

Etude des BIOFilms marins comme bio-INDICateurs de la qualité chimique de l'eau de mer en milieu côtier méditerranéen

CONVENTION N° : 2021 0018



(janvier 2021 à Janvier 2025)

Porteur du projet :

Jean-François Briand, Maître de conférences-HDR

MAPIEM-UR 4323-

"Ecologie microbienne, biochimie et biologie moléculaire des biofilms marins"

Université de Toulon

CS 60584

83041 Toulon CEDEX 9

E-mail : briand@univ-tln.fr

Tél.: 04 94 14 67 60 / 06 32 72 40 39

SOMMAIRE

Introduction et contexte.....	4
Equipe du projet.....	5
PARTIE I : SUCHIMED 2021.....	6
I-Matériels et méthodes	6
I-1-Immersion et échantillonnage en mer durant SUCHIMED 2021	6
I-2- Méthodes d'analyse des contaminants dans les biofilms.	8
I-3-Analyses statistiques liées aux contaminants dans les biofilms.	9
I-4-. Environmental data collection	10
I-5-Extraction d'ADN, amplification et séquençage Illumina Miseq (metabarcoding)	11
I-6 Traitement bioinformatique des séquences.....	11
I-7 Analyses biostatistiques des données de metabarcoding	12
I-8- Caractérisation biochimique des substances polymériques extracellulaires (EPS) des biofilms.	13
I-9- Extraction et analyse du métabolome total	14
II-Résultats et discussion	15
II-1 Paramètres physico-chimiques de l'eau de mer pendant la campagne d'immersion.....	15
II-2 Bioaccumulation des contaminants organiques dans les biofilms	16
II-3 Bioaccumulation des contaminants métalliques dans les biofilms	18
II-4-Comparaison de la bioaccumulation dans les biofilms et les moules	19
II-5 Diversité et composition des communautés de diatomées dans les biofilms.....	22
II-5-1 Alpha et beta-diversité des communautés de diatomées.....	22
II-5-2 Composition des communautés de diatomées	25
II-5-3 Identification des taxons qui discriminent les sites présentant des profils de communautés et des paramètres abiotiques différents.....	27
II-6 Caractérisation biochimique des substances polymériques extracellulaires faiblement liées dans les biofilms	29
II-7 Approche de métabolomique pour la caractérisation des biofilms.....	31
III-Conclusions.....	33
PARTIE II : ETUDE en MESOCOSMES SUR LE PHENANTHRENE.....	35
I-Matériels et méthodes	36
I.1. Sites d'étude et immersion	36
I-2-Dispositifs expérimentaux	37
I-2-1 Récupération des plaques et mise en place des mésocosmes	37

I-2-2 Contamination en phénanthrène des mésocosmes	38
I-3 Diversité et composition taxonomique des biofilms par metabarcoding.....	38
I-3-1 Extraction de l'ADN et amplification par PCR	38
I-3-2 Analyses bioinformatique des données de séquençage.....	39
I-3-3 Analyses statistiques	39
II-Résultats et discussion	40
II-1 Diversité alpha.....	40
II-2 Diversité bêta	41
II-3 Composition des communautés.....	42
III-Conclusions.....	44
Conclusions générales – Perspectives.....	46
Références bibliographiques.....	48
ANNEXES.....	50
ANNEXE 1 : : Liste des 18 PAHS, 14 PCBS ET 25 OCPs analysés dans les biofilms.....	50
ANNEXE 2 : Analyse en composantes principales des variables (groupes de composés organiques et éléments traces métalliques, représentés par des flèches) par sites.	51
ANNEXE 3 : Barre et al. 2024.....	52
ANNEXE 4 : Alpha diversité (richesse estimée par l'indice Chao1 et diversité estimée par l'indice de Shannon) des communautés de diatomées dans les biofilms des échantillons de la campagne SUCHIMED 2021	53

INTRODUCTION ET CONTEXTE

Les biofilms sont formés par des communautés microbiennes procaryotes et eucaryotes qui colonisent les surfaces biotiques et abiotiques, en particulier en milieu marin. Ce processus naturel et universel mène à l'installation d'une communauté microbienne complexe qui produit une matrice de substances polymériques extracellulaires (EPS) qui les entoure et contrôle en partie leurs échanges avec le milieu naturel marin.

Au sein de cette communauté microbienne des biofilms, la composante autotrophe est représentée en milieu marin quasi exclusivement par un grand nombre de taxa de diatomées (Stramenopiles, Bacillariophyceae) (Figure 1). Ces microorganismes photosynthétiques sont connus pour leur sensibilité aux variations des conditions environnementales (eg Chiu et al. 2006, Laras et al. 2014, Briand et al 2017). Les diatomées benthiques ont été beaucoup étudiées et utilisées en eau douce comme bioindicateur de la qualité de l'eau (eg Rimet et al. 2012, Pandey et al. 2018, Chonova et al. 2019).



Figure 1 : Biofilm ayant colonisé une plaque A4 de polyéthylène, après 1 mois d'immersion dans la rade de Toulon en novembre 2019, observé au Microscope Electronique à Balayage (MEB environnemental). Différentes espèces de diatomées (solitaires ou coloniales) apparaissent clairement puisqu'elles sont symétriques et font plusieurs dizaines de µm.

En revanche, même s'il existe quelques publications décrivant les communautés de diatomées des biofilms (eg Briand et al. 2012, 2017, Perez-Burillo et al., 2020 ; Laroche et al., 2023), peu d'études ont été réalisées en milieu marin pour évaluer le potentiel des biofilms en général et de ces communautés de diatomées benthiques spécifiquement comme outils de bioindication. Un des freins réside probablement dans la nécessité de compétence élevée dans l'identification spécifique de ces

organismes par reconnaissance morphologique. Ce type de compétence en taxinomie nécessite un long apprentissage et n'est plus reconnu actuellement dans les critères d'excellence de la recherche, ce qui a limité sa transmission à de nouvelles générations. Dans ce contexte, nous avons développé au laboratoire une approche de metabarcoding basée sur le séquençage Illumina du gène *rbcl* codant pour la grande sous-unité de l'enzyme Rubisco, enzyme clé de la photosynthèse - et l'utilisation de la base de données diatbarcode (Rimet et al., 2017) pour l'identification des diatomées des biofilms marins (Vedie et al., 2021 ; Barry-Martinet et al., soumis).

Le projet avait pour but d'étudier le potentiel des communautés de diatomées des biofilms comme outil de bioindication de la qualité des masses d'eau méditerranéennes côtières.

Deux parties complémentaires ont été menées à bien :

(1) l'étude des biofilms directement issus de la campagne SUCHIMED 2021 opérée par IFREMER par plusieurs approches complémentaires et pluridisciplinaires (bioaccumulation des contaminants organiques et métalliques, diversité et composition des communautés de diatomées, EPS, métabolomique).

(2) une expérimentation complémentaire en mésocosmes au laboratoire en conditions contrôlées, à partir d'eau de mer naturelle, destinée à mieux comprendre l'effet des HAP sur les communautés procaryotes et de diatomées des biofilms.

EQUIPE DU PROJET

Nom	Etablissement / laboratoire	Statut	Domaine / Compétences
Briand Jean-François	UTLN / MAPIEM	MCF-HDR	Ecologie et écotoxicologie microbiennes
Ortalo-Magné Annick	UTLN / MAPIEM	MCF	Biochimie
Barry-Martinet Raphaëlle	UTLN / MAPIEM	IE	Microscopie (MEB), extraction ADN, PCR, échantillonnage
Bouchoucha Marc	IFREMER / LER PAC	Cadre de recherche	Ecotoxicologie
Barré Abel	UTLN-MAPIEM / IFREMER-LER PAC	Doctorant	Ecologie et écotoxicologie microbiennes

Le financement du doctorant A. Barré a été assuré dans le cadre du projet complété par une bourse EJD Région Sud (également en partenariat avec l'Agence de l'eau RMC).

PARTIE I : SUCHIMED 2021

I-MATERIELS ET METHODES

I-1-Immersion et échantillonnage en mer durant SUCHIMED 2021

L'expérience a été menée dans le cadre de la campagne océanographique française SUCHIMED (BOUCHOUCHA Marc, 2021, <https://doi.org/10.17600/18001619>). Parmi les 66 sites suivis avec des moules en 2021, 50 ont été sélectionnés (Figure 2) pour étudier les biofilms marins, compte tenu de leurs profils de contamination contrastés connus.

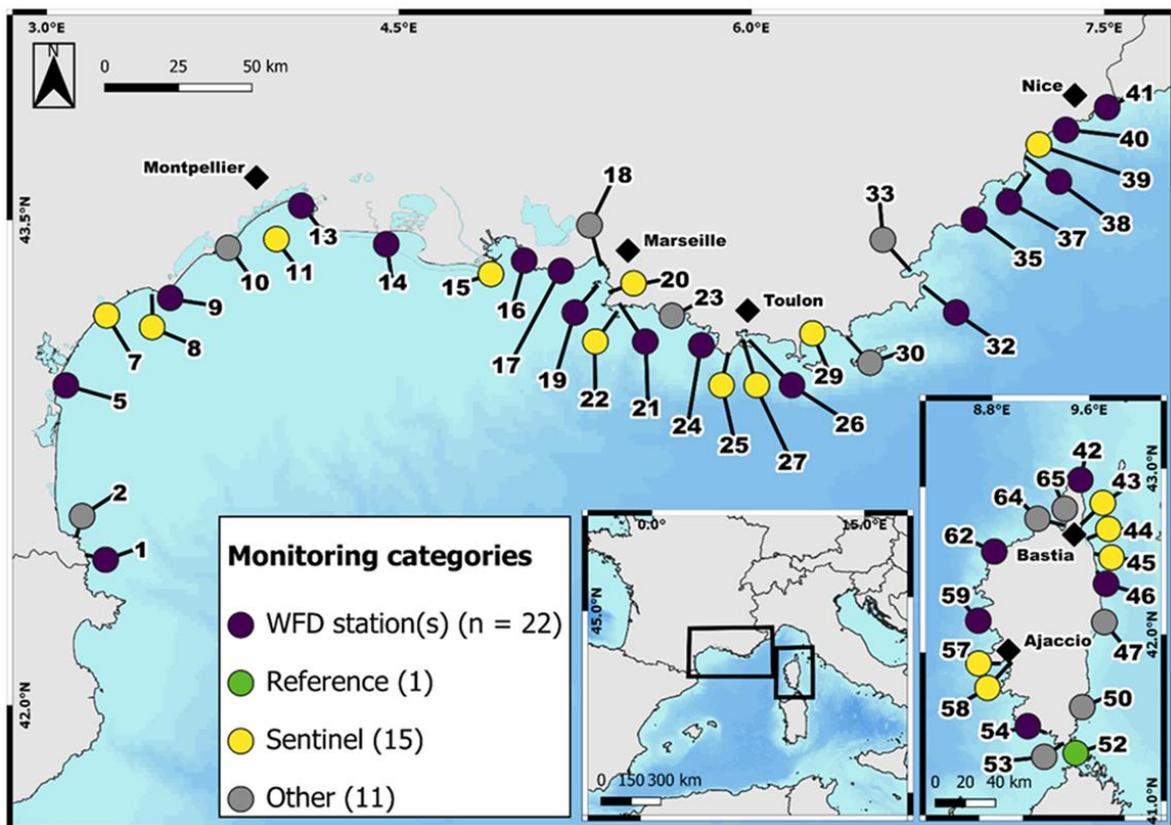


Figure 2: Localisation des sites d'immersion de la campagne SUCHIMED 2021 : 1 - Banyuls ; 2 - Port-Vendres ; 5 - Port-la-Nouvelle ; 7 - Embouchure de l'Aude ; 8 - Embouchure de l'Hérault ; 9 - Cap d'Agde ; 10 - Frontignan ; 11 - Émissaire de la station d'épuration (STEP) de Montpellier ; 13 - Grau-du-Roi ; 14 - Saintes-Maries-de-la-Mer ; 15 - Embouchure du Rhône ; 16 - Ponteau ; 17 - Carry ; 18 - Digue de Marseille ; 19 - Ile de Pomègues ; 20 - Embouchure de l'Huveaune ; 22 - Ile Plane ; 21 - Émissaire de la STEP de Marseille Cortiou ; 23 - La Ciotat ; 24 - Iles des Embiez ; 25 - Émissaire de la STEP de Toulon Cap Sicié ; 26 - Toulon Grande Rade ; 27 - Toulon Petite Rade ; 29 - Embouchure du Gapeau ; 30 - Fort de Bregançon ; 32 - Pampelone ; 33 - Saint-Tropez ; 35 - Fréjus ; 38 - Antibes Nord ; 37 - Antibes Sud ; 39 - Embouchure du Var ; 40 - Rade de Villefranche ; 41 - Menton ; 42 - Rogliano ; 43 - Émissaire de la STEP de Bastia Nord ; 44 - Émissaire de la STEP de Bastia Sud ; 45 - Embouchure du Golu ; 46 - Poggio-Mezzana ; 47 - Embouchure du Tavignano ; 50 - Porto-Vecchio ; 52 - Iles Lavezzi ; 53 - Bonifacio ; 54 - Figari-Bruzzi ; 58 - Émissaire de la STEP d' Ajaccio Gravone ; 57 - Émissaire de la STEP d' Ajaccio ; 9 - Cargèse ; 62 - Revellata ; 64 - Saint-Florent ; 65 - Canari.

WFD = sites du réseau de suivi de la Directive cadre sur l'eau (DCE) ; Reference = sites de Référence ; Sentinel = sites proches de sources de contamination dédiés aux contaminants émergents

Trois plaques de polyéthylène haute densité A4 de 0,8 cm d'épaisseur ont été immergées sur chaque site, soit 150 plaques déployées sous les poches à moules. Les plaques de polyéthylène et les poches contenant les moules ont été immergées simultanément et pendant la même période. Avant l'immersion, les plaques ont été stockées dans une boîte étanche afin d'éviter tout risque de contamination sur le pont du navire. Lors de la récupération, les plaques ont été grattées immédiatement après leur sortie de l'eau dans un laboratoire humide sur le pont du bateau afin de minimiser les risques de contamination. Le polyéthylène a été choisi parce que c'est un thermoplastique ductile, non biodégradable et relativement inerte, réduisant le risque de lixiviation des additifs par rapport à d'autres polymères conventionnels. Il s'agissait également de choisir un substrat facilement utilisable dans le cadre d'études comparatives.

Les systèmes d'ancrage ont été mis en place entre le 17 mars et le 8 avril 2021 par le R/V « Europe », et récupérés entre le 14 juin et le 7 juillet 2021 par le navire « Tethys II ». Une période de déploiement de trois mois est suffisante pour atteindre un pseudo-équilibre entre les concentrations de contaminants dans les tissus des moules et celles dans le milieu environnant et la durée d'immersion des plaques a donc été identique pour des raisons de logistique mais aussi parce qu'un biofilm est « mature » après 1 mois environ.

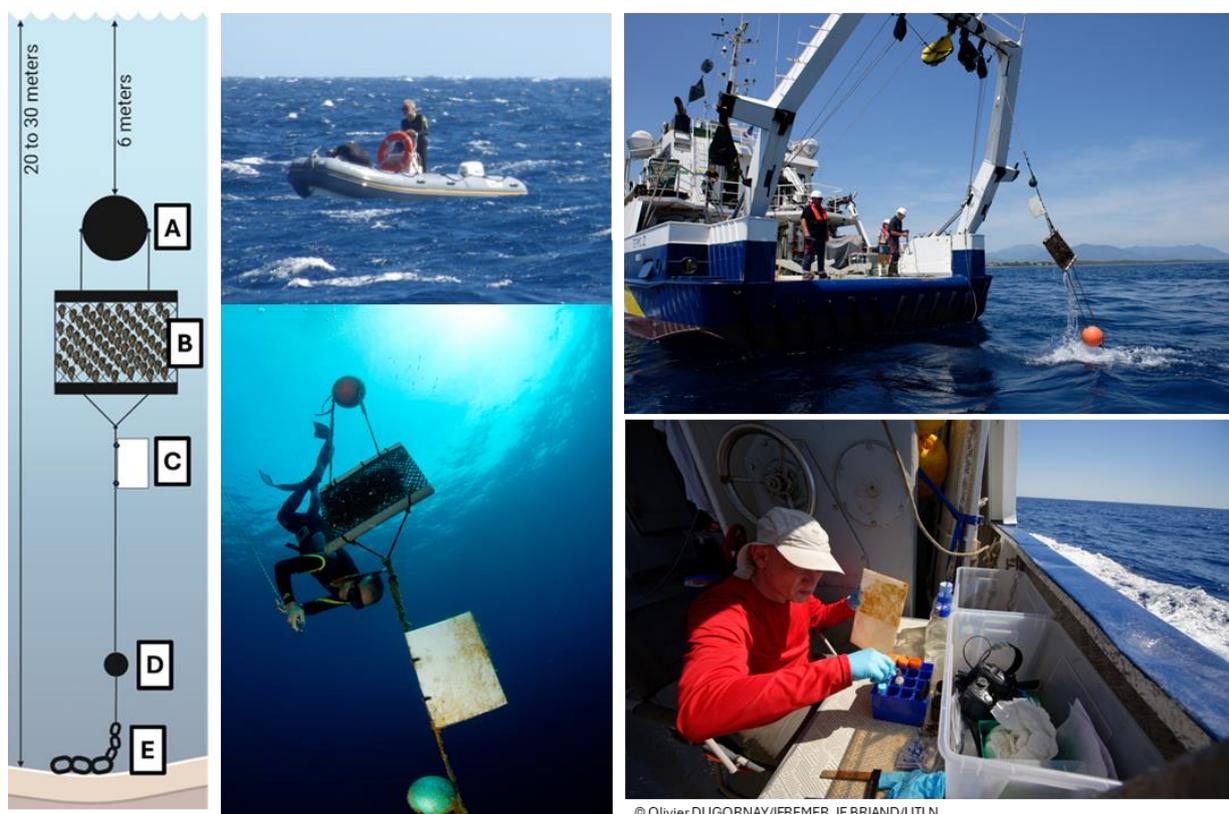


Figure 3 : systèmes d'immersion des plaques (couplés aux poches de moules) et les différentes étapes de l'échantillonnage en mer

Immédiatement après la récupération (Figure 3), deux zones de 210 cm² chacune de biofilm ont été grattées sur les plaques pour les analyses des composés organiques et des éléments métalliques. Une lame chirurgicale stérile en acier au carbone montée sur un manche de scalpel a été utilisée pour les analyses des composés organiques, tandis qu'un couteau à lame en céramique a été utilisé pour les échantillons consacrés aux éléments métalliques. Les échantillons ont été conservés à 4°C dans des bouteilles en verre de 50 ml et dans des tubes à centrifuger stériles en polypropylène Metalfree® de 15 ml (Labcon, USA), respectivement.

Pour l'ADN, une zone de 10x10cm a été grattée avec une lame stérile en acier. Pour les EPS, une zone de 21x15cm a été grattée avec le même type de scalpel que pour l'ADN. Les échantillons ont été congelés à -80°C et -20°C dans des tubes à centrifuger stériles en polypropylène de 15 et 50 mL, respectivement.

I-2- Méthodes d'analyse des contaminants dans les biofilms.

Les quantifications respectives des Eléments Traces Métalliques (ETM) et des Contaminants Organiques (OC) dans les moules et les biofilms ont été réalisées par les mêmes laboratoires avec les mêmes instruments afin de limiter les biais analytiques et d'assurer une comparabilité adéquate des données.

Analyse des ETM : Chaque échantillon a subi des étapes de prétraitement qui consistaient en un broyage mécanique suivi d'une lyophilisation et d'une minéralisation. Ensuite, 9 ETM (Cr, Mn, Co, Ni, Cu, Zn, As, Cd et Pb) ont été quantifiés par spectrométrie de masse à plasma inductif (ICP-MS, iCAP TQ Thermo) pour une masse d'échantillon initiale de 200 mg ps. Le Hg total a été quantifié par fluorescence atomique (AMA-254 Altec) avec une limite de quantification (LOQ) de 0,015 mg.kgdw⁻¹ et une masse d'échantillon initiale de 100 mg dw. Des matériaux de référence certifiés BCR-414 (plancton) et NIST-2976 (tissu de moule) ont été utilisés pour évaluer la précision des méthodes de mesure analytique. Les résultats sont exprimés en µg par g de poids sec de biofilm (µg.gdw⁻¹)

Analyses des OC : Les échantillons de biofilms ont été analysés pour les HAP, les PCB et les OCP. Toutes ces analyses ont été réalisées selon des méthodes validées (norme ISO/IEC 17025:2005) basées sur la spectrométrie de masse et ont été effectuées au laboratoire national français de référence pour les PCB et les HAP du ministère français de l'agriculture. Les unités utilisées sont les ng par g de poids sec de biofilm (ng.gdw⁻¹). Des protocoles détaillés pour la quantification des HAP, des PCB et des OCP sont fournis dans le texte supplémentaire S3. La liste des 57 composés est fournie dans le tableau supplémentaire S4. La contribution potentielle du polyéthylène à la contamination des biofilms par lixiviation de certains contaminants a également été étudiée en grattant et en analysant deux plaques de PE vierges.

Pour garantir la qualité de l'analyse des PCB, HAP et OCP, outre l'utilisation d'étalons internes appropriés dans chaque échantillon, des étalons externes étiquetés ont été systématiquement ajoutés à la fin de chaque processus analytique afin de déterminer les taux de récupération. En outre, un contrôle continu de la procédure analytique a été mis en œuvre au moyen de blancs de procédure. Pour les PCB, la contamination analytique étant totalement maîtrisée, c'est-à-dire inférieure aux niveaux de concentration observés dans les échantillons et régulièrement contrôlés au moyen d'une carte de contrôle, la concentration des blancs n'a pas été soustraite pour cette classe de contaminants, contrairement aux HAP et aux OCP. La reproductibilité a été évaluée à l'aide d'échantillons de contrôle de la qualité (CQ) caractérisés régulièrement sur plusieurs années. Les CQ étaient les suivants : un échantillon d'huile de poisson naturellement contaminé par les PCB et un échantillon de poisson naturellement contaminé par les HAP. La LOQ a été fixée comme la concentration correspondant à un rapport signal/bruit supérieur à 3 et a été calculée pour chaque molécule, dans chaque échantillon testé. La limite de quantification d'un congénère de PCB peut être définie comme la concentration d'un analyte dans un extrait d'échantillon qui produit une réponse instrumentale pour deux ions surveillés avec un rapport signal/bruit (S/N) de 3:1 pour le signal de données brutes le moins intense (Centre commun de recherche de la Commission européenne, 2016 ; règlement (UE) 2017/644 de la Commission, 2017).

