

## Rapport final

*« Etude des diatomées des rivières non-permanentes :  
dynamique saisonnière des peuplements,  
capacités de bioindication et de reviviscence »*





# SOMMAIRE

LISTE DES FIGURES .....	I
LISTE DES TABLEAUX .....	III
GLOSSAIRE .....	IV
LISTE DES ABREVIATIONS.....	V
REMERCIEMENTS.....	VI
INTRODUCTION GENERALE : Cadre scientifique et Objectifs.....	1
I. Cadre scientifique.....	3
II. Objectifs .....	3
III. Remarque.....	5
CHAPITRE 1 : Impact de l'assèchement de biofilms phototrophes sur les communautés microbiennes à l'échelle de microcosme et mésocosme .....	7
I. Expérience préliminaire en microcosme .....	9
1. Objectifs de l'étude.....	9
2. Matériel et méthodes.....	9
a. Matériel :.....	11
b. Protocole expérimental .....	12
3. Résultats et discussion.....	13
a. Composition.....	14
b. Etat physiologique .....	14
c. Conclusions .....	15
II. Expérience en mésocosme .....	17
1. Objectifs.....	17
2. Matériel et méthodes.....	17
a. Matériel :.....	17
b. Protocole expérimental .....	18
<i>Mise en place du dispositif expérimental</i> .....	18
<i>Phases étudiées</i> .....	19
<i>Paramètres suivis</i> .....	20

<i>Protocole expérimental</i> .....	20
<i>Suivi analytique</i> .....	22
<i>Analyses statistiques</i> .....	25
2. Résultats .....	26
a. Données physico-chimiques .....	26
b. Compartiment phototrophe. ....	26
<i>Composition globale</i> .....	26
<i>Activité photosynthétique</i> .....	29
<i>Croissance du biofilm</i> .....	30
<i>Communautés de diatomées et indices biologiques</i> .....	31
c. Compartiment procaryote.....	32
<i>Diversité fonctionnelle bactérienne</i> .....	32
<i>Diversité génétique procaryote</i> .....	33
<i>Densités bactériennes</i> .....	35
2. Discussion.....	35
a. Données physico-chimiques .....	35
b. Compartiment phototrophe .....	35
c. Compartiment procaryote.....	36
III. Conclusion générale .....	38
CHAPITRE 2 : Impact de l'assèchement de biofilms sur les communautés de diatomées en milieu naturel.....	39
I. Objectifs .....	41
II. Matériel et méthodes .....	41
1. Site expérimental .....	41
2. Protocole expérimental.....	41
3. Analyses de laboratoire.....	43
4. Analyses statistiques.....	43
III. Résultats .....	44
1. Communautés « contrôles ».....	44

2. Impact de l'assèchement sur les dynamiques des communautés de diatomées ..	45
3. Impact de l'assèchement sur les taux de mortalité et installation du biofilm.....	47
IV. Discussion.....	48
1. Impact de l'assèchement sur les communautés de diatomées .....	48
2. Rôle de la dérive et du biofilm sec comme source cellulaire .....	49
3. Analyse de la composition spécifique.....	49
4. Impact de l'assèchement sur le taux de mortalité .....	50
V. Conclusions .....	50
CHAPITRE 3 : Etude de la valeur indicatrice des communautés de diatomées de rivières asséchées et approche taxonomique .....	53
1. Objectifs .....	55
2. Acquisition et exploitation des données.....	55
3. Résultats .....	57
II. Etude de la bioindication en mésocosme.....	60
1. Matériel et méthodes.....	60
2. Résultats et discussion.....	60
III. Etude de la bioindication en milieu naturel : Etude sur le Maureillas. ....	62
1. Matériel et méthodes.....	62
2. Résultats .....	62
3. Discussion.....	63
IV. Conclusions .....	64
CONCLUSION GENERALE : Conclusions et Perspectives.....	67
I. Conclusion générale .....	69
II. Perspectives .....	70
PUBLICATIONS.....	73
I. Publications .....	75
II. Posters et communications.....	76
REFERENCES.....	79
ANNEXES (Voir CD joint).....	83



## LISTE DES FIGURES

Figure 1 : Schéma synthétisant les différents processus abordés au cours de la thèse et la valorisation en cours des résultats. ....	5
Figure 2 : Dispositif PhytoPAM avec fibre optique et boîte noire (conditions DAS). ....	10
Figure 3 : Emission de fluorescence mesurée par le PhytoPAM en fonction des conditions du milieu et de la quantité de lumière reçue par le photosystème II des cellules chlorophylliennes. ....	11
Figure 4 : Schéma expérimental des microplaques utilisées lors de l'expérience. La plaque grisée est couverte par une feuille blanche, les puits barrés sont inutilisés. ....	12
Figure 5 : Proportion microbienne et efficacité maximale du PSII des diatomées et des cyanobactéries mélangées. ....	13
Figure 6 : Schéma du dispositif "Canal artificiel". ....	18
Figure 7 : Dispositif expérimental avant le début de l'expérimentation. ....	19
Figure 8 : Coupons asséchés au dessus du canal (a.) et coupons témoins transférés dans un aquarium en circuit fermé (b.) ....	19
Figure 9 : Schéma récapitulatif de l'expérience réalisée à partir des coupons colonisés du canal artificiel. Avant T0, les substrats artificiels (coupons) sont installés durant un mois dans le canal afin d'être colonisés par le biofilm en place. ....	21
Figure 10 : Plaque de Biolog composée de 3 x 32 puits. R = réplicats. ....	24
Figure 11 : Principe de la méthode ARISA (Automated Ribosomal Intergenic Spacer Analysis), d'après Richaume, Pourcelot et al. (2006). ....	25
Figure 12 : Comptages réalisés sur les différents échantillons après l'assèchement (A) et après la remise en eau (Re), pour chaque durée d'assèchement testée, comparés aux contrôles. ....	27
Figure 13 : Proportion microbienne détectée par le PhytoPAM après la remise en eau (Re), comparée aux contrôles. ....	28
Figure 14 : Modification visible de la structure du biofilm après 3 jours d'assèchement et 3 jours de remise en eau. ....	28
Figure 15 : Evolution du pourcentage de diatomées vivantes en fonction de la durée de l'assèchement, après la fin de l'assèchement et après la fin de la remise en eau, comparé aux contrôles. ....	29
Figure 16 : Activité photosynthétique du biofilm phototrophe au cours de l'expérience. ....	30
Figure 17 : Dosages de chlorophylle a et phéophytine en fonction de la durée de l'assèchement subie. ....	31
Figure 18 : ACP basée sur les proportions des communautés de diatomées. ....	32
Figure 19 : ACP basée sur la diversité fonctionnelle des bactéries. ....	33

