du PSII du biofilm exposé similaire à celui de la communauté non exposée. Les changements structuraux observés au sein du biofilm sont plus importants que les dommages physiologiques créés suite à une exposition aux métaux (García-Meza *et al.*, 2005 ; Guasch *et al.*, 2002 ; Morin *et al.*, 2008) : il semblerait que les cellules des microorganismes phototrophes aient une capacité d'adaptation importante afin de maintenir constantes les activités métaboliques essentielles au développement du biofilm dans le milieu. Selon cette hypothèse, une communauté qui devient plus tolérante aux stress provoqués par une forte concentration métallique dans le milieu maintiendra une activité photosynthétique même si la réduction de la biomasse d'espèce sensible est importante.

Une augmentation de la tolérance aux fortes concentrations métalliques des microorganismes composant un biofilm phototrophe résulte en partie dans la sécrétion des EPS qui protègent les cellules en piégeant les métaux au sein du biofilm mais à l'extérieur de la cellule (Barranguet *et al.*, 2000) ; ces EPS créent donc un micro-environnement favorable à la croissance des microorganismes. En effet, au sein des EPS, la présence de polysaccharides comprenant des groupements fonctionnels chargés négativement (carboxyle, phosphate, sulfate, etc.) constitue autant de sites de liaisons potentiels permettant la fixation de cations métalliques (Kaplan *et al.*, 1988). Les exopolysaccharides sécrétés par les communautés algales et bactériennes créent des liaisons ioniques avec les métaux réduisant ainsi la biodisponibilité et la toxicité des métaux présents dans le milieu. Ozturk et Aslim (2008) ont montré que des espèces de cyanobactéries résistantes à une exposition au Cr sécrètent une quantité d'EPS significativement plus importante que les souches sensibles. De nombreux auteurs ont observé une augmentation de la production des EPS (liées ou solubles) en réponse à une exposition des

biofilms aux métaux. Par exemple, García-Meza *et al.* (2005) ont observé une augmentation de la production des EPS proportionnelle à la concentration de métaux ajoutés dans le milieu (**Figure 18**). De même, Gonçalves *et al.* (2018) ont observé une production 98 fois plus importante des EPS par les cellules *T. flocculosa* après 4 jours d'exposition à $10 \mu\text{g L}^{-1}$ de Cu par rapport à un biofilm non exposé. Ils ont noté que le niveau de tolérance des communautés présentes au sein du biofilm était augmenté par la séquestration des métaux par les EPS à l'extérieur de la cellule. En revanche, malgré une quantité d'EPS sécrétée proportionnelle à la concentration en métaux présente dans le milieu, ils ont observé une concentration en Cu intracellulaire 4,5 fois plus importante dans les cellules des micro-algues et des cyanobactéries exposées à $10 \mu\text{g L}^{-1}$ par rapport à celles exposées à $6 \mu\text{g L}^{-1}$. Ces résultats sont en accord avec Serra et Guasch (2009) qui ont observé une quantité de Cu intracellulaire 10 fois supérieure lorsque le milieu de culture du biofilm est dopé avec $30 \mu\text{g L}^{-1}$ de Cu. Ils suggèrent donc que la sécrétion d'EPS n'est pas suffisante pour empêcher le Cu de pénétrer à l'intérieur des cellules : les EPS ne semblent donc pas représenter l'unique moyen de détoxification permettant une tolérance des organismes phototrophes à la présence de fortes concentrations en métaux. Malgré l'augmentation de la concentration du Cu intracellulaire, aucune conséquence n'a été observée sur l'activité photosynthétique : il existe également à l'intérieur de la cellule des réponses moléculaires permettant de limiter la toxicité du cuivre.

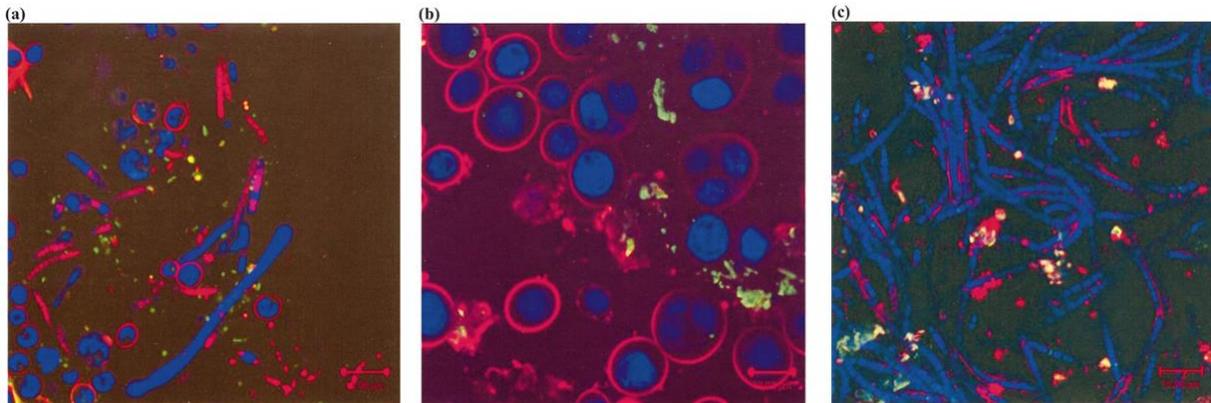


Figure 18 Images obtenues en microscopie confocale à balayage laser de biofilms phototrophes non exposés (a) et exposés pendant 5 jours à $100 \mu\text{M}$ de Cu (b) ou 1mM de Zn (c). Les EPS sont colorées en rouge avec la *Canavalia ensiformis*, les bactéries en vert et les micro-algues en bleu. D'après García-Meza *et al.* (2005)

2.3 A l'échelle moléculaire

Pour une meilleure tolérance des métaux, il est indispensable pour la cellule de mettre en place des mécanismes de défense permettant de limiter le passage du métal dans la membrane plasmique ainsi que de piéger les ions métalliques libres au sein de la cellule. Différents mécanismes physiologiques ou génétiques peuvent être développés par les microalgues et les cyanobactéries pour accroître leurs tolérances aux stress métalliques. En réponse à un stress métallique, Santos *et al.* (2013) ont observé une augmentation de la quantité de frustulines qui sont des protéines situées sur la paroi de la cellule des diatomées pour y jouer un rôle de protection. Les cellules tolérantes aux métaux augmentent la sécrétion des polysaccharides permettant une augmentation de l'épaisseur de la paroi cellulaire limitant ainsi l'entrée des métaux dans la cellule (Lu *et al.*, 2010). Les cellules algales ou les cyanobactéries ont la capacité de diminuer le nombre de sites de fixation des métaux à la surface des cellules afin de limiter la concentration métallique intracellulaire, d'inhiber l'absorption des métaux ou de développer des mécanismes d'exclusion et de détoxification interne (Genter, 1996 ; Rai *et al.*, 1981).

Suite à une augmentation de la concentration intracellulaire en métaux, les microorganismes phototrophes peuvent synthétiser des polypeptides appelés phytochélatines riches en cystéine et donc capables de se lier aux métaux (Branco *et al.*, 2010 ; Figueira *et al.*, 2014). Jensen *et al.* (1982) ont observé la production de polymères polyphosphatés par certaines espèces de cyanobactéries en réponse à une exposition métallique. Ces chélateurs de métaux réduisent la concentration ionique intracellulaire, ce phénomène de détoxification interne réduit la toxicité du métal.

Lorsque ces différents mécanismes de défense ne parviennent pas à diminuer les concentrations de métaux intracellulaires, ces métaux peuvent causer un stress oxydant induisant la production de ROS, se traduisant par une augmentation de la mortalité cellulaire (Torres *et al.*, 1998). Par exemple, Dao et Beardall (2016) ont mesuré une quantité de ROS intracellulaire variant d'un facteur 4 en fonction de la concentration métallique et de la tolérance de deux espèces d'algues vertes d'eau douce. Dans certains cas, un stress métallique affecte la viabilité cellulaire en créant des dommages cellulaires irréversibles : peroxydation des lipides et carbonylation des protéines modifiant la perméabilité des membranes et modifications des propriétés biochimiques de la paroi cellulaire (De La Rocha *et al.*, 2000 ; Regoli and Giuliani, 2014).

Pour limiter les dommages cellulaires engendrés par un stress oxydant, les cellules phototrophes développent des mécanismes de défense capables de piéger les ROS tels que des enzymes anti-oxydantes (catalase et superoxyde dismutase), des enzymes détoxifiantes (glutathion réductase) et des antioxydants de faibles poids moléculaires (Gonçalves *et al.*, 2018). Cong *et al.* (2012) ont observé qu'une faible concentration en Zn était suffisante pour déclencher une augmentation de la production d'enzymes anti-oxydantes permettant une protection des cellules contre le stress oxydant.

CHAPITRE II

MATERIEL ET METHODES

1 Modèles biologiques

1.1 Présentation des souches phototrophes utilisées

Les trois espèces microbiennes phototrophes utilisées tout au long de ces travaux, l'algue verte *Uronema confervicolum*, la diatomée *Nitzschia palea* et la cyanobactérie *Phormidium autumnale* ont été isolées à partir de biofilms prélevés dans les rivières du Tarn et Garonne (**Figure 19**).

Les **diatomées**, composant la classe des Bacillariophycées, sont des microorganismes unicellulaires photosynthétiques dont la couleur varie du jaune clair au brun foncé. Leurs tailles varient entre 2 et 500 μm . Elles possèdent des pigments caroténoïdiens (β -carotènes, diatoxanthine, diadinoxanthine et fucoxanthine) et peuvent vivre sous forme de colonies ou de manière isolées. Elles sont constituées d'une enveloppe rigide, appelée frustule, composée de silice hydratée et divisée en deux unités imbriquées : l'épithèque et l'hypothèque. Une distinction entre les genres de diatomées peut être réalisée en fonction de la forme du frustule : centrale à symétrie radiale ou pennale à symétrie bilatérale. Du fait de son omniprésence dans les environnements dulcicoles, du nombre abondant d'espèces (au moins 12 000 espèces décrites), du temps de régénération court et de sa sensibilité face à de nombreux facteurs de stress environnementaux, les diatomées sont particulièrement étudiées en tant que bio-indicateur de qualité des eaux (Santos *et al.*, 2013). Ces caractéristiques ont conduit à leur utilisation comme modèle notamment dans l'évaluation de l'exposition à une pollution métallique d'un cours d'eau (Arini, 2011 ; Morin, 2006a). *N. palea*, diatomée pennale, est retrouvée dans des habitats lotiques et lentiques ; elle est dans certains cas le taxon le plus abondant d'un biofilm phototrophe (Raschke, 1993 ; Silva-Benavides, 1996 ; Simkhada et Jüttner, 2006). Sabater (2000) décrit *N. palea* comme étant une espèce tolérante à une exposition aux métaux ; elle représente donc un bon indicateur des eaux contaminées.

Les **cyanobactéries**, plus communément appelées algues bleues, sont des bactéries photosynthétiques retrouvées dans de nombreux environnements d'eaux douces ou salées capables de vivre dans des climats tempérés ou extrêmes ; on en dénombre au moins 2 000 espèces.

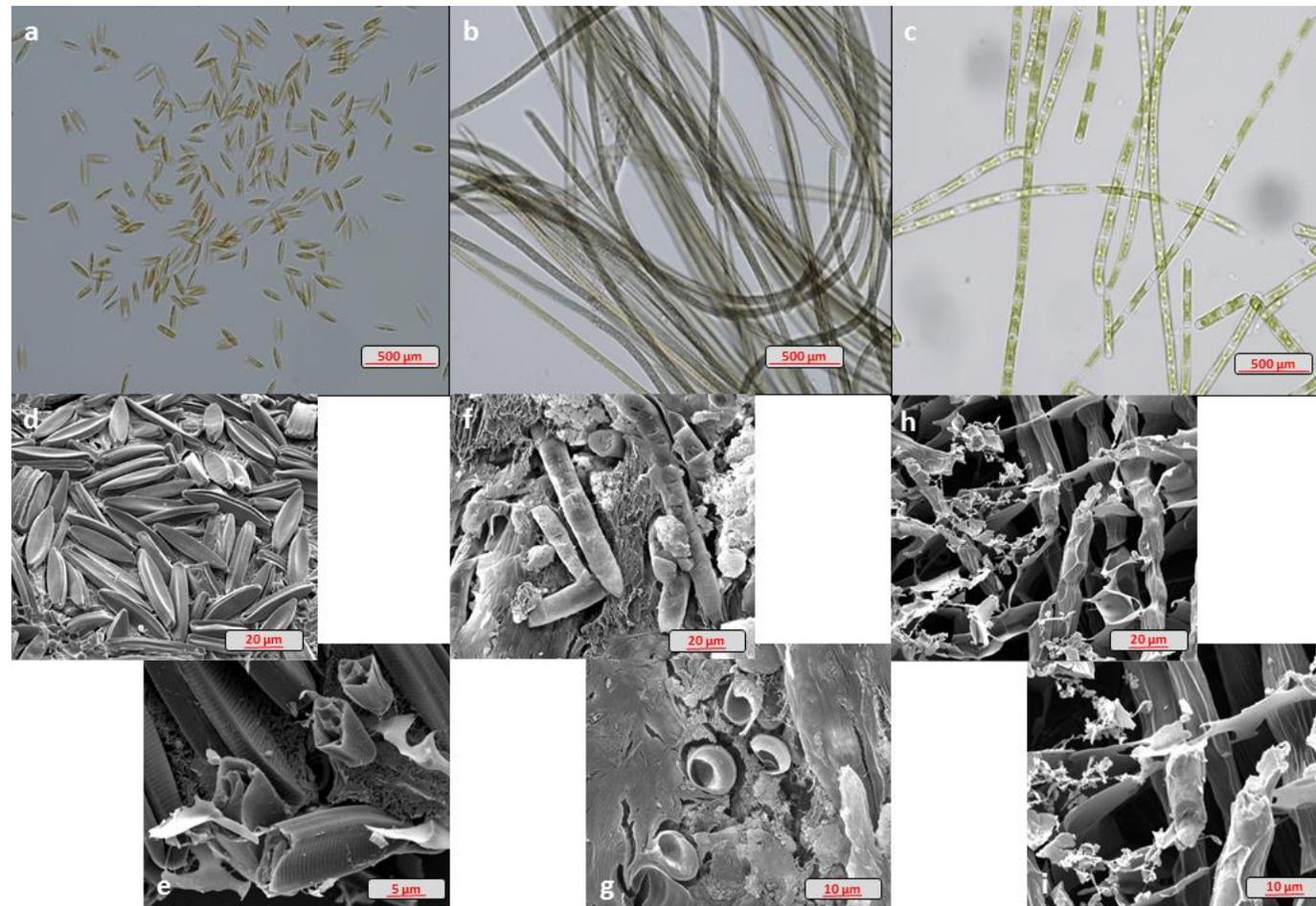


Figure 19 Image en microscopie optique (a à c) et en cryo-microscopie à balayage (d à i) des trois espèces de microorganismes phototrophes utilisées : la diatomée *N. palea* (a, d et e), la cyanobactérie *P. autumnale* (b, f et g) et l'algue verte filamenteuse *U. confervicolum* (c, h et i).

De taille très variable, les cyanobactéries sont composées d'une gaine de mucilage qui entoure les cellules lorsqu'elles sont sous forme de colonies (filamenteuses ou non filamenteuses). En culture, la cyanobactérie se développe sous forme de biofilm ou d'agrégat floculant. Ces microorganismes unicellulaires ont une forte capacité d'adaptation face à différentes contraintes environnementales telles que des températures élevées ou des variations importantes de salinité dans le milieu (Fogg, 1956 ; Montoya, 2009).

Les **algues vertes** filamenteuses ne correspondent pas à un groupe phylogénétique précis : elles regroupent un ensemble d'organismes dont la taille varie de quelques micromètres à plus d'un mètre et dont les aspects peuvent être très divers. En revanche, elles partagent un mode de vie commun sous forme de filaments fixés et des caractéristiques écologiques proches. On les retrouve dans les milieux marins et dulcicoles lorsque l'intensité lumineuse est forte (Biggs, 1996).

De manière générale, un biofilm phototrophe jeune est dominé par des diatomées (colonisateurs pionniers des surfaces) accompagnées de leur cortège bactérien, puis par les algues vertes ; la présence des cyanobactéries devient importante dans un biofilm mature (Leflaive *et al.*, 2008).

Ces trois modèles d'étude présentent donc des caractéristiques morphologiques et fonctionnelles distinctes ; cette différence est d'autant plus intéressante dans l'objectif de comparer les réponses de chaque grande famille de microorganismes phototrophes présents au sein d'un biofilm benthique.

1.2 Entretien des cultures et milieux de culture utilisés

Pour cultiver ces microorganismes phototrophes, il est nécessaire d'utiliser un milieu de culture permettant la croissance et la reproduction des algues d'eau douce. Pour cela, le milieu de culture **Combo** a été utilisé pour les cultures de l'algue verte *U. confervicolum* et de la diatomée *N. palea* (Kilham *et al.*, 1998) ; le milieu de culture **BG11** (Stanier *et al.*, 1971) a quant à lui été utilisé pour la culture de la cyanobactérie *P. autumnale* (**Tableau 4**).

Les précultures permettant d'avoir un stock d'agrégat en suspension nécessaire au lancement d'une expérimentation ont été réalisées en erlenmeyers contenant le milieu de culture

adapté et placées dans des enceintes contrôlées en température et lumière. De nouveaux ensemencements sont réalisés toutes les cinq semaines pour n'avoir que des cultures contenant des microorganismes en phase exponentielle de croissance. Pour cela, à partir d'un biofilm remis en suspension par agitation manuelle, un prélèvement de 10 mL de la suspension est ajouté dans un nouvel erlenmeyer contenant 390 mL de milieu de culture stérile propre à chaque espèce. Ces erlenmeyers sont ensuite entreposés dans des enceintes à 18°C, avec un cycle de 16 h de lumière et 8 h d'obscurité sous une intensité lumineuse de $30 \pm 5 \mu\text{mol s}^{-1} \text{m}^{-2}$. Un système de bullage artificiel de chaque erlenmeyer est mis en place afin de favoriser la croissance des algues (apport de CO₂).

Tableau 4 Composition chimique des milieux de culture Combo et BG11.

Produit (mg L ⁻¹)	Combo	BG11
CaCl ₂ .2H ₂ O	36,76	36
MgSO ₄ .7H ₂ O	36,97	75
KH ₂ PO ₄	8,71	28,6
NaNO ₃	85,01	1500
NaHCO ₃	12,6	-
Na ₂ CO ₃ .10H ₂ O	-	54
Na ₂ O ₂ SiO ₂ .2H ₂ O	21,84	-
H ₃ BO ₃	24	29
C ₆ H ₈ O ₇ .H ₂ O	-	6
MnCl ₂ .4H ₂ O	0,18	1,8
CuSO ₄ .5H ₂ O	0,001	0,1
ZnSO ₄ .7H ₂ O	0,022	0,2
CoCl ₂ .6H ₂ O	0,01	-
Co(NO ₃) ₂ .6H ₂ O	-	0,05
Na ₂ MoO ₄ .2H ₂ O	0,022	0,4
Sélénium	1,6	-
NaVO ₂	1,2	-
Na ₂ EDTA.2H ₂ O	4,36	1
FeCl ₃ .6H ₂ O	1,5	-
Fe(NH ₄) ₃ citrate	-	6

2 Les réacteurs expérimentaux

2.1 Présentation et description générale

Un lot de trois dispositifs expérimentaux, dont un est représenté sur la **Figure 20**, a été conçu et réalisé en collaboration avec la société Arias (Toulouse, France). Ces dispositifs, utilisés tout au long des travaux de thèse, sont inspirés de celui mis au point par Singer *et al.* (2006) qui est, à ce jour, techniquement et scientifiquement validé suite à plusieurs expérimentations (Besemer *et al.*, 2007 ; Besemer *et al.*, 2009 ; Augspurger *et al.*, 2010 ; Mussmann *et al.*, 2013). Le dispositif expérimental, également appelé « module », est constitué de 12 mini-canaux hydrauliques (**Figure 20C**), soit un total de 36 mini-canaux disponibles pour chaque expérimentation (3 modules). Leurs caractéristiques sont une longueur de 1,25 m, une largeur de 3 cm et une hauteur de 5 cm, réalisés en Poly(méthyl méthacrylate) (PMMA). Quarante-cinq coupons en Polyoxyméthylène (POM-C), de densité 1,4, de taille Lxl 29 mm x 10 mm, et de hauteur $8,315 \pm 0,095$ mm sont disposés au fond de chaque canal ; ils représentent le support permettant l'adhésion des cellules et le développement du biofilm (**Figure 21**). L'ensemble des coupons de chaque canal est maintenu par un système de serrage à la sortie du canal sans dénivellé. Des nids d'abeille sont disposés à l'entrée de chaque canal pour uniformiser le flux d'eau dès son entrée dans le canal, et ainsi éviter la présence d'ondulations associées aux effets de renvoi des parois latérales (**Figure 21**). Par groupe de 4, ces mini-canaux sont alimentés en circuit fermé à l'aide de trois réservoirs (**Figure 20D**) en partie basse d'une capacité de 60 L chacun. Un système de pompage avec un débit de $2200 \text{ m}^3 \text{ h}^{-1}$ (**Figure 20E**) permet une remontée de l'eau vers trois réservoirs de mise en charge d'une capacité de 20 L chacun (**Figure 20A**) et munis d'un trop-plein vers les réservoirs du bas. Ces réservoirs sont placés dans un bain marie, permettant de réguler la température de l'eau en circulation par chauffage, le refroidissement se faisant par la climatisation continue de la pièce. Placé sous le bain marie et au-dessus des canaux, un dispositif d'éclairage par LED à spectre lumière du jour émettant une lumière blanche froide 6000°K est présent afin de permettre le bon développement des microorganismes phototrophes (**Figure 20B**). Ce dispositif peut simuler le cycle jour/nuit, avec une variation de l'intensité par paliers de 2 h.

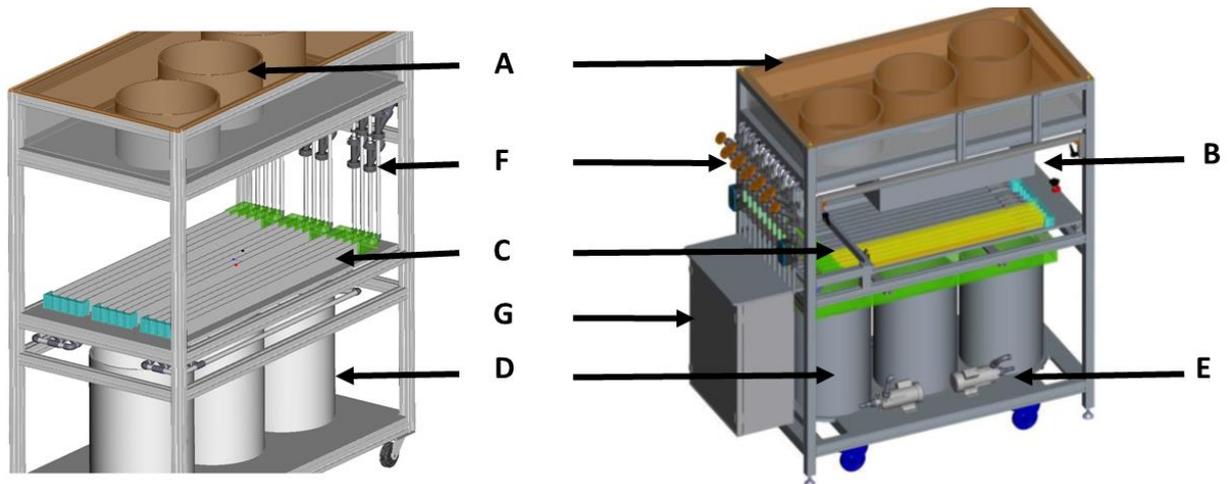


Figure 20 Représentation en 3D des différentes parties qui composent le dispositif expérimental : réservoirs de mise en charge (A), dispositif d'éclairage (B), trois groupes de 4 mini-canaux (C), réservoirs inférieurs (D), pompe de recircularisation (E), vanne manuelle d'alimentation (F), boîtier d'alimentation électrique (G).

La pente du plateau supportant les canaux de chaque module est variable, allant de 0 à 2,4 % par rapport à l'horizontale. De ce fait, la vitesse d'écoulement résultera de l'ouverture de la vanne manuelle d'alimentation (**Figure 20F**) ainsi que de la pente du canal. Sur chaque module, un débitmètre permet de vérifier le débit de l'eau circulant dans les canaux. Le débitmètre utilisé, modèle FFUS10-1G1SR de la société SICK, permet de couvrir une gamme de débits de 18 L h^{-1} à 1260 L h^{-1} avec une précision relative de plus ou moins 2 % de la valeur affichée. Sur chaque module est également présent un capteur à ultrason (UM18-217126111 de la société SICK) qui, calibré, permet de donner la valeur de la hauteur d'eau au-dessus des coupons. Son temps de réponse est de 32 ms, et sa précision relative est de plus ou moins 1 % de la valeur affichée.

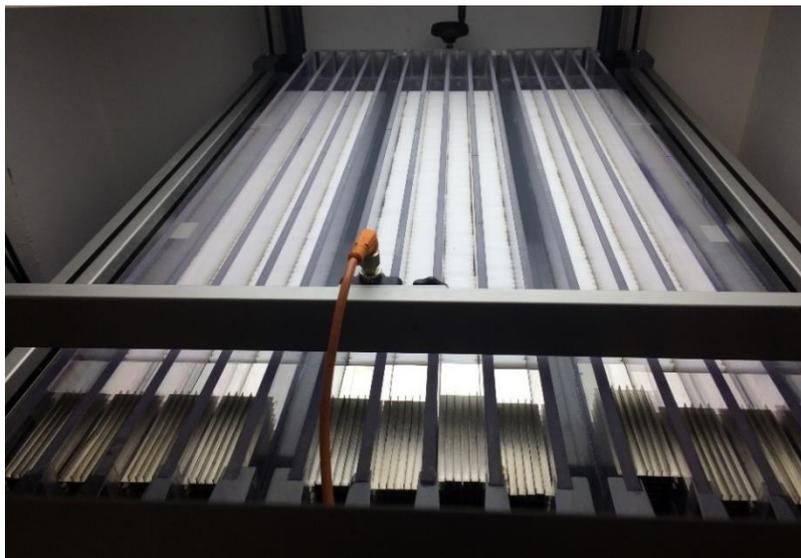


Figure 21 Photographie en vue de dessus des canaux : les rangées de 80 coupons sont séparées par des parois transparentes.

2.2 Choix des conditions environnementales

2.2.1 Source lumineuse

L'éclairage est assuré par des LED en lumière blanche positionnées de manière uniforme sur un panneau disposé sur toute la longueur et la largeur de chaque module et situé au-dessus des canaux, avec une variation possible de l'intensité lumineuse de 0 à $150 \mu\text{mol s}^{-1} \text{m}^{-2}$. L'intensité lumineuse est mesurée à l'aide d'une sonde de quantamètre (model LI-189, LICOR, Inc- Lincoln- Nebraska). De manière à distribuer de façon la plus homogène possible la lumière au niveau des 12 mini-canaux, des plaques en plexiglass sont fixées sur les faces latérales du dispositif afin de recentrer la lumière et limiter les effets de bord. Notre choix s'est porté sur un éclairage à 60 % de l'intensité maximale du dispositif, soit une intensité lumineuse de $71,5 \pm 13,5 \mu\text{mol s}^{-1} \text{m}^{-2}$ en positionnant la rampe de LED proche des canaux, 19 cm au-dessus, afin d'obtenir une distribution homogène de l'éclairage : en effet une distance importante entre le biofilm et la rampe augmente la diffusion de la lumière. L'activité photosynthétique des communautés algales benthiques est saturée entre 100 et $400 \mu\text{mol s}^{-1} \text{m}^{-2}$ quel que soit l'état du biofilm (Bothwell, 1993). De plus, ces conditions d'éclairement sont de l'ordre de grandeur de l'intensité lumineuse présente dans les enceintes permettant la pré-culture des algues.

2.2.2 Conditions hydrodynamiques

Afin de simuler au mieux un écoulement naturel à surface libre, il est nécessaire de travailler en **régime turbulent**. De plus, en régime laminaire, le biofilm n'aurait accès aux nutriments que par diffusion au sein des masses d'eau. Au contraire, en régime turbulent, les nutriments contenus dans l'eau sont suffisamment mélangés, ce qui constitue un gradient maximal entre l'eau à la surface du biofilm et l'eau circulant au sein du biofilm. L'écoulement dans chacun des 12 mini-canaux présents dans le dispositif est caractérisé par deux nombres sans dimension : le nombre de Reynolds (Re_D) et le rayon hydraulique (R_h^+). Le nombre de Reynolds, donnant les conditions seuils entre un régime laminaire, transitoire et turbulent, est ici défini par l'équation suivante :

$$Re_D = \frac{V \cdot 2 \cdot R_h}{\nu}$$

avec V la vitesse moyenne dans le canal ($m \cdot s^{-1}$), ν la viscosité cinématique de l'eau à $20^\circ C$ ($1,007 \cdot 10^{-6} m^2 \cdot s^{-1}$), $R_h = l \cdot h / (l + 2 \cdot h)$ le rayon hydraulique du canal (m), l la largeur du canal (m) et h la hauteur d'eau dans le canal (m).

Le régime est parfaitement turbulent quand $Re_D > 2000$ (Julien, 2002).

Le rayon hydraulique adimensionnel (R_h^+) permettant de caractériser plus précisément le profil de vitesse se définit par l'équation suivante :

$$R_h^+ = \frac{R_h \cdot u^*}{\nu} \text{ avec } u^* = \sqrt{R_h \cdot S \cdot g}$$

avec u^* la vitesse de frottement sur les bords et le fond de chaque canal ($m \cdot s^{-1}$), S la pente du canal par rapport à l'horizontale et g l'accélération de la pesanteur ($9,81 m \cdot s^{-2}$).

On considère que la couche limite turbulente équivaut à celle des cours d'eau naturels quand $R_h^+ > 100$.

Lorsque l'on fait varier le débit de l'eau qui circule, on modifie la valeur des paramètres Re_D et R_h^+ . Dans les modules, le débit peut être fixé à une valeur par l'intermédiaire de vannes crantées présentes à chaque entrée de canal mais également en inclinant le plateau sur lequel les canaux sont disposés. Afin d'assurer un écoulement turbulent et similaire à celui des cours

d'eau naturels, une pente minimale de 1,2 % et un débit minimum de 150 L h⁻¹ doivent être choisis (ces conditions permettent d'obtenir un Re_D supérieur à 2000 et R_h^+ supérieur à 100).

2.2.3 Temps de mélange

Le temps de mélange permet de connaître le temps nécessaire pour atteindre une homogénéité de concentration dans le circuit hydraulique fonctionnant en mode fermé. Le comportement général du mélange dans un système de quatre canaux et de leur alimentation commune a été caractérisé expérimentalement en utilisant la méthode de traçage par impulsion pour laquelle 100 mL d'une solution de NaCl (45g L⁻¹) sont injectés en sortie de canal. L'expérience est réalisée avec des coupons propres, pour une pente fixe (1,2 %) et quatre débits différents : 150, 250, 350 et 450 L h⁻¹ avec un volume opérationnel dans chaque réservoir de 45 L (volume cumulé entre le réservoir du bas et celui du haut). La conductivité de l'eau est mesurée dans le réservoir supérieur avec une sonde spécifique (conductivity meter 524, CRISON, SELI) afin d'enregistrer la réponse temporelle en conductivité suite à l'impulsion de sel. Le temps de mélange nécessaire pour obtenir 90 % de la valeur maximale, celle représentant un milieu aqueux circulant homogène, est ensuite relevé, ce qui correspond au temps de mélange pour obtenir 90 % d'homogénéité (**Figure 22**).

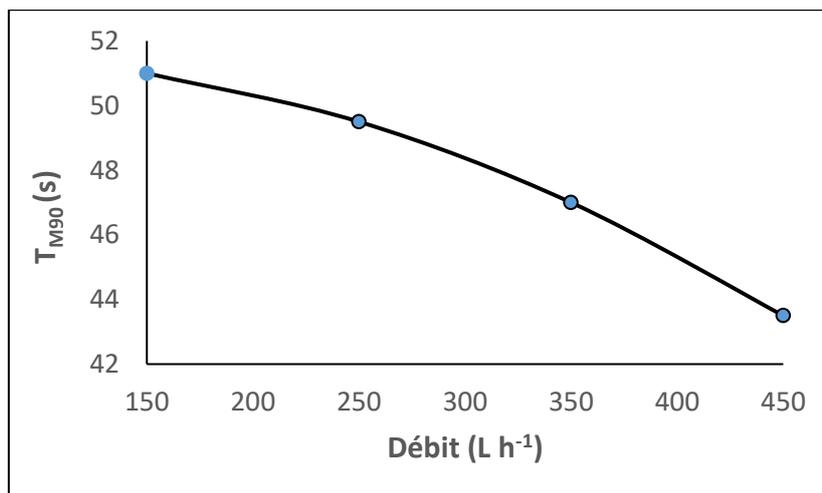


Figure 22 Variation du temps de mélange nécessaire pour obtenir 90 % de la valeur maximale en fonction du débit.

2.2.4 Eau alimentant le dispositif

Plusieurs types d'eaux peuvent être utilisés au cours de l'expérimentation. L'eau de rivière peut être une première source. Celle-ci a pour avantage d'être facile d'accès mais très variable en fonction des saisons en qualité chimique, microbiologique et turbidité (écran partiel à la lumière). Le phosphate, élément indispensable à la croissance d'un biofilm (Bothwell, 1985), est généralement en faible concentration dans l'eau de rivière. Afin d'alimenter les trois modules, le transport et le stockage d'un volume d'eau de 600 L est nécessaire et contraignant. De plus, utiliser l'eau de rivière au cours de nos expérimentations est très difficile du fait de l'étude de biofilm phototrophe mono-espèce et donc le risque d'ensemencement par d'autres espèces *via* la biomasse planctonique. Les milieux de cultures synthétiques, eau potable complétée d'oligoéléments, peuvent également être utilisés comme eau circulant dans le dispositif. De plus, ce milieu peut être adapté afin de favoriser l'espèce algale utilisée. Pour être le plus reproductible possible tout en ayant tous les nutriments nécessaires à la croissance des microorganismes phototrophes choisis, nous avons décidé d'utiliser les milieux de cultures synthétiques, c'est-à-dire le Combo et le BG11.

2.2.5 Nettoyage et entretien du dispositif

Entre chaque expérimentation ainsi que lors de la première utilisation, de l'eau de javel diluée à de l'eau du réseau circule dans l'ensemble des canalisations et des mini-canaux pendant 24 h. Chaque partie est ensuite rincée à l'eau du réseau pour éliminer les résidus de chlore avant d'être séchée à l'air libre pendant 36 h minimum. Entre chaque expérience, les coupons sont nettoyés de manière individuelle à l'aide d'un détergent (eau de javel) puis rincés plusieurs fois à l'eau.

3 Stratégies expérimentales en microcosme

Afin de répondre aux questions posées, des approches expérimentales reposant sur l'utilisation de microcosmes en laboratoire (mini-canaux hydrauliques) ont été utilisées. Les microcosmes concernés par une exposition au Cu ou au Zn ont été dopés avec une solution de $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ ou $\text{ZnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ afin d'obtenir une concentration finale de 20 et 200 $\mu\text{g L}^{-1}$ de cuivre et 60 ou 600 $\mu\text{g L}^{-1}$ de zinc (**Chapitre IV**) ou 50 $\mu\text{g L}^{-1}$ de cuivre (**Chapitre V et VI**).

3.1 Biofilms phototrophes exposés au Cu et au Zn

3.1.1 Objectif de l'expérience

L'étude a été menée dans le but d'étudier l'incidence physiologique d'une exposition d'un biofilm phototrophe mono-espèce à des éléments trace métalliques : le cuivre et le zinc. Les concentrations finales en métaux rajoutés correspondent à des concentrations environnementales de cours d'eau pollués en France (Montuelle *et al.*, 2010) et sont nettement inférieures à la CI_{50} pour chacune des trois espèces phototrophes. Au cours de ses travaux de thèse, Coutaud (2016) a estimé que la concentration inhibitrice médiane du Cu est de l'ordre de 570 mg L^{-1} pour un biofilm phototrophe complexe.

Cette expérimentation a été valorisée par la rédaction d'un article scientifique présenté dans le **Chapitre IV**.

3.1.2 Déroulement de l'expérimentation

Le plan expérimental, représenté sur la **Figure 24** est le même pour les trois espèces phototrophes. Au cours d'une expérimentation, l'inoculum d'une seule espèce est utilisé pour ensemençer les 3 modules présents dans la même pièce afin d'obtenir des résultats issus d'une même préculture et de limiter les risques de contamination entre modules. Trois séries d'expérimentations consécutives, d'une durée de 21 jours, ont donc eu lieu afin d'exposer séparément les trois microorganismes aux différentes concentrations métalliques souhaitées.

Le T_0 correspond à l'inoculation de la suspension du biofilm dans les réservoirs alimentant les mini-canaux. Durant les cinq premiers jours, l'eau qui circule au sein des canaux ne contient que du milieu de culture afin de permettre l'adhésion des cellules phototrophes sur les coupons disposés au fond de chaque canal et l'adaptation du biofilm aux conditions de culture. A T_5 jours, des solutions mères de Cu à une concentration de 200 mg L^{-1} et/ou de zinc à une concentration de 600 mg L^{-1} ont été ajoutées dans différents modules afin d'obtenir une concentration finale en Cu de 20 et $200 \text{ } \mu\text{g L}^{-1}$ et/ou une concentration en zinc de 60 et $600 \text{ } \mu\text{g L}^{-1}$ dans l'eau qui circule. A la fin de l'expérimentation, soit après 21 jours de croissance dans le microcosme, les prélèvements du biofilm réalisés par grattage des coupons à l'aide d'une brosse à dent ont été effectués afin de réaliser les différentes mesures permettant de caractériser la réponse des biofilms phototrophes aux différentes conditions expositions. En amont de cet échantillonnage, l'activité photosynthétique des biofilms ayant colonisé les coupons est mesurée au niveau de chaque canal.

Dans chacun des 3 modules, un réservoir alimentant 4 canaux est utilisé comme témoin (sans ajout de Cu et de Zn) (**Figure 23**). Les deux réservoirs restants sont dopés avec 20 et $200 \text{ } \mu\text{g L}^{-1}$ de Cu dans le module 1 appelés Cu20 et Cu200, 60 et $600 \text{ } \mu\text{g L}^{-1}$ de Zn dans le module 2 appelés Zn60 et Zn600, et avec un mélange des faibles (Cu20Zn60) et fortes (Cu200Zn600) concentrations en Cu et Zn dans le module 3.

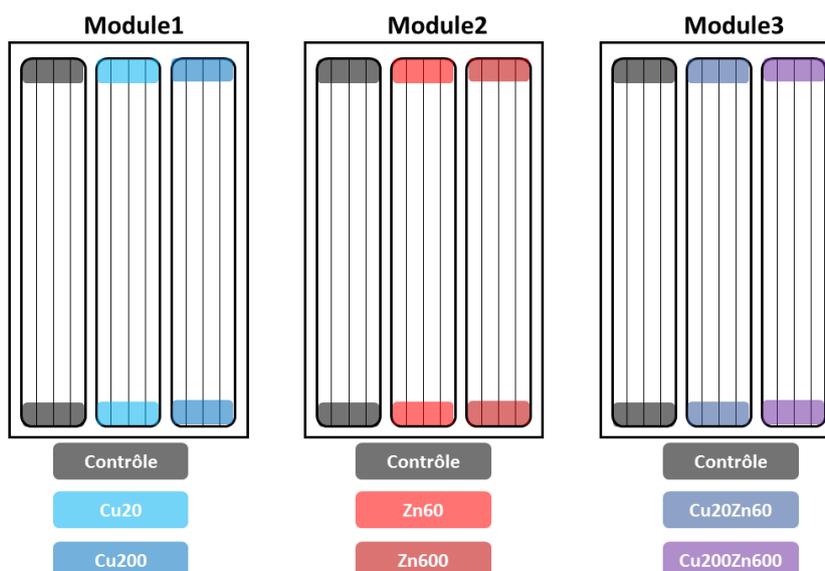


Figure 23 Concept expérimental dans les trois modules. Chaque module est composé de trois lots de quatre canaux.

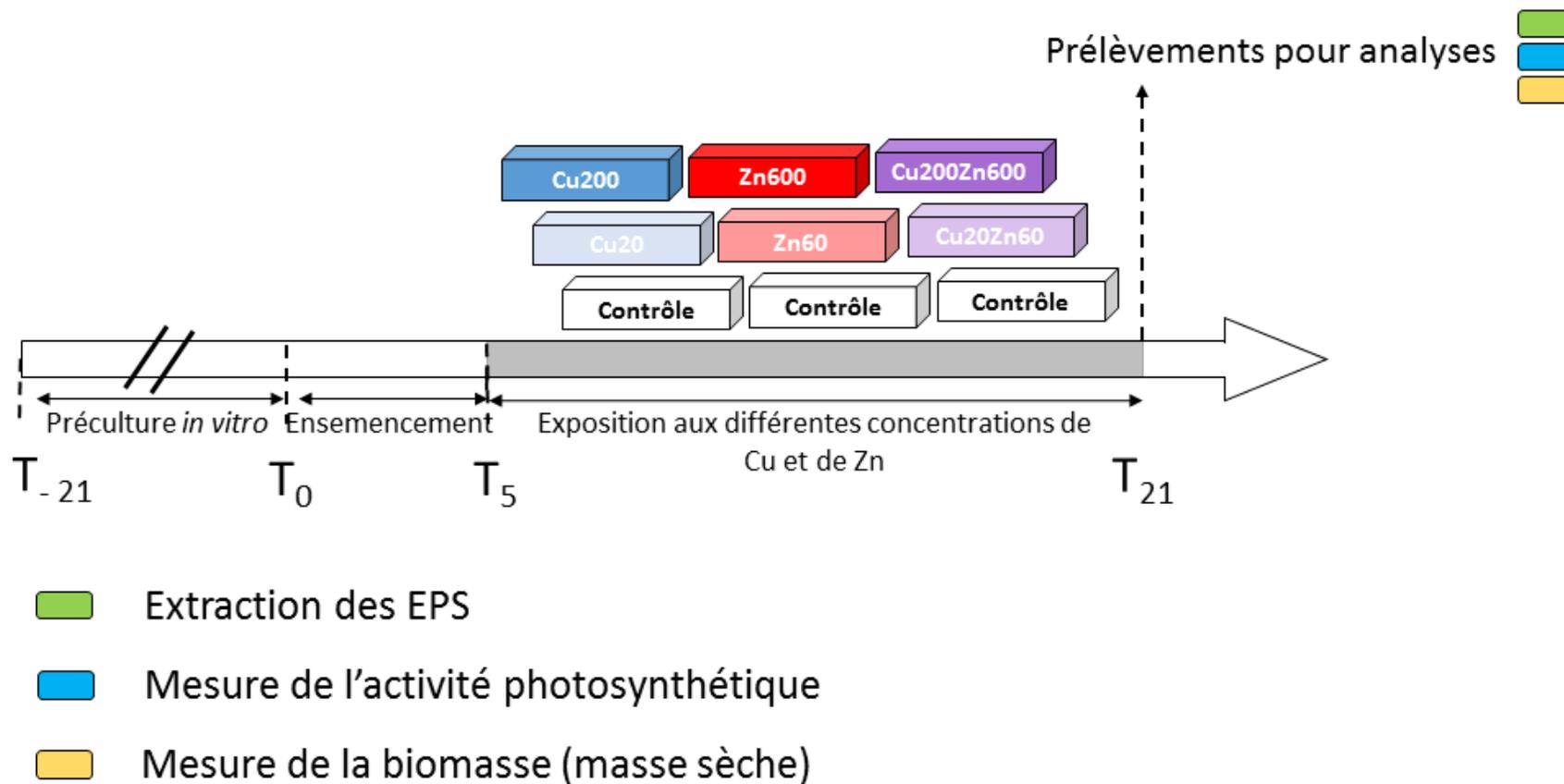


Figure 24 Plan de chaque expérimentation réalisée en microcosmes contenant 7 conditions expérimentales différentes : microcosmes contrôle (coupons colonisés en absence de métaux), Cu20 (exposés à 20 $\mu\text{g L}^{-1}$ de Cu), Cu200 (exposés à 200 $\mu\text{g L}^{-1}$ de Cu), Zn60 (exposés à 60 $\mu\text{g L}^{-1}$ de Zn), Zn600 (exposés à 600 $\mu\text{g L}^{-1}$ de Zn), Cu20Zn60 (exposés à 20 $\mu\text{g L}^{-1}$ de Cu et 60 $\mu\text{g L}^{-1}$ de Zn) et microcosme Cu200Zn600 (exposés à 200 $\mu\text{g L}^{-1}$ de Cu et 600 $\mu\text{g L}^{-1}$ de Zn).

3.2 Biofilms phototrophes exposés à différents facteurs environnementaux

3.2.1 Objectifs de l'expérience

Cette étude a été réalisée afin d'étudier la réponse de biofilms phototrophes simplifiés face à différents facteurs environnementaux. Dans un premier temps, nous avons décidé de faire varier des facteurs connus pour impacter la croissance d'une cellule phototrophe : la disponibilité en nutriments (P), l'intensité lumineuse et la température de l'eau (**Figure 25**). Dans un second temps, au cours de leur croissance sous différentes conditions environnementales, ces biofilms sont brièvement exposés à une concentration de Cu égale à 50 $\mu\text{g L}^{-1}$ dans le but de quantifier la bioaccumulation du Cu à des conditions n'induisant pas de modification de la physiologie du biofilm (**Chapitre IV**). Enfin, une période d'assèchement des modules suivie d'une remise en eau est réalisée afin de simuler la non permanence des cours d'eau lors de périodes estivales.

3.2.2 Déroulement de l'expérimentation

Les conditions contrôlées de pré-culture dans les enceintes sont identiques à celles utilisées dans l'expérimentation précédente (paragraphe 3.1) pour les trois espèces phototrophes. Puis trois expérimentations successives ont été réalisées afin d'utiliser séparément les trois microorganismes (**Figure 25**). Au total, trois expérimentations en microcosmes ont donc été effectuées sur une période de 7 semaines chacune.

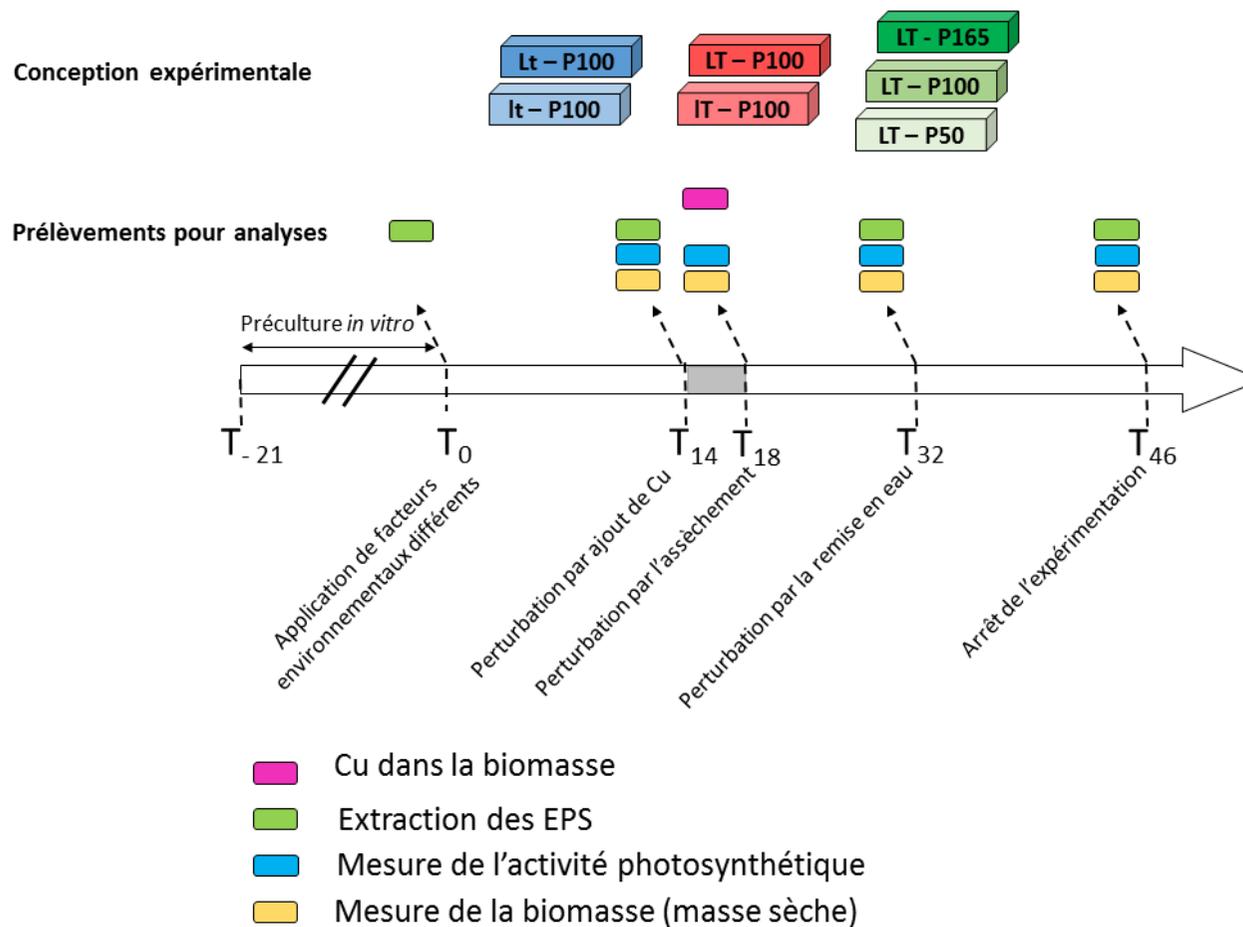


Figure 25 Plan de chaque expérimentation réalisée en microcosme contenant 7 conditions expérimentales différentes : les mentions « L » et « I » indiquent un biofilm qui s'est développé avec une intensité lumineuse respective de 70 et 30 $\mu\text{mol s}^{-1} \text{m}^{-2}$. Les mentions « T » et « t » indiquent les températures auxquelles le biofilm s'est développé, soit 22°C et 19°C. Les mentions P165, P100 et P50 indiquent un biofilm qui s'est développé avec une concentration en P égale à 8,71, 5,23 et 2,61 mg L^{-1} .

Chaque expérience en microcosme se déroule de la façon suivante, et ce pour chaque combinaison de facteurs environnementaux appliquée : une première phase de croissance pendant 14 jours est suivie d'une exposition au cuivre pendant 4 jours, avant de terminer par une période d'assèchement et de remise en eau d'une durée de 14 jours chacune. Pour chaque expérimentation, un nombre de 7 microcosmes correspondant aux 7 conditions différentes :

- Un **premier module**, contenant une eau de circulation à une température de **22°C** avec une concentration en **P égale à 5,23 mg L⁻¹** permet de tester un gradient de deux luminosités : 30 et 70 $\mu\text{mol s}^{-1} \text{m}^2$.
- Un **deuxième module** contient de l'eau de circulation à **19°C** avec une concentration en **P égale à 5,23 mg L⁻¹** permet de tester le même gradient de luminosité que le module 1.
- Le **troisième module** qui contient une eau de circulation à **22°C** et un éclairage fixé à **70 $\mu\text{mol s}^{-1} \text{m}^2$** permet de tester un gradient de concentration en phosphore égal au milieu de culture (P100 % = 5,23 mg L⁻¹) et équivalent à 165 % et 50 % du milieu de culture (respectivement 8,71 mg L⁻¹ et 2,61 mg L⁻¹).

A la fin de la période d'assèchement (T₃₂), l'ensemble des trois modules est alimenté avec du milieu de culture frais, identique à celui présent à T₀.

Au terme de chaque période de l'expérimentation (périodes mentionnées dans la **Figure 25**), 12 coupons sont prélevés de manière aléatoire pour évaluer les effets des paramètres d'expositions sur la nature et la quantité des EPS produites. De la même manière, 10 coupons sont collectés et mis en suspension dans 50 mL de milieu de culture pour déterminer la biomasse développée sur les coupons.

4 Analyse de la réponse microbienne et de la production d'EPS

4.1 Observation microscopique des biofilms : cryomicroscopie électronique à balayage (Cryo-MEB)

Afin de visualiser l'aspect des trois biofilms phototrophes mono-espèce utilisés pendant les différentes expérimentations, de la cryomicroscopie électronique à balayage (Cryo-MEB) a été réalisée sur des biofilms âgés de 21 jours provenant de l'expérimentation réalisée en

microcosme (paragraphe 3.1). Ces observations ont été faites au Centre de Microscopie Electronique Appliquée à la Biologie (CMEAB), situé à la faculté de médecine de Rangueil (Université Paul Sabatier) avec le microscope électronique à balayage Quanta 250 FEG FEI (**Figure 26a**) équipé d'un module de cryopréparation quorum PP3000T (**Figure 26b**). La cryomicroscopie permet une meilleure préservation de l'échantillon tout en augmentant la qualité de l'observation.

Le biofilm issu d'un coupon prélevé dans un mini-canal en condition contrôle, c'est-à-dire sans ajout de métaux, a été fixé dans une solution de glutaraldéhyde à 2 % et conservé à 4°C. L'échantillon a été déposé sur un filtre puis fixé sur un support avant d'être congelé dans de l'azote liquide à -220°C. L'échantillon congelé a été transféré sous vide dans le module de cryopréparation qui permet l'introduction des échantillons fixés par congélation dans le microscope. La température dans la chambre est maintenue constante à -140°C, elle est abaissée à -95°C pendant 15 min afin de sublimer l'échantillon. L'échantillon est ensuite métallisé avec du Pb (60 s, 10 mA) avant d'être transféré vers la cryoplatine du microscope électronique où la température est également de -140°C afin de préserver l'échantillon congelé dans un état stable. En amont de l'étape de sublimation, l'échantillon a été cryofracturé de manière aléatoire par un couteau de cryofracture.

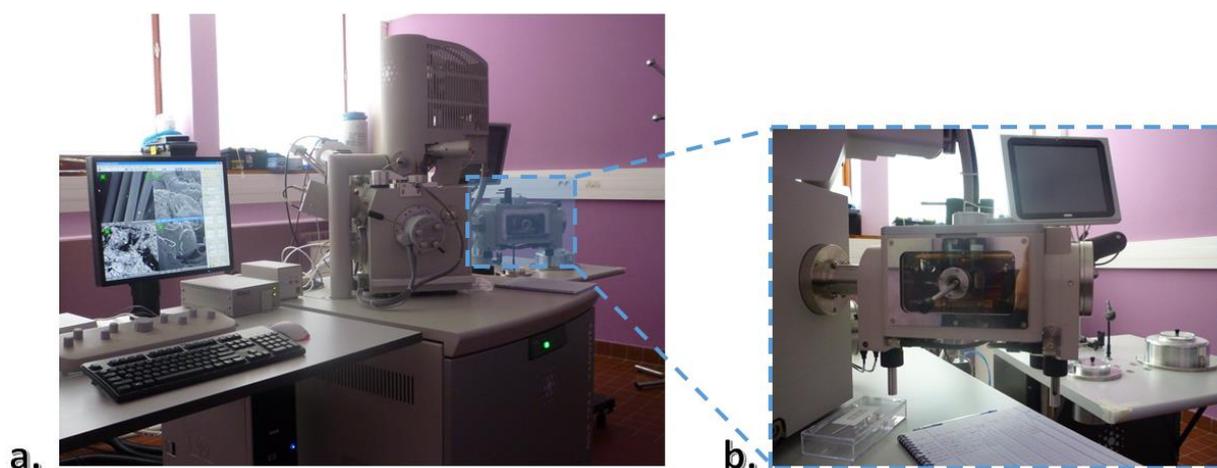


Figure 26 Photographie du Microscope Electronique à Balayage à effet de champ (a) (Quanta 250 FEG FEI) équipé d'un module de cryopréparation (b) (Quorum PP3000T).

4.2 Mesure de la biomasse

Le biofilm présent sur les coupons est mis en suspension dans 50 mL de milieu de culture en grattant les coupons avec une brosse à dent propre. La matière sèche (MS), exprimée en mg, a été mesurée par pesée d'un culot sec d'une suspension de biofilm après 24 h à 110°C ou 72 h à 70°C puis calculée d'après la formule :

$$MS \text{ (mg)} = m_2 - m_1$$

avec m_1 le poids du pilulier vide et sec (en mg) et m_2 le poids du pilulier avec la suspension de biofilm après le passage à l'étuve (en mg). Cette matière sèche est ensuite exprimée en mg MS cm^{-2} en tenant compte du nombre de coupons prélevés.

4.3 Mesure de l'activité photosynthétique

Le suivi de l'activité photosynthétique d'un biofilm phototrophe permet d'observer certaines altérations de l'état physiologique général du biofilm, par l'intermédiaire d'un fluorimètre (**Figure 27a**) appelé PhytoPAM (Phytoplankton Analyzer, Heinz Walz GmbH, Effeltrich, Germany). En enregistrant la fluorescence émise par le photosystème II des cellules chlorophylliennes après l'émission d'un flash de lumière saturante sur le biofilm, cet appareil permet d'évaluer l'efficacité photosynthétique. Les échantillons sont préalablement laissés à l'obscurité pendant 20 minutes de façon à réaliser des mesures sur des échantillons en « dormance photosynthétique » (Baker, 2008). L'échantillon subit par la suite différentes expositions lumineuses (**Figure 27b**) :

- Un éclairage minimal ($0,15 \mu\text{mol s}^{-1} \text{m}^{-2}$) : cette première source lumineuse induit une émission de fluorescence de la part des cellules sans intervention de la photosynthèse permettant de définir le F_0 (estimation de la biomasse présente dans l'échantillon).
- Un flash court (0,1 à 1s) de lumière saturante ($8\ 000$ à $10\ 000 \mu\text{mol s}^{-1} \text{m}^{-2}$) : ce flash lumineux induit la fermeture des centres réactifs du photosystème II (PSII), ce qui provoque une augmentation de la fluorescence émise et de la chaleur (perte thermique), permettant de définir la fluorescence maximale (F_m) équivalente à l'activité photosynthétique.

La mesure des valeurs F_0 et F_m permet de calculer le rendement maximal de fluorescence du PSII (Φ_{PSII}) :

$$\Phi_{PSII} = \frac{F_m - F_0}{F_m}$$

La valeur de la longueur d'onde d'excitation est définie en fonction de la famille de microorganismes photosynthétiques analysée. En effet, pour la cyanobactérie un signal de fluorescence (F_0 et F_m) sera détecté avec une longueur d'excitation de 645 nm, due à l'absorption par l'allophycocyanine. L'algue verte, par la présence de chlorophylle *b*, émet un signal à une longueur d'onde d'excitation de 520 nm. Au contraire, les diatomées montreront un signal à 470 nm et 520 nm dû à l'absorption de la chlorophylle *c*, des caroténoïdes et de la fucoxanthine.

Pour chaque réplicat, correspondant à un mini-canal, 8 mesures sont réalisées afin d'obtenir un rendement moyen de fluorescence du PSII.

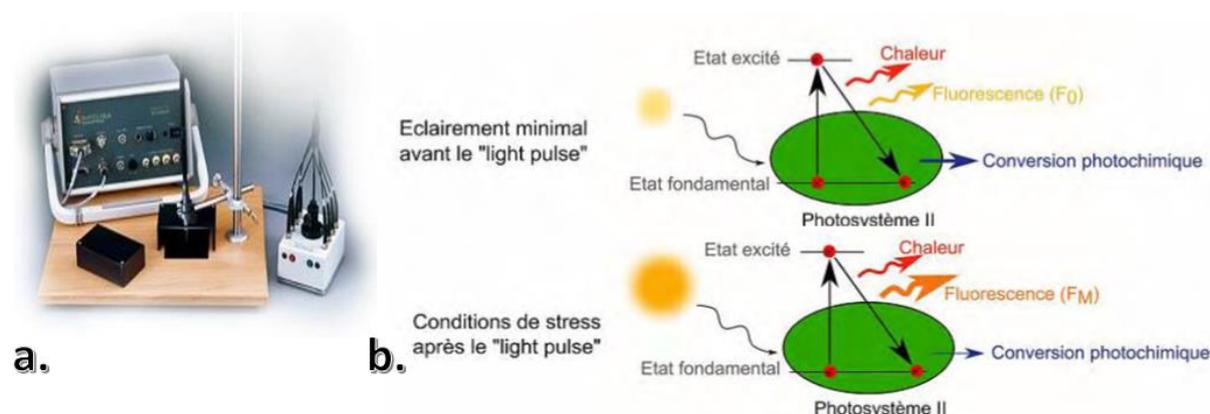


Figure 27 Emission de fluorescence mesurée par le PhytoPAM (a) en fonction des conditions de lumière émise au travers de la fibre optique et reçue par le photosystème II des cellules phototrophes (b). Modifiée d'après Roux-Barthès (2014).

4.4 Identification et caractérisation des EPS

Afin de récupérer une fraction d'EPS représentative de la matrice du biofilm, il est nécessaire de prendre certaines précautions d'échantillonnage du biofilm et de conservation des extraits d'EPS. L'échantillon de biofilm ne doit pas être congelé entre le prélèvement et l'extraction des EPS pour limiter la lyse cellulaire qui conduirait à la libération de matériels

intracellulaires. D'autre part, après extraction, les échantillons d'EPS solubilisés doivent être conservés à 4°C ou dans de la glace pour limiter toute activité enzymatique.

4.4.1 Extraction des EPS

Afin de mettre au point une méthode permettant l'extraction des EPS de trois familles différentes de microorganismes phototrophes, des cultures en erlenmeyer sont renouvelées toutes les 5 semaines, ce qui permet d'avoir constamment de la biomasse algale permettant la réalisation du protocole. Soixante-douze heures avant l'extraction, le milieu de culture spécifique à chaque espèce est renouvelé.

Pour réaliser une extraction des EPS de biofilms cultivés en erlenmeyer ou en microcosmes sur une biomasse algale équivalente quelle que soit la méthode utilisée, il est nécessaire de pouvoir réaliser un prélèvement reproductible et homogène de l'agrégat. Pour cela, un prétraitement des cultures est réalisé avec l'Ultra-Turrax (T25, Janke-Kunkel) à 13 500 tpm pendant 1 min permettant de désagréger la biomasse (**Figure 28**). L'ensemble des extractions sera réalisé sur des échantillons de biofilm en suspension dont la concentration est équivalente à 10 g L⁻¹ de masse sèche. Pour cela, les échantillons sont concentrés ou dilués dans un tampon PBS (Phosphate Buffer Saline, 10 mM HPO₄²⁻/H₂PO₄⁻ à pH 7,4). Pour les expérimentations permettant la mise en place du protocole d'extraction (**Chapitre III**), les traitements ont été réalisés dans 1 mL avec une quantité de 10 mg de biomasse (MS) ; ce faible volume permet d'augmenter le nombre de traitements possibles pour une même culture. En revanche, 20 mg (MS) ont été traités lors des extractions réalisées au cours des différentes expérimentations en microcosme (**Chapitre IV, V et VI**).

Suite à une étude bibliographique concernant les techniques d'extraction déjà utilisées afin d'extraire les EPS de biofilm phototrophes, 5 protocoles ont été sélectionnés mettant en oeuvre 2 méthodes physiques et 3 méthodes chimiques. Pour chaque espèce, chaque méthode et chaque condition ont été réalisées en triplicats. Avant tout traitement, un lavage des échantillons de biofilms est réalisé avec du tampon PBS afin d'éliminer tous les composés non liés au biofilm et le milieu de culture restant. L'étape de centrifugation est commune à toutes les techniques : elle permet de récupérer les EPS solubles extraites dans le surnageant du reste de la biomasse. La centrifugation est effectuée à 4 000 g pendant 15 min à 4°C (Heraeus

Multifuge 3SR). Les méthodes d'extraction mécaniques et chimiques sont appliquées de façon individuelle ou combinées en séquentiel.

4.4.1.1 Protocoles d'extraction physique

La résine échangeuse de cation (Dowex Marathon Sigma-Aldrich), a été testée à une concentration de 25 ou 50 g g⁻¹ (MS) pendant 60 à 90 min afin d'optimiser ces conditions d'utilisation pour de futures études.

L'extraction par ultrasons (Bandelin Sonopuls HD 2070) a été effectuée à 25 Watts et 20 kHz pendant 2 minutes en immergeant la sonde dans 1 mL de suspension de biofilm ; l'échantillon est maintenu à basse température dans de la glace pour limiter la montée en température due au traitement.

4.4.1.2 Protocoles d'extraction chimique

Le formamide (CH₃NO), dont le mécanisme d'action n'est pas connu, est utilisé dans les processus d'extraction d'EPS de boues activées ou de granules afin d'augmenter l'efficacité d'extraction des EPS fortement liées et protéger les cellules contre la lyse cellulaire (Adav and Lee, 2008 ; Liang *et al.*, 2010). Le formamide est dilué à 0,22 % dans le tampon PBS. Placés à 4°C sur une plaque agitante (150 tpm), les échantillons sont incubés pendant 60 min dans cette solution avant d'être centrifugés afin de récupérer le surnageant contenant les EPS extraites.

L'Ethylène Diamino Tetra Acetic acid (EDTA, Sigma-Aldrich), chélateur de cations, n'est soluble qu'à des pH supérieurs à 8 ; il est donc mis en solution dans du Tris-HCl 1 M (pH 8,00 ± 0,05, Sigma) à une teneur en EDTA en solution égale à 1 %. L'extraction a été effectuée à température ambiante pendant 90 min sur une plaque agitante (150 tpm).

Le détergent non ionique Tween 20 (Sigma- Aldrich) est préparé dans du tampon PBS à 0,25 %. Afin d'optimiser le protocole d'extraction, différents temps d'incubation ont été testés (60 et 90 min) en laissant les échantillons à température ambiante.

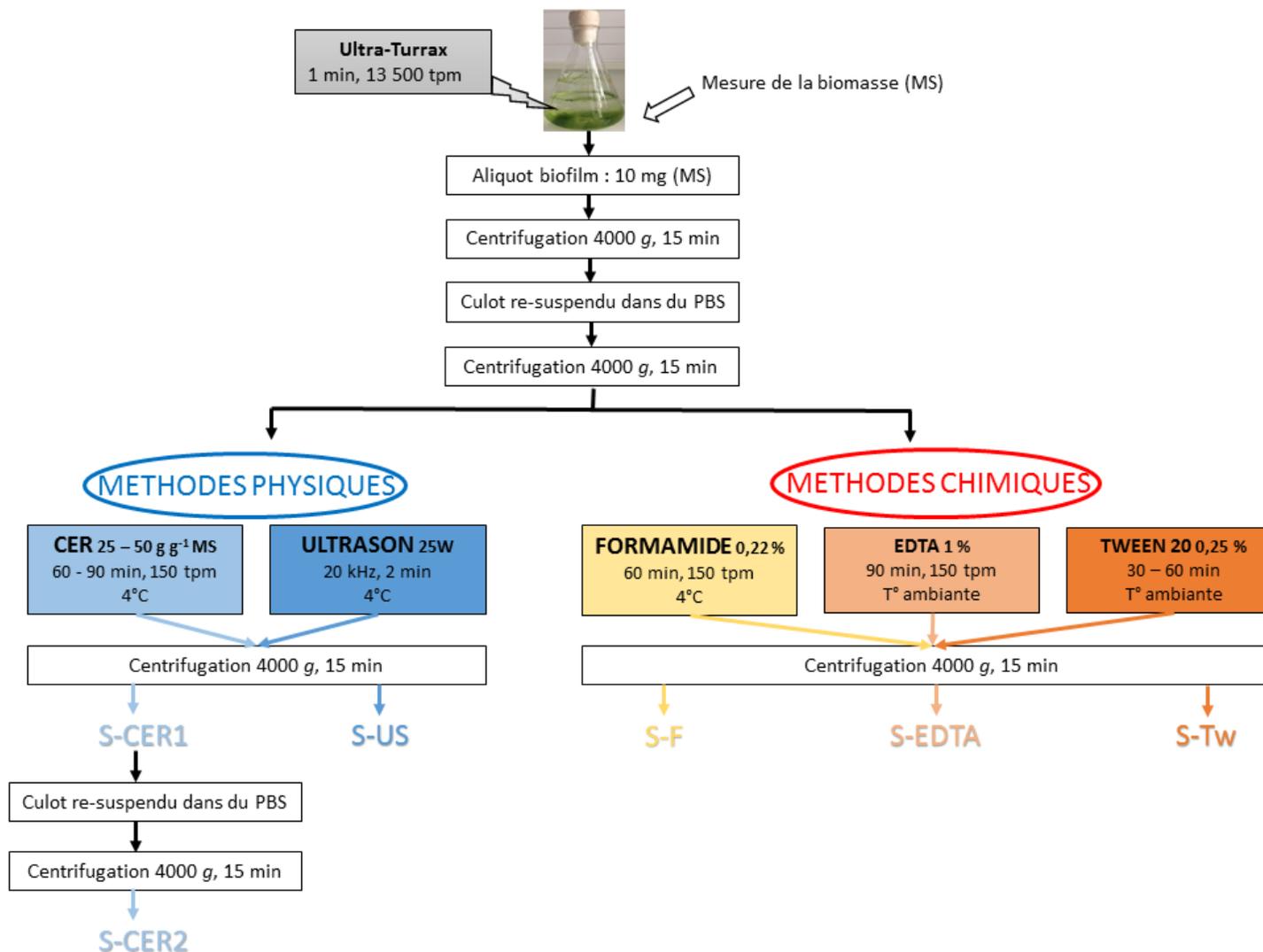


Figure 28 Méthodes d'extraction des EPS produites par les trois espèces de microorganismes phototrophes utilisées au cours des différentes expérimentations. S-X représente le surnageant post-centrifugation correspondant à la technique X appliquée. S-CER = S-CER1 + S-CER2.

4.4.2 Méthodes de caractérisation des EPS

4.4.2.1 Dosages colorimétriques

Par des dosages biochimiques, la quantification des EPS (protéines, polysaccharides et ADN) est réalisée après chaque protocole d'extraction.

4.4.2.1.1 Dosages des protéines (PN) à l'acide bicinchoninique (BCA)

L'acide bicinchoninique est un composé hydrosoluble qui forme un complexe avec Cu^{2+} de couleur bleu-violet (Smith *et al.*, 1985). L'intensité de la couleur produite par ce complexe, mesurée à 540 nm, est proportionnelle à la concentration en protéines présentes dans l'extrait. Le réactif BCA (BCA-Kit, Sigma) est composé de deux composants :

- Une solution A constituée d'acide bicinchoninique, de carbonate de sodium, de bicarbonate de sodium, de tartrate de sodium et de sulfate cuprique pentahydraté.
- Une solution B de sulfate de cuivre (CuSO_4) à 1 %.

Dans un premier temps, une solution appelée « solution de travail BCA » a été préparée en mélangeant les solutions A et B dans des proportions 50/1 (v/v). Le dosage des protéines à l'acide est effectué en micro-dosage dans des microplaques 96 puits. Vingt-cinq μL d'échantillon et 200 μL de solution de travail BCA ont été déposés dans les puits de la microplaque en triplicats. Dans le cas d'échantillon contenant de l'EDTA, 20 μL d'échantillon sont incubés avec 1 mL de solution mère BCA. Un temps d'incubation de 15 min à 60°C est nécessaire, suivi d'un temps de refroidissement de 10 minutes, avant de lire l'absorbance à 540 nm sur le lecteur microplaque ELISA (Lecteur Synergy Mx Biotek). De la même manière, une gamme étalon de BSA (0 à 800 mg L^{-1} , Bovine Serum Albumin, Sigma) a été réalisée dans les divers tampons d'extraction et a été traitée en parallèle.

4.4.2.1.2 Dosages des polysaccharides (PS) à l'antrone

Le dosage à l'antrone permet de quantifier l'ensemble des sucres qui contiennent des fonctions carbonyles (C=O). La réaction entre l'antrone et les sucres totaux est révélée par une coloration verte dont l'intensité, mesurée à 620 nm, augmente proportionnellement avec la concentration en sucre présent dans les extraits (Dreywood, 1946).

Une solution de travail a été préparée en mélangeant le réactif à l'anthrone (SIGMA) dans de l'acide sulfurique (H_2SO_4) concentré à 95 % pour obtenir une concentration finale en anthrone de 2 g L^{-1} . Le dosage des polysaccharides totaux a également été réalisé à l'aide de microplaques 96 puits. Cent μL d'échantillon ainsi que 200 μL de solution mère sont déposés en triplicats dans les puits de la microplaque. Un temps d'incubation de 30 min à 60°C est nécessaire, suivi d'un temps de refroidissement de 10 min, avant de lire l'absorbance à 620 nm sur le lecteur microplaque ELISA (Lecteur Synergy Mx Biotek). De la même manière, une gamme étalon de glucose (0 et 100 mg L^{-1}) a été préparée dans les divers tampons d'extraction et a été traitée en parallèle.