I-3-Analyses statistiques liées aux contaminants dans les biofilms.

Toutes les analyses statistiques ont été réalisées à l'aide du logiciel R (R v.4.1.1, R Core Team). Une analyse discriminante des niveaux de CO a été réalisée en suivant les étapes suivantes : les concentrations de chacun des 57 composés ont été moyennées pour les répliqués situés sur le même site, et les concentrations inférieures à la LOQ ont été remplacées par des valeurs nulles. Ensuite, tous les composés ont été additionnés au sein de leurs groupes respectifs (HAP, OCP, DL et NDL-PCB) sur chaque site. Les valeurs aberrantes hautes et basses ont été identifiées comme étant plus de 1,5 fois l'intervalle interquartile au-dessus ou au-dessous du troisième et du premier quartile, respectivement. Les moyennes ajustées (\bar{x}) et les écarts-types (σ) ont été calculés à partir des ensembles de données sans valeurs aberrantes et utilisés pour répartir en cinq classes les concentrations totales de HAP, de PCO, de DL-PCB et de NDL-PCB dans les biofilms. La méthode de classement basée sur le σ choisie a été adaptée à partir de celles utilisées dans des études antérieures (Andral et al., 2004 ; Briand et al., 2023) et comprenait cinq classes, définies comme référence ($< \bar{x}$), faible ($< \bar{x} + \sigma$), modérée ($< \bar{x} + 2*\sigma$), élevée ($< \bar{x} + 3*\sigma$) et très élevée ($> \bar{x} + 3*\sigma$). En ce qui concerne les ETM, trois éléments (Cd, Hg et Pb) ont été sélectionnés et Cu a également été considéré en raison de la faible fiabilité de la matrice des moules pour cet élément, de sa forte toxicité combinée à son utilisation intensive dans l'agriculture biologique (Pesce et al., 2024) et dans les peintures antisalissures (Briant et al., 2022).

Les quatre ETM cibles ont été discriminés en cinq classes selon la même méthodologie que pour les groupes de composés organiques.

Les concentrations en OC et EMT accumulés par les moules lors de la campagne 2021 ont été obtenues auprès des auteurs de la publication qui leur est consacrée (Briand et al., 2023). Les composés et éléments quantifiés conjointement dans les deux matrices environnementales ont été inclus pour les analyses de corrélation, c'est-à-dire tous les métal(lويد)s, PCB et HAP mais 15 des 25 OCP (liste des exclus : β - et δ - isomères de l'hexachlorocyclohexane, oxychlordan, α - et γ - isomères du chlordan, cis- et trans-nonachlore, ortho-para isomères du DDD et du DDE, et mirex).

Les corrélations entre les biofilms et les moules pour chaque composé et élément individuel ont été étudiées à l'aide de la fonction cor du progiciel stats avec la méthode de Pearson et en considérant les limites de quantification comme les concentrations. La matrice dans laquelle chaque composé ou élément s'accumule préférentiellement a été déterminée en utilisant la valeur log₁₀ de la moyenne (sur 49 sites) du rapport entre la concentration de l'élément ou du composé X dans les biofilms sur le site i et celle dans les tissus des moules également sur le site i (BMLR).

Le test de Mantel sur les corrélations matricielles entre les concentrations dans les biofilms et celles dans les moules a été déterminé pour chaque groupe de CO et pour les ETM. Il visait à évaluer côte à côte les corrélations des matrices des groupes de contaminants entre les moules et les biofilms. Avant le test de Mantel, toutes les valeurs inférieures aux limites de quantification ont été remplacées par des zéros et les matrices de concentration ont été transformées en matrices de dissimilarité de Bray-Curtis à l'aide de la fonction vegdist du progiciel vegan. Les corrélations des matrices au niveau des groupes ont été calculées par le test de Mantel implémenté (Mantel, 1967 ; Legendre et Legendre, 1998) en utilisant la corrélation de Spearman avec la fonction mantel du paquetage vegan dans R v4.1.1. La signification de la corrélation a été évaluée en utilisant 9999 permutations pour chaque test et a été décrite comme statistiquement significative si $p < 0,05$.

I-4-. Environmental data collection

Environmental data were collected for 50 sites from the Copernicus and MENOR databases. The Copernicus data included ammonium (hereafter NH_4 ; [$\text{mmol}\cdot\text{m}^{-3}$]), phosphate (PO_4 ; [$\text{mmol}\cdot\text{m}^{-3}$]), nitrate (NO_3 ; [$\text{mmol}\cdot\text{m}^{-3}$]), chlorophyll-a (CHL ; [$\text{mg}\cdot\text{m}^{-3}$]), dissolved oxygen (O_2 ; [$\text{mmol}\cdot\text{m}^{-3}$]), and pH, retrieved from the model Mediterranean Sea Biogeochemistry Reanalysis (product MEDSEA_MULTIYEAR_BGC_006_008) with a spatial resolution of $0.042^\circ \times 0.042^\circ$. Silicate (SIL ; [$\text{mmol}\cdot\text{m}^{-3}$]) data were retrieved from the model Mediterranean Sea Biogeochemistry Analysis and Forecast (product MEDSEA_ANALYSISFORECAST_BGC_006_014), also with a resolution of $0.042^\circ \times 0.042^\circ$.

Les données de température (°C) et de salinité (PSU) ont été extraites de la base de données MENOR (Garnier et al., 2014), qui offre une résolution spatiale plus élevée de $0,011^\circ \times 0,011^\circ$ et une résolution temporelle plus fine d'intervalles de 3 heures par rapport à la résolution temporelle quotidienne de Copernicus. MENOR offre une plus grande précision que Copernicus dans la capture des gradients environnementaux locaux et des courtes variations spatio-temporelles des données spécifiques à la région pour le nord-ouest de la mer Méditerranée.

I-5-Extraction d'ADN, amplification et séquençage Illumina Miseq (metabarcoding)

L'extraction de l'ADN total a été réalisée en suivant le protocole fourni par le fabricant du kit DNeasy PowerBiofilm (Qiagen, Allemagne). Moins de 0,02 g de biofilm décongelé a été utilisé.

L'amplification PCR a été réalisée sur le gène plastidique *rbcl* en ciblant un code-barre de 312 pb. Pour amplifier cette région, la paire d'amorces *Diat_rbcl_708F* (Stoof-leichsenring et al., 2012) et R3 (Bruder et Medlin 2007) a été légèrement modifiée. L'amorce Forward combinait un mélange équimolaire de *Diat_rbcl_708F_1* (AGGTGAAGTAAAAGGTTTCWACTTAAA), *Diat_rbcl_708F_2* (AGGTGAAGTTAAAGGTTTCWTAYTTAAA) et *Diat_rbcl_708F_3* (AGGTGAACTAAAGGTTTCWACTTAAA) ; l'amorce Reverse combinait un mélange équimolaire de R3_1 (CCTTAATTTACCWACWACTG) et R3_2 (CCTTAATTTACCWACAACAG). Pour chaque échantillon d'ADN, l'amplification par PCR a été réalisée en trois exemplaires dans un volume final de 25 μ L. Chaque mélange PCR était composé de 1 μ L d'ADN extrait, 0,75 U de polymérase Takara LA Taq®, 2,5 μ L de tampon 10X, 1,25 μ L de 10 μ M d'amorces *Diat_rbcl_708F_1_2_3* et R3_1_2, et complété par de l'eau de qualité biologie moléculaire pour un volume final de 50 μ L. Les conditions de la réaction PCR ont été initiées par une étape de dénaturation à 95 °C pendant 15 min suivie d'un total de 30 cycles de 95 °c pendant 45 s (dénaturation), 55 °C pendant 45 s (recuit), et 72 °C pendant 45 s (extension finale).

Les amplicons ont ensuite été séquencés par paires (2 \times 300 pb, plateforme Illumina chez Eurofins Genomics (Konstanz, Allemagne)).

I-6 Traitement bioinformatique des séquences

Le pipeline DADA2 a été utilisé comme décrit par Tapolczai et al. (2019). Les données sont disponibles dans la base de données BioProject du NCBI (numéro d'accession en cours). Le tableau ASV global a été assigné taxonomiquement en utilisant le pipeline FROGS avec la base de données *rbcl* Rsystem *Diat.barcode* 10.1 (Rimet et al. 2019). Les multi-affiliations ont été choisies manuellement pour les ASV les plus abondants (>1000 reads pour l'ensemble du tableau), en priorisant les espèces précédemment enregistrées dans les habitats marins. Le tableau taxonomique final a été filtré sur la base de plusieurs critères : les séquences présentant un minimum de 95 % d'identité blast ont été conservées, tandis que les rangs taxonomiques, des espèces aux classes, avec une valeur RDP < 0,6 ont été considérés

comme incertains et étiquetés comme « inconnus » (par exemple, « genre inconnu », « espèce inconnue », etc). Le tableau de biom et l'arbre phylogénétique correspondants ont été exportés de FROGS pour les analyses statistiques ultérieures. Les lectures ont été normalisées au nombre minimum de lectures dans l'ensemble du jeu de données.

I-7 Analyses biostatistiques des données de metabarcoding

Toutes les analyses statistiques ont été réalisées à l'aide de R (version 4.1.1) avec les paquets phyloseq, vegan, microbiome, stats, agricolae et pairwiseAdonis. Les indices de Shannon et de Chao1 ont été calculés au niveau taxonomique des espèces. Une mise à l'échelle multidimensionnelle non métrique (NMDS) a été réalisée à l'aide de la fonction « ordinate » du logiciel phyloseq, avec la méthode de dissimilarité de Bray-Curtis, toujours au niveau taxonomique de l'espèce. L'analyse de la variance (ANOVA) et l'analyse de la variance multivariée permutatoire (PERMANOVA) ont été effectuées sur la matrice de distance en tenant compte du site.

Des analyses de redondance basées sur la distance (db-RDA) ont été réalisées pour les trois écorégions, en utilisant des variables explicatives centrées et mises à l'échelle et des données sur les communautés de diatomées transformées par Hellinger (Legendre et Gallagher, 2001) sur la base de l'indice de dissimilarité de Bray-Curtis. Les variables explicatives sélectionnées étaient la température, la salinité, le pH, la saturation en oxygène, la chlorophylle a, NO₃, NH₄, PO₄, les silicates, le TEPI, le PAH-PI, le PCB-PI et le OCP-PI. Pour les métaux traces et les composés organiques, les indices de pollution ont été calculés sur la base de l'indice de pollution par les éléments traces (TEPI) (Gallo et al., 2023 ; Mille et al., 2018 ; Richir & Gobert, 2014). Pour les métaux traces (Al, V, Cr, Mn, Co, Ni, Cu, Zn, As, Mo, Ag, Cd, Ba, Pb et Hg), le TEPI a été calculé à l'aide de la formule suivante :

$$TEPI = \left(\prod_{i=1}^n \frac{C_i}{C_{moy}} \right)^{1/n}$$

où C_i est la concentration de l'élément i dans le site ou la station surveillée, C_{moy} est la concentration moyenne de l'élément i dans toutes les stations, et n est le nombre total d'éléments pris en compte dans l'indice TEPI. De même, des indices distincts ont été calculés pour d'autres catégories de polluants : un indice de pollution pour les HAP (PAHPI), un indice de pollution pour les PCB (PCBPI), un indice de pollution pour les OCP (OCPPI), et un indice de pollution incluant tous les contaminants organiques (OPI).

Pour les paramètres environnementaux, les valeurs moyennes ont été calculées sur la durée de l'immersion des plaques afin d'obtenir des conditions représentatives spécifiques au site. En outre, le taux de saturation en oxygène de l'eau de mer a été calculé sur la base de la concentration en oxygène

dissous mesurée, car il tient compte de la température et de la salinité et fournit une mesure plus pertinente de la disponibilité de l'oxygène.

Une analyse de partitionnement de la variance a été effectuée pour quantifier les contributions relatives de quatre groupes de facteurs environnementaux à la différenciation des communautés. Ces groupes sont les suivants : facteurs physico-chimiques (qui regroupent la température, la salinité, le pH, la saturation en oxygène et la chlorophylle a), nutriments (PO_4 , NO_3 , NH_4 et silicates), substances organiques (PAH-PI, PCB-PI et OCP-PI) et métaux (TEPI).

L'analyse LEfSe (Segata et al. 2011) nous a permis d'identifier des taxons spécifiques en fonction des conditions. Enfin, les ASV et les espèces ont été exportés de R à l'aide de la fonction « core_members » afin de générer des diagrammes de Venn entre les sites, en distinguant les communautés exclusives et les communautés centrales (communes à tous les échantillons).

I-8- Caractérisation biochimique des substances polymériques extracellulaires (EPS) des biofilms.

Isolement des EPS faiblement liées des biofilms (LB-EPS, *Loosely Bound*) : les échantillons de biofilms ont été soumis à un protocole d'extraction afin d'isoler une fraction d'EPS, les EPS faiblement liées, parmi les exopolymères composant la matrice. Ces EPS présentent un intérêt particulier du fait de leur situation supposée en surface de la matrice du biofilm étant donné leur extraction facilitée. Pour cette étape d'extraction des EPS, un traitement physique doux -en lieu et place d'un traitement chimique parfois utilisé pour plus d'efficacité- a été choisi afin de préserver au mieux les fonctions chimiques des polymères et de ne pas lyser les cellules du biofilm (assurant l'isolement de substances effectivement extracellulaires). Plus précisément, les échantillons de biofilm ont été soumis à une centrifugation à haute vitesse, processus venant mettre en solution dans le surnageant obtenu les EPS faiblement liées décrochées (qualifiées aussi d'EPS solubles, car venant facilement en solution, ou colloïdales, étant donné leur nature), alors que le biofilm restant (dit résiduel et constitué encore d'EPS plus fortement liées et des microorganismes associés), se sépare dans le culot de centrifugation. Pour isoler les EPS du surnageant de centrifugation (contenant également des petits solutés), une précipitation des polymères est réalisée par ajout d'alcool. Les EPS sont alors récupérées par centrifugation, avant d'être séchées par lyophilisation et pesées.

Cette méthodologie a permis une quantification et une analyse biochimique subséquente des LB-EPS des biofilms récoltés.

Quantification colorimétrique des protéines : la teneur en protéines des EPS isolées des biofilms a été évaluée à l'aide d'une méthode de dosage colorimétrique décrite par Bradford (1976) qui se base sur le principe de liaison protéine-colorant. Huit solutions-étalon d'albumine sérique bovine (BSA) de concentrations allant de 0 à 25 $\mu\text{g/mL}$ ont été préparés à partir d'une solution de 25 $\mu\text{g/mL}$ obtenue

en dissolvant la BSA dans de l'eau ultrapure. Pour le dosage des protéines parmi les EPS, 150 µL de chaque étalon ou échantillon d'EPS ont été ajoutés dans une microplaque transparente à 96 puits, suivis de l'ajout de 150 µL de réactif Bradford. La plaque a été agitée pendant 15 secondes et laissée au repos pendant 1 minute. L'absorbance a ensuite été mesurée à 595 nm à l'aide d'un lecteur de microplaques TECAN.

Quantification colorimétrique des glucides ou carbohydrates : la teneur en glucides a été évaluée à l'aide de la méthode à l'antrone décrite par Morris (1948). Huit solutions étalons de D-glucose avec des concentrations allant de 0 à 360 µg/ml ont été préparées dans des flacons en verre de 8 ml avec un volume final de 0,5 ml. Pour le réactif Anthrone, 50 ml d'acide sulfurique concentré ont été refroidis dans un bain de glace pendant 20 minutes, puis 100 mg d'antrone ont été ajoutés. Chaque échantillon et chaque étalon ont reçu 2 ml de la solution d'antrone et d'acide sulfurique, ont été vortexés et placés dans un bain sec à 80°C. La température a ensuite été augmentée à 95°C et les flacons ont été incubés pendant 15 minutes une fois que le bloc a atteint cette température. Après l'incubation, les flacons ont été refroidis à température ambiante pendant 30 minutes et vortexés à nouveau. L'absorbance a été mesurée à 625 nm à l'aide d'un lecteur de microplaques TECAN après transfert de 200 µl de chaque étalon et échantillon dans une microplaque transparente à 96 puits.

Quantification colorimétrique des acides uroniques : la teneur en acides uroniques (glucides acides) dans les EPS des biofilms a été évaluée à l'aide de la méthode Blumenkrantz & Asboe-Hansen (1973). Des standards de calibration avec des concentrations d'acide glucuronique allant de 0 à 64 µg/ml ont été préparés dans des flacons en verre de 8 ml avec un volume final de 200 µl. Pour les réactifs, 0,238 g de tétraborate de sodium ont été dissous dans 50 ml d'acide sulfurique à 95 % (4,77 g/l), et 150 mg de MHDP et 500 mg de NaOH ont été dissous dans 100 ml d'eau pour obtenir une solution de MHDP à 0,15 % et de NaOH à 0,5 %. Chaque échantillon ou étalon a reçu 1,2 ml d'acide tétraborate-sulfurique, a été vortexé et incubé à 90°C pendant 10 minutes. Les flacons ont ensuite été refroidis dans un bain de glace pendant au moins 3 minutes. Après refroidissement, 20 µl de la solution de MHDP-NaOH ont été ajoutés à chaque flacon, vortexés à nouveau, et 200 µl de chaque standard ont été transférés dans une microplaque transparente à 96 puits pour la mesure de l'absorbance à 520 nm à l'aide d'un lecteur de plaque TECAN.

I-9- Extraction et analyse du métabolome total

1) la préparation de l'échantillon avant analyse comprend une étape de quenching du biofilm (blocage du métabolisme dès la récolte par ajout de solvant), une étape d'extraction du métabolome (action du solvant choisi approprié -ici, l'acétate d'éthyle- et d'un traitement aux ultrasons permettant de casser les cellules), suivie de la préparation de la solution de l'extrait métabolique à une concentration

donnée pour son injection en chromatographie ; 2) l'analyse du métabolome (par LC-MS ; séparation des métabolites analysés en SM) ; 3) l'extraction et le traitement des données LC-MS conduisant à une matrice de données exploitables ; 4) l'analyse statistique de la matrice obtenue permettant de visualiser les similarités ou les différences entre échantillons.

II-RESULTATS ET DISCUSSION

Des biofilms se sont développés sur des plaques A4 de polyéthylène (HDPE) après trois mois d'immersion sur les 49 sites côtiers le long des côtes méditerranéennes françaises incluant la Corse, avec une biomasse suffisante pour (i) des analyses quantitatives des métaux et des contaminants organiques, (ii) disposer d'une quantité d'ADN suffisante pour l'amplification du gène *rbcL* permettant, après séquençage, l'identification des diatomées, (iii) disposer d'une quantité suffisante d'EPS pour leur caractérisation biochimique globale, et (iv) disposer d'une quantité suffisante pour une analyse métabolomique.

II-1 Paramètres physico-chimiques de l'eau de mer pendant la campagne d'immersion

Les données obtenues pour tous les sites grâce aux outils de modélisation ont révélé de nettes variations régionales dans les paramètres physicochimiques moyens et les concentrations de nutriments en fonctions des écorégions. La température moyenne en surface a varié de 15,92°C dans le Rhône-Ouest à 17,73°C en Corse, reflétant un gradient ouest - est. La salinité a varié de 35,7 PSU dans Rhône-Ouest, sous l'influence des apports d'eau douce du fleuve Rhône, à 38,1 PSU en Corse.

Table 1 : Des données environnementales ont été obtenues pour 50 sites à partir des bases de données Copernicus et MENOR. Une moyenne des données journalières a été calculée sur les 3 mois d'immersion.

<i>Variables</i>	<i>West-Rhone (St.01 to 14)</i>	<i>East-Rhone (St. 16 to 41)</i>	<i>Corsica (St. 42 to 65)</i>
<i>Temperature (°C)</i>	15.92	16.14	17.73
<i>Salinity (PSU)</i>	35.71	37.99	38.07
<i>pH</i>	8.13	8.11	8.07
<i>O2 saturation (%)</i>	104.09	102.65	103.17
<i>Chlorophyll A (mg.m⁻³)</i>	0.33	0.21	0.08
<i>NH4 (mmol.m⁻³)</i>	0.55	0.26	0.19
<i>NO3 (mmol.m⁻³)</i>	2.46	1.34	0.64
<i>PO4 (mmol.m⁻³)</i>	0.05	0.04	0.02
<i>Silicates (mmol.m⁻³)</i>	3.12	2.25	1.57

Les valeurs moyennes du pH étaient relativement stables et la saturation en oxygène supérieure à 100 % dans toutes les régions. les concentrations d' NH_4^+ , de NO_3^- et de $\text{Si}(\text{OH})_4$ étaient plus élevées en

Rhône-Ouest (0,55, 2,46 et 3,12 mmol-m⁻³, respectivement) et diminuent en Corse (0,19, 0,64 et 1,57 mmol-m⁻³, respectivement), peut-être en raison de l'influence décroissante des apports de nutriments fluviaux. Les niveaux de PO₄³⁻ étaient uniformément bas dans toutes les régions. En accord avec ces concentrations en nutriments, les concentrations de chlorophylle a étaient plus élevées en Rhône ouest avec une forte diminution en Corse (0,08 mg-m⁻³).

II-2 Bioaccumulation des contaminants organiques dans les biofilms

L'ensemble des contaminants métalliques (40 par ICP-MS) et organiques (environ 60 incluant HAP, PCB dioxines like et non-dioxines like, OCPs) recherchés ont pu être détectés et très souvent quantifiés dans les biofilms (Figures 4 et 5), démontrant la capacité de ces biofilms à bioaccumuler les contaminants en fonction des sites (Barré et al.,2024).