Figure 20 : ACP basée sur les données d'ARISA. Les chiffres correspondent à la longueur de l'OTU en paires de bases. ....	34
Figure 21 : Schéma de la station d'étude. ....	42
Figure 22 : ACP sur les communautés « contrôles » de diatomées, en fonction des dates de prélèvement. ....	45
Figure 23 : ACP sur les communautés de diatomées, après 1 semaine, (A), 2 semaines (B) et 4 semaines d'assèchement (C). Les points sont regroupés en fonction du traitement (C : Contrôles ; S : pierres asséchées ; N : pierres nettoyées). ....	46
Figure 24 : Taux de mortalité des pierres « S » au cours des 28 jours de remise en eau, pour chaque durée d'assèchement. ....	47
Figure 25 : Evolution du nombre de taxons lors de la remise en eau sur les communautés des pierres nettoyées « N », pour chaque durée d'assèchement. ....	48
Figure 26 : Localisation des stations d'étude en Charente et Charente-Maritime. Rouge : stations ayant subi un assèchement estival ; Jaune : stations n'ayant pas subi d'assèchement estival. ....	57
Figure 27 : Diagrammes de Schöeller-Berkaloff sur les données interannuelles ....	59
Figure 28 : Moyennes des notes IBD et IPS (n = 17). GLOBAL, notes calculées sur les inventaires avec toutes les valves ; CHLORO, notes calculées sur les inventaires avec seulement les chloroplastes. ....	61
Figure 29 : Différence moyenne des notes IBD et IPS en valeur absolue, calculée sur toutes les valves, entre les communautés sèches et les communautés contrôles. ....	63
Figure 30 : Taxon inconnu, dominant dans le canal artificiel ....	76

## LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1 : Efficacité du photosystème II pour les cyanobactéries et les diatomées seules ou en mélange à l'état initial, après assèchement et après remise en eau, et valeurs moyennes des contrôles. ND : non détectable par le PhytoPAM. ....	14
Tableau 2 : Dosages de nutriments avant le début de l'expérience, comparé à la rivière Laudot (Tarn).....	26
Tableau 3 : Mesures physico-chimiques relevées au cours de l'expérience (n = 8). ....	26
Tableau 4 : Indices de Shannon sur le biofilm procaryote, en fonction des perturbations subies par le biofilm. ....	34
Tableau 5 : Paramètres mesurés au cours de l'expérience (n = 14).....	44
Tableau 6 : NPMANOVA sur les communautés de diatomées après 1, 2 et 4 semaines d'assèchement.....	46
Tableau 7 : Récapitulatif des stations suivies. En orange : les stations qui n'ont pas subi d'assèchement ; en gras : les dates où le prélèvement a été effectué en assec. ....	58

## GLOSSAIRE

- Assèchement :** Portion partielle ou totale d'une rivière qui s'assèche durant quelques semaines à quelques mois au cours d'une année.
- Bioindicateur :** Indicateur constitué par une espèce végétale, fongique ou animale ou par un groupe d'espèces (groupe éco-sociologique) ou groupement végétal dont la présence (ou l'état) renseigne sur certaines caractéristiques écologiques (c'est-à-dire physico-chimiques, microclimatique, biologiques et fonctionnelle) de l'environnement, ou sur l'incidence de certaines pratiques.
- Mésocosme :** Dispositif expérimental clos, de taille moyenne, destiné aux études écologiques, dont les conditions peuvent être partiellement ou totalement contrôlées.
- Microcosme :** Dispositif expérimental clos, de petite taille, destiné aux études écologiques, dont les conditions peuvent être partiellement ou totalement contrôlées.
- Proxy :** Intermédiaire par lequel une information est perçue de façon indirecte.
- Reviviscence :** Retour à la vie active de formes vivantes qui étaient entrées en anhydrobiose (vie latente) sous l'effet de la dessiccation.

## LISTE DES ABREVIATIONS

<b>ACP :</b>	Analyses en Composantes Principales
<b>ADN :</b>	Acide DésoxyriboNucléique
<b>ARISA :</b>	Analyse automatisée de l'espace intergénique ribosomal Automated Ribosomal Intergenic Spacer Analysis
<b>ARNr :</b>	Acide Ribonucléique ribosomal
<b>DAPI :</b>	Di Aminido Phenyl Indol
<b>DCE :</b>	Directive Cadre sur l'Eau
<b>IBD :</b>	Indice Biologique Diatomées
<b>IPS :</b>	Indice de PolluoSensibilité Spécifique
<b>MEB :</b>	Microscopie Electronique à Balayage
<b>MET :</b>	Microscopie Electronique à Transmission
<b>NPMANOVA :</b>	Analyse multivariée non paramétrique Non Parametric MANOVA
<b>OTU :</b>	Unité taxonomique opérationnelle Operational Taxonomic Unit
<b>PCR :</b>	Réaction de Polymérisation en chaîne Polymerase Chain Reaction

## REMERCIEMENTS

Je souhaiterais en premier lieu remercier l'Agence de l'Eau Adour-Garonne pour le financement octroyé pour la réalisation de ce projet. Je remercie particulièrement Jean-Pierre Rebillard, Maugaux Saüt et Frédéric Sibien pour leur bienveillance, leur disponibilité et leur confiance, ainsi que leur réactivité lorsque j'ai eu besoin d'avoir accès à leur base de données.

Je remercie également l'Agence Nationale de la Recherche et de la Technologie de m'avoir attribué une subvention CIFRE et ASCONIT Consultants pour le co-financement sur ces 3 années.

Je souhaite remercier au sein d'ASCONIT Consultants, Serge Rochepeau, Philippe Blancher et Florence Pérès pour leur confiance et leur soutien, et plus particulièrement Florence Pérès d'avoir porté ce projet à bout de bras. Je remercie également l'équipe de diatomistes d'ASCONIT Consultants pour leur appui technique et le partage de leur expérience concernant les diatomées.

Je souhaite remercier mes encadrants Jean-Luc Rols, Loïc Ten-Hage et Joséphine Leflaive de l'équipe CIRCE d'EcoLab, qui sont les piliers essentiels de ce travail de thèse, tant d'un point de vue technique et scientifique que personnel. J'ai une pensée également pour les autres membres de l'équipe, Jessica Ferriol, Alexandre Lamy et René Le Cohu pour leur disponibilité et leur gentillesse lorsque j'ai eu besoin d'aide.

Je tiens enfin à remercier ASCONIT Consultants et plus particulièrement Sylvain Coulon et Julien Barthès pour le soutien et la rigueur dont ils ont fait preuve lors des phases de terrain que je n'ai pu assurer.