4.4.2.1.3 Dosage de l'ADN au Picogreen

Le dosage de l'ADN présent dans les extraits a été évalué en utilisant le kit Picogreen® « Quant-iT™ PicoGreen® dsDNA Assay Kit P11496 » (Thermo Fisher) en suivant le protocole fourni par le fabricant. Une solution de travail, nommée TE, a été préparée en diluant 200 fois le Picogreen® dans un tampon Tris-EDTA (10 mM Tris-HCl , 1 mM EDTA , $\text{pH } 7,5$). Pour chaque extrait, 100 μL d'échantillon ainsi que 100 μL de solution TE ont été déposés en triplicats dans des microplaques 96 puits. Après un temps d'incubation de 2 min à température ambiante, les plaques sont analysées à l'aide d'un lecteur à microplaque (Optima FluoStar, BMG Labtech). Les échantillons sont excités par un faisceau à 485 nm et la fluorescence émise à une longueur d'onde de 520 nm est mesurée. En parallèle et en suivant la même procédure, une gamme étalon d'ADN $_{\lambda}$ de 0 à $1\,000 \text{ ng mL}^{-1}$ (extrait du phage λ , fourni avec le kit) a été réalisée.

Comparé à d'autres méthodes utilisées en routine pour quantifier l'ADN, ce dosage est facile à réaliser, présente une bonne sensibilité avec une limite de détection de 250 pg mL^{-1} d'ADN double brin et ne nécessite que peu de volume d'ADN en solution.

4.4.2.2 Chromatographie à exclusion stérique

Le système de chromatographie liquide par exclusion stérique utilisé est de type AKTA Purifier 10 (GE Healthcare), équipé d'un spectromètre UV et connecté à un fluorimètre (1260 Infinity, Agilent Technologies) (**Figure 29**). Cette chromatographie en phase liquide permet de séparer des molécules en fonction de leur volume hydrodynamique. En fonction de leur taille,

les molécules vont traverser plus ou moins vite les pores présents dans le gel de polymères qui constitue la colonne (phase stationnaire). Les molécules les plus grandes seront moins retenues dans la colonne, elles auront donc un temps de rétention plus court que les petites molécules et elles sortiront de la colonne en début d'éluion.

Le système comporte deux pompes (A et B), qui permettent de faire varier la composition de la solution tampon en générant un gradient entre les éluants de chaque pompe (**Figure 29**). Dans notre étude, l'éluion des échantillons a été réalisée avec une seule phase mobile constituée d'un tampon PBS (10 mM $\text{HPO}_4^{2-}/\text{H}_2\text{PO}_4^-$, 2,7 mmol L^{-1} KCl, 137 mmol L^{-1} NaCl, pH 7,4) circulant à un débit de 0,4 mL min^{-1} . Les surnageants, obtenus durant le protocole d'extraction des EPS, ont été filtrés (0,2 μm) avant d'être injectés (250 μL) à travers une boucle d'injection. L'échantillon d'intérêt va ensuite traverser deux colonnes : la SUPERDEX PEPTIDE 10/300 GL (GE Healthcare) puis la SUPERDEX 200 10/300 GL (GE Healthcare). Selon les indications du fabricant, la séparation des molécules peut s'effectuer pour une gamme de taille comprise entre 0,3 et 10 kDa et entre 10 et 600 kDa respectivement. En sortie de colonne, un détecteur (spectromètre) fournit des données relatives :

- l'absorbance à 210 nm, permettant de détecter les molécules organiques totales,
- l'absorbance à 280 nm, permettant de détecter préférentiellement les protéines et les molécules organiques présentant des doubles liaisons.

De plus, il est aussi possible de coupler la sortie de colonne avec un fluorimètre (Fluostar, BMG Labtech) réglé sur une longueur d'onde d'excitation de 221 nm et sur une longueur d'onde d'émission de 350 nm afin de détecter la fluorescence des acides aminés tryptophane et de détecter plus spécifiquement les protéines.

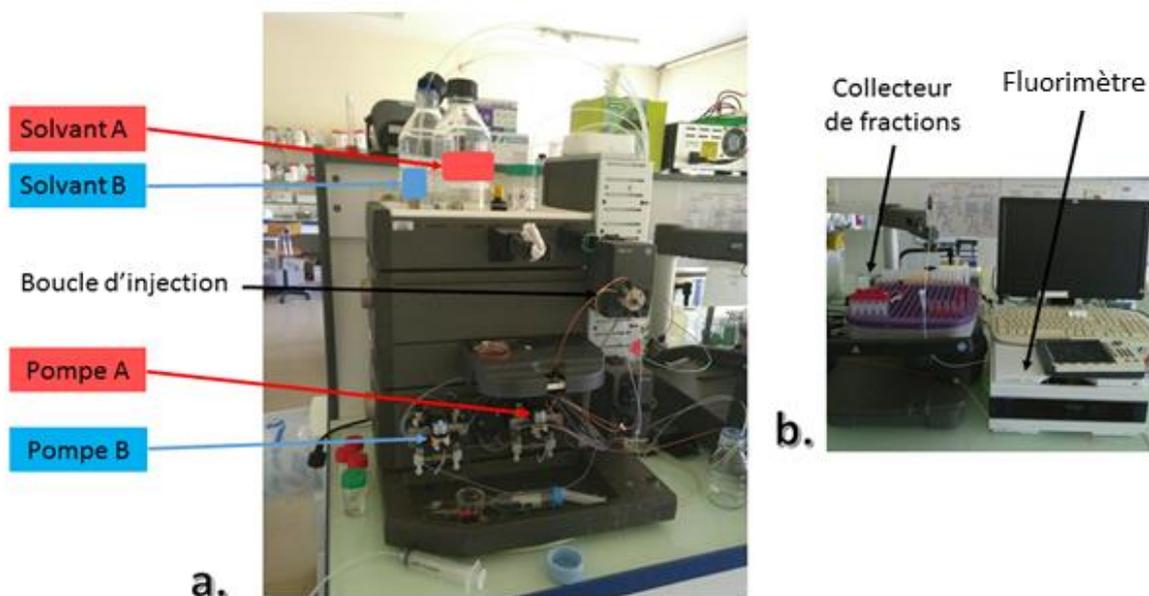


Figure 29 Système de chromatographie liquide Akta Purifier 10 couplé à un spectrophotomètre UV (a) et relié à un collecteur de fractions ainsi qu'à un fluorimètre (b).

Grâce à une gamme étalon obtenue après injection d'une série de protéines ayant des tailles connues (entre 0,3 et 669 kDa), il est possible de proposer une droite de calibration afin d'estimer la masse moléculaire des diverses molécules présentes dans l'échantillon à partir de leur volume d'éluion (**Figure 30**).

Les profils chromatographiques sont enregistrés en temps réel par un logiciel (UNICORN 5.1, GE Healthcare). Le volume mort et le volume total sont estimés à 15 mL et 46 mL respectivement. Pour un signal donné et après avoir déterminé manuellement la ligne de base, l'intégration de la surface des pics et les aires totales de chaque profil sont calculés automatiquement par le logiciel.

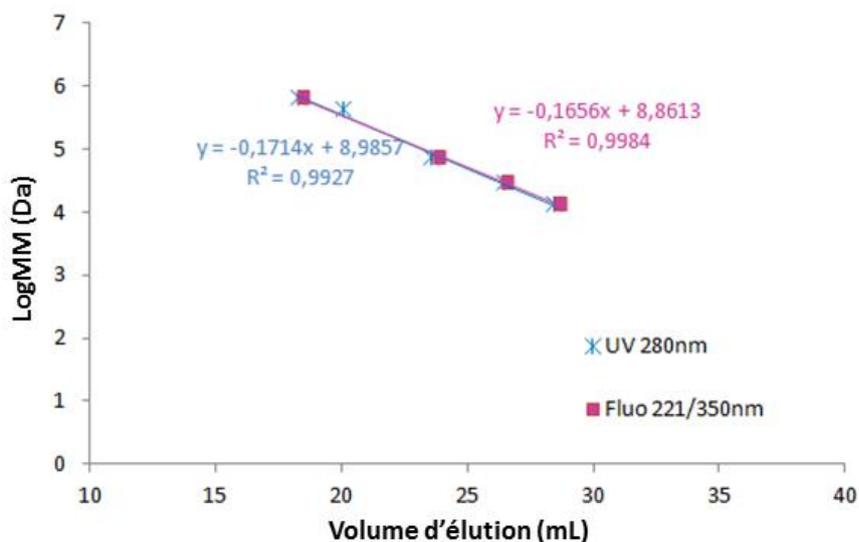


Figure 30 Relation entre la taille des protéines et le volume d'éluion après le passage dans les colonnes Superdex peptide 10/300 GL et Superdex 200 10/300 GL permettant l'obtention de la droite de calibration.

4.4.2.3 Contrôle de la lyse cellulaire : quantification de la chlorophylle *a*

La teneur en chlorophylle *a* des différents échantillons de biofilm est mesurée au spectrophotomètre ($\lambda = 663 \text{ nm}$) après avoir été extraite d'après le protocole utilisant de l'acétone à 90 % décrit par Humphrey and Wootton (1966). A partir d'une suspension de biofilm homogénéisée (13 500 tpm, Ultra-Turrax T25), une gamme de concentration a été réalisée de 0 à 10 mg MS mL⁻¹. Chaque culot cellulaire obtenu après centrifugation (4 000 g, 15 min à 4°C) est désagrégé dans 15 mL d'acétone à 90 % par un bain à ultrason pendant 1 min avant d'être laissé pendant 4 h à l'obscurité à température ambiante. Enfin, le surnageant est récupéré pour une détermination spectrométrique de l'absorbance à 663 nm.

Les valeurs d'absorbance obtenues pour chaque concentration permettent d'obtenir une équation de droite permettant par la suite d'estimer la quantité de cellule lysée après une étape d'extraction. Dans ce dernier cas, il suffit de doser la Chl *a* dans les surnageants lors des étapes d'extraction des EPS pour évaluer le taux de lyse cellulaire induit par chaque technique d'extraction.

4.5 Analyse de la diversité bactérienne

4.5.1 Préparation des échantillons

Quinze mL de biofilm en suspension ont été centrifugés à 12 000 g pendant 20 min à 4°C. A partir du culot, des aliquotes contenant 100 mg de masse humide ont été réalisés avant d'être stockés à -80°C (Lyautey *et al.*, 2005).

4.5.2 Extraction de l'ADN génomique total

Quelle que soit l'espèce utilisée au cours de ces travaux de thèse, les biofilms sont constitués d'une seule espèce phototrophe et de son cortège bactérien (isolement du microorganisme phototrophe à partir d'échantillons de biomasses périphytiques de rivière en condition non axénique). Afin d'étudier la diversité des communautés bactériennes composant le biofilm, la première étape consiste à extraire l'ADN génomique présent dans chaque échantillon. Pour cela, nous avons utilisé le kit *DNeasy Plant Mini Kit* de QIAGEN. Les extractions ont été réalisées en suivant le protocole du fournisseur. Après extraction, une migration des échantillons sur un gel d'agarose 1 % (Sigma-Aldrich), pendant 25 min à 100 V dans un tampon TAE 0,5X (252 g L⁻¹ trizma base, CH₃COOH dans les proportions 0,057/1 (v/v), 18,6 g L⁻¹ de Na₂EDTA ; Thermo Scientific™) a été réalisée en présence d'un marqueur de masse pour être ensuite révélée au SYBR Green (Sigma Aldrich) par fluorométrie (Fluoroscanner Ascent, LabSystem).

4.5.3 Amplification par PCR

Pour l'amplification des parties intergéniques, le couple d'amorces ITSr (5'GTCGTAACAAGGTAGCCGTA-3') et ITSReub (5'-GCCAAGGCATCCACC-3') est utilisé (Cardinale *et al.*, 2004) ; elles correspondent aux extrémités des intergènes ciblés et sont marquées par fluorescence.

Les gènes de l'ARNr 16S des souches bactériennes présentes au sein du biofilm ont été amplifiés par PCR dans 10 µL de solution de réaction contenant 0,5 µM de chaque amorce, 3 ng d'échantillon d'ADN, 1X du tampon Go Taq Hot Start polymerase (Promega), 0,2 mM de

chaque dNTP (Promega), 2,5 mM de MgCl₂, 0,5 mg mL⁻¹ de BSA (Bovin Serum Albumin, Acetylated, Promega) et 0,5 U de la Hot Start Polymerase (Promega).

Le programme de PCR est le suivant : une étape de dénaturation pendant 5 min à 94°C suivi de 35 cycles de dénaturation de 1 min à 91°C, d'hybridation des amorces pendant 1 min à 56°C et d'élongation pendant 2 min à 72°C. Enfin une dernière étape d'extension est réalisée pendant 10 min à 72°C. Pour chaque amplification, de l'ADN témoin (*Escherichia coli*) a été utilisé comme référence positive et de l'eau milli-Q comme témoin négatif.

La vérification et la quantification de la concentration d'ADN extrait et amplifié est déterminée pour chaque échantillon par migration sur un gel d'agarose à 1,65 %.

4.5.4 ARISA

Parmi les différentes techniques biomoléculaires, l'ARISA (Automated Ribosomal Intergenic Spacer Analysis) a été choisie dans le but d'étudier la diversité génétique et donc la potentielle évolution des communautés bactériennes au sein du biofilm. Cette méthode est utilisée pour étudier les impacts environnementaux (exposition aux métaux, influence des saisons, etc.) sur la structure des populations bactériennes dans un biofilm (Lear *et al.*, 2009 ; Lyautey *et al.*, 2011). Elle est basée sur l'hétérogénéité de longueur entre espèce de l'intergène 16S – 23S de l'ADNr 16s.

Les produits de PCR sont dénaturés à 96°C pendant 3 min avec l'ajout d'une solution de formamide à 37 % avant d'être introduits dans l'analyseur 3130 xl Capillary Genetic Analyzer (Applied Biosystems) avec un standard de taille ADN LIZ1200 (Applied Biosystems). Le génotypage des échantillons est réalisé au sein du plateau de Génomique GeT-Purpan à Toulouse. Les données obtenues ont ensuite été analysées avec le Logiciel Peak Scanner 1.0 (Applied Biosystems). La taille des fragments d'ADN a été arrondie au nombre entier le plus proche. Les pics identiques à 2 pb près ont été considérés comme correspondants à la même unité taxonomique opérationnelle (OTU). Les fragments de moins de 200 pb ainsi que les pics correspondant à moins de 0,1 % de l'aire totale de l'échantillon ont été exclus de l'analyse. Pour chaque chromatogramme, les pics ont été notés comme présents ou absents et collectés en matrice de taxons (OTU).

4.6 Détermination de la teneur en Cuivre et en Zinc dans la biomasse par Spectrométrie à Emission Optique couplée à l'ICP (ICP-OES)

Après séchage des échantillons en suivant le protocole décrit dans le paragraphe 4.2, la biomasse des biofilms est pesée avant d'être digérée (étapes réalisées dans une salle blanche à EcoLab (Toulouse, France)). Pour cela les échantillons sous forme de poudre sont remis en suspension dans 1,5 mL d'HNO₃ 68 % pendant une nuit. Les échantillons sont ensuite placés dans un DigiPREP blocks afin de suivre le programme suivant : rampe de montée de 30 min pour atteindre une température de 80°C puis maintien du pallier de température durant 60 min. Après refroidissement, 1 mL d'eau oxygénée à 30% est ajouté à chaque échantillon avant d'être replacé au sein du digiPREP pour une rampe de montée de 15 min pour atteindre 55°C puis maintien du pallier de température durant 25 min. Les échantillons sont ensuite dégazés puis suivent le dernier programme : rampe de montée de 30 min pour atteindre 80°C puis maintien du pallier de température durant 80 min. Enfin, les échantillons sont dilués pour atteindre un volume final de 20 mL. Afin de déterminer les teneurs métalliques de la biomasse, les échantillons sont analysés avec le Thermo Electron IRIS Intrepid II.

5 Analyses statistiques des données

5.1 Les analyses univariées

Pour permettre la comparaison de l'ensemble des données de physico-chimie, la quantité de protéines et de polysaccharides, l'activité photosynthétique, les descripteurs de biomasse (masse sèche), le nombre d'OTU, des tests d'ANOVA, de Man Whitney ou de Kruskal Wallis ont été réalisés en fonction de la normalité (test de Shapiro), du nombre d'échantillons et de leurs appariements. Ces analyses statistiques ont été réalisées à partir du logiciel PAST 3.18 (<https://folk.uio.no/ohammer/past/>).

5.2 Les incertitudes

Les incertitudes représentées sur les différents graphiques correspondent aux erreurs définies par σ/\sqrt{N} avec σ l'écart type et N le nombre de réplicats.

CHAPITRE III

OPTIMISATION D'UNE METHODE D'EXTRACTION DES EPS DE BIOFILMS PHOTOTROPHES

3. EXTRACTION DES EPS DE BIOFILMS PHOTOTROPHES

Les EPS responsables de l'adhésion et de la cohésion des cellules au sein d'un biofilm sont des polymères complexes majoritairement composés de protéines et de polysaccharides (Ahimou *et al.*, 2007). Les méthodes actuellement utilisées pour caractériser la nature et la structure des EPS de biofilms hétérotrophes sont nombreuses et très diverses mais peu d'études ont été réalisées sur les biofilms phototrophes. Une étape d'extraction des EPS de la matrice d'un biofilm est généralement nécessaire pour leur analyse qualitative et quantitative. Diverses méthodes d'extraction physiques ou chimiques incluant la centrifugation, les traitements thermiques, la sonication, la chélation de cations divalents (résines échangeuses de cations ou EDTA) sont couramment utilisées pour extraire les EPS de biofilms hétérotrophes impliqués dans le traitement des eaux usées (Comte *et al.*, 2007). En ce qui concerne l'analyse des EPS des biofilms phototrophes, la majorité des études ont été réalisées sur des EPS produites par des diatomées benthiques, mais peu sur les algues vertes et les cyanobactéries. Le choix de la méthode d'extraction dépend de la sensibilité des cellules des microorganismes vis-à-vis de la lyse cellulaire et des polymères que l'on souhaite cibler. De ce fait, en tenant compte des espèces composant le biofilm phototrophe, il est souvent nécessaire d'optimiser et d'adapter les protocoles d'extraction des EPS décrits dans la littérature.

Ce chapitre présente l'optimisation d'un protocole d'extraction des EPS applicable à la diversité des microorganismes (procaryotes et eucaryotes) rencontrés dans les biofilms phototrophes, et donc approprié pour l'analyse des EPS de biofilms complexes. En tenant compte de la diversité des liaisons chimiques liant les polymères entre eux au sein de la matrice, plusieurs méthodes d'extraction présentant des modes d'action différents ont été appliquées à trois biofilms simplifiés composés d'une algue verte (*Uronema confervicolum*), d'une diatomée (*Nitzschia palea*) ou d'une cyanobactérie (*Phormidium autumnale*). Ainsi, cinq méthodes d'extraction (chimique ou mécanique) ont été comparées en termes de quantité et de diversité moléculaire des protéines et polysaccharides extraits. De plus, dans les travaux de thèse réalisés suite à cette optimisation (**chapitres IV et V**), nous avons pour objectif d'analyser la nature des EPS produites par les biofilms lorsqu'ils sont exposés à des ETM cationiques (Cu^{2+} et Zn^{2+}) notamment par rapport à leur capacité de biosorption. De ce fait, des méthodes d'extraction impliquant la déstructuration de liaisons ioniques ont été évaluées avec la précaution que le taux de lyse cellulaire soit faible et le rendement d'extraction relativement important.

3. EXTRACTION DES EPS DE BIOFILMS PHOTOTROPHES

Dans le but de i) déstructurer la matrice et faciliter ainsi l'accessibilité aux liaisons et ii) permettre un pipetage reproductible des échantillons, un prétraitement mécanique à l'Ultra-Turrax (13 500 tpm pendant 1 min) a été systématiquement appliqué sur la suspension de biofilm avant l'extraction. Nous avons ensuite testé une méthode mécanique peu spécifique (sonication), une méthode chimique agissant sur les interactions hydrophobes (incubation en présence de Tween 20) et deux autres méthodes déstructurant les ponts ioniques (incubation en présence d'EDTA ou de résine anionique). Enfin, un traitement au formamide, déjà mentionné dans la littérature pour son rôle protecteur contre la lyse cellulaire, a également été testé (Fang *et al.*, 2014). En parallèle, une quantification de la chlorophylle *a* (chl *a*) par spectrométrie a été effectuée dans les extraits afin d'évaluer la lyse cellulaire, permettant par la suite une sélection de la méthode d'extraction la plus efficace mais n'induisant pas ou peu de lyse cellulaire. En effet, si l'intégrité des membranes n'est pas préservée, les composés intracellulaires sont susceptibles d'être libérés dans la fraction d'EPS extraite qui ne sera de ce fait plus représentative de la matrice extracellulaire du biofilm phototrophe.

Dans la littérature, les ultrasons sont couramment appliqués à des intensités variables et pas toujours maîtrisées afin de déstructurer la matrice d'agrégats bactériens issus de boues activées (Ras *et al.*, 2011). Dans notre étude, une quantité importante de chl *a* a été mesurée dans les extraits d'EPS après un traitement aux ultrasons, correspondant à des taux de lyse d'environ 10 % pour les biofilms composés de la diatomée *N. palea* et de l'algue verte *U. confervicolum* et un taux supérieur à 30 % pour la cyanobactérie *P. autumnale* après seulement 2 min de traitement avec une faible intensité (25 W, 20 kHz). Ces taux de lyse traduisent une sensibilité importante des cellules des microorganismes phototrophes à ce type de traitement. Ces résultats confirment la nécessité de supprimer l'étape de traitement aux ultrasons du protocole multi-méthode préconisé par Ras *et al.* (2011) lors de l'extraction des EPS d'un biofilm de diatomées effectuée par Verneuil *et al.* (2015). L'utilisation du Tween 20 pour l'extraction des EPS a également été écartée au vu du fort taux de lyse engendré : environ 6 % pour la cyanobactérie *P. autumnale* et la diatomée *N. palea* et un taux pouvant atteindre jusqu'à 20 % pour l'algue verte *U. confervicolum*.

Après un dosage colorimétrique des protéines et des polysaccharides extraits, la résine anionique échangeuse de cations (CER, Dowex Marathon Sigma-Aldrich) s'est montrée plus efficace que l'EDTA tout en ayant un taux de lyse plus faible. Ces deux méthodes présentant

3. EXTRACTION DES EPS DE BIOFILMS PHOTOTROPHES

un mode d'action similaire, il n'était pas pertinent de les combiner. Nous avons donc dans un second temps étudié l'efficacité d'extraction de la combinaison du formamide et de la CER sélectionnés dans la partie précédente : formamide 0,22 % dilué dans un tampon PBS pendant 1 h suivi d'un traitement CER à 50 g g⁻¹ MS dans du PBS pendant 1 h 30. Les résultats suggèrent que l'application séquentielle de ces deux méthodes est plus efficace pour extraire les EPS à partir des trois biofilms phototrophes simplifiés étudiés, sans modifier significativement le taux de lyse qui reste compris entre 0,26 et 1,02 % pour les trois espèces phototrophes. Les protéines sont extraites en quantité supérieure aux polysaccharides pour les 3 espèces phototrophes. Les quantités de protéines (en mg éqBSA g⁻¹ MS) et de polysaccharides (en mg éqGlc g⁻¹ MS) extraites sont respectivement de 11,9 ± 0,8 et 2,9 ± 0,4 pour *P. autumnale*, 16,3 ± 0,8 et 5,6 ± 0,8 pour *N. palea* et enfin 10,7 ± 1,0 et 6,3 ± 0,7 pour *U. confervicolum*. Ces résultats conduisent à l'évaluation de ratios protéines/polysaccharides (PN/PS) respectifs compris entre 1,7 ± 0,4, 2,9 ± 0,6 et 4,1 ± 0,7 pour les biofilms constitués d'*U. confervicolum*, *N. palea* ou *P. autumnale*. Même si une différence de ratio est visible en fonction des espèces considérées, les profils chromatographiques par exclusion de taille des EPS extraites en utilisant la CER sont similaires pour les trois espèces avec une majorité de polymères de petites tailles (de 400 à 11 300 Da). Malgré tout, le profil chromatographique des polymères de la diatomée, analysé à 280 nm, révèle la présence de polymères de moyenne et grande tailles qui sont absents sur les profils des deux autres espèces et qui pourraient traduire une sécrétion de molécules de haut poids moléculaire spécifique à la diatomée.

Ce protocole permet ainsi d'extraire une fraction d'EPS représentative de la matrice de biofilms composés de cyanobactérie, de diatomée et d'algue verte et offre ainsi la possibilité de comparer des extraits issus de différents biofilms. De plus, nous avons proposé un protocole novateur reproductible permettant le contrôle de la lyse cellulaire de façon rapide. Enfin, l'analyse des EPS extraites par chromatographie est un outil complémentaire aux dosages colorimétriques important dans la caractérisation des EPS puisqu'elle permet d'obtenir une empreinte de la diversité moléculaire des différents polymères présents dans les extraits.

**COMPARISON OF EXTRACTION METHODS FOR THE
CHARACTERIZATION OF EXTRACELLULAR POLYMERIC
SUBSTANCES FROM AGGREGATES OF THREE BIOFILM
FORMING PHOTOTROPHIC MICROORGANISMS**

Emilie Loustau^{a,b}, Jean-Luc Rols^a, Joséphine Leflaive^a, Claire-Emmanuelle Marcato-
Romain^b, Elisabeth Girbal-Neuhauser^{b*}

^a EcoLab, Université de Toulouse, CNRS, INPT, UPS, Toulouse, France

^b LBAE, Université de Toulouse, UPS, Auch, France

* Corresponding author: elisabeth.neuhauser@iut-tlse3.fr

Article paru dans la revue *Canadian Journal of Microbiology* ; 64(11): 887-899

([dx.doi.org/10.1139/cjm-2018-0182](https://doi.org/10.1139/cjm-2018-0182))

ABSTRACT

This paper aims to define a robust procedure to extract Extracellular Polymeric Substances (EPS) from aggregates of three benthic phototrophic microorganisms (cyanobacterium *Phormidium autumnale*, diatom *Nitzschia palea* and green alga *Uronema confervicolum*). This study focuses on the extraction efficiency of polysaccharide and protein EPS by using two physical methods (sonication, cation exchange resin) and three chemical methods (Formamide, EDTA, Tween 20) with minimum cell lysis. Cell lysis was evaluated by monitoring chlorophyll *a* release. Results indicated that sonication or incubation with 0.25 % Tween 20 of the algae aggregates induced high level of cell lysis. A combined extraction approach, with a first dispersing pre-treatment (Ultra-Turrax, 13,500 rpm, 1 min), Formamide addition (0.22 %) and then incubation with Dowex Cation Exchange Resin (50 g per g of dry biomass), provided the highest amount of extracted EPS (protein as most part), with low cell lysis. Furthermore, extracted EPS were characterised by Size Exclusion Chromatography and the obtained fingerprints revealed similar profiles for the three benthic microorganisms with a majority of low molecular weight polymers (400 to 11,300 Da). However, additional EPS of high (> 600,000 Da) and intermediate (20,000 to 80,000 Da) molecular sizes were specifically detected in the diatom extracts.

Keywords

PHOTOTROPHIC BIOFILM, EPS EXTRACTION

INTRODUCTION

Phototrophic biofilms are microbial aggregates consisting of heterotrophic (bacteria, protozoan, etc.) and phototrophic (diatoms, cyanobacteria, green algae, etc.) microorganisms embedded in a matrix of Extracellular Polymeric Substances (EPS) (Lock *et al.* 1984). These biofilms, often attached to river bed substrates (pebbles, aquatic plants, etc.), are involved in solute exchanges with the water column. They play a key role in aquatic environments through various processes such as primary production (Dodds 2006), mineralization and element recycling (Lawrence *et al.* 2001; Sabater *et al.* 2007; Teissier *et al.* 2007) and pollutants sorption or biodegradation (Becker, 1996; Garacci *et al.* 2017).

Phototrophic biofilms can be considered as highly diversified microbial “jungles” (Battin *et al.* 2016) and the main ecological service they stimulate consists in driving carbon cycling. In one way, respiratory carbon dioxide from heterotrophs can be assimilated by the phototrophs and in return, the photo-autotrophic organisms exude oxygen and organic compounds (oligosaccharides and amino acids) that will support the growth of the heterotrophic microorganisms (Battin *et al.* 2003; Ylla *et al.* 2009). Diatoms, cyanobacteria and green algae are predominant organisms in such biofilms, however the composition of the community can change under (i) abiotic factors such as light (Battin *et al.* 2016), hydrodynamics and temperature (Villanueva *et al.* 2011; Lambert *et al.* 2012), nutrients (Leflaive *et al.* 2008; Serra *et al.* 2010) or pollutants (Lambert *et al.* 2012; Leflaive *et al.* 2015) and also by (ii) biotic interactions such as grazing and competition (Böhme *et al.* 2009; Wey *et al.* 2012).

In most epilithic biofilms, the microorganisms account for less than 30 % of the carbon mass, whereas the EPS matrix can account for over 70 % (Lyautey, 2005). EPS are complex polymers, mainly composed of polysaccharides and proteins. They are responsible for both adhesive and cohesive interactions (Ahimou *et al.* 2007) playing key roles in maintaining the biofilm structural integrity and protecting the embedded cells against erosion, desiccation and pollutants (pesticides, metals, etc.). EPS can be used as carbon source for the growth of heterotrophic microorganisms and this is particularly true for polysaccharides that are mainly composed of glucose and, to a lower extent, of galactose and mannose (Passarelli *et al.* 2015). EPS are generally produced by the inherent microorganisms, but they can also be released after cell lysis or come from the surrounding water column as exogenous polymers adsorbed into the biofilm matrix (Wingender *et al.* 1999). Environmental parameters have been shown to play a key role in the modification of the biofilm biomass, and to exert an indirect effect on the

3. EXTRACTION DES EPS DE BIOFILMS PHOTOTROPHES

quantity and the diversity of EPS present in phototrophic biofilms. As an example, high temperatures and light intensities favoured the excretion of capsular polysaccharides by mono-species biofilms of green algae or cyanobacteria (Di Pippo *et al.* 2012). In many phototrophic biofilms dominated by diatoms (De Brouwer and Stal 2002) or cyanobacteria (Stuart *et al.* 2016), illumination conditions seemed to increase the amount of bound EPS. The proportion and the composition of polymers also depend on the type and the specificity of microorganisms (Neu, 1996; Kavita *et al.* 2013), the age of biofilms (Pivokonsky *et al.* 2006) and the presence of nutrients or pollutants (Miao *et al.* 2009; Ozturk and Aslim 2010; Sheng *et al.* 2010; Kavita *et al.* 2013). Biotic factors such as competition may affect the relative abundance and the composition of the EPS excreted in the biofilm matrix. Indeed, the proportion of polysaccharides in extracted EPS increased from 44 to 69 % as benthic diatom cells grew progressively towards nutrient limited conditions (Underwood *et al.* 2004).

Because of the biochemical diversity of the biofilm matrix, EPS have been called “the dark matter of biofilms” (Flemming *et al.* 2007). In the literature, numerous methods are available to characterize the properties and the structural organization of EPS from bacterial heterotrophic aggregates but only few studies are performed on phototrophic biofilms. Considering EPS extraction from microbial aggregates involved in wastewater treatment (Comte *et al.* 2007), some physical and chemical methods are commonly used such as centrifugation, heating, sonication and chelation of divalent cations with cation exchange resin (CER) or with Ethylene Diamine Tetraacetic Acid (EDTA). Pan *et al.* (2016) reported that the extracted amount, the composition and the physicochemical properties of extracted EPS can vary significantly depending on the choice of extraction processes. Regarding phototrophic biofilms, benthic diatoms are the main studied species while the EPS produced by other benthic organisms such as green algae and cyanobacteria are less explored. Takahashi *et al.* (2010) showed that EPS extracted from benthic diatoms (*Nitzschia palea*) by using CER treatments, gave a high extracted amount of polysaccharides compared to proteins. Strieth *et al.* (2017) suggested to incubate cyanobacterial biofilm with a solution containing EDTA (0.2 mmol L⁻¹) and NaCl (0.14 mol L⁻¹) in order to extract EPS in a semi continuous process. Interestingly, some recent studies performed on diatom-dominated biofilms recommended a combination of chemical and physical processes to increase the amount of extracted EPS. For instance, Verneuil *et al.* (2015) suggested to apply a first centrifugation step followed by the successive incubations with EDTA and then with the detergent Tween 20. In a similar way, the combination of CER, sonication and Ethanol treatments was proposed by Pierre *et al.* (2014).

3. EXTRACTION DES EPS DE BIOFILMS PHOTOTROPHES

In addition to testing the efficiency of different extraction methods to release EPS, some authors have included cell lysis measurements in order to control possible EPS contamination by the release of intracellular materials (DNA, ATP, Glucose-6-phosphate dehydrogenase). Inactivation of Glucose-6 phosphate dehydrogenase by some chemicals (formaldehyde, alkali or acid) prevent systematic detection of cell lysis for chemical extraction methods (Guo *et al.* 2014). Recent studies performed on heterotrophic mono-species biofilms (Randrianjatovo-Gbalou *et al.* 2017) have shown that DNA is an integral component of the biofilm matrix and therefore cannot be considered as a reliable parameter for cell lysis control. As for ATP, the short life time of this molecule due to its high biodegradability does not allow a reliable measure of cell lysis. In addition, cell lysis is not only related to the employed extraction method but also to the architecture and morphology of the microbial species. As an example, sonication is widely used for EPS extraction from bacterial aggregates of activated sludge (Ras *et al.* 2008; Liang *et al.* 2010; Bourven *et al.* 2011) without significant cell lysis, while it induces strong lysis on benthic algae samples (Ge *et al.* 2013). Optimization and specific adaptation of the extraction protocol in relation to the microbial species is thus needed for EPS characterization from phototrophic biofilms.

The aim of this study is to provide quantitative elements that could help to choose appropriate EPS extraction methods applicable to phototrophic biofilms by taking into account the diverse composition of benthic species. The cyanobacterium *Phormidium autumnale*, the diatom *Nitzschia palea* and the green alga *Uronema confervicolum* were selected as main three algal species within the diversity of natural phototrophic biofilms. The objective was thus i) to extract EPS with various physical or chemical methods that will not induce intracellular material contamination due to cell lysis and ii) to select the extraction methods allowing good EPS extraction efficiency. A simple and quantitative assay was proposed to evaluate cell lysis and hence measured the sensitivity of each algal species to the various extraction methods. A quantitative analysis was then performed by measuring the amounts of proteins and polysaccharides obtained by various extraction methods. Finally, an appropriate extraction protocol was formulated and a qualitative analysis of the extracted EPS was also undertaken by size exclusion chromatography in order to compare the EPS fingerprints of each algal species.

EXPERIMENTAL PROCEDURES

Algae cultures

The three biofilm-forming microorganisms used in this study, *i.e* the cyanobacterium *P. autumnale*, the diatom *N. palea* and the green alga *U. confervicolum* were isolated from phototrophic biofilms in the Tarn and Garonne rivers (Southwestern France). These samples were maintained in the non-axenic algae collection of EcoLab (Toulouse University, France). Microorganisms were cultivated during three weeks in Erlenmeyer flasks of growth media specifically adapted to each species (400 mL): BG11 medium (Stanier *et al.* 1971) for *P. autumnale*, Combo medium (Kilham *et al.* 1998) for *N. palea* and *U. confervicolum*. All manipulations were made under a UV-sterilized laminar flow hood (Jouan MSC 12). The cultures were grown at 18°C under light/dark periods of 16 hr / 8 hr (light intensity: $30 \pm 5 \mu\text{mol s}^{-1} \text{m}^{-2}$). The growth media in Erlenmeyer flasks were systematically renewed 72 hr before collecting the algae suspension for EPS extraction experiments. This last sampling step coincided at the end of the light period. Biomass dry weight (DW) was measured by weighting the dried pellet (103°C, 24 hr) from an aliquot of 5 mL of the biomass suspension.

EPS extraction

Prior to EPS extraction, all algae suspensions were homogenised by using an Ultra-Turrax disperser (T25, Janke-Kunkel, 13,500 rpm, 1 min) at room temperature (**Erreur ! Source du renvoi introuvable.**). From this homogenized suspension, 10 mg DW of aggregates were centrifuged (4000 g, 15 min) and the supernatant S-UT was collected in order to analyse the initial EPS solubilized in the culture medium after Ultra-Turrax homogeneization. The pellet was then washed with 1 mL of PBS solution (Phosphate Buffer Saline, 10 mM $\text{HPO}_4^{2-}/\text{H}_2\text{PO}_4^-$ at pH 7.4, with 2.7 mmol L⁻¹ KCl and 137 mmol L⁻¹ NaCl) and centrifuged once again in the same conditions in order to collect the cell aggregates that will receive the different extraction methods.

Formamide method. As described by Liang *et al.* (2010), the cell pellets were re-suspended in 1 mL of PBS containing 0.22 % Formamide, incubated for 60 min on a rotary disc shaker (150 rpm, 4°C) and centrifuged (4000 g, 15 min) before collecting the supernatant S-F.

3. EXTRACTION DES EPS DE BIOFILMS PHOTOTROPHES

CER method. Cation Exchange Resin (Dowex Marathon Sigma-Aldrich) and cell pellets (10 mg DW) were suspended in 1 mL PBS to reach final concentration of 25 or 50 gram of cationic beads per gram of DW biomass. The suspension was incubated during 60 or 90 minutes on a rotary disc shaker (150 rpm, 4°C), centrifuged (4000 g, 15 min) before collecting the supernatant S1-CER. The residual pellet of biomass and CER beads was washed with PBS and centrifuged before collecting a second supernatant S2-CER. The total CER extracted EPS was calculated as the sum of both supernatants, S1-CER and S2-CER.

EDTA method. The cationic chelator EDTA (1 mL 1 % EDTA, Tris-HCl 0.1 M at pH 8.5) was incubated with the cell pellets for 90 min on a rotary disc shaker (150 rpm, 4°C), and centrifuged (4000 g, 15 min) before collecting the supernatant S-EDTA.

Sonication method. Sonication was performed (Bandelin Sonopuls HD 2070, 25 W and 20 kHz, 2 min, in ice water) on the re-suspended pellet in 1 mL of PBS. The sample was centrifuged (4000 g, 15 min) before collecting the supernatant S-US.

Tween 20 method. Biomass pellets were incubated in 1 mL PBS containing 0.25 % of Tween 20 for 30, 45 or 60 min at room temperature, and then centrifuged (4000 g, 15 min) before collecting the supernatant S-Tw.

Cell lysis was evaluated at the end of each extraction method. All supernatants were stored at 4°C (< 24 hr) or at -20°C (> 24 hr) before quantifying polysaccharides and proteins.

Cell lysis detection

Cell lysis was evaluated in each supernatant extract obtained after the tested EPS extraction methods: first by measuring the OD at 663 nm revealing the solubilized chlorophyll *a*, then by using the equations established with calibrated suspensions of each algal species submitted to cell lysis by acetone treatment (see Supplementary Material (SM), Annex A). This procedure allows to transform the OD₆₆₃ measured in the EPS extracts supernatants to an equivalent concentration of lysed biomass. The proportion of cell lysis was expressed as a percentage of lysed cells using the following equation:

$$\text{cell lysis step } n \text{ (\%)} = \frac{\text{OD}_{663}}{a * C_{n-1}} * 100 \quad [1]$$

where OD₆₆₃ corresponds to the OD value at 663 nm of the supernatant after the treatment, *a* is the slope of the linear correlation specific to each microorganism (equations 1A to 3A in SM A) and C_{n-1} is the concentration of the DW biomass in the re-suspended pellet before the treatment.

3. EXTRACTION DES EPS DE BIOFILMS PHOTOTROPHES

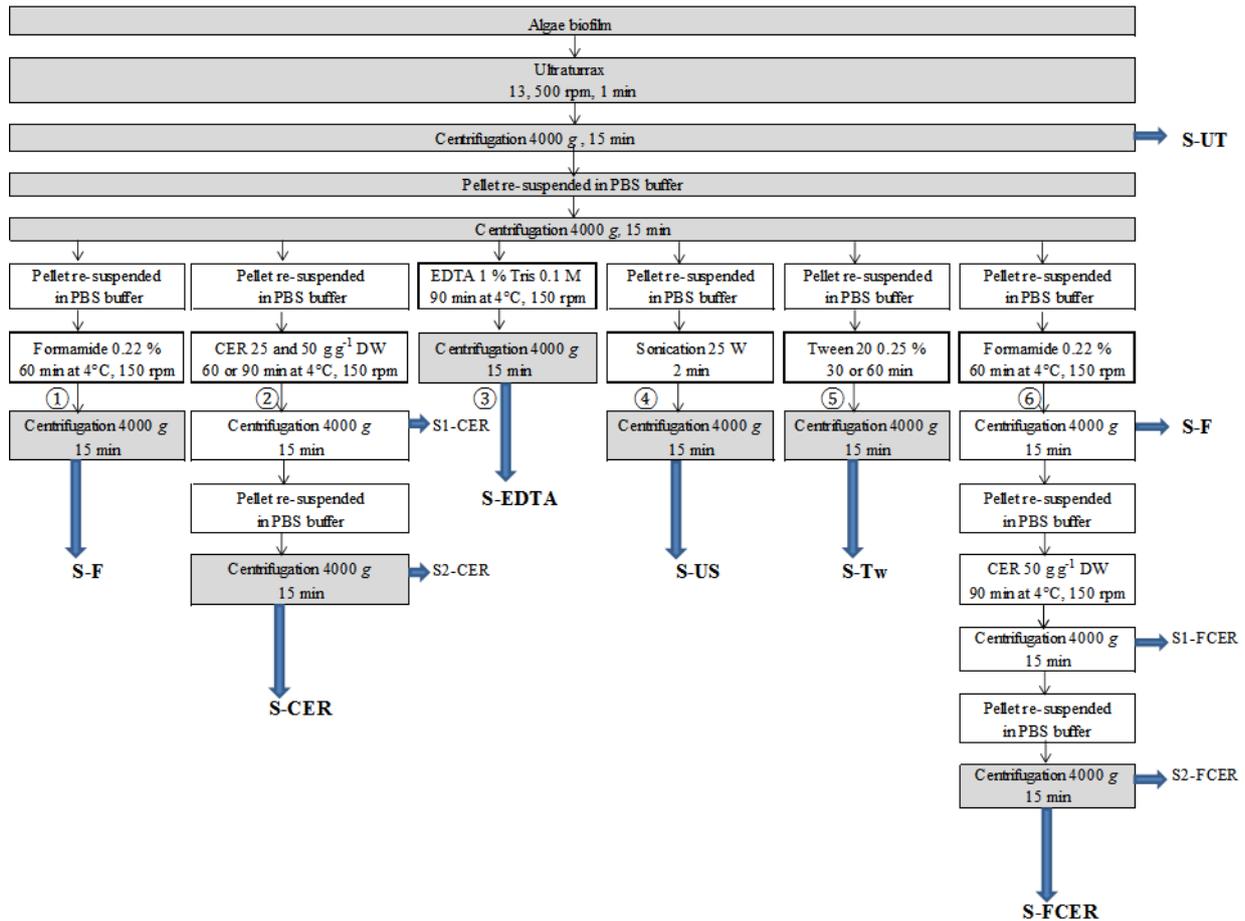


Figure 1 Methods tested for EPS extraction from the three algal aggregates. The steps coloured in grey are common to all methods. Methods 1 to 5 are single methods, whereas method 6 is a combination of successive extractions by Formamide and CER treatments. The solubilized EPS were collected after the final centrifugation step as single supernatants called S-F, S-EDTA, S-US and S-Tw for Formamide (method 1), EDTA (3), sonication (4) and Tween (5) treatments, respectively. For CER method, the total extracted EPS (S-CER for method 2 and S-FCER for method 6) were recovered after pooling the first supernatant (S1-CER for method 2 and S1-FCER for method 6) with the second one collected after washing the CER beads (S2-CER for method 2 and S2-FCER for method 6).

3. EXTRACTION DES EPS DE BIOFILMS PHOTOTROPHES

Proteins and polysaccharides quantification

For each EPS extract, protein concentrations were measured with the BiCinchoninic Acid (BCA) method (Smith *et al.* 1985): 25 μL of each sample and 200 μL of BCA reagent (Sigma-Aldrich) were incubated in a 96 wells microplate (60°C, 15 min) and measured at 540 nm with a microplate reader (Synergy Mx Biotek). Only samples containing EDTA were processed differently: 20 μL of sample and 1 mL of BCA reagent were incubated in order to avoid underestimation of the protein content due to the chelation between EDTA and Cu^{2+} contained in the BCA reagent. Bovine serum albumin (BSA) diluted in the various extraction buffers was used as a standard with concentrations ranging from 0 to 800 mg L^{-1} .

Polysaccharides were estimated using the Anthrone method (Dreywood 1946) allowing total carbohydrate to be quantified: 100 μL of each sample and 200 μL of Anthrone reagent (2 % anthrone in 96 % sulfuric acid) were incubated in a 96 wells microplate (30 min at 60°C), cooled at room temperature for 10 min and measured at 620 nm with a microplate reader (Synergy Mx Biotek). Glucose diluted in the various extraction buffers was used as a standard with concentrations ranging from 0 to 100 mg L^{-1} .

The quantification of polysaccharides and proteins was performed three times for each algal sample.

DNA quantification

Extracellular DNA was quantified within the EPS extracts using the PicoGreen® fluorescent staining (Quant-it™ PicoGreen® dsDNA assay kit, Invitrogen) as described by Tang *et al.* (2013). Briefly, 100 μL of each sample and 100 μL of PicoGreen® were incubated at room temperature for 2 min, in a 96 wells microplate. After that, the fluorescence intensity of the emitted light at 520 nm was measured after an excitation at 485 nm. λDNA diluted in the various extraction buffers was used as a standard with concentrations ranging from 0 to 1000 $\mu\text{g L}^{-1}$.

Size Exclusion Chromatography (SEC)

The size distribution of extracted EPS was investigated by SEC using an AKTA Purifier System (GE Healthcare), equipped with a 250 μL injection loop and two columns: a Superdex peptide 10/300 GL (GE Healthcare) with a resolving range 0.3 – 10 kDa, followed by a Superdex 200 10/300 GL (GE Healthcare) with a resolving range 10 – 600 kDa. The exclusion volume of this chromatographic system was estimated to be 15 mL and the total permeation volume to be 46

3. EXTRACTION DES EPS DE BIOFILMS PHOTOTROPHES

mL. All measurements were performed using PBS as eluent with a flow rate of 0.4 mL min⁻¹. Detection was carried out with a diode array UV detector at 280 nm (for protein detection) or 210 nm (for detecting all types of organic materials).

The apparent molecular weight of the eluted molecules was calculated from a calibration curve obtained after injection of a mix of different standard proteins purchased from GE Healthcare (Thyroglobulin, 669 kDa; Aldolase, 158 kDa; Conalbumin, 75 kDa; Carbonic Anhydrase, 29 kDa; Ribonuclease A, 13.7 kDa; Aprotinin, 6.511 kDa) or from Sigma-Aldrich (Angiotensin II, 1.046 kDa; Leucine Enkephaline, 0.556 kDa; Thyrotropin, 0.362 kDa).

The following equation was obtained for this calibration curve:

$$\text{Log (MW)} = -0.1421 \text{ Ve} + 8.316 \quad (\text{R}^2 = 0.9923) \quad [2]$$

with MW (Molecular Weight) expressed in Da and Ve (peak elution Volume) in mL.

RESULTS AND DISCUSSION

Selection of methods for EPS extraction

1. Cell lysis monitoring

In order to evaluate the sensitivity of each algal species to cell lysis, chlorophyll *a* concentration was measured in the soluble fraction obtained after applying individually the five different physical and chemical treatments (**Erreur ! Source du renvoi introuvable.**). Prior homogenisation appeared as an essential step of the extraction procedure leading to aggregate dislocation and allowing a precise and reproducible quantity of biomass to be sampled from each algal suspension. This homogenization was particularly crucial for the *P. autumnale* cultures which create a very compact aggregate.

As shown in **Table 1**, Ultra-Turrax pre-treatment did not really affect the cellular integrity of *U. confervicolum* and *N. palea* since the evaluated percentages (see equation 1 in Experimental Procedures) of cell lysis in the S-UT supernatants were less than 0.5 % (0.09 ± 0.09 % and 0.36 ± 0.09 %, respectively). On the other hand, the cyanobacterium strain was more sensitive to Ultra-Turrax with a percentage of lysed cells equal to 1.06 ± 0.12 % that was considered as acceptable.

For all the algal species, sonication (at 25 W, 20 kHz for 2 min) induced high percentages of cell lysis: cyanobacterial strain was the most sensitive with a cell lysis percentage reaching

3. EXTRACTION DES EPS DE BIOFILMS PHOTOTROPHES

33.05 ± 10.02 %. Diatom and green alga strains were more resistant towards sonication, but the cell lysis percentages were still high, around 10 % (**Table 1**). These results indicated that the applied sonication condition cannot be recommended as a procedure for EPS extraction from phototrophic biofilms and confirms earlier studies showing that sonication process induces a strong lysis rate on benthic algae samples (Ge *et al.* 2013) and on diatom biofilms (Verneuil *et al.* 2015).

Different CER extraction conditions were tested on each algal aggregate: incubation during 60 or 90 minutes at 4°C and CER concentration of 25 or 50 g g⁻¹ DW of biomass. The diatom and green alga strains exhibited a very good resistance to CER treatments in terms of cell lysis percentages which remained below 1.3 % even after 90 minutes. The cyanobacterial strain was somewhat more sensitive to CER compared to the two other algae with a cell lysis percentage reaching 2.36 ± 0.41 % was measured after 90 min in the presence of CER at 25 g g⁻¹ DW. However, for all three algal species, the cell lysis percentages were below 1.5 % with 50 g g⁻¹ DW during 60 min, which is considered as acceptable. This is in agreement with Takahashi *et al.* (2010) who reported that the amount of ATP measured in extracts obtained after incubation of benthic diatoms for 60 min at 4°C with 50 g g⁻¹ DW of similar Dowex resin was not significant.

Incubation of the phototrophic biofilms in the presence of Tween 20 (0.25 % during 30, 45 or 60 minutes) was applied in different conditions. Results showed that all conditions induced non-acceptable cell lysis percentages for the three algae species (4.38 ± 1.7 % to 19.46 ± 0.9 %), the green alga remaining more sensitive to this detergent. As for EDTA treatment (1 % for 90 min), cell lysis was acceptable with maximum lysis percentages under the 5 % limit (with 4.09 ± 0.16 % for the diatom species) but higher than 1 %. It can be noticed that diatoms were a little more sensitive towards EDTA than the two other species. Finally, incubation with Formamide (0.22 % for 60 min) induced cell lysis lower than 0.4 % for all species.

Reverting to the main aim of this study, which is to develop an EPS extraction protocol able to be applied on the three algal species with minimal cell lysis, sonication and Tween 20 extraction treatments appeared as the less suitable methods. Ultra-Turrax pre-treatment (13,500 rpm for 1 min) was kept since it allows biomass homogenization without notable cell lysis. In addition, CER at 25 or 50 g g⁻¹ DW, Formamide at 0.22 % or EDTA at 1 % are acceptable extraction conditions which can be considered as single applications or combined together.

3. EXTRACTION DES EPS DE BIOFILMS PHOTOTROPHES

Table 1 Evaluation of cell lysis (in percentage), (n= 3, mean \pm standard error) measured in the supernatants (S) obtained after the various extraction methods on the three algal aggregates: S-UT for Ultra-Turrax, S-US for sonication, S-CER for CER, S-F for Formamide, S-EDTA for EDTA and S-Tw for Tween 20 extraction processes. The percentage of lysed cells was estimated after measurement of the OD at 663 nm of each supernatant and correlation of this chlorophyll *a* absorbance with the amount of lysed cells according to the equations established for each algal species (see equations 1 to 3 in Experimental Procedures).

Methods	Conditions		Species		
			Cyanobacterium	Diatom	Green alga
			<i>Phormidium autumnale</i>	<i>Nitzschia palea</i>	<i>Uronema confervicolum</i>
S-UT	13,500 rpm	1 min	1.06 \pm 0.12	0.09 \pm 0.09	0.36 \pm 0.09
S-US	25 W, 20 kHz	2 min	33.05 \pm 10.02	9.65 \pm 0.36	10.92 \pm 0.86
S-CER	25 g g ⁻¹ DW	60 min	1.27 \pm 0.11	1.21 \pm 0.24	0.33 \pm 0.11
	25 g g ⁻¹ DW	90 min	2.36 \pm 0.41	1.06 \pm 0.13	0.31 \pm 0.17
	50 g g ⁻¹ DW	60 min	1.42 \pm 0.21	0.79 \pm 0.43	0.47 \pm 0.03
	50 g g ⁻¹ DW	90 min	1.68 \pm 0.27	0.77 \pm 0.23	1.33 \pm 0.21
S-F	0.22 %	60 min	0.15 \pm 0.06	0.15 \pm 0.03	0.35 \pm 0.07
S-EDTA	1 %	90 min	2.36 \pm 0.26	4.09 \pm 0.16	1.13 \pm 0.07
S-Tw	0.25 %	30 min	6.20 \pm 0.21	6.51 \pm 0.09	14.17 \pm 0.47
	0.25 %	45 min	6.92 \pm 0.64	4.38 \pm 1.70	19.46 \pm 0.90
	0.25 %	60 min	6.29 \pm 0.13	6.32 \pm 0.20	19.18 \pm 1.09

3. EXTRACTION DES EPS DE BIOFILMS PHOTOTROPHES

2. Extracted proteins and polysaccharides

The efficiency of extraction methods, selected by cell lysis criteria, was evaluated by quantifying proteins and polysaccharides using colorimetric assays (BCA and Anthrone respectively). Results show that for each biofilm, the amounts of extracted proteins and polysaccharides were strongly dependent upon the extraction method (**Erreur ! Source du renvoi introuvable.**). Moreover, for a same method, the quantities of extracted proteins and polysaccharides are similar whatever the type of algal species. It can be noticed that for all the tested aggregates, the amount of extracted proteins (**Erreur ! Source du renvoi introuvable.a**) is more important than polysaccharides (**Erreur ! Source du renvoi introuvable.b**). However, these quantities are expressed in different relative units as mg of equivalent BSA for the proteins and as mg of equivalent glucose (Glc) for the polysaccharides.

Independently of the algae species, CER applications showed to be the most efficient method for protein extraction. Protein concentrations reached 6 mg eqBSA g⁻¹ DW for the cyanobacteria, 7 mg eqBSA g⁻¹ DW for the diatom and 5.9 mg eqBSA g⁻¹ DW for the green alga (**Erreur ! Source du renvoi introuvable.a**). CER applications also appeared as the most efficient method to extract polysaccharides from the diatom aggregates, with concentrations reaching 3.9 mg eqGlc g⁻¹ DW (**Erreur ! Source du renvoi introuvable.b**), while both CER and EDTA appeared as the best methods for polysaccharides extraction from cyanobacterium or green alga aggregates (2.8 and 4.5 mg eqGlc g⁻¹ DW, respectively). CER and EDTA are both supposed to release EPS after chelation of bivalent cations (mainly Ca²⁺ and Mg²⁺), however, for all the aggregates, the amounts of proteins recovered with EDTA were 3 to 4 times lower than with CER. On the other hand, the efficiency of these two methods was similar for polysaccharides extraction from either cyanobacteria or green alga, and to a slightly less extent in the case of diatom. It is possible that in addition to the cation chelator activity, a shear stress was applied to the biomass during its incubation under mechanical agitation with the CER beads that could reinforce EPS detachment. For the EPS extraction by Formamide, the contents of proteins extracted were intermediate compared with those of CER and EDTA for the three algal species, whereas they were the lowest for polysaccharides. Considering the proportion of extracted proteins and polysaccharides, the results obtained in this study are in agreement with those of Verneuil *et al.* (2015). Indeed, using the same protein and polysaccharide quantification methods (BCA and Anthrone respectively) and standards (bovine albumin and glucose),

3. EXTRACTION DES EPS DE BIOFILMS PHOTOTROPHES

authors revealed that the quantities of extracted proteins were approximately twice as high than polysaccharides in *N. palea* biofilms submitted to Tween 20 and EDTA extraction methods. The data obtained here are also consistent with Takahashi *et al.* (2010) results which recommend to extract EPS components (proteins and polysaccharides) from benthic diatoms with CER (50 g g⁻¹ DW).

Formamide treatment was found to be another effective method for proteins extraction even if the amounts of extracted proteins were generally reduced with a factor 1.4 to 1.7 compared to the CER method. The fact that Formamide appears here as a good extraction reagent is difficult to explain since it is rather considered as a protective reagent. Formamide was nevertheless described by Adav and Lee (2008) as a potentiator to enhance CER extraction of tightly bounded EPS and to preserve cells from lysis. However, no information was available about the chemical mechanisms of cell modification and possible EPS solubilisation provided by Formamide.

Finally, for the three tested biofilm species, CER was the most efficient method applied alone for both proteins and polysaccharides recovery and can thus be considered as the most appropriate method for EPS extraction from phototrophic biofilms. In addition, the data suggested that Formamide is also a potential extractive reagent for extracellular proteins, and in a lower extent for polysaccharides.

EPS extraction with combined methods

In order to develop an efficient extraction protocol including both physical and chemical methods with minimum cell lysis, Formamide treatment (0.22 % for 60 min) was combined with CER incubations (50 g g⁻¹ DW for 90 min) whilst keeping prior Ultra-Turrax step to disaggregate the biofilm (**Erreur ! Source du renvoi introuvable.**).

The amount of proteins and polysaccharides measured in the final extracts obtained after combining both Formamide and then CER treatments (S-FCER) showed different trends depending on the species compared to CER applied alone (S-CER) (see **Table 2**). The concentration of proteins extracted from cyanobacteria increased by 28 % (7.7 ± 0.9 mg eqBSA g⁻¹ DW for S-FCER against 6 ± 0.5 mg eqBSA g⁻¹ DW for S-CER) whilst polysaccharide content decreased by 35 % (1.8 ± 0.4 mg eqGlc g⁻¹ DW against 2.8 ± 0.2 mg eqGlc g⁻¹ DW).

3. EXTRACTION DES EPS DE BIOFILMS PHOTOTROPHES

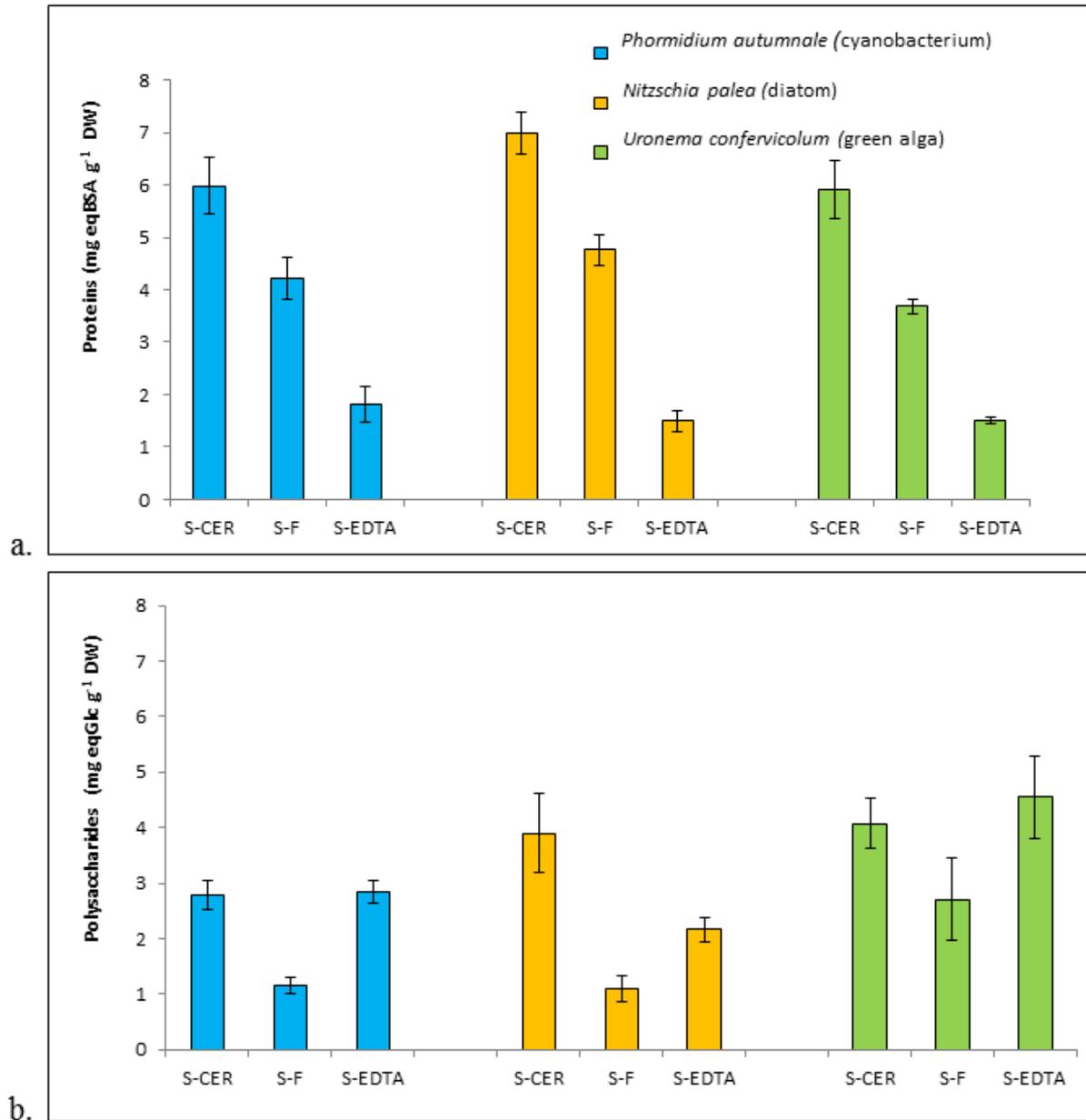


Figure 2 Proteins (a) and polysaccharides (b) content in extracts from the three algal aggregates, obtained by the single methods of EPS extraction. Each method was tested three times for extraction and three times for EPS quantification from the same algal sample (n= 9, mean \pm standard error). The significance of the extracts as S-XX is explained in **Erreur ! Source du renvoi introuvable..**

The same trend was observed for the green alga where the combination of methods increased the protein concentration by 19 % (7 ± 0.9 mg eqBSA g⁻¹ DW for S-FCER against 5.9 ± 0.6 mg

3. EXTRACTION DES EPS DE BIOFILMS PHOTOTROPHES

eqBSA g⁻¹ DW for S-CER) and decreased the polysaccharide content by 12 % (3.6 ± 0.9 mg eqGlc g⁻¹ DW against 4.1 ± 0.37 mg eqGlc g⁻¹ DW). On the other hand, for the diatom aggregates, the combination of methods increased the concentration of extracted proteins by 64 % (11.5 ± 1.3 mg eqBSA g⁻¹ DW for S-FCER against 7 ± 0.4 mg eqBSA g⁻¹ DW for S-CER) as well as the concentration of polysaccharide by 15 % (4.5 ± 0.3 mg eqGlc g⁻¹ DW against 3.9 ± 0.7 mg eqGlc g⁻¹ DW). Combining a prior Formamide treatment before CER step globally increased the Protein/polysaccharide ratio (PN/PS) in extracts from all algal species (S-FCER), see **Table 2**. This indicates that a previous extraction with Formamide did not prevent proteins from further solubilisation by CER. Moreover, the cell lysis percentages evaluated in extracts were very low (< to 1 %) and below those observed in the extracts obtained from CER applied alone. The same trend was observed with the DNA quantification using a specific fluorescent marker (PicoGreen®) since very low DNA contents were measured in all the extracts obtained with the combined method (see SM Annex B). This confirms that no or very little cell lysis has occurred during the extraction procedure, assessing the accuracy of chlorophyll *a* release measurement for cell lysis control. These results confirm the protective role of Formamide already mentioned in the literature for activated sludge (Liang *et al.* 2010). For all the biofilms, the Formamide step contributed to significant EPS extraction and in particular to recover proteins.

As to conclude, by adding the amount of EPS in the supernatants obtained from the consecutive Formamide and CER steps (S-F + S-FCER), it was obtained a total of extracted proteins of 11.9 ± 0.8 , 16.3 ± 0.8 and 10.7 ± 1.0 mg eqBSA g⁻¹ DW and a total of extracted polysaccharides of 2.9 ± 0.4 , 5.6 ± 0.8 and 6.3 ± 0.7 mg eqGlc g⁻¹ DW in the cyanobacterium, diatom and green alga aggregates, respectively. The higher amount of extracted total EPS (sum of proteins and polysaccharides) was obtained for the diatom biofilm, which is known to secrete a large quantity of EPS, and currently described as a pioneer specie of substrates in rivers (Lind *et al.* 1997). Indeed, this is favoured by their small size and great mobility through the EPS matrix compared to other benthic microorganisms (Eulin and Le Cohu 1998). Considering the PN/PS ratio, the proportion of proteins is significantly lower in the green alga extracts (1.7 ± 0.4) than in the cyanobacterium (4.1 ± 0.7) and diatom (2.9 ± 0.6) extracts.

The use of combined extraction methods to increase the extraction efficiency has already been studied in phototrophic biofilms. Indeed, Verneuil *et al.* (2015) combined EDTA and Tween 20 methods to extract EPS from *N. palea* diatom biofilm and used similar quantification

3. EXTRACTION DES EPS DE BIOFILMS PHOTOTROPHES

methods and biochemical standards to assay proteins and polysaccharides. The PN/PS ratio reached 2.28, which is also similar to the one obtained in our study. Stuart *et al.* (2016) extracted a majority of polysaccharides (PN/PS = 0.1) from a cyanobacteria biofilm by combining Formaldehyde and Ethanol methods, but with different quantification methods compared to our study (phenol sulfuric acid method for polysaccharides and Bradford assay for proteins quantification). All these results indicate that the PN/PS ratio is method-dependent as well as strain-dependent, and that comparisons of extraction efficiencies between different studies remain difficult since there are no universal units to express the amount of extracted EPS.

Nevertheless, the present data underline the ability of the combining Formamide and CER treatments to increase the extraction efficiency. Moreover, the fact that protein to polysaccharide ratios are impacted by the choice of the extraction method suggests that different types of EPS were solubilized between Formamide and CER extraction steps, thus reinforcing the interest of a combined method protocol.

Molecular fingerprint of the extracted EPS

Although differences were observed in the amounts of proteins and polysaccharides extracted from the three species, the qualitative features of the extracted EPS were, on the other hand, not determined. Size Exclusion Chromatography (SEC) was used to further investigate the extracted EPS by comparing qualitative fingerprint profiles of EPS extracted with the combined method protocol from each algal species. The SEC analysis was performed on the supernatants recovered after the CER extraction step (S-FCER) after applying the combined protocol. SEC analysis was also performed on extracts obtained after the first extraction step with Formamide (S-F), but important interferences of Formamide was observed on the chromatographic profiles that prevented a correct visualization of the EPS peaks.

For each algal strain, the size distribution profiles of the S-FCER extracts were monitored at both 210 and 280 nm (**Erreur ! Source du renvoi introuvable.**). 210 nm monitoring can detect all the organic and inorganic compounds while 280 nm monitoring is commonly used for the detection of proteins due to their conjugated character and ability to absorb at this wavelength (Görner *et al.* 2003; Comte *et al.* 2007).

3. EXTRACTION DES EPS DE BIOFILMS PHOTOTROPHES

Table 2 Proteins (PN, in mg eqBSA g⁻¹ DW) and polysaccharides (PS, in mg eqGlc g⁻¹ DW) content in extracts from the three algal aggregates. Treatments consisted to single CER extraction (S-CER) or single Formamide extraction (S-F), or combined Formamide followed by CER extraction (S-FCER represents the EPS extracted in the second step of the combined method, S-F + S-FCER represents all the EPS extracted by the complete combined method). Each method was tested three times for extraction and three times for EPS quantification from the same algal sample (n= 9, mean ± standard error).

	Cyanobacterium				Diatom				Green alga			
	<i>Phormidium autumnale</i>				<i>Nitzschia palea</i>				<i>Uronema confervicolum</i>			
	PN	PS	PN/PS	Lysis rate (%)	PN	PS	PN/PS	Lysis rate (%)	PN	PS	PN/PS	Lysis rate (%)
Single methods												
S-CER	6.0 ± 0.5	2.8 ± 0.2	2.1 ± 0.2	1.68 ± 0.27	7.0 ± 0.4	3.9 ± 0.7	1.8 ± 0.3	0.77 ± 0.23	5.9 ± 0.6	4.1 ± 0.37	1.4 ± 0	1.33 ± 0.21
S-F	4.2 ± 0.4	1.1 ± 0.1	3.8 ± 0.4	0.15 ± 0.06	4.8 ± 0.3	1.1 ± 0.2	4.4 ± 1.2	0.15 ± 0.03	3.7 ± 0.2	2.7 ± 0.7	1.4 ± 0.4	0.35 ± 0.07
Partial combined method												
S-FCER	7.7 ± 0.9	1.8 ± 0.4	4.2 ± 0.2	0.70 ± 0.06	11.5 ± 0.9	4.5 ± 0.3	2.6 ± 0.3	0.11 ± 0.05	7.0 ± 0.9	3.6 ± 0.2	1.9 ± 0.4	0.67 ± 0.06
Complete combined method												
S-F + S-FCER	11.9 ± 0.8	2.9 ± 0.4	4.1 ± 0.7	0.85 ± 0.12	16.3 ± 0.8	5.6 ± 0.8	2.9 ± 0.6	0.26 ± 0.08	10.7 ± 1.0	6.3 ± 0.7	1.7 ± 0.4	1.02 ± 0.13

4. REPONSE PHYSIOLOGIQUE A UNE EXPOSITION METALLIQUE (CU ET ZN)

The size distribution profiles observed at 210 nm were similar for the three extracts showing a major peak eluted at 42 mL, a series of unresolved peaks eluted between 30 and 40 mL and two minor peaks eluted after 45 mL (Erreur ! Source du renvoi introuvable.a). The single peak eluted at 42 mL was also observed in the control chromatogram corresponding to injection of PBS buffer containing 0.22 % Formamide and in the S-F extracts, suggesting that this peak may correspond to the elution of the remaining Formamide that was used in the first extraction step (results not shown). On the other hand, the molecules eluted between 30 to 40 mL correspond to molecules extracted from the biofilms. The correlation curve established between the elution volume and the molecular weight indicates that these molecules showed apparent molecular weights ranging from 11,300 to 400 Da (see Equation 2). The molecules eluted after 45 mL are very small molecules that cannot be considered as polymeric substances.

As for 210 nm monitoring, a series of molecules eluted between 30 to 40 mL (11,300 to 400 Da) was observed at 280 nm (Erreur ! Source du renvoi introuvable.b). Interference of Formamide observed at 210 nm at 42 mL was not detected at 280 nm. In addition, other conjugated compounds not clearly detected at 210 nm were eluted at 45 mL, i.e. near the total permeation volume that may correspond to simple organic acids secreted during the photosynthetic process. Interestingly, some high molecular weight molecules eluted around 15 mL (apparent molecular weight above 600,000 Da) and some intermediate size molecules eluted between 24 and 28 mL (apparent molecular weights from 80,000 to 20,000 Da) were detected in the 280 nm profiles. This was particularly visible on the chromatogram corresponding to the extract obtained from the diatom biofilm. In agreement with this observation, SEC fractionation of EPS extracts of *N. Palea* biofilm was previously performed by Verneuil *et al.* (2015) and some molecules detected at 280 nm were also excluded from the Superdex 200 column that may correspond to large protein-like polymers or to the assemblage of protein-containing colloids. If profiles obtained at 280 nm were similar for the three extracts, a pool of intermediate sized proteins was detected only in *N. palea* EPS profiles.

Finally, the qualitative SEC analysis has overall evidenced the presence of high and intermediate molecular weight compounds in the diatom extracts that constitutes the main difference between the three analysed biofilms. Although global EPS fingerprints of the various biofilm extracts remained rather similar, other chromatographic techniques with higher resolution and/or different chromatographic interactions can be used in the future to improve EPS fractionation.

