

UNIVERSITE DE SAVOIE
Ecole Doctorale SISEO

THESE

Présentée en vue de l'obtention du grade de
DOCTEUR DE L'UNIVERSITE DE SAVOIE
Mention : « Biodiversité, écologie, environnement »

Par

Aurélie VILLENEUVE

Soutenue le 16 décembre 2008

**EFFETS CONJOINTS DE FACTEURS PHYSIQUES
(LUMIERE ET VITESSE DU COURANT) ET CHIMIQUES
(PESTICIDES) SUR LA STRUCTURE ET LA COMPOSITION
DU PERIPHYTON :
UNE APPROCHE MULTI-ECHELLES**

Composition du Jury :

BOUCHEZ Agnès	Chargée de Recherche, UMR CARRETEL, Thonon (directrice de Thèse)
MONTUELLE Bernard	Directeur de Recherche, UR Qualité des eaux Cemagref, Lyon (Directeur de Thèse)
DOMAIZON Isabelle	Maître de Conférence, UMR CARRETEL, Thonon
BOHATIER Jacques	Professeur d'Université, UMR CNRS 6023, Clermont- Ferrand
GARABETIAN Frédéric	Professeur d'Université, UMR 5805 EPOC-OASU, Bordeaux (Rapporteur)
GUASCH Helena	Professeur d'Université, Institute of Aquatic Ecology, Girona (Espagne) (Rapporteur)

Remerciements

L'originalité est une composante nécessaire du travail de thèse, mais aussi un exercice particulièrement difficile à atteindre dans les remerciements ...Il est ainsi facile de s'enliser dans la rédaction d'une longue liste de personnes (qui ne sera jamais exhaustive) et d'y associer une longue liste d'adjectifs. Cependant, il est très important pour moi de vous remercier sincèrement, vous tous qui avez soit, permis que je sois présente au sein de l'UMR CARRTEL, soit construit ce projet avec moi, ou encore permis sa réalisation... Et oui, petit rappel pour le lecteur non scientifique (car peut-être qu'il y en aura), une thèse n'est pas un travail solitaire, et le chercheur n'est pas seulement un homme grisonnant un peu fou et excentrique. En réalité, le travail de recherche accompli au cours de ces trois ans est le résultat de l'addition de nombreuses conditions favorables : une équipe dynamique et accueillante, un encadrement présent, intelligent et surtout humain...et enfin un cadre de travail idyllique (qui n'aurait pas envie de travailler dans un grand bureau face au lac Lemman), A la manière d'un générique de film je tiens donc à vous remercier chaleureusement pour avoir contribué au tournage d'une partie du film de ma vie professionnelle mais également personnelle.

Donc voici (pas par ordre d'apparition, ni d'importance, mais tout simplement par ordre alphabétique) ceux qui m'ont soutenu dans mon travail :

Producteurs :

Dorioz Jean-Marcel (directeur de l'UMR CARRTEL)

Guillard Jean (directeur adjoint de l'UMR CARRTEL)

Scénaristes et réalisateurs :

Bouchez Agnès (directrice de thèse)

Montuelle Bernard (directeur de thèse)

Acteurs/Techniciens

Druart Jean-Claude (taxonomiste)

LeBerre Brigitte (biologiste moléculaire)

Margoum Christelle (chimiste)

Perga Marie-Elodie (chercheuse/ aide statistique)

Perney Pascal (technicien de laboratoire)

Rimet Frédéric (taxonomiste)

Volat Bernadette (technicienne de laboratoire)

Figurants

Tous les membres du personnel de l'UMR CARRETEL et de l'UR QELY

Supervision (comité de pilotage/jury) :

Bohatier Jacques (Président)

Garabetian Frederique (Rapporteur)

Guash Helena (Rapporteur)

Humbert Jean-François

Leboulanger Christophe

Leroux Xavier

Marmonnier Pierre

Financement

Région Rhône-Alpes

Et puisque ces trois ans n'ont pas été que « travail », voici ceux qui m'ont aidé à me divertir en dehors du plateau de tournage et contribué à la réalisation de mon film personnel ...Merci à vous tous les p'tits loups : Marie, les doud's, Mat, Béren et Anthony, Anne, Muriel, l'équipe de basket détente de La Stella, tout les amis qui sont venus me visiter pendant ce séjour à Thonon (pour ma compagnie ou la joie des sports d'hiver...) : Aurore, Betty, Céline et Gildas...

Enfin merci à mes parents et mon petit frère d'être toujours présents tout simplement....

Eh oui, certains ont joué un rôle dans les deux films. Comme quoi il est toujours possible d'allier travail et plaisir !!

Résumé

Cette thèse s'articule autour de l'**hypothèse générale selon laquelle une modification des facteurs physiques des milieux aquatiques (intensité lumineuse et vitesse du courant) peut entraîner une modification de la dynamique et/ou de la structure, de la composition et du fonctionnement du périphyton et donc de sa réponse à la présence de polluants**. Cette hypothèse a été testée 1) dans des systèmes de complexité croissante allant d'approches expérimentales (microcosmes et mésocosmes) à des approches *in situ*, et 2) pour des variations de faible intensité des facteurs physiques et chimiques telles qu'observées sur le terrain.

* L'effet de la lumière (éclairé/ombragé) et l'effet de la présence de diuron (herbicide) à faible concentration ($1 \mu\text{g.L}^{-1}$) ont été testés en **microcosmes de laboratoire**. Nous avons ainsi :

- observé un décalage du développement des biofilms placés sous ombrage.
- caractérisé des espèces plus aptes à se développer dans des conditions limitantes de lumière, notamment parmi les diatomées.
- mis en évidence qu'à ces changements de diversité et de structure, sont associés une modification de la réponse et un changement de la tolérance des communautés périphytiques à un même stress toxique

* La vitesse du courant est un autre facteur physique d'intérêt pour la structuration des biofilms. Les petits milieux lotiques sont composés d'une succession de différents faciès hydrauliques, radier, mouille, cascade.... Chacun de ces faciès est, en théorie, caractérisé par des communautés microbiennes adaptées aux conditions environnementales locales. Au sein de **mésocosmes d'extérieur**, nous avons créé des zones d'hydraulique très contrastée avec comme objectif l'établissement de communautés différentes. L'application d'un mélange de pesticides nous a ensuite permis d'évaluer la tolérance de ces différentes communautés. Nous avons observé :

- un retard d'installation et une moindre densité du périphyton au sein de zones d'hydraulique rapide
- un changement de diversité algale (développement plus important d'algues filamenteuses en zone de faible courant) qui entraîne une différence de réponse et de tolérance aux pesticides.
- une répercussion de la présence de micro-habitats physiques diversifiés à l'échelle locale (décimètre) à une échelle plus globale (rivières artificielles hétérogènes ou homogènes sur le plan hydraulique).
- un effet des variations saisonnières (printemps / automne) qui entraînent des différences de structure, de diversité et de fonctionnement des biofilms et finalement une différence de sensibilité à la présence de molécules polluantes.

* **Une étude *in situ***, a permis d'approfondir ces résultats, dans le contexte plus complexe d'une petite rivière, en caractérisant les communautés périphytiques et leurs réponses au stress chimique en fonction du régime hydraulique. Ces travaux ont été menés sur la Morcille, petite rivière d'ordre 1, qui traverse un bassin versant occupé à 60-70 % par de la vigne. Les communautés périphytiques de ce cours d'eau sont soumises à deux types de pollution: les phytosanitaires et la pollution organique. Des études antérieures ont montré un changement global et permanent de diversité et de tolérance des communautés périphytiques le long d'un gradient amont-aval de pollution, sans toutefois aborder les interactions entre niveaux de contaminations et facteurs hydrauliques. Cette étude de terrain permet également d'évaluer la pertinence des résultats obtenus lors de nos essais en microcosmes et mésocosmes. Ainsi, nous avons :

- Confirmé une différence de structure des communautés périphytiques entre l'amont et l'aval.
- Observé, en accord avec nos expérimentations en rivières artificielles, des différences de structuration et de diversité des communautés issues de zones d'hydraulique différente.
- Caractérisé des réponses différentes au mélange *in situ* de polluants de la part des communautés issues de zones d'hydraulique différente.
- Enregistré une modification de la réponse des communautés en lien avec des changements saisonniers.

Une analyse « transversale » de ces résultats, s'appuyant sur les différents niveaux d'études abordés (du microcosme à l'*in situ*) nous a également permis, de préciser les méthodologies expérimentales nécessaires.

Mots clés : Périphyton, écosystèmes lotiques, intensité lumineuse, vitesse du courant, pesticides, diversité

Sommaire

INTRODUCTION GENERALE ET HYPOTHESES **14**

CHAPITRE 1 :

REVUE BIBLIOGRAPHIQUE **26**

A- MODELE BIOLOGIQUE : LE PERIPHYTON **27**

1- DEFINITION	27
2- STRUCTURE ET COMPOSITION DU PERIPHYTON	28
2.1- La matrice extracellulaire	28
2.2- Les organismes périphytiques et leurs relations	30
3- ROLE DES COMMUNAUTES MICROBIENNES EN MILIEU LOTIQUE	31
4- FORMATION ET DEVELOPPEMENT DU PERIPHYTON	32
4.1- Formation d'un biofilm	32
4.2- Contrôle de l'évolution spatio-temporelle du périphyton en milieu lotique	33
4.3- Effet des variables secondaires sur la dynamique du périphyton	38
5- LE PERIPHYTON COMME BIO-INDICATEUR	45

B- MODELES CHIMIQUES : LE DIURON ET L'AZOXYSTROBINE **48**

1- LES PESTICIDES	48
1.1- L'azoxystrobine	50
1.2- Le diuron	52
2- LE DIURON DANS LES MILIEUX AQUATIQUES ET SON IMPACT SUR LES ORGANISMES MICROBIENS	52

C- SYSTEMES EXPERIMENTAUX POUR L'ETUDE D'IMPACT DES PESTICIDES EN MILIEUX AQUATIQUES **56**

1- MONO ESSAIS DE LABORATOIRE : TEST D'ECOTOXICITE	57
2- MICROCOSMES DE LABORATOIRES ET MESOCOSMES <i>EX OU IN SITU</i>	58

CHAPITRE 2 :

MATERIEL ET METHODES **61**

A- SYSTEMES EXPERIMENTAUX ET SITE D'ETUDE **62**

1- LES ESSAIS MONO-CULTURE : TEST D'INHIBITION DE LA CROISSANCE ALGALE	62
1.1- Réalisation des tests en microplaques	63
1.2- Détermination de la CE ₅₀	63
2- LES MICROCOSMES : ESSAIS EN RIVIERES DE LABORATOIRE	64
2.1- Description des rivières	64
2.2- Nature et positionnement des substrats	64
2.3- Déroulement des essais et échantillonnage (figure 16)	64
3- LES MESOCOSMES : ESSAIS EN CANAUX ARTIFICIELS	65
3.1- Description des canaux artificiels	66
3.2- Nature et positionnement des substrats	67
3.3- Déroulement des essais et échantillonnage	68

3.4- Le mélange polluant _____	69
3.5- Analyses physico-chimiques _____	69
4- ETUDE <i>IN SITU</i> : SITE ATELIER ARDIERES-MORCILLE _____	69
4.1- Caractéristiques géographiques du site d'étude _____	70
4.2- Caractéristiques chimiques et physiques des stations d'échantillonnage _____	71
4.3- Nature et positionnement des substrats _____	73
4.4- Déroulement des essais et échantillonnage _____	73
4.5- Préparation des échantillons _____	74
B- ANALYSES BIOLOGIQUES _____	74
1- MESURE DE LA STRUCTURE GENERALE DU BIOFILM : _____	76
1.1- Estimation de la biomasse _____	76
1.2- Dénombrement cellulaire bactérien _____	76
2- EVALUATION DE LA PRODUCTION PERIPHYTIQUE _____	78
2.1- Estimation de la production primaire _____	78
2.2- Estimation de la production bactérienne _____	79
3- CARACTERISATION DE LA STRUCTURE ET COMPOSITION DES COMMUNAUTES PERIPHYTIQUES _____	80
3.1- Microscopie _____	80
3.2- Analyse moléculaire : PCR-DGGE (Polymerase Chain Reaction- Denaturing Gradient Gel Electrophoresis) _____	82
3.3- Analyse de diversité pigmentaire par HPLC (High Performance Liquid Chromatography) _____	86
C- TRAITEMENTS STATISTIQUES DES DONNEES _____	86
1- STRUCTURE GENERALE DU BIOFILM ET PRODUCTIONS PERIPHYTIQUES: _____	87
2- STRUCTURE ET COMPOSITION DES COMMUNAUTES PERIPHYTIQUES _____	88
2.1- Traitement des données de microscopie (Rimet et al., 2006) _____	88
2.2- Analyse des résultats de DGGE _____	89
2.3- Analyse de la composition pigmentaire _____	90

CHAPITRE 3 :

EFFET D'UNE PRESSION CHIMIQUE (HERBICIDE) ET D'UN FACTEUR PHYSIQUE (INTENSITE LUMINEUSE) SUR LE PERIPHYTON : APPROCHE EXPERIMENTALE EN MICROCOSMES **91**

A- ECOTOXICITE DU DIURON SUR LA CROISSANCE ALGALE _____	93
B- RESULTATS DE L'EXPERIMENTATION EN MICROCOSMES _____	94
1- STRUCTURE GENERALE DES BIOFILMS _____	94
2- DIVERSITE PERIPHYTIQUE _____	97
2.1- Diversité procaryotique : analyse par DGGE _____	97
2.2- Diversité algale : analyse par microscopie _____	100
C- EFFET DU DIURON ET D'UNE MODIFICATION DE L'INTENSITE LUMINEUSE SUR LE PERIPHYTON _____	102

CHAPITRE 4 :

**EFFET CONJOINT DU REGIME HYDRAULIQUE ET D'UN MELANGE DE PESTICIDES
SUR LE PERIPHYTON : APPROCHE EXPERIMENTALE EN MESOCOSMES** **106**

**A- ETUDE A UNE ECHELLE LOCALE (DECIMETRIQUE) : VARIATION DE LA VITESSE DU COURANT AU
SEIN D'UN MEME CANAL** **107**

1- CARACTERISTIQUES PHYSICO-CHIMIQUES DE L'EAU DES CANAUX	108
1.1- Physico chimie des éléments majeurs	108
1.2- Dosage des phytosanitaires	111
2- ECOTOXICITE DU DIURON, DE L'AZOXYSTROBINE ET DE LEUR MELANGE SUR LA SOUCHE SELENASTRUM CAPRICORNUTUM	112
3- STRUCTURE GENERALE DU PERIPHYTON AU SEIN DES CANAUX ARTIFICIELS	112
4- TOLERANCE DES COMMUNAUTES AU MELANGE POLLUANT	115
5- DIVERSITE PERIPHYTIQUE	115
5.1- Diversité phytobenthique : étude par DGGE	115
5.2- Diversité phytobenthique : étude par microscopie	117
5.3- Diversité procaryotique : étude par DGGE:	119
6- EFFET DES PHYTOSANITAIRES SUR LE PERIPHYTON A L'ECHELLE LOCALE (DECIMETRIQUE) EN AUTOMNE	120

B- IMPORTANCE DE LA SAISON D'ECHANTILLONNAGE **125**

1- CARACTERISTIQUES PHYSICO-CHIMIQUES DE L'EAU DES CANAUX EN ETE	125
1.1- Physico chimie des éléments majeurs	125
2.2- Dosage des phytosanitaires	128
2- STRUCTURE GENERALE DU PERIPHYTON AU SEIN DES CANAUX ARTIFICIELS	129
3- TOLERANCE DES COMMUNAUTES AU MELANGE POLLUANT	134
4- DIVERSITE PERIPHYTIQUE	135
4.1- Diversité phytobenthique : étude par DGGE	135
4.2- Diversité algale : étude par microscopie	136
4.3- Diversité procaryotique : étude par DGGE:	139
5- EFFET DES PHYTOSANITAIRES A L'ECHELLE LOCALE EN ETE ET COMPARAISON SAISONNIERE	140

**C- ETUDE A L'ECHELLE GLOBALE : COMPARAISON DE RIVIERES HOMOGENES OU HETEROGENES
EN TERME D'HYDRAULIQUE** **149**

1- CARACTERISTIQUES PHYSICO-CHIMIQUES DES CANAUX ARTIFICIELS	149
1.1- Physico chimie des éléments majeurs	149
1.2- Dosage des phytosanitaires	152
2- STRUCTURE GENERALE DU PERIPHYTON AU SEIN DES CANAUX ARTIFICIELS	153
3- EVALUATION DE LA RESISTANCE DES COMMUNAUTES AU MELANGE POLLUANT	156
4- ETUDE DE LA DIVERSITE PERIPHYTIQUE	156
4.1- Diversité phytobenthique : étude par DGGE	156
4.2- Diversité phytobenthique : étude par microscopie	158
4.3- Diversité procaryotique : étude par DGGE:	159
5- EFFET DES PHYTOSANITAIRES A UNE ECHELLE PLUS GLOBALE (UNITE EXPERIMENTALE)	161

CHAPITRE 5 :

**STRUCTURE ET DIVERSITE PERIPHYTIQUE LE LONG D'UN GRADIENT DE
POLLUTION : APPROCHE DE TERRAIN** **168**

A- IMPORTANCE DE L'HYDRAULIQUE ET EFFETS DES PESTICIDES <i>IN SITU</i>	170
1- STRUCTURE GENERALE DU PERIPHYTON DE L'AMONT A L'AVAL DE LA MORCILLE	170
2- DIVERSITE PERIPHYTIQUE	173
2.1- Diversité pigmentaire : étude par HPLC	173
2.2- Diversité algale : étude par DGGE	174
2.3- Diversité phytobenthique : étude par microscopie	176
2.4- Diversité procaryotique : étude par DGGE :	179
DISCUSSION GENERALE - CONCLUSIONS	186
A. RESISTANCE, ADAPTATION ET RESILIENCE : UNE ANALYSE DES REPNSES DES COMMUNAUTES PERIPHYTIQUES A LA CONTAMINATION	188
1- LE PERIPHYTON, UNE COMMUNAUTE COMPLEXE AU CARREFOUR D'INTERACTIONS ENVIRONNEMENTALES	188
2- LA DIVERSITE DE L'ECOSYSTEME PERIPHYTIQUE EST-ELLE UN SUPPORT DE RESISTANCE A LA PRESENCE DE PESTICIDES ?	191
3- QUEL EST LE POIDS DE LA VARIABILITE NATURELLE FACE A UNE PERTURBATION DE FAIBLE INTENSITE?	194
B. QUELLES INFORMATIONS PEUT ON TIRER DU CHANGEMENT D'ECHELLE D'ETUDE ?	197
1- COMPLEMENTARITE DES DIFFERENTS SYSTEMES ETUDIES : DU BIO-ESSAI AU TERRAIN.	197
2- LE DEUXIEME EST UN CHANGEMENT D'ECHELLE D'OBSERVATION SPATIALE, EN MESOCOSME OU <i>IN SITU</i> .	200
3- LE « CHANGEMENT D'ECHELLE » AU NIVEAU DES CHANGEMENTS D'EXPOSITION :	201
C. ET LA BIOINDICATION ?	202
1- LA SPECIFICITE DES BIOFILMS (TAILLE, DIVERSITE...) PERMET-ELLE D'EN FAIRE UN OUTIL PARTICULIER DANS L'EVALUATION DE L'ETAT DES MILIEUX ?	202
2- PEUT-ON PROPOSER UN PROTOCOLE D'EVALUATION D'EFFET DE SUBSTANCES	205
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES	208

Index des figures

Figure 1 : Modèle conceptuel de la structure et des flux métaboliques au sein du périphyton.....	28
Figure 2 : Schéma conceptuel du périphyton.....	30
Figure 3 : Schéma conceptuel du rôle du périphyton et de l'épihyton dans le flux des nutriments ...	31
Figure 4 : Schéma de formation des biofilms	32
Figure 5 : Schéma conceptuel des variables influençant le développement du périphyton	33
Figure 6 : Modèle simplifié d'évolution temporelle de la biomasse du périphyton à court terme.....	34
Figure 7 : Zonation d'un hydrosystème fluvial	36
Figure 8 : Illustration des effets directs et indirects des brouteurs sur la stœchiométrie des nutriments.	44
Figure 9 : Schéma conceptuel des relations entre les facteurs environnementaux et biologiques affectant la croissance et les fonctions du périphyton.....	45
Figure 10 : Organigramme des différents outils utilisés pour décrire l'effet d'une perturbation sur le périphyton.....	47
Figure 11 : principale voie de transfert des pesticides dans l'eau.....	49
Figure 12 : Quantité de pesticides commercialisés en France en 2005 (données IFEN).....	50
Figure 13 : Les divers niveaux de complexité biologique concernant les approches expérimentales en écotoxicologie.....	56
Figure 14 : Exemple de courbe dose-effet sur deux « endpoints » : la biomasse et la mortalité.....	58
Figure 15 : Schéma d'une microplaque 96 puits.	63
Figure 16 : Plan expérimental de l'étude en microcosmes.....	65
Figure 17 : (a) photo des canaux installés en extérieur ; (b) Schéma de conception des canaux.....	66
Figure 18 : Photo des chicanes en plexiglas installée dans le canal 1 pour crée des zones contrastées de vitesse de courant	67
Figure 19 : Profils de vitesse de courant ($m.s^{-1}$) obtenu avec le logiciel SigmaPlot.....	67
Figure 20 : Schéma d'une unité de prélèvement (carrelage).	68
Figure 21 : Calendrier des expérimentations.....	68
Figure 22 : Cartographie de la Morcille	70
Figure 23 : photographie des quatre sites de prélèvements	71
Figure 24 : Analyse physico-chimique de l'eau de la Morcille campagne 2005.....	72
Figure 25 : photographie d'une unité de prélèvement.....	73
Figure 26 : Cytogramme obtenu par cytométrie sur du biofilm.	78
Figure 27 : Explication schématique de l'utilisation des MRPP et de la statistique A calculée lors de l'analyse MRPP	89
Figure 28 : Courbe dose-réponse d'inhibition de la croissance de la souche <i>Selenastrum Capricornutum</i> en présence de diuron	94
Figure 29 : CAH réalisées à partir de la matrice de dissimilarité (indice de Dice) déduite de l'analyse du gel DGGE issus de l'amplification du gène codant pour l'ARN 16S	98
Figure 30 : CAH réalisées à partir de la matrice de dissimilarité (indice de Dice) : (a) à la lumière ; (b) sous ombrage.....	99
Figure 31 : CAH réalisées à partir de la matrice de dissimilarité (indice de Bray-Curtis) déduite de l'analyse microscopique de la communauté algale.....	100
Figure 32 : CAH basées sur les abondances des espèces phytobenthiques au sein de biofilms au cours de l'expérimentation. (a) à la lumière et (b) à l'obscurité.....	101
Figure 33 : Schéma bilan de l'effet d'une modification de l'intensité lumineuse et d'une contamination chronique au diuron ($1\mu g.L^{-1}$) sur le périphyton	105
Figure 34 : Evolution de la teneur en NH_4 , NO_2 , NO_3 , PO_4^{3-} , SiO_2 , de la conductivité, du pH et de la température au cours de l'expérimentation en automne ;	110
Figure 35 : CAH réalisée à partir de la matrice de dissimilarité (indice de Dice) déduite de l'analyse du gel DGGE issus de l'amplification du gène codant pour l'ARN 18S	117

Figure 36 : Dynamique temporelle de l'abondance (nombre de cellules.cm ⁻²) des trois grands groupes d'algues répertoriées au sein des canaux : (a) diatomées, (b) cyanobactéries et (c) chlorophycées.	117
Figure 37 : Résultats de l'analyse MRPP sur les données de microscopie	118
Figure 38 : CAH réalisée à partir de la matrice de dissimilarité (indice de Bray-curtis) déduite de l'analyse microscopique de la communauté algale totale	119
Figure 39 : CAH réalisée à partir de la matrice de dissimilarité (indice de Dice) déduite de l'analyse du gel DGGE issus de l'amplification du gène codant pour l'ARN 16S	120
Figure 40 : Evolution temporelle des différents descripteurs au sein du canal témoin au cours de l'expérimentation automnale	123
Figure 41 : Evolution de la teneur en NH ₄ , NO ₂ , NO ₃ , PO ₄ ³⁻ , SiO ₂ , de la conductivité, du pH et de la température au cours de l'expérimentation en été	127
Figure 42 : CAH réalisée à partir de la matrice de dissimilarité (indice de Dice) déduite de l'analyse du gel DGGE issus de l'amplification du gène codant pour l'ARN 18S	136
Figure 43 : Dynamique temporelle des trois grands groupes d'algues répertoriées au sein des canaux : (a) diatomées, (b) chlorophycées et (c) cyanobactéries	137
Figure 44 : Résultats de l'analyse MRPP (statistique A) sur les données de microscopie	138
Figure 45 : CAH réalisée à partir de la matrice de dissimilarité (indice de Bray-curtis) déduite de l'analyse microscopique de la communauté algale totale	138
Figure 46 : CAH réalisée à partir de la matrice de dissimilarité (indice de Dice) déduite de l'analyse du gel DGGE issus de l'amplification du gène codant pour l'ARN 16S	140
Figure 47 : Evolution des grands groupes algaux identifiés au cours de l'expérimentation. (a) en automne, (b) en été	144
Figure 48 : Résumé des principales caractéristiques (valeurs maximales) périphytiques en été et en automne	144
Figure 49 : Schéma bilan représentant les changements de structure et de diversité du périphyton en lien avec la présence de polluant et les conditions hydrologiques locales en été et en automne	147
Figure 50 : Evolution de la teneur en NH ₄ , NO ₂ , NO ₃ , PO ₄ ³⁻ , SiO ₂ , de la conductivité, du pH et de la température au cours de l'expérimentation en automne au sein des quatre canaux	151
Figure 51 : CAH réalisée à partir de la matrice de dissimilarité (indice de Dice) déduite de l'analyse du gel DGGE issus de l'amplification du gène codant pour l'ARN 18S. (a) pour toutes les dates de prélèvements, (b) pour les trois dernières dates de prélèvements	154
Figure 52 : Dynamique temporelle de l'abondance (cell.cm ⁻²) des trois grands groupes d'algues répertoriées au sein des canaux : (a) diatomées, (b) cyanobactéries et (c) chlorophycées	158
Figure 53 : Résultats de l'analyse MRPP (statistique A) sur les données de microscopie	159
Figure 54 : CAH réalisée à partir de la matrice de dissimilarité (indice de Dice) déduite de l'analyse du gel DGGE issus de l'amplification du gène codant pour l'ARN 16S	161
Figure 55 : Schéma bilan des changements de structure et de diversité du périphyton en lien avec la présence de polluant (diuron + azoxystrobine) et le type d'écoulement (homogène/hétérogène) en automne	163
Figure 56 : Analyse hiérarchique de correspondances basées sur une matrice en classe d'intensité de la présence des différents pigments ; (a) pour les deux saisons, (b) en été et (c) en hiver	174
Figure 57 : CAH réalisée à partir de la matrice de dissimilarité (indice de Dice) issue des résultats de l'analyse du gel DGGE issus de l'amplification du gène codant pour l'ARN 18S : (a) en été ; (b) en hiver	175
Figure 58 : Composition algale (basé sur le nombre de cellules) du périphyton en été	176
Figure 59 : Composition algale (basé sur le nombre de cellules) du périphyton en hiver	177
Figure 60 : Résultats de l'analyse MRPP (statistique A) sur les données de microscopie pour l'échantillonnage d'été (a) et d'hiver (b)	178
Figure 61 : CAH réalisée à partir du biovolume de la communauté totale (microalgues et diatomées) en été (a) et en hiver (b)	179
Figure 62 : CAH sur matrice de dissimilarité issue des résultats de DGGE pour le 16S : (a) en été ; (b) en hiver	180

Figure 63 : Schéma bilan représentant les changements de structure et de diversité du périphyton en lien avec la localisation le long de la Morcille et la vitesse du courant en été (a) et en hiver (b).....	185
Figure 64 : Schéma conceptuel des variables influençant le développement du périphyton. Les flèches en orange représentent les interactions testées au cours de ce travail	190
Figure 65 : Fréquence des différentes formes de relations entre diversité et perturbation reportée dans la littérature. (a) Effet de la diversité sur les perturbations. En gris, l'effet de la diversité sur le succès d'une invasion d'espèce, en blanc effet de la diversité sur le succès d'autres types de perturbations. Une relation négative indique que la diversité diminue l'effet de la perturbation ou de l'invasion. (b) Effets de perturbations sur la diversité. (c) Forme de la corrélation entre la perturbation (l'axe horizontal) et la diversité (l'axe vertical) (Hughes <i>et al.</i> , 2007).....	193
Figure 66 : Représentation schématique des caractéristiques de stabilité d'une communauté au cours du temps (Clements et Newman, 2002 modifié de Niemi <i>et al.</i> , 1990).....	196

Index des Tableaux

Tableau 1 : Biomasse moyenne (exprimée en mg.m ⁻² de chlorophylle a) en fonction du type de substrat.....	36
Tableau 2 : Biomasse moyenne (exprimée en mg.m ⁻² de chlorophylle) en fonction de la rugosité du substrat artificiel.....	37
Tableau 3 : Influence des aménagements des cours d'eau et de l'activité anthropique sur les variables environnementales et leurs effets potentiels sur la biomasse périphytique	39
Tableau 4 : Résultats d'étude de l'effet de la vitesse du courant sur le périphyton ; Chlo a : Chlorophylle a ; MSSC : matière sèche sans cendre.....	40
Tableau 5 : Teneur en diuron (1998-1999) d'après IFEN 2001.....	52
Tableau 6 : Statistiques de recherche et de quantification du diuron dans les eaux de surface et souterraines (IFEN 2002).....	54
Tableau 7 : Différents résultats de test de toxicité du diuron sur des micro-algues.....	55
Tableau 8 : Préparation des solutions mères de pesticides.....	62
Tableau 9 : Concentration (mg.L ⁻¹) d'exposition des algues pour le test d'inhibition de la croissance.....	62
Tableau 10 : Teneur (µg.L ⁻¹) des différents pesticides recherchés dans la Morcille en Juin 2005	72
Tableau 11 : Teneur (µg.L ⁻¹) des différents métaux lourds recherchés dans la Morcille en Juin 2005.....	73
Tableau 12 : Conditionnement des échantillons et principales analyses effectuées pour les différents niveaux d'étude	75
Tableau 13 : Programme PCR pour l'amplification de l'ADN codant pour l'ARN 16s.....	85
Tableau 14 : Programme PCR pour l'amplification de l'ADN codant pour l'ARN 18s.....	85
Tableau 15 : Valeurs des paramètres de structure (biomasse et densité cellulaire) et de production.....	95
Tableau 16 : Nombre de OTUs observé sur les profils DGGE issus de l'amplification du gène codant pour l'ARN 16S.....	97
Tableau 17 : Teneurs en diuron et azoxystrobine dans l'eau des canaux témoin (T) et pollué (P)	111
Tableau 18 : Teneur au sein du périphyton en azoxystrobine (AZS), diuron (DIU) et ses produits de dégradation (DCA et DCMU) au sein du périphyton après 67 jours de croissance.....	111
Tableau 19 : Résultats des tests d'inhibition de la croissance algale (<i>Selenastrum Capricornutum</i>) CE50 et nombre de Hill estimés à partir de la courbe dose-effet (macro REGTOX).....	112
Tableau 20 : Paramètres généraux de structure (biomasse, densité bactérienne et algale) et descripteurs de production (production primaire et bactérienne) des biofilms en automne, pour les canaux témoin et pollué, au sein des zones lentes et rapides.....	114
Tableau 21 : Résultats de l'ANOVA à trois facteurs (pollution, vitesse et date) et des tests de Tukey-HSD (α= 5%) réalisés sur les descripteurs de structure générale et de production	115
Tableau 22 : Valeurs de CE50 en µg.L ⁻¹ calculées à partir de la méthode PICT et à l'aide de la macro REGTOX.....	115
Tableau 23 : Nombre de OTUs observées sur les profils DGGE issus de l'amplification du gène codant pour l'ARN 18S.....	116
Tableau 24 : Nombre d'OTUs observées sur le gel DGGE correspondant à l'amplification du gène codant pour l'ARN 16S.....	119
Tableau 25 : Teneur en diuron et azoxystrobine (µg.L ⁻¹) dans l'eau du canal témoin (T), pollué (P) et dans l'eau d'alimentation (E).....	128
Tableau 26 : Teneur en azoxystrobine, diuron et ses produits de dégradation (DCA et DCMU) au sein du périphyton du 37 ^{ème} au 77 ^{ème} jour de croissance dans le canal témoin (T) ou pollué (P) en zone lente (L) ou rapide (R).....	129
Tableau 27 : Paramètres généraux de structure (biomasse, densité bactérienne et algale) et descripteurs de production (production primaire et bactérienne) des biofilms en été, pour les canaux témoin et pollué, au sein des zones lentes et rapides	130
Tableau 28 : Résultat de l'ANOVA à trois facteurs (pollution, vitesse et date) et des tests de Tukey (α = 5%) réalisés sur les descripteurs de structure générale et de production. En grisé les valeurs statistiquement significatives au seuil de 5%.....	131

Tableau 29 : Valeurs de CE50 en $\mu\text{g.L}^{-1}$ estimées à partir de la méthode PICT et à l'aide de la macro REGTOX.....	134
Tableau 30 : Nombre de OTUs observées sur le gel DGGE correspondant à l'amplification du gène codant pour l'ARN 18S.....	135
Tableau 31 : Nombre de OTUs observées sur le gel DGGE correspondant à l'amplification du gène codant pour l'ARN 16S.....	139
Tableau 32 : Teneurs en diuron et azoxystrobine ($\mu\text{g.L}^{-1}$) dans l'eau des canaux témoins (TM : témoin mixte, et TL : témoin laminaire), pollués (PM : pollué mixte, et PL : pollué laminaire).....	152
Tableau 33 : Teneur en Azoxystrobine (AZS), Diuron (DIU) et ses produits de dégradation (DCA, DCMU) au sein du périphyton après 67 jours de croissance.....	153
Tableau 34 : Paramètres généraux de structure et descripteurs de production au sein des biofilms en automne, pour les 4 canaux.....	155
Tableau 35 : Résultats de l'ANOVA à trois facteurs (pollution, vitesse et date) et des tests de Tukey-HSD réalisés sur les descripteurs de structure générale.....	156
Tableau 36 : Valeurs de CE50 en $\mu\text{g.L}^{-1}$ estimées à partir de la méthode PICT et à l'aide de la macro REGTOX.....	156
Tableau 37 : Nombre d'OTUs observées sur le gel DGGE correspondant à l'amplification du gène codant pour l'ARN 18S.....	157
Tableau 38 : Nombre d'espèces détectées par microscopie.....	159
Tableau 39 : Nombre d'OTUs observées sur le gel DGGE correspondant à l'amplification du gène codant pour l'ARN 16S, aux 5 dates d'échantillonnage.....	160
Tableau 40 : Test de l'effet du facteur saisonnier : résultats de l'ANOVA à un facteur (saison) pour les descripteurs biologiques.....	172
Tableau 41 : Descripteurs généraux de structure et de production du périphyton en été.....	172
Tableau 42 : Test de l'effet de la vitesse et du site d'échantillonnage en été : résultats de l'ANOVA à deux facteurs (site et vitesse) pour les descripteurs biologiques (production primaire, biomasse, densité bactérienne et phytobenthique) et résultats des tests de Tukey.....	172
Tableau 43 : Descripteurs généraux de structure et de production du périphyton en hiver.....	172
Tableau 44 : Test de l'effet de la vitesse et du site d'échantillonnage en hiver : résultats de l'ANOVA à deux facteurs (site et vitesse) pour les descripteurs biologiques.....	172
Tableau 45 : Nombre de bandes observées sur les profils DGGE issus de l'amplification du gène codant pour l'ARN 18S.....	175
Tableau 46 : Nombre d'espèces, nombre de genres et principaux indices biologiques (IPS et IBD) déterminés à partir des données d'analyse par microscopie des échantillons de périphyton de la Morcille en été et en hiver.....	176
Tableau 47 : Nombre d'OTUs observées sur les profils DGGE de l'analyse 16S.....	179
Tableau 48 : Coefficient de variation (en %) de la biomasse, la densité bactérienne et la production primaire au cours des expérimentations en microcosmes, mésocosmes et <i>in situ</i>	198
Tableau 49 : Valeurs de différents descripteurs de structure et de diversité après environ 42 jours de colonisation du périphyton pour les trois niveaux d'expérimentation (microcosmes, mésocosmes-été et <i>in situ</i> -été).....	199
Tableau 50 : Approches expérimentales utilisant le biofilm pour évaluer l'effet de toxiques sur le biofilm. Ces expérimentations ont été réalisées sur le terrain ou en mésocosmes. Sabater et al. (2007).....	203

Introduction générale et hypothèses

L'eau est une ressource essentielle pour l'homme et un milieu de vie pour de nombreuses espèces animales et végétales. Elle est également nécessaire aux activités économiques : des prélèvements d'eau sont en effet quotidiennement effectués pour de multiples usages (l'alimentation en eau potable, l'irrigation, la production d'énergie, les activités industrielles...). Les milieux aquatiques sont également le réceptacle de la quasi-totalité des rejets liquides des villes, industries et activités agricoles. Ils font également l'objet d'aménagements (drainage, barrage...) qui peuvent en perturber l'équilibre. L'enjeu, à l'échelle française et mondiale, est de gérer de façon équilibrée les besoins en eau liés aux activités humaines et la préservation de la ressource en eau, tant en quantité qu'en qualité.

Aujourd'hui, rares sont les régions du monde épargnées par la pollution et les milieux aquatiques continentaux non contaminés. On estime ainsi que la moitié des fleuves et des lacs européens et nord-américains est gravement polluée. Selon les experts du Conseil Mondial de l'Eau (Rapport du 2^{ème} Forum mondial de l'eau, 2000), seuls deux des principaux fleuves mondiaux peuvent être qualifiés de sains : l'Amazone et le Congo. Au total, 50 % des espèces aquatiques d'eau douce ont disparu entre 1970 et 2000 ou sont menacées d'extinction (2^{ème} rapport mondial des Nations Unies, 2006).

Les pressions exercées sur les écosystèmes d'eau douce sont très variées et souvent d'origine humaine, en lien avec différents facteurs :

- Croissance de la population et de la consommation.
- Développement des infrastructures (barrages, urbanisation, autoroutes).
- Conversion des terres (déforestation, agriculture, urbanisation).
- Surexploitation (destruction des pêches, irrigation peu rentable).
- Rejet de polluants (matières de vidange, produits agrochimiques et effluents industriels).
- Introduction d'espèces exotiques (remplaçant ou menaçant les espèces indigènes).

Parmi ces perturbations, le rejet de polluants du fait de l'industrie ou des activités agricoles peut avoir de graves conséquences sur la biodiversité des écosystèmes aquatiques et sur l'alimentation en eau potable. On distingue trois types majeurs de pollution : les métaux lourds, les nutriments et enfin les pesticides.

Les métaux lourds peuvent être essentiels ou non aux organismes. Un métal est dit essentiel lorsqu'il est indispensable à la vie et donc présent dans les tissus des organismes à des concentrations constantes. En l'absence de ces métaux (Ca, Mg, Fe...), on observe des dérèglements fonctionnels qui disparaissent après administration de ces éléments. Cependant, à plus forte dose, ces métaux peuvent générer une toxicité comme par exemple

le Cuivre et Zinc (Casarett et Doull, 1980). Les autres métaux (Hg, Cd...) sont des métaux dits non-essentiels qui peuvent avoir un impact sur l'environnement et la santé humaine. Les métaux sont présents partout et sont transportés vers les milieux aquatiques par l'air (déposition sèche), les eaux de pluies (déposition humide) ou par érosion des roches. Le développement de l'industrie (métallurgique, minière, papetière...) et de l'agriculture a largement contribué à la dégradation de la qualité des eaux par les métaux (Nriagu, 1979 ; Lantzy et Mackenzie, 1979 ; Liang *et al.*, 2004). Bien que certains de ces contaminants puissent être adsorbés sur les particules en suspension ou sur les sédiments, dans des conditions favorables de pH et de conductivité, ils peuvent être aussi relargués et dissous dans la colonne d'eau. Ainsi, le niveau de contamination des eaux peut se maintenir même sans apports extérieurs. De nombreux métaux sont toxiques pour les organismes aquatiques : Hg, Cr, Cd, Ni, Cu, Pb ... et les atteintes peuvent apparaître à tous les niveaux trophiques (certains métaux lourds pouvant être bio accumulés par les organismes (Borgmann *et al.*, 2004 ; Croteau *et al.*, 2005 ; Campbell *et al.*, 2006). Par exemple, des tests d'inhibition de la croissance de l'algue *Chlorella ellipsoidea* en présence de Cu, Zn, Ni et Cd ont montré une corrélation négative entre la concentration en métaux lourds et la teneur en chlorophylle *a* (Hao *et al.*, 2001). A un niveau trophique supérieur, Xu *et al.* (2002) ont montré qu'il existait une relation entre la diversité du zooplancton et la teneur en Cu dans la colonne d'eau. Enfin, l'exemple le plus marquant de contamination des eaux par les métaux est celui de la catastrophe de Minamata. De 1932 à 1968, une usine pétrochimique rejetait ses eaux usées, chargées en mercure, dans la baie de Minamata. Ce mercure a été bioaccumulé dans les poissons, crustacés et mollusques. Ces produits, consommés par la population locale, ont été à l'origine d'une maladie neurologique liée à l'ingestion de mercure : la maladie de Minamata (Harada, 1995 ; Ninomiya *et al.*, 1995 ; Akagi *et al.*, 1998 ; Harada *et al.*, 1998).

Les activités industrielles et agricoles et les rejets ménagers sont également à l'origine d'un autre type de pollution : la dégradation des milieux aquatiques par l'augmentation des teneurs **en nutriments** (nitrate, phosphate) provoquant l'eutrophisation des milieux. Ce serait même, d'après Mainstone et Parr (2002) la principale cause de dégradation des écosystèmes aquatiques dans les pays développés. Cependant, contrairement à la pollution liée aux métaux lourds, cette forme de pollution n'a pas d'effet notable sur la santé humaine (sauf en cas de bloom algaux produisant des toxines), mais elle a des conséquences environnementales et économiques importantes. Pretty *et al.* (2003) ont estimé à 100 millions de £ par an le coût de l'eutrophisation en Angleterre, en terme de traitement des eaux (élimination des nitrates pour l'eau potable), de perte de biodiversité...

Enfin, **les pesticides** (insecticides, raticides, fongicides, et herbicides) sont des composés chimiques dotés de propriétés toxicologiques, utilisés par les agriculteurs pour lutter contre les animaux ou les plantes jugés nuisibles. Malheureusement, une grande partie des pesticides est dispersée dans l'atmosphère, soit lors de leur application, soit par évaporation... Disséminés par le vent et parfois loin de leur lieu d'épandage, ils retombent avec les pluies directement sur les plans d'eau et sur les sols. Ils sont ensuite drainés vers les milieux aquatiques par les eaux de pluie (ruissellement et infiltration). Les pesticides sont aujourd'hui à l'origine d'une pollution diffuse qui contamine toutes les eaux continentales : cours d'eau, eaux souterraines et zones littorales. En France, le rapport de l'IFEN pour l'année 2005 rapporte que des pesticides ont été détectés dans 91% des points de mesure des cours d'eau et dans 55% des points de mesures des eaux souterraines. 36% des stations échantillonnées ont une qualité de l'eau allant de moyenne à très mauvaise qualité (selon le SEQ eau). Les impacts des pesticides sur les milieux aquatiques sont très variés et dépendent de la nature des pesticides utilisés. Tous réseaux confondus, 408 substances ont été recherchées dans les eaux superficielles, et 201 (49 %) ont été détectées au moins une fois. Parmi elles, les herbicides sont les produits phytosanitaires les plus fréquemment détectés dans les eaux superficielles.

Outre ces changements de la qualité chimique de l'eau, la plupart des milieux aquatiques ont été profondément remaniés par l'homme. De nombreux **aménagements de cours d'eau** ont été réalisés : dragage, canalisation, endiguement, mais aussi rectification du cours et recalibrage. Ces aménagements répondent à des objectifs légitimes : protéger des inondations, lutter contre l'érosion des berges, faciliter la navigation fluviale, produire de l'énergie, irriguer, alimenter en eau potable les hommes et le bétail, et, beaucoup plus récemment, créer des bases de loisirs. Mais ils ont souvent été conduits dans l'ignorance des fonctionnements hydrologique et écologique des systèmes fluviaux. Or, ces aménagements modifient de façon durable les composantes physiques des cours d'eau : pente, profondeur, vitesse du courant, forme et nature des berges, ensoleillement. Tous ces aménagements peuvent avoir des répercussions sur le fonctionnement des écosystèmes, répercussions qui ont été insuffisamment prises en considération (Malavoi et Adam, 2007a et b).

Suite à ces constats et pour évaluer l'impact de ces perturbations, les pouvoirs publics en Europe, le Conseil et le Parlement européens, ont adopté en octobre 2000 la Directive-Cadre sur l'Eau (2000/60/CE). Cette Directive aux objectifs ambitieux - l'atteinte du « bon état écologique » des masses d'eau superficielles et souterraines en 2015 - définit un cadre communautaire pour la gestion et la préservation des eaux. Elle soulève également de

très nombreuses questions scientifiques, dont celle relative à la définition du « bon état écologique », ainsi que des contraintes techniques (comparaison des sites et définition des situations de références) et financières fortes.

La DCE prévoit tout d'abord la mise en place d'un système de référence par type de cours d'eau afin de permettre des comparaisons à l'échelle de l'Europe. En effet, les variations naturelles observées d'un cours d'eau à l'autre rendent problématique et contestable la recherche d'un système applicable partout et surtout la référence à une situation idéale unique. Pour la description des sites de référence, la DCE laisse le choix entre deux systèmes typologiques :

- le système A figé, basé sur des écorégions et des paramètres imposés avec des limites de classe prédéfinies,
- et un système B plus souple avec plusieurs paramètres optionnels (Directive Cadre Européenne sur l'eau).

Les deux systèmes sont basés sur des caractéristiques abiotiques naturelles et requièrent *a minima* une base géographique incluant la géologie et l'altitude, couplée à la taille du cours d'eau. Malgré sa rigidité, le système A est utilisable car la diversité naturelle des écosystèmes est essentiellement influencée par leurs caractéristiques géographiques, ainsi que par la dimension du bassin. Il est cependant critiquable pour deux raisons : (1) les écorégions proposées sont en fait des limites biogéographiques tirées de la distribution des espèces aquatiques, sans relations fortes avec l'écosystème et (2) les classes prédéfinies ne permettent pas une discrimination évidente des discontinuités spatiales (Wasson *et al.*, 2004). Pour ces raisons, le CEMAGREF a développé en France une approche par hydro-écorégions (Wasson *et al.*, 2002), spécifiquement dédiée à la typologie des eaux courantes, et en accord avec les exigences de la Directive Cadre Européenne sur l'eau. L'approche par écorégions a été adaptée aux écosystèmes aquatiques par divers auteurs à partir de 1987 afin de définir des objectifs régionaux pour la qualité et la gestion de l'eau. Ces auteurs identifient la géologie, le relief et le climat comme les déterminants primaires du fonctionnement des écosystèmes d'eau courante à l'échelle du bassin versant qui permettent de délimiter des hydro-écorégions (Wasson *et al.*, 2002).

Une fois la caractérisation du biotope réalisée, on évalue l'état écologique du cours d'eau par rapport à la situation de référence de l'hydro-écorégion. L'état écologique du cours d'eau est déterminé à partir de trois critères : les paramètres hydrobiologiques, les éléments physico-chimiques et la qualité biologique.

La qualité physico-chimique est évaluée à partir de la présence de trois éléments :

- les macro-polluants : il s'agit de la pollution « classique ». Ces macro-polluants ne deviennent gênants qu'à fortes doses : matières en suspension (MES), nutriments (nitrates/nitrites, phosphates...)
- les micro-polluants minéraux (métaux lourds : mercure, cadmium, plomb...). A la différence des macro-polluants, ils peuvent être toxiques à très faibles doses selon leur spéciation, y compris sous forme de traces. Ces polluants peuvent être d'origine naturelle et/ou anthropique.
- les micro-polluants synthétiques (ou xénobiotiques) : ces polluants sont d'origine anthropique : biocides, pesticides...

La qualité biologique est estimée à partir de la présence et de l'état de quatre groupes biologiques : les poissons, les invertébrés, la flore aquatique et le phytoplancton, via des indicateurs spécifiques, standardisés et normalisés. Sur ce plan, la Directive Cadre Européenne sur l'Eau laisse chaque Etat membre libre de choisir ses indicateurs. Actuellement, en France, les indicateurs biocénologiques validés par une normalisation AFNOR sont au nombre de 5 : l'indice biologique global normalisé (IBGN 1992 NF T 90-350), l'indice biologique diatomées (IBD 2000 NF T 90-354), l'indice oligochètes de bio-indication des sédiments (IOBS 2002NF T 90-390), l'indice biologique macrophyte en rivière (IBMR 2003 NF T 90-395) et enfin l'indice poisson en rivière (IPR 2004 (NF T 90-334) (Perrin *et al.*, 2004). Cependant ces indicateurs n'ont pas été construits sur les bases des exigences de la Directive Cadre Européenne sur l'eau du fait de leur antériorité (sauf pour l'indice poisson normalisé en 2004). Ils s'évaluent par rapport à une référence unique, ne tenant ainsi pas compte du type de cours d'eau. Une mise à jour a été réalisée dans ce sens par le CEMAGREF concernant l'IBD et l'IBGN (mise à jour 2004 de la norme AFNOR). Les indices concernant les végétaux supérieurs et les oligochètes ne peuvent actuellement être mis à jour par manque de données permettant d'établir des statistiques fiables. La France dispose donc de trois indices répondant aux critères de la Directive Cadre Européenne sur l'eau : IBD, IBGN et IPR, ceux-ci ayant été conçus pour évaluer une population par rapport à une référence. Pour combler les écarts entre les différents indicateurs utilisés par les Etats membres, des harmonisations sont en cours pour intercalibrer leurs significations.

Dans cette Directive, les microorganismes périphytiques (microalgues, bactéries...) ne sont donc pas nommément cités (sauf les Diatomées), mais ils sont identifiés comme un des éléments clés du contrôle de la qualité chimique des milieux et de l'établissement (ou non) de biocénoses caractéristiques d'un « bon état écologique ». En effet leur rôle dans les processus bio(géo)chimiques constituant les cycles élémentaires (Carbone, Azote, Phosphore, ...) en font un maillon essentiel dans l'évolution des teneurs en nutriments et en matière organique des hydrosystèmes (Paerl et Pinckney, 1996). Ils influencent la qualité

écologique des milieux en créant des conditions environnementales favorables ou non aux biocénoses « supérieures » (invertébrés, poissons). Ces microorganismes sont au carrefour de nombreuses interactions bio-chimiques, parfois contradictoires (stimulation, inhibition) et leurs structure, diversité et fonctionnement peuvent être, en retour, affectés par une modification des conditions physico-chimiques du milieu. Ainsi, à travers leur diversité taxonomique ou fonctionnelle, les microorganismes peuvent révéler des changements de conditions environnementales et, sous certaines conditions, être de bons indicateurs biologiques de la qualité écologique et chimique des milieux aquatiques (Amann, 2000 ; Eismann et Montuelle, 1999 ; Montuelle et Volat, 1998 ; Ainsworth et Goulder, 2000). Le choix du périphyton comme bio-indicateur permet donc de compléter les outils nécessaires à la mise en place de la DCE et à l'évaluation et la compréhension de l'impact de perturbations physiques ou chimiques sur les masses d'eau.

Cependant, le choix d'un indicateur ne suffit pas, il faut également réfléchir au niveau d'observation de cet indicateur. La définition de bio-indicateurs qui sont selon Blandin (1986) « des organismes ou ensemble d'organismes qui - par référence à des variables biochimiques, cytologiques, physiologiques, éthologiques ou écologiques – permettent de façon pratique et sûre de caractériser l'état d'un écosystème ou d'un écosystème et de mettre en évidence aussi précocement que possible leurs modifications naturelles ou provoquées », est une définition très large et ambitieuse. En effet, elle regroupe plusieurs niveaux d'organisation du vivant (cellulaire, individus et même communauté) répondant chacun à des questions précises. Le bio-indicateur retenu pour cette thèse est le périphyton. Nous étudierons les effets de pesticides (diuron et azoxystrobine) et par une modification de la vitesse du courant en milieu lotique sur les communautés constitutives du périphyton (bactéries et algues) en travaillant à trois niveaux d'observation : (1) l'individu (bio-essai), (2) la communauté dans un environnement plus au moins contrôlé (microcosme et mésocosme) et enfin (3) la communauté *in situ*.

Le premier niveau d'évaluation de l'impact de polluants, et probablement le plus usité, est le **bio-essai mono-spécifique**. De ces essais, qui satisfont au mieux les exigences de répétabilité, de reproductibilité, de fiabilité et de robustesse, découlent les valeurs seuils d'effet de molécules polluantes (NOEC, LOEC, EC₅₀...). Cependant, ces essais manquent de réalisme écologique car ils suppriment les relations espèce-espèce et espèces-environnement responsables de la stabilité des écosystèmes et de la modulation éventuelle d'effets toxiques. Ainsi, la question de Cairns *et al.* (1996) fait toujours débat : « les effets observés à l'échelle de l'individu (croissance, reproduction...) dans le cadre d'essais mono-spécifiques permettent-ils de prédire les effets sur les populations et les communautés sachant que ces derniers sont

évalués sur d'autres critères tels que la composition (diversité spécifique et abondance), la structure (relation trophique) et la productivité (dynamique trophique) ? ».

Pour apporter des éléments de réponse à cette question et vérifier la pertinence des valeurs seuils obtenues par les mono-essais nous avons donc poursuivi nos investigations à un niveau plus complexe.

Ce deuxième niveau d'évaluation requiert l'utilisation de **systèmes expérimentaux** ayant un environnement contrôlé ou partiellement contrôlé (microcosmes de laboratoire et mésocosmes en extérieur) dans lesquels se développent des **communautés périphytiques**. L'application de polluants peut se faire en continu à faibles doses et ainsi, nous pouvons tester des effets sub-létaux tels que des modifications des caractéristiques intrinsèques de ces communautés (Tlili *et al.*, 2008).

Dans le cadre des études menées *in situ* sur le périphyton, les scientifiques sont confrontés à l'hétérogénéité spatiale et temporelle de la distribution des communautés. Cette hétérogénéité est, en partie, associée à la variabilité de la nature et de la taille des substrats naturels servant de supports pour la colonisation du périphyton. L'installation du périphyton sur des supports identiques (lames de verre) au sein de nos systèmes permettra donc de s'affranchir de cette variabilité. De plus, le contrôle du temps de colonisation, des conditions chimiques (concentration en nutriments, intensité du stress polluant...) et physiques (luminosité, vitesse du courant...) permettra d'établir une relation « exposition-effet » et non une réponse « dose-effet » pour caractériser l'impact de pesticides sur le périphyton. Les systèmes expérimentaux décrits dans cette thèse sont des maillons indispensables entre les bio-essais de laboratoire et les études *in situ* afin de comprendre les mécanismes de réponse et de résilience à un stress polluant impactant des communautés. Ils nous permettront d'émettre des hypothèses qui seront ultérieurement validées ou non *in situ*. En particulier, on considérera ici que les biais liés à l'artificialité d'un dispositif expérimental constituent un inconvénient mineur au regard des avantages apportés par le contrôle des variables les plus influentes (intensité lumineuse, vitesse du courant...) sur la dynamique du périphyton. Via ces systèmes, nous pourrions évaluer la pertinence des bio-descripteurs choisis pour évaluer l'impact de polluants sur les communautés microbiennes aquatiques en terme de diversité, d'architecture et de fonctions. Nous pourrions également observer les éventuelles interactions entre deux types de stress : physique et chimique.

Enfin, un troisième niveau d'observation est **l'étude des communautés *in situ*** qui permet d'appréhender une situation écologique avec réalisme par la prise en compte globale de l'ensemble des caractéristiques physiques, chimiques et biologiques de l'écosystème étudié. Toutefois, compte tenu de la complexité des milieux aquatiques naturels, il est alors

difficile de dissocier l'effet des différents facteurs, biotiques et abiotiques, sur la réponse des organismes choisis pour évaluer l'effet de polluants : facteurs de confusions, variabilités locales ou globales, interactions... Nous avons donc, comme de nombreux auteurs, choisis de travailler préalablement avec des systèmes expérimentaux (essais de laboratoire, microcosmes et mésocosmes) permettant de simplifier la situation environnementale réelle et ainsi d'isoler certains facteurs d'intérêt pour en tester l'effet (effet des pesticides et importance des facteurs physiques) puis, dans un second temps, de tester les effets *in situ*, en situation environnementale complexe.

Quel que soit le niveau d'étude du périphyton, les connaissances actuelles sur sa composition et sa dynamique montrent l'importance de bien prendre en compte l'évolution temporelle du biofilm si l'on veut comprendre son rôle dans l'environnement et élaborer des indicateurs fiables et pertinents de la qualité des milieux aquatiques. La dynamique de la biomasse du périphyton à court terme peut en effet se définir par une succession de trois phases (Biggs, 1996 et Chapitre 1, p 34) : une phase de colonisation, une phase exponentielle de croissance et enfin une phase de sénescence. Schématiquement, on définit un pic de biomasse (PB) obtenu après un certain temps de développement (noté T_{pb}). Cette dynamique est contrôlée par de nombreux facteurs, biotiques ou abiotiques, naturels ou anthropiques. Des changements de ces facteurs ou de leur intensité entraînent une modification de la dynamique du biofilm : décalage temporel du pic de biomasse (plus précoce ou plus tardif), modification de son intensité par rapport à une situation de référence. De même, le fonctionnement du biofilm (via différents descripteurs) varie également selon cette dynamique et son contrôle par les facteurs environnementaux. Battin *et al.* (2003b) ont par exemple prouvé qu'une augmentation de la vitesse du courant entraîne une diminution de l'épaisseur du biofilm et une augmentation de la densité bactérienne. Ces modifications d'évolution du biofilm peuvent être accompagnées de changement de diversité. Par exemple, des biofilms sous conditions limitantes de lumière seront des biofilms majoritairement composés de diatomées tandis qu'au sein de biofilms plus fortement éclairés, on voit se succéder les diatomées, les chlorophycées et parfois les cyanobactéries (Biggs, 2000 ; Sekar *et al.*, 2002).

Pour chaque expérimentation réalisée dans cette thèse, nous testons donc l'hypothèse générale **qu'une modification des facteurs physiques (notamment l'intensité lumineuse et la vitesse du courant) entraîne une modification de la dynamique et/ou de la structure et de la composition du biofilm et donc de sa réponse à la présence de polluants (en termes de diversité et de fonctionnement des communautés périphytiques)**. Cette hypothèse sera testée pour des variations

« environnementales » des facteurs étudiés, cohérentes avec les observations de terrain de ces facteurs (vitesse de courant, concentration en pesticides).

* Cette hypothèse a d'abord été testée **au sein de microcosmes** où le périphyton se développait sous deux conditions lumineuses (« éclairé » versus « sous ombrage ») et en présence ou non de diuron (herbicide) à une faible concentration ($1\mu\text{g.L}^{-1}$), telle que rencontrée dans l'environnement (Dorigo *et al.* 2007). Nous pensons ainsi :

- observer un décalage du développement des biofilms placés en condition limitante de lumière. En s'appuyant sur le modèle de Biggs, on émet l'hypothèse que le pic de biomasse sera plus tardif et quantitativement limité par rapport à une situation où la lumière n'est pas limitante, toutes autres conditions étant égales par ailleurs.

- caractériser des espèces plus aptes à se développer dans des conditions limitantes de lumières, notamment des diatomées.

- mettre en évidence qu'à ces changements de diversité et de structure, sont associés une modification de la réponse et un changement de la tolérance des communautés périphytiques à un même stress toxique (méthode PICT). Par exemple, les diatomées étant des espèces généralement plus résistantes à la présence d'herbicides que les chlorophycées (El Jay, 1998), les biofilms sous ombrage devraient donc être plus tolérants à la présence de polluants.

* Un autre facteur physique d'intérêt pour la structuration des biofilms est la vitesse du courant. Les petits milieux lotiques sont composés d'une succession de différents faciès hydrauliques, radier, mouille, cascade...Chacun de ces faciès est, en théorie, caractérisé par des communautés périphytiques adaptées aux conditions environnementales locales. En mettant en œuvre des **mésocosmes d'extérieur**, l'objectif était de créer des zones très contrastées en terme d'hydraulique avec comme hypothèse sous jacente l'émergence de communautés périphytiques différentes.

Nous pensons ainsi observer :

- un retard d'installation et une moindre densité périphytique au sein de zones d'hydraulique rapide (du fait de l'abrasion par exemple) ;

- un changement de diversité en lien avec la vitesse du courant (notamment un développement plus important d'algues filamenteuses au sein de zones de faible courant) ce qui pourrait entraîner une différence de réponse et de tolérance aux pesticides entre des communautés des zones lentes et rapides.

- une répercussion de la présence de micro-habitats physiques diversifiés (caractérisés par une large gamme de vitesses de courant) sur la réponse des périphytons, par comparaison de rivières artificielles hétérogènes ou homogènes sur le plan hydraulique.

- Enfin, il est probable que des variations saisonnières entraînent des différences de structure, de diversité et de fonctionnement des biofilms et donc une différence de sensibilité à la présence de molécules polluantes.

* **L'étude *in situ*** permettra d'approfondir ces résultats en caractérisant les communautés périphytiques et leurs réponses au stress chimique en fonction du régime hydraulique dans un gradient de pollution.

Un cas concret d'impact des pesticides sur les communautés périphytiques aquatiques est celui de la Morcille. La Morcille, affluent de l'Ardières, est une petite rivière (8km) d'ordre 1, qui traverse un bassin versant occupé à 60-70 % par de la vigne, avec un habitat dispersé, sans traitement d'effluent. Les communautés périphytiques de ce cours d'eau sont soumises essentiellement à deux types de pollution : les phytosanitaires (utilisés pour le traitement de la vigne) et la pollution organique (liée à la présence des habitats). Ce bassin versant fait l'objet d'un suivi physico-chimique et écologique depuis plusieurs années dans le cadre de la Zone Atelier Bassin du Rhône et d'un programme régional (Montuelle *et al.*, 2006). Ces études sur la qualité de l'eau, montrent qu'il existe un gradient chimique amont-aval, caractérisé par une augmentation de la teneur en MO (COD) et en certains nutriments (PO₄, nitrites, ammonium). Des suivis périodiques des phytosanitaires présents dans l'eau de la Morcille montrent un gradient de concentrations croissant d'amont en aval, en situation d'étiage ou de crue (Rabiet *et al.*, 2008). La station amont de ce cours d'eau peut être considérée comme exempte de pollution phytosanitaire et trophique et est utilisée comme station de référence. Les résultats préliminaires ont montré un changement global et permanent de diversité et de tolérance des communautés périphytiques le long du gradient amont-aval de pollution. Le présent travail aborde les interactions entre niveaux de contaminations et facteurs hydrauliques et permet d'évaluer la pertinence des résultats obtenus en microcosmes et mésocosmes. Ainsi, nous devrions :

- Confirmer une différence de structure des communautés périphytiques entre l'amont et l'aval, en lien avec le gradient de contamination.

- Observer, en accord avec nos expérimentations en rivières artificielles, des différences de structuration et de diversité des communautés issues de zones d'hydraulique différente.

- Caractériser, *in situ*, des réponses différentes au mélange de polluants de la part des communautés issues de zones d'hydraulique différente.

- Enregistrer une modification de la réponse des communautés en lien avec les changements saisonniers.

Nous testerons l'hypothèse que, pour une évaluation de l'impact de substances polluantes *in situ*, il peut être important de prendre en compte les différents faciès d'un cours d'eau ainsi que la saison d'échantillonnage.

En résumé, cette thèse a donc trois objectifs bien distincts :

- **Le premier objectif, du domaine de l'écotoxicologie, consiste à évaluer l'impact de pesticides à de faibles concentrations (inférieures aux NOEC) sur des communautés périphytiques.**

- **Le second objectif, plus basé sur les théories de l'écologie, entre dans le débat de la relation biodiversité-fonctionnement des écosystèmes. Nous cherchons à évaluer la conséquence d'une modification de diversité et/ou architecture des biofilms provoquée par une variation de facteurs physiques (naturels ou anthropiques) sur le fonctionnement et la réponse des communautés à une perturbation (stress polluant).**

- **enfin le dernier objectif, plus finalisé, permet de préciser la stratégie d'échantillonnage des cours d'eau et d'aider au choix des bio-descripteurs pour l'évaluation de l'impact de xénobiotiques sur la qualité des milieux.**

Enfin, une analyse « transversale » de ces résultats, s'appuyant sur les différents niveaux d'études abordés (du bio-essai à l'*in situ*) permettra de discuter des méthodologies expérimentales mises en œuvre et du changement d'échelle ainsi réalisé.

Chapitre 1 :

Revue bibliographique

A- Modèle biologique : le périphyton

Le périphyton¹ est un mode de développement microbien ubiquiste des écosystèmes aquatiques et plus particulièrement de toute surface immergée. Il joue un rôle essentiel dans le fonctionnement des écosystèmes aquatiques car il est le siège de processus auto- et hétérotrophes intervenant dans les principaux cycles biogéochimiques (Kostel *et al.*, 1999) et de ce fait assure le recyclage des différents éléments constitutifs de la matière vivante par transformation d'un état organique à un état minéral et inversement. Par sa composante algale, le périphyton contribue largement à la production primaire, c'est à dire, la synthèse de matière organique vivante à partir de matière minérale grâce à la photosynthèse. Par sa composante hétérotrophe, il assure la biodégradation et la minéralisation de composés organiques et le recyclage des nutriments. Il constitue enfin, par sa biomasse, une source de nourriture importante pour les invertébrés (Cattaneo et Kalff, 1980) et leur sert aussi de refuge (Kostel *et al.*, 1999), tout au moins pour les cours d'eau de tête de bassin.

1- Définition

Selon Winpenny (2000) la définition du terme biofilm doit intégrer :

- (i) l'idée de surface ou d'interface sur laquelle se développent les microorganismes,
- (ii) la matrice de polymères extracellulaires qui enveloppe et protège les microorganismes constituant le biofilm,
- (iii) la notion de communauté et des propriétés fonctionnelles liées à la structure et la composition des biofilms.

Le périphyton désigne donc un assemblage de microorganismes vivant à la surface de substrats immergés d'origine minérale ou organique et qui peuvent être par ailleurs vivants ou morts (Wetzel, 1983). Il existe de nombreuses définitions du terme périphyton et toutes s'attardent sur sa complexité du fait de sa diversité. Sand-Jensen (1983) intègre à sa définition la notion d'évolution temporelle et décrit le périphyton comme un assemblage dynamique. Au cours de sa formation, une succession de différentes espèces algales est observée (Winpenny, 2000).

Il est donc important de retenir que les biofilms ont deux composantes principales : les microorganismes et la matrice des substances polymériques et que ces deux composantes évoluent dans le temps.

¹ Bien que ce terme désigne *sensu stricto* le biofilm se développant sur des surfaces végétales, nous le considérerons, comme de nombreux auteurs, comme générique et analogue à « biofilm » ou « épilithon ».

2- Structure et composition du périphyton

Les biofilms présentent un assemblage très varié d'organismes : procaryotes ou eucaryotes, unicellulaires ou pluricellulaires, autotrophes ou hétérotrophes. Ces organismes appartiennent à des niveaux trophiques différents : des producteurs primaires, des décomposeurs et des consommateurs. A ces trois compartiments, on peut également ajouter le compartiment viral. Ces organismes sont regroupés dans une matrice extracellulaire où ils entretiennent entre eux des relations complexes, telles que la consommation des exsudats algaux par les bactéries, mais également des relations compétitives susceptibles de mener à la dominance de certaines espèces (figure 1). Des phénomènes de prédation ont également lieu, en particulier via le broutage exercé par des invertébrés.

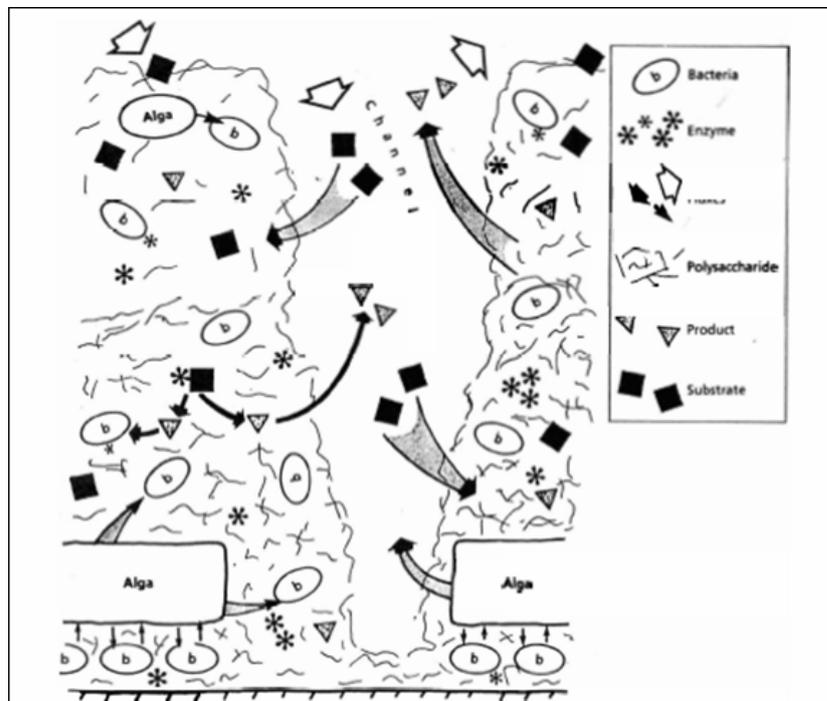


Figure 1 : Modèle conceptuel de la structure et des flux métaboliques au sein du périphyton (Lock, 1993 ; Wetzel, 2001)

2.1- La matrice extracellulaire

Les polymères extracellulaires (EPS) sont sécrétés par les organismes du biofilm et peuvent, à ce titre, être qualifiés de polymères biosynthétiques (Volatier, 2004). Ces polymères sont des composés chimiques très variés tels que des polysaccharides, des protéines, des acides nucléiques, des acides humiques et des phospholipides (Freeman et Lock, 1995 ; Flemming *et al.*, 2000, Nivens *et al.*, 2001). La nature des composés sécrétés diffère d'une espèce à l'autre et est également fonction de l'état physiologique des organismes (Christensen et Characklis, 1989). Cette matrice, partie intégrante du biofilm, assure de nombreux rôles :

- elle permet la structuration du biofilm et assure son intégrité (Flemming *et al.*, 2000)

- elle protège les organismes contre les agressions extérieures naturelles ou anthropiques et contre les facteurs intrinsèques du milieu : biotiques (broutage) (Lawrence *et al.*, 2002) ou abiotiques (Davies, 2000 ; Flemming *et al.*, 2000). Flemming (1995) montrait, par exemple, que la matrice permettait de protéger les organismes contre de nombreux stress environnementaux (radiations UV, modification du pH, choc osmotique...). En 1999, Elasir et Miller, confirmaient ces résultats, pour une espèce bactérienne : *Pseudomonas aeruginosa*. La présence de la matrice d'exopolymères (essentiellement des alginates) diminuait les risques de dommages à l'ADN dus à une exposition aux UV chez *P. aeruginosa*. Cette matrice a également la faculté de protéger les organismes contre certains agents anti-microbiens, comme les antibiotiques (Gilbert *et al.*, 1987) ou certains pesticides.

- Les composés organiques ou inorganiques dissous peuvent également être absorbés par la matrice (Wolfaardt *et al.*, 1998) ou transiter de la colonne d'eau aux organismes périphytiques via des « micro-canaux » au sein desquels la diffusion des éléments organiques et inorganiques est facilitée (Lock, 1993 ; Costerton *et al.*, 1994 ; Wimpenny et Colasanti, 1997) (figure 1). Ces composés peuvent être des éléments nutritifs mais également des xénobiotiques (Wolfaardt *et al.*, 1998) et le biofilm peut bioaccumuler ces composés. La bioaccumulation de métaux lourds (As, Cd, Pb, Hg et Zn) au sein de différents niveaux trophiques (sédiment, périphyton, invertébrés et poisson) d'une rivière de l'Idaho a été étudié par Farag *et al.* en 1998. Ils ont montré que la teneur en métaux était supérieure dans les biofilms par rapport aux autres compartiments.

- Enfin, la matrice agit comme une barrière de diffusion (Lock *et al.*, 1984, Jones et Lock, 1989) et favorise l'installation de gradients de diffusion pour les composés dissous. Elle se caractérise par la variété de micro-environnements qu'elle contient et qui constituent de multiples micro-habitats possibles pour les microorganismes. Cette matrice contient, pour les biofilms les plus épais par exemple, des zones aérobies et anaérobies permettant l'apparition d'une zonation fonctionnelle. Ces caractéristiques confèrent donc aux biofilms une complexité supplémentaire entraînant une diversification spatiale des organismes au sein de la matrice.

Pour conclure, les organismes vivants fixés à la surface d'un support au sein d'une matrice polymérique bénéficient donc d'échanges inter-cellulaires favorisés du fait de leur proximité. Des interactions existent entre les organismes eux-mêmes, entre les organismes et les composés de la matrice, entre les organismes et le substrat et enfin, entre les organismes et la colonne d'eau.

2.2- Les organismes périphytiques et leurs relations

Presque tous les microorganismes ont des mécanismes d'adhérence aux surfaces et entre eux. Ils peuvent s'intégrer à un biofilm en formation, de même qu'ils peuvent se détacher du biofilm sous l'action des forces mécaniques ou chimiques de l'environnement. L'adhésion est le fait de divers mécanismes : fimbria, pili, protéines de différents types (Fletcher et Floodgate, 1973 ; Brading *et al.*, 1995). Les biofilms naturels sont rarement clonaux mais au contraire abritent souvent de nombreux microorganismes – bactéries, protozoaires et algues, chaque groupe exécutant des fonctions métaboliques spécialisées.

Au sein du périphyton coexistent principalement des algues, des bactéries, des champignons... (Fletcher et Marshall, 1982). De nombreuses hypothèses existent quant aux mécanismes de coexistence, et quant à la relation coexistence – ressources nutritives (figure 2).

Il existe au sein du biofilm plusieurs types de relations possibles en fonction de la nature même du biofilm, des conditions environnementales ...

- La première est **une relation de compétition** envers les éléments nutritifs de la colonne d'eau (Mohamed *et al.*, 1998).
- La deuxième est une **relation de dépendance** des bactéries vis-à-vis des algues (Currie 1990, Rier et Stevenson, 2001 ; Niyogi *et al.*, 2003) en lien avec l'excrétion du carbone par ces dernières.
- Et enfin, la dernière est une **relation de dépendance mutuelle** entre bactéries et algues (Rier et Stevenson, 2002 ; Carr *et al.*, 2005)

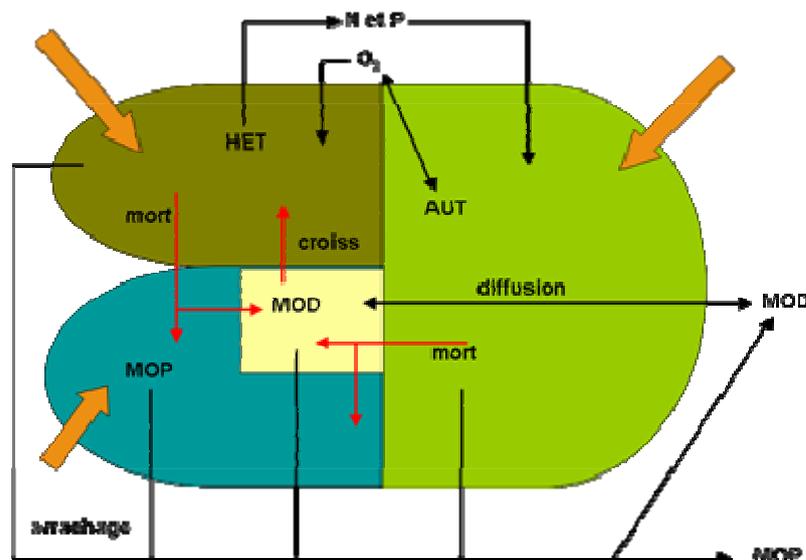


Figure 2 : Schéma conceptuel du périphyton. HET = organismes hétérotrophes ; AUT = organismes autotrophes ; MOP = Matière organique particulaire ; MOD = Matière organique dissoute ; N = azote ; P = Phosphore. Les flèches rouges décrivent les processus internes, les flèches noires les interactions avec la colonne d'eau et les flèches oranges les apports par sédimentation (Flipo, 2000).

Le périphyton est donc principalement un assemblage de bactéries et d'algues puis de protistes et de champignons (Fletcher et Marshall, 1982) se développant en interdépendance, mais contraints par de nombreux facteurs physiques et chimiques liés à la colonne d'eau.

3- Rôle des communautés microbiennes en milieu lotique

Du fait de sa position à l'interface entre le substrat et la colonne d'eau, le périphyton joue un rôle fondamental dans les cycles biogéochimiques (figure 3) (Hansson, 1989 ; Dodds, 2003), et, par sa biomasse, constitue également la principale ressource alimentaire pour les invertébrés benthiques (Hansson, 1992 ; Munoz *et al.*, 2001). Les organismes périphytiques photosynthétiques assurent généralement une part prépondérante de la production primaire dans les cours d'eau de faible ordre (<3) (Gustavson *et al.*, 2003).

Les communautés bactériennes hétérotrophes benthiques participent à la dégradation de la matière organique (Van Hannen *et al.*, 1999) et assurent la majorité de son recyclage (Cale *et al.*, 1988). Elles interviennent également dans le recyclage des substances inorganiques et contribuent au déroulement des cycles biogéochimiques. Ces cycles assurent la circulation permanente de la matière, alternativement sous forme minérale et organique (Garland, 1997 ; Wetzel, 2001).

Enfin, la communauté bactérienne, comme les champignons, peut également avoir un rôle actif dans la dégradation des polluants (Watanabe, 2001).