# Introduction générale

## *Cadre scientifique et objectifs*



## I. Cadre scientifique

Les rivières non permanentes sont caractérisées par un assèchement de leur lit qui dure de quelques semaines à quelques mois. Un nombre conséquent de cours d'eau sont concernés en France, mais ils n'ont fait l'objet que d'un intérêt très récent de la part des collectivités et des organismes de recherche. La problématique du réchauffement climatique ainsi que les besoins démographiques croissants entraînent une forte pression sur les cours d'eau : précipitations moins importantes ou « efficaces », pression d'irrigation (très forte dans les départements de Charente et Charente-Maritime), ... Ces situations soulèvent de véritables questions quant à l'évolution des rivières françaises, puisque le suivi imposé par la Directive Cadre sur l'Eau (Directive 2000/60/EC) se révèle parfois difficile car non approprié aux rivières asséchées.

La méconnaissance des dynamiques de population de diatomées rend difficile la prise de décision concernant la protection de la biodiversité dans ces milieux. En effet, la réponse à un stress tel que l'assèchement induit inévitablement des adaptations à l'échelle des individus ou des populations. L'état des connaissances actuelles permet de poser certaines hypothèses concernant les stratégies de survie des populations : la possibilité d'une recolonisation par la dérive lors de la remise en eau ou la capacité de reviviscence des diatomées à partir d'un biofilm sec. Ces changements peuvent se traduire par des modifications structurelles favorisant certaines espèces et qui peuvent donc potentiellement impacter les indices diatomiques utilisés lors des suivis de routine.

L'appréhension de ces problématiques se fait à 3 niveaux d'organisation biologique et de réalisme croissants :

- Celui du microcosme, lors d'une expérience sur des cultures d'algues afin d'étudier de façon plus spécifique l'impact d'un assèchement sur des communautés simples (Chapitre 1) ;
- Celui du mésocosme, dans un canal artificiel, sur un biofilm benthique plus complexe et des conditions plus contrôlées qu'en milieu naturel (Chapitre 1) ;
- Celui du milieu naturel, comme rencontré lors des investigations de routine effectuées sur les communautés de diatomées au sein d'une palette diversifiée de cours d'eau (Chapitres 2 et 3).

## II. Objectifs

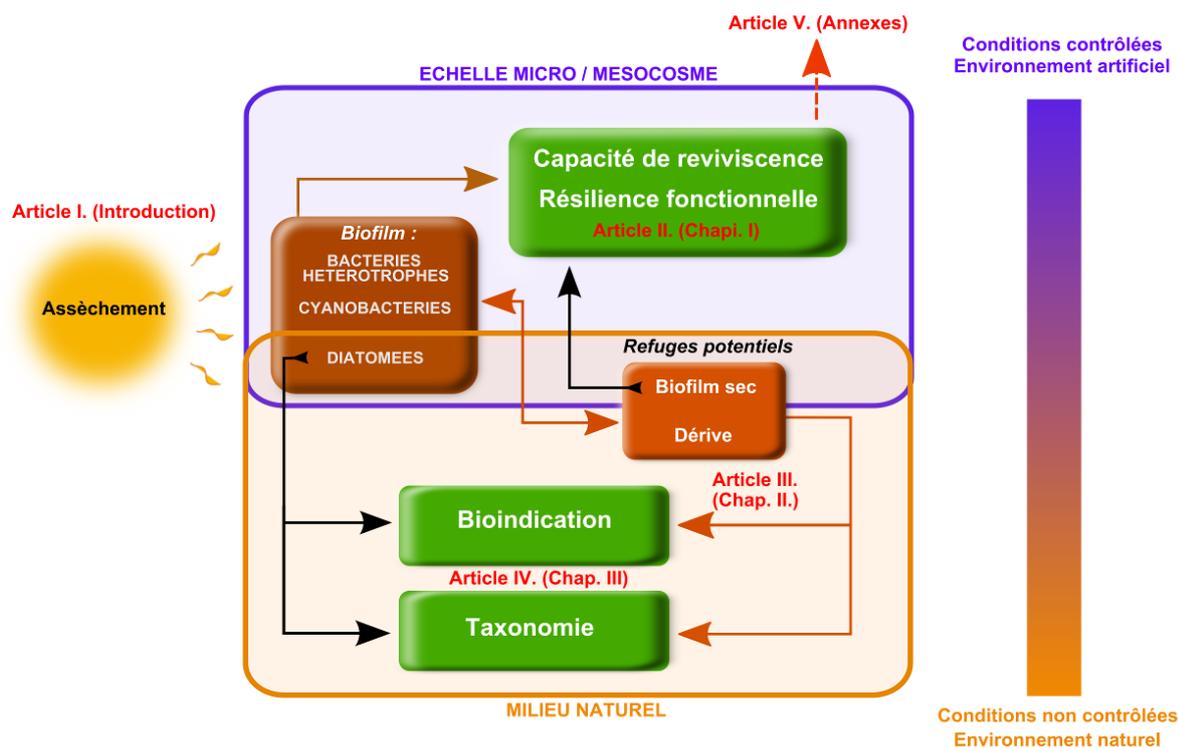
L'objectif de ce travail est de comprendre l'impact d'un épisode d'assèchement de longueur variable sur la structure et la fonction des différents compartiments microbiens composant un biofilm benthique. La communauté des diatomées sera plus particulièrement étudiée en milieu naturel, ainsi que les incidences d'un assèchement sur les outils utilisés (indices diatomiques) pour les suivis de la qualité biologique de l'eau effectués dans le cadre de la Directive européenne.

Le premier chapitre décrit l'étude de l'impact de l'assèchement de biofilms benthiques simplifiés sur les communautés microbiennes, en milieu confiné (facteurs environnementaux maîtrisés). La capacité de reviviscence des diatomées et la résilience fonctionnelle hétérotrophe du biofilm dans son ensemble sont mises en évidence, pour des assèchements de durées variables (1 à 8 semaines).

Le second chapitre décrit l'étude de l'impact de l'assèchement de biofilms naturels sur les communautés de diatomées en conditions réelles. La repousse à partir du biofilm sec et de la dérive est appréhendée par une expérience d'assèchement provoqué dans une rivière méditerranéenne, le Maureillas (66).

Enfin le troisième et dernier chapitre est consacré à l'étude de l'impact de l'assèchement sur les indices biologiques basés sur les diatomées et utilisés dans le cadre du suivi européen (DCE), couplée à une approche taxonomique. Il repose sur des données récoltées sur le terrain lors d'assèchements en Charente et Charente-Maritime, comparées à des relevés de données physico-chimiques et biologiques des années antérieures. Les différentes approches indicielles réalisées au cours des études décrites précédemment y sont également synthétisées.