Les niveaux de contamination étaient principalement classés de ligne de base (classe 0) à modéré (classe 2) pour les HAP et les DL-PCB (86%), pour les NDL-PCB (92%) et pour les OCP (96%). Pour les HAP et les PCB, le nombre de sites très fortement contaminés (4^e classe) est supérieur au nombre de sites fortement contaminés (3^e classe), tandis que pour les OCP, un seul site se trouve dans les 3^e et 4^e classes.

Les concentrations totales de HAP allaient de 6 à 1 033,19 ng.gdw⁻¹, 50 % des sites se situant en dessous de 96,92 ng.gdw⁻¹. Parmi les 18 HAP ciblés, le fluoranthène, le benzo[b]fluorène, le pyrène et l'indéno[1,2,3-c,d]pyrène ont contribué le plus aux concentrations totales de HAP sur tous les sites avec une part relative moyenne par site de 12,90 ± 3,05%, 10,28 ± 2,28%, 10,30 ± 7,90% et 9,88 ± 3,60%, respectivement. Des tendances similaires ont été observées pour les DL et NDL-PCB, montrant une augmentation d'un facteur 100 entre leurs valeurs respectives les plus faibles et les plus élevées à la station 46 (0,05 ng.gdw⁻¹ et 0,36 ng.gdw⁻¹) et à la station 21 (5,01 ng.gdw⁻¹, 39,88 ng.gdw⁻¹). Quatre sites ont été classés dans la quatrième classe pour les deux groupes de PCB (st.18, 19, 21 et 27), tandis que la st.53 a été classée dans la quatrième classe DL-PCB et dans la deuxième classe pour les NDL-PCB.

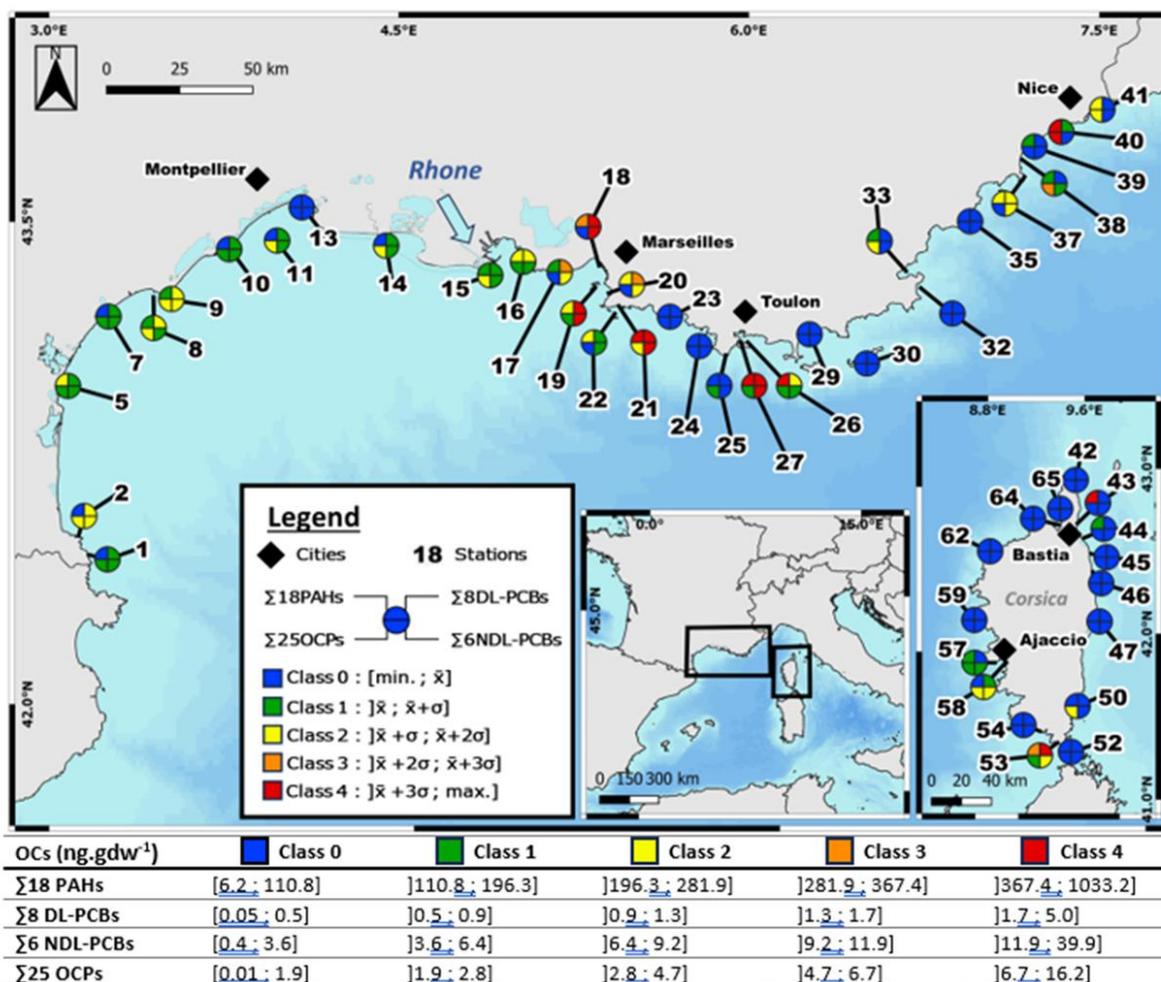


Figure 4 : Localisation géographique des 49 stations d'échantillonnage. Les grandes métropoles françaises sont représentées par des losanges bleus. Chaque station est représentée par un camembert divisé en quatre quadrants symbolisant les quatre familles de composés organiques. Le quadrant supérieur gauche fait référence aux concentrations totales de HAP des biofilms. Le quadrant supérieur droite pour les DL-PCB ; en bas à droite pour les NDL-PCB ; et en bas à gauche pour les OCP. Chaque moitié du demi-cercle est colorée selon la classe de contamination. Le bleu indique la valeur de référence ($< \text{moyenne}$), le vert indique une contamination faible ($< \text{moyenne} + \text{SD}$), le jaune indique une contamination modérée ($< \text{moyenne} + 2 \times \text{SD}$), l'orange une contamination élevée ($< \text{moyenne} + 3 \times \text{SD}$) et le rouge très élevée ($> \text{moyenne} + 3 \times \text{SD}$)

Les concentrations totales en OCPs variaient de 0,01 à 16,21 ng.gdw⁻¹, avec 50% de tous les sites en dessous de 2,68 ng.gdw⁻¹. St.40 (16,21 ng.gdw⁻¹) a été classé dans la quatrième classe et St.38 (6,73 ng.gdw⁻¹) dans la troisième classe. Parmi tous les OCP, le p,p'-DDE était le principal contributeur (28,58±25,65% en moyenne), dépassant la moitié du total des OCP dans cinq sites : st.22 (51,13%), st.38 (67,93%), st.35 (69,48%), st.32 (76,99%), et st.24 (90,70%). Les pesticides prédominants suivants étaient le p,p'-DDD, le γ -hexachlorocyclohexane et le δ -hexachlorocyclohexane, contribuant à une moyenne de 16,65±23,42, 14,90±18,10 et 12,92±13,06%, respectivement.

II-3 Bioaccumulation des contaminants métalliques dans les biofilms

Les niveaux de contamination pour les métaux traces ont été principalement classés de baseline (classe 0) à modéré (classe 2) pour le Cd (94%), pour le Pb (92%), pour le Cu (90%) et pour le Hg (82%). Les valeurs pour le Cu variaient de 2,86 à 75,85 $\mu\text{g.gdw}^{-1}$, avec 50 % des valeurs inférieures à 17,87 $\mu\text{g.gdw}^{-1}$. Trois sites appartiennent à la quatrième classe, par ordre décroissant : st.02, st.53 (62,84 $\mu\text{g.gdw}^{-1}$) et st.27 (53,58 $\mu\text{g.gdw}^{-1}$). Dans l'ensemble, les concentrations de Cu les plus élevées ont été observées dans les ports. En ce qui concerne le Cd, les concentrations variaient de 0,09 à 0,69 $\mu\text{g.gdw}^{-1}$, avec 50% des valeurs inférieures à 0,21 $\mu\text{g.gdw}^{-1}$. Deux sites situés dans l'écorégion Rhône-est appartiennent à la quatrième classe : st.18 et st.24 (0,48 $\mu\text{g.gdw}^{-1}$). Les concentrations de Pb varient entre 0,76 et 35,92 $\mu\text{g.gdw}^{-1}$, avec 50% des valeurs inférieures à 7,89 $\mu\text{g.gdw}^{-1}$. Trois sites ont été classés dans la quatrième classe : st.27, st.53 (23,57 $\mu\text{g.gdw}^{-1}$) et st.18 (22,05 $\mu\text{g.gdw}^{-1}$). Les valeurs de Hg ont atteint leur maximum à la station st.27 avec 0,77 $\mu\text{g.gdw}^{-1}$, et 50 % des stations avaient des concentrations inférieures à 0,03 $\mu\text{g.gdw}^{-1}$. Dans l'écorégion ER, six stations appartiennent à la quatrième classe : st.16 (0,17 $\mu\text{g.gdw}^{-1}$), st.18 (0,37 $\mu\text{g.gdw}^{-1}$), st.19 (0,14 $\mu\text{g.gdw}^{-1}$), st.21 (0,24 $\mu\text{g.gdw}^{-1}$), st.26 (0,30 $\mu\text{g.gdw}^{-1}$) et st.27 (0,77 $\mu\text{g.gdw}^{-1}$). En Corse, le st.53 est également dans cette catégorie avec 0,32 $\mu\text{g.gdw}^{-1}$.

Par ailleurs, la typologie globale des sites a pu être confirmée en tenant compte de l'ensemble des analyses des contaminants organiques et métallique (Annexe 1). Les biofilms provenant de sites exposés à des activités urbaines-industrielles, tels que les ports (st.18, 26, 27, 40 et 53) et les stations d'épuration (st.21) présentaient une accumulation plus importante de Hg, Cu, Pb, HAP et PCB. À l'inverse, les sites situés à proximité des petites villes et des embouchures de rivières présentaient une plus faible variabilité des contaminants.

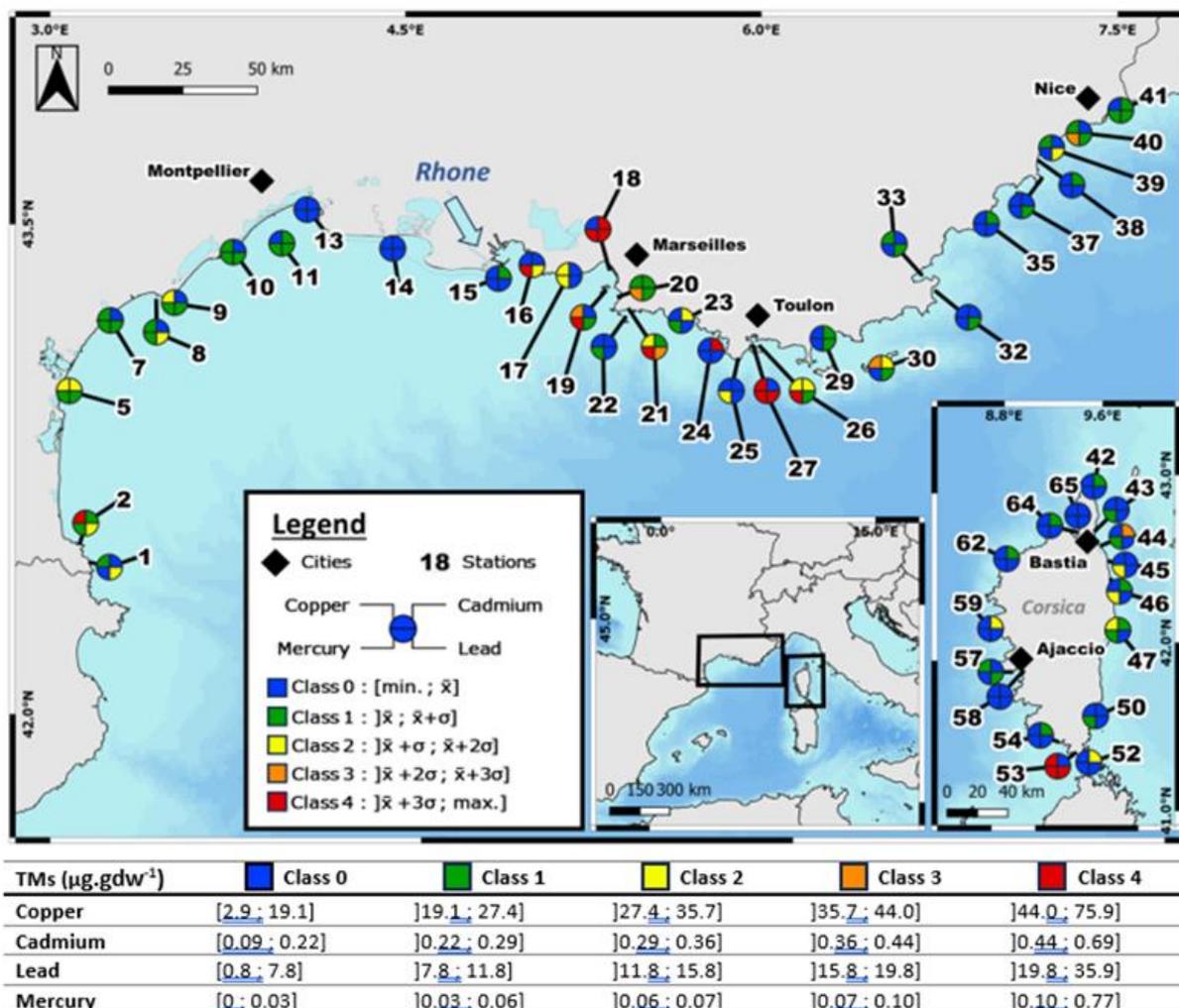


Figure 5 : Localisation géographique des 49 stations d'échantillonnage. Les grandes métropoles françaises sont représentées par des losanges bleus. Chaque station est représentée par un camembert divisé en quatre quadrants symbolisant les quatre metalloïdes principaux. Le quadrant supérieur gauche fait référence aux concentrations en cuivre. Le quadrant supérieur droite pour le cadmium ; en bas à droite pour le plomb ; et en bas à gauche pour le mercure. Chaque moitié du demi-cercle est colorée selon la classe de contamination. Le bleu indique la valeur de référence (< moyenne), le vert indique une contamination faible (< moyenne + SD), le jaune indique une contamination modérée (< moyenne + 2 × SD), l'orange une contamination élevée (< moyenne + 3 × SD) et le rouge très élevée (> moyenne + 3 × SD)

II-4-Comparaison de la bioaccumulation dans les biofilms et les moules

Le test de corrélation des matrices de Mantel appliqué entre les concentrations mesurées dans les biofilms et celles de *Mytilus galloprovincialis* a révélé des corrélations très fortes et significatives pour les 18 HAP ($r = 0,81$, $p < 0,001$, $n = 882$) et les 8 DL-PCB ($r = 0,92$, $p < 0,001$, $n = 392$) (Tableau 2). Les 6 NDL-PCB ont également révélé des corrélations fortes et significatives entre les deux matrices ($r = 0,46$, $p < 0,05$, $n = 294$). Par contre, les OCP ont montré des corrélations non significatives ($r = 0,17$, $p > 0,05$, $n = 735$) pour les 15 composés en commun, tout comme les métaux(loïdes) ($r = 0,33$, $p > 0,05$, $n = 490$).

Table 2

Mantel matrices correlation values between mussels and marine biofilms for organic compounds (PAHs, DL and NDL-PCBs, OCPs) and inorganic elements on the whole 49 sites as well as on each ecoregion (Est-Rhone, West-Rhone, and Corsica). The test significance follows Spearman's rank correlation values and is represented as follows: nothing ($p > 0.05$); * ($p < 0.05$); ** ($p < 0.01$); *** ($p < 0.001$). The number of rows/columns in each of the distance matrices is given after semicolon.

Dataset (nb. of observations)	PAHs (18)	DL-PCBs (8)	NDL-PCBs (6)	OCPs (15)	Metal (loïds) (10)
Whole (49)	0.81***; 882	0.92***; 392	0.55*; 294	0.06*; 735	0.33; 490
West-Rhone (WR, 11)	0.47***; 198	0.98***; 88	0.41; 66	0.21*; 165	0.41*; 110
East-Rhone (ER, 22)	0.80***; 396	0.91***; 176	0.43; 132	0.09; 330	0.39*; 220
Corsica (C, 16)	0.79***; 288	0.78***; 128	0.46; 96	0.10; 240	0.26; 160

En ce qui concerne les HAP, les coefficients de corrélation de Mantel entre les biofilms et les moules étaient plus élevés dans les écorégions ER ($r = 0,80$; $n = 396$) et C ($0,79$; 288) que dans l'écorégion Rhône-ouest ($0,47$; 198). Inversement, une corrélation plus importante a été observée pour les OCP dans l'écorégion Rhône-ouest ($r = 0,21$, $p < 0,05$, $n = 165$) par rapport à Rhône-est et la Corse. De légères différences ont été observées pour les PCB, qui étaient toujours fortement corrélés dans chaque écorégion pour les congénères non apparentés aux dioxines et les congénères apparentés aux dioxines, respectivement. Les concentrations de métaux(loïds) étaient positivement et significativement corrélées sur les côtes continentales, c'est-à-dire dans les écorégions Rhône-ouest et est, mais non significatives en Corse.

Individuellement, les valeurs de corrélation des HAP allaient de 0,00 pour le pyrène à 0,90 pour l'indénopyrène (Figure 6). Les HAP faiblement corrélés comprenaient le phénanthrène ($r = 0,14$), l'anthracène ($r = 0,02$), le pyrène et le dibenzo(a,l)pyrène ($r = 0,28$). Le benzo(c)fluorène ($r = 0,57$) et le 5-méthylchrysène ($r = 0,40$) étaient modérément corrélés. Les autres HAP présentaient des valeurs de corrélation élevées supérieures à 0,7, à savoir fluoranthène ($r = 0,71$), dibenzo(a,e)pyrène ($r = 0,76$), benzo(j)fluoranthène ($r = 0,77$), cyclopenta(c,d)pyrène ($r = 0,78$), benzo(a)anthracène ($r = 0,8$), benzo(a)pyrène ($r = 0,84$), le chrysène et le dibenz(a,h)anthracène ($r = 0,84$ pour les deux), le benzo(b)fluoranthène ($r = 0,87$), le benzo(k)fluoranthène ($r = 0,88$), le benzo(g,h,i)pérylène ($r = 0,88$) et l'indéno(1,2,3-cd)pyrène. Les corrélations pour les PCB allaient de $r = 0,31$ (congénère 123) à $r = 0,67$ (congénère 167). Trois congénères présentaient des valeurs de corrélation $< 0,5$ (PCB 123, 28 et 157). Onze congénères présentaient des valeurs de corrélation $> 0,5$, à savoir les PCB 52, 101, 105, 114, 118,

138, 153, 156, 167, 180 et 189. Plusieurs OCP n'ont montré aucune corrélation, à savoir, β -endosulfan ($r = -0,3$), dieldrine et p,p'-DDT ($r = -0,08$ pour les deux), o,p'-DDT ($r = -0,02$), hexachlorobenzène ($r = 0,03$), heptachlore époxyde cis ($r = 0,06$), γ -hexachlorocyclohexane et α -endosulfan ($r = 0,11$ pour les deux), α -hexachlorocyclohexane ($r = 0,15$), pentachlorobenzène ($r = 0,23$), heptachlor époxyde trans ($r = 0,24$) et endrine ($r = 0,29$). L'heptachlore, le p,p'-DDE et le p,p'-DDD étaient modérément corrélés ($r = 0,41, 0,48$ et $0,63$, respectivement).

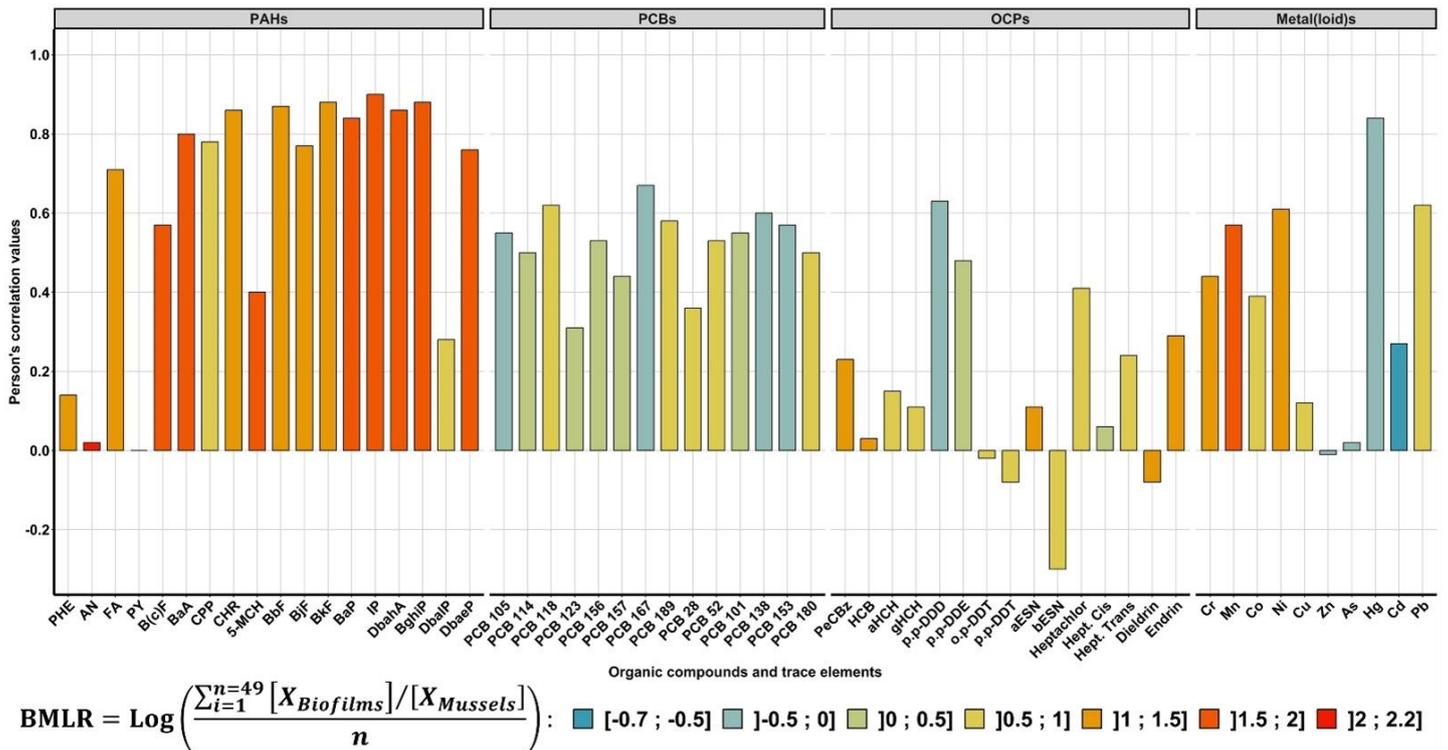


Figure 6 : Valeurs de corrélation de Pearson pour chaque composé organique, métal trace et métalloïde. Le code couleur obtenue après calcul du BMLR indique la matrice dans laquelle un composé ou un élément s'accumule de préférence : les barres bleues indiquent les éléments qui sont plus accumulés dans les moules que dans les biofilms, les barres rouges sont plus accumulées dans les biofilms que dans les moules.