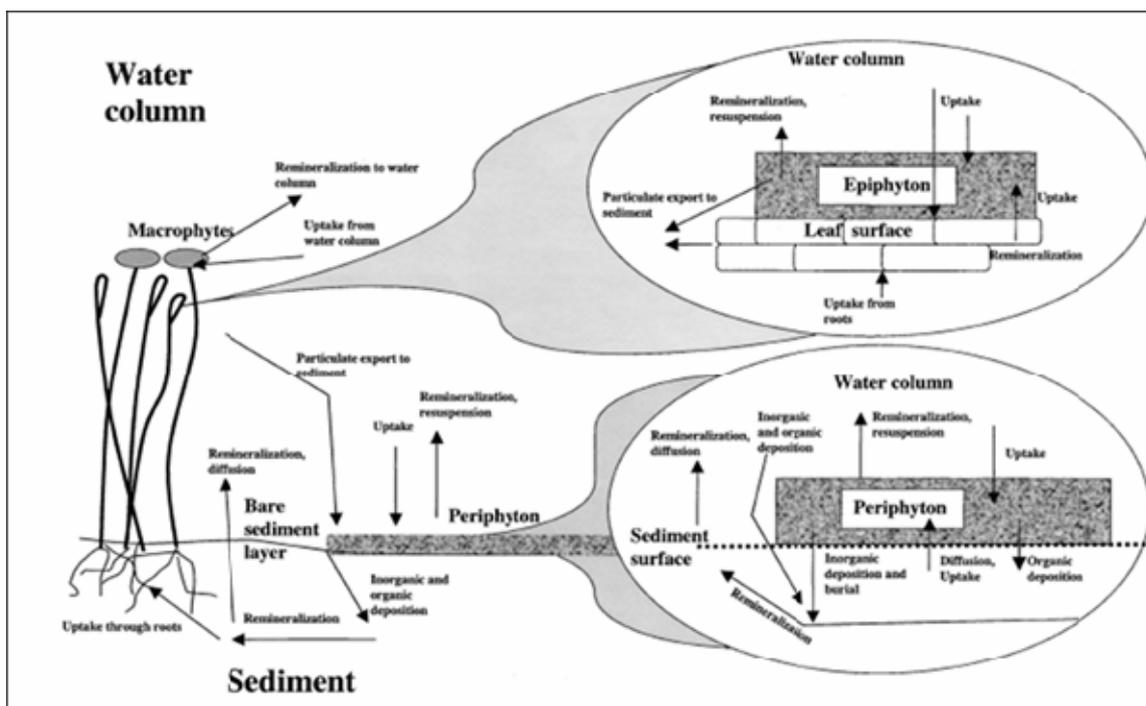


Figure 3 : Schéma conceptuel du rôle du périphyton et de l'épiphyton dans le flux des nutriments (Dodds, 2003).

4- Formation et développement du périphyton

4.1- Formation d'un biofilm

Considérant le biofilm comme une unité fonctionnelle à structures multicellulaires organisées, on peut alors parler de cycle de développement ou de cycle de vie. Ce cycle se déroule en cinq étapes (figure 4), variables en fonction des conditions physiques et chimiques du milieu (Duncan et Blinn, 1989):

1- La première étape est l'adhésion (réversible) de microorganismes mobiles à une surface, principalement par des liaisons chimiques non covalentes ou faibles.

2- Vient ensuite l'adhésion permanente par la formation de molécules protéiques appelées ligands et de structures telles que les pili. Ces premiers points fixes augmentent la capacité d'ancrage d'autres microorganismes en augmentant et en diversifiant les surfaces d'ancrage. Certaines espèces qui ne sont pas capables de s'ancrer elles-mêmes peuvent alors s'intégrer à d'autres espèces déjà installées en colonies. On a ici les prémices de la complexité structurale du biofilm.

3- Les microorganismes se divisent en place, formant ainsi des micro-colonies. À partir d'une concentration suffisamment dense d'individus, les micro-colonies commencent la sécrétion de la matrice extracellulaire.

4- Le biofilm grandit et « mûrit », s'épaississant jusqu'à devenir macroscopique.

5- La cinquième étape est la phase de dispersion induite par le vieillissement du biofilm (auto-détachement), par certains stress ou par certaines carences. Les microorganismes peuvent alors se séparer du biofilm, en consommant parfois la matrice qui représente alors une source d'énergie. Ces microorganismes retournent à l'état de libre circulation et peuvent aller coloniser de nouvelles surfaces (Davies *et al.*, 1998). L'auto-détachement est un phénomène biologique décrivant la « capacité » des microorganismes à auto-réguler la densité cellulaire du biofilm (Stoodley *et al.*, 2002).

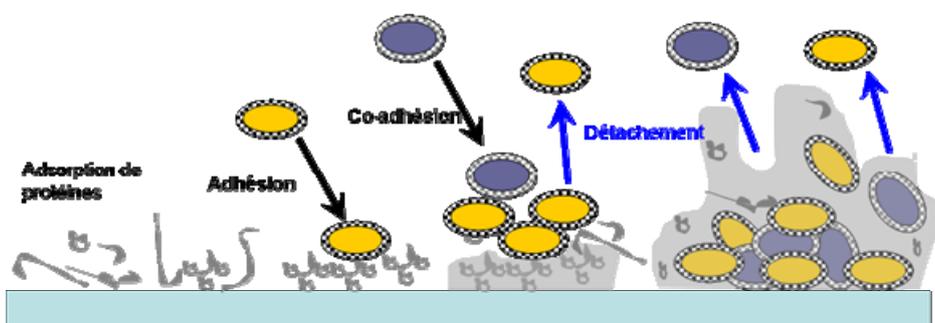


Figure 4 : Schéma de formation des biofilms (inspiré de Stoodley *et al.*, 2002)

Cette dynamique à micro-échelle est également sous la dépendance de facteurs environnementaux à une échelle spatiale et temporelle plus large.

4.2- Contrôle de l'évolution spatio-temporelle du périphyton en milieu lotique

Biggs (2000) décrit deux types de variables pouvant influencer le développement du périphyton : les variables primaires (climat, géologie...) et les variables secondaires qui influencent plus directement le développement du périphyton (régime hydraulique, qualité de l'eau...) (figure 5).

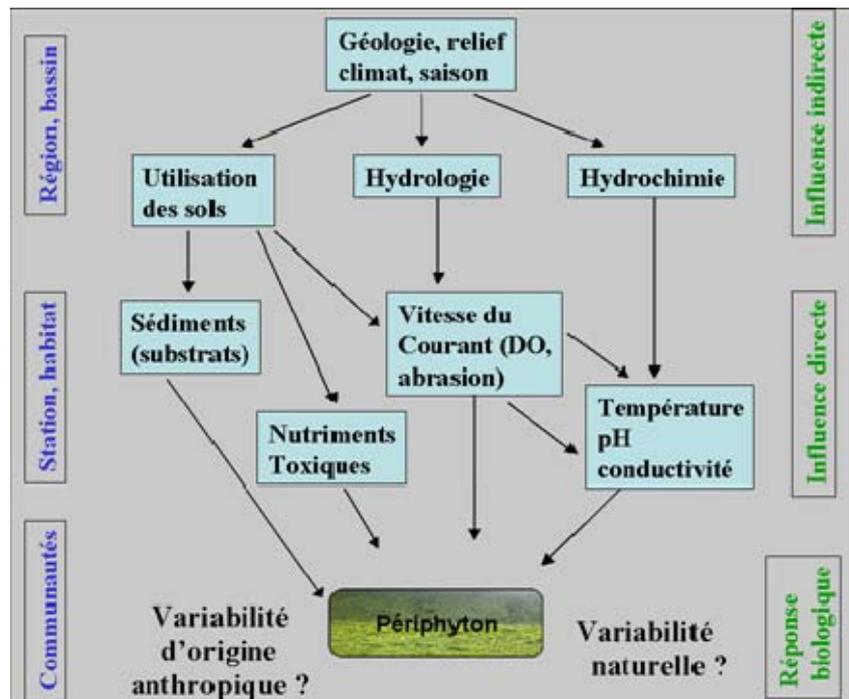


Figure 5 : Schéma conceptuel des variables influençant le développement du périphyton (adapté de Juliette Tison, Cemagref Bordeaux, com. Pers.)

Le périphyton est donc au carrefour de nombreuses interactions qui définiront son évolution spatiale et temporelle. En retour, il sera possible d'utiliser cette évolution et les caractéristiques écologiques du périphyton pour en déduire des indicateurs de qualité du milieu.

4.2.1- Evolution temporelle de la biomasse et de la diversité périphytique:

- A court terme (< 2mois)

Un modèle simplifié d'évolution temporelle, à court terme, de la biomasse périphytique a été décrit par Biggs (1996) et Peterson (1996). Cette évolution est caractérisée par trois phases successives : une phase de colonisation (adhésion et formation des premières micro-colonies), une phase exponentielle de croissance et une phase de sénescence (phase de dispersion) (figure 6). Le début de la phase de croissance est caractérisé par une faible biomasse et une diversité assez importante. Lors du vieillissement du périphyton, la biomasse et le nombre de cellules augmentent, jusqu'à une phase plateau

atteinte en général après 4 à 6 semaines (observations réalisées pour des biofilms se développant sur des substrat artificiels en bois disposés dans le Fjord de Kiel pendant 12 semaines (Hillebrand et Sommer, 2000)). Lors de la phase exponentielle de croissance, la diversité phytobenthique diminue (Guash *et al.*, 1997 ; Hillebrand et Sommer, 2000) traduisant l'installation d'un stade climacique (Biggs, 2000). Les espèces pionnières sont souvent des diatomées suivies, selon les conditions physiques du milieu, par des algues filamenteuses puis des cyanobactéries (Biggs, 2000 ; Sekar *et al.*, 2002).

A ce schéma très simplifié s'ajoutent des processus d'auto détachement de la biomasse qui peuvent très fortement modifier la dynamique du périphyton. (Bouletreau *et al.*, 2006). De plus, il faut noter qu'en rivière, il y a un "re-ensemencement" continu du périphyton par les organismes phytoplanctoniques (immigration de cellules extérieures). Ce phénomène peut également très fortement influencer sur la biomasse et la diversité périphytique (Stevenson et Peterson, 1991). En conclusion, la dynamique du périphyton est dépendante des facteurs physiques et du flux de microorganismes pouvant potentiellement enrichir le périphyton (Besemer *et al.*, 2007).

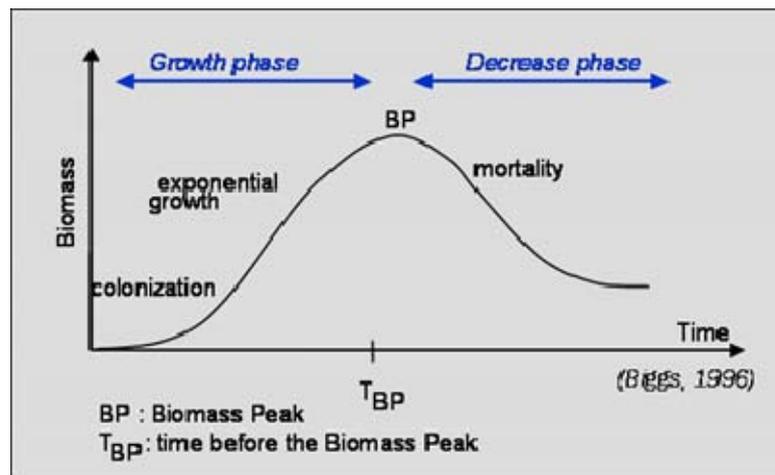


Figure 6 : Modèle simplifié d'évolution temporelle de la biomasse du périphyton à court terme (Biggs, 1996).

- A long terme (2-15 mois)

L'évolution à long terme du périphyton est majoritairement contrainte par la fréquence des crues et les interactions avec la quantité de nutriments et l'intensité lumineuse. Ainsi, on décrit trois types de développement à long terme (Biggs, 2000) :

1- La biomasse périphytique est faible et constante tout au long de l'année. Ceci peut être du à une fréquence de crues très rapprochée (7-10 jours), à une carence en nutriments ou en lumière, à des conditions qui permettent un fort développement d'invertébrés qui limitent le développement périphytique par le broutage.

2- Il existe des cycles d'accumulation et de « relargage » de biomasse. Ce patron est souvent observé au sein de rivières ayant une fréquence de crues modérée et une quantité non limitante de nutriments et de lumière.

3- La croissance du périphyton est saisonnière : des phases d'accumulation de biomasse (fin de l'hiver, début du printemps et automne) entrecoupées de périodes de faible biomasse. Cette évolution saisonnière est caractéristique de rivières ayant une fréquence de crues très faible et reflète la dynamique naturelle des communautés en absence de forçage par les facteurs physiques extérieurs.

4.2.2- Organisation spatiale à différentes échelles

L'organisation spatiale des communautés peut être étudiée à différentes échelles spatiales : longitudinale (concept de continuum fluvial- Vannote *et al.*, 1980) ou transversale (Patch Dynamic Concept – Pringle *et al.*, 1988).

Concept de continuum fluvial (zonation longitudinale)

La place du cours d'eau dans le bassin hydrographique peut conditionner la structure et la diversité de sa biocénose. En effet, le concept de continuum fluvial, introduit dans les années 1980 par Robin L. Vannote, est un modèle descriptif longitudinal du fonctionnement écologique des cours d'eau des zones tempérées. Il intègre à la fois les indicateurs biologiques et la géomorphologie et repose sur l'idée que les cours d'eau doivent être considérés comme des écosystèmes ouverts, qui se transforment en permanence de leur source à leur embouchure. Les modifications progressives de leurs conditions physiques (largeur, profondeur, débit, courant, température...) de l'amont à l'aval engendrent un gradient continu des ressources trophiques disponibles qui détermine la distribution des organismes, en fonction de leurs différentes stratégies développées pour exploiter ces ressources alimentaires (figure 7).

Ce gradient longitudinal se caractérise par une diminution de la vitesse du courant, de la pente, une augmentation de la température (en lien avec une diminution de l'altitude). Les zones amont sont des zones boisées principalement érosives où domine la matière organique particulaire grossière (MOP) tandis que les zones aval sont des zones de sédimentation notamment de MOP fine. Ces différences d'environnement physique (vitesse du courant, intensité lumineuse...) et chimique (nature de la MO) peuvent à elles seules avoir des répercussions sur la structure et le fonctionnement des communautés périphytiques.

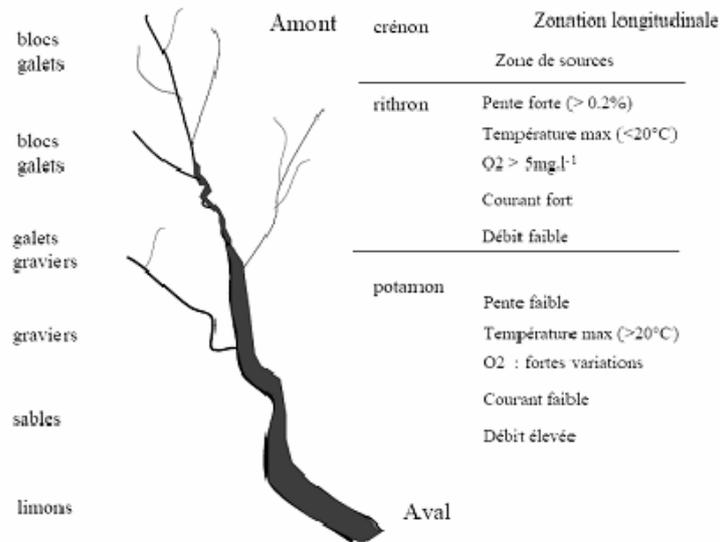


Figure 7 : Zonation d'un hydrosystème fluvial

De plus, d'amont en aval la granulométrie sédimentaire diminue (figure 7). Or, un des facteurs prédominants dans le contrôle de la nature et de la composition taxonomique du périphyton est le type de substrat sur lequel il se développe (Burkholder, 1996). La première relation est une corrélation entre la taille et la nature du substrat et la quantité de biomasse périphytique (Cattaneo *et al.*, 1997 ; Ledger et Hildrew, 1998). Plus le substrat est stable et « large », plus le périphyton est apte à se développer. Ainsi, on peut classer la quantité de biomasse de façon décroissante selon le type de substrat : les blocs -roches (> 25 cm) > les pierres -galets (2.5 à 25 cm) > les granulats grossiers (2.5 mm à 2.5 cm) > les sables (0,1 à 2.5 mm) > les vases (< 0,1mm). Cattaneo *et al.*, (1997) ont ainsi étudiés la relation entre taille du substrat, trophie et biomasse périphytique au sein de neuf rivières de l'est de l'Ontario et de l'ouest du Québec (tableau 1). La valeur maximale de biomasse a été obtenue sur les galets (146 mg de chlorophylle.m⁻²) et la minimale sur les graviers fins (1.09 mg.m⁻²). Les sables et roches présentent des densités intermédiaires. Cependant, une analyse séparée de la biomasse faiblement attachée et de la biomasse étroitement fixée au substrat, révèle que, dans les sables, la majorité de la biomasse est faiblement fixée au substrat. Si on ne considère que la biomasse fortement fixée, la relation taille du substrat-biomasse est beaucoup plus nette (Cattaneo *et al.*, 1997).

Substrat	Taille (mm)	chlo a (mg.m ⁻²)
sable	0,71 ± 0,5	25,4
gravier fin	5,6 ± 2,2	26,1
gravillons	29,1 ± 3,4	29
galet	76,4 ± 5,9	64,1
roches	223,3 ± 46,2	62,1

Tableau 1 : Biomasse moyenne (exprimée en mg.m⁻² de chlorophylle a) en fonction du type de substrat (Cattaneo *et al.*, 1997)

Des études sur substrat naturel ou artificiel ont révélé que la biomasse périphytique était fonction également de la topographie du substrat colonisé et pas uniquement de sa taille (Murdock et Dodds, 2007). Murdock et Dodds (2007) ont quantifié les biomasses périphytiques installées sur 6 types de substrats artificiels (tableau 2). Ils ont, comme Cattaneo *et al.* (1997), distingué la biomasse « posée » et la biomasse « attachée ». La conclusion est que le développement de la biomasse « attachée » est dépendant de la rugosité du substrat : elle est maximum pour la roche (62.9 mg.m⁻² de Chl a) et minimale pour le verre (17.1 mg.m⁻² de chl a) qui présente également la rugosité minimale (0.87 µm).

Substrat	rugosité (µm)	Biomasse (posée)	Biomasse (attachée)
		Chl a (mg.m ⁻²)	Chl a (mg.m ⁻²)
Verre	0,87	40	17,1
Tuile blanche	3,19	25,7	22,9
Tuile Rouge	5,99	45,7	31,4
Ardoise	15,2	68,6	54,3
Roche	17,10	54,3	62,9
Brique	53,8	28,6	57,1

Tableau 2 : Biomasse moyenne (exprimée en mg.m⁻² de chlorophylle) en fonction de la rugosité du substrat artificiel (Murdock et Dodds, 2007)

La nature, la taille et la topographie du substrat peuvent également avoir une incidence sur la diversité périphytique. Les substrats les plus fins sont dominés par des algues unicellulaires tandis que les algues filamenteuses se développent préférentiellement sur des substrats plus grossiers (Murdock et Dodds, 2007). L'hypothèse émise est que des substrats plus larges sont constitués d'une plus grande diversité de micro-habitats et sont donc capables d'abriter une plus grande biodiversité (Biggs, 2000 ; Luttenton et Baisden, 2006).

A l'importance du type de substrat colonisé s'ajoutent, le long du continuum fluvial, les variations de lumière, de température, de vitesse de courant... qui participent à la mosaïque d'habitats constituant les écosystèmes d'eau courante.

Cependant, cette description longitudinale des cours d'eau ne suffit pas à caractériser leurs complexités spatiales car elle omet de prendre en compte :

- Les gradients environnementaux transversaux (Junk *et al.*, 1989) et verticaux (Stanford et Ward, 1988)
- Les apports d'origine anthropique qui peuvent modifier ponctuellement la qualité physico-chimique de l'eau (Davis *et al.*, 2001) et entraîner une instabilité locale.

Zonation transversal : mosaïque écologique

Le « Patch Dynamic Concept » est une théorie commune à tous les écosystèmes. Elle permet de considérer la dynamique d'un écosystème à travers 4 dimensions : 3

dimensions spatiales et la dimension temporelle (Pickett et White, 1985). Dans cette théorie, les perturbations ont une grande importance car elles permettent de libérer des espaces et ainsi de contribuer à la dynamique du système. L'évolution des communautés est alors considérée en « chaque point » de l'écosystème et décrite comme une succession d'espèces colonisant un espace libre pour former un assemblage climacique. Ce concept permet donc d'observer l'écosystème comme une mosaïque dont chaque unité élémentaire a ses propres caractéristiques. Les prémices de ce concept sont nées d'études menées sur les écosystèmes terrestres (Watt, 1947), sur les récifs corallien (Connell, 1978)...Si les écosystèmes étudiés sont nombreux, les organismes ciblés sont également multiples : plantes annuelles (Wu et Levin, 1994), nématodes marins (Lambhead et Hodda, 1994), moules...(Denny, 1995). Ce n'est que depuis un peu plus de dix ans que les écologistes s'emploient à appliquer ce concept aux écosystèmes lotiques (Poff et Ward, 1990 ; Resh *et al.*, 1994 ; Townsend et Hildrew, 1994). Matthaei *et al.* (1999, 2000) ont, par exemple, travaillé sur la répartition des invertébrés et l'importance des perturbations hydrauliques dans cette distribution.

Au sein d'une rivière, les éléments de la mosaïque peuvent être la résultante des variations longitudinales (substrat, température..) et transversales. Les changements transversaux peuvent être liés au couvert végétal (dus aux macrophytes ou à la ripisylve), aux variations locales de la vitesse du courant, au broutage....

L'évolution spatiale du biofilm est donc, comme son évolution temporelle, très complexe et contrainte par de nombreux facteurs dont la hiérarchisation est elle-même complexe.

4.3- Effet des variables secondaires sur la dynamique du périphyton

De nombreux aménagements peuvent provoquer des modifications des caractéristiques physiques et chimiques des cours d'eau. Par exemple, la construction de barrages destinés à réguler le débit de rivières ou de fleuves, à prévenir des catastrophes naturelles ou à fournir de l'énergie, présente un coût environnemental : inondation de la zone en amont, modification du régime d'écoulement des eaux en aval, modification de la qualité des eaux dans la retenue. Une autre conséquence est l'augmentation de l'évaporation, ou les modifications des flux sédimentaires et des nutriments vers l'aval. Les effets spécifiques de ces aménagements sur les biofilms sont présentés dans le tableau 3.

Aménagement	Variable environnementale modifiée	Effet potentiel sur la biomasse périphytique
Régulation du débit (homogénéisation, stabilité du lit...)	Hydrologie	↗
Intensification de l'agriculture Aménagement des berges ça dépend du type d'aménagement		↘
Extraction de sédiments		↘
Rejet d'eaux usées (ou traitées)	Métaux lourds	↘
	Pesticides	↘
	Nutriments	↗
Intensification de l'agriculture	Nutriments	↗
Destruction de la ripisylve	Intensité lumineuse	↗
Intensification de l'agriculture (sédiments en suspension)		
Intensification de l'agriculture	Invertébrés (broutage)	↘

Tableau 3 : Influence des aménagements des cours d'eau et de l'activité anthropique sur les variables environnementales et leurs effets potentiels sur la biomasse périphytique (d'après Biggs 2000)

4.3.1- Effets de modifications du régime hydraulique

Toutes les rivières sont caractérisées par des variations spatiales et temporelles de la vitesse du courant. Ces variations peuvent être naturelles (saisonniers, liées à la morphologie du cours d'eau..) ou liées aux activités anthropiques (chenalisation, construction de barrages...) et affectent les communautés périphytiques algales et bactériennes (tableau 4). De nombreux travaux montrent en effet que des perturbations du flux peuvent fortement réduire la biomasse algale périphytique et modifier la composition de la communauté (Uehlinger, 1991 ; Biggs, 1996 ; Peterson, 1996 ; Francoeur et al., 1998, Francoeur et Biggs 2006). Dans les torrents, la vitesse de courant apparaît même comme le facteur de forçage principal de l'évolution des biofilms (Fisher et Grimm, 1991 ; Biggs, 1995) soit par effet de cisaillement (Biggs et Thomsen, 1995) soit par effet d'abrasion lié à la présence de matières en suspension (Francoeur et Biggs, 2006).

Auteurs	Systèmes expérimentaux	Vitesse de courant (m.s ⁻¹)	Shear stress (N.m ⁻²)	Effets sur les algues	Effets sur les bactéries
Biggs & Thomsen (1995)	Mésocosmes 14 jours	0.3-0.7	4.5 – 25.6	↓chlo a ↓MSSC	
Biggs & Stokseth (1996)	<i>In situ</i> (Rivière Sokna, Nouvelle- Zélande) 64 jours	Lent : 0.3 Moyenne : 0.3-0.7 Rapide : > 0.7	.	↓ MSSC	
Besemer et al (2007)	Microcosmes 12 semaines	Laminaire : 0.065 Transitoire : 0.16 Turbulent : 0.39		↓chlo a = la composition grands groupes algaux	↓densité bactérienne = la richesse
Battin et al. (2003)	Mésocosmes 30 jours	Lent : 0.065 Rapide : 0.23	1.07-13.31	↓chlo a	↓densité bactérienne ↑exopolysaccharides

Tableau 4 : Résultats d'étude de l'effet de la vitesse du courant sur le périphyton ; Chlo a : Chlorophylle a ; MSSC : matière sèche sans cendre.

Biggs et Thomsen (1995) ont simulé l'effet de crues sur le périphyton. Ils ont ainsi estimé la perte de biomasse liée à une augmentation de la vitesse du courant ($> 1 \text{ m.s}^{-1}$) et des forces de cisaillement ($3.1 \text{ à } 25.6 \text{ N.m}^{-2}$) et l'importance de la composition périphytique dans la réponse à ce stress. Ils ont ainsi observé une perte de biomasse (MSSC) allant de 32 à 86 % selon l'intensité de la perturbation. Cependant, cette réponse est modulée par la composition périphytique. Le périphyton, exposé à des forces d'abrasion de 91.8 N.m^{-2} , composé d'algues non filamenteuses est plus résistant à l'effet de crues (44% de perte de biomasse) que du périphyton composé d'algues filamenteuses (perte de 75 à 72 % de biomasse). Biggs et Stokseth (1996) ont également montré qu'il existait une relation inversement proportionnelle entre la biomasse et la vitesse du courant pour des gammes de vitesses allant de faible (0.3 m.s^{-1}) à forte ($> 0.7 \text{ m.s}^{-1}$). Cette relation a aussi été démontrée par Ghosh et Gaur (1998) pour des gammes de vitesses moins contrastées. Ils ont travaillé, sur un site naturel en l'absence de crue, avec quatre conditions de vitesse de courant : statique, lente ($0.1-0.14 \text{ m.s}^{-1}$), moyenne ($0.18 \text{ à } 0.21 \text{ m.s}^{-1}$) et rapide ($0.38 \text{ à } 0.43 \text{ m.s}^{-1}$). Ils ont ainsi observé une diminution du biovolume algal moyen avec l'augmentation de la vitesse du courant. A titre d'exemple, le biovolume observé en condition « statique » ($0.016 \text{ mm}^3.\text{mm}^{-2}$) est cinq fois supérieur à celui mesuré en condition « rapide » ($0.003 \text{ mm}^3.\text{mm}^{-2}$). Besemer *et al.* (2007), ont également mis en évidence l'effet de la vitesse du courant sur les communautés périphytiques, notamment sur la communauté procaryotique. Ils ont travaillé avec trois conditions de courant : laminaire (0.065 m.s^{-1}), transitoire (0.162 m.s^{-1}) et turbulente (0.39 m.s^{-1}). Comme dans les travaux précédemment cités, ils ont observé une diminution de la biomasse algale (exprimée en chlorophylle a) avec l'augmentation de la vitesse. Ils ont montré que la vitesse du courant contrôle également le développement bactérien car l'abondance bactérienne (déterminée par épifluorescence) diminue quand la vitesse du courant augmente. De plus, ces travaux montrent que le développement des algues filamenteuses et des cyanobactéries est limité par une augmentation du flux. Ce

changement de composition spécifique, en réponse à une perturbation hydraulique, avait également été observé par Biggs *et al* (1998). A des gammes de vitesses moindres (0.065 à 0.23 m.s^{-1}) et en mésocosmes, Battin *et al.* (2003b) ont mis en évidence des différences de structure architecturale et fonctionnelle des biofilms : réduction de la densité bactérienne (diminution de 3,4 fois entre les deux conditions) et algale (diminution de la teneur en chlorophylle *a* de 2,5 fois) et de l'épaisseur du biofilm. Cependant, pour les fortes valeurs de courant, et malgré une réduction de la densité bactérienne, les biofilms produisent plus d'exopolysaccharides. Aux faibles vitesses de courant, la sinuosité de surface du biofilm et sa fragmentation augmentent avec l'épaisseur. Ceci facilite le transfert de solutés de la colonne d'eau vers le biofilm (Battin *et al.*, 2003a) et peut ainsi modifier le métabolisme de la communauté microbienne.

La vitesse du courant est donc un facteur prépondérant du contrôle des communautés périphytiques à la fois algale et bactérienne. Ses effets sont observables à la fois sur la structure générale (biomasse totale, densités cellulaires), sur l'architecture (sinuosité, rugosité...) mais également sur la diversité.

4.3.2- Effets de modifications de l'intensité lumineuse

Du fait de la présence d'organismes phototrophes, l'éclairage est un facteur indispensable au développement de la communauté périphytique. Le périphyton est soumis à un environnement lumineux variable spatialement et temporellement en terme d'intensité et de spectre lumineux (saison, couvert végétal...). L'intensité lumineuse contrôle la photosynthèse et de nombreux auteurs ont décrit l'existence d'une gamme d'intensité pour laquelle la photosynthèse est efficace ($30-400 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$) avec un effet d'inhibition au-delà de $500 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ (Steinman et MacIntire, 1987, Guasch et Sabater, 1995 ; Roberts *et al.*, 2004). Sur le terrain, la présence d'un couvert végétal entraîne une diminution de l'intensité lumineuse suffisante pour modifier la composition algale du biofilm. Mosisch *et al.* (2001) ont observé une nette diminution de la biomasse (MSSC) et de la teneur en *Chl a* en lien avec l'augmentation du pourcentage de « zones couvertes » (<57% (prairie) à >72% (forêt)). Guasch et Sabater en 1995 ont également observé cette diminution de teneur en Chlorophylle *a* en lien avec une augmentation du couvert végétal et donc une diminution de l'intensité lumineuse. Cette diminution est accompagnée d'un changement de composition algale. Les biofilms ombragés ($62-80 \mu\text{mol photons.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$) sont principalement composés de diatomées (dans le cas de leur étude : *Achnanthes Minutissima*) tandis que des biofilms en conditions non limitantes de lumière ($185-916 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$) voient se développer des chlorophycées et des cyanobactéries (notamment *Schizothrix*). Van den Grinten (2004) a étudié la composition taxonomique de biofilms lacustres selon un gradient vertical caractérisé par une modification de l'intensité lumineuse (% d'irradiance allant de 76.5 à

0.04% d'un lac). Les biofilms installés à 200 cm de profondeur (0.04-0.47 % d'irradiance incidente) et ceux à 10 cm (67.7-76.5% d'irradiance incidente) ne présentent environ que 50% de similitude (indice de Bray-curtis basé sur la détermination microscopique). Les différences observées, et imputées aux variations de l'intensité lumineuse, sont essentiellement dues au développement de diatomées planctoniques en profondeur (telles que *Asterionella*, *Fragilaria*...) mais également à l'augmentation de l'abondance des Chlorophytes avec la profondeur. D'autres auteurs (Sekar *et al.*, 2002) ont également obtenu ces résultats et, pour résumer, on notera que les biofilms ombragés sont plus fins et que la communauté algale périphytique est dominée par les diatomées tandis que ce sont les chlorophycées qui dominent dans les zones plus ensoleillées.

Au-delà de la structure et de la diversité, c'est le fonctionnement du périphyton qui peut être altéré. En effet, la production primaire, qui joue un rôle important en tant que source de C pour le réseau trophique (Dodds *et al.*, 1996) peut également être affectée par une modification de l'intensité lumineuse (Mosisch *et al.*, 2001). Guasch et Sabater, (1998) ont montré que l'historique lumineux influence aussi la résistance du biofilm à la présence de contaminants.

Au-delà du seul compartiment phototrophe, c'est l'ensemble de la communauté microbienne périphytique qui peut être affectée par une modification de son environnement lumineux. Cependant, peu d'études sur la communauté bactérienne existent. Lyautey *et al.* en 2005, ont étudié l'effet de variations saisonnières sur ces communautés et ont déterminé que cinq facteurs sont majoritairement responsables des modifications de diversité observées durant un an au sein de la Garonne (France) : la lumière, la température, l'oxygène dissous, les flux et la conductivité.

Un effet indirect, via la modification de la nature des exsudats carbonés issus des cellules algales et utilisés par les bactéries, a également été observé (Chrost, 1991 ; Rier et Stevenson, 2001 ; Rier *et al.*, 2006).

4.3.3- Effets de modifications des concentrations en nutriments

Un autre facteur important contrôlant le développement du périphyton et que les activités humaines peuvent altérer est la teneur en nutriments. De nombreux travaux ont été réalisés pour déterminer l'effet d'un changement de la teneur en N et P, que ce soit sur du phytoplancton, du périphyton lacustre (Haglund et Hillebrand, 2005), de rivière (Sekar, 2002 ; Uehlinger et Brock, 2005), ou des communautés benthiques marines (Hillebrand et Sommer, 2000b). Généralement, l'augmentation de la teneur en nutriments (N et P) est associée à une augmentation de biomasse et de productivité (Hill et Knight, 1988; Hill *et al.*, 1992; Dodds *et al.*, 1997; Biggs, 2000; Tank et Dodds, 2003). Dodds *et al.* (2002) ont mis en évidence une corrélation positive entre le taux de chlorophylle *a* benthique et la quantité de

nutriments dans la colonne d'eau. A partir de la compilation de résultats issus de 620 stations aux Etats-Unis (données issues de United States National Stream Water-Quality Monitoring Networks), ils ont déterminé qu'au-delà de $30 \mu\text{g.L}^{-1}$ de P total et $40 \mu\text{g.L}^{-1}$ de N total la teneur en chlorophylle a est significativement supérieure. En cas de forte teneur en nutriment ($150 \mu\text{M}$ de N et $10 \mu\text{M}$ de P seul ou en mélange (ratio N :P de 15 :1) une perte de diversité due à la dominance de certaines espèces est également observée (Hillebrand et Sommer, 2000).

Les diatomées sont souvent la composante principale du périphyton. Certains auteurs se sont donc intéressés à l'importance de la teneur en Silice (Si) dans la colonne d'eau (Sommer, 1996 ; Hillebrand et Sommer, 2000) sur le développement du périphyton. Sommer en 1996, démontre, en laboratoire, que pour de faibles ratios Si :N et Si :P, les diatomées, limitées par le manque de Silice, étaient remplacées par des cyanobactéries (en cas de faible ratio N :P) ou des Chlorophycées (en cas de fort ratio N :P).

Cependant, l'effet d'un enrichissement en nutriments peut être difficile à quantifier du fait des nombreuses interactions existant avec la lumière, la nature du sédiment, la vitesse du courant, la température... (Biggs et Close, 1989). Par exemple, les interactions entre azote, phosphore et lumière compliquent la relation périphyton/teneur en éléments nutritifs (Dodds *et al.*, 1996). Uehlinger (2005) montrait que le périphyton réagissait à un enrichissement en nutriments par une augmentation de biomasse et de son métabolisme, mais uniquement pour des conditions optimales de lumière et de température.

4.3.4. Effet du broutage par les invertébrés

L'effet du broutage est surtout important dans un environnement hydrauliquement stable car l'instabilité limite la capacité des invertébrés brouteurs à se fixer sur le biofilm (Steinman *et al.*, 1991). On peut distinguer les effets directs des brouteurs sur le périphyton des effets indirects (via la quantité de nutriments).

L'effet direct du broutage tend à freiner l'accumulation de biomasse (Rosemond *et al.*, 1993). Les cladocères, copépodes et chironomes ont la capacité de fortement diminuer la biomasse périphytique (Mason et Bryant, 1975 ; Hann, 1991). Lors d'une expérience consistant à contrôler la présence de brouteurs par l'introduction d'insecticide, Brock *et al.* (1995) ont démontré qu'en absence de brouteurs, la biomasse périphytique est plus importante.

La présence d'organismes brouteurs peut également avoir un effet indirect sur le périphyton via les nutriments. Il existe trois voies principales (figure 8):

- Les brouteurs relarguent des débris fécaux et augmentent ainsi la quantité de nutriments pour les hétérotrophes (Mulholland *et al.*, 1991; Kahlert et Baunsgaard, 1999)

- Du fait du broutage, la proportion de débris diminue au sein du périphyton. En effet, les brouteurs vont se nourrir à la fois de débris et d'algues mais seules les algues vont se

régénérer. On observe donc un rajeunissement du biofilm et une augmentation de la part du vivant par rapport au détritique. Les débris étant riches en C et pauvres en nutriments, l'action des brouteurs se traduit par une modification du rapport C :N :P du périphyton, augmentant ainsi la teneur relative en nutriments au sein du périphyton (Hillebrand *et al.*, 2008).

- le dernier effet est lié à la modification de l'architecture du biofilm. La désintégration partielle du biofilm, notamment de la matrice, permet aux organismes encore adhérents d'avoir un accès plus direct aux nutriments de la colonne d'eau (Riber et Wetzel, 1987 ; Bothwell, 1989 ; Burkholder *et al.*, 1990).

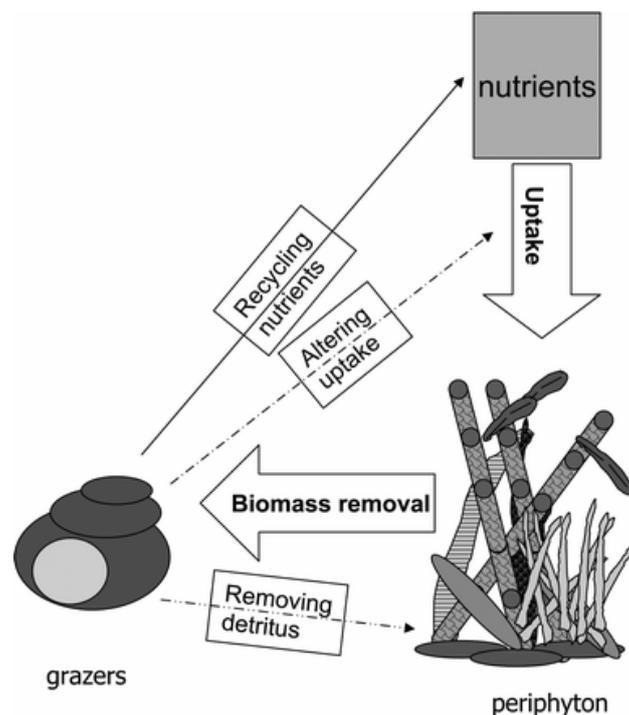


Figure 8 : Illustration des effets directs et indirects des brouteurs sur la stœchiométrie des nutriments. 3 voies par lesquelles les brouteurs peuvent affecter le ratio C :N :P du périphyton. (Hillebrand *et al.*, 2008)

Schéma bilan des effets des différents facteurs environnementaux sur le périphyton :

Le périphyton est un élément fondamental dans le fonctionnement des milieux lotiques. Il est en effet à la base de la chaîne alimentaire et participe à la régulation de la dynamique des nutriments, du carbone et de l'oxygène (Browder *et al.*, 1994). Dans les milieux lotiques, le périphyton est sous la contrainte de nombreux facteurs biotiques et abiotiques (figure 9).

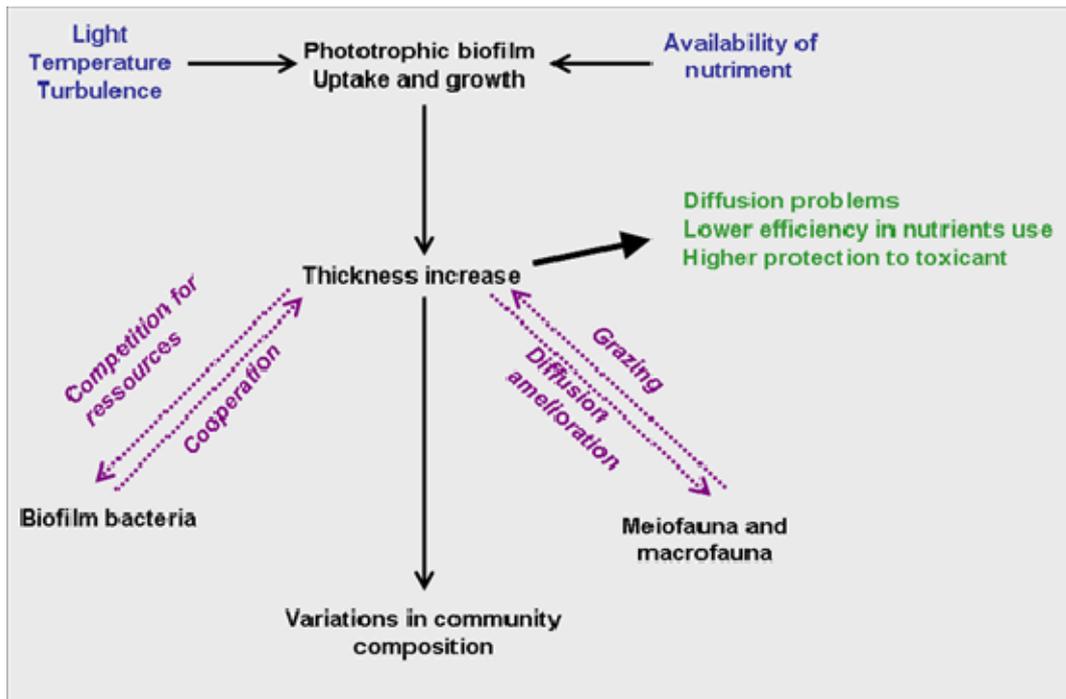


Figure 9 : Schéma conceptuel des relations entre les facteurs environnementaux et biologiques affectant la croissance et les fonctions du périphyton (Sabater et Admiraal, 2005)

5- Le périphyton comme bio-indicateur

L'utilisation du périphyton comme indicateur d'un stress biotique ou abiotique peut se justifier par des critères de pertinence écologique, tels que son rôle dans le cycle de la matière, mais aussi parce qu'il satisfait certains des critères énoncés par Cairns *et al.* (1993) pour le choix des marqueurs biologiques. Par exemple :

- son ubiquité : il colonise tous les types de milieux aquatiques à toutes les saisons (Kostel *et al.*, 1999),
- son abondance et la simplicité des opérations de collecte et de transport,
- son mode de vie sédentaire permet d'intégrer et de refléter les conditions physiques et biologiques de l'environnement où il se trouve,
- son taux d'accroissement élevé qui permet une intégration relativement rapide des changements environnementaux (Mc Intire, 1993 ; Mc Cormick et Cairns, 1994 ; Lowe *et al.*, 1996) et qui permet une visualisation des effets sur plusieurs générations (à l'échelle des microorganismes) (Culp *et al.*, 2000)

A ces critères généraux s'ajoutent des critères spécifiques liés à la composition et à la structure du périphyton :

- sa diversité taxonomique, qui lui confère une sensibilité progressive et non une réponse de type « tout ou rien » à une large gamme de stress toxiques (Lowe *et al.*, 1996 ; Kostel *et al.*, 1999),

- ses capacités d'adsorption de composés minéraux ou organiques (Flemming, 1995), qui lui permettent d'être, au moins partiellement, un intégrateur des conditions chimiques variables de la colonne d'eau.

- son niveau d'organisation biologique qui permet d'intégrer les relations entre espèces d'un même niveau trophique ou de niveaux trophiques différents.

Deux approches co-existent pour évaluer l'impact d'une perturbation d'origine naturelle ou anthropique sur le périphyton (figure 10):

(i) La première approche est basée sur des descripteurs de structure (biomasse, taxonomie, diversité, architecture ...).

La détermination de la composition taxonomique, et plus particulièrement de la communauté algale, par microscopie (Hill *et al.*, 2000) permet le calcul de nombreux indices révélateurs de la qualité des eaux. Le plus courant est l'indice biologique diatomique (IBD, NF T90-354). Cette approche étant longue et fastidieuse de mise en œuvre, ces dernières années, de nombreuses méthodes permettant de s'affranchir d'une identification microscopique pour l'évaluation de la diversité, ont été favorisées. L'application des techniques moléculaires, par exemple, permet de s'intéresser à la fois à la diversité des communautés eucaryotes et procaryotes. Mais il reste actuellement impossible, sur la base de ces méthodes, d'utiliser un calcul d'indice de diversité standardisé et donc de qualité de l'eau, comme le permet l'IBD.

La détermination de la biomasse périphytique peut renseigner sur l'état trophique ou la qualité chimique du système étudié. Il existe différentes méthodes d'estimation de la biomasse basées sur l'extraction de pigments (notamment la Chlo *a*), le dénombrement cellulaire, la matière sèche ou la matière sèche sans cendre (qui rend compte de toute particule organique et inorganique).

L'architecture du périphyton est considérée comme étant la résultante directe de variations de nombreux facteurs physiques qui modèlent ainsi la croissance périphytique. Ainsi, l'occurrence ou la dominance de certaines formes de croissance peuvent nous informer des conditions physiques du milieu, de l'intensité de la pression de broutage.... Classiquement, l'observation de l'architecture 3D du biofilm se fait par microscopie électronique à balayage (Hudon et Bourget, 1981) et plus récemment, la microscopie à épifluorescence a permis d'observer la dynamique en 3D de la croissance du biofilm. L'utilisation de sondes spécifiques des différents groupes d'organismes (algues, bactéries...) permet d'observer leurs répartitions au sein du biofilm (Lauwrence *et al.*, 1998).

(ii) La seconde approche rend compte des propriétés fonctionnelles du périphyton indépendamment de la composition des espèces. Elle porte généralement sur le suivi d'activités métaboliques (respiration, photosynthèse, activités enzymatiques...) ayant un rôle essentiel pour le fonctionnement global de l'écosystème.

La détermination de la productivité du périphyton a été abordée de différente manière :

- d'une manière très globale (production et respiration) par mesure de l'oxygène dissous (Odum, 1956 ; DeNicola *et al.*, 2003),
- à une plus petite échelle via l'utilisation de microélectrodes (Revsbech *et al.*, 1983) pour l'obtention de profils verticaux d'oxygène (Pringault *et al.*, 1999)
- par incorporation d'isotope du carbone pour mesurer l'activité photosynthétique (Bott, 1996), de leucine ou de thymidine triciée pour mesurer la production bactérienne (Buesing, 2003)
- L'utilisation du PAM (Pulse amplitude monitored) peut également permettre d'évaluer l'activité photosynthétique (au niveau du transport des électrons) (Kromkamp *et al.*, 1998 ; Barranguet et Kromkamp, 2000).

Il est cependant important de noter que ces deux approches, structurale et fonctionnelle, sont complémentaires pour l'étude de l'impact d'une perturbation sur le périphyton. En effet, un impact sur le fonctionnement n'implique pas nécessairement un effet sur la structure du biofilm et *vice versa*.

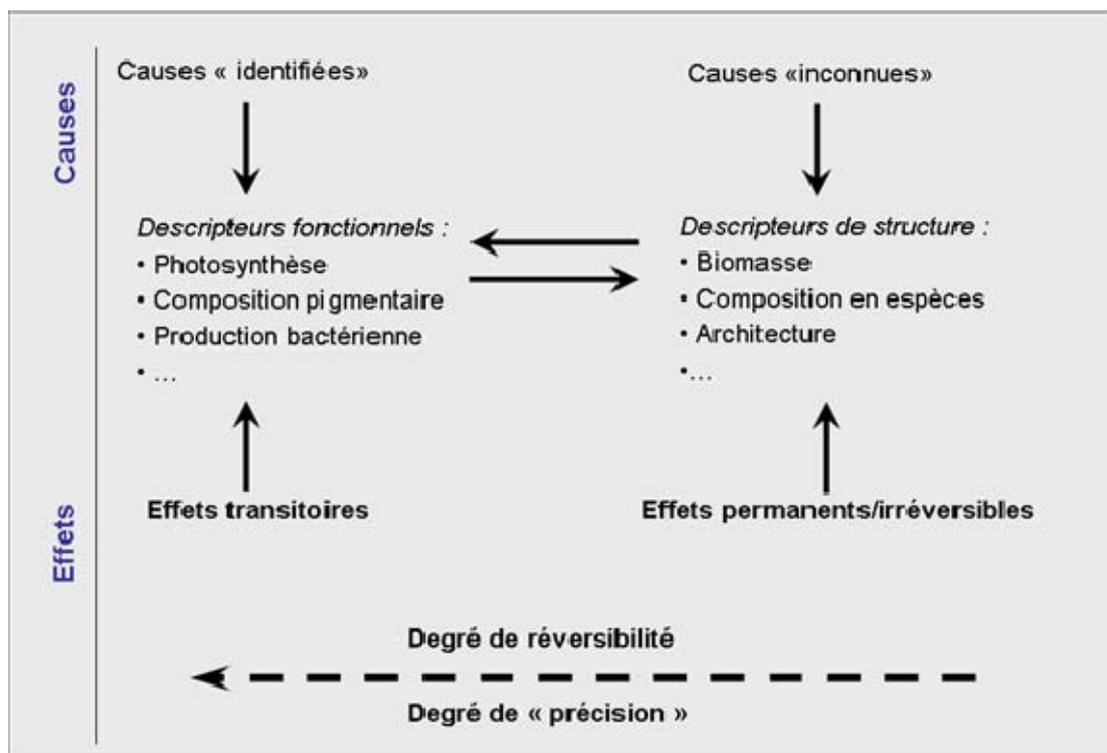


Figure 10 : organigramme des différents outils utilisés pour décrire l'effet d'une perturbation sur le périphyton. Ces outils peuvent être sélectionnés sur la base de causes et d'effets identifiés, de l'intensité de l'effet, du degré de réversibilité ou de détail requis (Sabater et Admiraal, 2005)

B- Modèles chimiques : le diuron et l'azoxystrobine

1- Les pesticides

Le terme pesticide (du latin *pestis* qui veut dire « fléau » et *cadere* qui veut dire « tuer ») désigne une substance destinée à lutter contre des nuisances biologiques. Ils peuvent être naturels ou de synthèse et sont des produits biologiquement actifs présentant une toxicité pour des organismes considérés comme nuisibles. L'agriculture est la principale utilisatrice de pesticides mais ils peuvent également être utilisés pour l'entretien de la voirie, des voies ferrées...

Les pesticides sont classés selon la nature des organismes ciblés. Ainsi, on distingue (Ramade 1998) :

- les corvicides pour l'élimination des oiseaux ravageurs
- les rotenticides pour tuer les rongeurs
- les nématocides contre les nématodes phytoparasites
- les acaricides pour éliminer les acariens
- les insecticides
- les **fongicides** utilisés contre les champignons phytopathogènes ou vecteurs de mycoses animales ou végétales
- et enfin les **herbicides** destinés à détruire les plantes adventices

Les pesticides sont également classés en fonction de leur nature chimique. On distingue ainsi une grande diversité de familles du fait du grand nombre de substances actives (environ 800) et de préparations commerciales (environ 6000) selon IFEN 2004. Les plus représentées sont les triazines, les urées substituées, les phénols, les carbamates et les organophosphorés.

En fonction des conditions d'utilisation et selon les caractéristiques du milieu, ces substances actives sont susceptibles de se retrouver dans les différents compartiments de l'environnement (air, sol, eau, sédiments, etc...) (figure 11) ainsi que dans les denrées alimentaires. Elles peuvent présenter, en plus de leurs effets intentionnels sur les parasites ou organismes visés, des dangers très variables pour l'homme et les écosystèmes, avec un impact immédiat ou à long terme.

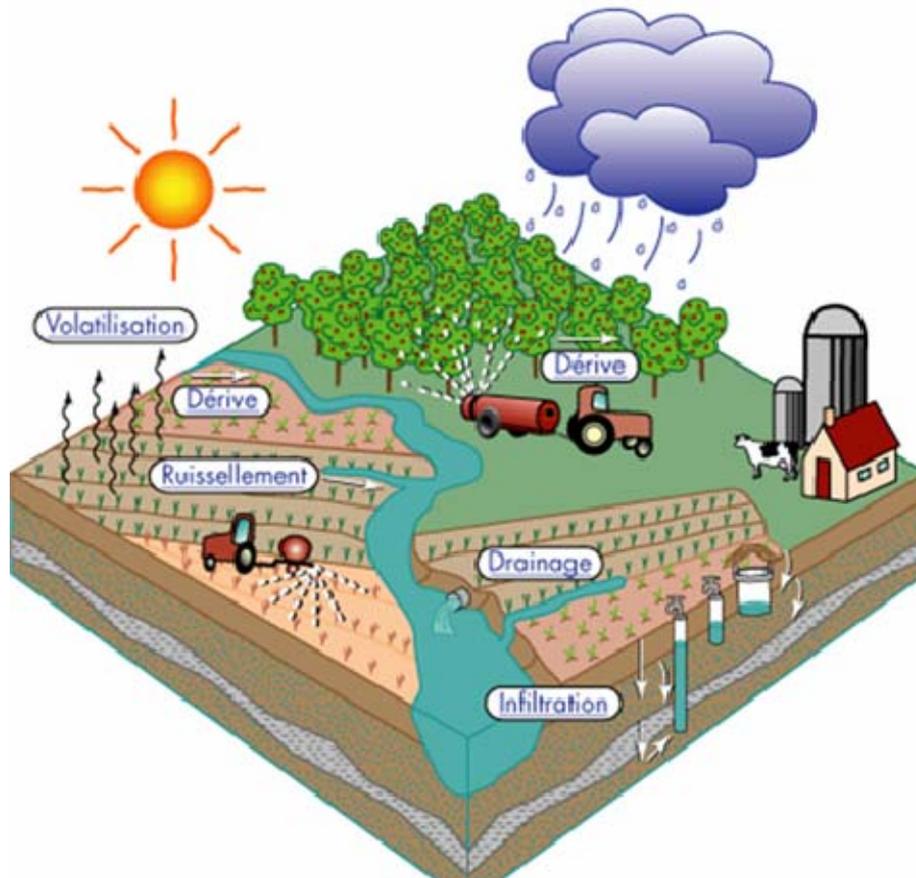


Figure 11 : principale voie de transfert des pesticides dans l'eau (Ministère de l'environnement, Canada, 2004)

En 2005, d'après les données de l'Union des Industries de la Protection des Plantes (UIPP) (figure 12), 74 719 tonnes de substances actives ont été commercialisées. Sur le long terme, depuis 1996, la quantité totale de pesticides a diminué d'environ 20 %, avec une rupture nette à partir de 2002, suite à la baisse des doses autorisées de fongicides minéraux. Entre 2004 et 2005, on constate une remontée de 2,5 % des ventes globales de phytosanitaires. Cette augmentation est principalement due aux herbicides (+12 %). *A contrario*, la baisse de consommation des fongicides minéraux se poursuit. Les herbicides et fongicides sont donc les substances actives les plus usitées et sont, à ce titre, plus susceptibles de contaminer les milieux aquatiques. Ces tonnages ne donnent cependant qu'une indication très grossière en terme de pression environnementale car les différentes substances présentent des niveaux de risque très hétérogènes.

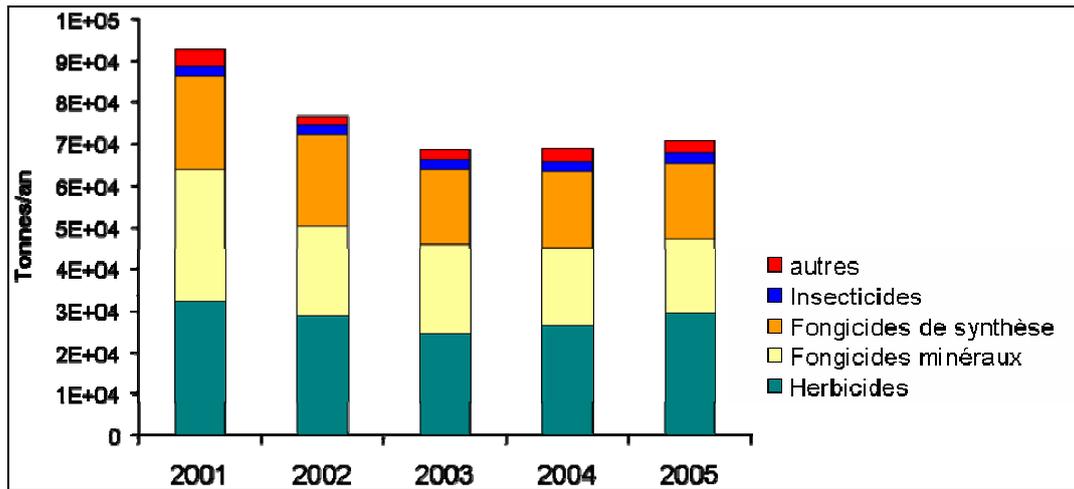


Figure 12 : Quantité de pesticides commercialisés en France en 2005 (données IFEN)

Deux pesticides sont utilisés en mélange pour cette étude : l'azoxystrobine ($C_{22}H_{17}N_3O_5$) et le diuron ($C_9H_{10}Cl_2N_2O$). Ces deux pesticides sont retrouvés dans les eaux de la Morcille tout au long de l'année.

1.1- L'azoxystrobine

L'azoxystrobine est un **fongicide** à large spectre de la famille des strobilurines. Produit d'utilisation mondiale, il est développé à ce jour en France par Sopra avec les spécialités Amistar et Amistar Pro pour les céréales et Quadris sur la vigne. Pour l'entretien des vignes, l'azoxystrobine est actuellement la seule matière active contrôlant efficacement cinq maladies majeures dont le Mildiou et l'Oïdium. Il est cependant classé toxique (T), dangereux pour l'environnement (R50) et très toxique pour les organismes aquatiques (R53). Il peut en effet entraîner des effets néfastes à long terme pour l'environnement aquatique.

Actuellement, peu de travaux de recherche ont été réalisés concernant la toxicité et l'impact sur les écosystèmes aquatiques de cette molécule. Une compilation bibliographique des données et limites toxicologiques est disponible:

- sur le site AGRITOX (Base de données sur les substances actives phyto-pharmaceutiques) gérée par l'INRA (<http://www.dive.afssa.fr/agritox/index.php>)
- et sur le site <http://sitem.herts.ac.uk/aeru/footprint/fr/Reports/54.htm>

Fiche d'identité de l'azoxystrobine :

Type de pesticide	Fongicide	
Famille chimique	Strobilurine	
Mode d'action	L'activité fongicide s'exerce au niveau du site de réduction ubihydroquinone Qo, en bloquant le transfert d'électrons entre les cytochromes b et c1 de la chaîne respiratoire mitochondriale (Von Jagow et Link, 1986), inhibant ainsi la production d'ATP et par conséquent la croissance du champignon (Zeng <i>et al.</i> , 2000 ; Bartlett <i>et al.</i> , 2002)	
Formule brute	C ₂₂ H ₁₇ N ₃ O ₅	
Poids moléculaire (g.mol⁻¹)	403.4	
Solubilité dans l'eau à 20°C (mg.L⁻¹)	6.7	
DT50 par photolyse dans l'eau (jours)	11 (vitesse modérée)	
DT50 hydrolyse neutre à 20°C (jours)	Stable (très persistant)	
DT50 sédiment (jours)	232 (Lent)	
Ecotoxicologie		
	Valeur/Risque	Espèce
Poisson toxicité aiguë CL50 (mg.L⁻¹)	0.47 (Modéré)	<i>Oncorhynchus mykiss</i>
Poissons toxicité chronique NOEC 21 jours (mg.L⁻¹)	0.147	inconnue
Invertébrés aquatiques Toxicité aiguë CE50 (mg.L⁻¹)	0.26 (Modéré)	<i>Daphnia magna</i>
Plantes aquatiques CE50 (mg.L⁻¹)	3 (Modéré)	<i>Lemna gibba</i>
Algues CE50 (mg.L⁻¹)	0.36	<i>Pseudokirchneriella subcapitata</i>
Algues NOEC (mg.L⁻¹)	0.8	inconnue

1.2- Le diuron

Le diuron est un **herbicide** de la famille des urées substituées. Cette substance se présente sous la forme d'un solide cristallin incolore et inodore (ACTA, 2004). Selon ACTA (2004), cet herbicide agit sur les processus de la photosynthèse. Il est, comme l'azoxystrobine, classé R50/53 : très toxique pour les organismes aquatiques, et peut entraîner des effets néfastes à long terme pour l'environnement aquatique.

Jusqu'en 2003, le diuron a été utilisé seul notamment pour le désherbage des cultures d'arbres fruitiers (poiriers, cognassiers, pommiers...) ou de légumes (Ministère de la Santé et des Solidarités, 2005). La réglementation française (Journal Officiel du 5 avril 2002) a retiré l'autorisation de mise sur le marché aux produits phytopharmaceutiques contenant du diuron seul (i.e., non associé à d'autres substances actives), pour tous les usages agricoles. De plus, la réglementation (Journal Officiel du 19 mai 2002) interdit l'utilisation des produits phytopharmaceutiques contenant du diuron, en utilisation non agricole, entre le 1er novembre et le 1er mars. L'OMS fixe à $4,5 \mu\text{g.L}^{-1}$ la valeur sanitaire maximale (Vmax) pour le diuron dans l'eau potable (Ministère de la Santé et des Solidarités, 2005). Enfin il est classé sur la liste européenne des 16 substances « dangereuses prioritaires » et est désormais totalement interdit d'utilisation depuis 2008. Ces caractéristiques sont reportées sur sa fiche p 29.

2- Le diuron dans les milieux aquatiques et son impact sur les organismes microbiens

Ce xénobiotique est entraîné aussi bien dans les eaux de surface par ruissellement que dans les eaux souterraines par lessivage des sols. La dégradation microbienne est la voie principale de dégradation du diuron présent dans les environnements aquatiques (Moncada, 2005). Une quantification des teneurs en diuron dans les eaux de surface et souterraines, issue de l'IFEN (2001) est présentée dans le tableau 5.

	Valeur moyenne ($\mu\text{g.L}^{-1}$)	Valeur maxi – 90% des cas ($\mu\text{g.L}^{-1}$)	Valeur maxi ($\mu\text{g.L}^{-1}$)
Eaux superficielles	0.13	0.3	20.2
Eaux souterraines	0.03	0.05	3

Tableau 5 : Teneur en diuron (1998-1999) d'après IFEN 2001

Selon le Ministère de la Santé et des Solidarités (2005) parmi les pesticides détectés au moins une fois dans les eaux destinées à la consommation à une concentration supérieure à $0,1 \mu\text{g.L}^{-1}$ (seuil limite légal de qualité pour chaque pesticide) pendant la période 2001 à 2003, 8 l'ont été à plus de 50 reprises. A l'échelon national : la 6^{ème} substance de cette liste est le diuron.

Fiche d'identité du diuron

Type de pesticide	Herbicide	
Famille chimique	Phenyl urée	
Mode d'action	Le diuron est un herbicide systémique. C'est un inhibiteur de la photosynthèse notamment du transport d'électron au niveau du photosystème II.	
Formule brute	C ₉ H ₁₀ Cl ₂ N ₂ O	
Poids moléculaire (g.mol⁻¹)	233.09	
Solubilité dans l'eau à 20°C (mg.L⁻¹)	35.6	
DT50 par photolyse dans l'eau (jours)	43 (stable)	
DT50 hydrolyse neutre à 20°C (jours)	Stable (très persistant)	
DT50 sédiment (jours)	48 (Vitesse modérée)	
Ecotoxicologie		
	Valeur/Risque	Espèce
Poisson toxicité aiguë CL50 (mg.L⁻¹)	4.3 (Modéré)	<i>Oncorhynchus mykiss</i>
Poissons toxicité chronique NOEC 21 jours (mg.L⁻¹)	0.41	<i>Oncorhynchus mykiss</i>
Invertébrés aquatiques Toxicité aiguë CE50 (mg.L⁻¹)	5.7 (Modéré)	<i>Daphnia magna</i>
Invertébrés aquatiques Toxicité chronique NOEC 21 jours (mg.L⁻¹)	0.096	<i>Daphnia magna</i>
Plantes aquatiques CE50 (mg.L⁻¹)	0.0183 (Modéré)	Lemna gibba
Algues CE50 (mg.L⁻¹)	0.0027 (Élevé)	<i>Scenedesmus quadricauda</i>

Ces données soulignent le fait que le diuron est un contaminant fréquent des eaux de surface et des eaux souterraines. De plus, cette substance présente de forts taux de recherche dans les eaux (tableau 6). En effet, le diuron est la troisième substance la plus recherchée parmi les substances identifiées comme prioritaires par l'IFEN en 2002 (après l'atrazine et la simazine). Cet état de fait démontre bien le caractère préoccupant de cette contamination.

Nombre de points de recherche		Taux de recherche du diuron		Taux de quantification du diuron	
Eaux de surface	Eaux souterraines	Eaux de surface	Eaux souterraines	Eaux de surface	Eaux souterraines
635	1246	78.6%	57.5%	38.6%	6.6%

Tableau 6 : Statistiques de recherche et de quantification du diuron dans les eaux de surface et souterraines (IFEN 2002)

Le diuron est un inhibiteur de la photosynthèse et plus particulièrement du transport d'électrons au niveau du photosystème II chez les microorganismes phototrophes et les plantes (Wessels et Van der Veen, 1956). Du fait de leurs caractéristiques physiologiques, les algues planctoniques et périphytiques sont donc les cibles privilégiées de cet herbicide au sein des écosystèmes aquatiques. De nombreuses études sur la toxicité du diuron ont été réalisées à partir de tests mono-spécifiques sur des microalgues. Que le diuron soit utilisé seul ou en mélange, ces études révèlent une forte variabilité de la réponse des microalgues (Fernandez-alba *et al.*, 2002 ; Blackaus *et al.*, 2004 ; Koutsaftis et Aoyama, 2006, Gatidou et Thomadai, 2007). Les CE50 déterminées, dépendantes de l'espèce et des conditions de réalisation du test (Tableau 7), varient de 1 à 45 $\mu\text{g.L}^{-1}$. Les produits de dégradation du diuron (DCPMU, DCPU et DCA) sont beaucoup moins toxiques que la molécule mère (Fernandez *et al.*, 2002 ; Gatidou et Thomadai, 2007).

Au niveau du périphyton, donc à une échelle plus complexe que les tests monospécifiques mettant en évidence des relations dose–effet simples, Arrhenius *et al.* (2004), ont démontré que le diuron était l'herbicide le plus toxique parmi 12 inhibiteurs du photosystème II. Les CE50 obtenues pour le diuron sont de 8.4-11.4 $\mu\text{g.L}^{-1}$ en été et de 3.5-4.9 $\mu\text{g.L}^{-1}$ au printemps. Elles peuvent atteindre 100 $\mu\text{g.L}^{-1}$ pour d'autres herbicides (Fluometuron ou le Monolinuron).

Tlili *et al.*, (2008) démontraient également l'importance du mode de contamination (durée et intensité de l'exposition) pour évaluer la réponse de communautés périphytiques à la pollution par le diuron. Ils ont ainsi testé 8 modes de contaminations couplant ou non une exposition chronique (1 $\mu\text{g.L}^{-1}$ de diuron) avec et un ou plusieurs pics de pollution (7 ou 14 $\mu\text{g.L}^{-1}$ de diuron). La réponse du périphyton à une contamination dépend de son histoire :

des communautés préalablement exposées au diuron, sont plus tolérantes à un pulse de contamination ($14 \mu\text{g.L}^{-1}$) que des communautés n'ayant pas subi de stress préalable.

Des études à l'échelle de la communauté microalgale ont également montré que la présence de diuron diminuait la production primaire, la biomasse algale, la richesse spécifique et modifiait la structure de la communauté planctonique ou périphytique (Molander et Blanck, 1992; Arrhenius *et al.*, 2004; Perschbacher et Ludwig, 2004). Au sein du périphyton, l'impact du diuron ne se limite cependant pas au seul compartiment algal, mais peut également affecter, directement (Canna-Michaelidou et Nicolaou, 1996; Strachan *et al.*, 2001; Tixier *et al.*, 2001) ou indirectement, la communauté bactérienne (Riemann *et al.*, 2000, Pesce *et al.*, 2006).

Espèce	Groupe	Produits	Durée	Endpoint	Toxicité CE50 ($\mu\text{g.L}^{-1}$)	Auteurs
<i>Scenedesmus vacuolatus</i>	Chlorophycée	diuron	24 h	Biomasse	6.6	Blackaus <i>et al.</i> , 2004
<i>Chaetoceros granilis</i>	Diatomée	diuron	24h	Biomasse	4.93	Koutsaftis et Aoyama, 2006
<i>Scenedesmus subcapitatus</i>	Chlorophycée	diuron	72h	Inhibition croissance	19	EFSA Scientific Report
		diuron	72h	Biomasse	1	
<i>Anabaena flosaquae</i>	Cyanobactérie	diuron	72h	Biomasse	23	
		diuron	72h	Inhibition croissance	31	
<i>Selenastrum Capricornotum</i>	Chlorophycée	diuron	72h	Inhibition croissance	45	Fernandez <i>et al.</i> , 2002
		DCEMU	72h	Inhibition croissance	58	
		DCEPU	72h	Inhibition croissance	70	
<i>Dunaliella tertiolecta</i>	Chlorophycée	diuron	96h	Inhibition croissance	5.9	Gatidou et Thomaidis, 2007
		DCEMU	96h	Inhibition croissance	345	
		DCEPU	96h	Inhibition croissance	< 15% d'inhibition	
		DCA	96h	Inhibition croissance	6381	
<i>Navicula forcipata</i>	Diatomée	diuron	96h	Inhibition croissance	27	
		DCA	96h	Inhibition croissance	6269	

Tableau 7 : Différents résultats de test de toxicité du diuron sur des micro-algues.

C- Systèmes expérimentaux pour l'étude d'impact des pesticides en milieux aquatiques

Ramade en 1977 donnait la première définition du terme Ecotoxicologie (terme créé par un toxicologue (R. Truhaut en 1974) : « L'écotoxicologie est la science qui étudie les polluants dans les écosystèmes ». Cette définition est élargie en 1992 et étend cette science à l'étude des polluants dans la biosphère toute entière (Ramade, 1992). Ainsi, l'écotoxicologie regroupe l'évaluation des processus et mécanismes de dispersion des polluants dans les biotopes et la biomasse, celle de leurs effets sur les populations, les peuplements, les communautés et les écosystèmes pris dans leur ensemble. Ceci implique des contextes différents et donc la mise en œuvre d'approches expérimentales adaptées (figure 13).

Une première série d'approches expérimentales de l'étude des polluants en laboratoire est plus du ressort de la toxicologie de l'environnement que de l'écotoxicologie (Ramade, 2007). Le contexte des études est alors fondamentalement réductionniste et donne la priorité à la réplicabilité des données acquises (ex : mono-essais de laboratoire, microcosmes). Dans ce type d'études, les paramètres expérimentaux sont peu nombreux et faciles à normaliser.

A l'opposé de ces études, les secondes, effectuées *in* ou *ex situ* et dans des conditions proches ou identiques à celles définies par les paramètres environnementaux du site de l'expérience sont bien plus réalistes. Elles ont donc été conçues pour fournir une réponse appropriée à la question de l'évaluation de l'impact réel des polluants dans les écosystèmes naturels (mésocosmes). Ces dispositifs sont pourvus d'une représentativité élevée.

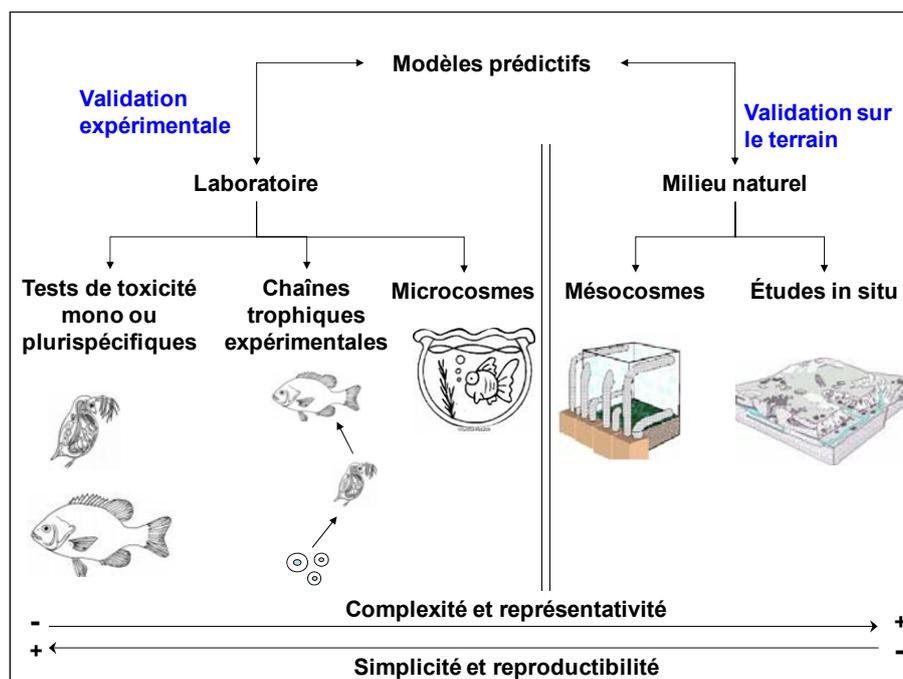


Figure 13 : Les divers niveaux de complexité biologique concernant les approches expérimentales en écotoxicologie (d'après Caquet *et al.*, 1996)

1- Mono essais de laboratoire : test d'écotoxicité

Un test d'écotoxicité est un essai expérimental permettant de déterminer l'effet d'un ou plusieurs produits sur un groupe d'organismes sélectionnés, dans des conditions définies (Keddy *et al.*, 1994). Il est possible de classer les tests d'écotoxicité en fonction du temps d'expérimentation par rapport au cycle de vie de l'organisme et de la complexité de la communauté biologique étudiée.

Les tests de toxicité aiguë couvrent une partie relativement courte du cycle de vie de l'organisme. Pour les bactéries, les protistes, les algues, les poissons, les daphnies, les rats et les oiseaux, cette période varie de 24 à 48 heures. La toxicité chronique résulte, au contraire, de l'exposition répétée d'un organisme vivant à de faibles doses d'une substance sur une longue période et peut être mesurée par des changements du métabolisme, de reproduction, l'apparition de mutations et la mort. Beaucoup de protistes et d'algues sont capables de réaliser une division cellulaire en moins de 24 h. Pour une algue, une période de 24 heures peut correspondre à une génération entière. Par conséquent, les tests sur les organismes unicellulaires couvrant une période supérieure à 24 heures doivent plutôt être classés parmi les tests de toxicité chronique (Landis et Yu, 1998). Pour caractériser la toxicité d'une substance dans un contexte réglementaire, il est nécessaire d'évaluer sa toxicité aiguë et sa toxicité chronique pour plusieurs niveaux trophiques.

Il existe différents critères d'évaluation de cette toxicité :

- CE50 : Concentration efficace inhibant 50% du caractère étudié (croissance, activité photosynthétique...), par rapport à un témoin,
- CL50 : Concentration létale entraînant la mort de 50 % de la population, par rapport à un témoin,
- NOEC : No Observed Effect Concentration. La concentration à laquelle aucun effet n'est mesuré sur le caractère étudié,
- LOEC : Lowest Observed Effect Concentration. La concentration la plus faible du schéma expérimental entraînant un effet mesurable.

Pour une évaluation du risque potentiel pour les écosystèmes, les gestionnaires peuvent également utiliser les notions de :

- PNEC : Predicted No Effect Concentration
- PEC : Predicted Effect concentration.

On peut ainsi calculer un rapport PEC/PNEC qui sert de base à l'évaluation du risque potentiel d'application de substance polluante sur les milieux.

Les relations dose-réponse sont déterminées par les variations de la réponse biologique en fonction de la dose administrée. En général, l'augmentation de la dose d'une substance nocive entraîne une hausse proportionnelle de l'effet toxique sur le paramètre

biologique étudié. La courbe dose-réponse définit le lien entre la dose et la réponse (figure 14), sur la base des hypothèses suivantes :

- la réponse augmente conjointement à la dose administrée,
- il existe une dose seuil, en deçà de laquelle il n'y a aucun effet mesurable.

Deux paramètres de cette courbe sont utilisés pour la caractériser (Landis et Yu, 1998) :

- la concentration ou la dose ayant un effet sur 50 % du critère étudié (CE50) (mais on peut parfaitement utiliser une CE25 ou CE 10).... Par ailleurs certaines substances peuvent avoir un effet positif et être exprimée par une CE125 (cas du P sur la croissance algale).
- la pente de la partie linéaire de la courbe.

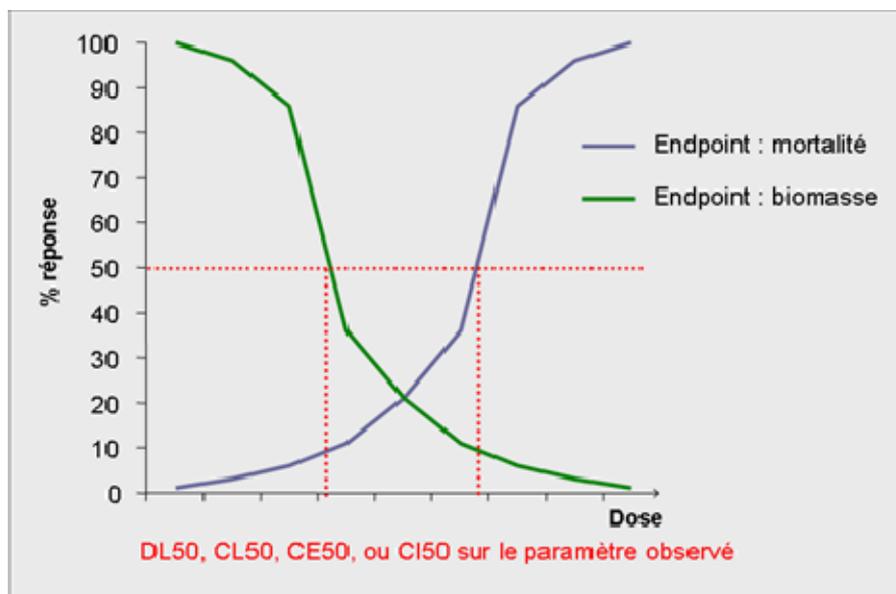


Figure 14 : Exemple de courbe dose-effet sur deux « endpoints » : la biomasse et la mortalité

L'utilité des essais mono-spécifiques de laboratoire pour caractériser les propriétés écotoxicologiques (CE50, NOEC, LOEC...) de molécules potentiellement polluantes n'est plus à prouver. Mis en œuvre au laboratoire dans des conditions contrôlées, ils satisfont au mieux les critères de répétabilité, de reproductibilité, de fiabilité et de robustesse. Toutefois, leur utilisation pour l'évaluation et la prédiction des effets sur les écosystèmes naturels est limitée du fait de leur manque de réalisme écologique. Pour aborder ce dernier aspect, il apparaît nécessaire de travailler à un niveau d'organisation biologique supérieur, au sein de systèmes expérimentaux plus complets.

2- Microcosmes de laboratoires et mésocosmes ex ou in situ

Il existe autant de systèmes expérimentaux (micro ou mésocosmes) que d'études de flux, d'impact...de polluants. Dans le but d'être le plus proche possible des facteurs naturels

d'exposition à un toxique et dans le cas de l'étude de pesticides sur le périphyton, les mésocosmes lotiques, notamment les rivières artificielles, sont particulièrement adaptés. Ce sont des systèmes expérimentaux de taille et de forme très variables, permettant de simplifier un écosystème naturel. Ils peuvent être au laboratoire, *ex situ* ou installés sur le site même de l'étude (*in situ*). On distingue les microcosmes des mésocosmes par la taille croissante du système et par leur localisation (en intérieur ou en extérieur). Si cette distinction est admise par la communauté, on notera cependant un léger abus de langage dans nos propos puisque la SETAC (1991) définissait une longueur minimale de 15 m pour qu'une rivière expérimentale puisse être considérée comme un mésocosme.