Le travail réalisé au cours de ces 3 années de thèse est synthétisé dans la Figure 1. Elle présente les différents articles soumis, en cours de rédaction ou en projet, et les différents éléments détaillés dans le présent rapport.



**Figure 1 : Schéma synthétisant les différents processus abordés au cours de la thèse et la valorisation en cours des résultats.**

Article I. : Synthèse bibliographique sur les stratégies de résistance à la sécheresse des biofilms benthiques phototrophes (titre à définir).

Article II. : Impact de l'assèchement de biofilms phototrophes sur les communautés microbiennes à l'échelle de microcosme et mésocosme (rédaction en cours).

Article III. : " Impact of drought on diatom communities and the consequences for the use of diatom index values in the Maureillas river (Pyrénées-Orientales, France) " (soumis à la revue *River Research and Applications*).

Article IV. : Synthèse bibliographique sur la bioindication, enrichie avec les données obtenues lors des différentes expériences (encore à définir).

Article V. : Description d'une nouvelle espèce de Biraphidée dans un mésocosme : *Germainiella* sp..

### III. Remarque

La fin de la thèse étant prévue pour le milieu de l'année 2014, ce rapport n'est pas exhaustif et le début de l'année prochaine fera l'objet d'un travail de synthèse conséquent sur les données

existantes (physico-chimiques et inventaires diatomiques), fournies par l'Agence de l'Eau Adour-Garonne. Ces données concernent la seconde partie du chapitre 2 et une partie du chapitre 3.

Ce complément sera disponible dans la version finale du manuscrit de thèse, qui sera transmise à l'Agence de l'Eau Adour-Garonne.

**IMPORTANT** : Ces données font ou vont faire l'objet de publications scientifiques, merci de maîtriser la diffusion de ces informations.

# Chapitre 1

***Impact de l'assèchement de biofilms  
phototrophes sur les communautés  
microbiennes à l'échelle de microcosme et  
mésocosme :***

***Capacité de reviviscence et résilience fonctionnelle.***



Dans ce chapitre, les biofilms sont étudiés dans un environnement contrôlé afin de suivre précisément l'évolution des différents compartiments microbiens du biofilm phototrophe.

L'utilisation de conditions contrôlées permet l'étude de la repousse exclusivement à partir du biofilm sec, en s'affranchissant de la dérive de biomasse planctonique ou d'origine benthique. Dans ce but, deux expériences sont réalisées, l'une sur des algues cultivées en microplaques (microcosme) et l'autre sur un biofilm établi dans un canal artificiel (mésocosme).

L'expérience en microcosme est une expérience préliminaire pour comprendre le comportement d'espèces photosynthétiques seules ou associées, dans le but d'étudier ensuite un biofilm à une échelle plus complexe, celle du mésocosme avec une communauté plus diversifiée.

## I. Expérience préliminaire en microcosme

### 1. Objectifs de l'étude

Le but de cette étude préliminaire est d'analyser l'impact d'un assèchement sur l'activité photosynthétique d'une cyanobactérie (*Leptolyngbia* sp), d'une diatomée (*Nitzschia palea*) et du mélange des deux. Le mélange d'espèces permettra également de mettre en évidence les modifications structurelles de façon relative et ainsi de définir les influences interspécifiques. Ces espèces ont été isolées de cours d'eau de la région Midi-Pyrénées et sont « environnées » de leur cortège bactérien.

### 2. Matériel et méthodes

Cette étude préliminaire repose sur l'utilisation d'un PhytoPAM (PAM = Pulse Amplitude Modulation) (Figure 2). En réponse à l'émission d'un flash de lumière saturante sur le biofilm, le PhytoPAM enregistre la fluorescence des pigments photosynthétiques à 4 longueurs d'onde d'émission. Il permet de mesurer le niveau de base de fluorescence en donnant un proxy (intermédiaire par lequel on perçoit une information) de la biomasse ainsi que les proportions relatives des différents groupes d'algues, donnant une idée de l'état physiologique des communautés phototrophes.



**Figure 2 : Dispositif PhytoPAM avec fibre optique et boîte noire (conditions DAS).**

Les données de fluorescence de référence utilisées ont été créées au laboratoire à partir de cultures pures de *Leptolyngbia* sp (cyanobactérie benthique) et de *Fistulifera saprophila* (diatomée benthique). Seules les diatomées et les cyanobactéries sont suivies car le compartiment algues vertes n'est pas présent ou négligeable dans le mésocosme que l'on souhaite étudier (canal artificiel). Les mesures sont effectuées en conditions DAS (Dark-Adapted State), ce qui signifie que les biofilms subissent au préalable une adaptation à l'obscurité de 20 min afin de stabiliser leur fluorescence à son minimum. C'est le flash (ou « pulse ») provoqué par le phytoPAM qui permet de mesurer la fluorescence maximale du biofilm étudié et ainsi de déterminer son efficacité photosynthétique (Roháček and Barták, 1999), correspondant au taux de transfert des électrons dans le photosystème II.