4. REPOSE PHYSIOLOGIQUE A UNE EXPOSITION METALLIQUE (CU ET ZN)

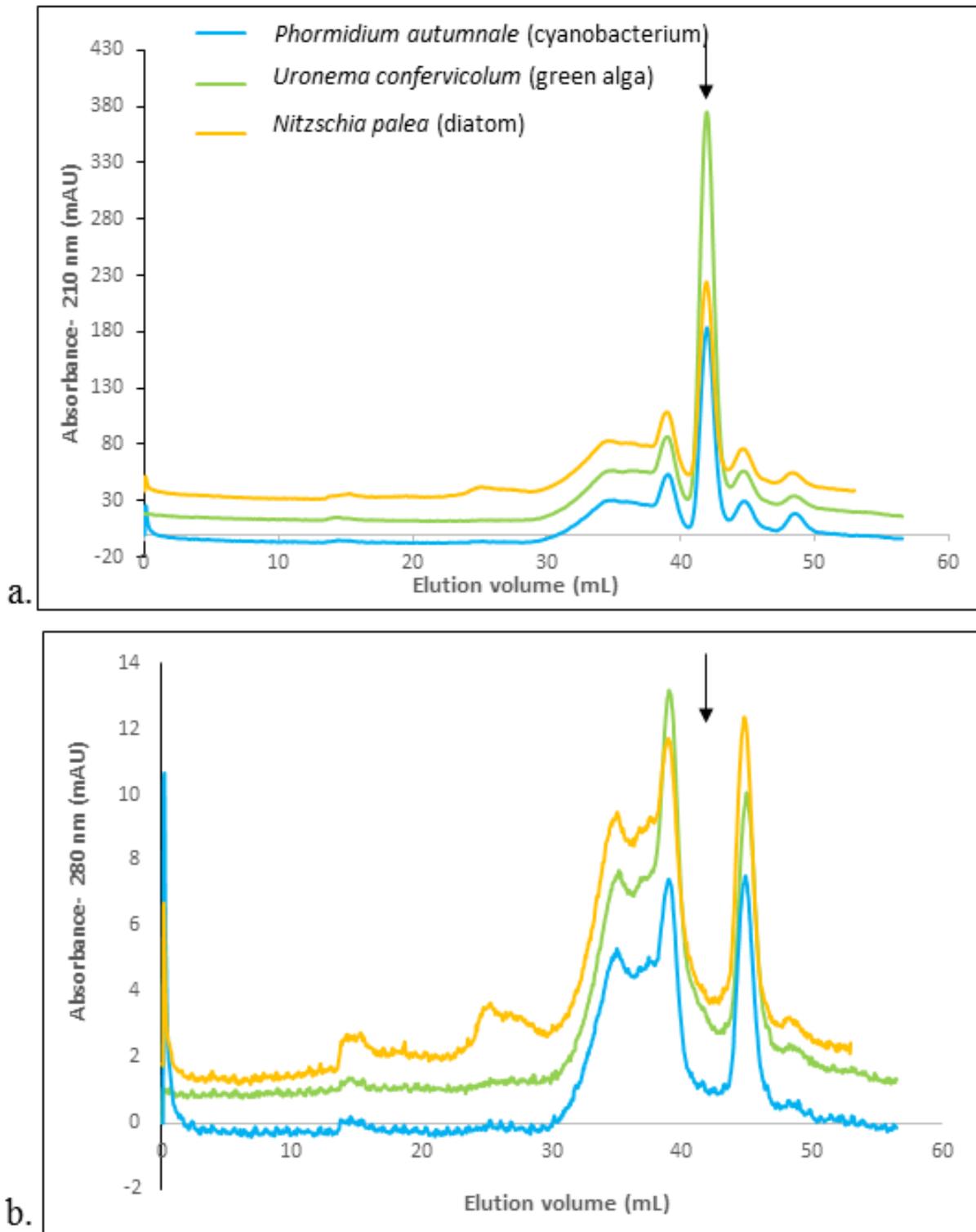


Figure 3 SEC EPS fingerprints of the EPS extracts (S-FCER), recovered from the three algal aggregates, and measured at 210 nm (a) or 280 nm (b). The vertical arrows indicate the position of the peak obtained after injection of PBS buffer containing 0.22 % Formamide.

Acknowledgements

EL was supported by a Ph. D. fellowship from the French « Ministère de l'Enseignement Supérieur, de la Recherche et de l'Innovation ». This work was funded by the IDEX UNITI grant of the University of Toulouse, France (No. 2016 – 46 – CIF – D – DRDV).

REFERENCES

- Adav, S.S. and Lee, D.-J. (2008) Extraction of extracellular polymeric substances from aerobic granule with compact interior structure. *J. Hazard. Mater.* **154**: 1120–1126.
- Ahimou, F., Semmens, M.J., Haugstad, G., and Novak, P.J. (2007) Effect of protein, polysaccharide, and oxygen concentration profiles on biofilm cohesiveness. *Appl. Environ. Microbiol.* **73**: 2905–2910.
- Battin, T.J., Kaplan, L.A., Newbold, J.D., Cheng, X., and Hansen, C. (2003) Effects of current velocity on the nascent architecture of stream microbial biofilms. *Appl. Environ. Microbiol.* **69**: 5443–5452.
- Battin, T.J., Besemer, K., Bengtsson, M.M., Romani, A.M., and Packmann, A.I. (2016) The ecology and biogeochemistry of stream biofilms. *Nat. Rev. Microbiol.* **14**: 251–263.
- Becker, K. (1996) Exopolysaccharide production and attachment strength of bacteria and diatoms on substrates with different surface tensions. *Microb. Ecol.* **32**: 23–33.
- Böhme, A., Risse-Buhl, U., and Küsel, K. (2009) Protists with different feeding modes change biofilm morphology. *FEMS Microbiol. Ecol.* **69**: 158–169.
- Bourven, I., Joussein, E., and Guibaud, G. (2011) Characterisation of the mineral fraction in extracellular polymeric substances (EPS) from activated sludges extracted by eight different methods. *Bioresour. Technol.* **102**: 7124–7130.
- Comte, S., Guibaud, G., and Baudu, M. (2007) Effect of extraction method on EPS from activated sludge: an HPSEC investigation. *J. Hazard. Mater.* **140**: 129–137.
- De Brouwer, J.F. and Stal, L.J. (2002) Daily fluctuations of exopolymers in cultures of the benthic diatoms *Cylindrotheca closterium* and *Nitzschia sp.* (*Bacillariophyceae*) 1. *J. Phycol.* **38**: 464–472.
- Di Pippo, F., Ellwood, N.T.W., Guzzon, A., Siliato, L., Micheletti, E., De Philippis, R., and Albertano, P.B. (2012) Effect of light and temperature on biomass, photosynthesis and capsular polysaccharides in cultured phototrophic biofilms. *J. Appl. Phycol.* **24**: 211–220.

4. REPONSE PHYSIOLOGIQUE A UNE EXPOSITION METALLIQUE (CU ET ZN)

- Dodds, W.K. (2006) Eutrophication and trophic state in rivers and streams. *Limnol. Oceanogr.* **51**: 671–680.
- Dreywood, R. (1946) Qualitative test for carbohydrate material. *Ind. Eng. Chem. Anal. Ed.* **18**: 499–499.
- Eulin, A. and Le Cohu, R. (1998) Epilithic diatom communities during the colonization of artificial substrates in the River Garonne (France). Comparison with the natural communities. *Arch. Für Hydrobiol.* 79–106.
- Fang, F., Lu, W.-T., Shan, Q., and Cao, J.-S. (2014) Characteristics of extracellular polymeric substances of phototrophic biofilms at different aquatic habitats. *Carbohydr. Polym.* **106**: 1–6.
- Flemming, H.-C., Neu, T.R., and Wozniak, D.J. (2007) The EPS matrix: the “house of biofilm cells.” *J. Bacteriol.* **189**: 7945–7947.
- Garacci, M., Barret, M., Mouchet, F., Sarrieu, C., Lonchambon, P., Flahaut, E., et al. (2017) Few Layer Graphene sticking by biofilm of freshwater diatom *Nitzschia palea* as a mitigation to its ecotoxicity. *Carbon* **113**: 139–150.
- Ge, L.Y., Huang, Y.G., Gao, D.X., and Deng, H.H. (2013) Comparison of Extraction Methods for Quantifying Extracellular Polymers of Marine Algae. In, *Applied Mechanics and Materials*. Trans Tech Publ, pp. 1173–1178.
- Görner, T., de Donato, P., Ameil, M.-H., Montarges-Pelletier, E., and Lartiges, B.S. (2003) Activated sludge exopolymers: separation and identification using size exclusion chromatography and infrared micro-spectroscopy. *Water Res.* **37**: 2388–2393.
- Guo, X., Liu, J., and Xiao, B. (2014) Evaluation of the damage of cell wall and cell membrane for various extracellular polymeric substance extractions of activated sludge. *J. Biotechnol.* **188**: 130–135.
- Humphrey, G.K. and Wootton, M. (1966) Determination of photosynthetic pigments in seawater Paris: UNESCO.
- Kavita, K., Mishra, A., and Jha, B. (2013) Extracellular polymeric substances from two biofilm forming *Vibrio* species: Characterization and applications. *Carbohydr. Polym.* **94**: 882–888.
- Kilham, S.S., Kreeger, D.A., Lynn, S.G., Goulden, C.E., and Herrera, L. (1998) COMBO: a defined freshwater culture medium for algae and zooplankton. *Hydrobiologia* **377**: 147–159.

4. REPONSE PHYSIOLOGIQUE A UNE EXPOSITION METALLIQUE (CU ET ZN)

- Lambert, A.-S., Morin, S., Artigas, J., Volat, B., Coquery, M., Neyra, M., and Pesce, S. (2012) Structural and functional recovery of microbial biofilms after a decrease in copper exposure: Influence of the presence of pristine communities. *Aquat. Toxicol.* **109**: 118–126.
- Lawrence, J.R., Kopf, G., Headley, J.V., and Neu, T.R. (2001) Sorption and metabolism of selected herbicides in river biofilm communities. *Can. J. Microbiol.* **47**: 634–641.
- Leflaive, J., Danger, M., Lacroix, G., Lyautey, E., Oumarou, C., and Ten-Hage, L. (2008) Nutrient effects on the genetic and functional diversity of aquatic bacterial communities. *FEMS Microbiol. Ecol.* **66**: 379–390.
- Leflaive, J., Felten, V., Ferriol, J., Lamy, A., Ten-Hage, L., Bec, A., and Danger, M. (2015) Community structure and nutrient level control the tolerance of autotrophic biofilm to silver contamination. *Environ. Sci. Pollut. Res.* **22**: 13739–13752.
- Liang, Z., Li, W., Yang, S., and Du, P. (2010) Extraction and structural characteristics of extracellular polymeric substances (EPS), pellets in autotrophic nitrifying biofilm and activated sludge. *Chemosphere* **81**: 626–632.
- Lind, J.L., Heimann, K., Miller, E.A., van Vliet, C., Hoogenraad, N.J., and Wetherbee, R. (1997) Substratum adhesion and gliding in a diatom are mediated by extracellular proteoglycans. *Planta* **203**: 213–221.
- Lock, M.A., Wallace, R.R., Costerton, J.W., Ventullo, R.M., and Charlton, S.E. (1984) River epilithon: toward a structural-functional model. *Oikos* 10–22.
- Lyautey, E. (2005) Caractérisation, dynamique et facteurs de contrôle des communautés bactériennes de biofilms de rivière.
- Miao, A.-J., Schwehr, K.A., Xu, C., Zhang, S.-J., Luo, Z., Quigg, A., and Santschi, P.H. (2009) The algal toxicity of silver engineered nanoparticles and detoxification by exopolymeric substances. *Environ. Pollut.* **157**: 3034–3041.
- Neu, T.R. (1996) Significance of bacterial surface-active compounds in interaction of bacteria with interfaces. *Microbiol. Rev.* **60**: 151.
- Ozturk, S. and Aslim, B. (2010) Modification of exopolysaccharide composition and production by three cyanobacterial isolates under salt stress. *Environ. Sci. Pollut. Res.* **17**: 595–602.
- Pan, M., Zhu, L., Chen, L., Qiu, Y., and Wang, J. (2016) Detection Techniques for Extracellular Polymeric Substances in Biofilms: A Review. *BioResources* **11**: 8092–8115.

4. REPONSE PHYSIOLOGIQUE A UNE EXPOSITION METALLIQUE (CU ET ZN)

- Passarelli, C., Meziane, T., Thiney, N., Boeuf, D., Jesus, B., Ruivo, M., et al. (2015) Seasonal variations of the composition of microbial biofilms in sandy tidal flats: Focus of fatty acids, pigments and exopolymers. *Estuar. Coast. Shelf Sci.* **153**: 29–37.
- Pierre, G., Zhao, J.-M., Orvain, F., Dupuy, C., Klein, G.L., Graber, M., and Maugard, T. (2014) Seasonal dynamics of extracellular polymeric substances (EPS) in surface sediments of a diatom-dominated intertidal mudflat (Marennes–Oléron, France). *J. Sea Res.* **92**: 26–35.
- Pivokonsky, M., Kloucek, O., and Pivokonska, L. (2006) Evaluation of the production, composition and aluminum and iron complexation of algal organic matter. *Water Res.* **40**: 3045–3052.
- Randrianjatovo-Gbalou, I., Rouquette, P., Lefebvre, D., Girbal-Neuhauser, E., and Marcato-Romain, C.-E. (2017) In situ analysis of *Bacillus licheniformis* biofilms: amyloid-like polymers and eDNA are involved in the adherence and aggregation of the extracellular matrix. *J. Appl. Microbiol.* **122**: 1262–1274.
- Ras, M., Girbal-Neuhauser, E., Paul, E., Sperandio, M., and Lefebvre, D. (2008) Protein extraction from activated sludge: an analytical approach. *Water Res.* **42**: 1867–1878.
- Ras, M., Lefebvre, D., Derlon, N., Paul, E., and Girbal-Neuhauser, E. (2011) Extracellular polymeric substances diversity of biofilms grown under contrasted environmental conditions. *Water Res.* **45**: 1529–1538.
- Sabater, S., Guasch, H., Ricart, M., Román, A., Vidal, G., Klünder, C., and Schmitt-Jansen, M. (2007) Monitoring the effect of chemicals on biological communities. The biofilm as an interface. *Anal. Bioanal. Chem.* **387**: 1425–1434.
- Serra, A., Guasch, H., Admiraal, W., Van der Geest, H.G., and Van Beusekom, S.A.M. (2010) Influence of phosphorus on copper sensitivity of fluvial periphyton: the role of chemical, physiological and community-related factors. *Ecotoxicology* **19**: 770–780.
- Sheng, G.-P., Yu, H.-Q., and Li, X.-Y. (2010) Extracellular polymeric substances (EPS) of microbial aggregates in biological wastewater treatment systems: a review. *Biotechnol. Adv.* **28**: 882–894.
- Smith, P.K., Krohn, R.I., Hermanson, G.T., Mallia, A.K., Gartner, F.H., Provenzano, Md., et al. (1985) Measurement of protein using bicinchoninic acid. *Anal. Biochem.* **150**: 76–85.

4. REPONSE PHYSIOLOGIQUE A UNE EXPOSITION METALLIQUE (CU ET ZN)

- Stanier, R.Y., Kunisawa, R., Mandel, M., and Cohen-Bazire, G. (1971) Purification and properties of unicellular blue-green algae (order *Chroococcales*). *Bacteriol. Rev.* **35**: 171.
- Strieth, D., Schwing, J., Kuhne, S., Lakatos, M., Muffler, K., and Ulber, R. (2017) A semi-continuous process based on an ePBR for the production of EPS using *Trichocoleus sociatus*. *J. Biotechnol.* **256**:
- Stuart, R.K., Mayali, X., Boaro, A.A., Zemla, A., Everroad, R.C., Nilson, D., et al. (2016) Light regimes shape utilization of extracellular organic C and N in a cyanobacterial biofilm. *mBio* **7**: e00650–16.
- Takahashi, E., Ledauphin, J., Goux, D., and Orvain, F. (2010) Optimising extraction of extracellular polymeric substances (EPS) from benthic diatoms: comparison of the efficiency of six EPS extraction methods. *Mar. Freshw. Res.* **60**: 1201–1210.
- Tang, L., Schramm, A., Neu, T.R., Revsbech, N.P., and Meyer, R.L. (2013) Extracellular DNA in adhesion and biofilm formation of four environmental isolates: a quantitative study. *FEMS Microbiol. Ecol.* **86**: 394–403.
- Underwood, G.J., Boulcott, M., Raines, C.A., and Waldron, K. (2004) Environmental effects on exopolymer production by marine benthic diatoms: dynamics, changes in composition, and pathways of production1. *J. Phycol.* **40**: 293–304.
- Verneuil, L., Silvestre, J., Randrianjatovo, I., Marcato-Romain, C.-E., Girbal-Neuhauser, E., Mouchet, F., et al. (2015) Double walled carbon nanotubes promote the overproduction of extracellular protein-like polymers in *Nitzschia palea*: An adhesive response for an adaptive issue. *Carbon* **88**: 113–125.
- Villanueva, V.D., Font, J., Schwartz, T., and Romani, A.M. (2011) Biofilm formation at warming temperature: acceleration of microbial colonization and microbial interactive effects. *Biofouling* **27**: 59–71.
- Wey, J.K., Jürgens, K., and Weitere, M. (2012) Seasonal and successional influences on bacterial community composition exceed that of protozoan grazing in river biofilms. *Appl. Environ. Microbiol.* **78**: 2013–2024.
- Wingender, J., Neu, T.R., and Flemming, H.-C. (1999) What are bacterial extracellular polymeric substances? In, *Microbial extracellular polymeric substances*. Springer, pp. 1–19.

4. REPOSE PHYSIOLOGIQUE A UNE EXPOSITION METALLIQUE (CU ET ZN)

Ylla, I., Borrego, C., Romani, A.M., and Sabater, S. (2009) Availability of glucose and light modulates the structure and function of a microbial biofilm. *FEMS Microbiol. Ecol.* **69**: 27–42.

SUPPLEMENTARY DATA

ANNEX A: CELL LYSIS DETECTION

As described by Humphrey and Wootton (1966), each biofilm previously homogenized (Ultra-Turrax, 13,500 rpm, 1 min) were submitted to chlorophyll *a* extraction in order to obtain calibration curves for cell lysis evaluation. A range of calibrated cell suspensions was prepared and the corresponding biomass pellets were lysed in 90 % acetone. The released chlorophyll *a* was determined by measuring the OD at 663 nm and for all the species, calibration curves were obtained (**Figure A**). Equations 1A to 3A were established in which *y* is the OD at 663 nm and *x* is the initial cell amount expressed in mg DW mL⁻¹:

$$y = 0.5841 x \quad [1A]$$

for the cyanobacterium at biomass concentration < 1 mg DW mL⁻¹ (R² = 0.9909)

$$y = 0.5305 x \quad [2A]$$

for the diatom at biomass concentration < 10 mg DW mL⁻¹ (R² = 0.9845)

$$y = 0.4601 x \quad [3A]$$

for the green alga at biomass concentration < 2 mg DW mL⁻¹ (R² = 0.9474)

These equations were used for evaluating cell lysis during the tested EPS extraction methods. The OD at 663 nm was measured in all the obtained extracts supernatants and the appropriate equation associated to the algae was used for evaluation of the percentage of lysed cells.

References

Humphrey, G.K. and Wootton, M. (1966) Determination of photosynthetic pigments in seawater Paris: UNESCO.

4. REPOSE PHYSIOLOGIQUE A UNE EXPOSITION METALLIQUE (CU ET ZN)

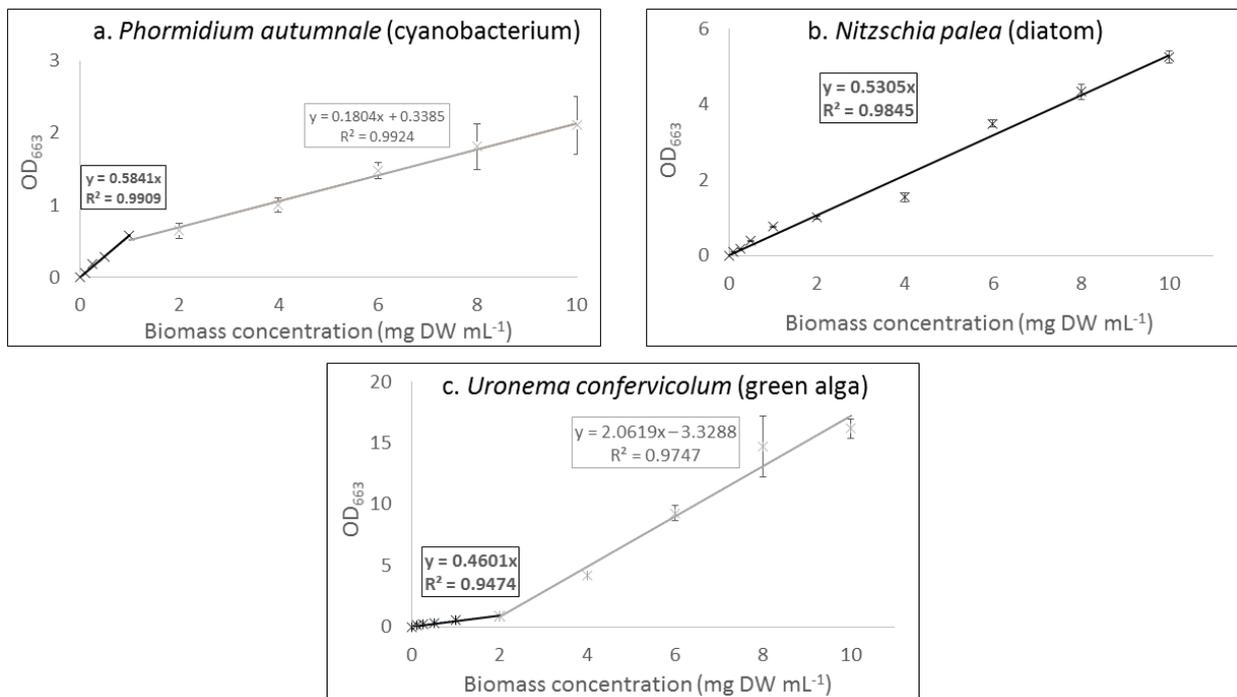


Figure A Standard curves for calibration of cell lysis. Absorbance at 663 nm (OD₆₆₃) related to chlorophyll a release from cell lysis induced by acetone extraction was measured in algae suspensions prepared at various biomass concentrations (from 0 to 10 mg DW mL⁻¹). (a.) *Phormidium autumnale*, (b.) *Nitzschia palea* and (c.) *Uronema confervicolum*. For the three species, Chlorophyll a was extracted three times for each concentration (n = 3, mean ± standard error).

ANNEX B: DNA QUANTIFICATION IN THE EPS EXTRACT

In order to confirm the low rate of cell lysis previously evaluated with the Chlorophyll *a* method, DNA was quantified in the EPS extracts obtained with the selected extraction methods (Formamide and CER) applied alone or combined. Whatever the tested microorganism or extraction method, the DNA content was very low and found in the range of 10^{-5} to $8 \cdot 10^{-5}$ mg eqDNA g^{-1} DW (**Figure B**), confirming the low cell lysis percentages evaluated through chlorophyll *a* release (inferior to 1.7 %). Noticeably, the amount of DNA measured in the final extracts obtained after combining Formamide and CER (S-FCER) was lower than the amount measured in single CER extracts (S-CER) indicating possible protection of the cells by the previous Formamide treatment. Indeed, for the three species, a decrease about 55 % of the DNA content was observed with the combined method compared to the single CER method. This content was clearly lower than the amounts of extracted proteins or polysaccharides, indicating that DNA is not a major component of the EPS extracts.

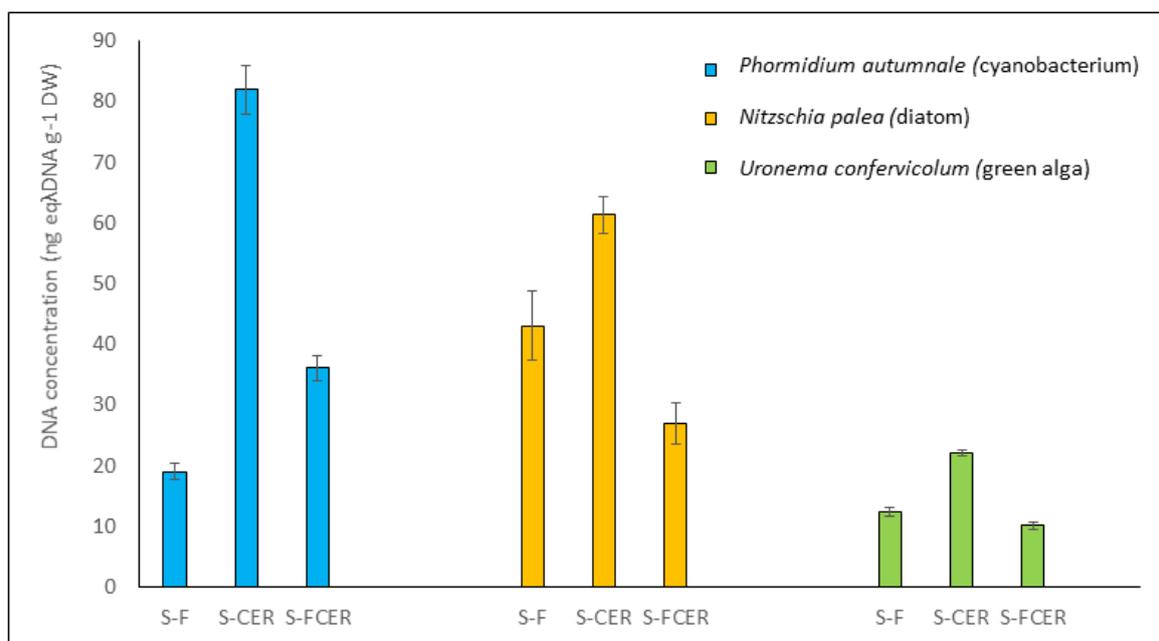


Figure B DNA content in the extracts supernatants obtained after application of the single methods (S-F and S-CER) or after the partial combined method (S-FCER). Each method was tested three times for extraction and three times for DNA quantification from the same algal sample (n = 9, mean \pm standard error).

CHAPITRE IV

EFFETS D'UNE EXPOSITION METALLIQUE (CU ET ZN) SUR LA PHYSIOLOGIE DE BIOFILMS PHOTOTROPHES MONO-ESPECE

4. REPONSE PHYSIOLOGIQUE A UNE EXPOSITION METALLIQUE (CU ET ZN)

4. REPONSE PHYSIOLOGIQUE A UNE EXPOSITION METALLIQUE (CU ET ZN)

Au cours des trente dernières années, plus d'un milliard de tonnes de métaux lourds ont été libérées dans l'environnement (Haferburg and Kothe, 2012) engendrant une dégradation générale de la qualité des cours d'eau. L'industrie minière et l'agriculture sont les activités anthropiques responsables de la majorité du Cu et du Zn retrouvés dans l'environnement (Hogsden and Harding, 2012 ; Johnson and Hallberg, 2005). Cependant, si à faible concentration ces deux éléments traces métalliques (ETM) représentent des micronutriments essentiels à la croissance algale, de fortes concentrations sont néfastes pour les biofilms phototrophes et représentent donc une menace pour les écosystèmes aquatiques.

Pour faire face aux fortes concentrations en ETM, les microorganismes phototrophes présents au sein d'un biofilm possèdent différents mécanismes de défenses, spécifiques à chaque espèce. Lorsque ces différentes stratégies ne parviennent pas à diminuer suffisamment les concentrations intracellulaires en ETM, ces métaux causent un stress oxydant qui induit la production d'espèce réactive à l'oxygène (ROS). Des modifications de certains processus métaboliques et une augmentation de la mortalité cellulaire peuvent alors être observées (Dao and Beardall, 2016 ; Gechev *et al.*, 2006). En effet, suite à la formation de ROS engendrée par une exposition aux ETM, il a été démontré que le Cu et le Zn avaient des effets délétères sur l'activité photosynthétique de certaines espèces d'algue vertes (Cao *et al.*, 2015; Perales-Vela *et al.*, 2007), de diatomées (Cid *et al.*, 1995) et de cyanobactéries (Miao *et al.*, 2005).

La matrice des biofilms phototrophes est composée de polysaccharides, certains contenant des sucres acides ayant une forte affinité pour les cations métalliques bivalents (Rossi *et al.*, 2012), ce qui laisse à présager une forte capacité d'adsorption et d'accumulation des cations métalliques présents dans la colonne d'eau. Cependant, à ce jour, peu d'études concernent les effets d'une exposition métallique sur la nature des EPS produites par les communautés microbiennes aquatiques. De ce fait, leur rôle dans les processus permettant d'améliorer la tolérance des microorganismes à la présence de fortes concentrations en ETM mérite d'être approfondi. Cao *et al.* (2015) ont étudié les effets de Cu^{2+} et de Zn^{2+} à différentes concentrations (100 à 500 $\mu\text{g L}^{-1}$) sur la quantité de protéines et de polysaccharides solubles produits par un biofilm mono-espèce (*Cladophora*). Leurs résultats ont montré une augmentation de la quantité de polysaccharides et de protéines sécrétés par l'algue verte en réponse à une exposition métallique avec, pour une même concentration testée, une quantité en polymères supérieure en présence de Zn comparée au Cu. Cependant, en absence de protocole

4. REPONSE PHYSIOLOGIQUE A UNE EXPOSITION METALLIQUE (CU ET ZN)

d'extraction appliqué sur la matrice des EPS liées, seules la fraction soluble a été analysée. Au contraire, Mota *et al.* (2015) n'ont quant à eux pas observé de différence significative dans la quantité de polysaccharides sécrétés par la cyanobactérie *Cyanothece sp.* en présence ou en absence de Cu à forte concentration (0, 100 ou 300 $\mu\text{g L}^{-1}$) dans le milieu.

Ce **Chapitre IV**, constitué d'un article soumis dans la revue *Environmental Science and Pollution Research*, décrit la première étude écotoxicologique réalisée dans le cadre de la thèse. Cette étude a pour objectif d'évaluer les différences de réponse de biofilms phototrophes simplifiés suite à une exposition au Cu et/ou au Zn à des concentrations environnementales assimilables à celles retrouvées dans des cours d'eau pollués (lessivage de sols viticoles pour le Cu ou drainage d'anciens sites miniers pour le Zn) (Gaillardet *et al.*, 2014 ; Montuelle *et al.*, 2010). Ainsi, la tolérance des phototrophes a été évaluée en utilisant des concentrations inférieures aux IC_{50} (Coutaud *et al.*, 2018): 20 et 200 $\mu\text{g L}^{-1}$ pour Cu et de 60 et 600 $\mu\text{g L}^{-1}$ pour Zn, seuls ou en cocktails pendant deux semaines. Pour un même ETM, un facteur 10 est appliqué entre les deux concentrations testées afin d'accentuer les effets potentiels sur les phototrophes.

Pour répondre à cet objectif, des mini-canaux artificiels ont été utilisés, ce qui permet de produire des biofilms phototrophes dans des conditions expérimentales contrôlées et identiques entre chaque expérimentation. Cette expérimentation a été réalisée avec trois biofilms simplifiés composés d'une seule espèce phototrophe : une algue verte (*U. confervicolum*), une diatomée (*N. palea*) ou une cyanobactérie (*P. autumnale*). Il est parfois difficile de comprendre les relations de causalité entre la présence de contaminants et les réponses des biofilms au vu du grand nombre de paramètres non contrôlés présents dans un milieu lotique. De ce fait, cette expérimentation réalisée en laboratoire facilite le contrôle de certains de ces paramètres (lumière, température, hydrodynamique, concentration en ETM, composition du milieu nutritif, etc.). Afin de faciliter la colonisation des supports artificiels par les microorganismes, l'exposition aux ETM a été réalisée cinq jours après l'ensemencement des mini-canaux artificiels.

La réponse physiologique des microorganismes phototrophes a été évaluée après deux semaines d'exposition par mesure de la biomasse algale produite et par la mesure de l'activité photosynthétique. En complément et afin d'étudier la réponse métabolique, la matrice d'EPS a

4. REPONSE PHYSIOLOGIQUE A UNE EXPOSITION METALLIQUE (CU ET ZN)

été soumise au protocole d'extraction présenté dans le **Chapitre III**. Ceci a permis la quantification des protéines et des polysaccharides extraits par dosages colorimétriques et l'analyse de leur diversité moléculaire par chromatographie à exclusion stérique.

Les trois biofilms mono-espèce testés dans cette étude ont la particularité d'être produits à partir de lots de microorganismes phototrophes isolés de l'environnement, en conditions non axéniques. Nous avons donc recherché une éventuelle influence du cortège bactérien associé sur la production et la qualité des EPS. Une divergence de diversité des communautés bactériennes a été observée au sein des différents biofilms qui se développent en absence de métaux dans les différents modules mais la production d'EPS n'est pas significativement différente (réplicats en condition contrôle). Par conséquent, pour la suite de l'étude, une modification dans la quantité d'EPS extraites sera considérée comme étant une réponse des organismes phototrophes sans tenir compte de la variation de la communauté bactérienne.

A travers cette étude, nous avons mis en évidence que les réponses physiologiques et métaboliques d'un biofilm phototrophe dépendent de la nature du métal considéré et de sa concentration. En effet, même si les trois espèces phototrophes ont présenté une sensibilité différente, seules les fortes concentrations en ETM testées ont diminué la biomasse algale et l'activité photosynthétique avec un effet plus important du Cu. Après deux semaines d'exposition, la quantité d'EPS qui composent les matrices des biofilms de *N. palea* et *P. autumnale* est plus importante en comparaison avec un biofilm dont la croissance a lieu sans ajout de métaux dans le milieu. Pour les trois biofilms, une augmentation de la quantité de protéines présentes dans la matrice a été observée en réponse à une exposition à de fortes concentrations en ETM. Toutefois en présence de Zn à forte concentration ($600 \mu\text{g L}^{-1}$), les empreintes protéiques contenues dans les matrices des biofilms de *N. palea* et *P. autumnale* sont différentes de celles obtenues en présence de Cu ($200 \mu\text{g L}^{-1}$) ou en condition contrôle. L'absence de ces pics sur les chromatogrammes d'extraits d'EPS de biofilms exposés à de fortes concentrations en Cu suggère une sécrétion active de certains composés protéiques en réponse à une exposition à de fortes concentrations en Zn.

En revanche, la production de polysaccharides est dépendante des espèces présentes au sein du biofilm. En effet, les fortes concentrations en ETM favorisent la sécrétion de polysaccharides par la cyanobactérie *P. autumnale* alors qu'au contraire une diminution de leur quantité est observée pour les deux microorganismes eucaryotes testés dans cette étude (l'algue

4. REPONSE PHYSIOLOGIQUE A UNE EXPOSITION METALLIQUE (CU ET ZN)

verte *U. confervicolum* et la diatomée *N. palea*). En conclusion, les réponses physiologiques des biofilms phototrophes à une exposition en ETM vont dans le sens d'une surproduction d'EPS permettant très certainement la séquestration des ETM au sein de la matrice du biofilm, ce qui permet d'accroître la tolérance des microorganismes phototrophes à leur présence dans la colonne d'eau et au sein du biofilm.

**PHYSIOLOGICAL RESPONSES OF THREE MONO-SPECIES
PHOTOTROPHIC BIOFILMS EXPOSED TO COPPER AND ZINC**

Emilie Loustau^{a,b}, Jessica Ferriol^a, Shams Koteiche^a, Joséphine Leflaive^a, Frédéric Moulin^c,

Elisabeth Girbal-Neuhauser^b, Jean-Luc Rols^{a*}

^a EcoLab, Université de Toulouse, CNRS, INPT, UPS, Toulouse, France

^b LBAE, Université de Toulouse, UPS, Auch, France

^c IMFT, Université de Toulouse, CNRS, INPT, UPS, Toulouse, France

* Corresponding author: jean-luc.rols@univ-tlse3.fr

Article soumis à la revue Environmental Science and Pollution Research

4. REPONSE PHYSIOLOGIQUE A UNE EXPOSITION METALLIQUE (CU ET ZN)

Abstract

In freshwater ecosystem, phototrophic biofilms play a crucial role through adsorption and sequestration of organic and inorganic pollutants. However, extracellular polymeric substances (EPS) secretion by phototrophic biofilms exposed to trace metals (TM) are poorly documented. This work evaluated the physiological responses of phototrophic biofilms by exposing three microorganisms (cyanobacterium *Phormidium autumnale*, diatom *Nitzschia palea* and green alga *Uronema confervicolum*) to 20 and 200 $\mu\text{g L}^{-1}$ of Cu or 60 and 600 $\mu\text{g L}^{-1}$ of Zn, both individually and in combination. Analysis of TM effects on algal biomass and photosynthetic efficiency showed that metals were toxic at the higher concentrations and that all the strains were more sensitive to Cu than to Zn. *U. confervicolum* was the most impacted in terms of growth while *P. autumnale* was the most impacted in term of photosynthetic efficiency. In consequence to metal exposure, a higher EPS production was measured in diatom and cyanobacterium biofilms, essentially caused by an overproduction of protein-like polymers. On the other hand, the amount of secreted polysaccharides decreased during metal exposure of the diatom and green alga biofilms. Size exclusion chromatography revealed specific EPS molecular fingerprints in *N. palea* and *P. autumnale* biofilms that have secreted different protein-like polymers during their development in the presence of Zn600. These proteins were not detected in the presence of Cu200. These results highlight interesting divergent responses between the three mono-species biofilms and suggest that increasing proteins production in EPS biofilms may be the main response of natural biofilm against TM pollutants in freshwater rivers.

Keywords

Metal toxicity, photosynthetic efficiency, EPS production, proteins stimulation

4. REPONSE PHYSIOLOGIQUE A UNE EXPOSITION METALLIQUE (CU ET ZN)

INTRODUCTION

Soils and rivers are largely contaminated through anthropogenic activities by receiving regularly heavy metals from industrialization, urbanization, mining, fertilizers and pesticide applications (Pacyna *et al.*, 2007). Over a billion tons of toxic heavy metals have been released into the environment during the last 30 years (Haferburg and Kothe, 2012). One consequence is the degradation of surface water quality in many parts of the world with the associated risks for human health (Lone *et al.*, 2008). Copper and zinc are released into the environment mainly by mining and agriculture (Hogsden and Harding, 2012; Johnson and Hallberg, 2005). The contamination by these metals has been increasing in aquatic environment through leaching of soils and run-off from agricultural land (Weingerl and Kerin, 2000; Rabiet *et al.*, 2015). Copper is essential for photosynthesis and mitochondrial respiration, for carbon and nitrogen metabolisms, for oxidative stress protection and is required for cell wall synthesis (Hänsch and Mendel, 2009). Zinc plays critical roles in a wide variety of biochemical processes (Hänsch and Mendel, 2009; Li *et al.*, 2012); it is also important for energy production and maintains the structural integrity of bio-membranes. If copper and zinc are essential micronutrients for algae, when their concentration is largely above those required for optimal growth, they are deleterious to the cells, causing serious threat to aquatic ecosystems and becoming a global issue.

Many prokaryotic and eukaryotic microorganisms such as bacteria, fungi and microalgae, colonize substratum in shallow aquatic environment to form phototrophic biofilms (Kroll *et al.*, 2016). Phototrophic biofilms are known for their essential ecological functions such as primary production, oxygen production and nutrient cycling (Lamberti, 1996). They serve as habitat for different protists and invertebrates and have a capacity to respond quickly to environmental stressors (Lyautey *et al.*, 2005). In aggregated form, microorganisms are known to produce a complex matrix of extracellular polymeric substances (EPS) largely composed of polysaccharides and proteins. EPS are the major contributor to the mass of phototrophic biofilm and participate to the maintenance of the biofilm integrity (Bellinger *et al.*, 2010; Sheng *et al.*, 2010; Stewart *et al.*, 2013). EPS production can serve as a protection mechanism against various stresses (Levy *et al.*, 2007; Staats *et al.*, 2000) and can mediate the exchanges of substances between benthic organisms and water column. Extracellular polysaccharides produced by phototrophic biofilms contain acidic sugars that show a high affinity for bivalent metal cations (Rossi *et al.*, 2012), suggesting their ability to adsorb and accumulate metal cations and nanoparticles present in the water column (Coutaud *et al.*, 2014; Coutaud *et al.*, 2018).

4. REPONSE PHYSIOLOGIQUE A UNE EXPOSITION METALLIQUE (CU ET ZN)

The toxic effects of heavy metals on the microbial community of phototrophic biofilms are essential to know because these biofilms represent the first link in the food web of many aquatic environments (Fabrega *et al.*, 2011). Since early investigations by Reese (1937) and Williams and Mount (1965), the effects of metals on phototrophic biofilm communities have been largely studied. It was reported that exposures to trace metals (TM) such as Cu or Zn induced changes in the abundance of species and the composition of the microbial community. Differences in sensitivity to metals among species composing biofilm communities induce community tolerance, a concept introduced by Blanck *et al.* (1988). This tolerance can be explained by the development of acquiescence mechanisms or by a natural selection of species: biofilms treated with various concentrations of Cu (0.63 or 6.35 mg L⁻¹) or Zn (7.85 mg L⁻¹) showed a clear shift in species composition (García-Meza *et al.*, 2005; Xu *et al.*, 2016). Reactive oxygen species (ROS) production by aerobic organisms is frequently stimulated by stressors including metal exposure. When the cells cannot maintain a balance in ROS levels by protective antioxidant mechanisms, modifications in some metabolic processes may occurred (Gechev *et al.*, 2006). In consequence of ROS formation, Cu and Zn have been shown to cause adverse effects on the photosynthetic activity of green alga species (Cao *et al.*, 2015; Perales-Vela *et al.*, 2007), diatom species (Cid *et al.*, 1995) and cyanobacterium species (Miao *et al.*, 2005). Furthermore, Cu and Zn have been shown to inhibit cell division of green microalgae (Perales-Vela *et al.*, 2007; Sabatini *et al.*, 2009), diatom species (Anu *et al.*, 2016) and cyanobacterium species (Miao *et al.*, 2005); they also affect cell size and morphology of diatom microalgae (Manimaran *et al.*, 2012; Morin *et al.*, 2007). Compared to other heavy metals such as mercury, an exposure to Cu resulted in a greater growth inhibition of freshwater diatom even at low concentration (100 µg L⁻¹) and after short duration of exposure (24 h) (Mu *et al.*, 2017). Concerning chronic exposure during 28 days, cyanobacterium cells were more affected by Cu (100 to 300 µg L⁻¹) compared with other divalent heavy metals with higher exposure concentrations (Pb, Cd or Li) (Mota *et al.*, 2015). The growth rate inhibition of two freshwater green algae species increased as Cu concentration (1 and 5 mg L⁻¹) or exposure time (1 h to 72 h) increased (Angel *et al.*, 2017). A significant decrease of the chlorophyll *a* content with an increase of Cu concentration was reported for marine diatom (50 to 850 µg L⁻¹) (Anu *et al.*, 2016; Manimaran *et al.*, 2012) and green alga species (10 to 1000 µg L⁻¹) (Levy *et al.*, 2008). Concerning Zn exposure, Xu *et al.* (2016) observed an eleven-fold decrease of the chlorophyll *a* content in fluvial phototrophic biofilm exposed to high Zn concentration around 7.85 mg L⁻¹. On the contrary, exposure to low Zn concentrations (under 250 µg L⁻¹) accelerated the growth of green alga species (Cao *et al.*, 2015). Miao *et al.* (2005) suggest that for similar concentrations, the toxic effects of copper on diatom, cyanobacterium and green alga microorganisms on growth rate and photosynthetic activity were higher than zinc.

4. REPOSE PHYSIOLOGIQUE A UNE EXPOSITION METALLIQUE (CU ET ZN)

EPS production is considered as a first protective barrier against toxic substances and in particular against metal income into the cells (Pistocchi *et al.*, 2000; Sheng and Liu, 2011). However, the secretion of EPS, in response to a stress situation, is extremely dependent on the existing environmental conditions (Stewart and Franklin, 2008). Using confocal laser-scanning microscopy, García-Meza *et al.* (2005) visualized an increase of EPS production by a phototrophic biofilm mostly composed of green algae and cyanobacteria under Cu exposure (0.635 and 6.35 mg L⁻¹). In the same way, more EPS (especially loosely bound-EPS) were produced in bacterial biofilm used for the treatment of wastewater contaminated by Cu (Miao *et al.*, 2017). In contrast, Cao *et al.* (2015) showed only a small increase of extracellular protein production by the green alga *Cladophora* after treatment with Cu and Zn, especially at low concentrations (100 to 500 µg L⁻¹) and the amount of polysaccharides produced by the cyanobacterium *Cyanothece sp.* was not enhanced by the presence of heavy metals (Mota *et al.*, 2015). These few contrasted results show that the effects of TM on the qualitative and quantitative composition of EPS in the extracellular matrix of phototrophic biofilm are still poorly understood and remain largely under-investigated.

The aim of the present study was to test the hypotheses that in realistic hydrodynamic conditions (i) exposure to Cu and Zn will modify qualitatively and quantitatively the EPS produced by benthic algae, (ii) these modifications will be species-dependent and (iii) will occur at non-inhibiting concentrations. In this purpose, three species largely represented in phototrophic biofilms, i.e. the diatom *Nitzschia palea*, the cyanobacterium *Phormidium autumnale* and the green alga *Uronema confervicolum*, were used to form mono-species biofilms. In order to simulate natural water flow conditions, these strains were cultivated in artificial streams. The tolerance of these microorganisms was tested at values of 60 and 600 µg L⁻¹ for Zn and 20 and 200 µg L⁻¹ for Cu corresponding to concentrations less than the half maximal inhibitory concentration (IC₅₀) for Cu (Coutaud *et al.*, 2018). The physiological response of the biofilms towards TM exposure was investigated through their effect on biomass growth, on photosynthetic efficiency and on EPS production. Polysaccharides and proteins were extracted from the biofilms and quantified as an estimation of EPS composition. Molecular weight (MW) distribution of extracted EPS was suggested as a useful tool for EPS fingerprint characterization.

MATERIAL AND METHODS

Maintenance of algal strains

The three benthic phototrophic microorganisms used in this study, the cyanobacterium *Phormidium autumnale*, the diatom *Nitzschia palea* and the green alga *Uronema confervicolum* were isolated from phototrophic biofilms in the rivers Tarn and Garonne (Southwestern France). These three species are maintained in non-axenic conditions in the algae collection of EcoLab (Toulouse, France) at 18 °C under white light of $30 \pm 5 \mu\text{mol s}^{-1} \text{m}^{-2}$ with light / dark periods of 16 h / 8 h. Individual pre-cultures of the three species were prepared for 21 days in 500 mL Erlenmeyer flasks with adapted nutrient media: BG11 medium (Stanier *et al.*, 1971) for *P. autumnale*, Combo medium (Kilham *et al.*, 1998) for *N. palea* and *U. confervicolum*. Before inoculation in the hydraulic mini-channels, the algal biomass was homogenized by using an Ultra-Turrax disperser (T25, Janke-Kunkel, 13,500 rpm, 1 min) and subdivided in equal inocula.

Experimental setup

The experiment was carried out in a dedicated device composed of several hydraulic mini-channels (see Supplementary data section A, **Figure A.1**). The study was conducted with a series of three experiments, each experiment corresponding to the use of one of the three species of phototrophic microorganisms (**Figure 1**). The operating conditions were the following. Physical-chemical parameters fixed for the circulating water in the mini-channels were a temperature of 20 ± 0.2 °C, a pH of 8 ± 0.1 (pH meter Multi 3430 SET C) during the light period and a flow rate of 300 L h^{-1} obtained with the combination of the manual valve and a slope of 1.2%. The choice of this flow rate resulted from the analysis of flow regime in mini-channels (see Supplementary data section B). The light intensity was $71.5 \pm 13.5 \mu\text{mol s}^{-1} \text{m}^{-2}$ with a circadian cycle of light / dark periods of 16 h / 8 h. For each condition, the lower tanks were filled with 50 L of nutrient media adapted to each species and a suspension of biofilm biomass was added. After 5 days, the time required for the colonization of coupons by species, copper (CuSO_4) or zinc ($\text{ZnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$) was added in the circulating water to reach the final concentrations specific to each block of four mini-channels. In each module, one block was a control (without metal addition) and the two others contained one or two metals at two different concentrations: 20 and $200 \mu\text{g L}^{-1}$ for Cu (Cu20 and Cu200, respectively), 60 and $600 \mu\text{g L}^{-1}$ for Zn (Zn60 and Zn600, respectively) or a mix of the metals Cu20Zn60 and Cu200Zn600. The lowest concentrations are closed to concentrations recorded in polluted rivers (Montuelle *et al.*, 2010; Gaillardet *et al.*, 2014). Incubations with metals were conducted during 16 days. To avoid nutrient

4. REPOSE PHYSIOLOGIQUE A UNE EXPOSITION METALLIQUE (CU ET ZN)

depletion, 100 mL of a concentrated solution were added every week, consisting of NO_3^- at 2.44 g L^{-1} and PO_4^{3-} at 0.228 g L^{-1} for the three species and additional SiO_2 at 5 g L^{-1} for the diatom. Finally, at day 21, biofilms were scrapped from the coupons with a toothbrush and suspended in 100 mL (for EPS extraction) or 15 mL (for biofilm biomass and bacterial community structure) of culture media before analysis. For each replicate, one per mini-channel giving four replicates per block, ten coupons were collected for the characterization of biofilm biomass and bacterial community structure and fifteen coupons for the extraction of EPS.

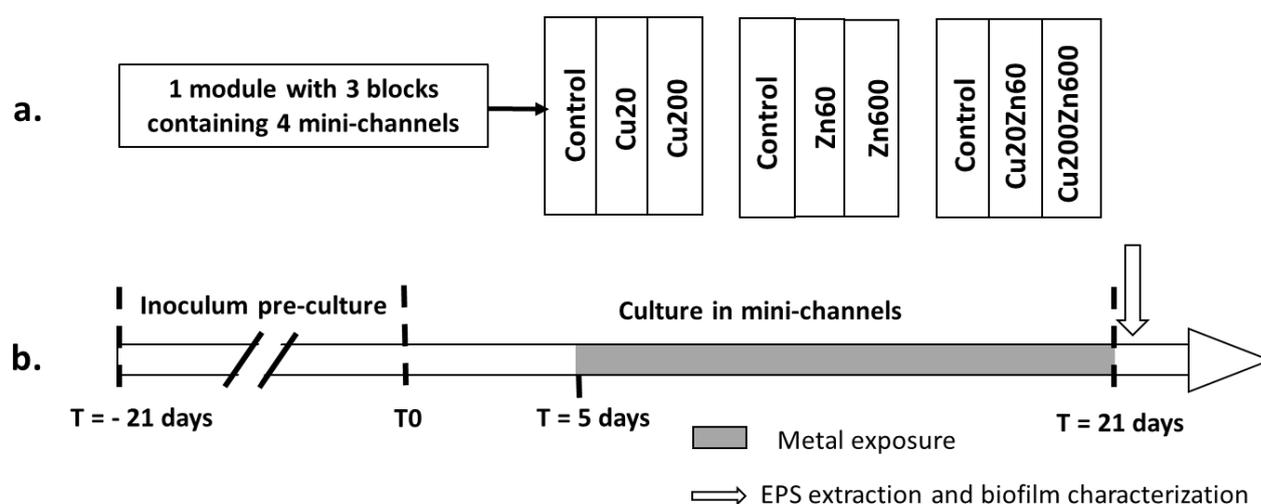


Figure 1 (a) Experimental design realised for the three species of phototrophic microorganisms. In each module, one experimental condition is the same in the four mini-channels of one block. Seven different conditions were tested: control (biofilms without metal exposure), Cu20 or Cu200 (biofilms exposed to 20 or 200 $\mu\text{g L}^{-1}$ of Cu, respectively), Zn60 or Zn600 (biofilms exposed to 60 or 600 $\mu\text{g L}^{-1}$ of Zn, respectively), Cu20Zn60 (biofilm exposed to 20 $\mu\text{g L}^{-1}$ of Cu and 60 $\mu\text{g L}^{-1}$ of Zn) and Cu200Zn600 (biofilm exposed to 200 $\mu\text{g L}^{-1}$ of Cu and 600 $\mu\text{g L}^{-1}$ of Zn). (b) Experimental setup where T0 = time of inoculation of the mini-channels.

Biofilm biomass

A subsample of the biofilm suspension obtained as described above was used to assess biofilm biomass by measuring the dry weight (DW) after 72 h of drying at 70 °C.

PhytoPAM measurements

PhytoPAM measurements were performed directly in the mini-channels by measuring fluorescence response to a saturating light flash after 20 minutes of dark adaptation (dark-adapted state (DAS))

4. REPONSE PHYSIOLOGIQUE A UNE EXPOSITION METALLIQUE (CU ET ZN)

conditions) (Baker, 2008). For each condition in one block, thirty-two total values were performed (eight measures per mini-channel).

The physiological state of algae was estimated from the maximal efficiency of the photosystem II (yield), corresponding to the transfer rate of electrons, thanks to the formula defined by Roháček and Barták (1999):

$$\Phi_{\text{PSII}} (\text{DAS conditions}) = 1 - (F_0/F_M) ; 0 < \Phi_{\text{PSII}} < 1 \quad (1)$$

F_M represents the maximal fluorescence and F_0 corresponds to the minimal fluorescence of the photosystem II, in DAS conditions. The photosynthetic efficiency is specific to each algal group, so no comparison is permitted between the values of the different species used here.

Bacterial community structure

In this experiment, the algal strains were not axenic. The TM potentially impacted the bacteria associated with each alga, bacteria that are also EPS producers. We assumed that the variations of EPS production we observed were linked to algal physiology and not to modifications of the associated bacteria, notably because alga represented by far most of the biomass. Genetic prokaryote diversities of the bacteria associated with the algae were monitored with ARISA (Automated Ribosomal Intergenic Spacer Analysis) (Fisher and Triplett, 1999). The DNA of biofilm communities was extracted with the DNeasy Plant Mini Kit (Qiagen), the lysis buffer of the first step being directly applied on the pellet. ARISA PCR was performed using the universal bacterial primers FAM-labelled ITSReub (GCCAAGGCATCCACC) and ITSR (GTCGTAACAAGGTAGCCGTA) (Cardinale *et al.*, 2004). An initial denaturation step at 94 °C for 5 min was followed by 35 cycles at 91 °C for 1 min, 56 °C for 1 min and 72 °C for 2 min. Finally, an extension was carried out at 72 °C for 10 min. After denaturation at 96 °C for 3 min in the presence of formamide (37%), the PCR products were analysed on 3130 xl Capillary Genetic Analyser (Applied Biosystems) together with a DNA size standard ladder LIZ1200 (Applied Biosystems) and the results were analysed with the Peak Scanner 1.0 software (Applied Biosystems). The size of DNA fragments was rounded to the nearest whole number. Fragments shorter than 200 bp were excluded from the analysis. The area under the peaks was normalized to the total area of the sample, and peaks corresponding to less than 0.1% of total area were excluded from the analysis. For each couple of primers, peaks on the chromatogram, corresponding to OTUs, were scored as present or absent from the chromatogram analysis and gathered in taxa (OTU)-presence matrix.

Extracellular polymeric substances assays

1. EPS extraction

EPS were extracted from biofilms following the sequential method developed previously by Loustau *et al.* (2018). The biomass suspension was firstly homogenized by pre-treatment with an Ultra-Turrax disperser (T25, Janke-Kunkel) at 13,500 rpm for 1 min at room temperature. Then, a volume of the homogenized suspension corresponding to 10 mg DW was centrifuged at 4,000 g for 15 min. The pellet was washed with PBS solution (Phosphate Buffer Saline, 10 mM $\text{HPO}_4^{2-}/\text{H}_2\text{PO}_4^-$ at pH 7.4, with 2.7 mmol L⁻¹ of KCl and 137 mmol L⁻¹ of NaCl) and centrifuged again. Two EPS extraction steps were applied in sequence with intermediate centrifugations (4,000 g for 15 min) to collect the supernatants containing the solubilized EPS. In the first step, the biomass pellet was suspended in 2 mL of PBS solution containing 12 μL of 37% formamide and the tube was shaken gently on a rotary disc shaker at 150 rpm and 4 °C for 60 min. Centrifugation at 4,000 g for 15 min allowed to recover the EPS released in the supernatant (called “S-F”). In the second step, the biomass pellet was re-suspended with 2 mL of PBS solution with addition of cation exchange resin (CER, Dowex Marathon) with a final dosage of 50 g g⁻¹ DW. The suspension was stirred for 90 min at 150 rpm and 4 °C. Then, the sample was centrifuged at 4,000 g for 15 min to recover the supernatant (called “S-CER1”). PBS was added again on the pellet to clean up the beads allowing a second supernatant to be collected after centrifugation (called “S-CER2”). The amount of EPS extracted during the CER extraction step (S-CER) was the sum of the EPS amounts contained in both supernatants (S-CER = S-CER1 + S-CER2).

The cellular integrity during the extraction steps was controlled by the measurement of chlorophyll *a* release in the EPS extracts (Loustau *et al.*, 2018). It allows to estimate for each biofilm sample the percentage of cell lysis due to the extraction treatments.

2. Proteins and polysaccharides quantification

For each EPS extract, protein concentration was measured by the bicinchoninic acid (BCA) method (Smith *et al.*, 1985). For 25 μL of each sample, 200 μL of BCA reagent (Sigma-Aldrich) were incubated in a 96 wells microplate (15 min at 60 °C) before measuring the optical density at 540 nm with a microplate reader (Synergy Mx Biotek). Bovine serum albumin (BSA) was used as a standard with concentrations ranging from 0 to 800 mg L⁻¹.

Polysaccharides concentrations were estimated using the anthrone method (Dreywood, 1946) allowing total carbohydrates to be quantified: 100 μL of each sample and 200 μL of anthrone reagent

4. REPOSE PHYSIOLOGIQUE A UNE EXPOSITION METALLIQUE (CU ET ZN)

(2% anthrone in 96% sulfuric acid) were incubated in a 96 wells microplate (30 min at 60 °C), cooled at room temperature for 10 min before measuring the optical density at 620 nm with the microplate reader. Glucose was used as a standard with concentrations ranging from 0 to 100 mg L⁻¹.

3. Size Exclusion Chromatography

The size distribution of extracted EPS (S-CER) was investigated by size exclusion chromatography (SEC) using an AKTA Purifier System (GE Healthcare), equipped with a 250 µL injection loop and two columns: a Superdex peptide 10/300 GL (GE Healthcare) with a resolving range 0.3 – 10 kDa, followed by a Superdex 200 10/300 GL (GE Healthcare) with a resolving range 10 – 600 kDa. The exclusion volume of this chromatographic system was estimated to be 15 mL and the total permeation volume to be 46 mL. All measurements were performed using PBS as eluent with a flow rate of 0.4 mL min⁻¹. Detection was carried out with fluorescence: an excitation and emission wavelengths of 221 nm / 350 nm were selected to detect protein-like substances (Bhatia *et al.*, 2013).

The apparent molecular weight of the eluted molecules was calculated from a calibration curve obtained after injection of a mix of different standard proteins purchased from GE Healthcare (thyroglobulin, 669 kDa; aldolase, 158 kDa; conalbumin, 75 kDa; carbonic anhydrase, 29 kDa; ribonuclease A, 13.7 kDa; aprotinin, 6.511 kDa) or from Sigma-Aldrich (angiotensin II, 1.046 kDa; leucine enkephaline, 0.556 kDa; thyrotropin, 0.362 kDa).

The following equation was obtained for this calibration curve:

$$\text{Log (MW)} = -0.1421 \text{ Ve} + 8.316 \quad (\text{R}^2 = 0.9923) \quad (2)$$

with MW (Molecular Weight) expressed in Da and Ve (peak elution Volume) in mL.

Statistical analyses

Statistical analyses were performed using the PAST software (Paleontological Statistics, version 2.17 and 3.06) (Hammer *et al.*, 2001). For all analyses, the normality was checked on each dataset (EPS quantity, biomass, PhytoPam) with the Shapiro-Wilk test and data were transformed if needed. When data were normally distributed, two-way ANOVAs were used to test the effects of copper and zinc, followed by a Tukey post-hoc test. The non-parametric Kruskal-Wallis test was used with Mann-Whitney test for pairwise comparisons of non-parametric data. Data given in the text are means ± standard error (SE). For all statistical analyses, significance was inferred at $p < 0.05$.

RESULTS

1. Effect of TM on biomass growth

Compared to controls (without metal contamination), no significant effects were observed on biomass growth for *P. autumnale* and *U. confervicolum* exposed to copper and/or zinc at the lower concentrations (Cu20 or Zn60 or Cu20Zn60). Even at these low concentrations, *N. palea* appeared more sensitive to Cu than to Zn exposure showing a $27 \pm 2\%$ decrease in biofilm biomass after Cu20 exposure ($p= 0.043$) (**Figure 2**). At the higher metal concentrations (Cu200 or Zn600, respectively), significant biomass reduction was observed for *N. palea*: $38.1 \pm 4.6\%$ ($p= 0.019$) and $29.3 \pm 0.8\%$ ($p= 0.022$), and for *U. confervicolum*: $80.8 \pm 5.7\%$ ($p= 0.021$) and $42.2 \pm 9.4\%$ ($p= 0.042$). Noticeably, at similar Cu200 or Zn600 concentrations, no effect was detected on the growth of the cyanobacteria *P. autumnale*. When the two metals were added simultaneously (Cu200Zn600), a synergetic effect was nevertheless observed for this cyanobacteria with a decrease in biomass growth above 50% ($p= 0.016$). This was not the case for the two others species since no significant differences in biofilm growth between Cu200 and Cu200Zn600 exposure were observed for *N. palea* and *U. confervicolum*. These data indicate that among the three strains tested, the green alga *U. confervicolum* was the most sensitive to TM, while the cyanobacteria *P. autumnale* was the most resistant when TM were added alone.

2. Effect of TM on photosynthetic efficiency

For the three phototrophic species and compared to the controls, no significant deleterious effect on ϕ PSII was exerted by an exposure to Cu or Zn alone and at the lower concentrations (Cu20 or Zn60) (**Figure 3**). Important decrease by $39.2 \pm 5.87\%$ ($p < 0.0001$) was nevertheless observed after exposure of *P. autumnale* species to a mixture of the two metals at similar low concentrations (Cu20Zn60). At the higher metal concentrations, the photosynthesis efficiency was particularly reduced for *P. autumnale* with a decrease of $32.8 \pm 3.4\%$ and $20.5 \pm 2.5\%$ after Cu200 and Zn600 exposure, respectively. In these conditions, photosynthesis efficiency was only reduced by $10.2 \pm 4.2\%$ and $8.5 \pm 2.1\%$ for *N. palea* species and by $17.8 \pm 2.6\%$ and $7.5 \pm 1.3\%$ for *U. confervicolum* species.

4. REPOSE PHYSIOLOGIQUE A UNE EXPOSITION METALLIQUE (CU ET ZN)

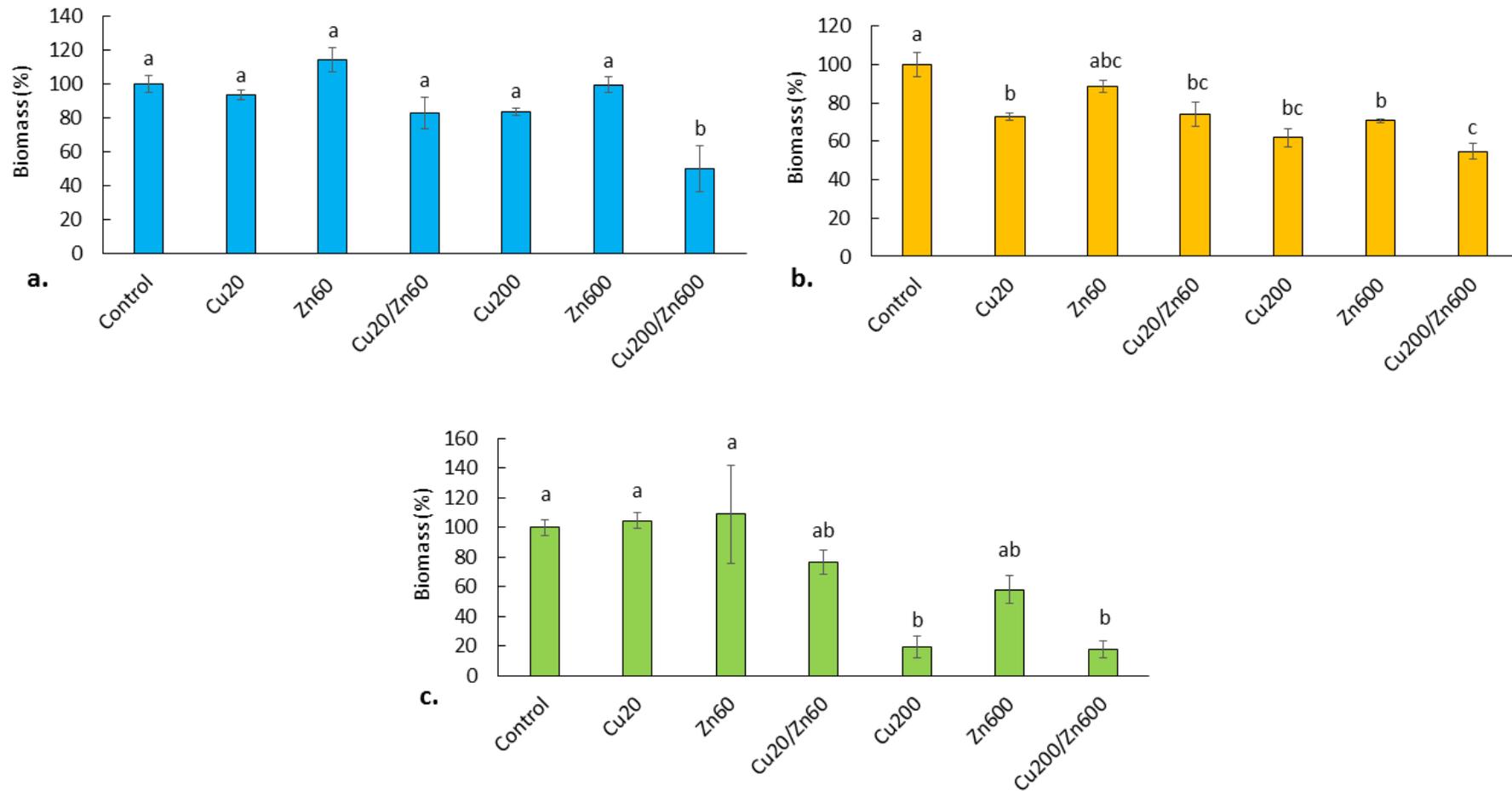


Figure 2 Effects of copper and zinc exposure on the cyanobacterium (*P. autumnale*; a), the diatom (*N. palea*; b) and the green alga (*U. confervicolum*; c) biomasses (n = 4, mean ± SD) compared to the control biomass (n = 12, mean ± SD). The mean control value was fixed at 100% (5.4 ± 0.3, 3.0 ± 0.2 and 2.1 ± 0.1 mg DW cm⁻² for *P. autumnale*, *N. palea* and *U. confervicolum* biofilms, respectively). The biofilms were exposed under 16 days to copper at 20 µg L⁻¹ (Cu20) or 200 µg L⁻¹ (Cu200), to zinc at 60 µg L⁻¹ (Zn60) or 600 µg L⁻¹ (Zn600) and to a mix of the metals (Cu20Zn60 or Cu200Zn600).

4. REPOSE PHYSIOLOGIQUE A UNE EXPOSITION METALLIQUE (CU ET ZN)

The highest decreases of the ϕ PSII compared to the controls were observed under metals mixture at the higher concentrations (Cu200Zn600) with values of $29.3 \pm 1.7\%$ ($p = 0.008$) for *N. palea* species, $52.1 \pm 4.2\%$ ($p < 0.0001$) for *P. autumnale* species and $37.6 \pm 1.2\%$ ($p < 0.0001$) for *U. confervicolum* species. For *N. palea* and *U. confervicolum* species, a synergetic effect was obtained on the ϕ PSII compared to those obtained with each metal alone.

These data showed that even if no deleterious effects were observed under low metal concentrations, the ϕ PSII of the cyanobacteria *P. autumnale* was the most sensitive when the concentration of heavy metals increased. In addition, they showed that with the tested metal concentrations, all the strains were more sensitive to Cu than to Zn.

3. Effect of TM on EPS production

Polysaccharides and proteins contents in extracted EPS

After EPS extraction from the various biofilms, polysaccharides and proteins were quantified using colorimetric assays and referred to glucose equivalent or BSA equivalent, respectively (**Table 1**). It can be noticed that using such relative quantification, the amounts of extracted polysaccharides were higher than the amounts of proteins.

No significant effects were observed on the amounts of polysaccharides and proteins extracted for the three biofilms exposed to zinc at the lower concentration (Zn60), except for the green alga with a decrease of 17% for proteins compared to the control. The effect of Cu exposure at the lower concentration (Cu20) was species-dependent and particularly important for *P. autumnale*, with an increase by 82% of the amount of polysaccharides. Conversely, the amount of polysaccharides extracted from *U. confervicolum* decreased by 15%. No significant effect of copper exposure at the lower concentration was observed for *N. palea* biofilm.

Similar tendencies for polysaccharides amount increase in *P. autumnale* or decrease in *U. confervicolum* and in *N. palea* biofilms were observed at the higher metal concentrations (Cu200 or Zn600) compared to the controls. Comparison of the lower and higher metal contaminations for *N. palea* biofilms indicated that polysaccharides were decreased by 39% with an increase of Cu concentration and by 29% with an increase of Zn concentration. For *U. confervicolum*, significant decreases of the amount of polysaccharides by 22% and by 10% were observed, respectively. On the contrary, for the cyanobacterium *P. autumnale*, no significant difference on the amount of polysaccharides extracted was observed with an increase of metal concentration.

4. REPOSE PHYSIOLOGIQUE A UNE EXPOSITION METALLIQUE (CU ET ZN)

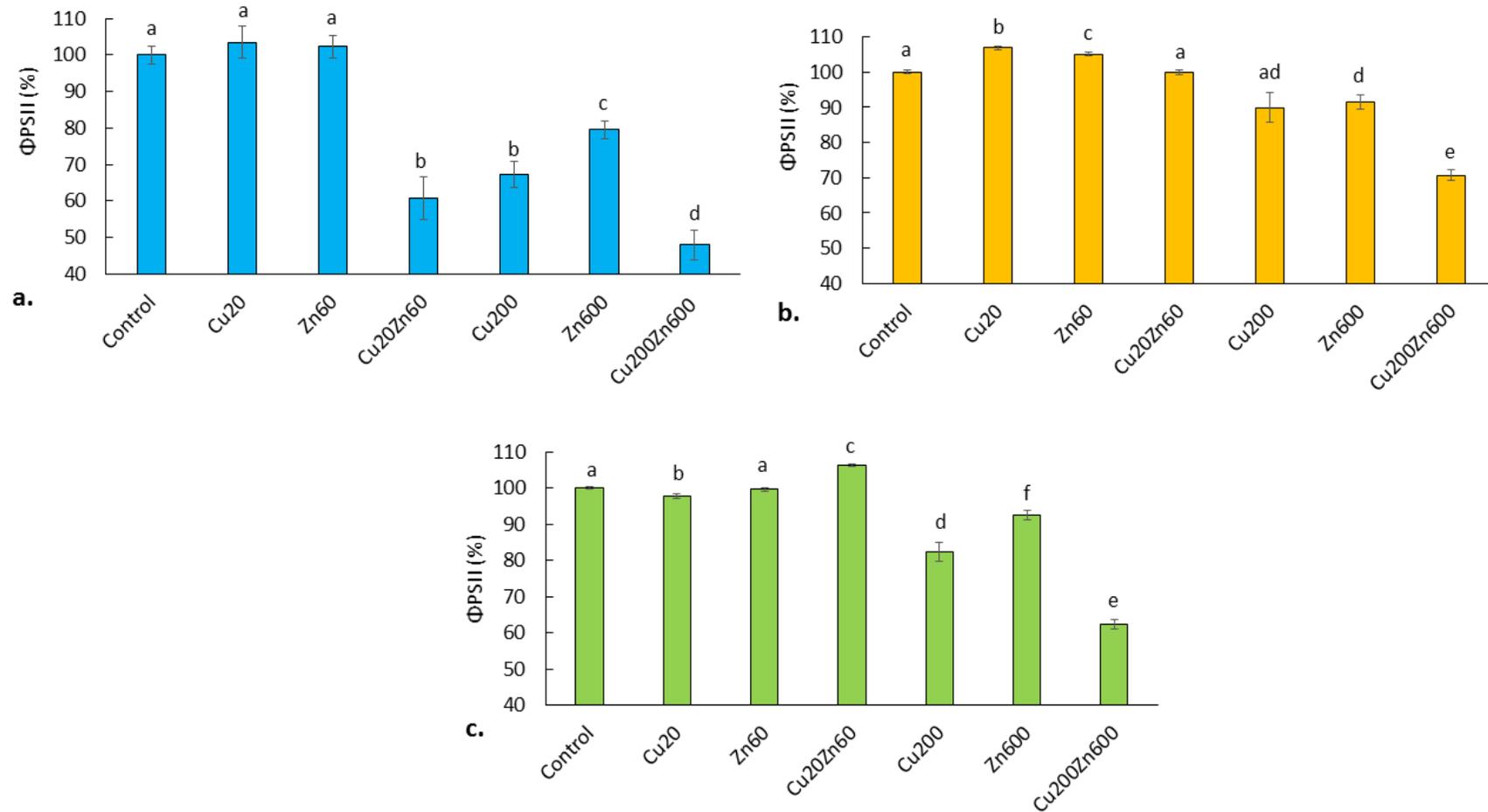


Figure 3 Effects of copper and zinc exposure on the cyanobacterium (*P. autumnale*; a), the diatom (*N. palea*; b) and the green alga (*U. confervicolum*; c) photosynthetic efficiencies (Φ_{PSII}) ($n = 32$, mean \pm SD) compared to the control ($n = 96$, mean \pm SD). The mean control value was fixed at 100% (0.26 ± 0.01 , 0.62 ± 0.01 and 0.72 ± 0.01 for *P. autumnale*, *N. palea* and *U. confervicolum* biofilms, respectively). The biofilm was exposed under 16 days to copper at $20 \mu\text{g L}^{-1}$ (Cu20) or $200 \mu\text{g L}^{-1}$ (Cu200), to zinc at $60 \mu\text{g L}^{-1}$ (Zn60) or $600 \mu\text{g L}^{-1}$ (Zn600) and to a mix of the metals (Cu20Zn60 or Cu200Zn600).