De nombreux termes sont rencontrés dans la littérature pour désigner ces systèmes expérimentaux lotiques : rivières de laboratoire, rivières artificielles, canaux expérimentaux, canaux artificiels.... En 1971, Warren et Davies emploient le terme de « rivière de laboratoire » pour désigner un canal relativement petit dans lequel l'écoulement est contrôlé et dont l'utilisation permet d'étudier des systèmes biologiques complexes et leurs interactions avec le milieu. Cette définition est précisée par Lamberti et Steinman (1993) qui soulignent que l'emploi du terme « rivière de laboratoire » doit se limiter à des systèmes expérimentaux positionnés en milieu fermé. Les termes « canaux expérimentaux » ou « canaux artificiels » sont plus fréquemment utilisés lorsque les caractéristiques physiques du milieu sont étudiées au cours des essais. Dans le présent document nous emploierons donc préférentiellement le terme de « rivière de laboratoire » pour nos microcosmes et de « canaux artificiels » pour les mésocosmes installés en extérieurs. Ces systèmes expérimentaux permettent de travailler à des niveaux d'organisation biologique complexes et donc de prendre en compte les relations interspécifiques mais aussi des interactions abiotiques. Dans le cas d'essais d'écotoxicologie il est également possible d'établir une relation « exposition-réponse » et non une relation « concentration-effet », c'est à dire, de prendre en compte les conditions d'exposition des organismes aux polluants et d'adopter une approche multicritères pour caractériser l'écosystème (Volatier, 2004).

Du fait de la taille relativement importante des dispositifs, ces essais permettent d'étudier la réponse des communautés en continu et à des temps d'exposition supérieurs à ceux observés dans le cas de bio-essais de laboratoire. Ils sont donc plus adaptés à :

- l'étude des effets d'une perturbation sur la dynamique de succession des espèces,
- l'étude des effets d'une perturbation sur les processus écologiques fondamentaux, tels que les cycles de la matière et les flux d'énergie (Guckert, 1993),
- l'identification des effets temporaires, progressifs ou persistants (Rand *et al.*, 2000 ; Belanger *et al.*, 2002), qui peuvent être évalués par la résilience des communautés.

- l'étude des effets liés à l'intensité d'une perturbation (concentration et forme du contaminant) et à la dynamique d'exposition (durée, fréquence),
- l'étude simultanée du devenir et des effets des polluants (Belanger *et al.*, 2000),
- la distinction des effets directs et des effets écologiques indirects d'une perturbation (Belanger *et al.*, 2000 ; Culp *et al.*, 2000 ; Hense *et al.*, 2003).

Pour conclure, les canaux ou rivières expérimentales ne sont pas la copie conforme de l'écosystème étudié. Cependant, ils permettent le contrôle de certaines variables et donc la simplification du système afin de faciliter l'identification de relations cause-effet. On peut ainsi les définir comme un maillon entre le test écotoxicologique et les études *in situ* (Caquet *et al.*, 2000) indispensable pour la compréhension des effets de xénobiotiques et leur interaction éventuelle avec les facteurs de l'environnement.

Chapitre 2 :

Matériel et Méthodes

A- Systèmes expérimentaux et site d'étude

1- Les essais mono-culture : test d'inhibition de la croissance algale

Afin d'estimer la toxicité du diuron, de l'azoxystrobine et d'un mélange de ces deux pesticides, par la définition de la CE_{50} et de la pente de la relation dose-effet, nous avons mis en place des tests d'inhibition de la croissance algale.

Ces tests ont été effectués sur une souche de *Selenastrum Capricornutum*, en microplaques 96 puits, en présence de concentrations croissantes de pesticides selon la norme ISO 8692 : 1989 (f).

Les solutions mères des deux pesticides ont été réalisées à partir de standards analytiques (Riedel De Haën, Sigma Aldrich, France) afin d'obtenir des solutions à 40 mg.L^{-1} pour le diuron, 60 mg.L^{-1} pour l'azoxystrobine et une solution du mélange à 240 mg.L^{-1} de diuron + 120 mg.L^{-1} d'azoxystrobine (tableau 8).

	Masse molaire (g.mol^{-1})	Masse (mg)	Solvant	Volume solvant (mL)
diuron	233.1	4	eau	100
azoxystrobine	403.4	6	Acétone	100
Mélange		2.4 de diuron 1.2 d'azoxystrobine	Acétone	10

Tableau 8 : Préparation des solutions mères de pesticides

Les concentrations finales d'exposition des algues sont reportées dans le tableau 9. Ces concentrations ont été choisies en fonction des données de la littérature sur ce type d'algue et permettent d'encadrer la valeur de la CE_{50} attendue. Pour le mélange, un rapport 2:1 (diuron:azoxystrobine) a été choisi après analyse des données issues du site de la Morcille.

	diuron	azoxystrobine	mélange	
			diuron	azoxystrobine
C0	0 mg.L^{-1}	0 mg.L^{-1}	0 mg.L^{-1}	$0 \text{ mg.L}^{-12.4}$
C1	8 mg.L^{-1}	$1,2 \text{ mg.L}^{-1}$	2.4 mg.L^{-1}	1.2 mg.L^{-1}
C2	0.8 mg.L^{-1}	$0,6 \text{ mg.L}^{-1}$	1.2 mg.L^{-1}	0.6 mg.L^{-1}
C3	$80 \text{ } \mu\text{g.L}^{-1}$	$0,3 \text{ mg.L}^{-1}$	0.6 mg.L^{-1}	0.3 mg.L^{-1}
C4	$16 \text{ } \mu\text{g.L}^{-1}$	$60 \text{ } \mu\text{g.L}^{-1}$	0.3 mg.L^{-1}	0.15 mg.L^{-1}
C5	$3.2 \text{ } \mu\text{g.L}^{-1}$	$12 \text{ } \mu\text{g.L}^{-1}$	$60 \text{ } \mu\text{g.L}^{-1}$	$30 \text{ } \mu\text{g.L}^{-1}$
C6	$0.64 \text{ } \mu\text{g.L}^{-1}$	$2,4 \text{ } \mu\text{g.L}^{-1}$	$12 \text{ } \mu\text{g.L}^{-1}$	$6 \text{ } \mu\text{g.L}^{-1}$
C7	$0.128 \text{ } \mu\text{g.L}^{-1}$	$0,48 \text{ } \mu\text{g.L}^{-1}$	$2.4 \text{ } \mu\text{g.L}^{-1}$	$1.2 \text{ } \mu\text{g.L}^{-1}$
C8	$0.0256 \text{ } \mu\text{g.L}^{-1}$	$0,096 \text{ } \mu\text{g.L}^{-1}$	$0.48 \text{ } \mu\text{g.L}^{-1}$	$0.24 \text{ } \mu\text{g.L}^{-1}$
C9	$0.0052 \text{ } \mu\text{g.L}^{-1}$	$0,0192 \text{ } \mu\text{g.L}^{-1}$	$0.096 \text{ } \mu\text{g.L}^{-1}$	$0.048 \text{ } \mu\text{g.L}^{-1}$

Tableau 9 : Concentration (mg.L^{-1}) d'exposition des algues pour le test d'inhibition de la croissance.

1.1- Réalisation des tests en microplaques

Les tests sont réalisés en microplaques 96 puits selon le schéma présenté sur la figure 15. On introduit 100 μL de culture algale en phase exponentielle de croissance, 100 μL de milieu de culture liquide (L-C) et 50 μL de la solution de pesticide à la concentration choisie dans chaque puit. Les microplaques sont ensuite incubées en chambre de culture pendant 72 h selon les conditions suivantes :

- température : 18-20 °C
- luminosité : 100-120 $\mu\text{E. m}^{-2}.\text{s}^{-1}$
- photocycle : 24 heures de lumière

On effectue une mesure de la densité optique à 650 nm (Bérard *et al.*, 1998) à T = 72h et 96 h à l'aide d'un lecteur spectrophotométrique de microplaques MRX-II (Dynex Technologies). Ces mesures nous permettent d'établir une courbe de relation dose-effet et d'estimer la CE_{50} .

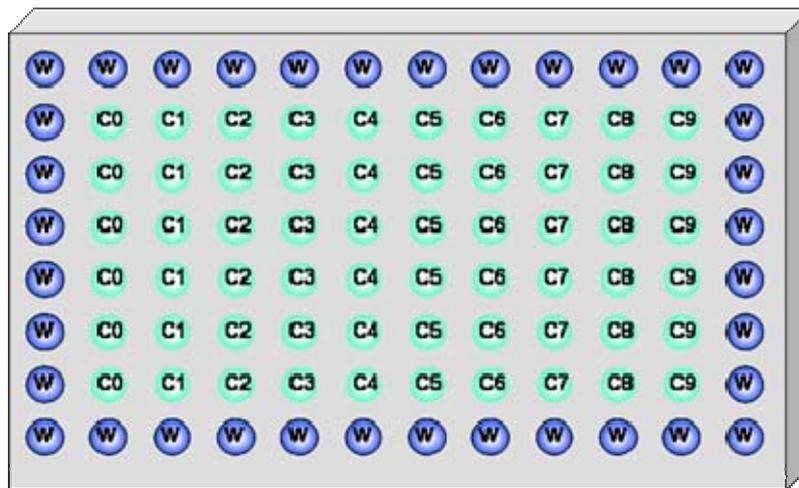


Figure 15 : Schéma d'une microplaque 96 puits. Les puits W représentent les blancs constitués du milieu liquide L-C. Les puits C contiennent l'échantillon en présence de la gamme de concentration en pesticides (6 réplicats).

1.2- Détermination de la CE_{50}

La méthode de calcul des CE_x est celle développée dans le logiciel RegTox (http://perso.wanadoo.fr/eric.vindimian/DOC_fr_web/doc_fr_2.html). Cette méthode permet d'éviter des réplicats de mesure pour chaque concentration, en multipliant les concentrations testées. Nous avons estimé à l'aide de cette macro les CE_{50} optimales et l'intervalle de confiance de cette valeur pour un risque $\alpha = 5\%$. La toxicité est également caractérisée par la valeur de la pente de la relation dose-effet décrite ici par le nombre de Hill. Un intervalle de confiance de la pente est également disponible pour un risque $\alpha = 5\%$.

2- Les microcosmes : essais en rivières de laboratoire

La communauté périphytique installée dans les rivières de laboratoire est exposée simultanément à une modification des conditions lumineuses et de la qualité chimique de l'eau. On cherche ainsi à observer l'effet conjoint de l'ombrage et de l'introduction d'un pesticide (diuron) à une faible concentration ($1\mu\text{g.L}^{-1}$), ainsi que la récupération de cette communauté après arrêt de la contamination. Deux modes de contamination ont été testés : contamination « subite » et contamination chronique. Dans ce travail, une pollution « subite » correspondra à l'introduction de diuron à faible concentration sur une situation « propre » tandis qu'une pollution chronique correspondra à une situation où dès le départ le périphyton est en contact avec le diuron.

2.1- Description des rivières

8 petites rivières de laboratoires ($L = 90\text{ cm}$, $l = 18\text{ cm}$ et $h = 4\text{ cm}$) ont été utilisées. Le volume total d'eau dans ces rivières est de 15 L pour une hauteur d'eau de 4 cm. L'eau est prélevée dans la zone amont de la Morcille et renouvelée toutes les semaines. Un ombrage est créé par la mise en place d'un grillage à maillage grossier au-dessus des rivières E, F, G et H. Des pompes assurent la re-circulation de l'eau dans les rivières, au départ d'un aquarium d'alimentation où l'eau retourne par écoulement gravitaire.

2.2- Nature et positionnement des substrats

La colonisation du périphyton se fait sur des lames en verre ayant une face dépolie pour faciliter l'adhésion ($7.5 * 2.5\text{ cm}$) disposées régulièrement au fond de la rivière.

2.3- Déroulement des essais et échantillonnage (figure 16)

L'expérimentation est suivie pendant 2 mois, au cours desquels 3 prélèvements ont été réalisés. Les prélèvements se font de manière aléatoire, par tirage au sort de 6 lames par canal aux 3 dates suivantes :

- **T0** = à la fin d'une période de colonisation de 4 semaines durant laquelle les canaux A, B, E et F ne subissent aucune pollution, alors que les canaux C, D, G et H ont subis 4 semaines de pollution.

- **T15** = après 6 semaines de développement du périphyton et respectivement: 2 semaines de pollution pour les canaux B et F, 6 semaines pour les canaux C et G et 15 jours d'arrêt de pollution pour les canaux D et H.

- **T30** = après 8 semaines de développement et donc 4 semaines de pollution pour les canaux B et F, 8 semaines pour les canaux C et G et 4 semaines de restauration pour les canaux D et H.

Les canaux A et E restent donc indemnes de toute pollution durant les 2 mois de l'expérimentation. La concentration en diuron au sein des rivières polluées est de $1\mu\text{g.L}^{-1}$. A chaque prélèvement, le biofilm récolté sur les 6 lames de verre a été mis en suspension dans 150 mL d'eau du canal préalablement filtrée sur $0.2\ \mu\text{m}$. Cette solution périphytique a ensuite été homogénéisée par agitation puis répartie pour les différentes analyses.

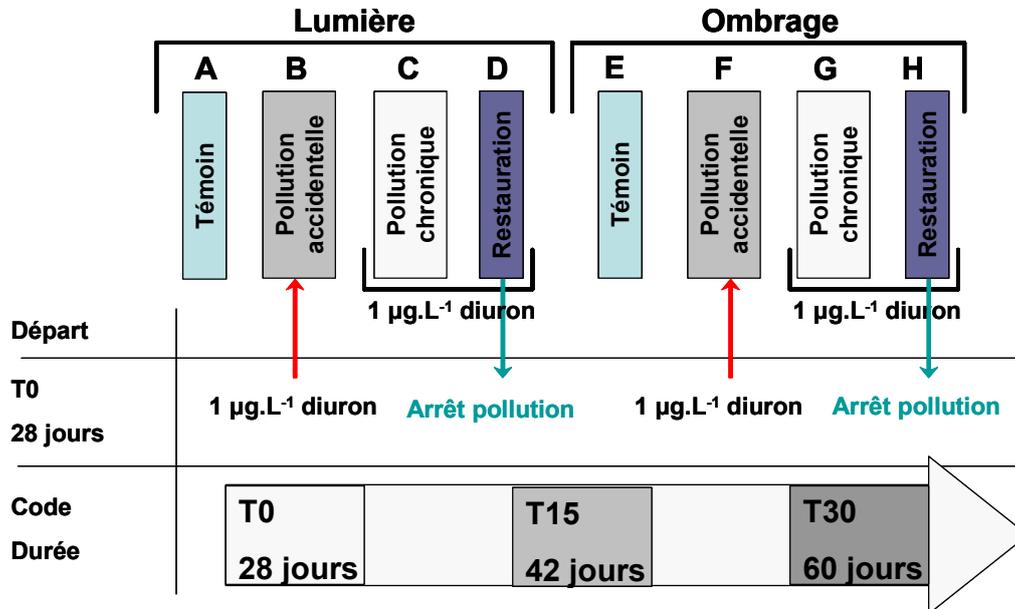


Figure 16 : Plan expérimental de l'étude en microcosmes

3- Les mésocosmes : essais en canaux artificiels

La communauté périphytique installée dans des canaux artificiels est exposée simultanément à une modification des conditions hydrauliques et à une modification de la qualité chimique de l'eau. On cherche ainsi à observer l'effet conjoint de l'hydraulique et de l'introduction d'un mélange de pesticides (diuron -azoxystrobine) à faible concentration. Ces essais ont été réalisés dans quatre canaux artificiels conçus au LSE-ENTPE par L. Volatier (2004) et installés en extérieur sur le site de l'UMR CARTEL.

L'influence du régime hydraulique sur la structure et le fonctionnement du périphyton est observée à deux niveaux :

- **intra-canal** : par comparaison de périphyton échantillonné dans des zones de courant contrasté (vitesses lentes $< 0.2\ \text{m.s}^{-1}$ et rapides $0.2 - 1\ \text{m.s}^{-1}$)
- **inter-canal** : par comparaison des prélèvements issus de canaux ayant un régime hydraulique laminaire à ceux issus de canaux ayant un régime hydraulique mixte.

Dans ces conditions hydrauliques, l'effet d'une modification de la qualité de l'eau est étudié par prélèvement du périphyton avant et après exposition à un mélange de pesticides (diuron et azoxystrobine). Les substrats artificiels, installés au fond des canaux, sont colonisés

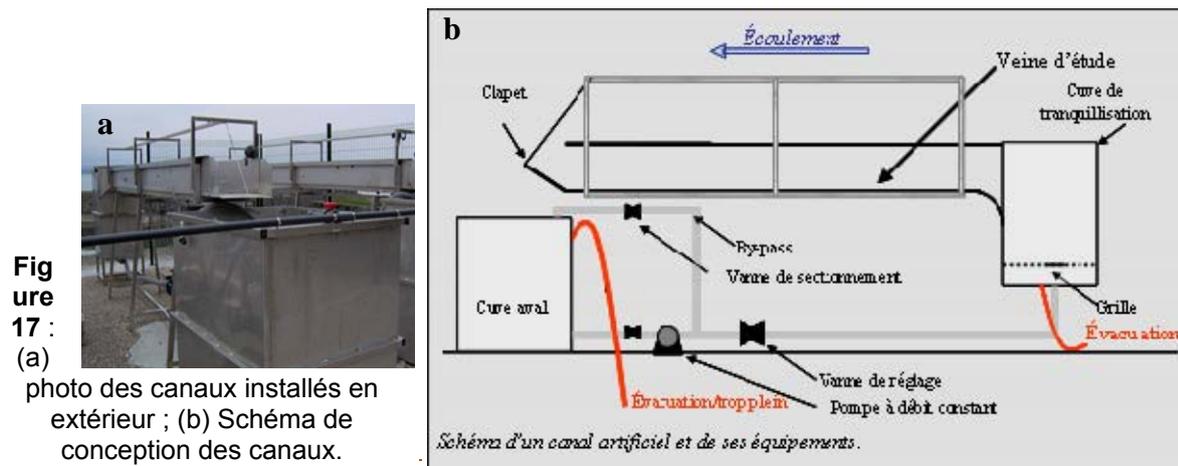
pendant 1 mois. Dans les canaux tests, le mélange polluant est alors introduit pendant 1 mois. On a donc 4 canaux représentant 4 modalités expérimentales différentes :

- **canal 1** : canal témoin turbulent
- **canal 2** : canal pollué turbulent
- **canal 3** : canal pollué laminaire
- **canal 4** : canal témoin laminaire

3.1- Description des canaux artificiels

Les canaux ainsi que leurs supports sont en acier inoxydable. Chaque canal se compose de trois modules indépendants (figure 17) :

- une partie linéaire, de section rectangulaire constante, la veine d'étude dont le dimensionnement est : 400 x 40 x 35 cm ;
- une cuve située en extrémité amont de la veine d'étude qui joue le rôle de cuve de tranquillisation du flux : 70 x 70 x 125 cm
- une cuve aval qui sert essentiellement à la remise en circulation du fluide lorsque l'installation fonctionne en circuit semi-fermé ou fermé : 130 x 92 x 124 cm.



L'alimentation de la cuve de tranquillisation se fait par le fond, et la jonction cuve/veine d'étude est assurée par un convergent (entonnement) en forme d'ellipse pour éviter un changement trop brutal de section. Le volume total d'eau dans un canal est de 2.14 m³. La mise en mouvement de l'eau et sa re-circulation sont assurées par une pompe en acier inoxydable (GRUNDFOS, tri 400V).

Un schéma de principe (Volatier, 2004) de fonctionnement des canaux est présenté dans la figure 17. Les canaux sont alimentés avec l'eau du lac Léman prélevée en continu à 36 m de profondeur. Ils fonctionnent en circuit semi-ouvert grâce à un trop plein et. l'eau de chaque canal est entièrement renouvelée environ 4 fois par jour. L'eau évacuée par le trop-plein est reversée au lac au travers d'un filtre à charbon actif destiné à piéger les pesticides.

Les turbulences au sein des canaux 1 et 2 sont créées par l'installation dans la veine d'étude de chicanes en plexiglas (figure 18).



Figure 18 : Photo des chicanes en plexiglas installée dans le canal 1 pour crée des zones contrastées de vitesse de courant

Au sein de ces canaux « turbulents », des zones d'hydrauliques différentes sont identifiées : les zones lentes (0 à 0.2 m.s^{-1}) et les zones rapides (0.2 à 1.1 m.s^{-1}). Les canaux laminaires présentent des vitesses homogènes le long de la veine d'étude, comprises entre 0 et 0.2 m.s^{-1} . Les vitesses locales ont été mesurées avec un micro-moulinet et leurs profils sont reportés sur la figure 19.

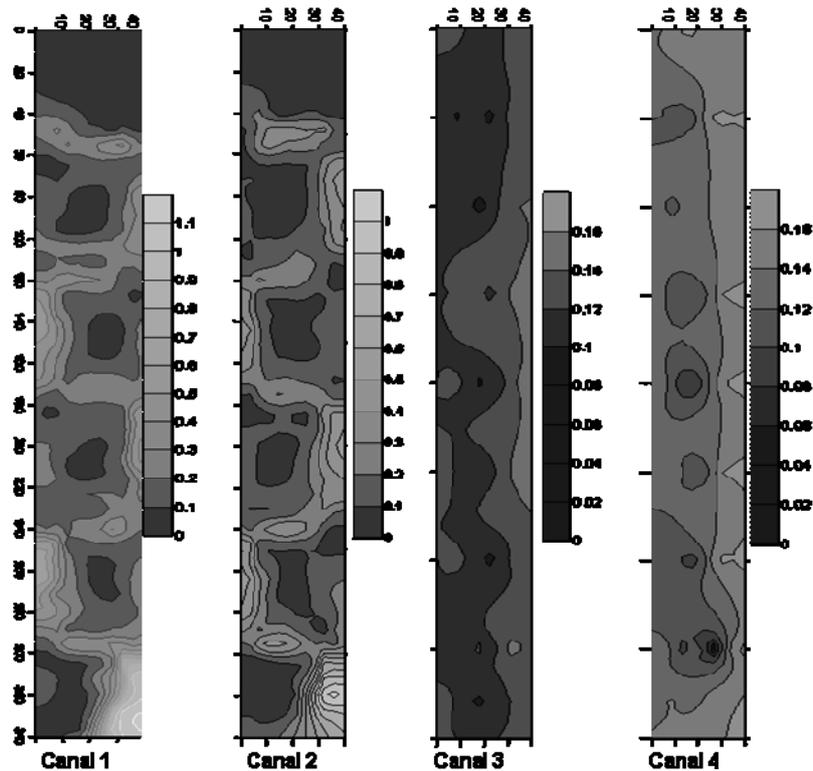


Figure 19 : Profils de vitesse de courant (m.s^{-1}) obtenu avec le logiciel SigmaPlot

3.2- Nature et positionnement des substrats

Les substrats artificiels utilisés sont de deux types :

- lames de verre avec une face sablée pour une meilleure adhésion du biofilm (7.5 x 2.5 cm)
- des pastilles de verre avec une face sablée (surface = 0.65 cm²)

Les lames et pastilles nécessaires aux analyses de chaque prélèvement sont collées sur une même plaque de carrelage afin de faciliter l'échantillonnage (figure 20). Ces unités de prélèvement sont ensuite placées sur le fond de la veine d'étude, dans une zone d'échantillonnage définie selon les profils de vitesse.

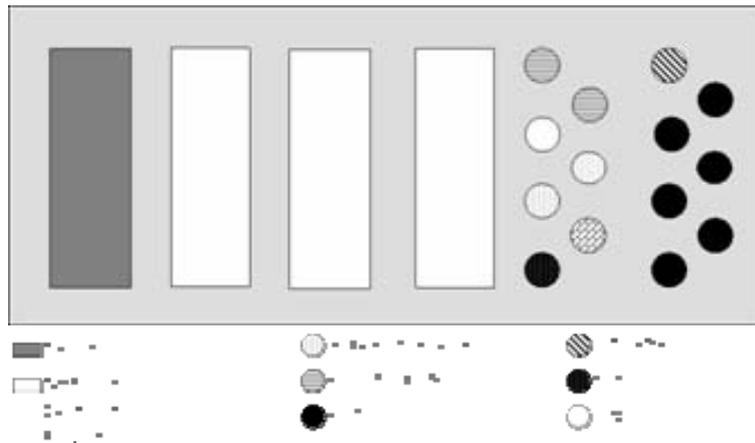


Figure 20 : Schéma d'une unité de prélèvement (carrelage). A chaque prélèvement trois unités sont prélevées par zone de vitesse ou par canal

3.3- Déroulement des essais et échantillonnage

Deux expérimentations ont été réalisées : une estivale (10/05/06 au 17/07/06) et une automnale (11/09/06 au 13/11/06). Elles ont duré environ 63 jours et sont composées chacune d'une phase de colonisation du substrat (28 jours) et de 35 jours d'exposition au mélange polluant dans les canaux tests (figure 21 et fiche intercalaire).

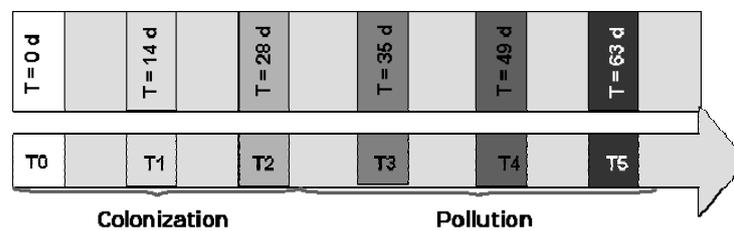


Figure 21 : Calendrier des expérimentations

Cinq échantillonnages ont été réalisés au cours de l'expérimentation. Pour chaque date, nous avons prélevé aléatoirement 3 échantillons (3 unités de prélèvement décrites ci-dessus) de biofilm par canal ou par zone hydraulique. Les prélèvements sont toujours effectués à la même heure, soit à 9h du matin dans le cadre de cette étude. Au total 200 échantillons de biofilms ont été récoltés. Biomasse, production primaire et bactérienne ont

été immédiatement caractérisées. Les autres paramètres sont déterminés ultérieurement sur échantillons congelés ou formolés.

3.4- Le mélange polluant

Le mélange polluant est composé de deux pesticides : l'azoxystrobine (fongicide) et le diuron (herbicide). La concentration théorique totale en pesticide présente au sein des canaux est de $1.5 \mu\text{g.L}^{-1}$: $1 \mu\text{g.L}^{-1}$ de diuron et $0.5 \mu\text{g.L}^{-1}$ d'azoxystrobine. Le jour de l'introduction du polluant, l'installation est en circuit fermé. Ensuite, pour maintenir cette concentration, en compensant l'évaporation et l'élimination des pesticides par le rejet d'eau au trop plein, le mélange est introduit en continu via une pompe péristaltique (Ismatec, IPN8).

Des dosages du diuron et de l'azoxystrobine sont effectués, dans l'eau et au sein du biofilm, pour contrôler l'apport en polluant pendant l'expérimentation.

3.5- Analyses physico-chimiques

Des mesures de pH, température et de conductivité ont été effectuées tous les jours durant l'expérimentation à l'aide d'une sonde multiparamètres.

Pour vérifier l'homogénéité de la qualité chimique de l'eau, une fois par semaine et les jours de prélèvements, des échantillons d'eau ont également été prélevés afin de mesurer :

- le titre alcalimétrique complet (TAC₃, norme AFNOR NF EN ISO 9963-1),
- la teneur en azote ammoniacal (NH_4^+ , norme AFNOR NF T 90-015), en azote nitrique (NO_3^- , norme AFNOR NF EN ISO 13395), en azote nitreux (NO_2^- , Norme AFNOR NF EN 26777), en silice (SiO_2 , Norme AFNOR NF T 90-007) en OrthoPhosphates (PO_4^{3-} , Norme AFNOR NF EN 1189)
- le carbone organique dissous (COD, FD T 90-102).

4- Etude *in situ* : site atelier Ardières-Morcille

La Morcille, affluent de l'Ardières (Beaujolais, France), est une petite rivière (8km) qui traverse un bassin versant occupé à 60-70 % par de la vigne, avec un habitat dispersé, sans traitement d'effluent. Les communautés périphytiques de ce cours d'eau subissent deux types de pollution : les phytosanitaires (utilisés pour le traitement de la vigne) et la pollution organique (liée à la présence des habitats). Cette rivière fait l'objet d'un suivi physico-chimique et écologique depuis plusieurs années dans le cadre de la Zone Atelier Bassin du Rhône et de différents programmes de recherche régionaux ou nationaux (CPER Rhône Alpes, ECCO, ECOGER). Dans ces études, les communautés périphytiques ont été étudiées selon le seul gradient amont-aval de pollution. Trois zones ont été distinguées : référence

(amont), intermédiaire et polluée (aval). Cette échelle d'observation ne permet pas de prendre en compte les changements de régime hydraulique locaux qui peuvent interagir avec les modifications de la qualité de l'eau. Or la Morcille, comme toute rivière, est constituée de différents faciès hydrauliques le long du continuum fluvial amont-aval mais également sur un transect transversal.

Pour décrire précisément l'impact du mélange polluant sur ce cours d'eau, il est important de fragmenter l'étude de la rivière à l'échelle du faciès hydraulique. Le rôle de la vitesse du courant sur la structure, la diversité, le fonctionnement et la réponse des communautés microbiennes a ainsi été évalué. Une étude saisonnière de la réponse des communautés microbiennes nous a également permis de caractériser l'effet de la température et de l'ensoleillement. Trois scénarii observables d'un point de vue spatial et temporel ont donc été étudiés.

4.1- Caractéristiques géographiques du site d'étude

Le bassin versant de l'Ardières (220 km²) se situe au nord du département du Rhône, dans le Haut-Beaujolais, entre la bordure orientale du massif central et l'extrémité ouest de la vallée de la Saône. La Morcille constitue un sous bassin (9 km²) de l'Ardières, et son exutoire se situe en amont de saint Jean d'Ardières (figure 22).

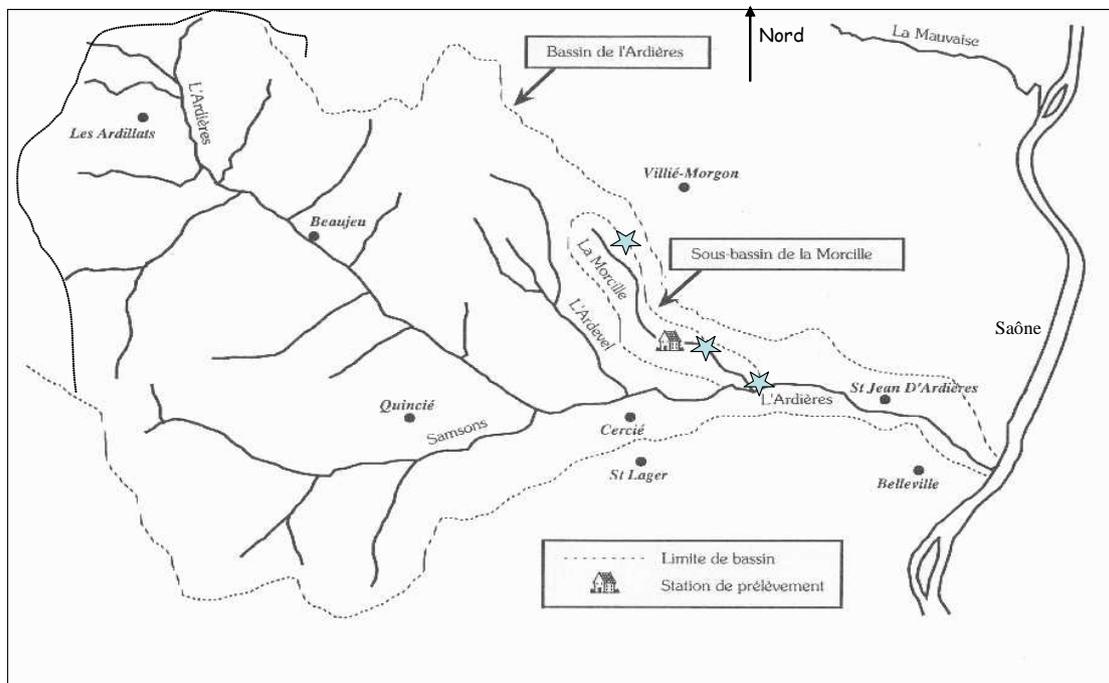


Figure 22 : Cartographie de la Morcille

Quatre sites de prélèvements ont été retenus pour notre étude afin d'évaluer l'effet conjoint de la vitesse du courant et de la présence de phytosanitaire sur le périphyton.

2 sites sont situés à l'amont de la Morcille. Ces sites sont situés en zone boisée, peu cultivée et sans habitation : ils correspondent donc à nos points de référence en terme de qualité chimique de l'eau, mais avec des caractéristiques hydrauliques très contrastées : un site dit « lent » (de type mouille) et « rapide » (de type cascade).

Les 2 autres sites sont situés au niveau des Versauds. Ce site est fortement viticole (53 % du bassin versant) et sa géomorphologie favorise la contamination du cours d'eau par les phytosanitaires. Ce site sera donc notre site test quant à l'effet des phytosanitaires sur la communauté périphytique. Nous avons également, dans cette zone, distingué un site dit « lent », d'un site dit « rapide » (figure 23).

Ces 4 sites sont donc notés :

- **AM L** : zone amont lente
- **AM R** : zone amont rapide
- **AV L** : zone aval lente
- **AV R** : zone aval rapide

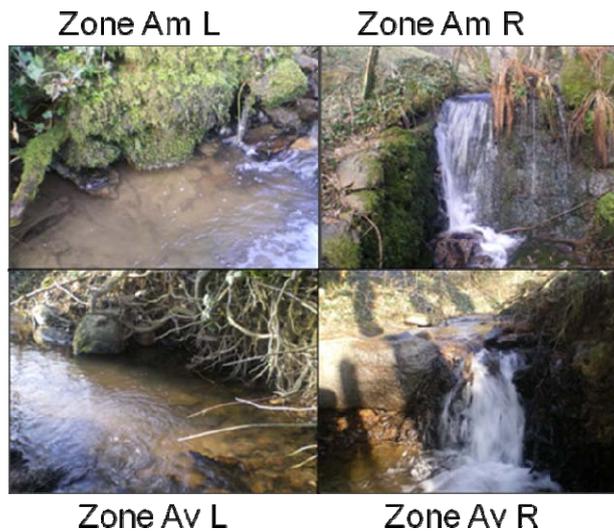


Figure 23 : photographie des quatre sites de prélèvements

4.2- Caractéristiques chimiques et physiques des stations d'échantillonnage

Le site de la Morcille fait l'objet d'un suivi physico chimique au niveau de trois stations depuis 2004. Les résultats d'une campagne de mesure de 2005 sont reportés sur la figure 24. Les sites sont désignés 1 (Saint Joseph), 2 (Versauds) et 3 (Saint Ennemond) d'amont en aval. On observe un gradient d'amont en aval : augmentation de la conductivité (environ 150 à 280 $\mu\text{Sm.cm}^{-1}$), du COD, de la teneur en NH_4^+ , NO_2^- et PO_4^{3-} .

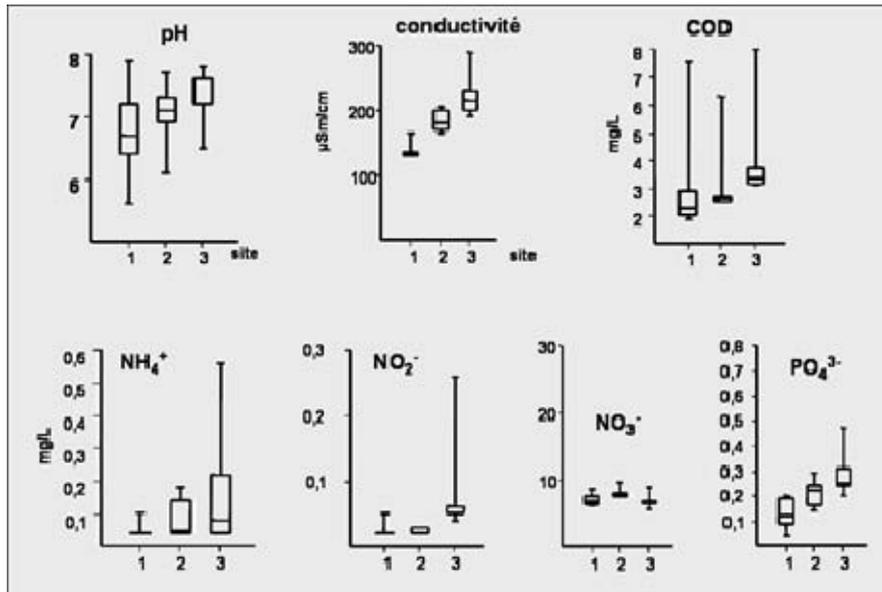


Figure 24 : Analyse physico-chimique de l'eau de la Morcille campagne 2005 (n=6).

Les pesticides ont également été dosés (tableau 10) et leur teneur augmente également d'amont en aval (0,68 à 4,02 $\mu\text{g.L}^{-1}$ en pesticides totaux). On observe une dégradation de la qualité de l'eau passant de la classe « très bonne qualité » (vert) à « qualité moyenne » (jaune). Il est à noter que toutes les substances phytosanitaires présentes sur le site n'ayant pas de seuils de qualité définis, il est impossible de définir une qualité moyenne pour les pesticides organiques.

	1	2	3
Asoxystrobin	0	0,13	0,05
Dichlorobenzamide 2,6	0	0,2	0,17
Diuron	0	0,09	0,43
Monuron	0	0,86	0,02
Myclobutoryl	0	0	0,06
Norflurazon desmethyl	0,07	0,86	0,93
Norflurazon	0	0,38	0,6
Oxadixyl	0	0,18	0,32
Procymidone	0	0,11	0,1
Simazine	0	0,02	0,03
Terbumeton	0	0,02	0,02
Terbutylazine	0	0,14	0,21
Terbutylazine desethyl	0	0,11	0,08
Terbuconazole	0	0	0,08
Total en $\mu\text{g/L}$	0,07	3,1	3,1

Tableau 10 : Teneur ($\mu\text{g.L}^{-1}$) des différents pesticides recherchés dans la Morcille en Juin 2004.

On observe le même gradient amont-aval de diminution de la qualité de l'eau en lien avec la teneur en métaux lourds (notamment As et Cu) (tableau 11).

	Morcille		
	1	2	3
As	2,6	14,4	18,2
Cd	< 0,3	< 0,3	< 0,3
Cr	0,5	0,5	< 0,5
Cu	3,2	4,4	5,3
Ni	< 1	< 1	< 1
Pb	< 1	1,4	< 1
Zn	< 20	< 20	< 20

Tableau 11 : Teneur ($\mu\text{g.L}^{-1}$) des différents métaux lourds recherchés dans la Morcille en Juin 2005. Le surlignage de couleur représente l'appartenance aux classes du SEQeau et donc reflète la qualité chimique de l'eau.

Globalement, et en accord avec les classes de qualité du SEQeau, l'amont (zones boisées) de la Morcille est de bonne qualité en terme de teneur en pesticide et métaux lourds (sauf pour la teneur en cuivre) alors qu'en aval (Saint Ennemonde, zones viticoles et présence d'habitation) la qualité de l'eau est dégradée.

4.3- Nature et positionnement des substrats

Les substrats utilisés pour cette étude sont des cailloux prélevés dans la Morcille. Ces cailloux ont été lavés puis autoclavés afin de les stériliser. Ils ont ensuite été gravés, pour une identification ultérieure rapide, et leurs surfaces ont été mesurées. De 3 à 4 cailloux ont ensuite été placés dans des sacs en grillage à maillage large (figure 25). Cinq sacs ont été placés par zone d'échantillonnage. Un sac correspond alors à un réplicat et un réplicat est constitué de 3 à 5 cailloux.



Figure 25 : photographie d'une unité de prélèvement (sac contenant 3 cailloux autoclavés et identifiés)

4.4- Déroulement des essais et échantillonnage

Deux expérimentations ont été réalisées : une estivale (juin 2007) et une hivernale (janvier 2008). Les sacs ont été fixés dans le lit de la rivière et incubés pendant 6 semaines. Un seul prélèvement a été effectué à la fin de cette période d'incubation. Les sacs ont été

prélevés, maintenus dans l'eau de la rivière le temps du transport vers le laboratoire pour analyse.

4.5- Préparation des échantillons

Au laboratoire, les cailloux ont été brossés à l'aide d'une brosse à dents et le biofilm récolté a été repris dans 100 mL d'eau amont de la Morcille préalablement filtrée sur 0.2 µM. Ces 100 mL de solution périphtyque ont été répartis pour les différentes analyses. La biomasse, les productions primaire et bactérienne ont été immédiatement caractérisées. La détermination des autres paramètres se fait ultérieurement sur échantillons congelés ou formolés.

B- Analyses Biologiques

Des analyses biologiques ont été réalisées pour mettre en évidence un effet de la variation de facteurs physiques (intensité lumineuse, vitesse du courant) et de l'introduction des pesticides au travers des paramètres suivants :

- paramètres généraux de structure du biofilm : biomasse totale, dénombrement cellulaire (bactérien et algal),
- paramètres fonctionnels : intensité des productions primaire et bactérienne,
- paramètres de diversité : composition et structure des communautés périphtyques.

Le tableau 12 récapitule les principales analyses effectuées aux différents niveaux d'étude.

	Test Ecotox	Microcosmes	Mésocosmes		In situ	
Dimensionnement	Microplaques	Canaux de laboratoire	Rivières expérimentales		La Morcille	
		L = 90 cm l = 18 cm h = 4 cm	L = 400 cm l = 40 cm h = 35 cm			
Renouvellement	non	1 x / semaine	4 x / jour			
Durée	72 h	60 jours	63 jours		42 jours	
Descripteurs Physiques						
Eclairement (μmol photons.m ⁻² .s ⁻¹)	Artificiel 100-120	Artificiel 14.6-56.3	été Naturel 566	automne Naturel 226.4	été Naturel 51.93-88.03	hiver Naturel 81.57-125.15
Température (°C)	18-20	non	8.7-26.4	7.2-20.7	9.5-11.8	2.4-3.3
Vitesse du courant (cm.s ⁻¹)	non	1.73-2.8	20 <v<1000		Non caractérisable (min – max)	
Descripteurs Chimiques de l'eau						
Conductivité (μS cm ⁻¹)		x	x	x	x	x
pH		x	x	x	x	x
TAC			x			
NH ₄ ⁺ (mg.L ⁻¹)			x	x	x	x
NO ₃ ⁻ (mg.L ⁻¹)		x	x	x	x	x
NO ₂ ⁻ (mg.L ⁻¹)		x	x	x	x	x
SiO ₂ (mg.L ⁻¹)			x	x		
PO ₄ ³⁻ (mg.L ⁻¹)		x	x	x	x	x
COD (mg.L ⁻¹)		x	x	x	x	x
diuron (μg.L ⁻¹)		x	x	x	x	x
Azoxystrobine (μg.L ⁻¹)			x	x	x	x
Prélèvement et Préparation de l'échantillon						
Support		Lames de verre	Pastilles et lames de verre		Cailloux autoclavés	
Echantillon		Solution périphytique	Périphyton		Solution périphytique	
Descripteurs Biologiques (quantité d'échantillon par réplicat)						
Structuraux						
Biomasse (mg.cm ⁻²)		2 mL	1 pastille		2 mL	
Densité bact (10 ⁷ cells. cm ⁻²)		2 mL	1 pastille		2 mL	
Densité phyto (10 ⁵ cells. cm ⁻²)		2 mL				
Diversité						
Diversité DGGE 16S		250 μL	100 mg		250 μL	
Diversité DGGE 18S		250 μL	100 mg		250 μL	
Composition pigmentaire		15 mL			15 mL	
Diversité phyto par microscopie		20 mL	1 lame		20 mL	
Fonctionnels						
Production primaire (μg C.h ⁻¹ .cm ⁻²)		1 mL	1 pastille		1 mL	
Production bactérienne (10 ⁻¹⁰ mmole H.h ⁻¹ .cm ⁻²)		1 mL	1 pastille		1 mL	
CE50 (μg.L ⁻¹)		1 mL	1 pastille		1 mL	

Tableau 12 : Conditionnement des échantillons et principales analyses effectuées pour les différents niveaux d'étude

1- Mesure de la structure générale du biofilm :

1.1- Estimation de la biomasse

Principe : La biomasse totale est estimée par mesure de la teneur en matière organique, elle-même évaluée par détermination de la masse sèche puis de la masse minérale. Cette estimation ne concerne pas seulement la matière organique vivante, elle inclut également la nécromasse et tout autre dépôt de matière organique provenant d'apports allochtones ou autochtones.

Protocole : Pour les expérimentations en microcosmes et *in situ*, on travaille avec 2 mL de solution périphytique. Pour les expérimentations en mésocosmes une pastille est grattée à l'aide d'une lame de scalpel. Le biofilm récolté est repris dans 2 mL d'eau du canal filtrée sur 0.2 µm. Au total, trois réplicats sont réalisés pour chaque échantillon. La suspension est filtrée sous dépression sur filtre GF/F. Les filtres utilisés sont préalablement séchés puis pesés (m_0). La mesure de la masse sèche (m_1) est effectuée par pesée après séchage du filtre à 105°C pendant 24 h. La mesure de la masse minérale (m_2) se fait après calcination à 480°C dans un four à moufle pendant 2h.

La matière sèche (MS) et la masse sèche sans cendre (MSSC) se calculent alors de la manière suivante :

$$MS = (1/S) \times (m_1 - m_0) \times (V_s/V_f) \text{ (mg.cm}^{-2}\text{)}$$

$$MSSC = (1/S) \times (m_1 - m_2) \times (V_s/V_f) \text{ (mg/cm}^{-2}\text{)}$$

Avec :

S = surface totale de prélèvement du périphyton

Vs = volume de la suspension

1.2- Dénombrement cellulaire bactérien

La cytométrie en flux (CFM) est utilisée en routine pour l'analyse des microorganismes marins depuis une vingtaine d'années. D'abord utilisée pour discriminer et énumérer les populations phytoplanctoniques (Olson *et al.*, 1985), la CFM a été ensuite appliquée à l'analyse des communautés bactériennes hétérotrophes (Monger et Landry, 1993 ; Li *et al.*, 1995 ; Marie *et al.*, 1999). En 1999, Marie *et al.* (1999), ont mis au point une technique d'énumération des virus marins par cytométrie en flux grâce à l'utilisation d'un nouveau colorant des acides nucléiques : le SYBR Green I (SYBR-I).

Nous avons choisi d'utiliser cette technique afin de dénombrer les bactéries hétérotrophes au sein des biofilms.

Principe : La cytométrie en flux permet le comptage de cellules isolées entraînées dans un flux liquide. Les cellules, alignées les unes derrière les autres et séparées d'au moins 1 mm, défilent à grande vitesse (plus de 30 km/h) devant un laser. La diffusion lumineuse, soit dans l'axe du laser, soit à 90° donne respectivement une information sur la taille et sur la structure de chacune des cellules. La source lumineuse permet en outre l'excitation de molécules fluorescentes portées par la cellule. L'analyse au cytomètre est en effet précédée d'une étape de marquage avec des molécules spécifiques d'une structure ou d'une fonction cellulaire et émettant une fluorescence après leur excitation. Les signaux de diffusion et de fluorescence (photons) sont captés par des détecteurs qui les transforment en signaux électriques, traités par un système informatique. Chaque cellule est ainsi transformée en un "évènement électrique" (event) avec plusieurs coordonnées (taille, granularité, fluorescence 1, fluorescence 2...). Ces évènements électriques forment des nuages de points (sur des cytogrammes) (figure 26) autour desquels on dessine des fenêtres électroniques (gating) identifiant des groupes ayant des caractéristiques communes.

Protocole : Le protocole suivi est inspiré de Duhamel et Jacquet (2006). Trois réplicats, correspondant chacun à une pastille de verre ou 2 mL de solution périphytique, sont prélevés par date de prélèvement. 3 mL d'eau du canal filtré sur 0.02 µm et du formaldéhyde 2% final sont ajoutés au biofilm. A ce stade, les échantillons sont congelés à l'azote liquide puis conservés à -80°C. Le jour de l'analyse, 5 µL de Tween 80 (10%), 1 mL de solution de sodium pyrophosphate (10 mM) et 4 mL d'eau milliQ sont ajoutés. Cette étape permet d'extraire les bactéries de la matrice périphytique. Les échantillons sont ensuite placés dans un sonicateur (3 fois 1 min) puis incubés dans la glace (15 min). Ils sont ensuite centrifugés 1 min à 800g puis filtrés sur 10 µm. Le surnageant est ensuite dilué au 1/25^{ième}. Un microlitre d'une solution de billes calibrées, servant d'étalon interne, (Fluoresbrite Carboxy YG 10 Micron Microsphere [2,57 % Solids-Latex], Polysciences) est ajouté à 1 mL du surnageant dilué. Les bactéries sont marquées avec du SYBR-I à la concentration de 1/10000 dilué dans du TE filtré à travers 0,02 µm. Les échantillons sont incubés 15 min à l'obscurité à température ambiante puis 10 min à 70°C. L'analyse se fait avec un cytomètre FACSCalibur (Becton Dickinson) possédant un laser d'une capacité de 15 mW à 488 nm avec des filtres standards.

L'analyse des résultats a été effectuée avec le logiciel CYTOWIN (Vaulot, 1989).

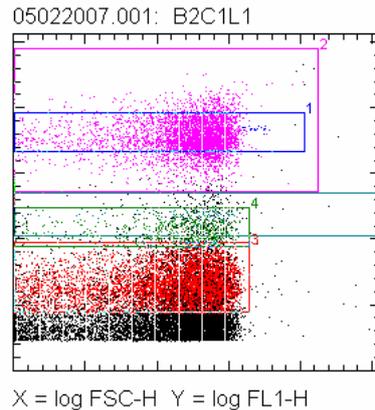


Figure 26: Cytogramme obtenu par cytométrie sur du biofilm (Jacquet, 2006) ; Rose : Bactéries, Rouges : Phages, Vert : Cyanophages.

2- Evaluation de la production périphytique

2.1- Estimation de la production primaire

Principe : Les organismes phytobenthiques convertissent les molécules carbonées inorganiques (CO_2 , HCO_3) en composés carbonés organiques par photosynthèse et ainsi sont à la base de la chaîne alimentaire aquatique. La production primaire (exprimée en μg de $\text{C}\cdot\text{j}^{-1}\cdot\text{cm}^{-2}$) est définie comme le taux de fixation de carbone inorganique dans le matériel particulaire par unité de surface.

Le principe de la méthode au ^{14}C (Steemann-Nielsen, 1952) est simple : une quantité déterminée de carbone inorganique radioactif est introduite dans un volume d'échantillon connu. Le carbone inorganique radioactif sert de traceur, sa concentration étant négligeable par rapport au carbone inorganique total. Après un temps d'incubation, la radioactivité mesurée est proportionnelle au carbone assimilé.

Protocole : Trois réplicats, pastilles ou 3x 1 mL de solution périphytique, sont analysés à chaque date de prélèvement et introduits dans une fiole à scintillation. Pour les pastilles, le biofilm est recouvert de 1 mL d'eau du canal filtrée sur 0,2 μm . Un contrôle est réalisé avec une pastille ou 1 mL de solution périphytique placé à l'obscurité. 25 μL de $\text{NaH}^{14}\text{CO}_3$ (0.2 μCi par vial) sont ajoutés dans chaque fiole puis les échantillons sont incubés 2h dans une chambre de culture (température : 18-20 $^\circ\text{C}$, luminosité, 100-120 $\mu\text{E}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$). Les échantillons sont ensuite formolés (200 μL de formol 4%) et peuvent être conservés à l'obscurité et à température ambiante. Pour éliminer le carbonate radioactif non assimilé (décarbonatation), 100 μL d'acide acétique sont ajoutés puis les fioles sont mises à agiter 1h sous hotte. Les échantillons sont ensuite séchés pendant une heure à 60 $^\circ\text{C}$. 1 mL de DMSO est introduit dans chaque fiole et les échantillons sont de nouveau mis à sécher pendant 1h à 60 $^\circ\text{C}$ afin de solubiliser la matière organique. Finalement, 14 mL de liquide scintillant (Ultima Gold LLT, Perkin Elmer) sont ajoutés,. Après 2 à 3 jours d'incubation à l'obscurité,

pour éviter le phénomène de chimioluminescence, les tubes sont placés dans un compteur à scintillation (2100-TR, Packard Instruments) et la radioactivité mesurée est exprimée en dpmi (désintégration par minute). Ces résultats sont ensuite convertis en mg de C.cm⁻².h⁻¹ à l'aide des équations suivantes (Pelletier, 1973) :

$$[Ca] = (A \text{ éch}/A \text{ sol.}) * [C] * K_i$$

A éch. = activité apparente de l'échantillon en dpmi
 A sol. = activité apparente de la solution de ¹⁴C en dpmi
 [C] = teneur de l'eau en C minéral total en mg.L⁻¹ déduite du TAC (meq.L⁻¹)
 K_i = coefficient de correction isotopique = 1.1 (Steemann-Nielsen, 1952)
 [Ca] = quantité de C assimilée en mg

$$P = [Ca] / T/S$$

P = Production primaire en mg de C.cm⁻².h⁻¹
 T = temps d'incubation en h
 S = Surface de colonisation par le biofilm en cm²

2.2- Estimation de la production bactérienne

Déterminer la production bactérienne est important permet de quantifier la contribution des bactéries au cycle du carbone dans les écosystèmes (Azam, 1994 ; Simon *et al.*, 2002). De nombreuses méthodes ont ainsi été proposées, et les deux les plus largement utilisées consistent à suivre l'incorporation de radiotraceurs (³H]thymidine, [³H] ou [¹⁴C]leucine) au sein des macromolécules cellulaires (respectivement au sein de l'ADN et des protéines) durant un court temps d'incubation (Riemann et Bell, 1990). Ces deux méthodes ont initialement été développées pour estimer la production du bactérioplancton dans les océans (Simon et Azam, 1989). Il est donc nécessaire d'adapter cette technique à l'estimation de la production bactérienne au sein de nos biofilms. Le protocole utilisé est basé sur les résultats de Buesing (2003). Le radioélément utilisé est la [³H]thymidine. Il est d'abord nécessaire de déterminer la concentration saturante en [³H]thymidine au sein de nos biofilm ainsi que le temps d'incubation maximal pour lequel l'incorporation de la thymidine est linéaire.

• détermination de la concentration saturante et du temps d'incubation

Le biofilm a été incubé en présence de concentration croissante (0.3-5 μM) en [³H]thymidine (TRA 310 MC, GE Healthcare) et à des temps d'incubation croissants (30 à 90 min). Trois réplicats et un contrôle ont été réalisés pour chaque concentration. 200μL de formol 4% sont ajoutés au contrôle avant ajout de l'élément traceur.

Une pastille recouverte de périphyton ou 1 mL de solution est introduit dans un tube falcon 15mL. Pour les pastilles, on rajoute 1mL d'eau du canal filtrée sur 0.2μm. 100μL de la

solution [³H]thymidine à la concentration désirée sont ajoutés. Après incubation, la réaction est arrêtée par ajout de 200 µL de formol 4%. Trois lavages successifs du culot périphytique par centrifugation (8500 g pendant 20 minutes) sont réalisés avec 5 ml de formol 4%. Puis un dernier lavage est réalisé avec 5 ml d'éthanol 80% pour éliminer les lipides marqués. Enfin le culot est rincé 2 fois avec du TCA 5%. Le culot est ensuite transféré dans une fiole à scintillation avec 3 ml de NaOH 2N pour extraire les macromolécules nucléiques, en chauffant à 100°C pendant 1 heure au bain-marie. Après refroidissement, 1 ml du surnageant est transféré dans une fiole à scintillation avec 7 ml de scintillant (Hionic-Fluor).

Les tubes sont ensuite placés dans le compteur à scintillation (2100-TR, Packard Instruments) et la radioactivité mesurée est exprimée en dpmi (désintégration par minute). Ces résultats sont ensuite convertis en mmole de [³H]thymidine.cm⁻².h⁻¹ à l'aide de l'équation suivante :

$$[Pb] = [(A \text{ éch}/AS \text{ sol.}) * (Ci)] / (T * S)$$

A éch. = activité apparente de l'échantillon en dpmi
 AS sol. = activité spécifique de la solution de [³H]thymidine en Ci.mmole⁻¹
 (C) = Constante en Ci.dpmi⁻¹ (4.5*10⁻¹³)
 T = temps d'incubation en heure
 S = surface de colonisation en cm²

• Traitement des échantillons

La concentration finale d'incubation retenue est de 250 nM et le temps d'incubation optimal est de 30 minutes. Les échantillons sont donc traités comme indiqué ci-dessus en présence de 250 nM de [³H]thymidine pendant 30 minutes d'incubation.

3- Caractérisation de la structure et composition des communautés périphytiques

3.1- Microscopie

Ce travail a été réalisé par Jean-claude Druart pour les échantillons issus des microcosmes et mésocosmes et par Frédéric Rimet pour les échantillons provenant du site naturel de la Morcille.

La solution périphytique (20 mL) formolée (10% final) est homogénéisée puis divisée en deux parties. Deux analyses sont ensuite réalisées : d'une part la détermination des diatomées, et d'autre part les autres micro-algues.

• Traitement et comptage des échantillons phytoplancton (NF EN 15-204)

La préparation des échantillons consiste à faire sédimenter les microalgues (et les autres particules) contenues dans un échantillon sur le fond d'une chambre de sédimentation (lame mince). Un volume connu de solution périphytique (10 mL) est donc versé en une seule fois dans la chambre de sédimentation

Ensuite les microalgues sont comptées et identifiées en microscopie inversée sur la chambre de sédimentation préparée. L'identification est réalisée avec un maximum de précision (niveau spécifique, voire au niveau de la forme ou de la variété). Une liste floristique est ainsi constituée. Les résultats sont ensuite exprimés en nombre d'individus par unité de volume et en biovolume pour chaque taxon.

Un objet algal est défini comme une cellule ou un groupe de cellules indépendantes des autres particules de l'échantillon. De cette façon, sont comptés comme une unité :

- les cellules : ex : *Chlorella*, *Euglena*, etc ...
- les coenobes : *Pediastrum*, *Scenedesmus*, etc ...
- les colonies : *Merismopedia*, *Microcystis*, *Sphaerocystis*, etc ...
- les filaments : *Oscillatoria*, *Oedogonium*, *Mougeotia*, sont comptés par longueurs de

112 μm (correspondant à la largeur du réticule oculaire),

Trois stratégies de comptages sont envisageables, cependant la première est celle qui est préférentiellement utilisée :

1- Habituellement, le comptage est effectué par transects (diamètres). Au minimum $\frac{1}{2}$ diamètre doit être compté afin de prendre en compte l'éventuel effet de bord. Pour cette stratégie, le nombre de diamètres doit être indiqué.

2- Dans le cas d'échantillons présentant une faible densité, il est possible d'effectuer le comptage sur la chambre entière. Pour cette stratégie, il doit être spécifié que l'ensemble de la chambre a été compté.

3- Il est également possible d'effectuer le comptage sur un nombre de champs choisis aléatoirement. Pour cette stratégie de comptage, le nombre de champs doit être également indiqué.

Dans tous les cas, le comptage se fait par champs, qui correspondent au réticule oculaire des microscopes. Le comptage se fait à l'objectif x40 et avec le zoom x1.6.

Après détermination des 400 individus demandés par la norme, il est possible, à titre d'information, de balayer le reste de la lame et de déterminer d'autres taxons. Ceux-ci peuvent alors être enregistrés, en mentionnant l'effectif 0,2 (ce qui correspond à une probabilité de rencontre du taxon sur la lame).

• Traitement et comptage des diatomées (NF T 90.354)

La préparation des échantillons consiste à ne conserver que les frustules siliceuses des diatomées en éliminant la matière organique des échantillons, et le cas échéant le carbonate de calcium. Les échantillons sont ensuite rincés et inclus dans de la résine pour les monter sur des lames de microscopie.

Un volume d'échantillon_(environ 5 mL) homogénéisé est introduit dans un tube à essai et 4 volumes d'eau oxygénée sont ajoutés. Ces tubes sont ensuite chauffés. La durée et la température de cette phase sont variables suivant la quantité de matière organique à éliminer (jusqu'à l'obtention d'une solution légèrement blanchâtre). Le surnageant est ensuite éliminé et quelques gouttes d'HCl sont ajoutées pour éliminer le carbonate de calcium. La durée varie en général entre un quart d'heure et une heure. Les échantillons sont ensuite rincés et purifiés par 3 à 4 cycles de dilution/décantation dans de l'eau déminéralisée. La décantation nécessite une demi-journée minimum. A chaque cycle, le surnageant est évacué. Le culot est transféré dans un pilulier et quelques gouttes de cette suspension sont reprises et diluées dans de l'eau déminéralisée. Quelques gouttes de la suspension sont déposées sur une lamelle préalablement dégraissée puis séchées à 40°C. Sur une lame, une à trois gouttes de résine sont déposées, la lamelle contenant les diatomées est retournée sur cette lame. L'ensemble est placé sur la plaque chauffante. Après ébullition de la résine, la lame est retirée et posée sur une surface plane. Le manipulateur appuie alors sur la lamelle avec une pince. La norme indique que « *Cette phase est importante car elle permet la répartition des diatomées dans un plan horizontal, répartition indispensable pour une bonne observation des caractéristiques morphologiques des diatomées.* » il demeurera toutefois toujours des diatomées placées non horizontalement.

La préparation peut être observée dès que la résine est solidifiée et la lame refroidie ou peut être conservée pour une observation ultérieure.

La norme impose ensuite le comptage de 400 individus. Le balayage s'effectue à l'objectif x100 zoom x1 et tous les individus rencontrés sont identifiés.

3.2- Analyse moléculaire : PCR-DGGE (Polymerase Chain Reaction-Denaturing Gradient Gel Electrophoresis)

Objectif : La PCR-DGGE a pour objectif l'évaluation de la diversité dans une communauté complexe de microorganismes sur la base de leurs génotypes. Cette technique est basée en premier lieu sur une réaction de polymérisation en chaîne (PCR) qui permet l'amplification d'une région cible du génome. A l'échelle d'une communauté, la spécificité de l'amplification par PCR permet d'évaluer la diversité génétique sur des critères taxonomiques et fonctionnels.

Principe : Dans le but d'évaluer la diversité taxonomique des communautés composant les biofilms, une région de l'ADN ribosomal (18S pour les eucaryotes et 16S pour les procaryotes) est amplifiée par PCR. Le choix de l'opéron ribosomal se justifie par :

- (i) sa présence dans tous les organismes (à l'exception des virus),
- (ii) son abondance dans la cellule et son importance dans le fonctionnement cellulaire,
- (iii) la présence de régions conservées, c'est à dire qui ne varient pas ou peu au cours de l'évolution, et de régions très variables qui permettent *a priori* une identification au niveau de l'espèce.

Les amplicons obtenus, de tailles identiques, sont ensuite séparés par électrophorèse à travers un gel vertical de polyacrylamide. Ce gel contient un gradient linéaire de substances dénaturantes qui permet de séparer les amplicons sur la base de leur séquence nucléotidique. En effet, la DGGE exploite la propriété de l'ADN à être dénaturé *in vitro* sous l'effet d'un traitement chimique (urée) et/ou thermique. Cette dénaturation est fonction de la composition en nucléotides de la séquence d'ADN étudiée. La stabilité de l'ADN est directement liée à sa composition en A, T, G et C et plus particulièrement aux liaisons permettant l'appariement de ces bases. L'appariement « GC » est le siège de trois liaisons hydrogène tandis que l'appariement « AT » comporte uniquement deux liaisons hydrogène. Ainsi, un ADN plus riche en GC sera plus stable qu'un ADN riche en AT et sa dénaturation nécessitera une plus grande température ou une concentration en agent dénaturant supérieure. Le fragment riche en GC migrera donc plus loin dans le gel de polyacrylamide. La température dénaturante d'un fragment d'ADN est également nommée température de fusion et elle sert à caractériser le fragment d'ADN.

Le principe de séparation des fragments d'ADN repose sur les hypothèses suivantes :

- (i) deux fragments qui diffèrent d'une seule paire de bases ont une température de fusion différente,
- (ii) la fusion d'un fragment d'ADN se produit sous l'effet combiné de la concentration en substances dénaturantes et de la température,
- (iii) la rupture de la structure bi-hélicoïdale d'un fragment affecte sa mobilité au sein du gel,
- (iv) la vitesse de migration d'un amplicon dépend principalement de sa conformation, de la porosité du gel et du voltage appliqué. L'influence de la masse moléculaire des fragments n'est pas significative (Muyzer *et al.*, 1993 ; Jackson et Churchill, 1999).

Lors de la dénaturation, la séparation complète de la double hélice d'ADN est empêchée grâce à la présence d'un domaine à forte température de fusion créé artificiellement en incorporant à la molécule un domaine riche en GC. Cette étape est réalisée durant l'amplification par PCR en additionnant une queue GC sur l'amorce spécifique à la région étudiée.

Le gel est positionné verticalement et la migration des fragments d'ADN s'effectue de la plus faible à la plus forte concentration en agent dénaturant. Les amplicons sont initialement introduits sous une forme double brin. Sous l'effet du champ électrique, ils vont migrer dans le gel jusqu'à atteindre la concentration en substance dénaturante qui provoquera la dissociation du double brin d'ADN. Ce changement de conformation entraîne une perte de mobilité. La migration du fragment est alors fortement ralentie voire stoppée du fait de l'encombrement de sa nouvelle structure (Muyzer *et al.*, 1993). La révélation sous UV des molécules d'ADN est rendue possible par l'emploi de molécules intercalantes de l'ADN tel que le SYBR Gold ou le Bromure d'Ethidium.

Ainsi, lors de l'analyse d'une communauté complexe, des profils multi-bandes sont obtenus et théoriquement chaque bande correspond à une séquence qui est représentative d'une espèce. Cependant, il est également admis que derrière une bande peuvent se cacher plusieurs séquences. Ainsi, la notion d'OTUs (Operational Taxonomic Units) est plus adaptée pour décrire les résultats d'une DGGE en termes de diversité. Kroes *et al.* (1999) définissent une OTU comme étant un groupe des séquences d'ADN ribosomal 16S dans lequel les séquences se ressemblent à 99% tandis que McCaig *et al.* (1999) fixent cette limite à 97%.

Ainsi, dans une DGGE, les variations dans le nombre d'OTUs nous donnent une certaine image de la richesse spécifique d'une communauté.

Protocole :

• Extraction d'ADN

Une des étapes clés dans la réalisation d'une PCR-DGGE est l'extraction d'ADN. Afin d'optimiser les résultats, nous avons procédé à une comparaison de différentes méthodes d'extraction.

Différentes méthodes d'éclatement des cellules ont été testées :

- lyse mécanique : écrasement des cellules à l'aide d'un piston ou broyage à l'aide d'un Fast-Prep avec addition de billes de verre de différentes tailles
- lyse chimique : addition de lysosyme et de tampon de lyse

Cette étape a été suivie soit :

- d'une méthode d'extraction classique avec du phénol-chloroforme
- de différentes méthodes d'extraction en Kit : DNAeasy (Qiagen), Ultraclean for Soil (MoBio)...

L'extraction à l'aide du kit MoBio avec éclatement des cellules au Fast-Prep a été sélectionnée. Selon les instructions du fournisseur, l'étape d'éclatement consiste à casser

les cellules à l'aide de billes (fournies dans le kit) et d'une agitation au Fast-Prep. (1 min à la vitesse 5.5 m.s^{-1}). Ensuite, l'ADN est extrait (à partir de 250 μL de solution périphytique ou de 100 mg de périphyton dans les cas des mésocosmes) puis dosé (GeneQuant, Pharmacia Biotech)

• **Amplification par PCR**

La réaction de PCR est réalisée dans un thermocycler PTC-100 (MJ Research, Inc). Le mix de réaction contient : 5 μL de tampon 10X, 1,5 mM de MgCl_2 , 120 μM de chaque dNTP, 1 μM de chaque amorce, 5 mg/mL de BSA et 1,25 U de Taq polymérase et de l'eau stérile qsp pour 50 μL .

Les amorces et les programmes PCR spécifiques utilisés pour chaque type d'amplification sont :

- pour amplifier l'ADN codant pour l'ARN 16S les amorces sont 328GC (GC clamp – CCTACGGGAGGCAGCAG) (Muyzer *et al.*, 1993) et 907RM (CCGTCAATTCMTTGGAGTTT) (Schauer, 2003) et le programme est reporté dans le tableau 13.
- pour amplifier l'ADN codant pour l'ARN 18S les amorces sont GC516R (GC clamp- ACCAGACTTGCCCTCC) (Amann *et al.*, 1990) et 1AF (CTGGTTGATCCTGCCAG) (Medlin *et al.*, 1988) et le programme PCR, défini par Diez *et al.* (2001), est reporté dans le tableau 14.

L'amplification des produits de PCR est ensuite vérifiée par électrophorèse sur gel d'agarose 0,5%. La visualisation des amplicons est rendue possible par addition de Bromure d'Ethidium, agent intercalant de l'ADN et fluorescent sous UV courts. Par comparaison avec un marqueur de taille (Promega, 100pb) la taille des amplicons est également vérifiée.

	1 ^{ère} boucle	2 ^{ème} boucle	3 ^{ème} boucle	4 ^{ème} boucle
Nombre de cycles	1	10	20	1
Dénaturation	5 min à 94°C	1 min à 94°C	1 min à 94°C	5 min à 72°C
Hybridation		1 min à 65°C (-1°C/cycle)	1 min à 55°C	
Elongation		3 min à 72°C	3 min à 72°C	

Tableau 13 : Programme PCR pour l'amplification de l'ADN codant pour l'ARN 16s

	1 ^{ère} boucle	2 ^{ème} boucle	3 ^{ème} boucle
Nombre de cycles	1	35	1
Dénaturation	3 min à 94°C	30 sec à 94°C	7 min à 72°C
Hybridation		45 sec à 56°C	
Elongation		2 min à 72°C	

Tableau 14 : Programme PCR pour l'amplification de l'ADN codant pour l'ARN 18s

• Analyse DGGE et révélation du gel

L'analyse DGGE est effectuée avec le système DGGE 2000 (CBS Scientific Company) selon le mode opératoire décrit par Muyzer *et al.* (1998) et les conditions expérimentales de Shauer *et al.* (2003). L'analyse se déroule en cinq étapes principales :

(i) la préparation d'un gel de 0.75 mm d'épaisseur contenant 6% de polyacrylamide et un gradient de substance dénaturante allant de 40 à 80% pour l'étude des communautés procaryotiques et de 30 à 50 % pour l'étude des communautés eucaryotiques. Une solution contenant 100% d'agent dénaturant est composée d'une solution d'urée à 7M et de formamide déionisée à 40% (v:v),

(ii) le dépôt de 20 µL de produits PCR puis leur migration pendant 16 h à 100 V dans un bain de TAE 1X (40 mM Tris, 20 mM acétate de sodium, 1 mM d'EDTA) maintenu à 60°C,

(iii) la coloration de l'ADN avec du SYBR Gold (Molecular Probes),

(iv) la révélation sous UV des fragments,

(v) le traitement des résultats avec le logiciel Kodak 1D permettant l'analyse des gels en termes de présence/absence de bandes (OTUs)

Les OTUs sont identifiées et comparées entre elles sur la base de leur mobilité dans le gel. Une matrice présence/absence est créée à partir de l'analyse du gel.

3.3- Analyse de diversité pigmentaire par HPLC (High Performance Liquid Chromatography)

Objectif : Cette technique permet d'évaluer la diversité pigmentaire des communautés périphytiques et ainsi de déterminer les principales classes phytobenthiques présentes dans les échantillons.

Principe : L'HPLC est la méthode la plus communément utilisée pour analyser la diversité pigmentaire que ce soit pour les communautés planctoniques des lacs et des océans, ou pour les communautés périphytiques d'eau douce (Wilhelm *et al.*, 1991 ; Roy *et al.*, 1996 ; Pinckney *et al.*, 1997 ; Steinman *et al.*, 1998). Elle permet de séparer, d'identifier et de quantifier les divers pigments présents chez les microalgues. Cette technique est basée sur le partage de solutés entre une phase solide stationnaire et une phase liquide mobile. Chaque soluté (pigment) migre avec une vitesse qui lui est propre et qui est fonction de son affinité pour les deux phases, ce qui permet la séparation des différents pigments présents dans l'échantillon. Les temps de rétention et l'aire des pics obtenus sur les chromatogrammes permettent l'identification et la quantification des différents pigments et donc des différentes classes pigmentaires algales.

Protocole : 15 mL de la solution périphytique sont filtrés sur filtre GF/F pour chaque réplicat. Ces filtres sont conservés à -80°C jusqu'à analyse. Les pigments sont ensuite extraits en additionnant dans un tube à centrifuger les filtres et 4 mL du solvant d'extraction (98% méthanol ; 2% acétone). Ces tubes sont ensuite placés dans un sonicateur (1min à 180 W) puis centrifugés 6 min à 6000g à 0°C . Le surnageant est récupéré puis filtré sur un filtre nylon de porosité 0,2 μm . Le filtrat est introduit dans une fiole ambrée de 1,5 mL et conservé au congélateur jusqu'à l'analyse par HPLC (Chaîne HPLC Waters ; pompe 600, passeur 717 et barrette de diodes 996 ; colonne Phenomenex Luna 5 μ -C18(2), 240 mm x 4.6 mm). L'analyse des chromatogrammes permet l'identification des pics en fonction de leurs temps de rétention et la quantification des différents pigments en fonction de l'aire des pics.

C- Traitements statistiques des données

1- Structure générale du biofilm et productions périphytiques:

L'effet des différents facteurs (lumière, vitesse du courant, pollution....) sur les descripteurs biologiques a été testé par ANOVA à critères multiples (MANOVA). Pour respecter les conditions d'application de l'ANOVA certaines données ont dû préalablement être transformées (exemple : la production a été $\log(x)$ transformée pour respecter les conditions de normalité et d'homogénéité des variances). Ces tests ont été réalisés avec le logiciel XLSTAT.

• Analyse de variance (ANOVA)

L'ANOVA est une technique permettant de savoir si une ou plusieurs variables **dépendantes** (appelées aussi variables à expliquer telles que la biomasse, le nombre de cellules...qui sont des valeurs numériques et continues) sont en relation avec une ou plusieurs variables dites **indépendantes** (ou variables explicatives telles que l'intensité lumineuse, l'âge du biofilm, la vitesse du courant...)

Lorsqu'il y a plusieurs variables indépendantes à prendre en compte simultanément (comme dans le cas de nos données), au lieu de faire plusieurs analyses de variance (une par facteur), on réalise une **analyse de variance à critères multiples**. On teste si les différences de variation dans chaque groupe défini par les modalités des variables explicatives (exemple : canaux éclairés ou ombragés, vitesse lente ou rapide...) s'écartent de manière significative de la valeur 0, et cela de manière simultanée dans l'ensemble des variables explicatives.

On teste ainsi plusieurs hypothèses. Par exemple dans le cas d'un effet conjoint de l'intensité lumineuse et de la présence de pollution on teste les hypothèses :

- H01 = une modification de l'intensité lumineuse n'a aucun effet sur la biomasse, la densité cellulaire... du périphyton
- H02 = l'introduction du polluant n'a aucun effet sur la biomasse, la densité cellulaire... du périphyton
- H03 = les effets de l'intensité lumineuse et du polluant sont indépendants (pas d'interaction).

Si les hypothèses H0 sont rejetées, L'ANOVA peut être couplée à des tests de comparaisons multiples dont le but est de vérifier si les paramètres correspondant aux différentes modalités d'un facteur sont significativement différents ou non.

De nombreux tests ont été proposés pour comparer les moyennes des modalités. La majorité de ces tests s'appuie aussi sur l'hypothèse de normalité. XLSTAT propose les principaux tests parmi lesquels le test de Tuckey (HSD) qui est le test est le plus utilisé (HSD : honestly significant difference) et que nous appliquons donc à l'analyse de nos données.

2- Structure et composition des communautés périphytiques

2.1- Traitement des données de microscopie (Rimet *et al.*, 2006)

Afin de tester la signification de groupes définis *a priori*, (exemple : pollué/non pollué) des MRPP (Multi-Response Permutation Procedures) ont été calculées à l'aide du logiciel PcOrd. Une MRPP est une procédure non paramétrique qui permet de tester l'hypothèse de la non différence entre deux ou plusieurs groupes, ici composés de communautés d'algues (chlorophycées, cyanobactéries et diatomées). L'analyse MRPP permet le calcul de la statistique A. La statistique A est un descripteur de l'homogénéité inter-groupes, comparée à ce qui est attendu aléatoirement. Cette statistique A a été utilisée pour comparer la signification des classifications :

- si la statistique A est élevée et proche de 1, les groupes sont très différents, et dans notre cas, les groupes seront composés de communautés d'algues très différentes.
- si la statistique A est proche de 0, les groupes sont peu différents, et dans notre cas, les groupes seront composés de communautés d'algues proches.

La figure 27 donne une explication schématique de l'analyse MRPP.

Il est également possible, dans le cas de groupes différents, de déterminer les taxons indicateurs de chaque groupement. Un objectif important en écologie est en effet de détecter les espèces indicatrices caractéristiques de conditions environnementales particulières. Dans notre cas, les conditions environnementales sont figurées par des groupes de canaux

ou des zones ayant des communautés d'algues homogènes (exemple : zones lentes ou rapides au sein d'un canal). L'analyse de Dufrene et Legendre (1997) - ou méthodes de l'analyse des espèces indicatrices- permet de détecter les taxons indicateurs de ces groupes. Cette méthode combine l'abondance du taxon dans un groupe et sa fidélité dans le groupe. La signification des espèces indicatrices est testée (test de randomisation de Monte-Carlo).