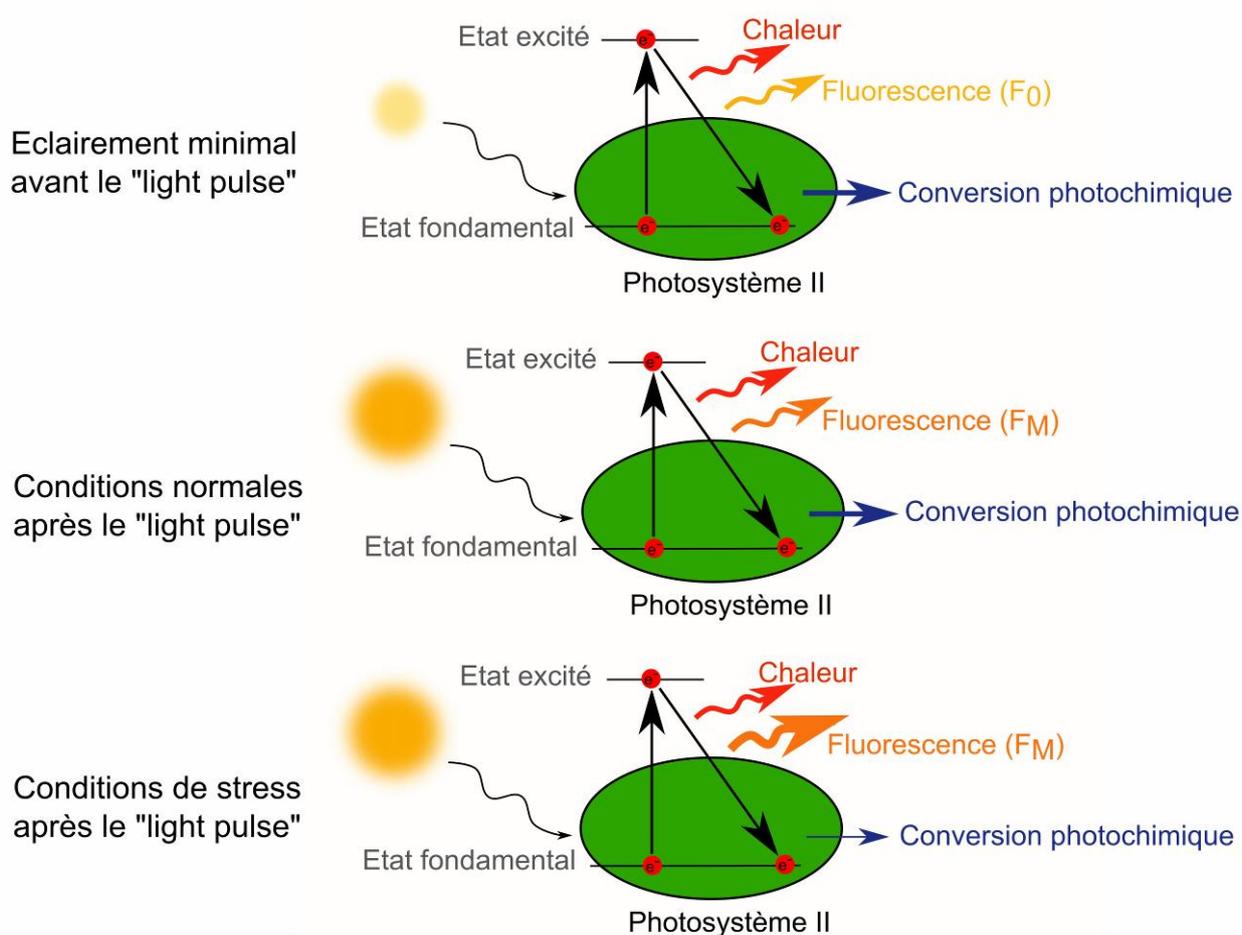
L'efficacité maximale du photosystème II ( $\Phi_{PSII}$ ) se mesure grâce à cette formule (Roháček and Barták, 1999) :

$$\Phi_{PSII} \text{ (DAS conditions)} = \frac{(F_M - F_0)}{F_M} = 1 - \left(\frac{F_0}{F_M}\right) ; 0 < \Phi_{PSII} < 1$$

$F_M$  = Fluorescence maximale mesurée en conditions DAS, avec un photosystème II fermé.

$F_0$  = Fluorescence minimale mesurée en conditions DAS, avec un photosystème II ouvert.

Le principe de l'émission de fluorescence dans des environnements contraint ou non est détaillé dans la Figure 3.



**Figure 3 : Emission de fluorescence mesurée par le PhytoPAM en fonction des conditions du milieu et de la quantité de lumière reçue par le photosystème II des cellules chlorophylliennes.**

L'expérience est réalisée sur le site d'EcoLab, Université Paul Sabatier, à Toulouse.

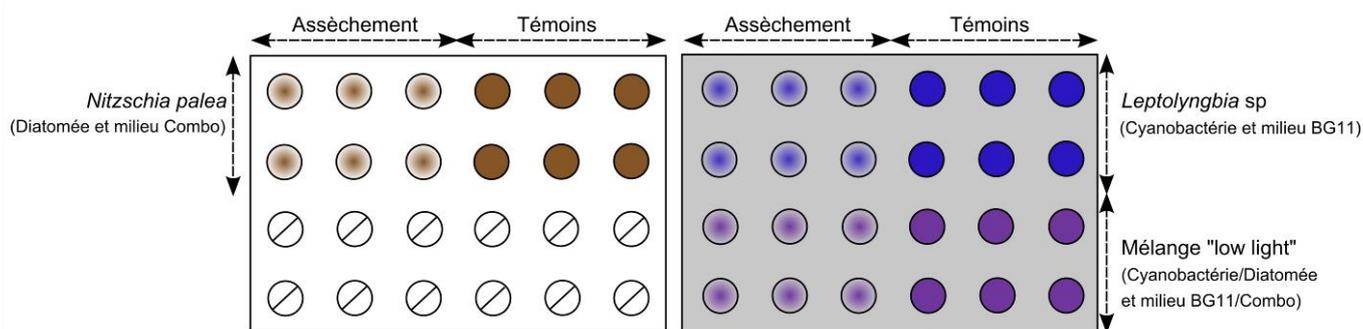
#### a. Matériel :

- Culture de *Nitzschia palea* (diatomée)
- Culture de *Leptolyngbia sp* (cyanobactérie)
- Microplaques de 24 puits
- Enceinte à 18°C, 16 h de lumière et 8 h d'obscurité par 24 h
- Milieux de culture BG11 (cyanobactéries ; Stanier *et al.* (1971)) et Combo (diatomées ; Kilham *et al.* (1998))
- PhytoPAM

## b. Protocole expérimental

Sur des microplaques de 24 puits d'une contenance de 2 mL, 12 réplicats de chaque micro-organisme sont mis en culture avec leur milieu associé, Milieu BG11 pour la cyanobactérie ou Milieu Combo pour la diatomée. Sur ces 12 réplicats, 6 subiront le traitement d'assèchement et 6 serviront de témoins. Le protocole utilisé est le même pour le mélange des deux micro-organismes (50 % chacun) où un mélange des deux milieux de culture est utilisé (50 % chacun). La seule différence est que le milieu contenant la cyanobactérie (seule ou en mélange, plus sensible à la lumière) est couvert d'une feuille de papier blanc (conditions « low light », opposées aux conditions « high light » quand le milieu n'est pas couvert). La disposition des microplaques est représentée dans la Figure 4.

Les cultures « low light » sont soumises à une irradiance de  $22,45 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$  alors que les cultures « high light » sont soumises à une irradiance de  $64,45 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$  dans l'enceinte d'incubation.



**Figure 4 : Schéma expérimental des microplaques utilisées lors de l'expérience. La plaque grisée est couverte par une feuille blanche, les puits barrés sont inutilisés.**

Une fois le dispositif mis en place, les microplaques sont incubées à  $18^{\circ}\text{C}$  dans une enceinte (cycle jour / nuit : 16 h / 8 h) durant 1 semaine afin de laisser les micro-organismes benthiques s'installer dans leur nouvel environnement (phase préliminaire d'adaptation).