En ce qui concerne les métaux traces et les métalloïdes, les valeurs de corrélation pour le Zn et l'As étaient $r = -0,01$ et $r = 0,02$. Le Cu était faiblement corrélé ($r = 0,12$) ainsi que le Cd ($r = 0,27$). Co, Cr et Mn étaient modérément corrélés ($r = 0,39, 0,44$ et $0,57$, respectivement). Ni, Pb et Hg étaient fortement corrélés ($r = 0,61, 0,62$ et $0,84$, respectivement).

Le cuivre est par ailleurs clairement mieux bioaccumulé par les biofilms que par les moules comme nous l'avons par ailleurs déjà montré (Djaoudi et al., 2022). De plus, certains OCPs semblent aussi mieux bioaccumulés que dans les moules. Enfin, dans les zones géographiques oligotrophes où les moules sont connues pour mal se développer et donc avoir des capacités d'accumulation réduites, les biofilms ont eux montré des capacités de développement et de bioaccumulation préservées.

II-5 Diversité et composition des communautés de diatomées dans les biofilms

Tous les échantillons ont pu être amplifiés et séquencés avec une profondeur de séquençage suffisante pour leur analyse.

II-5-I Alpha et beta-diversité des communautés de diatomées

On observe peu de différence significative de variation de richesse (indice Chao1) ou de diversité (indice de Shannon) au sein des communautés de diatomées dans les biofilms collectés quels que soient les sites (Annexe 4).

En termes de beta-diversité, la structure de la communauté de diatomées varie significativement entre les trois écorégions (PERMANOVA, $p < 0,0001$, Figures 7). Les stations de l'ouest du Rhône (chiffres bleus) forment un groupe distinct, séparé le long de l'axe 1 (25,8 % de la variation). Cela a mis en évidence des différences significatives dans la composition des communautés par rapport à celles du Rhône-Est (en vert) et de la Corse (en rouge). Les stations vertes et rouges se chevauchent dans une certaine mesure mais sont différenciées le long de l'axe 2 (11,8 % de la variation), ce qui suggère une variabilité de la composition des communautés au sein de ces écorégions également.

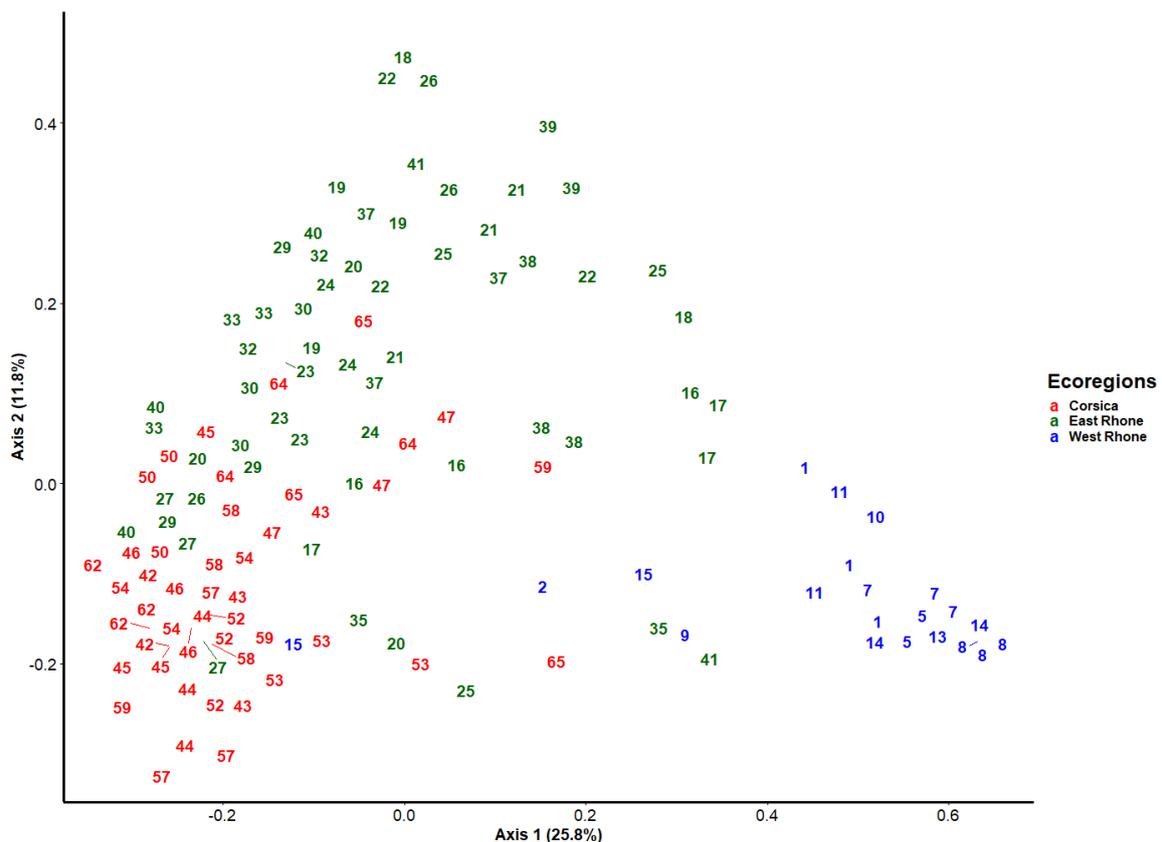


Figure 7 : Beta-diversité des communautés de diatomées des biofilms (49 sites incluant les réplicats représentés par le numéro de station) en utilisant une PCoA basée sur la distance de Bray-Curtis.

Aucune tendance claire n'a été identifiée en ce qui concerne le regroupement des stations au sein des écorégions. Par la suite, des analyses multivariées de redondance, basée sur les distances de Bray-Curtis (dbRDA), et permettant d'évaluer le % d'explication des principaux paramètres environnementaux dans la structuration des communautés de diatomées des biofilms, ont été réalisées globalement et par éco-région (Figure 8A, B et C). Des sommes pondérées des familles de polluants organiques (PAHPI, PCBPI et OCPPI) et des métaux (TEPI), ont été utilisées quand le nombre de variables explicatives était trop important au regard du nombre de sites impliqués

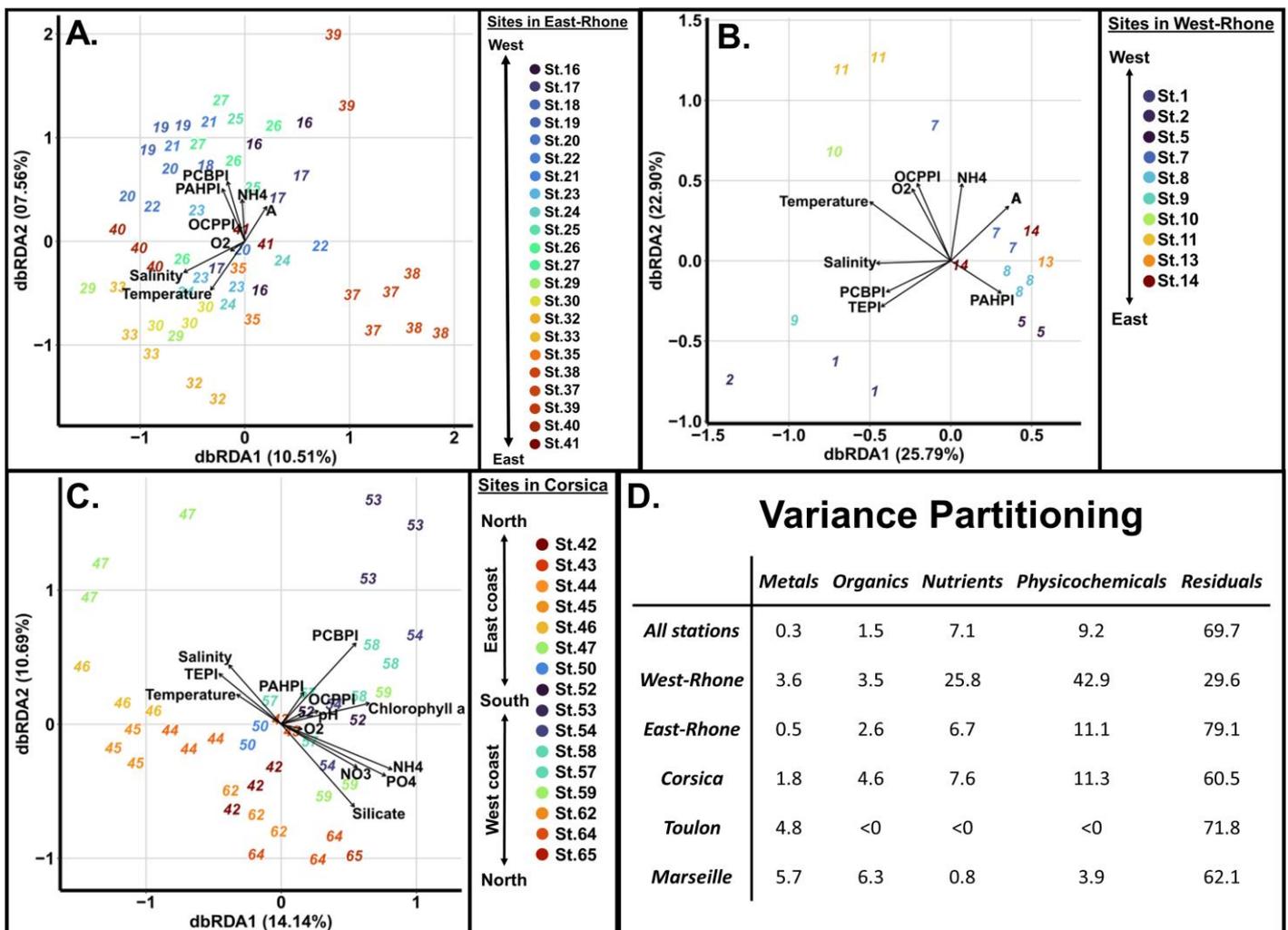


Figure 8 : Analyses de redondance (dbRDA) montrant les relations entre la composition des communautés de diatomées dans les biofilms et les principaux paramètres physico-chimiques, incluant les contaminants bioaccumulés par ces biofilms par éco-région (A : Rhône-Est, B : Rhône-ouest, C : Corse). Dans (A), le vecteur A rassemble PO₄, silicates, pH, NO₃ et chlorophylle a ; Dans (B), le vecteur A rassemble TEPI, NO₃, PO₄, pH, silicates et chlorophylle a. Le tableau indique le partitionnement de la variance par groupe de variables à différentes échelles spatiales (D).

Dans Rhône-Ouest, les deux premiers axes expliquent une variation cumulée de 48,68 % de la composition des communautés. La salinité (SAL), la température (TEMP) et l'oxygène (O₂) ont montré de fortes corrélations avec dbRDA1, entraînant une différenciation le long de l'axe horizontal. En revanche, les indices de pollution pour les HAP (PAHPI), les PCB (PCBPI) et les CCP (OCPPI) sont étroitement associés au dbRDA2 clairement moins explicatif. Le regroupement dans l'espace d'ordination suggère des distinctions claires dans la structure de la communauté de diatomées entre les sites WR. Les sites côtiers influencés par les polluants (par exemple, St.08, St.13) contrastent avec des sites plus propres ou différemment influencés (par exemple, St.01, St.09). Cela indique que les facteurs de stress environnementaux, en particulier les polluants et les niveaux de nutriments, sont des facteurs clés de la différenciation des communautés.

Dans l'écorégion Est-Rhône, dbRDA1 et dbRDA2 représentent 18,07 % de la variation de la composition des communautés, soit 2,7 fois moins que pour Rhône-ouest. Comme pour ce dernier, la salinité (SAL), la température (TEMP) et l'oxygène (O₂) sont regroupés et étroitement associés à dbRDA1, ce qui indique leur rôle dans la structuration des communautés de diatomées le long de l'axe primaire. Inversement, les indices de pollution tels que le PAHPI, le PCBPI et le OCPPI présentent une forte relation avec dbRDA2, soulignant leur influence dans le gradient secondaire de différenciation des communautés.

Dans l'écorégion corse, dbRDA1 et dbRDA2 expliquent 24,78 % de la variation de la composition des communautés de diatomées. Bien que ces valeurs soient deux fois plus faibles que celles observées pour la région Ouest-Rhône, elles mettent en évidence des gradients environnementaux notables influençant les structures des communautés dans cette zone. Comme pour les deux autres éco-régions, la salinité (SAL) et la température (TEMP) sont positivement corrélées avec dbRDA1. Cependant, les silicates (SIL) et les nitrates (NO₃) sont également associés à dbRDA1. Les indices de pollution présentent toujours une relation plus forte avec dbRDA2. Le regroupement des sites révèle la présence de diverses communautés de diatomées dans cette région. Par exemple, les sites tels que St.47, St.53 et St.64 sont positionnés vers les extrêmes.

De plus, des analyses de partitionnement de variance ont permis de quantifier le rôle relatif de 4 groupes de variables dans cette structuration des communautés de diatomées : les paramètres physico-chimiques (température, salinité, saturation en oxygène, pH), les nutriments (phosphates, nitrates, ammonium, silicates), les contaminants métalliques à travers le calcul du TEPI (somme des concentrations normalisées) et les contaminants organiques via le calcul du OPI (Figure 8D). A l'échelle de la campagne, les communautés de diatomées des biofilms sont clairement plus influencées par les paramètres physico-chimiques et les nutriments que par les polluants. Bien que cela soit plus ou moins important suivant les éco-régions, si on réduit l'échelle géographique étudiée, on observe une

augmentation de l'effet des polluants sur la structuration de ces communautés de diatomées. A une échelle locale comme la région de Marseille ou Toulon, où les variations des paramètres physico-chimiques et des nutriments sont plus limitées, le rôle des polluants sur la composition des biofilms en diatomées semble encore plus important.

Nos données montrent donc que les facteurs physico-chimiques du milieu environnant influencent fortement les communautés de diatomées des biofilms, de la même façon que les communautés planctoniques (eg Malviya et al. 2016). Trois études récentes ont mis en évidence le rôle structurant des paramètres de l'eau de mer sur les communautés de diatomées des biofilms avec une approche de metabarcoding (Laroche et al., 2023, Védie et al., 2022, Barry-Martin et al, soumis), un résultat cohérent avec les observations antérieures basées sur la microscopie et sur des biofilms épilithiques plutôt en zone tropicale (Hillebrand et Sommer 2000, Chiu et al. 2005, Patil et Anil, 2005, Munda 2005, Mitbavkar et Anil 2008). Cependant, très peu d'étude ont étudié et démontré l'effet de polluants, exclusivement des métaux, sur les diatomées dans les biofilms (Belando et al. 2017, Djaoudi et al. 2022) et aucune relativement aux paramètres environnementaux, ce qui renforce l'originalité et l'importance de notre approche globale.

II-5-2 Composition des communautés de diatomées

Parmi les 193 espèces qui ont été identifiées après les étapes de nettoyage du pipeline bioinformatique (Figure 9), 167 (86,5 % de toutes les espèces ne représentant que 13.1% des séquences) ont été considérées comme « non core » (Figure 10), c'est-à-dire qu'elles avaient une abondance inférieure à 0,1 % et qu'elles n'étaient pas présentes dans au moins deux tiers des échantillons au sein d'un groupe. A l'opposé, 26 espèces (13,5 %) ont été identifiées comme appartenant à la « core community ». Deux espèces (1,0 % des taxons, 4,9 % des séquences) ont été partagées dans toutes les écorégions, *Nitzschia* sp. et *Cylindrotheca closterium*.

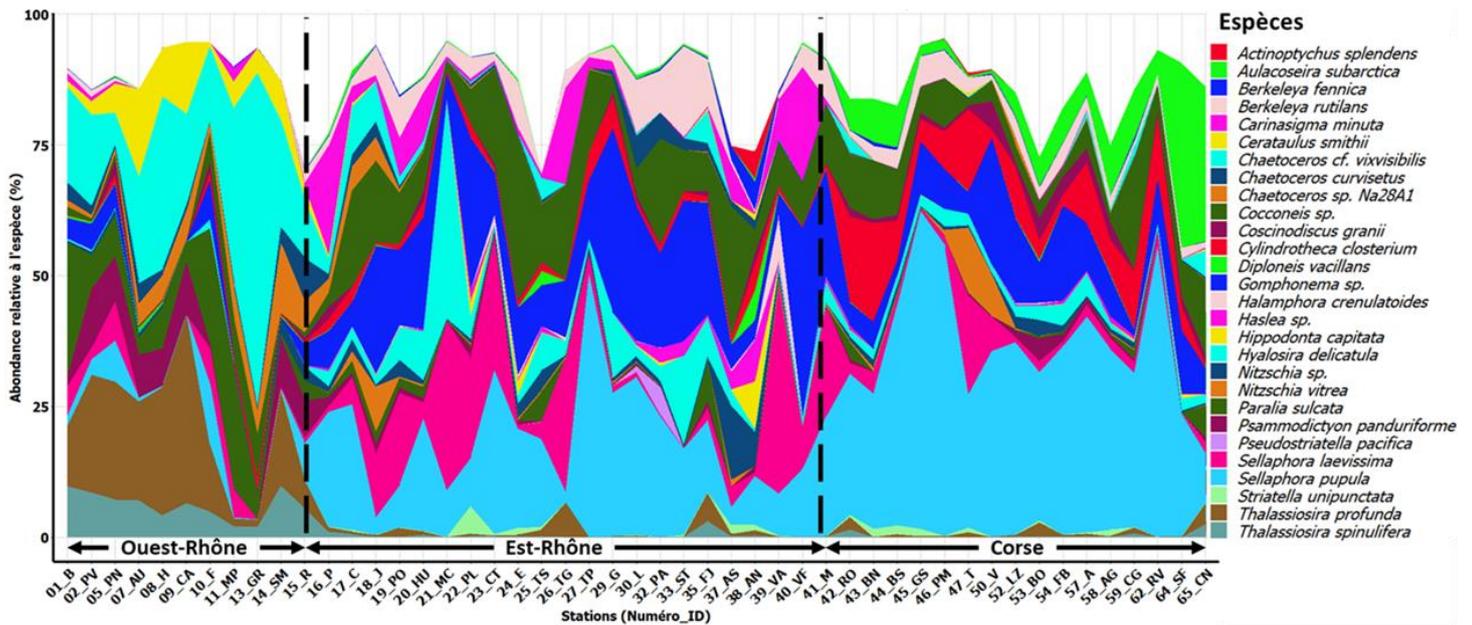


Figure 9 : Composition de la communauté de diatomées (espèces >5% dans au moins un site) dans les biofilms aux 49 localisations géographiques de la campagne SUCHIMED suite à l’amplification et au séquençage du gène *rbcl*.

Quelques espèces dominent particulièrement la région Rhône-Ouest (12 espèces, 6,2 %, 29,2 % des séquences) incluant *Chaetoceros cf. vixvisibilis* (4.5% des séquences) et *Thalassiosira profunda* (3.2 % des séquences), Corse (4 espèces, 2,1 %, 4,6 % des séquences) dont *Aulacoseira subartica* (4.3% des séquences) et Rhône-Est (1 espèce, *Carinasigma minuta*, 0,5 %, 1,9 % des séquences).