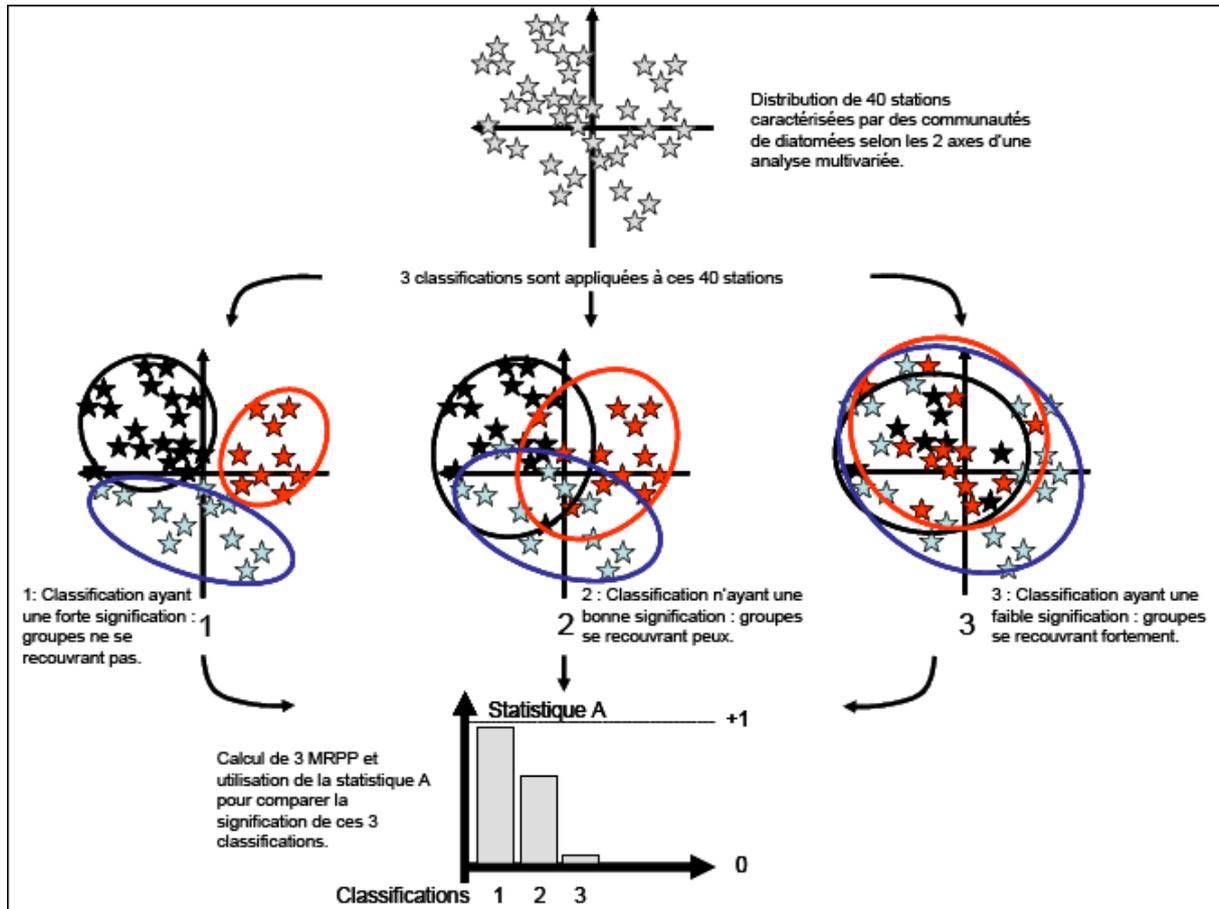


Figure 27 : Explication schématique de l'utilisation des MRPP et de la statistique A calculée lors de l'analyse MRPP (Rimet *et al.*, 2006)

2.2- Analyse des résultats de DGGE

Une matrice présence/absence créée à partir de l'analyse du gel sert de base à la création d'une Classification Ascendante Hiérarchique (CAH) avec le logiciel XLSTAT. La première étape consiste à construire une matrice de dissimilarité basée sur l'indice de Dice (données binaires).

La classification ascendante hiérarchique (CAH) est une méthode de classification qui présente les avantages suivants :

- On travaille à partir des dissimilarités entre les objets que l'on veut regrouper. On peut donc choisir un type de dissimilarité adapté au sujet étudié et à la nature des données.

- L'un des résultats est le dendrogramme, qui permet de visualiser le regroupement progressif des données. On peut alors se faire une idée d'un nombre adéquat de classes dans lesquelles les données peuvent être regroupées.

La classification ascendante hiérarchique (CAH) est une méthode de classification itérative. On commence par calculer la dissimilarité entre les N objets. Puis on regroupe les deux objets dont le regroupement minimise un critère d'agrégation donné, créant ainsi une classe comprenant ces deux objets. On calcule ensuite la dissimilarité entre cette classe et les N-2 autres objets en utilisant le critère d'agrégation. Puis on regroupe les deux objets ou classes d'objets dont le regroupement minimise le critère d'agrégation. On continue ainsi jusqu'à ce que tous les objets soient regroupés. Ces regroupements successifs produisent un arbre binaire de classification (dendrogramme), dont la racine correspond à la classe regroupant l'ensemble des individus. Ce dendrogramme représente une hiérarchie de partitions.

On peut alors choisir une partition en tronquant l'arbre à un niveau donné, le niveau dépendant soit des contraintes de l'utilisateur (l'utilisateur sait combien de classes il veut obtenir), soit de critères plus objectifs.

Dans le cas de l'étude des données issues de l'analyse de gels DGGE (données binaires) nous avons travaillé avec l'indice de dissimilarité de Dice et la méthode d'agrégation du lien moyen.

2.3- Analyse de la composition pigmentaire

Les résultats obtenus par HPLC sont transformés en une matrice contenant des données semi-quantitatives (classe d'intensité de chaque pigment en fonction de l'aire du pic obtenu sur le chromatogramme). Cette matrice sert de base à la classification ascendante hiérarchique (CAH) basée cette fois sur l'indice de dissimilarité générale (du fait de la nature semi-quantitative des données) et la méthode d'agrégation du lien moyen.

Chapitre 3 :

Effet d'une pression chimique (herbicide) et d'un facteur physique (intensité lumineuse) sur le périphyton : approche expérimentale en microcosmes

Hypothèses et questions :

- Une modification de l'intensité lumineuse entraîne-t-elle un changement de fonctionnement et de diversité (algale et bactérienne) au sein du périphyton ?
- L'introduction de diuron à concentration environnementale ($1 \mu\text{g.L}^{-1}$) a-t-elle un impact sur le périphyton ? Cet impact dépend-il du mode d'application (« subite », chronique) et de l'historique de pollution ?
- La réponse à ce stress polluant est-elle modulée par les conditions d'éclairement ?

Du fait de la présence d'organismes phototrophes, l'éclairage est un facteur favorisant le développement de la communauté périphytique. *In situ*, le périphyton est soumis à un environnement lumineux variable spatialement et temporellement en terme d'intensité et de spectre lumineux (saison, couvert végétal). L'intensité lumineuse contrôle la photosynthèse et de nombreux auteurs ont décrit l'existence d'une gamme d'intensité pour laquelle la photosynthèse est efficace (30-400 $\mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$) avec un effet d'inhibition au delà de 500 $\mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ (Steinman et MacIntire, 1987, Guasch et Sabater, 1995, Roberts *et al.*, 2004). Sur le terrain, la présence d'un couvert végétal entraîne une diminution de l'intensité lumineuse suffisante pour modifier la composition algale du biofilm. Les diatomées dominent au sein des biofilms présents dans les rivières ombragées tandis que les algues vertes se développent principalement dans les rivières plus éclairées (Sekar *et al.*, 2002 ; Van den Gritten, 2004). La production primaire, qui joue un rôle important en tant que source de C pour le réseau trophique (Dodds *et al.*, 1996) est également affectée (Mosisch *et al.*, 2001).

Au-delà du seul compartiment phototrophe, c'est l'ensemble de la communauté microbienne périphytique qui peut être affectée par une modification de son environnement lumineux. La communauté bactérienne est affectée par les variations saisonnières de la lumière (Lyautey *et al.*, 2005) et par la nature des exsudats carbonés issus des cellules algales (Chrost, 1991). La variabilité des conditions environnementales conduit à une augmentation de la biodiversité (MacCabe et Cyr, 2006) et les rythmes saisonniers, en terme de succession de régimes hydrauliques et d'ensoleillement, se traduisent par des différences de métabolismes ou de diversité algale et bactérienne (MacLeod et Barton, 1998 ; Lyautey *et al.*, 2005).

In situ, à ces modifications de l'intensité lumineuse, s'ajoute en interaction positive ou négative, l'effet de facteurs chimiques tels que la teneur en matière organique, en nutriments, en oxygène dissous et également en phytosanitaires. Des études s'intéressent aux effets liés à la présence de phytosanitaires, par exemple issus du traitement de la vigne, sur les communautés microbiennes aquatiques. L'effet de ces substances sur la structure taxonomique et fonctionnelle du périphyton est partiellement identifié : changement de diversité algale et/ou de signature pigmentaire (Guasch *et al.*, 1998 ; Brümmer *et al.*, 2000 ; Dorigo et Le Boulanger, 2001 ; Barranguet *et al.*, 2002 ; Schmitt-Jansen et Altenburger, 2005), de fonctions (Downing *et al.*, 2004). Cependant, peu d'études considèrent les communautés bactériennes périphytiques (Sandaa *et al.*, 1999 ; Pesce *et al.*, 2006). Récemment, Pesce *et al.* (2006) ont mis en évidence l'effet du diuron (herbicide) sur les relations entre communautés bactériennes et algales et, à notre connaissance, seuls Dorigo *et al.* (2007) ont considéré la communauté périphytique dans son ensemble. Ils montrent ainsi des changements de diversité algale et bactérienne le long d'un gradient amont-aval de pollution diffuse. Ils ne prennent cependant pas en compte l'historique de

pollution et l'interaction éventuelle avec des modifications des facteurs physiques comme l'intensité lumineuse. La question se pose donc de savoir si les modifications de diversité liées à des intensités lumineuses différentes conduisent à des réponses différentes en présence de contaminants ?

L'objectif de ce travail est donc, de tester en rivières artificielles (microcosmes), les effets de modifications conjointes de l'intensité lumineuse (ombragé ou éclairé) et de la qualité chimique de l'eau (exposition à un pesticide) sur les communautés algales et bactériennes périphytiques. Ces systèmes expérimentaux simulent les conditions de petits cours d'eau forestiers (qui représentent le type d'écosystème majoritaire dans les têtes de bassins hydrologiques). Nous avons testé 3 modes de contamination par le diuron à concentration environnementale ($1\mu\text{g.L}^{-1}$) : pollution chronique, pollution « subite » et récupération après arrêt d'une pollution chronique, et nous avons suivi leurs effets sur les biofilms au cours du temps (30, 42 et 60 jours). La réponse des biofilms a été étudiée par finger printing (PCR-DGGE) des communautés bactériennes, par détermination taxonomique de la communauté algale, par caractérisation de la signature pigmentaire, des densités cellulaires et des biomasses et par mesure de la production primaire (incorporation de ^{14}C).

A- Ecotoxicité du Diuron sur la croissance algale

En préambule à l'étude de l'impact du diuron sur une communauté complexe dans un environnement variable, la toxicité de ce pesticide a été déterminée sur une souche d'algue pure (test d'inhibition de la croissance) : *Selenastrum Capricornutum*. Ce test a été réalisé en microplaques 96 puits, en présence de concentrations croissantes de pesticides selon la norme ISO 8692 : 1989 (f) (Chapitre 2 p 64).

La courbe dose-effet (figure 28) nous a permis de déterminer la CE50 après 96 h d'exposition au diuron, de la souche *Selenastrum Capricornutum*.

La CE50 calculée est de $25.8\mu\text{g.L}^{-1}$ (intervalle de confiance $\alpha = 5\%$, 21.2 - 30.75 $\mu\text{g.L}^{-1}$) et le nombre de Hill (correspondant à la pente de la courbe) est de 1.85 (intervalle de confiance $\alpha = 5\%$, 21.45 - 2.51).

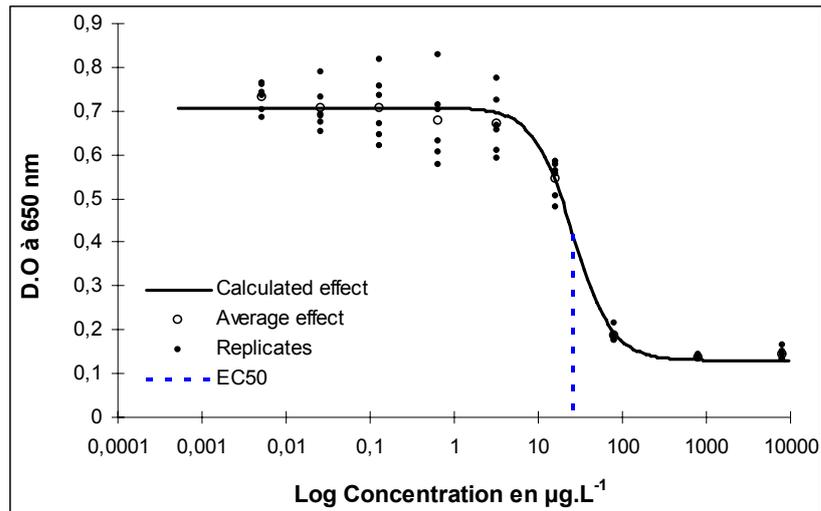


Figure 28 : Courbe dose-réponse d'inhibition de la croissance de la souche *Selenastrum Capricornutum* en présence de diuron

B- Résultats de l'expérimentation en microcosmes

Huit petites rivières (L = 90 cm, l = 18 cm et h = 4 cm) ont été utilisées pour évaluer l'effet d'une modification conjointe de l'intensité lumineuse et de la qualité chimique de l'eau sur le périphyton. Au sein de ces microcosmes, la colonisation du périphyton se fait sur des lames de verre durant 60 jours. Trois prélèvements ont été réalisés : le premier après 28 jours de croissance (T0), le second après 42 jours de croissance (T15) et enfin le troisième après 60 jours (T30). Le matériel et les méthodes utilisés pour cette expérimentation sont détaillés dans le Chapitre 2 p 61-62.

1- Structure générale des biofilms

Les résultats ont été obtenus par l'analyse d'échantillons moyens (constitué par le mélange du périphyton de 6 lames prélevées au hasard et mis en suspension). L'analyse statistique des données est donc rendue difficile par l'absence de répétitions. Cependant, une étude préliminaire (Villeneuve *et al.*, soumis) avait permis de déterminer les coefficients de variation intra-canal pour la biomasse, le dénombrement bactérien et algal et la production primaire à la lumière et sous ombrage. Ils sont :

- à la lumière de 12.1% pour la biomasse, 28.8% pour la densité bactérienne, 26.6 % pour la densité algale et 22 % pour la production primaire
- sous ombrage de 9.4% pour la biomasse, 9.6 % pour la densité bactérienne, 18.8% pour la densité algale et 34.6% pour la production primaire

Les résultats obtenus au cours de l'expérimentation pour les différents descripteurs sont présentés dans le tableau 15.

Canal	Biomasse (mg.cm ²)			10 ⁷ cell bact.cm ²			10 ⁶ cell phyto.cm ²			Production primaire µg de C.h ⁻¹ .cm ²														
	Lumière			Ombrage			Lumière			Ombrage			Lumière			Ombrage								
	T0	T15	T30	T0	T15	T30	T0	T15	T30	T0	T15	T30	T0	T15	T30	T0	T15	T30	T0	T15	T30			
Témoin (A et E)	1,12	1,10	1,24	1,08	2,02	2,68	2,9	1,8	0,82	2,2	3,6	2,6	2,4	1,9	2,6	1,7	2,9	1,9	0,90	2,75	0,36	1,08	3,67	1,69
Accidentelle (B et F)	1,71	0,67	1,08	1,16	1,16	1,42	2,9	2,6	1,4	4,2	2,2	3,4	1,8	2,3	2,8	2,2	1,6	3,8	1,66	1,98	0,53	2,16	2,73	0,75
Chronique (C et G)	1,20	0,70	1,10	0,63	0,96	0,94	1,1	2,0	4,7	2,2	4,2	1,8	1,2	1,6	2,4	1,2	3,4	2,4	2,27	2,45	0,74	0,86	2,97	1,51
Récupération (D et H)	0,91	1,30	2,28	1,11	2,27	1,59	1,8	3,3	3,7	5,0	8,2	3,8	1,2	3,6	3,0	3,9	7,1	3,1	0,87	3,25	0,86	0,93	4,54	1,79

Tableau 15 : Valeurs des paramètres de structure (biomasse et densité cellulaire) et de production (Ombrage = 15 µmol.m⁻².s⁻¹ ; Lumière = 56 µmol.m⁻².s⁻¹ ; Résilient= canal en récupération après arrêt de contamination ; « subite » = 1 µg.L⁻¹ pendant 15 j ; Chronique = 1 µg.L⁻¹ pendant 60 j

La biomasse varie globalement de 0.67 mg.cm⁻² (Canal B, âgé de 42 jours) à 2.68 mg.cm⁻² (canal E, âgé de 60 jours).

A la lumière, on n'observe pas d'augmentation de biomasse durant la maturité du biofilm, à l'exception du canal résilient (canal D) qui voit sa biomasse périphytique doublée en 30 jours. Pour les autres canaux, les biomasses périphytiques sont stables à la lumière (même pour le canal témoin). Les biomasses périphytiques de biofilm subissant une pollution « subite » ou chronique (1.08 mg.cm⁻² et 1.10 mg.cm⁻²) ne sont pas différentes de celle du témoin (1.24 mg.cm⁻²) en fin de croissance.

Sous ombrage, les canaux témoin (canal E) et résilient (canal H) ont des biomasses périphytiques qui doublent respectivement en 30 jours et 15 jours, tandis qu'elles sont stables pour les autres canaux. Sous ombrage, en fin d'expérimentation, le périphyton sous pression de pollution (« subite ») (1.42 ± 0.13 mg.cm⁻²) ou chronique (0.94 ± 0.09 mg.cm⁻²) a une biomasse inférieure au périphyton se développant dans une situation propre (2.68 ± 0.25 mg.cm⁻²) ou en récupération (1.59 ± 0.15 mg.cm⁻²).

A part pour les canaux témoins (A et E), on n'observe pas de différence de biomasse entre les biofilms situés à la lumière et sous ombrage.

La densité bactérienne varie globalement de 0.82 10⁷ cell.cm⁻² (canal témoin à la lumière et après 60 jours de croissance) à 8.2 10⁷ cell.cm⁻² (canal résilient sous ombrage, après 42 jours de croissance)

A la lumière, les densités bactériennes des périphytons issus du canal témoin (A) et du canal en situation de pollution « subite » (B) sont identiques et diminuent au cours du temps. Pour le périphyton en situation de pollution chronique ou de restauration, l'évolution temporelle de la densité bactérienne est inverse : elle est multipliée par 4 dans le canal C (pollution chronique) et par 2 dans le canal D (résilient). La densité bactérienne est, en fin

de croissance, supérieure dans les canaux ayant subit ($3.8 \pm 1.06 \cdot 10^7 \text{ cell.cm}^{-2}$) ou subissant une pollution chronique ($4.7 \pm 1.35 \cdot 10^7 \text{ cell.cm}^{-2}$).

Sous ombrage, à l'exception du canal G (pollution « subite »), la densité cellulaire bactérienne augmente entre le 28^{ième} et le 42^{ième} jour de croissance du biofilm puis diminue après. La densité bactérienne périphytique est donc maximale, sous ombrage, après 42 jours de colonisation. Les biofilms en situation de résilience ont la densité bactérienne la plus importante ($8.2 \cdot 10^7 \text{ cell.cm}^{-2}$) en comparaison à toutes les autres conditions testées.

La densité algale varie de $1.2 \cdot 10^6 \text{ cell.cm}^{-2}$ (canaux C, G et D après 28 jours de croissance) à $7.1 \cdot 10^6 \text{ cell.cm}^{-2}$ (canal H après 42 jours de croissance).

A la lumière, la densité algale a tendance à augmenter au sein de tous les canaux au cours du temps. En fin de croissance, on n'observe aucune différence de densité cellulaire entre le canal témoin et ceux en situation de pollution ou de résilience.

Sous ombrage, on observe la même dynamique qu'à la lumière (augmentation au cours du temps de la densité algale). La densité algale est maximale au sein du canal résilient (canal H) après 42 jours de croissance. En fin de croissance, aucune différence de densité n'est observée en fonction des conditions chimiques.

La production primaire varie de $0.36 \mu\text{g de C.h}^{-1}.\text{cm}^{-2}$ (canal témoin à la lumière après 60 jours de croissance) à $4.54 \mu\text{g de C.h}^{-1}.\text{cm}^{-2}$ (canal résilient sous ombrage après 42 jours de croissance).

A la lumière, la production primaire est maximale après 42 jours de croissance quelles que soient les conditions de « pollution ». En fin de croissance (60 jours), on n'observe aucune différence de production en fonction des différents traitements.

Sous ombrage, la production primaire est également maximale après 42 jours et identique au sein des différents canaux en fin d'expérimentation.

On n'observe, comme pour la densité algale, aucune différence de production entre les deux conditions lumineuses.

En résumé : Sur tous les descripteurs étudiés (Tableau 15), les biofilms dans une situation de récupération (D et H) semblent avoir une structure distincte de tous les autres biofilms. Leur biomasse et leur nombre de cellules bactériennes et algales sont supérieurs quelles que soient les conditions d'éclairement.

On n'observe, a priori, aucune différence de structure entre les canaux témoins et les canaux subissant un stress chimique accidentel. Un stress chronique semble provoquer une légère diminution de biomasse (sous ombrage) et une augmentation de la densité bactérienne (pour les deux conditions lumineuses).

Le stress lumineux semble provoquer une modification de la structure des communautés périphytiques : la biomasse et la densité bactérienne sont supérieures sous ombrage tandis que la densité algale et la production primaire restent inchangées.

2- Diversité périphytique

2.1- Diversité procaryotique : analyse par DGGE

Les bactéries ne sont pas les organismes cibles du polluant utilisé (herbicide), cependant, les relations étroites existant au sein du periphyton entre les différents compartiments justifient l'étude de la diversité procaryotique.

Le nombre total d'OTUs observé est de 45 : 35 OTUs sont présentes à la lumière et 43 à l'obscurité. En fin de croissance, le nombre d'OTUs est toujours supérieur dans le periphyton à l'obscurité. Pour une même condition lumineuse, le profil comportant le plus grand nombre de bande est toujours le canal témoin. Les profils les moins diversifiés correspondent aux échantillons provenant des canaux en situation de pollution chronique (canal C : 11 OTUs et canal G : 17 OTUs) (tableau16). On n'observe pas de tendance claire d'évolution du nombre d'OTUs au cours du temps à la lumière (augmentation pour les canaux témoin et résilient et stabilité pour les deux autres). Sous ombrage, la tendance à l'augmentation du nombre d'OTUs, donc de la diversité procaryotique au cours de la croissance est nette (tableau 16).

Nombre de bandes	lumière			Ombrage		
	T0	T15	T30	T0	T15	T30
Témoin (A et E)	14	13	22	18	21	29
aigue (B et F)	17	17	16	14	19	23
Chronique (C et G)	15	21	11	11	21	17
Restauration (D et H)	11	17	15	16	18	22

Tableau 16 : Nombre de OTUs observé sur les profils DGGE issus de l'amplification du gène codant pour l'ARN 16S.

La transposition des résultats de DGGE en une matrice présence-absence permet l'analyse statistique de la structure des communautés. Cette matrice est transformée en matrice de dissimilarité (indice de Dice) et cette nouvelle matrice sert de base à l'analyse hiérarchique des correspondances (CAH, figure 29). Cette première CAH révèle que deux facteurs principaux structurent la diversité bactérienne : le temps et le facteur lumière. On observe en effet trois groupes :

- le groupe « gris foncé » regroupe la majorité des échantillons issus de biofilms jeunes
- le groupe « jaune » est composé des échantillons issus des canaux éclairés subissant un stress chimique
- le groupe « gris clair » plus hétérogène regroupe à la fois les échantillons issus des canaux témoins et des canaux sous ombrage.

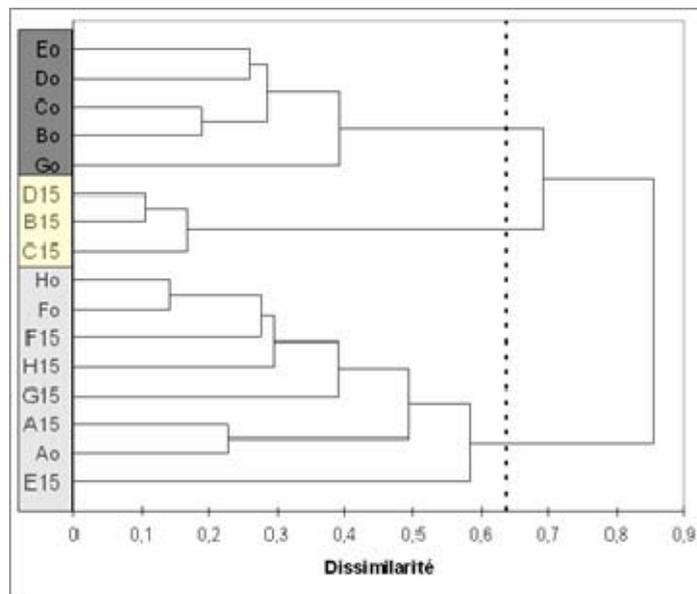


Figure 29 : CAH réalisées à partir de la matrice de dissimilarité (indice de Dice) déduite de l'analyse du gel DGGE issus de l'amplification du gène codant pour l'ARN 16S

Les résultats ont ensuite été analysés séparément, d'une part à la lumière et d'autre part sous ombrage afin d'évaluer l'effet du stress polluant. Pour chacune de ces deux conditions d'éclairage, la diversité bactérienne périphytique après 28 jours de colonisation (T0) est identique au sein de tous les canaux.

A la lumière (figure 30a), On retrouve trois groupes :

- le premier (gris foncé) composé des échantillons C30 et D30. Ce regroupement est lié à l'historique de pollution au sein des canaux. En effet, les biofilms issus des ces deux canaux ont subi une pollution chronique et bien que le canal D soit en situation de récupération, on n'observe pas de retour à un état « propre ». La structure de sa

communauté bactérienne en fin de croissance ne s'apparente pas à celle du canal témoin (indice de Dice D30/A30 = 0.46)

- le second groupe (gris moyen) est composé des échantillons issus des canaux B, C et D après 42 jours de colonisation et du canal témoin après 60 jours.

- le troisième (gris foncé) regroupe les échantillons issus du prélèvement T0, du témoin après 42 jours de croissance et du canal ayant subi un stress accidentel, après 60 jours de croissance.

Ces deux derniers groupes reflètent donc l'évolution temporelle de la communauté bactérienne et ne mettent pas en évidence d'effet de la pollution.

L'analyse hiérarchique des correspondances ne montre donc pas de regroupement net en fonction de l'historique de pollution. Seuls les échantillons issus des canaux subissant ou ayant subi une pollution chronique ont une communauté bactérienne distincte en fin de croissance.

Sous ombrage (figure 30b), on observe également trois groupes :

- le premier (gris foncé), comme à la lumière, regroupe les échantillons « jeunes ».
- les échantillons issus des canaux en situation de pollution chronique ou de résilience forment le deuxième groupe (gris moyen).
- le troisième est constitué des échantillons issus du canal témoin et subissant une pollution « subite » en cours de croissance (gris clair)

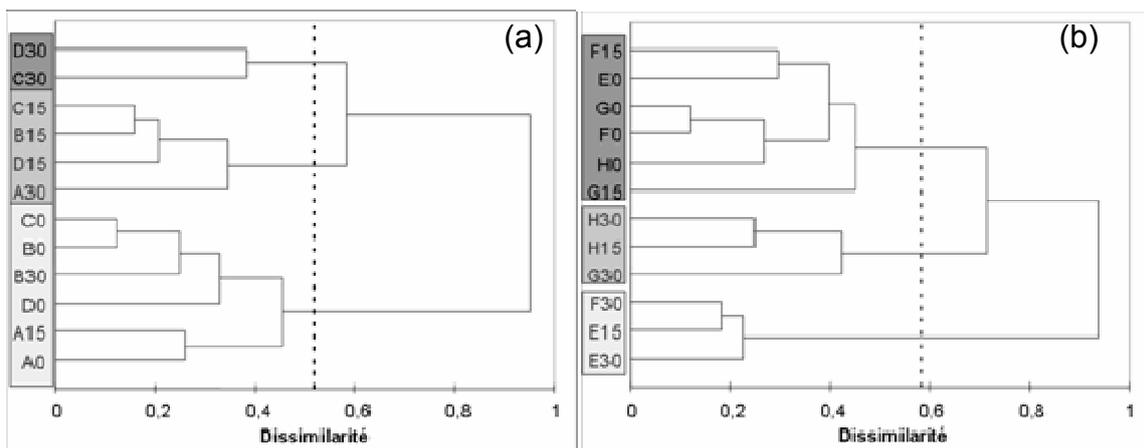


Figure 30 : CAH réalisées à partir de la matrice de dissimilarité (indice de Dice) : (a) à la lumière ; (b) sous ombrage

En résumé : A la lumière comme sous ombrage, seule la pollution chronique semble avoir un effet sur la composition de la communauté bactérienne (indice de dissimilarité de Dice à la lumière : A30/D30 = 0.46 ; sous ombrage : E30/H30 = 0.45). La communauté bactérienne subissant un stress « accidentel » mais de faible intensité (1µg.L⁻¹ de diuron) est identique à celle du canal témoin (indice de Dice à la lumière : A30/B30 = 0.29 ; sous ombrage : E30/F30 = 0.23).

2.2- Diversité algale : analyse par microscopie

Sur cette CAH (figure 31), la diversité phytobenthique des biofilms issus des canaux à la lumière se distingue de celle des autres échantillons. Le facteur de forçage principal de la communauté périphytique serait donc, comme pour les procaryotes, le stress lumineux. On note cependant un effet temporel au sein des biofilms à la lumière, avec notamment le regroupement des échantillons issus du premier prélèvement.

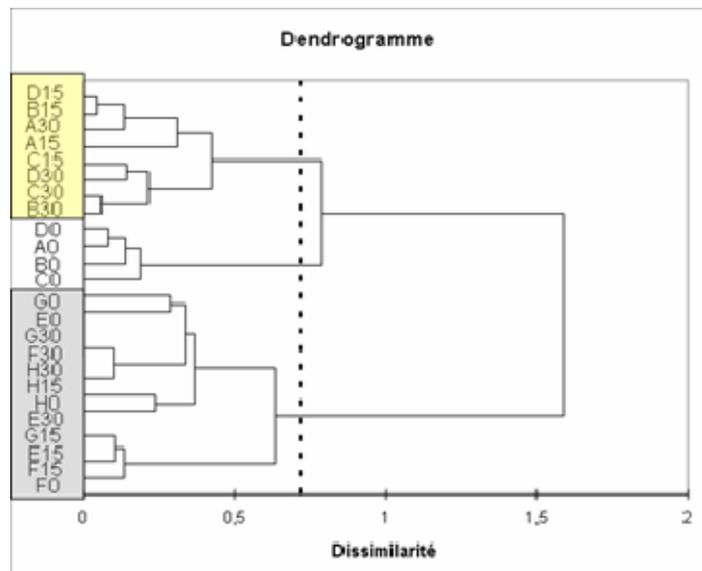


Figure 31 : CAH réalisées à partir de la matrice de dissimilarité (indice de Bray-Curtis) déduite de l'analyse microscopique de la communauté algale

Certaines espèces sont spécifiques des biofilms éclairés. Ce sont principalement des chlorophycées : *Monoraphidium spp*, *Scenedesmus obtusus* ou *Cosmarium sp*. A l'obscurité, les biofilms sont principalement diatomiques et dominés par *Fragilaria ulna*.

Pour évaluer l'effet de la présence de diuron, nous avons réalisé l'analyse en séparant les deux conditions lumineuses.

A la lumière (figure 32a), trois groupes sont observés :

- Le premier (gris clair) est composé des échantillons issus du premier prélèvement (28 jours de croissance). Malgré les différents traitements chimiques (témoin, pollués,

résilient), aucune différence de composition algale n'est mise en évidence après 28 jours de colonisation.

- le deuxième (gris foncé) est composé des échantillons témoins et de deux échantillons (B15 qui correspond à 15 jours d'exposition au diuron et D15 qui correspond à 15 jours d'arrêt d'exposition au polluant). Ces communautés algales, ayant pourtant subi une pollution, ne sont pas différentes de celles du témoin après 42 jours de croissance.

- Enfin, le troisième groupe (gris moyen), regroupe les échantillons issus du canal subissant une pollution chronique et de ceux en fin de croissance des canaux B et D. Une exposition chronique entraîne donc une forte modification de la communauté algale en comparaison à la structure de référence.

Sous ombrage (figure 32b) on n'observe pas de regroupement selon le facteur pollution. Il semble en effet, que le facteur structurant à l'obscurité soit le temps. Seul le périphyton issu du canal de référence a une composition algale différente des autres en fin d'expérimentation (E30).

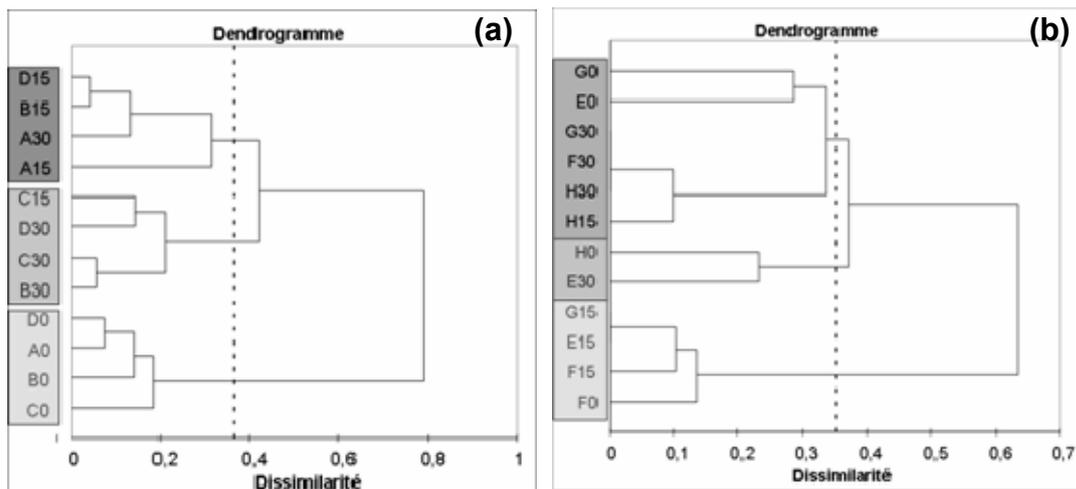


Figure 32 : CAH basées sur les abondances des espèces phytobenthiques au sein de biofilms au cours de l'expérimentation. (a) à la lumière et (b) à l'obscurité.

C- Effet du diuron et d'une modification de l'intensité lumineuse sur le périphyton

Une modification de l'intensité lumineuse entraîne-t-elle un changement de fonctionnement et de diversité (algale et bactérienne) au sein du périphyton ?

L'effet de la lumière, sur l'architecture générale du périphyton, son fonctionnement et/ou sa diversité, est déduit de l'observation des canaux témoins A (lumière) et E (ombrage). Notre valeur expérimentale moyenne de $56 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ correspond aux valeurs basses observées sur le terrain (sur la Morcille) lors d'un suivi printanier au printemps (de 17 à $81 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$, Dorigo *et al.*, 2007). Il existe une gamme efficace d'intensité lumineuse qui a été décrite par de nombreux auteurs : de 30 à $400 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ pour laquelle la photosynthèse est efficace. Au delà de $500 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ on observe un effet d'inhibition (Steinman et MacIntire ; 1987 ; Guasch et Sabater, 1995 ; Roberts *et al.*, 2004). Au sein de nos microcosmes éclairés ($56 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$), la lumière n'est donc pas un facteur limitant de la photosynthèse contrairement aux microcosmes sous ombrage ($< 15 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$).

En terme d'architecture générale et de fonctionnement, la faible diminution de l'intensité lumineuse entraîne une augmentation de la biomasse et de la densité cellulaire bactérienne au sein de nos microcosmes. Ces résultats sont inverses à ceux obtenus par de nombreux auteurs. Hill et Fanta (2008) pour la même gamme d'intensité lumineuse observaient une relation positive entre l'intensité lumineuse (17 à $54 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$) et la biomasse (0.4 à 2.5 mg.cm^{-2}). Steinman *et al.*, en 1990, ont également montré qu'une diminution de l'intensité lumineuse (de 150 à $1 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$) provoquait un abattement de la biomasse (x2) et de la densité bactérienne (de 4 à $1.5 \cdot 10^6 \text{ cells.cm}^{-2}$). Romani et Sabater (1999) ont aussi étudié la dynamique périphytique entre deux conditions lumineuses (éclairage et obscurité). L'intensité lumineuse minimale durant leur étude était de $2 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$. Ils ont observé une réduction de tous les descripteurs généraux de structure du périphyton : biomasse (*chlo a*), densité bactérienne et algale, production primaire.... Au sein de nos microcosmes, l'effet d'une limitation de l'intensité lumineuse est donc plus complexe. En effet, outre l'accroissement de la biomasse et de la densité bactérienne, la densité algale et la production primaire ne sont pas affectées par la diminution de l'intensité lumineuse (56 à $15 \mu\text{mol.s}^{-1}.\text{cm}^{-2}$).

Ces modifications d'architecture sont accompagnées de changements de diversité algale et bactérienne. En terme de communauté algale, les biofilms sous ombrage sont principalement diatomiques et moins diversifiés que les biofilms éclairés qui contiennent des

chlorophycées et des cyanobactéries. Ces résultats sont en accord avec de nombreux travaux dont ceux de Sekar *et al.* (2002) et Van den Gritten (2004). Les communautés diatomiques installées sous ombrage sont tout aussi productives que les communautés algales composant le biofilm « éclairé » (pas de diminution de la production primaire). Le changement de diversité observé entre les deux conditions lumineuses correspond donc à une adaptation de la communauté algale. A l'inverse, la diversité procaryotique (déduite du nombre d'OTUs) semble supérieure au sein des biofilms sous ombrage. La composition bactérienne est également différente entre l'ombre et la lumière.

En absence d'autre perturbation, une modification de l'intensité lumineuse provoque un changement de structure et de diversité du périphyton. Le périphyton sous ombrage est principalement diatomique, et sa communauté bactérienne est plus diversifiée et plus dense (figure 33).

L'introduction de diuron à très faible concentration a-t-il un impact sur le périphyton ? Cet impact dépend t-il du mode d'application (« subite », chronique) et des conditions lumineuses ?

L'effet du diuron est ici subtil et difficile à mettre en évidence. En terme d'architecture du biofilm on n'observe pas de différence entre les canaux pollués et témoins (pas de diminution de biomasse ni de densité cellulaire algale). Sur les trois conditions de pollution testées, seul le périphyton issu des canaux en situation de pollution chronique ou résilient semble se structurer différemment et ce quelle que soit la condition lumineuse.

Globalement, l'effet du polluant est en partie masqué par la forte évolution temporelle des communautés et par l'effet d'une modification de l'intensité lumineuse. Cependant, en analysant séparément les résultats issus des deux conditions d'éclairage, on observe un effet du diuron même à une faible dose ($1 \mu\text{g.L}^{-1}$) très largement inférieure à la CE50 déterminée sur la croissance d'une souche pure ($25 \mu\text{g.L}^{-1}$). La dose appliquée au sein des microcosmes ($1 \mu\text{g.L}^{-1}$) correspond environ à la dose qui inhiberait 5% (CE5) de la croissance de la souche pure. Il semble donc que certains paramètres permettent de détecter des doses plus faibles de diuron que les paramètres utilisés dans les tests standards (croissance). Les travaux d'Arrhenius *et al.* (2004) démontraient que la communauté algale périphytique était trois fois plus sensible à la présence de diuron qu'une souche pure (*Scenedesmus vacuolatus*) en tests normalisés. Ainsi, certaines espèces présentes au sein du biofilm sont peut être plus sensibles.

Les communautés procaryotiques, à la lumière comme à l'obscurité, ne sont pas modifiées par un stress temporel en diuron. Par contre, une pollution chronique (présence de $1 \mu\text{g.L}^{-1}$ de diuron dès le début de la colonisation et pendant 2 mois) provoque un changement de composition procaryotique et une diminution de la richesse sans retour à un état de référence après 1 mois d'arrêt de la pollution. El Fantroussi *et al.* (1999), observaient également un changement de diversité et une diminution de la richesse bactérienne dans des sols contaminés par le diuron. Dans notre étude, ces changements sont accompagnés par une augmentation de la densité bactérienne. La présence de diuron à faible dose pourrait donc stimuler la croissance de certaines espèces bactériennes. Ce phénomène a été décrit par Prado et Airoidi en 2001 pour les communautés microbiennes du sol : le taux de croissance microbien dans le sol était stimulé par de faibles concentrations en diuron (jusqu'à $3.3 \mu\text{g.L}^{-1}$) puis inhibé au-delà. Une autre hypothèse, apportée par De Lorenzo en 1999, serait que la présence de diuron, en provoquant la mort des algues permet de diminuer la compétition envers les nutriments entre hétérotrophes et phototrophes et de favoriser ainsi le développement bactérien. Dans le cas de notre étude, cette hypothèse ne semble pas valide (avec nos outils d'observation) car aucune différence de densité cellulaire algale n'est observée entre une situation « propre » et une situation polluée. Il semble donc que l'effet du diuron sur la communauté bactérienne soit plutôt un effet direct et non une réponse aux effets provoqués sur la communauté algale.

L'impact du diuron est cependant différent entre les deux conditions d'éclairement. En effet, bien que le compartiment bactérien soit impacté à la lumière comme sous ombrage, l'effet sur la communauté algale est modulé par les conditions d'éclairement. Le périphyton sous ombrage, principalement composé de diatomées, a une composition inchangée en présence de diuron : il semblerait donc qu'il soit plus tolérant à ce contaminant. Cette augmentation de la tolérance des communautés algales adaptées à de faibles intensités lumineuses a déjà été mise en évidence pour d'autres herbicides. Guasch *et al.*, en 1997, ont observé, en milieu naturel, que le périphyton issu de sites ombragés était plus résistant à la présence d'atrazine. Ce comportement est également remarqué en présence de simazine (Millie *et al.*, 1992). L'hypothèse émise est que la variation du contenu pigmentaire du périphyton issu de zones ombragées limiterait l'action des herbicides inhibiteurs du photosystème II (Millie *et al.*, 1992).

Toutes ces modifications sont cependant sans conséquence pour la production primaire qui est identique quelles que soient les conditions d'éclairement ou de pollution

La réponse du périphyton à un stress toxique (herbicide) de faible intensité dépend donc du mode d'exposition (« subite » ou chronique) au polluant et des conditions d'éclairement. L'impact le plus important est observé sur du périphyton se développant en conditions non limitantes de lumière et subissant une pollution chronique (figure 33).

Une contamination « subite » n'a, *a priori*, pas d'effet visible sur les descripteurs choisis et selon le pas de temps de cette expérimentation.

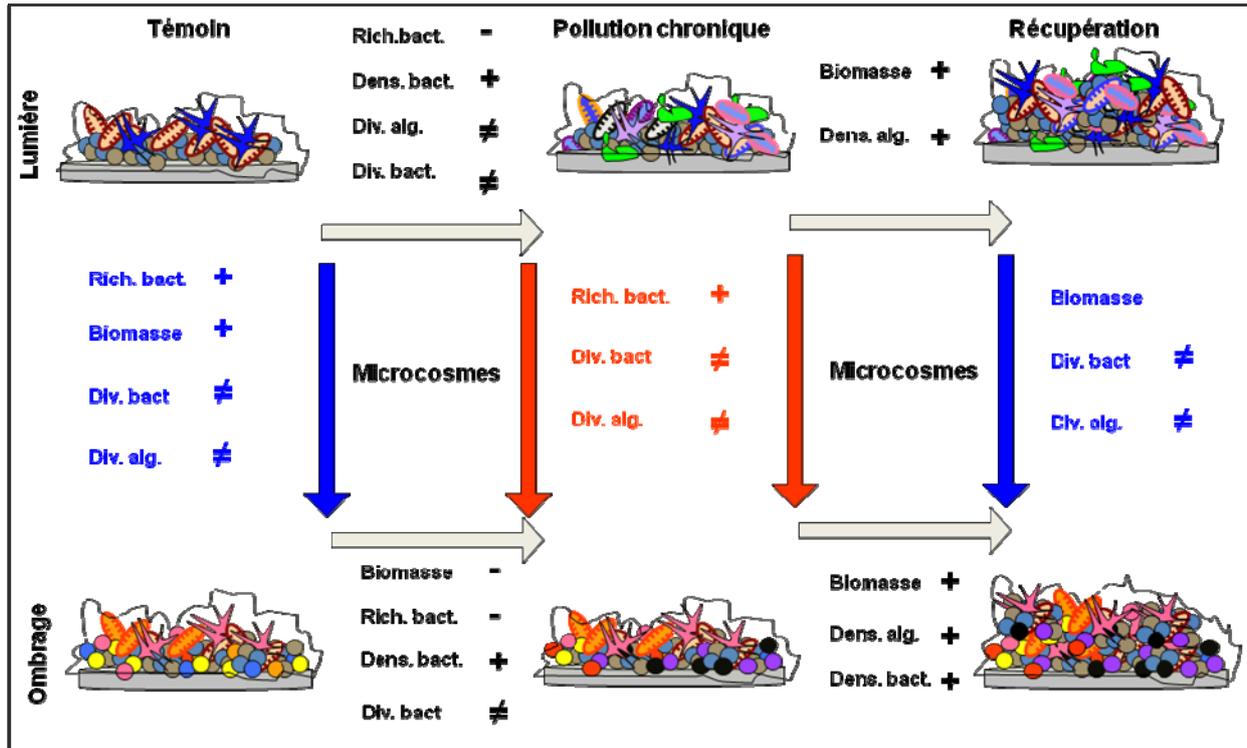


Figure 33 : Schéma bilan² de l'effet d'une modification de l'intensité lumineuse et d'une contamination chronique au diuron ($1\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$) sur le périphyton (+ : augmentation ; - : diminution et ≠ : changement. Les flèches donnent le sens de lecture. Une flèche verte symbolise une situation « propre » et une flèche rouge une situation polluée)

²

La légende des schémas bilan est reportée sur la fiche synoptique plastifiée

Chapitre 4 :

Effet conjoint du régime hydraulique et d'un mélange de pesticides sur le périphyton : approche expérimentale en mésocosmes

Hypothèses et questions :

- A l'échelle locale, l'augmentation de la vitesse du courant entraîne-t-elle un retard d'installation et une moindre densité périphytique ?

- Un mélange polluant à faible dose a-t-il un impact sur le périphyton ?

- Les modifications de l'hydraulique provoquent-elles un changement de diversité algale ou bactérienne ? Ce changement est-il accompagné d'une différence de réponse et/ou de tolérance aux pesticides ?

- Ces modifications, observées à une échelle locale, ont-elles une répercussion à une échelle plus globale (à l'échelle du canal) ?

Enfin, existe-t-il des variations saisonnières de structure, de diversité et de fonctionnement des biofilms en lien avec une différence de sensibilité à la présence de molécules polluantes ?

Le périphyton est un carrefour d'interactions complexes où, en particulier, la lumière ainsi que la qualité chimique du milieu jouent un rôle prépondérant.

Parmi ces interactions, il paraît également important d'évaluer l'effet du régime hydraulique sur la dynamique du périphyton. De nombreux travaux ont, en effet, mis en évidence que le régime hydraulique est un facteur de contrôle important des communautés périphytiques. Les perturbations hydrauliques (turbulences, crues) contrôlent la biomasse algale benthique et modifient la composition spécifique des communautés périphytiques. Dans certains cas, particulièrement pour de fortes valeurs de courant ($> 1\text{m/s}$), c'est même le facteur de forçage principal, soit par effet de cisaillement (Biggs et Thomsen, 1995) soit par un effet d'abrasion lié à la présence de matière en suspension (Francoeur et Biggs, 2006). A des gammes de vitesse moindre (0.065 à 0.23 m/s), Battin *et al.* (2003a) ont mis en évidence des différences de structure architecturale et fonctionnelle des biofilms : réduction de la densité et de l'épaisseur, mais augmentation de la teneur en chlorophylle *a* et de la densité bactérienne avec l'augmentation de la vitesse. Aux faibles vitesses de courant, la sinuosité de surface du biofilm et sa fragmentation augmentent avec l'épaisseur. Ceci facilite le transfert de solutés de la colonne d'eau vers le biofilm (Battin *et al.*, 2003b) et peut ainsi modifier le métabolisme de la communauté microbienne.

L'effet d'une modification de la vitesse du courant peut être étudié à deux niveaux d'observation :

- à une échelle locale (décimétrique), une rivière est une mosaïque de micro-habitats pouvant être caractérisés par des différences de vitesse de courant. Les communautés périphytiques peuvent être différentes au sein de deux zones très proches d'une même rivière,

- à une échelle plus globale. Les deux modalités s'apparentent alors à l'étude d'une rivière chenalisée (rivière homogène en terme de régime hydraulique, avec un flux tendant vers le laminaire) et d'une rivière « naturelle » (beaucoup plus hétérogène, avec un flux turbulent).

Afin d'évaluer la réponse des communautés à la présence d'un mélange polluant en fonction du régime hydraulique, nous avons exposé une communauté périphytique installée dans des canaux artificiels simultanément à une modification des conditions hydrauliques et de la qualité de l'eau. Ces essais ont été réalisés dans quatre canaux artificiels (conçus par L. Volatier, LSE, 2004) installés en extérieur sur le site de l'UMR CARRTEL. L'influence du conjointe d'un mélange polluant et du régime hydraulique sur la structure et le fonctionnement du périphyton, a été observé à deux échelles spatiales (décimétrique et à l'échelle du canal) et temporelles (variabilité hebdomadaire et saisonnière). A une échelle locale (décimétrique), on a étudié la différence de réponse du périphyton au sein d'un même canal entre des zones lentes et rapides (Partie A et B). Cette expérimentation a été

réalisée durant deux mois en automne ainsi qu'en en été (Partie B). Enfin, à une échelle plus globale, nous avons comparé la structure et la diversité de périphytons issus de canaux ayant un régime homogène (à tendance laminaire) à celles de périphytons issus de canaux soumis à un régime hétérogène (Partie C). Ces canaux sont soumis, ou non, à une pollution par un mélange de phytosanitaires.

A- Etude à une échelle locale (décimétrique) : variation de la vitesse du courant au sein d'un même canal

Les échantillonnages ont été réalisés en automne au sein de deux canaux artificiels ayant des zones contrastées de vitesse du courant (zones lentes dont la vitesse maximale est de 0.2 m.s^{-1} et zones rapides dont la vitesse est comprise entre 0.3 et $> 1 \text{ m.s}^{-1}$). Un canal est dit témoin (T) et l'autre pollué (P). L'expérimentation s'est déroulée du 14/09/2006 au 27/11/2006. Le détail de cette expérimentation est reporté dans le chapitre 2 p 62 à 66.

1- Caractéristiques physico-chimiques de l'eau des canaux

1.1- Physico chimie des éléments majeurs

Trois formes de l'azote (NH_4^+ , NO_2^- et NO_3^-), les orthophosphates, le Carbone organique dissous (COD), la silice ont été dosés, dans l'eau des canaux témoin (T) et pollué (P) et dans l'eau d'alimentation (E), tout au long de l'expérimentation. Un suivi du pH, de la conductivité et de la température a également été réalisé (figure 34).

On observe une diminution de la température commune aux deux canaux (maximum : 23°C à un minimum de 7°C) entre le 14/09/2006 et le 27/11/2006. Le pH augmente entre le début et la fin de l'expérimentation ($7,67$ - $8,85$) et la conductivité est relativement constante (290 - $295 \mu\text{S.cm}^{-1}$).

Les teneurs en éléments minéraux et COD suivent la même évolution au sein des deux canaux durant l'expérimentation et, pour certains éléments, elle diffère de celle de l'eau d'alimentation, traduisant ainsi l'activité du périphyton installé dans les canaux. Les teneurs en NH_4^+ ($0,005 \text{ mg.L}^{-1}$) et PO_4^{3-} ($0,002 \text{ mg.L}^{-1}$) sont stables durant l'expérimentation. La teneur en NO_3^- dans l'eau des canaux ($0,44 \text{ mg.L}^{-1}$) est inférieure à celle de l'eau d'alimentation ($0,6 \text{ mg.L}^{-1}$) et on observe une forte diminution de cette teneur ($0,2 \text{ mg.L}^{-1}$) le 16 octobre 2006. Cette date correspond au troisième prélèvement (37 jours de croissance), c'est-à-dire quelques jours après l'introduction du polluant, période durant laquelle les canaux fonctionnent en circuit fermé pendant une journée. A cette même date on observe également au sein des canaux une forte augmentation du COD ($2,47 \text{ mg.L}^{-1}$). La teneur en

silice dans les canaux ($0,54 \text{ mg.L}^{-1}$) est très inférieure à celle de l'eau d'alimentation ($1,9 \text{ mg.L}^{-1}$). Elle diminue dans les canaux jusqu'au 13 novembre 2006, jusqu'à épuisement complet. En fin d'expérimentation, la teneur en silice remonte dans l'eau des canaux.

La qualité chimique de l'eau des canaux diffère donc de l'eau d'alimentation du fait du développement du périphyton mais est identique au sein des deux canaux. En accord avec les limites supérieures du SEQeau (COD : 5 mg.L^{-1} , NH_4^+ : $0,5 \text{ mg.L}^{-1}$, NO_3^- : 2 mg.L^{-1} , PO_4^{3-} : $0,1 \text{ mg.L}^{-1}$) ces données sont caractéristiques d'une eau de très bonne qualité (classe bleue). Le passage en circuit fermé (37^{ième} jour) au début de la phase de pollution provoque une forte modification des caractéristiques chimiques de l'eau.

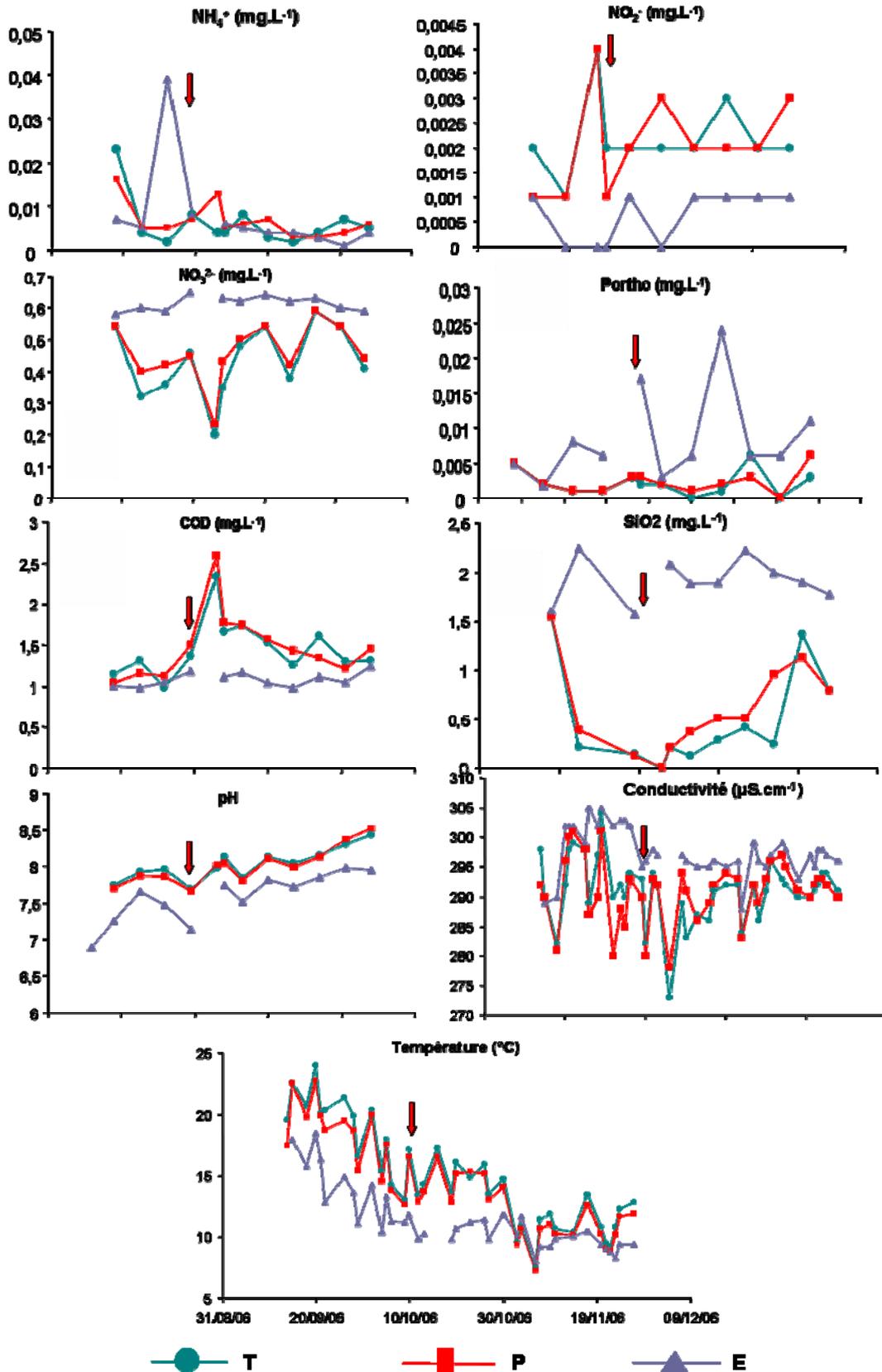


Figure 34 : Evolution de la teneur en NH_4 , NO_2 , NO_3 , PO_4^{3-} , SiO_2 , de la conductivité, du pH et de la température au cours de l'expérimentation en automne ; T = canal témoin, P = canal pollué et E = eau d'entrée. La flèche rouge symbolise la date d'introduction du mélange polluant.

1.2- Dosage des phytosanitaires

Les teneurs en diuron et azoxystrobine ont été dosées dans l'eau des canaux du 37^{ième} au 96^{ième} jour (tableau 17). La teneur en phytosanitaire dans le canal témoin, bien que détectée, est inférieure à la limite de quantification. Dans le canal pollué, la teneur en phytosanitaire (au 37^{ième} jour) est supérieure à la teneur théorique apportée (1,5 µg.L⁻¹ de contamination) et diminue progressivement tout au long de la période de pollution (37^{ième} au 67^{ième} jour). Cependant, le rapport 2 :1 (diuron : azoxystrobine) est respecté. Après l'arrêt de la pollution (après le 67^{ième} jour) la teneur en phytosanitaire diminue rapidement. Le taux de renouvellement de l'eau dans les canaux permet donc une élimination rapide.

Eaux			
Canal	jours	Diuron (µg.L ⁻¹)	Azoxystrobine (µg.L-1)
T	37	<LQ	<LQ
	52	<LQ	<LQ
	67	<LQ	<LQ
	83	<LQ	<LQ
	96	<LQ	<LQ
P	37	4,91	2,13
	52	2,63	1,09
	67	0,93	0,35
	83	0,12	<LQ
	96	<LQ	<LQ
LQ (µg.L ⁻¹)		0,01	0,05

Tableau 17: Teneurs en diuron et azoxystrobine dans l'eau des canaux témoin (T) et pollué (P), LQ= limite de quantification

Les teneurs en diuron et ses principaux produits de dégradation (DCA et DCMU) et en azoxystrobine ont également été dosées au sein du biofilm au 67^{ième} jour de l'expérimentation (tableau 18). Dans le canal témoin (T) les teneurs en diuron et produits de dégradation sont inférieures aux limites de quantification et l'azoxystrobine n'est pas détectée. Au sein du biofilm du canal pollué (P), on retrouve uniquement le diuron. Sa teneur est plus importante au sein des biofilms des zones rapides (0,156 µg.kg⁻¹ sec) que des zones lentes (0,095 µg.kg⁻¹ sec).

Biofilm (T = 67 jours) Concentration en µg.kg ⁻¹ sec					
Canal	hydrologie	DIU	DCA	DCMU	AZS
T	Lent	<LQ	<LQ	<LQ	nd
	Rapide	<LQ	<LQ	<LQ	nd
P	Lent	0,095	<LQ	<LQ	<LQ
	Rapide	0,156	<LQ	<LQ	<LQ
LQ (µg.kg ⁻¹)		0,04	0,1	0,06	0,09

Tableau 18 : Teneur au sein du périphyton en azoxystrobine (AZS), diuron (DIU) et ses produits de dégradation (DCA et DCMU) au sein du périphyton après 67 jours de croissance. LQ = limite de quantification

2- Ecotoxicité du diuron, de l'azoxystrobine et de leur mélange sur la souche *Selenastrum capricornutum*

L'écotoxicité des phytosanitaires a été évaluée selon le test standardisé d'inhibition de la croissance algale décrit au chapitre 2 p 64-65. Les CE50 après 96 h d'exposition au diuron, à l'azoxystrobine et à un mélange 2:1 de ces deux pesticides ont été évaluées en utilisant la souche *Selenastrum Capricornutum* (tableau 19).

	Polluant seul		Mélange 2/1	
	Diuron	Asoxystrobine	Diuron	Asoxystrobine
CE50 optimal $\mu\text{g.L}^{-1}$	25,8	85,3	19,03	9,51
Interval de confiance pour $\diamond = 5 \%$	21,2-30,7	71,3-107,7	13,5-25	6,8-13,15
Nombre de Hill optimal	1,85	1,54	0,82	
Interval de confiance pour $\diamond = 5 \%$	1,45-2,51	1,22-2,14	0,66-1,025	

Tableau 19 : Résultats des tests d'inhibition de la croissance algale (*Selenastrum Capricornutum*) CE50 et nombre de Hill estimés à partir de la courbe dose-effet (macro REGTOX)

La CE50 calculée est plus faible pour le diuron ($25.8 \mu\text{g.L}^{-1}$) et plus élevée pour l'azoxystrobine ($85.3 \mu\text{g.L}^{-1}$). Le diuron est donc le pesticide qui a le plus fort effet en terme d'inhibition de la croissance. On n'observe aucun effet cumulé (augmentation de la toxicité) en présence d'un mélange 2:1 de diuron et d'azoxystrobine. La CE50 observée pour ce mélange est de $19.03 + 9.51 \mu\text{g.L}^{-1}$, soit $28,5 \mu\text{g.L}^{-1}$, ce qui ne diffère pas de la valeur obtenue pour le diuron seul.

3- Structure générale du périphyton au sein des canaux artificiels

La biomasse, les densités cellulaires (algale et bactérienne), la production primaire et la production bactérienne ont été mesurées pour le périphyton du canal témoin (exempt de pollution : T) et du canal test (où l'on a introduit un mélange de diuron et d'azoxystrobine : P). Les échantillons ont été prélevés d'une part dans des zones lentes ($L < 0.2 \text{ m.s}^{-1}$) et d'autre part dans des zones rapides ($R : 0.2 \text{ à } 1 \text{ m.s}^{-1}$). Les résultats (tableau 20), ont été testés par une ANOVA à trois facteurs (date, vitesse et pollution) et en cas de significativité, l'analyse a été complétée par un test de comparaisons multiples de Tukey-HSD (tableau 21).

Aucune différence significative de structure ou de production n'a été mise en évidence sur les biofilms en automne en relation avec une modification de la vitesse du courant ou de la qualité chimique à l'exception d'un effet vitesse sur la production bactérienne. Il semble qu'à cette saison ces deux facteurs ne soient pas les facteurs de

forçage principaux des communautés périphytiques en terme de structure générale et de production.

Cependant, une différence notable est liée à la dynamique temporelle du périphyton. En effet, la structure d'un biofilm âgé de 15 jours est sensiblement différente de celle du périphyton âgé de 67 jours (tableau 20). Les biomasses et densités cellulaires augmentent tandis que les productions diminuent. Par exemple dans les zones rapides du canal témoin, le périphyton voit sa biomasse multipliée par 10 (de 1.21 à 10.87 mg.cm⁻²), sa densité bactérienne multipliée par 5 (de 0.23 à 1.2 10⁹ cell.cm⁻²) et sa densité algale par 4 (de 3 à 12.6 10⁹ cell.cm⁻²). A contrario sa production bactérienne est divisée par 10 (de 13.6 à 1.8 10⁻⁹ mmoles de H.h⁻¹.cm⁻²) et sa production primaire par 3 (9.7 à 3.4 µg de C.h⁻¹.cm⁻²).

En conclusion, dans cette expérimentation d'automne, quelles que soient les conditions de pollution ou de vitesse de courant, après 67 jours de croissance, les biofilms sont plus denses mais moins productifs. Seule la maturation (liée au temps) est donc ici le facteur d'évolution des biofilms

Descripteurs	Biomasse en mg.cm ⁻²				densité bact 10 ⁹ cells.cm ⁻²				densité phyto 10 ⁹ cells.cm ⁻²			
	Témoin		Pollué		Témoin		Pollué		Témoin		Pollué	
	Lent	Rapide	Lent	Rapide	Lent	Rapide	Lent	Rapide	Lent	Rapide	Lent	Rapide
jours												
15	1,03 ± 0,08	1,21 ± 0,14	1,68 ± 0,23	1,68 ± 0,28	0,19 ± 0,027	0,23 ± 0,04	0,39 ± 0,07	0,3 ± 0,044	0,37	3,00	1,84	3,34
30	9,48 ± 4,6	9,44 ± 0,96	5,59 ± 1,12	10,32 ± 1,51	1,26 ± 0,45	1,1 ± 0,23	1,1 ± 0,31	1,86 ± 0,31	9,04	8,05	6,42	1,04
37	5,03 ± 0,97	10,87 ± 3,86	9,64 ± 2,92	6,51 ± 1,26	1,43 ± 0,17	1,15 ± 0,26	1,45 ± 0,18	1,3 ± 0,24	5,36	5,38	6,93	2,74
52	6,27 ± 1,24	6,37 ± 1,74	9,17 ± 2,28	9,17 ± 0,65	2 ± 0,15	1,1 ± 0,44	1,59 ± 0,66	1,2 ± 0,13	7,26	1,02	9,12	13,90
67	5,25 ± 1,42	8,12 ± 1,59	11,48 ± 1,95	9,82 ± 1,46	1,15 ± 0,58	1,2 ± 0,3	2,72 ± 0,81	1,63 ± 0,37	7,05	12,60	21,30	13,70
83	4,01 ± 1,15	7,67 ± 2,83	8,53 ± 0,75	8,88 ± 3,21								
96	2,35 ± 0,81	9,84 ± 2,52	4,89 ± 0,36	10,99 ± 1,17								

Représentation	Biomasse (mg.cm ⁻²)				Densité bact (10 ⁹ cells.cm ⁻²)				Densité phyto (10 ⁹ cells.cm ⁻²)			
	TL	TR	PL	PR	TL	TR	PL	PR	TL	TR	PL	PR

Descripteurs	Production primaire en µg de C.h ⁻¹ .cm ⁻²				Production bactérienne en 10 ⁹ mmole de H .h ⁻¹ .cm ⁻²			
	Témoin		Pollué		Témoin		Pollué	
	Lent	Rapide	Lent	Rapide	Lent	Rapide	Lent	Rapide
jours								
15	8,8 ± 0,2	9,7 ± 0,5	10,9 ± 1,1	11,6 ± 0,4	16,8 ± 4,8	13,6 ± 3,4	36,1 ± 9,9	42,4 ± 16,8
30	2,3 ± 1,6	1,06 ± 0,2	4,5 ± 2,1	0,2 ± 0,1	1,49 ± 0,15	1,15 ± 0,15	1,77 ± 0,57	1,33 ± 0,79
37	3,1 ± 2,7	4,1 ± 0,9	2,7 ± 0,9	2,2 ± 1,2	2,24 ± 0,31	1,42 ± 0,52	3,78 ± 0,31	1,76 ± 0,71
52	15,2 ± 1,7	13,8 ± 9,1	13,6 ± 7,3	5,5 ± 3,5	42,4 ± 27,6	0,63 ± 0,39	23,4 ± 11,3	3,51 ± 1,44
67	3,9 ± 0,3	3,4 ± 1,04	5,4 ± 2,1	2,3 ± 1,9	24,4 ± 4,9	1,77 ± 0,74	43 ± 21,4	7,26 ± 2,45

Représentation	Production primaire (µg C.h ⁻¹ .cm ⁻²)				Production bactérienne (10 ⁹ mmole H.h ⁻¹ .cm ⁻²)			
	TL	TR	PL	PR	TL	TR	PL	PR

Tableau 20 : Paramètres généraux de structure (biomasse, densité bactérienne et algale) et descripteurs de production (production primaire et bactérienne) des biofilms en automne, pour les canaux témoin et pollué, au sein des zones lentes et rapides.

ANOVA à 3 facteurs : P ($\alpha = 5\%$)																																			
	Biomasse	densité algale	densité bactérienne	production primaire	log (production bactérienne)																														
	0,002	0,022	0,003	0,0001	0,001																														
Tukey-HSD : P ($\alpha = 5\%$)																																			
	pollution	vitesse	date 1	date 2	date 3	date 4	date 5																												
	0,211	0,201	0,136	0,524	0,131	0,347	0,495	0,224	0,126	0,006	< 0,0001	0,010	0,000	0,001	0,002	0,070	0,698	0,531	0,001	0,003	0,246	0,346	0,513	0,007	0,024	0,373	0,583	0,163	< 0,0001	0,596	0,075	0,002	0,020	0,028	0,103

Tableau 21 : Résultats de l'ANOVA à trois facteurs (pollution, vitesse et date) et des tests de Tukey-HSD ($\alpha = 5\%$) réalisés sur les descripteurs de structure générale et de production. En grisé les valeurs statistiquement significatives.

4- Tolérance des communautés au mélange polluant

Les valeurs de CE50 calculées varient de $0.05 \mu\text{g.L}^{-1}$ à $73.66 \mu\text{g.L}^{-1}$ de mélange polluant. La réponse des communautés est très variable dans le temps. En effet, après 37 jours de croissance, le périphyton issu de zones rapides est plus sensible ($0.05 \mu\text{g.L}^{-1} < \text{CE50} < 0.08 \mu\text{g.L}^{-1}$) que celui se développant en zones lentes ($6.48 \mu\text{g.L}^{-1} < \text{CE50} < 24.34 \mu\text{g.L}^{-1}$). Au cours du temps cette tendance disparaît : après 52 jours de croissance, les zones rapides sont aussi tolérantes que les zones lentes. En fin d'expérimentation (67 jours), les communautés microbiennes issues du canal pollué sont plus tolérantes ($12.10 \mu\text{g.L}^{-1} < \text{CE50} < 27.73 \mu\text{g.L}^{-1}$) à la présence du mélange diuron + azoxystrobine (tableau 22).

Date	Témoïn		Pollué	
	Lent	rapide	Lent	rapide
37	6,5	0,1	24,3	0,0
52	18,1	73,7	49,6	14,4
67	1,8	2,0	27,7	12,1

Tableau 22 : Valeurs de CE50 en $\mu\text{g.L}^{-1}$ calculées à partir de la méthode PICT et à l'aide de la macro REGTOX.

5- Diversité périphytique

5.1- Diversité phytobenthique : étude par DGGE

Le nombre total d'OTUs détectées par l'analyse du gel des deux canaux témoin et pollué est de 33. Dans le canal témoin, le nombre d'OTUs est compris entre 7 et 17 selon les échantillons (tableau 23). Après 37 jours de croissance, on observe une forte diminution du nombre d'OTUs (divisé par 2) puis une augmentation pour atteindre le maximum de richesse après 52 jours dans les zones lentes et 67 jours dans les zones rapides. Dans le canal pollué, le nombre de OTUs est compris entre 4 et 18. Sa dynamique est identique à

celle du canal témoin : diminution de la richesse après 37 jours de croissance puis recolonisation plus ou moins précoce selon le type de zone échantillonnée. Dans les zones lentes, le maximum de richesse périphytique est atteint après 52 jours de croissance, tandis que dans les zones rapides il faut attendre 67 jours (tableau 23).

Canal date	Témoin		Pollué	
	Lent	Rapide	Lent	Rapide
15	14	13	6	6
30	12	13	10	6
37	7	7	6	4
52	17	14	16	5
67	10	16	8	18

Tableau 23 : Nombre de OTUs observées sur les profils DGGE issus de l'amplification du gène codant pour l'ARN 18S, aux 5 dates d'échantillonnage (en nombre de jours de croissance).

La transposition des résultats de DGGE en une matrice présence-absence permet l'analyse statistique de la structure des communautés algales. Cette matrice est transformée en matrice de dissimilarité (indice de Dice) qui sert de base à l'analyse CAH (figure 35).

L'analyse de la composition phytobenthique par DGGE ne montre pas de forçage des communautés liées aux variations de la vitesse du courant ou de la qualité de l'eau. En effet, la CAH ne regroupe pas les échantillons selon ces deux facteurs. A priori, le facteur le plus structurant pour les communautés phytobenthiques semble être le facteur temps. Dans le canal témoin, par exemple, le biofilm âgé de 15 jours (1TR et 1TL = groupe gris moyen sur la figure 35) est constitué d'une communauté algale très différente de celle des autres dates d'échantillonnage. Ensuite, sont regroupés les échantillons de biofilm âgés de 30 (2TL et 2TR), 52 (4TL et 4TR) et 67 jours (5TL et 5TR) (groupe gris « foncé »). Comme pour l'analyse de la richesse, le périphyton âgé de 37 jours (3TL et 3TR = groupe gris clair) est très différents des autres. Le périphyton du canal pollué suit à peu près le même regroupement.

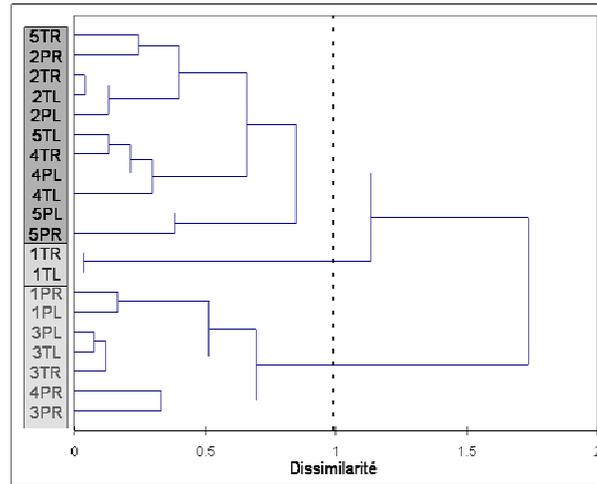


Figure 35 : CAH réalisée à partir de la matrice de dissimilarité (indice de Dice) déduite de l'analyse du gel DGGE issus de l'amplification du gène codant pour l'ARN 18S, TR : témoin rapide, TL : témoin lent, PR : pollué rapide et PL : pollué lent aux 5 dates d'échantillonnage (1 : 15 jours, 2 : 30 jours, 3 : 37 jours, 4 : 52 jours et 5 : 67 jours).

5.2- Diversité phytobenthique : étude par microscopie

5è espèces de microalgues et 1 espèce de Cyanobactérie ont été identifiées par microscopie. Parmi elles, 40 espèces de Diatomées, 17 espèces de Chlorophycées qui sont regroupées selon leur dynamique temporelle (figure 36). Les espèces majoritairement présentes au sein du périphyton sont les diatomées. Les chlorophycées sont plus abondantes dans le canal pollué, notamment en fin de croissance. Les cyanobactéries se développent principalement au sein des zones lentes du canal pollué.

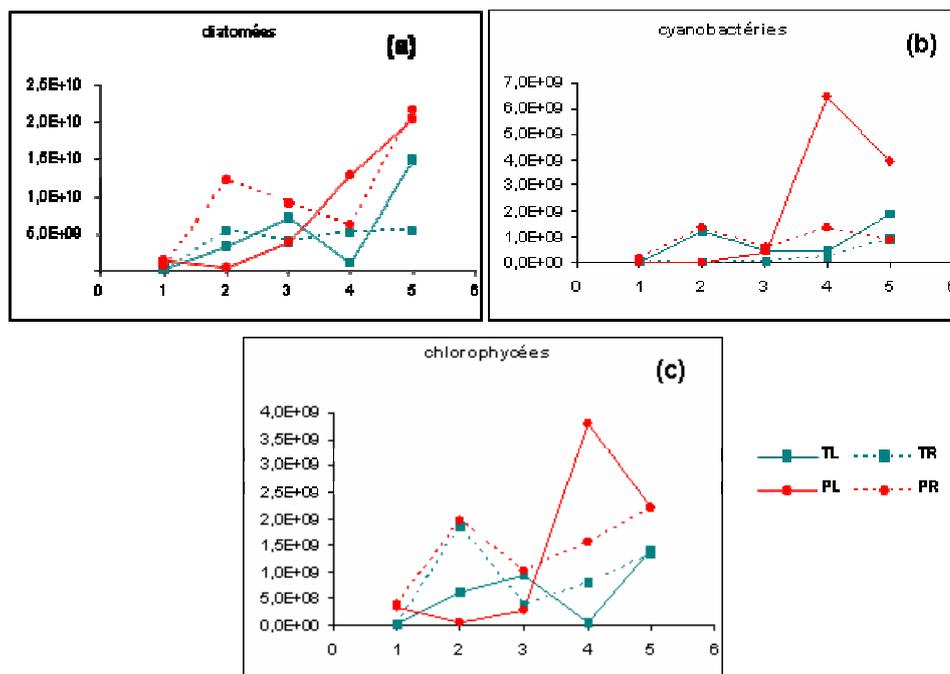


Figure 36 : Dynamique temporelle de l'abondance (nombre de cellules.cm⁻²) des trois grands groupes d'algues répertoriées au sein des canaux : (a) diatomées, (b) cyanobactéries et (c) chlorophycées. TL = témoin lent, TR= témoin rapide, PL= pollué lent, PR= pollué rapide.

La détermination des groupes caractérisés par la vitesse du courant, l'état chimique et l'âge du périphyton a permis d'analyser l'importance de ces facteurs sur la structure de la communauté algale par MRPP (figure 37). L'âge du périphyton est le facteur primordial, suivi de la pollution. La vitesse du courant n'a, a priori, aucun effet sur la diversité algale en automne.

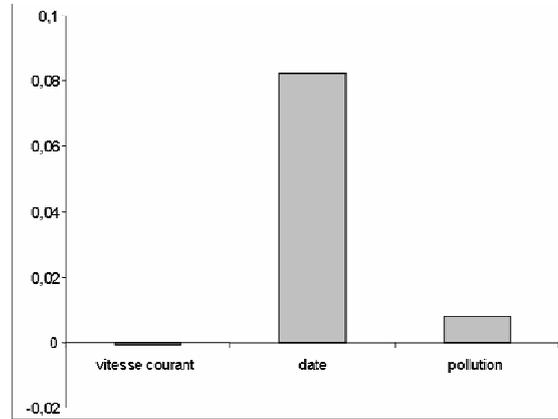


Figure 37 : Résultats de l'analyse MRPP sur les données de microscopie

La matrice d'abondance des différentes espèces identifiées et dénombrées a servi de base à une CAH (figure 38). On observe trois groupes :

- le premier (blanc) est principalement composé des échantillons issus de biofilms jeune (15 et 30 jours),

Parmi les échantillons de périphyton plus mature, deux groupes sont distingués :

- le groupe « gris clair » qui correspond à des échantillons matures (49 et 63 jours) de biofilms subissant un stress chimique,
- le groupe « gris foncé » qui regroupe des échantillons issus de biofilms « pollués » mais plus jeunes (35 jours) et les échantillons provenant du canal témoin.