4. REPOSE PHYSIOLOGIQUE A UNE EXPOSITION METALLIQUE (CU ET ZN)

Table 1 Effects of copper and/or zinc exposure during the biofilm growth for the cyanobacterium *P. autumnale*, the diatom *N. palea* and the green alga *U. confervicolum* on the total EPS extracted (S-F + S-CER) from the biofilm. Results of the assays are presented by the total amounts of proteins (PN, in mg eqBSA g⁻¹ DW) and polysaccharides (PS, in mg eqGlc g⁻¹ DW) depending on the metal exposure (n = 12 for metal exposure and n = 36 for the control, mean ± SD). Two groups without any letter in common in a same line are significantly different (p < 0.05). The values in bold were significantly different from the control, and highlighted when higher than the control.

		Control	Cu20	Zn60	Cu20Zn60	Cu200	Zn600	Cu200Zn600
Cyanobacterium	PS	16.1 ± 1.1 a	29.3 ± 2.6 b	22.0 ± 2.7 acd	16.1 ± 1.8 a	26.6 ± 1.5 bd	22.8 ± 2.0 bd	14.9 ± 1.1 ac
<i>P. autumnale</i>	PN	10.4 ± 0.5 a	11.4 ± 0.5 a	11.2 ± 0.2 a	14.5 ± 0.9 b	15.5 ± 0.5 bc	17.9 ± 0.9 bc	18.6 ± 1.2 c
Diatom	PS	25.9 ± 1.4 ab	30.8 ± 2.6 a	24.6 ± 2.4 abc	22.1 ± 1.7 bcd	18.7 ± 1.6 cd	17.5 ± 0.9 d	11.2 ± 0.9 e
<i>N. palea</i>	PN	15.1 ± 0.6 ac	13.3 ± 0.9 a	14.3 ± 0.8 ac	27.6 ± 1.7 b	16.2 ± 0.2 c	26.9 ± 0.9 b	23.6 ± 0.4 d
Green alga	PS	42.0 ± 1.8 a	35.6 ± 1.4 b	43.9 ± 2.9 a	40.8 ± 1.3 bc	27.9 ± 1.4 cd	39.3 ± 1.3 bc	23.8 ± 1.0 d
<i>U. confervicolum</i>	PN	4.1 ± 0.1 a	2.7 ± 0.3 b	3.4 ± 0.2 c	3.6 ± 0.4 ac	4.7 ± 0.4 ae	6.1 ± 0.2 de	5.8 ± 0.1 e

4. REPOSE PHYSIOLOGIQUE A UNE EXPOSITION METALLIQUE (CU ET ZN)

The amounts of extracted proteins were significantly higher for the three biofilms exposed to the higher concentrations (Cu200 or Zn600) compared to lower concentrations (Cu20 or Zn60) of the two metals. For *P. autumnale*, significant increases of the amount of proteins were observed with an increase of Cu or Zn concentrations by 36% and 60%, respectively. The amount of proteins extracted from *N. palea* increased by 22% and 88%, respectively. Then for *U. confervicolum*, the amount of proteins extracted increased by 74% and 79%, respectively. For the three phototrophic species, the increase of proteins amount was more important with the increase of Zn concentration (Zn60 vs Zn600) than with the increase of Cu concentration (Cu20 vs Cu200).

Characterization of extracted EPS by Size Exclusion Chromatography

Size exclusion chromatography (SEC) can be used to characterize the fingerprint and/or the molecular weight distribution of EPS (Sheng *et al.*, 2010). A global SEC fingerprint monitored at 210 nm was undertaken for each EPS extract obtained after CER step treatment (S-CER) for the three species exposed to the higher metal concentrations (Cu200 or Zn600) and their controls (Erreur ! Source du renvoi introuvable.a, c and e). The EPS profiles of the green alga strain were similar under metal exposure (Cu200 or Zn600) or control condition (**Figure 4e**). On the contrary, the exposure of the diatom *N. palea* to the higher Zn concentration (Zn600) has affected the EPS profile leading to an increase in the peak amplitude of almost all the eluted molecules while it was not the case when the diatom was exposed to Cu200 (**Figure 4c**). Concerning the cyanobacterium species, some modifications could also be noticed in the EPS profile after Zn exposure: the absorbance intensities of the peaks located between 30 to 37 mL and around 44 mL were slightly increased (**Figure 4a**). However, it was difficult to correlate this increase of UV absorbance in the Zn600 EPS profiles to a surexpression of polysaccharides or proteins like-polymers because 210 nm monitoring can detect very diversified organic and inorganic compounds. As an example, formamide used during the first step of the extraction procedure was detected at 210 nm as a single peak eluted at 41.7 mL (**Figure 4a, c and e**).

A more specific detection of protein-like polymers was therefore performed based on fluorescence excitation and emission monitoring as previously described by Bhatia *et al.* (2013). One couple of wavelengths ($\lambda_{Ex} / \lambda_{Em} = 221 \text{ nm} / 350 \text{ nm}$) was selected for SEC monitoring, allowing the detection of tryptophan fluorescence that can be more specific and sensitive to analyse the eluted protein like-polymers (**Figure 4b, d, f**).

4. REPOSE PHYSIOLOGIQUE A UNE EXPOSITION METALLIQUE (CU ET ZN)

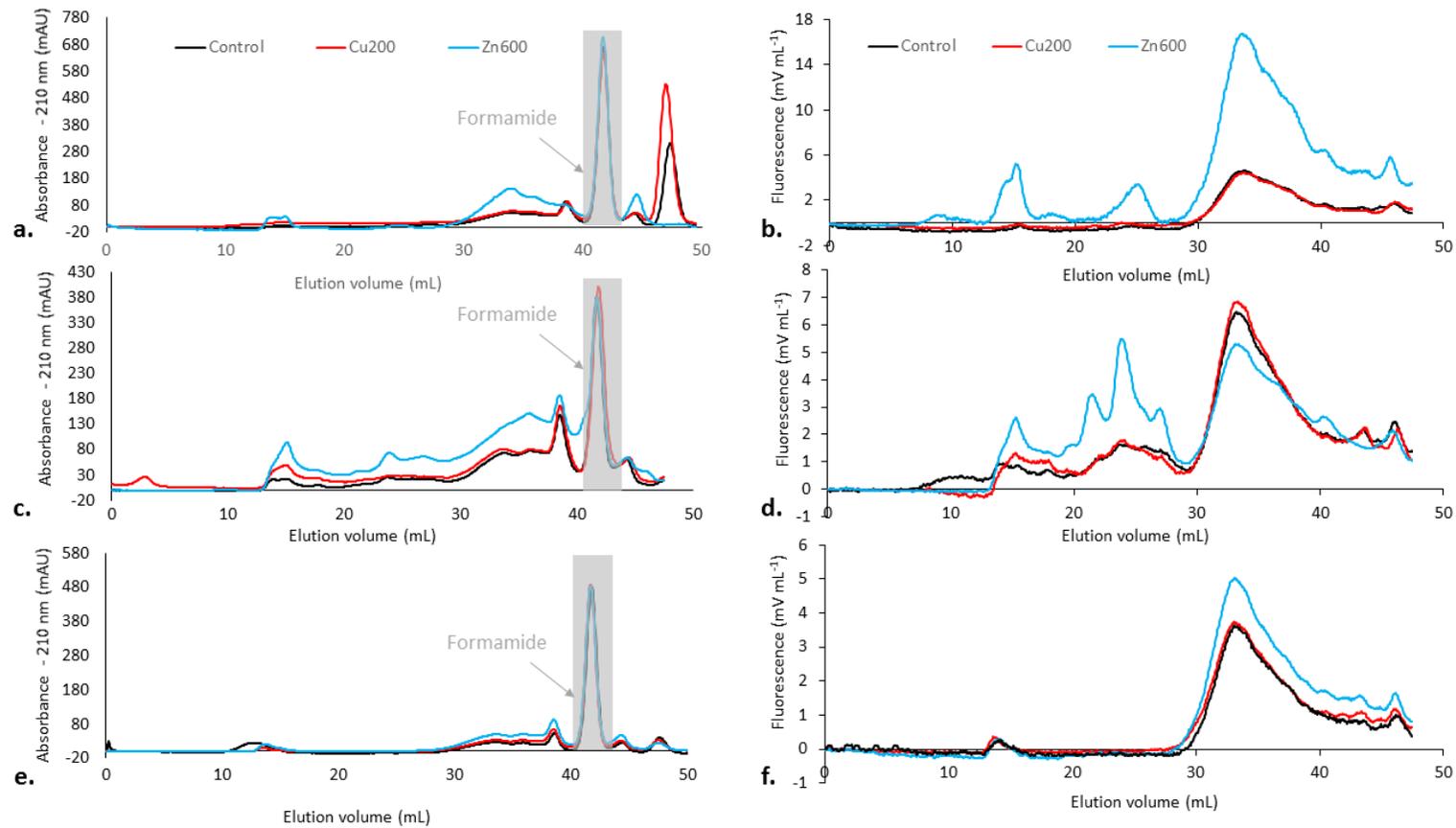


Figure 4 Size exclusion chromatography of the EPS extracts (S-CER) measured at 210 nm (a, c and e) and the proteins obtained with fluorescence (Excitation / Emission: 221 nm / 350 nm) (b, d and f) recovered from *P. autumnale* (a and b), *N. palea* (c and d) and *U. confervicolum* (e and f) species for the control or Cu200 and Zn600 exposure. The vertical arrows indicate the position of the peak obtained after injection of PBS buffer containing 0.22% formamide.

4. REPOSE PHYSIOLOGIQUE A UNE EXPOSITION METALLIQUE (CU ET ZN)

Fluorescence monitoring evidenced an increase in protein-like molecules in the EPS extracted after Zn exposure of both cyanobacterium and diatom biofilms (**Figure 4b** and **4d**) while it was not the case for the green alga EPS extract (**Figure 4f**). Comparison of the size profiles of the protein-like molecules extracted from the *P. autumnale* biofilm exposed or not to Zn clearly showed three increased populations: one corresponding to high molecular weight proteins (eluted from 15 to 20 mL, size up to 360 kDa), a second to intermediate size proteins (eluted from 20 to 30 mL, size from 6 to 360 kDa) and a last population of low molecular weight molecules (from 30 to 40 mL, 0.1 to 6 kDa). The effect of Zn exposure on the diatom *N. palea* biofilm was somewhat different since in comparison with the unexposed biofilm, the last population of low molecular weight protein-like molecules (30 to 40 mL) was not increased. As for *P. autumnale*, an increase in the secretion of high molecular weight proteins (15 to 20 mL) was observed after Zn exposure. Noticeably, the intermediate size molecules exhibited a specific pattern since a group of three peaks could be clearly visualized on the *N. palea* profile while only one was detected in the *P. autumnale* profile. These data confirm that high Zn concentration exposure significantly stimulates protein secretion by cyanobacterium and diatom biofilms. In addition, they point out the fact that the secreted molecules might be divergent since specific fluorescent profiles were obtained for the intermediate size proteins extracted from these two biofilms.

4. Characterization of the bacterial community

In order to evaluate the possible contribution of bacteria associated with each alga to the EPS variations, attention has paid to the composition of the bacterial community in each channel. The composition of these communities was compared with Jaccard similarity indices, calculated from the matrixes obtained with ARISA fingerprinting. Our results showed that the main factor controlling the structure of biofilm bacterial community was the experimental module. Indeed, for the controls, the similarity within modules was higher than the similarity between modules (**Table 2**). Conversely, for the three species, the module did not significantly influence the EPS extracted (pool of PS + PN): for control replicates realized in different modules, no significant difference was observed. Therefore, a modification in bacterial community composition did not influence the quantity of EPS extracted.

4. REPOSE PHYSIOLOGIQUE A UNE EXPOSITION METALLIQUE (CU ET ZN)

Table 2 Comparison of similarity index (Jaccard) of bacterial community (n = 3 for one module, mean \pm SD) and the EPS extracted (n = 4 for one module, mean \pm SD) for biofilm (represented by *P. autumnale*, *N. palea* or *U. confervicolum*) grown without metal exposure (control) within the same or different module (intra or inter-module respectively). For each species and each parameter (distance index or EPS (here EPS = PS + PN)), two groups without any letter in common are significantly different ($p > 0.05$).

	Similarity index (Jaccard)		EPS extracted, for each module (mg g ⁻¹ DW)
	intra-module	inter-module	
Cyanobacterium			28.4 \pm 2.2 _a
<i>P. autumnale</i>	0.546 \pm 0.052 _a	0.149 \pm 0.009 _b	27.1 \pm 1.1 _a
			24.0 \pm 2.7 _a
Diatom			40.1 \pm 2.8 _a
<i>N. palea</i>	0.694 \pm 0.042 _a	0.133 \pm 0.006 _b	41.7 \pm 1.6 _a
			40.0 \pm 1.8 _a
Green alga			43.8 \pm 2.6 _a
<i>U. confervicolum</i>	0.639 \pm 0.115 _a	0.059 \pm 0.014 _b	48.5 \pm 1.6 _a

DISCUSSION

Physiological effects of Cu and Zn on phototrophic biofilm

In this study, three mono-species phototrophic biofilms cultivated in hydraulic mini-channels in non-axenic conditions were exposed to contrasted concentrations of Cu or Zn. The physiological response of each species was first evaluated at the cellular level, measuring the growth inhibition and photosynthesis activity decrease. The three species, chosen to cover the major groups of benthic algae present in river biofilms, showed contrasted responses.

In terms of growth, the cyanobacterium *P. autumnale* was the most resistant species. *N. palea* was the only species whose biomass production decreased because of metal exposure at environmental concentrations (Cu20 or Zn60). These results are in agreement with González *et al.* (2016) who observed a decrease of *N. palea* biomass under Ag exposure for 14 days, whereas *U. confervicolum* biomass was unchanged. A more drastic reduction in algal biomass has been reported in other studies at moderate Cu concentration compared to our findings. As an example, a reduction of 42% in algal biomass was observed under 32.5 $\mu\text{g L}^{-1}$ of Cu in fluvial phototrophic biofilm for an exposition of six weeks (Serra and Guasch, 2009). At high metal concentrations, the growth of *U. confervicolum*

4. REPOSE PHYSIOLOGIQUE A UNE EXPOSITION METALLIQUE (CU ET ZN)

was more affected than the one of the other species. Dao and Beardall (2016) found that the biomass of two freshwater green algae declined with increasing of Pb concentrations until concentrations higher than IC50.

Surprisingly, the observations made on biofilm growth were not fully correlated with the measures of photosynthetic activity, while this parameter is supposed to be more sensitive than growth to detect deleterious effects (Dorigo and Leboulanger, 2001). Indeed, at environmental concentrations, Cu and Zn showed no deleterious effects on the photosynthetic activity of the three species. This is consistent with the results of Lambert *et al.* (2016) who found that Φ PSII value of phototrophic biofilm was higher in microcosm containing $15 \mu\text{g L}^{-1}$ of Cu compared to the control. In contrast, higher concentration of metals (Cu200 or Zn600) have decreased the photosynthetic activity by 8 to 33%, *P. autumnale* being the more sensitive species for this parameter. This observation is in agreement with published data indicating that cyanobacteria are less resistant than green algae to Cu exposure (Takamura *et al.*, 1989; Takamura *et al.*, 1990). Cu and Zn stresses are known to functionally impair phototrophic communities by reducing photosynthetic activity (Cao *et al.*, 2015; Lambert *et al.*, 2012; Perales-Vela *et al.*, 2007; Xu *et al.*, 2016). These effects can be attributed to the substitution of Mg, which is the central atom of chlorophyll molecule, by dissolved Zn^{2+} or Cu^{2+} , leading to the inhibition of photosynthesis. Interaction of chlorophyll with Cu and Zn showed that Cu forms preferentially Cu-chlorophyll link compare to Zn; in consequence, Zn effect is highly minor compared to Cu when both metals are present in the same concentration (Zvezdanović and Marković, 2009).

The tolerance of the diatom may be explained by the presence of the frustule, the siliceous extracellular skeleton of diatom cells, which acts as protection barrier against molecules (Hale and Mitchell, 2001) and plays an important protective role against Zn and Cu toxicity (Guasch *et al.*, 2002). Serra *et al.* (2009) also observed a higher biomass tolerance of cyanobacteria than green algae when biofilm were chronically exposed to Cu at $100 \mu\text{g L}^{-1}$. In addition, a difference in the affinity of Cu or Zn for intracellular or extracellular fixation sites can modulate their toxicity and explain the observed enhanced toxic effect of Cu, even at lower concentrations. An excess of Cu or Zn can promote the generation of ROS which can damage several cellular components, and/or promote a competitive binding to metal transporters inhibiting the uptake of other essential metals (Gaetke and Chow, 2003; Nies, 1999; Tottey *et al.*, 2012).

The negative effects of TM on biomass production and photosynthetic activity may have direct or indirect effects on the water ecosystem due to the role of microorganisms in the sorption of organic or inorganic nutrients (Fischer *et al.*, 2002; Romani *et al.*, 2004). The algal cell biomass recovery after exposure to contaminants is important for grazing invertebrates and therefore the ecosystem food web, a decrease affecting the transfer of energy towards higher trophic levels (Sheldon and

4. REPONSE PHYSIOLOGIQUE A UNE EXPOSITION METALLIQUE (CU ET ZN)

Walker, 1997; Schmitt *et al.*, 1995). Knowledge on the tolerance and response of microalgae to heavy metals is important in order to determine the potential utility of microalgae for pollution assessment. In presence of copper and zinc in freshwater, the prediction of phototrophic biofilm modification allows to evaluate the changes in ecosystem functioning.

Effects of Cu and Zn on EPS production

In the present study, the three mono-species phototrophic biofilms have developed different responses face to metal contamination including modulation of their EPS matrix composition. In the presence of copper or zinc at high concentrations (Cu200 or Zn600), *P. autumnale* was able to increase its polysaccharide production compared to the control. On the opposite, the quantity of extracellular polysaccharides was lower than the control for the eukaryotic *N. palea* and *U. confervicolum* species. This suggests that for phototrophic eukaryotic microorganisms, polysaccharides were less produced, or less extracted by our protocol. On the contrary, the prokaryotic *P. autumnale* microorganisms have secreted some polysaccharides and this might be considered as a protective mechanism. One interesting perspective to this study would be to compare the biochemical nature and physico-chemical properties of the polysaccharides produced in the absence or presence of cationic metals. Indeed, acidic sugars such as alginate-like exopolysaccharides are able to adsorb metal cations and protect microorganisms from the harsh environment. Cyanobacteria, known as producers of exopolysaccharides, have been considered as very promising chelating agents for the removal of positively charged heavy metal ions from water solution (De Philippis *et al.*, 2011).

As regards to the amount of proteins, the three phototrophic species are able to increase their proteins excretion in response to high concentrations of metal. In our experiments, the total amount of protein extracted was highest for Zn600 exposure than for Cu200, whatever the species considered. This may contribute to the lower toxicity of Zn compared to Cu. Although a fundamental role in cell tolerance towards cationic pollutants can be attributed to such released proteins, further investigations are needed to explore the involved mechanism and its specificity towards Zn cation.

To confirm global EPS production or consumption in the presence of high Cu and Zn concentrations, EPS obtained from the three biofilms after the CER step of the previously described multi-method extraction procedure (Loustau *et al.*, 2018) were analysed by SEC. Absorbance monitoring at 210 nm clearly showed that only Zn exposure has triggered global EPS production for both *P. autumnale* and *N. palea* biofilms. In line with the colorimetric BCA assays, the overproduction of proteins by *P. autumnale* and by *N. palea* cells under Zn600 exposure was confirmed by the fluorescence profiles, but it was not the case for *U. confervicolum*. That can be explained by the fact that the amount of

4. REPOSE PHYSIOLOGIQUE A UNE EXPOSITION METALLIQUE (CU ET ZN)

proteins extracted from the green alga biofilm is significantly lower than for the two other biofilms. In addition, SEC profiles revealed specific EPS molecular fingerprints in *N. palea* and *P. autumnale* biofilms that have secreted different intermediate molecular weight protein-like polymers during their development in the presence of Zn600. These proteins were not detected in the presence of Cu200 although some increase in protein secretion was measured in *P. autumnale* biofilms exposed to Cu200. Possible interferences of non-proteic compounds such as pigments or polyphenols with the BCA reagent might lead to protein overestimation by the colorimetric assay.

Our results suggest that the presence of specific proteins in the extracellular matrix could play a significant role in the difference of species sensitivity to TM. Indeed, the diatom biofilm containing three intermediate molecular weight proteins seems to have the less sensitive photosynthesis process towards Zn exposure. Proteins and polysaccharides from EPS matrix may serve as a boundary between microbial cells and their immediate environment. Moreover, their overall anionic charges may be essential for sequestering metal cations (Cu^{2+} or Zn^{2+}) and reduce the metal income into the cell (García-Meza *et al.*, 2005; Masmoudi *et al.*, 2013; Kaplan *et al.*, 1988). Further characterization of the secreted proteins and their capacity to adsorb metal cations *in vitro* will help to confirm such molecular mechanism.

To our knowledge, this is the first study investigating the quantitative and qualitative protein fingerprints produced by phototrophic biofilm under environmental metal exposure. In most of previous studies, authors limited their analyses to the polysaccharides fraction (Aslam *et al.*, 2012; De Brouwer *et al.*, 2002). Polysaccharides characterisation is often preferred while in our study it would appear that proteins composing EPS biofilm play an important role for phototrophic cell tolerance under metal exposure. To conclude, it might be relevant to have a closer look at the anionic properties of the polymers (proteins and polysaccharides) composing the EPS of these three phototrophic biofilms and to analyse, *in vitro*, their capacity to sorb Cu and Zn at these concentrations.

ACKNOWLEDGEMENTS

EL was supported by a Ph. D. fellowship from the French « Ministère de l'Enseignement Supérieur, de la Recherche et de l'Innovation ». This work was funded by the Idex UNITI grant of the University of Toulouse, France (No. 2016 – 46 – CIF – D – DRDV). We are grateful to the ARIAS company (Toulouse), especially J.-J. Bertrand, for manufacturing the three mini-channels modules. We thank Vanina Agache for ARISA experiments.

REFERENCES

- Angel, B.M., Simpson, S.L., Granger, E., Goodwyn, K., and Jolley, D.F. (2017) Time-averaged concentrations are effective for predicting chronic toxicity of varying copper pulse exposures for two freshwater green algae species. *Environ. Pollut.* **230**: 787–797.
- Anu, P.R., Nandan, S.B., Jayachandran, P.R., and Xavier, N.D. (2016) Toxicity effects of copper on the marine diatom, *Chaetoceros calcitrans*. *Reg. Stud. Mar. Sci.* **8**: 498–504.
- Aslam, S.N., Cresswell-Maynard, T., Thomas, D.N., and Underwood, G.J. (2012) Production and characterization of the intra-and extracellular carbohydrates and polymeric substances (EPS) of three sea-ice diatom species, and evidence for a cryoprotective role for EPS. *J. Phycol.* **48**: 1494–1509.
- Baker, N.R. (2008) Chlorophyll fluorescence: a probe of photosynthesis in vivo. *Annu Rev Plant Biol* **59**: 89–113.
- Bellinger, B.J., Gretz, M.R., Domozych, D.S., Kiemle, S.N., and Hagerthey, S.E. (2010) Composition of extracellular polymeric substances from periphyton assemblages in the Florida everglades. *J. Phycol.* **46**: 484–496.
- Bhatia, D., Bourven, I., Simon, S., Bordas, F., Van Hullebusch, E.D., Rossano, S., et al. (2013) Fluorescence detection to determine proteins and humic-like substances fingerprints of exopolymeric substances (EPS) from biological sludges performed by size exclusion chromatography (SEC). *Bioresour. Technol.* **131**: 159–165.
- Blanck, H., Wängberg, SA and Molander, S. (1988) Pollution-induced community tolerance (PICT)-a new ecotoxicological tool. In: Cairns J Jr. & Pratt JR (eds) Functional testing of Aquatic Biota for Estimating Hazards of Chemicals, ASTM STP 988. *Am. Soc. Test. Mater. Phila.* pp 219-230.
- Cao, D., Xie, P., Deng, J., Zhang, H., Ma, R., Liu, C., et al. (2015) Effects of Cu²⁺ and Zn²⁺ on growth and physiological characteristics of green algae, *Cladophora*. *Environ. Sci. Pollut. Res.* **22**: 16535–16541.
- Cardinale, M., Brusetti, L., Quatrini, P., Borin, S., Puglia, A.M., Rizzi, A., et al. (2004) Comparison of different primer sets for use in automated ribosomal intergenic spacer analysis of complex bacterial communities. *Appl. Environ. Microbiol.* **70**: 6147–6156.
- Cid, A., Herrero, C., Torres, E., and Abalde, J. (1995) Copper toxicity on the marine microalga *Phaeodactylum tricorutum*: effects on photosynthesis and related parameters. *Aquat. Toxicol.* **31**: 165–174.

4. REPONSE PHYSIOLOGIQUE A UNE EXPOSITION METALLIQUE (CU ET ZN)

- Coutaud, A., Meheut, M., Viers, J., Rols, J.-L., and Pokrovsky, O.S. (2014) Zn isotope fractionation during interaction with phototrophic biofilm. *Chem. Geol.* **390**: 46–60.
- Coutaud, M., Méheut, M., Glatzel, P., Pokrovski, G.S., Viers, J., Rols, J.-L., and Pokrovsky, O.S. (2018) Small changes in Cu redox state and speciation generate large isotope fractionation during adsorption and incorporation of Cu by a phototrophic biofilm. *Geochim. Cosmochim. Acta* **220**: 1–18.
- Dao, L.H. and Beardall, J. (2016) Effects of lead on growth, photosynthetic characteristics and production of reactive oxygen species of two freshwater green algae. *Chemosphere* **147**: 420–429.
- De Brouwer, J.F.C., Ruddy, G.K., Jones, T.E.R., and Stal, L.J. (2002) Sorption of EPS to sediment particles and the effect on the rheology of sediment slurries. *Biogeochemistry* **61**: 57–71.
- De Philippis, R., Colica, G., and Micheletti, E. (2011) Exopolysaccharide-producing cyanobacteria in heavy metal removal from water: molecular basis and practical applicability of the biosorption process. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **92**: 697-708.
- Dorigo, U. and Le Boulanger, C. (2001) A pulse-amplitude modulated fluorescence-based method for assessing the effects of photosystem II herbicides on freshwater periphyton. *J. Appl. Phycol.* **13**: 509–515.
- Dreywood, R. (1946) Qualitative test for carbohydrate material. *Ind. Eng. Chem. Anal. Ed.* **18**: 499–499.
- Fabrega, J., Luoma, S.N., Tyler, C.R., Galloway, T.S., and Lead, J.R. (2011) Silver nanoparticles: behaviour and effects in the aquatic environment. *Environ. Int.* **37**: 517–531.
- Fischer, H., Sachse, A., Steinberg, C.E., and Pusch, M. (2002) Differential retention and utilization of dissolved organic carbon by bacteria in river sediments. *Limnol. Oceanogr.* **47**: 1702–1711.
- Fisher, M.M. and Triplett, E.W. (1999) Automated approach for ribosomal intergenic spacer analysis of microbial diversity and its application to freshwater bacterial communities. *Appl. Environ. Microbiol.* **65**: 4630–4636.
- Gaetke, L.M. and Chow, C.K. (2003) Copper toxicity, oxidative stress, and antioxidant nutrients. *Toxicology* **189**: 147–163.
- Gaillardet, J., Viers, J., and Dupré, B. (2014) Trace elements in river waters. *Treatise on Geochemistry* (second edition), **7**: 195-235.
- García-Meza, J.V., Barrangue, C., and Admiraal, W. (2005) Biofilm formation by algae as a mechanism for surviving on mine tailings. *Environ. Toxicol. Chem.* **24**: 573–581.

4. REPONSE PHYSIOLOGIQUE A UNE EXPOSITION METALLIQUE (CU ET ZN)

- Gechev, T.S., Van Breusegem, F., Stone, J.M., Denev, I., and Laloi, C. (2006) Reactive oxygen species as signals that modulate plant stress responses and programmed cell death. *Bioessays* **28**: 1091–1101.
- González, A.G., Fernández-Rojo, L., Leflaive, J., Pokrovsky, O.S., and Rols, J.L. (2016) Response of three biofilm-forming benthic microorganisms to Ag nanoparticles and Ag⁺: the diatom *Nitzschia palea*, the green alga *Uronema confervicolum* and the cyanobacteria *Leptolyngbya* sp. *Environ. Sci. Pollut. Res.* **23**: 22136–22150.
- Guasch, H., Paulsson, M., and Sabater, S. (2002) Effect of copper on algal communities from oligotrophic calcareous streams 1. *J. Phycol.* **38**: 241–248.
- Haferburg, G. and Kothe, E. (2012) Biogeosciences in heavy metal-contaminated soils. In, *Bio-Geo Interactions in Metal-Contaminated Soils*. Springer, pp. 17–34.
- Hammer, Ø., Harper, D.A.T., and Ryan, P.D. (2001) PAST-Palaeontological statistics. *Www Uv Es ~ Pardomvpe2001 Ipastpastprogpast Pdf Acessado Em* **25**: 2009.
- Hänsch, R. and Mendel, R.R. (2009) Physiological functions of mineral micronutrients (Cu, Zn, Mn, Fe, Ni, Mo, B, Cl). *Curr. Opin. Plant Biol.* **12**: 259–266.
- Hogsden, K.L. and Harding, J.S. (2012) Anthropogenic and natural sources of acidity and metals and their influence on the structure of stream food webs. *Environ. Pollut.* **162**: 466–474.
- Johnson, D.B. and Hallberg, K.B. (2005) Acid mine drainage remediation options: a review. *Sci. Total Environ.* **338**: 3–14.
- Kaplan, D., Christiaen, D., and Arad, S. (1988) Binding of heavy metals by algal polysaccharides. In: *Algal Biotechnology*, Stadler, T. et al. (Eds), Elsevier Applied Science, London, pp. 122-136.
- Kilham, S.S., Kreeger, D.A., Lynn, S.G., Goulden, C.E., and Herrera, L. (1998) COMBO: a defined freshwater culture medium for algae and zooplankton. *Hydrobiologia* **377**: 147–159.
- Kroll, A., Matzke, M., Rybicki, M., Obert-Rausser, P., Burkart, C., Jurkschat, K., et al. (2016) Mixed messages from benthic microbial communities exposed to nanoparticulate and ionic silver: 3D structure picks up nano-specific effects, while EPS and traditional endpoints indicate a concentration-dependent impact of silver ions. *Environ. Sci. Pollut. Res.* **23**: 4218–4234.
- Lambert, A.S., Dabrin, A., Morin, S., Gahou, J., Foulquier, A., Coquery, M., and Pesce, S. (2016) Temperature modulates phototrophic periphyton response to chronic copper exposure. *Environ. Pollut.* **208**: 821–829.
- Lambert, A.-S., Morin, S., Artigas, J., Volat, B., Coquery, M., Neyra, M., and Pesce, S. (2012) Structural and functional recovery of microbial biofilms after a decrease in copper exposure: Influence of the presence of pristine communities. *Aquat. Toxicol.* **109**: 118–126.

4. REPONSE PHYSIOLOGIQUE A UNE EXPOSITION METALLIQUE (CU ET ZN)

- Lamberti, G.A. (1996) The role of periphyton in benthic food webs. In: *Algal ecology*. Elsevier, pp. 533–572.
- Levy, J.L., Angel, B.M., Stauber, J.L., Poon, W.L., Simpson, S.L., Cheng, S.H., and Jolley, D.F. (2008) Uptake and internalisation of copper by three marine microalgae: comparison of copper-sensitive and copper-tolerant species. *Aquat. Toxicol.* **89**: 82–93.
- Levy, J.L., Stauber, J.L., and Jolley, D.F. (2007) Sensitivity of marine microalgae to copper: the effect of biotic factors on copper adsorption and toxicity. *Sci. Total Environ.* **387**: 141–154.
- Li, Y., Zheng, Y., Qian, J., Chen, X., Shen, Z., Tao, L., et al. (2012) Preventive effects of zinc against psychological stress-induced iron dyshomeostasis, erythropoiesis inhibition, and oxidative stress status in rats. *Biol. Trace Elem. Res.* **147**: 285–291.
- Loustau, E., Rols, J.-L., Leflaive, J., Marcato-Romain, C.-E., and Girbal-Neuhauser, E. (2018) Comparison of extraction methods for the characterization of extracellular polymeric substances from aggregates of three biofilm-forming phototrophic microorganisms. *Can. J. Microbiol.* **64**: 887-899.
- Lyautey, E., Jackson, C.R., Cayrou, J., Rols, J.-L., and Garabétian, F. (2005) Bacterial community succession in natural river biofilm assemblages. *Microb. Ecol.* **50**: 589–601.
- Maleva, M.G., Malec, P., Prasad, M.N.V., and Strzałka, K. (2016) Kinetics of nickel bioaccumulation and its relevance to selected cellular processes in leaves of *Elodea canadensis* during short-term exposure. *Protoplasma* **253**: 543–551.
- Manimaran, K., Karthikeyan, P., Ashokkumar, S., Prabu, V.A., and Sampathkumar, P. (2012) Effect of copper on growth and enzyme activities of marine diatom, *Odontella mobiliensis*. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* **88**: 30–37.
- Masmoudi, S., Nguyen-Deroche, N., Caruso, A., Ayadi, H., Morant-Manceau, A., Tremblin, G., and Schoefs, B. (2013) Cadmium, copper, sodium and zinc effects on diatoms: From heaven to hell—A review. *Cryptogam. Algal.* **34**: 185–225.
- Miao, A.-J., Wang, W.-X., and Juneau, P. (2005) Comparison of Cd, Cu, and Zn toxic effects on four marine phytoplankton by pulse-amplitude-modulated fluorometry. *Environ. Toxicol. Chem.* **24**: 2603–2611.
- Miao, L., Wang, C., Hou, J., Wang, P., Ao, Y., Li, Y., et al. (2017) Response of wastewater biofilm to CuO nanoparticle exposure in terms of extracellular polymeric substances and microbial community structure. *Sci. Total Environ.* **579**: 588–597.
- Montuelle, B., Dorigo, U., Bérard, A., Volat, B., Bouchez, A., Tlili, A., et al. (2010) The periphyton as a multimetric bioindicator for assessing the impact of land use on rivers: an overview of the Ardères-Morcille experimental watershed (France). *Hydrobiologia* **657**: 123–141.

4. REPOSE PHYSIOLOGIQUE A UNE EXPOSITION METALLIQUE (CU ET ZN)

- Morin, S., Vivas-Nogues, M., Duong, T.T., Boudou, A., Coste, M., and Delmas, F. (2007) Dynamics of benthic diatom colonization in a cadmium/zinc-polluted river (Riou-Mort, France). *Fundam. Appl. Limnol. Für Hydrobiol.* **168**: 179–187.
- Mota, R., Pereira, S.B., Meazzini, M., Fernandes, R., Santos, A., Evans, C.A., et al. (2015) Effects of heavy metals on *Cyanothece sp.* CCY 0110 growth, extracellular polymeric substances (EPS) production, ultrastructure and protein profiles. *J. Proteomics* **120**: 75–94.
- Mu, W., Jia, K., Liu, Y., Pan, X., and Fan, Y. (2017) Response of the freshwater diatom *Halamphora veneta* (Kützing) Levkov to copper and mercury and its potential for bioassessment of heavy metal toxicity in aquatic habitats. *Environ. Sci. Pollut. Res.* **24**: 26375–26386.
- Nies, D.H. (1999) Microbial heavy-metal resistance. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **51**: 730–750.
- Pacyna, E.G., Pacyna, J.M., Fudala, J., Strzelecka-Jastrzab, E., Hlawiczka, S., Panasiuk, D., et al. (2007) Current and future emissions of selected heavy metals to the atmosphere from anthropogenic sources in Europe. *Atmos. Environ.* **41**: 8557–8566.
- Perales-Vela, H.V., González-Moreno, S., Montes-Horcasitas, C., and Cañizares-Villanueva, R.O. (2007) Growth, photosynthetic and respiratory responses to sub-lethal copper concentrations in *Scenedesmus incrassatulus* (*Chlorophyceae*). *Chemosphere* **67**: 2274–2281.
- Pistocchi, R., Mormile, M.A., Guerrini, F., Isani, G., and Boni, L. (2000) Increased production of extra- and intracellular metal-ligands in phytoplankton exposed to copper and cadmium. *J. Appl. Phycol.* **12**: 469–477.
- Rabiet, M., Coquery, M., Carlier, N., Gahou, J., and Gouy, V. (2015) Transfer of metal (loid) s in a small vineyard catchment: contribution of dissolved and particulate fractions in river for contrasted hydrological conditions. *Environ. Sci. Pollut. Res.* **22**: 19224–19239.
- Reese, M.J. (1937) The microflora of the non-calcareous streams Rheidol and Melindwr with special reference to water pollution from lead mines in Cardiganshire. *J. Ecol.* **25**: 385–407.
- Roháček, K. and Barták, M. (1999) Technique of the modulated chlorophyll fluorescence: basic concepts, useful parameters, and some applications. *Photosynthetica* **37**: 339.
- Romaní, A.M., Giorgi, A., Acuna, V., and Sabater, S. (2004) The influence of substratum type and nutrient supply on biofilm organic matter utilization in streams. *Limnol. Oceanogr.* **49**: 1713–1721.
- Rossi, F., Micheletti, E., Bruno, L., Adhikary, S.P., Albertano, P., and De Philippis, R. (2012) Characteristics and role of the exocellular polysaccharides produced by five cyanobacteria isolated from phototrophic biofilms growing on stone monuments. *Biofouling* **28**: 215–224.

4. REPONSE PHYSIOLOGIQUE A UNE EXPOSITION METALLIQUE (CU ET ZN)

- Sabatini, S.E., Juarez, A.B., Eppis, M.R., Bianchi, L., Luquet, C.M., and de Molina, M. del C.R. (2009) Oxidative stress and antioxidant defenses in two green microalgae exposed to copper. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* **72**: 1200–1206.
- Schmitt, J., Nivens, D., White, D.C., and Flemming, H.-C. (1995) Changes of biofilm properties in response to sorbed substances-an FTIR-ATR study. *Water Sci. Technol.* **32**: 149–155.
- Serra, A., Corcoll, N., and Guasch, H. (2009) Copper accumulation and toxicity in fluvial periphyton: the influence of exposure history. *Chemosphere* **74**: 633–641.
- Serra, A. and Guasch, H. (2009) Effects of chronic copper exposure on fluvial systems: linking structural and physiological changes of fluvial biofilms with the in-stream copper retention. *Sci. Total Environ.* **407**: 5274–5282.
- Sheng, G.-P., Yu, H.-Q., and Li, X.-Y. (2010) Extracellular polymeric substances (EPS) of microbial aggregates in biological wastewater treatment systems: a review. *Biotechnol. Adv.* **28**: 882–894.
- Sheng, Z. and Liu, Y. (2011) Effects of silver nanoparticles on wastewater biofilms. *Water Res.* **45**: 6039–6050.
- Smith, P.K., Krohn, R.I., Hermanson, G.T., Mallia, A.K., Gartner, F.H., Provenzano, Md., et al. (1985) Measurement of protein using bicinchoninic acid. *Anal. Biochem.* **150**: 76–85.
- Staats, N., Stal, L.J., and Mur, L.R. (2000) Exopolysaccharide production by the epipellic diatom *Cylindrotheca closterium*: effects of nutrient conditions. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* **249**: 13–27.
- Stanier, R.Y., Kunisawa, R., Mandel, M., and Cohen-Bazire, G. (1971) Purification and properties of unicellular blue-green algae (order Chroococcales). *Bacteriol. Rev.* **35**: 171–205.
- Stewart, P.S. and Franklin, M.J. (2008) Physiological heterogeneity in biofilms. *Nat. Rev. Microbiol.* **6**: 199–210.
- Stewart, T.J., Traber, J., Kroll, A., Behra, R., and Sigg, L. (2013) Characterization of extracellular polymeric substances (EPS) from periphyton using liquid chromatography-organic carbon detection–organic nitrogen detection (LC-OCD-OND). *Environ. Sci. Pollut. Res.* **20**: 3214–3223.
- Takamura, N., Kasai, F., and Watanabe, M.M. (1989) Effects of Cu, Cd and Zn on photosynthesis of freshwater benthic algae. *J. Appl. Phycol.* **1**: 39–52.
- Takamura, N., Kasai, F., and Watanabe, M.M. (1990) Unique response of *Cyanophyceae* to copper. *J. Appl. Phycol.* **2**: 293–296.
- Tottey, S., Patterson, C.J., Banci, L., Bertini, I., Felli, I.C., Pavelkova, A., et al. (2012) Cyanobacterial metallochaperone inhibits deleterious side reactions of copper. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **109**: 95–100.

4. REPONSE PHYSIOLOGIQUE A UNE EXPOSITION METALLIQUE (CU ET ZN)

- Weingerl, V. and Kerin, D. (2000) Distribution of zinc in vineyard areas treated with zinc containing phytopharmaceuticals. *Acta Chim. Slov.* **47**: 453–468.
- Williams, L.G. and Mount, D.I. (1965) Influence of zinc on periphytic communities. *Am. J. Bot.* **52**: 26–34.
- Xu, Y., Wang, C., Hou, J., Dai, S., Wang, P., Miao, L., et al. (2016) Effects of ZnO nanoparticles and Zn²⁺ on fluvial biofilms and the related toxicity mechanisms. *Sci. Total Environ.* **544**: 230–237.
- Zvezdanović, J. and Marković, D. (2009) Copper, iron, and zinc interactions with chlorophyll in extracts of photosynthetic pigments studied by VIS spectroscopy. *Russ. J. Phys. Chem. A* **83**: 1542–1546

Supplement A: Description of the hydraulic mini-channels

The mini-channels (length 1.25 m, width 0.03 m and height 0.05 m) are made in poly(methyl methacrylate) (PMMA), and they receive eighty coupons (made of polyoxymethylene (POM-C), density 1.4, size 29 mm x 10 mm, thickness 8.315 ± 0.095 mm) transversally placed along each channel to support biofilms growth (**Figure A.1**). The flow is homogeneously distributed at the entrance of the mini-channels by disposing honeycomb structures. The twelve mini-channels are disposed on a plate for which the slope can be chosen (0 to 2.4%). A block of four contiguous mini-channels is pooled with a single closed circulating loop of water, generating four pseudo-replicates for biofilm sampling. Each circulating loop, or mini-channel block, is constituted by a lower tank (60 L) and an upper tank (20 L) made of polyvinyl chloride (PVC) and a pump ($2,200 \text{ m}^3 \text{ h}^{-1}$) to pull up the water in the upper tank. Each mini-channel is feeding by the circulating water with a controlled flow rate (0.1 to $0.5 \text{ m}^3 \text{ h}^{-1}$) fixed by a manual valve and the slope of the mini-channels. The flow rate is continuously measured with a flowmeter (FFUS10-1G1SR model, SICK company) and the height of water above the coupons with a movable ultrasonic sensor (UM18-217126111 model, SICK company), allowing to calculate the velocity of water flow in the mini-channels (varying from 0.1 to 0.5 m s^{-1}). The upper tanks are enclosed in a heating water bath favoring the temperature regulation of the circulating water, the modules being in an air-conditioned room. Each module is equipped with a lightening apparatus, consisting of three rows each with a length of 1.2 m, where every row consists of several light-emitting diode (LED, daylight, $6,500^\circ\text{K}$). This lightening apparatus is presented as a movable plate and can be fixed at different positions on the mini-channels (between 19 and 43 cm above the surface of the coupons). The light intensity is chosen for each module (from 0 to $150 \mu\text{mol s}^{-1} \text{ m}^{-2}$), integrating a programmed lightening cycle day / night, and a linear increase or decrease of the intensity during the two hours preceding the day or the night, respectively.

4. REPOSE PHYSIOLOGIQUE A UNE EXPOSITION METALLIQUE (CU ET ZN)

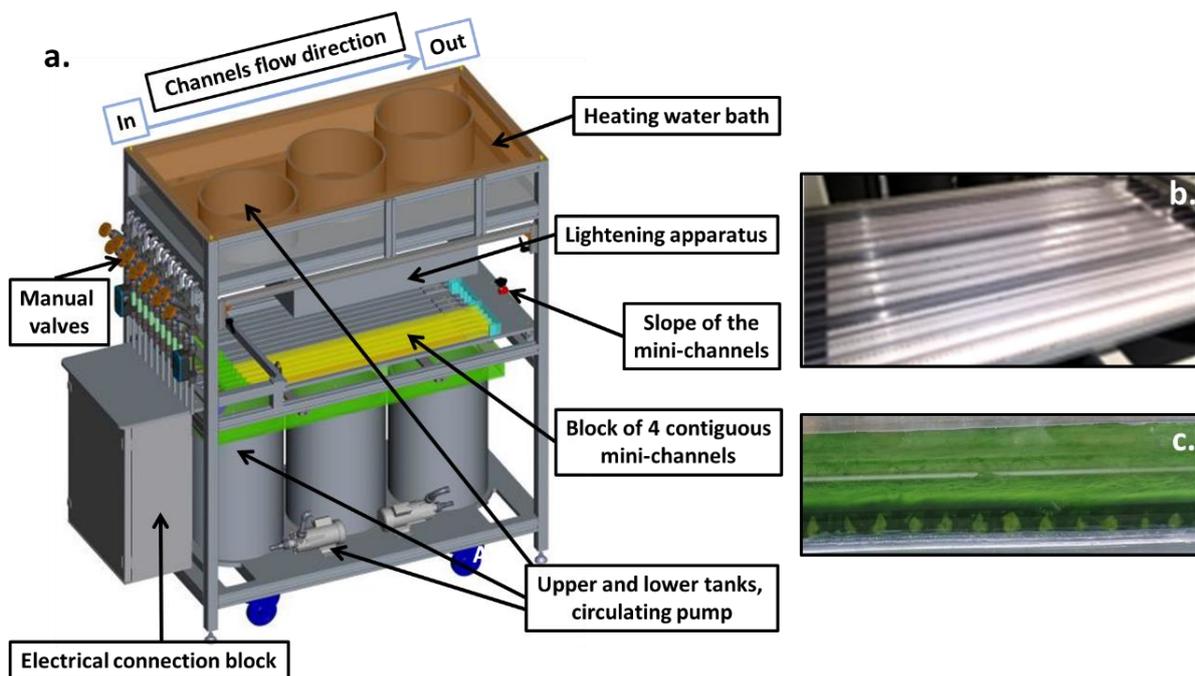


Figure A.1 Schematic 3D representation of one module of twelve hydraulic mini-channels (a), Photographs (b) of one plate with the twelve mini-channels and their virgin coupons and (c) a block of four mini-channels with coupons colonized by the green alga *U. confervicolum*.

Supplement B: Characterization of the flow in mini-channels

One of the most important factors affecting the biofilm structure and behavior is the velocity field of the fluid in the vicinity of the microbial layer. Hydrodynamic conditions will determine the rate of transport of cells and nutrients to the surface, as well as the magnitude of shear forces acting on the developing biofilm (Stoodley *et al.*, 1998). Several parameters have been investigated, such as Reynolds number, dimensionless hydraulic radius, Froude number, shear stress and friction velocity, to describe the hydrodynamic conditions of the flow in the mini-channels. Such quantities are required to determine to which extent the biofilms grown in the mini-channels undergo environmental stresses similar or not to those present in a natural stream.

B.1 Flow regime

B.1.a Reynolds number

The mini-channel device was designed to generate laminar, transitional or fully turbulent flows. The flow regime depends on the dimensionless Reynolds number (Re_D), defined as:

$$Re_D = V \cdot 2 \cdot R_h / \nu \quad (A1)$$

where V is the bulk velocity in the channel ($m \cdot s^{-1}$) calculated by $V = Q/l \cdot h$, with Q the measured flow rate ($m^3 \cdot s^{-1}$), l the width of the channel (0.03 m) and h the water level measured in the channel (m); $\nu = 1.007 \cdot 10^{-6} \cdot m^2 \cdot s^{-1}$ represents the kinematic viscosity of water at 20°C and $R_h = l \cdot h / (l + 2 \cdot h)$ is the hydraulic radius of the canal (m). The flow is considered fully turbulent for $Re_D > 2000$ (Dingman, 1984).

Figure B.1 shows the increase of the water depth with the flow rate and its decrease with the slope in the mini-channels. **Figure B.2** shows the increase of the Reynolds number with the flow rate and the slope in the mini-channels. Fully turbulent flow regimes ($Re_D > 2000$) are obtained at a flow rate superior to 150 L h⁻¹ and a slope superior to 0.6%.

4. REPOSE PHYSIOLOGIQUE A UNE EXPOSITION METALLIQUE (CU ET ZN)

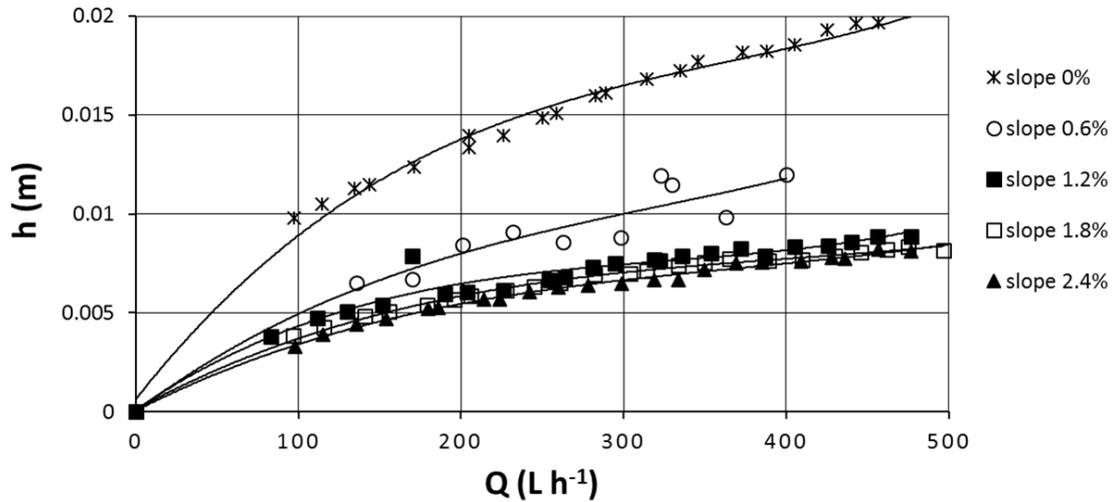


Figure B.1 Evolution of the water depth (h , in mm) as a function of flow rate (Q , in $L h^{-1}$) in the mini-channels for different slopes (%).

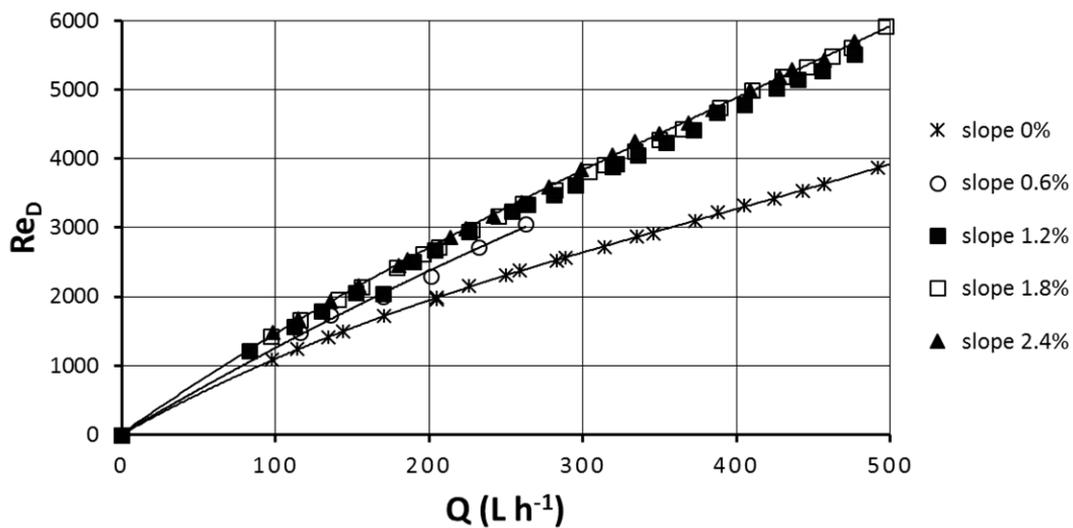


Figure B.2 Evolution of the dimensionless Reynolds number (Re_D) as a function of flow rate (Q , in $L h^{-1}$) in the mini-channels for different slopes (%).

B.1.b Froude number

The dimensionless Froude number (Fr) is used to study the behavior of a fluid during a change of pipe configuration. It also controls how the free surface will adapt to bottom topography. It must be checked regularly even if it does not play a fundamental role on friction and turbulence. Fr is defined by the following formula:

$$Fr = V/(g \cdot h)^{1/2} \quad (B2)$$

4. REPOSE PHYSIOLOGIQUE A UNE EXPOSITION METALLIQUE (CU ET ZN)

where g is the acceleration due to gravity ($g = 9.81 \text{ m s}^{-2}$). The flow is considered fully supercritical (torrential behavior) for $Fr > 1$ (Dingman, 1984).

Figure B.3 shows the increase of the Froude number with the flow rate and the slope in the mini-channels. A supercritical flow ($Fr > 1$) is obtained at a flow rate superior to 100 L h^{-1} and a slope superior to 0.6%.

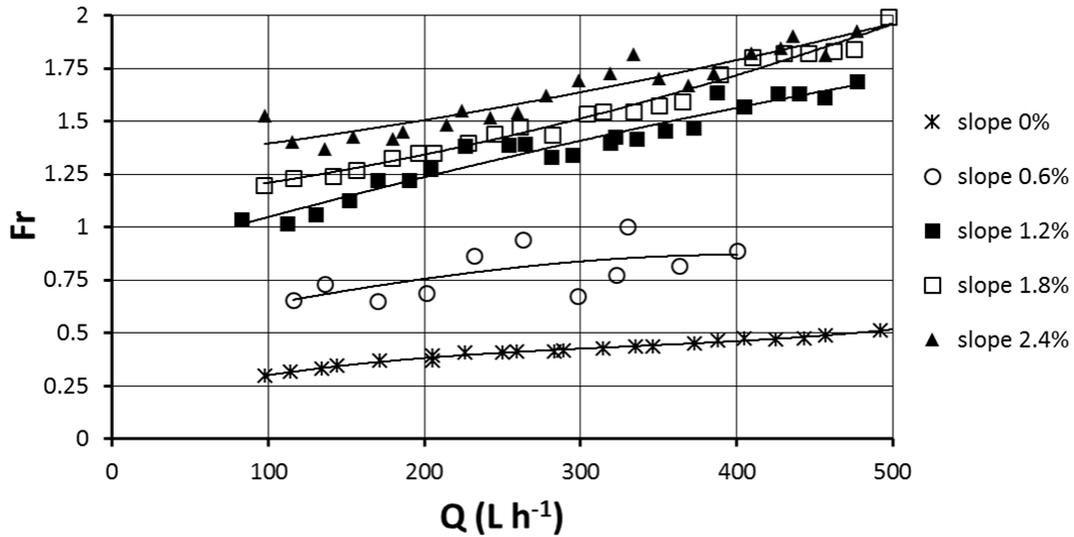


Figure B.3 Evolution of the dimensionless Froude number (Fr) as a function of flow rate (Q , in L h^{-1}) in the mini-channels for different slopes (%).

B.1.c Shear stress

Shear stress is considered as the most relevant quantity for the development of the biofilm, due to its effect on biofilm thickness, structure, density and surface roughness during biofilm formation (Graba *et al.*, 2013). The formula below allows us to know the amount of shear stress that biofilm surface is facing:

$$\tau = \rho \cdot (u^*)^2 \quad (\text{B3})$$

where ρ is the density and u^* is the friction velocity (m s^{-1}), defined as $u^* = (R_h \cdot S \cdot g)^{1/2}$, with S the slope of the channel (%) and R_h the hydraulic radius. This definition relies on the assumption of uniform flow conditions and corresponds to a balance between the gravity-generated driving force along the channel and the friction along the walls. The friction velocity u^* also scales the turbulence intensity near the surface of the microbial layer.

Figures B.4 and **B.5** show the evolution of the both shear stress and the friction velocity, also known as shear stress velocity, with respect to the increase of the flow rate at different slopes.

4. REPOSE PHYSIOLOGIQUE A UNE EXPOSITION METALLIQUE (CU ET ZN)

The shear stress (τ) showed an increase with the increase of both the flow rate and slope, with values between 0.4 and 1.2 Pa for slopes superior to 0.6%. For the same conditions, the friction velocity (u^*) increased with the increase of both the flow rate and slope, reaching values as between 0.018 and 0.034 m s^{-1} , which correspond to values of the friction velocity measured by Graba *et al.* (2013) in natural watercourses.

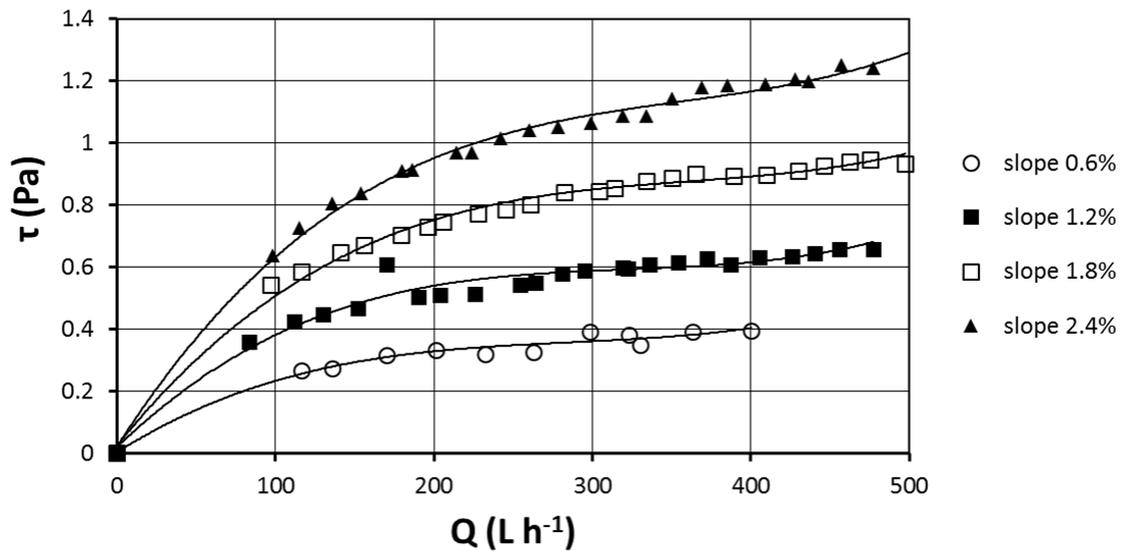


Figure B.4 Evolution of the shear stress (τ , in Pa) as a function of flow rate (Q , in L h^{-1}) in the mini-channels for different slopes (%).

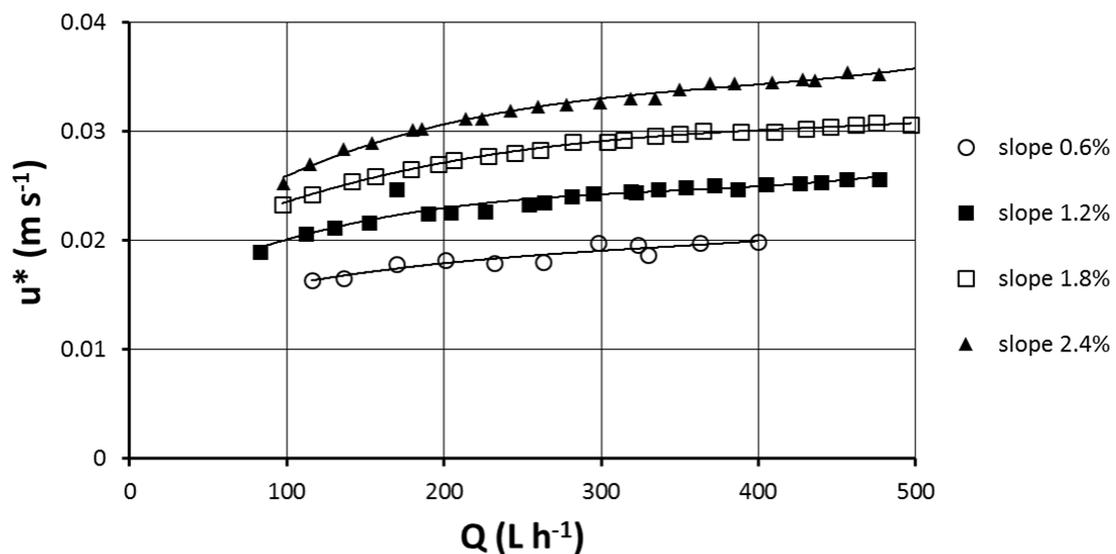


Figure B.5 Evolution of the friction velocity (u^* , in m s^{-1}) as a function of flow rate (Q , in L h^{-1}) in the mini-channels for different slopes (%).

B.1.d Dimensionless hydraulic radius

In addition to Reynolds number, a dimensionless hydraulic radius (R_{h+}) was defined to determine if the turbulent boundary layer was equivalent to that present in natural watercourses. R_{h+} is defined by the formula (Julien, 2002):

$$R_{h+} = R_h \cdot u^* / \nu \quad (B4)$$

The turbulent boundary layer in the channel is considered to be equivalent to that of rivers when $R_{h+} > 100$, which corresponds to flow conditions where the turbulent boundary layer has enough space to develop all its classical sublayers, i.e. the viscous, the buffer and the inertial sublayers.

Figure B.6 shows the increase of the dimensionless hydraulic radius with the flow rate and the slope in the mini-channels. The condition $R_{h+} > 100$, indicating the presence of a completely developed turbulent boundary layer in the mini-channels, is obtained at a flow rate superior to 200 L h⁻¹ and a slope superior to 0.6%. For our experiments of biofilm growth, the conditions chosen are a flow rate of 300 L h⁻¹ and a slope of 1.2%.

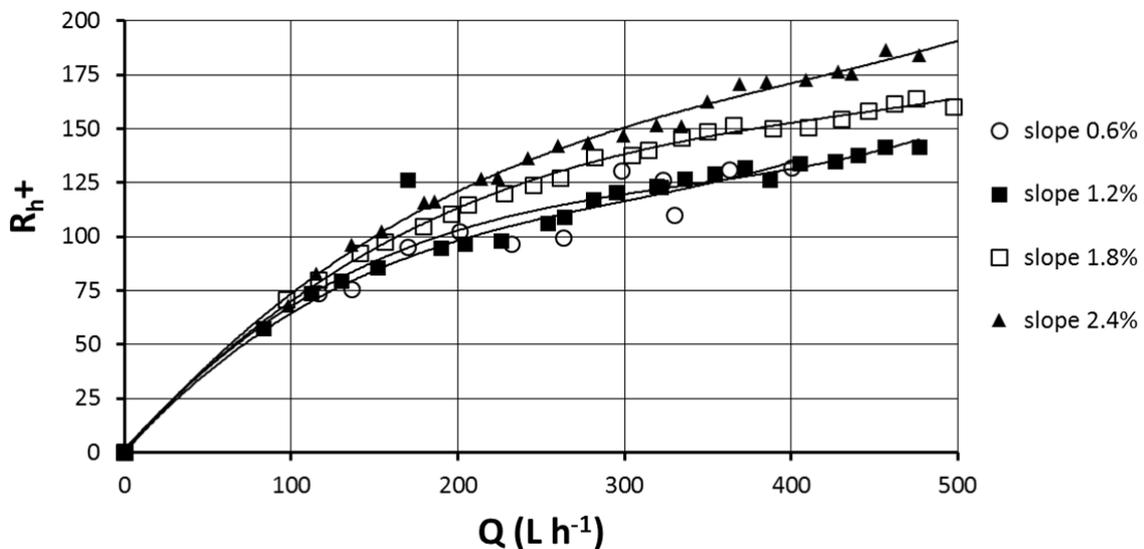


Figure B.6 Evolution of the dimensionless hydraulic radius (R_{h+}) as a function of flow rate (Q , in L h⁻¹) in the mini-channels for different slopes (%).

B.1.e Surface roughness

The roughness (ϵ , in m) in the bottom of the mini-channels (at the surface of the coupons) characterizes the type of hydraulic flow, as smooth with low ϵ values, or rough for higher values. This roughness is quantified by the standard deviation of the mean thickness of the

4. REPONSE PHYSIOLOGIQUE A UNE EXPOSITION METALLIQUE (CU ET ZN)

coupons. For 80 coupons randomly chosen, the mean thickness is 8.315 ± 0.095 mm, giving $\varepsilon = 0.95 \cdot 10^{-4}$ m.

The hypothesis of a hydraulically smooth turbulent flow regimes requires that $\varepsilon < 10 \cdot \nu / u^*$. In other terms, we expect an hydraulically smooth turbulent flow regime as long as the surface roughness remains smaller than the viscous sublayer thickness which is given by $10 \cdot \nu / u^*$. For the highest measured velocity friction (0.034 m s^{-1} at a flow rate of 490 L h^{-1} and a slope of 2.4%), the term $10 \cdot \nu / u^*$ reaches its lower value, equal to $2.96 \cdot 10^{-4}$ m, still 5 times larger than the surface roughness $\varepsilon = 0.95 \cdot 10^{-4}$ m. Therefore, we can conclude that all the turbulent flows in the channel are initially in the smooth turbulent flow regime.

B.2 Operating conditions for a fully turbulent flow

The previous investigations converge to the choice of a flow rate of 300 L h^{-1} , obtained with the combination of the manual valve and a slope of 1.2%, to generate a turbulent flow in the mini-channels. For low slopes (0% and 0.6%), subcritical flows are obtained, with Froude numbers below unity, for which downstream flow conditions would control the backwater curves along the mini-channels (**Figure B.3**). For slopes equal to 1.2% and above, supercritical flow conditions are generated, with Froude number above unity, for which the free surface profiles are controlled by entrance conditions and are then less sensitive to the bed evolution (biofilm growth) during the experiments. Moreover, water depths for slopes equal to 1.2% and above remain small compared with the mini-channel width, below 8 mm in the range of flow rate available (0 to 500 L h^{-1}) (**Figure B.1**). With a slope of 1.2% and a flow rate of 300 L h^{-1} , water depth h is equal to 7.5 mm, a quarter of the mini-channel width l . Such a low aspect ratio of h/l limits the formation of secondary currents in the cross-section, insuring homogeneous flow conditions for the coupons placed at the bottom of the mini-channels. The channel Reynolds number is around 4000, twice the value of 2000 usually proposed as a lower limit for turbulent flows (**Figure B.2**). More precisely, the dimensionless hydraulic radius R_{h+} is around 120, so that the turbulent boundary layer is fully developed, with a structure (viscous, buffer, inertial and external layers) and turbulence properties similar to those of large-scale river flows (**Figure B.6**). Finally, the friction velocity u^* , which is related to the drag that the flow exerts on the bed, is around 2.5 cm s^{-1} for a slope of 1.2% and a flow rate of 300 L h^{-1} (slopes of 1.8% and 2.4% yielded significantly larger values of the friction velocity) (**Figure B.5**). The main motivation for choosing a value of 2.5 cm s^{-1} was first, that it is typical of low flow conditions found for biofilm growing *in situ* near river sides, and second, that it is right in the middle of

4. REPOSE PHYSIOLOGIQUE A UNE EXPOSITION METALLIQUE (CU ET ZN)

the ranges used in previous studies on biofilm growth in larger flumes. For instance, for the Garonne river, with a slope of 0.1%, flow depths of around 10 cm are commonly observed for phototrophic biofilm colonization areas during low flow conditions. It corresponds to a value of the friction velocity around 3.1 cm s^{-1} , estimated using a uniform flow hypothesis leading to $u^* = (h \cdot g \cdot S)^{1/2}$. In larger flume experiments of biofilm growth, this value of 2.5 cm s^{-1} was already chosen as a reference for the same reasons (Boulêtreau *et al.*, 2010; Graba *et al.*, 2010; Graba *et al.*, 2013; Labiod *et al.*, 2007). This choice of 2.5 cm s^{-1} for the mini-channel experimental set-up allows then easier comparisons with both studies in larger flumes and *in situ* investigations.

Supplement C: Characterization of the mixing in mini-channels

Mini-channels are operating with a circulating water in a closed circuit. The degree of homogenization of the compounds solubilized in the water can be evaluated by the mixing time, defined as the time needed to reach a concentration of equilibrium after the addition of a compound. The mixing time was experimentally evaluated using the method of pulse tracer with salt (addition of 100 mL of water containing 4.5 g of NaCl and continuous measurement of the conductivity with a specific conductivity meter (model 524)). The experiment was performed for four different flow rates and one adjusted slope (150, 250, 350 and 450 L h⁻¹, and a slope of 1.2%, according to previous hydrodynamic study presented in A.1) for a block of four contiguous mini-channels using the same circulating loop. We choose to define the mixing time as T₉₀, the time needed to reach 90% of the final conductivity after the pulse of salt in the loop.

Figure C.1 shows the evolution of the mixing time T₉₀ as a function of the tested flow rates, which consists to a gradually decrease of the mixing time with the increase of the flow rate. The mixing time, with a few dozen of seconds, is largely lower than the duration of incubation for growing phototrophic biofilm (several weeks). For the conditions of the experimentations realized with a flow rate of 300 L h⁻¹ and a slope of 1.2%, T₉₀ is equal to 48 seconds.

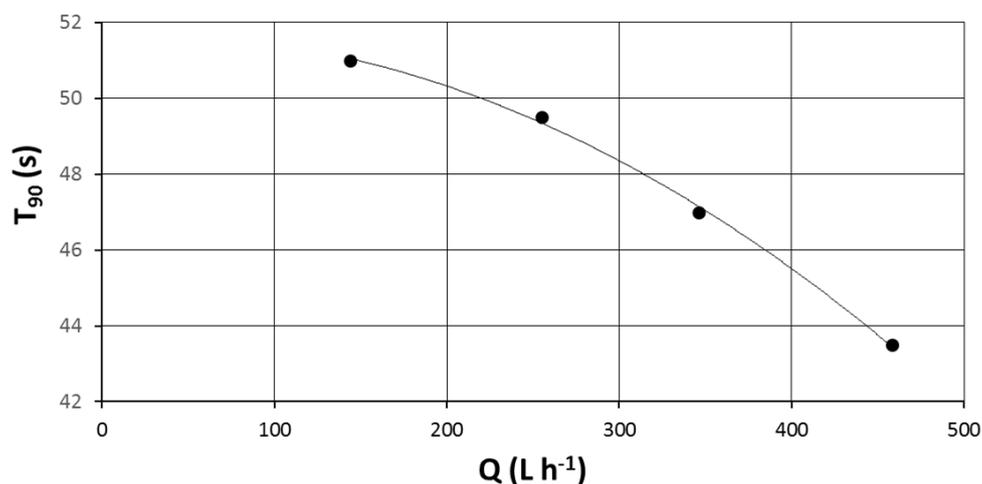


Figure C.1 Evolution of the mixing time (T₉₀, in s) as a function of flow rate (Q, in L.h⁻¹) in the mini-channels.

REFERENCES

- Boulêtreau, S., Sellali, M., Elozegi, A., Nicaise, Y., Bercovitz, Y., Moulin, F., *et al.* (2010) Temporal dynamics of river biofilm in constant flows: a case study in a riverside laboratory flume. *Int. Rev. Hydrobiol.* **95**: 156–170.
- Dingman, S.L. (1984) Fluvial hydrology. Freeman and Company, New York, USA.
- Graba, M., Moulin, F.Y., Boulêtreau, S., Garabétian, F., Kettab, A., Eiff, O., *et al.* (2010) Effect of near-bed turbulence on chronic detachment of epilithic biofilm: Experimental and modeling approaches. *Water Resour. Res.* **46**: W11531: 1-15.
- Graba, M., Sauvage, S., Moulin, F.Y., Urrea, G., Sabater, S., and Sanchez-Pérez, J.M. (2013) Interaction between local hydrodynamics and algal community in epilithic biofilm. *Water Res.* **47**: 2153–2163.
- Julien, P.Y. (2002) River mechanics Cambridge University Press, 434 p..
- Labioud, C., Godillot, R., and Caussade, B. (2007) The relationship between stream periphyton dynamics and near-bed turbulence in rough open-channel flow. *Ecol. Model.* **209**: 78–96.
- Stoodley, P., Dodds, I., Boyle, J.D., and Lappin-Scott, H.M. (1998) Influence of hydrodynamics and nutrients on biofilm structure. *J. Appl. Microbiol.* **85**: 19S–28S.