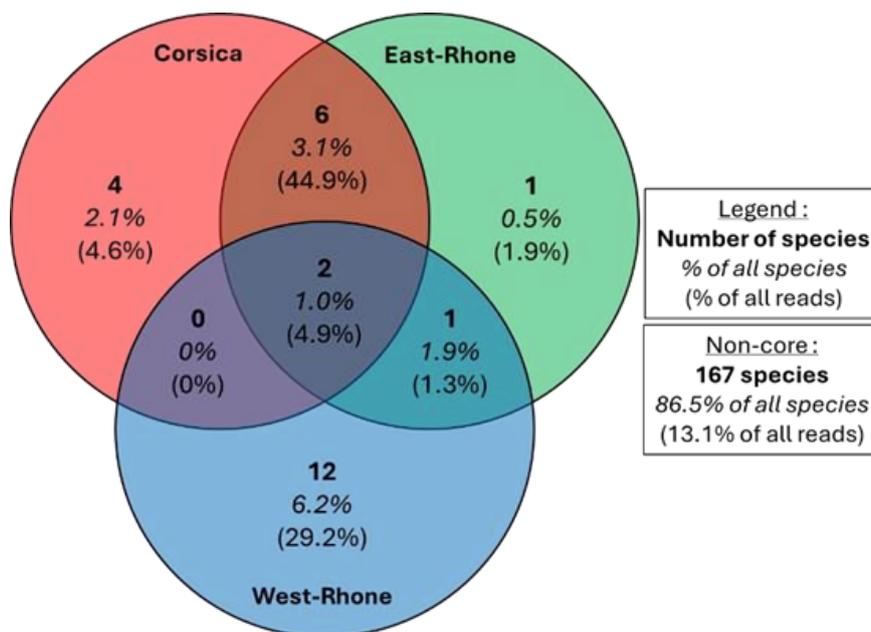
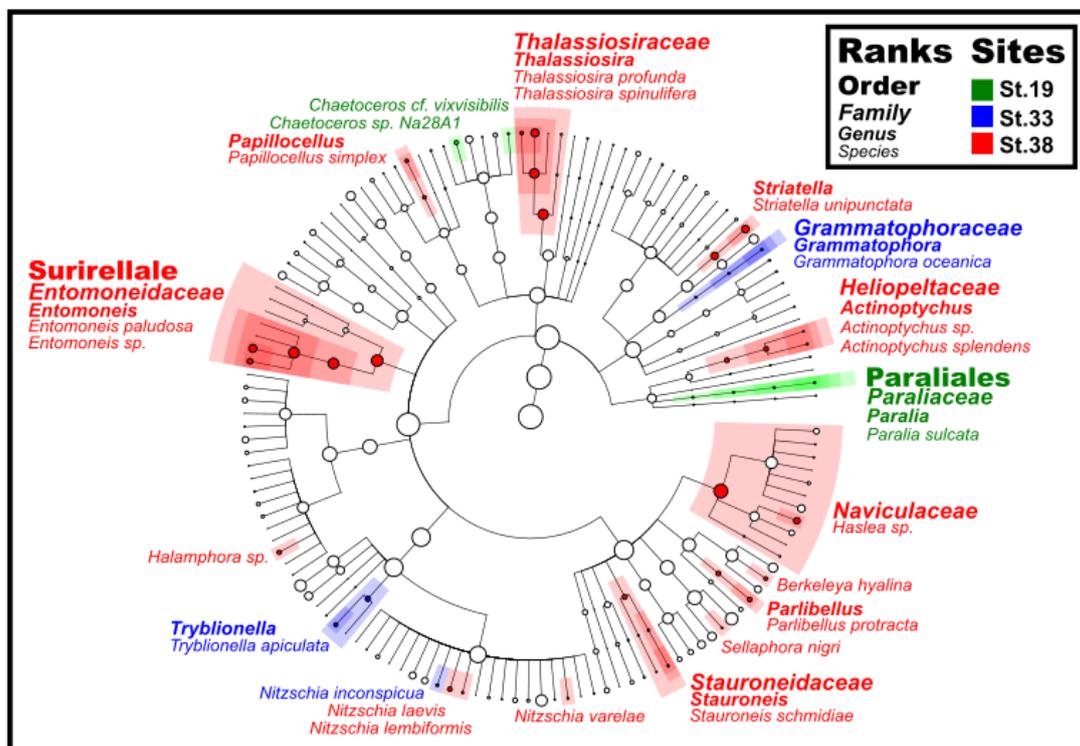


Figure 10 : « Core community » des diatomées des biofilms aux 49 localisations de la campagne SUCHIMED suite à l’amplification et au séquençage du gène *rbcl* (abondance > 0,1 % et présence dans au moins deux tiers des échantillons).

Par contre, les espèces dominantes sont partagées entre la Corse et le Rhône-Est sont au nombre de six (3,1%, 44,9% des séquences) : *Sellaphora pupula* (27.6% des séquences), *Gomphonema* sp. (14.1% des séquences), *Cocconeis* sp. (10.5% des séquences), *Sellaphora laevissima* (7.6% des séquences), *Hyalosira delicatula* (4.8% des séquences) et *Berkeleya rutilans* (4.3% des séquences).

II-5-3 Identification des taxons qui discriminent les sites présentant des profils de communautés et des paramètres abiotiques différents

Les analyses discriminantes de type LEfSe ont été effectuées à l'intérieur d'une éco-région, avec trois sites possédant des triplicats, et présentant des profils de contamination variés incluant un site peu pollué. Nous n'avons pas pu trouver ces éléments dans l'éco-région Rhône-ouest ce qui a restreint les analyses aux deux autres éco-régions. Il faut noter que ces analyses ne donnent pas d'information sur l'abondance relative des taxa mais uniquement sur des rapports d'abondance relative entre site. Pour les sites de l'île de Pomègues (19), Saint-Tropez (33) et Antibes Nord (38) dans l'écorégion Rhône-Est (Figure 11), des taxons différenciés pour les trois sites ont pu être mis en évidence.



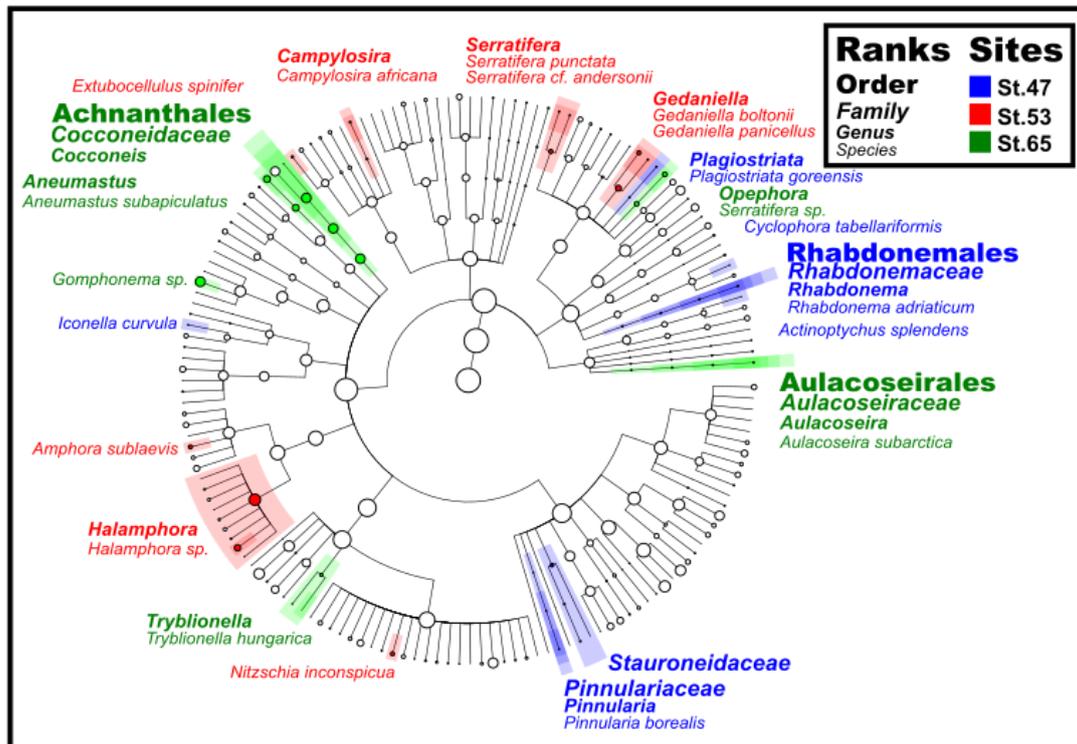


Figure 11 : Analyses discriminantes de type LefSe permettant d'identifier des taxa de diatomées spécifiques à des sites de la campagne SUCHIMED dans deux eco-régions (Est-Rhône et corse) (19 : Pomegues Island; 33 : Saint-Tropez; 38 : Antibes N; 47 : Tavignano RM; 53 : Bonifacio ; 65 : Canari)

Le site 19 multicontaminé montre un enrichissement de l'ordre des Paraliales. Le site 38 présente un plus grand nombre de taxons spécifiques (par exemple, l'ordre des Surirellales, les familles Thalassiosiraceae, Heliopeltaceae, Naviculaceae et Stauroneidaceae). Dans le site 33, peu contaminé, la famille des Grammatophoraceae est significativement plus abondante que dans les sites 19 et 38.

En corse, nous avons pu également mettre en évidence plusieurs taxa spécifiques aux trois sites mais plutôt aux genres ou à l'espèce. Le site 65 (Canari), qui présente un profil très spécifique de contamination en Nickel et Chrome, présente un enrichissement en *Aulacoseira subarctica*, qui y est de plus l'espèce la plus abondante, mais aussi en *Coconeis*, *Serratifera* sp., *Tryblionella hungarica*, *Gonphonema* sp. et *Aneumastus subapicalatus*. Les communautés du site multicontaminé de Bonifacio sont enrichies en taxa peu abondant comme *Extubocellulus spinifer*, *Amphora sublaevis*, *Halamphora* sp., *Nitzschia inconspicua*, *Campilosira africana*, deux espèces de *Gedaniella* et de *Serratifera*.

Dans la mesure où la sélection des communautés est d'abord due aux paramètres environnementaux, on ne retrouve pas clairement de taxa associés aux sites contaminés, ce qui s'explique probablement aussi par des profils de multi-contamination différents dans ces sites (Pomègues et Bonifacio par exemple).

II-6 Caractérisation biochimique des substances polymériques extracellulaires faiblement liées dans les biofilms

Les masses sèches de biofilm, qui varient entre 16,7mg et 3323,1mg avec 431,7+/-553,7mg en moyenne, étaient significativement plus élevées à l'Ouest du Rhône qu'à l'Est du Rhône et qu'en Corse (test de Krustall-Wallis, $p < 0.001$ et Wilcoxon, $p < 0.001$). Les masses d'EPS faiblement liées (LB-EPS) ne varient pas significativement entre les trois écorégions et allaient de 0,9mg à 78,0mg avec 19,0+/-14,2mg en moyenne. Cependant, le % de LB-EPS, exprimé par le ratio entre la masse de LB-EPS sur la masse de biofilm, était significativement plus faible à l'ouest du Rhône qu'à l'Est du Rhône et qu'en Corse (test de Krustall-Wallis, $p < 0.001$ et Wilcoxon, $p < 0.001$). Ce pourcentage varie entre 0,2% et 45,5% avec 7,7+/-5,9% en moyenne.

L'ordination de l'ACP, basée sur la composition des LB-EPS dans les biofilms (protéines, carbohydrates et acides uroniques), révèle des schémas distincts entre les sites d'échantillonnage (Figure 12).

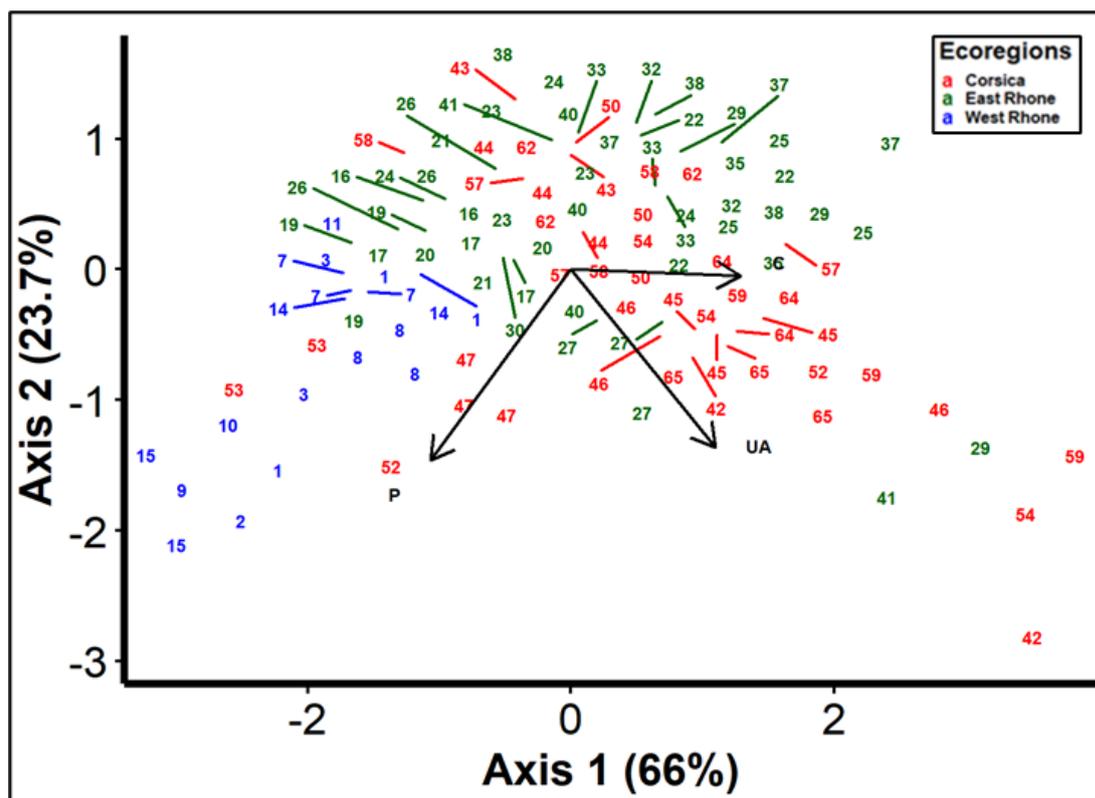


Figure 12 : ACP basée sur la composition globale des substances polymériques extracellulaires (EPS) (protéines-P, carbohydrates-C et acides uroniques-UA) dans les biofilms de la campagne SUCHIMED 2021

Les deux premières composantes principales (PC1 et PC2) expliquent une variance cumulée de 89,71 % (66,04 % pour PC1 et 23,67 % pour PC2).

La composition des EPS obtenue par les dosages globaux semblent influencée significativement par les écorégions (PERMANOVA, $p < 0.001$). Les sites dans l'écorégion du Rhône occidental (de st.01 à st.14) ont plutôt tendance à être associés à une teneur en protéines plus élevée que dans les écorégions du Rhône oriental et de la Corse. Inversement, les sites du Rhône oriental (de st.16 à st.41) et de la Corse (de st.42 à st.65) sont distribués le long de l'axe PC1, montrant des proportions plus élevées de carbohydrates et d'acides uroniques. Ces résultats sont plutôt cohérents avec la seule publication qui traite des EPS à partir d'échantillons de biofilms dans différentes conditions environnementales (Blanco et al. 2019).

Par ailleurs, des corrélations de Pearson entre les différents composants des EPS ainsi que les ratios protéines/carbohydrates et les concentrations en contaminants des biofilms ont été réalisées pour rechercher un lien entre adsorption des contaminants et production spécifique d'EPS par les biofilms en réponse (Figure 13).

Seul le rapport acide uronique/glucides (UA/C) était significativement mais faiblement corrélé avec les valeurs de TEPI ($r = 0,35$, $p < 0,001$, $n = 106$) et de PCBPI ($r = 0,38$, $p < 0,001$, $n = 106$). Il semble que ces analyses globales des protéines, carbohydrates ou acides uroniques ne permettent pas d'identifier assez spécifiquement la réponse éventuelle des biofilms à la présence en contaminants.

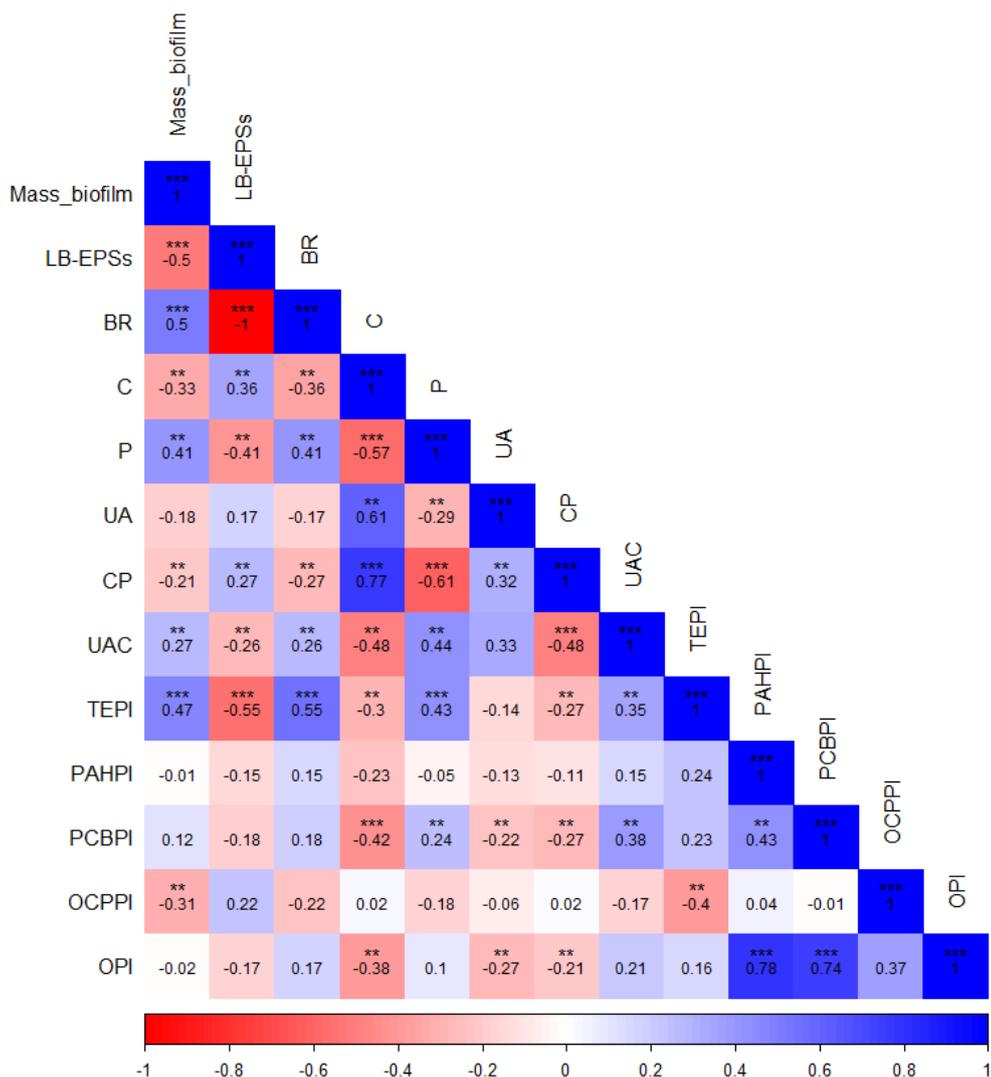


Figure 13 : Corrélation de Pearson entre différentes caractéristiques des EPS et les contaminants. Mass_biofilm (mg) ; LB-EPSs :% de la masse du biofilm résiduel sur la masse du biofilm; C : Concentration en glucides (en $\mu\text{g/L}$) ; P : Concentration en protéines (en $\mu\text{g/L}$) ; UA : Concentration en acides uroniques (en $\mu\text{g/L}$) ; UAC : rapport acide uronique/carbohydrates ; CP : rapport carbohydrates/protéines ; TEPI : Indice de pollution par les métaux ; PAHPI : Indice de pollution par les HAP ; PCBPI : Indice de pollution par les PCB ; OCPPI : Indice de pollution par les pesticides organochlorés ; OPI : Indice de pollution par les composés organiques. Les valeurs de corrélation sont comprises entre -1 (décorrélé) et 1 (corrélé). La signification de la corrélation est : pas d'étoile : $p > 0.05$, * : $p < 0.05$, ** : $p < 0.01$, *** : $p < 0.001$.

II-7 Approche de métabolomique pour la caractérisation des biofilms

Dernière-née des sciences « -omiques », la métabolomique a vocation d'établir, en un minimum d'étapes, une image exhaustive du profil métabolique d'un échantillon. Elle offre la possibilité d'obtenir une vue, aussi complète et précise que possible, de l'ensemble des métabolites d'un échantillon (molécules de petites tailles - faible masse moléculaire -, donc non polymériques), appelé métabolome. Le métabolome d'un échantillon biologique reflète l'état métabolique des organismes vivants en lien avec la spécificité de leur patrimoine génétique et de leur environnement. La

spectrométrie de masse couplée à la chromatographie en phase liquide (LC-MS) est la technique la plus communément utilisée pour une approche métabolomique globale (non-ciblée sur des métabolites en particulier) car elle présente l'avantage d'analyser un vaste pool de métabolites avec une sensibilité et une résolution élevée. Ce sont des milliers de signaux qui sont détectés et qui apportent une information sur le métabolome de l'échantillon biologique.

Parmi tous les sites d'échantillonnage, une sélection a été faite pour l'analyse des biofilms en métabolomique, avec pour critères de choix, des biofilms disponibles en triplicats pour un même site, une large répartition géographique avec la représentativité des régions classées en Ouest-Rhône, Est-Rhône et Corse, en plus d'un niveau de pollution caractéristique (Figure 13).