Quelques espèces indicatrices de chaque groupe ont pu être identifiées ($\alpha = 5\%$). Ainsi, il semble qu'à 67 jours, le périphyton soit très différent et caractérisé par la présence de deux espèces de diatomées : *Diatoma ehrenbergii* et *Navicua rhynchocephala*. Avec moins de significativité ($\alpha = 10\%$), l'installation de chlorophycées telles que *Scenedesmus acutus* est également caractéristique d'un biofilm âgé. *Cyclotella cyclopuncta* et *Diatoma vulgare* sont des espèces de diatomées se développant principalement au début du cycle de croissance du périphyton.

Le niveau de pollution peut également être caractérisé par la présence de certaines espèces. Ainsi du périphyton se développant en l'absence de pollution sera caractérisé par la présence de *Scenedesmus ecoris* (zone lente) et *Mougeotia* sp., *Amphora pediculus* et *Monoraphidium minutum* (zones rapides). Ces espèces disparaissent en présence du mélange diuron + azoxystrobine. Sous pression de pollution, on voit apparaître deux

espèces de diatomée (*Diatoma vulgaris* et *Encyonema minutum*), une espèce de chlorophycée (*Scenedesmus spinosus*) et une espèce de cyanobactérie (*Lyngbya* sp.)

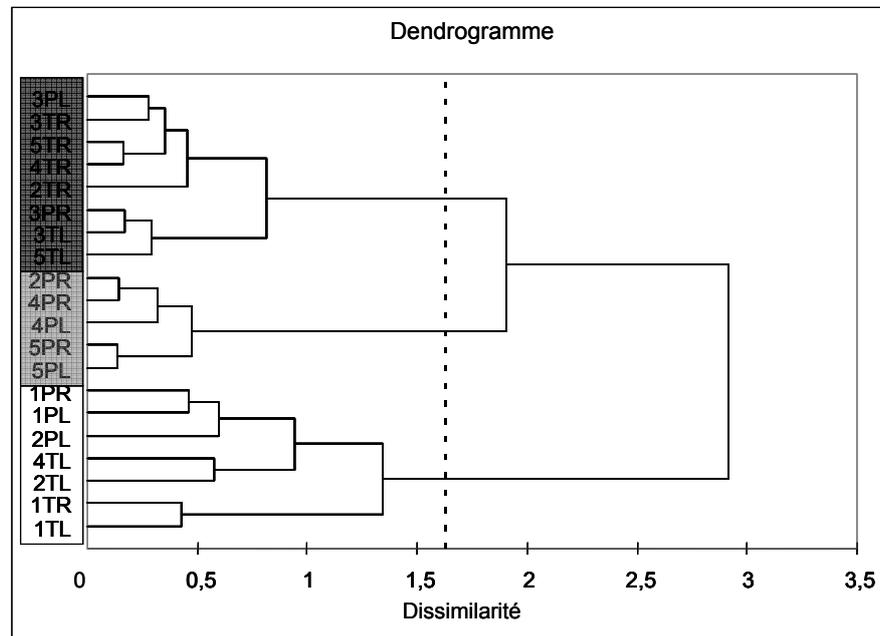


Figure 38 : CAH réalisée à partir de la matrice de dissimilarité (indice de Bray-curtis) déduite de l'analyse microscopique de la communauté algale totale

5.3- Diversité procaryotique : étude par DGGE:

Le nombre total d'OTUs détectées est de 40 et varie de 5 à 25. On observe la même dynamique pour toutes les conditions testées : diminution du nombre d'OTUs entre le 15^{ème} et le 37^{ème} jour puis augmentation entre le 37^{ème} et le 67^{ème} jour (tableau 24). En terme de richesse, il n'y a donc aucune différence entre les communautés bactériennes issues de zones lentes et rapides ou d'un canal pollué et témoin.

Date	Témoin		Pollué	
	Lent	Rapide	Lent	Rapide
15	14	15	20	15
30	5	7	10	9
37	7	5	9	7
52	19	25	17	17
67	19	21	19	10

Tableau 24 : Nombre d'OTUs observées sur le gel DGGE correspondant à l'amplification du gène codant pour l'ARN 16S, aux 5 dates d'échantillonnage (en nombre de jours de croissance).

Comme pour les communautés algales, l'étude de la diversité par DGGE révèle nettement la dynamique temporelle de communautés procaryotiques (figure 39). En effet trois groupes sont observés :

- le premier (gris moyen) regroupe les échantillons des biofilms jeunes (âgés de 15 jours),
- le second groupe (gris clair) regroupe l'ensemble des échantillons issus de biofilms âgés de 30 et 37 jours, sans distinction entre ceux subissant un stress toxique ou se développant dans des zones contrastées de courant,
- et enfin le dernier groupe (gris foncé) est composé de l'ensemble des échantillons issus du périphyton âgé de 50 et 67 jours.

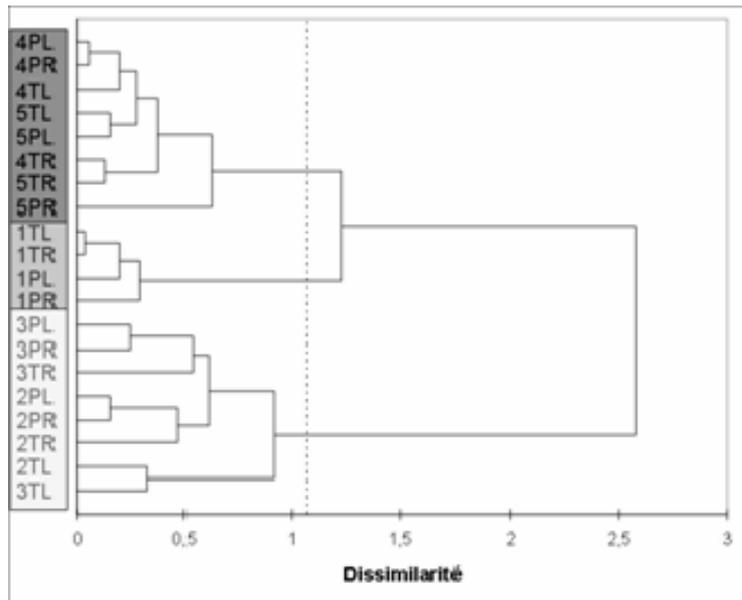


Figure 39 : CAH réalisée à partir de la matrice de dissimilarité (indice de Dice) déduite de l'analyse du gel DGGE issus de l'amplification du gène codant pour l'ARN 16S, TR : témoin rapide, TL = témoin lent, PR : pollué rapide et PL : pollué lent aux 5 date d'échantillonnage (1 : 15 jours ; 2 : 30 jours ; 3 : 35 jours ; 4 : 52 jours et 5 : 67 jours).

Ces groupes s'établissent sans distinction entre périphyton subissant ou non un stress toxique ou se développant dans des zones contrastées de courant. Aucun effet significatif lié au type de zone échantillonnée ou au mélange polluant n'a pu être mis en évidence sur la communauté procaryotique en automne.

6- Effet des phytosanitaires sur le périphyton à l'échelle locale (décimétrique) en automne

A l'échelle locale, l'augmentation de la vitesse du courant modifie-t-elle le développement du périphyton ?

En automne, le facteur ayant le plus d'effet sur les descripteurs étudiés est l'évolution temporelle du biofilm (cf canal témoin, figure 40). Globalement, en automne, l'accumulation de biomasse est faible (maximum 10,87 mg.cm⁻²) et assez précoce. Le pic de biomasse est

en effet atteint après seulement 30 jours de colonisation. Murdoch *et al.* (2004) observaient également une faible et rapide accumulation de biomasse périphytique en automne. Au sein de nos mésocosmes, la biomasse et les densités algales et bactériennes augmentent jusqu'au 30^{ième} jours date à laquelle elles sont maximales. Ensuite, on observe un « déclin » de ces descripteurs. Cette évolution est caractéristique de la dynamique à court du terme du périphyton décrite par Biggs en 1996. Cependant, cette phase exponentielle de croissance est habituellement suivie d'une phase plateau, plus ou moins longue, qui précède la phase de déclin (Biggs, 1996, Hillebrand et Sommer, 2000). Il semble qu'au sein de nos mésocosmes, cette dynamique soit perturbée. En effet, après 37 jours de croissance, un événement non maîtrisé (modification de la qualité chimique de l'eau : épuisement de la silice, augmentation du COD) a provoqué un changement brutal de structure (diminution rapide de la biomasse et des densités cellulaires), de diversité et de fonctionnement du périphyton. Après cette date, (entre le 37^{ième} et le 52^{ième} jour de croissance) la biomasse et la densité restent stables mais la diversité des communautés algales et bactériennes change radicalement et le périphyton s'enrichit. Enfin, durant la dernière semaine de maturation (du 52^{ième} au 60^{ième} jour), seul le fonctionnement du périphyton évolue (diminution de la production primaire et augmentation de la production bactérienne). Sa structure et sa diversité sont stables traduisant vraisemblablement l'installation d'un stade climacique (Biggs, 2000). Ces résultats mettent donc en exergue les grandes différences existant entre du périphyton âgé de 14 jours et du périphyton plus mature (67 jours). Par exemple, la communauté algale évolue au cours du temps. Après 14 jours de croissance, le périphyton, de faible biomasse et avec une densité réduite, est essentiellement diatomique puis au cours du temps apparaissent les chlorophycées et les cyanobactéries. Certaines espèces ne sont présentes qu'au sein de périphyton mature : c'est le cas de diatomées (*Diatoma ehrenbergii* et *Navicula rhynchocephala*) mais également d'une chlorophycée (*Scenedesmus acutus*). C'est résultats sont en accord avec ceux de nombreux auteurs (Biggs, 2000 ; Sekar *et al.*, 2002) qui décrivent la succession du périphyton : les espèces pionnières sont souvent les diatomées, suivies par les chlorophycées et selon les conditions par les cyanobactéries.

A cette saison la dynamique du périphyton n'est pas influencée par les variations locales de la vitesse du courant. La structure, la diversité et le fonctionnement du périphyton se développant dans des zones rapides ne sont pas significativement différents de ceux du périphyton en zones lentes. Pourtant, de nombreux auteurs ont décrit une relation inversement proportionnelle entre la biomasse et la vitesse du courant (Biggs et Stokseth, 1996 ; Ghosh et Gaur, 1998). Besemer *et al.* (2007) ont également mis en évidence l'effet de la vitesse du courant sur les communautés périphytiques, notamment sur la communauté procaryotique. A trois conditions de courant : laminaire (0.065 m.s^{-1}), transitoire (0.162 m.s^{-1}) et turbulente (0.39 m.s^{-1}), ils ont observé une diminution de la biomasse algale (déduite des

teneurs en chlorophylle *a*) avec l'augmentation de la vitesse. Ils ont montré que la vitesse du courant contrôle également le développement bactérien, l'abondance bactérienne (déterminée par microscopie à épifluorescence) diminuant quand la vitesse du courant augmente. De plus, ces travaux montrent que le développement des algues filamenteuses et des cyanobactéries est limité par une augmentation du flux. Ce changement de composition spécifique, en réponse à une perturbation hydraulique, avait également été observé par Biggs *et al.* (1998). Dans des gammes de vitesse moindre (0.065 à 0.23 m.s⁻¹) et en mésocosmes, Battin *et al.* (2003b) ont mis en évidence des différences de structure architecturale et fonctionnelle des biofilms liées à l'augmentation de vitesse: réduction de la densité bactérienne (3,4 fois entre les deux conditions) et algale (diminution de la teneur en chlorophylle *a* de 2,5 fois) et de l'épaisseur du biofilm. Au sein de nos mésocosmes, le périphyton est principalement diatomique et l'abondance des chlorophycées et cyanobactéries, bien que caractéristique de la maturation du périphyton, reste faible. On n'observe ainsi, aucune différence de composition algale ou bactérienne entre nos deux zones hydrauliques. Il semble qu'en automne, le développement du périphyton soit contraint par d'autres facteurs. Lear *et al.* (2008) ont par exemple démontré que la variabilité spatiale de la diversité bactérienne épilithique au sein d'une rivière est principalement due aux variations de température et de lumière. Nos résultats en microcosmes (Villeneuve *et al.*, soumis et chapitre 3) montrent également que l'un des facteurs principaux de forçage du périphyton est l'intensité lumineuse. De plus, le changement de qualité chimique, provoqué par le passage en circuit fermé du système expérimental, a également pu provoquer un stress temporaire mais suffisant pour être à l'origine de la structuration du périphyton. De nombreux auteurs ont en effet évalué l'importance de la teneur en nutriments pour la croissance du périphyton (Haglund et Hillebrand, 2005 ; Uehlinger, 2005 ; Hillebrand et Sommer, 2000). Hillebrand et Sommer ont notamment évalué l'importance de la teneur en silice sur le développement du périphyton. Les diatomées étant souvent les principales algues composant le périphyton, la teneur en silice peut être un facteur prédominant. Or, au sein de nos mésocosmes, la teneur en silice est limitante aux alentours du 37^{ème} jour de croissance, ce qui pourrait en partie expliquer le changement de trajectoire brutale observé dans la dynamique du périphyton.

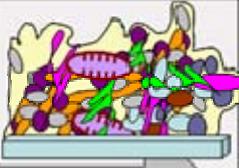
Biomasse	+	-	=	=
Densité algale	+	-	=	=
Densité bact.	+	-	=	=
Prod. bact.	-	=	+	+
Prod. prim.	-	=	+	-
Rich. bact.	-	=	+	=
Rich. algale	=	-	+	=
Comp. algale	=	≠	≠	=
Comp. Bact.	≠	=	≠	=
				
	15 à 30 jours	30 à 37 jours	37 à 52 jours	52 à 67 jours

Figure 40 : Evolution temporelle des différents descripteurs au sein du canal témoin au cours de l'expérimentation automnale (+ : = augmentation du descripteur ; - : diminution ; = : pas de changement ; ≠ : changement)

A cette saison on n'observe donc pas de différence de structure ou diversité du périphyton en relation avec des variations locales de la vitesse du courant. On peut supposer que le périphyton est contraint par d'autres facteurs dont l'influence est prédominante en comparaison de celle de la vitesse du courant. Ces facteurs peuvent être la forte diminution de la température enregistrée, la diminution de la qualité de l'éclairement ou encore le changement de qualité chimique mesurée au 37^{ième} jour de croissance. L'évolution temporelle du périphyton (figure 40) montre qu'aucun descripteur n'évolue de manière similaire. Cependant, après 52 jours de croissance les descripteurs de structure se stabilisent ce qui peut traduire l'installation d'un stade climacique.

L'introduction de diuron et d'azoxystrobine (à dose environnementale) a-t-elle un impact sur le périphyton ?

L'introduction d'un mélange de pesticides, à des doses très inférieures aux CE50 mesurées sur souche pure mais correspondant à une réalité environnementale mesurée (Gouy et Nivon, 2007), ne provoque pas de grand changement de structure ou de

fonctionnement. Seule la communauté algale semble être sensible à la présence du mélange polluant. Comme pour l'âge du périphyton, certaines espèces sont caractéristiques de périphyton se développant lors d'une exposition aux toxiques. Dans nos systèmes expérimentaux, on retrouve par exemple deux espèces de diatomées (*Diatoma vulgare* et *Encyonema minutum*), une espèce de chlorophycée (*Scenedesmus spinosus*) et une espèce de cyanobactérie (*Lyngbya sp.*) qui sont présentes uniquement au sein du périphyton exposé au mélange diuron et azoxystrobine. *Diatoma vulgare* et *Lyngbya sp.* ne sont pas connus comme espèces indicatrices. A contrario, le genre *Scenedesmus* est caractéristique de milieu de qualité dégradée (en terme de trophie) et *Encyonema minutum* est une diatomée ayant un tube muqueux qui peut lui conférer une certaine forme de résistance aux perturbations. Pesce *et al.* en 2006, observaient également un changement de composition algale du périphyton en présence de diuron à une concentration plus élevée que dans notre étude ($10 \mu\text{g.L}^{-1}$). Ce changement était cependant accompagné d'une modification de la dynamique périphytique : suppression des pics de densité algale, de densité et de production bactérienne. Au sein de nos mésocosmes, le changement de composition algale n'est pas accompagné d'une modification de la biomasse, des densités cellulaires ou des productions. Tlili *et al.* en 2008, pour une concentration en diuron proche de celle utilisée au cours de notre expérimentation, observaient également un changement de composition algale sans effet sur la communauté bactérienne.

L'impact des phytosanitaires sur le périphyton sera discuté plus en détail dans la partie B de ce même chapitre.

En automne, comme pour l'effet de la vitesse du courant, il semble que la dynamique du périphyton ne soit pas fortement contrainte par la présence du mélange polluant aux concentrations testées. Cette dynamique est en effet identique à celle observé au sein du canal témoin (figure 40) à l'exception de l'évolution de la diversité algale. Certains facteurs (lumière, température, qualité de l'eau) caractéristiques de la saison d'échantillonnage (automne) doivent avoir un poids plus important dans la structuration du périphyton.

Quel sera l'effet de ces mêmes facteurs (vitesse du courant et pesticides) sur le périphyton quand les conditions d'éclairement et de température sont moins limitées ?

B- Importance de la saison d'échantillonnage

Pour tester un éventuel effet lié à la saison, la même expérimentation a été réalisée en été. Nous avons également caractérisé la structure générale, la diversité périphytique et son fonctionnement au sein de deux canaux artificiels : l'un témoin, l'autre pollué ($1.5 \mu\text{g.L}^{-1}$ d'un mélange 2:1 de diuron et d'azoxystrobine). La réponse des communautés a, comme en automne, été observée au sein de zones hydrauliquement très contrastées. Ces résultats sont comparés à ceux obtenus en automne afin d'évaluer l'importance du facteur saisonnier dans la réponse des communautés à une échelle locale. Le schéma d'expérimentation ainsi que les protocoles sont décrits précisément dans le chapitre 2 p : 67-72.

1- Caractéristiques physico-chimiques de l'eau des canaux en été

1.1- Physico chimie des éléments majeurs

Comme en automne, trois formes de l'azote (NH_4^+ , NO_2^- et NO_3^-), les orthophosphates, le COD, la silice ont été dosés, dans l'eau des canaux témoin (T) et pollué (P) et dans l'eau d'alimentation (E), tout au long de l'expérimentation. Un suivi du pH, de la conductivité et de la température a également été réalisé (figure 41).

Entre le 12/05/2006 et le 13/07/2006, et à l'inverse de l'automne, la température augmente au cours de l'expérimentation (minimum : 8.7°C à maximum : 26.4°C).

Les teneurs en éléments minéraux suivent la même évolution au sein des deux canaux durant l'expérimentation. La teneur en NH_4^+ (teneur moyenne $0,006 \text{ mg.L}^{-1}$) augmente en début d'expérimentation (max : $0,014 \text{ mg.L}^{-1}$). La teneur en PO_4^{3-} ($0,005 \text{ mg.L}^{-1}$) est stable durant l'expérimentation et légèrement supérieure à la teneur observée en automne. La teneur en NO_3^- dans l'eau des canaux ($0,26 \text{ mg.L}^{-1}$) est inférieure à celle de l'eau d'alimentation ($0,6 \text{ mg.L}^{-1}$) et en constante diminution au cours de l'expérimentation. Le COD ($2,41 \text{ mg.L}^{-1}$) est stable dans le temps à l'exception d'un point dans le canal pollué (le 19/06/2006 qui correspond à l'introduction du polluant dans le canal). La teneur en silice dans les canaux ($1,1 \text{ mg.L}^{-1}$) est inférieure à celle de l'eau d'alimentation en début d'expérimentation ($1,9 \text{ mg.L}^{-1}$) et devient même limitante à partir du 29/05/2006. La teneur en silice augmente cependant à partir du 19/06/2006 et est supérieure à celle mesurée en automne.

La qualité chimique de l'eau des canaux diffère donc de l'eau d'alimentation (du fait du développement du périphyton) mais est identique au sein des deux canaux. En accord avec les limites supérieures du SEQeau (COD : 5 mg.L⁻¹, NH₄⁺ : 0,5 mg.L⁻¹, NO₃⁻ : 2 mg.L⁻¹, PO₄³⁻ : 0,1 mg.L⁻¹) ces données sont caractéristiques d'une eau de très bonne qualité (classe bleue). La qualité chimique de l'eau ne diffère donc pas entre l'automne et l'été. La température a cependant une évolution inverse entre ces deux saisons et la teneur en silice semble être moins limitante en été qu'en automne. On notera également qu'à cette saison la durée du jour et l'intensité lumineuse augmentent.

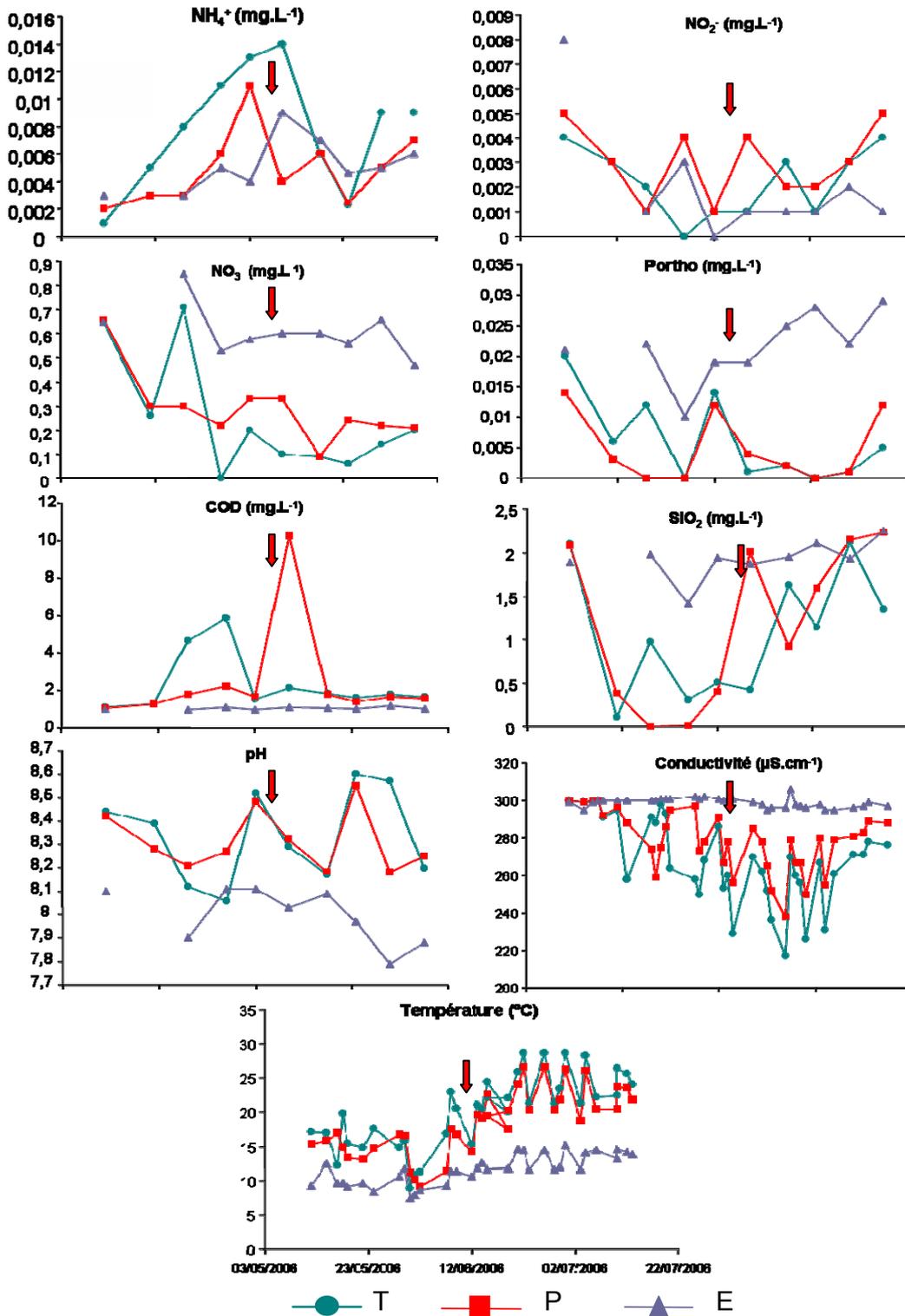


Figure 41 : Evolution de la teneur en NH_4 , NO_2 , NO_3 , PO_4^{3-} , SiO_2 , de la conductivité, du pH et de la température au cours de l'expérimentation en été

2.2- Dosage des phytosanitaires

Les teneurs en diuron et azoxystrobine ont été dosées dans l'eau des canaux du 35^{ième} au 77^{ième} jour (tableau 25). Dans le canal témoin la présence de diuron a été observée à des quantités très faibles ($0.065-0.099 \mu\text{g.L}^{-1}$) alors que ce produit n'a pu être quantifié dans l'eau du lac alimentant le système expérimental. Dans le canal pollué, au cours de la période de pollution, la teneur en phytosanitaires est en accord avec la teneur théorique apportée ($1,5 \mu\text{g.L}^{-1}$ de contaminants) et les proportions 2 :1 des deux polluants sont globalement respectées. Après l'arrêt de la pollution (après le 63^{ième} jour) la teneur en phytosanitaire diminue rapidement.

Eaux			
Canal	Jours	Diuron ($\mu\text{g.L}^{-1}$)	Azoxystrobine ($\mu\text{g.L}^{-1}$)
T	35	<LQ	<LQ
	49	0,099	<LQ
	63	<LQ	<LQ
	70	0,064	<LQ
	77	0,065	<LQ
P	35	1,945	0,917
	49	1,018	0,360
	63	2,052	0,787
	70	0,066	<LQ
	77	0,089	<LQ
E	35	<LQ	<LQ
	49	<LQ	<LQ
	63	<LQ	<LQ
	70	<LQ	<LQ
	77	<LQ	<LQ

Tableau 25 : Teneur en diuron et azoxystrobine ($\mu\text{g.L}^{-1}$) dans l'eau du canal témoin (T), pollué (P) et dans l'eau d'alimentation (E). (LQ = limite de quantification)

Les teneurs en diuron et ses principaux produits de dégradation (DCA et DCMU) et en azoxystrobine ont également été dosées au sein du biofilm au 35^{ième}, 49^{ième} et 70^{ième} jour de l'expérimentation (tableau 26). Dans le canal témoin, les teneurs en diuron et produits de dégradation sont inférieures à la limite de quantification et l'azoxystrobine n'est pas détectée quelles que soient les conditions hydrauliques. Au sein du biofilm du canal pollué, la quantité de phytosanitaire est fonction du type de zone échantillonnée. Les teneurs en diuron et azoxystrobine sont environ 3 fois plus importantes au sein des zones rapides ($2,18 \mu\text{g.kg}^{-1}$ sec de biofilm) que des zones lentes ($0,76 \mu\text{g.kg}^{-1}$ sec). Cependant, l'azoxystrobine est retenue par le périphyton dans une proportion moindre par rapport au diuron. En été, on retrouve un produit de dégradation du diuron, le DCMU, au sein du biofilm des zones rapides.

Biofilm concentration en $\mu\text{g.kg}^{-1} \text{ sec}$					
canal	jours	Diuron	DCA	DCMU	Azoxystrobine
TR	35	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ
	49	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ
	63				
	70	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ
	77				
TI	35	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ
	49	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ
	63				
	70	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ
	77				
PR	35	2,18	<LQ	0,081	0,11
	49	1,91	<LQ	<LQ	0,05
	63				
	70	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ
	77				
PL	35	0,76	<LQ	<LQ	0,04
	49	0,60	nd	<LQ	<LQ
	63				
	70	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ
	77				

Tableau 26 : Teneur en azoxystrobine, diuron et ses produits de dégradation (DCA et DCMU) au sein du périphyton du 37^{ième} au 77^{ième} jour de croissance dans le canal témoin (T) ou pollué (P) en zone lente (L) ou rapide (R) ; LQ= limite de quantification et nd = non détecté.

2- Structure générale du périphyton au sein des canaux artificiels

La biomasse, les densités cellulaires (algale et bactérienne), la production primaire et la production bactérienne ont été mesurées pour le périphyton du canal témoin (exempt de pollution : T) et du canal test (où l'on a introduit un mélange de diuron et d'azoxystrobine : P). Les échantillons ont été prélevés d'une part dans des zones lentes ($L < 0.2 \text{ m.s}^{-1}$) et d'autre part dans des zones rapides ($R : 0.2 \text{ à } 1 \text{ m.s}^{-1}$). Les résultats (tableau 27), ont été testés par une ANOVA à trois facteurs (date, vitesse et pollution) et en cas de significativité, l'analyse a été complétée par un test de comparaisons multiples de Tukey-HSD (tableau 28)

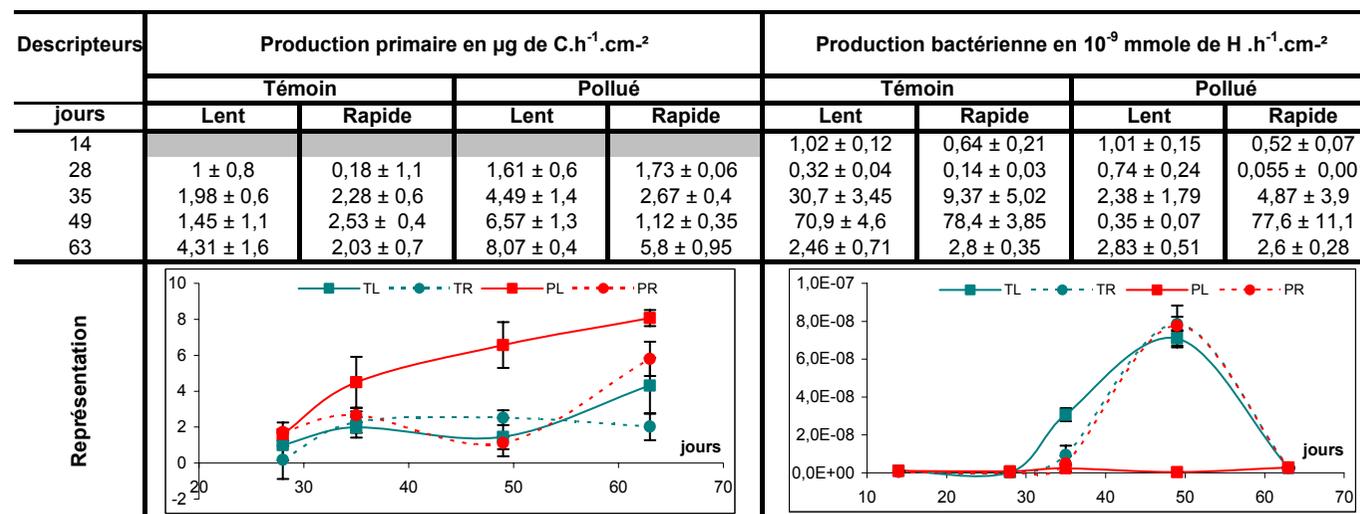
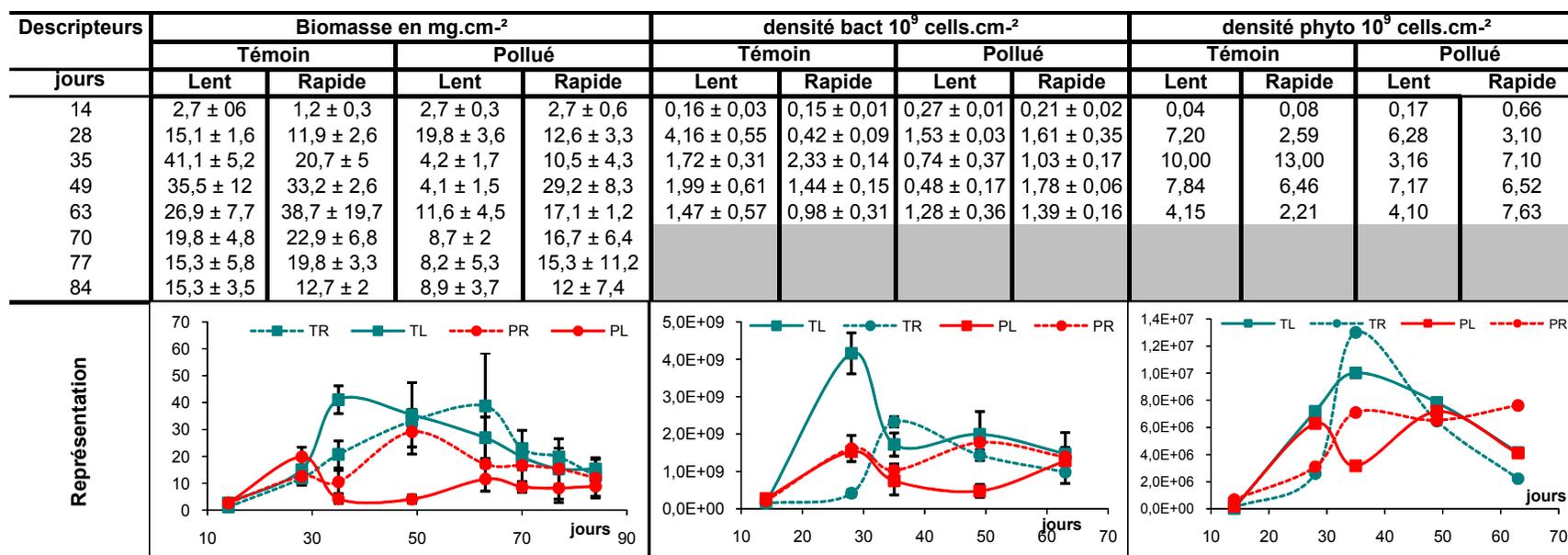


Tableau 27 : Paramètres généraux de structure (biomasse, densité bactérienne et algale) et descripteurs de production (production primaire et bactérienne) des biofilms en été, pour les canaux témoïn et pollué, au sein des zones lentes et rapides

ANOVA à 3 facteurs : P ($\alpha = 5\%$)					
	Biomasse	production primaire	log (production bactérienne)	densité bactérienne	densité algale
	0,0002	0,0003	0,002	0,143	0,018
Tuckey HSD : P ($\alpha = 5\%$)					
pollution	< 0,0001	0,001	0,073		0,360
vitesse	0,148	0,003	0,124		0,300
date-1	< 0,0001	0,159	0,024		0,001
date-2	0,014	0,006	0,022		0,626
date-3	0,049	0,254	0,912		0,008
date-4	0,001	0,334	< 0,0001		0,065
date-5	0,002	0,107	0,260		0,876

Tableau 28 : Résultat de l'ANOVA à trois facteurs (pollution, vitesse et date) et des tests de Tukey ($\alpha = 5\%$) réalisés sur les descripteurs de structure générale et de production. En grisé les valeurs statistiquement significatives au seuil de 5%.

La biomasse varie globalement de 1.2 mg.cm⁻² (TR à 14 jours) à 41.1 mg.cm⁻² (TL à 35 jours).

Au sein du canal témoin, la biomasse augmente jusqu'au 35^{ième} jour dans les zones lentes puis diminue progressivement. Dans les zones rapides, le maximum de biomasse n'est atteint qu'au 63^{ième} jour (38.7 mg.cm⁻²). L'évolution de la biomasse, dans le canal témoin, est donc caractérisée par une phase d'accumulation dont le pic dépend des conditions hydrauliques (35^{ième} ou 63^{ième} jour). Cette phase est suivie d'un déclin de la biomasse.

Au sein du canal pollué, dans les zones lentes, la biomasse évolue comme dans le canal témoin jusqu'au 28^{ième} jour. Après introduction du polluant (28^{ième} jour), la biomasse diminue fortement (elle est divisée par 5 entre le 28^{ième} et le 35^{ième} jour). Dans les zones lentes, l'accumulation de biomasse reste faible (max : 11.6 mg.cm⁻²). Dans les zones rapides, le pic de biomasse est atteint le 49^{ième} jour (29.2 mg.cm⁻²) et l'évolution de la biomasse est identique à celle du canal témoin.

L'ensemble des 3 facteurs (âge, vitesse et pollution) permet d'expliquer l'évolution de la biomasse. (ANOVA, P=0.0002). L'âge du biofilm est le facteur influençant le plus la biomasse périphytique qui est en constante évolution au cours de l'expérimentation. La vitesse du courant n'influence pas directement la biomasse. Cependant, la pollution entraîne une diminution de la biomasse périphytique mais uniquement au sein des zones lentes (ANOVA interaction vitesse-pollution : P = 0.02). L'évolution de la biomasse périphytique est donc fonction à la fois de la vitesse du courant et de la qualité chimique de l'eau. Le périphyton des zones lentes est le plus impacté dans sa croissance par la présence du mélange diuron-azoxystrobine.

En été, quelles que soient les conditions expérimentales, la biomasse est 6 fois plus importante qu'en automne. Contrairement à l'automne, l'introduction de polluants conjointement à une modification de la vitesse du courant provoque une diminution de la biomasse uniquement dans les zones lentes.

La densité bactérienne varie au cours de l'expérience $0.16 \cdot 10^9 \text{ cell.cm}^{-2}$ à $1.47 \cdot 10^9 \text{ cell.cm}^{-2}$ au sein des zones lentes du canal témoin. La densité maximale ($4.16 \cdot 10^9 \text{ cell.cm}^{-2}$) est obtenue avec un périphyton âgé de 28 jours. Au sein des zones rapides (du canal témoin), la densité bactérienne varie de $0.15 \cdot 10^9 \text{ cell.cm}^{-2}$ à $0.98 \cdot 10^9 \text{ cell.cm}^{-2}$ avec un maximum atteint au 35^{ième} jour de croissance ($2.33 \cdot 10^9 \text{ cell.cm}^{-2}$). Bien que l'on observe une évolution temporelle de la densité bactérienne ainsi qu'un léger retard d'installation dans les zones rapides, les résultats de l'ANOVA à trois facteurs ne sont pas significatifs. La densité bactérienne varie donc peu au cours du temps et ne dépend pas des conditions hydrauliques au sein du canal témoin.

Au sein du canal pollué, la densité bactérienne maximale est atteinte le 28^{ième} jour dans les zones lentes ($1.53 \cdot 10^9 \text{ cell.cm}^{-2}$) et le 49^{ième} dans les zones rapides ($1.78 \cdot 10^9 \text{ cell.cm}^{-2}$). On observe, comme au sein du canal témoin un léger retard d'installation de la communauté bactérienne dans les zones rapides. Comme pour le canal témoin, les effets du vieillissement du périphyton et de la vitesse du courant ne sont pas significatifs. Aucune différence de densité bactérienne n'est observé, en été, entre le canal témoin et pollué quelque soit les conditions d'hydrauliques.

En été, la densité bactérienne est identique à celle de l'automne. La pollution et la vitesse du courant n'ont pas d'effet significatif sur la densité bactérienne, quelle que soit la saison.

La densité algale varie de $0.04 \cdot 10^9 \text{ cells.cm}^{-2}$ à $4.15 \cdot 10^9 \text{ cells.cm}^{-2}$ après 63 jours de croissance dans les zones lentes du canal témoin. La densité algale maximale est observée le 35^{ième} jour de croissance ($10 \cdot 10^9 \text{ cells.cm}^{-2}$). Dans les zones rapides du canal témoin, la densité algale atteint son maximum également après 35 jours de croissance ($13 \cdot 10^9 \text{ cells.cm}^{-2}$).

Dans les zones rapides du canal pollué, la densité algale est maximale après 35 jours de croissance ($7.10 \cdot 10^9 \text{ cells.cm}^{-2}$) et suit la même dynamique qu'au sein des zones rapides du canal témoin. Dans les zones lentes, la dynamique de la densité algale semble être perturbée par l'introduction du polluant. En effet, la densité augmente jusqu'au 28^{ième} jour

puis diminue rapidement après l'introduction du polluant (la densité algale est divisée par 2 entre le 28^{ième} et le 35^{ième} jour). Après le 35^{ième} jour de croissance, la densité algale augmente de nouveau pour atteindre son maximum au 49^{ième} jour ($7.17 \cdot 10^9 \text{ cells.cm}^{-2}$).

Ces différences de dynamique algale entre canal pollué et canal témoin sont cependant non significatives (Test de Tukey). Le facteur de forçage principal de la densité algale, en été, est le temps de croissance.

La densité algale du périphyton âgé de 60 jours est supérieure en automne. En été comme en automne l'introduction de diuron et d'azoxystrobine et l'augmentation de la vitesse du courant n'ont aucun effet significatif sur la densité algale.

La production primaire au sein des zones lentes du canal témoin varie de $1 \mu\text{g C.h}^{-1} \cdot \text{cm}^{-2}$ à $4.31 \mu\text{g C.h}^{-1} \cdot \text{cm}^{-2}$ et est en constante augmentation au cours de l'expérimentation. Dans les zones rapides, elle varie de $0.18 \mu\text{g C.h}^{-1} \cdot \text{cm}^{-2}$ à $2.53 \mu\text{g C.h}^{-1} \cdot \text{cm}^{-2}$ et est relativement constante durant les 63 jours de croissance.

La production primaire est globalement plus importante au sein du canal pollué. Elle varie de 1.73 à $5.8 \mu\text{g C.h}^{-1} \cdot \text{cm}^{-2}$ dans les zones rapides. Dans les zones lentes, où la biomasse est moindre, elle varie de 1.61 à $8.07 \mu\text{g C.h}^{-1} \cdot \text{cm}^{-2}$. La production primaire est donc deux fois supérieure au sein du canal pollué par rapport au canal témoin. La production primaire semble être le descripteur le plus sensible aux différents facteurs étudiés. Elle est influencée à la fois par la variation de la vitesse du courant (> dans les zones lentes), par la qualité de l'eau (> dans les zones polluées) et par l'âge du biofilm (> pour du périphyton âgé de 63 jours par rapport au périphyton âgé de 14 jours).

En été, la production primaire maximale mesurée au sein du périphyton est 2 fois inférieure à celle mesurée en automne. A l'inverse de l'automne, la production primaire estivale est impactée par la présence de polluants et des changements d'hydrauliques.

La production bactérienne suit la même évolution au sein des zones lentes et rapides du canal témoin. Elle varie d'environ $1 \cdot 10^{-9} \text{ mmole H.h}^{-1} \cdot \text{cm}^{-2}$ à $80 \cdot 10^{-9} \text{ mmoles H.h}^{-1} \cdot \text{cm}^{-2}$ et atteint son maximum après 49 jours de croissance avant de diminuer rapidement. Il n'y a donc aucune différence entre les deux zones d'hydraulique.

Au sein des zones rapides du canal pollué, la production bactérienne évolue de manière identique à celle du canal témoin. Le maximum ($77.6 \cdot 10^{-9} \text{ mmoles H.h}^{-1} \cdot \text{cm}^{-2}$) est atteint après 49 jours de croissance. Comme pour la biomasse et la production primaire, les zones lentes sont les seules à être impactées. La production bactérienne au sein des zones lentes

du canal pollué est faible (max : $2.83 \cdot 10^{-9}$ mmoles H.h⁻¹.cm⁻²) et relativement constante au cours de l'expérimentation.

A l'inverse de la production primaire, la production bactérienne maximale périphyton en été est 2 fois supérieure à celle mesurée en automne.

En terme de structure générale, en été, le facteur le plus structurant pour le périphyton est, comme précédemment, son âge. Pour tous les descripteurs de structure, on observe une phase de croissance, un maximum puis une phase de déclin.

Cette évolution temporelle de certains descripteurs est cependant modifiée par une variation de la vitesse du courant et la présence de polluants. L'augmentation de la vitesse du courant tend à retarder le développement des communautés algales et bactériennes et à freiner l'accumulation de biomasse. Les zones lentes sont donc plus « précoces » mais également plus impactées par la présence des polluants en terme de biomasse et de production. Comme en automne, les densités cellulaires ne sont pas sensibles à la présence de diuron et d'azoxystrobine.

L'effet des polluants et de la vitesse du courant est donc modulé par la saison.

3- Tolérance des communautés au mélange polluant

Les résultats du PICT (tableau 29), très variables, restent difficiles à interpréter, bien qu'une les CE50 semblent plus élevées dans les zones rapides et notamment au sein du canal pollué. Ces résultats pourraient en partie expliquer les différences de réponses observées avec les descripteurs de structure. A la fin de l'expérience, après arrêt de la pollution (t = 78 jours), on observe une tendance à l'acquisition de résistance. En effet, la CE50 moyenne est plus élevée dans le canal pollué ($60.5 \mu\text{g.L}^{-1}$) que dans le canal témoin ($25 \mu\text{g.L}^{-1}$).

Globalement, les CE50 observées en été sont supérieures à celles obtenues en automne. Il semblerait que la communauté périphytique estivale soit plus tolérante à la présence de polluants.

Date	Témoin		Pollué	
	Lent	Rapide	Lent	Rapide
49	27	23	23	65
63	38	51	22	32
78	21	29	62	59

Tableau 29 : Valeurs de CE50 en $\mu\text{g.L}^{-1}$ estimées à partir de la méthode PICT et à l'aide de la macro REGTOX pour les trois dernières dates d'échantillonnage (en nombre de jours de croissance).

4- Diversité périphytique

4.1- Diversité phytobenthique : étude par DGGE

Le nombre total d'OTUs détectées par l'analyse du gel DGGE (tableau 30) des canaux témoin et pollué est de 51. En automne, seulement 33 OTUs avaient été observées. La communauté algale du périphyton, bien que moins dense, est donc plus diversifiée en été.

Dans le canal témoin, le nombre d'OTUs est compris entre 4 et 26. Le maximum de diversité est observé après 35 jours de croissance pour les deux conditions hydrauliques. Le périphyton issu de zones lentes semble être plus diversifié (26 OTUs) que celui issu de zones rapides (19 OTUs).

Dans le canal pollué, le nombre d'OTUs est compris entre 3 et 20. La dynamique est identique à celle du canal témoin : diminution de la richesse après un maximum à 35 jours de croissance. Comme pour le canal témoin, la richesse algale périphytique est supérieure dans les zones lentes (20 OTUs).

On observe une différence de richesse entre les deux conditions de pollution testées : la diversité algale est plus faible sous pression de pollution (à $t = 35$ et 46 jours de croissance). En automne aucune différence de richesse n'était observée sous pression de pollution.

jours	Témoin		Pollué	
	Lent	Rapide	Lent	Rapide
14	15	9	9	10
28	7	11	8	8
35	26	19	20	10
46	24	18	6	3
63	10	4	13	3

Tableau 30 : Nombre de OTUs observées sur le gel DGGE correspondant à l'amplification du gène codant pour l'ARN 18S, aux 5 dates d'échantillonnage (en nombre de jours de croissance).

La transposition des résultats de DGGE en une matrice présence-absence permet l'analyse statistique de la structure des communautés. Cette matrice est transformée en une matrice de dissimilarité (indice de Dice) qui sert de base à l'analyse CAH (figure 42).

Les résultats de la CAH montrent trois groupes distincts :

- le premier (blanc) est composé uniquement des échantillons issus de biofilms jeunes (14 jours).
- Le deuxième (gris foncé) regroupe de nombreux échantillons sans distinction d'hydraulique ou de la qualité chimique de l'eau,

- Les échantillons issus de biofilms âgés (49 et 63 jours) se développant dans des zones rapides forment le dernier groupe (gris clair).

L'analyse de la composition algale par DGGE ne montre pas de forçage des communautés liées aux variations de la qualité de l'eau (pas de distinction entre les canaux pollué et témoin).

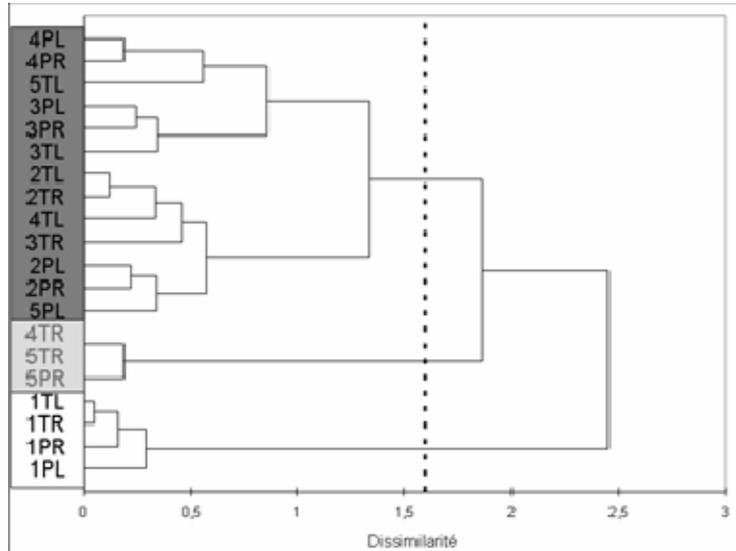


Figure 42 : CAH réalisée à partir de la matrice de dissimilarité (indice de Dice) déduite de l'analyse du gel DGGE issu de l'amplification du gène codant pour l'ARN 18S ; TR : témoin rapide, TL = témoin lent, PR : pollué rapide et PL : pollué lent aux 5 date d'échantillonnage (1 : 14 jours ; 2 : 28 jours ; 3 : 35 jours ; 4 : 46 jours et 5 : 63 jours).

Comme en automne, le facteur structurant le plus les communautés algales semble être le temps. L'évolution temporelle de la communauté semble masquer l'effet de la pollution observé sur le nombre d'OTUs.

4.2- Diversité algale : étude par microscopie

Au total, 41 espèces, appartenant à trois principaux groupes algaux, ont été identifiées: 27 diatomées, 13 chlorophycées et 1 cyanobactérie. L'évolution temporelle est reportée sur la figure 43. La différence majeure observée entre traitements est l'apparition des cyanobactéries principalement au sein des canaux témoin au 35^{ème} jour de croissance. Au sein des zones lentes du canal pollué, les cyanobactéries ne se développent pas.

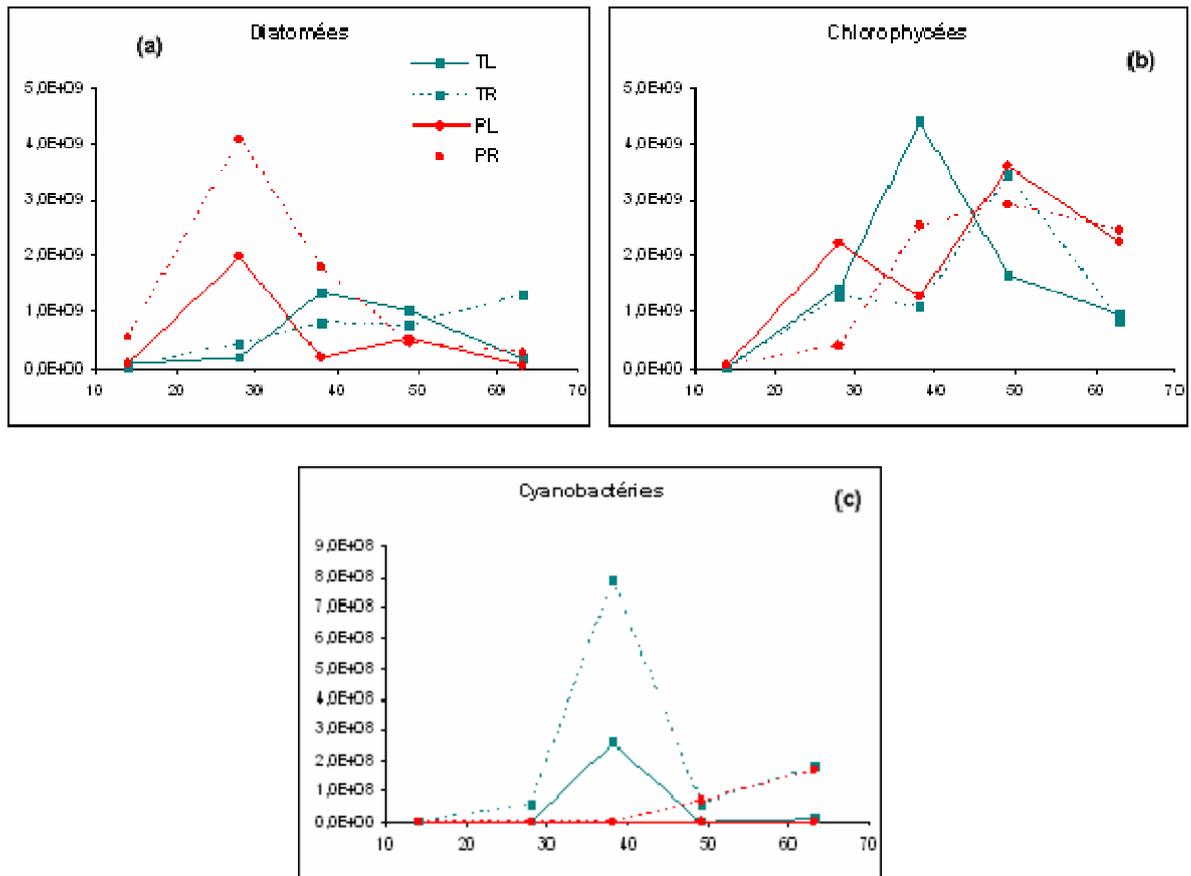


Figure 43 : Dynamique temporelle des trois grands groupes d'algues répertoriées au sein des canaux : (a) diatomées, (b) chlorophycées et (c) cyanobactéries ; TR : témoin rapide, TL = témoin lent, PR : pollué rapide et PL : pollué lent aux 5 dates d'échantillonnage.

L'analyse de la communauté algale au niveau de l'espèce révèle que certaines espèces sont caractéristiques des conditions environnementales des canaux. Dans les canaux pollués, on observe la présence au sein du périphyton d'une diatomée (*Nitzschia frustulum*) qui est une espèce connue pour être polluo-tolérante. Dans les canaux non pollués, on voit se développer une plus grande diversité de classe : Diatomées (notamment *Ulnaria ulna*) qui n'est présente qu'au sein des canaux témoins), Desmidiées (*Cosmarium botrytis*), Chlorophycée (*Chlorella sp1*) et enfin une espèce de cyanobactérie (*Pseudoanabaena mucicola*).

Certaines espèces sont également indicatrices de l'âge du biofilm : ainsi un biofilm âgé de 15 jours est composé de *Nitzschia palea* et *Stephanodiscus alpinus* (deux espèces de diatomées qui disparaissent ensuite) tandis qu'après 63 jours apparaît une autre espèce de diatomée : *Achnantidium minutissimum*.

La détermination de groupes caractérisés par la vitesse du courant, l'état chimique et l'âge du périphyton a permis d'analyser par MRPP l'importance de ces facteurs sur la structure de la communauté phytobenthique (figure 44). Il apparaît que l'âge du biofilm est

le facteur primordial suivi de la pollution. La vitesse du courant n'a, a priori, aucun effet sur la diversité phytobenthique observée par microscopie en été.

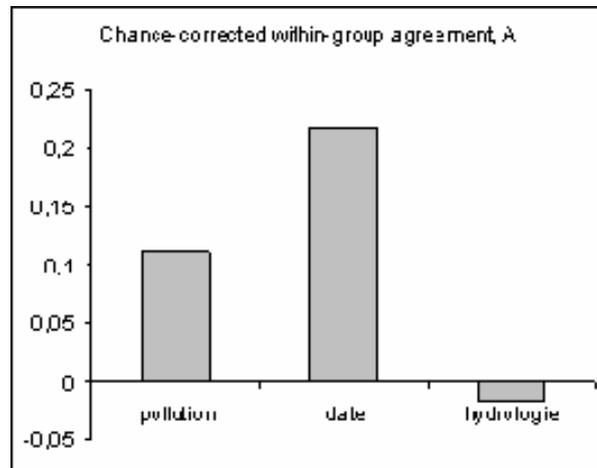


Figure 44 : Résultats de l'analyse MRPP (statistique A) sur les données de microscopie

La transformation des résultats de quantification microscopique en une matrice de dissimilarité (basée sur l'indice de Bray-Curtis) sert de base à l'analyse hiérarchique des correspondances (figure 45). Comme indiqués par les résultats de l'analyse MRPP, le facteur principal est le temps, avec notamment la forte évolution des communautés entre les 15 premiers jours de colonisation et la suite de son développement.

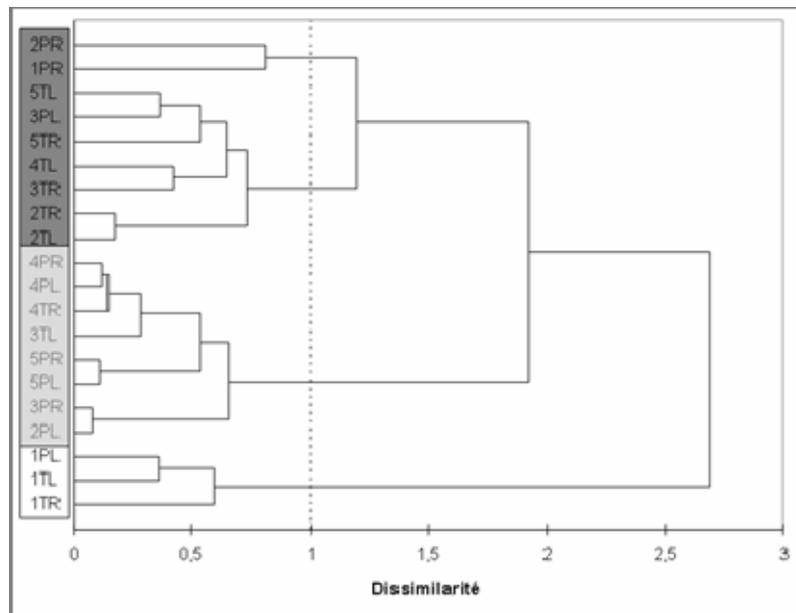


Figure 45 : CAH réalisée à partir de la matrice de dissimilarité (indice de Bray-curtis) déduite de l'analyse microscopique de la communauté algale totale ; TR : témoin rapide, TL = témoin lent, PR : pollué rapide et PL : pollué lent aux 5 date d'échantillonnage (1 : 14 jours ; 2 : 28 jours ; 3 : 35 jours ; 4 : 46 jours et 5 : 63 jours).

4.3- Diversité procaryotique : étude par DGGE:

Le nombre total d'OTUs détectées est de 41 et varie de 12 à 22 selon les échantillons (tableau 31). On observe une même stabilité de la dynamique pour toutes les conditions testées : légère diminution de la richesse au cours des 49 premiers jours puis une réaugmentation. La même dynamique était observée en automne.

jours	Témoïn		Pollué	
	Lent	Rapide	Lent	Rapide
14	22	21	21	17
28	21	21	18	16
35	16	20	19	19
49	12	14	16	13
63	13	17	19	16

Tableau 31 : Nombre de OTUs observées sur le gel DGGE correspondant à l'amplification du gène codant pour l'ARN 16S, aux 5 dates d'échantillonnage (en nombre de jours de croissance)

Comme pour les communautés algales, l'étude de la diversité procaryotique par DGGE analysée par CAH (figure 46) révèle la dynamique temporelle de ces communautés. En effet trois groupes sont observés :

- le premier (gris foncé) regroupe les échantillons analysés à partir de biofilms jeunes (âgés de 14 jours)
- le second (gris clair) regroupe les échantillons issus de biofilms âgés de 28 et 35 jours sans distinction entre ceux subissant un stress toxique ou non, et se développant dans des zones contrastées de courant
- et enfin le dernier (blanc) est composé des échantillons issus du périphyton plus âgé (49 et 63 jours).

Aucun effet significatif du type de zone échantillonnée ou du mélange polluant n'a pu être mis en évidence sur la communauté procaryotique, en été comme en automne.

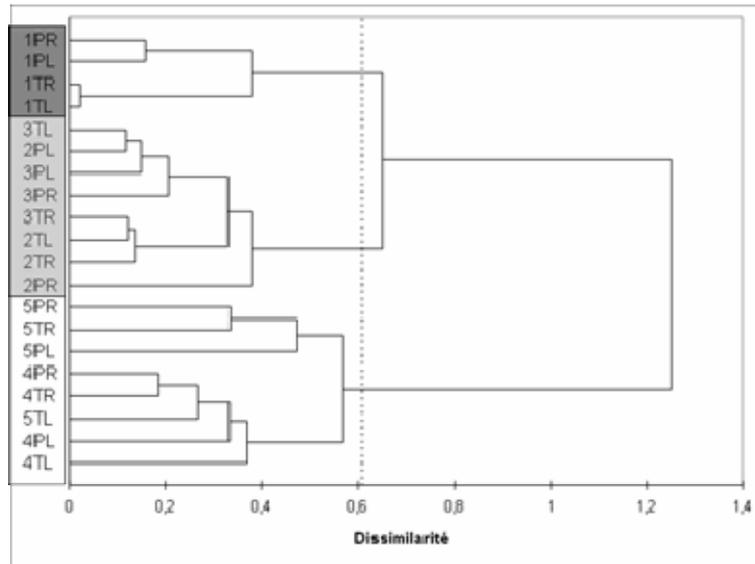


Figure 46 : CAH réalisée à partir de la matrice de dissimilarité (indice de Dice) déduite de l'analyse du gel DGGE issu de l'amplification du gène codant pour l'ARN 16S ; TR : témoin rapide, TL = témoin lent, PR : pollué rapide et PL : pollué lent aux 5 date d'échantillonnage (1 : 14 jours ; 2 : 28 jours ; 3 : 35 jours ; 4 : 46 jours et 5 : 63 jours).

5- Effet des phytosanitaires à l'échelle locale en été et comparaison saisonnière

Des variations locales (décimétriques) de la vitesse du courant ont-elles un effet sur le périphyton ?

Rappel : En automne, les variations locales de la vitesse du courant n'engendrent pas de différences de structure (biomasse et densité cellulaire), de diversité (algale et bactérienne) ou de fonctionnement au sein du périphyton. La seule différence observée en automne est une modification de la production bactérienne qui est supérieure au sein des zones lentes (chapitre 4A). Nous supposons alors que la diminution de la température et de l'intensité lumineuse avait une plus grande importance dans la structuration du périphyton que les variations locales de la vitesse du courant. Mais qu'en est-il alors en été où l'intensité lumineuse est deux fois supérieure à celle de l'automne et où la température augmente au cours de l'expérimentation ?

En été, ces mêmes modifications d'hydraulique (augmentation de la vitesse du courant de 0.2 à 1 m.s⁻¹) vont modifier la dynamique de croissance et de fonctionnement du périphyton : dans un environnement chimique « sain », l'augmentation localisée de la vitesse du courant provoque un retard d'installation des communautés. Le pic de biomasse est retardé au sein des zones rapides (maximum après 63 jours de croissance au lieu de 35 jours au sein des zones lentes). Cependant, le pic de biomasse est de même intensité entre

ces deux conditions hydrauliques. Biggs et Thomsen (1995) avaient observé une perte de biomasse (MSSC) allant de 32 à 86 % conjointement à une augmentation de la vitesse du courant ($<1 \text{ m.s}^{-1}$). Biggs et Stokseth (1996) ont également montré qu'il existait une relation inversement proportionnelle entre la biomasse et la vitesse du courant pour des gammes de vitesse allant de faible (0.3 m.s^{-1}) à forte ($> 0.7 \text{ m.s}^{-1}$). Cette relation a aussi été démontrée par Ghosh et Gaur (1998) pour des gammes de vitesse moins contrastées. Ils ont travaillé, sur un site naturel en l'absence de crue, avec quatre conditions de vitesse de courant : statique, lent ($0.1\text{-}0.14 \text{ m.s}^{-1}$), moyenne ($0.18 \text{ à } 0.21 \text{ m.s}^{-1}$) et rapide ($0.38 \text{ à } 0.43 \text{ m.s}^{-1}$). Ils ont ainsi observé une diminution du biovolume algal avec l'augmentation de la vitesse du courant. Pendant les 50 premiers jours de notre expérimentation nous observons également cette relation inversement proportionnelle entre la vitesse du courant et la biomasse. Cependant, en fin d'expérimentation la biomasse maximale observée dans les zones rapides est identique à la biomasse maximale des zones lentes. C'est pourquoi dans notre étude nous ne concluons pas à une relation inversement proportionnelle entre la biomasse et la vitesse du courant mais à un effet retardateur de la vitesse du courant sur l'installation et le développement du périphyton. Dans les zones lentes, l'installation de la communauté bactérienne est également plus précoce (28 jours de croissance) et la densité bactérienne est supérieure (x2). Cette relation inversement proportionnelle entre l'abondance bactérienne et la vitesse du courant a déjà été mise en évidence par Besemer *et al.*, en 2007. A contrario, au sein de nos systèmes nous n'observons pas d'effet de ces variations locales de la vitesse du courant sur la densité algale ou sur les productions (primaire et bactérienne). L'étude par microscopie et par finger-printing a également permis de détecter certaines différences de diversité entre des zones lentes et rapides. Le périphyton issu de zones lentes est plus riche (26 taxons contre seulement 19 dans les zones rapides) et contient plus de chlorophycées que celui issu de zones rapides. Le développement des chlorophycées serait donc limité par l'augmentation de la vitesse du courant. Ces changements de composition spécifiques ont déjà été observés par Besemer *et al.* (2007) et Biggs *et al.* (1998). Cependant, au sein de nos mésocosmes, la forte évolution temporelle observée rend difficile la mise en évidence de l'effet de la vitesse du courant. Comme en automne, il semble que le facteur prépondérant pour la dynamique du périphyton soit le facteur temps. Les variations de structure et de diversité observées entre du périphyton jeune (14 jours) et plus âgé (63 jours) sont en effet plus importantes que celles observées entre zones lentes et rapides. Ainsi, l'analyse de la diversité des microalgues n'a pas permis de mettre en évidence l'existence d'espèces caractéristiques de la vitesse du courant. En 2004, Soininen décrivait pourtant une relation entre la vitesse du courant (de 10 à 100 cm.s^{-1}) et la richesse algale. Comme au sein de nos mésocosmes, la richesse diminuait avec l'augmentation de la vitesse du courant (42 taxons de diatomées identifiées au sein de zones lentes et seulement

23 dans des zones rapides). A la suite de cette observation, il mettait clairement en évidence l'existence de certaines préférences hydrauliques chez les diatomées. Ainsi, pour de fortes vitesses de courant (100 cm.s^{-1}), on retrouvait *Fragilaria capucina* et *Meridion circulare* tandis que la présence d'*Achnantes helvetica* et d'*Achnantes oblongella*... était indicatrice d'une faible vitesse de courant.

Pour conclure, au sein de nos mésocosmes, les variations temporelles (à l'échelle de la semaine) sont plus marquantes que les variations spatiales (à l'échelle du centimètre). Cette observation concorde avec les travaux de Lear et al. (2008) sur les communautés bactériennes de biofilms issus d'une rivière en Nouvelle-Zélande : une étude de 10 semaines, avec des prélèvements hebdomadaires, révèle que la variation temporelle de la diversité bactérienne (à l'échelle de la semaine) est supérieure à la variation spatiale (à l'échelle du mètre).

Cependant, l'effet de l'augmentation locale de la vitesse du courant dans nos mésocosmes a pu être partiellement décrit (figure 49). Celle ci :

- **retarde l'installation du périphyton (notamment de la communauté bactérienne),**
- **est sans effet sur les productions bactérienne et primaire,**
- **a un effet sur la dynamique des grands groupes algaux (dans les zones lentes, le périphyton est plus riches en chlorophycées) et sur la richesse algale.**

Existe-t-il des variations saisonnières de structure, de diversité et de fonctionnement des biofilms ?

Les principales différences environnementales mesurées entre les deux saisons d'expérimentation sont une diminution forte de la température et de l'intensité lumineuse entre l'été et l'automne. En été, l'intensité lumineuse moyenne durant l'expérimentation est de $566 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ pour une température moyenne de 22.4°C . En automne la température moyenne s'abaisse à 12.1°C et l'intensité lumineuse est de $226.4 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$. Ces variations sont suffisantes pour modifier la nature du périphyton et sa dynamique de croissance. En effet, en été, la biomasse périphytique est environ 6 fois supérieure (Test de Mann-Whitney, $p = 0.006$) à celle de l'automne, mais le pic de biomasse est plus précoce en automne (30 jours de croissance) par rapport à l'été (entre 35 et 63 jours de croissance). Moschini-Carlos *et al.*, en 2000, observaient également une moindre biomasse périphytique durant une période de diminution de la température (de août à décembre). Les densités algales et bactériennes ne sont pas significativement différentes entre ces deux saisons et

pourtant, des différences nettes de productions sont observées. En été, la production bactérienne est environ 2 fois supérieure (Test de Mann-Whitney, $p = 0.032$) à celle mesurée en automne. Les bactéries présentes en été, bien qu'aussi nombreuses qu'en automne, sont plus productives. A l'inverse, on enregistre une plus faible production primaire en été (Test de Mann-Whitney, $p = 0.006$). La faible production primaire du périphyton en période estivale a déjà été décrite par Moschini-Carlos *et al.* (2000). Ils observaient en effet, après 42 jours de croissance une nette supériorité de production au sein de périphyton pendant une période de baisse de température (août à décembre). Les algues présentes en été sont donc moins productives que celles installées au sein du périphyton en automne. Les différences saisonnières des variables abiotiques influencent donc l'état physiologique ou la composition spécifique de la communauté algale. Au sein de nos mésocosmes, en automne, la richesse algale du périphyton est supérieure à celle mesurée en été. On dénombre ainsi 58 espèces de microalgues en automne et seulement 41 en été. Parmi ces espèces certaines ne sont présentes qu'en automne (*Planothidium rostratum*, *Diatoma vulgare*, *Fragilaria crotonensis*, *Navicula cryptotenelloides*, *Nitzschia fonticola*, *Navicula gregaria*, *Navicula reichardtiana*, *Puncticulata radiosa*, *Lyngbia sp.* et *Scenedesmus ecornis*) et d'autres ne sont capables de se développer qu'en période estivale (*Nitzschia frustulum*, *Stephanodiscus alpinus*, *Ulnaria ulna* et *Pseudoanabaena mucicola*). Certaines de ces espèces expriment des préférences saisonnières et sont connues pour constituer des assemblages spécifiques de chaque saison. Ainsi, *Fragilaria crotonensis* est une espèce préférant les eaux chaudes. Nous la retrouvons pourtant au sein des mésocosmes dans l'expérimentation d'automne. Nous le rappelons cette expérimentation s'est déroulée de septembre à novembre. Les premières phases de la colonisation ont donc eu lieu en fin d'été ce qui explique que l'on retrouve certaines espèces « estivales » telles que *Fragilaria crotonensis* mais aussi *Scenedesmus ecornis*. Une autre espèce caractéristique du périphyton automnal de nos canaux est *Puncticulata radiosa* qui est une espèce plutôt hivernale. La composition du périphyton au sein de mésocosme est donc « intimement » liée à la dynamique du phytoplancton du lac Léman (CIPEL, 2006). En été, les espèces caractéristiques ne sont pas non plus uniquement des espèces préférant des eaux chaudes et très éclairées. En effet, on retrouve *Stephanodiscus alpinus* qui est une espèce plutôt hivernale. Malgré ces spécificités de composition algale entre ces deux saisons, on remarque que l'évolution temporelle globale des trois grands groupes algaux présents est identique entre l'été et l'automne (figure 47).

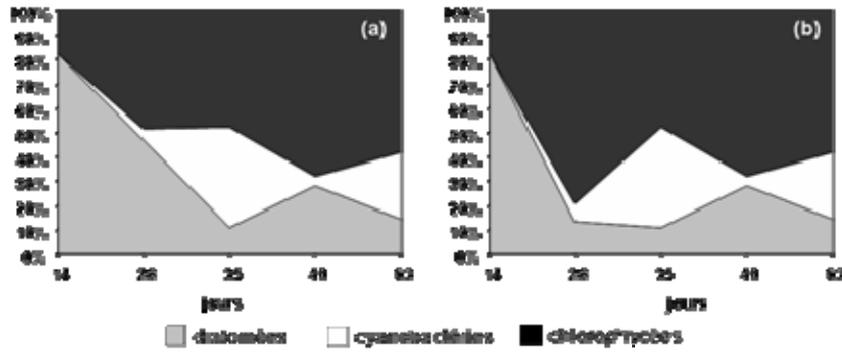


Figure 47 : Evolution des grands groupes algaux identifiés au cours de l'expérimentation. (a) en automne, (b) en été.

Les premières algues à s'installer sont les diatomées. En automne, elles sont présentes à plus de 50% pendant environ 35 jours de croissance tandis qu'en été, les chlorophycées deviennent dominantes plus rapidement (aux alentours du 28^{ième} jour). Les cyanobactéries ne semblent pas affectées par le changement de saison. Les travaux de Sekar *et al.* (2004) ne montraient pas non plus de différence d'évolution des groupes algaux au cours de l'année. Cependant, dans leur système expérimental, la succession des algues était différente : (1) les chlorophycées, (2) les diatomées et en enfin (3) les cyanobactéries.

	Été		Automne
Biomasse (mg.cm ⁻²)	41.1	>	10.87
Densité bact. (cells.cm ⁻²)	2 10 ⁹	=	4.2 10 ⁹
Densité alg. (cells.cm ⁻²)	12.6 10 ⁹	=	13 10 ⁹
Prod. prim. (µg C.h ⁻¹ .cm ⁻²)	4.31	<	15.2
Prod. bact. (mmoles H.h ⁻¹ .cm ⁻²)	78.4	>	42.4
Nb esp Alg	41	<	58
Rich. bact.	21	>	17

Figure 48 : Résumé des principales caractéristiques (valeurs maximales) périphytiques en été et en automne

Entre l'été et l'automne (figure 48) on observe les mêmes tendances d'organisation : un biofilm mature est globalement composé de 25% de diatomées, 20% de cyanobactéries et de 55% de chlorophycées. Cependant, il existe de forte disparité entre descripteurs et le niveau d'observation (par exemple de la diversité algale) permet ou non d'observer des différences saisonnières, Ainsi, pour le périphyton, la différenciation saisonnière est basée sur la présence ou l'absence de quelques espèces et également sur des changements d'intensité des descripteurs fonctionnels (production primaire et bactérienne). Les descripteurs généraux de structure (densité cellulaire) ne permettent pas d'observer l'effet saisonnier.

Les différences créées par des variations locales de la vitesse du courant et par la saison d'échantillonnage entraînent-elles une réponse différente à la présence de molécules polluantes ?

Rappel : En automne, la présence d'un mélange diuron + azoxystrobine a peu d'effet sur le périphyton. Seuls, certains changements de composition spécifique algale ont pu être mis en évidence. Le périphyton des canaux « propres » contient des espèces caractéristiques qui ne se développent pas en cas de pollution (*Amphora pediculus*, *Mougeotia sp.*, *Monoraphidium minutissimum*). A l'inverse, la présence de *Diatoma vulgare*, *Encyonema minutum* et de *Scenedesmus spinosus* indique la présence de diuron et d'azoxystrobine dans l'eau. Mais, l'introduction de polluant n'a aucun effet sur la biomasse, les densités cellulaires ou les productions du périphyton, que ce soit dans des zones lentes ou rapides. En automne, les CE50 mesurées en présence du mélange polluant variaient beaucoup au cours du temps (0.1 à 73.7 $\mu\text{g.L}^{-1}$) et les valeurs maximales observées dans ce travail sont supérieures à celles mesurées par Arrhenius *et al.* en 2004 sur le périphyton en présence de diuron (4.4 à 18.2 $\mu\text{g.L}^{-1}$ en septembre).

En été, les variations saisonnières (température, intensité lumineuse) et les modifications locales de la vitesse du courant ont engendré la formation de périphytons très différents de ceux échantillonnés en automne. On observe, comme en automne, une grande variabilité temporelle des CE50 mesurées (21 à 51 $\mu\text{g.L}^{-1}$) qui restent également très largement supérieures à celles observées par Arrhenius *et al.* (8.4 à 11.4 $\mu\text{g.L}^{-1}$). Cependant, comme pour ces auteurs, on constate que les valeurs minimales de CE50 sont supérieures en été par rapport à l'automne. Ceci laisse supposer que l'introduction de diuron et d'azoxystrobine aura plus d'effet sur le périphyton en automne. Cependant l'application de ce stress polluant (diuron et azoxystrobine) sur le périphyton estival provoque un changement de structure et de diversité qui n'est pas observé en automne. Comme supposé

précédemment, en automne, l'effet de la température et de l'intensité lumineuse serait prépondérant sur celui lié à la présence de pesticide à des concentrations environnementales : l'action conjointe température –lumière est antagoniste à l'effet du stress toxique. Outre ces variations saisonnières dans la réponse du périphyton, en été, l'effet des pesticides diffère également selon l'origine du périphyton (zones lentes ou rapides). Le périphyton issu de zones lentes, qui a une installation plus précoce, est aussi le plus sensible à la présence de polluant. La biomasse, la richesse algale, et la production bactérienne diminuent au sein des zones lentes en cas de pression de pollution. Le travail de Guasch *et al.* en 1997 montrait l'existence d'une relation inversement proportionnel entre l'âge du périphyton et la CE50 mesurée pour l'atrazine et également entre la densité algale et la CE50. Il semblerait donc qu'un biofilm plus mature soit plus sensible à la présence d'herbicide. Au sein de nos mésocosmes, le périphyton issu des zones lentes est plus rapidement mature que le périphyton issus des zones rapides. Cela peut en partie expliquer les différences de tolérance à la présence de diuron et d'azoxystrobine. Un autre point important est que le périphyton des zones lentes est plus riche en chlorophycées que le périphyton des zones rapides, qui est pour sa part plus riche en diatomées. Or les diatomées sont des espèces généralement plus résistantes à la présence de polluant que les chlorophycées (El Jay, 1998). Au sein des zones lentes, ce sont donc la structure, la diversité et le fonctionnement du périphyton qui sont modifiés tandis qu'au sein des zones rapides, seul le compartiment algal est impacté : la richesse diminue et la composition change. A priori, dans les zones lentes, l'effet du diuron sur les organismes autotrophes (diminution de la richesse, changement de composition taxonomique et diminution de la production) engendre un effet indirect sur la communauté bactérienne qui est beaucoup moins productive (diminution de la production et maintien de la densité). Le diuron, en impactant le développement des organismes photosynthétiques, peut limiter la production de matière organique autochtone d'origine algale et de fait limiter l'activité des bactéries (Baines et Pace, 1991 ; Raymond et Bauer, 2001).

De plus, comme en automne, l'analyse de la communauté algale au niveau spécifique révèle la présence de certaines espèces uniquement au sein du canal pollué (*Nitzschia frustulum*) tandis que d'autres ne sont présentes qu'au sein du canal témoin (*Ulnaria ulna*, *Cosmarium botrytis*...). *Nitzschia frustulum* est une diatomée connue pour être pollutotolérante (en terme de trophie).