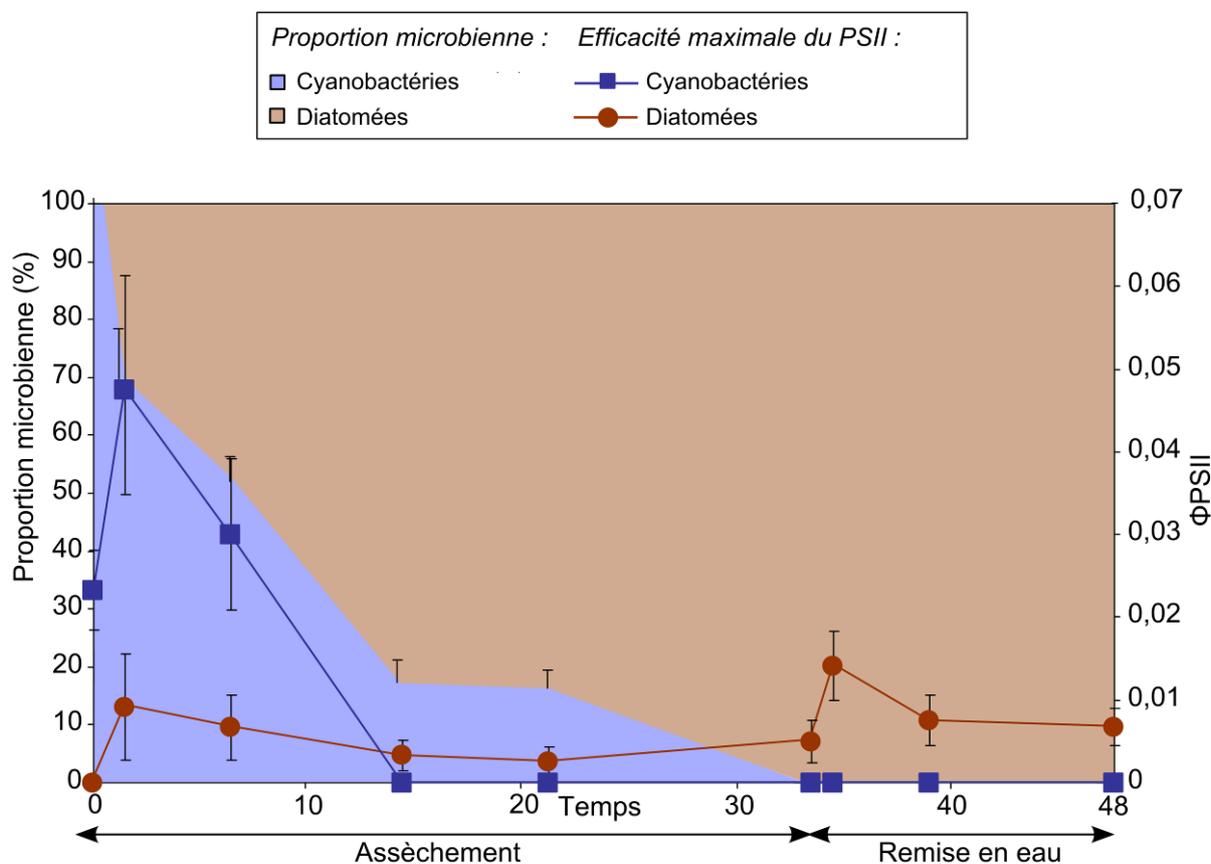
Après une semaine d'incubation, le milieu est retiré des puits non témoins (= assèchement) à l'aide d'une pipette et les mesures PhytoPAM débutent. Deux mesures sont réalisées sur chaque réplicat et les données obtenues concernant la composition et l'efficacité photosynthétique sont enregistrées.

Entre chaque mesure, les microplaques sont recouvertes de parafilm afin de limiter l'évaporation du milieu toujours contenu dans les puits témoins.

Après une période d'assèchement de 34 jours dans l'enceinte, les puits asséchés sont remplis de milieu de culture (= remise en eau) et remis à incuber pour une durée de 14 jours. Le milieu des témoins est quant à lui renouvelé une première fois 16 jours après le début du traitement d'assèchement, et une seconde fois au moment de la remise en eau des autres puits (à 34 jours).

### 3. Résultats et discussion

Les proportions d'espèces photosynthétiques mélangées et leur efficacité photosynthétique obtenues au cours des 48 jours d'expérience sont synthétisées dans la Figure 5. Pour chaque point, 12 mesures ont été enregistrées (2 mesures par puits sur 6 réplicats).



**Figure 5 : Proportion microbienne et efficacité maximale du PSII des diatomées et des cyanobactéries mélangées.**

Les témoins sont restés stables au cours de l'expérience, tant du point de vue de la composition que de l'activité photosynthétique. Les milieux de culture sont renouvelés environ toutes les 3 semaines, lorsqu'une baisse d'activité photosynthétique est constatée. On note cependant que les valeurs moyennes d'activité des témoins sont plus élevées pour les diatomées seules (0,365) que pour les cyanobactéries seules (0,128). De plus, les cyanobactéries dominent le mélange lorsqu'il n'y a pas de perturbation d'assèchement (Tableau 1).

**Tableau 1 : Efficacité du photosystème II pour les cyanobactéries et les diatomées seules ou en mélange à l'état initial, après assèchement et après remise en eau, et valeurs moyennes des contrôles. ND : non détectable par le PhytoPAM.**

	$\Phi_{PSII}$	Etat initial	Après assèchement	Après remise en eau	Valeurs moyennes des contrôles
Cyanobactéries seules		0,016	0,004	0,012	0,128
Diatomées seules		0,260	0,003	0,576	0,365
Cyanobactéries mélangées		0,023	ND	ND	0,159
Diatomées mélangées		ND	0,005	0,007	0,005

### a. Composition

On observe dans la Figure 5 et le Tableau 1 une diminution de la proportion de *Leptolyngbia* sp (cyanobactérie) détectée par le PhytoPAM au profit de *Nitzschia palea* (diatomée). Cette modification est progressive durant les 5 semaines d'assèchement, mais elle est également durable, puisque les cyanobactéries restent indétectables par le PhytoPAM après 2 semaines de remise en eau. Il semblerait donc que le signal des diatomées était « dissimulé » par le signal des cyanobactéries au début de l'expérience, ces dernières étant bien plus représentées en termes de biomasse dans le canal au stade initial du mélange.

### b. Etat physiologique

Les efficacités photosynthétiques des diatomées seules et cyanobactéries seules ont un profil similaire, où l'assèchement provoque une diminution progressive de leur activité synthétique, qui reprend lors de la remise en eau (Tableau 1). Les deux micro-organismes non mélangés sont affectés par l'assèchement, mais les diatomées (après 14 jours en eau :  $0,576 \pm 0,03$ ) ont un rebond de reprise d'activité. Les cyanobactéries, quant à elles, retrouvent leur activité initiale (après 14 jours en eau :  $0,0128 \pm 0,007$ ).