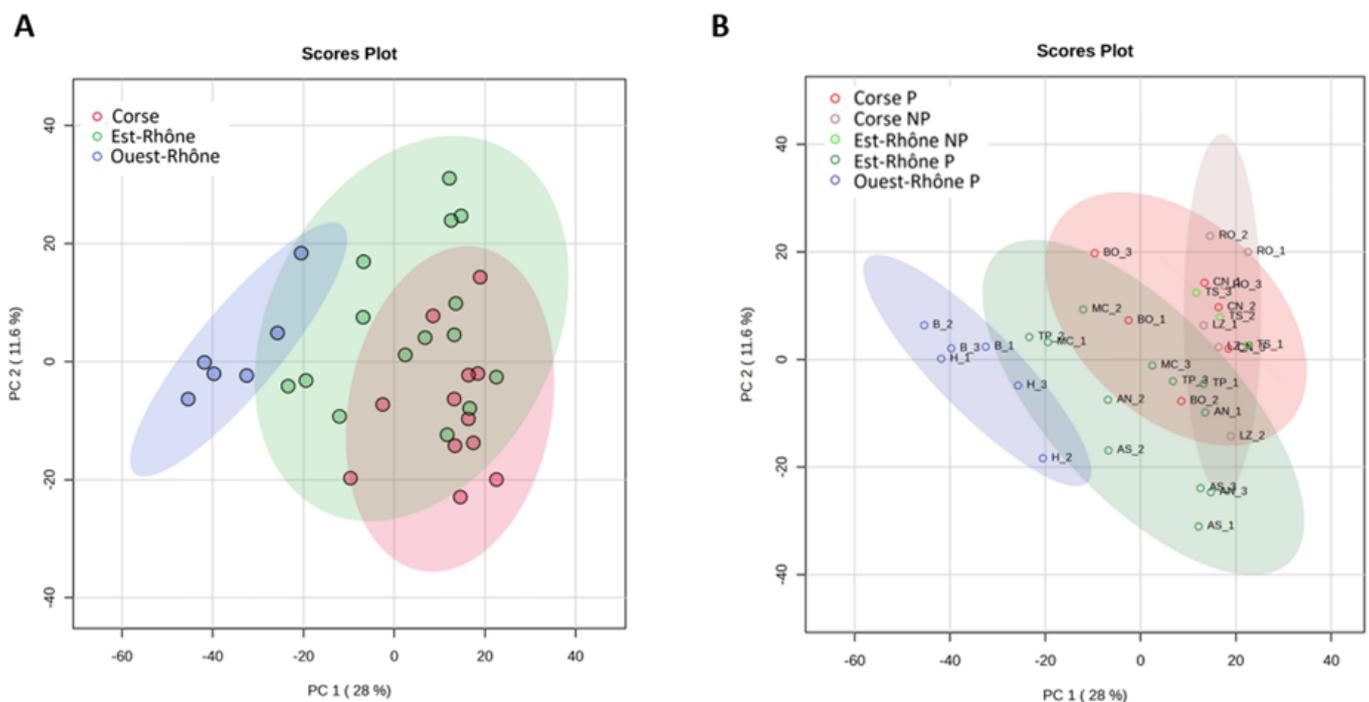


Figure 13: ACP des analyses métabolomiques d'une sélection de biofilms.

B - Banyuls (1); H - Herault RM (8); MC -Marseilles' Cortiou WTP (21); TS - Toulon's Sicié Cape WTP (25); TP - Toulon's small bay (27); AN - Antibes N (38);AS - Antibes S (37); RO - Rogliano (42);LZ - Lavezzi Isl. (52); BO - Bonifacio (53);CN – Canari (65)

A. Echantillons regroupés par éco-région. B. Distinction par éco-région et niveau de pollution (l'identification des sites est reportée sur cette figure) ; P : Pollué ; NP : Non Pollué.

Des analyses en composantes principales (ACP) des données quantitatives de métabolomique (chaque métabolite isolé étant quantifié relativement) ont permis de mettre en évidence des profils métabolomiques pouvant se distinguer selon de la région de collecte des biofilms (avec une discrimination sur l'axe 1 qui représente 28% de la variance ; Figures 10 A et B). Sur l'ACP (Figure 13A), la proximité/différence de composition des métabolomes suit la proximité/éloignement géographique des sites de récolte, allant ainsi de l'Ouest du Rhône à la Corse en passant par l'Est du Rhône, centré

sur l'ACP. Plus précisément, des échantillons de l'Ouest-Rhône ont des métabolomes soit totalement distincts et caractéristiques, soit proches d'échantillons de l'Est-Rhône (mais pas de la Corse). Et il en est de même pour des échantillons de Corse qui peuvent partager un profil métabolomique proche de biofilms récoltés à l'Est du Rhône mais pas à l'Ouest.

Si, à la distinction des éco-régions, on ajoute celle d'un niveau de pollution du site (avec un classement simplifié en site pollué (P) ou site moins/non pollué (NP) ; Figure 13B), les sites non pollués de l'Est du Rhône et de la Corse ressortent avec des profils métabolomiques proches mais la distinction entre sites pollués et non pollués, même au sein d'une même éco-région, n'est pas évidente.

L'identification de métabolites discriminants entre les sites contaminés et non-contaminés et, éventuellement, spécifiques à la réponse des biofilms à la présence de certains contaminants est nécessaire pour améliorer cette approche innovante par profils métaboliques.

III-CONCLUSIONS

Les résultats de la campagne SUCHIMED 2021 ont permis de clairement démontrer les éléments suivants :

- Des biofilms se sont développés sur des plaques A4 de polyéthylène après trois mois d'immersion sur les 49 sites côtiers le long des côtes méditerranéennes françaises incluant la Corse, avec une biomasse suffisante pour (i) des analyses quantitatives des métaux et des contaminants organiques, (ii) disposer d'une quantité d'ADN suffisante pour l'amplification du gène *rbcl* permettant, après séquençage, l'identification des diatomées, (iii) disposer d'une quantité suffisante d'EPS pour leur caractérisation biochimique globale, et (iv) une bonne répétabilité des triplicats.

- L'ensemble des contaminants métalliques (40 par ICP-MS) et organiques (environ 60 incluant HAP, PCB dioxines like et non-dioxines like, OCPs) recherchés ont pu être détectés et très souvent quantifiés dans les biofilms, démontrant la capacité de ces biofilms à bioaccumuler les contaminants de façon différentielle en fonction des sites.

- La comparaison des profils de bioaccumulation des biofilms et des moules, utilisés comme référence, a montré de très bonnes corrélations pour les HAP, les PCB et certains OCPs et métaux. D'autres métaux critiques comme le cuivre sont clairement mieux bioaccumulés par les biofilms comme nous l'avons par ailleurs déjà montré (Djaoudi et al., 2022). De plus, certains OCPs semblent aussi mieux bioaccumulés que dans les moules. Enfin, dans les zones géographiques oligotrophes où les moules sont connues pour mal se développer et donc avoir des capacités d'accumulation réduites, les biofilms ont eux montré des capacités de développement et de bioaccumulation préservées.

- La structure des communautés de diatomées des biofilms (beta-diversité) est clairement influencée à la fois par les paramètres physico-chimiques, les nutriments et les polluants. A l'échelle de la campagne, les deux premiers groupes de variables semblent plus importantes que les polluants. Cependant, si on réduit l'échelle géographique étudiée, on observe une augmentation de l'effet des polluants sur la structuration de ces communautés de diatomées. A une échelle locale, comme la région de Marseille ou Toulon où les variations des paramètres physico-chimiques et des nutriments sont plus limitées, l'impact relatif des polluants semble devenir plus important sur les abondances relatives des taxa de diatomées dans les biofilms.
- On observe peu ou pas d'effet des polluants sur l'alpha-diversité des biofilms. Un faible nombre d'espèces (≤ 5) dominant la composition des communautés, complétées par plusieurs dizaines de taxa peu abondants ou rares. La présence de polluants modifie principalement l'abondance relative des taxa présents dans un site et on n'arrive donc pas à identifier réellement de taxa bioindicateur de polluant ni à l'échelle de la campagne, ni à celle des éco-régions, à l'exception peut-être d'*Aulacoseira subarctica* en Corse. La multiplicité des facteurs de contrôle de ces communautés de diatomées, qui ne présentent apparemment pas de hiérarchie forte entre eux, rend complexe les interprétations.
- Les analyses de composition des matrices EPS telles qu'elles ont été réalisées ne permettent pas de dégager de réelle tendance. Les réponses des biofilms à la présence de polluants en termes de production d'EPS, qui ont été décrites en laboratoire mais plutôt sur des souches isolées de bactéries dans la littérature, peuvent nécessiter une caractérisation plus fine de la nature des EPS.
- Les approches par profils métaboliques semblent indiquer des patterns similaires à ceux des communautés, sans discrimination évidente des sites pollués. Ces résultats de métabolomiques nécessitent surtout une identification des métabolites pour une meilleure interprétation.

PARTIE II : ETUDE EN MESOCOSMES SUR LE PHENANTHRENE

L'état des lieux global de la contamination en HAP dans l'environnement marin côtier reste complexe du fait des différences entre les études liées à la méthode (i.e. techniques de mesures utilisées, matrices analysées : colonne d'eau, phase dissoute ou particulaire, sédiment, biote). Les HAP sont des composés persistants et hydrophobes, ils sont majoritairement retrouvés adsorbés sur les particules à des niveaux très élevés dans les sédiments et moins importants dans la colonne d'eau. De plus l'occurrence varie de manière temporelle en fonction des saisons (Bancon-Montigny et al., 2019; Patel et al., 2020). Bien que certaines concentrations mesurées étaient relativement élevées, depuis le début des campagnes en 2003, aucune hausse significative des niveaux de contamination des sites côtiers n'a été mesurée et certaines tendances sont même plutôt à une baisse significative (Bouchoucha et al., 2021; Briand et al., 2023).

Lors de SUCHIMED 2021, 18 HAP ont été retrouvés de manière assez hétérogène le long des côtes méditerranéennes françaises, variant suivant la matrice (moule ou biofilm) (Figure 14). Les concentrations mesurées dans les moules variaient de 1.44 ng.g-1 de poids sec (ps) à Cargèse en Corse jusqu'à 60,4 ng.g-1 ps dans la petite rade de Toulon. Pour les BF la somme variait de 6,2 à 1033 ng.g-1 ps respectivement à Porto Vecchio et Toulon Petite Rade. Dans les biofilms, les HAP ont été retrouvés à des concentrations élevées à proximité des embouchures des fleuves ou grands centres urbains et industriels, dont Toulon (Briand et al., 2023, Barre et al., 2024).

Le Phénanthrène a été identifié comme un des HAP majeurs et fréquents qui présentaient l'avantage d'avoir une solubilité plus élevée en milieu aqueux en raison de sa structure à trois cycles aromatiques par rapport à nombre de ses congénères. Ceci devait garantir une solubilisation à concentration « élevée » pour assurer la biodisponibilité du polluant au cours de l'exposition en mésocosmes.

L'objectif de cette approche expérimentale en laboratoire était de déterminer spécifiquement l'effet d'un hydrocarbure aromatique polycyclique (HAP), le phénanthrène, sur la diversité, la structure et la composition des communautés de procaryotes et de diatomées de biofilms issus de deux sites contrastés en termes de pression anthropique (Cap Sicié et la petite rade de Toulon), et ce en milieu contrôlé en mésocosmes.

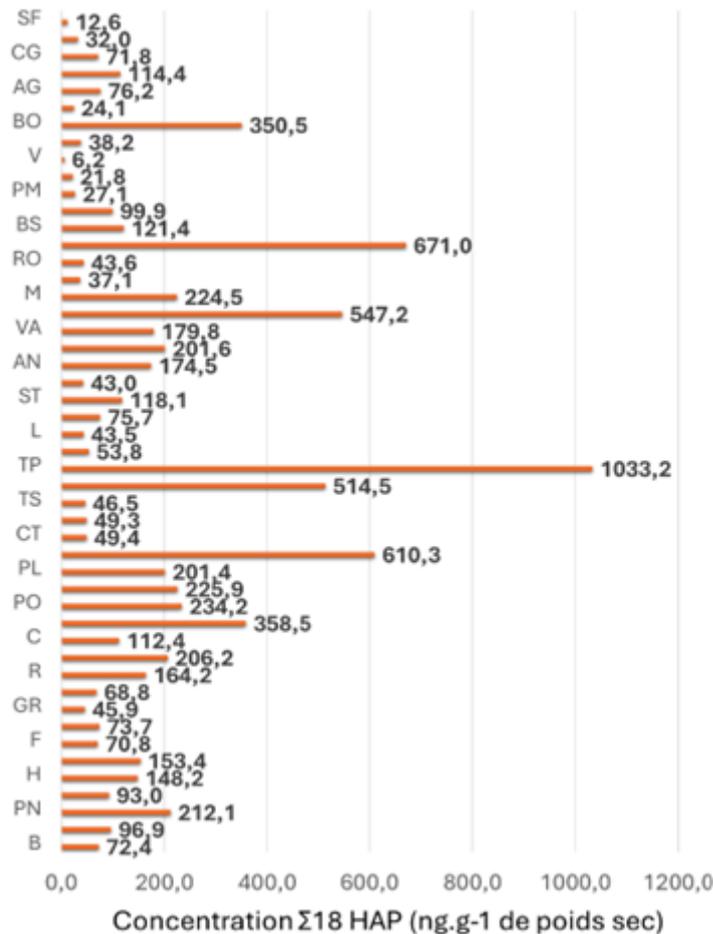


Figure 14 : Evolution de la concentration de la Σ18 HAP le long du littoral français de Banyuls jusqu'en Corse mesurée dans la matrice biofilms (SUCHIMED 2021).

I-MATERIELS ET METHODES

I.1. Sites d'étude et immersion

Deux sites côtiers contrastés en termes de pression anthropique, et notamment de concentration totale en HAP, ont été choisis pour former les BF naturels avant exposition en mésocosmes. Le premier site dit de référence puisque « non contaminé » en HAP, est localisé au niveau du Cap Sicié (CS) (Figure 15). Il est ouvert sur la mer Méditerranée et situé entre Six-Fours et La Seyne-sur-Mer (43.1052281, 5.8854795). Le deuxième site se situe dans la Petite Rade (PR) de Toulon (43.105208, 5.885463) qui est une baie semi-fermée très anthropisée (Port militaire et de commerce). De plus, les conditions environnementales sont très similaires sauf l'hydrodynamisme ou les nutriments.

Pour chaque site, durant la période de février à mars, des BF ont été formés en immergeant 4 plaques en polyéthylène de 10x15 cm à environ 4 m de profondeur du 22/02/2024 au 20/03/2024 pour le site PR et du 15/03/2024 au 04/04/2023 pour CS (Figure 15). Pour PR, les plaques ont été immergées en

les attachant à une corde lestée, elle-même attachée par le haut sur un ponton statique et permanent. Dans le cas de CS, les plaques ont été attachées à une ligne permanente accrochée au fond remontant à la surface grâce à des bouées.

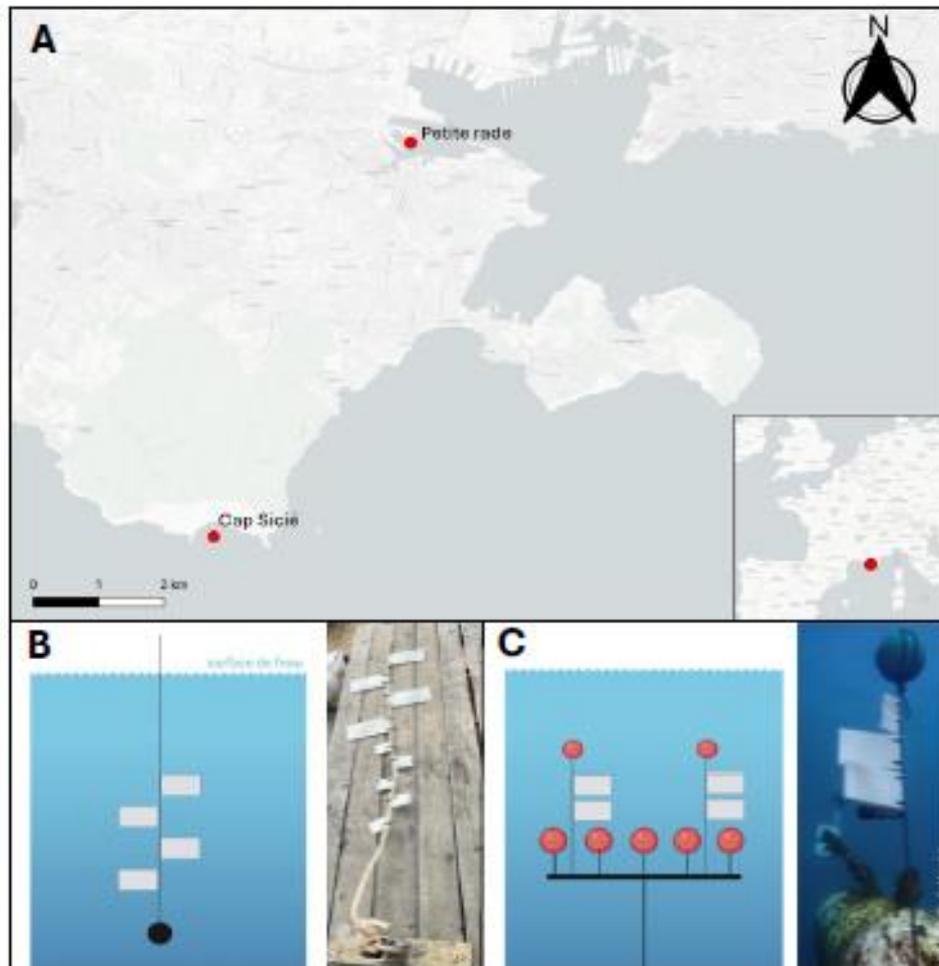


Figure 15 : Localisation (A) et dispositifs d'immersion des plaques dans la petite rade de Toulon (B) et à Cap Sicié (C)

I-2-Dispositifs expérimentaux

I-2-1 Récupération des plaques et mise en place des mésocosmes

Deux séries de mésocosmes ont été réalisées, une pour chaque site. Après chaque immersion, les plaques ont été récupérées et transportées jusqu'au laboratoire dans une glacière remplie d'eau prélevée in situ. Ensuite, les plaques ont été transférées de manière individuelle chacune dans un aquarium de 10L. Les aquariums étaient remplis d'eau de mer prélevée in situ, filtrée à 90 μm afin d'éviter le broutage du biofilm et oxygénée grâce à un bulleur permettant en plus une agitation du milieu. Chaque mésocosme a reçu un ajout différent en PHE. Durant 9 jours, les mésocosmes ont été

placés dans un phytotron, incubateur permettant de maintenir des conditions environnementales retrouvées in situ : température de 16°C, avec un cycle jour/nuit 11:13h (Figure 16).



Figure 16 : Les 4 mésocosmes (contrôle + 3 concentrations de phénanthrène ajoutées) correspondant à l'expérience avec des biofilms issus de la petite rade de Toulon dans le phytotron

I-2-2 Contamination en phénanthrène des mésocosmes

Une solution mère à 1 mg/L a été préparée en dissolvant du PHE à 97 % sous forme de poudre (Thermo Scientific Chemical) dans un mélange d'eau osmosée et de DMSO à 0,05 % (p/v). Pour chacune des 2 expériences, 4 concentrations de PHE ont été ajoutées chacune dans un mésocosme : 0 ng.L⁻¹ (aquarium n°1, 0 ng.L⁻¹), 10 ng.L⁻¹ (mésocosme n°2), 100 ng.L⁻¹ (mésocosme n°3), 500 ng.L⁻¹ (mésocosme n°4).

I-3 Diversité et composition taxonomique des biofilms par metabarcoding

I-3-1 Extraction de l'ADN et amplification par PCR

Pour chaque plaque, 3 répliques ont été réalisées soit 12 échantillons de biofilm par site. Chaque réplique a été échantillonnée en grattant à l'aide d'un scalpel stérile une surface de 5x5 cm de BF puis stocké à

4°C. L'ADN a été extrait à l'aide du kit DNeasy PowerBiofilm (Qiagen) conformément aux instructions du fabricant puis stocké à -80°C. Un contrôle négatif a été inclus dans le protocole d'extraction. La quantité et la qualité de l'ADN ont été mesurées à l'aide du spectrophotomètre NanoDrop 1000 (ThermoScientific).

Deux marqueurs génétiques ont été sélectionnés et amplifiés par PCR, le gène *rbcl* pour cibler les diatomées et les régions V4-V5 du gène de l'ARNr 16S pour cibler les procaryotes. Pour le gène *rbcl* un mélange de trois amorces sens "AGGTGAAGTAAAAGGTTCTACTTAAA", "AGGTGAAGTAAAAGGTTCTAYTTAAA", "AGGTGAACTAAAGGTTCTACTTAAA") et deux anti-sens ("CCTTCTAATTTACWACWACTG", "CCTTCTAATTTACWACAACAG" ont été utilisées (Vasselon et al., 2017). Chaque réaction PCR (50µL) a été réalisée avec cycles PCR suivant : dénaturation initiale à 95 °C pendant 15 min, 40 cycles de dénaturation à 95 °C pendant 45 s, à 50 °C pendant 45 s, suivi d'une élongation à 72 °C pendant 45 s. L'élongation finale a été réalisée à 72 °C pendant 5 min. Pour l'ARNr 16S les amorces sens 515F-Y (5'-GTGYCAGCMGCCGCGGTAA) et anti-sens 926R (5'-CCGYCAATTYMTTTRAGTTT) ont été choisies (Parada et al., 2016). Chaque réaction PCR (50µL) a été réalisée comme suit : dénaturation initiale à 95 °C pendant 5 min, 30 cycles de dénaturation à 95 °C pendant 45 s, l'hybridation à 50 °C pendant 1 min, suivi d'une élongation à 72 °C pendant 1 min. L'extension finale a été réalisée à 72 °C pendant 10 min. À chaque fois les contrôles négatifs ont été réalisés en utilisant le mélange réactionnel PCR sans ADN (à la place de l'eau sans nucléase). Après amplification, les produits de PCR ont été confirmés par électrophorèse sur gel d'agarose 2X puis envoyés à Eurofins pour un séquençage Illumina Miseq (2x300bp).

I-3-2 Analyses bioinformatique des données de séquençage

A partir du jeu de séquences obtenu, les amorces ont été retirées avec le logiciel cutadapt version 4.8. Ensuite, avec DADA2 (Callahan et al., 2016), les lectures ont été filtrées, dérépliquées, assemblées et les chimères ont été retirées avec la technique De novo, puis une table d'ASV a été construite. Les séquences artéfactuelles ont été retirées par une étape de filtration où seuls les ASVs représentant au moins 0,0005% des séquences sont conservés (Bokulich et al., 2013). L'affiliation taxonomique des ASV a été réalisée à l'aide de FROGS v.4.1 (Find Rapid OTU with Galaxy Solution). Les ASVs des procaryotes et des diatomées ont été assignées en utilisant la base de données SILVA 138.1 et *rbcl* diatbarcode 11.1, respectivement. Les ASV qui étaient non affiliés ou affiliés comme chloroplastes ou mitochondries ont été supprimées de l'ensemble de données pour les gènes de l'ARNr 16S.