CHAPITRE V

EFFETS DE FACTEURS

ENVIRONNEMENTAUX SUR LA

REPONSE PHYSIOLOGIQUE DE

BIOFILMS PHOTOTROPHES MONO-

ESPECE

– CONSEQUENCES SUR LEUR

CAPACITE DE SORPTION DU CU

5. MODULATION DE LA CAPACITE DE SORPTION DU CU

Dans un contexte de changements globaux, les facteurs environnementaux subissent des modifications importantes, en grande partie à cause de pressions anthropiques croissantes. Les biofilms phototrophes subissent des stress engendrés par une modification de ces facteurs environnementaux. Il est donc intéressant de se questionner sur la façon dont les microorganismes phototrophes présents au sein de ces biofilms (diatomées, algue vertes et cyanobactéries) vont se comporter en réponse à ces contraintes environnementales en pleine évolution.

Les communautés présentes au sein d'un biofilm phototrophe sont particulièrement sensibles aux variations de luminosité, de température et aux quantités de nutriments disponibles dans la colonne d'eau (Bengtsson *et al.*, 2018 ; Lear *et al.*, 2008). Par exemple, une augmentation de la température des cours d'eau favorise la croissance algale et induit une augmentation de l'activité photosynthétique et des activités enzymatiques au sein du biofilm phototrophe (Necchi, 2004; Staehr and Sand-Jensen, 2006). En revanche, la température permettant une activité photosynthétique maximale est spécifique à chaque espèce phototrophe (DeNicola, 1996). De ce fait, une modification de la température des cours d'eau pourrait engendrer un changement dans la composition des communautés microbiennes au sein d'un biofilm phototrophe sans pour autant modifier l'activité microbienne du fait de leur redondance fonctionnelle.

Peu d'études concernent les effets croisés de facteurs environnementaux sur la réponse des communautés aquatiques. Par exemple, la conséquence sur la production des EPS par des cellules phototrophes ayant subi une modification croisée de plusieurs facteurs reste encore largement méconnue. A ce jour, seuls Di Pippo *et al.* (2012) ont étudié les effets combinés de l'intensité lumineuse et de la température sur l'activité photosynthétique, la production des EPS et l'abondance de la cyanobactérie *Synechocystis sp.* et de l'algue verte *Chorococcum sp.* Ainsi, cette étude montre que face à un multi-stress environnemental, la réponse microbienne peut varier et se traduire par une modulation de la nature et de la quantité des EPS sécrétées. Cependant, Di Pippo *et al.* (2012) ne se sont intéressés qu'à la modification de la fraction polysaccharidique des EPS en réponse à une hausse de la lumière ou de la température sans analyser la fraction protéique. De plus, les diatomées qui jouent un rôle fondamental dans la structure et le fonctionnement de la plupart des biofilms phototrophes dont elles sont généralement le groupe algal dominant (Stevenson *et al.*, 1996), ne sont pas abordées dans cette étude. Il est de ce fait nécessaire de compléter ces données afin de mieux comprendre les

5. MODULATION DE LA CAPACITE DE SORPTION DU CU

mécanismes mis en jeu par chacun des groupes algaux composant un biofilm phototrophe en réponse à un stress induit par la variation des conditions environnementales telles que la température, la luminosité ou la disponibilité en nutriments.

Au cours de cette expérimentation qui avait pour premier objectif de montrer l'impact des facteurs environnementaux sur la production d'EPS et les activités fonctionnelles des biofilms, nous avons émis l'hypothèse que l'application d'un tel stress pouvait potentiellement impacter les propriétés du biofilm telles que la capacité de sorption d'éléments traces métalliques. En effet, de par leur composition (groupe carboxyle, phosphore, amine ou hydroxyle), les EPS présentes dans la matrice de biofilms phototrophes sont capables de séquestrer une quantité importante de métaux lourds (Wei *et al.*, 2016; Yin *et al.*, 2011). Les polymères de la matrice extracellulaire peuvent donc être en partie responsables du rôle écologique majeur joué par les biofilms phototrophes au sein d'un écosystème aquatique en raison de leur forte capacité de sorption d'éléments nutritifs et de polluants organiques et inorganiques. De plus, cette capacité de sorption pourrait être modulée par les conditions environnementales comme suggéré par Magaletti *et al.* (2004) qui ont observé une augmentation de la quantité des EPS ainsi qu'une modification de la nature des polysaccharides sécrétés par la diatomée *C. fusiformis* lorsque le milieu est carencé en P ou en N.

Un premier objectif de l'étude réalisée dans ce chapitre a donc été de déterminer l'importance des facteurs environnementaux dans la structure (composition des EPS produites) et les fonctions de biofilms phototrophes simplifiés. Pour cela, en utilisant comme modèle des biofilms mono-espèce, nous avons choisi d'analyser les effets d'une variation de la température, de la luminosité ou de la quantité en P disponible sur la biomasse algale et l'activité photosynthétique. En effet, la quantité d'éléments nutritifs disponibles dans la colonne d'eau représente un facteur pouvant limiter la croissance des organismes phototrophes (Christoffersen *et al.*, 2006; Staehr and Sand-Jensen, 2006). Leflaive *et al.* (2015) ont ainsi pu observer une modification dans la composition des communautés au sein d'un biofilm phototrophe avec une variation de la concentration en P dans le milieu.

Pour répondre à cet objectif, les biofilms ont été soumis, pendant 14 jours, à 2 niveaux thermiques (19 et 22°C) appliqués conjointement à 2 intensités lumineuses (30 et 70 $\mu\text{mol s}^{-1} \text{m}^{-2}$). L'écart de température de 3°C est en accord avec les prédictions des scientifiques en conséquence du changement climatique global (IPCC, 2007). Les modules utilisés au cours de

5. MODULATION DE LA CAPACITE DE SORPTION DU CU

l'expérimentation ne possédant pas de système de refroidissement, la régulation de l'eau qui circule au sein du système a été réalisée uniquement par l'intermédiaire d'un bain marie et de l'air ambiant climatisé. De ce fait, nous avons été contraints de définir la température basse à 19°C. Les conditions d'éclairage ont été définies en fonction des conditions de pré-culture afin de ne pas créer un écart trop important entre ces valeurs et celles appliquées au cours de cette expérimentation. En parallèle, trois concentrations en P sont testées en modifiant les concentrations du milieu de culture (2,61, 5,23 et 8,71 mg L⁻¹).

Le second objectif de cette étude a été d'analyser la capacité de sorption du Cu par les biofilms mono-espèce soumis à différentes contraintes environnementales (luminosité, température, P). Pour cela, après une période de croissance de 14 jours avec un jeu de différentes valeurs de température, d'intensité lumineuse et de concentration en P, le milieu circulant a été dopé pendant 4 jours avec une solution de Cu (50 µg L⁻¹) proche des valeurs environnementales retrouvées dans un cours d'eau pollués (Montuelle *et al.*, 2010). Cette concentration de 50 µg. L⁻¹ en Cu a été choisie car au cours du **chapitre IV**, une exposition de la cyanobactérie *P. autumnale* ou de l'algue verte *U. confervicolum* à une concentration en Cu égale à 20 µg L⁻¹ n'a pas impacté la biomasse après 2 semaines d'exposition alors qu'une légère diminution a pu être observée pour la diatomée *N. palea*. Toutefois, à cette concentration de 50 µg. L⁻¹, Anu *et al.* (2016) n'ont observé aucun impact sur le taux de croissance de la diatomée *C. calcitrans*. Enfin, l'exposition au Cu a induit une plus forte variation dans la quantité de protéines et de polysaccharides extraites que le Zn.

La sorption du Cu par les biofilms phototrophes a donc été évaluée après 18 jours de croissance des biofilms par mesure des concentrations en Cu dans la biomasse algale après minéralisation du biofilm et analyse par spectrométrie d'émission optique couplé à plasma inductif (ICP-OES).

Malgré le faible écart entre les conditions environnementales testées, les résultats obtenus ont montré que la température, la luminosité et la concentration en P disponible dans le milieu sont autant de facteurs qui influencent les fonctions des trois biofilms mono-espèce. En effet, nous avons mis en évidence une modification de la biomasse, de l'activité photosynthétique et des EPS extraites (nature et quantité) pour les trois espèces phototrophes pour les différentes conditions de croissance.

L'activité photosynthétique de la diatomée est modulée en fonction des différentes conditions d'exposition lumineuses ou thermiques. En effet, l'activité photosynthétique de *N. palea* est

5. MODULATION DE LA CAPACITE DE SORPTION DU CU

plus importante lorsque l'intensité lumineuse est faible. De plus, une augmentation de la température de 3°C provoque une augmentation de l'activité photosynthétique de 15 %. Au contraire, les activités photosynthétiques de la cyanobactérie et de l'algue verte, qui sont deux espèces phototrophes filamenteuses, ne sont pas impactées par une modification de la température ou de la luminosité. Les concentrations en P permettant le rendement photosynthétique maximal sont spécifiques à chaque espèce, sans lien avec la croissance algale : de fortes concentrations en P (5,23 et 8,71 mg L⁻¹) sont favorables à *U. confervicolum* alors que la plus faible concentration testée (2,61 mg L⁻¹) est bénéfique pour *N. palea*. Indépendamment des conditions environnementales, la quantité d'EPS extraites est fonction de l'activité photosynthétique du phototrophe avec une corrélation positive entre ces deux fonctions métaboliques pour la cyanobactérie et l'algue verte mais négative pour la diatomée. L'étude de l'influence des facteurs environnementaux sur la quantité d'EPS révèle un effet combiné de la température et de la luminosité pour *P. autumnale* et *U. confervicolum*. En effet, les effets d'une modification de la température sont dépendants de la luminosité et *vice versa*. Par exemple, à 19°C une diminution de la luminosité (de 70 à 30 $\mu\text{mol s}^{-1} \text{m}^{-2}$) se traduit par une augmentation de 32 % du COT (Carbone Organique Total) mesuré dans les extraits d'*U. confervicolum* alors qu'aucune différence significative n'est observée à 22°C.

Les EPS contenues dans la matrice des biofilms mono-espèce ont une influence significative sur la capacité de sorption de Cu. En effet, en modifiant la biomasse du biofilm ou la quantité de polymères au sein de la matrice, ce qui a pour conséquence de moduler la cohésion entre les cellules et la densité de la matrice, les facteurs environnementaux (température, luminosité et concentration en P) modifient indirectement l'accessibilité des sites de fixation anioniques. En revanche, une modification de la nature des EPS (protéiques ou polysaccharidiques) n'influence pas significativement la capacité de sorption du Cu.

Cette étude a permis de caractériser des croissances différentes des biofilms en fonction de la composition microbienne et des conditions environnementales, ce qui suggère qu'une faible modification des facteurs environnementaux peut modifier la composition d'un biofilm phototrophe et de ce fait avoir un impact sur les processus d'autoépuration (séquestration d'ETM) et donc la qualité chimique des cours d'eau.

**EFFECT OF ENVIRONMENTAL FACTORS ON THE
PHOTOTROPHIC BIOFILMS PHYSIOLOGY:
CONSEQUENCES ON THE INTERACTION WITH CU**

Emilie Loustau^{a,b}, Joséphine Leflaive^a, Claire Boscus^a, Quentin Amalric^a, Elisabeth Girbal-Neuhauser^b, Jean-Luc Rols^a

^a EcoLab, Université de Toulouse, CNRS, INPT, UPS, Toulouse, France

^b LBAE, Université de Toulouse, UPS, Auch, France

* Corresponding author: jean-luc.rols@univ-tlse3.fr

Article en préparation

Abstract

Phototrophic biofilms seem to be suitable candidates for the sorption of trace metallic elements because they influence the metal fate and future in surface waters. However, the structure community and their functions are largely dependent of the environmental factors. We produced mono-species biofilms by using one diatom (*Nitzschia palea*), one green alga (*Uronema confervicolum*) or one cyanobacterium (*Phormidium autumnale*), in order to determine the combined effects of light intensity, temperature and phosphorus concentration on the biofilm physiology (growth and function) and their consequences on the sorption ability toward copper. The three environmental factors are more or less favourable for the growth or the photosynthetic efficiency function of the phototrophic species composing the biofilms. In addition, differences in culture conditions induced modification in the quantity and the quality of extracellular polymeric substances (EPS) extracted and influenced the concentration of Cu sorbed by the biofilm. While the biofilm sorption ability was correlated with the dry weight biomass and the quantity of EPS extracted, it was surprisingly not affected by the nature of polymers (polysaccharides and proteins) composing the EPS matrix. These results seem to suggest significant changes in the phototrophic biofilm sorption capacity and hence a modification in heavy metal concentration in lotic ecosystem exacerbated by the climatic changes due to global warming and the increase of anthropogenic activities.

Keywords

Climate change, resistance, photosynthetic efficiency, EPS production, Cu sorption

INTRODUCTION

Metallic pollution in lotic environment attracted increasing attention from scientists. A great numbers of anthropic activities such as agricultural practices, industries and wastes discharges (mining, sewage, industry, fuel and energy production, *etc.*) are responsible for the release of heavy metal in river ecosystems (Sud *et al.*, 2008), copper being one of the most commonly detected contaminants. Benthic phototrophic microorganisms are sensitive to metal pollution, and chronic exposure to Cu may influence the community (biomass, composition and structure) and function (photosynthetic efficiency, extracellular polymeric substances (EPS) production and antioxidant enzymatic activities) (Serra and Guasch, 2009). However, toxicity effects induced by Cu depend on the microbial species tested, the environmental factors (light intensity, temperature and media used) and the exposure time (Manimaran *et al.*, 2012).

Phototrophic biofilms, which occur naturally on the surfaces of almost all immersed solid substrates in lotic ecosystems, contain different types of microorganisms (autotrophic and heterotrophic) enclosed in an EPS matrix. EPS are composed of polysaccharides (PS), proteins (PN), nucleic acids, lipids and glycoproteins and represent a complex high-molecular-weight mixture of polymers surrounding microbial cells. They are heterogeneous solid materials containing major sites for the uptake and the storage of organic and inorganic trace pollutants (Flemming *et al.*, 2016; Hou *et al.*, 2016). Since there are many functional groups on the EPS surface such as carboxyl, phosphoric, amine and hydroxyl groups, EPS are considered as one of effective components for the sorption of heavy metal (Wei *et al.*, 2016; Yin *et al.*, 2011). Therefore, heavy metal can thus be trapped in the network of EPS matrix to form a metal-EPS complex. Microbial cells provide also a surface area with an overall anionic charge ideal for binding metals (Douglas and Beveridge, 1998). Studying and understanding the biofilm sorption capacity of metal contaminants and the EPS implication is of great importance from an environmental viewpoint. Indeed, sorption is regarded as one of the most cost-effective methods for removal or recovery heavy metals from water (Demirbas, 2008).

Light intensity, temperature and nutrients are three of the most important relevant environmental factors affecting biofilm community (Bengtsson *et al.*, 2018; Lear *et al.*, 2008). An increase of water temperature has been reported to increase the growth, the photosynthetic efficiency, the respiration and the enzymatic activities of phototrophic biofilm (Necchi, 2004;

Staehr and Sand-Jensen, 2006). However, the optimum temperatures for the photosynthetic activity vary among phototrophic species (DeNicola, 1996), so water temperature could induce a shift on microbial community composition and not necessarily an increase on microbial activity. Villanueva *et al.* (2011) evaluated the effects of increasing water temperature from 11.1 to 13.2 °C and from 14.7 to 16 °C and variations of P concentrations (0.054 and 0.54 mg P L⁻¹) on biofilm formation. The results showed that the biofilm growth at the higher temperature was faster, while the biomass of mature biofilm was mainly determined by nutrient availability. Nutrient concentration in river circulating water may be a limiting factor for the microorganism phototrophic growth (Christoffersen *et al.*, 2006; Staehr and Sand-Jensen, 2006). P concentration also led to a significant shift in biofilm community composition, these changes being more pronounced in diatom than in cyanobacteria dominated biofilm (Leflaive *et al.*, 2015). In addition, Magaletti *et al.* (2004) have reported an increase of EPS and modification of polysaccharides released by the diatom *Cylindrotheca fusiformis* subjected to P or N deficiency; it could be considered as a metabolic response to an unbalanced N/P ratio in the medium. Light is the primary resource of streams, necessary and indispensable for the photosynthetic activity by algae and cyanobacteria and therefore lays the basis of the carbon and nutrient cycles in streams. Hence, alterations in light or nutrient resources affect C/P ratios of phototrophic biofilm with consequences for higher trophic levels ecosystem function (Fanta *et al.*, 2010; Hill *et al.*, 2011). However, the microbial community composing phototrophic biofilm is fast growing with a short generation time and a good responsiveness to modification of environmental conditions (Romaní, 2009); they represent a good indicator of disturbance in rivers ecosystems.

The aim of this study was to evaluate the effects of a modification in temperature, light intensity or P available in water circulating on phototrophic biofilm in the context of a warming change. The study considered the prediction of increases of 2 – 4 °C in mean river water temperature (IPCC 2007). The effects of temperature on biofilm physiology were evaluated in relation to light intensity to determine the interactive effects of temperature with available light intensity. Understanding how light modulates the physiology of phototrophic biofilms is fundamental because the global climate change and the anthropic activities alter the light intensity available for the biofilm by increased light with deforestation or decreased light and increased heavy metal concentration with soil erosion in lotic ecosystem (Lenoir *et al.*, 2008). Additionally, we study the consequence of a modification in biofilm physiology on their capacity to sorb heavy

metals. Cu was selected as a target heavy metal to evaluate its sorption ability. To our knowledge, the way that environmental factors could interact with biofilms Cu sorption is not documented. At sub-lethal concentrations as $50 \mu\text{g L}^{-1}$, copper caused a non-significant effect in growth rate and chlorophyll concentration for a green alga and a cyanobacterium species whereas a decrease of a diatom species biomass was observed (Anu *et al.*, 2016; Loustau *et al.*, 2019 (submitted)). We hypothesized that i) environmental factors tested change the quantity and the nature of EPS secreted by the phototrophic biofilms and these modifications depend on the phototrophic species, and ii) differences in the species responses of biofilm would lead to divergences in their response to Cu sorption. For this, an experiment with artificial streams was performed with three phototrophic microorganisms representing the diversity of natural biofilms: the cyanobacterium *Phormidium autumnale*, the diatom *Nitzschia palea* and the green alga *Uronema confervicolum*. Dry weigh (DW) biomass, photosynthetic efficiency and EPS production have been monitored after two weeks of biofilm growth, then after four days to Cu exposure at $50 \mu\text{g L}^{-1}$ to evaluate the impact of environmental factors on the Cu sorption by measuring the Cu content of the phototrophic biofilms.

MATERIAL AND METHODS

In this article, we consider algae as photosynthetic microorganisms including cyanobacteria that fulfill the same functions in biofilms than eukaryotic algae.

Biofilm establishment

The three benthic phototrophic microorganisms used in this study, the cyanobacterium *P. autumnale*, the diatom *N. palea* and the green alga *U. confervicolum* were isolated from phototrophic biofilms in the rivers Tarn and Garonne (Southwestern France) in non-axenic conditions. Individual pre-cultures of the three species were grown in 500 mL Erlenmeyer flasks with adapted nutrient media (BG11 medium (Stanier *et al.*, 1971) for *P. autumnale*, Combo medium (Kilham *et al.*, 1998) for *N. palea* and *U. confervicolum*) during a period of 21 days. Erlenmeyers incubation was carried out in a controlled chamber at $18 \text{ }^\circ\text{C}$ under white light of $30 \pm 5 \mu\text{mol s}^{-1} \text{ m}^{-2}$ with light / dark periods of 16 h / 8 h.

Before inoculation in the hydraulic mini-channels, the algal biomass was homogenized by using an Ultra-Turrax disperser (T25, Janke-Kunkel, 13,500 rpm, 1 min) and subdivided in equal inocula.

Experimental procedure

Benthic phototrophic microorganisms grown in devices composed of several hydraulic mini-channels (length 1.25 m, width 0.03 m and height 0.05 m) made in Poly(methyl methacrylate) (PMMA) (see Loustau, *et al.* (2019) (submitted) for more information on the set up). Each mini-channel or microcosm was considered as replicate, and for each treatment, three replicates were established. Eighty artificial substrates for biofilm growth (coupons made of Polyoxymethylene (POM-C), density 1.4, size 29 mm x 10 mm, thickness 8.315 ± 0.095 mm) were placed in the mini-channels.

During the first 14 days of biofilm growth (**Figure 1**), four different conditions were tested: high light intensity and high temperature (*LT*), low light intensity and high temperature (*lT*), high light intensity and low temperature (*Lt*), low light intensity and low temperature (*lt*). For the high and low temperature treatments, the circulating water in the microcosms was set at 22 and 19 °C, respectively; the high and low luminosities were set at 70 and 30 $\mu\text{mol s}^{-1} \text{m}^{-2}$, respectively, with a constant day-light cycle (16 h / 8 h). Microcosms were filled with modified BG11 for *P. autumnale* or modified Combo for *N. palea* and *U. confervicolum*: the phosphorus (P) concentration was fixed at 5.23 mg L⁻¹. Under *LT* condition, mono-species biofilms were grown at different P concentrations: 8.71 mg L⁻¹ (corresponding to 135% of the P concentration (*LT-P135*) present in medium culture), 5.23 mg L⁻¹ (corresponding to the P concentration (*LT-P100*) present in medium culture) and 2.61 mg L⁻¹ (corresponding to 50 % of the P concentration (*LT-P50*) present in medium culture). After 14 days of culture, the physiological responses of biofilms were defined by photosynthetic efficiency measurement and by determination of biomass and EPS (amount and composition). Ten coupons were collected per microcosm for the characterization of biofilm biomass and fifteen for the EPS extraction. Biofilms were scrapped from the coupons with toothbrush and suspended in 100 mL (EPS extraction) or 15 mL (biofilm biomass) of culture media before analysis.

Two weeks after the beginning of the experiment, copper (CuSO₄) was added in the circulating water to reach the final concentrations equal to 50 $\mu\text{g L}^{-1}$. After Cu exposure of four days, 10 coupons were collected per microcosm for the analysis of Cu content in the biofilm.

5. MODULATION DE LA CAPACITE DE SORPTION DU CU



Figure 1 Experimental design realised during 18 days in hydraulic mini-channels for the three mono-species phototrophic biofilms.

Biofilm biomass

A subsample of the biofilm suspension obtained as described above was used to assess biofilm biomass by measuring the dry weight after 72 h of drying at 70 °C.

PhytoPam Measurements

PhytoPam measurements were performed by measuring fluorescence response to a saturating light flash after 20 minutes of dark adaptation (dark-adapted state (DAS) conditions) (20 min of adaptation) (Baker, 2008). The physiological state of algae was estimated from the maximal efficiency of the photosystem II (yield), corresponding to the transfer rate of electrons, thanks to the formula defined by Roháček and Barták (1999):

$$\Phi_{\text{PSII}} (\text{DAS conditions}) = 1 - (F_0/F_M) ; 0 < \Phi_{\text{PSII}} < 1 \quad (1)$$

F_M represents the maximal fluorescence and F_0 corresponds to the minimal fluorescence of the photosystem II, in DAS conditions. The photosynthetic efficiency is specific to each algal group, so no comparison is permitted between the values of the different species used here.

For the experiment in microcosms, non-invasive PhytoPam measurements were performed before the addition of copper, corresponding to 14 days of growth. For each condition, thirty-two total values were performed, corresponding to the three microcosm replicates of one experimental condition.

Extracellular polymeric substances assays

1. EPS extraction

EPS were extracted from biofilms following the sequential method developed previously by Loustau *et al.* (2018). In summary, the biomass suspension was firstly homogenized by pre-treatment with an Ultra-Turrax disperser (T25, Janke-Kunkel) at 13,500 rpm for 1 min at room temperature. Two EPS extraction steps were applied in sequence with intermediate centrifugations (4,000 g for 15 min) to collect the supernatants containing the solubilized EPS. In the first step, the biomass pellet was suspended in a solution containing PBS and Formamide at 0.22% and the tube was shaken on a rotary disc shaker at 150 rpm and 4 °C for 60 min. In the second step, the biomass pellet was re-suspended with a PBS solution and a cation exchange resin (CER, Dowex Marathon) with a final dosage of 50 g g⁻¹ DW of biomass was added. The suspension was stirred for 90 min at 150 rpm and 4 °C.

The cellular integrity during the extraction steps was evaluated by the measurement of chlorophyll *a* release in the supernatants (Loustau *et al.*, 2018). It allows to estimate the percentage of cell lysis due to the extraction treatments of each biomass sample.

2. Proteins and polysaccharides quantification

For each EPS extract, protein concentration was measured by the bicinchoninic acid (BCA) method (Smith *et al.*, 1985). For 25 µL of each sample, 200 µL of BCA reagent (Sigma-Aldrich) were incubated in a 96 wells microplate (15 min at 60 °C) before measuring the optical density at 540 nm with a microplate reader (Synergy Mx Biotek). Bovine serum albumin (BSA) was used as a standard with concentrations ranging from 0 to 800 mg L⁻¹.

Polysaccharide concentration in extracted EPS were estimated using the anthrone method (Dreywood, 1946) allowing total carbohydrates to be quantified: 100 µL of each sample and 200 µL of anthrone reagent (2% anthrone in 96% sulfuric acid) were incubated in a 96 wells microplate (30 min at 60 °C), cooled at room temperature for 10 min before measuring the optical density at 620 nm with the microplate reader. Glucose was used as a standard with concentrations ranging from 0 to 100 mg L⁻¹.

3. Total organic carbon

After acidification of EPS extract with hydrochloric acid and volatilization of inorganic carbon by catalytic oxidation at 720 °C, the Total Organic Carbon (TOC) was analyzed with a Shimadzu

TOC-L analyzer. Analysis were performed by the Physico-Chemical Analyses Plateform of EcoLab (Toulouse, France).

Cu content in biofilms

The analysis of the Cu content in biofilms were made by Inductively Coupled Plasma and quantified by Optical Emission Spectrometer (ICP-OES) at EcoLab laboratory (Toulouse, France) using an Thermo Electron IRIS Intrepid II. Approximately 20 mg powdered biofilm samples were mineralized in a 1:1 mixture of 65% HNO₃ and 30% H₂O₂ at 80 °C for 6 h. The analytical performance was monitored thought reference materials (BCR[®] - 670). The reproducibility of digestion procedure was evaluated by repeated analyses by two.

Data processing

Statistical analyses were performed using the PAST software (Paleontological Statistics, version 2.17 and 3.06) (Hammer *et al.*, 2001). For all analysis, the normality was checked on each dataset (biofilm biomass, photosynthetic efficiency, EPS amount and Cu concentration in biofilm biomass) with the Shapiro-Wilk test and data were transformed if needed. When data were normally distributed, two-way ANOVAs were used to test the effects of environmental parameters on biofilm biomass, photosynthetic efficiency, EPS extracted and sorption ability followed by a Tukey post-hoc test. The non-parametric Kruskal-Wallis test was used with Mann-Whitney test for pairwise comparisons of non-parametric data. Data given in the text are means \pm standard error (SE). For all statistical analyses, significance was inferred at $p < 0.05$.

RESULTS

The effects of light intensity, temperature and P concentration on the biofilm growth and its photosynthetic efficiency

Before looking at their effects on EPS production, the impact of the three chosen factors on the biofilm growth and their photosynthetic efficiency was checked, and the potential significant effects are summarized in **Table 1**.

1. Biomass growth

After 14 days of culture, the most important biomass was observed for *P. autumnale* biofilm with values ranged between 3.04 ± 0.25 and 4.51 ± 0.17 mg DW cm⁻², followed by *U. confervicolum* with values ranged between 0.50 ± 0.06 and 2.29 ± 0.17 mg DW cm⁻² and then *N. palea* with values ranged between 0.21 ± 0.03 and 0.51 ± 0.06 mg DW cm⁻² (**Figure 2a to c**). The diatom biomass was significantly influenced by the temperature of the circulating water ($p=0.047$): a decrease by 3 °C induced a decrease of *N. palea* biomass by 38% and 58% under high and low light intensity, respectively (**Figure 2a**). High temperature created a conducive environment for *N. palea* biofilm development whereas it induced an increase by 18 and 50% of *U. confervicolum* biomass for high and low light intensity, respectively (**Figure 2b**). On the contrary, a modification by 3 °C of the water temperature had any influence on *P. autumnale* biomass growth (**Figure 2c**). The biomass of *U. confervicolum* had trebled with an increase of the light intensity at high temperature and doubled under low temperature. Similarly, a decrease of the light intensity created a significant reduction by 30% and 27% of *P. autumnale* biomass at 22 and 19 °C, respectively.

According to the species considered, the phosphorus concentration present in the modified culture medium had different effects on the phototrophic biofilm growth. Indeed, low P concentration tested (*LT-P50*) had not been conducive to the growth of *N. palea* biofilm with a decrease by a factor two of the biomass compared with the medium P concentration (*LT-P100*) (**Figure 2d**). On the contrary, the maximum *U. confervicolum* biomass was obtained when the P concentration was the lower: a significant decrease by 30% and 51% were observed when the green alga grown under *LT-P100* and *LT-P165*, respectively (**Figure 2e**). Finally, the P concentration in the circulating water had any significant influence on the *P. autumnale* biofilm growth (**Figure 2f**).

5. MODULATION DE LA CAPACITE DE SORPTION DU CU

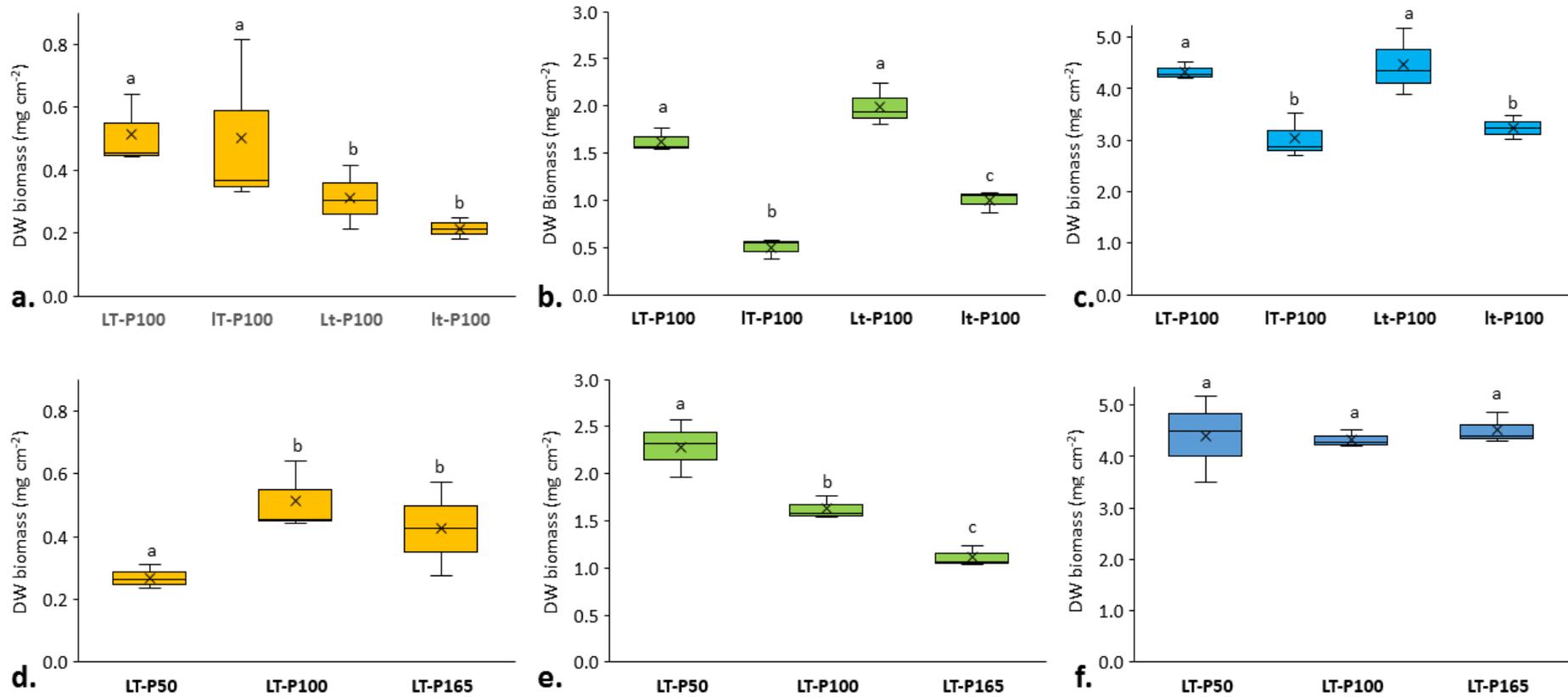


Figure 2 Effect of environmental factors on the diatom (*N. palea* in orange; a. and d.), the green alga (*U. confervicolum* in green; b. and e.) and the cyanobacterium (*P. autumnale* in blue; c. and f.) biomasses (n = 3). The biofilms were exposed during 14 days to high or low light intensity ($L = 70$ or $l = 30 \mu\text{mol s}^{-1} \text{m}^{-2}$, respectively) and high or low temperature ($T = 22$ or $t = 19 \text{ }^\circ\text{C}$, respectively) (a. to c.) or different P concentrations at LT condition ($P50 = 2.61$, $P100 = 5.23$ or $P165 = 8.71 \text{ mg L}^{-1}$) (d. to f.).

2. Photosynthetic efficiency

The optimal condition of temperature and light intensity for the maximum physiological condition, corresponding to the higher Φ PSII value, was species dependant: *LT-P100* for *N. palea* with value of 0.82 ± 0.01 , *Lt-P100* for *U. confervicolum* with value of 0.72 ± 0.01 and *LT-P100* for *P. autumnale* with value of 0.20 ± 0.01 (**Figures 3a to c**).

A decrease of light intensity induced an increase of the photosynthetic efficiency for *N. palea* biofilm with a more significant effect at 22 °C (0.77 ± 0.01 to 0.82 ± 0.01) compared to 19 °C (0.69 ± 0.01 to 0.71 ± 0.01) (**Figure 3a**). The circulating water temperature had also a significant effect on the *N. palea* photosynthetic efficiency ($p= 0.001$): an increase by 12% and 15% of the Φ PSII values were obtained in consequence to an increase of the temperature at high and low light intensity, respectively. On the contrary, temperature and light intensity had any significant effect on the photosynthetic efficiency of the green alga and cyanobacterium biofilms (**Figures 3b and c**).

The P concentration in the culture media had a significant effect on the photosynthetic efficiency of the three phototrophic biofilms. The condition *LT-P100* corresponded to the optimal P concentration for the three phototrophic species (**Figures 3d, e and f**). For *N. palea* and *U. confervicolum* biofilms, the lower Φ PSII values were obtained when they grew under *LT-P50* condition with a decrease by 23% and 11% compared to *LT-P100*, respectively. In contrast, a decrease of the P concentration induced any significant difference on the cyanobacterium photosynthetic efficiency. A decreased Φ PSII value was also observed when the P concentration increase from *LT-P100* to *LT-P165* for *N. palea* and *P. autumnale* biofilms. For the three phototrophic species, there was any significant correlation between photosynthetic yield and biomass, which means that these both measurements were influenced by different parameters (data not shown).

5. MODULATION DE LA CAPACITE DE SORPTION DU CU

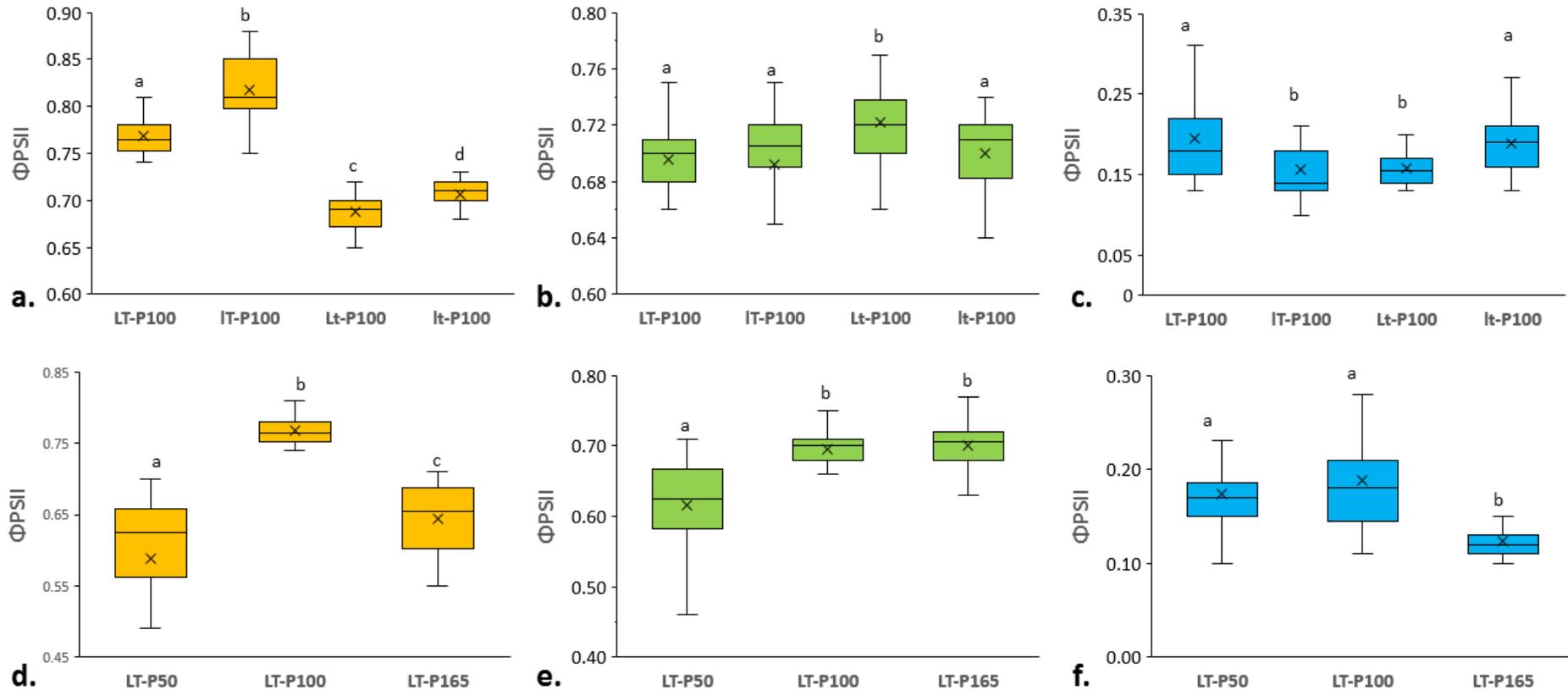


Figure 3 Effect of environmental factors on the diatom (*N. palea* in orange; a. and d.), the green alga (*U. confervicolum* in green; b. and e.) and the cyanobacterium (*P. autumnale* in blue; c. and f.) photosynthetic efficiency (n = 32). The biofilms were exposed during 14 days to high or low light intensity ($L = 70$ or $l = 30 \mu\text{mol s}^{-1} \text{m}^{-2}$, respectively) and high or low temperature ($T = 22$ or $t = 19 \text{ }^\circ\text{C}$, respectively) (a. to c.) or different P concentrations at LT condition ($P50 = 2.61$, $P100 = 5.23$ or $P165 = 8.71 \text{ mg L}^{-1}$) (d. to f.).

The effects of light intensity, temperature and P concentration on the amounts and quality of extracted EPS

The control of the cell lysis was realized with the measurement of the chlorophyll *a* released in the EPS extract after each protocol: it was lower than 5% for all samples.

TOC in the EPS extracts was used to quantify the amount of extracted EPS. At day 14, the mean TOC values for all tested conditions were equal to 71 ± 3 mg C g⁻¹ DW for *P. autumnale* biofilms, followed to 65 ± 2 mg C g⁻¹ DW for *N. palea* biofilms and 57 ± 3 mg C g⁻¹ DW for *U. confervicolum* biofilms (**Figure 4**). For the three species, the quantity of proteins extracted was higher than for polysaccharides as shown into a PN/PS ratio higher than one for all the EPS extracts, excepted for the cyanobacterium at *LT-P100* and *LT-P50* conditions.

The quantity of EPS extracted from *N. palea* biofilm was modulated by the temperature ($p=0.002$) and the P concentration ($p<0.001$). Indeed, a decrease by 3 °C of the circulating water temperature resulted in an increase of about 15% in TOC (**Figure 4a**). The highest amount of EPS extracted was obtained when the diatom grew with the highest P concentration (*LT-P165*): compared to *LT-P100*, the quantity increased by 42% (**Figure 4d**). Neither the light intensity nor the temperature influenced the quality of EPS produced by *N. palea* biofilm. However, an increase by a factor 2 of the PN/PS ratio was observed in the *lt-P100* condition, resulting from a lower quantity of polysaccharides. The PN/PS ratio was also modulated by the P concentration ($p=0.048$): if the ratio was the same when the biofilm grew with low or medium P concentration (*LT-P50* or *LT-P100*, respectively), the ratio was multiplied by two for the green alga and the diatom biofilm and by four for the cyanobacterium biofilm when the P concentration was higher (*LT-P165*).

According to the temperature, a modification of light intensity created differences in EPS extracted from *U. confervicolum* biofilm ($p=0.006$). Indeed, under low circulating water temperature (19 °C), TOC was enhanced by 32% when the light intensity decreased (**Figure 4b**). The TOC and the PN/PS ratio were also provided by the P concentration ($p=0.001$ and 0.005 , respectively). An exposure to the lower P concentration (*LT-P50*) created a TOC decrease of about 26% compared to *LT-P100* (**Figure 4e**). Inversely, the PN/PS ratio was lower of about 60% at *LT-P100* condition compared to *LT-P50*.

The cross effect of the temperature and the light intensity had an impact on the quantity of EPS extracted on *P. autumnale* biofilm ($p=0.002$): with a reduction of the light intensity, the TOC

5. MODULATION DE LA CAPACITE DE SORPTION DU CU

was decreased by 23% when the temperature was higher (22°C). Effect of light intensity on the quality of EPS extracted from *P. autumnale* biofilm was depend on the water circulating temperature (**Figure 4c**). Indeed, the PN/PS ratio was multiplied by 3 with a decrease of the light intensity at 22 °C and decreased by 15% at 19 °C. The quality of EPS produced by the cyanobacterium was also depending on the P concentration (p= 0.001): as well as to the green alga, *LT-P100* condition represents the P concentration tested with the lower PN/PS ratio (**Figure 4f**). Conversely, compared to *LT-P100*, an increase (*LT-P165*) or a decrease (*LT-P50*) of P concentration decreased the TOC value by 27% and 36%, respectively.

For the cyanobacterium and the green alga biofilms, the EPS extracted were positively correlated to the photosynthetic efficiency (p= 0.02 and p< 0.0001, respectively) whereas they were negatively correlated for the diatom biofilms (p= 0.005). Then for *P. autumnale*, the EPS quality (PN/PS) was negatively correlated with the photosynthetic efficiency (p< 0.0001).

5. MODULATION DE LA CAPACITE DE SORPTION DU CU

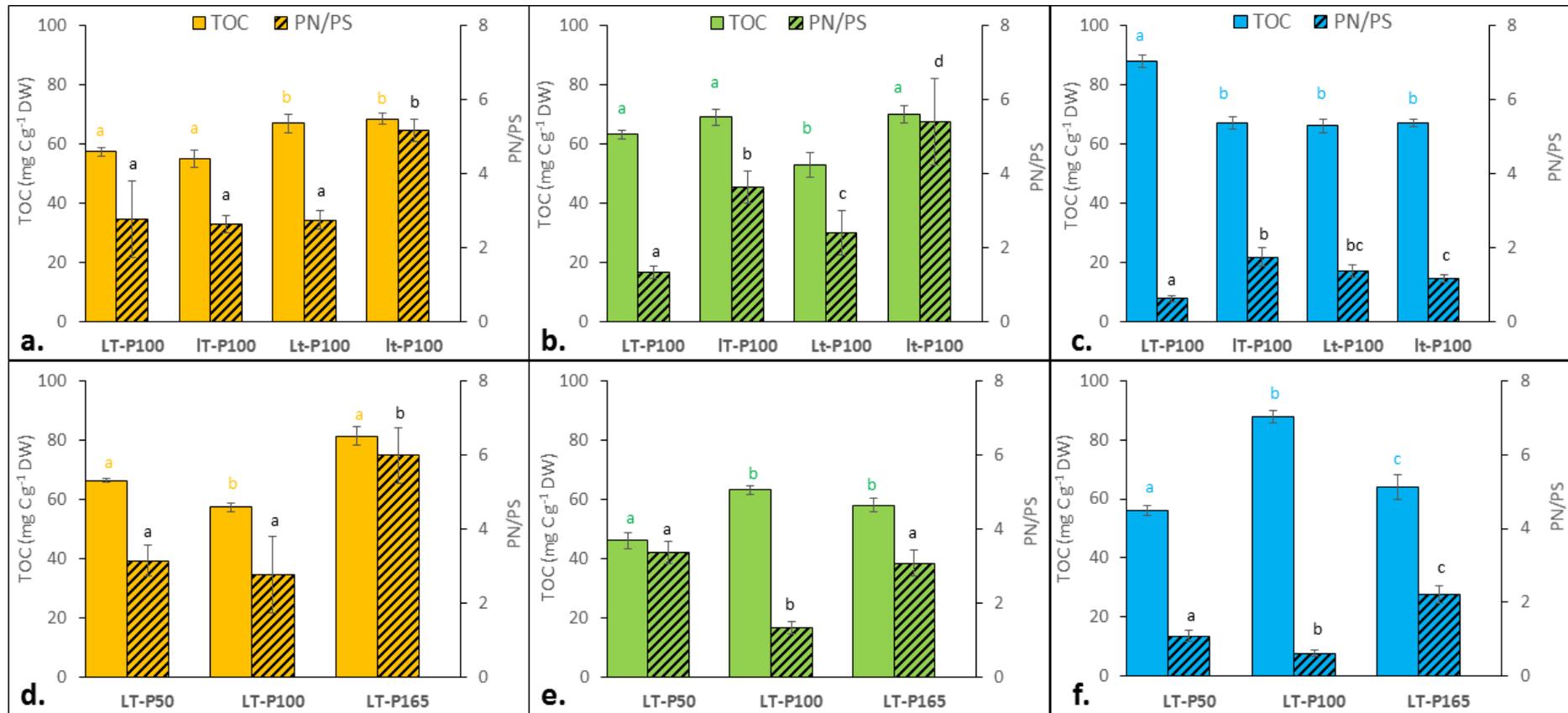


Figure 4 TOC ($n = 3$, mean \pm standard error) and PN/PS ratio ($n = 9$, mean \pm standard error) content in EPS extracts from biofilms composed by the diatom (*N. palea* in orange; a. and d.), the green alga (*U. confervicolum* in green; b. and e.) and the cyanobacterium (*P. autumnale* in blue; c. and f.). The biofilms were exposed during 14 days to high or low light intensity ($L = 70$ or $l = 30 \mu\text{mol s}^{-1} \text{m}^{-2}$, respectively) and high or low temperature ($T = 22$ or $t = 19 \text{ }^\circ\text{C}$, respectively) (a. to c.) or different P concentrations at LT condition ($P50 = 2.61$, $P100 = 5.23$ or $P165 = 8.71 \text{ mg L}^{-1}$) (d. to f.).

The effects of light intensity, temperature and P concentration on the Cu sorption ability by phototrophic biofilms

In this work, we define “sorption” as the overall Cu uptake from the solution by the biofilm, including Cu adsorption by EPS and cell walls and incorporation by cells.

The ability of biofilms to sorb Cu during the four days of exposure was different for the three phototrophic species with the higher concentration of Cu in *N. palea* biofilm (between 422 ± 5 and 854 ± 51 mg Cu kg⁻¹ DW), followed by *P. autumnale* (between 187 ± 5 and 439 ± 15 mg Cu kg⁻¹ DW) and then *U. confervicolum* (between 39 ± 1 to 116 ± 13 mg Cu kg⁻¹ DW) (**Figure**).

A difference of 3 °C of the water temperature induced modification in the concentration of Cu sorbed by *N. palea* biofilm ($p= 0.032$): a decrease of the temperature gave an increase of Cu sorbed in biomasses of 33% at the higher light intensity and 95% at the lower light intensity (**Figure 5a**). The light intensity influenced the *P. autumnale* biofilm sorption ability but this effect was dependant of the temperature ($p < 0.001$). Indeed, the results showed that with a decrease of the light intensity, the cyanobacterium biofilm sorption increased from 211 ± 5 to 397 ± 20 mg Cu kg⁻¹ DW at 22 °C and decreased from 439 ± 15 to 351 ± 12 mg Cu kg⁻¹ DW at 19 °C (**Figure 5c**). A modification of P concentration in the culture medium also modulated the sorption ability of the diatom ($p= 0.004$) and the cyanobacterium ($p= 0.045$) biofilms. Low P concentration tested (*LP-P50*) promoted the Cu sorption for *N. palea* and *P. autumnale* species (**Figure 5d** and **f**). Finally, the quantity of Cu sorbed in the *U. confervicolum* biofilm was no significantly different with the exception of *Lt-P100* condition where the quantity was lower (about 65%) (**Figure 5b** and **e**).

The concentration of Cu sorbed by the green alga biofilm was positively correlated with the biomass ($p= 0.003$) and the amount of extracted EPS ($p= 0.003$), whereas these correlations were negative for the cyanobacterium biofilm ($p= 0.02$ and 0.007 , respectively). Finally, the Cu sorbed in the diatom biofilm was negatively correlated with the biomass ($p= 0.007$) and positively with the amount of extracted EPS ($p= 0.0003$). However, there was no evident correlation between the biofilm sorption ability and the nature of EPS extracted when analysed through the PN/PS ratio

5. MODULATION DE LA CAPACITE DE SORPTION DU CU

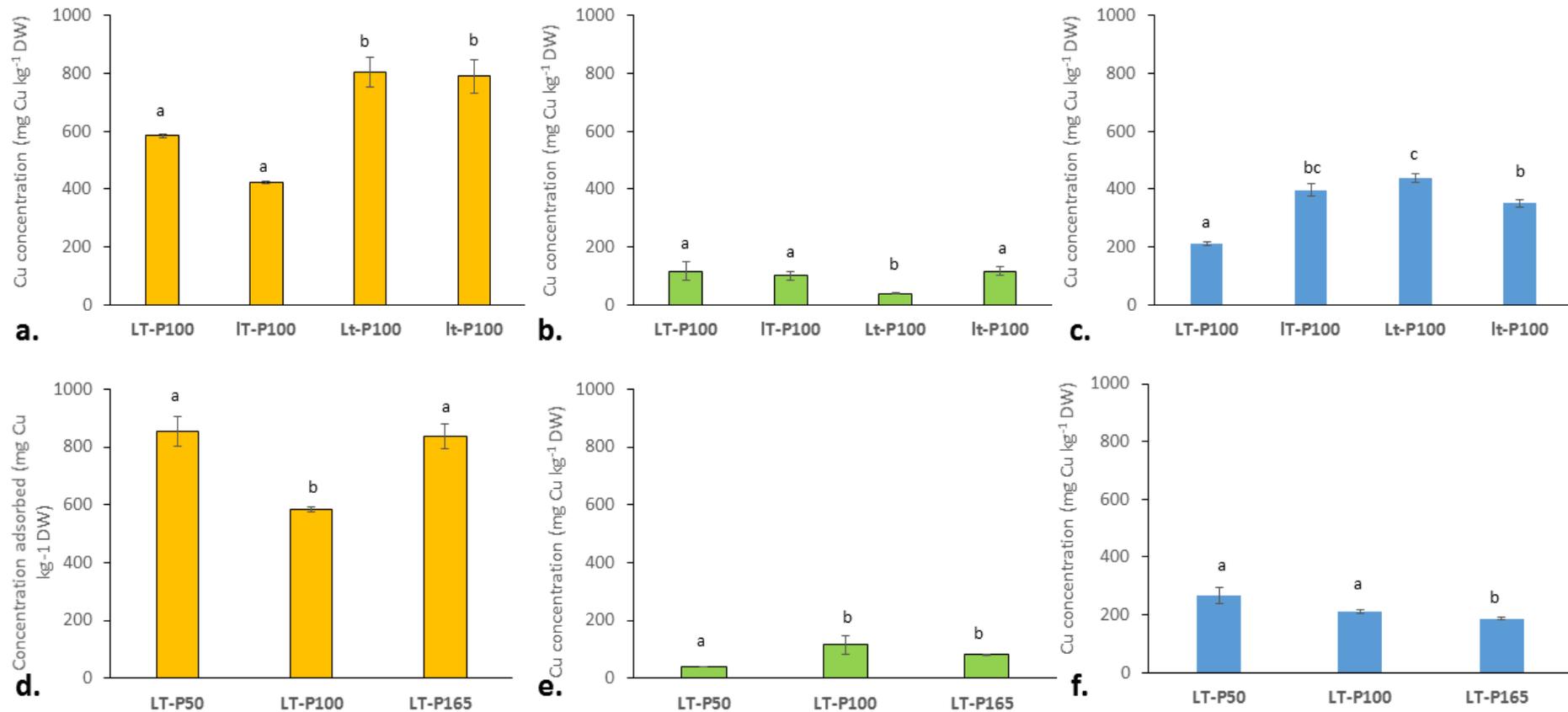


Figure 5 Effect of environmental factors on the ability of biofilms composed by the diatom (*N. palea* in orange; a. and d.), the green alga (*U. confervicolum* in green; b. and e.) and the cyanobacterium (*P. autumnale* in blue; c. and f.) to sorb Cu (n = 6). After a growth period during 14 days to high or low light intensity ($L = 70$ or $l = 30 \mu\text{mol s}^{-1} \text{m}^{-2}$, respectively) and high or low temperature ($T = 22$ or $t = 19 \text{ }^\circ\text{C}$, respectively) (a. to c.) or different P concentrations at LT condition ($P50 = 2.61$, $P100 = 5.23$ or $P165 = 8.71 \text{ mg L}^{-1}$) (d. to f.), Cu was added to obtain $50 \mu\text{g L}^{-1}$ in the circulating water and measured in biofilm biomass after 4 days of exposure.

5. MODULATION DE LA CAPACITE DE SORPTION DU CU

Table 1 Results of two-way ANOVA for the influence of environmental factors (light intensity, temperature and P concentration) on the physiology and the sorption ability of the three phototrophic biofilms. Significant p-values are in bold.

		Light intensity	Temperature	Light * Temp	P concentration
<i>N. palea</i>	Biomass	0.593	0.047	0.654	0.023
	ΦPSII	0.001	0.001	0.024	0.032
	TOC	0.876	0.002	0.592	< 0.001
	PN/PS	0.078	0.057	0.056	0.048
	Sorbed Cu	0.051	0.032	0.077	0.004
<i>U. confervicolum</i>	Biomass	0.001	0.001	0.468	0.001
	ΦPSII	0.226	0.226	0.487	0.001
	TOC	0.099	0.199	0.006	0.001
	PN/PS	0.005	0.076	0.637	0.005
	Sorbed Cu	0.041	0.732	0.130	0.051
<i>P. autumnale</i>	Biomass	0.001	0.483	0.897	0.910
	ΦPSII	0.867	0.785	0.053	0.006
	TOC	0.339	0.220	0.002	0.020
	PN/PS	0.022	0.632	0.004	0.001
	Sorbed Cu	< 0.001	< 0.001	< 0.001	0.045

DISCUSSION

By using phototrophic mono-species biofilms composed of a cyanobacterium (*P. autumnale*), a diatom (*N. palea*) or a green alga (*U. confervicolum*), our experiments highlighted the responses of each phototrophic groups which could be present in natural biofilm in river ecosystem.

The effects of light intensity, temperature and P concentration on the biofilm growth and its photosynthetic efficiency

The responses of the biofilm exposed to a combination of two different light intensity and temperature and three different P concentration in the culture medium were used to evaluate the influence of these environmental factors on the biofilm growth and the photosynthetic efficiency. Despite the moderate increase of temperature chosen, only 3 °C, warming conditions drive significant changes in phototrophic biofilms, with an increase of *N. palea* biomass and a decrease of *U. confervicolum* biomass after two weeks of culture. On the contrary, *P. autumnale* biomass gave no significant difference between the two temperatures. The warming temperature could lead to a taxonomic shift in natural biofilm with a domination of diatom species to the detriment of filamentous phototrophic microorganisms. However, the interaction between species when the temperature increase can generate community changes (Jiang and Morin, 2004) that were not predictable from the response of a mono-species biofilm.

Optimum combined temperature and light intensity for the maximum photosynthetic efficiency vary among algal species: it corresponds to the condition *Lt-P100* for *U. confervicolum*, *lT-P100* for *N. palea* and *LT-P100* for *P. autumnale*. These results confirm the conclusion of Falk *et al.* (1996) who stated that it is not possible to describe a general mechanism for photosynthetic adjustment to temperature that encompasses all autotrophic and heterotrophic species because of genetic diversity and differential strategies in growth and development. However, the temperature has been reported to increase the rates of photosynthesis in phytoplankton (Christoffersen *et al.*, 2006; Staehr and Sand-Jensen, 2006), but our results for benthic biofilm showed that the response was species dependent. An increase of temperature or light intensity, as result of climate change, may only affect the photosynthetic efficiency of the diatom biofilm. For the two other phototrophic species, and in agreement with Ylla *et al.* (2009),

5. MODULATION DE LA CAPACITE DE SORPTION DU CU

light intensity was the limiting parameter which control the growth. Unlike Di Pippo *et al.* (2012) conclusions, $30 \mu\text{mol s}^{-1} \text{m}^{-2}$ provides sufficient light intensity for the development of the three phototrophic biofilms even if higher light intensity exposure ($70 \mu\text{mol s}^{-1} \text{m}^{-2}$) induced more biomass production for the cyanobacterium and the green alga biofilms. *P. autumnale* and *U. confervicolum* are filamentous cells and form thick biofilm with streamers at the surface that can create a self-shading effect and the light intensity can become a limiting factor. On the contrary, the pennate diatom strain forms biofilm with a thin thickness that the light intensity can be accessed by all cells composing the surface of the biofilm. Consequently, a higher light intensity promotes the growth of phototrophic biofilm composed of filamentous alga species. The development of filamentous algae with an increase of light intensity can be explain by the increased thickness of natural biofilm observed in previous studies (Rao, 2010; Villanueva *et al.*, 2011). However, increased light intensity did not significantly affect biofilm photosynthetic efficiency of the two filamentous biofilms; this might be an adaptation of the photosynthetic apparatus of these algal cells.

P concentration, which is often directly involved in eutrophication processes (Smith *et al.*, 1999), has an effect on the three phototrophic biofilms tested and represents the parameter which has the most elevated impact on the biofilms physiology. High P concentration limited the photosynthetic efficiency of the phototrophic biofilms composed by the cyanobacterium or the diatom: the photosynthetic efficiency of the both phototrophic species decreased when the concentration was higher to 5.23 mg L^{-1} , reaching a threshold of photosynthesis efficiency saturation between 5.23 to 8.71 mg L^{-1} . On the contrary, the photosynthetic activity of the green alga biofilm was promoted by high P concentration in the culture medium.

P concentration has no significant effect on cyanobacterium biofilm biomass. Leflaive *et al.* (2015) also reported that the total biomass of biofilm dominated by cyanobacteria was totally unaffected by P stressors. On the contrary, increase in P concentration between 2.61 to 8.71 mg L^{-1} created a decrease of green alga biofilm biomass whereas an increase of the diatom biofilm biomass was observed when the P concentration increased from 2.61 to 5.23 mg L^{-1} . These results suggest that the dominance of species composing natural phototrophic biofilm was dependant on the P concentration in the surface water.

The effects of light intensity, temperature and P concentration on the EPS produced by the three phototrophic species and their consequences on biofilm Cu sorption ability

After the analysis of the biofilm responses through the biomass production and the photosynthetic efficiency, we investigated if a relation occurred with the corresponding EPS production. Our experiments showed a link between the photosynthetic efficiency and the quantity of EPS extracted, but this was function of the species composing the biofilm. Indeed, a positive correlation was obtained for the two biofilms composed by filamentous algae (*P. autumnale* and *U. confervicolum*) whereas this correlation was reversed for *N. palea*. Many authors have showed that EPS released are concomitants to primary production (Underwood and Paterson, 2003); it can correspond to a metabolic response in case of stress (Orvain *et al.*, 2003; Perkins *et al.*, 2001).

The nature of polymers produced by the three phototrophic biofilms was also influenced by the environmental factors. *P. autumnale* cells, the single prokaryotic among the three phototrophic microorganisms, used the C (product of photosynthesis) to produce more exopolysaccharides than proteins. This differential EPS composition within the biofilm matrix might indicate a difference of mechanism responsible of the EPS production in response to environmental condition. On the contrary, no link between the nature of polymers with the photosynthetic efficiency or the biofilm biomass was observed for the two other species. Finally, for the green alga biofilm, the PN/PS ratio significantly decreased (increase in the amount of polysaccharides) with an increase in temperature. For this biofilm composed by long filaments, the polysaccharides contain around the cells could contribute to the protective properties of *U. confervicolum* cells when the water temperature are higher, since they increased following a heat stress.

Sorption of Cu by biofilm is regarded as an efficient and cost-effective approach to remove metal ions from aqueous environment (Vijayaraghavan and Yun, 2008). Our results showed a variability in the ability of biofilm to sorb Cu according to environmental factors and phototrophic species composing the biofilm. This suggests that in the case of natural biofilm, the concentration of Cu sorbed by the biofilm will depend on numerous factors and will be difficult to estimate. After four days of Cu exposure, the maximum concentration of Cu in biofilm biomass was 805 ± 35 mg Cu kg⁻¹ DW for the diatom species under *Lt-P100* condition. However, it is possible that the Cu concentration in biofilm biomass was underestimated in this

study. The culture medium circulating in the microcosm contains a large number of cations such as Na^+ and Ca^{2+} . Previous studies found that these cations can occupy and compete for the available binding sites in EPS, thereby frequently resulting in decreased metal adsorption (Pokrovsky *et al.*, 2008).

In aquatic ecosystem, environmental conditions are very variable and can strongly modify the responses of phototrophic biofilm to anthropogenic contamination; but studies in this aspect are still scarce so far and their influences are rarely taken into account in mono-species ecological tests. Light intensity, temperature or available nutrient influence strongly biofilm structure (biomass and quantity of EPS) and these factors can have a crucial effect on biofilm community response to Cu contamination. Cu concentrations sorbed by the biofilm differed between environmental factors and phototrophic species composing the biofilm. The quantity of EPS and the biofilm biomass significantly govern the Cu concentrations in phototrophic biofilm. The green alga biofilm had higher Cu concentration when the biomass increased whereas the correlation was negative for the two other species. The difference in Cu sorption may be explained by the three-dimensional architecture of the biofilm. Indeed, *P. autumnale* and *N. palea* form more compact biofilm than *U. confervicolum* that can explain differences in the accessibility of Cu binding sites. Increasing Cu sorption with increasing biofilm biomass imply a significant contribution of surface cells to metal sorption, these cells providing additional sorption sites (Hill *et al.*, 2000).

The quantity of EPS extracted and the concentration of Cu in the biofilm were positively correlated for the green alga *U. confervicolum* and the diatom *N. palea*. In this case, the secretion of EPS by the phototrophic cells allows to facilitate the uptake of Cu. On the contrary, the cyanobacterium *P. autumnale* exhibited a higher sorption ability when the quantity of EPS was lower, suggesting that EPS creates a protective envelope that prevents the uptake of Cu by cells. The same trend are already observed with heterotrophic microorganisms: González *et al.* (2010) analysed the adsorption of Cu by *Pseudomonas aureofaciens* biofilm and showed that this strain exhibited greatly enhanced metal adsorption ability after losing their EPS. Ha *et al.* (2010) who analysed the role of EPS in metal ion complexation on *Shewanella oneidensis* biofilm has gathered the same results.

To our surprise, the PN/PS ratio has any influence on the concentration of Cu on the three phototrophic biofilms. However, the nature of EPS is known to affect the affinity to metal

5. MODULATION DE LA CAPACITE DE SORPTION DU CU

cations and the biofilm sorption performance depending on the functional groups (Li and Yu, 2014). It may be interesting to identify the composition changes of major functional groups of EPS after binding with Cu by Fourier transform infrared spectroscopy.

This study confirms the importance of EPS in the sorption of Cu. However, in light of the complexity and the diversity of polymers composing the biofilm matrix, it seems difficult to understand and predict the adsorption and the future of heavy metals in aquatic environment. Our results however confirms that light, temperature and phosphorus are key environmental factors in the structure and the functions of natural phototrophic biofilm. However, we not considered the interactions within the community in complex biofilm who can affect their functioning and architecture and can heavily modify the expected effects of environmental parameters.

ACKNOWLEDGEMENTS

This work was funded by the Idex UNITI grant of the University of Toulouse, France (No. 2016 – 46 – CIF – D – DRDV). We thank Jessica Ferriol for PhytoPam measurements, Didier Lambriqot for TOC measurements and David Baqué for Cu measurements.

REFERENCES

- Anu, P.R., Nandan, S.B., Jayachandran, P.R., and Xavier, N.D. (2016) Toxicity effects of copper on the marine diatom, *Chaetoceros calcitrans*. *Reg. Stud. Mar. Sci.* **8**: 498–504.
- Baker, N.R. (2008) Chlorophyll fluorescence: a probe of photosynthesis in vivo. *Annu Rev Plant Biol* **59**: 89–113.
- Bengtsson, M.M., Wagner, K., Schwab, C., Urich, T., and Battin, T.J. (2018) Light availability impacts structure and function of phototrophic stream biofilms across domains and trophic levels. *Mol. Ecol.*
- Christoffersen, K., Andersen, N., Søndergaard, M., Liboriussen, L., and Jeppesen, E. (2006) Implications of climate-enforced temperature increases on freshwater pico-and nanoplankton populations studied in artificial ponds during 16 months. *Hydrobiologia* **560**: 259–266.
- Demirbas, A. (2008) Heavy metal adsorption onto agro-based waste materials: a review. *J. Hazard. Mater.* **157**: 220–229.
- DeNicola, D.M. (1996) Periphyton responses to temperature at different ecological levels. *Algal Ecol. Freshw. Benthic Ecosyst.* 149–181.
- Di Pippo, F., Ellwood, N.T.W., Guzzon, A., Siliato, L., Micheletti, E., De Philippis, R., and Albertano, P.B. (2012) Effect of light and temperature on biomass, photosynthesis and capsular polysaccharides in cultured phototrophic biofilms. *J. Appl. Phycol.* **24**: 211–220.
- Douglas, S. and Beveridge, T.J. (1998) Mineral formation by bacteria in natural microbial communities. *FEMS Microbiol. Ecol.* **26**: 79–88.
- Dreywood, R. (1946) Qualitative test for carbohydrate material. *Ind. Eng. Chem. Anal. Ed.* **18**: 499–499.
- Falk, S., Maxwell, D.P., Laudenbach, D.E., and Huner, N.P. (1996) Photosynthetic adjustment to temperature. In, *Photosynthesis and the environment*. Springer, pp. 367–385.
- Fanta, S.E., Hill, W.R., Smith, T.B., and Roberts, B.J. (2010) Applying the light: nutrient hypothesis to stream periphyton. *Freshw. Biol.* **55**: 931–940.
- Flemming, H.-C., Wingender, J., Szewzyk, U., Steinberg, P., Rice, S.A., and Kjelleberg, S. (2016) Biofilms: an emergent form of bacterial life. *Nat. Rev. Microbiol.* **14**: 563.

5. MODULATION DE LA CAPACITE DE SORPTION DU CU

- González, A.G., Shirokova, L.S., Pokrovsky, O.S., Emnova, E.E., Martínez, R.E., Santana-Casiano, J.M., et al. (2010) Adsorption of copper on *Pseudomonas aureofaciens*: protective role of surface exopolysaccharides. *J. Colloid Interface Sci.* **350**: 305–314.
- Ha, J., Gélabert, A., Spormann, A.M., and Brown Jr, G.E. (2010) Role of extracellular polymeric substances in metal ion complexation on *Shewanella oneidensis*: batch uptake, thermodynamic modeling, ATR-FTIR, and EXAFS study. *Geochim. Cosmochim. Acta* **74**: 1–15.
- Hammer, Ø., Harper, D.A.T., and Ryan, P.D. (2001) PAST-Palaeontological statistics. *Www Uv Es~ Pardomvpe20011pastpastprogpast Pdf Acessado Em* **25**: 2009.
- Hill, W.R., Bednarek, A.T., and Larsen, I.L. (2000) Cadmium sorption and toxicity in autotrophic biofilms. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.* **57**: 530–537.
- Hill, W.R., Rinchard, J., and Czesny, S. (2011) Light, nutrients and the fatty acid composition of stream periphyton. *Freshw. Biol.* **56**: 1825–1836.
- Hou, J., You, G., Xu, Y., Wang, C., Wang, P., Miao, L., et al. (2016) Impacts of CuO nanoparticles on nitrogen removal in sequencing batch biofilm reactors after short-term and long-term exposure and the functions of natural organic matter. *Environ. Sci. Pollut. Res.* **23**: 22116–22125.
- IPCC. 2007. Contribution of Working Group II to the Fourth Assessment. Report of the Intergovernmental Panel on Climate Change. in *Climate Change 2007: Impacts, Adaptation and Vulnerability* (eds. Parry ML, Canziani OF, Palutikof JP, van der Linden PJ, Hanson CE), p. 976, Cambridge, UK.
- Jiang, L. and Morin, P.J. (2004) Temperature-dependent interactions explain unexpected responses to environmental warming in communities of competitors. *J. Anim. Ecol.* **73**: 569–576.
- Kilham, S.S., Kreeger, D.A., Lynn, S.G., Goulden, C.E., and Herrera, L. (1998) COMBO: a defined freshwater culture medium for algae and zooplankton. *Hydrobiologia* **377**: 147–159.
- Lear, G., Anderson, M.J., Smith, J.P., Boxen, K., and Lewis, G.D. (2008) Spatial and temporal heterogeneity of the bacterial communities in stream epilithic biofilms. *FEMS Microbiol. Ecol.* **65**: 463–473.
- Leflaive, J., Felten, V., Ferriol, J., Lamy, A., Ten-Hage, L., Bec, A., and Danger, M. (2015) Community structure and nutrient level control the tolerance of autotrophic biofilm to silver contamination. *Environ. Sci. Pollut. Res.* **22**: 13739–13752.

- Lenoir, J., Gégout, J.-C., Marquet, P.A., De Ruffray, P., and Brisse, H. (2008) A significant upward shift in plant species optimum elevation during the 20th century. *science* **320**: 1768–1771.
- Li, W.-W. and Yu, H.-Q. (2014) Insight into the roles of microbial extracellular polymer substances in metal biosorption. *Bioresour. Technol.* **160**: 15–23.
- Loustau, E., Rols, J.-L., Leflaive, J., Marcato-Romain, C.-E., and Girbal-Neuhauser, E. (2018) Comparison of extraction methods for the characterization of extracellular polymeric substances from aggregates of three biofilm-forming phototrophic microorganisms. *Can. J. Microbiol.*
- Loustau, E., Ferriol, J., Koteiche, S., Leflaive, J., Moulin, F.Y., Girbal-Neuhauser, E., and Rols, J.L. (2019) Physiological responses of three mono-species phototrophic biofilms exposed to copper and zinc (submitted).
- Magaletti, E., Urbani, R., Sist, P., Ferrari, C.R., and Cicero, A.M. (2004) Abundance and chemical characterization of extracellular carbohydrates released by the marine diatom *Cylindrotheca fusiformis* under N-and P-limitation. *Eur. J. Phycol.* **39**: 133–142.
- Manimaran, K., Karthikeyan, P., Ashokkumar, S., Prabu, V.A., and Sampathkumar, P. (2012) Effect of copper on growth and enzyme activities of marine diatom, *Odontella mobiliensis*. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* **88**: 30–37.
- Necchi, O. (2004) Photosynthetic responses to temperature in tropical lotic macroalgae. *Phycol. Res.* **52**: 140–148.
- Orvain, F., Galois, R., Barnard, C., Sylvestre, A., Blanchard, G., and Sauriau, P.-G. (2003) Carbohydrate production in relation to microphytobenthic biofilm development: an integrated approach in a tidal mesocosm. *Microb. Ecol.* **45**: 237–251.
- Perkins, R.G., Underwood, G.J.C., Brotas, V., Snow, G.C., Jesus, B., and Ribeiro, L. (2001) Responses of microphytobenthos to light: primary production and carbohydrate allocation over an emersion period. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* **223**: 101–112.
- Pokrovsky, O.S., Martinez, R.E., Golubev, S.V., Kompantseva, E.I., and Shirokova, L.S. (2008) Adsorption of metals and protons on *Gloeocapsa sp.* cyanobacteria: a surface speciation approach. *Appl. Geochem.* **23**: 2574–2588.
- Rao, T.S. (2010) Comparative effect of temperature on biofilm formation in natural and modified marine environment. *Aquat. Ecol.* **44**: 463–478.
- Roháček, K. and Barták, M. (1999) Technique of the modulated chlorophyll fluorescence: basic concepts, useful parameters, and some applications. *Photosynthetica* **37**: 339.