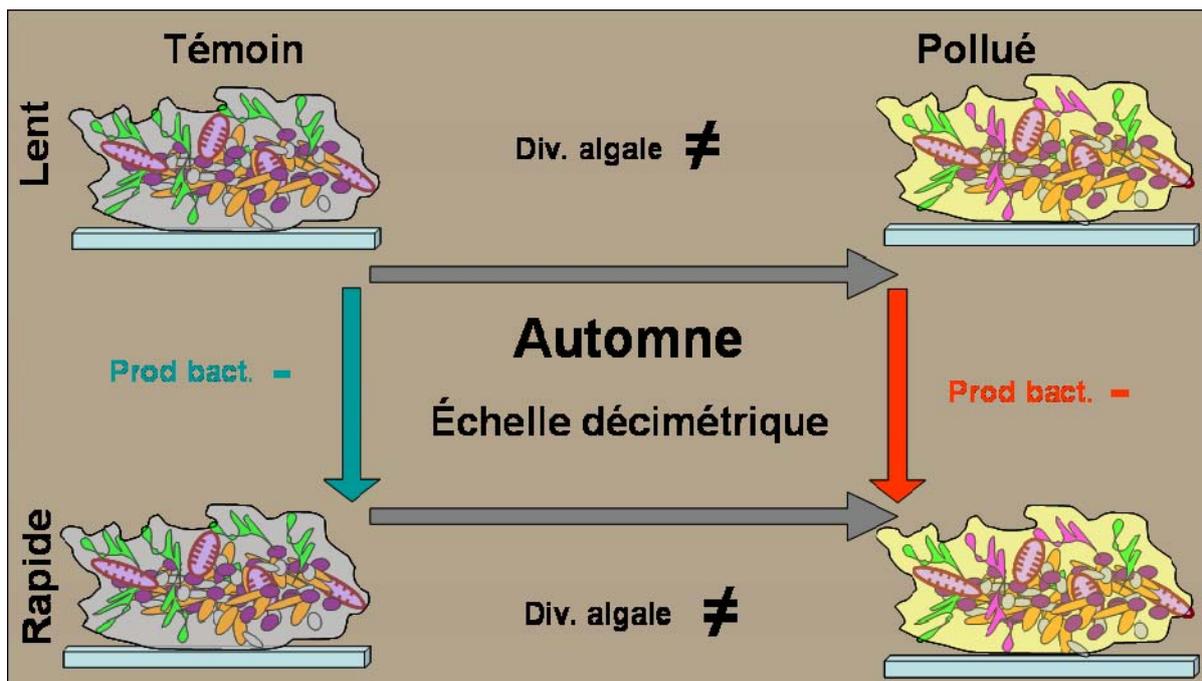
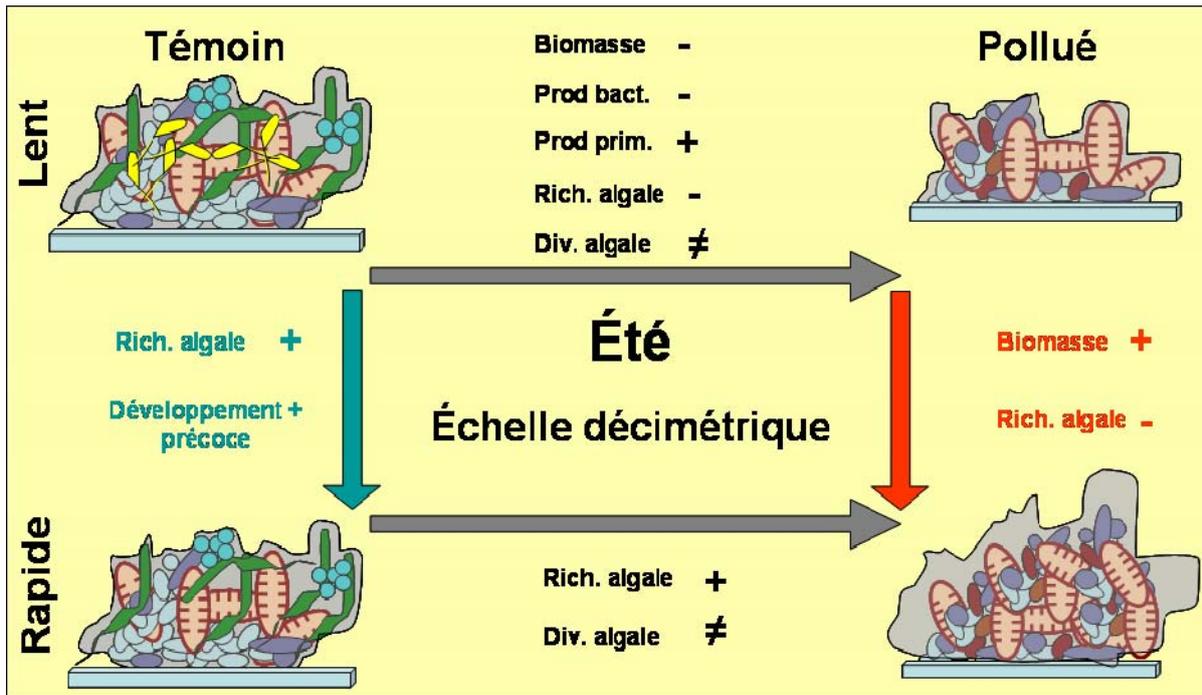


Figure 49 : Schéma bilan représentant les changements de structure et de diversité du périphyton en lien avec la présence de polluant et les conditions hydrologiques locales en été et en automne. (+ : augmentation, - : diminution ; ≠ : changement). Les flèches donnent le sens de lecture. Une flèche verte symbolise une situation propre tandis qu'une flèche rouge représente une situation polluée.

En résumé (figure 49), en été, les variations locales de la vitesse du courant entraînent une réponse différente du périphyton à la présence de polluant. Les zones lentes (0.2 m.s^{-1}) sont plus impactées que les zones de plus forte vitesse (1 m.s^{-1})

A une échelle locale, l'étude de l'impact de polluant sur le périphyton nécessite de prendre en compte les variations de la vitesse du courant mais également la saison d'échantillonnage. Ces résultats permettent de proposer une hiérarchie de l'influence des différents facteurs sur le périphyton :

1- en premier, la saison d'échantillonnage (notamment l'effet des variations de température et d'intensité lumineuse)

2- puis la variabilité spatiale de la vitesse du courant (à l'échelle décimétrique)

3- enfin la qualité chimique : la présence de ces deux pesticides à des concentrations environnementales

A cette hiérarchisation, il faut ajouter la forte variabilité temporelle observée sur les descripteurs étudiés (à l'échelle de la semaine).

Cependant, ces différences locales (significatives ou non à l'échelle décimétrique) peuvent-elles être perçues à une échelle plus globale ? Est-ce qu'une rivière hétérogène en terme d'hydraulique développera un biofilm similaire à celui d'une autre rivière plus homogène, en présence de polluants ?

C- Etude à l'échelle globale : comparaison de rivières homogènes ou hétérogènes en terme d'hydraulique

Cette expérimentation correspond à celle dite d'automne (11/09/06 au 13/11/06). Quatre canaux artificiels ont été utilisés afin d'estimer l'effet d'un changement du type d'écoulement (laminaire ou mixte) sur le périphyton. Conjointement, et comme dans les chapitres précédents, nous avons évalué l'impact de l'introduction d'un mélange diuron+azoxystrobine sur la diversité et la structure du périphyton. Au final, les données de cette partie sont issues de quatre canaux :

- TL = témoin laminaire (ou canal témoin homogène en terme d'hydraulique)
- TM = témoin mixte (ou canal témoin hétérogène)
- PL= pollué laminaire (ou canal pollué homogène)
- PM = pollué mixte (ou canal pollué hétérogène)

Les détails de cette expérimentation sont reportés au chapitre 2 et sur la feuille intercalaire.

1- Caractéristiques physico-chimiques des canaux artificiels

1.1- Physico chimie des éléments majeurs

Trois formes de l'azote (NH_4^+ , NO_2^- et NO_3^-), les orthophosphates, le COD, la silice ont été dosés, dans l'eau des 4 canaux témoins (TM et TL) et pollués (PM et PL) et dans l'eau d'alimentation (E), tout au long de l'expérimentation. Un suivi du pH, de la conductivité et de la température a également été réalisé (figure 50). On observe une diminution de la température commune aux quatre canaux (de 24°C à 7 °C) entre le 14/09/2006 et le 27/11/2006. Le pH augmente entre le début et la fin de l'expérimentation (7,31-8,58) et la conductivité est relativement constante.

Les teneurs en éléments minéraux et COD suivent la même évolution au sein des quatre canaux durant l'expérimentation. Les teneurs en NH_4^+ (teneur moyenne 0,006 mg.L⁻¹) et PO_4^{3-} (0,002 mg.L⁻¹) sont stables durant l'expérimentation. La teneur en NO_3^- dans l'eau des canaux (0,44 mg.L⁻¹) est inférieure à celle de l'eau d'alimentation (0,6 mg.L⁻¹) et on observe une forte diminution de cette teneur (0,2 mg. L⁻¹) le 16 octobre 2006. Cette date correspond au troisième prélèvement (37 jours de croissance), c'est-à-dire après l'introduction du polluant, période durant laquelle les canaux fonctionnent en circuit fermé. A cette même date on observe également au sein des canaux une forte augmentation du COD (2,47 mg. L⁻¹). La teneur en silice dans les canaux (0,57 mg. L⁻¹) est très inférieure à celle de l'eau d'alimentation (1,9 mg. L⁻¹). Elle diminue dans les canaux jusqu'au 16 octobre 2006,

jusqu'à s'épuisée complètement. Puis en fin d'expérimentation, la teneur en silice remonte dans l'eau des canaux.

La qualité chimique de l'eau des canaux diffère donc de celle de l'eau d'alimentation (du fait du développement du périphyton) mais est identique au sein des quatre canaux. En accord avec les limites supérieures du SEQeau (COD : 5 mg.L⁻¹, NH₄⁺ : 0,5 mg.L⁻¹, NO₃⁻ : 2 mg.L⁻¹, PO₄³⁻ : 0,1 mg.L⁻¹) ces données sont caractéristiques d'une eau de très bonne qualité (classe bleue). Le passage en circuit fermé (37^{ième} jour) pendant le début de la phase de pollution provoque un forte modification des caractéristiques chimiques de l'eau.

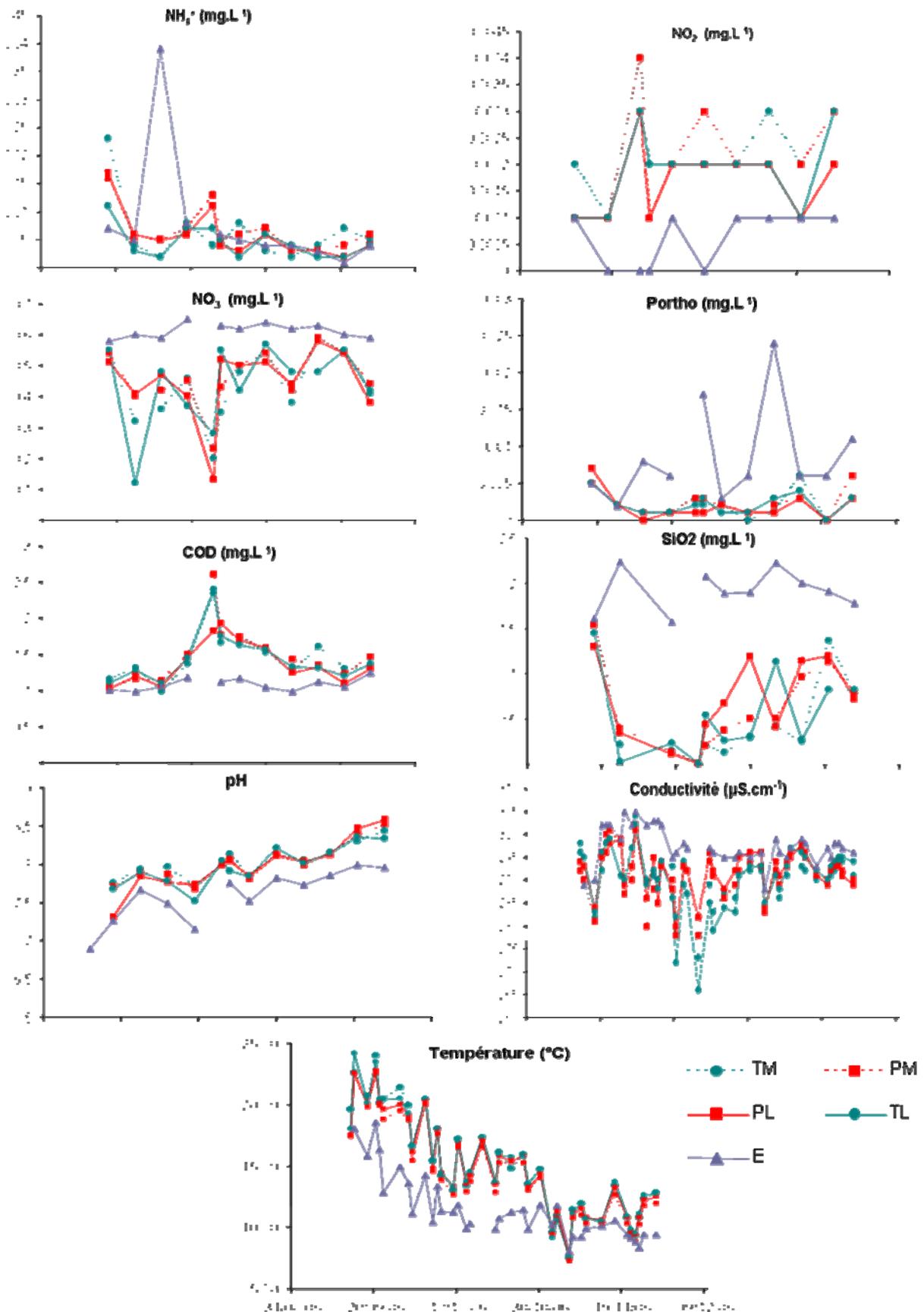


Figure 50 : Evolution de la teneur en NH₄, NO₂, NO₃, PO₄³⁻, SiO₂, de la conductivité, du pH et de la température au cours de l'expérimentation en automne au sein des quatre canaux : Témoin Mixte (TM), Pollué Mixte (PM), Témoin Laminaire (TL) et Pollué Laminaire (PL)

1.2- Dosage des phytosanitaires

Les teneurs en diuron et azoxystrobine ont été dosées dans l'eau des canaux (du 37^{ième} au 96^{ième} jour). Les résultats sont reportés dans le tableau 32. Dans les canaux témoins les teneurs en diuron et azoxystrobine sont inférieures au seuil de quantification. Dans les deux canaux pollués, les teneurs en phytosanitaires sont comparables et supérieures à la teneur théorique apportée ($1,5 \mu\text{g.L}^{-1}$ de pollution totale) mais le rapport 2:1 en diuron et azoxystrobine est maintenu. Après arrêt de la pollution (67^{ième} jour) la teneur en phytosanitaires diminue rapidement.

		Eaux	
Canal	jours	Diuron ($\mu\text{g.L}^{-1}$)	Azoxystrobine ($\mu\text{g.L}^{-1}$)
TM	37	<LQ	<LQ
	52	<LQ	<LQ
	67	<LQ	<LQ
	83	<LQ	<LQ
	96	<LQ	<LQ
PM	37	4,91	2,13
	52	2,63	1,09
	67	0,93	0,35
	83	0,12	<LQ
	96	<LQ	<LQ
PL	37	3,73	1,81
	52	3,12	1,17
	67	1,16	0,40
	83	0,19	0,49
	96	<LQ	<LQ
TL	37	<LQ	<LQ
	52	<LQ	<LQ
	67	<LQ	<LQ
	83	<LQ	<LQ
	96	<LQ	<LQ
LQ ($\mu\text{g.L}^{-1}$) :		0,01	0,05

Tableau 32 : Teneurs en diuron et azoxystrobine ($\mu\text{g.L}^{-1}$) dans l'eau des canaux témoins (TM : témoin mixte, et TL : témoin laminaire), pollués (PM : pollué mixte, et PL : pollué laminaire) ; LQ = limite de quantification

Les teneurs en diuron et ses principaux produits de dégradation (DCA et DCMU) et en azoxystrobine ont également été dosées au sein du biofilm au 67^{ième} jour de l'expérimentation (tableau 33). Dans les canaux témoins (TM et TL) les teneurs en diuron et produits de dégradation sont inférieures à la limite de quantification et l'azoxystrobine n'est pas détectée. Au sein du biofilm des canaux pollués (PM et PL), seul le diuron est présent en quantité suffisante pour être quantifié. Sa teneur est plus importante au sein des zones rapides ($0,156 \mu\text{g.kg}^{-1} \text{ sec}$) que des zones lentes ($0,095 \mu\text{g.kg}^{-1} \text{ sec}$) dans les canaux ayant un régime mixte. La teneur en diuron au sein du périphyton du canal laminaire est équivalente à celle des zones lentes du canal mixte.

Biofilm (T = 67 jours) Concentration en $\mu\text{g.kg}^{-1}$ sec					
Canal hydrologie		DIU	DCA	DCMU	AZS
TM	Lent	<LQ	<LQ	<LQ	nd
	Rapide	<LQ	<LQ	<LQ	nd
PM	Lent	0,095	<LQ	<LQ	<LQ
	Rapide	0,156	<LQ	<LQ	<LQ
PL		0,108	<LQ	<LQ	<LQ
TL		<LQ	<LQ	<LQ	nd
LQ ($\mu\text{g.kg}^{-1}$)		0,04	0,1	0,06	0,09

Tableau 33 : Teneur en Azoxystrobine (AZS), Diuron (DIU) et ses produits de dégradation (DCA, DCMU) au sein du périphyton après 67 jours de croissance.

2- Structure générale du périphyton au sein des canaux artificiels

Les différents paramètres de structure et de fonctionnement du biofilm ont été mesurés à différentes dates dans chacun des 4 canaux. Les résultats sont reportés dans le tableau 34 et ont été testés par une ANOVA à trois facteurs (date, vitesse et pollution) et en cas de significativité, l'analyse a été complétée par un test de comparaison multiple des moyennes de Tukey-HSD (tableau 35).

De façon générale, tous les descripteurs étudiés sont dépendants de l'âge du biofilm.

La biomasse varie de 1.1 à 10.6 mg.cm^{-2} au sein des canaux témoin. Il n'y a pas de différence significative (tableau 34 et 35) de biomasse entre le canal mixte et laminaire.

Au sein des canaux pollués, la biomasse varie de 1.7 à 11.5 mg.cm^{-2} . Comme pour le canal témoin, la modification du régime d'écoulement n'a aucun effet sur la biomasse. Cependant, la présence de polluant modifie significativement (tableau 35) la dynamique temporelle de la biomasse périphytique : au sein des canaux pollués le pic de biomasse est atteint plus tardivement. Néanmoins, à l'échelle locale (entre zones lentes et rapides) et à cette même saison (automne), aucune différence significative de biomasse n'avait été observée.

La densité bactérienne varie de 0.2 à 1.5 $10^9 \text{ cell.cm}^{-2}$ au sein du canal témoin mixte. En régime laminaire, la densité bactérienne est supérieure. Elle varie de 0.4 à 2.9 $10^9 \text{ cell.cm}^{-2}$. La densité bactérienne est donc significativement (tableau 35) influencée par le mode d'écoulement des canaux.

Au sein des canaux pollués, on observe la même différence de densité bactérienne entre les deux régimes d'écoulement. La communauté bactérienne est 2 fois plus dense au sein du canal laminaire. Aucun effet du polluant n'est observé sur la densité bactérienne.

La densité algale varie 0.34 à 14.20 $10^9 \text{ cell.cm}^{-2}$ au sein des canaux témoins. Aucune différence n'est observée entre les deux modes d'écoulement.

Au sein des canaux pollués, la densité algale varie de 1.53 à 55.3 $10^9 \text{ cell.cm}^{-2}$. La densité algale est en constante augmentation au cours de l'expérimentation et ce, quel que

soit le régime d'écoulement. La communauté algale des canaux pollués est significativement (tableau 35) plus dense que celle des canaux témoins.

La production primaire, au sein des canaux témoins varie de 1.7 à 15.1 $\mu\text{g C h}^{-1}.\text{cm}^{-2}$. Il n'y a pas de différence de production primaire entre les communautés algales issues d'un canal à régime laminaire ou à régime mixte.

Au sein des canaux pollués, l'augmentation de la densité algale est accompagnée d'une diminution de la production primaire par rapport au témoin notamment après 52 jours de croissance. La production primaire dans les canaux pollués est comprise entre 4.7 $\mu\text{g C h}^{-1}.\text{cm}^{-2}$ et 9.6 $\mu\text{g C h}^{-1}.\text{cm}^{-2}$ tandis qu'elle est d'environ 15 $\mu\text{g C h}^{-1}.\text{cm}^{-2}$ dans les canaux témoins.

La production bactérienne est, comme la densité bactérienne, supérieure au sein des canaux laminaires quelles que soient les conditions de pollution. Dans le canal témoin laminaire, la production bactérienne peut être 5 fois supérieure à celle de la communauté issue d'un régime turbulent. Aucun impact du mélange diuron+azoxystrobine n'a été mis en évidence sur la production bactérienne.

L'observation des paramètres généraux de structure du périphyton issus de canaux à régime hydraulique turbulent ou uniquement laminaire, pollués ou non a permis de mettre en évidence :

- une modification de la structure du périphyton après l'introduction des pesticides : la croissance du périphyton semble être ralentie au sein des canaux pollués quel que soit le régime hydraulique
- En terme de structure, l'effet du polluant est modulé par le type de régime hydraulique : les biofilms sont plus denses au sein des canaux laminaires.
- ces modifications sont accompagnées d'une diminution de la production primaire plus marquée au sein des canaux laminaires
- le régime hydraulique, quant à lui, a un impact sur la densité cellulaire bactérienne qui est inférieure au sein des canaux à régime mixte.

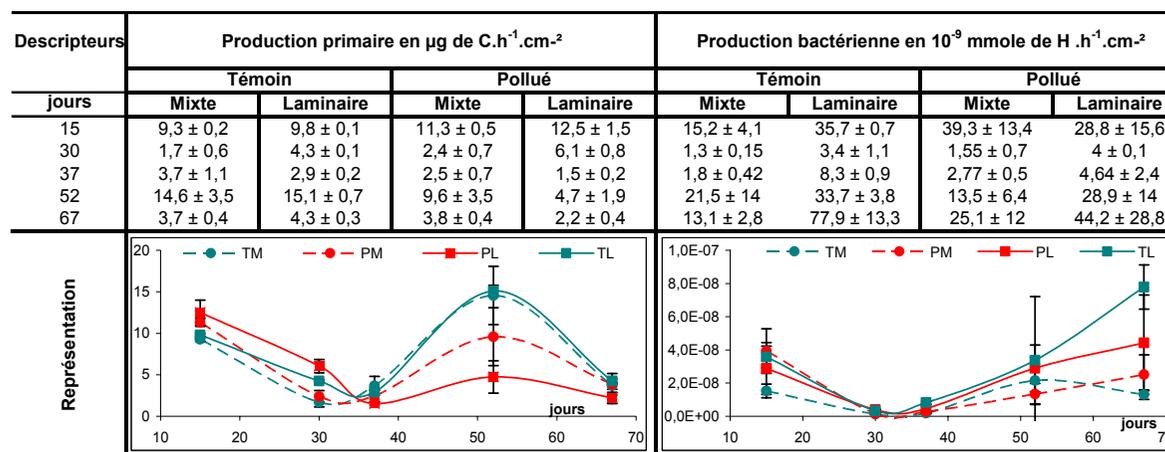
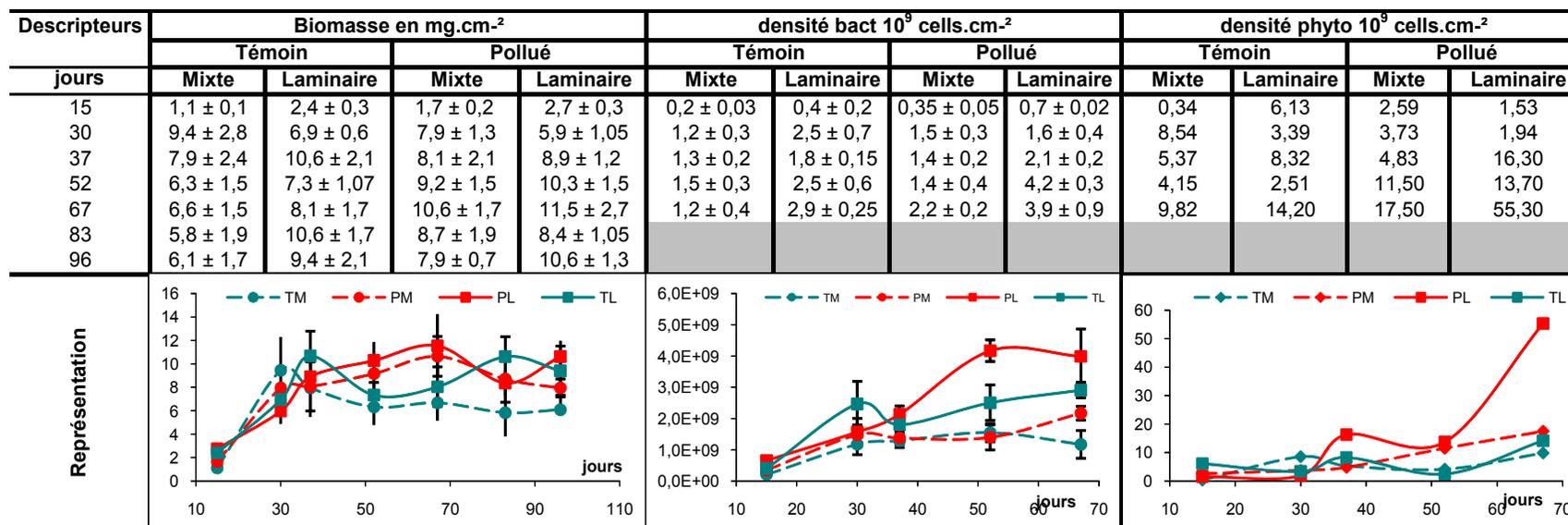


Tableau 34 : Paramètres généraux de structure et descripteurs de production au sein des biofilms en automne, pour les 4 canaux : Témoïn Mixte (TM), Pollué Mixte (PM), Témoïn Laminaire (TL) et Pollué Laminaire (PL)

ANOVA à 3 facteurs : P ($\alpha = 5\%$)					
	Biomasse	densité bactérienne	densité algale	production primaire	log (production bactérienne)
	< 0,0001	0,0002	0,014	0,0001	< 0,0001
Tukey-HSD : P ($\alpha = 5\%$)					
Hydrologie	0,363	0,001	0,168	0,524	0,0003
pollution	0,031	0,053	0,023	0,054	0,589
date-1	< 0,0001	0,001	0,442	< 0,0001	0,0002
date-2	0,168	0,615	0,726	0,058	< 0,0001
date-3	0,060	0,393	0,401	0,035	< 0,0001
date-4	0,296	0,053	0,309	0,136	0,001
date-5	0,023	0,016	0,008	0,288	< 0,0001

Tableau 35 : Résultats de l'ANOVA à trois facteurs (pollution, vitesse et date) et des tests de Tukey-HSD réalisés sur les descripteurs de structure générale. En grisé les valeurs statistiquement significatives.

3- Evaluation de la résistance des communautés au mélange polluant

Le périphyton des canaux laminaires semble être plus tolérant à la présence du mélange polluant que celui des canaux mixtes (tableau 36). Cette différence s'explique en partie par les différences de structure (notamment de densité) observées entre ces deux régimes hydrauliques. On ne voit cependant aucune acquisition de tolérance après exposition au mélange polluant.

date	Témoin		pollué	
	Mixte	Laminaire	Mixte	Laminaire
37	3,3	55,4	12,2	30,3
52	45,8	69,1	32,1	53,3
67	1,9	35,8	19,9	34,5

Tableau 36 : Valeurs de CE50 en $\mu\text{g.L}^{-1}$ estimées à partir de la méthode PICT et à l'aide de la macro REGTOX

4- Etude de la diversité périphytique

4.1- Diversité phytobenthique : étude par DGGE

Le nombre total d'OTUs détectées pour l'analyse du gel DGGE des canaux témoins et pollués est de 46.

Dans les canaux témoins, le nombre d'OTUs est compris entre 12 et 21 (tableau 37). Le nombre d'OTUs est relativement constant dans le temps à l'exception du 37^{ième} jour où l'on observe une diminution du nombre d'OTUs.

Dans les canaux pollués, on observe également cette diminution du nombre d'OTUs au 37^{ième} jour de croissance. La recolonisation dans les canaux pollués après le 37^{ième} jour est plus lente qu'au sein des canaux témoins (au 52^{ième} jour 14 OTUs sont détectées dans les canaux pollués et 20 dans les canaux témoin). Cependant, après 67

jours de colonisation, le nombre d'OTUs est identique à celui des canaux témoins. On n'observe pas de différence de richesse entre les deux régimes d'écoulement.

jours	Témoïn		Pollué	
	Mixte	Laminaire	Mixte	Laminaire
15	18	18	9	12
30	19	21	16	23
37	12	13	7	11
52	20	18	14	14
67	17	19	18	17

Tableau 37 : Nombre d'OTUs observées sur le gel DGGE correspondant à l'amplification du gène codant pour l'ARN 18S, aux 5 dates d'échantillonnage

La transposition des résultats de DGGE en une matrice présence-absence permet l'analyse statistique de la composition des communautés algales. Cette matrice est transformée en une matrice de dissimilarité (indice de Dice) qui sert de base à l'analyse CAH (figure 51a).

Les résultats de la CAH montrent quatre groupes distincts parmi lesquels :

- le premier (gris clair) est composé uniquement des échantillons de biofilms jeunes (15 et 30 jours).
- Le deuxième (gris foncé) regroupe principalement des échantillons issus de périphyton plus âgés (de 37 à 67 jours de croissance). Ces échantillons sont issus des canaux laminaires mais également du canal pollué à régime mixte.
- Les échantillons issus du canal témoin mixte forment également un groupe (blanc)

L'analyse de la composition algale par DGGE ne montre donc pas de forçage des communautés liées aux variations de la qualité de l'eau (pas de distinction entre les canaux pollués et témoins). Comme précédemment, la composition algale de périphyton « jeune » diffère beaucoup des autres échantillons. Si on analyse séparément les échantillons de la période de pollution (figure 51b), on remarque un regroupement des échantillons issus des canaux laminaires (gris foncé) en opposition à ceux issus des canaux à régime mixte. Au sein de ces canaux à régime mixte, la composition algale du périphyton du canal témoin (5TM, 4TM) se distingue clairement de celle des autres en fin de croissance (groupe gris clair).

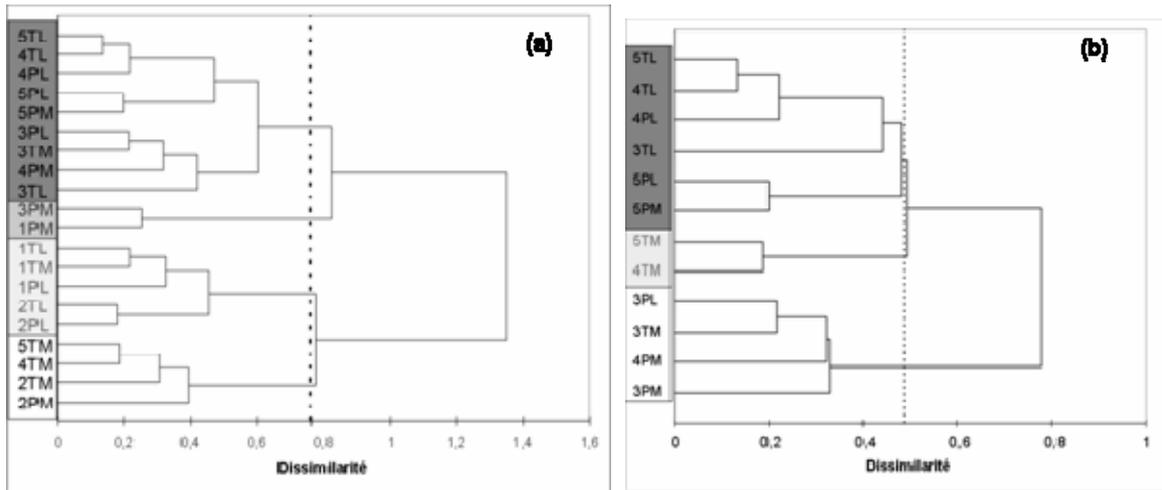


Figure 51 : CAH réalisée à partir de la matrice de dissimilarité (indice de Dice) déduite de l'analyse du gel DGGE issu de l'amplification du gène codant pour l'ARN 18S. (a) pour toutes les dates de prélèvements, (b) pour les trois dernières dates de prélèvements, Témoin Mixte (TM), Pollué Mixte (PM), Témoin Laminaire (TL) et Pollué Laminaire (PL) ; (1 : 15 jours ; 2 : 30 jours ; 3 : 35 jours ; 4 : 52 jours et 5 : 67 jours)

4.2- Diversité phytobenthique : étude par microscopie

Au total, 70 espèces, appartenant à trois groupes algaux, ont été identifiées: 46 diatomées, 23 chlorophycées et 1 cyanobactérie. L'évolution temporelle de ces groupes est reportée sur la figure 52. La seule différence observée concerne la quantité de diatomées : elle est supérieure au sein des canaux pollués quel que soit le régime d'écoulement.

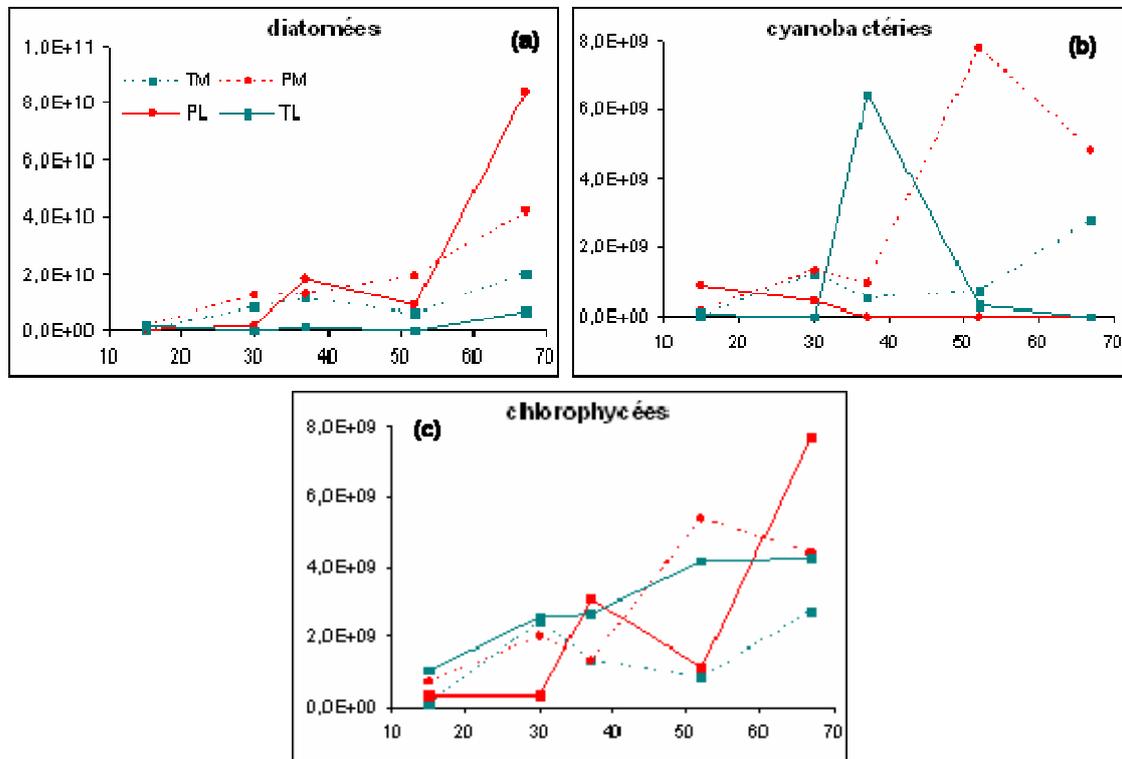


Figure 52 : Dynamique temporelle de l'abondance (cell.cm^{-2}) des trois grands groupes d'algues répertoriées au sein des canaux : (a) diatomées, (b) cyanobactéries et (c) chlorophycées

Au niveau spécifique, on observe un effet du régime d'écoulement sur la richesse algale (Tableau 38). Le nombre d'espèces identifiées est significativement inférieur au sein des canaux à régime homogène (laminaire).

jours	Témoin		Pollué	
	Mixte	Laminaire	Mixte	Laminaire
15	25	19	31	21
30	32	24	29	25
37	24	20	33	23
52	26	22	30	22
67	29	24	31	21

Tableau 38 : Nombre d'espèces détectées par microscopie

La détermination a priori de groupes caractérisés par le régime d'écoulement (laminaire/mixte), l'état chimique (pollué/non-pollué) et l'âge du périphyton a permis d'analyser par MRPP (figure 53) l'importance de ces facteurs sur la structure de la communauté algale. Il apparaît que l'âge du biofilm est le facteur primordial suivi de la pollution puis le régime hydraulique.

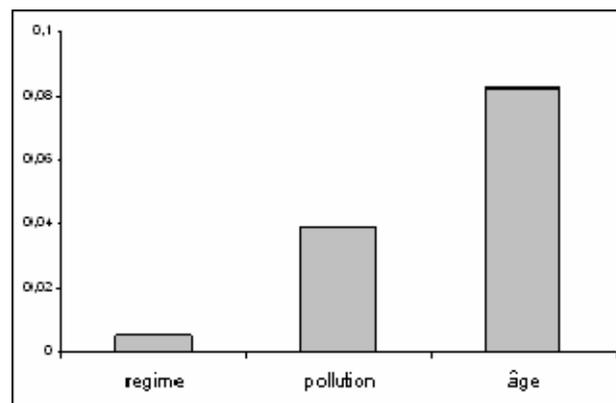


Figure 53 : Résultats de l'analyse MRPP (statistique A) sur les données de microscopie

L'analyse microscopique au niveau spécifique a permis d'identifier certaines espèces indicatrices du niveau de pollution (pollué : *Encyonema minutum*, *Fragilaria capucina*, *Melosira varians*, *Puncticulata radiosa*), du régime d'écoulement (mixte : *Monoraphidium minutissimum*; Laminaire : *Scenedesmus ecornis* et *Scenedesmus spinosus*) et de l'âge du périphyton (jeune : *Cyclotella cyclopuncta* et *Diatoma vulgare*; mature : *Diatoma ehrenbergii* et *Navicula gregaria*).

4.3- Diversité procaryotique : étude par DGGE:

Le nombre total d'OTUs détectées pour l'analyse du gel DGGE des canaux témoins et pollués est de 34.

Dans les canaux témoins, le nombre d'OTUs est compris entre 10 et 26 (tableau 39). Le nombre d'OTUs est relativement constant dans le temps à l'exception du 52^{ième} jour dans la rivière mixte où l'on observe une forte augmentation du nombre d'OTUs. La diversité maximale est supérieure au sein de la rivière mixte (26 OTUs) en comparaison avec la rivière laminaire (15 OTUs).

Dans les canaux pollués, on observe également cette augmentation du nombre d'OTUs au 52^{ième} jour de croissance au sein du canal mixte. Aucune différence n'est observée entre les canaux témoins et pollués (tableau 39).

En terme de richesse, il semble que seul le régime d'écoulement ait une influence sur la composition bactérienne du périphyton.

jours	Témoïn		Pollué	
	Mixte	Laminaire	Mixte	Laminaire
15	17	15	18	12
30	11	15	12	13
37	11	10	11	12
52	26	15	22	11
67	19	15	19	17

Tableau 39 : Nombre d'OTUs observées sur le gel DGGE correspondant à l'amplification du gène codant pour l'ARN 16S, aux 5 dates d'échantillonnage (en nombre de jours de croissance).

La transposition des résultats de DGGE en une matrice présence-absence permet l'analyse statistique de la composition procaryotique. Cette matrice est transformée en une matrice de dissimilarité (indice de Dice) qui sert de base à l'analyse CAH (figure 54). On observe trois groupes distincts :

- le premier (gris clair) est composé des échantillons de périphyton jeune (âgé de 15 jours) sans distinction de régime d'écoulement.
- Le second (gris foncé) regroupe des échantillons issus des canaux laminaires (témoïn à 30 et 37 jours et pollué à 30, 52 et 67 jours)
- Le dernier (blanc) regroupe essentiellement les échantillons issus des canaux ayant un régime mixte (à l'exception de deux échantillons provenant du périphyton du canal témoïn laminaire en fin de croissance).

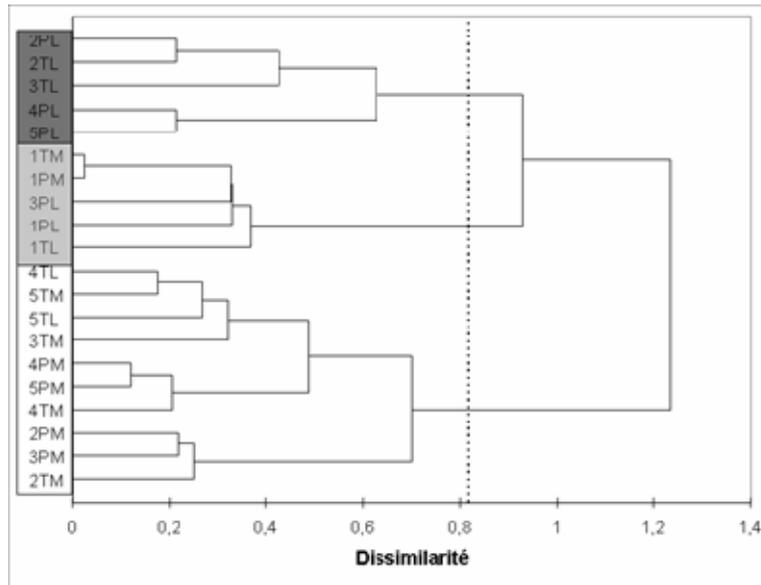


Figure 54 : CAH réalisée à partir de la matrice de dissimilarité (indice de Dice) déduite de l'analyse du gel DGGE issu de l'amplification du gène codant pour l'ARN 16S ; Témoin Mixte (TM), Pollué Mixte (PM), Témoin Laminaire (TL) et Pollué Laminaire (PL) ; (1 : 15 jours ; 2 : 30 jours ; 3 : 35 jours ; 4 : 52 jours et 5 : 67 jours)

La communauté bactérienne semble donc contrainte par son âge mais également par le régime d'écoulement. Le périphyton se développant au sein des canaux ayant un régime d'écoulement hétérogène présente une communauté bactérienne différente et plus diversifiée que le périphyton se développant au sein d'un canal laminaire.

5- Effet des phytosanitaires à une échelle plus globale (unité expérimentale)

Le périphyton se développe-t-il différemment au sein de rivières hétérogène ou homogène en terme d'hydraulique ?

Au sein de nos canaux expérimentaux « mixtes » la variabilité de la vitesse du courant (de 0 à 1 m.s^{-1}) est à l'origine de la création de zones d'hydraulique contrastée dites lentes et rapides. Ces canaux sont nommés « hétérogènes ». A contrario, au sein des canaux expérimentaux à flux laminaire, la vitesse de courant est plus homogène (de 0 à 0,3 m.s^{-1}). Nous appellerons ces canaux « canaux homogènes ». L'objectif général de cette étude était donc de décrire le lien entre l'hétérogénéité de l'habitat (créé ici par la variabilité de la vitesse du courant) et la diversité des communautés périphytiques. Rainey et Travisano en 1998, affirmaient, de façon générale, que l'hétérogénéité spatiale est cruciale pour l'**émergence** de la biodiversité et son **maintien** après une perturbation.

Au sein de nos mésocosmes, une première étude à une échelle **locale** (décimétrique) n'a pas révélé de différences significatives de structure du périphyton

(communautés algale et bactérienne) en lien avec le type de zones hydrauliques échantillonnées (lente ou rapide) (Cf partie A de ce même chapitre, p 124-128). On retrouve, entre des zones lentes et rapides, la même dynamique des grands groupes algaux (diatomées, chlorophycées, et cyanobactérie), la même composition bactérienne.... Cependant, au sein des mêmes mésocosmes, cette même étude analysée à une échelle **globale** (le canal dans son ensemble) montre que la dynamique hydraulique influence la nature du périphyton en terme de diversité (algale et bactérienne), de densité cellulaire (bactérienne) et également de production. La diversité bactérienne de biofilms des canaux hétérogènes (mixtes) est différente de celle de biofilms des canaux homogènes. Ces changements de diversité sont liés à une augmentation de la richesse (nombre d'OTUs maximum observé au sein du canal mixte est de 26 et seulement de 15 pour le canal laminaire) et à une réduction d'un facteur deux de la densité bactérienne et de la production au sein du périphyton des canaux hétérogènes. Au sein d'un environnement hétérogène, la communauté bactérienne périphytique est donc plus diversifiée mais moins dense et moins productive.

La richesse algale est également supérieure au sein des canaux hétérogènes : 32 espèces ont été détectées (par microscopie) tandis que seulement 24 espèces ont été observées au sein des canaux plus homogènes. La densité cellulaire et la production primaire sont cependant inchangées entre ces deux conditions.

De nombreux exemples de la relation entre hétérogénéité de l'habitat et diversité existent. Cette relation a été observée pour de nombreux organismes vivants au sein d'écosystèmes variés. Les causes de l'hétérogénéité spatiale sont multiples et peuvent être liées à des facteurs biotiques ou abiotiques. Beaucoup de travaux sur la biodiversité du sol révèlent ce lien entre la diversité d'habitat et la biodiversité et ce à différentes échelles d'observation allant du microsite au paysage (Beare *et al.*, 1995 ; Ettema, 1998, Ettema *et al.*, 1998, Sulkava et Huhta, 1998, Ettema *et al.*, 2000). Les écosystèmes « sol » et « sédiment », particulièrement hétérogènes, sont même reconnus pour être généralement plus diversifiés que les milieux aquatiques souvent plus homogènes (Torsvik *et al.*, 2002 ; Curtis et Sloan, 2004). Cette relation entre diversité d'habitat et biodiversité s'explique par le fait que certaines espèces manifestent des préférences écologiques. Ainsi, en présence d'habitats divers, les organismes compétiteurs exprimant leur préférence peuvent être spatialement et temporellement séparés. Par exemple, Buckling *et al.* (2000) ont étudié la diversité de *Pseudomonas aeruginosa* en mésocosme en fonction de la répartition plus ou moins homogène des nutriments. Ils ont travaillé avec d'une part des mésocosmes statiques où la répartition des nutriments est hétérogène et d'autre part avec des mésocosmes « agités » dans lesquels la répartition des nutriments est homogène. Ils ont conclu que la diversité génétique de *P. aeruginosa* est supérieure dans un environnement

dont les niches « écologiques » sont plus diversifiées. La plus grande richesse algale et bactérienne observée au sein de nos canaux hétérogènes peut donc en partie s'expliquer par cette séparation physique des organismes en compétition.

De plus, l'hétérogénéité spatiale peut être renforcée par les organismes eux-mêmes. En se développant en population, ils peuvent, par leur activité, modifier leur propre habitat et celui d'autres espèces (Levins 1979, Shorrocks et Rosewell, 1987, Anderson, 1995) favorisant ainsi le maintien de la diversité. Le développement des communautés microbiennes en biofilm est un très bon exemple de ce phénomène « d'autorégulation » de l'habitat. En effet, la matrice extracellulaire permettant la cohésion des organismes au sein du périphyton agit également comme barrière de diffusion (Lock *et al.*, 1984 ; Lock, 1993 et Chapitre 1 p 29) et favorise par exemple l'installation de gradients de diffusion pour les composés dissous. Ainsi, cette matrice se caractérise par la variété des micro-environnements qu'elle contient et qui constituent de multiples micro-habitats supplémentaires pour les microorganismes.

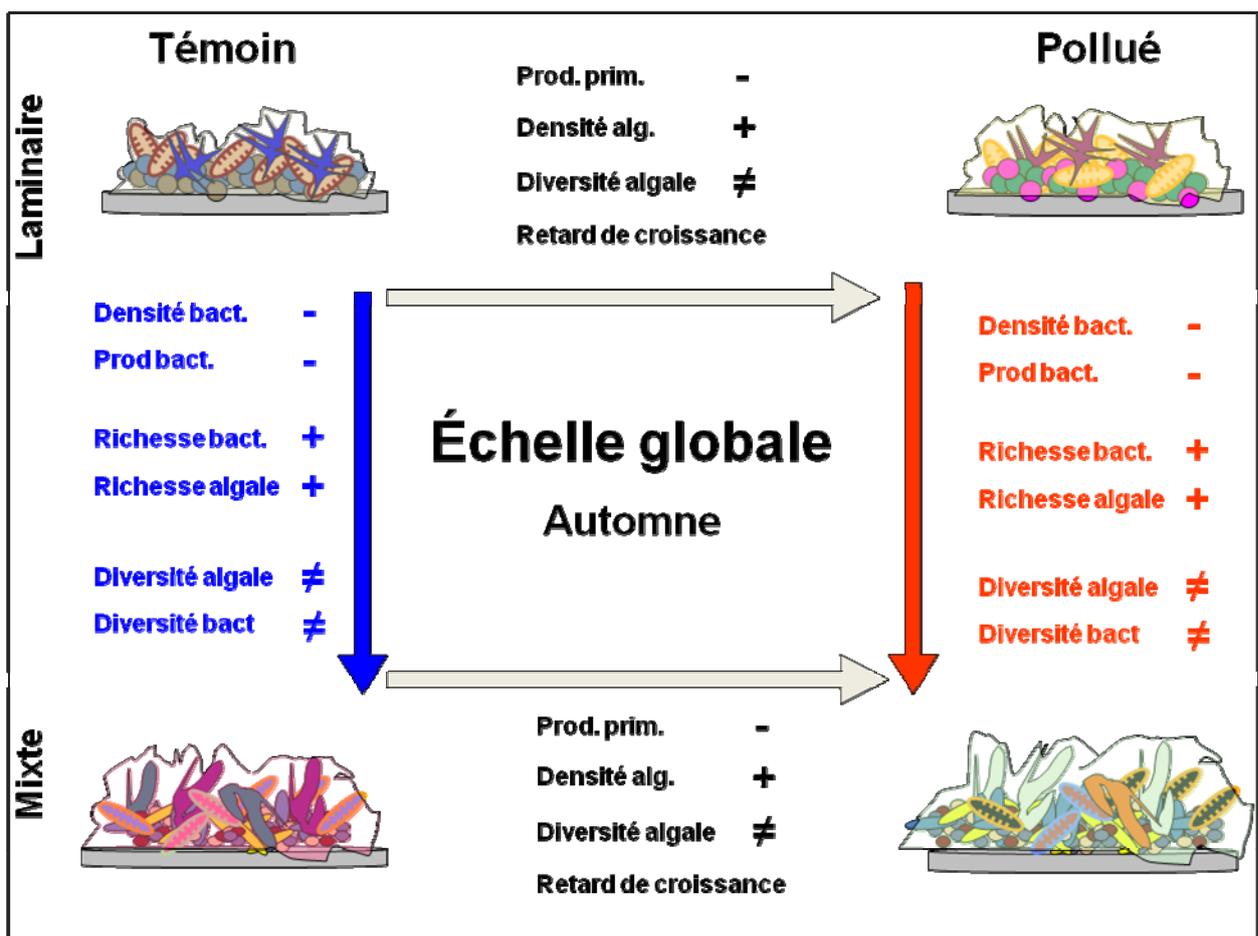


Figure 55 : Schéma bilan des changements de structure et de diversité du périphyton en lien avec la présence de polluant (diuron + azoxystrobine) et le type d'écoulement (homogène/hétérogène) en automne.

En conclusion, au sein de nos mésocosmes et à l'échelle du canal artificiel, l'hétérogénéité spatiale liée aux variations de la vitesse du courant a permis l'émergence de périphyton ayant des caractéristiques distinctes. Dans cet environnement hétérogène, le périphyton contient un plus grand nombre d'espèces algales et bactériennes. La densité et la production bactérienne sont moindres tandis que la densité et la production algale restent inchangées (figure 55). Nos travaux rejoignent donc la théorie des différents auteurs cités précédemment : l'hétérogénéité spatiale favorise la diversité biologique. L'accumulation de petits effets non significatifs à l'échelle locale (décimètre), est à l'origine de différences perceptibles à une échelle plus globale (canal artificiel). Si l'on en revient à l'affirmation de Rainey et Travisano (1998), nos travaux valident la thèse selon laquelle l'hétérogénéité spatiale est cruciale pour l'émergence de la biodiversité.

Cette relation a été établie en milieu « pristine ». Dans un contexte de pression de contamination, quel sera le rôle de cette diversité sur la tolérance et la résistance aux perturbations ?

Quels sont les effets d'un mélange diuron + azoxystrobine sur le périphyton au sein de deux canaux ayant des régimes hydrauliques contrastés ?

Comme à l'échelle locale, l'introduction du mélange de pesticides modifie la structure et la diversité de la communauté algale, à l'échelle du canal. La communauté algale du périphyton sous une pression toxique est plus dense et moins productive que celle issue du canal témoin. On observe également une différence de diversité entre les deux : certaines espèces de diatomées ne sont identifiées qu'en présence du diuron et de l'azoxystrobine. C'est le cas de *Diatoma vulgare*, *Encyonema minutum*, *Fragilaria capucina* mais ces espèces ne sont pas connues pour être polluo-tolérantes³. De nombreux auteurs ont souligné l'effet des herbicides sur la richesse spécifique des organismes autotrophes, effet dû à la sélection d'espèces plus résistantes au détriment des espèces plus sensibles (Dahl et Blanck, 1996 ; Pérès *et al.*, 1996 ; DeLorenzo *et al.*, 1999). En 2006, Pesce réalisait une expérience sur des communautés périphytiques en microcosme en présence d'environ 8 µg.l⁻¹ de diuron. Le périphyton était prélevé dans une rivière avant d'être introduit dans des microcosmes. L'expérience a été réalisée sur deux années consécutives (2003 et 2004) dans les mêmes conditions expérimentales. Il a observé un effet du diuron sur la

³ Rappelons que les diatomées sont actuellement utilisées de façon indiciaire pour leur capacité à distinguer des milieux de trophies différents. Leur capacité à mettre en évidence des pollutions toxiques est actuellement en cours d'étude.

biomasse périphytique (chlo a) et sur la densité algale en 2004 mais pas en 2003. En 2004, le diuron inhibait l'activité microbienne autotrophe en maintenant les biomasses et les densités algales à un faible niveau au cours de l'expérimentation (24 jours). Il notait également un changement de composition taxonomique de la communauté algale dans les microcosmes pollués (diminution ou disparition des genres *Scenedesmus*, *Cyclotella* et *Oocystis*). Cependant, en 2003, ce même auteur n'observait pas d'effet du diuron sur le périphyton. La communauté initiale (prélevé dans la rivière pour ensemercer les microcosmes) était cependant très différente et moins diversifiée (3 genres contre 6 en 2004) que celle de 2004. Cet auteur conclut que l'effet du diuron sur le périphyton semble dépendre de la composition taxonomique initiale et non pas du nombre d'espèces présentes. Nos résultats confirment totalement et pour une échelle d'étude supérieure cette conclusion. En effet, au sein de nos mésocosmes, bien que moins riches, le périphyton issus des canaux homogènes n'est pas pour autant plus sensible à la présence de polluant. Ce serait donc bien la nature des espèces présentes qui serait décisif dans la réponse du périphyton aux pesticides et non pas le nombre d'espèce le composant.

Pesce (2006) observait également un effet sur la communauté hétérotrophe : inhibition de la productivité microbienne hétérotrophe, avec un maintien de la densité, de la production et de l'activité bactérienne à de faibles niveaux au cours de l'expérimentation (24 jours). Nous n'observons pas de tels effets dans nos travaux. Dans notre étude, le diuron agit en modifiant le développement de la communauté autotrophe mais ne semble pas entraîner la sénescence d'une fraction importante de cellules algales (pas de diminution voir même augmentation de la densité cellulaire algale). Ainsi, on n'observe pas ici d'effet indirect sur les bactéries que se soit une inhibition (comme observé par Pesce en 2006) ou une stimulation (comme observé par DeLorenzo *et al.* en 1999). DeLorenzo *et al.* (1999) avaient observé une stimulation du compartiment bactérien suite à une chute de l'activité autotrophe (diminution du taux de photosynthèse, réduction des biomasses et des densités algales...) résultant de la présence d'herbicides de la famille des triazines. Cette stimulation était attribuée à un meilleur accès des bactéries aux ressources nutritives du fait de la baisse de compétitivité des autotrophes. Au sein de nos mésocosmes, la communauté bactérienne, très sensible au changement de régime hydraulique et aux variations temporelles, n'est cependant pas influencée directement ou indirectement par la présence de diuron.

Comme attendu, les organismes autotrophes du périphyton, cibles principales des herbicides et donc du diuron, sont les plus impactés par le mélange polluant. Cependant, les différences de diversité et de structure des communautés bactérienne et algale issues des canaux mixtes et laminaires n'entraînent pas de différences de réponse au stress toxique. Les effets d'un mélange de diuron et d'azoxystrobine, aux doses testées, sur le périphyton sont identiques au sein des deux types de canaux. Il semble que la communauté bactérienne soit sensible au régime d'écoulement tandis que la communauté algale paraît être plus sensible à l'introduction du toxique (figure 55).

Quel est le rôle de la biodiversité dans la réponse du périphyton à un stress toxique ?

Une augmentation de diversité (nombre d'espèces) ne rend donc pas le périphyton plus tolérant au mélange toxique, tout au moins aux concentrations appliquées durant cette étude. Cette observation ouvre un volet intéressant sur les relations entre biodiversité et fonctionnement des écosystèmes. Mac Cann (2000) alimentait ce grand débat par l'introduction de l'hypothèse de biodiversité-stabilité : il introduisait le principe selon lequel si le nombre d'interactions trophiques augmente au sein d'une communauté, la résistance et la résilience de l'écosystème augmentent également. L'idée sous-jacente est donc que des écosystèmes plus diversifiés ont plus de chance de contenir des espèces résistantes aux perturbations et donc capables de compenser la perte fonctionnelle provoquée par la disparition d'autres espèces. Cette hypothèse est également nommée **l'hypothèse de l'assurance biologique** (Yachi et Loreau, 1999).

Or, au sein de nos mésocosmes, bien que possédant plus d'espèces algales et bactériennes susceptibles d'être résistantes à la perturbation provoquée par les pesticides, le périphyton du canal hétérogène semble plus sensible. Le gain de diversité n'a donc pas permis un gain fonctionnel, à l'échelle des paramètres testés. Les espèces présentes au sein du périphyton du canal homogène sont aussi résistantes. Or, bien que moins diversifié, ce périphyton est plus dense et plus productif. Dans le cas du périphyton, une hypothèse explicative peut être que l'architecture du périphyton permet une meilleure protection contre les polluants (barrière de diffusion) qu'un nombre plus élevé d'espèces. De même, de nombreuses espèces ont des propriétés fonctionnelles redondantes et donc l'élimination ou l'apparition d'une espèce n'influencera pas le fonctionnement de la communauté. L'hypothèse « des rivets » ou « du conducteur-passager » ne s'applique pas ici, en tout cas pas à la sensibilité d'espèces aux relativement faibles concentrations de phytosanitaires.

A contrario, une autre hypothèse, non contradictoire, est que au sein du canal homogène sont présentes toutes les espèces clés nécessaires pour répondre au stress polluant tandis que certaines d'entre elles manqueraient au sein du canal hétérogène ?

Chapitre 5 :

Structure et diversité périphytique le long d'un gradient de pollution : approche de terrain

Hypothèses et questions :

- Existe-t-il, *in situ*, dans un contexte de complexité environnementale, des différences entre le périphyton en amont et en aval d'un cours d'eau contaminé (la Morcille) ?
- Ces différences, en terme de structuration, de fonctionnement et de diversité du périphyton issu de zones d'hydraulique différente, sont-elles en accord avec nos expérimentations en milieux artificiels ?
- Quelle est l'importance de ces changements dans la réponse du périphyton à une dégradation de la qualité chimique de l'eau ?
- Quelle est l'importance de la saison dans la structuration du périphyton et dans sa tolérance à une pollution chimique ?

La réponse du périphyton à un stress chimique est dépendante du niveau et du temps d'exposition ainsi que des espèces présentes au moment de la pollution (Gurney et Robinson, 1989). Les données de la littérature (Guash et Sabater, 1998, Battin et al, 2003b...) et nos résultats précédemment obtenus en microcosmes et mésocosmes montrent que des modifications de l'intensité lumineuse et de la vitesse du courant peuvent modifier de manière significative la structure et surtout la diversité du périphyton. Guash et Sabater (1998) ont montré que des différences de diversité liées à l'historique lumineux peuvent entraîner des réponses différentes à la présence de contaminants. Nos résultats précédents, en système expérimental contrôlé, montrent également que la réponse des communautés périphytiques à un stress chimique peut être variable en fonction des caractéristiques physiques de leur zone de prélèvement et de la saison. Les communautés périphytiques issues de zones lentes durant la période estivale ont une évolution structurale plus perturbée en présence de contaminants que des communautés contraintes par une vitesse de courant plus rapide. En automne, les changements de structure liés à un stress hydraulique ou chimique ne sont plus observés. Mais qu'en est-il sur le terrain où les facteurs physiques et chimiques en interactions et de confusions sont plus nombreux ?

Dorigo *et al* (2007) ont observé, sur une rivière du Beaujolais caractérisée par un gradient amont-aval de pollution par des phytosanitaires (Gouy et Nivon 2007, Montuelle et al. 2006), un changement de composition spécifique des communautés bactériennes et algales périphytiques le long de ce même gradient. Pour faciliter l'analyse et la discrimination de l'effet des phytosanitaires, les échantillonnages ont été réalisés dans des zones homogènes en terme de courant et d'intensité lumineuse.

Nous avons complété cette étude de la structure et diversité de communautés périphytiques le long d'un gradient de pollution en complexifiant le plan d'échantillonnage. Pour cela, la vitesse du courant a été intégrée comme facteur d'interférence avec l'action des phytosanitaires en analysant la structure du périphyton de l'amont à l'aval au sein de zones d'hydraulique très contrastées en été et en hiver.

Les paramètres biologiques mesurés visent donc à mettre en évidence un effet de la vitesse du courant et de la présence de pesticides à travers l'étude :

- des paramètres généraux de structure : biomasse totale, dénombrement cellulaire (bactérien et algal),
- de l'intensité des productions primaire et bactérienne,
- de la composition et de la richesse de la communauté périphytique (bactéries et algues).

Les protocoles utilisés sont identiques à ceux utilisés au cours des expérimentations en canaux artificiels (Chapitre 2B). Les analyses se font cependant sur une solution périphytique et non directement sur le biofilm (tableau 12 p72). La diversité algale a

également été estimée au travers de la composition pigmentaire du périphyton (chapitre 2B p83).

A- Importance de l'hydraulique et effets des pesticides in situ

1- Structure générale du périphyton de l'amont à l'aval de la Morcille

Les résultats obtenus pour l'étude de la biomasse, des densités cellulaires et des productions bactériennes et algales sont reportés dans le tableau 41 pour l'échantillonnage estivale et dans le tableau 43 pour celle d'hiver. L'importance de la saison d'échantillonnage a été testée par une ANOVA à un facteur dont les résultats sont reportés dans le tableau 40. Puis, l'effet de la vitesse du courant et l'importance de la localisation du périphyton dans le cours d'eau (amont-aval) ont été testées pour chaque saison par une ANOVA à 2 facteurs. Les moyennes ont ensuite été comparées à l'aide du test de Tukey-HSD. Les résultats de ces ANOVAs à deux facteurs sont reportés dans les tableaux 42 (été) et 44 (hiver).

Les biomasses moyennes sont comprises entre 8.2 et 14.1 $\mu\text{g.cm}^{-2}$. La biomasse périphytique au sein de la Morcille ne varie ni en fonction de la saison, ni du type zones hydrauliques, ni de l'amont à l'aval de la Morcille.

La densité bactérienne varie de $1,88.10^8$ à $4,42.10^8$ cell.cm^{-2} en été et de $1,81.10^7$ à $7,36.10^7$ cell.cm^{-2} en hiver. Au sein du périphyton de la Morcille, la densité bactérienne est significativement supérieure en été. En étudiant les deux saisons séparément, on constate, que la densité cellulaire bactérienne est supérieure dans les biofilms situés dans les zones rapides en été comme en hiver. La localisation le long du cours d'eau (amont-aval) influe également sur la densité bactérienne. En été comme en hiver, la densité bactérienne est plus importante à l'aval de la Morcille quelle que soit la zone hydraulique échantillonnée. Le périphyton ayant la plus dense communauté bactérienne est donc échantillonné en aval au sein des zones rapides.

La saison, l'hydraulique et la zone échantillonnée (amont, aval) sont donc trois facteurs contrôlant le développement de la communauté bactérienne.

Les différences saisonnières de densité cellulaire ne sont pas accompagnées d'une modification de la **production bactérienne**. La communauté bactérienne, bien que moins dense en hiver, est aussi productive qu'en été.

L'augmentation du nombre de cellules bactériennes de l'amont à l'aval entraîne une augmentation de la production selon le même gradient (cette différence est significative uniquement en hiver). Le périphyton situé en aval, plus dense, est également plus productif. La production bactérienne est également affectée, particulièrement en été, par une

modification de la vitesse du courant. En période estivale, les communautés bactériennes situées au sein de zones rapides sont plus denses et plus productives. En hiver, on n'observe pas ce schéma ; à l'inverse de l'été, le périphyton situé au sein des zones lentes semble plus productif bien que moins dense.

Une autre modification saisonnière des caractéristiques du périphyton concerne sa **composante algale**. En hiver, la communauté algale est globalement plus dense qu'en été (tableau 41). L'influence des facteurs hydrauliques et la localisation dans le cours d'eau dépendent de la saison d'échantillonnage. En été, seule la vitesse du courant influe sur la densité algale qui est plus importante dans les zones rapides (environ d'un facteur 3). En hiver, ce facteur devient négligeable en regard de l'effet du facteur «amont-aval». En hiver, la densité algale périphytique augmente d'amont en aval (d'un facteur 2 à 4) quelle que soit la vitesse du courant.

Aucune différence saisonnière significative n'est observée concernant **la production primaire**. Cependant, le périphyton situé à l'aval a une production plus importante que ceux situés à l'amont quelle que soit la saison ou l'hydrologie. De plus, en hiver, le facteur vitesse de courant influence également la production primaire. Le périphyton situé dans les zones lentes est significativement plus productif que celui situé dans les zones rapides.

Sur le site de la Morcille, bien qu'aucune modification de biomasse ne soit enregistrée, la structure générale du périphyton est contrainte par la saison, le site échantillonné et la vitesse du courant.

En hiver, bien que moins dense, le périphyton est aussi productif qu'en été. Une augmentation de la vitesse du courant provoque une augmentation de la densité bactérienne (été et hiver) et algale (été). La relation densité-production est donc complexe et dépend de la saison. En effet, en été, l'importante densité bactérienne dans les zones rapides est accompagnée d'une production plus élevée. Cette relation est inversée en hiver où la communauté bactérienne la plus productive est également la moins dense (zones lentes). La production primaire globale n'est pas affectée par un accroissement de la vitesse du courant en été, cependant en hiver, la communauté algale située dans les zones lentes est plus productive (sans différence significative de densité).

La dégradation de la qualité chimique le long du gradient amont-aval entraîne également un changement des caractéristiques générales du périphyton. En hiver, le périphyton situé à l'aval est plus dense et plus productif que celui situé en amont. En été, la densité algale n'est pas affectée par cette dégradation de la qualité chimique. Cependant, on observe une augmentation de la production primaire et de la densité bactérienne d'amont en aval (sans modification de la production bactérienne).

ANOVA à un facteur ($\alpha = 5\%$)

	Biomasse	densité algale	production primaire	densité bactérienne	production bactérienne
P	0,887	0,0001	0,349	<0,0001	0,051

Tableau 40 : Test de l'effet du facteur saisonnier : résultats de l'ANOVA à un facteur (saison) pour les descripteurs biologiques (production primaire et bactérienne, biomasse, densité bactérienne et algale). En grisé les valeurs significatives

	biomasse $\mu\text{g.cm}^{-2}$		densité bactérienne $10^8 \text{ cells.cm}^{-2}$		production bactérienne $10^{-10} \text{ mmole H.h}^{-1}.\text{cm}^{-2}$		densité algale $10^2 \text{ cells.cm}^{-2}$		production primaire $\mu\text{g C.h}^{-1}.\text{cm}^{-2}$	
	Lent	Rapide	Lent	Rapide	Lent	Rapide	Lent	Rapide	Lent	Rapide
Amont	8,3 ± 3,3	12,3 ± 5,1	1,88 ± 0,5	4,42 ± 0,8	0,73 ± 0,2	3,05 ± 1,4	1,62 ± 0,6	3,41 ± 1,1	1,57 ± 0,3	3,38 ± 0,9
Aval	8,9 ± 3,6	10,2 ± 2,5	3,05 ± 0,2	4,06 ± 0,3	1,73 ± 0,2	2,21 ± 1,1	0,92 ± 0,2	3,8 ± 1,9	7,9 ± 1,3	4,7 ± 0,5

Tableau 41 : Descripteurs généraux de structure et de production du périphyton en été

ANOVA à deux facteurs ($\alpha = 5\%$) en été

	Biomasse	densité algale	production primaire	densité bactérienne	production bactérienne
P	0,09	0,005	<0,0001	<0,0001	0,002

Test de Tukey-HSD ($\alpha = 5\%$)

Vitesse		0,001	0,145	<0,0001	0,002
Site		0,632	<0,0001	0,012	0,22

Tableau 42 : Test de l'effet de la vitesse et du site d'échantillonnage en été : résultats de l'ANOVA à deux facteurs (site et vitesse) pour les descripteurs biologiques (production primaire, biomasse, densité bactérienne et phytobenthique) et résultats des tests de Tukey. En grisé les valeurs significatives

	biomasse $\mu\text{g.cm}^{-2}$		densité bactérienne $10^7 \text{ cells.cm}^{-2}$		production bactérienne $10^{-10} \text{ mmole H.h}^{-1}.\text{cm}^{-2}$		densité algale $10^2 \text{ cells.cm}^{-2}$		production primaire $\mu\text{g C.h}^{-1}.\text{cm}^{-2}$	
	Lent	Rapide	Lent	Rapide	Lent	Rapide	Lent	Rapide	Lent	Rapide
Amont	12,4 ± 7,9	11,8 ± 3	1,81 ± 0,09	2,54 ± 0,5	0,48 ± 0,07	0,41 ± 0,07	5,7 ± 1,2	2,1 ± 0,6	3,4 ± 2,1	0,4 ± 0,2
Aval	14,1 ± 2,2	11,1 ± 1	2,7 ± 0,4	7,36 ± 0,6	3,7 ± 1,7	1,7 ± 1,5	9,2 ± 3,7	9,7 ± 2,2	8,8 ± 3,7	2,2 ± 1,1

Tableau 43 : Descripteurs généraux de structure et de production du périphyton en hiver

ANOVA à deux facteurs ($\alpha = 5\%$) en hiver

	Biomasse	densité algale	production primaire	densité bactérienne	production bactérienne
P	0,586	<0,0001	0,003	<0,0001	<0,0001

Test de Tukey-HSD ($\alpha = 5\%$)

Vitesse		0,052	0,002	<0,0001	0,034
Site		<0,0001	0,02	<0,0001	<0,0001

Tableau 44 : Test de l'effet de la vitesse et du site d'échantillonnage en hiver : résultats de l'ANOVA à deux facteurs (site et vitesse) pour les descripteurs biologiques (production primaire, biomasse, densité bactérienne et phytobenthique) et résultats des tests de Tukey. En grisé les valeurs significatives

2- Diversité périphytique

2.1- Diversité pigmentaire : étude par HPLC

Au total, pour les deux saisons, treize pigments ont été détectés. Les pigments majoritaires sont la fucoxanthine et cis-fucoxanthine, la diatoxanthine et la lutéine. Ces pigments sont tous caractéristiques de la présence de diatomées.

L'analyse hiérarchique des correspondances (figure 56) révèle de grandes différences saisonnières dans la composition pigmentaire des biofilms (figure 56a). Certains pigments (canthaxanthine, chlorophylle B) ne sont présents qu'en été et d'autres (cis-19'-butanoyloxyfucoxanthine) qu'en hiver.

En été (figure 56b), l'analyse de la composition pigmentaire révèle trois groupes dépendants de la vitesse du courant :

- un premier groupe (gris foncé) est composé essentiellement des échantillons issus des zones rapides, qu'elles soient situées à l'aval (P1R) ou à l'amont (T1R) du cours d'eau,
- un second groupe (gris moyen) est composé des échantillons issus des zones avalentes lentes (P1L),
- et enfin, le dernier groupe (gris clair) et le plus différent, est le groupe constitué des échantillons des zones amont lentes (T1L).

Il semblerait donc qu'en été, la composition pigmentaire soit, en premier lieu, contrainte par la vitesse du courant, puis au sein des zones lentes, on distingue des différences entre l'amont et l'aval.

Par contre, **en hiver** (figure 56c), on n'observe aucun regroupement des échantillons selon les facteurs étudiés. Il semblerait que la composition pigmentaire soit contrainte par d'autres paramètres (température, ensoleillement...).

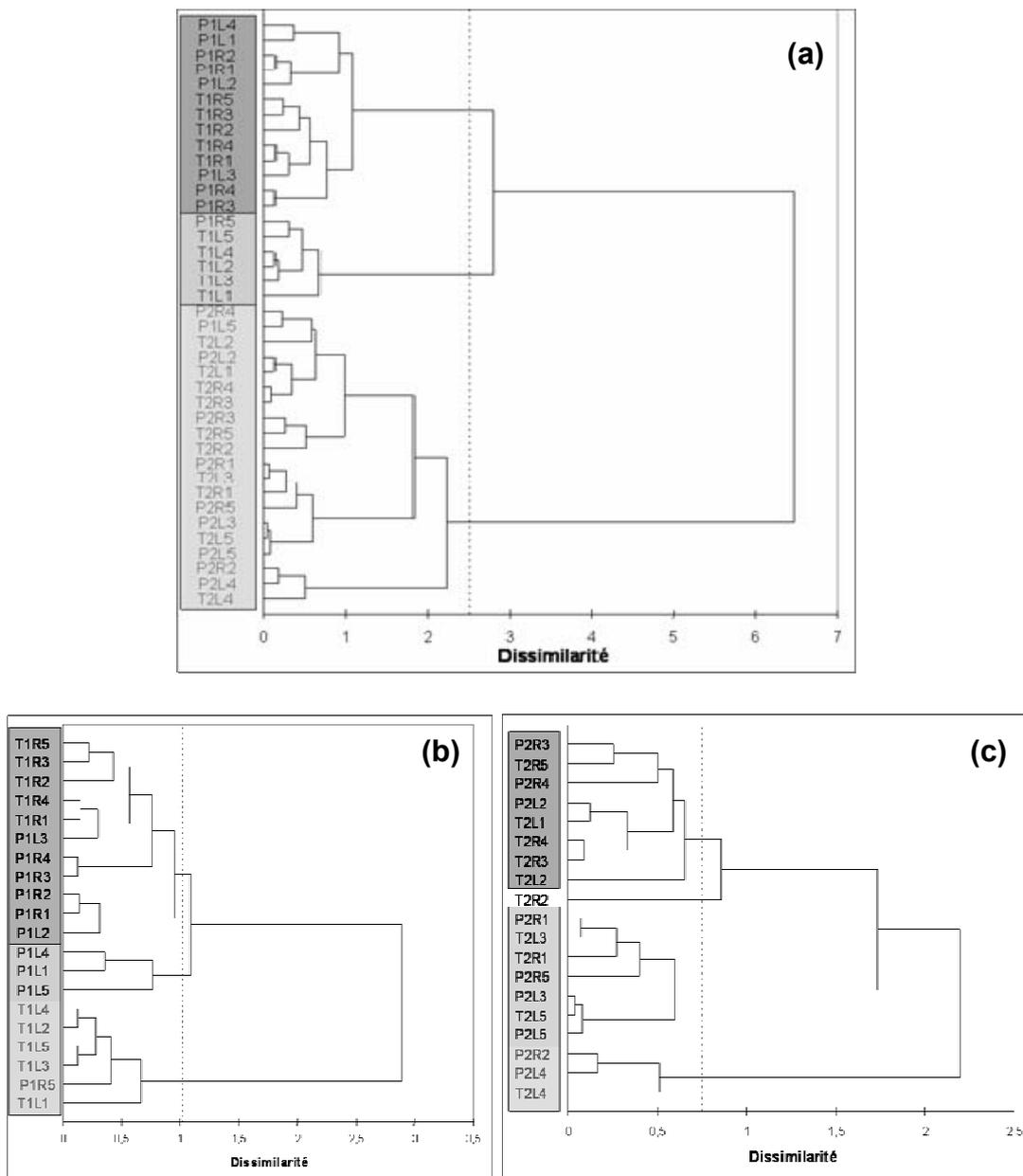


Figure 56 : Analyse hiérarchique de correspondances basées sur une matrice en classe d'intensité de la présence des différents pigments ; (a) pour les deux saisons, (b) en été et (c) en hiver, pour les échantillons de la zone T (amont-témoin) ou P (aval-polluée), à la saison 1 (été) ou 2 (hiver), en zone L (lente) ou R (rapide) en 5 répétitions.

2.2- Diversité algale : étude par DGGE

Le nombre total d'OTUs détectées est de 42 en été et 51 en hiver. Quelles que soient les conditions chimiques et de vitesse de courant, le nombre d'OTUs est significativement supérieur en hiver (tableau 45).

L'étude saisonnière (en été et en hiver) de la diversité phytobenthique montre que de l'amont à l'aval, le nombre moyen d'OTUs par profil augmente également de façon significative mais reste inchangé entre zones lentes et rapides.

Saison	Eté				Hiver			
	Amont		Aval		Amont		Aval	
Zone	lent	rapide	lent	rapide	lent	rapide	lent	rapide
Nombre de bandes								
Moyenne	5,8	7	15,6	14,4	10,6	16,6	16,8	19,4
Min	2	4	12	10	7	15	15	18
Max	11	13	18	19	13	18	19	21

Tableau 45 : Nombre de bandes observées sur les profils DGGE issus de l'amplification du gène codant pour l'ARN 18S

L'étude des gels DGGE permet également de nous informer sur la structure saisonnière des communautés phytobenthiques. Ces résultats sont reportés sur la figure 57. En été, comme en hiver, les résultats de l'analyse hiérarchique regroupent les échantillons en 4 groupes bien distincts. Cependant, entre l'été et l'hiver, la hiérarchie des facteurs de forçage n'est pas la même. En effet, **en été** (figure 57a), c'est la localisation le long du cours d'eau (amont, aval) qui entraîne la plus grande dissimilarité entre échantillons. Ensuite, c'est la vitesse du courant qui structure la communauté au sein d'un même site. En été on observe donc quatre types de diversité caractéristiques respectivement des zones amont-lente (T1L), amont-rapide (T1R), aval-lente (P1L), et aval-rapide (P1R). **En hiver** (figure 57b), plus que le site de prélèvement c'est en premier lieu la vitesse du courant qui structure la communauté algale. Ainsi, on retrouve également quatre groupes : T2L, T2R, P2L et P2R. Cependant les « témoins » (amont) et « pollués » (aval) d'une même zone hydraulique (par exemple en zone rapide : T2R et P2R) sont moins différents entre eux que les deux témoins subissant des vitesses de courant très contrastées (T2L et T2R).