Concernant le mélange (Figure 5), on observe une baisse d'activité photosynthétique pour les deux micro-organismes étudiés pendant la phase d'assèchement, rapide pour les cyanobactéries et progressive pour les diatomées. Cette observation est cohérente avec les données obtenues pour la composition du mélange.

Les valeurs d'activité photosynthétique pour les diatomées mélangées sont bien moins élevées que lorsque les diatomées sont seules (0,007 contre 0,576 en fin de remise en eau). De telles différences de valeurs peuvent s'expliquer par l'interaction entre les espèces et les conditions expérimentales. En effet, les cyanobactéries peuvent avoir une activité inhibitrice sur la croissance des diatomées, mais la principale raison doit être que les diatomées mélangées reçoivent moins de lumière que les diatomées seules (le mélange étant couvert). Pour vérifier cette hypothèse, il aurait fallu également tester les diatomées en conditions « low light ».

En effet, l'expérience a également été testée sur le mélange « high light » mais ces conditions étaient très défavorables pour les cyanobactéries dont la présence avait significativement diminuée après la première semaine d'adaptation. Sur le mélange « low light », les diatomées perdaient en moyenne 30 % d'activité photosynthétique (0,006 pour le mélange « high light » contre 0,004 pour le mélange « low light », résultats non montrés), c'est donc pour cette raison que le mélange « low light » a été choisi pour l'illustration des résultats.

L'activité des diatomées en mélange reprend significativement juste après la remise en eau avant de diminuer progressivement. Il semblerait que la reprise d'activité des diatomées ait entraîné une importante consommation du milieu de culture lors des premiers jours de remise en eau. Il aurait donc été intéressant de renouveler le milieu après quelques jours de remise en eau afin de voir l'évolution sans limitation nutritionnelle. L'activité photosynthétique des cyanobactéries a disparu au cours de l'assèchement et 14 jours de remise en eau ne sont pas suffisants pour leur permettre de reprendre une activité photosynthétique lorsqu'elles cohabitent avec les diatomées.

L'activité photosynthétique en mélange est dominée par les cyanobactéries lorsqu'il n'y a pas de perturbation d'assèchement (témoins).

Les données concernant l'activité photosynthétique sont cohérentes avec celles observées sur la composition du mélange d'algues.

### **c. Conclusions**

Cette expérience préliminaire met en évidence l'impact d'un assèchement sur un biofilm simplifié associé à une modification de la structure et de l'état physiologique des cyanobactéries et des diatomées utilisées. La modification structurelle est durable avec une transition des cyanobactéries vers les diatomées au cours de l'assèchement, la situation étant restée identique après 14 jours de remise en eau.

On observe également une résilience fonctionnelle étant donné que l'activité photosynthétique reprend rapidement après la remise en eau, que les espèces microbiennes soient seules ou en mélange.

## II. Expérience en mésocosme

D'après les résultats de l'étude préliminaire en microcosme, il semblerait que l'assèchement ait un effet notable et durable sur la structure du compartiment photosynthétique (cyanobactéries et diatomées isolées ou en mélange), associée à une résilience fonctionnelle.

### 1. Objectifs

L'objectif de cette étude est de définir l'impact d'un assèchement sur un biofilm microbien diversifié (communauté d'algues et de bactéries), et ses conséquences lors de la remise en eau. Lors de cette dernière étape, c'est uniquement la repousse à partir du biofilm sec qui est ciblée.

### 2. Matériel et méthodes

L'expérience est réalisée sur le site d'EcoLab, Université Paul Sabatier, à Toulouse.

Deux phases sont étudiées : une phase d'assèchement de différentes durées (1, 2, 4 et 8 semaines) et une phase de remise en eau d'une durée de 13 jours dans des aquariums individuels, propres à chaque durée d'assèchement.

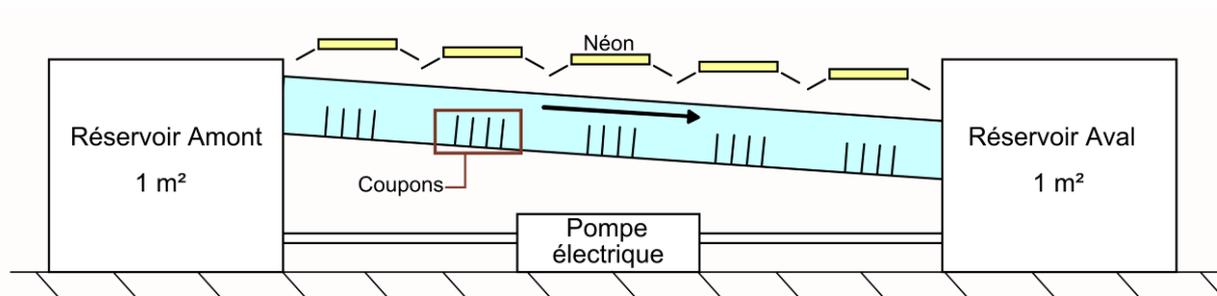
#### a. Matériel :

- Biofilm benthique cultivé depuis plusieurs années
- Canal artificiel ( $L \times l \times h = 400 \times 20 \times 20$  cm) doté d'une pompe créant un courant en circuit fermé
- 44 coupons en polyéthylène ( $\sim 5 \times 10 \times 0,5$  cm) = substrats artificiels
- Aquariums individuels (10 L) dotés d'une pompe créant un courant en circuit fermé
- Dispositif lumineux au-dessus du canal et des aquariums
- Eau du canal filtrée (aquariums)
- PhytoPAM
- Sonde multiparamètres WTW
- Ultrathurax
- Centrifugeuse
- Tubes de 15 mL, 50 mL et eppendorfs
- Microplaques de Biolog
- Spectrophotomètre
- Microscope inversé Zeiss Axiovert 10