- Romaní, A. (2009) Freshwater biofilms. *Biofouling* 137.
- Serra, A. and Guasch, H. (2009) Effects of chronic copper exposure on fluvial systems: linking structural and physiological changes of fluvial biofilms with the in-stream copper retention. *Sci. Total Environ.* **407**: 5274–5282.
- Smith, P.K., Krohn, R.I., Hermanson, G.T., Mallia, A.K., Gartner, F.H., Provenzano, Md., et al. (1985) Measurement of protein using bicinchoninic acid. *Anal. Biochem.* **150**: 76–85.
- Smith, V.H., Tilman, G.D., and Nekola, J.C. (1999) Eutrophication: impacts of excess nutrient inputs on freshwater, marine, and terrestrial ecosystems. *Environ. Pollut.* **100**: 179–196.
- Staehr, P.A. and Sand-Jensen, K.A.J. (2006a) Seasonal changes in temperature and nutrient control of photosynthesis, respiration and growth of natural phytoplankton communities. *Freshw. Biol.* **51**: 249–262.
- Stanier, R.Y., Kunisawa, R., Mandel, M., and Cohen-Bazire, G. (1971) Purification and properties of unicellular blue-green algae (order *Chroococcales*). *Bacteriol. Rev.* **35**: 171.
- Stevenson, R.J., Bothwell, M.L., Lowe, R.L., and Thorp, J.H. (1996) Algal ecology: Freshwater benthic ecosystem Academic press.
- Sud, D., Mahajan, G., and Kaur, M.P. (2008) Agricultural waste material as potential adsorbent for sequestering heavy metal ions from aqueous solutions—A review. *Bioresour. Technol.* **99**: 6017–6027.
- Underwood, G.J. and Paterson, D.M. (2003) The importance of extracellular carbohydrate production by marine epipelagic diatoms. *Adv. Bot. Res.* **40**: 183–240.
- Vijayaraghavan, K. and Yun, Y.-S. (2008) Bacterial biosorbents and biosorption. *Biotechnol. Adv.* **26**: 266–291.
- Villanueva, V.D., Font, J., Schwartz, T., and Romani, A.M. (2011) Biofilm formation at warming temperature: acceleration of microbial colonization and microbial interactive effects. *Biofouling* **27**: 59–71.
- Wei, D., Li, M., Wang, X., Han, F., Li, L., Guo, J., et al. (2016) Extracellular polymeric substances for Zn (II) binding during its sorption process onto aerobic granular sludge. *J. Hazard. Mater.* **301**: 407–415.
- Yin, Y., Hu, Y., and Xiong, F. (2011) Sorption of Cu (II) and Cd (II) by extracellular polymeric substances (EPS) from *Aspergillus fumigatus*. *Int. Biodeterior. Biodegrad.* **65**: 1012–1018.

5. MODULATION DE LA CAPACITE DE SORPTION DU CU

Ylla, I., Borrego, C., Romaní, A.M., and Sabater, S. (2009) Availability of glucose and light modulates the structure and function of a microbial biofilm. *FEMS Microbiol. Ecol.* **69**: 27–42.

CHAPITRE VI

IMPACTS DES FACTEURS ENVIRONNEMENTAUX SUR LA RESILIENCE DE BIOFILMS PHOTOTROPHES MONO-ESPECE SOU MIS A UNE DOUBLE PERTURBATION (EXPOSITION AU CU ET ASSECHEMENT)

6. RESILIENCE FACE A UN DOUBLE STRESS (CU ET ASSECHEMENT)

Lors d'une période de sécheresse, un cours d'eau peut voir son niveau baisser, jusqu'à une disparition complète de l'écoulement de surface, ce qui engendre une concentration progressive de tous les polluants contenus dans la colonne d'eau. Ce processus pouvant amplifier la toxicité des polluants vis-à-vis des biofilms (Proia *et al.*, 2013; Stampfli *et al.*, 2013), nous avons par une expérimentation en microcosmes à l'aide des mini-canaux hydrauliques, testé l'impact d'activités humaines au travers d'une exposition métallique (cuivre) sur les activités fonctionnelles (activité photosynthétique) et métaboliques (EPS sécrétées) des communautés procaryotes et eucaryotes d'un biofilm phototrophe dans un contexte simulant un cours d'eau non permanent. Les effets combinés du Cu et de la sécheresse sur les activités des communautés phototrophes n'ont, pour l'instant, pas fait l'objet d'études. De plus, avec le changement climatique global, une amplification du fonctionnement intermittent des cours d'eau est à prévoir, particulièrement dans les climats méditerranéens où les épisodes de précipitations sont rares et violents (Bonada and Resh, 2013). Les communautés microbiennes qui sont indispensables au fonctionnement des écosystèmes aquatiques, peuvent donc être soumises à des contraintes physiques ou chimiques de grandes amplitudes et vraisemblablement accentuées dans les années à venir (IPCC, 2007). Face à ces contraintes, une différence dans la sensibilité des espèces phototrophes benthiques peut être observée du fait de leurs caractéristiques structurelles ou de leurs propriétés physiologiques différentes (Ledger *et al.*, 2008).

L'objectif de cette étude est de définir de quelle manière les microorganismes phototrophes réagissent face à un stress provoqué par une double perturbation en s'intéressant aux processus de résiliences fonctionnelles et métaboliques. Dans ce but, des biofilms mono-espèce déjà établis ont été exposés pendant 4 jours à du Cu ($50 \mu\text{g L}^{-1}$), condition représentative de concentrations environnementales retrouvées dans des écosystèmes lotiques pollués (Montuelle *et al.*, 2010), mais n'ayant pour autant aucun effet néfaste sur la biomasse et l'activité photosynthétique des trois espèces de microorganismes phototrophes testées dans cette étude (**Chapitre IV**). Ensuite, les biofilms subissent 14 jours d'assèchement, suivis d'une remise en eau avec du milieu de culture frais pendant 14 jours (**Figure 31**).

Notre étude étant réalisée sur des biofilms mono-espèce, le biofilm est considéré résilient s'il n'existe pas de différence significative entre les valeurs mesurées avant la perturbation (Temps0) et celles mesurées à la fin de la période de remise en eau (Temps32). Cette capacité de résilience des espèces qui composent le biofilm dépend de la résistance et de la capacité de

6. RESILIENCE FACE A UN DOUBLE STRESS (CU ET ASSECHEMENT)

récupération (en anglais « recovery »). La résistance est définie de manière générale comme étant la capacité d'un système à limiter les effets de la perturbation. De ce fait, une faible résistance du biofilm se traduit par une modification importante des valeurs de la variable mesurée avant et après la perturbation, au contraire aucune modification ne sera observée dans le cas d'un biofilm résistant.

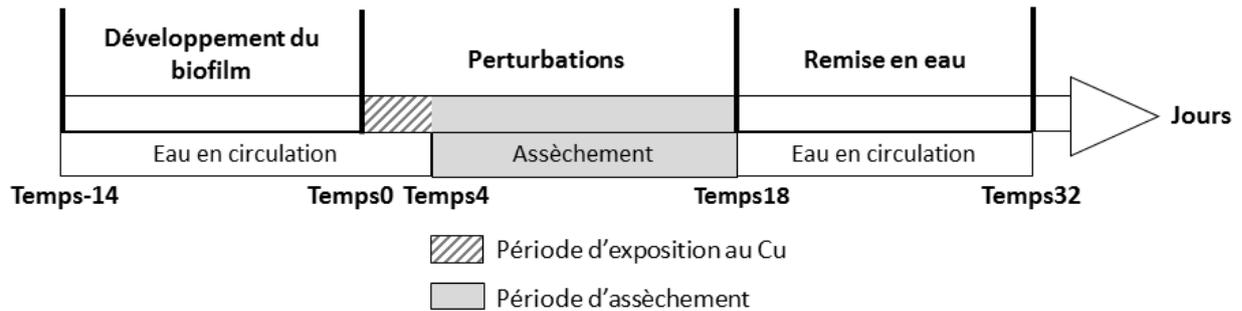


Figure 31 Schéma récapitulatif de l'expérience réalisée en microcosme pendant 46 jours. Avant le Temps0, les biofilms mono-espèce en suspension ont été inoculés dans les modules pour leur permettre de coloniser les coupons en place.

Au cours de cette étude, nous avons également jugé important d'appréhender l'influence de la température, de la luminosité et de la concentration en P disponible dans le milieu de culture sur la capacité de résilience des biofilms phototrophes. En effet, nous avons pu observer au cours du **chapitre V** que ces facteurs environnementaux, aux conditions testées, pouvaient avoir une influence sur la structure (biomasse et EPS) et les fonctions des trois biofilms phototrophes. Ces différences de réponse, notamment dans la quantité et la nature des EPS extraites, laissent supposer que ces facteurs puissent engendrer des modifications de la capacité de résistance des cellules phototrophes face à une perturbation. De plus, dans un écosystème aquatique et en conséquence du réchauffement climatique global, la non permanence d'un cours d'eau peut s'accompagner d'une modification de la luminosité, de la température et de la concentration en nutriments, perçue par la biomasse benthique (Roux-Barthès, 2014). Enfin, la température a une influence sur la toxicité des polluants. Lambert *et al.* (2016) ont évalué les conséquences d'une augmentation de la température (de +5°C à +15°C) sur la résistance des communautés phototrophes de biofilm à une exposition chronique au Cu. Les résultats ont montré qu'une augmentation de la température entraîne une atténuation des effets du Cu sur les

6. RESILIENCE FACE A UN DOUBLE STRESS (CU ET ASSECHEMENT)

microorganismes phototrophes, se traduisant par une réduction voire une absence d'effet du Cu sur la structure et l'activité photosynthétique.

La réponse des trois biofilms mono-espèce a été étudiée à travers divers paramètres :

- l'activité photosynthétique par l'intermédiaire du phytoPam,
- la quantité des EPS extraites des biofilms suite à une extraction séquentielle (Chapitre III), et déterminée par une quantification du carbone organique total (COT),
- la proportion de polysaccharides (PS) et de protéines (PN) présents dans les extraits, déterminés par dosages colorimétriques. Les concentrations en polysaccharides et protéines sont respectivement calculées en $\text{mg } \text{eqGlc g}^{-1}\text{MS}$ et $\text{mg } \text{eqBSA g}^{-1}\text{MS}$.

Bien que les EPS produites par les microorganismes présents au sein d'un biofilm phototrophe représentent un mécanisme de protection important dans la tolérance des stress engendrés par de multiples perturbations (Schimel *et al.*, 2007), cette matrice d'exopolymères n'a pas encore été étudiée en détail.

Les prélèvements ont été effectués à l'état initial (Temps0), c'est-à-dire avant la perturbation au Cu, à la fin de la phase d'assèchement (Temps18) pour déterminer l'impact de la double perturbation, et à la fin de la phase de remise en eau (Temps32) afin de caractériser la capacité de récupération des biofilms. La période d'assèchement précédée d'une exposition au Cu a eu un effet différent sur la capacité de résilience lorsque l'on compare la cyanobactérie, l'algue verte et la diatomée. La capacité de résilience est considérée comme étant l'évolution de la variable analysée (activité photosynthétique, nature et quantité des EPS extraites) entre l'état initial (avant perturbation, Temps0) et l'état final (après remise en eau, Temps32). Il semblerait que la cyanobactérie ait une capacité de résilience plus rapide ou plus efficace que les deux autres espèces phototrophes. En effet, après une période de remise en eau de deux semaines, l'efficacité de l'activité photosynthétique (Temps32 ; $0,22 \pm 0,01$ en excluant la seule condition d'exposition pour laquelle on observe une diminution de l'activité) est supérieure à celle mesurée à l'état initial (Temps0 ; $0,17 \pm 0,01$). Concernant l'algue verte, l'activité photosynthétique après 2 semaines de remise en eau est similaire à celle mesurée à l'état initial (respectivement $0,66 \pm 0,01$ et $0,69 \pm 0,01$). A l'inverse, la diatomée a montré une activité plus faible qu'en condition initiale ($0,70 \pm 0,02$ à Temps0 contre $0,61 \pm 0,03$ à Temps32). Cette différence de réponses suite à la perturbation peut s'expliquer par une différence dans la morphologie des cellules et l'épaisseur des parois cellulaires. En effet, contrairement à la

6. RESILIENCE FACE A UN DOUBLE STRESS (CU ET ASSECHEMENT)

cyanobactérie et l'algue verte, la diatomée n'est pas une espèce filamenteuse et possède un frustule siliceux qui enveloppe la cellule. Les deux autres espèces phototrophes forment quant à elles de longs filaments qui leur permettent une meilleure résistance aux perturbations, notamment à la dessiccation. De plus, il est possible que la silice soit sensible à une modification de l'hydratation de la matrice.

Concernant les EPS présentes dans la matrice à la fin des 18 jours de perturbation, l'évolution de la quantité des polymères (protéines et polysaccharides) est différente pour les trois microorganismes phototrophes qui semblent avoir des stratégies de résistance différentes. En effet, la quantité d'EPS extraites des biofilms composés de la cyanobactérie *P. autumnale* ou de la diatomée *N. palea* à la fin de la perturbation (Temps18) est inférieure à celle à l'état initial (Temps0) qui se traduit par une diminution moyenne respective de $53 \pm 2 \%$ et $18 \pm 5 \%$. Au contraire pour l'algue verte *U. confervicolum*, et ceci fonction des conditions environnementales (forte température ou forte concentration en P dans le milieu), la quantité d'EPS extraites est supérieure à celle obtenue à l'état initial avec une augmentation moyenne de $36 \pm 8 \%$. En revanche, pour les trois organismes phototrophes, une remise en eau permet au bout de deux semaines d'obtenir une quantité d'EPS extraites similaire à l'état initial. Plus précisément, l'algue verte et la diatomée, qui sont deux microorganismes eucaryotes, ont tendance en fonction des conditions environnementales, à produire une quantité légèrement supérieure d'EPS alors que la quantité d'EPS sécrétée par la cyanobactérie (microorganisme procaryote) a tendance à être légèrement inférieure. Malgré un fort impact de la perturbation sur la quantité de PN et de PS extraits, deux semaines de croissance avec un retour des conditions initiales (de Temps18 à Temps32) semblent suffisantes pour retourner à une quantité d'EPS similaire même si la comparaison de cette quantité est réalisée sur des biofilms d'âges différents.

Enfin, lorsque l'on s'intéresse à la composition des EPS avant la remise en eau (Temps18), l'assèchement a eu un fort impact quelles que soient les conditions de température, de luminosité et de concentration en P dans le milieu de culture. Après la remise en eau, la diatomée et la cyanobactérie ont montré une réponse similaire avec une faible modification du rapport PN/PS en comparaison de celui obtenu à la fin de la perturbation (Temps18) se traduisant par une quantité en polysaccharides supérieure à celle de l'état initial (Temps0). La période de remise en eau a, en revanche, induit des modifications plus importantes du ratio

6. RESILIENCE FACE A UN DOUBLE STRESS (CU ET ASSECHEMENT)

PN/PS entre Temps18 et Temps32, ce qui conduit à un moindre écart de ce rapport avec l'état initial (Temps0).

Pour conclure, la double application de perturbations par l'exposition au Cu pendant 4 jours suivi d'une période d'assèchement du biofilm pendant deux semaines conduit à des réponses de résistance (modification de la quantité et de la nature des EPS produites) qui dépendent des organismes phototrophes considérés. Après deux semaines de remise en eau (Temps32), la résilience ainsi que la capacité de récupération de l'état physiologique du biofilm (activité photosynthétique) et de la sécrétion d'EPS (nature et quantité de polymères) sont également propres à chaque espèce. Il n'existe en revanche aucun lien entre la capacité de résistance ou de résilience des différents biofilms phototrophes et la quantité et/ou la nature des EPS extraites à la fin de la période d'assèchement (Temps18) ou de remise en eau (Temps32). Les résultats de ce travail de recherche suggèrent donc, qu'en plus des EPS, les cellules phototrophes mettent en place un autre mécanisme de défense pour faire face aux stress engendrés par la double perturbation. L'ensemble de ces réponses (résistance et résilience) reste également sous une forte dépendance des facteurs environnementaux

**PHYSIOLOGICAL RESILIENCE
OF THREE MONO-SPECIES PHOTOTROPHIC BIOFILMS
SUBJECTED TO ENVIRONMENTAL FACTORS
TOWARDS CU EXPOSURE AND DROUGHT**

Emilie Loustau^{a,b}, Joséphine Leflaive^a, Claire Boscus^a, Quentin Amalric^a, Elisabeth Girbal-
Neuhauser^b, Jean-Luc Rols^a

^a EcoLab, Université de Toulouse, CNRS, INPT, UPS, Toulouse, France

^b LBAE, Université de Toulouse, UPS, Auch, France

Article en préparation

6. RESILIENCE FACE A UN DOUBLE STRESS (CU ET ASSECHEMENT)

Abstract

In a context of global change associated with anthropic pressures, multiple stressors in link with increasing concentration of copper or flow resumption may damage phototrophic biofilm from surface waters. The climate change and the non-permanent stream can lead modifications of water temperature, light intensity and nutrient availability. This study evaluates the combined effects of drought and Cu exposure at environmental concentration ($50 \mu\text{g L}^{-1}$) on mono-species phototrophic biofilms, and the dependence of these effects to the environmental factors tested (temperature, light intensity and P concentration). To assess these interactions, an experiment with artificial streams was performed during 46 days with three simplified biofilms composed by a green alga (*Uronema confervicolum*), a diatom (*Nitzschia palea*) or a cyanobacterium (*Phormidium autumnale*). Results indicate that after the disturbance (Cu exposure followed by drought period), the photosynthetic efficiency recovery of the three phototrophic biofilms after two rewetting weeks are different, the diatom species showing a smaller resilience. Phosphorus concentration in the culture medium plays an important role in this recovery indicating that nutrients availability has to be considered. Contrary to the diatom and the green alga biofilms, the higher P concentration tested enhanced the photosynthetic efficiency recovery of the cyanobacterium biofilm.

After two weeks of rewetting periods, no drastic modification in the quantity of extracellular polymeric substances (EPS) extracted was observed. However, for the cyanobacterium and diatom biofilms, the quantity of polysaccharides (PS) composing the matrix was higher than before disturbance. A modification of PN/PS ratio (PN for proteins) was observed at the end of the disturbance period and after the rewetting period, but these responses were dependant on the environmental factors and the phototrophic species. According to these results, the consequences of environmental risk of climate change and anthropic pollution are complex and difficult to estimate because they are dependent of the environmental factors and the target organisms (prokaryote and eukaryote) composing the biofilm.

Keywords

Climate change, resilience, photosynthetic efficiency, EPS production

6. RESILIENCE FACE A UN DOUBLE STRESS (CU ET ASSECHEMENT)

INTRODUCTION

Understanding and predicting how communities respond and resist to disturbances in terms of composition or function are current concerns for microbial ecologists (Costello *et al.*, 2012; Gonzalez *et al.*, 2012). Disturbance is defined as a causal event inducing a perturbation in a community (Rykiel and Edward, 1985). The resilience of an ecosystem to disturbance can be characterized by the resistance, that is the degree to which a community remains unchanged when it is subjected to a disturbance, and the recovery, that is, the ability of a system to return to pre-disturbance levels (Hodgson *et al.*, 2015; Oliver *et al.*, 2015). Consequently, a resilient system is able to minimize the impact of the disturbance (due to a high resistance) and have the ability to continuous functioning under changing conditions (high capacity to recover).

Freshwater ecosystems are often exposed to chemical disturbances as they receive many organic or inorganic pollutants at low concentrations (pesticides, organic solvents, heavy metals) through agriculture, domestic and industrial uses (Segner *et al.*, 2014; Ternes *et al.*, 1999). In lotic environment, contaminations are discharged either continuously (producing potentially chronic effects) or in pulses (causing potentially acute effects). In addition to these multiple chemical stresses, the communities of intermittent rivers are exposed to desiccation stress. Indeed, in these lotic ecosystems, worldwide distributed, water sometimes stop flowing (Datry *et al.*, 2017). In a context of climate change as well as increased water extraction for human uses (irrigation, drinking water) and altered land-use patterns, the severity and the frequency of drought events will most likely increase substantially over the coming decades (Döll and Schmied, 2012; Larned *et al.*, 2010; Milly *et al.*, 2005). Indeed, most models agree that climate change will lead to more intense summer drought, higher temperature, and more frequent episodes of intense rainfall (Acuña, 2010; Sabater *et al.*, 2016).

In many river ecosystems, including intermittent rivers, the essential of the primary production is performed by benthic organisms, macrophytes or phototrophic biofilms. These biofilms are complex microbial communities composed of heterotrophic and phototrophic, eukaryotic and prokaryotic microorganisms embedded in a protective matrix of extracellular polymeric substances (EPS) (Lock, 1993). The functions fulfilled by phototrophic biofilms, such as photosynthesis, primary production, oxygen production, nutrients uptake and contaminants removal are at the base of key ecological functions of fluvial ecosystems (Battin *et al.*, 2003;

6. RESILIENCE FACE A UN DOUBLE STRESS (CU ET ASSECHEMENT)

Corcoll *et al.*, 2012; Lawrence *et al.*, 2001). They are largely implicated in geochemical cycles (Battin *et al.*, 2003, 2007). The “fixed” trait of biofilms make them particularly exposed to environmental and chemical stresses (Sabater *et al.*, 2002). Biofilms can have very high resilience capacities in terms of functions (photosynthesis, enzymatic activities) while their structure does not recover (Romaní and Sabater, 1997). Despite the frequency of hydrological disturbance and their effects on biofilms, few studies have investigated the combined effects of toxicants and hydrology in aquatic ecosystems, although these two pressures may frequently affect aquatic systems simultaneously or successively, with possible strong interactions. For instance, the toxicity of pollutants to biofilms may be augmented by a previous drought period as shown by Proia *et al.* (2013) who have evaluated the combined effects of drought and the fungicide tebuconazole. The biofilm exposed to both stresses showed more persistent effects and had a lower recovery than the biofilms exposed only to the pollutant. The interaction between two stressors may vary according to the biofilm component. Indeed, water intermittency and short-term exposure to a mixture of pharmaceutical compounds had cumulative effects on the algal component of biofilms, while the bacterial component exhibited co-tolerance (Corcoll *et al.*, 2015).

The environmental conditions can potentially modulate the response of biofilms to stressors or combined stressors. Light intensity, temperature and nutrients are the main factors that affect phototrophic microbial communities (Sabater *et al.*, 2016). Light is the principal energy source fuelling biofilm primary production: a modification of light intensity affects biofilm growth, its physiology and the community composition (Sabater *et al.*, 2002). Temperature increase can change algal diversity with the development of tolerant species to the detriment of more sensitive species (Di Pippo *et al.*, 2012). Furthermore, temperature has a marked influence on chemical toxicity (Holmstrup *et al.*, 2010). Lambert *et al.* (2016) showed that temperature can modulate phototrophic biofilm response to chronic copper exposure: an increase in temperature reduced Cu effects on algal biomass, photosynthetic efficiency and diatom composition. This can be explained by an increase of Cu-tolerant species at higher temperature. The availability and the concentration of nutrients also plays an important role on the phototrophic biofilm. As nutrient concentrations increase, the proportion of tolerant species increases whereas the abundance of sensitive species declines (Delgado *et al.*, 2012). This is particularly true for phosphorus (P) that is a limiting nutrient in many lotic ecosystem (Schindler, 1977; Schindler *et al.*, 2008).

6. RESILIENCE FACE A UN DOUBLE STRESS (CU ET ASSECHEMENT)

One essential component of biofilms is the matrix of exopolymers which gives its cohesion to the assemblage of organisms. These exopolymeric substances (EPS) are produced by bacteria and algae through excretion, sorption or cell lysis, and are mainly composed by polysaccharides and proteins with a certain amount of lipids, DNA and humic substances (Sheng *et al.*, 2010; Tansel and Tansel, 2013). EPS create strong gradients within the biofilm by limiting access to nutrients, oxygen and light intensity for the cells located far from the biofilm surface. Both the biofilm physical structure integrity due to EPS assembly and the plasticity of the organisms that live within it ensure and support their survival in harsh environments or under changing environmental conditions. Temperature and light have been shown to have indirect effects on the composition and the quantity of the EPS produced by biofilms (Di Pippo *et al.*, 2012; Loustau, *et al.*, 2019b (in preparation)). The EPS matrix protects the cells from desiccation and other environmental stresses (pollutants, UV radiation, *etc.*), contributes also to the adhesion of microorganisms on immersed substratum, supports the growth of the heterotrophic microorganisms and adsorbs and accumulates organic pollutants or metal cations present in the water column. Although EPS produced by microalgae represent an important mechanisms to tolerate such stresses (Schimel *et al.*, 2007), these pathways have not been studied in detail as yet.

In a context of global change, biofilms will likely be exposed to multiple stressors, in varying environmental conditions. The effects of these multiple stressors on aquatic ecosystem functioning remain to be determined (Segner *et al.*, 2014) as much as the effect of environmental conditions on the resilience of communities. The aim of this study was to assess in what extent classic environmental factors could modulate the resistance and the recovery of phototrophic biofilms exposed to realistic combined stressors. Biofilms were chosen as a model of aquatic community because of their importance for the functioning of the ecosystem, their good resilience capacities and their high risk to be exposed to stressors in the environment. The two stressors chosen were exposure to a low concentration of Cu, a known algicide, and drought. A special attention was given to the EPS produced by the biofilms, since they may be directly involved in the resistance mechanism to the two stressors, and since modifications in the inorganic component of biofilms may have noticeable consequences for the ecosystem. In a first step, three different and very simplified biofilms, with one algal species and the associated bacteria, were used.

MATERIAL AND METHODS

Experimental procedure

The three benthic microalgae used in the study are the diatom *Nitzschia palea*, the green alga *Uronema confervicolum* and the cyanobacterium *Phormidium autumnale*. They were isolated from phototrophic biofilms in the rivers Tarn and Garonne (Southwestern France) and maintained in non-axenic conditions in the algae collection of EcoLab (Toulouse, France).

Biofilms formed with one of these strains and the associated bacteria were cultivated in a combination of 2 light intensities ($70 \mu\text{mol s}^{-1} \text{m}^{-2}$, *L* - high light intensity or $30 \mu\text{mol s}^{-1} \text{m}^{-2}$, *l* - low light intensity) and 2 temperatures ($22 \text{ }^\circ\text{C}$, *T* - high temperature or $19 \text{ }^\circ\text{C}$, *t* - low temperature), at a medium P concentration (5.23 mg L^{-1} , *P100*). Two additional conditions were used, with high light intensity and high temperature at high (8.71 mg L^{-1} , *P165*) and low (2.61 mg L^{-1}) P concentrations.

For each microbial species, the experiment was carried out in six blocks composed of four hydraulic mini-channels pooled with a single closed circulating loop of nutrient medium, generating pseudo-replicates for biofilm sampling (for a complete description of the microcosms, see Loustau *et al.*, 2019a). A flow rate of 300 L h^{-1} was applied by the combination of the manual valve and a slope of 1.2%. The nutrient media was adapted to each species: BG11 medium (Stanier *et al.*, 1971) for *P. autumnale*, Combo medium (Kilham *et al.*, 1998) for *N. palea* and *U. confervicolum*. A circadian cycle of light / dark periods of 16 h / 8 h was applied. Individual pre-cultures of the three species were prepared for 21 days at 18°C in 500 mL Erlenmeyer flasks with nutrient media (light intensity: $30 \pm 5 \mu\text{mol s}^{-1} \text{m}^{-2}$). Before inoculation in the hydraulic mini-channels, the algal biomass was homogenized by using an Ultra-Turrax disperser (T25, Janke-Kunkel, 13,500 rpm, 1 min) and subdivided into equal inocula. During the first 2 weeks of cultivation in the microcosms (Time-14 to Time0), the six different environmental conditions were applied, one condition for one block of four mini-channels (**Figure 1**). Then, the nutrient media circulating in all the mini-channels blocks were supplemented with $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ to obtain a Cu concentration to $50 \mu\text{g L}^{-1}$ during 4 days (Time0 to Time4). After this period, the nutrient media were removed and a fast drought of the biofilms occurred. To study the recovery ability of the three phototrophic biofilm after 2 weeks of drought phase (Time4 to Time18), the biofilms were rewetted during 2 weeks (until Time32) by addition of fresh nutrient media with the corresponding P concentrations (*P50*, *P100* or *P165*). For each biofilm sampling, three replicates were taken.

6. RESILIENCE FACE A UN DOUBLE STRESS (CU ET ASSECHEMENT)

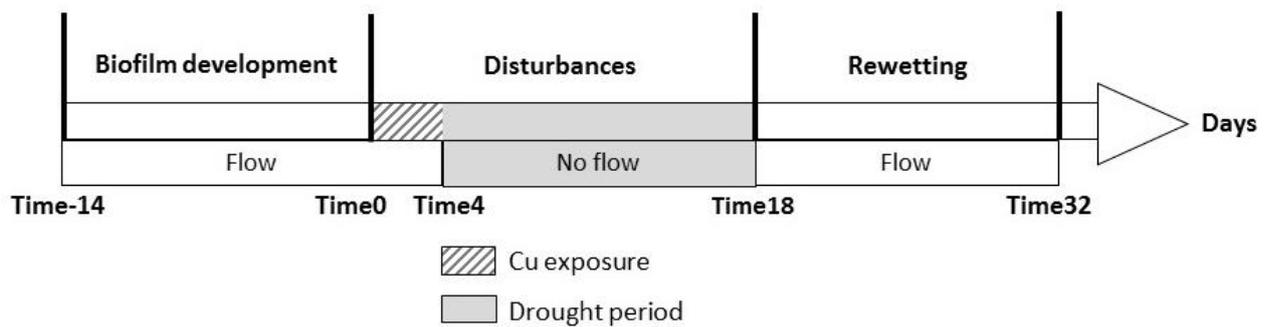


Figure 1 Experimental design realized during 46 days for the three mono-species phototrophic biofilms: after culture during 14 days under different conditions of temperature, light intensity or P concentration, a disturbance period during 18 days was applied (Cu exposure during 4 days followed by a drought period during 14 days). Then, biofilms grew with fresh nutrient media under the same culture conditions that during the first 14 days.

PhytoPam Measurements

PhytoPam measurements were performed by measuring fluorescence response to a saturating light flash after 20 minutes of dark adaptation (dark-adapted state (DAS) conditions) (Baker, 2008). The physiological state of algae was estimated from the maximal efficiency of the photosystem II (yield), corresponding to the transfer rate of electrons, thanks to the formula defined by Roháček and Barták (1999):

$$\Phi_{PSII} \text{ (DAS conditions)} = 1 - (F_0/F_M) ; 0 < \Phi_{PSII} < 1 \quad (1)$$

F_M represents the maximal fluorescence and F_0 corresponds to the minimal fluorescence of the photosystem II, in DAS conditions. Non-invasive PhytoPam measurements were performed before and after the disturbance period (Time0 and Time18) and after 2 weeks of biofilms rewetting (Time32). For each condition (one block), thirty-two total measurements were performed (eight for each mini-channel).

Extracellular polymeric substances assays

1. EPS extraction

EPS were extracted from 10 mg DW (dry weight) L^{-1} of biofilms suspension following the sequential method developed previously by Loustau *et al.* (2018): a pre-step of biomass

6. RESILIENCE FACE A UN DOUBLE STRESS (CU ET ASSECHEMENT)

suspension homogenization with an Ultra-Turrax disperser (T25, Janke-Kunkel) at 13,500 rpm for 1 min at room temperature followed by a first extraction step with 0.22% formamide and stirring at 150 rpm and 4 °C for 60 min, and a second extraction step with addition of cation exchange resin (CER, Dowex Marathon at 50 g g⁻¹ biofilm dry weight) stirred for 90 min at 150 rpm and 4 °C. After each first and second steps, the samples were centrifuged at 4,000 g for 15 min to recover the supernatants containing the extracted EPS. The total amount of EPS extracted was the sum of the EPS amounts contained in both supernatants (formamide + CER). The cellular integrity during the extraction steps was controlled by the measurement of chlorophyll *a* release in the supernatants (Loustau *et al.*, 2018). It allows to estimate the percentage of cell lysis due to the extraction treatments of each biomass sample.

2. Proteins and polysaccharides quantification

For each EPS extract, protein concentration (PN) was measured by the bicinchoninic acid (BCA) method (Smith *et al.*, 1985): 25 µL of each sample and 200 µL of BCA reagent (Sigma-Aldrich) were incubated in a 96-well microplate (15 min at 60 °C) before measuring the optical density at 540 nm with a microplate reader (Synergy Mx Biotek). Bovine serum albumin (BSA) was used as a standard with concentrations ranging from 0 to 800 mg L⁻¹.

Polysaccharide concentration (PS) was estimated using the anthrone method (Dreywood, 1946) allowing total carbohydrates to be quantified: 100 µL of each sample and 200 µL of anthrone reagent (2% anthrone in 96% sulfuric acid) were incubated in a 96-well microplate (30 min at 60 °C), cooled at room temperature for 10 min before measuring the optical density at 620 nm with the microplate reader. Glucose was used as a standard with concentrations ranging from 0 to 100 mg L⁻¹.

3. Total Organic Carbon

After acidification of the EPS extract with hydrochloric acid and volatilization of inorganic carbon by catalytic oxidation at 720 °C, the Total Organic Carbon (TOC) was analyzed with a Shimatzu TOC-L analyzer. Analyses were performed by the Physico-Chemical Analyses Platform of EcoLab (Toulouse, France).

Statistical analyses

The impact of the disturbance and the recovery after rewetting on the photosynthetic efficiency and EPS production (quantity and quality) were determined based on the measures realized at

6. RESILIENCE FACE A UN DOUBLE STRESS (CU ET ASSECHEMENT)

Time18 and Time32, respectively, and normalized by the measures obtained at Time0 (= baseline), as the following expressions:

$$\text{Impact (\%)} = 100 - (100 \times V_{\text{Time18}} / V_{\text{Time0}}) \quad (2)$$

$$\text{Recovery (\%)} = 100 \times V_{\text{Time32}} / V_{\text{Time0}} \quad (3)$$

where V_{Time0} represents the mean value of the parameter for the measures performed from one block (including four mini-channels) at Time0, and V_{Time18} and V_{Time32} represent the mean value of the same parameter for the measures performed from one mini-channel of the same block at Time18 and Time32, respectively.

A recovery rate during the rewetting period was calculated according to Ingrisch and Bahn (2018) for the photosynthetic efficiency and EPS production, as the following expression:

$$\text{Recovery rate (\% day}^{-1}\text{)} = [100 \times (V_{\text{Time32}} - V_{\text{Time18}}) / V_{\text{Time0}}] / (\text{Time32} - \text{Time18}) \quad (4)$$

For all analysis, the normality was checked on each dataset (photosynthetic efficiency and EPS production) with the Shapiro-Wilk test and data were transformed if needed. When data were normally distributed, two-way ANOVA was used to test the effects of temperature, light intensity or P concentration on the resistance and the recovery of the three phototrophic biofilms after the disturbance period and the rewetting period, respectively, followed by a Tukey post-hoc test. The non-parametric Kruskal-Wallis test was used with Mann-Whitney test for pairwise comparisons of non-parametric data. Data given in the text are means \pm standard error (SE). For all statistical analyses, significance was inferred at $p < 0.05$.

Results

In order to assess in what extent environmental factors (light intensity, temperature and P concentration) can modulate biofilm responses to combined disturbances, the impact of disturbance and the recovery of each biofilm were estimated for both photosynthesis activity and EPS. For each parameter, to better compare the resilience of biofilms, the results were presented with a bivariate representation as previously described by Ingrisch and Bahn (2018).

Biofilm photosynthetic efficiency

After 14 days of biofilm development, and before the application of the disturbance (Time0), the ranges of photosynthetic efficiency, specific to each algal group and dependent of the environmental factors chosen, were between 0.61 ± 0.03 to 0.72 ± 0.01 for *U. confervicolum*,

6. RESILIENCE FACE A UN DOUBLE STRESS (CU ET ASSECHEMENT)

0.59 ± 0.04 to 0.82 ± 0.01 for *N. palea* and 0.13 ± 0.01 to 0.20 ± 0.02 for *P. autumnale*. At the end of the disturbance period (Time18), a complete inhibition of the photosynthesis was observed associated to the drought, with a non-detectable yield for the three species in all culture conditions (leads to an impact value to 100%). This was completely independent from the environmental conditions (**Table 1**).

After two weeks of rewetting, *U. confervicolum* biofilm showed a full recovery of the initial photosynthetic efficiency, as reflected by no significant difference with yield values measured before and after the disturbance period (**Figure 2a**). Temperature and light intensity had no effect on the recovery rate of this green alga (**Figure 2d, Table 2**). In contrast, light intensity affected the recovery of *N. palea* photosynthetic efficiency ($p=0.0002$). Under the similar *P100* and temperature conditions, the recovery was significantly higher under the higher light intensity ($p=0.02$ at $19\text{ }^{\circ}\text{C}$ and $p<0.0001$ at $22\text{ }^{\circ}\text{C}$) (**Figure 2b**). Furthermore, temperature also influenced the resilience of the diatom biofilm ($p<0.0001$). With higher recovery rate values, the lower temperature tested appeared more favourable for photosynthesis recovery under similar light intensity and *P100* conditions (**Figure 2e**). As a consequence, biofilm diatom grown under *lt-P100* condition (lower light intensity, higher temperature, *P100*) showed the lowest recovery (**Figure 2b**). For *P. autumnale* biofilm, excepted for *lt-P100* condition where values before disturbance and after rewetting were similar, the photosynthetic efficiency was significantly higher after the recovery period than before disturbance under *P100* condition (**Figure 2c**). However, the recovery rates were different according to the culture conditions: the effect of the temperature was dependant on the luminosity (**Figure 2f**). Indeed, if no significant differences were observed at the higher light intensity for lower and higher temperature, the recovery rate was promoted by temperature when the biofilm was exposed at the lower light intensity tested ($p<0.0001$).

The P concentration factor influenced in a contrasted way the photosynthetic efficiency recovery of the three phototrophic biofilms (**Table 2**). Negative effects was observed for *U. confervicolum* and *N. palea* biofilms (**Figure 2d and e**), with a slower recovery rate for the *LT-165* condition compared to the *LT-P50* condition ($p=0.008$ for *U. confervicolum* and $p=0.0008$ for *N. palea*). On the contrary, the recovery rate of the cyanobacterium was significantly enhanced by a higher P concentration ($p<0.0001$) (**Figure 2f**).

6. RESILIENCE FACE A UN DOUBLE STRESS (CU ET ASSECHEMENT)

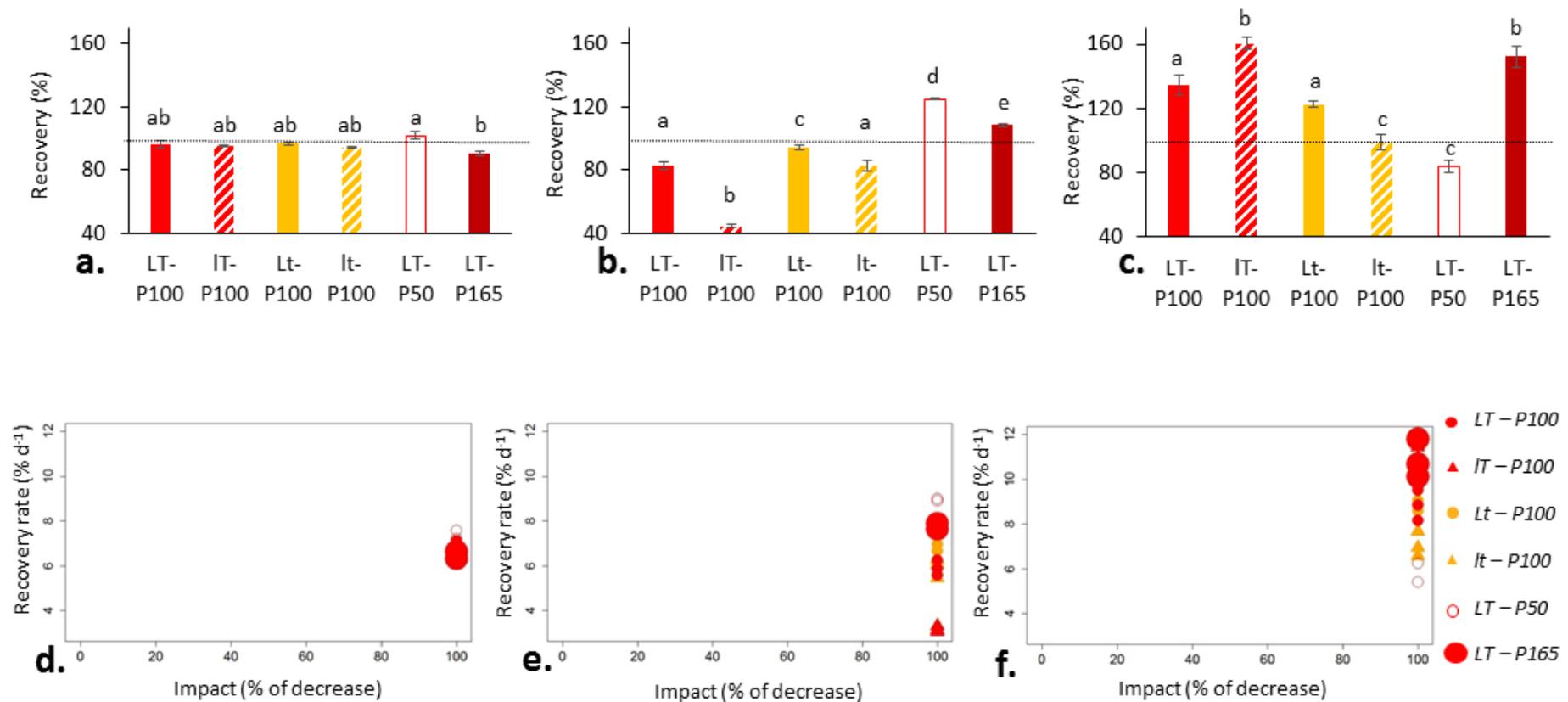


Figure 2 Effects of environmental factors on the photosynthetic efficiency of *U. confervicolum* (a. and d.), *N. palea* (b. and e.) and *P. autumnale* (c. and f.) phototrophic biofilms subjected to a Cu exposure during 4 days at $50 \mu\text{g L}^{-1}$ followed by a drought period during 14 days, and then to a rewetting period during 14 days ($n=3$). The values are given at day 18 for the impact of the disturbance and at day 32 for the recovery. The differences in temperature are represented by a variation of colour (orange for 19°C and red for 22°C), in light intensity by a variation of shape (round and triangle for 70 and $30 \mu\text{mol s}^{-1} \text{m}^{-2}$, respectively) and in P concentration by circle size.

Quantification of extracted EPS

At the end of the disturbance, EPS were quantified as equivalent TOC in the fractions obtained from each algal species after formamide and CER extraction steps (**Figure 3**). The evaluation of the cell lysis, realized with the measurement of the chlorophyll *a* released in the EPS extract, indicated $3.08 \pm 0.5\%$, $3.42 \pm 0.25\%$ and $3.46 \pm 0.23\%$ of cell lysis for *U. confervicolum*, *N. palea* and *P. autumnale* biofilms, respectively. After the biofilm development period (Time0), the amount of EPS extracted ranged from 37 ± 3 to 70 ± 3 mg TOC g⁻¹ DW of biofilm for *U. confervicolum*, 55 ± 3 to 81 ± 3 mg TOC g⁻¹ DW for *N. palea* and 56 ± 3 to 88 ± 4 mg TOC g⁻¹ DW for *P. autumnale*.

Temperature and light intensity conditions influenced the amounts of EPS extracted from *U. confervicolum* biofilm at the end of the disturbances (**Table 1**). Indeed, a significant increase of 36% ($p=0.02$) under *Lt-P100* condition compared to *LT-P100* ($p<0.0001$) or *IT-P100* ($p<0.0001$) was observed, which is reflected on the **Figure 3d** by a negative impact value for *Lt-P100* condition. The amounts of EPS extracted from *N. palea* biofilm at the end of the disturbance period were modulated by the temperature with a significant greater impact observed under the higher temperature exposure, with a decrease up to 55% of EPS extracted ($p=0.0006$ and 0.008 for *LT-P100* and *IT-P100*, respectively) (**Figure 3e**). Finally, the disturbances generated an impact in the amount of EPS extracted from *P. autumnale* biofilm with a decrease up to 63%, with no effect of the temperature or the light intensity (**Table 1**, **Figure 3f**).

After the rewetting period, the higher light intensity influenced the amount of EPS extracted from *U. confervicolum* biofilm, with an increase compared to pre-disturbance under low temperature (condition *Lt-P100*) (**Table 2**, **Figure 3a**). On the contrary, for *N. palea* biofilm, the temperature has an influence of the amounts of EPS extracted at the end of the rewetting period which were higher than before disturbance when the biofilm grown at the higher temperature ($p=0.003$ for *LT-P100* and $p=0.035$ for *IT-P100*) whereas no significant difference was observed with low temperature (**Figure 3b**). Finally, compared to the values before disturbance, the amounts of EPS extracted from *P. autumnale* biofilm were lower after the rewetting with a more important decrease under high light intensity (**Figure 3c**).

A change of light intensity and/or temperature has an influence on the recovery rates of *N. palea* and *P. autumnale* biofilms (**Figure 3e** and **f**). Indeed, as for the impact, the temperature influenced the *N. palea* resilience with a recovery rate of diatom biofilm exposed to the lower

6. RESILIENCE FACE A UN DOUBLE STRESS (CU ET ASSECHEMENT)

temperature lower than those exposed to the higher temperature. The cyanobacterium biofilm recovery rate was easier for the lower temperature regardless the light intensity (*Lt-P100*, $p=0.014$; *lt-P100*, $p=0.001$) or for the higher temperature and the lower light intensity (*lT-P100*, $p=0.014$). On the contrary, light intensity and temperature had no significant influence on the recovery rate of *U. confervicolum* biofilm (**Figure 3d**).

P concentration changed the recovery ability of the three phototrophic species (**Table 2**). The recovery ability of *U. confervicolum* biofilm was more important under the higher P concentration (*LT-P165*) than the lower (*LT-P50*) ($p=0.008$) (**Figure 3a**), which is consistent with the more positive impact of the disturbance observed for *LT-P165* (**d**). For this green alga biofilm grown under *LT-P50* condition, the positive impact (increase of 69% of extracted EPS) was more important than for *LT-P100* ($p=0.0002$) for which no impact was observed. Inversely, for *N. palea* biofilm, no impact was observed for the *LT-P50* condition, whereas under *LT-P100*, a significant decrease by 45% ($p=0.0005$) was obtained (**Figure 3e**). However, the *LT-P100* condition corresponded to the higher recovery rate for the diatom biofilm (**Figure 3e**). For the *P. autumnale* biofilm, there was no influence of P concentration on the impact of the disturbance on the amounts of extracted EPS after the disturbance period, with a mean value around $53 \pm 2\%$ (**Figure 3f**). For this cyanobacterium biofilm, *LT-P100* corresponded to the condition where the recovery rate was the lower.

Extracellular proteins and polysaccharides distribution in extracted EPS

In order to determine the impact of the disturbance on the distribution between proteins and polysaccharides in the extracted EPS, the ratio PN/PS was calculated before and after the disturbance period and after the rewetting period. Before the application of the disturbance, this ratio PN/PS ranged from 1.31 ± 0.17 to 5.39 ± 1.17 for *U. confervicolum*, 2.63 ± 0.23 to 5.98 ± 0.74 for *N. palea* and 0.61 ± 0.09 to 2.21 ± 0.23 for *P. autumnale* biofilms.

6. RESILIENCE FACE A UN DOUBLE STRESS (CU ET ASSECHEMENT)

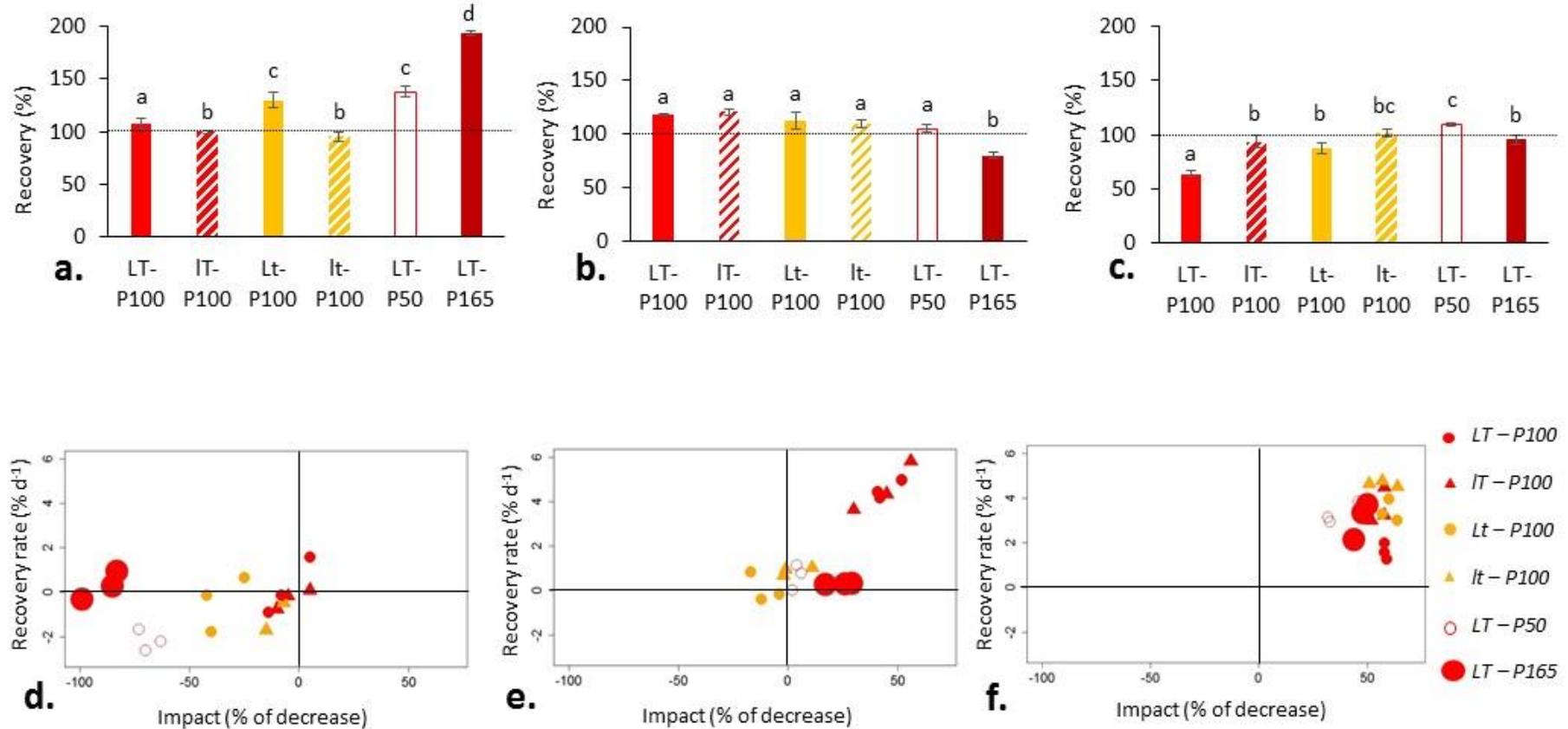


Figure 3 Effects of environmental factors on the amounts of extracted EPS produced by *U. confervicolum* (a. and d.), *N. palea* (b. and e.) and *P. autumnale* (c. and f.) phototrophic biofilms subjected to a Cu exposure during 4 days at $50 \mu\text{g L}^{-1}$ followed by a drought period during 14 days, and then to a rewetting period during 14 days ($n=3$). The values are given at day 18 for the impact of the disturbance and at day 32 for the recovery. The differences in temperature are represented by a variation of colour (orange for 19°C and red for 22°C), in light intensity by a variation of shape (round and triangle for 70 and $30 \mu\text{mol s}^{-1} \text{m}^{-2}$, respectively) and in P concentration by circle size.

6. RESILIENCE FACE A UN DOUBLE STRESS (CU ET ASSECHEMENT)

Both light intensity and temperature changed the disturbance impact on the PN/PS ratios of EPS extracted from *U. confervicolum* biofilm (**Table 1**). Indeed, the PN/PS ratios increased by approximately $48 \pm 11\%$ under high temperature whereas a decrease by $50 \pm 7\%$ was observed with *lt-P100* condition (**Figure 4d**). On the contrary, under *LT-P100* condition, no significant difference on the PN/PS ratios was observed during the disturbance period. The disturbance period created a drastic modification in the EPS composition of *N. palea* biofilm with a significant decrease of the PN/PS ratios by 53 to 94% (**Figure 4e**), which was the result of a simultaneous increase of PS and decrease of PN (results not shown). By contrast, temperature and light intensity induced no modulation of the disturbance impact on the PN/PS ratios (**Table 1**). As for the diatom, a decrease of the PN/PS ratio was observed for the *P. autumnale* biofilm in response to the disturbance (**Figure 4f**). The light intensity influenced the response in terms of PN/PS ratios with a lower impact under *LT-P100* condition ($p= 0.0031$).

At the end of the rewetting period, PN/PS ratios of *U. confervicolum* biofilm were lower but closed to that achieved before the disturbance (**Figure 4a**). On the contrary, the rewetting period allowed only a partial recovery on the PN/PS ratios of *N. palea* and *P. autumnale* biofilms: PN/PS ratios were lower (largely lower for *N. palea* biofilm) than that achieved before the disturbance period (**Figure 4b and c**).

For the three phototrophic species, the P concentration influenced the impact of the disturbance. Indeed, the positive (for *U. confervicolum*) or negative (for *N. palea* and *P. autumnale*) impacts on the PN/PS ratios were more important with the higher P concentration tested (*LT-P165*). However, *LT-P165* corresponded to the condition where the ratio was the lowest for *N. palea* and *P. autumnale* biofilms due to higher PS production (data not shown), whereas under this condition, *U. confervicolum* biofilm gave the highest PN/PS ratio due to a lower PS presence in the extracted EPS post-disturbance.

For the three phototrophic species, neither the temperature nor light intensity tested had a significant effect on the recovery rate of PN/PS ratios during the rewetting period (**Table 2**). For the green alga biofilm, the P concentration influenced the recovery rate of the PN/PS ratio measured at the end of the rewetting period. Indeed, with the lower P concentration tested (*LT-P50*), the recovery rate was higher than those obtained under *LT-P100* ($p= 0.023$) and *LT-P165* ($p= 0.031$) conditions. On the contrary, the three P concentrations tested did not change the PN/PS ratios of *P. autumnale* and *N. palea* biofilms during the rewetting period.

6. RESILIENCE FACE A UN DOUBLE STRESS (CU ET ASSECHEMENT)

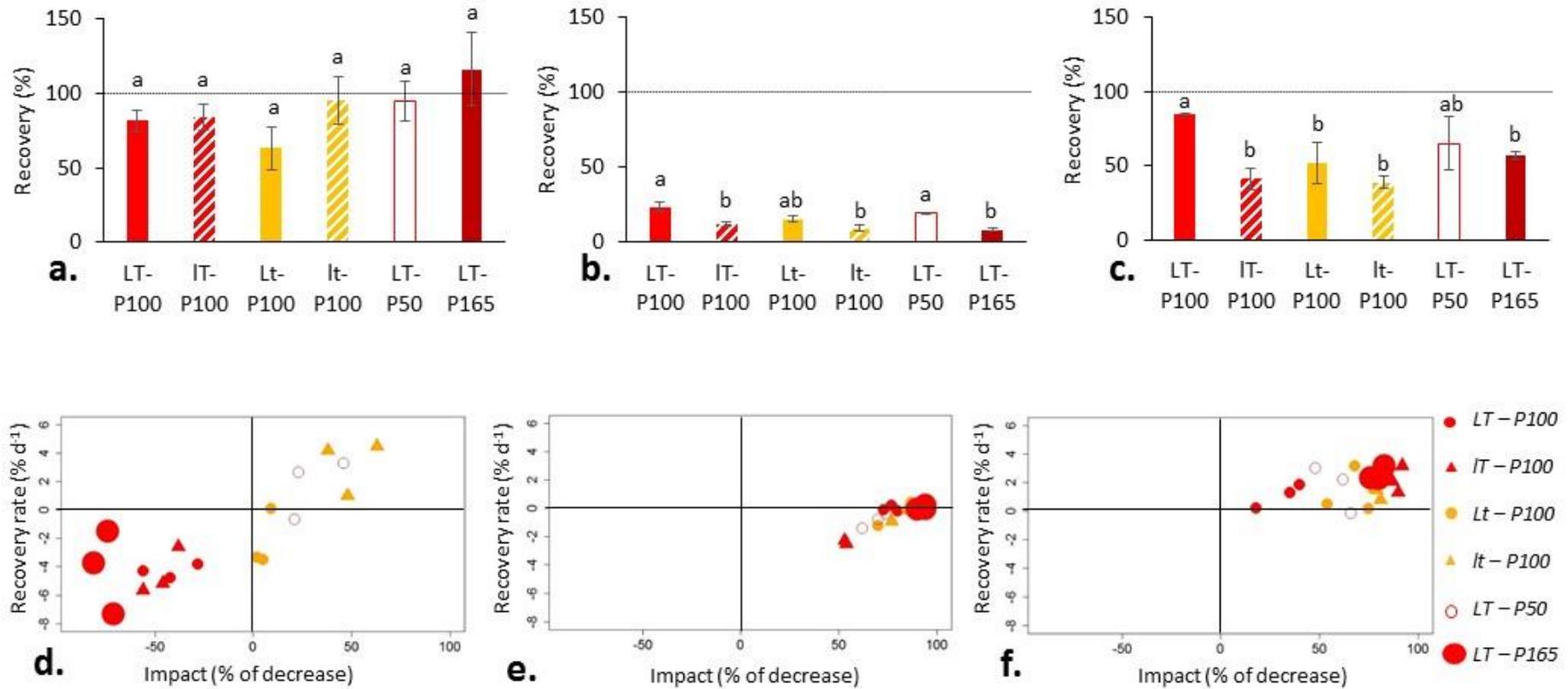


Figure 4 Effects of environmental factors on the quality (PN/PS ratio) of extracted EPS produced by *U. confervicolum* (a. and d.), *N. palea* (b. and e.) and *P. autumnale* (c. and f.) phototrophic biofilms subjected to a Cu exposure during 4 days at $50 \mu\text{g L}^{-1}$ followed by a drought period during 14 days, and then to a rewetting period during 14 days ($n=3$). The values are given at day 18 for the impact of the disturbance and at day 32 for the recovery. The differences in temperature are represented by a variation of colour (orange for 19°C and red for 22°C), in light intensity by a variation of shape (round and triangle for 70 and $30 \mu\text{mol s}^{-1} \text{m}^{-2}$, respectively) and in P concentration by circle size.

6. RESILIENCE FACE A UN DOUBLE STRESS (CU ET ASSECHEMENT)

Table 1 Results of two-way ANOVA for the influence of environmental factors (light intensity, temperature and P concentration) on the impact of disturbances for the three phototrophic biofilms. Significant p-values are in bold.

		Light intensity	Temperature	Light * Temp	P concentration
<i>U. confervicolum</i>	Yield	1	1	1	1
	TOC	0.0464	0.0040	0.1102	< 0.0001
	PN/PS	0.0084	0.0514	0.0098	0.0273
<i>N. palea</i>	Yield	1	1	1	1
	TOC	0.8198	0.0002	0.1452	0.0002
	PN/PS	0.5188	0.1895	0.1049	0.0013
<i>P. autumnale</i>	Yield	1	1	1	1
	TOC	0.7831	0.0606	0.327	0.0509
	PN/PS	0.0031	0.1289	0.1095	0.0002

Table 2 Results of two-way ANOVA for the influence of environmental factors (light intensity, temperature and P concentration) on the recovery after disturbances for the three phototrophic biofilms. Significant p-values are in bold.

		Light intensity	Temperature	Light * Temp	P concentration
<i>U. confervicolum</i>	Yield	0.5244	0.8778	0.6906	0.0006
	TOC	0.7432	0.6132	0.5733	0.0077
	PN/PS	0.8409	0.4627	0.3276	0.0024
<i>N. palea</i>	Yield	0.0002	< 0.0001	0.0068	< 0.0001
	TOC	0.2950	< 0.0001	0.3984	< 0.0001
	PN/PS	0.1491	0.3588	0.0821	0.0510
<i>P. autumnale</i>	Yield	0.7118	0.0597	0.0224	0.0013
	TOC	0.0020	0.0037	0.2082	0.0249
	PN/PS	0.7000	0.1471	0.6400	0.4772

Discussion

In this study, we investigated how environmental factors such as temperature, light intensity and P concentration in the culture medium can affect the resilience of phototrophic biofilms after a Cu exposure followed by a biomass drought. To better understand the effects of these highly variable environmental factors, the most reasonable approach was to work with simplified biofilms cultivated under controlled conditions. Both resistance and recovery, the two major underlying processes of resilience (Hodgson *et al.*, 2015; Nimmo *et al.*, 2015), have been assessed to analyse the responses of biofilms to the combined disturbances.

The functional responses of biofilms after metal exposure followed by drought, assessed through photosynthetic efficiency, depended on the environmental conditions and on the algal species. Independently of environmental factors, the diatom *Nitzschia palea* diatom had a lower resilience ability than the other two species, with only a partial recovery in optimum PSII quantum efficiency. On the contrary, the photosynthetic efficiency of *Uronema confervicolum* biofilm showed an almost full recovery after 14 days of rewetting, which highlights the high resilience capacity to desiccation of this green alga. The recovery ability of the *Phormidium autumnale* biofilm was also remarkable. Indeed, except for the low P concentration (*LT-P50*) and for the *lt-P100*, for the other conditions the final yield value was higher than before the disturbance.

A decrease in the yield may be linked to a direct impairment of the PSII (Juneau *et al.*, 2002) or it could be a response to a general toxicity, such as the one induced by DNA damaging agents (Tetu *et al.*, 2013). Reduced yields of photosynthesis may also be the results of physiological cascades initiated by a nonspecific permeability of cell membranes (Einhellig, 2004). The lower resilience of the diatom biofilm observed here is consistent with results from earlier studies. Indeed, flow interruption caused a significant decrease of living diatoms and in their photosynthetic capacity (Corcoll *et al.*, 2015; Proia *et al.*, 2013). On the contrary, compared to pre-disturbance, Barthès *et al.* (2015) observed a diatom photosynthetic efficiency higher after 5 weeks of dry phase of a natural biofilm followed by 2 weeks of rewetting. In their study, the biofilm was exposed only to desiccation whereas in our study the *N. palea* biofilm was subjected to two stressors. The additional stress generated by a copper exposure can explain this lower resilience capacity. Community response depends on the microorganisms capacity

6. RESILIENCE FACE A UN DOUBLE STRESS (CU ET ASSECHEMENT)

to tolerate each stressor and on the possible occurrence of positive or negative co-tolerance (Tlili *et al.*, 2011).

The contrasted ability of microorganisms to withstand combined stresses may be related to differences in morphology and cell wall thickness. *U. confervicolum* and *P. autumnale* form long, strong and thick filaments while the pennate diatom strain has much smaller isolated cells, less able to resist against perturbation such as water loss. Consequently, the physiological plasticity of *N. palea* cells is likely the lowest.

The recovery ability of the diatom strain was also the most impacted by a modification of temperature or light intensity. The lower temperature and the higher light intensity tested (*Lt-P100*) facilitated the recovery of *N. palea* photosynthetic efficiency. Unlike light intensity and temperature, P concentration in the culture medium influences the recovery ability of the three biofilms. Similarly to the results obtained by Leflaive *et al.* (2015) where biofilm were exposed to Ag contamination, P concentration tended here to reduce the impact of the disturbance only for the cyanobacterium biofilm. Such contrasted modulation of biofilm resilience by P concentration may have some consequences in terms of biofilm species composition after a disturbance in natural environments. As nutrient concentration increase, the abundance of tolerant taxa such as *P. autumnale* would increase whereas the abundance and richness of sensitive taxa such as *N. palea* and *U. confervicolum* would decline. After a drought period, the nutrient composing the circulating water would therefore play a key role in the phototrophic biofilm recovery, with potential consequences in terms of biofilm composition and ecosystem functioning.

Algal species have evolved various metabolic adaptations and defence systems to survive to a variety of environmental stresses. Four days of metal exposure at not toxic concentration followed by two weeks of drought was enough to cause changes in the EPS quantity of the three phototrophic biofilms. This impact was different for the three phototrophic species and depended on the environmental factors (temperature, light intensity and P concentration). Following the combined disturbance, the cyanobacterium biofilm showed a decrease up to 63% for EPS extracted regardless of environmental factors. Similarly to *P. autumnale* biofilm, the amount of EPS extracted from *N. palea* biofilm decreased at the end of the disturbance period, with the exception for biofilms grown under the lower temperature (*Lt-P100* and *lt-P100*) and the lower P concentration (*LT-P50*) where the amount remained constant. On the contrary, if the amount of EPS extracted from *U. confervicolum* biofilm was not modified by the

6. RESILIENCE FACE A UN DOUBLE STRESS (CU ET ASSECHEMENT)

disturbance under low light intensity (*IT-P100* and *lt-P100*) and for *LT-P100*, an increase of extracted EPS was observed for the others conditions. This result suggests that the modulation of EPS production can be an important element by providing a protective barrier against disturbance or a carbon source. Indeed, drying disturbance encompass multiple stress such as limitation of substrate and nutrient diffusion (Schimel *et al.*, 2007) which can be limited by the use of polymers as a C source by the phototrophic cells. Inversely, *U. confervicolum* EPS form the viscous mucilage that surrounds cells (Underwood and Paterson, 2003) and probably play an important role in cell protection when conditions become unfavourable.

Although the impact of combined stresses on the quantity of EPS extracted depended on environmental factors, the diatom and the green alga biofilms were resilient with a similar quantity of EPS before disturbance and after rewetting periods without influence of the temperature and the light intensity. This resilience ability was due to a high resistance of the biofilms to the disturbance, or a high recovery during the two rewetting weeks. On the contrary, the amount of EPS extracted from *P. autumnale* biofilm at the end of the rewetting period depended on the environmental factors with, in some cases, a partial resilience on the EPS composing the biofilm matrix. For the diatom and the cyanobacterium species, we observed modifications of EPS composition with an increase of polysaccharides at the end of the disturbance period and a lower recovery, which resulted in a conservation of the PN/PS ratio at the end of the rewetting period. However, to verify the stability of the new state, it would have been necessary to follow rewetted biofilms during a longer period. These benthic microorganisms enhanced the secretion of polysaccharides, which are highly sticky and form a hydrated matrix embedding and protecting cells. Extracellular polysaccharides, probably very hydrophilic, could be very efficient to retain interstitial pore water and protect phototrophic cells against desiccation. This is in agreement with Orvain *et al.* (2014) who think that polysaccharides are implicated in the formation of a protective wall, supplying hydrophilic and stabilizing properties that could convey important functions to the biofilm matrix in terms of resistance to environmental stresses. Certain sugars, mainly non reducing disaccharides, may take the place of water in preventing the disintegration of membranes as cells dry and the aggregation of macromolecules (Alpert and Oliver, 2002). The increase of the proteins fraction in the green alga biofilm matrix after the disturbance period, under the higher temperature conditions (*LT-P100* and *IT-P100*) and *LT-P165*, is responsible of the biofilm structure and the hydration maintain. Microorganisms tolerate desiccation through a set of molecular

6. RESILIENCE FACE A UN DOUBLE STRESS (CU ET ASSECHEMENT)

mechanisms including polysaccharides that replace water and form a reservoir for water and proteins that stabilize macromolecules and membranes.

To complete this study, it can be useful to analyze the efficient antioxidant machinery responses that counter damage by reactive oxygen species (ROS). Indeed, when the balance between ROS production and elimination is disturbed, the cellular damages are manifested in the form of degradation of biomolecules like pigments, proteins, polysaccharides and DNA that ultimately amalgamate in cellular death (Das and Roychoudhury, 2014). Consequently, in complement to EPS analyses, studies of enzymatic and antioxidant activities can be used to improve understanding of phototrophic biofilms responses to multi-stresses.

The results of this study showed divergent responses, which are function of species composing the phototrophic biofilm. More investigations are necessary to anticipate the effect of a temporary disturbance on microbial physiology in natural biofilm.

During the last decade, the number of studies considering the resilience of biofilms increased, as well as the number of studies considering the responses of ecosystem components to combined stresses. However, the studies focusing on the modulation of ecosystem resilience ability by environmental conditions remain very scarce. In a context of global change, with an increasing frequency of disturbances, a considerable effort should be made in this direction.

ACKNOWLEDGEMENTS

This work was funded by the Idex UNITI grant of the University of Toulouse, France (No. 2016 – 46 – CIF – D – DRDV). We thank Jessica Ferriol for PhytoPam measurements and Didier Lambrigot for TOC measurements.

References

- Acuña, V. (2010) Flow regime alteration effects on the organic C dynamics in semiarid stream ecosystems. In, *Global Change and River Ecosystems—Implications for Structure, Function and Ecosystem Services*. Springer, pp. 233–242.
- Alpert, P. and Oliver, M.J. (2002) Drying without dying. *Desiccation Surviv. Plants Dry. Dying* 3–43.
- Baker, N.R. (2008) Chlorophyll fluorescence: a probe of photosynthesis in vivo. *Annu Rev Plant Biol* **59**: 89–113.
- Barthès, Ten-Hage, L., Lamy, A., Rols, J.-L., and Leflaive, J. (2015) Resilience of aggregated microbial communities subjected to drought—small-scale studies. *Microb. Ecol.* **70**: 9–20.
- Battin, T.J., Kaplan, L.A., Newbold, J.D., and Hansen, C.M. (2003) Contributions of microbial biofilms to ecosystem processes in stream mesocosms. *Nature* **426**: 439.
- Bonada, N. and Resh, V.H. (2013) Mediterranean-climate streams and rivers: geographically separated but ecologically comparable freshwater systems. *Hydrobiologia* **719**: 1–29.
- Corcoll, N., Bonet, B., Morin, S., Tlili, A., Leira, M., and Guasch, H. (2012) The effect of metals on photosynthesis processes and diatom metrics of biofilm from a metal-contaminated river: a translocation experiment. *Ecol. Indic.* **18**: 620–631.
- Corcoll, N., Casellas, M., Huerta, B., Guasch, H., Acuña, V., Rodríguez-Mozaz, S., et al. (2015) Effects of flow intermittency and pharmaceutical exposure on the structure and metabolism of stream biofilms. *Sci. Total Environ.* **503**: 159–170.
- Costello, E.K., Stagaman, K., Dethlefsen, L., Bohannan, B.J., and Relman, D.A. (2012) The application of ecological theory toward an understanding of the human microbiome. *Science* **336**: 1255–1262.
- Das, K. and Roychoudhury, A. (2014) Reactive oxygen species (ROS) and response of antioxidants as ROS-scavengers during environmental stress in plants. *Front. Environ. Sci.* **2**: 53.
- Datry, T., Bonada, N., and Boulton, A.J. (2017) Intermittent Rivers and Ephemeral Streams: Ecology and Management. *Elsevier* 1–20.
- Delgado, C., Pardo, I., and García, L. (2012) Diatom communities as indicators of ecological status in Mediterranean temporary streams (Balearic Islands, Spain). *Ecol. Indic.* **15**: 131–139.