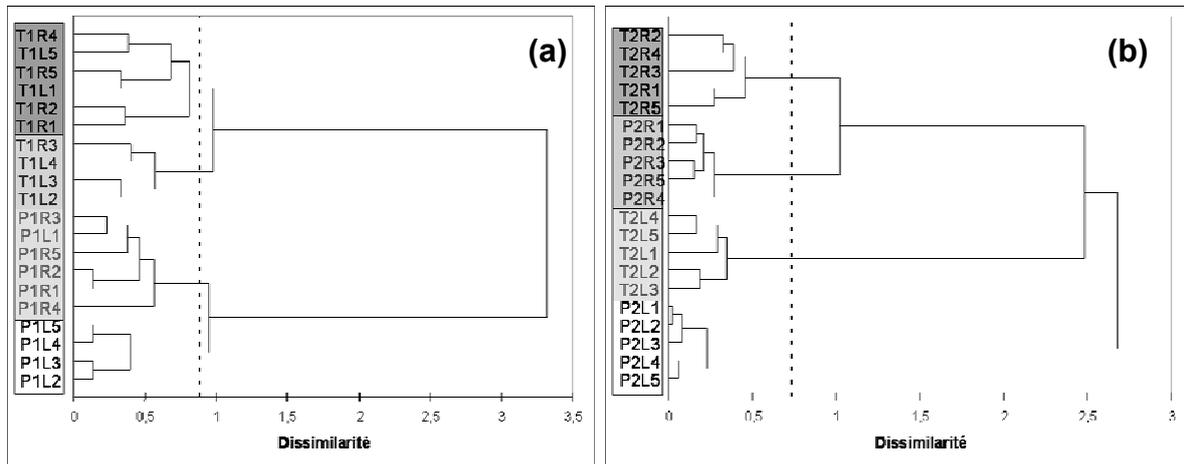


Figure 57 : CAH réalisée à partir de la matrice de dissimilarité (indice de Dice) issue des résultats de l'analyse du gel DGGE issus de l'amplification du gène codant pour l'ARN 18S : (a) en été ; (b) en hiver, pour les échantillons de la zone T (amont-témoin) ou P (aval-polluée), à la saison 1 (été) ou 2 (hiver), en zone L (lente) ou R (rapide) en 5 répétitions.

2.3- Diversité phytobenthique : étude par microscopie

Le périphyton issu de la Morcille est composé d'un grand nombre d'espèces de diatomées en été comme en hiver (154 espèces). Seules quinze autres espèces de microalgues ont été identifiées dont dix cyanobactéries, trois chlorophycées et deux chrysophycées.

Site	Eté				hiver			
	Amont		Aval		Amont		Aval	
Hydraulique	Lent	Rapide	Lent	Rapide	Lent	Rapide	Lent	Rapide
ESPECES	27	29,4	32,8	32,2	35,6	29	33	34,6
GENRES	7,0	6,98	7,68	7,48	13,58	7,44	9,32	9,86
IPS	12,6	11,4	11,2	11,66	15,66	12,16	11,14	11,3
IBD	12,1	10,96	11,36	11,8	14,6	11,66	10,56	10,28

Tableau 46 : Nombre d'espèces, nombre de genres et principaux indices biologiques (IPS et IBD) déterminés à partir des données d'analyse par microscopie des échantillons de périphyton de la Morcille en été et en hiver.

En été (tableau 46), le nombre moyen d'espèces est compris entre 27 et 33 et augmente de manière significative entre l'amont et l'aval. Le nombre de genres, compris entre 7 et 12, évolue selon le même « patron » le long du cours d'eau. Cependant, ces variations n'entraînent aucune modification des indices diatomiques classiques (IPS et IBD) d'amont en aval, dont les valeurs moyennes (de 10 à 12) révèlent une qualité de l'eau globalement moyenne. Les résultats de microscopie ne mettent pas en évidence d'effet de la vitesse du courant sur le nombre d'espèce ou de genre. Cependant, en terme de grands groupes algaux (figure 58) on observe des différences nettes : le périphyton des zones lentes est dominé par la présence des diatomées tandis que dans les zones rapides, se sont les cyanobactéries qui sont majoritaires. Cette observation est valable à l'amont comme à l'aval de la Morcille.

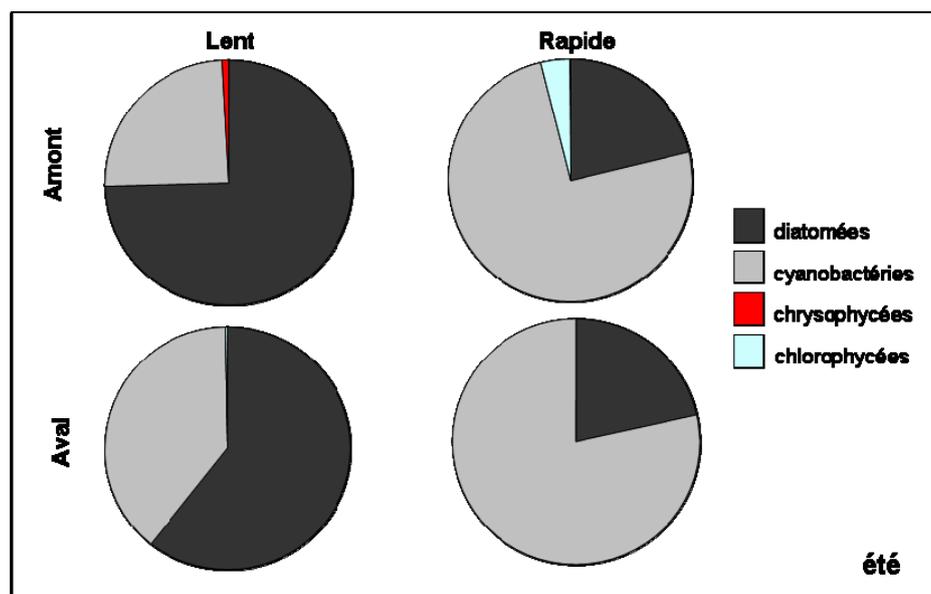


Figure 58 : Composition algale (basé sur le nombre de cellules) du périphyton en été

En hiver (tableau 46), le nombre moyen d'espèces est compris entre 29 et 35. Aucune différence en terme de richesse n'est observée entre l'amont et l'aval du cours d'eau ni entre les deux zones hydrauliques échantillonnées. Cependant, les indices diatomiques d'évaluation de la qualité de l'eau varient sensiblement de l'amont à l'aval notamment au sein des zones lentes. En amont, l'IBD et l'IPS indiquent une eau de bonne qualité pour les zones lentes (14) et de moyenne qualité pour les zones rapides (12). De l'amont à l'aval, les zones lentes sont déclassées, l'IBD (10.56) et l'IPS (11.1) indiquent en effet une eau de qualité moyenne. Dans les zones rapides, on observe également une diminution de l'IBD et de l'IPS (non déclassante) de l'amont vers l'aval. Comme en été, en amont, on observe une dominance des diatomées dans les zones lentes. Dans les zones rapides, même si les diatomées restent majoritaires, on observe un développement des cyanobactéries. En aval, le périphyton est majoritairement composé de cyanobactéries que ce soit dans les zones lentes ou rapides (figure 59).

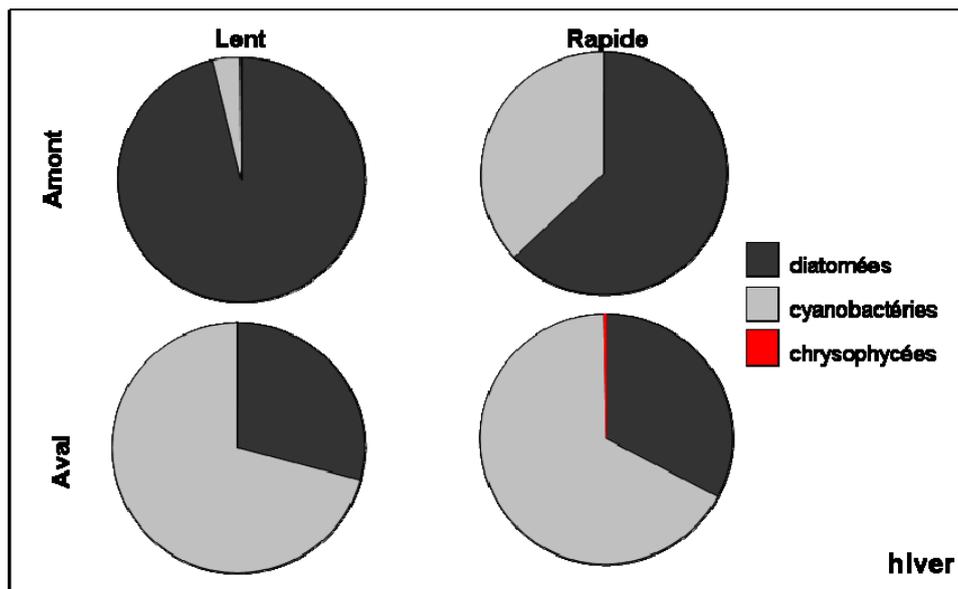


Figure 59 Composition algale (basé sur le nombre de cellules) du périphyton en hiver

La définition *a priori* de groupes caractérisés par la localisation le long du cours d'eau et par la vitesse du courant à permis d'analyser par MRPP l'importance de ces facteurs sur la structure de la communauté algale (figure 60). Tous les facteurs (pollution, vitesse du courant) ont un impact sur les communautés pour les deux saisons, qu'ils soient isolés ou en interaction.

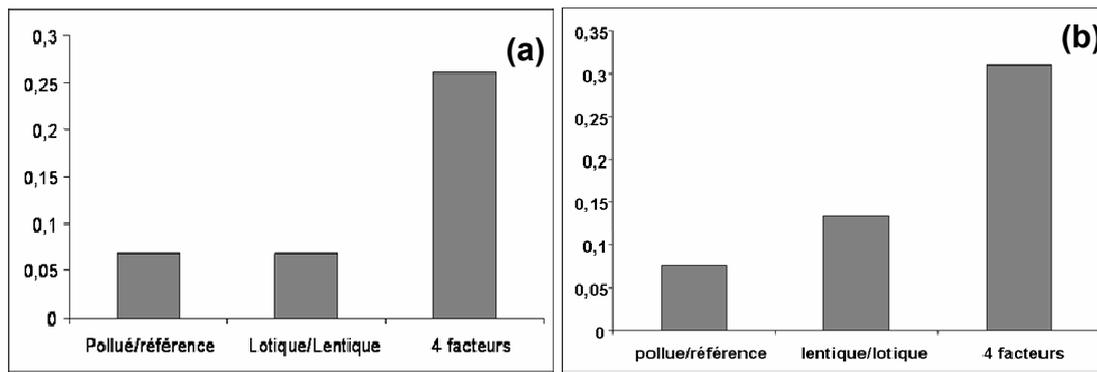


Figure 60 : Résultats de l'analyse MRPP (statistique A) sur les données de microscopie pour l'échantillonnage d'été (a) et d'hiver (b)

En été L'analyse hiérarchique, basée sur l'analyse des biovolumes, définit trois groupes (figure 61a) :

- les biofilms situés en amont (T1L et T1R), où aucun effet significatif du courant n'est observé
- les biofilms situés en aval dans les zones rapides (P1R)
- les biofilms situés en aval dans les zones lentes (P1L).

La distinction nette entre l'amont et l'aval est liée à la présence de trois diatomées présentes exclusivement dans les zones avals : *Nitzschia palea* (polluo-tolérante et halophile), *Luticola mutica* et *Hantzschia amphioxys*.

Les zones lotiques sont caractérisées par la présence de *Leptolyngbya sp. 1*, *Navicula cryptotenella* (polluosensible) et *Nitzschia fonticola*.

En hiver L'analyse hiérarchique, basée sur l'analyse des biovolumes, définit également trois groupes (figure 61b) :

- les biofilms situés en aval (P2R et P2L), où aucun effet significatif du courant n'est observé bien que les échantillons issus de zones lentes se regroupent en opposition à ceux issus de zones rapides. Ces distinctions sont liées à la présence de certaines espèces exclusivement au sein de zones définies par la qualité de l'eau ou la vitesse du courant. Ainsi, le périphyton issu des zones lentes en aval (P2L) est caractérisé par la présence de *Gomphonema pumilum var. rigidum* et *Leptolyngbya valderiana*. Dans les zones rapides en aval (P2R) on voit se développer d'autres espèces, notamment *Aphanocapsa holsatica* et *Leptolyngbya sp.1*.
- les biofilms situés en amont dans les zones rapides (T2R)
- les biofilms situés en amont dans les zones lentes (T2L). Ce groupe est caractérisé par la présence de nombreuses espèces de diatomées : *Achnanthydium kranzii*, *Achnanthydium minutissimum* (polluosensible ou électives des eaux faiblement minéralisées), *Diademsis gallica var. perpusilla E*, *Gomphonema micropus*, *Gomphonema parvulum*, *Navicula*

cryptocephala, *Planothidium frequentissimum*, *Pinnularia subcapitata*, *Planothidium lanceolatum* et *Rhoicosphenia abbreviata* (polluosensible).

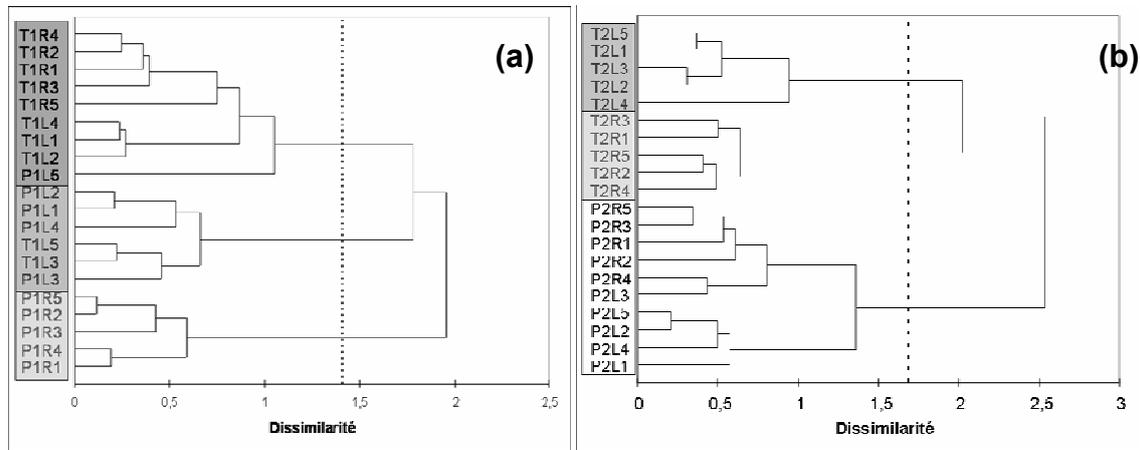


Figure 61 : CAH réalisée à partir du biovolume de la communauté totale (microalgues et diatomées) en été (a) et en hiver (b) pour les échantillons de la zone T (amont-témoin) ou P (aval-polluée), à la saison 1 (été) ou 2 (hiver), en zone L (lente) ou R (rapide) en 5 répétitions.

2.4- Diversité procaryotique : étude par DGGE :

Le nombre total d'OTUs détectées est de 30 en été et 38 en hiver (tableau 47). Quelles que soient les conditions chimiques et de vitesse de courant, le nombre d'OTUs est significativement supérieur en hiver. L'étude saisonnière de la diversité procaryotique montre que de l'amont à l'aval, le nombre moyen d'OTUs par profil augmente également de façon significative. Ces différences sont cependant plus marquées en été. Une modification de la vitesse du courant ne provoque pas de modification significative du nombre d'OTUs par profil.

Saison	Été				Hiver			
	Amont		Aval		Amont		Aval	
Zone								
Nombre de bandes	lent	rapide	lent	rapide	lent	rapide	lent	rapide
Moyenne	11,8	12,6	14,8	16,2	16,2	20,8	18,6	17,4
Min	10	10	14	15	9	17	16	17
Max	13	14	15	17	19	23	20	18

Tableau 47 : Nombre d'OTUs observées sur les profils DGGE de l'analyse 16S

L'étude des gels DGGE permet également de nous informer sur la structure saisonnière des communautés procaryotiques. Ces résultats sont reportés sur la figure 62.

Comme pour la communauté phytobenthique, le facteur le plus structurant de la communauté bactérienne est sa localisation le long du cours d'eau. En effet, en été comme en hiver, l'analyse hiérarchique des correspondances montre très clairement une séparation des échantillons issus des zones amont (T) et aval (P). Au sein d'un même site, la

composition bactérienne des biofilms issus de zones lentes diffère de celle des biofilms issus de zones plus rapides. Cette distinction n'est pas significative en été à l'aval.

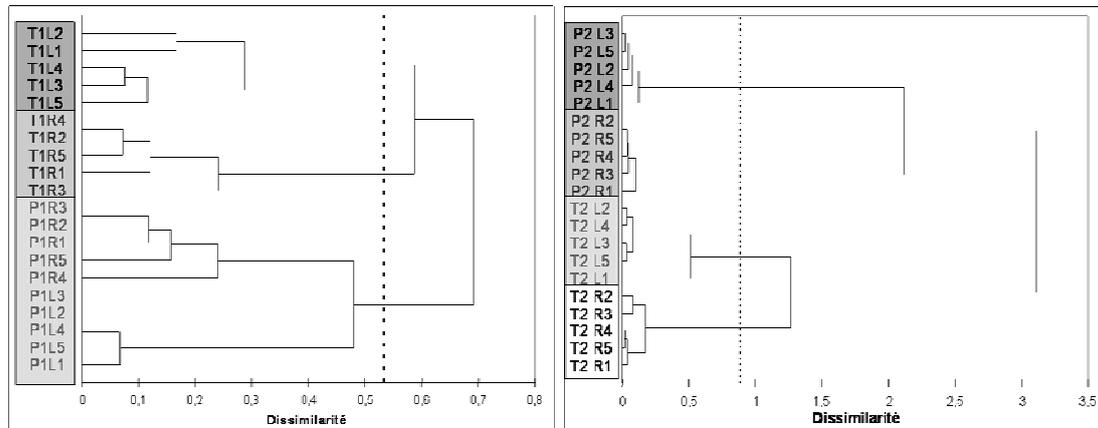


Figure 62 : CAH sur matrice de dissimilarité issue des résultats de DGGE pour le 16S : (a) en été ; (b) en hiver ; pour les échantillons de la zone T (amont-témoin) ou P (aval-polluée), à la saison 1 (été) ou 2 (hiver), en zone L (lente) ou R (rapide) en 5 répétitions.

3- Effet conjoint d'une pollution complexe et d'une modification de l'hydraulique sur le périphyton de la Morcille

Les différences de structuration, de fonctionnement et de diversité du périphyton issu de zones d'hydraulique différente, sont-elles en accord avec nos expérimentations en milieux artificiels ? Quelle est l'importance de la saison dans la structuration du périphyton ?

Dans cette étude, nous avons étudié l'effet de la vitesse du courant *in situ* à une échelle locale (décimétrique) sur le développement du périphyton en zone amont de la Morcille. **En été**, au sein de zones d'hydraulique « rapide », la communauté bactérienne est significativement plus dense et la production bactérienne est plus importante. Au sein de nos mésocosmes, pour une même échelle d'observation et sur les mêmes descripteurs, nous observons une relation inverse entre la densité bactérienne et la vitesse du courant. Cette relation inverse a également été observée par Besemer *et al.* (2007) et par Battin *et al.* (2003b). Cependant, simultanément à ces changements dans la communauté bactérienne, ces auteurs observaient une diminution de la densité algale. Dans notre étude *in situ*, l'augmentation de la vitesse du courant provoque au contraire une augmentation de la densité algale. Sur le site de la Morcille et durant l'été, il semble qu'une augmentation de la vitesse du courant stimule la croissance du périphyton (communautés algale et bactérienne). Ces résultats vont à l'encontre de ceux obtenus par de nombreux auteurs qui avaient établi qu'une augmentation de la vitesse du courant (allant jusqu'à plus de $1 \text{ m}\cdot\text{s}^{-1}$) limitait la

croissance du périphyton (Biggs et Thomsen, 1995 ; Biggs et Stokseth, 1996 ; Ghosh et Gaur, 1998, et Chapitre 1 p 40). Cependant si les effets sont multiples, c'est que les causes le sont aussi. En effet, la vitesse du courant peut agir de différentes manières sur la croissance du périphyton. Deux voies d'action antagonistes ont été décrites. L'augmentation de la vitesse du courant peut :

- d'une part influencer sur le transfert des nutriments en contrôlant l'adsorption des nutriments par le périphyton (Biggs, 1996 ; Borchardt, 1996 ; Stevenson, 1996). Ainsi, l'augmentation de la vitesse du courant et de la turbulence peuvent faciliter le transfert des nutriments de la colonne d'eau vers le biofilm conduisant ainsi à une augmentation de la photosynthèse, de la respiration et du taux de croissance en relation avec une augmentation de la vitesse du courant (Whitford et Schumacher, 1961 ; Lock et John, 1979 ; Dodds, 1989 ; Biggs et Hickey, 1994). Au sein de la Morcille, le périphyton dans les zones les plus rapides bénéficierait donc d'une facilité d'accès aux nutriments par rapport à celui situé dans les zones lentes.

- et d'autre part, pour des vitesses fortes et plus encore en présence de matière en suspension, avoir un effet « d'abrasion » sur le périphyton conduisant à l'arrachage du périphyton et à freiner la recolonisation (Stevenson, 1983 ; Stevenson et Peterson, 1989).

Biggs *et al.* (1998), émettent ainsi l'hypothèse que cet effet « négatif » de la vitesse du courant dépend de la composition taxonomique du périphyton et également de sa structure (notamment de sa biomasse (MSSC)). Ainsi, un biofilm mucilagineux est plus résistant qu'un biofilm composé d'algues filamenteuses et il semble exister une limite de biomasse (40 g.m^{-2}) en dessous de laquelle on n'observe pas d'arrachage du périphyton. Or, la biomasse périphytique de la Morcille est très faible ($1,2\text{-}1,4 \text{ g.m}^{-2}$ ce qui est très largement inférieure à 40 g.m^{-2}) et est principalement composé de diatomées (très peu de filamenteuses). On peut supposer que l'effet d'abrasion est quasi nul sur ce périphyton à l'inverse de nos observations en mésocosmes où la biomasse (MSSC) était beaucoup plus importante. Ces caractéristiques particulières au périphyton de la Morcille peuvent être dues aux crues fréquentes de cette rivière.

En plus de ces différences de structure, on observe également un changement de composition pigmentaire et des diversités bactérienne et algale. Ainsi en été, les zones lotiques sont, par exemple, caractérisées par la présence de *Leptolyngbya sp.* (cyanobactérie) et de deux diatomées (*Navicula cryptotenella* et *Nitzschia fonticola*). Ces deux espèces de diatomées sont des espèces faiblement polluo-tolérantes.

Ces résultats sont cependant fonction de la saison d'échantillonnage. En effet, en été, l'augmentation de la vitesse du courant entraîne une augmentation de la densité algale qui n'est pas observée en hiver. **En hiver**, on observe même une diminution de cette densité algale à l'amont de la Morcille. Il semble donc que dans les conditions hivernales (diminution

de la température et de l'intensité lumineuse globale) la vitesse du courant a un effet négatif sur le développement de la communauté algale. En hiver, on observe donc, comme de nombreux auteurs (Biggs et Thomsen, 1995 ; Biggs et Stokseth, 1996 ; Ghosh et Gaur, 1998), une corrélation négative entre la vitesse du courant et la densité algale. Cette diminution de la densité algale est accompagnée, en hiver, par une augmentation de la densité bactérienne. Cette stimulation peut être attribuée à un meilleur accès des bactéries aux ressources nutritives du fait de la baisse de compétitivité des autotrophes (DeLorenzo, 1999). Comme en été ces changements généraux de structure sont accompagnés d'une modification de la diversité bactérienne et algale.

En résumé, la croissance du périphyton est sous la contrainte conjointe de la saison d'échantillonnage et de la vitesse du courant (figure 63). L'effet de la vitesse du courant est variable selon la saison : en été, l'augmentation de la vitesse du courant stimule le développement du périphyton. A l'inverse, en hiver, cette perturbation inhibe le développement algal et, par un effet indirect, stimule la croissance bactérienne.

Existe-t-il, *in situ*, dans un contexte de complexité environnementale, des différences entre le périphyton amont et aval d'un cours d'eau contaminé (la Morcille) ?

La Morcille est une rivière dont le suivi des caractéristiques physico-chimiques a révélé une dégradation de la qualité de l'eau d'amont en aval (Gouy et Nivon, 2007, Montuelle *et al.*, 2006, Dorigo *et al.*, 2007). On observe en effet une augmentation de la conductivité (environ 150 à 280 $\mu\text{Sm}\cdot\text{cm}^{-1}$), du COD, de la teneur en NH_4^+ , NO_2^- et PO_4^{3-} . La teneur en pesticides augmente également d'amont en aval (0,68 à 4,02 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ en pesticides totaux). Tout ceci conduit à une dégradation de la qualité de l'eau passant de la classe « très bonne qualité » (vert) à « qualité moyenne » (jaune) selon le SEQeau. La teneur en pesticide est notamment l'un des principaux critères déclassant dans cette rivière. Les herbicides inhibiteurs du photosystème II (principalement le diuron et le monuron) sont particulièrement abondants au printemps tandis que les autres herbicides sont présents en hiver (notamment le norflurazon et ses produits de dégradation). Sur le bassin versant viticole de la Morcille, les herbicides sont appliqués de mars à avril alors que les fongicides le sont de mai à juillet (Gouy et Nivon, 2007). En été, du fait de la persistance des herbicides (notamment du diuron) dans les milieux et de l'application des fongicides, on a donc un mélange complexe de polluant contenant notamment des herbicides et des fongicides (de 15 à 20 produits sont détectés, en moyenne, lors d'analyse multirésidus). De plus, la teneur totale en pesticides

reste élevée même en dehors des périodes d'application ce qui suggère 1/ que les pesticides rejoignent la rivière par ruissellement, infiltration ou lessivage des sols, 2/ que les sols de ce bassin versant sont contaminés et 3/ que les produits utilisés sont persistants dans l'environnement.

En réponse à ces modifications de la qualité chimique de l'eau, au cours de notre étude, nous avons observé un changement de structure, de diversité et de fonctionnement du périphyton. En été comme en hiver, dans les zones lentes ou rapides, le périphyton de la zone aval est plus dense, plus diversifié, et plus productif. Ces résultats sont donc en accord avec ceux obtenus précédemment par Dorigo *et al.* (2007). Ces auteurs avaient également observé, au printemps comme en hiver, un changement de composition taxonomique bactérienne et algale. Dans leur étude, ces changements de composition étaient accompagnés d'une augmentation de la tolérance au diuron en aval (évaluation par la méthode PICT). Dans leur étude comme dans la notre, il est cependant impossible de distinguer l'effet isolé de chaque perturbation chimique : augmentation de la teneur en nutriments, en métaux lourds, en pesticides... Dans l'étude de Dorigo *et al.*, le PICT sur le Diuron permettait cependant de montrer l'augmentation de tolérance et donc la forte présomption de l'effet de cet herbicide. Ce qui n'exclue pas d'autres effets. De plus, durant notre étude en mésocosmes, nous avons déjà constaté une augmentation de densité cellulaire en lien avec la présence de diuron et d'azoxystrobine (chapitre 4C p 157-158 et figure 55) mais cet effet était accompagné d'une diminution de la production primaire. Au sein de la Morcille, cet impact sur la production primaire n'est pas observé. Il peut, par exemple, être masqué par un effet antagoniste lié à l'augmentation de la teneur en nutriment ou du COD.... Nous pouvons exclure l'influence des paramètres physiques sur la structure et le fonctionnement du périphyton car les sites échantillonnés sont comparables en terme d'intensité lumineuse, de substrats.

Au sein de la Morcille, le périphyton peut être sensible à l'augmentation de la teneur en nutriments (Schäfer *et al.*, 2001). Des changements de composition bactérienne ont souvent été imputés à la teneur en azote et phosphore (Lyautey *et al.*, 2003). Les bactéries et les algues composant le périphyton peuvent également être sensible à la présence de pesticides (Johnsen *et al.*, 2001 ; Knapp *et al.*, 2005, Pesce *et al.*, 2006 ; Tiili *et al.* 2008).

En résumé, les perturbations chimiques entre l'amont et l'aval de la Morcille entraînent une modification de la diversité, de la structure et du fonctionnement du périphyton. Globalement, en été comme en hiver, le périphyton en zone aval est plus dense, plus riche et plus productif que celui situé en zone amont (figure 63). Il semblerait que les effets « néfastes » des pesticides observés en mésocosmes,

notamment sur la production primaire, soient masqués par un effet antagoniste peut être lié aux variations de la teneur en nutriments.

Quelle importance ont les variations saisonnières et les variations d'hydraulique dans la réponse du périphyton à une dégradation de la qualité chimique de l'eau ?

Bien que l'on observe des différences de structure et de diversité du périphyton en fonction de la zone hydraulique et de la saison d'échantillonnage, l'impact d'une dégradation de la qualité chimique de l'eau sur le périphyton est identique et touche à la fois la communauté algale et bactérienne. Les variations des conditions environnementales (saison et vitesse de courant) ne sont pas à l'origine d'une structuration du périphyton modifiant la tolérance à une pollution chimique complexe. Et pourtant, au sein de nos mésocosmes, on observait une différence de réponse saisonnière du périphyton à la présence d'un mélange de diuron et d'azoxystrobine (cf chapitre 4B p ...), le périphyton étant plus impacté en été. De plus, *in situ*, entre des zones d'hydrauliques contrastées, on n'observe aucune différence de réponse à la pollution. Il semble que les espèces présentes dans les zones rapides soient aussi sensibles que celles des zones lentes. Bien que dans les zones lentes le périphyton soit principalement composé de diatomées, algues connues pour leur résistance à la présence de pesticides (El Jay, 1998), il est tout aussi impacté par la dégradation de la qualité chimique.

Les facteurs environnementaux extérieurs (vitesse du courant, saison...) créent donc de la diversité mais ces changements sont sans conséquence sur la réponse du périphyton à la dégradation de la qualité chimique.

En résumé, quelle que soit la saison ou la zone hydraulique, la dégradation de la qualité chimique de l'eau de la Morcille a le même effet sur le périphyton : changement de diversité algale et bactérienne, augmentation des productions et des densités cellulaires (figure 63). Il semble donc qu'*in situ*, la hiérarchisation proposée au chapitre 4B soit modifiée. La force structurante de la dégradation de la qualité chimique de l'eau serait plus importante que celle observée en mésocosmes. Une nouvelle hiérarchie peut être proposée à la vue de nos résultats :

- 1- dégradation de la qualité chimique de l'eau**
- 2- saison d'échantillonnage et vitesse du courant, en interaction**

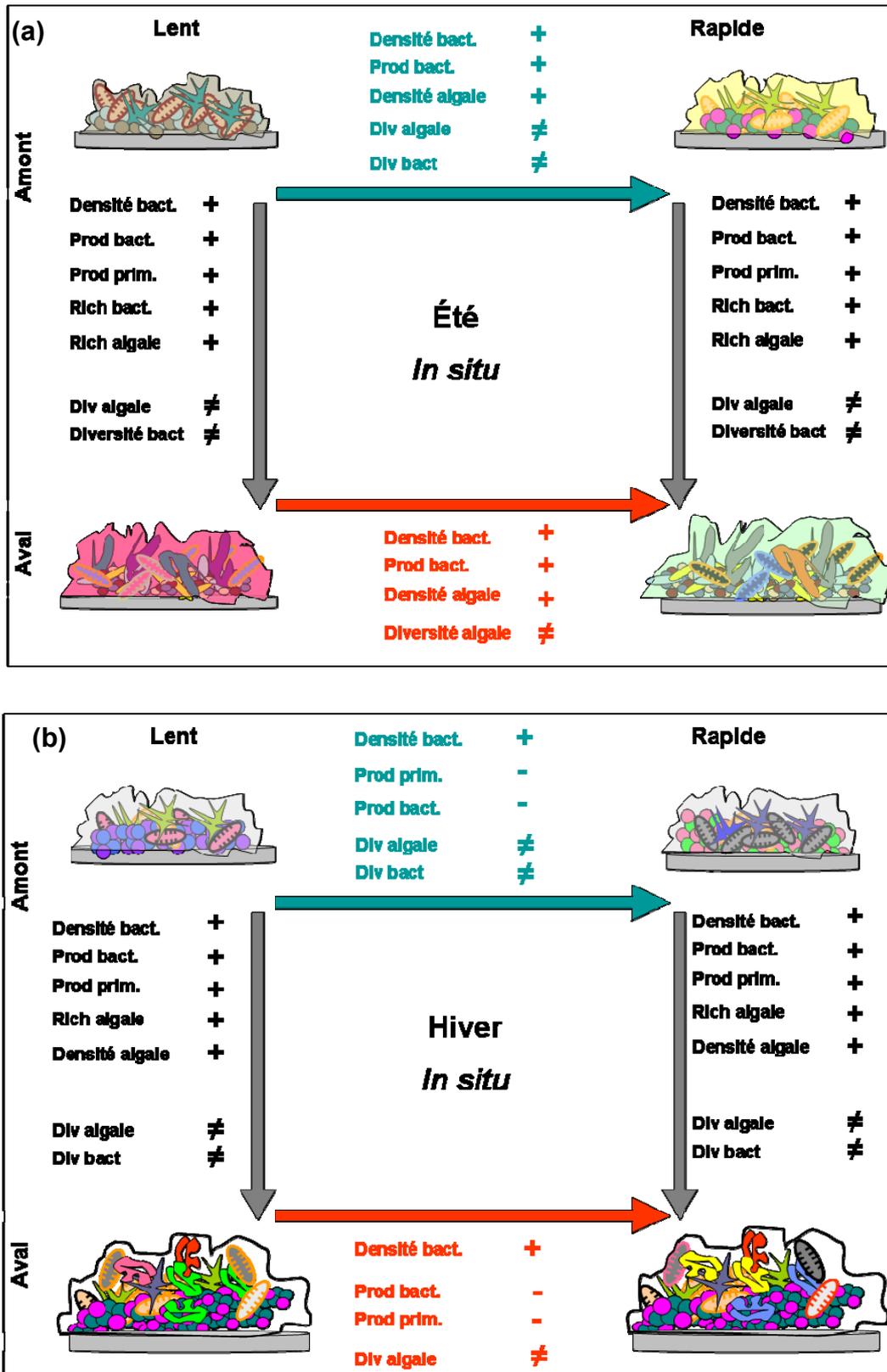


Figure 63 : Schéma bilan représentant les changements de structure et de diversité du périphyton en lien avec la localisation le long de la Morcille et la vitesse du courant en été (a) et en hiver (b). (+ : augmentation ; - = diminution et ≠ : changement). Les flèches représentent le sens de lecture

Discussion générale - Conclusions

Rappels des objectifs de la thèse :

- **En terme d'écologie** : Quelle sont les conséquences des modifications de diversité et/ou d'architecture du périphyton associées à des variations de facteurs physiques (naturels) sur la dynamique des communautés périphytiques et sur leur réponse à une perturbation (stress polluant) ?
- **En terme d'écotoxicologie** : Quel est l'impact de pesticides à de faibles concentrations sur les communautés périphytiques ? Comment mesurer cet impact de manière pertinente ?
- **En terme de gestion des milieux aquatiques** : Quelle stratégie d'échantillonnage en cours d'eau et quels bio-descripteurs faut-il mettre en oeuvre pour évaluer l'impact de xénobiotiques sur la qualité des milieux ?

Une analyse « transversale » des résultats, s'appuyant sur les différents niveaux d'études abordés (du microcosme à *l'in situ*) permet également de discuter des méthodologies expérimentales mises en oeuvre et des changements d'échelle réalisés.

Au cours de ce travail, nous avons donc montré que le fonctionnement du périphyton dépend de nombreux facteurs physiques et chimiques et de leurs interactions. Or, les processus écosystémiques assurés par cette communauté (productivité et cycle des nutriments) sont le résultat de l'expression de traits fonctionnels associés à la composition et la diversité des espèces présentes dans le périphyton. Au final, un changement de diversité en réponse à une pression environnementale peut donc avoir des conséquences directes sur ces processus. Cependant, il existe relativement peu d'études sur la relation entre la diversité et les perturbations de l'environnement pour le périphyton (pour exemple : Cardinale et al., 2006 ; Poulickova et al., 2008)

L'évaluation de l'importance du niveau de diversité du périphyton dans la résistance et la résilience de l'écosystème aquatique ainsi que l'évaluation du rôle des perturbations dans l'établissement de la diversité périphytique ont donc été les fils conducteurs de ce travail.

De nombreuses études ont été menées pour comprendre dans quelle mesure et par quels mécanismes le niveau de biodiversité d'un écosystème est important pour assurer un fonctionnement stable des systèmes biologiques. La plupart de ces études se sont intéressées aux macro-organismes, montrant que de forts niveaux de biodiversité peuvent accroître les performances des écosystèmes et que la biodiversité peut jouer un rôle dans la stabilité des écosystèmes face à une perturbation (Loreau *et al.*, 2001). Cependant, très peu d'études similaires ont été effectuées sur les micro-organismes. Hughes *et al.*, (2007) soulignent que la relation entre diversité et perturbations est une relation bilatérale qui peut être étudiée sous deux angles complémentaires :

- l'importance de la diversité dans la réponse à une perturbation que nous avons étudiée en observant l'impact des pesticides sur le périphyton dans différentes conditions environnementales,
- le rôle des perturbations dans la création de la diversité que nous avons étudié en observant cette diversité à différents niveaux de vitesse du courant et d'intensité lumineuse mais également en observant le résultat de l'effet de pesticides sur le périphyton.

Ces études ont toutes été menées dans des conditions « environnementales » en terme de concentration en pesticide, de vitesse de courant et d'intensité lumineuse.

A. Résistance, adaptation et résilience : une analyse des réponses des communautés périphytiques à la contamination

1- Le périphyton, une communauté complexe au carrefour d'interactions environnementales

La colonisation par un biofilm d'un support vierge est une opération complexe et dépendante de nombreux facteurs abiotiques (saison, vitesse du courant éclaircissement, nutriments, ...) (Biggs et Stokseth, 1996 ; Kiffney et Bull, 2000 et cette étude) mais également biotiques (inoculation microbienne, broutage, lyse virale...) (Cazaubon *et al.*, 1995 ; Hillebrand, 2002). La dynamique spatio-temporelle de cette communauté résulte de l'équilibre entre des processus d'accrétion (immigration et prolifération des cellules) et de perte (mort et/ou émigration). Cette dynamique conceptualisée par Biggs (1996) suit une courbe théorique en trois phases d'accumulation, de croissance puis de sénescence (Chapitre 1 figure 6). Au cours de nos expérimentations en mésocosmes, la dynamique du périphyton suivait bien ces trois phases en été, alors qu'elle apparaissait moins nettement en automne. Cependant, aux deux saisons, la résultante finale est identique : le périphyton atteint un stade climacique (Biggs, 2000). La succession des espèces est un autre élément important dans la dynamique du périphyton. Dans nos systèmes expérimentaux, en été comme en automne, les premières espèces à coloniser le support sont les diatomées, suivies, selon les conditions physiques, des chlorophycées et des cyanobactéries. Dans toutes ces études, le biofilm était donc considéré comme une communauté complexe (algues, bactéries...) et dynamique en interaction avec son environnement physique, chimique et biologique. Récemment, Battin *et al.* (2007), ont proposé un nouveau mode de description du biofilm qu'ils considèrent comme un « paysage » avec de nombreux points communs avec un paysage forestier. Cette notion est en fait une reformulation de la notion d'écosystème. C'est-à-dire, qu'ils décrivent les interactions entre les composantes biotiques et abiotiques du périphyton, ce qui *in fine* revient à considérer le biofilm comme un écosystème à part entière. Ainsi, la répartition spatiale de la biomasse du biofilm, sa diversité et son fonctionnement sont contraints par de nombreux facteurs biotiques et abiotiques (Sabater *et al.*, 1998; Biggs, 2000 ; Hillebrand et Sommer, 2000 ; Villeneuve *et al.*, soumis). Ces interactions sont reportées de manière résumée sur la figure 64. Un nouveau regard sur nos travaux nous permet d'observer certaines similitudes entre les caractéristiques d'un écosystème et le périphyton. Nous avons en effet montré que la dynamique temporelle du périphyton tendait à atteindre un stade climacique (Biggs, 2000 et Chapitre 4A figure 40) et que cette dynamique dépendait des conditions extérieures notamment de la vitesse du courant et de la saison d'observation. Nous avons également montré l'existence d'une

hétérogénéité spatiale du périphyton, en lien avec des changements de vitesse du courant. En effet, au sein de nos mésocosmes et sur notre site d'étude (la Morcille), le périphyton issu de zones lentes est différent de celui issu de zones rapides. Nos observations appuient les travaux de Battin *et al.* (2007) et nous autorisent à percevoir le périphyton comme un écosystème façonné à la fois par la vitesse du courant, l'intensité lumineuse et probablement par de nombreux autres facteurs non testés dans notre travail (la présence d'organismes brouteurs (Steinman *et al.*, 1987), la concentration en nutriments (Hillebrand and Sommer, 2000 ; Dodds *et al.*, 2003, etc...)).

Les facteurs physiques testés (intensité lumineuse et vitesse du courant) sont donc en partie à l'origine de la diversité périphytique. Certains de nos résultats sur l'effet des facteurs physiques sont cependant en contradiction avec la littérature notamment en ce qui concerne l'effet d'une diminution de l'intensité lumineuse (microcosmes). En effet, à l'inverse de nombreux auteurs (Steinman *et al.*, 1990 ; Hill et Fanta, 2008), nous n'observons pas de diminution de biomasse ou de richesse algale en lien avec la diminution de l'intensité lumineuse. Ces résultats s'éclairent à la vue des théories de l'écologie montrant notamment que l'effet d'une perturbation dépend à la fois de son intensité et de sa fréquence. C'est, par exemple, l'**hypothèse des perturbations intermédiaires** (Connell, 1978) selon laquelle des perturbations ayant une intensité et une fréquence intermédiaires favorisent la coexistence d'espèces compétitives et d'espèces pionnières moins compétitives. A contrario, des perturbations trop intenses et fréquentes sont la cause d'une réduction du nombre d'espèces et, dans ces conditions, seules quelques espèces pionnières adaptées sont capables de s'établir et de se maintenir. Dans l'évaluation de l'effet d'une perturbation il faut donc prendre en compte l'intensité et la fréquence de la perturbation appliquée, tout en gardant à l'esprit que la diversité initiale peut moduler l'effet de cette perturbation. Dans notre travail et ceux des auteurs cités ci-dessus, les intensités de perturbation se situeraient plutôt dans une gamme « intermédiaire » ; cependant, bien que quasiment identiques, ces perturbations n'ont pas les mêmes effets. Ces différences d'effet peuvent en partie s'expliquer par la nature du pool d'espèces initiales. Pour évaluer la place de nos travaux par rapport à cette hypothèse, nous pouvons comparer nos résultats à ceux d'auteurs ayant travaillé sur les mêmes perturbations mais à une intensité ou une fréquence plus importante. Ainsi, concernant le stress hydraulique appliqué dans notre étude (maximum 1 m.s^{-1}), les effets observés sont moindres en comparaison de ceux de Battin *et al.* en 2003 qui travaillaient avec une plus grande amplitude de variation des vitesses de courant. Ce constat laisse penser que nos travaux s'insèrent, en terme de perturbations hydrauliques, dans la théorie des perturbations intermédiaires et que, de fait, les modifications de vitesse du courant appliquées dans notre étude sont bénéfiques à l'établissement et au maintien de la diversité. Il en est de même pour les variations de l'intensité lumineuse et de la perturbation chimique

(pesticides). En effet, au sein de nos mésocosmes ou microcosmes, nous n'observons aucune perte de richesse algale ou bactérienne en présence ponctuelle de diuron. A *contrario*, une pollution chronique, même de faible intensité ($1 \mu\text{g.L}^{-1}$), provoque une diminution de la richesse bactérienne du périphyton en microcosmes (Chapitre 3 p 84). A l'inverse, une diminution de l'intensité lumineuse provoque une augmentation de la richesse bactérienne. Sur la base du nombre d'espèces, les trois facteurs testés au cours de ce travail semblent répondre à l'hypothèse des perturbations intermédiaires. Il semble en effet, que des variations de l'intensité lumineuse ou de la vitesse du courant de moyenne amplitude favorisent la co-existence des espèces.

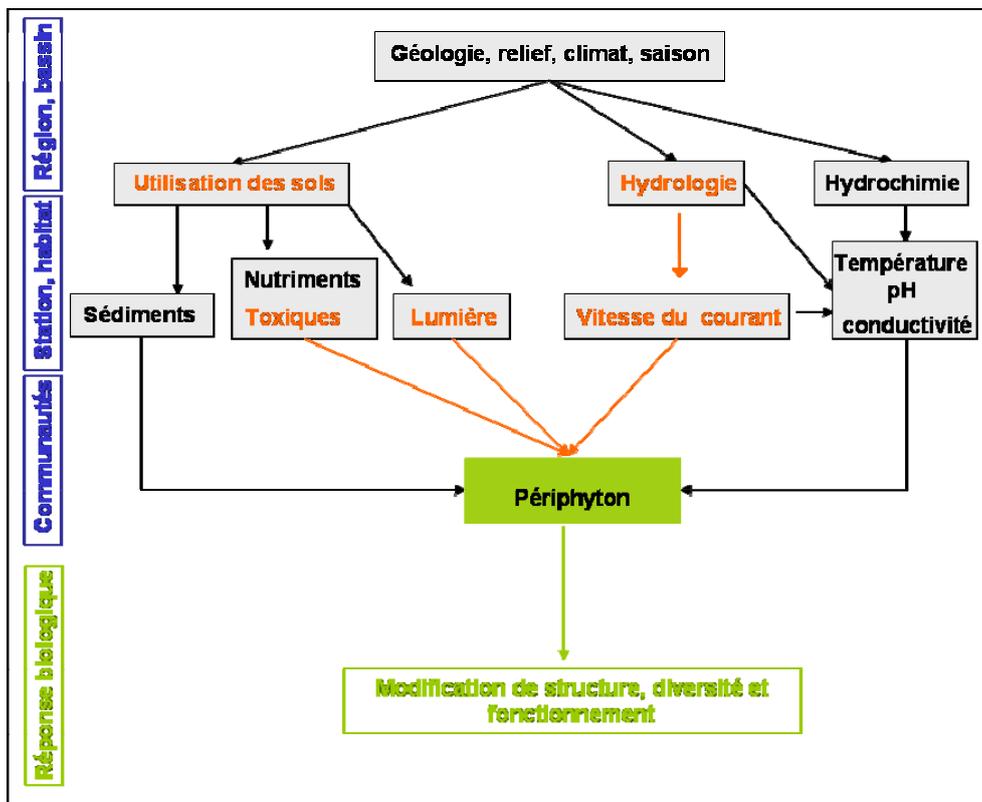


Figure 64 : Schéma conceptuel des variables influençant le développement du périphyton. Les flèches en orange représentent les interactions abordées au cours de ce travail (modifié d'après Tison, com. pers). La couleur orange représente les parties traitées au cours de cette thèse

Au cours de cette thèse, nous avons donc en partie analysé l'origine de la diversité périphytique. Les bactéries et les algues composant l'écosystème biofilm sont directement ou indirectement influencées par les variations de l'intensité lumineuse et de la vitesse du courant.

Au final, plus qu'une communauté biologique, le périphyton peut donc être perçu comme un écosystème hétérogène spatialement et temporellement. Ainsi, avec cette perception du périphyton, il est possible d'étudier les micro-organismes à travers les

principales théories de l'écologie écosystémique et ainsi de s'interroger sur le rôle de la diversité périphytique dans la réponse à la présence de pesticides.

La diversité créée par les perturbations peut-elle expliquer des différences de résistance et/ou de résilience face à une perturbation chimique ?

2- La diversité de l'écosystème périphytique est-elle un support de résistance à la présence de pesticides ?

Au cours de nos études en microcosmes et mésocosmes nous avons évalué la diversité du périphyton avant et après l'introduction de pesticides et ce pour différents scénarii de pression « environnementale » par les pesticides. Ainsi nous avons montré en microcosmes que le périphyton sous ombrage était moins impacté par la présence de diuron que celui situé à la lumière. Or, entre communautés à l'ombre et à la lumière, le nombre d'espèces d'algues était identique, seule changeait la composition spécifique. Au sein des mésocosmes, des différences de diversité ont été créées par modification du régime hydraulique. Nous avons ainsi observé que les rivières hétérogènes en terme d'hydraulique sont plus riches et plus diversifiées mais ne sont pas plus résistantes à la présence de pesticides que les rivières ayant un régime hydraulique homogène. Dans ces deux expériences, nous avons donc d'une part des communautés ayant la même richesse mais pas la même tolérance et d'autre part des communautés ayant la même tolérance mais pas la même richesse. Une augmentation de diversité (nombre d'espèces) ne rend donc pas le périphyton plus tolérant au mélange toxique, tout au moins aux concentrations appliquées et dans les conditions expérimentales de ces études. Cette observation ouvre un volet intéressant sur les relations entre biodiversité et fonctionnement des écosystèmes. Vaste questionnement en écologie, **le lien entre la biodiversité et les perturbations** a suscité de nombreuses études (Tilman *et al.*, 1994 ; Naeem *et al.*, 1994 ; Naeem et Li, 1997 ; Naeem *et al.*, 2000; Gessner *et al.*, 2004, Humbert et Dorigo, 2005; Smith, 2007). En 2007, Hughes *et al.* ont réalisé une synthèse des relations observées par de nombreux auteurs entre la diversité et les perturbations au sein de systèmes expérimentaux (figure 65). Il existe de nombreux exemples contradictoires de la relation entre diversité (richesse) et perturbation. L'effet de la perturbation peut être soit indifférent à la diversité (type I), soit diminué avec une augmentation de la diversité (type II) ou encore augmenté avec la diversité (type III). Les deux premières relations sont les plus fréquentes et dans notre travail, nous observons une relation de type I entre la diversité (richesse) et la réponse à une perturbation chimique (pesticides). Le nombre d'espèces ne semble pas modifier la résistance du périphyton au mélange polluant (diuron et azoxystrobine). En 2000, Mac Cann alimentait le débat en introduisant l'**hypothèse de biodiversité-stabilité** : si le

nombre d'interactions trophiques augmente au sein d'un écosystème, la résistance et la résilience de l'écosystème augmentent également. Les écosystèmes plus diversifiés auraient donc plus de chance de contenir des espèces résistantes aux perturbations qui pourraient compenser la perte fonctionnelle provoquée par la disparition d'autres espèces (redondance fonctionnelle). Cette hypothèse est également nommée l'hypothèse de l'assurance biologique (Yachi et Loreau, 1999). Or, au sein de nos mésocosmes (Chapitre 4C), le périphyton des canaux hétérogènes, bien que possédant plus d'espèces algales et bactériennes, et donc susceptible d'être moins perturbé par l'apport de pesticides, est tout aussi sensible que celui des autres canaux. Le gain de diversité n'a donc pas permis un gain fonctionnel, à l'échelle des paramètres testés. L'assemblage d'espèces dans le canal homogène conduit à la même résistance. On peut avancer comme explication que toutes les espèces nécessaires au bon fonctionnement du périphyton en présence de pesticides sont présentes à la fois dans le canal « hétérogène » et dans le canal « homogène ». De même au sein de nos microcosmes ombragés, où la biomasse et la production primaire sont moins impactées, il semble qu'une diminution de l'intensité lumineuse favorise l'installation d'espèces naturellement plus résistantes aux pesticides. Ces résultats s'inscrivent donc plutôt dans la logique de l'**hypothèse des espèces clés**, espèces qui subsisteraient dans les microcosmes quand les conditions lumineuses changent. Dans cette hypothèse, ce n'est donc pas tant le niveau de diversité (nombre d'espèces) qui importe, mais la présence ou l'absence de ces espèces clés. Ainsi, il semble que certaines espèces (souvent des diatomées) sont capables de se développer en présence de pesticides et permettent ainsi le maintien de la dynamique et du fonctionnement global du périphyton. Cette hypothèse est visible dans nos systèmes expérimentaux mais pas lors de notre étude sur le terrain. En effet, on n'observe pas de différence d'impact du gradient de pollution entre des zones lentes et rapides bien qu'il existe en situation propre des différences nettes de composition spécifique.

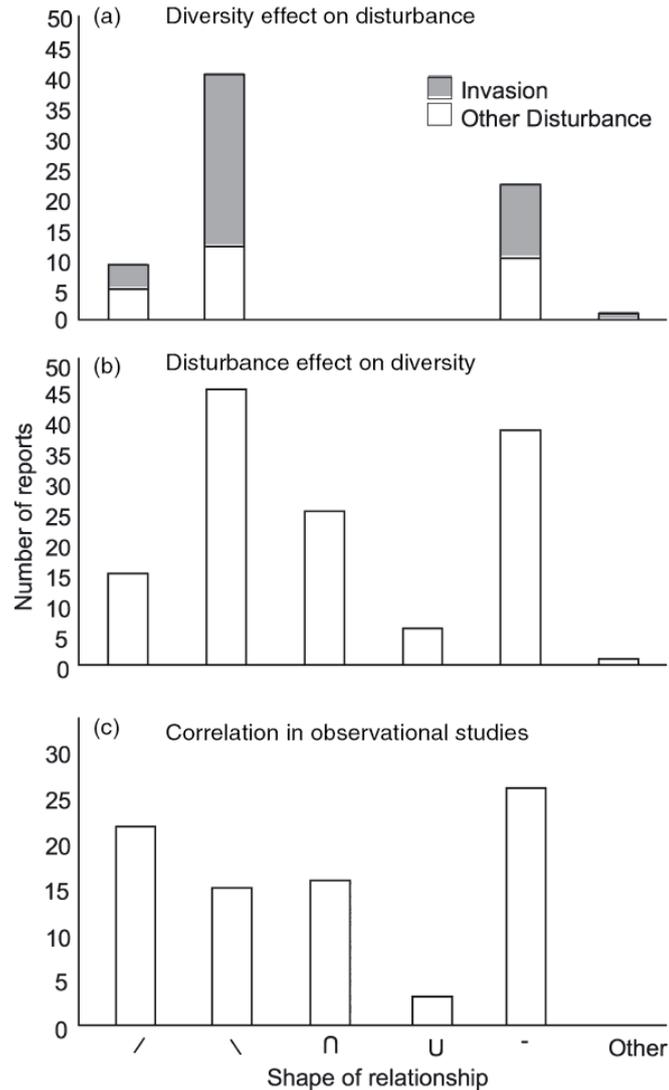


Figure 65 : Fréquence des différentes formes de relations entre diversité et perturbation (respectivement axe vertical et axe horizontal de la relation) reportées dans la littérature. (a) Effet de la diversité sur les perturbations. En gris, l'effet de la diversité sur le succès d'une invasion d'espèce, en blanc effet de la diversité sur le succès d'autres types de perturbations. Une relation négative indique que la diversité diminue l'effet de la perturbation ou de l'invasion. (b) Effets de perturbations sur la diversité. (c) Corrélation entre la perturbation et la diversité (Hughes *et al.*, 2007)

Une même valeur de diversité (richesse par exemple) peut donc être associée à des résistances différentes de réponse aux pesticides) selon les conditions environnementales qui l'ont généré. Ceci impose de s'interroger 1/ sur la pertinence de la métrique utilisée pour décrire cette biodiversité, et 2/ sur les conditions d'établissement de cette diversité. Le caractère multidimensionnel de la diversité rend par conséquent indispensable le recours à des outils permettant de l'évaluer en détail, mais impose une utilisation prudente de ces indicateurs. En effet, dans la mesure où ils ne donnent qu'une vision partielle des différentes composantes de la biodiversité, il conviendrait d'en combiner plusieurs (ou de définir un indicateur intégratif) pour

avoir une analyse robuste des tendances observées. Une démonstration univoque de ces hypothèses appliquées au périphyton pourrait s'appuyer sur des approches complémentaires de biologie moléculaire, de physiologie cellulaire et des tests d'écotoxicologie. A partir de ces différents éléments, il semble indispensable de ne pas restreindre la question du « rôle de la diversité dans le fonctionnement des écosystèmes » à des questions sur la relation entre diversité et fonctionnement, mais d'intégrer dans le questionnement la manière dont les contraintes environnementales (activités humaines, variables de contrôle physiques et chimiques) régissent les patrons et la dynamique de la diversité. Il semble également nécessaire d'évaluer et de hiérarchiser le poids respectif de la contrainte par les facteurs naturels du milieu et du stress créé par les pesticides.

3- Quel est le poids de la variabilité naturelle face à une perturbation de faible intensité?

Au vu de nos résultats et de la littérature, le périphyton peut s'interpréter comme un ensemble biologique et physique dynamique capable d'autorégulation (Bouletreau *et al.*, 2006). Chacune des espèces est incluse dans un réseau complexe d'interactions dynamiques vivant-vivant et vivant-physique. L'effet de ces interactions peut s'observer au niveau de la structure des communautés (types et nombre d'espèces présentes, distribution spatiale des espèces, organisation spatiale des constituants physiques) et/ou au niveau de leur fonctionnement (variation à court terme de la structure, échange de matière et d'énergie au sein du périphyton et avec le milieu aquatique). Ainsi, comme un écosystème, le périphyton possède à la fois des propriétés de stabilité (résistance et résilience) (Larsen, 1995 ; Loreau et Behera, 1999 ; Carpenter *et al.*, 2001) et des propriétés dynamiques (constance et persistance) (Abbadie et Lateltin, 2005). En absence de perturbation, l'état de la communauté oscille autour d'un état d'équilibre (figure 66 ; Partie 1 de la courbe). L'application d'une perturbation entraîne, selon son intensité et sa fréquence, une réponse biologique du périphyton (diminution de biomasse, changement de diversité...) (figure 66 ; Partie 2 de la courbe). La question se pose donc de pouvoir discriminer entre la variabilité naturelle du périphyton de l'effet d'une perturbation de faible intensité.

A cette question nous n'avons pas de réponse évidente à apporter. En effet, dans nos études en microcosmes, mésocosmes ou *in situ*, il semble que le poids des facteurs naturels, notamment de la saison d'échantillonnage ou de la dynamique temporelle hebdomadaire, soit prépondérant. Par exemple, au sein des mésocosmes, les variations temporelles (à l'échelle de la semaine) sont plus marquantes que les variations spatiales liées à la modification de la vitesse du courant à l'échelle du décimètre tandis que l'effet du

polluant est à peine perceptible. Aux faibles valeurs d'intensité de perturbation de cette étude, il semble donc que la variation naturelle du périphyton soit la cause majeure de sa dynamique. Cependant, l'évaluation de la perturbation par les pesticides en microcosmes et mésocosmes dépend de la métrique utilisée pour quantifier la réponse biologique. Par exemple, au sein de nos mésocosmes en automne et à une échelle globale (Chapitre 4C), avec la biomasse périphytique comme descripteur, nous observons uniquement la dynamique temporelle naturelle. En effet, la biomasse n'est pas influencée par une modification du régime hydraulique ou par l'introduction de pesticides. Ainsi, dans nos conditions d'essais, ce descripteur ne rend compte que de la variabilité naturelle du périphyton. *A contrario*, le choix de la production primaire comme « end-point » de mesure permet d'observer une diminution de ce descripteur fonctionnel liée à la présence des polluants.

La figure 66 et la discussion de la partie précédente soulignent également l'importance de la diversité (du type de communauté) dans la variation de la réponse biologique à une perturbation. Ainsi au sein de nos microcosmes, nous avons montré que la communauté issue des canaux sous ombrage est plus résistante à la présence de diuron. Guasch *et al.*, en 1997, observaient également une telle différence d'effet de l'atrazine entre des communautés de sites ombragés et de sites plus « dégagés ». Ce phénomène était aussi mis en évidence en présence de simazine par Millie *et al.* (1992).

A travers cette réflexion, nous voulons insister sur l'importance du choix des « end-points » de mesure et de la caractérisation des conditions environnementales lors de la perturbation mais également sur l'importance d'étudier la trajectoire de réponse et non pas simplement une réponse ponctuelle à un instant T donné. Nous avons, par exemple, pu observer qu'en fin d'expérimentation le niveau de certains descripteurs était identique quelles que soient les conditions testées n'indiquant alors plus aucun reflet de l'impact des polluants. Pourtant, les trajectoires empruntées par les communautés pour parvenir à une réponse finale identique, étaient différentes. Il suffit par exemple d'observer, au sein de nos mésocosmes et en été (Chapitre 4B, p 135), la trajectoire des différents descripteurs. Après 63 jours, la densité bactérienne est identique entre canal pollué et canal témoin alors que les trajectoires de ce descripteur sont différentes et que ces différences permettent de conclure à un effet du mélange polluant diuron + azoxystrobine.

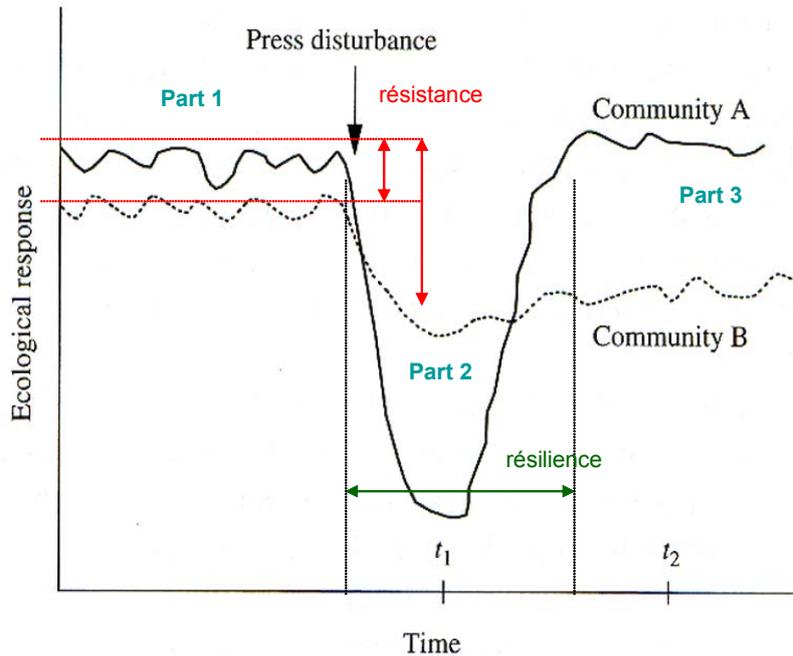


Figure 66 : Représentation schématique des caractéristiques de stabilité d'une communauté au cours du temps (Clements et Newman, 2002 modifié de Niemi *et al.*, 1990)

Il est donc difficile de différencier la variation naturelle des communautés de l'effet des polluants. Que ce soit en microcosmes, mésocosmes ou sur le terrain, il semble que les facteurs naturels, notamment de la dynamique temporelle (à l'échelle de la saison mais également de la semaine), aient un effet prépondérant. Cependant, ces travaux nous ont permis de mettre en évidence l'importance 1/ du choix des métriques utilisées, 2/ de l'étude de la trajectoire de réponse des communautés et 3/ de prendre en considération les autres facteurs « constructeurs » de ces communautés.

En résumé, ces travaux ont permis d'éclairer le lien entre perturbations physiques et diversité. La dynamique temporelle (biomasse, densité cellulaire, diversité...) du périphyton est contrôlée en partie par des modifications de vitesse du courant et d'intensité lumineuse. Ces changements vont provoquer une différence de réponse des communautés à la présence de pesticides. Nous avons donc répondu à nos deux premiers objectifs qui étaient 1/ d'évaluer les conséquences d'une modification de diversité et/ou d'architecture du périphyton provoquée par une variation de la vitesse du courant et de l'intensité lumineuse sur le fonctionnement et la réponse des communautés à la présence des pesticides et 2/ d'évaluer l'impact de pesticides à de faibles concentrations sur les communautés périphytiques. Ces réponses ouvrent de nouveaux questionnements sur le changement d'échelle dans l'évaluation de l'impact et dans le choix des biodescripteurs les plus pertinents.

B. Quelles informations peut-on tirer du changement d'échelle d'étude ?

Le concept d'échelle, tant spatiale que temporelle, occupe une place essentielle en écologie et en écotoxicologie car l'étude des phénomènes écologiques ne peut être abordée à une échelle unidimensionnelle (Ramade, 1992). En effet, certaines études ont montré que la relation entre biodiversité et fonctionnement des écosystèmes dépend de l'échelle spatiale d'observation. Ainsi, à une échelle locale, il existerait une relation entre les processus écosystémiques tandis qu'à une échelle plus large (du paysage à l'échelle régionale) la biodiversité affecterait principalement la stabilité et la résistance des écosystèmes (Humbert et Dorigo, 2005).

Au cours de cette thèse, nous avons effectué plusieurs types de « changement d'échelle ».

1- Complémentarité des différents systèmes étudiés : du bio-essai au terrain.

Nous avons complexifié notre système d'étude du test de laboratoire à *l'in situ* en passant par les microcosmes et mésocosmes. Le questionnement sous-jacent est de savoir quels sont les apports spécifiques des différents niveaux d'études ?

La simplification du système d'étude est habituellement destinée à augmenter la répétabilité des résultats et également à diminuer la variabilité liée à des facteurs non maîtrisés (Caquet *et al.*, 1996, figure 13). Mais qu'en est-il en réalité ? En comparant les coefficients de variation de trois des descripteurs utilisés aux différents niveaux d'étude, on remarque effectivement que la simplification du système d'étude permet globalement de diminuer ces coefficients de variation (tableau 48). Cette diminution dépend du descripteur et des conditions expérimentales. En effet, les coefficients de variations de la biomasse sont plus faibles au sein des microcosmes de laboratoire que ceux observés sur le terrain. *A contrario*, les coefficients de variation de la densité bactérienne restent relativement constants. Cependant, dans les mésocosmes (rivière homogène) ou *in situ* (zone amont lente) certaines conditions environnementales spécifiques génèrent une variation de la densité bactérienne ou de la production primaire du même ordre que celle observée dans les microcosmes de laboratoire.

Systèmes	Echelle d'observation	Saison	Perturbations	Coefficient de variation en %		
				Biomasse	Densité bactérienne	Production primaire
Microcosmes (n=3)	Globale		Lumière	12,1	28,8	22
			Ombre	9,4	9,6	34,6
Mésocosmes (n=3)	Locale	été	Lent	21,6	23,5	55,9
			Rapide	26,3	15,5	26,4
		Automne	Lent	24,6	23,9	35,2
			Rapide	20,8	25,5	29,4
	Globale	Automne	Hétérogène	23,2	23,6	20,9
			Homogène	15,4	22,1	14,5
In situ (n=5)	Locale	été	Lent	39,6	25,3	16,5
			Rapide	41,5	19,4	29,3
		Hiver	Lent	63,7	5,11	61,9
			Rapide	25,7	18,7	50,9

Tableau 48 : Coefficient de variation (en %) de la biomasse, la densité bactérienne et la production primaire au cours des expérimentations en microcosmes, mésocosmes et *in situ*.

La réduction de la taille du système expérimental ne génère donc pas toujours une amélioration de la reproductibilité des données. Toutes perturbations confondues, seule la biomasse semble intégrer un patron d'augmentation de la variabilité croissant avec l'échelle d'étude. Ceci conforte des résultats de Montuelle *et al.* 2006 qui, par comparaison d'activités microbiennes périphytiques entre une rivière et un canal expérimental placé en dérivation, avaient montré que la variabilité des résultats en cours d'eau était supérieure à celle obtenue en canal dans seulement 58% des cas. Le gain de précision attendu en contrôlant la taille d'une installation expérimentale n'est donc pas toujours obtenu.

Certaines hypothèses peuvent ainsi être émises afin d'expliquer ces résultats :

- les mésocosmes extérieurs sont également soumis à des variations climatiques et de qualité d'eau non contrôlés
- les écosystèmes étudiés sont complexes, constitués d'un assemblage de plusieurs communautés (bactéries, algues, champignons)... avec une dynamique et des facteurs de contrôle internes qui peuvent contribuer à la variabilité mesurée.
- enfin sur le terrain, les facteurs environnementaux peuvent s'exercer en antagonisme et se lisser mutuellement (ex les densités bactériennes).

Pour comparer la structure du périphyton à âge et une situation équivalents, nous comparons les résultats obtenus uniquement au sein des situations témoins des zones lentes à un instant *t* soit environ 42 jours : deuxième prélèvement au sein des microcosmes à la lumière, 4^{ème} dans les mésocosmes en été et prélèvement de terrain en été (tableau 49). On remarque une grande hétérogénéité de structure entre les différents systèmes d'études. Globalement, le périphyton se développant en mésocosmes est le plus dense et le plus riche en terme de communauté algale. La biomasse périphytique de la Morcille est très faible en

comparaison de celle obtenue dans nos microcosmes et mésocosmes. Par contre, la richesse bactérienne est identique dans tous les systèmes.

Systèmes	Biomasse (mg.cm ⁻²)	Densité bactérienne (10 ⁸ cells.cm ⁻²)	Densité algale (10 ⁶ cells.cm ⁻²)	Production primaire (µg C.h ⁻¹ .cm ⁻²)	Richesse algale	Richesse bactérienne
Microcosmes (n=3)	1,1	0,18	1,9	2,75	14	13
Mésocosmes (n=3)	35,5	19,9	7,84	1,45	24	12
In situ (n=5)	8,3 10 ⁻³	1,88	1,62 10 ⁻⁴	1,57	6	12

Tableau 49 : Valeurs de différents descripteurs de structure et de diversité après environ 42 jours de colonisation du périphyton pour les trois niveaux d'expérimentation (microcosmes, mésocosmes-été et *in situ*-été)

Ces résultats montrent que même des systèmes de mésocosmes complexes ne permettent pas de simuler un cours d'eau réel. Cependant, ces approches expérimentales permettent d'établir avec une certaine robustesse des relations de causalité. Ainsi, nous avons isolé l'effet d'une variation de l'intensité lumineuse ou de la vitesse du courant sur le périphyton. Ces deux facteurs entraînent chacun des modifications de la structure et de la diversité périphytique. Ces conclusions n'auraient pas été possibles *in situ* tant le nombre de facteurs en interaction est important. En effet, il est difficile sur le terrain (voire impossible) de définir des zones où seul un facteur varie. Les microcosmes et mésocosmes sont donc bien le maillon indispensable entre le test standardisé et les études *in situ* (Caquet *et al.*, 2000). Schulz *et al.* en 2002, avaient également conclu à la pertinence et au réalisme environnemental des rivières expérimentales dans l'évaluation de l'impact de pesticides sur les communautés aquatiques. Cependant, à l'inverse de nos résultats, les microcosmes présentaient une structure de biofilm similaire à celle observée sur le terrain. Dans nos travaux, même si les microcosmes sont alimentés avec l'eau du site d'étude (Chapitre 2 p 67), nous n'observons pas les mêmes structures de périphyton. Cependant, les taxons majoritaires sont identiques et essentiellement des diatomées. Ces résultats rejoignent ceux de Roeselers *et al.* (2006) qui observaient en effet de grandes différences de diversité entre l'inoculum de départ et la diversité en microcosmes.

En conclusion, nous rejoignons l'idée de nombreux auteurs que les expérimentations en microcosmes et mésocosmes ont une portée limitée mais importante pour l'étude de l'écologie des communautés et pour les études écotoxicologiques (Carpenter, 1996). Elles permettent en effet de tester les grandes théories de l'écologie en permettant de contrôler la diversité, les perturbations...

(Srivastava et al., 2004 ; Benton et al., 2007 et cette étude) ou encore, dans un objectif d'évaluation de l'impact, de contrôler la dose, le temps d'exposition et le mode d'application des polluants (Volatier, 2004 et cette étude). Ainsi, cet emboîtement de systèmes nous a permis d'isoler l'effet de l'intensité lumineuse et de la vitesse du courant sur le périphyton et ainsi d'obtenir des systèmes plus réalistes pour l'évaluation de l'impact du diuron et de l'azoxystrobine. Nous pouvons ainsi conclure qu'une faible modification de l'intensité lumineuse provoque principalement un changement de composition algale sans perte de richesse et une diminution de la richesse bactérienne. Les variations de la vitesse de courant quant à elles peuvent provoquer un changement de composition algale et de production bactérienne. Cependant, cette observation est dépendante de la saison d'échantillonnage et de l'échelle d'observation.

2- Changement d'échelle d'observation spatiale, en mésocosme ou *in situ*

Quelles sont les complémentarités des niveaux d'observation pour l'évaluation de l'impact des pesticides : locale (à l'échelle de la zone hydraulique décimétrique) ou plus globale (à l'échelle du mésocosme) ?

A partir de systèmes expérimentaux de type mésocosme, nous pouvons étudier la structure et la diversité du périphyton à différentes échelles spatiales. Nous avons ainsi, en mésocosmes (Chapitre 4A et B) et *in situ* (Chapitre 5), évalué les différences de structure et de diversité sur des patches (de l'ordre du décimètre) caractérisés par des vitesses de courant contrastées. Ensuite, nous avons observé l'effet de la présence de ces multitudes de patches sur le fonctionnement global des mésocosmes (Chapitre 4C). Au sein de nos mésocosmes, l'hétérogénéité spatiale (en terme de vitesse du courant) à une échelle décimétrique n'a pas permis de mettre en évidence de grandes différences entre zones lentes et rapides d'un même canal (automne). En observant les effets à l'échelle plus globale du canal, de fortes différences de diversité entre canal à flux homogène et canal à flux hétérogène ont été mises en évidence. Comme conclu précédemment, l'hétérogénéité spatiale est cruciale pour l'émergence de la biodiversité (Rainey et Travisano, 1998). L'échantillonnage de ces différents types de zones apparaît donc important pour avoir une meilleure perception de la structure et de la diversité du périphyton. Cette conclusion est d'autant plus vraie que, sur le site de la Morcille, les différences créées par les variations de la vitesse du courant sont déjà perceptibles à une échelle très réduite (Dorigo *et al.*, soumis). Dans le cas de notre travail, à une échelle supérieure et considérée comme locale pour la taille du cours d'eau (à l'amont de la Morcille, entre des zones lentes et rapides), nous avons également observé de fortes différences de structure et de diversité du périphyton.

Ces conclusions observées à différentes échelles auront des conséquences pour l'établissement d'un plan d'échantillonnage standardisé.

De plus, *in situ*, les pollutions sont très complexes et souvent composées de nombreuses molécules à des doses très faibles. Dans ce cas, comment évaluer l'impact réel de ces polluants sur le milieu ? Faut-il travailler avec les molécules majoritairement présentes ? Dans quelle mesure pouvons nous simplifier la pollution pour évaluer un risque réel et non plus potentiel ?

3- Le « changement d'échelle » au niveau des changements d'exposition :

d'abord une substance simple (diuron), puis un mélange binaire (diuron + azoxystrobine) et enfin, un mélange complexe *in situ*.

Nous avons montré dans nos études en microcosmes que l'introduction de diuron, à des doses très inférieures aux NOECs, entraîne pour les communautés bactériennes non cibles une augmentation de la densité cellulaire, une diminution de richesse et un changement de composition des deux compartiments biologiques étudiés (bactérien et algal). Ceci laisse penser que le développement de certaines souches bactériennes est favorisé par la présence de diuron. Ce résultat pourrait ultérieurement être approfondi par un séquençage afin de déterminer quelles sont ces espèces les plus « polluo-tolérantes ». Ces effets sont cependant modulés par le mode d'application du polluant. En effet, seule une exposition « chronique » entraîne de tels effets (Chapitre 3 p 92). On peut donc s'interroger sur l'effet cumulé de petites doses de différentes pollutions sur le périphyton ? De nombreux auteurs ont travaillé sur l'effet cumulé de pesticides avec d'autres pesticides, des métaux lourds ou encore avec d'autres xénobiotiques (Gatidou et Thomaidis, 2007, Koutsaftis et Aoyama, 2006, DeLorenzo et Serrano, 2006). Ils ont observé des effets tantôt antagonistes, synergétiques ou encore additifs de ces mélanges de polluants, mais ces résultats ont souvent été obtenus pour des doses élevées n'ayant pas toujours une grande réalité environnementale. Nous avons étudié l'effet cumulé d'un herbicide (le diuron) et d'un fongicide (l'azoxystrobine) dont les cibles sont deux composantes du périphyton (algues et champignons) à des doses inférieures aux NOECs algues. Contrairement à nos attentes, nous n'avons pas observé d'effets cumulés en présence de ce mélange. Il semble que cette complexification de pollution n'ait pas été suffisante en terme de dose, de temps d'application ou de type de molécules polluantes pour entraîner un impact différent de celui observé dans le cas d'une pollution simple liée au diuron. Par contre, sur le terrain, le cumul de l'amont à l'aval d'une pollution par des pesticides variés (de 0,68 à 4,02 $\mu\text{g.l}^{-1}$ en pesticides totaux, tableau 10 p 76), les métaux lourds (tableau 11 p 76), et la matière organique provoque des changements radicaux de diversité (changement de composition

algale et bactérienne et augmentation de la richesse) et de fonctionnement (augmentation des productions primaire et bactérienne).

En conclusion, *in situ*, un mélange complexe de polluants, dont certaines composantes unitaires sont inférieures aux NOECs (d'autres ne sont pas définies), génère un effet quantifiable, alors qu'au sein de nos mésocosmes, en isolant uniquement un type de substance parmi les molécules majoritairement présentes, ces effets sont plus difficilement quantifiables car proches des variations naturelles du périphyton.

C. Et la bioindication ?

Le dernier objectif de cette thèse est plus finalisé et rejoint des objectifs de gestion des milieux aquatiques, qui découlent de la mise en œuvre de la DCE. Il s'agit de préciser la potentialité d'utilisation du périphyton comme outil d'évaluation de l'état des milieux et de discuter l'apport des essais réalisés pour la compréhension du fonctionnement des écosystèmes aquatiques.

1- La spécificité des biofilms (taille, diversité...) permet-elle d'en faire un outil particulier dans l'évaluation de l'état des milieux ?

L'utilisation du périphyton comme indicateur d'un stress biotique ou abiotique est largement admis par la communauté scientifique (Schneider *et al.*, 1995 ; Griffith *et al.*, 2002 ; Sabater et Admiraal, 2005 ; Sabater *et al.*, 2007 ; et tableau 50). Il peut se justifier par des critères de pertinence écologique, tel que son rôle dans le cycle de la matière, mais aussi parce qu'il satisfait certains des critères énoncés par Cairns *et al* (1993) pour le choix des marqueurs biologiques (voir chap 2 p 32).