I-3-3 Analyses statistiques

Les analyses statistiques relatives au séquençage des deux cibles ont été effectuées avec le package R Phyloseq version 1.48.0. Les échantillons ont été raréfiés à la profondeur de lecture la plus petite (Annexe 1). L'alpha diversité a été calculée en se basant sur deux indices : Chao1 et Shannon. Les effets

des sites et des traitements d'exposition aux HAP ont été testés par une analyse de la variance (ANOVA) si les données suivaient une loi normale ou dans le cas contraire un test non paramétrique de Kruskal-Wallis. Suivie de tests post-hoc Tukey dans le cas de l'ANOVA et de test de Dunn dans le cas du test Kruskal-Wallis. La diversité bêta a été représentée avec des analyses en coordonnées principales (PCoA) basées sur des matrices de distance de Bray-Curtis et pondérée Unifrac. Afin de vérifier la significativité des dissimilarités de ces deux distances, des analyses de variance permutées (PERMANOVA) avec comme facteur le site et/ou les traitements HAP ont été réalisées, suivies de comparaisons par paires.

II-RESULTATS ET DISCUSSION

II-1 Diversité alpha

Pour les procaryotes, l'alpha diversité était significativement différente entre les deux sites pour l'indice de richesse Chao1 (Kruskal-Wallis, $p < 0,0001$) et l'indice de diversité de Shannon (Kruskal-Wallis, $p < 0,0001$), avec des valeurs significativement plus importantes pour le site PR (Figure 17). Cependant, entre les différents traitements HAP d'un même site, aucune différence significative n'a été observée (Kruskal-Wallis : Chao1 $p > 0,05$ et Shannon : $p > 0,05$).

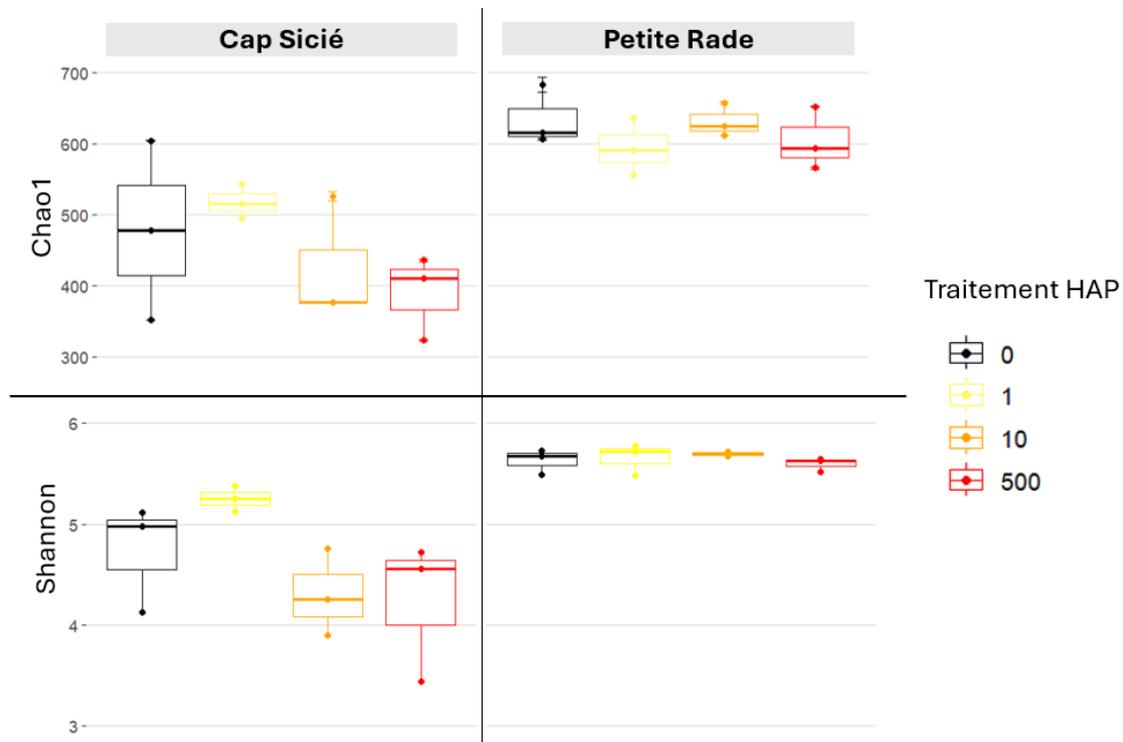


Figure 17 : Boxplots des indices de diversité alpha Chao1 et Shannon au niveau ASV, obtenus à partir du gène de l'ARNr 16S pour chaque traitement d'HAP des deux sites Petite Rade (PR) et Cap Sicié (CP). La ligne dans chaque boîte à moustache indique la médiane, la boîte délimite les 25e et 75e centiles et la moustache correspond à la plage complète

Pour les diatomées (Figure 18), seul le site de la petite rade (PR) a donné des résultats exploitables. l'indice Chao1 est similaire entre les traitements (ANOVA, $p > 0,05$). Cependant, pour l'indice de Shannon, il y a une variation de la diversité entre les traitements HAP qui est significative (ANOVA, $p = 0,03$) mais seulement entre le contrôle (HAP 0) et HAP 1 (Tukey, $p < 0,05$).

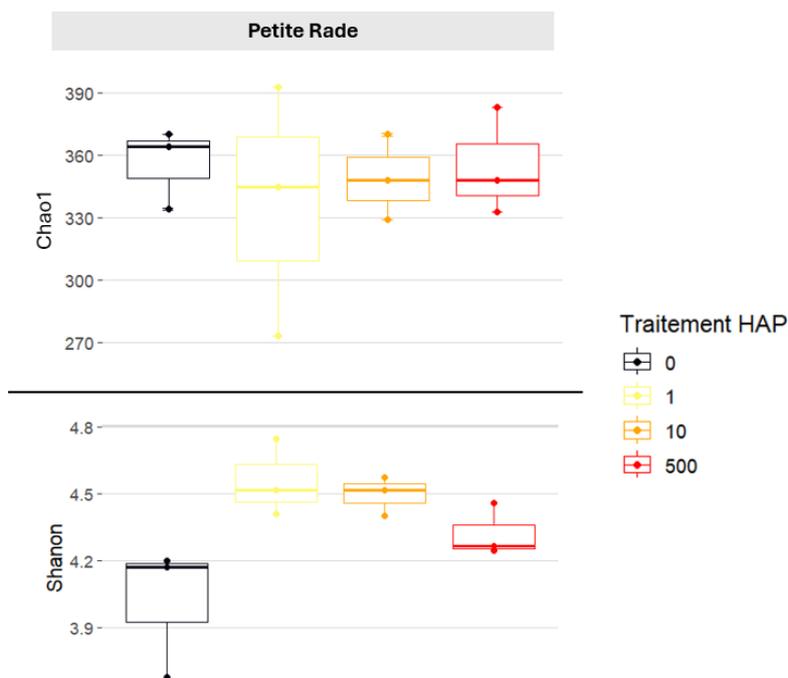


Figure 18. Boxplots des indices de diversité alpha Chao1 et Shannon au niveau ASV obtenue à partir du gène RbcL pour chaque traitement HAP du site Petite Rade (PR)

II-2 Diversité bêta

Pour les procaryotes, les PCoA basées sur les distances Unifrac pondérées (tiennent compte des abondances relatives et des relations phylogénétiques, Figure 19A) mettent en évidence une différence significative entre les structures de communautés des sites CS et PR. L'axe 1 capture 71% de la variabilité en séparant clairement CS et PR et met en évidence la dissimilarité des communautés entre les sites qui sont significatives (PERMANOVA $p < 0,001$) confirmé par le test post hoc ($p < 0,001$). L'axe 2 capture 17% de la variabilité mettant en évidence une dissimilarité des communautés par rapport aux conditions d'exposition HAP. (PERMANOVA, $p < 0,01$). Visuellement, un gradient apparait avec l'augmentation des concentrations d'exposition au PHE pour le site CS uniquement. Cependant, les tests post hoc n'ont montré aucune différence significative entre paires de groupes (PERMANOVA comparaisons multiples paires, $p > 0,05$), probablement en raison d'une grande variabilité au sein des réplicats.

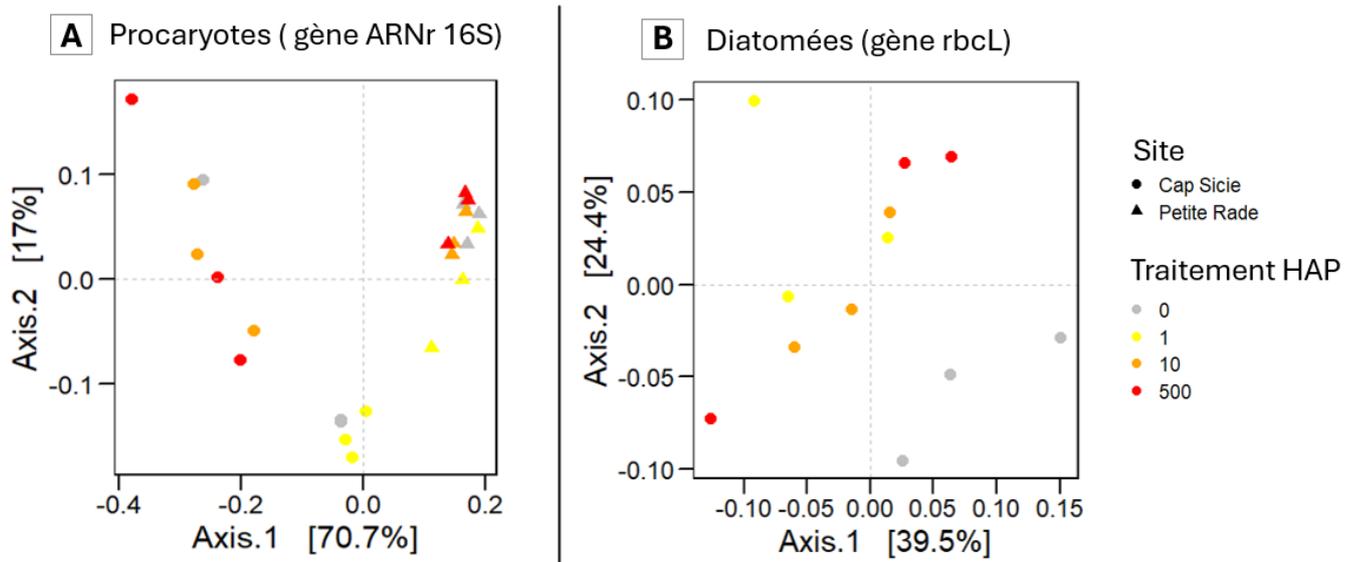


Figure 19 : Analyses en Coordonnées Principales de la beta-diversité des communautés des biofilms des différents sites (formes) et des différents traitements d'exposition aux HAP (couleurs). Distance Unifrac pondérée des communautés de procaryotes (A) et de diatomées (B)

Pour les communautés de diatomées, la PcoA basée sur la distance Unifrac pondérée capture au total 63% de la variabilité (Figure 19B). Des dissimilarités significatives ont été mesurées entre les traitements (PERMANOVA, $p < 0.001$) mais le test post hoc de la PERMANOVA n'indique cependant, de nouveau, pas de différence entre les groupes (PERMANOVA comparaisons multiples paires, $p > 0.05$).

II-3 Composition des communautés

La figure 20 représente les 10 familles les plus abondantes des communautés procaryotes de biofilm pour les sites CS et PR. Quel que soit le site, les communautés sont dominées par trois familles : Flavobacteriaceae, Hypomonadaceae et Rhodobacteraceae. La famille Flavobacteriaceae représente 33 à 48 % pour PR, contre 6 à 29 % pour CS. La famille des Hypomonadaceae représente à PR 9 à 16 % contre 11 à 28% pour CS. Enfin, les Rhodobacteraceae correspondent à 17 à 25 % à PR contre 6 à 29 % à CS.

Pour le site PR, l'abondance de ces 10 familles est similaire entre les traitements. En revanche, pour CS, l'abondance varie de manière plus importante entre les traitements mais aussi au sein d'un même traitement. Pour la composition de la condition contrôle (HAP 0), le troisième réplica (CS_0_3) diverge totalement des deux autres et s'apparente à un HAP 10 ou 500. La composition varie entre les conditions contrôle et HAP 1 par rapport à HAP 10 et 500. On observe principalement l'augmentation importante de la famille Pseudoalteromonadaceae, passant pour HAP 0 et 1 de 1 à 2 % contre 17 à 51 % pour HAP 10 ou 500 (sans prendre en compte CS_0_3). Parallèlement, une diminution des

Rhodobacteraceae est aussi notable, de 26 à 29% pour HAP 0 et 1 à 6 à 13% pour HAP 10 et 500 (sans CS_0_3). Il y a aussi une diminution des Saprospiraceae passant de 5% à 10% pour HAP 0 et 1 contre 0,5% à 2% pour les HAP 10 et 500

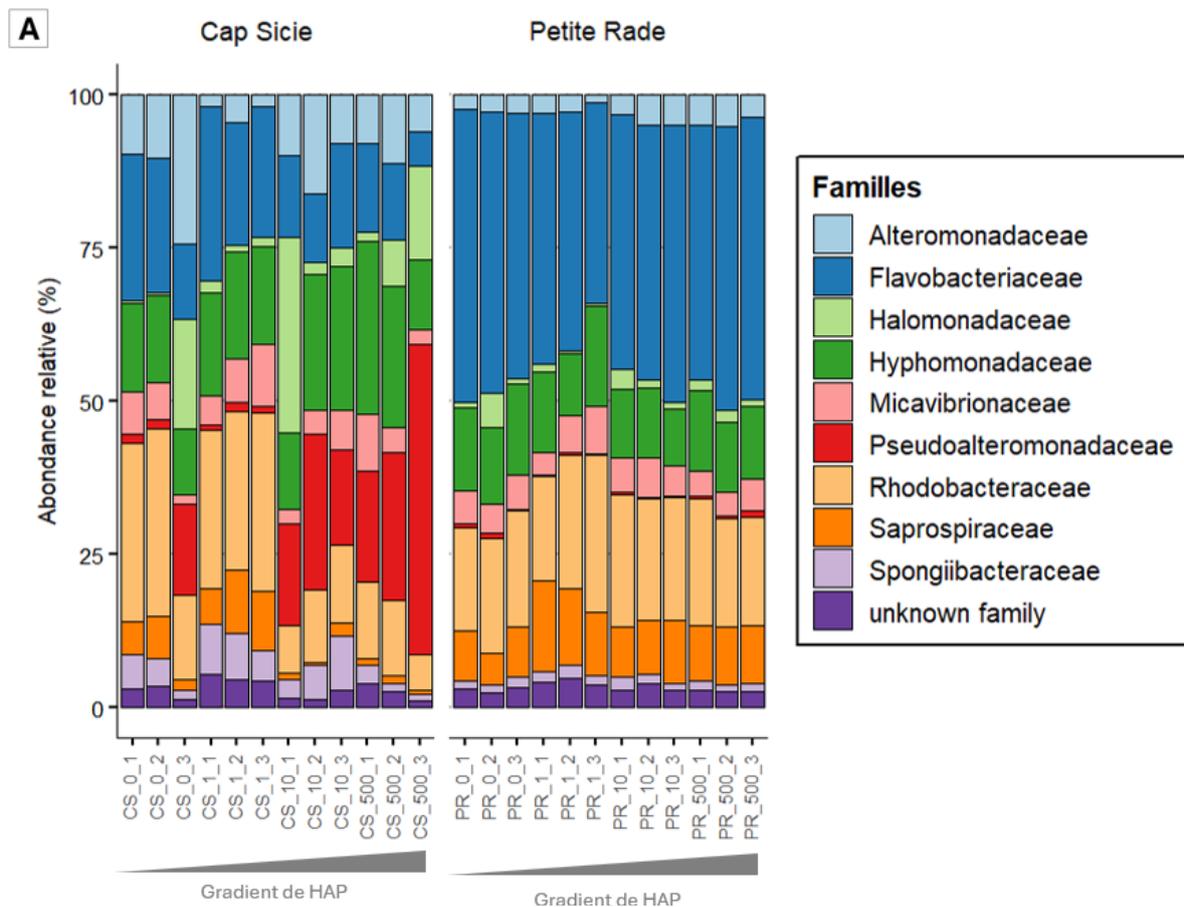


Figure 20 : Composition des 10 rangs taxonomiques les plus abondants des communautés de biofilms pour chaque échantillon des différents sites au rang de la famille pour les procaryotes

Pour les communautés de diatomées de la Petite Rade (Figure 21), les espèces les plus abondantes sont *Thalassosira profunda* (12 à 29%), *Psammodictyon panduriforme var continuum* (20 à 39%) et *Nitzschia* sp. (5 à 26%). Une augmentation de l'abondance relative de deux espèces pour les deux traitements les plus importants est visible : *Entomoneis paludosa* et *Berkeleya hyalina*. Pour *Entomoneis paludosa*, entre faible concentration (HAP 0 et 1) et forte concentration (HAP 10 et 500), l'abondance était de 1 à 5% contre 5 à 10% respectivement. Pour *Berkeleya hyalina*, l'abondance passe de 0,5 à 3% pour les traitements HAP 0 et 1 contre 0,5 à 31% pour HAP 10 et 500, particulièrement pour un des répliques de HAP 500. On observe en parallèle une diminution de *Nitzschia cf longissima*.

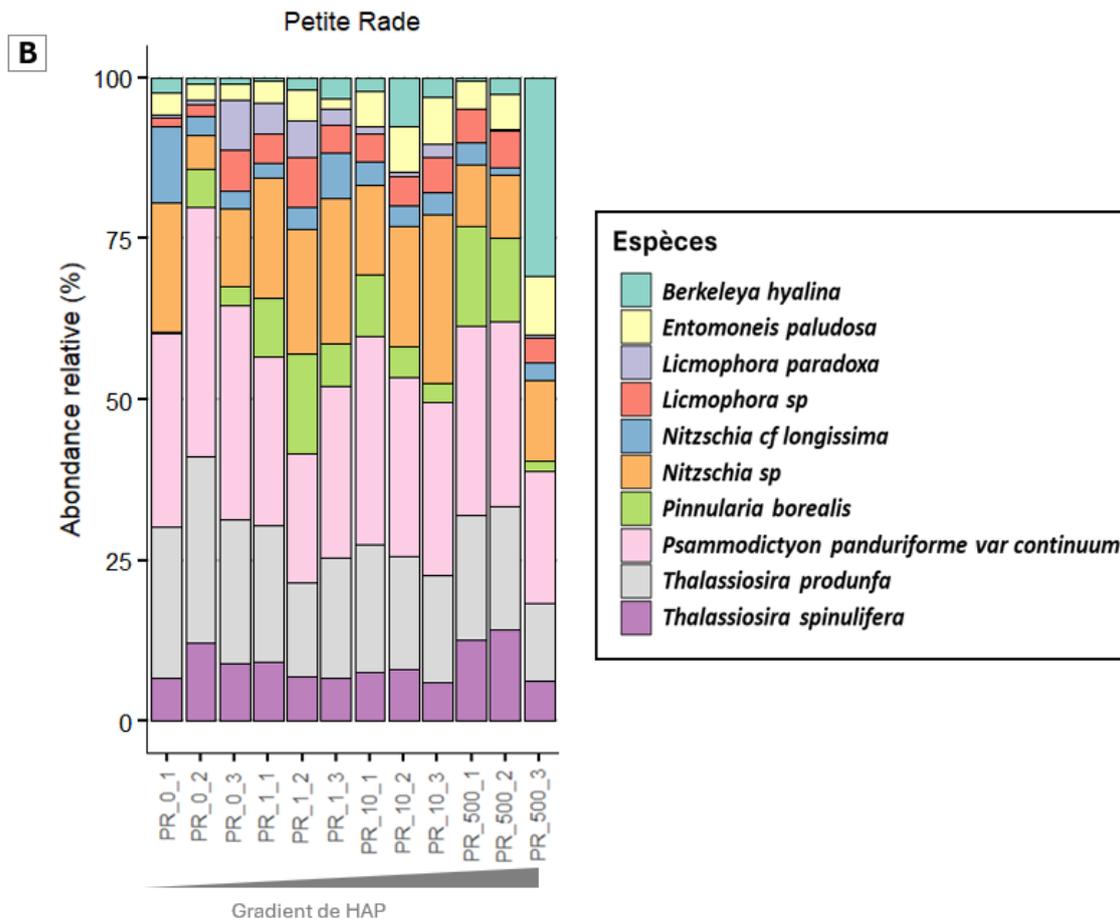


Figure 21 : Composition des 10 rangs taxonomiques les plus abondants des communautés de biofilms pour chaque échantillon des différents sites au rang de l'espèce pour les diatomées

III-CONCLUSIONS

Cette étude avait pour objectif de découpler l'effet spécifique d'un polluant et même d'un congénère de l'ensemble des paramètres qui contrôlent la structure des communautés microbienne de biofilms en milieu marin. Durant la campagne SUCHIMED 2021, qui a confirmé des données des campagnes précédentes réalisées uniquement avec des moules, les HAP ont été identifiés comme des polluants majeurs et fréquents de l'environnements côtiers méditerranéens. L'ajout de concentrations croissantes de phénanthrène, à des concentrations qui restent réalistes en méditerranée, a permis de montrer une réponse modérée, dépendant du type de microorganisme et de leur exposition préalable à des HAP.

- Quelques soient les microorganismes (bactéries ou diatomées), peu ou pas d'effet sur l'alpha diversité a pu être observé. Ceci est cohérent à la fois avec des expériences précédentes sur d'autres polluants comme les métaux dans la rade de Toulon (Djaoudi et al., 2022) et avec les résultats de la campagne SUCHIMED 2021.

- Pour les communautés procaryotes, l'effet de phénanthrène semble dépendre de la concentration mais uniquement sur le site de Cap Sicié, peu exposé aux HAP. Ceci implique que les communautés de la petite rade, sont adaptées aux concentrations d'exposition.
- Même si l'absence de données pour les communautés de diatomées à cap Sicié limite nos conclusions, il semble que, contrairement aux procaryotes, les communautés de diatomées de la petite rade conservent elles une sensibilité au PHE, puisque certains taxa semblent résistants alors que d'autres sont plus sensibles, ce qui modifie la structure des communautés de biofilms. Il faut noter que les concentrations choisies ne permettent pas de sélectionner de taxa rares qui deviendraient très abondants, ni de diminuer significativement la richesse ou la diversité, ce qui est aussi cohérent avec les données de la campagne en mer.
- Nos résultats indique donc une plus grande sensibilité et une moins bonne capacité d'adaptation aux polluants des diatomées par rapport aux procaryotes dans les biofilms marins.