6. RESILIENCE FACE A UN DOUBLE STRESS (CU ET ASSECHEMENT)

- Di Pippo, F., Ellwood, N.T.W., Guzzon, A., Siliato, L., Micheletti, E., De Philippis, R., and Albertano, P.B. (2012) Effect of light and temperature on biomass, photosynthesis and capsular polysaccharides in cultured phototrophic biofilms. *J. Appl. Phycol.* **24**: 211–220.
- Döll, P. and Schmied, H.M. (2012) How is the impact of climate change on river flow regimes related to the impact on mean annual runoff? A global-scale analysis. *Environ. Res. Lett.* **7**: 014037.
- Dreywood, R. (1946) Qualitative test for carbohydrate material. *Ind. Eng. Chem. Anal. Ed.* **18**: 499–499.
- Einhellig, F.A. (2004) Mode of allelochemical action of phenolic compounds CRC Press: Boca Raton, FL, USA.
- Gonzalez, A., King, A., Robeson II, M.S., Song, S., Shade, A., Metcalf, J.L., and Knight, R. (2012) Characterizing microbial communities through space and time. *Curr. Opin. Biotechnol.* **23**: 431–436.
- Hodgson, D., McDonald, J.L., and Hosken, D.J. (2015) What do you mean, “resilient”? *Trends Ecol. Evol.* **30**: 503–506.
- Holmstrup, M., Bindesbøl, A.-M., Oostingh, G.J., Duschl, A., Scheil, V., Köhler, H.-R., et al. (2010) Interactions between effects of environmental chemicals and natural stressors: a review. *Sci. Total Environ.* **408**: 3746–3762.
- Ingrisch, J. and Bahn, M. (2018) Towards a comparable quantification of resilience. *Trends Ecol. Evol.*
- Juneau, P., El Berdey, A., and Popovic, R. (2002) PAM fluorometry in the determination of the sensitivity of *Chlorella vulgaris*, *Selenastrum capricornutum*, and *Chlamydomonas reinhardtii* to copper. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* **42**: 155–164.
- Kilham, S.S., Kreeger, D.A., Lynn, S.G., Goulden, C.E., and Herrera, L. (1998) COMBO: a defined freshwater culture medium for algae and zooplankton. *Hydrobiologia* **377**: 147–159.
- Lambert, A.S., Dabrin, A., Morin, S., Gahou, J., Foulquier, A., Coquery, M., and Pesce, S. (2016) Temperature modulates phototrophic periphyton response to chronic copper exposure. *Environ. Pollut.* **208**: 821–829.
- Larned, S.T., Datry, T., Arscott, D.B., and Tockner, K. (2010) Emerging concepts in temporary-river ecology. *Freshw. Biol.* **55**: 717–738.

6. RESILIENCE FACE A UN DOUBLE STRESS (CU ET ASSECHEMENT)

- Lawrence, J.R., Kopf, G., Headley, J.V., and Neu, T.R. (2001) Sorption and metabolism of selected herbicides in river biofilm communities. *Can. J. Microbiol.* **47**: 634–641.
- Ledger, M.E., Harris, R.M., Armitage, P.D., and Milner, A.M. (2008) Disturbance frequency influences patch dynamics in stream benthic algal communities. *Oecologia* **155**: 809–819.
- Leflaive, J., Felten, V., Ferriol, J., Lamy, A., Ten-Hage, L., Bec, A., and Danger, M. (2015) Community structure and nutrient level control the tolerance of autotrophic biofilm to silver contamination. *Environ. Sci. Pollut. Res.* **22**: 13739–13752.
- Lock, M.A. (1993) Attached microbial communities in rivers. *Aquat. Microbiol. Ecol. Approach Blackwell Oxf.* 113–138.
- Loustau, E., Ferriol, J., Koteiche, S., Gerlin, L., Leflaive, J., Moulin, F.Y., Girbal-Neuhauser, E., and Rols, J.L. (2019a) Physiological responses of three mono-species phototrophic biofilms exposed to copper and zinc.
- Loustau, E., Ferriol, J., Leflaive, J., Girbal-Neuhauser, E., and Rols, J.L. (2019b) Effect of environmental parameters on the phototrophic biofilms physiology: consequences on the interaction with Cu.
- Loustau, E., Rols, J.-L., Leflaive, J., Marcato-Romain, C.-E., and Girbal-Neuhauser, E. (2018) Comparison of extraction methods for the characterization of extracellular polymeric substances from aggregates of three biofilm-forming phototrophic microorganisms. *Can. J. Microbiol.*
- Milly, P.C., Dunne, K.A., and Vecchia, A.V. (2005) Global pattern of trends in streamflow and water availability in a changing climate. *Nature* **438**: 347.
- Montuelle, B., Dorigo, U., Bérard, A., Volat, B., Bouchez, A., Tlili, A., et al. (2010) The periphyton as a multimetric bioindicator for assessing the impact of land use on rivers: an overview of the Ardières-Morcille experimental watershed (France). *Hydrobiologia* **657**: 123–141.
- Nimmo, D.G., Mac Nally, R., Cunningham, S.C., Haslem, A., and Bennett, A.F. (2015) Vive la résistance: reviving resistance for 21st century conservation. *Trends Ecol. Evol.* **30**: 516–523.
- Oliver, T.H., Heard, M.S., Isaac, N.J., Roy, D.B., Procter, D., Eigenbrod, F., et al. (2015) Biodiversity and resilience of ecosystem functions. *Trends Ecol. Evol.* **30**: 673–684.
- Orvain, F., De Crignis, M., Guizien, K., Lefebvre, S., Mallet, C., Takahashi, E., and Dupuy, C. (2014) Tidal and seasonal effects on the short-term temporal patterns of bacteria,

6. RESILIENCE FACE A UN DOUBLE STRESS (CU ET ASSECHEMENT)

- microphytobenthos and exopolymers in natural intertidal biofilms (Brouage, France). *J. Sea Res.* **92**: 6–18.
- Proia, L., Vilches, C., Boninneau, C., Kantiani, L., Farré, M., Romaní, A.M., et al. (2013) Drought episode modulates the response of river biofilms to triclosan. *Aquat. Toxicol.* **127**: 36–45.
- Reichstein, M., Bahn, M., Ciais, P., Frank, D., Mahecha, M.D., Seneviratne, S.I., et al. (2013) Climate extremes and the carbon cycle. *Nature* **500**: 287.
- Roháček, K. and Barták, M. (1999) Technique of the modulated chlorophyll fluorescence: basic concepts, useful parameters, and some applications. *Photosynthetica* **37**: 339.
- Romaní, A.M. and Sabater, S. (1997) Metabolism recovery of a stromatolitic biofilm after drought in a Mediterranean stream. *Arch. Für Hydrobiol.* 261–271.
- Roux-Barthès, A. (2014) Biofilms phototrophes de rivières non permanentes: Dynamiques des communautés microbiennes et des populations de diatomées et pertinence de leur utilisation en bioindication.
- Rykiel, J. and Edward, J. (1985) Towards a definition of ecological disturbance. *Aust. J. Ecol.* **10**: 361–365.
- Sabater, S., Guasch, H., Romaní, A., and Muñoz, I. (2002) The effect of biological factors on the efficiency of river biofilms in improving water quality. *Hydrobiologia* **469**: 149–156.
- Sabater, S., Timoner, X., Borrego, C., and Acuña, V. (2016) Stream biofilm responses to flow intermittency: from cells to ecosystems. *Front. Environ. Sci.* **4**: 14.
- Schimel, J., Balsler, T.C., and Wallenstein, M. (2007a) Microbial stress-response physiology and its implications for ecosystem function. *Ecology* **88**: 1386–1394.
- Schimel, J., Balsler, T.C., and Wallenstein, M. (2007b) Microbial stress-response physiology and its implications for ecosystem function. *Ecology* **88**: 1386–1394.
- Schindler, D.W. (1977) Evolution of phosphorus limitation in lakes. *Science* **195**: 260–262.
- Schindler, D.W., Hecky, R.E., Findlay, D.L., Stainton, M.P., Parker, B.R., Paterson, M.J., et al. (2008) Eutrophication of lakes cannot be controlled by reducing nitrogen input: results of a 37-year whole-ecosystem experiment. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **105**: 11254–11258.
- Segner, H., Schmitt-Jansen, M., and Sabater, S. (2014) Assessing the impact of multiple stressors on aquatic biota: the receptor's side matters ACS Publications.

6. RESILIENCE FACE A UN DOUBLE STRESS (CU ET ASSECHEMENT)

- Sheng, G.-P., Yu, H.-Q., and Li, X.-Y. (2010) Extracellular polymeric substances (EPS) of microbial aggregates in biological wastewater treatment systems: a review. *Biotechnol. Adv.* **28**: 882–894.
- Smith, P.K., Krohn, R.I., Hermanson, G.T., Mallia, A.K., Gartner, F.H., Provenzano, Md., et al. (1985) Measurement of protein using bicinchoninic acid. *Anal. Biochem.* **150**: 76–85.
- Stampfli, N.C., Knillmann, S., Liess, M., Noskov, Y.A., Schäfer, R.B., and Beketov, M.A. (2013) Two stressors and a community—Effects of hydrological disturbance and a toxicant on freshwater zooplankton. *Aquat. Toxicol.* **127**: 9–20.
- Stanier, R.Y., Kunisawa, R., Mandel, M., and Cohen-Bazire, G. (1971) Purification and properties of unicellular blue-green algae (order *Chroococcales*). *Bacteriol. Rev.* **35**: 171.
- Tansel, B. and Tansel, D.Z. (2013) Adhesion strength and spreading characteristics of EPS on membrane surfaces during lateral and central growth. *Colloids Surf. B Biointerfaces* **111**: 594–599.
- Ternes, T.A., Stumpf, M., Mueller, J., Haberer, K., Wilken, R.-D., and Servos, M. (1999) Behavior and occurrence of estrogens in municipal sewage treatment plants—I. Investigations in Germany, Canada and Brazil. *Sci. Total Environ.* **225**: 81–90.
- Tetu, S.G., Johnson, D.A., Varkey, D.R., Phillipy, K., Stuart, R.K., Dupont, C., et al. (2013) Impact of DNA damaging agents on genome-wide transcriptional profiles in two marine *Synechococcus* species. *Front. Microbiol.* **4**: 232.
- Tlili, A., Maréchal, M., Bérard, A., Volat, B., and Montuelle, B. (2011) Enhanced co-tolerance and co-sensitivity from long-term metal exposures of heterotrophic and autotrophic components of fluvial biofilms. *Sci. Total Environ.* **409**: 4335–4343.
- Underwood, G.J. and Paterson, D.M. (2003) The importance of extracellular carbohydrate production by marine epipelagic diatoms. *Adv. Bot. Res.* **40**: 183–240.

CHAPITRE VII

CONCLUSION GENERALE ET

PERSPECTIVES

Mes travaux de thèse s'inscrivent dans un contexte intégrant les changements globaux associés à des pressions anthropiques croissantes, qui conduisent à une modification des facteurs environnementaux associés et *in fine* à l'altération de la qualité physico-chimique des cours d'eau. Premier maillon de la chaîne trophique, le devenir du biofilm phototrophe dans les écosystèmes aquatiques est une thématique centrale dans l'évaluation et la protection de la biodiversité. Afin de prédire le comportement des ETM seuls ou en mélange ainsi que les impacts qu'ils peuvent avoir à l'échelle de l'écosystème, il est nécessaire de s'intéresser à ces biofilms qui régissent le devenir des ETM dans l'environnement. Les biofilms phototrophes sont de nos jours un modèle couramment utilisé en écotoxicologie et dans la bio-indication afin d'évaluer la qualité des écosystèmes aquatiques. Malheureusement, la complexité du fonctionnement d'un biofilm en milieu naturel ainsi que la multitude de facteurs à considérer rendent difficile l'interprétation de l'impact d'un facteur sur la communauté des microorganismes phototrophes.

C'est dans cette optique qu'a été réalisé ce travail de thèse au cours duquel nous avons voulu comprendre la dynamique de différentes populations de microorganismes phototrophes en réponse à une modification des conditions environnementales dans un cours d'eau où les concentrations en ETM sont importantes. Pour cela, l'ensemble de nos expérimentations ont été réalisées sur des biofilms mono-espèce, ce qui nous a permis de travailler à l'échelle de la population sans tenir compte de la dynamique de successions écologiques associées à une communauté complexe (au sens biofilm naturel). En effet, plusieurs types d'interactions interspécifiques peuvent alors avoir lieu au sein de biofilms (Little *et al.*, 2008) influençant potentiellement la physiologie de chacune des espèces lors d'une exposition à un contaminant. Nous avons donc pu analyser la réponse spécifique et le comportement de différentes algues benthiques et ainsi avoir une idée des stratégies d'adaptation de chacune d'elle, notamment par la quantité et qualité des EPS produites. Bien que ces résultats ne puissent pas être extrapolés au cas d'un biofilm phototrophe complexe, cette approche est nécessaire pour décortiquer la contribution potentielle de chaque acteur au sein d'un biofilm phototrophe naturel.

1. Protocole d'extraction des EPS de biofilms phototrophes : compromis entre quantité de polymères extraits et lyse cellulaire

Nous avons émis comme hypothèse que la réponse des communautés phototrophes suite au stress engendré par la perturbation d'un facteur environnemental pouvait être associée à une modification de la nature et de la quantité des EPS composant le biofilm, et plus précisément

des fractions protéiques et polysaccharidiques. Il existe souvent une imprécision dans la définition des EPS puisque certains auteurs n'étudient que les exopolysaccharides alors que les protéines représentent également une part non négligeable de la matrice d'un biofilm phototrophe (Ai *et al.*, 2015; Svetličić *et al.*, 2013). Pour mettre en évidence ce type de réponse, il est donc indispensable d'être capable d'extraire les polymères composant les EPS, tout en veillant à ne pas endommager les membranes cellulaires des microorganismes phototrophes afin de ne pas libérer de matériel intracellulaire. Les méthodes d'extraction utilisées dans la littérature étant très diverses, le premier objectif de ce travail de thèse a donc été de mettre au point un protocole permettant d'extraire une fraction d'EPS représentative de la diversité biochimique de l'échantillon. Pour cela, nous avons testé dans le **Chapitre III** la faisabilité de divers types de traitements : les EPS faiblement liées à la matrice, qu'elles soient de type protéines ou polysaccharides, sont récupérées après passage à l'ultra-Turrax et centrifugation. Les traitements chimiques sont quant à eux plus spécifiques car ils ciblent les interactions chimiques des EPS plus fortement liées à la matrice extracellulaire. Cependant, ces traitements sont plus drastiques et peuvent engendrer une contamination des EPS extraites par libération du contenu intracellulaire suite à la lyse des cellules phototrophes. De ce fait, il est nécessaire de contrôler le taux de lyse afin de déterminer le bon compromis entre le maintien de l'intégrité des parois cellulaires et la quantité de EPS extraites.

Au cours de notre étude, l'analyse de la lyse cellulaire par mesure de la chl *a* (composante intracellulaire des cellules phototrophes) nous a conduit à écarter le traitement au Tween dans le cadre d'extraction des EPS de biofilms phototrophes simplifiés. Cependant, afin d'étudier les EPS produites par la diatomée *N. palea* en réponse à une exposition à des nanotubes de carbone, Verneuil *et al.* (2015) ont utilisé un protocole d'extraction combinant plusieurs traitements incluant une incubation au Tween 20 (dans les mêmes conditions que notre étude). Lors de leur étude, la lyse cellulaire a pourtant été vérifiée par des observations microscopiques ; la mesure de la chl *a* mise au point au cours de notre étude peut donc remettre en question la fiabilité de la microscopie en tant qu'outil dans la détection de lyse cellulaire au cours d'un protocole d'extraction des EPS.

La comparaison des quantités de polysaccharides et de protéines extraits par les différentes techniques d'extraction testées nous a permis de sélectionner un protocole d'extraction multi-méthodes combinant un traitement chimique au formamide suivi d'un traitement physique par la mise en contact de l'échantillon avec une résine échangeuse de cations. Ces méthodes utilisées de façon séquentielle nous ont permis d'extraire une quantité

de protéines (entre $7,0 \pm 0,9$ mg éqBSA g^{-1} MS et $11,5 \pm 0,9$ mg éqBSA g^{-1} MS) et de polysaccharides (entre $1,8 \pm 0,4$ mg éqGlc g^{-1} MS et $4,5 \pm 0,3$ mg éqGlc g^{-1} MS) différentes en fonction des trois espèces phototrophes testées tout en ayant un taux de lyse inférieur à 1 % (libération de chl *a* comme marqueur). Afin de préserver l'intégrité des cellules, nous avons utilisé des méthodes d'extraction d'EPS peu abrasives. De ce fait, les TB-EPS les plus étroitement liées aux cellules phototrophes peuvent y rester associées induisant une potentielle sous-estimation des valeurs réelles de quantité d'EPS présentes au sein de la matrice.

La non standardisation des unités concernant la quantité des EPS extraites rend difficile la comparaison directe des teneurs en protéines et polysaccharides que nous avons obtenues avec celles citées dans la littérature. En effet, les quantités de polymères extraits peuvent être exprimées en référence à la biomasse (Fang *et al.*, 2014), à la quantité de cellules (Takahashi *et al.*, 2010) ou en lien avec le volume d'extraits (Ge *et al.*, 2013). S'il est difficile de comparer la quantité d'EPS extraites avec celles obtenues dans de précédentes études, l'efficacité d'extraction reste comparable à travers l'analyse du rapport PN/PS. Par exemple, Ge *et al.* (2013) ont obtenu un rapport de 1,7 en utilisant la CER pour extraire les EPS d'un biofilm composé de l'algue verte *P. subcordiformis*. Malgré la différence dans les méthodes de dosage des protéines (Lowry modifié vs BCA) ce rapport est en accord avec celui que nous avons obtenus après un traitement CER pour l'algue verte *U. confervicolum* ($1,4 \pm 0,4$). De la même manière, malgré la différence dans la méthode de dosage utilisée, le rapport PN/PS obtenu pour la diatomée *N. palea* après un traitement combinant le formamide et la CER ($2,9 \pm 0,6$) est en accord avec celui obtenu par Takahashi *et al.* (2010) après un traitement associant le glutaraldéhyde et la CER (2,18). L'ensemble de ces études ont utilisé le glucose et la BSA comme étalon, ce qui rend possible la comparaison de ces rapports. En revanche, l'utilisation d'unités sans lien avec la biomasse ou la quantité de cellules n'est pas adaptée à des études déterminant la capacité de production des EPS par des microorganismes composant le biofilm.

Certaines études utilisent des méthodes permettant l'extraction des EPS mais avec une forte probabilité de lyse cellulaire qui n'est pas toujours vérifiée ; c'est par exemple le cas du Tween 20, des traitements thermiques (utilisation d'eau chaude) ou des ultrasons. Une contamination des extraits par relargage de composants intracellulaires peut réellement influencer l'interprétation des résultats d'une étude. C'est pour cela que nous avons mis en place un contrôle de lyse cellulaire rapide et reproductible à partir d'une simple mesure de la Chl *a* présente au sein de l'extrait par spectrométrie.

Enfin, en fonction des méthodes d'extraction employées, la nature des liaisons ciblées ne sont pas identiques et cela peut également modifier la quantité et la nature des EPS extraites. Dans l'objectif d'analyser la réponse des communautés phototrophes à une exposition métallique, il nous a paru important d'orienter notre approche expérimentale vers une stratégie d'extraction ciblant les liaisons ioniques. Notre protocole, basé sur l'application successive d'un traitement au formamide et d'une résine échangeuse de cation est apparu comme le meilleur compromis entre la quantité des EPS extraites et le maintien de l'intégrité des organismes phototrophes. Il aurait cependant été pertinent de tester ces deux méthodes d'extraction de manière simultanée (en réalisant un seul traitement en présence de formamide et de CER); en effet, cela pourrait limiter les erreurs liées à la manipulation de l'échantillon (perte de biomasse, incertitude des pipetages, etc.) et de réduire le temps d'extraction. De plus, le formamide étant un agent de protection pour les cellules phototrophes (Fang *et al.*, 2014), nous aurions pu le combiner avec le Tween 20 qui, au cours de notre étude, a été écarté au vu du fort taux de lyse engendré. Enfin, les sucres uroniques sont décrits comme étant des chélateurs de cations divalents dans des études sur les bactéries hétérotrophes, il serait peut-être judicieux de dissocier la quantité de sucres chargés et de sucres neutres lors du dosage des EPS extraites en utilisant le protocole proposé par Rondel *et al.* (2013). Pour terminer, le dosage de l'ADN par des méthodes colorimétriques étant simple et rapide, il peut également être intéressant d'évaluer la teneur en acides nucléiques de la matrice extracellulaire. En effet, même si nous l'avons retrouvé en faible quantité dans notre étude (maximum 38 ng éqλADN g⁻¹ MS pour la méthode d'extraction formamide + CER) en comparaison à d'autres études réalisées sur des espèces hétérotrophes (de 1,74 à 7,7 μg L⁻¹, DeFlaun *et al.* (1986)), l'ADN peut également être un chélateur de cations (Mulcahy *et al.*, 2008).

2. Cu et Zn en milieu aquatique : conséquences sur les biofilms phototrophes

Cette première étude écotoxicologique réalisée dans le cadre de la thèse, avait pour objectif d'appréhender la réponse de biofilms phototrophes mono-espèce à une exposition au Cu et au Zn, seuls ou en cocktails. Ces deux ETM sont fréquemment retrouvés dans des milieux aquatiques naturels subissant des apports de drainage de sites miniers anciens ou de ruissellement de surfaces viticoles. Une meilleure compréhension des liens entre une exposition aux ETM et les effets induits sur les biofilms phototrophes mono-espèce permettra d'appréhender de manière plus précise leurs impacts sur la qualité écologique des milieux aquatiques. Pour cela, les effets du Cu et du Zn sur la biomasse, sur l'intégrité des

photosystèmes II (PSII) et sur la production des EPS ont été évalués sur des biofilms phototrophes mono-espèce.

Au cours de ces travaux, nous avons mis en évidence une variabilité de l'influence de la concentration et de la nature des ETM sur la réponse des biofilms phototrophes. En effet, les plus faibles concentrations en Cu ($20 \mu\text{g L}^{-1}$) et Zn ($60 \mu\text{g L}^{-1}$) testées dans le **Chapitre IV** n'induisent pas d'impact significatif sur l'intégrité des systèmes photosynthétiques et la biomasse des trois biofilms mono-espèce testés. En revanche, de manière spécifique à chaque espèce, des modifications dans la quantité et de la nature des EPS extraites ont pu être observées suite à cette exposition. En effet, le Cu et le Zn induisent une augmentation respective de 82 et 37 % des polysaccharides extraits du biofilm de la cyanobactérie *P. autumnale* sans modification de la quantité de protéines extraites. Le Cu à une concentration de $20 \mu\text{g L}^{-1}$ a un effet différent sur l'algue verte *U. confervicolum* puisqu'après 16 jours d'exposition nous avons observé une diminution respective des protéines et des polysaccharides de 34 et 15 %. Enfin, aucune modification de la quantité des EPS extraites n'est observée pour la diatomée *N. palea* suite à une exposition aux ETM. Ainsi, ces résultats laissent supposer un mode d'action différent des organismes phototrophes exposés à ces ETM. Les réponses métaboliques en termes de sécrétion et/ou consommation des polymères extracellulaires semblent suffisantes pour pallier le stress sans induire de dommages ni de conséquences sur l'écosystème aquatique. Serra and Guasch (2009) ont cependant observé une réduction d'environ 40 % de la biomasse algale lors d'une exposition chronique au Cu à des concentrations similaires à celles utilisées dans notre études ($32,5 \mu\text{g L}^{-1}$). Il faut donc être vigilant car cette divergence dans les résultats obtenus peut être fonction de nombreux facteurs :

- l'hydrodynamique de l'écoulement et la physico-chimie du milieu (la matière organique, le pH, etc.) sont des paramètres qui peuvent influencer la spéciation de l'ETM (libre ou complexé) et par conséquent sa disponibilité et donc son degré de toxicité ;
- la température de l'eau en circulation : Lambert *et al.* (2016) ont montré que des températures élevées diminuent la sensibilité des communautés microbiennes benthiques au Cu. L'eau de circulation dans nos modules est fixée à 22°C , ce qui correspond à une température relativement élevée.

Suite à une exposition des biofilms à des concentrations en Cu ou en Zn dix fois plus importantes (respectivement 200 ou $600 \mu\text{g L}^{-1}$), nous avons pu observer des effets communs aux trois espèces phototrophes (**Figure 32**). En effet, même si les conséquences d'une contamination par le Cu sont plus importantes que celles observées pour le Zn, la présence de

l'un de ces métaux à forte concentration se traduit par une **diminution de la biomasse du biofilm** pour la diatomée et l'algue verte principalement.

En parallèle, nous avons également pu observer des **dommages au niveau du système photosynthétique** des espèces phototrophes. Une exposition des biofilms phototrophes à un cocktail des deux ETM conduit à une amplification de ces conséquences. Les hypothèses pouvant expliquer ce phénomène reposent sur :

- la déstructuration de la molécule de chlorophylle *a* par la substitution du cation de magnésium Mg^{2+} par le Cu^{2+} ou Zn^{2+} au centre de la molécule, avec une plus forte capacité du Cu que du Zn à se lier à la macromolécule cyclique (**Figure 32**). Il serait donc intéressant d'étudier ce relargage du Mg^{2+} dans le cytosol des cellules phototrophes et le milieu extracellulaire.
- le déséquilibre entre la production de ROS et les capacités cellulaires anti-oxydantes provoque un stress oxydant. Le système photosynthétique représente une cible importante du stress oxydant (Nishiyama *et al.*, 2006; Saison *et al.*, 2010), ce qui corrobore nos observations. De plus, une surproduction de ROS peut à terme fragiliser les membranes cellulaires, voire conduire à leur rupture pouvant se traduire par une baisse de la concentration cellulaire.

Il serait donc intéressant d'étudier si en réponse à ce stress, les cellules produisent une quantité de proline (Wu *et al.*, 1998), de thiols de faibles poids moléculaires (notamment le glutathion) (Rijstenbil and Gerringa, 2002) et activent également des enzymes anti-oxydantes de type superoxyde-dismutase (Pinto *et al.*, 2003). Au vu de la taille des espèces phototrophes utilisées au cours de cette étude, il serait pertinent d'analyser les parois cellulaires par une simple visualisation des échantillons par microscopie optique afin d'avoir une idée de l'état physiologique. Il aurait également été possible d'évaluer l'impact de ces ETM sur la concentration des cellules phototrophes. Cependant, la cyanobactérie *P. autumnale* forme de très longs filaments qui rendent le comptage difficile et la concentration obtenue approximative.

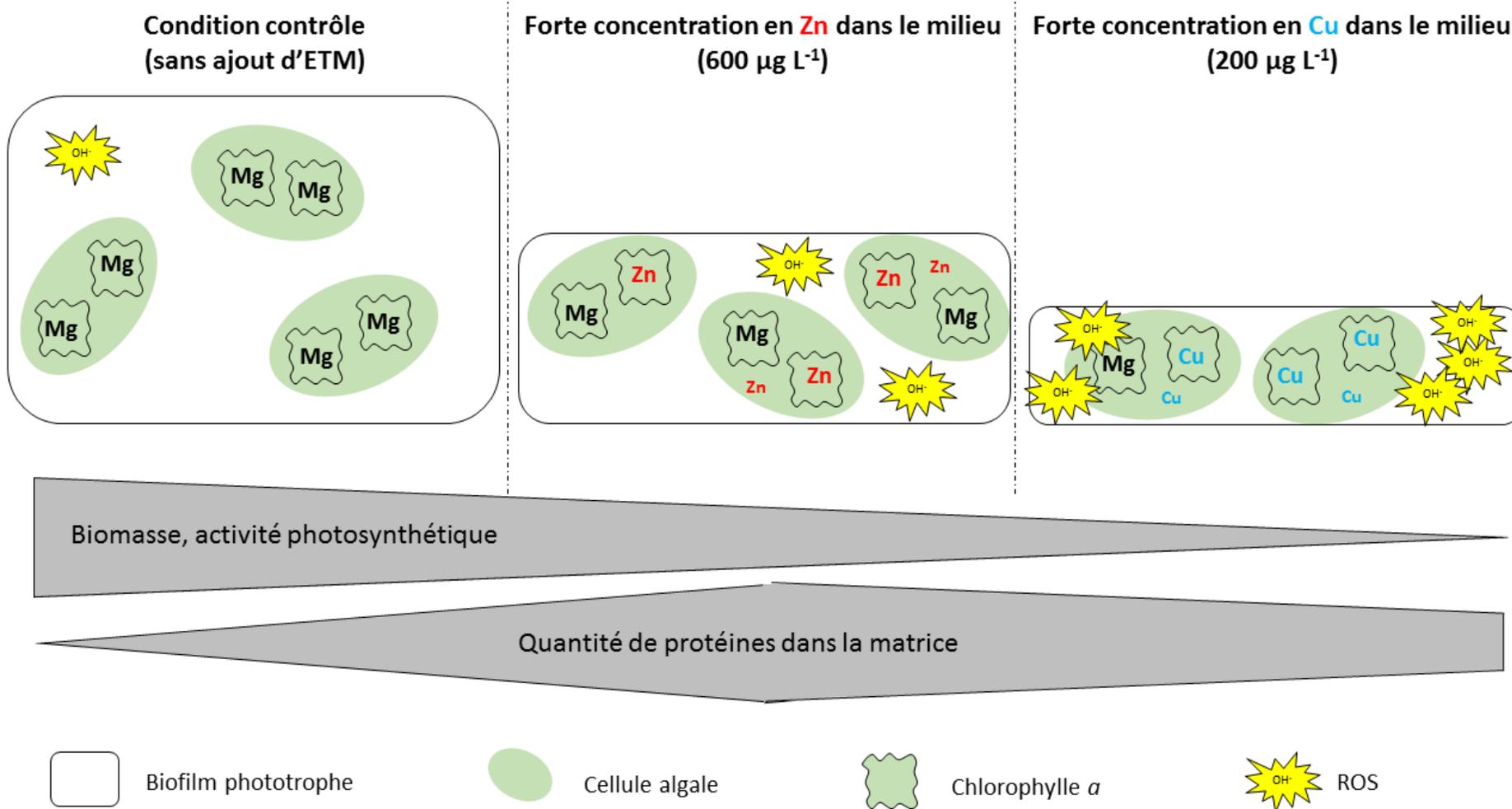


Figure 32 Représentation schématique des effets d'une contamination par les ETM (600 µg L⁻¹ de Zn ou 200 µg L⁻¹ de Cu) sur la physiologie des populations d'organismes phototrophes après deux semaines d'exposition.

Nous avons pu observer un impact plus important de cette contamination métallique à forte concentration (200 $\mu\text{g L}^{-1}$ de Cu et/ou 600 $\mu\text{g L}^{-1}$ de Zn) sur l'activité photosynthétique de la cyanobactérie *P. autumnale* avec une diminution pouvant atteindre 52 % lorsque le biofilm est exposé au cocktail Cu et Zn. Cette variabilité des effets découle de la classe des organismes phototrophes qui conditionne la sensibilité des espèces mais aussi de la structure du biofilm (matrice d'EPS) qui influence la protection des cellules phototrophes face aux contaminants. En effet, lorsque l'on s'intéresse à l'analyse de la matrice extracellulaire, les résultats de notre étude révèlent une augmentation respective de 65 et 42 % de la quantité de polysaccharides après deux semaines d'exposition aux fortes concentrations en Cu et en Zn testées pour la cyanobactérie *P. autumnale* alors qu'une diminution peut être mise en évidence pour *U. confervicolum* (34 % pour le Zn et 64 % pour le Cu) et *N. palea* (environ 30 %). La lutte contre le stress induit par la présence d'ETM à forte concentration dans le milieu semble donc passer par une stratégie liée « au style de vie du biofilm ». En effet, les polysaccharides composant la matrice des biofilms peuvent avoir un rôle nutritif et être considérés comme source de C par les microorganismes phototrophes (Xiao and Zheng, 2016) (cela peut être le cas de l'algue verte et de la diatomée) ou au contraire jouer un rôle de ligands, ce qui représente une fonction cruciale dans la protection des cellules face aux agressions extérieures (García-Meza *et al.*, 2005; Miao *et al.*, 2017) (cela peut-être le cas de la cyanobactérie). Afin d'avoir une idée plus précise du rôle des EPS des différents biofilms phototrophes, il serait intéressant d'analyser les structures des sucres présents dans la matrice du biofilm composé de la cyanobactérie *P. autumnale* et ceux présents dans les biofilms composés de l'algue verte *U. confervicolum* ou de la diatomée *N. palea*. Ainsi, en accord avec d'autres études (Rossi and De Philippis, 2015), nous pouvons supposer que le biofilm de *P. autumnale* serait majoritairement composé de polysaccharides uroniques impliqués dans la structure et l'aspect gélifiant du biofilm. Au contraire, les matrices des biofilms d'*U. confervicolum* et *N. palea* seraient quant à elles composées de sucres neutres de réserve.

Le dernier point important à aborder quant à la réponse des communautés phototrophes suite à une exposition aux ETM concerne la **quantité de protéines** dans la matrice extracellulaire. Une augmentation significative de cette quantité de protéines dans les EPS extraites de biofilms exposés aux fortes concentrations en ETM (200 $\mu\text{g L}^{-1}$ de Cu et/ou 600 $\mu\text{g L}^{-1}$ de Zn) a été observée en comparaison à celles des biofilms contrôles, avec une augmentation plus importante lors d'une exposition au Zn (**Figure 32**). Au vu de cette étude, il semblerait donc que les protéines jouent un rôle primordial dans la tolérance des cellules phototrophes à

de fortes concentrations en ETM, même si les rapports PN/PS sont inférieurs à 1. Cependant, nous avons très peu de connaissance sur les EPS produites par des organismes phototrophes en réponse à une exposition métallique. Récemment, De Philippis *et al.* (2011) ont réalisé une description des modifications et du rôle des polysaccharides produits par les cyanobactéries dans un milieu contaminé en métaux sans s'intéresser aux protéines également présentes dans la matrice.

Notre travail constitue donc une étude préliminaire, mais il est nécessaire de réaliser une analyse moléculaire plus précise afin de caractériser les propriétés physico-chimiques des protéines sécrétées suite à un stress métallique. Une analyse des EPS par microscopie confocale à balayage laser en utilisant des marqueurs ciblant les protéines tels que le Sypro Ruby ou l'Epicoconone pourrait être réalisée en complément afin d'avoir une idée plus globale de la quantité et de la répartition des EPS au sein du biofilm. De plus, le protocole d'extraction utilisé dans cette étude ne permettant pas d'extraire la totalité des EPS de la matrice, une approche de quantification des EPS *in situ* peut être réalisée afin d'obtenir une quantité des protéines et des polysaccharides plus proche de la réalité. Pour cela, des marqueurs fluorescents tels que l'Epicoconone peuvent être utilisés pour quantifier *in situ* les protéines de la matrice (Randrianjatovo *et al.*, 2015) alors que la coloration PAS (Periodic Acid Schiff) peut quant à elle quantifier les polysaccharides (Randrianjatovo-Gbalou *et al.*, 2016).

3. Influence des conditions environnementales sur la réponse des biofilms et leur conséquence sur la capacité de sorption du Cu

Lorsqu'ils sont présents à des concentrations que l'on peut retrouver dans des écosystèmes aquatiques pollués, le Cu et le Zn sont 2 oligoéléments ayant pour principale conséquence une modification de la nature et de la quantité des EPS contenues dans la matrice d'un biofilm phototrophe (**Chapitre IV**). De nombreuses études décrivent le rôle de ces EPS dans la sorption des métaux, mais les mécanismes de liaison et la manière dont ces processus sont influencés par les facteurs environnementaux sont très peu connus. Or, l'intensité et la fréquence des modifications des contraintes physiques, chimiques ou biologiques que subissent les communautés phototrophes seront vraisemblablement augmentées par le changement global (IPCC, 2007).

Durant ces travaux de thèse, nous avons évalué la réponse de trois espèces phototrophes soumises à deux niveaux de température, combinés à deux niveaux de luminosité, ainsi qu'à trois concentrations en P différentes dans le milieu (à température et luminosité constantes)

(Chapitre V). Il semblerait que la sensibilité des espèces phototrophes aux variations de température et de luminosité dépende en partie de la structure des cellules. En effet, l'activité photosynthétique de la diatomée *N. palea* est plus élevée lorsque la température testée est élevée (22°C) et la luminosité faible (30 $\mu\text{mol s}^{-1} \text{m}^{-2}$). Au contraire, ces deux paramètres n'ont pas d'influence significative sur l'activité photosynthétique des deux espèces phototrophes filamenteuses. Les capacités d'adaptation de la cyanobactérie *P. autumnale* et de l'algue verte *U. confervicolum* semblent donc supérieures à celle de la diatomée. Indépendamment des conditions favorables à la croissance de chacune des espèces, il est possible que les espèces phototrophes filamenteuses soient moins sensibles aux phénomènes de photo-inhibition engendrés par de fortes intensités lumineuses grâce à l'auto-ombrage créé par certains filaments. De plus, le biofilm composé de *N. palea* représente le biofilm le moins épais de l'étude, ce qui peut expliquer sa réponse et sa plus forte sensibilité face aux modifications de température et de lumière.

Si le fonctionnement du système photosynthétique révèle une plus forte sensibilité de la diatomée à une variation de la température ou de l'intensité lumineuse, au contraire, un effet marqué d'une modification de ces facteurs a été observé sur la biomasse du biofilm composé de l'algue verte *U. confervicolum*. Au vu de ces résultats, il semble difficile de généraliser les effets d'un changement climatique sur la physiologie d'un biofilm phototrophe. Ces différences peuvent être liées à l'écologie de l'espèce et aux conditions d'éclairement et de température nécessaires à une bonne croissance de chacune des espèces phototrophes étudiées. La variabilité de ces résultats met en garde sur la nécessité de ne négliger aucune population phototrophe lors d'une étude. En accord avec Tlili *et al.* (2011), ces résultats confirment, d'une part, la nécessité d'utiliser plusieurs descripteurs afin d'évaluer la sensibilité globale du biofilm. D'autre part, ils révèlent un risque de perturbation des processus microbiens pouvant se traduire, à terme, par un dysfonctionnement de l'écosystème.

Dans cette étude, l'état physiologique et la sensibilité des phototrophes suite aux modifications des paramètres environnementaux testés ne peuvent être estimés qu'à partir des mesures de l'activité photosynthétique et de la biomasse algale. La cytométrie en flux aurait permis de compléter cette étude en évaluant les cellules phototrophes viables présentes dans le biofilm après marquage des cellules comme décrit par Negoescu *et al.* (1996). La quantification des microorganismes viables peut également être étudiée par PCR en temps réel (qPCR), cependant une surestimation du nombre de cellules viables peut avoir lieu du fait de la présence d'ADN dans la matrice (Klein *et al.*, 2012).

Après 4 jours d'exposition à $50 \mu\text{g L}^{-1}$ de Cu, nous avons pu observer une différence dans la capacité de sorption des biofilms en fonction de l'espèce phototrophe considérée. L'algue verte *U. confervicolum* présente la plus faible capacité de sorption du Cu (de 39 ± 1 à $116 \pm 13 \text{ mg Cu kg}^{-1} \text{ MS}$), la cyanobactérie *P. autumnale* une capacité intermédiaire (de 187 ± 5 à $439 \pm 15 \text{ mg Cu kg}^{-1} \text{ MS}$) alors que la diatomée *N. palea* possède quant à elle la capacité de sorption la plus élevée (de 422 ± 5 à $854 \pm 51 \text{ mg Cu kg}^{-1} \text{ MS}$). Par une modification de la physiologie du biofilm, les facteurs environnementaux ont une influence sur l'accumulation du Cu dans la biomasse qui dépend des conditions d'expositions et des espèces phototrophes étudiées. Par exemple, nous avons observé une diminution de la quantité de Cu sorbé avec une augmentation de la température ($+3^\circ\text{C}$) pour le biofilm composé de *N. palea* alors qu'elle n'influence pas significativement la capacité de sorption du Cu de l'algue verte *U. confervicolum* (**Figure 5, chapitre V**). Cependant, il est difficile de conclure que seule une modification de la température au sein d'un écosystème est suffisante pour modifier la capacité de sorption de *N. palea*. En effet, les conditions physico-chimiques du milieu peuvent également moduler l'exposition des communautés phototrophes au Cu. C'est le cas du pH qui par une variation intra-journalière est décrit comme le paramètre majeur influençant la capacité de sorption métallique (Beck *et al.*, 2009; Nimick *et al.*, 2003). En effet, le pH de la colonne d'eau peut modifier l'état de spéciation et la disponibilité des métaux : un pH élevé (milieu alcalin) peut engendrer une modification des charges et la solubilité des métaux en formant des complexes hydroxylés (Pardo *et al.*, 2003). Ainsi, dans notre étude, les biofilms phototrophes sont cultivés dans un milieu légèrement alcalin et riche en oligoéléments, il est donc possible que ces conditions de croissance aient limité la biodisponibilité du Cu. Cependant, un pH élevé favorise les charges négatives des groupements fonctionnels des polymères (carboxyles, phosphates et les amines) ce qui augmente significativement la complexation des cations métalliques par le biofilm (Pardo *et al.*, 2003) par l'augmentation des sites de liaisons au sein de la matrice (Comte *et al.*, 2007).

La sorption des métaux n'est pas seulement en lien avec les paramètres physico-chimiques et la concentration en ETM dans la colonne d'eau. Par exemple, les particules minérales capables de se lier aux ETM jouent un rôle important dans le devenir de ces ETM dans un écosystème (Arini, 2011). Il aurait donc été intéressant de réaliser, par ICP-MS, un suivi de la teneur en Cu « labile » (Cu^{2+}), qui représente la forme la plus biodisponible pour les organismes (Deaver and Rodgers, 1996).

Ces travaux ont permis de montrer une capacité de sorption du Cu en lien avec la quantité d'EPS produites et la biomasse du biofilm (**Figure 33**). En effet, nous avons observé une corrélation négative entre la quantité d'EPS extraites ou la biomasse et la quantité de Cu biosorbé dans le biofilm composé de la cyanobactérie *P. autumnale*. Il est ainsi possible que les polymères produits créent une barrière de protection à la surface des cellules formant une matrice dense (**Figure 33** ①) et en conséquence, le nombre de liaisons cationiques accessibles est faible. Au contraire, une corrélation positive entre la quantité d'EPS extraites ou la biomasse avec la quantité de Cu biosorbé dans le biofilm composé de la diatomée *N. palea* a été constatée. Dans ce cas-là, les EPS produites (en lien avec une augmentation de la biomasse) sont des EPS faiblement liées avec un nombre important de sites de liaison accessibles ; elles peuvent être responsables de la quantité de Cu accumulé au sein du biofilm (**Figure 33** ②). De la même manière, la quantité d'EPS produites est corrélée positivement à la quantité de Cu dosé dans la biomasse du biofilm composé d'algue verte *U. confervicolum*. Une seconde hypothèse pouvant expliquer la différence de corrélation entre la quantité d'EPS et la capacité de sorption des différentes espèces phototrophes pourrait être en lien avec les caractéristiques physico-chimiques des polymères de la matrice. En effet, il est possible que la quantité relative des polymères anioniques soit faible dans le biofilm de *P. autumnale* alors qu'ils représenteraient une part importante dans les biofilms composés de *N. palea* ou *U. confervicolum*.

Contraints par les dispositifs utilisés, nous avons réalisé des expérimentations à des températures relativement hautes et au contraire à des intensités lumineuses faibles. Etant donné que les réponses des biofilms sont variées et non linéaires, un niveau de réponse différent de celui-ci serait donc envisageable lors d'une modification des valeurs des facteurs testés.

La consommation de biofilms phototrophes contaminés en ETM par les consommateurs primaires pourra donc favoriser leur transfert le long des chaînes trophiques aquatiques. Tout en restant conscients qu'en milieu naturel une multitude de paramètres biotiques (succession écologique, broutage) et abiotiques (physico-chimie de l'eau, contraintes de cisaillement, etc.) peuvent modifier la quantité de Cu accumulé au sein d'un biofilm, nos travaux montrent tout de même l'importance capitale de la composition en espèces phototrophes dans un biofilm.

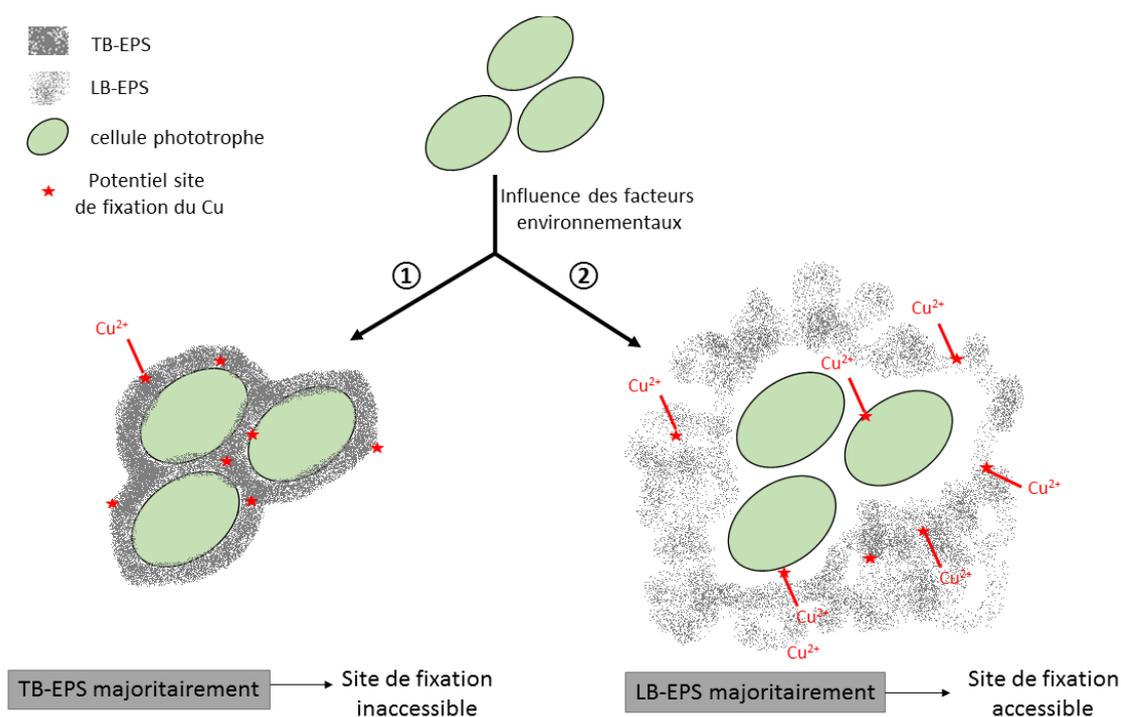


Figure 33 Proposition de deux mécanismes de réponse des biofilms phototrophes à une variation des facteurs environnementaux en lien avec la quantité d'EPS produites (matrice composée de TB-EPS ① ou de LB-EPS ②) et ses conséquences sur la capacité de sorption du Cu (après 18 jours de croissance du biofilm).

Même si les activités agricoles contribuent à une augmentation des concentrations en P dans les cours d'eau par lessivage des sols, les concentrations en P utilisées au cours de notre étude sont clairement supérieures. La concentration en P disponible dans le milieu représente le facteur environnemental ayant le plus fort impact sur la physiologie des populations phototrophes et notamment sur la biomasse (**Table 1, Chapitre V**), ce qui confirme son rôle important dans les processus d'eutrophisation. En effet, lorsque la concentration en P est doublée d'un milieu de culture à un autre (2,61 et 5,23 mg L⁻¹), nous avons observé une diminution de moitié de la biomasse du biofilm composé de *N. palea* et une diminution de 30 % des biofilms composés d'*U. confervicolum*. L'augmentation de la concentration en P (de 2,61 à 8,71 mg L⁻¹) se traduit par une augmentation de la quantité d'EPS extraites des biofilms phototrophes composés de la cyanobactérie *P. autumnale* (+15 %) et de l'algue verte *U. confervicolum* (+26 %) et de la diatomée *N. palea* (+22 %).

En modifiant la quantité et la nature des EPS au sein de la matrice, les changements globaux attendus (augmentation de la température et de la concentration en P ou diminution de la luminosité) peuvent induire une perturbation dans la capacité de sorption des ETM par les biofilms phototrophes modifiant ainsi la concentration en ETM dans les écosystèmes aquatiques (**Figure 34**). De plus, les conditions favorables à la croissance des espèces phototrophes étant différentes, il est possible que ces changements globaux modifient la composition d'un biofilm phototrophe, ce qui engendrera des modifications dans la quantité de Cu séquestré au sein du biofilm.

Ces travaux montrent l'intérêt de réaliser une étude plus précise du devenir du métal au sein de la biomasse du biofilm. Il serait intéressant de suivre les flux de métaux par marquage fluorescent en utilisant le fluorochrome Rhodamine comme décrit par Yu *et al.* (2008) afin de différencier, par microscopie confocale, la fraction métallique adsorbée au niveau des EPS, à la surface des cellules et à l'intérieur des cellules. Ceci permettrait de confirmer le rôle des EPS sécrétées par les différentes populations phototrophes. En complément, une observation *in vivo* des biofilms phototrophes par microscopie confocale à balayage laser peut également être un bon outil puisqu'elle permet d'étudier un biofilm de manière non intrusive et non destructive. Cette analyse permettrait l'ajout d'informations sur la complexité et la structure des EPS en visualisant les TB-EPS en lien direct avec les cellules phototrophes et les LB-EPS plus diffus et clairsemés autour des cellules.

4. Application d'un multi-stress : capacités de résistance et de résilience du biofilm phototrophe

La structure ainsi que le fonctionnement des biofilms phototrophes peuvent être fortement altérés par des conditions environnementales variables, ce qui pourrait à terme se traduire par un dysfonctionnement de l'écosystème. En effet, nous avons pu mettre en évidence une forte variabilité de l'influence de la température, de la luminosité et de la disponibilité en P sur la croissance, les activités fonctionnelles et métaboliques des trois biofilms phototrophes mono-espèce testés (**Chapitre V**). La fréquence élevée des événements d'assèchement des cours d'eau est également un facteur à considérer dans un contexte de changement global. Les microorganismes phototrophes qui n'ont aucun moyen d'évitement, sont contraints de mettre en place différentes stratégies pour pallier le stress de dessiccation engendré par une interruption de l'écoulement de surface, voire une émergence des rives.

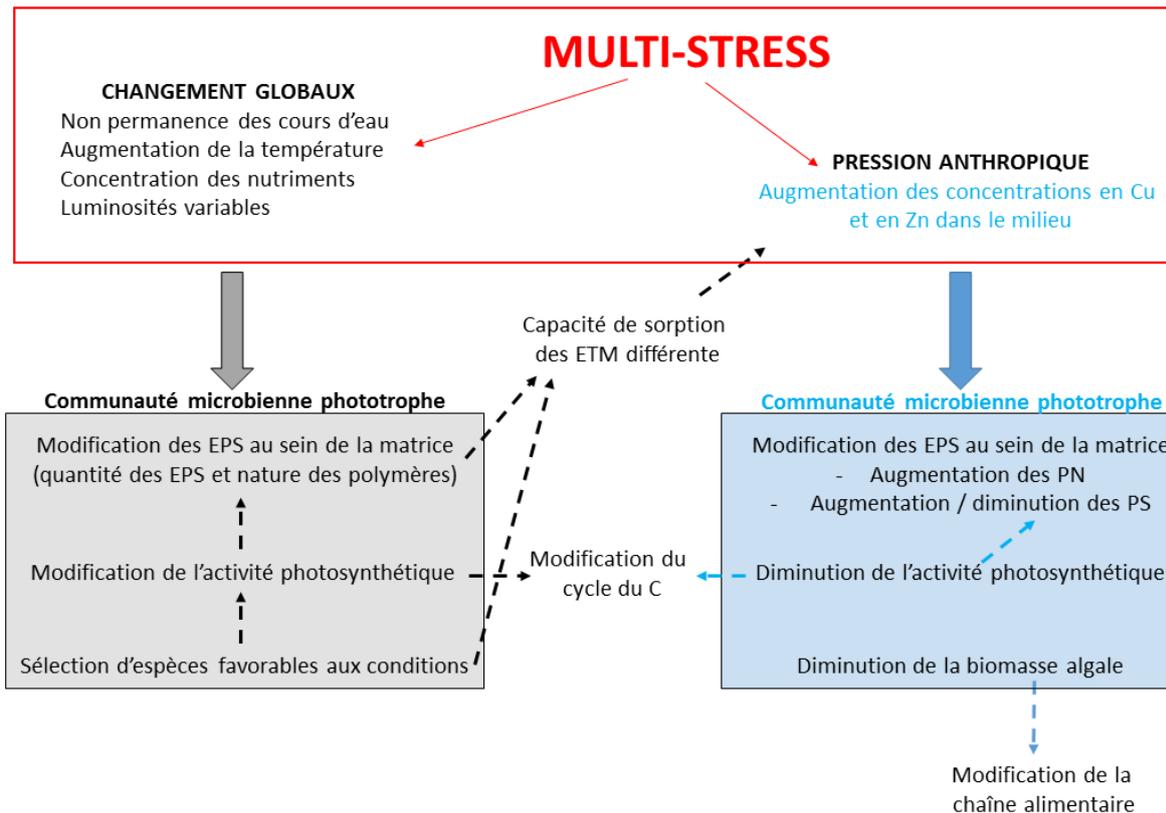


Figure 34 Représentation schématique des conséquences des changements globaux et des contaminations métalliques sur la physiologie des biofilms phototrophes et leurs impacts sur la qualité des cours d'eau.

Cependant, ces stratégies d'ajustement sont spécifiques à chaque espèce. En effet, suite à un double stress (exposition au Cu pendant 4 jours suivie de 14 jours d'assèchement), les trois microorganismes phototrophes testés semblent avoir des stratégies de résistance différentes avec une différence notable dans l'évolution de la quantité des EPS au sein de la matrice du biofilm (**Chapitre VI**). La quantité d'EPS extraites des biofilms composés de la cyanobactérie *P. autumnale* ou de la diatomée *N. palea* à la fin de la perturbation est inférieure à celle mesurée à l'état initial avant perturbation, alors qu'elle est supérieure pour un biofilm composé de l'algue verte *U. confervicolum*. Malgré un fort impact de la perturbation sur les quantités de PN et de PS extraits, une ré-immersion de deux semaines permet un retour aux conditions initiales en matière de quantité d'EPS des trois biofilms. Il faut cependant être conscient qu'il est difficile dans ce cas de parler de résilience car les âges des biofilms (avant application de la perturbation, et après deux semaines de ré-immersion) qui sont comparés sont différents. Or, la composition et la quantité des EPS sont fortement dépendantes de l'âge du biofilm (Zhang *et al.*, 2011). Cependant, une comparaison avec un biofilm qui se serait développé 6 semaines sans

perturbation (sans ajout de Cu ni arrêt de l'écoulement) n'aurait pas été pertinente. En effet, avec un débit de l'eau en circulation de 300 L h⁻¹, correspondant à une vitesse d'écoulement d'environ 38 cm s⁻¹, et un âge du biofilm de plusieurs semaines, les contraintes de cisaillement appliquées à la surface des biofilms auraient pu provoquer le détachement en lambeaux du biofilm se traduisant par une modification de la biomasse, de la nature et de la quantité des EPS. Il est également possible qu'il y ait eu un détachement d'une partie du biofilm lors de la remise en eau après deux semaines d'assèchement. En effet, certaines espèces ou certaines conditions de culture peuvent être plus ou moins favorables à la production d'EPS responsables de l'adhésion des cellules au support. Cependant, au vu des faibles variations observées entre les réplicats d'une même condition, ce détachement ne semble pas amener un biais aux résultats obtenus.

La capacité de récupération de l'état physiologique du biofilm, mesuré à travers l'activité photosynthétique, est également propre à chaque espèce phototrophe et fonction des conditions environnementales. Il semblerait en effet que la diatomée ait une capacité de résilience plus lente ou moins efficace que les deux autres espèces aux conditions testées. En effet, à chaque fois que l'algue verte et la cyanobactérie ont été exposées à une contamination en Cu suivie d'un assèchement, ces deux espèces phototrophes ont retrouvé leur activité photosynthétique après deux semaines de remise en eau. Il semblerait qu'une nouvelle fois, les caractéristiques structurelles des EPS ainsi que leurs propriétés physiologiques jouent un rôle fondamental dans la sensibilité des espèces phototrophes. Cette différence peut expliquer la tolérance induite au sein d'une communauté : suite à une perturbation, il est possible d'observer un remplacement des espèces sensibles par des espèces plus tolérantes. Au travers de cette étude, nous pouvons imaginer une dominance des espèces filamenteuses au détriment de la diatomée dans un biofilm phototrophe composé de ces trois espèces et exposé aux mêmes facteurs environnementaux.

De façon plus globale, les résultats obtenus suite à l'exposition multi-stress des biofilms phototrophes mono-espèce ramènent à la notion de « coût de tolérance » (Moe *et al.*, 2013; Proia *et al.*, 2013; Stampfli *et al.*, 2013). En effet, une exposition à un premier stress (exposition au Cu) sous différentes contraintes environnementales (lumière, température et concentration en P) peut amener à une tolérance et une modification physiologique des microorganismes phototrophes. Cependant, le coût de tolérance en lien avec ce premier stress peut entraîner la diminution des capacités de tolérance à un stress supplémentaire (période d'assèchement ici) et engendrer ainsi une vulnérabilité de certaines espèces. Cette notion de coût de tolérance peut expliquer la divergence de nos résultats avec ceux obtenus par Barthès *et al.* (2015), qui ont

observé un impact de l'assèchement sur la structure des communautés plus important pour les cyanobactéries (*Leptolyngbya sp.*, espèce filamenteuse) que pour les diatomées (*N. palea*). Cependant des expérimentations supplémentaires sont nécessaires afin de valider cette hypothèse en comparant la résilience fonctionnelle de phototrophes suite à une exposition multi-stress (Cu + assèchement) à ceux ayant uniquement subi les 2 semaines d'assèchement sans exposition préalable au Cu.

La combinaison de facteurs tels que les apports de P (provenant de la fertilisation des sols cultivés), les températures élevées, les faibles luminosités influencent également la tolérance des microorganismes face à cette perturbation. Ces résultats peuvent remettre en question l'utilisation des organismes phototrophes, principalement des diatomées en tant que bio-indicateur de l'état écologique des cours d'eau.

L'influence de l'exposition métallique et de l'assèchement sur la physiologie du biofilm phototrophe obtenu ici doit être confirmée en tenant compte du réalisme des écosystèmes naturels. En effet, dans cette étude les périodes d'assèchement ont été simulées en retirant instantanément l'écoulement de surface, ce qui n'est pas réaliste comparé aux écosystèmes aquatiques naturels où les biofilms subissent des modifications douces des niveaux d'eau entraînant généralement d'autres facteurs de stress (osmotique, lié aux radiations et aux températures, pressions de broutage, élévation des concentrations en nutriments et contaminants, etc.) (Roux-Barthès, 2014). Ces facteurs de stress peuvent exacerber les effets toxiques sur les biofilms phototrophes (Proia *et al.*, 2013). De ce fait, même si nous avons observé des effets de l'exposition métallique et de l'assèchement sur la physiologie des biofilms phototrophes, des études supplémentaires devraient être réalisées en opérant un assèchement progressif des biofilms, en diminuant le débit et la hauteur d'eau par paliers, afin d'évaluer de manière plus précise les niveaux d'expositions des populations phototrophes.

5. Une différence d'efficacité de sorption, de sensibilité et de résilience des espèces phototrophes en réponse aux changements globaux

Lors de notre étude, la sensibilité des trois espèces phototrophes à une exposition métallique représentative des concentrations retrouvées dans un cours d'eau pollué a été caractérisée. Après 16 jours d'exposition, la cyanobactérie *P. autumnale* est l'espèce phototrophe qui présente la plus forte sensibilité. A l'inverse, la diatomée *N. palea* est l'espèce la moins sensible de notre étude.

Indépendamment de l'intensité lumineuse et de la température de l'eau en circulation, la capacité de sorption est différente pour les trois espèces. Les biofilms composés de la diatomée ont une capacité de sorption significativement supérieure à celle des biofilms composés de l'algue verte ou de la cyanobactérie. Au vu de sa faible sensibilité à une exposition aux ETM et de sa forte capacité de sorption, il est possible que la diatomée *N. palea* joue un rôle majeur dans l'effet puits de biofilms phototrophes complexes probablement en lien avec la mobilisation et/ou la production d'EPS spécifiques.

Les conséquences du changement climatique associé à une augmentation de l'anthropisation, étudiées par une variation de la température de l'eau en circulation, de l'intensité lumineuse ou de la concentration en phosphore dans le milieu, ont une influence significative sur l'activité de la diatomée *N. palea*. Par exemple, en réponse à une augmentation de la température de 3°C, on peut observer une diminution de la quantité des EPS produites, pouvant avoir un effet direct sur la capacité de sorption des ETM. De plus, suite à une modification de la température ou de l'intensité lumineuse, *N. palea* présente une plus faible capacité de résilience comparée à *P. autumnale* ou *U. confervicolum*.

La composition des espèces phototrophes contenues dans un biofilm complexe semble donc être un élément essentiel dans sa capacité à séquestrer les ETM. La cyanobactérie *P. autumnale* et l'algue verte *U. confervicolum* peuvent représenter de bons acteurs dans la capacité de résilience d'un biofilm phototrophe soumis à des changements globaux. Au contraire, la diatomée *N. palea* qui possède une faible capacité de résilience et une forte sensibilité aux variations environnementales ne semble pas être l'espèce jouant un rôle prépondérant ; malgré le fait qu'il s'agisse de l'espèce testée ayant la plus grande capacité de sorption des ETM.

6. Perspectives

Ce travail de thèse, en plus de proposer un protocole d'extraction permettant la caractérisation des EPS de biofilms phototrophes, a apporté des données nouvelles par le suivi des réponses d'espèces phototrophes face à des contraintes environnementales d'amplitude variable. Nous avons eu, au cours de ces travaux, une approche globale de la réponse de biofilms phototrophes mono-espèce à des perturbations environnementales, qu'elles soient en lien avec le réchauffement climatique (augmentation de la température, modification de l'intensité

lumineuse, intermittence des cours d'eau) ou les activités anthropiques (concentration en P dans le milieu, concentration en ETM). La variabilité dans les réponses des différentes espèces testées souligne la nécessité de ne pas négliger la composition algale, même des populations minoritaires au sein d'un biofilm. Les perspectives de ces travaux sont multiples : d'une part, l'approfondissement des études des fractions d'EPS extraites et d'autre part, le changement des échelles de travail.

Lors de nos travaux, nous avons mis en évidence une variation de la nature et de la quantité des EPS extraites de biofilms exposés aux ETM en fonction des conditions de température, de luminosité et de concentration en P dans le milieu. Cependant, l'interprétation des données est limitée i) aux quantités des polysaccharides et des protéines extraites par le protocole d'extraction et ii) à une empreinte de la diversité moléculaire des différents polymères obtenue par SEC. Il serait pertinent, dans le cadre de nouvelles expérimentations, d'étudier plus en détail les propriétés physico-chimiques des protéines et des polysaccharides pour connaître le rôle de chacun d'eux dans les interactions des métaux avec la matrice. Ainsi, comme Pivokonsky *et al.* (2006), nous aurions pu utiliser la chromatographie d'affinité avec des ligands métalliques (Cu^{2+} ou Zn^{2+}) afin de détecter les protéines capables de former des complexes avec les ETM utilisés dans notre étude. Nous aurions également pu comparer le profil des polymères chargés négativement avant et après l'exposition métallique par chromatographie échangeuse d'anions (Caudan *et al.*, 2012). De plus, une approche protéomique permettant d'identifier tout ou partie des protéines sécrétées permettrait de définir plus précisément les voies métaboliques mises en jeu pour la formation de la matrice (polymères de structure et d'agrégation, enzymes de synthèse ou de dégradation des polymères). Enfin, nos travaux montrent l'intérêt de réaliser une étude du devenir du métal au sein de la biomasse du biofilm. Il serait intéressant de suivre les flux de métaux par marquage fluorescent afin de différencier, par microscopie confocale, la fraction métallique adsorbée au niveau des EPS, à la surface des cellules ou à l'intérieur des cellules.

Plusieurs types d'interactions entre les espèces phototrophes et hétérotrophes peuvent avoir lieu au sein des biofilms phototrophes (Little *et al.*, 2008), ce qui peut influencer la réponse de chacune des espèces suite à un stress environnemental. Bien que nous ayons fait le choix de travailler sur des biofilms mono-espèce, la généralisation des effets des facteurs environnementaux sur les biofilms phototrophes reste difficile. Ayant une idée des réponses spécifiques à chaque espèce, il serait maintenant envisageable de réaliser des expérimentations sur des biofilms mixtes réalisés par assemblage d'espèces, plus proches des conditions environnementales, pour anticiper les effets des paramètres environnementaux sur la nature des

EPS, la capacité de sorption du Cu et le potentiel de résilience des biofilms naturels en réponse à un multi-stress. Cette étude permettrait également de déterminer l'influence des interactions entre espèces.

La prédation est un élément qui peut modifier les résultats des effets des facteurs environnementaux sur les microorganismes phototrophes (Norf *et al.*, 2007; Wey *et al.*, 2008). De plus, une modification de l'épaisseur du biofilm due à une modification de la croissance de phototrophes et/ou une sécrétion d'EPS différentes peut modifier la croissance des protozoaires (Joubert *et al.*, 2006). Il serait donc judicieux de réaliser des expérimentations en utilisant un milieu environnemental plus complexe avec par exemple l'intégration d'autres composantes du réseau trophique comme la pression de broutage. De cette façon, tout en mimant des conditions environnementales (écoulement de l'eau, température, luminosité, nutriments, etc.), chaque compartiment d'un écosystème aquatique pourrait y être représenté.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Adams, G.L., Pichler, D.E., Cox, E.J., O’gorman, E.J., Seeney, A., Woodward, G., and Reuman, D.C. (2013) Diatoms can be an important exception to temperature–size rules at species and community levels of organization. *Glob. Change Biol.* **19**: 3540–3552.
- Adav, S.S. and Lee, D.-J. (2008) Extraction of extracellular polymeric substances from aerobic granule with compact interior structure. *J. Hazard. Mater.* **154**: 1120–1126.
- Agrawal, S.C. (2009) Factors affecting spore germination in algae. *Folia Microbiol. (Praha)* **54**: 273–302.
- Ahimou, F., Semmens, M.J., Haugstad, G., and Novak, P.J. (2007) Effect of protein, polysaccharide, and oxygen concentration profiles on biofilm cohesiveness. *Appl. Environ. Microbiol.* **73**: 2905–2910.
- Ahner, B.A. and Morel, F.M. (1995) Phytochelatin production in marine algae. 2. Induction by various metals. *Limnol. Oceanogr.* **40**: 658–665.
- Ai, X.-X., Liang, J.-R., Gao, Y.-H., Lo, S.C.-L., Lee, F.W.-F., Chen, C.-P. (2015) MALDI-TOF MS analysis of the extracellular polysaccharides released by the diatom *Thalassiosira pseudonana* under various nutrient conditions. *J. Appl. Phycol.* **27**: 673–684.
- Allen, J.L., Ten-Hage, L., and Leflaive, J. (2016) Allelopathic interactions involving benthic phototrophic microorganisms. *Environ. Microbiol. Rep.* **8**: 752–762.
- Allison, S.D. and Martiny, J.B. (2008) Resistance, resilience, and redundancy in microbial communities. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **105**: 11512–11519.
- Àlvarez, G., González, M., Isabal, S., Blanc, V., and León, R. (2013) Method to quantify live and dead cells in multi-species oral biofilm by real-time PCR with *propidium monoazide*. *AMB Express* **3**: 1.
- Anu, P.R., Nandan, S.B., Jayachandran, P.R., and Xavier, N.D. (2016). Toxicity effects of copper on the marine diatom, *Chaetoceros calcitrans*. *Regional Studies in Marine Science* **8**, 498–504.
- Arini, A. (2011) Décontamination métallique et capacités de récupération de deux composantes biologiques d’un hydrosystème naturel (biofilms diatomiques et bivalves filtreurs) après remédiation d’un site industriel.
- Augspurger, C., Karwautz, C., Mulsman, M., Daims, H., and Battin, T.J. (2010) Drivers of bacterial colonization patterns in stream biofilms. *FEMS Microbiol. Ecol.* **72**: 47–57.

- Austin, A.T., Yahdjian, L., Stark, J.M., Belnap, J., Porporato, A., Norton, U. (2004) Water pulses and biogeochemical cycles in arid and semiarid ecosystems. *Oecologia* **141**: 221–235.
- Azeredo, J., Azevedo, N.F., Briandet, R., Cerca, N., Coenye, T., Costa, A.R. (2017) Critical review on biofilm methods. *Crit. Rev. Microbiol.* **43**: 313–351.
- B**abauta, J., Atci, E., Ha, P., Lindemann, S., Ewing, T., Call, D.R. (2014) Localized electron transfer rates and microelectrode-based enrichment of microbial communities within a phototrophic microbial mat. *Front. Microbiol.* **5**: 11.
- Baker, N.R. (2008) Chlorophyll fluorescence: a probe of photosynthesis in vivo. *Annu Rev Plant Biol* **59**: 89–113.
- Barranguet, C., Charantoni, E., Plans, M., and Admiraal, W. (2000) Short-term response of monospecific and natural algal biofilms to copper exposure. *Eur. J. Phycol.* **35**: 397–406.
- Barthès, A., Leflaive, J., Coulon, S., Peres, F., Rols, J.-L., and Ten-Hage, L. (2015a) Impact of Drought on Diatom Communities and the Consequences for the use of Diatom Index Values in the River Maureillas (Pyrénées-Orientales, France). *River Res. Appl.* **31**: 993–1002.
- Barthès, Amélie, Ten-Hage, L., Lamy, A., Rols, J.-L., and Leflaive, J. (2015b) Resilience of aggregated microbial communities subjected to drought—small-scale studies. *Microb. Ecol.* **70**: 9–20.
- Battin, T.J., Kaplan, L.A., Denis Newbold, J., and Hansen, C.M.E. (2003a) Contributions of microbial biofilms to ecosystem processes in stream mesocosms. *Nature* **426**: 439–442.
- Battin, T.J., Kaplan, L.A., Newbold, J.D., Cheng, X., and Hansen, C. (2003b) Effects of current velocity on the nascent architecture of stream microbial biofilms. *Appl. Environ. Microbiol.* **69**: 5443–5452.
- Battin, T.J., Besemer, K., Bengtsson, M.M., Romani, A.M., and Packmann, A.I. (2016) The ecology and biogeochemistry of stream biofilms. *Nat. Rev. Microbiol.* **14**: 251–263.
- Battisti, C., Poeta, G., and Fanelli, G. (2016) An Introduction to Disturbance Ecology: A Road Map for Wildlife Management and Conservation Springer.
- Bayles, K.W. (2007) The biological role of death and lysis in biofilm development. *Nat. Rev. Microbiol.* **5**: 721.
- Becker, K. (1996) Exopolysaccharide production and attachment strength of bacteria and diatoms on substrates with different surface tensions. *Microb. Ecol.* **32**: 23–33.

- Beck, A.J., Janssen, F., Polerecky, L., Herlory, O., and de Beer, D. (2009) Phototrophic biofilm activity and dynamics of diurnal Cd cycling in a freshwater stream. *Environ. Sci. Technol.* **43**: 7245–7251.
- Bell, W. and Mitchell, R. (1972) Chemotactic and growth responses of marine bacteria to algal extracellular products. *Biol. Bull.* **143**: 265–277.
- Bengtsson, M.M., Wagner, K., Schwab, C., Urich, T., and Battin, T.J. (2018) Light availability impacts structure and function of phototrophic stream biofilms across domains and trophic levels. *Mol. Ecol.*
- Besemer, K., Singer, G., Limberger, R., Chlup, A.-K., Hochedlinger, G., Hödl, I., et al. (2007) Biophysical controls on community succession in stream biofilms. *Appl. Environ. Microbiol.* **73**: 4966–4974.
- Besemer, K., Hödl, I., Singer, G., and Battin, T.J. (2009) Architectural differentiation reflects bacterial community structure in stream biofilms. *ISME J.* **3**: 1318.
- Bharti, A., Velmourougane, K., and Prasanna, R. (2017) Phototrophic biofilms: diversity, ecology and applications. *J. Appl. Phycol.* **29**: 2729–2744.
- Biggs, B.J.F. (1996) Patterns in benthic algae of streams. *Algal Ecol. Freshw. Benthic Ecosyst.* 31–56.
- Blanck, H., Wängberg, S., Aake, and Molander, S. (1988) Pollution-induced community tolerance (PICT)-a new ecotoxicological tool. In: Cairns J Jr. & Pratt JR (eds) Functional testing of Aquatic Biota for Estimating Hazards of Chemicals, ASTM STP 988. *Am. Soc. Test. Mater. Phila. Pp 219-230* Cited 138 Times 2011-03.
- Böhme, A., Risse-Buhl, U., and Küsel, K. (2009) Protists with different feeding modes change biofilm morphology. *FEMS Microbiol. Ecol.* **69**: 158–169.
- Bonada, N. and Resh, V.H. (2013) Mediterranean-climate streams and rivers: geographically separated but ecologically comparable freshwater systems. *Hydrobiologia* **719**: 1–29.
- Bothwell, M.L. (1985) Phosphorus limitation of lotic periphyton growth rates: An intersite comparison using continuous-flow troughs (Thompson River system, British Columbia). *Limnol. Oceanogr.* **30**: 527–542.
- Bothwell, M. (1993) Algal-nutrient dynamics. *Res. Artif. Stream Appl. Uses Abus.* **12**: 327–333.
- Boulêtreau, S., Lyautey, E., Dubois, S., Compin, A., Delattre, C., Touron-Bodilis, A. (2014) Warming-induced changes in denitrifier community structure modulate the ability of phototrophic river biofilms to denitrify. *Sci. Total Environ.* **466**: 856–863.