Ecotoxicological assessment	Test substance/(interaction)	Direct effects/modulation
Acute test on natural biofilms	Atrazine toxicity/light during growth	Low light during growth caused pigment changes (HPLC) and increased EC50 for atrazine
Experimental stream (re-circulated)	Cu/grazing	Reduced biomass (AFDW), changed pigments (HPLC), change of physiological profiles
Indoor microcosm (natural biofilms in aquaria)	Polluted stream water (Zn+Cd) biofilm age	Changed algal species composition, reduced photon yield/less effect with age
Indoor microcosm (natural biofilms in aquaria)	Zn, Cd/phosphate	Reduced algal biomass, changed diatom species/P compensated for metal toxicity
Acute test on natural biofilms	Municipal effluent	Increased photosynthesis (¹⁴ C) at low concentration, reduced photosynthesis (¹⁴ C) at higher concentration
Indoor microcosm	Isoproturon	Reduced algal density, changed algal species
Laboratory test and experimental stream	Hexazinone (2.7 mg L ⁻¹ 12 h)	Reduced photosynthesis (oxygen change), no effect on algal biomass
Indoor microcosm (flow-through aquaria) and acute test	Zinc toxicity	Reduced algal biomass, photosynthesis (¹⁴ C) at lower Zn levels than species composition and acute toxicity changes
Indoor experimental stream	Cd (10, 100 µg L ⁻¹)	Changed diatom species
Experimental stream "in situ"	Diluted, treated acid mine drainage	Increased algal biomass, no effect on algal species
Experimental stream (mesocosm)	Surfactant	No effect on algal biomass, pigments or species composition
Experimental stream	Atrazine/grazing	No direct effect; grazing increases atrazine toxicity—reduced photosynthesis (¹⁴ C incorporation) and algal density
Experimental stream	Cu (15 µg L ⁻¹)/velocity 1–50 cm s ⁻¹	Reduced algal biomass, and cell densities, changed algal species/moderate velocity increases Cu toxicity
Experimental stream	Cu (0–200 µg L ⁻¹)	Reduced algal biomass and photosynthesis (yield with the PAM), changed periphyton community
Outdoor flow-through aquaria and acute test	Cu (0–1 µmol L ⁻¹), 12 weeks	Change periphyton community, increased Cu, Zn, Ni, Ag tolerance
Experimental stream	Zn (0–1000 µg L ⁻¹)	Changed algal species (Zn>50 µg L ⁻¹)
Experimental stream "in situ"	Herbicide velpar (145–432 µg L ⁻¹)	Reduced productivity (oxygen change/chl), no effect on biomass and species composition
Experimental stream	Alkyl sulfates (AS) 57–419 µg L ⁻¹	C14.4AS increased photosynthesis (¹⁴ C incorporation), changed algal species
Natural experiment	Zn pollution (mining area)	Lower community metabolic production (GPP, and NPP and CR measured with O ₂ change) with increasing metal concentrations.
Natural experiment	Metal pollution (mining area, Cu, Pb)	Changed algal species
Natural experiment	Metals (mining spill accident)	Changed diatom species
Natural experiment	Cu, Zn (mining area)	Reduced species abundance and richness
Natural experiment	Metal pollution (Cd, Cu, Pb, Ag, Zn)	Reduced algal biomass; no effect on primary production (GPP)
Routine sampling	Field exposure in the field to different pollution levels	Changes in algal species at high metal concentrations (expressed as cumulative criterion units, CCU)
Routine sampling	Field exposure in the field to different pollution levels	Metal pollution not related to diatom indices, only related to cell abundance
Acute test and chronic exposure in the field	Environmental exposure in the field to different pollution levels	No clear direct effect; increased EC50 after higher atrazine and nutrient exposure
Acute test and chronic exposure in the field	Field exposure in the field to different pollution levels	Difference in Zn tolerance (measured with acute test on ¹⁴ C incorporation) attributed to biogeography and water chemistry
Acute test and chronic exposure in the field	Herbicide exposure in agricultural stream	Increased tolerance because of pre-exposure. Tolerance induction measured with acute toxicity tests using ¹⁴ C incorporation, photon yield, and relative yield (PAM)
Acute test and chronic exposure in the field	Zn, Cd polluted river	No clear effect of exposure on tolerance induction. Tolerance induction measured with acute toxicity tests using ¹⁴ C incorporation

Tableau 50 : Approches expérimentales utilisant le biofilm pour évaluer l'effet de toxiques sur le biofilm. Ces expérimentations ont été réalisées sur le terrain ou en mésocosmes. Sabater et al. (2007)

L'utilisation du périphyton comme bio-indicateur permet donc un large choix de descripteurs qui peuvent permettre de discriminer les variations naturelles des variations liées à différents toxiques. Cependant, cette étude fait émerger la nécessité de prendre

quelques précautions concernant l'utilisation du périphyton comme bio-indicateur de la qualité des milieux aquatiques.

En effet, en ce qui concerne l'évaluation de l'impact de pesticides sur le périphyton, nos travaux ont montré :

1/ l'importance de la diversité initiale dans la réponse à la pollution. Ainsi, il nous apparaît très important de prendre en compte les conditions d'établissement de la diversité périphytique (environnement physique notamment), c'est à dire son historique et les réponses à la pollution,

2/ l'importance du choix des métriques et du couplage de différentes techniques pour décrire l'effet des polluants. Ce point a été déjà appuyé par Sabater *et al.*, 2007, dans une revue concernant la surveillance de l'effet de xénobiotiques sur le périphyton. Ils montraient en effet que le choix du descripteur dépendait du type d'effets recherchés. Ainsi, pour mesurer des effets aigus, ils conseillaient de s'appuyer plutôt sur des approches physiologiques (activité photosynthétique, mesures d'activité d'enzymes extracellulaires...). Des effets chroniques peuvent, quant à eux, altérer d'autres descripteurs comme la biomasse, le taux de croissance ou encore la composition spécifique. Nous compléterons cette remarque par le fait que le descripteur choisi doit être plus sensible à la perturbation appliquée qu'au facteur naturel contrôlant le périphyton. Par exemple, dans le cas de nos études, nous excluons l'utilisation de la biomasse périphytique (matière sèche sans cendre) pour évaluer la réponse à l'application de diuron et d'azoxystrobine à faibles doses compte tenu de la forte variabilité naturelle de ce descripteur. *A contrario*, nous rejoignons l'idée de Sabater *et al.* (2007) qui indiquent que la composition spécifique de la communauté est un bon indicateur de pollution chronique, même à très faibles doses. Dans toutes nos études, la pollution chronique a en effet conduit à un changement de composition algale et/ou bactérienne.

3/ La pertinence d'étudier la trajectoire de réponse du périphyton et non pas de travailler en un seul point final de mesure comme de nombreuses études citées dans le tableau 50. En effet, le périphyton est une communauté dynamique qui a des capacités de résilience plus ou moins rapides selon la perturbation appliquée. Ainsi, en observant uniquement un état initial et un état final après perturbation, du fait des capacités du périphyton à endurer une perturbation, nous risquons de manquer un effet transitoire produit par les pesticides.

2- Peut-on proposer un protocole d'évaluation d'effet de substances polluantes sur une base d'étude multi-échelle ? Quelles sont les perspectives de recherche à court terme ?

A la vue de ces résultats et discussions il apparaît indispensable de standardiser les méthodes d'études de l'effet des polluants sur le périphyton. Nous tenterons donc, pour conclure ce travail, de proposer une ébauche de protocole d'évaluation d'effets de substances sur une base multimétrique et de préciser les conditions d'échantillonnage nécessaires à la meilleure mise en évidence possible de l'impact des pesticides sur le périphyton.

En regroupant tous les résultats il apparaît indispensable de ne pas limiter l'évaluation de l'impact de pesticides aux seuls bio-essais standardisés de laboratoire. Des approches plus réalistes permettant la prise en compte des interactions entre facteurs semblent indispensables à plus de pertinence environnementale. Ainsi, les expérimentations en mésocosmes installés en extérieurs semblent être adaptées à ce type de questionnement à condition d'en standardiser l'utilisation.

Même si nous n'avons pas abordé ce sujet dans la discussion, le premier niveau de standardisation doit concerner le type de support de croissance du biofilm (ce sujet a cependant été longuement abordé dans le Chapitre 2 p 36-38). Pour les études écotoxicologiques, de nombreux auteurs admettent que ce sont les lames de verre à surface rugueuse qui sont les substrats les plus adaptés (Admiraal et al., 1999 ; Guasch et al., 2003).

Contrairement à Blanck et Dahl (1996) qui suggèrent de travailler uniquement sur le biofilm jeune nous pensons qu'il serait plus judicieux d'étudier sa dynamique. Pour cela, il faudrait définir une durée et un intervalle entre prélèvements adaptés afin de pouvoir observer à la fois les capacités de résistance et de résilience du périphyton. Une durée de deux mois semble être suffisante pour observer ces deux caractéristiques. Par contre nous suggérons d'observer l'effet des pesticides à intervalles plus rapprochés, notamment sur les descripteurs physiologiques. D'autres techniques que celles utilisées au cours de ce travail pourraient le permettre par des mesures *in vivo* (par exemple : mesures de photosynthèse par fluorescence avec un appareil tel que le Phyto PAM).

Parallèlement au choix du substrat, de la durée et de l'intervalle des prélèvements, une étape importante est le choix des descripteurs. Nous recommandons, comme d'autres auteurs (Sabater *et al.*, 2007), de coupler les approches structurelles et fonctionnelles. Ces descripteurs sont évidemment à choisir en fonction du type d'action des molécules testées. Dans le cas du diuron (inhibiteur du photosystème II), il est intéressant, d'étudier à la fois la structure globale du périphyton mais également de réaliser un « zoom » sur la diversité et le

fonctionnement du compartiment algal (cible de l'herbicide) et sur le compartiment bactérien (non cible mais ayant des relations directes avec le compartiment algal au sein du biofilm). En terme de diversité une approche par empreinte génétique (DGGE) couplée à de la microscopie est très adaptée, la DGGE permettant une visualisation rapide mais peu précise de l'état de la diversité tandis que la microscopie permet de calculer des indices de diversité et d'identifier les espèces clés. L'étude microscopique aurait également pu être approfondie par l'observation des formes tétragènes chez les diatomées (Morin, 2006). La diversité algale comme la diversité bactérienne auraient également pu être caractérisées plus complètement par clonage-séquençage, approche qui présente cependant un coût plus élevé.

A l'inverse des descripteurs de diversité et de fonction, les descripteurs utilisés pour étudier la structure du périphyton (densité cellulaire et biomasse) ne se révèlent pas assez sensibles pour l'étude des effets de faibles doses de pesticides. Ainsi, d'autres pistes pourraient être explorées : comme le dosage des exopolysaccharides et des autres composants de la matrice (Battin et Sengschmitt, 1999), la mesure de l'épaisseur du biofilm par microscopie (Battin *et al.*, 2003).

Les descripteurs de fonctionnement (la production primaire et la production bactérienne) sont deux méthodes qui, bien que délicates et présentant une assez forte variabilité au niveau des résultats, sont sensibles et répondent rapidement à la présence des pesticides testés.

Enfin, il apparaît nécessaire de bien connaître le milieu naturel récepteur des molécules testées, d'identifier les facteurs dominants au sein de ce milieu, afin de revenir vers les systèmes expérimentaux avec suffisamment d'informations pertinentes pour amorcer, si nécessaire, des études telles que celles décrites ci-dessus (caractéristiques physiques, nature et concentration des polluants...). Les questionnements écologiques et écotoxicologiques nécessitent donc des approches itératives entre le terrain et le laboratoire. C'est la démarche que nous avons appliquée pour comprendre l'écosystème anthropisé qu'est la Morcille. Cette rivière relativement ombragée présente des zones de vitesse très contrastées au sein d'un bassin versant progressivement dominé par l'activité viticole. Il était donc intéressant d'évaluer l'effet interactif de l'intensité lumineuse, de la vitesse du courant et des pesticides sur le périphyton. Cependant, nous avons observé une forte différence de réponse entre le périphyton dans nos microcosmes et mésocosmes et le périphyton de la Morcille. Une hypothèse est que les rejets domestiques, qui augmentent également d'amont en aval, sont un autre facteur de confusion possible. Ainsi, dans un avenir proche, il serait donc intéressant de conjuguer, à ces trois facteurs, l'effet de l'enrichissement en nutriments (observé sur le site de la Morcille) afin de rendre les futurs essais plus réalistes.

Pour résumer, dans le cas d'études sur les processus écologiques et l'effet des facteurs naturels sur le périphyton, les microcosmes et mésocosmes répondent parfaitement aux objectifs. Ainsi, nous avons déterminé, d'une part, le lien entre variations de l'intensité lumineuse et de la vitesse du courant et les modifications de la diversité et de la structure du périphyton et, d'autre part, montré la complémentarité et les limites respectives des différents systèmes d'étude mis en oeuvre. Quel que soit le système expérimental testé, une connaissance approfondie des milieux récepteurs, une stratégie d'échantillonnage et une standardisation des approches sont nécessaires à la validation d'outils appropriés pour la bioindication. Dans un second temps, une prise en compte des coûts et de la facilité de mise en œuvre pourra intervenir pour en faciliter la généralisation.

Références bibliographiques

- Abbadie L. and Lateltin E., 2005, Biodiversité, fonctionnement des écosystèmes et changements globaux. In Biodiversité et Changement globaux. ADPF, 80-100.
- Admiraal, W., Blanck, H., Buckert-De Jong, M., Guasch, H., Ivorra, N., Lehmann, V., Nystrom, B. A. H., Paulsson, M. and Sabater, S. 1999. Short-term toxicity of zinc to microbenthic algae and bacteria in a metal polluted stream. - *Water Research* 33: 1989-1996.
- Ainsworth A.M. and Goulder R. 2000, Epilithic and planktonic leucine aminopeptidase activity and leucine assimilation along the River Tweed, Scottish Borders. *The Science of the Total Environment*, 251-252:83-93.
- Akagi, H., Grandjean, P., Takizawa, Y. and Weihe, P. 1998, Methylmercury dose estimation from umbilical cord concentrations in patients with Minamata disease. - *Environmental Research* 77: 98-103.
- Amann R.I., Krumholz L., Stahl D.A., 1990, Fluorescent-oligonucleotide probing of whole cells for determinative, phylogenetic, and environmental studies in microbiology. *J. Bacteriol.*, 172, 762-770.
- Amann, R. (2000). "Who is out there? Microbial Aspects of Biodiversity." *Systematic and Applied Microbiology*. 23(1): 1-8.
- Anderson M. J. , 1995, Variations in Biofilms Colonizing Artificial Surfaces. *Journal of the Marine Biological Association* 75 : 705–714.
- Arrhenius, A., Gronvall, F., Scholze, M., Backhaus, T. and Blanck, H. 2004. Predictability of the mixture toxicity of 12 similarly acting congeneric inhibitors of photosystem II in marine periphyton and epipsammon communities. - *Aquatic Toxicology* 68: 351-367.
- Azam, F., Smith, D. C., Steward, G. F. and Hagstrom, A. 1994. Bacteria - Organic-Matter Coupling and Its Significance for Oceanic Carbon Cycling. - *Microbial Ecology* 28: 167-179.
- Backhaus, T., Arrhenius, A. and Blanck, H. 2004. Toxicity of a mixture of dissimilarly acting substances to natural algal communities: Predictive power and limitations of independent action and concentration addition. - *Environmental Science & Technology* 38: 6363-6370.
- Baines, S.B., and Pace M.L., 1991, The production of dissolved organic carbon by phytoplankton and its importance to bacteria -- patterns across marine and fresh-water systems. *Limnology and Oceanography* 36(6):1078-1090.
- Barranguet, C. and Kromkamp, J. 2000. Estimating primary production rates from photosynthetic electron transport in estuarine microphytobenthos. - *Marine Ecology-Progress Series* 204: 39-52.
- Barranguet, C., Plans, M., van der Grinten, E., Sinke, J. J. and Admiraal, W. 2002. Development of photosynthetic biofilms affected by dissolved and sorbed copper in a eutrophic river. - *Environmental Toxicology and Chemistry* 21: 1955-1965.
- Battin, T. J. and Sengschmitt, D. 1999. Linking sediment biofilms, hydrodynamics, and river bed clogging: Evidence from a large river. - *Microbial Ecology* 37: 185-196.
- Battin, T. J., Kaplan, L. A., Newbold, J. D. and Hansen, C. M. E. 2003a, Contributions of microbial biofilms to ecosystem processes in stream mesocosms. - *Nature* 426: 439-442.
- Battin, T. J., Kaplan, L. A., Newbold, J. D., Cheng, X. H. and Hansen, C. 2003b. Effects of current velocity on the nascent architecture of stream microbial biofilms. - *Applied and Environmental Microbiology* 69: 5443-5452.
- Battin, T. J., Sloan, W. T., Kjelleberg, S., Daims, H., Head, I. M., Curtis, T. P. and Eberl, L. 2007, Microbial landscapes: new paths to biofilm research. - *Nature Reviews Microbiology* 5: 76-81.

- Beare, M. H., Coleman, D. C., Crossley, D. A., Hendrix, P. F. and Odum, E. P. 1995. A Hierarchical Approach to Evaluating the Significance of Soil Biodiversity to Biogeochemical Cycling. - *Plant and Soil* 170: 5-22.
- Belanger, S. E., Bowling, J. W., Lee, D. M., LeBlanc, E. M., Kerr, K. M., McAvoy, D. C., Christman, S. C. and Davidson, D. H. 2002, Integration of aquatic fate and ecological responses to linear alkyl benzene sulfonate (LAS) in model stream ecosystems. - *Ecotoxicology and Environmental Safety* 52: 150-171.
- Belanger, S. E., Guckert, J. B., Bowling, J. W., Begley, W. M., Davidson, D. H., LeBlanc, E. M. and Lee, D. M. 2000, Responses of aquatic communities to 25-6 alcohol ethoxylate in model stream ecosystems. - *Aquatic Toxicology* 48: 135-150.
- Benton, T. G., Solan, M., Travis, J. M. J. and Sait, S. M. 2007. Microcosm experiments can inform global ecological problems. - *Trends in Ecology & Evolution* 22: 516-521.
- Bérard, A., Dorigo, U., Humbert, J. F., Leboulanger, C. and Seguin, F. 2002, La méthode PICT (Pollution-Induced Community Tolerance) appliquée aux communautés algales : intérêt comme outil de diagnose et d'évaluation du risque écotoxicologique en milieu aquatique. - *Annales de limnologie* 38: 247-261.
- Bérard, A., Pelte, T., Menthon, E., Druart, J. C. and Bourrain, X. 1998. Characterisation of phytoplankton from two limnic systems contaminated by a herbicidal photosynthetic inhibitor. The PICT method (Pollution-Induced Community Tolerance): application and significance. - *Annales De Limnologie-International Journal of Limnology* 34: 269-282.
- Besemer, K., Singer, G., Limberger, R., Chlup, A. K., Hochedlinger, G., Hodl, I., Baranyi, C. and Battin, T. J. 2007. Biophysical controls on community succession in stream biofilms. - *Applied and Environmental Microbiology* 73: 4966-4974.
- Biggs B.J.F. and M. E. Close. 1989. Periphyton biomass dynamics in gravel bed rivers: The relative effects of flows and nutrients. *Freshwater Biology*, 22: 209–231.
- BIGGS B.J.F., 2000, New Zealand periphyton guideline : detecting, monitoring and managing enrichment of streams. Ministry for the Environment, 121 p.
- Biggs B.J.F., 1995, The contribution of flood disturbance, catchment geology and land use to the habitat template of periphyton in stream ecosystems. *Freshwater biology*, 33, 419-438.
- Biggs, B. J. F. 1996. Hydraulic habitat of plants in streams. - *Regulated Rivers-Research & Management* 12: 131-144.
- Biggs, B. J. F. and Hickey, C. W. 1994. Periphyton Responses to a Hydraulic-Gradient in a Regulated River in New-Zealand. - *Freshwater Biology* 32: 49-&.
- Biggs, B. J. F. and Stokseth, S. 1996. Hydraulic habitat suitability for periphyton in rivers. - *Regulated Rivers-Research & Management* 12: 251-261.
- Biggs, B. J. F. and Thomsen, H. A. 1995. Disturbance of Stream Periphyton by Perturbations in Shear-Stress - Time to Structural Failure and Differences in Community Resistance. - *Journal of Phycology* 31: 233-241.
- Biggs, B. J. F., Goring, D. G. and Nikora, V. I. 1998. Subsidy and stress responses of stream periphyton to gradients in water velocity as a function of community growth form. - *Journal of Phycology* 34: 598-607.
- Blandin P., 1986, Bioindicateurs et diagnostic des systèmes écologiques. *Bulletin d'Ecologie*, 17, 215-307.
- Borchardt M.A.,1996, Nutrients. In: *Algal Ecology* R.J. Stevenson, M.L. Bothwell & R.L. Lowe). Academic Press, California.

- Borgmann, U., Norwood, W. P. and Dixon, D. G. 2004. Re-evaluation of metal bioaccumulation and chronic toxicity in *Hyalella azteca* using saturation curves and the biotic ligand model. - *Environmental Pollution* 131: 469-484.
- Bothwell M.L., 1989, Phosphorus-limited growth dynamics of lotic periphytic diatom communities: aerial biomass and cellular growth rate responses. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*. 46:1293-1301.
- Bott, T. L., 1996, Primary productivity and community respiration, p. 533-556. In F. R. Hauer and G. A. Lamberti (ed.), *Methods in stream ecology*. Academic Press, San Diego, CA
- Bouletreau, S., Garabetian, F., Sauvage, S. and Sanchez-Perez, J. M. 2006. Assessing the importance of a self-generated detachment process in river biofilm models. - *Freshwater Biology* 51: 901-912.
- Brading, M.G., J. Jass, and H.M. Lappin-Scott, 1995, Dynamics of Biofilm Formation, In H.M. Lappin-Scott and J.W. Costerton (Eds.), *Microbial Biofilms, Plant and Microbial Biotechnology Research Series, 5*, Cambridge University Press, Cambridge, pp. 46-63.
- Brock, T. C. M., Roijackers, R. M. M., Rollon, R., Bransen, F. and Vanderheyden, L. 1995. Effects of Nutrient Loading and Insecticide Application on the Ecology of Elodea-Dominated Fresh-Water Microcosms .2. Responses of Macrophytes, Periphyton and Macroinvertebrate Grazers. - *Archiv Fur Hydrobiologie* 134: 53-74.
- Browder, J.A., Gleason, P.J. and Swift, D.R., 1994. Periphyton in the Everglades: spatial variation, environmental correlates, and ecological implications. In: Davis, S.M., Ogden, J.C. (Eds.), *Everglades: The Ecosystem and its Restoration*. St. Lucie Press, Delray Beach, FL, pp. 379-418.
- Brummer, I. H. M., Fehr, W. and Wagner-Dobler, I. 2000. Biofilm community structure in polluted rivers: Abundance of dominant phylogenetic groups over a complete annual cycle. - *Applied and Environmental Microbiology* 66: 3078-3082.
- Buckling, A., Kassen, R., Bell, G. and Rainey, P. B. 2000. Disturbance and diversity in experimental microcosms. - *nature* 408: 961-964.
- Buesing, N. and Gessner, M. O. 2003. Incorporation of radiolabeled leucine into protein to estimate bacterial production in plant litter, sediment, epiphytic biofilms, and water samples. - *Microbial Ecology* 45: 291-301.
- Burkholder J.M., 1996, Interactions of benthic algae with their substrata. In : STEVENSON R.J., Bothwell M.L. et Lowe R.L. *Algal ecology : freshwater benthic ecosystems*. Academic Press, pp. 253-297.
- Burkholder J.M., Wetzel R.G. and Klomparens K.L., 1990, Direct comparison of phosphate uptake by adnate and loosely attached microalgae within an intact biofilm matrix, *Applied of Environmental Microbiology*. 56 : 2882-2890.
- Cairns J. Mc Cormic P.V. and Niederlehner B.R.,1993, A proposed framework for developing indicators of ecosystem health. *Hydrobiologia*, 263, 1-44.
- Cairns Jr J., Bidwell J.R. and Arnegard M.E., 1996, Toxicity testing with communities : microcosms, mesocosms, and whole-system manipulations. *Reviews of Environmental Contamination and Toxicology*, 147 : 45-69.
- Campbell, C. G., Garrido, F., Illera, V. and Garcia-Gonzalez, M. T. 2006. Transport of Cd, Cu and Pb in an acid soil amended with phosphogypsum, sugar foam and phosphoric rock. - *Applied Geochemistry* 21: 1030-1043.
- CannaMichaelidou, S. and Nicolaou, A. S. 1996. Evaluation of the genotoxicity potential (by Mutatox(TM) test) of ten pesticides found as water pollutants in Cyprus. - *Science of the Total Environment* 193: 27-35.

- Caquet, T., Lagadic, L. and Sheffield, S. R. 2000. Mesocosms in ecotoxicology (1): Outdoor aquatic systems. - In: Reviews of Environmental Contamination and Toxicology, Vol 165, pp. 1-38.
- Caquet, T., Lagadic, L., Jonot, O., Baturu, W., Kilanda, M., Simon, P., LeBras, S., Echaubard, M. and Ramade, F. 1996. Outdoor experimental ponds (mesocosms) designed for long-term ecotoxicological studies in aquatic environment. - *Ecotoxicology and Environmental Safety* 34: 125-133.
- Cardinale B.J., Hillebrand H. and Charles D.F., 2006, Geographic patterns of diversity in streams are predicted by a multivariate model of disturbance and productivity, *Journal of Ecology*, 94 (3) : 609-618
- Carpenter, S. R. 1996. Microcosm experiments have limited relevance for community and ecosystem ecology. - *Ecology* 77: 677-680.
- Carpenter, S., Walker, B., Anderies, J.M., and Abel N., 2001, From metaphor to measurement: resilience of what to what? *Ecosystems* 4: 765-781.
- Carr, G. M., Morin, A. and Chambers, P. A. 2005. Bacteria and algae in stream periphyton along a nutrient gradient. - *Freshwater Biology* 50: 1337-1350.
- Casarett and Doull's toxicology: the basic science of poisons. 2e édition. J. Doull, C.D. Klaassen et M.O. Amdur (éditeurs). MacMillan, New York, NY (1980).
- Cattaneo A. and Kalff J. 1980, The relative contribution of aquatic macrophytes and their epiphytes to the production of macrophytes beds. *Limnology and Oceanography*, 25 : 280-289.
- Cattaneo, A., Kerimian, T., Roberge, M. and Marty, J. 1997. Periphyton distribution and abundance on substrata of different size along a gradient of stream trophy. - *Hydrobiologia* 354: 101-110.
- Cazaubon, A., Rolland, T. and Loudiki, M. 1995. Heterogeneity of Periphyton in French Mediterranean Rivers. - *Hydrobiologia* 300: 105-114.
- Christensen B.E. and Characklis W.G . 1989, Physical properties of biofilms. In : Characklis W.G. et Marshall K.C. *Biofilms*. Wiley & sons, 93-100.
- Chrost, R. J., 1991, Environmental control of synthesis and activity of aquatic microbial ectoenzymes, p. 29-59. In R. J. Chrost (ed.), *Microbial enzymes in aquatic environments*. Springer Verlag, New York, N.Y.
- Clements, W.H. and Newman, M.C., 2002, *Community Ecotoxicology*. John Wiley & Sons.
- Connell, J. H. 1978. Diversity in tropical rain forest and coral reefs. *Science* 199:1302-
- Costerton, J.W., Lewandowski, Z., deBeer, D., Caldwell, D., Korber, D. and James, G. 1994. Biofilms, the customised microniche. *Journal of Bacteriology*, 176, 2137-2142.
- Croteau, M. N., Luoma, S. N. and Stewart, A. R. 2005. Trophic transfer of metals along freshwater food webs: Evidence of cadmium biomagnification in nature. - *Limnology and Oceanography* 50: 1511-1519.
- Culp, J. M., Podemski, C. L., Cash, K. J. and Lowell, R. B. 2000. A research strategy for using stream microcosms in ecotoxicology : integrating experiments at different levels of biological organization with field data. - *Journal of Aquatic Ecosystem Stress and Recovery* 7: 167-176.
- Currie D.J., 1990, Large-scale variability and interactions among phytoplankton, bacterioplankton, and phosphorus. *Limnology and Oceanography*, 35, 1437-1455.

- Curtis, T. P. and Sloan, W. T. 2004. Prokaryotic diversity and its limits: microbial community structure in nature and implications for microbial ecology. - *Current Opinion in Microbiology* 7: 221-226.
- Dahl, B. and Blanck, H. 1996. Toxic effects of the antifouling agent Irgarol 1051 on periphyton communities in coastal water microcosms. - *Marine Pollution Bulletin* 32: 342-350.
- Davies D.G., 2000, Physiological events in biofilm formation. In : Allison D., Gilbert P., Lappin-Scott H. et al. Community structure and co-operation in biofilms. Cambridge University Press, 129-166.
- Davies, D. G., Parsek, M. R., Pearson, J. P., Iglewski, B. H., Costerton, J. W. and Greenberg, E. P. 1998. The involvement of cell-to-cell signals in the development of a bacterial biofilm. - *Science* 280: 295-298.
- Davis, A. P., Shokouhian, M. and Ni, S. B. 2001. Loading estimates of lead, copper, cadmium, and zinc in urban runoff from specific sources. - *Chemosphere* 44: 997-1009.
- DeLorenzo, M. E. and Serrano, L. 2006. Mixture toxicity of the antifouling compound irgarol to the marine phytoplankton species *Dunaliella tertiolecta*. - *Journal of Environmental Science and Health Part B-Pesticides Food Contaminants and Agricultural Wastes* 41: 1349-1360.
- DeLorenzo, M. E., Scott, G. I. and Ross, P. E. 1999. Effects of the agricultural pesticides atrazine, deethylatrazine, endosulfan, and chlorpyrifos on an estuarine microbial food web. *Environmental Toxicology and Chemistry* 18: 2824-2835.
- DeNicola D.M., de Eyto E., Wemaere A. and Irvine K., 2003, Production and respiration of epilithic algal communities in Irish lakes of different trophic status. *Archiv für Hydrobiologie*, 157 : 67–87
- Denny, M. 1995. Predicting Physical Disturbance - Mechanistic Approaches to the Study of Survivorship on Wave-Swept Shores. - *Ecological Monographs* 65: 371-418.
- Directive 2000/60/CE du Parlement européen et du Conseil, du 23 octobre 2000, établissant un cadre pour une politique communautaire dans le domaine de l'eau
- Dodds W.K., 2003, The role of periphyton in phosphorus retention in shallow freshwater aquatic systems. *Journal of Phycology*, 39, 840-849.
- Dodds, W. K., 1989, Microscale vertical profiles of N, fixation, photosynthesis, O₂, chlorophyll a, and light in a cyanobacterial assemblage. *Appl. environ. Microbiol.* 55: 882-886
- Dodds, W. K., Hutson, R. E., Eichen, A. C., Evans, M. A., Gudder, D. A., Fritz, K. M. and Gray, L. 1996. The relationship of floods, drying, flow and light to primary production and producer biomass in a prairie stream. *Hydrobiologia* 333: 151-159.
- Dodds, W. K., Smith, V. H. and Lohman, K. 2002. Nitrogen and phosphorus relationships to benthic algal biomass in temperate streams. - *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences* 59: 865-874.
- Dodds, W. K., Smith, V. H. and Zander, B. 1997. Developing nutrient targets to control benthic chlorophyll levels in streams: A case study of the Clark Fork River. - *Water Research* 31: 1738-1750.
- Dorigo U., Leboulanger C., Bérard A., Bouchez A., Humbert J.-F., Montuelle B., 2007, Lotic biofilm community structure and pesticide tolerance along a contamination gradient in a vineyard area. *Aquat. Microb. Ecol.*, 50 : 91-102.
- Dorigo, U. and Leboulanger, C. 2001. A pulse-amplitude modulated fluorescence-based method for assessing the effects of photosystem II herbicides on freshwater periphyton. - *Journal of Applied Phycology* 13: 509-515.

- Downing, H. F., Delorenzo, M. E., Fulton, M. H., Scott, G. I., Madden, C. J. and Kucklick, J. R. 2004. Effects of the agricultural pesticides atrazine, chlorothalonil, and endosulfan on South Florida microbial assemblages. *Ecotoxicology* 13: 245-260.
- Duhamel, S. and Jacquet, S. 2006. Flow cytometric analysis of bacteria- and virus-like particles in lake sediments. *Journal of Microbiological Methods* 64: 316-332.
- Duncan, S.W., and D.W. Blinn., 1989. Importance of physical variables on the seasonal dynamics of epilithic algae in a highly shaded canyon stream. *Journal of Phycology*
- Eismann, F. and Montuelle, B., 1999, Microbial methods for assessing contaminant effects in sediments. *Rev. Environ. Contam. Toxicol.* 159, pp. 41–93
- El Fantroussi, S., Verschuere, L., Verstraete, W. and Top, E. M. 1999. Effect of phenylurea herbicides on soil microbial communities estimated by analysis of 16S rRNA gene fingerprints and community-level physiological profiles. - *Applied and Environmental Microbiology* 65: 982-988.
- El Jay A., 1998, Action des herbicides inhibiteurs du photosystème II sur quelques espèces phytoplanctoniques lacustres en culture monospécifiques et mixtes, Université de Paris 06, 286p.
- Elasir, M. O., and Miller R. V., 1999, Study of the response of a biofilm bacterial community to UV radiation. *Appl. Environ. Microbiol.* 65:2025-2031
- Ettema, C. H. 1998. Soil nematode diversity: Species coexistence and ecosystem function. - *Journal of Nematology* 30: 159-169.
- Ettema, C. H., Coleman, D. C., Vellidis, G., Lowrance, R. and Rathbun, S. L. 1998. Spatiotemporal distributions of bacterivorous nematodes and soil resources in a restored riparian wetland. - *Ecology* 79: 2721-2734.
- Ettema, C. H., Rathbun, S. L. and Coleman, D. C. 2000. On spatiotemporal patchiness and the coexistence of five species of *Chronogaster* (Nematoda : *Chronogasteridae*) in a riparian wetland. - *Oecologia* 125: 444-452.
- Farag, A. M., Woodward, D. F., Goldstein, J. N., Brumbaugh, W. and Meyer, J. S.: 1998, 'Concentrations of metals associated with mining waste in sediments, biofilm, benthic macroinvertebrates, and fish from the Coeur d'Alene River Basin, Idaho', *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 34, 119–127.
- Fernandez-Alba A.R., Hernando M.D., Piedra L. and Chisti Y., 2002, Toxicity evaluation of single and mixed antifouling biocides measured with acute toxicity bioassays, *Anal Chim Acta.* 456: 303–312.
- Fisher, S.G. and Grimm, N.B., 1991. Streams and disturbance: are cross-ecosystem comparisons useful?. In: Cole, J., Lovett, G. and Findlay, S. Editors, 1991. *Comparative Analyses of Ecosystems* Springer-Verlag, New York, pp. 196–221
- Flemming H.C. 1995, Sorption sites in biofilms. *Wat. Sci. Technol.*, 32, 27-33.
- Flemming H.C., Wingender J., Mayer C. et al. 2000, Cohesiveness in biofilm matrix polymers. In : Allison D., Gilbert P., Lappin-Scott H. et al. *Community structure and co-operation in biofilms.* Cambridge University Press, 167-198.
- Fletcher, M. and Marshall, K. C., 1982, Bubble contact angle method for evaluation of substratum interfacial characteristics and its relevance to bacterial attachment. *App. Environ. Microbiol.* 44, 797-732.
- Fletcher, M., and G. D. Floodgate. 1973. An electron-microscopic demonstration of an acidic polysaccharide involved in the adhesion of a marine bacterium to solid surfaces. *J. Gen. Microbiol.* 74:325–334.

- Flippo N., Poulin M., Even S. et Bourlange S., 2000, Modélisation du fonctionnement hydraulique et écologique du Grand Morin. Rapport technique, PIREN Seine.
- Francoeur S.N. and Biggs B.J.F., 2006, Short-term effects of elevated velocity and sediment abrasion on benthic algal communities. *Hydrobiologia*, 561, 59-69.
- Francoeur S.N., Biggs B.J.F. and Lowe R.L., 1998, Microform bed clusters as refugia for periphyton in a flood-prone headwater stream. *New Zealand Journal of Marine and Freshwater Research*, 32, 363-374.
- Francoeur, S. N. and Biggs, B. J. F. 2006. Short-term effects of elevated velocity and sediment abrasion on benthic algal communities. - *Hydrobiologia* 561: 59-69.
- Freeman C. et Lock M.A. The biofilm polysaccharide matrix : a buffer against changing organic substrate supply ? *Limnology and Oceanography*, 1995, vol 40, N°2, pp. 273-278.
- Garland, J. L. 1997. Analysis and interpretation of community-level physiological profiles in microbial ecology. - *Fems Microbiology Ecology* 24: 289-300.
- Gatidou, G. and Thomaidis, N. S. 2007. Evaluation of single and joint toxic effects of two antifouling biocides, their main metabolites and copper using phytoplankton bioassays. - *Aquatic Toxicology* 85: 184-191.
- Gessner, M. O., Inchausti, P., Persson, L., Raffaelli, D. G. and Giller, P. S. 2004. Biodiversity effects on ecosystem functioning: insights from aquatic systems. - *Oikos* 104: 419-422.
- Ghosh, M. and Gaur, J. P. 1998. Current velocity and the establishment of stream algal periphyton communities. - *Aquatic Botany* 60: 1-10.
- Gilbert, P., Brown, M.R.W. Costerton, J.W., 1987, Inocula for antimicrobial sensitivity testing: a critical review. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. 20
- Gouy V. and Nivon C., 2007, Protection des Eaux en Beaujolais viticole: caractérisation et suivi de la qualité de l'eau sur le bassin versant de la Morcille sur la période 2001–2006, Rapport d'étude Cemagref- Chambre d'Agriculture du Rhône, 81 pp.
- Griffith, M. B., Hill, B. H., Herlihy, A. and Kaufmann, P. R. 2002. Multivariate analysis of periphyton assemblages in relation to environmental gradients in Colorado Rocky Mountain streams. - *Journal of Phycology* 38: 83-95.
- Guasch, H. and Sabater, S. 1995. Seasonal-Variations in Photosynthesis-Irradiance Responses by Biofilms in Mediterranean Streams. - *Journal of Phycology* 31: 727-735.
- Guasch, H. and Sabater, S. 1998. Light history influences the sensitivity to atrazine in periphytic algae. - *Journal of Phycology* 34: 233-241.
- Guasch, H., Admiraal, W. and Sabater, S. 2003. Contrasting effects of organic and inorganic toxicants on freshwater periphyton. - *Aquatic Toxicology* 64: 165-175.
- Guasch, H., Ivorra, N., Lehmann, V., Paulsson, M., Real, M. and Sabater, S. 1998. Community composition and sensitivity of periphyton to atrazine in flowing waters: the role of environmental factors. - *Journal of Applied Phycology* 10: 203-213.
- Guasch, H., Munoz, I., Roses, N. and Sabater, S. 1997. Changes in atrazine toxicity throughout succession of stream periphyton communities. - *Journal of Applied Phycology* 9: 137-146.
- Guckert J.B., 1993, Artificial streams in ecotoxicology. In : Lamberti G.A. et Steinman A.D. *Research in artificial streams : applications, uses and abuses*. J. N. Am. Benthol. Soc., 12, 350-356.

- Gurney S.E. and Robinson G.G.C., 1989, The influence of two triazine herbicides on the productivity, biomass and community composition of freshwater marsh periphyton. *Aquat. Bot.* 36 :1-22.
- Gustavson, K., Mohlenberg, F. and Schluter, L. 2003. Effects of exposure duration of herbicides on natural stream periphyton communities and recovery. - *Archives of Environmental Contamination and Toxicology* 45: 48-58.
- Haglund, A. L. and Hillebrand, H. 2005. The effect of grazing and nutrient supply on periphyton associated bacteria. - *Fems Microbiology Ecology* 52: 31-41.
- Hann, B. J. 1991. Invertebrate grazer-periphyton interactions in a eutrophic marsh pond. *Freshwater Biology* 26:87-96.
- Hansson L.A., 1989, The influence of periphytic biolayer on phosphorus exchange between substrate and water. *Archiv fur Hydrobiologia.* 115(1) :21-26.
- Hansson, L. A. 1992. Factors Regulating Periphytic Algal Biomass. - *Limnology and Oceanography* 37: 322-328.
- Hao Y T, LI J-H, Pan X et al. 2001, Tolerance of *Chlorella ellipsoidea* and its removal of 4 heavy metals, *J Lake Sci.* 13(2):158
- Harada, M. 1995. Minamata Disease - Methylmercury Poisoning in Japan Caused by Environmental-Pollution. - *Critical Reviews in Toxicology* 25: 1-24.
- Harada, M., Nakanishi, J., Konuma, S., Ohno, K., Kimura, T., Yamaguchi, H., Tsuruta, K., Kizaki, T., Ookawara, T. and Ohno, H. 1998. The present mercury contents of scalp hair and clinical symptoms in inhabitants of the Minamata area. - *Environmental Research* 77: 160-164.
- Hense, B. A., Juttner, I., Welzl, G., Severin, G. F., Pfister, G., Behechti, A. and Schramm, K. W. 2003. Effects of 4-nonylphenol on phytoplankton and periphyton in aquatic microcosms. - *Environmental Toxicology and Chemistry* 22: 2727-2732.
- Hill, W. R. and Fanta, S. E. 2008. Phosphorus and light colimit periphyton growth at subsaturating irradiances. - *Freshwater Biology* 53: 215-225.
- Hill, W. R., Bednarek, A. T. and Larsen, I. L. 2000. Cadmium sorption and toxicity in autotrophic biofilms. - *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences* 57: 530-537.
- Hill, W. R., Boston, H. L. and Steinman, A. D. 1992. Grazers and Nutrients Simultaneously Limit Lotic Primary Productivity. - *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences* 49: 504-512.
- Hill, W.R. and Knight A.W., 1988, Nutrient and light limitation of algae in 2 northern California streams. *Journal of Phycology.*24: 125-132
- Hillebrand, H. 2002. Top-down versus bottom-up control of autotrophic biomass - a meta-analysis on experiments with periphyton. - *Journal of the North American Benthological Society* 21: 349-369.
- Hillebrand, H. 2008. Grazing regulates the spatial variability of periphyton biomass. - *Ecology* 89: 165-173.
- Hillebrand, H. and Sommer, U. 2000a. Diversity of benthic microalgae in response to colonization time and eutrophication. - *Aquatic Botany* 67: 221-236.
- Hillebrand, H. and Sommer, U. 2000b. Effect of continuous nutrient enrichment on microalgae colonizing hard substrates. - *Hydrobiologia* 426: 185-192.
- Hudon C. and Bourget E., 1981, Initial colonization of artificial substrate: community development and structure studied by scanning electron microscopy, *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences.* 38 :1371-1384.

- Hughes R., Byrnes J., Kimbro D. et Stachowicz J., 2007, Reciprocal relationship and potential feedbacks between biodiversity and disturbance, *Ecology Letters*, 10: 849-864.
- Humbert J.-F. and Dorigo U., 2005, Biodiversity and aquatic ecosystem functioning : a minireview. *Aquat. Ecosyst. Health Manage.* 8(4) : 367-374.
- Jackson C.R. and Churchill P.F., 1999, Analysis of microbial communities by denaturing gradient gel electrophoresis : applications and limitations. *Recent Res. Devel. Microbiology*, 3, 81-91.
- Johnsen, K., Jacobsen, C. S., Torsvik, V. and Sorensen, J. 2001. Pesticide effects on bacterial diversity in agricultural soils - a review. - *Biology and Fertility of Soils* 33: 443-453.
- Jones S.E. et Lock M.A. Hydrolytic extracellular enzyme activity in heterotrophic biofilms from two contrasting streams. *Freshwater Biology*, 1989, 22 : 289-296.
- Junk J.W., Bayley PB, Sparks R.E., 1989, The flood pulse concept in river floodplain systems. *Canadian Special Publications of Fisheries and Aquatic Sciences* 106: 110-127
- Kahlert, M. and Baunsgaard, M. T. 1999. Nutrient recycling - a strategy of a grazer community to overcome nutrient limitation. - *Journal of the North American Benthological Society* 18: 363-369.
- Keddy C., Greene J.C., and Bonnell M.A. 1994, Examen des biotests effectués sur des organismes entiers pour l'évaluation de la qualité des sols, des sédiments et des eaux douces au Canada. *Environnement Canada, Direction générale de la Conservation des écosystèmes, Ottawa, Ontario, Etude N°198*
- Kiffney, P. M. and Bull, J. P. 2000. Factors controlling periphyton accrual during summer in headwater streams of southwestern British Columbia, Canada. - *Journal of Freshwater Ecology* 15: 339-351.
- Knapp, C. W., Caquet, T., Hanson, M. L., Lagadic, L. and Graham, D. W. 2005. Response of water column microbial communities to sudden exposure to deltamethrin in aquatic mesocosms. - *Fems Microbiology Ecology* 54: 157-165.
- Kostel J.A., Wang H., ST. Amand A.L. et Gray K.A. 1. 1999, Use of a novel laboratory stream system to study the ecological impact of PCB exposure in a periphytic biolayer. *Water Research*, 33(18) :3735-3748.
- Koutsaftis, A. and Aoyama, I. 2006. The interactive effects of binary mixtures of three antifouling biocides and three heavy metals against the marine algae *Chaetoceros gracilis*. - *Environmental Toxicology* 21: 432-439.
- Kroes I., Lepp .PW., Relman D.A., 1999, Bacterial diversity within the human subgingival crevice. *Proc Natl Acad Sci USA* 96:14547-14552
- Kromkamp, J., Barranguet, C. and Peene, J. 1998. Determination of microphytobenthos PSII quantum efficiency and photosynthetic activity by means of variable chlorophyll fluorescence. - *Marine Ecology-Progress Series* 162: 45-55.
- Lamberti, G. A. and Steinman, A. D. 1993. Research in Artificial Streams - Applications, Uses, and Abuses. - *Journal of the North American Benthological Society* 12: 313-384.
- Lamshead P.J.D., Hodda M. 1994. Impact of disturbance on measurements of variability in marine nematode populations. *Vie Milieu*. 44: 21-7.
- Landis, W.G. and M.H. Yu., 1998, "Introduction to Environmental Toxicology", 2nd Ed., CRC/Lewis Publishers, Boca Raton, FL, 390 pages.
- Lantzy, R.J., and F.T. Mackenzie, 1979, Atmospheric trace metals: Global cycles and assessment of man's impact. *Geochim. Cosmochim. Acta*, 43, 511-525,.

- Larsen, J.Bo.,1995, Ecological stability of forests and sustainable silviculture. *Forest Ecology and Management*. 73, 85-96.
- Lawrence J.R., Scharf B., Packroff G. and Neu T.R., 2002, Microscale evaluation of the effects of grazing by invertebrates with contrasting feeding modes on river architecture and composition. *Microbial Ecology*, 43, 199-207.
- Lawrence, J. R., Nie, T. R. and Swerhone, G. D. W. 1998. Application of multiple parameter imaging for the quantification of algal, bacterial and exopolymer components of microbial biofilms. - *Journal of Microbiological Methods* 32: 253-261.
- Lear, G., Anderson, M. J., Smith, J. P., Boxen, K. and Lewis, G. D. 2008. Spatial and temporal heterogeneity of the bacterial communities in stream epilithic biofilms. - *Fems Microbiology Ecology* 65: 463-473.
- Ledger, M. E. and Hildrew, A. G. 1998. Temporal and spatial variation in the epilithic biofilm of an acid stream. - *Freshwater Biology* 40: 655-670.
- Levins R.,1979, Coexistence in variable environments, *Am. Nat.* 114 : 765–783.
- Li W. K. W., Jellet J. F. and Dickie P. M., 1995, DNA distributions in marine bacteria stained with TOTO or TO-PRO. *Limnol. Oceanogr.* 40,1485-1495.
- Liang, L. N., He, B., Jiang, G. B., Chen, D. Y. and Yao, Z. W. 2004. Evaluation of mollusks as biomonitors to investigate heavy metal contaminations along the Chinese Bohai Sea. - *Science of the Total Environment* 324: 105-113.
- Lock M.A., 1993, Attached microbial communities in rivers. In: Ford T.E. (ed) *Aquatic microbiology – an ecological approach*. Blackwell Scientific Publications, Oxford, United Kingdom, pp 113-138.
- Lock M.A., Wallace R.R., Costerton J.W. et al. *River epilithon : toward a structural-functional model*. *Oikos*, 1984, vol 42, pp. 10-22.
- Lock, M. A. and John P. H., 1979, The effect of flow patterns on uptake of phosphorus by river periphyton. *Limnol. Oceanogr.* 24: 376–383.
- Loreau M., Naeem S., Inchausti P., Bengtsson J., Grime J.P., Hector A., Hooper D.U., Huston M.A., Raffaelli D., Schmid B., Tilman D. & Wardle D.A. (2001), *Biodiversity and Ecosystem Functioning : Current Knowledge and Future Challenges*. *Science*, 294, 804-808
- Loreau, M. and Behera, 1999,. Phenotypic stability and diversity of ecosystem processes. *Theoretical Population Biology*. 56, 29-47.
- Lowe, R. L., Guckert, J. B., Belanger, S. E., Davidson, D. H. and Johnson, D. W. 1996. An evaluation of periphyton community structure and function sbstrata in experimental stream mesocosms. - *Hydrobiologia* 328: 135-146.
- Luttenton, M. R. and Baisden, C. 2006. The relationships among disturbance, substratum size and periphyton community structure. - *Hydrobiologia* 561: 111-117.
- Lyautey, E., Jackson, C. R., Cayrou, J., Rols, J. L. and Garabetian, F. 2005. Bacterial community succession in natural river biofilm assemblages. - *Microbial Ecology* 50: 589-601.
- Lyautey, E., Teissier, S., Charcosset, J. Y., Rols, J. L. and Garabetian, F. 2003. Bacterial diversity of epilithic biofilm assemblages of an anthropised river section, assessed by DGGE analysis of a 16S rDNA fragment. - *Aquatic Microbial Ecology* 33: 217-224.
- Mac Cann K., 2000, The diversity-stability debate. *Nature*. 405, 228-233.

- MacLeod, N.A. and Barton D.R., 1998, Effects of light intensity, water velocity and species composition on carbon and nitrogen stable isotope ratios in periphyton. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.* 55: 1919-1925.
- Mainstone, C. P. and Parr, W. 2002. Phosphorus in rivers - ecology and management. - *Science of the Total Environment* 282: 25-47.
- Malavoi, J.-R. and Adam P., 2007a. Les interventions humaines et leurs impacts hydromorphologiques sur les cours d'eau. *Ingénieries*. N° 50 : 35-48.
- Malavoi, J.-R. and Adam P., 2007b. La restauration hydromorphologique des cours d'eau : concepts et principes de mise en œuvre. *Ingénieries*. N° 50 : 49-61.
- Marie D., Brussaard C. P. D., Thyraug R., Bratbak G. and Vault D., 1999,. Enumeration of marine viruses in culture and natural samples by flow cytometry. *Appl. Environ. Microbiol.*, 65, 45-52.
- MASON, C. F. and BRYANT, R. J. ,1975. Production, nutrient content and decomposition of *Phragmites communis* and *Typha angustifolia*. *Journal of Ecology* 63:71–95.
- Matthaei, C. D., Arbuckle, C. J. and Townsend, C. R. 2000. Stable surface stones as refugia for invertebrates during disturbance in a New Zealand stream. - *Journal of the North American Benthological Society* 19: 82-93.
- Matthaei, C. D., Peacock, K. A. and Townsend, C. R. 1999. Patchy surface stone movement during disturbance in a New Zealand stream and its potential significance for the fauna. - *Limnology and Oceanography* 44: 1091-1102.
- Mc Cormick P.V. et Stevenson R.J., 1989, Effects of snail grazing on benthic algal community structure in different nutrient environments. *J. North. Am. Benthol. Soc.*, 8 :162-172.
- Mc intire C.D.,1993, Historical perspectives. In : Lamberti G.A. & Steinman A.D. *Research in artificial streams : applications, uses and abuses*. *J. N. Am. Benthol. Soc.*, 12, 314-317.
- McCabe, S. K. and Cyr, H. 2006. Environmental variability influences the structure of benthic algal communities in an oligotrophic lake. - *Oikos* 115: 197-206.
- McCaig, A. E., Glover, L. A. and Prosser, J. I. 1999. Molecular analysis of bacterial community structure and diversity in unimproved and improved upland grass pastures. - *Applied and Environmental Microbiology* 65: 1721-1730.
- McCormick, P. V. and Cairns, J. 1994. Algae as Indicators of Environmental-Change. - *Journal of Applied Phycology* 6: 509-526.
- Medlin L., Ellwood H.J., Stickel S. and Sogin M.L., 1988 , The characterization of enzymatically amplified eukaryotic 16S-like rRNA coding regions. *Gene*. 71 : 491–499.
- Millie, D. F., Hersh, C. M. and Dionigi, C. P. 1992. Simazine-Induced Inhibition in Photoacclimated Populations of *Anabaena-Circinalis* (Cyanophyta). - *Journal of Phycology* 28: 19-26.
- Mohamed MN, Lawrence JR & Robarts RD, 1998, Phosphorus limitation of heterotrophic biofilms from the Fraser River, British Columbia, and the effect of pulp mill effluent. *Microb. Ecol.* 36:121–130
- Molander, S. and Blanck, H. 1992. Detection of Pollution-Induced Community Tolerance (Pict) in Marine Periphyton Communities Established under Diuron Exposure. - *Aquatic Toxicology* 22: 129-144.
- Moncada, A., 2005, Environmental fate of diuron. Environmental Monitoring Branch, Department of Pesticide Regulation (<http://www.cdpr.ca.gov/docs/emprm/pubs/fatememo/diuron.pdf>).

- Monger B. C. and Landry M. R., 1993, Flow cytometric analysis of marine bacteria with Hoechst 33342. *Appl. Environ. Microbiol.*, 59, 905-911.
- Montuelle B. et Volat B., 1998, Impact of wastewater treatment plant discharge on enzyme activity in freshwater sediment. *Ecotoxicology and environment safety*, 40 :154-159.
- Montuelle B., Boisson JC, Volat B., Madigou E., 2006, Réponse des communautés microbiennes benthiques d'un petit cours d'eau soumis à un rejet domestique: Intérêt de l'utilisation d'un canal expérimental en dérivation et de substrats artificiels, 8^{ème} CILEF, Hammamet , Tunisie, 17-21/03/2006
- Montuelle et al., 2006 Evaluation de gains biologique et écologique associés à une réduction d'intrants polluants en milieu aquatique, Rapport final Cemagref- CPER 2003-2006, Région Rhône Alpes, 55 p).
- Morin S., 2006, Bioindication des effets des pollutions métalliques sur les communautés de diatomées benthiques, approches in situ et expérimentales, Université de Bordeaux 1, 300p.
- Moschini-Carlos, V., Henry, R. and Pompeo, M. L. M. 2000. Seasonal variation of biomass and productivity of the periphytic community on artificial substrata in the Jurumirim Reservoir (Sao Paulo, Brazil). - *Hydrobiologia* 434: 35-40.
- Mosisch, T. D., Bunn, S. E. and Davies, P. M. 2001. The relative importance of shading and nutrients on algal production in subtropical streams. - *Freshwater Biology* 46: 1269-1278.
- Mulholland P.J., Steinman A.D., Palumbo A.V., Elwood J.W., Kirschtel D.B., 1991, Role of nutrient cycling and herbivory in regulating periphyton communities in laboratory streams. *Ecology* 72: 966–982
- Munoz, I., Real, M., Guasch, H., Navarro, E. and Sabater, S. 2001. Effects of atrazine on periphyton under grazing pressure. - *Aquatic Toxicology* 55: 239-249.
- Murdock, J. N. and Dodds, W. K. 2007. Linking benthic algal biomass to stream substratum topography. - *Journal of Phycology* 43: 449-460.
- Muyzer, G. and Smalla, K. 1998. Application of denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) and temperature gradient gel electrophoresis (TGGE) in microbial ecology. - *Antonie Van Leeuwenhoek International Journal of General and Molecular Microbiology* 73: 127-141.
- Muyzer, G., Dewaal, E. C. and Uitterlinden, A. G. 1993. Profiling of Complex Microbial-Populations by Denaturing Gradient Gel-Electrophoresis Analysis of Polymerase Chain Reaction-Amplified Genes-Coding for 16s Ribosomal-Rna. - *Applied and Environmental Microbiology* 59: 695-700.
- Naeem S., Thompson J., Lawler S. P., Hawton J. H. and Woodfin R. M., 1994, Declining biodiversity can alter the performance of ecosystems. *Nature*. 368, 734-737.
- Naeem, S. and Li, S. B. 1997. Biodiversity enhances ecosystem reliability. - *Nature* 390: 507-509.
- Naeem, S., Knops, J. M. H., Tilman, D., Howe, K. M., Kennedy, T. and Gale, S. 2000. Plant diversity increases resistance to invasion in the absence of covarying extrinsic factors. - *Oikos* 91: 97-108.
- Niemi G.J., Devore P., Detenbeck N., Taylor D. and Lima A., 1990, Overview of case studies on recovery of aquatic systems from disturbance, *Environ. Manage.* 14: 571–587.
- Ninomiya, T., Ohmori, H., Hashimoto, K., Tsuruta, K. and Ekino, S. 1995. Expansion of methylmercury poisoning outside of minamata: An epidemiological study on chronic methylmercury poisoning outside of minamata. - *Environmental Research* 70: 47-50.

- Nivens DE, Ohman DE, Williams J, Franklin MJ. 2001. Role of alginate and its O acetylation in formation of *Pseudomonas aeruginosa* microcolonies and biofilms *J. Bacteriol.* 183:1047-57
- Niyogi, D. K., Lewis, W. M. and McKnight, D. M. 2003. Direct and indirect effects of mine drainage on bacterial processes in mountain streams. - *Journal of the North American Benthological Society* 22: 276-291.
- Nriagu, Jerome O, (1979)"Global Inventory of Natural and Anthropogenic Emissions of Trace Metals to the Atmosphere", *Nature*, 279, 409-411.
- Odum H.T., 1956, Primary production in flowing water. *Limnology and Oceanography*. 1 : 102-117.
- Olson R. J., Vulot D. and Chisholm S. W.,1985, Marine phytoplankton distribution measured using shipboard flow cytometry. *Deep-Sea Res*, 32, 1273-1280.
- Orvain, F., Galois, R., Barnard, C., Sylvestre, A., Blanchard, G. and Sauriau, P. G. 2003. Carbohydrate production in relation to microphytobenthic biofilm development: An integrated approach in a tidal mesocosm. - *Microbial Ecology* 45: 237-251.
- Paerl, H. W. and Pinckney, J. L. 1996. A mini-review of microbial consortia: Their roles in aquatic production and biogeochemical cycling. - *Microbial Ecology* 31: 225-247.
- Pelletier J., 1973, Contribution à l'étude de la production primaire du lac Léman, Thèse, 112p
- Pérès, F., Florin, D., Grollier, T., Feurtet-Mazel, A., Coste, M., Ribeyre, F., Ricard, M. and Boudou, A. 1996. Effects of the phenylurea herbicide isoproturon on periphytic communities in freshwater indoor microcosms. - *Environmental Pollution* 94: 141-152.
- Perrin, J.P., Lafont, M. and Pery, A., 2004, Outils de diagnose fonctionnelle pour l'ingénierie écologique en rivière. *Ingénieries Eau Agriculture Territoire*. Numéro Spécial: 57-67
- Perschbacher, P. W. and Ludwig, G. M. 2004. Effects of diuron and other aerially applied cotton herbicides and defoliant on the plankton communities of aquaculture ponds. - *Aquaculture* 233: 197-203.
- Pesce, S., Fajon, C., Bardot, C., Bonnemoy, F., Portelli, C. and Bohatier, J. 2006. Effects of the phenylurea herbicide diuron on natural riverine microbial communities in an experimental study. - *Aquatic Toxicology* 78: 303-314.
- Peterson, C. G. 1996. Mechanisms of lotic microalgal colonization following space-clearing disturbances acting at different spatial scales. - *Oikos* 77: 417-435.
- Pickett and White P.S., 1985, In: B.J. Harcourt, Editor, *The Ecology of Natural Disturbance and Patch Dynamics*, Academic Press, Inc., New York.
- Pinckney J.L., Millie D.F., Vinyard B.T. and Paerl H.W.,1997, Environmental controls of phytoplankton bloom dynamics in the Neuse River estuary (North Carolina, USA). *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, 54, 2491-2501.
- Poff, N.L., and J.V. Ward. 1990. The physical habitat template of lotic systems: recovery in the context of historical pattern of spatio-temporal heterogeneity. *Environmental Management* 14:629-646.
- Poulickova A., Hasler P., Lysakova M. and Spears B., The ecology of freshwater epipellic algae: an update, *Phycologia*,47(5) :437-450
- Prado, A. G. S. and Airoidi, C. 2001. The effect of the herbicide diuron on soil microbial activity. - *Pest Management Science* 57: 640-644.
- Pretty, J. N., Mason, C. F., Nedwell, D. B., Hine, R. E., Leaf, S. and Dils, R. 2003. Environmental costs of freshwater eutrophication in England and Wales. - *Environmental Science & Technology* 37: 201-208.

- Pringault, O., de Wit, R. and Kuhl, M. 1999. A microsensor study of the interaction between purple sulfur and green sulfur bacteria in experimental benthic gradients. - *Microbial Ecology* 37: 173-184.
- Pringle et al. 1988. Patch dynamics in lotic systems: the stream as a mosaic. *Journal of North America Benthic Society*, 7:503-524.
- Rabiet, M., Margoum, C., Gouy, V., Carluer, N., Coquery, M., 2008. Transfert des pesticides dans un petit bassin versant viticole. Influence des conditions hydrologiques sur le transport de ces contaminants. Ingénieries EAT, in press.
- Rainey, P. B. and Travisano, M. 1998. Adaptive radiation in a heterogeneous environment. - *Nature* 394: 69-72.
- Ramade F., 2007, Introduction à l'écotoxicologie. Ed : Dunod, Paris. 550pp.
- Ramade F. 1998. Dictionnaire encyclopédique des sciences de l'eau. Ediscience Paris, FRA. 785p
- Ramade F., 1992. Précis d'écotoxicologie. Masson Ed., Paris, Collection d'Ecologie, 22, 300 p.
- Rand, G. M., Clark, J. R. and Holmes, C. M. 2000. Use of outdoor freshwater pond microcosms: I. Microcosm design and fate of pyridaben. - *Environmental Toxicology and Chemistry* 19: 387-395.
- Raymond, P. A. and Bauer, J. E. 2001. DOC cycling in a temperate estuary: A mass balance approach using natural C-14 and C-13 isotopes. - *Limnology and Oceanography* 46: 655-667.
- Resh, V. H., Hildrew, A. G., Statzner, B. and Townsend, C. R. 1994. Theoretical Habitat Templates, Species Traits, and Species Richness - a Synthesis of Long-Term Ecological Research on the Upper Rhone River in the Context of Concurrently Developed Ecological Theory. - *Freshwater Biology* 31: 539-554.
- Revsbech N.P., Blackburn T.H. and Cohen Y., 1983, Microelectrode studies of the photosynthesis and O₂, H₂S and pH profiles of a microbial mat. *Limnology and Oceanography*. 28 :1062-1074.
- Riber H. and Wetzel R.G., 1987, Boundary layer and internal diffusion effects on phosphorus fluxes in lake periphyton, *Limnology and Oceanography*, 32 : 1181-1194.
- Riemann B. and Bell R. T., 1990, Advances in estimating bacterial biomass and growth in aquatic systems. *Archiv fur Hydrobiologie*. 118: 485-502.
- Riemann L., Steward G.F. and Azam F., 2000, Dynamics of bacterial community composition and activity during a mesocosm diatom bloom, *Applied of Environmental Microbiology*. 66 : 578-587.
- Rier, S. T. and Stevenson, R. J. 2001. Relation of environmental factors to density of epilithic lotic bacteria in 2 ecoregions. - *Journal of the North American Benthological Society* 20: 520-532.
- Rier, S. T. and Stevenson, R. J. 2002. Effects of light, dissolved organic carbon, and inorganic nutrients on the relationship between algae and heterotrophic bacteria in stream periphyton. - *Hydrobiologia* 489: 179-184.
- Rier, S. T., Stevenson, R. J. and LaLiberte, G. D. 2006. Photo-acclimation response of benthic stream algae across experimentally manipulated light gradients: A comparison of growth rates and net primary productivity. - *Journal of Phycology* 42: 560-567.
- Rimet F., Heudre D., Matte J.L. and Mazuer P., 2006, Communautés de diatomées des bassins Moselle, Meuse et Sarre - Correspondance avec les Hydro-Ecorégions. *Diren Lorraine*, 51 pp.

- Roberts, S., Sabater, S. and Beardall, J. 2004. Benthic microalgal colonization in streams of differing riparian cover and light availability. - *Journal of Phycology* 40: 1004-1012.
- Roeselers, G., Zippel, B., Staal, M., van Loosdrecht, M. and Muyzer, G. 2006. On the reproducibility of microcosm experiments - different community composition in parallel phototrophic biofilm microcosms. - *Fems Microbiology Ecology* 58: 169-178.
- Romani, A. M. and Sabater, S. 1999. Effect of primary producers on the heterotrophic metabolism of a stream biofilm. - *Freshwater Biology* 41: 729-736.
- Romani, A. M. and Sabater, S. 2000. Influence of algal biomass on extracellular enzyme activity in river biofilms. - *Microbial Ecology* 40: 16-24.
- Rosemond, A. D., Mulholland, P. J. and Elwood, J. W. 1993. Top-Down and Bottom-up Control of Stream Periphyton - Effects of Nutrients and Herbivores. - *Ecology* 74: 1264-1280.
- Roy S., Chanut J.P., Gosselin M., and SimeNgando T.,1996, Characterization of phytoplankton communities in the lower St Lawrence estuary using HPLC-detected pigments and cell microscopy. *Marine Ecology-Progress Series*. 142 (1-3), 55-73.
- Sabater, S. and Admiraal, W., 2005, Periphyton as biological indicators in managed aquatic ecosystems. In M. E. Azim, M. C. J. Verdegem, A. A. van Dam, and M. C. M. Beveridge (Eds.) *Periphyton: Ecology, Exploitation and Management*, pp. 71–89
- Sabater, S., Gregory, S. V. and Sedell, J. R. 1998. Community dynamics and metabolism of benthic algae colonizing wood and rock substrata in forest stream. - *Journal of phycology* 34: 561-567.
- Sabater, S., Guasch, H., Ricart, M., Romani, A., Vidal, G., Klunder, C. and Schmitt-Jansen, M. 2007. Monitoring the effect of chemicals on biological communities. The biofilm as an interface. - *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 387: 1425-1434.
- Sandaa, R. A., Torsvik, V., Enger, O., Daae, F. L., Castberg, T. and Hahn, D. 1999. Analysis of bacterial communities in heavy metal-contaminated soils at different levels of resolution. - *Fems Microbiology Ecology* 30: 237-251.
- Sand-Jenseb K., 1983, Physical and chemical parameters regulating growth of periphytic communities. In : Wetzel R.J. *Proceedings of the first international workshop on periphyton of freshwater ecosystems*, sept. 1982, Växjö, Suède. Dr W. Junk Publishers, pp. 63-71.
- Schafer, H., Bernard, L., Courties, C., Lebaron, P., Servais, P., Pukall, R., Stackebrandt, E., Troussellier, M., Guindulain, T., Vives-Rego, J. and Muyzer, G. 2001. Microbial community dynamics in Mediterranean nutrient-enriched seawater mesocosms: changes in the genetic diversity of bacterial populations. - *Fems Microbiology Ecology* 34: 243-253.
- Schauer M., Massana R. and Pedros-Alio C.,2000, Spatial differences in bacterioplankton composition along Catalan Coast (NW mediterranean) assessed by molecular fingerprinting. *FEMS Microbiology Ecology*, 33, 51-59.
- Schmitt-Jansen, M. and Altenburger, R. 2005. Predicting and observing responses of algal communities to photosystem II-herbicide exposure using pollution-induced community tolerance and species-sensitivity distributions. - *Environmental Toxicology and Chemistry* 24: 304-312.
- Schneider, J., Morin, A. and Pick, F. R. 1995. The Response of Biota in Experimental Stream Channels to a 24-Hour Exposure to the Herbicide Velpar L(R). - *Environmental Toxicology and Chemistry* 14: 1607-1613.

- Schulz, R., Thiere, G. and Dabrowski, J. M. 2002. A combined microcosm and field approach to evaluate the aquatic toxicity of azinphosmethyl to stream communities. - *Environmental Toxicology and Chemistry* 21: 2172-2178.
- Sekar, R., Nair, K. V. K., Rao, V. N. R. and Venugopalan, V. P. 2002. Nutrient dynamics and successional changes in a lentic freshwater biofilm. - *Freshwater Biology* 47: 1893-1907.
- Sekar, R., Venugopalan, V. P., Nandakumar, K., Nair, K. V. K. and Rao, V. N. R. 2004. Early stages of biofilm succession in a lentic freshwater environment. - *Hydrobiologia* 512: 97-108.
- Shorrocks B., Rosewell J., 1987, Spatial patchiness and community structure: coexistence and guild size of drosophilids on ephemeral resources. *Br Ecol Soc Symp* 27:29-51
- Simon M. and Azam F., 1989, Protein content and protein synthesis rates of planktonic marine bacteria, *Marine Ecology Progress Series*. 51 : 201-213.
- Simon, M., Grossart, H. P., Schweitzer, B. and Ploug, H. 2002. Microbial ecology of organic aggregates in aquatic ecosystems. - *Aquatic Microbial Ecology* 28: 175-211.
- Smith, V. H. 2007. Microbial diversity-productivity relationships in aquatic ecosystems. - *Fems Microbiology Ecology* 62: 181-186.
- Soininen, J. 2004. Assessing the current related heterogeneity and diversity patterns of benthic diatom communities in a turbid and a clear water river. - *Aquatic Ecology* 38: 495-501.
- Sommer, U. 1996. Nutrient competition experiments with periphyton from the Baltic Sea. - *Marine Ecology-Progress Series* 140: 161-167.
- Srivastava, D. S., Kolasa, J., Bengtsson, J., Gonzalez, A., Lawler, S. P., Miller, T. E., Munguia, P., Romanuk, T., Schneider, D. C. and Trzcinski, M. K. 2004. Are natural microcosms useful model systems for ecology? - *Trends in Ecology & Evolution* 19: 379-384.
- Stanford, J. A. and J. V. Ward. 1988. The hyporheic habitat of river ecosystems. *Nature* 335:64-66.
- Steemann Nielsen E.,1952, The use of radio-active carbon ¹⁴C for measuring organic production in the sea. *J. Con. Perm. int. Explor. Mer.* 18(2), 117-140.
- Steinman A.D. and McIntire C.D., 1987, Effects of irradiance on the community structure and biomass of algal assemblages in laboratory streams, *Can. J. Fish. Aquat. Sci.* 44: 1640-1648.
- Steinman A.D., Havens K.E., Louda J.W., et al.,1998, Characterization of the photoautotrophic algal and bacterial communities in a large, shallow, subtropical lake using HPLC-PDA based pigment analysis. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, 55 (1), 206-219.
- Steinman A.D., McIntire C.D., Gregory S.V., Lamberti A. and Ashkenas L., 1987, Effect of herbivore type and density on taxonomic structure and physiognomy of algal assemblages in laboratory streams. *Journal of the North American Benthological Society*, 6, 175-188.
- Steinman A.D., Mulholland P.J. and Kirschtel D.B., 1991, Interactive effects of nutrient reduction and herbivory on biomass, taxonomic structure, and P uptake in lotic periphyton communities, *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*. 48 , 1951-1959.
- Steinman, A. D., Mulholland, P. J., Palumbo, A. V., Flum, T. F., Elwood, J. W. and DeAngelis, D. L. 1990. Resistance of lotic ecosystems to a light elimination disturbance : a laboratory stream study. - *oikos* 58: 80-90.

- Stevenson, R. J., 1996, The stimulation and drag of current. 321–341 in R. J. Stevenson, M. L. Bothwell, and R. L. Lowe, editors. *Algal ecology: freshwater benthic ecosystems*. Academic Press, New York, New York, USA.
- Stevenson, R. J. and C. G. Peterson, 1989, Variation in benthic diatom (Bacillariophyceae) immigration with habitat characteristics and cell morphology. *J. Phycol.* 25: 120–129.
- Stevenson, R.J. and Peterson, C.G., 1991. Emigration and immigration can be important determinants of benthic diatom assemblages in streams. *Freshwater Biology*, 26 (2) : 279-294
- Stevenson, R.J., 1983, "Effects of current and conditions simulating autogenically changing microhabitats on benthic diatom immigration". *Ecology*. 64: 1514-1524
- Stoodley, P., Sauer, K., Davies, D. G. and Costerton, J. W. 2002. Biofilms as complex differentiated communities. - *Annual Review of Microbiology* 56: 187-209.
- Stoodley, P., Wilson, S., Hall-Stoodley, L., Boyle, J. D., Lappin-Scott, H. M. and Costerton, J. W. 2001. Growth and detachment of cell clusters from mature mixed-species biofilms. - *Applied and Environmental Microbiology* 67: 5608-5613.
- Strachan, G., Preston, S., Maciel, H., Porter, A. J. R. and Paton, G. I. 2001. Use of bacterial biosensors to interpret the toxicity and mixture toxicity of herbicides in freshwater. - *Water Research* 35: 3490-3495.
- Sulkava, P. and Huhta, V. 1998. Habitat patchiness affects decomposition and faunal diversity: a microcosm experiment on forest floor. - *Oecologia* 116: 390-396.
- Tank, J. L. and Dodds, W. K. 2003. Nutrient limitation of epilithic and epixylic biofilms in ten North American streams. - *Freshwater Biology* 48: 1031-1049.
- Tilman, D., Downing, J. A. and Wedin, D. A. 1994. Does Diversity Beget Stability - Reply. - *Nature* 371: 114-114.
- Tixier, C., Bogaerts, P., Sancelme, M., Bonnemoy, F., Twagilimana, L., Cuer, A., Bohatier, J. and Veschambre, H. 2000. Fungal biodegradation of a phenylurea herbicide, diuron: structure and toxicity of metabolites. - *Pest Management Science* 56: 455-462.
- Tixier, C., Sancelme, M., Bonnemoy, F., Cuer, A. and Veschambre, H. 2001. Degradation products of a phenylurea herbicide, diuron: Synthesis, ecotoxicity, and biotransformation. - *Environmental Toxicology and Chemistry* 20: 1381-1389.
- Tlili A., Dorigo U., Montuelle B., Margoum C., Carluer N., Gouy V., Bouchez A., Bérard A., 2008, Responses of chronically contaminated biofilms to short pulses of diuron. An experimental study simulating flooding events in a small river. *Aquat. Toxicol.*, 87 : 252–263.
- Torsvik, V., Ovreas, L. and Thingstad, T. F. 2002. Prokaryotic diversity - Magnitude, dynamics, and controlling factors. - *Science* 296: 1064-1066.
- Townsend, C. R. and Hildrew, A. G. 1994. Species Traits in Relation to a Habitat Templet for River Systems. - *Freshwater Biology* 31: 265-275.
- Uehlinger, U. 1991. Spatial and Temporal Variability of the Periphyton Biomass in a Prealpine River (Necker, Switzerland). - *Archiv Fur Hydrobiologie* 123: 219-237.
- Uehlinger, U. and Brock, J. T. 2005. Periphyton metabolism along a nutrient gradient in a desert river (Truckee River, Nevada, USA). - *Aquatic Sciences* 67: 507-516.
- Van der Grinten E., 2004, Dynamics species interactions in phototrophic biofilm, PhD thesis, Department of Aquatic Ecology and Ecotoxicology FNWI, Université d'Amsterdam, 149p.

- Van Hannen E.J., Zwart G., Van Agterveld M.P. et al. Changes in bacterial and eukaryotic community structure after mass lysis of filamentous cyanobacteria associated with viruses. *Applied Environmental Microbiology*, 1999, pp. 795-801.
- Vannote R.L., Minshall G.W., Cummins K.W., Sedell K.R., Cushing C.E. 1980. The River Continuum Concept. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences* 37: 130-137.
- Vaulot D., 1989, CytoPC: processing software for flow cytometric data. *Signal Noise*, 2, 8.
- Volatier, L., 2004, Responses of a periphytic assemblage exposed to a complex effluent: bioassays and artificial channels. PhD thesis, National Institute of Applied Sciences of Lyon, France, p. 303.
- Wasson J.G., Barrera S., Barrère B., Binet D., Collomb D., Gonzales I., Gourdin F., Guyot J.L., and Rocabado G., 2002, Hydro-ecoregions of the Bolivian Amazon Basin: A Geographical Framework for the Functioning of River Ecosystems. In: *Ecohydrology of South American Rivers and Wetlands*, McClain M.E. (ed.), IASH special publication N°6: chap 5: 69-91.
- Wasson J.G., Chandesris A., Pella H. and Blanc L., 2004, Les Hydro-écorégions: une approche fonctionnelle de la typologie des rivières pour la Directive Cadre Européenne sur l'Eau. *Ingénieries - Eau Agriculture Territoires*, 40: 3-10.
- Watt A.S., 1947 - Pattern and process in the plant community, *Journal of Ecology* 35 : 1-22
- Wessels J.S. and Van Der Veen R., 1956, The action of some derivatives of phenylurethan and of 3-phenyl-1, 1-dimethylurea on the Hill reaction. *Biochim Biophys Acta*. 19(3):548–549
- Wetzel R.G. Attached algal-substrata interactions : fact or myth, and when and how ? In : Wetzel R.J. *Proceedings of the first international workshop on periphyton of freshwater ecosystems*, sept. 1982, Växjö, Suède. Dr W. Junk Publishers, 1983, pp. 207-215.
- Wetzel, R. G. 2001. *Limnology: Lake and River Ecosystems*. Academic Press, San Diego. 1006 pp.
- Whitford L.A. and Schumacher G.J., 1961, Effect of current on mineral uptake and respiration by a fresh water alga. *Limnol Oceanogr* 6:423–425
- Wilhem, C., Rudolph, I. and Renner, W., 1991, A quantitative method based on HPLC-aided pigment analysis to monitor structure and dynamics of the phytoplankton assemblages – a study from Lake Meerfelder Maar (Eifel, Germany). *Arch. Hydrobiol.*, 123, 21–35.
- Wimpenny J. An overview of biofilms as functional communities. In : ALLISON D., GILBERT P., Lappin-Scott H. et al. *Community structure and co-operation in biofilms*. Cambridge University Press, 2000, pp. 1-24.
- Wimpenny J.W.T. and Colasanti R., 1997, A unifying hypothesis for the structure of microbial biofilms based on cellular automation models, *FEMS Microbiol. Ecol.* 22 :1–16
- Wolfaardt, G.M., J.R. Lawrence, R.D. Robarts, and Caldwell D.E., 1998. In situ characterization of biofilm exopolymers involved in the accumulation of chlorinated organics. *Microb. Ecol.* 35, 213-223.
- Wu, J. G. and Levin, S. A. 1994. A Spatial Patch Dynamic Modeling Approach to Pattern and Process in an Annual Grassland. - *Ecological Monographs* 64: 447-464.
- Xu, F. L., Dawson, R. W., Tao, S., Li, B. G. and Cao, J. 2002. System-level responses of lake ecosystems to chemical stresses using exergy and structural exergy as ecological indicators. - *Chemosphere* 46: 173-185.
- Yatchi S. and Loreau M. (1999). Biodiversity and ecosystem productivity in a fluctuating environment. The insurance hypothesis. *Proceeding of National Academy of Science of the United States of America*, 96, 1463-1468.