CONCLUSIONS GENERALES – PERSPECTIVES

Le projet BIOFINDIC s'est essentiellement développé autour de la campagne en mer SUCHIMED 2021 qui a couvert les 1800km de la façade méditerranéenne française. Il a permis de générer plus de 900 échantillons sur 49 sites d'immersion dont les analyses constituent un jeu de données à une échelle inédite pour des biofilms marins et avec une portée scientifique majeure pour ce mode de vie microbien moins étudié, bien que majeur, dans tous les écosystèmes marins.

Dans le cadre du projet, deux paramètres de bioindication de la qualité chimique des eaux côtières ont été explorés. Le premier concernait la bioaccumulation des contaminants dans les biofilms, le second la capacité des communautés de diatomées des biofilms à refléter cette qualité chimique des milieux côtiers.

En ce qui concerne la bioaccumulation des contaminants, le premier objectif était de démontrer la capacité de générer des biofilms *in situ* sur des supports artificiels dans des environnements marins côtiers très diversifiés, aussi bien d'un point de vue des caractéristiques physico-chimiques des eaux que des conditions d'exposition à des contaminants multiples. Le second était de démontrer la capacité à identifier et quantifier un grand nombre de contaminants au sein des mêmes biofilms et ce quelles que soient les conditions. Le troisième de montrer que la bioaccumulation était cohérente par rapport au bioindicateur utilisé par l'Agence de l'eau actuellement. Tous ces objectifs ont été atteints, ce qui positionne donc les biofilms comme outils pertinents d'évaluation de la qualité chimique des masses d'eau côtières. Bien sûr, il reste à comprendre plus précisément quels contaminants sont mal bioaccumulés et pourquoi. Ceci nécessitera de préciser le type d'interactions avec la matrice EPS pour les différents types de contaminants et les éventuelles compétitions entre contaminants. Une meilleure compréhension des variations spatio-temporelles de ces phénomènes de bioaccumulation, en intégrant d'autres contaminants, notamment émergents, permettra aussi de mieux définir les conditions de déploiement des supports et d'affiner le potentiel des biofilms comme bioindicateur. Il faut noter que cette approche nécessitera toujours de conserver une approche analytique lourde aussi bien d'un point de vue technique analytique que financier.

En ce qui concerne l'étude de la diversité des diatomées des biofilms par une approche de metabarcoding, basée sur l'utilisation du gène *rbcl* et l'utilisation de la diatbarcode, s'est révélée très performante d'un point de vue technique. Les données sont répétables et de très bonne qualité sans que la technicité ou le coût soit excessif. La possibilité de travailler à l'échelle de la façade méditerranéenne française a permis l'acquisition d'un jeu de données littéralement exceptionnel permettant une analyse de la complexité des facteurs de contrôle de ces communautés de diatomées. La conclusion principale qui montre à la fois le rôle prépondérant des conditions physico-chimiques, y

compris les nutriments, mais aussi l'augmentation de l'implication des polluants dans la structuration des communautés de diatomées quand on réduit l'échelle spatiale, sont extrêmement importants sur le plan écologique. Ce résultat implique certainement des approches locales pour la mise en évidence de patterns indicateurs de pollution. L'échelle spatiale pertinente pour du monitoring environnemental dépendra probablement des caractéristiques locales. La complexité associée aux multiples profils des sites de SUCHIMED 2021 a aussi rendu la mise en évidence de taxa bioindicateur difficile. Il apparaît clairement que des approches réductionnistes en conditions contrôlées comme réalisée avec le phénanthrène seront nécessaires pour en identifier. Cette expérimentation en conditions contrôlées mais avec des biofilms « naturels » a, par ailleurs, aussi suggéré l'importance du passif d'exposition dans la réponse des communautés et une plus grande sensibilité, donc un plus grand intérêt en bioindication, des diatomées par rapport aux procaryotes dans les biofilms.

Pour conclure, les nombreux résultats exceptionnels et enthousiasmants de ce projet justifient de poursuivre les recherches sur les interactions entre les biofilms et les contaminants dans les environnements côtiers pour préciser les conditions d'utilisation de ces biofilms comme bioindicateurs de la qualité chimique des milieux côtiers.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Bancon-Montigny, C., Gonzalez, C., Delpoux, S., Avenzac, M., Spinelli, S., Mhadhbi, T., Mejri, K., Hlaili, A. S. and Pringault, O. (2019). Seasonal changes of chemical contamination in coastal waters during sediment resuspension. *Chemosphere*, 235:651-661
- Barre A., Briand J.-F., Vaccher V., Briant N., Briand M., Dormoy B., Boissery P. & Bouchoucha M. (2024). A comparative biomonitoring study of trace metals and organic compounds bioaccumulation in marine biofilms and caged mussels along the French Mediterranean coast. *Environmental Pollution* 363:125239
- Barry-Martinet R., Pollet T., Fay F., Tunin-Ley A., Turquet J., Ghiglione J.F., Garnier C., Portas A., Burgaud G., Rimet F. and Briand J.F. Geographic genetic divergence in tycho planktonic taxa dominating diatom communities in marine biofilms. *Soumis dans eDNA*
- Belando, M. D., Marín A., Aboal M., García-Fernández A. J. and Marín-Guirao L. (2017) Combined in Situ Effects of Metals and Nutrients on Marine Biofilms: Shifts in the Diatom Assemblage Structure and Biological Traits *Science of The Total Environment* 574:381-89.
- Blanco, Y., Rivas, L.A., González-Toril, E., Ruiz-Bermejo, M., Moreno-Paz, M., Parro, V. et al. (2019) Environmental parameters, and not phylogeny, determine the composition of extracellular polymeric substances in microbial mats from extreme environments. *Science of The Total Environment* 650: 384-393.
- Bouchoucha, M., Tomasino, C., Amouroux, I., Andral, B., Brach-Papa, C., Briand, M., Buchet, R., Delmas, L., Galgani, F., Gonzalez, J.-L., Grouhel-Pellouin, A., Mauffret, A., Mille, T., Munaron, D., Ponzevera, E., Wessel, N., Boissery, P., Amouroux, I., Andral, B., ... Boissery, P. (2021). 20 ans de suivi de la contamination chimique des eaux côtières méditerranéennes. *Résultats & perspectives*.
- Briand, J.-F., Barani, A., Garnier, C., Réhel, K., Urvois, F., LePoupon, C. et al. (2017) Spatio-temporal variations of marine biofilm communities colonizing artificial substrata including antifouling coatings in contrasted French coastal environments. *Microbial Ecology* 74: 585-598.
- Briand, J.-F., Pochon, X., Wood, S.A., Bressy, C., Garnier, C., Réhel, K. et al. (2018) Metabarcoding and metabolomics offer complementarity in deciphering marine eukaryotic biofouling community shifts. *Biofouling* 34: 657-672.
- Briand, M. J., Herlory, O., Briant, N., Brach-Papa, C., Boissery, P. and Bouchoucha, M. (2023). The French Mussel Watch: More than two decades of chemical contamination survey in Mediterranean coastal waters. *Marine Pollution Bulletin* 191: 114901.
- Chiu, J.M.Y., Thiyagarajan, V., Tsoi, M.M.Y., and Qian, P.Y. (2006) Qualitative and quantitative changes in marine biofilms as a function of temperature and salinity in summer and winter. *Biofilms* 2: 183-195.
- Chonova, T., Kurmayer, R., Rimet, F., Labanowski, J., Vasselon, V., Keck, F. et al. (2019) Benthic diatom communities in an Alpine river impacted by waste water treatment effluents as revealed using DNA metabarcoding. *Frontiers in Microbiology* 10.
- Djaoudi K., Tesán Onrubia J.A., Boukra A., Guesnay L., Portas A., Barry-Martinet R., Angeletti B., Mounier S., Lenoble V. and Briand J.-F. (2022). Seawater copper content controls biofilm bioaccumulation and microbial community on microplastics. *STOTEN* 814:152278
- Hillebrand, H., and Sommer U. (2000) Effect of Continuous Nutrient Enrichment on Microalgae Colonizing Hard Substrates. *Hydrobiologia* 426: 185-92.

- Kermarrec, L., Franc, A., Rimet, F., Chaumeil, P., Frigerio, J.M., Humbert, J.F., and Bouchez, A. (2014) A next-generation sequencing approach to river biomonitoring using benthic diatoms. *Freshwater Science* 33: 349-363.
- Laroche O, Pantos O, Kingsbury JM, Zaiko A, Wallbank J, Lear G, et al. (2023). A spatio-temporal analysis of marine diatom communities associated with pristine and aged plastics. *Biofouling* 39:427-443.
- Larras, F., Keck, F., Montuelle, B., Rimet, F., and Bouchez, A. (2014) Linking diatom sensitivity to herbicides to phylogeny: a step forward for biomonitoring? *Environmental Science & Technology* 48: 1921-1930.
- Laroche, O., Pantos O., Kingsbury J.M., Zaiko A., Wallbank J., Lear G., Thompson-Laing J., et al. (2023) A Spatio-Temporal Analysis of Marine Diatom Communities Associated with Pristine and Aged Plastics ». *Biofouling* 39:427-443
- Malviya, S., Scalco E., Audic S., Vincent F., Veluchamy A., Poulain J., Wincker P., et al. (2016) Insights into Global Diatom Distribution and Diversity in the World's Ocean. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 113: E1516-1525.
- Mitbavkar, S. and Anil A.C. (2008) Seasonal Variations in the Fouling Diatom Community Structure from a Monsoon Influenced Tropical Estuary. *Biofouling* 24: 415-26.
- Munda, I.M. (2005) Seasonal Fouling by Diatoms on Artificial Substrata at Different Depths near Piran (Gulf of Trieste, Northern Adriatic). *Acta Adriatica* 46:137-157.
- Patel A.B., Shaikh S., Jain K. R., Desai C. and Madamwar D. (2020). Polycyclic Aromatic Hydrocarbons: Sources, Toxicity, and Remediation Approaches. *Frontiers in Microbiology*, 11: 562813
- Patil, J.S., and Anil A.C. (2005) Biofilm Diatom Community Structure: Influence of Temporal and Substratum Variability ». *Biofouling* 21 : 189-206.
- Pérez-Burillo J, Trobajo R, Vasselon V, Rimet F, Bouchez A, Mann DG (2020). Evaluation and sensitivity analysis of diatom DNA metabarcoding for WFD bioassessment of Mediterranean rivers. *Sci Total Environ* 727:138445
- Richard, H., Carpenter, E.J., Komada, T., Palmer, P.T., and Rochman, C.M. (2019) Biofilm facilitates metal accumulation onto microplastics in estuarine waters. *Science of The Total Environment* 683: 600-608.
- Rimet, F., and Bouchez, A. (2012) Biomonitoring river diatoms: Implications of taxonomic resolution. *Ecological Indicators* 15: 92-99.
- Rimet, F., Chaumeil, P., Keck, F., Kermarrec, L., Vasselon, V., Kahlert, M. et al. (2016) R-Syst::diatom: an open-access and curated barcode database for diatoms and freshwater monitoring. *Database* 2016: baw016-baw016.
- Védie E., Barry-Martinet R., Senez V., Berglin M., Stenlund P., Brisset H., Bressy C. and Briand J.-F. (2022). Influence of sharklet-inspired micropatterned polymers on spatio-temporal variations of marine biofouling. *Macromol Bioscience* e2200304 (IF 2021=5.859)

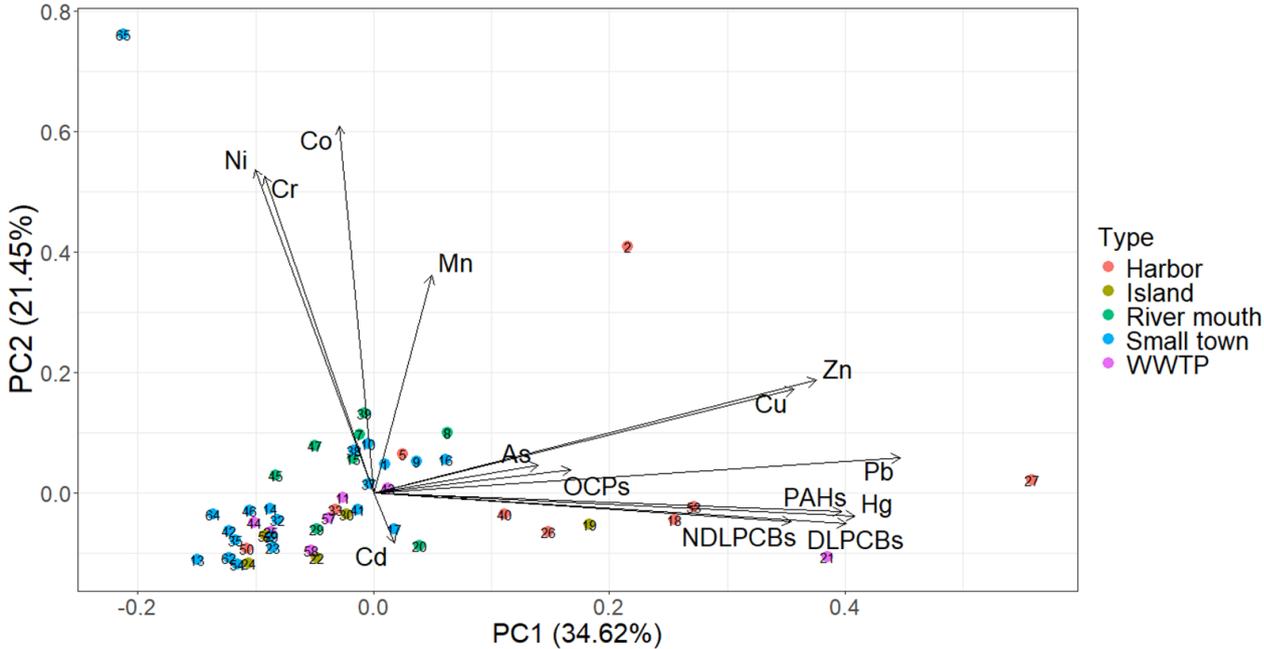
ANNEXES

ANNEXE 1 : : Liste des 18 PAHS, 14 PCBS ET 25 OCPs analysés dans les biofilms

Dichlorodiphenylethanes	o,p and p,p DDT, o,p and p,p DDD and DDE
Chlorobenzenes	Hexa- and pentachlorobenzene
Chlorocyclohexanes	α -, β -, γ -, and δ -Hexachlorocyclohexane
Cyclodienes	α - and β -endosulfan, heptachlor, dieldrin, endrin, mirex, cis- and trans-heptachlor epoxides
Total chlordanes	α - and γ -chlordane, oxychlordane, cis- and trans-nonachlor
Polycyclic aromatic hydrocarbons	Phenanthrene, anthracene, fluoranthene, pyrene, benzo(c)fluorene, benzo(a)anthracene, cyclopenta(c,d)pyrene, chrysene, 5-methylchrysene, benzo(b,j,k)fluoranthene, benzo(a)pyrene, indeno(1,2,3-cd)pyrene, dibenz(a,h)anthracene, benzo(g,h,i)perylene, dibenzo(a,l)pyrene, dibenzo(a,e)pyrene
Dioxin-like polychlorobiphenyls	Congeners 105, 114, 118, 123, 156, 157, 167, 189
Non-dioxin-like polychlorobiphenyls	Congeners 28, 52, 101, 138, 153, 180

Note : benzo(b)fluoranthene, benzo(j)fluoranthene, benzo(k)fluoranthene were quantified separately.

ANNEXE 2 : Analyse en composantes principales des variables (groupes de composés organiques et éléments traces métalliques, représentés par des flèches) par sites. Les composantes sont colorées en fonction de leur type (les ports en rouge, les îles en jaune foncé, les embouchures de rivière en vert, les petites villes en bleu et les stations d'épuration en violet). L'analyse ACP a été réalisée sur les valeurs de concentration centrées et mises à l'échelle à l'aide de la fonction autoplot du paquetage ggplot2 de R (R v.4.1.1, R Core Team).





Contents lists available at ScienceDirect

Environmental Pollution

journal homepage: www.elsevier.com/locate/envpol

A comparative biomonitoring study of trace metals and organic compounds bioaccumulation in marine biofilms and caged mussels along the French Mediterranean coast[☆]

Abel Barre ^a, Jean-François Briand ^{a,*}, Vincent Vaccher ^b, Nicolas Briant ^c, J. Marine Briand ^d, Bruno Dormoy ^e, Pierre Boissery ^f, Marc Bouchoucha ^d

^a Université de Toulon, MAFIEM, Toulon, France

^b LUNAM Université, Oniris, USC 1329 Laboratoire d'Etude des Résidus et Contaminants dans les Aliments (LABERCA), Nantes, France

^c Ifremer, CCEM Contamination Chimique des Écosystèmes Marins, F-44000, Nantes, France

^d Ifremer, Laboratoire Environnement Ressources Provence Azur Corse (LER-PAC), CS 20330, F-83507, La Seyne Sur Mer, France

^e Laboratoire d'Analyses de Surveillance et d'Expertise de la Mer (LASEM), Toulon, France

^f Agence de l'Eau Rhône Méditerranée Corse - Délégation Paca Corse, F-13001, Marseille, France

ABSTRACT

The bioaccumulation potential of contaminants in marine environments was investigated in biofilms and compared with caged mussels for a wide range of both organic and metallic contaminants across a large geographic area. Marine biofilms were sampled after three months of sub-surface immersion at 49 locations along the 1800 km of the French Mediterranean coast. Ten chemical elements (i.e. As, Cd, Co, Cr, Cu, Hg, Mn, Ni, Pb, and Zn) and 57 organic compounds (i.e., 18 polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs), 8 dioxin-like and 6 non-dioxin-like polychlorinated biphenyls (PCBs) and 25 organochlorine pesticides (OCPs)) were quantified in triplicates, revealing different multi-contaminated profiles depending on sites. Most of contaminants exhibited higher concentrations in biofilms than in mussels. Moreover, a remarkable significant and positive correlation between the concentrations in both biological matrices was observed for PAHs and PCBs, and more contaminant-dependent for OCPs and metals. These results highlighted the potential of biofilms as relevant bioindicators of the marine chemical contamination.

1. Introduction

Environmental pollution from organic and inorganic contaminants is a matter of concern for coastal marine ecosystems due to its ecological impacts on marine biological communities (Halpern et al., 2000; Doney, 2010). Inorganic (i.e., trace metal and metalloid elements, TMEs) and organic compounds (OCs), including polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs), polychlorinated biphenyls (PCBs) or organochlorine pesticides (OCPs) reach marine coastal fronts through various pathways. These include direct inputs (e.g., wastewater treatment plants, surface and ground waters' pollution loads) and diffuse inputs (urban and agricultural runoff). TMEs are naturally present and ubiquitous in marine

ecosystems, but their levels are significantly increased due to improper management of mining, industrial activities (including shipping), and domestic wastes. PAHs occur naturally, particularly in crude oil and as a result of volcanic eruptions or forest fires, but are released to a greater extent by anthropogenic activities involving an incomplete combustion of hydrocarbon feedstocks (Abdel-Shafy and Mansour, 2016; Patel et al., 2020). In contrast, PCBs and OCPs are exclusively anthropogenic. PCBs have been used widely in various industrial applications (e.g., in heat transfer fluids in electrical capacitors and transformers, lubricants in turbines) due to their low flammability, production costs, and high chemical stability. They have entered the environment primarily through improper disposal and spills. Organochlorine pesticides, used

Abbreviations: PHE, Phenanthrene; AN, Anthracene; FA, Fluoranthene; PY, Pyrene; B(c)F, Benzo(c)fluorene; BaA, benzo(a)anthracene; CPP, cyclopenta(c,d)pyrene; CHR, Chrysene; 5-MCH, 5-Methylchrysene; BbF, Benzo(b)fluoranthene; BjF, Benzo(j)fluoranthene; BkF, Benzo(k)fluoranthene; BaP, benzo(a)pyrene; IP, Indeno(1,2,3-cd)pyrene; DbahA, Dibenz(a,h)anthracene; BghiP, Benzo(g,h,i)perylene; DbaP, Dibenzo(a,d)pyrene; DbaeP, Dibenzo(a,e)pyrene; PeCbz, Penta-chlorobenzene; HCB, Hexachlorobenzene; aHCH, α -Hexachlorocyclohexane; gHCH, γ -Hexachlorocyclohexane; aESN, α -endosulfan; bESN, β -endosulfan; Hept. cis, Heptachlor epoxide cis; Hept. trans, Heptachlor epoxide trans; BMLR, Biofilms/mussels logarithmic ratio; C, Corsica; ER, East-of-the-Rhone; WR, West-of-the-Rhone; PAHs, Polycyclic aromatic hydrocarbons; DL-PCBs, Dioxin-like Polychlorobiphenyls; NDL-PCBs, Non-dioxin-like Polychlorobiphenyls; OCPs, Organochlorine pesticides; TMEs, Trace metal elements; LOQ, Limit of quantification.

[☆] This paper has been recommended for acceptance by Wen-Xiong Wang.

* Corresponding author, Université de Toulon, CS 60584, 83041, TOULON Cedex 9, France.

E-mail address: briand@univ-tln.fr (J.-F. Briand).

<https://doi.org/10.1016/j.envpol.2024.125239>

Received 4 July 2024; Received in revised form 1 November 2024; Accepted 1 November 2024

Available online 2 November 2024

0269-7491/© 2024 Elsevier Ltd. All rights are reserved, including those for text and data mining, AI training, and similar technologies.

ANNEXE 4 : Alpha diversité (richesse estimée par l'indice Chao1 et diversité estimée par l'indice de Shanon) des communautés de diatomées dans les biofilms des échantillons de la campagne SUCHIMED 2021