- Bradford, M.M. (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* **72**: 248–254.
- Branco, D., Lima, A., Almeida, S.F., and Figueira, E. (2010) Sensitivity of biochemical markers to evaluate cadmium stress in the freshwater diatom *Nitzschia palea* (Kützing) W. Smith. *Aquat. Toxicol.* **99**: 109–117.
- Brooks, R.T. (2009) Potential impacts of global climate change on the hydrology and ecology of ephemeral freshwater systems of the forests of the northeastern United States. *Clim. Change* **95**: 469–483.
- Buhmann, M., Kroth, P.G., and Schleheck, D. (2012) Photoautotrophic–heterotrophic biofilm communities: a laboratory incubator designed for growing axenic diatoms and bacteria in defined mixed-species biofilms. *Environ. Microbiol. Rep.* **4**: 133–140.
- C**ahoon, L.B. (2014) The role of benthic microalgae in neritic ecosystems. In, *Oceanography and Marine Biology, An Annual Review, Volume 37*. CRC Press, pp. 55–94.
- Cao, D., Xie, P., Deng, J., Zhang, H., Ma, R., Liu, C., et al. (2015) Effects of Cu²⁺ and Zn²⁺ on growth and physiological characteristics of green algae, *Cladophora*. *Environ. Sci. Pollut. Res.* **22**: 16535–16541.
- Cardinale, M., Brusetti, L., Quatrini, P., Borin, S., Puglia, A.M., Rizzi, A., et al. (2004) Comparison of different primer sets for use in automated ribosomal intergenic spacer analysis of complex bacterial communities. *Appl. Environ. Microbiol.* **70**: 6147–6156.
- Castenholz, R.W., Wilmotte, A., Herdman, M., Rippka, R., Waterbury, J.B., Itean, I., and Hoffmann, L. (2001) Phylum BX. cyanobacteria. In, *Bergey's Manual® of Systematic Bacteriology*. Springer, pp. 473–599.
- Cattaneo, A. and Kalff, J. (1980) The relative contribution of aquatic macrophytes and their epiphytes to the production of macrophyte beds 1. *Limnol. Oceanogr.* **25**: 280–289.
- Cattaneo, A. and Amireault, M.C. (1992) How artificial are artificial substrata for periphyton? *J. North Am. Benthol. Soc.* **11**: 244–256.
- Caudan, C., Filali, A., Lefebvre, D., Spérandio, M., and Girbal-Neuhauser, E. (2012) Extracellular Polymeric Substances (EPS) from Aerobic Granular Sludges: Extraction, Fractionation, and Anionic Properties. *Appl. Biochem. Biotechnol.* **166**: 1685–1702.
- Celler, K., Hödl, I., Simone, A., Battin, T.J., and Picioreanu, C. (2014) A mass-spring model unveils the morphogenesis of phototrophic Diatoma biofilms. *Sci. Rep.* **4**: 3649.

- Celmer, D., Oleszkiewicz, J.A., and Cicek, N. (2008) Impact of shear force on the biofilm structure and performance of a membrane biofilm reactor for tertiary hydrogen-driven denitrification of municipal wastewater. *Water Res.* **42**: 3057–3065.
- Characklis, W.G. and Wilderer, P.A. (1989) Structure and function of biofilms. In, *Structure and Function of Biofilms*. John Wiley & Sons.
- Cheng, Y.-S., Zheng, Y., Labavitch, J.M., and VanderGheynst, J.S. (2011) The impact of cell wall carbohydrate composition on the chitosan flocculation of *Chlorella*. *Process Biochem.* **46**: 1927–1933.
- Cheng, Y.-S., Zheng, Y., Labavitch, J.M., and VanderGheynst, J.S. (2013) Virus infection of *Chlorella variabilis* and enzymatic saccharification of algal biomass for bioethanol production. *Bioresour. Technol.* **137**: 326–331.
- Christoffersen, K., Andersen, N., Søndergaard, M., Liboriussen, L., and Jeppesen, E. (2006). Implications of climate-enforced temperature increases on freshwater pico-and nanoplankton populations studied in artificial ponds during 16 months. *Hydrobiologia* **560**, 259–266.
- Chróst, R.J. (1990) Microbial ectoenzymes in aquatic environments. In, *Aquatic microbial ecology*. Springer, pp. 47–78.
- Cid, A., Herrero, C., Torres, E., and Abalde, J. (1995). Copper toxicity on the marine microalga *Phaeodactylum tricornerutum*: effects on photosynthesis and related parameters. *Aquatic Toxicology* **31**, 165–174.
- Coleman, A.W. (1983) The roles of resting spores and akinetes in chlorophyte survival. *Surviv. Strateg. Algae* 1–21.
- Comte, S., Guibaud, G., and Baudu, M. (2007) Effect of extraction method on EPS from activated sludge: an HPSEC investigation. *J. Hazard. Mater.* **140**: 129–137.
- Cong, M., Wu, H., Liu, X., Zhao, J., Wang, X., Lv, J., and Hou, L. (2012) Effects of heavy metals on the expression of a zinc-inducible metallothionein-III gene and antioxidant enzyme activities in *Crassostrea gigas*. *Ecotoxicology* **21**: 1928–1936.
- Connor, S.J., Alexander-Trusiak, A.C., and Baird, D.J. (2018) Vulnerability of diatom communities in the Peace–Athabasca Delta to environmental change. *PeerJ* **6**: e5447.
- Corcoll, N., Bonet, B., Leira, M., and Guasch, H. (2011) Chl-a fluorescence parameters as biomarkers of metal toxicity in fluvial biofilms: an experimental study. *Hydrobiologia* **673**: 119–136.
- Cordoba-Castro, N.M., Montenegro-Jaramillo, A.M., Prieto, R.E., and Gonzalez-Marino, G.E. (2012) Analysis of the effect of the interactions among three processing variables for

- the production of exopolysaccharides in the microalgae *Scenedesmus obliquus* (UTEX 393). *Vitae* **19**: 60–69.
- Costerton, J.W., Geesey, G.G., and Cheng, K.-J. (1978) How bacteria stick. *Sci. Am.* **238**: 86–95.
- Costerton, J.W., Lewandowski, Z., Caldwell, D.E., Korber, D.R., and Lappin-Scott, H.M. (1995) Microbial biofilms. *Annu. Rev. Microbiol.* **49**: 711–745.
- Coundoul, F., Bonometti, T., Graba, M., Sauvage, S., Sanchez Pérez, J.-M., and Moulin, F.Y. (2015) Role of local flow conditions in river biofilm colonization and early growth. *River Res. Appl.* **31**: 350–367.
- Coutaud, A.M. (2016) Contribution des biofilms phototrophes d'écosystèmes aquatiques continentaux aux flux et fractionnements isotopiques des éléments en trace métallique (cuivre, zinc).
- Coutaud, M., Méheut, M., Glatzel, P., Pokrovski, G.S., Viers, J., Rols, J.-L., and Pokrovsky, O.S. (2018). Small changes in Cu redox state and speciation generate large isotope fractionation during adsorption and incorporation of Cu by a phototrophic biofilm. *Geochimica et Cosmochimica Acta* **220**, 1–18.
- D**a Silva, E.F., Almeida, S.F., Nunes, M.L., Luís, A.T., Borg, F., Hedlund, M., et al. (2009) Heavy metal pollution downstream the abandoned Coval da Mó mine (Portugal) and associated effects on epilithic diatom communities. *Sci. Total Environ.* **407**: 5620–5636.
- Dao, L.H. and Beardall, J. (2016) Effects of lead on growth, photosynthetic characteristics and production of reactive oxygen species of two freshwater green algae. *Chemosphere* **147**: 420–429.
- Das, T., Sehar, S., and Manefield, M. (2013) The roles of extracellular DNA in the structural integrity of extracellular polymeric substance and bacterial biofilm development. *Environ. Microbiol. Rep.* **5**: 778–786.
- Davis, J.S. (1972) Survival records in the algae, and the survival role of certain algal pigments, fat, and mucilaginous substances. *Biologist*.
- Dayananda, C., Sarada, R., Rani, M.U., Shamala, T.R., and Ravishankar, G.A. (2007) Autotrophic cultivation of *Botryococcus braunii* for the production of hydrocarbons and exopolysaccharides in various media. *Biomass Bioenergy* **31**: 87–93.
- De Brouwer, J.F. and Stal, L.J. (2002a) Daily fluctuations of exopolymers in cultures of the benthic diatoms *Cylindrotheca closterium* and *Nitzschia* sp. (*Bacillariophyceae*) 1. *J. Phycol.* **38**: 464–472.

- De Brouwer, J.F.C., Wolfstein, K., and Stal, L.J. (2002b) Physical characterization and diel dynamics of different fractions of extracellular polysaccharides in an axenic culture of a benthic diatom. *Eur. J. Phycol.* **37**: 37–44.
- De Crignis, M. (2010) Déterminisme de la production bactérienne dans les vasières intertidales du Bassin de Marennes-Oléron: rôle des exopolysaccharides.
- De La Rocha, C., Hutchins, D.A., Brzezinski, M.A., and Zhang, Y. (2000) Effects of iron and zinc deficiency on elemental composition and silica production by diatoms. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* **195**: 71–79.
- De Philippis, R., Colica, G., and Micheletti, E. (2011) Exopolysaccharide-producing cyanobacteria in heavy metal removal from water: molecular basis and practical applicability of the biosorption process. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **92**: 697.
- Deaver, E. and Rodgers, J.H. (1996) Measuring bioavailable copper using anodic stripping voltammetry. *Environ. Toxicol. Chem.* **15**: 1925–1930.
- Decho, A.W. (2000) Microbial biofilms in intertidal systems: an overview. *Cont. Shelf Res.* **20**: 1257–1273.
- DeFlaun, M.F., Paul, J.H., and Davis, D. (1986) Simplified method for dissolved DNA determination in aquatic environments. *Appl. Environ. Microbiol.* **52**: 654–659.
- Delattre, C., Pierre, G., Laroche, C., and Michaud, P. (2016) Production, extraction and characterization of microalgal and cyanobacterial exopolysaccharides. *Biotechnol. Adv.* **34**: 1159–1179.
- DeNicola, D.M. (1996) Periphyton responses to temperature at different ecological levels. *Algal Ecol. Freshw. Benthic Ecosyst.* 149–181.
- Di Pippo, F., Ellwood, N.T.W., Guzzon, A., Siliato, L., Micheletti, E., De Philippis, R., and Albertano, P.B. (2012) Effect of light and temperature on biomass, photosynthesis and capsular polysaccharides in cultured phototrophic biofilms. *J. Appl. Phycol.* **24**: 211–220.
- Ding, Z., Bourven, I., Guibaud, G., van Hullebusch, E.D., Panico, A., Pirozzi, F., and Esposito, G. (2015) Role of extracellular polymeric substances (EPS) production in bioaggregation: application to wastewater treatment. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **99**: 9883–9905.
- Dodds, W.K. (2003) The role of periphyton in phosphorus retention in shallow freshwater aquatic systems. *J. Phycol.* **39**: 840–849.
- Dodds, W.K. (2006) Eutrophication and trophic state in rivers and streams. *Limnol. Oceanogr.* **51**: 671–680.

- Domozych, D.S. (1999). Disruption of the Golgi apparatus and secretory mechanism in the desmid, *Closterium acerosum*, by brefeldin A. *Journal of Experimental Botany* **50**, 1323–1330.
- Domozych, D.S. (2007) Exopolymer production by the green alga *Penium margaritaceum*: implications for biofilm residency. *Int. J. Plant Sci.* **168**: 763–774.
- Dopheide, A., Lear, G., Stott, R., and Lewis, G. (2008) Molecular characterization of ciliate diversity in stream biofilms. *Appl. Environ. Microbiol.* **74**: 1740–1747.
- Dreywood, R. (1946) Qualitative test for carbohydrate material. *Ind. Eng. Chem. Anal. Ed.* **18**: 499–499.
- Du, G.Y., Son, M., An, S., and Chung, I.K. (2010) Temporal variation in the vertical distribution of microphytobenthos in intertidal flats of the Nakdong River estuary, Korea. *Estuar. Coast. Shelf Sci.* **86**: 62–70.
- Dubois, M., Gilles, K.A., Hamilton, J.K., Rebers, P. t, and Smith, F. (1956) Colorimetric method for determination of sugars and related substances. *Anal. Chem.* **28**: 350–356.
- Duong, T.T., Morin, S., Herlory, O., Feurtet-Mazel, A., Coste, M., and Boudou, A. (2008) Seasonal effects of cadmium accumulation in periphytic diatom communities of freshwater biofilms. *Aquat. Toxicol.* **90**: 19–28.
- Duong, T.T., Morin, S., Coste, M., Herlory, O., Feurtet-Mazel, A., and Boudou, A. (2010) Experimental toxicity and bioaccumulation of cadmium in freshwater periphytic diatoms in relation with biofilm maturity. *Sci. Total Environ.* **408**: 552–562.
- Durmaz, B. and Sanin, F.D. (2001) Effect of carbon to nitrogen ratio on the composition of microbial extracellular polymers in activated sludge. *Water Sci. Technol.* **44**: 221–229.
- E**hling-Schulz, M., Bilger, W., and Scherer, S. (1997) UV-B-induced synthesis of photoprotective pigments and extracellular polysaccharides in the terrestrial cyanobacterium *Nostoc commune*. *J. Bacteriol.* **179**: 1940–1945.
- Ellison, A.M., Bank, M.S., Clinton, B.D., Colburn, E.A., Elliott, K., Ford, C.R., et al. (2005) Loss of foundation species: consequences for the structure and dynamics of forested ecosystems. *Front. Ecol. Environ.* **3**: 479–486.
- F**ang, F., Lu, W.-T., Shan, Q., and Cao, J.-S. (2014) Characteristics of extracellular polymeric substances of phototrophic biofilms at different aquatic habitats. *Carbohydr. Polym.* **106**: 1–6.

- Fattom, A. and Shilo, M. (1984) Phormidium J-1 biofloculant: production and activity. *Arch. Microbiol.* **139**: 421–426.
- Figueira, E., Freitas, R., Guasch, H., and Almeida, S.F.P. (2014) Efficiency of cadmium chelation by phytochelatins in *Nitzschia palea* (Kützinger) W. Smith. *Ecotoxicology* **23**: 285–292.
- Fink, R., Oder, M., Rangus, D., Raspor, P., and Bohinc, K. (2015) Microbial adhesion capacity. Influence of shear and temperature stress. *Int. J. Environ. Health Res.* **25**: 656–669.
- Flemming, H.-C., Neu, T.R., and Wozniak, D.J. (2007) The EPS matrix: the “house of biofilm cells.” *J. Bacteriol.* **189**: 7945–7947.
- Flemming, H.-C. and Wingender, J. (2010) The biofilm matrix. *Nat. Rev. Microbiol.* **8**: 623–633.
- Flemming, H.-C. (2016) EPS—Then and Now. *Microorganisms* **4**: 41.
- Fogg, G.E. (1956) The comparative physiology and biochemistry of the blue-green algae. *Bacteriol. Rev.* **20**: 148.
- Fogg, G.E. (2001) Algal adaptation to stress—some general remarks. In, *Algal adaptation to environmental stresses*. Springer, pp. 1–19.
- Friedman, O., Dubinsky, Z., and Arad, S.M. (1991) Effect of light intensity on growth and polysaccharide production in red and blue-green *rhodophyta* unicells. *Bioresour. Technol.* **38**: 105–110.
- Frølund, B., Palmgren, R., Keiding, K., and Nielsen, P.H. (1996) Extraction of extracellular polymers from activated sludge using a cation exchange resin. *Water Res.* **30**: 1749–1758.
- G**aillardet, J., Viers, J., and Dupré, B. (2014). Trace elements in river waters.
- García-Meza, J.V., Barrangue, C., and Admiraal, W. (2005) Biofilm formation by algae as a mechanism for surviving on mine tailings. *Environ. Toxicol. Chem.* **24**: 573–581.
- Garozzo, D., Impallomeni, G., Spina, E., and Sturiale, L. (1998) The structure of the exocellular polysaccharide from the cyanobacterium *Cyanospira capsulata*. *Carbohydr. Res.* **307**: 113–124.
- Ge, L.Y., Huang, Y.G., Gao, D.X., and Deng, H.H. (2013) Comparison of Extraction Methods for Quantifying Extracellular Polymers of Marine Algae. In, *Applied Mechanics and Materials*. Trans Tech Publ, pp. 1173–1178.

- Ge, H., Xia, L., Zhou, X., Zhang, D., and Hu, C. (2014) Effects of light intensity on components and topographical structures of extracellular polysaccharides from the cyanobacteria *Nostoc* sp. *J. Microbiol.* **52**: 179–183.
- Gechev, T.S., Van Breusegem, F., Stone, J.M., Denev, I., and Laloi, C. (2006). Reactive oxygen species as signals that modulate plant stress responses and programmed cell death. *Bioessays* 28, 1091–1101.
- Geesey, G.G., Mutch, R., Costerton, J. t, and Green, R.B. (1978) Sessile bacteria: An important component of the microbial population in small mountain streams 1. *Limnol. Oceanogr.* **23**: 1214–1223.
- Gélabert, A., Pokrovsky, O.S., Schott, J., Boudou, A., and Feurtet-Mazel, A. (2007) Cadmium and lead interaction with diatom surfaces: a combined thermodynamic and kinetic approach. *Geochim. Cosmochim. Acta* **71**: 3698–3716.
- Genter, R.B. (1996) Ecotoxicology of inorganic chemical stress to algae. In, *Algal ecology*. Elsevier, pp. 403–468.
- Gloaguen, V., Morvan, H., Hoffmann, L., Plancke, Y., Wieruszeski, J.-M., Lippens, G., and Strecker, G. (1999) Capsular polysaccharide produced by the thermophilic cyanobacterium *Mastigocladus laminosus*: Structural study of an undecasaccharide obtained by lithium degradation. *Eur. J. Biochem.* **266**: 762–770.
- Glud, R.N., Kühl, M., Wenzhöfer, F., and Rysgaard, S. (2002) Benthic diatoms of a high Arctic fjord (Young Sound, NE Greenland): importance for ecosystem primary production. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* **238**: 15–29.
- Gold, C. (2002) Étude des effets de la pollution métallique (Cd/Zn) sur la structure des communautés de diatomées périphtiques des cours d'eau: approches expérimentales in situ et en laboratoire.
- Gold, C., Feurtet-Mazel, A., Coste, M., and Boudou, A. (2003) Impacts of Cd and Zn on the development of periphytic diatom communities in artificial streams located along a river pollution gradient. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* **44**: 0189–0197.
- Gonçalves, S., Kahlert, M., Almeida, S.F., and Figueira, E. (2018) Assessing Cu impacts on freshwater diatoms: biochemical and metabolomic responses of *Tabellaria flocculosa* (Roth) Kützing. *Sci. Total Environ.* **625**: 1234–1246.
- Guanzon, N.G., Nakahara, H., and Yoshida, Y. (1994) Inhibitory effects of heavy metals on growth and photosynthesis of three freshwater microalgae. *Fish. Sci.* **60**: 379–384.
- Guasch, H., Paulsson, M., and Sabater, S. (2002) Effect of copper on algal communities from oligotrophic calcareous streams 1. *J. Phycol.* **38**: 241–248.

- Guasch, H., Ricart, M., López-Doval, J., Bonnineau, C., Proia, L., Morin, S., et al. (2016) Influence of grazing on triclosan toxicity to stream periphyton. *Freshw. Biol.* **61**: 2002–2012.
- Guo, X., Liu, J., and Xiao, B. (2014) Evaluation of the damage of cell wall and cell membrane for various extracellular polymeric substance extractions of activated sludge. *J. Biotechnol.* **188**: 130–135.
- Guo, X., Wang, X., and Liu, J. (2016) Composition analysis of fractions of extracellular polymeric substances from an activated sludge culture and identification of dominant forces affecting microbial aggregation. *Sci. Rep.* **6**: 28391.
- H**aferburg, G. and Kothe, E. (2012) Biogeosciences in heavy metal-contaminated soils. In, *Bio-Geo Interactions in Metal-Contaminated Soils*. Springer, pp. 17–34.
- Hakenkamp, C.C. and Morin, A. (2000) The importance of meiofauna to lotic ecosystem functioning. *Freshw. Biol.* **44**: 165–175.
- Han, P., Shen, S., Wang, H.-Y., Sun, Y., Dai, Y., and Jia, S. (2015). Comparative metabolomic analysis of the effects of light quality on polysaccharide production of cyanobacterium *Nostoc flagelliforme*. *Algal Research* 9, 143–150.
- Hanelt, D. (1998) Capability of dynamic photoinhibition in Arctic macroalgae is related to their depth distribution. *Mar. Biol.* **131**: 361–369.
- Hanlon, A.R., Bellinger, B., Haynes, K., Xiao, G., Hofmann, T.A., Gretz, M.R., et al. (2006) Dynamics of extracellular polymeric substance (EPS) production and loss in an estuarine, diatom-dominated, microalgal biofilm over a tidal emersion—immersion period. *Limnol. Oceanogr.* **51**: 79–93.
- Hargraves, P.E. (1983), Diatom resting spores: significance and strategies. *Surviv. Strateg. Algae* 49–68.
- Hay, S.I., Maitland, T.C., and Paterson, D.M. (1993) The speed of diatom migration through natural and artificial substrata. *Diatom Res.* **8**: 371–384.
- Hofmann, T., Hanlon, A.R., Taylor, J.D., Ball, A.S., Osborn, A.M., and Underwood, G.J. (2009) Dynamics and compositional changes in extracellular carbohydrates in estuarine sediments during degradation. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* **379**: 45–58.
- Hogsden, K.L. and Harding, J.S. (2012) Anthropogenic and natural sources of acidity and metals and their influence on the structure of stream food webs. *Environ. Pollut.* **162**: 466–474.

- Holzinger, A., Lütz, C., and Karsten, U. (2011) Desiccation stress causes structural and ultrastructural alterations in the aeroterrestrial green alga *Klebsormidium crenulatum* (*Klebsormidiophyceae*, *Streptophyta*) isolated from an alpine soil crust 1. *J. Phycol.* **47**: 591–602.
- Humphrey, G.K. and Wootton, M. (1966) Determination of photosynthetic pigments in seawater Paris: UNESCO.
- I**NERIS, 2014. Données technico-économiques sur les substances chimiques en France : Zinc et principaux composés, DRC-14-136881-02237A, 74 p. (<http://rsde.ineris.fr/>).
- IPCC. 2007. Contribution of Working Group II to the Fourth Assessment. Report of the Intergovernmental Panel on Climate Change. in *Climate Change 2007: Impacts, Adaptation and Vulnerability* (eds. Parry ML, Canziani OF, Palutikof JP, van der Linden PJ, Hanson CE), p. 976, Cambridge, UK.
- Ivorra, N., Bremer, S., Guasch, H., Kraak, M.H., and Admiraal, W. (2000) Differences in the sensitivity of benthic microalgae to Zn and Cd regarding biofilm development and exposure history. *Environ. Toxicol. Chem.* **19**: 1332–1339.
- Ivorra, N., Barranguet, C., Jonker, M., Kraak, M.H., and Admiraal, W. (2002) Metal-induced tolerance in the freshwater microbenthic diatom *Gomphonema parvulum*. *Environ. Pollut.* **116**: 147–157.
- J**ahn, A. and Nielsen, P.H. (1995) Extraction of extracellular polymeric substances (EPS) from biofilms using a cation exchange resin. *Water Sci. Technol.* **32**: 157.
- Jensen, T.E., Baxter, M., Rachlin, J.W., and Jani, V. (1982) Uptake of heavy metals by *Plectonema boryanum* (*Cyanophyceae*) into cellular components, especially polyphosphate bodies: an X-ray energy dispersive study. *Environ. Pollut. Ser. Ecol. Biol.* **27**: 119–127.
- Jesus, B., Perkins, R.G., Consalvey, M., Brotas, V., and Paterson, D.M. (2006) Effects of vertical migrations by benthic microalgae on fluorescence measurements of photophysiology. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* **315**: 55–66.
- Johnson, D.B. and Hallberg, K.B. (2005) Acid mine drainage remediation options: a review. *Sci. Total Environ.* **338**: 3–14.
- Joubert, L.-M., Wolfaardt, G.M., and Botha, A. (2006) Microbial exopolymers link predator and prey in a model yeast biofilm system. *Microb. Ecol.* **52**: 187–197.
- Julien, P.Y. (2002) *River mechanics* Cambridge University Press.

- Kamjunke, N., Herzsprung, P., and Neu, T.R. (2015) Quality of dissolved organic matter affects planktonic but not biofilm bacterial production in streams. *Sci. Total Environ.* **506**: 353–360.
- Kaplan, D., Christiaen, D., and Arad, S. (1988) Binding of heavy metals by algal polysaccharides. *Algal Biotechnol. T Stadler Al.*
- Karsten, U. and Holzinger, A. (2012) Light, temperature, and desiccation effects on photosynthetic activity, and drought-induced ultrastructural changes in the green alga *Klebsormidium dissectum* (*Streptophyta*) from a high alpine soil crust. *Microb. Ecol.* **63**: 51–63.
- Keidan, M., Broshy, H., Van Moppes, D., and Arad, S. (2006) Assimilation of sulphur into the cell-wall polysaccharide of the red microalga *Porphyridium sp.* (*Rhodophyta*). *Phycologia* **45**: 505–511.
- Kilham, S.S., Kreeger, D.A., Lynn, S.G., Goulden, C.E., and Herrera, L. (1998) COMBO: a defined freshwater culture medium for algae and zooplankton. *Hydrobiologia* **377**: 147–159.
- Klein, M.I., Scott-Anne, K.M., Gregoire, S., Rosalen, P.L., and Koo, H. (2012) Molecular approaches for viable bacterial population and transcriptional analyses in a rodent model of dental caries. *Mol. Oral Microbiol.* **27**: 350–361.
- Klemm, P. and Schembri, M. (2004) Type 1 Fimbriae, Curli, and Antigen 43: Adhesion, Colonization, and Biofilm Formation. *Ecosal Plus* **1**.
- Klimmek, S., Stan, H.-J., Wilke, A., Bunke, G., and Buchholz, R. (2001) Comparative analysis of the biosorption of cadmium, lead, nickel, and zinc by algae. *Environ. Sci. Technol.* **35**: 4283–4288.
- Knowles, E.J. and Castenholz, R.W. (2008) Effect of exogenous extracellular polysaccharides on the desiccation and freezing tolerance of rock-inhabiting phototrophic microorganisms. *FEMS Microbiol. Ecol.* **66**: 261–270.
- Koehler, L.H. (1952) Differentiation of carbohydrates by anthrone reaction rate and color intensity. *Anal. Chem.* **24**: 1576–1579.
- Kostel, J.A., Wang, H., Amand, A.L.S., and Gray, K.A. (1999) 1. Use of a novel laboratory stream system to study the ecological impact of PCB exposure in a periphytic biolayer. *Water Res.* **33**: 3735–3748.
- Krembs, C., Eicken, H., Junge, K., and Deming, J.W. (2002) High concentrations of exopolymeric substances in Arctic winter sea ice: implications for the polar ocean

- carbon cycle and cryoprotection of diatoms. *Deep Sea Res. Part Oceanogr. Res. Pap.* **49**: 2163–2181.
- Lake, P.S. (2000) Disturbance, patchiness, and diversity in streams. *J. North Am. Benthol. Soc.* **19**: 573–592.
- Lama, L., Nicolaus, B., Calandrelli, V., Manca, M.C., Romano, I., and Gambacorta, A. (1996) Effect of growth conditions on endo-and exopolymer biosynthesis in *Anabaena cylindrica* 10 C. *Phytochemistry* **42**: 655–659.
- Lambert, A.S., Dabrin, A., Morin, S., Gahou, J., Foulquier, A., Coquery, M., and Pesce, S. (2016) Temperature modulates phototrophic periphyton response to chronic copper exposure. *Environ. Pollut.* **208**: 821–829.
- Larned, S.T., Datry, T., Arscott, D.B., and Tockner, K. (2010) Emerging concepts in temporary-river ecology. *Freshw. Biol.* **55**: 717–738.
- Lawrence, J.R., Scharf, B., Packroff, G., and Neu, T.R. (2002) Microscale evaluation of the effects of grazing by invertebrates with contrasting feeding modes on river biofilm architecture and composition. *Microb. Ecol.* **44**: 199–207.
- Lear, G., Anderson, M.J., Smith, J.P., Boxen, K., and Lewis, G.D. (2008). Spatial and temporal heterogeneity of the bacterial communities in stream epilithic biofilms. *FEMS Microbiology Ecology* **65**, 463–473.
- Lear, G., Niyogi, D., Harding, J., Dong, Y., and Lewis, G. (2009) Biofilm bacterial community structure in streams affected by acid mine drainage. *Appl. Environ. Microbiol.* **75**: 3455–3460.
- Lecuyer, S., Rusconi, R., Shen, Y., Forsyth, A., Vlamakis, H., Kolter, R., and Stone, H.A. (2011) Shear stress increases the residence time of adhesion of *Pseudomonas aeruginosa*. *Biophys. J.* **100**: 341–350.
- Ledger, M.E., Harris, R.M., Armitage, P.D., and Milner, A.M. (2008) Disturbance frequency influences patch dynamics in stream benthic algal communities. *Oecologia* **155**: 809–819.
- Leflaive, J., Boulêtreau, S., Buffan-Dubau, E., and Ten-Hage, L. (2008) Temporal patterns in epilithic biofilm–relation with a putative allelopathic activity. *Fundam. Appl. Limnol. Für Hydrobiol.* **173**: 121–134.
- Leflaive, J., Felten, V., Ferriol, J., Lamy, A., Ten-Hage, L., Bec, A., and Danger, M. (2015). Community structure and nutrient level control the tolerance of autotrophic biofilm to silver contamination. *Environmental Science and Pollution Research* **22**, 13739–13752.

- Li, H., Yuan, Y., Shen, C., Wen, Y., and Liu, H. (2008) Enantioselectivity in toxicity and degradation of dichlorprop-methyl in algal cultures. *J. Environ. Sci. Health Part B* **43**: 288–292.
- Li, P., Harding, S.E., and Liu, Z. (2001) Cyanobacterial exopolysaccharides: their nature and potential biotechnological applications. *Biotechnol. Genet. Eng. Rev.* **18**: 375–404.
- Liang, Z., Li, W., Yang, S., and Du, P. (2010) Extraction and structural characteristics of extracellular polymeric substances (EPS), pellets in autotrophic nitrifying biofilm and activated sludge. *Chemosphere* **81**: 626–632.
- Limoli, D.H., Jones, C.J., and Wozniak, D.J. (2015) Bacterial extracellular polysaccharides in biofilm formation and function. *Microbiol. Spectr.* **3**.
- Little, A.E., Robinson, C.J., Peterson, S.B., Raffa, K.F., and Handelsman, J. (2008) Rules of engagement: interspecies interactions that regulate microbial communities. *Annu Rev Microbiol* **62**: 375–401.
- Liu, H. and Fang, H.H. (2002) Extraction of extracellular polymeric substances (EPS) of sludges. *J. Biotechnol.* **95**: 249–256.
- Lowman, M.D. and Rinker, H.B. (2004) Forest canopies Elsevier.
- Lowry, O., Rosebrough, N., Farr, A., and Randall, R. (1951) Protein measurement with Folin-phenol reagent. *J Biol Chem* **193**: 265275.
- Lu, Y.J., Jiang, A.L., Dou, B.R., Wang, C., and Wang, C.H. (2010) Effect of Cd (II) and Zn (II) on growth and biochemical composition of alga *Nitzschia closterium*. *J Dalian Fish Univ* **25**: 178–182.
- Luís, A.T., Bonet, B., Corcoll, N., Almeida, S.F., Da Silva, E.F., Figueira, E., and Guasch, H. (2014) Experimental evaluation of the contribution of acidic pH and Fe concentration to the structure, function and tolerance to metals (Cu and Zn) exposure in fluvial biofilms. *Ecotoxicology* **23**: 1270–1282.
- Lunch, C.K., LaFountain, A.M., Thomas, S., Frank, H.A., Lewis, L.A., and Cardon, Z.G. (2013) The xanthophyll cycle and NPQ in diverse desert and aquatic green algae. *Photosynth. Res.* **115**: 139–151.
- Lund, J.W.G. (1954) The seasonal cycle of the plankton diatom, *Melosira italica* (Ehr.) Kutz. subsp. subarctica O. Mull. *J. Ecol.* 151–179.
- Lütz, C., Seidlitz, H.K., and Meindl, U. (1997) Physiological and structural changes in the chloroplast of the green alga *Micrasterias denticulata* induced by UV-B simulation. *Plant Ecol.* **128**: 55–64.

- Lyautey, E., Lacoste, B., Ten-Hage, L., Rols, J.-L., and Garabetian, F. (2005) Analysis of bacterial diversity in river biofilms using 16 S rDNA PCR-DGGE: methodological settings and fingerprints interpretation. *Water Res.* **39**: 380–388.
- Lyautey, E., Cournet, A., Morin, S., Boulêtreau, S., Etcheverry, L., Charcosset, J.-Y., et al. (2011) Electroactivity of phototrophic river biofilms and constitutive cultivable bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.* AEM-00500.
- M**agaletti, E., Urbani, R., Sist, P., Ferrari, C.R., and Cicero, A.M. (2004). Abundance and chemical characterization of extracellular carbohydrates released by the marine diatom *Cylindrotheca fusiformis* under N- and P-limitation. *European Journal of Phycology* **39**, 133–142.
- Martínez-Alonso, M., Van Bleijswijk, J., Gaju, N., and Muyzer, G. (2005) Diversity of anoxygenic phototrophic sulfur bacteria in the microbial mats of the Ebro Delta: a combined morphological and molecular approach. *FEMS Microbiol. Ecol.* **52**: 339–350.
- Mayer, C., Moritz, R., Kirschner, C., Borchard, W., Maibaum, R., Wingender, J., and Flemming, H.-C. (1999) The role of intermolecular interactions: studies on model systems for bacterial biofilms. *Int. J. Biol. Macromol.* **26**: 3–16.
- Mbaye, S. (2011) Couplage hydrodynamique-biomasse dans les procédés de dépollution. Approche locale des mécanismes de croissance et d'adhésion/détachement de micro-organismes sur substrats solides.
- McFarland, B.H., Hill, B.H., and Willingham, W.T. (1997) *Abnormal Fragilaria spp. (Bacillariophyceae)* in streams impacted by mine drainage. *J. Freshw. Ecol.* **12**: 141–149.
- McQuoid, M.R. and Hobson, L.A. (1996) Diatom resting stages. *J. Phycol.* **32**: 889–902.
- McSwain, B.S., Irvine, R.L., Hausner, M., and Wilderer, P.A. (2005) Composition and distribution of extracellular polymeric substances in aerobic flocs and granular sludge. *Appl. Environ. Microbiol.* **71**: 1051–1057.
- Miao, A.-J., Wang, W.-X., and Juneau, P. (2005). Comparison of Cd, Cu, and Zn toxic effects on four marine phytoplankton by pulse-amplitude-modulated fluorometry. *Environmental Toxicology and Chemistry* **24**, 2603–2611.
- Miao, L., Wang, C., Hou, J., Wang, P., Ao, Y., Li, Y., et al. (2017) Response of wastewater biofilm to CuO nanoparticle exposure in terms of extracellular polymeric substances and microbial community structure. *Sci. Total Environ.* **579**: 588–597.
- Minshall, G.W. (1978) Autotrophy in stream ecosystems. *BioScience* **28**: 767–771.

- Moe, S.J., De Schampelaere, K., Clements, W.H., Sorensen, M.T., Van den Brink, P.J., and Liess, M. (2013) Combined and interactive effects of global climate change and toxicants on populations and communities. *Environ. Toxicol. Chem.* **32**: 49–61.
- Montoya, H. (2009) Algal and cyanobacterial saline biofilms of the Grande Coastal Lagoon, Lima, Peru. *Nat. Resour. Environ. Issues* **15**: 127.
- Montuelle, B., Dorigo, U., Bérard, A., Volat, B., Bouchez, A., Tlili, A., et al. (2010) The periphyton as a multimetric bioindicator for assessing the impact of land use on rivers: an overview of the Ardières-Morcille experimental watershed (France). *Hydrobiologia* **657**: 123–141.
- Morin, S. (2006a) Bioindication des effets des pollutions métalliques sur les communautés de diatomées benthiques. Approches in situ et expérimentales.
- Morin, S. and Coste, M. (2006b) Metal-induced shifts in the morphology of diatoms from the Riou Mort and Riou Viou streams (South West France). *Use Algae Monit. Rivers VI Hung. Algol. Soc. Göd Hung. Balatonfüred* 91–106.
- Morin, S., Duong, T.T., Herlory, O., Feurtet-Mazel, A., and Coste, M. (2008) Cadmium toxicity and bioaccumulation in freshwater biofilms. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* **54**: 173–186.
- Mota, R., Pereira, S.B., Meazzini, M., Fernandes, R., Santos, A., Evans, C.A., De Philippis, R., Wright, P.C., and Tamagnini, P. (2015). Effects of heavy metals on *Cyanothece sp.* CCY 0110 growth, extracellular polymeric substances (EPS) production, ultrastructure and protein profiles. *Journal of Proteomics* **120**, 75–94.
- Mouhim, R.F., Cornet, J.-F., Fontane, T., Fournet, B., and Dubertret, G. (1993) Production, isolation and preliminary characterization of the exopolysaccharide of the cyanobacterium *Spirulina platensis*. *Biotechnol. Lett.* **15**: 567–572.
- Mulcahy, H., Charron-Mazenod, L., and Lewenza, S. (2008) Extracellular DNA chelates cations and induces antibiotic resistance in *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. *PLoS Pathog.* **4**: e1000213.
- Muñoz, I., Real, M., Guasch, H., Navarro, E., and Sabater, S. (2001) Effects of atrazine on periphyton under grazing pressure. *Aquat. Toxicol.* **55**: 239–249.
- Mussmann, M., Ribot, M., von Schiller, D., Merbt, S.N., Augspurger, C., Karwautz, C., et al. (2013) Colonization of freshwater biofilms by nitrifying bacteria from activated sludge. *FEMS Microbiol. Ecol.* **85**: 104–115.

- Necchi, O. (2004). Photosynthetic responses to temperature in tropical lotic macroalgae. *Phycological Research* 52, 140–148.
- Negoescu, A., Lorimier, P., Labat-Moleur, F., Drouet, C., Robert, C., Guillermet, C., et al. (1996) In situ apoptotic cell labeling by the TUNEL method: improvement and evaluation on cell preparations. *J. Histochem. Cytochem.* **44**: 959–968.
- Neu, T.R. and Marshall, K.C. (1990) Bacterial polymers: physicochemical aspects of their interactions at interfaces. *J. Biomater. Appl.* **5**: 107–133.
- Neu, T.R. (1996) Significance of bacterial surface-active compounds in interaction of bacteria with interfaces. *Microbiol. Rev.* **60**: 151.
- Newell, B.S., Dalpont, G., and Grant, B.R. (1972) The excretion of organic nitrogen by marine algae in batch and continuous culture. *Can. J. Bot.* **50**: 2605–2611.
- Nicolaus, B., Panico, A., Lama, L., Romano, I., Manca, M.C., De Giulio, A., and Gambacorta, A. (1999) Chemical composition and production of exopolysaccharides from representative members of heterocystous and non-heterocystous cyanobacteria. *Phytochemistry* **52**: 639–647.
- Nielsen, P.H. er, Jahn, A., and Palmgren, R. (1997) Conceptual model for production and composition of exopolymers in biofilms. *Water Sci. Technol.* **36**: 11–19.
- Nielsen, P.H. and Jahn, A. (1999) Extraction of EPS. In, *Microbial extracellular polymeric substances*. Springer, pp. 49–72.
- Nimick, D.A., Gammons, C.H., Cleasby, T.E., Madison, J.P., Skaar, D., and Brick, C.M. (2003) Diel cycles in dissolved metal concentrations in streams: occurrence and possible causes. *Water Resour. Res.* **39**:
- Nishiyama, Y., Allakhverdiev, S.I., and Murata, N. (2006) A new paradigm for the action of reactive oxygen species in the photoinhibition of photosystem II. *Biochim. Biophys. Acta BBA-Bioenerg.* **1757**: 742–749.
- Norf, H., Arndt, H., and Weitere, M. (2007) Impact of local temperature increase on the early development of biofilm-associated ciliate communities. *Oecologia* **151**: 341–350.
- Nriagu, J.O. (1979) The global copper cycle. *Copp. Environ. Part 1*: 1–17.
- Otero, A. and Vincenzini, M. (2004) Nostoc (Cyaniphyceae) goes nude: extracellular polysaccharides serve as a sink for reducing power under unbalanced C/N metabolism 1. *J. Phycol.* **40**: 74–81.

- Ozturk, S. and Aslim, B. (2008) Relationship between chromium (VI) resistance and extracellular polymeric substances (EPS) concentration by some cyanobacterial isolates. *Environ. Sci. Pollut. Res.* **15**: 478–480.
- Pan, X., Liu, J., Zhang, D., Chen, X., Li, L., Song, W., and Yang, J. (2010) A comparison of five extraction methods for extracellular polymeric substances (EPS) from biofilm by using threedimensional excitation-emission matrix (3DEEM) fluorescence spectroscopy. *Water Sa* **36**..
- Pardo, R., Herguedas, M., Barrado, E., and Vega, M. (2003) Biosorption of cadmium, copper, lead and zinc by inactive biomass of *Pseudomonas putida*. *Anal. Bioanal. Chem.* **376**: 26–32.
- Parker, C.L. (2013) The Effects of Environmental Stressors on Biofilm Formation of *Chlorella Vulgaris*.
- Parvinzadeh Gashti, M., Bellavance, J., Kroukamp, O., Wolfaardt, G., Taghavi, S.M., and Greener, J. (2015) Live-streaming: Time-lapse video evidence of novel streamer formation mechanism and varying viscosity. *Biomicrofluidics* **9**: 041101.
- Paule, A., Biaz, A., Leflaive, J., Lawrence, J.R., and Rols, J.L. (2015) Fate of the Herbicide Alachlor Exposed to Different Microbial *Consortia* in Aquatic Systems. *Water. Air. Soil Pollut.* **226**: 3.
- Pellicer-Nàcher, C., Domingo-Félez, C., Mutlu, A.G., and Smets, B.F. (2013) Critical assessment of extracellular polymeric substances extraction methods from mixed culture biomass. *Water Res.* **47**: 5564–5574.
- Perales-Vela, H.V., González-Moreno, S., Montes-Horcasitas, C., and Cañizares-Villanueva, R.O. (2007). Growth, photosynthetic and respiratory responses to sub-lethal copper concentrations in *Scenedesmus incrassatulus* (*Chlorophyceae*). *Chemosphere* **67**, 2274–2281.
- Pereira, S., Zille, A., Micheletti, E., Moradas-Ferreira, P., De Philippis, R., and Tamagnini, P. (2009) Complexity of cyanobacterial exopolysaccharides: composition, structures, inducing factors and putative genes involved in their biosynthesis and assembly. *FEMS Microbiol. Rev.* **33**: 917–941.
- Peterson, C.G. (1986) Effects of discharge reduction on diatom colonization below a large hydroelectric dam. *J. North Am. Benthol. Soc.* **5**: 278–289.
- Pichrtová, M., Remias, D., Lewis, L.A., and Holzinger, A. (2013) Changes in phenolic compounds and cellular ultrastructure of Arctic and Antarctic strains of *Zygnema*

- (*Zygnematophyceae*, *Streptophyta*) after exposure to experimentally enhanced UV to PAR ratio. *Microb. Ecol.* **65**: 68–83.
- Pierre, G., Zhao, J.-M., Orvain, F., Dupuy, C., Klein, G.L., Graber, M., and Maugard, T. (2014) Seasonal dynamics of extracellular polymeric substances (EPS) in surface sediments of a diatom-dominated intertidal mudflat (Marennes–Oléron, France). *J. Sea Res.* **92**: 26–35.
- Pimm, S.L. (1984) The complexity and stability of ecosystems. *Nature* **307**: 321.
- Pinto, E., Sigaud-kutner, T., Leitao, M.A., Okamoto, O.K., Morse, D., and Colepicolo, P. (2003) Heavy metal-induced oxidative stress in algae. *J. Phycol.* **39**: 1008–1018.
- Pokrovsky, O.S., Feurtet-Mazel, A., Martinez, R.E., Morin, S., Baudrimont, M., Duong, T., and Coste, M. (2010) Experimental study of cadmium interaction with periphytic biofilms. *Appl. Geochem.* **25**: 418–427.
- Potts, M. (1994) Desiccation tolerance of prokaryotes. *Microbiol. Rev.* **58**: 755–805.
- Proia, L., Vilches, C., Boninneau, C., Kantiani, L., Farré, M., Romani, A.M., et al. (2013) Drought episode modulates the response of river biofilms to triclosan. *Aquat. Toxicol.* **127**: 36–45.
- Rai, L.C., Gaur, J.P., and Kumar, H.D. (1981) Phycology and heavy-metal pollution. *Biol. Rev.* **56**: 99–151.
- Rajendran, U.M., Kathirvel, E., and Anand, N. (2007) Desiccation-induced changes in antioxidant enzymes, fatty acids, and amino acids in the cyanobacterium *Tolypothrix scytonemoides*. *World J. Microbiol. Biotechnol.* **23**: 251–257.
- Randrianjatovo, I., Girbal-Neuhauser, E., and Marcato-Romain, C.E. (2015) Epicocconone, a sensitive and specific fluorescent dye for in situ quantification of extracellular proteins within bacterial biofilms. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **99**: 4835–4844.
- Randrianjatovo-Gbalou, I., Girbal-Neuhauser, E., and Marcato-Romain, C.-E. (2016) Quantification of biofilm exopolysaccharides using an in situ assay with periodic acid–Schiff reagent. *Anal. Biochem.* **500**: 12–14.
- Randrianjatovo-Gbalou, I., Rouquette, P., Lefebvre, D., Girbal-Neuhauser, E., and Marcato-Romain, C.-E. (2017) In situ analysis of *Bacillus licheniformis* biofilms: amyloid-like polymers and eDNA are involved in the adherence and aggregation of the extracellular matrix. *J. Appl. Microbiol.* **122**: 1262–1274.
- Ras, M., Girbal-Neuhauser, E., Paul, E., Sperandio, M., and Lefebvre, D. (2008a) Protein extraction from activated sludge: an analytical approach. *Water Res.* **42**: 1867–1878.

- Ras Monique, Girbal-Neuhauser Elisabeth, Paul Etienne, and Lefebvre Dominique (2008b) A high yield multi-method extraction protocol for protein quantification in activated sludge. *Bioresour. Technol.* **99**: 7464–7471.
- Ras, M., Lefebvre, D., Derlon, N., Paul, E., and Girbal-Neuhauser, E. (2011) Extracellular polymeric substances diversity of biofilms grown under contrasted environmental conditions. *Water Res.* **45**: 1529–1538.
- Raschke, R.L. (1993) Diatom (*Bacillariophyta*) community response to phosphorus in the Everglades National Park, USA. *Phycologia* **32**: 48–58.
- Raungsomboon, S., Chidthaisong, A., Bunnag, B., Inthorn, D., and Harvey, N.W. (2006) Production, composition and Pb²⁺ adsorption characteristics of capsular polysaccharides extracted from a cyanobacterium *Gloeocapsa gelatinosa*. *Water Res.* **40**: 3759–3766.
- Regoli, F. and Giuliani, M.E. (2014) Oxidative pathways of chemical toxicity and oxidative stress biomarkers in marine organisms. *Mar. Environ. Res.* **93**: 106–117.
- Rijstenbil, J.W. and Gerringa, L.J.A. (2002) Interactions of algal ligands, metal complexation and availability, and cell responses of the diatom *Ditylum brightwellii* with a gradual increase in copper. *Aquat. Toxicol.* **56**: 115–131.
- Risse-Buhl, U., Trefzger, N., Seifert, A.-G., Schönborn, W., Gleixner, G., and Küsel, K. (2012) Tracking the autochthonous carbon transfer in stream biofilm food webs. *FEMS Microbiol. Ecol.* **79**: 118–131.
- Robson, B.J., Matthews, T.G., Lind, P.R., and Thomas, N.A. (2008) Pathways for algal recolonization in seasonally-flowing streams. *Freshw. Biol.* **53**: 2385–2401.
- Roeselers, G., Van Loosdrecht, M.C.M., and Muyzer, G. (2007) Heterotrophic pioneers facilitate phototrophic biofilm development. *Microb. Ecol.* **54**: 578–585.
- Roeselers, G., Van Loosdrecht, M.C.M., and Muyzer, G. (2008) Phototrophic biofilms and their potential applications. *J. Appl. Phycol.* **20**: 227–235.
- Romani, A.M. and Sabater, S. (2000) Influence of algal biomass on extracellular enzyme activity in river biofilms. *Microb. Ecol.* **40**: 16–24.
- Rondel, C., Marcato-Romain, C.-E., and Girbal-Neuhauser, E. (2013) Development and validation of a colorimetric assay for simultaneous quantification of neutral and uronic sugars. *Water Res.* **47**: 2901–2908.
- Rossi, F., Micheletti, E., Bruno, L., Adhikary, S.P., Albertano, P., and De Philippis, R. (2012) Characteristics and role of the exocellular polysaccharides produced by five

- cyanobacteria isolated from phototrophic biofilms growing on stone monuments. *Biofouling* **28**: 215–224.
- Rossi, F. and De Philippis, R. (2015) Role of cyanobacterial exopolysaccharides in phototrophic biofilms and in complex microbial mats. *Life* **5**: 1218–1238.
- Roux-Barthès, A. (2014) Biofilms phototrophes de rivières non permanentes: Dynamiques des communautés microbiennes et des populations de diatomées et pertinence de leur utilisation en bioindication. PhD Thesis. Université Toulouse III Paul Sabatier.
- Sabater, S. (2000) Diatom communities as indicators of environmental stress in the Guadiamar River, SW. Spain, following a major mine tailings spill. *J. Appl. Phycol.* **12**: 113–124.
- Sabater, S., Guasch, H., Romaní, A., and Muñoz, I. (2002) The effect of biological factors on the efficiency of river biofilms in improving water quality. *Hydrobiologia* **469**: 149–156.
- Sabater, S. and Barceló, D. (2010) Water scarcity in the Mediterranean: Perspectives under global change Springer.
- Sabra, W., Zeng, A.-P., Lünsdorf, H., and Deckwer, W.-D. (2000) Effect of oxygen on formation and structure of *Azotobacter vinelandii* alginate and its role in protecting nitrogenase. *Appl. Environ. Microbiol.* **66**: 4037–4044.
- Saison, C., Perreault, F., Daigle, J.-C., Fortin, C., Claverie, J., Morin, M., and Popovic, R. (2010) Effect of core–shell copper oxide nanoparticles on cell culture morphology and photosynthesis (photosystem II energy distribution) in the green alga, *Chlamydomonas reinhardtii*. *Aquat. Toxicol.* **96**: 109–114.
- Salminen, R., Batista, M.J., Bidovec, M., Demetriades, A., De Vivo, B., De Vos, W., et al. (2005) Geochemical Atlas of Europe. Part 1: Background Information, Methodology and Maps, Geological Survey of Finland, Espoo ISBN 951-890-921-3.
- Santarius, K.A. (1973) The protective effect of sugars on chloroplast membranes during temperature and water stress and its relationship to frost, desiccation and heat resistance. *Planta* **113**: 105–114.
- Santos, José, Almeida, S.F., and Figueira, E. (2013) Cadmium chelation by frustulins: a novel metal tolerance mechanism in *Nitzschia palea* (Kützinger) W. Smith. *Ecotoxicology* **22**: 166–173.
- Scheibe, R. and Beck, E. (2011) Drought, desiccation, and oxidative stress. In, *Plant desiccation tolerance*. Springer, pp. 209–231.

- Schimel, J., Balsler, T.C., and Wallenstein, M. (2007) Microbial stress-response physiology and its implications for ecosystem function. *Ecology* **88**: 1386–1394.
- Schmidt, H., Thom, M., Wieprecht, S., Manz, W., and Gerbersdorf, S.U. (2018) The effect of light intensity and shear stress on microbial biostabilization and the community composition of natural biofilms. *Res. Rep. Biol.* **9**: 1–16.
- Sekar, S. and Paulraj, P. (2007) Strategic mining of cyanobacterial patents from the USPTO patent database and analysis of their scope and implications. *J. Appl. Phycol.* **19**: 277–292.
- Serra, A. and Guasch, H. (2009) Effects of chronic copper exposure on fluvial systems: linking structural and physiological changes of fluvial biofilms with the in-stream copper retention. *Sci. Total Environ.* **407**: 5274–5282.
- Shen, Y., Zhang, H., Xu, X., and Lin, X. (2015) Biofilm formation and lipid accumulation of attached culture of *Botryococcus braunii*. *Bioprocess Biosyst. Eng.* **38**: 481–488.
- Sheng, G.-P., Yu, H.-Q., and Li, X.-Y. (2010) Extracellular polymeric substances (EPS) of microbial aggregates in biological wastewater treatment systems: a review. *Biotechnol. Adv.* **28**: 882–894.
- Shimao, M. (2001) Biodegradation of plastics. *Curr. Opin. Biotechnol.* **12**: 242–247.
- Shirkey, B., McMaster, N.J., Smith, S.C., Wright, D.J., Rodriguez, H., Jaruga, P., et al. (2003) Genomic DNA of *Nostoc commune* (Cyanobacteria) becomes covalently modified during long-term (decades) desiccation but is protected from oxidative damage and degradation. *Nucleic Acids Res.* **31**: 2995–3005.
- Silva-Benavides, A.M. (1996) The use of water chemistry and benthic diatom communities for qualification of a polluted tropical river in Costa Rica. *Rev. Biol. Trop.* **44**: 395–416.
- Simkhada, B. and Jüttner, I. (2006) Diatoms in ponds and small lakes of the *Kathmandu Valley*, Nepal—relationships with chemical and habitat characteristics. *Arch. Für Hydrobiol.* **166**: 41–65.
- Simkiss, K. and Taylor, M.G. (1989) Metal fluxes across the membranes of aquatic organisms. *Rev Aquat Sci* **1**: 173–188.
- Simoes, M., Pereira, M.O., Sillankorva, S., Azeredo, J., and Vieira, M.J. (2007) The effect of hydrodynamic conditions on the phenotype of *Pseudomonas fluorescens* biofilms. *Biofouling* **23**: 249–258.
- Singer, G., Besemer, K., Hödl, I., Chlup, A., Hochedlinger, G., Stadler, P., and Battin, T.J. (2006) Microcosm design and evaluation to study stream microbial biofilms. *Limnol. Oceanogr. Methods* **4**: 436–447.

- Sinsabaugh, R.L., Repert, D., Weiland, T., Golladay, S.W., and Linkins, A.E. (1991) Exoenzyme accumulation in epilithic biofilms. *Hydrobiologia* **222**: 29–37.
- Smith, P.K., Krohn, R.I., Hermanson, G.T., Mallia, A.K., Gartner, F.H., Provenzano, Md., et al. (1985) Measurement of protein using bicinchoninic acid. *Anal. Biochem.* **150**: 76–85.
- Smith, D.J. and Underwood, G.J. (1998) Exopolymer production by intertidal epipelagic diatoms. *Limnol. Oceanogr.* **43**: 1578–1591.
- Snelder, T.H., Datry, T., Lamouroux, N., Larned, S.T., Sauquet, E., Pella, H., and Catalogne, C. (2013) Regionalization of patterns of flow intermittence from gauging station records. *Hydrol. Earth Syst. Sci.* **17**: p–1685.
- Soanen, N., Da Silva, E., Gardarin, C., Michaud, P., and Laroche, C. (2016) Improvement of exopolysaccharide production by *Porphyridium marinum*. *Bioresour. Technol.* **213**: 231–238.
- Solano, C., García, B., Valle, J., Berasain, C., Ghigo, J.-M., Gamazo, C., and Lasa, I. (2002) Genetic analysis of *Salmonella enteritidis* biofilm formation: critical role of cellulose. *Mol. Microbiol.* **43**: 793–808.
- Soldo, D. and Behra, R. (2000) Long-term effects of copper on the structure of freshwater periphyton communities and their tolerance to copper, zinc, nickel and silver. *Aquat. Toxicol.* **47**: 181–189.
- Song, H.-S., Renslow, R.S., Fredrickson, J.K., and Lindemann, S.R. (2015) Integrating ecological and engineering concepts of resilience in microbial communities. *Front. Microbiol.* **6**: 1298.
- Souffreau, C., Vanormelingen, P., Verleyen, E., Sabbe, K., and Vyverman, W. (2010) Tolerance of benthic diatoms from temperate aquatic and terrestrial habitats to experimental desiccation and temperature stress. *Phycologia* **49**: 309–324.
- Staats, N., Stal, L.J., de Winder, B., and Mur, L.R. (2000) Oxygenic photosynthesis as driving process in exopolysaccharide production of benthic diatoms. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* **193**: 261–269.
- Staehr, P.A. and Sand-Jensen, K.A.J. (2006) Seasonal changes in temperature and nutrient control of photosynthesis, respiration and growth of natural phytoplankton communities. *Freshw. Biol.* **51**: 249–262.
- Stal, L.J. and De Brouwer, J.F.C. (2003) Biofilm formation by benthic diatoms and their influence on the stabilization of intertidal mudflats. *Berichte-Forschungszentrum Terramare* **12**: 109–111.

- Stampfli, N.C., Knillmann, S., Liess, M., Noskov, Y.A., Schäfer, R.B., and Beketov, M.A. (2013) Two stressors and a community—Effects of hydrological disturbance and a toxicant on freshwater zooplankton. *Aquat. Toxicol.* **127**: 9–20.
- Stanier, R.Y., Kunisawa, R., Mandel, M., and Cohen-Bazire, G. (1971) Purification and properties of unicellular blue-green algae (order *Chroococcales*). *Bacteriol. Rev.* **35**: 171.
- Stevenson, R.J., Bothwell, M.L., Lowe, R.L., and Thorp, J.H. (1996) Algal ecology: Freshwater benthic ecosystem Academic press.
- Stewart, P.S. and Franklin, M.J. (2008) Physiological heterogeneity in biofilms. *Nat. Rev. Microbiol.* **6**: 199.
- Stewart, P.S. (2012) Mini-review: convection around biofilms. *Biofouling* **28**: 187–198.
- Stosch, V. and Fecher, K. (1979) “Internal thecae” of *Eunotia soleiroi* III (*Bacillariophyceae*): development, structure and function as resting spores 1. *J. Phycol.* **15**: 233–243.
- Sundbäck, K., Odmark, S., Wulff, A., Nilsson, C., and Wängberg, S. (1997) Effects of enhanced UVB radiation on a marine benthic diatom mat. *Mar. Biol.* **128**: 171–179.
- Sutherland, I.W. (2001a) Biofilm exopolysaccharides: a strong and sticky framework. *Microbiology* **147**: 3–9.
- Sutherland, I.W. (2001b) The biofilm matrix—an immobilized but dynamic microbial environment. *Trends Microbiol.* **9**: 222–227.
- Svetličić, V., Žutić, V., Pletikapić, G., and Radić, T. (2013) Marine polysaccharide networks and diatoms at the nanometric scale. *Int. J. Mol. Sci.* **14**: 20064–20078.
- Takahashi, E., Ledauphin, J., Goux, D., and Orvain, F. (2010) Optimising extraction of extracellular polymeric substances (EPS) from benthic diatoms: comparison of the efficiency of six EPS extraction methods. *Mar. Freshw. Res.* **60**: 1201–1210.
- Takeda, M., Nakano, F., Nagase, T., Iohara, K., and Koizumi, J. (1998) Isolation and chemical composition of the sheath of *Sphaerotilus natans*. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **62**: 1138–1143.
- Tamaru, Y., Takani, Y., Yoshida, T., and Sakamoto, T. (2005) Crucial role of extracellular polysaccharides in desiccation and freezing tolerance in the terrestrial cyanobacterium *Nostoc commune*. *Appl. Environ. Microbiol.* **71**: 7327–7333.
- Tang, L., Schramm, A., Neu, T.R., Revsbech, N.P., and Meyer, R.L. (2013) Extracellular DNA in adhesion and biofilm formation of four environmental isolates: a quantitative study. *FEMS Microbiol. Ecol.* **86**: 394–403.

- Teissier, S. and Torre, M. (2002) Simultaneous assessment of nitrification and denitrification on freshwater epilithic biofilms by acetylene block method. *Water Res.* **36**: 3803–3811.
- Teitzel, G.M. and Parsek, M.R. (2003) Heavy metal resistance of biofilm and planktonic *Pseudomonas aeruginosa*. *Appl. Environ. Microbiol.* **69**: 2313–2320.
- Tlili, A., Maréchal, M., Bérard, A., Volat, B., and Montuelle, B. (2011) Enhanced co-tolerance and co-sensitivity from long-term metal exposures of heterotrophic and autotrophic components of fluvial biofilms. *Sci. Total Environ.* **409**: 4335–4343.
- Torres, E., Cid, A., Herrero, C., and Abalde, J. (1998) Removal of cadmium ions by the marine diatom *Phaeodactylum tricornutum* Bohlin accumulation and long-term kinetics of uptake. *Bioresour. Technol.* **63**: 213–220.
- Trabelsi, L., Ouada, H.B., Bacha, H., and Ghoul, M. (2009) Combined effect of temperature and light intensity on growth and extracellular polymeric substance production by the cyanobacterium *Arthrospira platensis*. *J. Appl. Phycol.* **21**: 405–412.
- Verneuil, L., Silvestre, J., Randrianjatovo, I., Marcato-Romain, C.-E., Girbal-Neuhauser, E., Mouchet, F., et al. (2015) Double walled carbon nanotubes promote the overproduction of extracellular protein-like polymers in *Nitzschia palea*: an adhesive response for an adaptive issue. *Carbon* **88**: 113–125.
- Vieira, H., Augusto, A., Coelho Ortolano, P.I., Giroldo, D., Oliveira, D., José, M., et al. (2008) Role of hydrophobic extracellular polysaccharide of *Aulacoseira granulata* (*Bacillariophyceae*) on aggregate formation in a turbulent and hypereutrophic reservoir. *Limnol. Oceanogr.* **53**: 1887–1899.
- Villanueva, V.D., Font, J., Schwartz, T., and Romani, A.M. (2011) Biofilm formation at warming temperature: acceleration of microbial colonization and microbial interactive effects. *Biofouling* **27**: 59–71.
- Wang, F., Lu, S., and Ji, M. (2006) Components of released liquid from ultrasonic waste activated sludge disintegration. *Ultrason. Sonochem.* **13**: 334–338.
- Waterborg, J.H. and Matthews, H.R. (1984) The Lowry method for protein quantitation. In, *Proteins*. Springer, pp. 1–3.
- Wei, D., Li, M., Wang, X., Han, F., Li, L., Guo, J., et al. (2016) Extracellular polymeric substances for Zn (II) binding during its sorption process onto aerobic granular sludge. *J. Hazard. Mater.* **301**: 407–415.

- Wey, J.K., Scherwass, A., Norf, H., Arndt, H., and Weitere, M. (2008) Effects of protozoan grazing within river biofilms under semi-natural conditions. *Aquat. Microb. Ecol.* **52**: 283–296.
- Wey, J.K., Jürgens, K., and Weitere, M. (2012) Seasonal and successional influences on bacterial community composition exceed that of protozoan grazing in river biofilms. *Appl. Environ. Microbiol.* **78**: 2013–2024.
- Whitchurch, C.B., Tolker-Nielsen, T., Ragas, P.C., and Mattick, J.S. (2002) Extracellular DNA required for bacterial biofilm formation. *Science* **295**: 1487–1487.
- Willkomm, M., Schlüssel, A., Reiz, E., and Arndt, H. (2007) Effects of microcurrents in the boundary layer on the attachment of benthic heterotrophic nanoflagellates. *Aquat. Microb. Ecol.* **48**: 169–174.
- Wingender, J., Neu, T.R., and Flemming, H.-C. eds. (1999a) *Microbial Extracellular Polymeric Substances* Springer Berlin Heidelberg, Berlin, Heidelberg.
- Wingender, J., Neu, T.R., and Flemming, H.-C. (1999b) What are bacterial extracellular polymeric substances? In, *Microbial extracellular polymeric substances*. Springer, pp. 1–19.
- Wingender, J., Strathmann, M., Rode, A., Leis, A., and Flemming, H.-C. (2001) [25] Isolation and biochemical characterization of extracellular polymeric substances from *Pseudomonas aeruginosa*. In, *Methods in enzymology*. Elsevier, pp. 302–314.
- Woodruff, S.L., House, W.A., Callow, M.E., and Leadbeater, B.S. (1999) The Effects of a Developing Biofilm on Chemical Changes across the Sediment-Water Interface in a Freshwater Environment. *Int. Rev. Hydrobiol.* **84**: 509–532.
- Wu, J.-T., Hsieh, M.-T., and Kow, L.-C. (1998) Role of proline accumulation in response to toxic copper in *Chlorella sp.*(*Chlorophyceae*) cells. *J. Phycol.* **34**: 113–117.
- Xiao, R. and Zheng, Y. (2016) Overview of microalgal extracellular polymeric substances (EPS) and their applications. *Biotechnol. Adv.* **34**: 1225–1244.
- Xu, H., Cai, H., Yu, G., and Jiang, H. (2013) Insights into extracellular polymeric substances of cyanobacterium *Microcystis aeruginosa* using fractionation procedure and parallel factor analysis. *Water Res.* **47**: 2005–2014.
- Yancey, P.H. (2005) Organic osmolytes as compatible, metabolic and counteracting cytoprotectants in high osmolarity and other stresses. *J. Exp. Biol.* **208**: 2819–2830.

- Yin, Y., Hu, Y., and Xiong, F. (2011) Sorption of Cu (II) and Cd (II) by extracellular polymeric substances (EPS) from *Aspergillus fumigatus*. *Int. Biodeterior. Biodegrad.* **65**: 1012–1018.
- Ylla, I., Borrego, C., Romání, A.M., and Sabater, S. (2009) Availability of glucose and light modulates the structure and function of a microbial biofilm. *FEMS Microbiol. Ecol.* **69**: 27–42.
- Zhang, P., Zhang, G., and Wang, W. (2007) Ultrasonic treatment of biological sludge: floc disintegration, cell lysis and inactivation. *Bioresour. Technol.* **98**: 207–210.
- Zhang, X. and Bishop, P.L. (2003) Biodegradability of biofilm extracellular polymeric substances. *Chemosphere* **50**: 63–69.
- Zhang, Z.-J., Chen, S.-H., Wang, S.-M., and Luo, H.-Y. (2011) Characterization of extracellular polymeric substances from biofilm in the process of starting-up a partial nitrification process under salt stress. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **89**: 1563–1571.
- Zhang, W., Sileika, T., and Packman, A.I. (2013) Effects of fluid flow conditions on interactions between species in biofilms. *FEMS Microbiol. Ecol.* **84**: 344–354.
- Zheng, Y., Roberts, M., Kelly, J., Zhang, N., and Walker, T. (2015) Harvesting microalgae using the temperature-activated phase transition of thermoresponsive polymers. *Algal Res.* **11**: 90–94.
- Zheng, Y., Xiao, R., and Roberts, M. (2016) Polymer-enhanced enzymatic microalgal cell disruption for lipid and sugar recovery. *Algal Res.* **14**: 100–108.
- Zogaj, X., Nimtz, M., Rohde, M., Bokranz, W., and Römling, U. (2001) The multicellular morphotypes of *Salmonella typhimurium* and *Escherichia coli* produce cellulose as the second component of the extracellular matrix. *Mol. Microbiol.* **39**: 1452–1463.

ABSTRACT

Phototrophic biofilm, the main benthic signature of fast-flowing rivers, provide an important number of ecosystem services related to self-purification mechanisms (nitrates, pesticides, metal contaminations, etc.). However, their functioning is strongly disturbed by the increasing anthropogenic pressures, particularly by the presence of traces metals (TM) or the sequential interruption of surface flow. In the context of global change, the response of phototrophic communities should be considered for river management, in term of chemical and ecological properties. The aim of this thesis was to understand the physiological responses of benthic phototrophic microorganisms to environmental parameters involved in global change (light, temperature, phosphorus) as well as their response to a multi-stress combining the exposure of biofilms to TM (Cu and Zn, alone or in cocktail) by the prolonged drying of biofilm. Physiological responses of biofilm (biomass, photosynthetic activity and EPS production (extracellular polymeric substances)) were studied to analyze the tolerance and resilience capacities of communities. Three benthic phototrophic species were chosen: the cyanobacteria *Phormidium autumnale*, the diatom *Nitzschia palea* and the green algae *Uronema confervicolum*. Cultures of biofilm in free surface flow microcosms (hydraulic mini-channels) allowed to control all the experimental parameters. The first step was to develop a method for EPS extraction from the biofilm matrix while preserving the cell integrity of phototrophic microorganisms. Subsequently, the study of physiological responses of monospecific phototrophic biofilm exposed to Cu or/and Zn showed different sensitivities of phototrophic species. Then the sorption capacity of Cu by these species depended on environmental parameters, via the modulation of EPS production and composition. Finally, the double-stress characterised by Cu exposition followed by drying biofilm induced also resilience responses when rewetting, modulated by the environmental parameters. Overall, the monospecific phototrophic biofilms studied present different tolerance and resilience capacities by modifying the abundance and composition of EPS produced.

KEYWORDS:

Phototrophic biofilm, EPS, extraction, TM, environmental factors, non-permanent streams, tolerance, resilience

AUTEUR : Emilie LOUSTAU

TITRE : Effet des facteurs environnementaux sur la nature des EPS, la capacité de sorption du Cu et le potentiel de résilience de biofilms phototrophes simplifiés

DIRECTEURS DE THESE : Jean-Luc ROLS et Elisabeth GIRBAL-NEUHAUSER

LIEU ET DATE DE SOUTENANCE : Toulouse, Université Paul Sabatier, le 8 avril 2019

RESUME

Les biofilms phototrophes, principale signature trophique benthique des rivières à écoulement rapide, offrent un panel de services écologiques en lien avec les processus d'autoépuration (nitrates, pesticides, pollutions métalliques, etc.). Cependant, leur fonctionnement est fortement perturbé par les pressions anthropiques croissantes qu'ils subissent, notamment celles associées à la présence d'éléments traces métalliques (ETM) ou encore l'interruption séquentielle de l'écoulement de surface. Dans un contexte de changement global avéré, la réponse des communautés phototrophes est au centre des préoccupations pour la gestion de ces milieux, tant pour leur qualité chimique qu'écologique. L'objectif de ce travail de thèse est de comprendre les réponses physiologiques des microorganismes phototrophes benthiques à des facteurs d'environnement révélateurs de changements globaux (lumière, température, phosphore) ainsi qu'à l'application d'un multi-stress combinant l'exposition à des ETM (Cu et Zn, appliqués seuls ou en cocktail) suivie d'un assèchement prolongé du biofilm. Les réponses physiologiques sont centrées sur la biomasse, l'activité photosynthétique et la production d'EPS (substances polymériques extracellulaires), en abordant ces processus par l'aptitude de tolérance et de résilience des communautés. Le choix s'est porté sur trois espèces phototrophes benthiques, une cyanobactérie (*Phormidium autumnale*), une diatomée (*Nitzschia palea*) et une algue verte (*Uronema confervicolum*). Un système expérimental adapté à la culture en biofilm au sein de microcosmes à écoulement de surface libre (mini-canaux hydrauliques) a permis de contrôler l'ensemble des paramètres des expérimentations. La première étape a consisté à mettre au point une méthode d'extraction des EPS de la matrice de biofilm tout en préservant l'intégrité cellulaire des microorganismes phototrophes. L'analyse de la réponse physiologique de biofilms phototrophes mono-espèce face à une exposition au Cu et/ou au Zn a permis de montrer les différences de sensibilité des espèces phototrophes testées. Puis, la capacité de sorption du Cu par ces mêmes biofilms phototrophes s'est révélée être dépendante des facteurs environnementaux, via la modulation des EPS produites et de leur nature. Enfin, l'application d'un double-stress, conjuguant l'exposition au Cu suivie d'un assèchement du biofilm, permet également de mesurer des réponses de résilience lors de la remise en eau, elles-mêmes modulées par les facteurs environnementaux testés. Globalement, les biofilms phototrophes mono-espèce testés présentent des capacités de tolérance et de résilience différentes avec des réponses de modulation de la quantité et de la nature des EPS produites.

MOTS-CLES

Biofilm phototrophe, EPS, extraction, ETM, facteurs environnementaux, cours d'eau intermittent, tolérance, résilience.

DISCIPLINE ADMINISTRATIVE : Ecologie Fonctionnelle

INTITULE ET ADRESSE DU LABORATOIRE

Laboratoire d'écologie fonctionnelle et Environnement (EcoLab) – UMR 5245 (UPS-CNRS- INPT),
Université Paul Sabatier, bât. 4R1 – 118 route de Narbonne 31062 Toulouse cedex 9 – France
Laboratoire de Biotechnologies Agroalimentaire et Environnementale (LBAE) – EA 4565, Université
Paul Sabatier, IUT site d'Auch, 24 rue d'Embaquès, 32000 Auch - France.