## b. Protocole expérimental

### *Mise en place du dispositif expérimental*

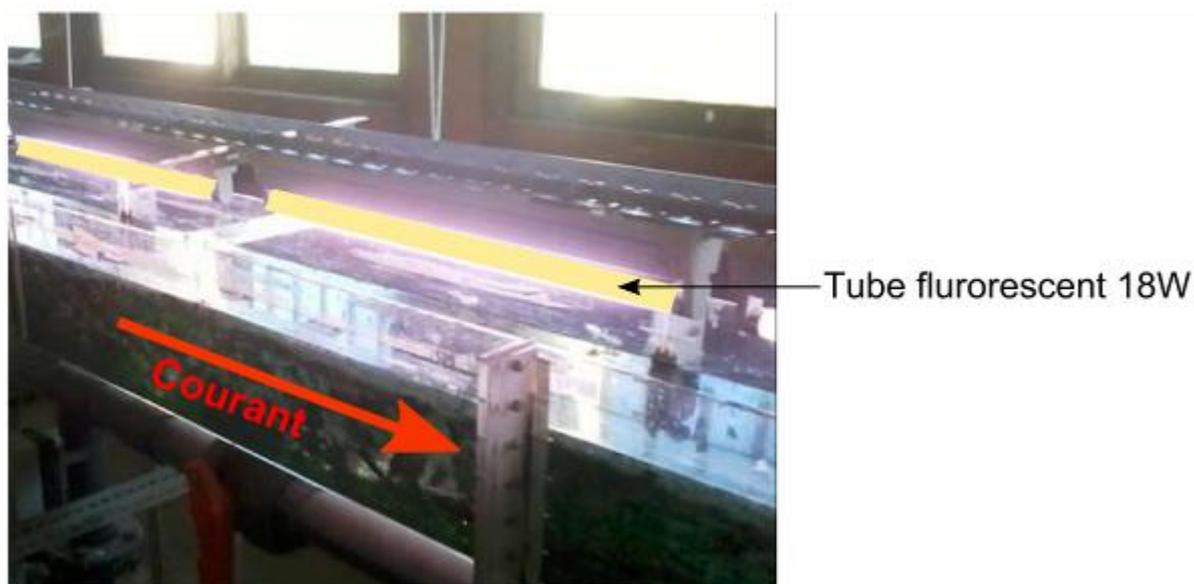
Le dispositif est schématisé dans la Figure 6.



**Figure 6 : Schéma du dispositif "Canal artificiel".**

Le dispositif expérimental est composé de deux réservoirs d'une capacité d'1 m<sup>3</sup>, avec un système de pompage permettant la circulation de l'eau. Un canal artificiel en plexiglas transparent long de 4 mètres, large de 20 cm, avec une hauteur d'eau de 20 cm, assure un écoulement permanent dont le débit est de l'ordre de 3 L.s<sup>-1</sup>. Des néons favorisant le développement biologique d'une puissance de 18 W (émission dans les spectres bleu et rouge) sont installés au-dessus du canal pour des cycles journaliers de 8 h / 16 h (nuit / jour).

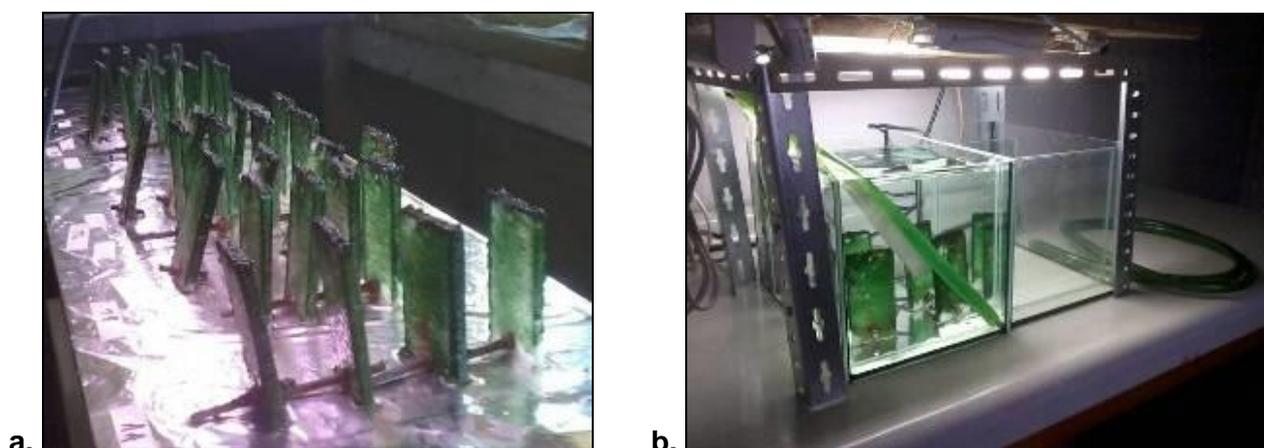
Un biofilm constitué de microorganismes provenant de cours d'eau de la région Midi-Pyrénées, est installé dans le canal depuis plusieurs années, avec des apports réguliers de biomasse provenant du milieu naturel. Le niveau d'eau est réalisé avec de l'eau du réseau d'eau potable. La charge en nutriments est contrôlée avant le début de l'expérience par l'intermédiaire de dosages afin de s'assurer qu'elle ne soit pas limitante (nitrates, phosphates, silice). Le dispositif d'éclairage est mis en place et le biofilm est décollé des parois et du fond du canal dans le but de lancer la colonisation sur des substrats vierges. 44 coupons (~ 5 x 10 x 0,5 cm) en polyéthylène sont immergés et lestés au fond du canal avec des tiges métalliques pour ne pas flotter et être déplacés par le courant. L'expérimentation est ensuite lancée pour une durée de 2 mois et demi (Figure 7).



**Figure 7 : Dispositif expérimental avant le début de l'expérimentation.**

### ***Phases étudiées***

Deux phases sont étudiées : la phase d'assèchement d'une durée de 1, 2, 4 et 8 semaines et la phase de remise en eau en aquariums individuels d'une durée de 13 jours (Figure 8). La chronologie de ces phases est détaillée dans la Figure 9. L'intérêt de séparer les aquariums de remise en eau est de s'affranchir des apports en biomasse de la colonne d'eau (correspondant à la dérive et non réalisable en milieu naturel).



**Figure 8 : Coupons asséchés au-dessus du canal (a.) et coupons témoins transférés dans un aquarium en circuit fermé (b.)**

Des coupons témoins sont également suivis, ils sont sortis du canal sans subir d'assèchement et placés dans un aquarium durant 13 jours (Figure 8, b.) afin de mesurer l'impact éventuel d'un changement de milieu (canal / aquarium) sur les communautés installées.

### ***Paramètres suivis***

Les compartiments phototrophe et hétérotrophe et procaryotes du biofilm sont suivis.

Concernant le compartiment autotrophe, il est caractérisé par les paramètres suivants :

- La composition du biofilm, plus particulièrement la proportion des cyanobactéries et des diatomées, par l'intermédiaire du PhytoPAM associé à des comptages cellulaires ;
- L'activité photosynthétique, également suivie par le PhytoPAM ;
- La croissance du biofilm, grâce à des dosages de chlorophylle *a* et de phéophytine.

Concernant le compartiment hétérotrophe et procaryote, les paramètres suivis sont :

- La diversité fonctionnelle, par l'utilisation de microplaques Biolog ;
- La diversité génétique procaryote, par l'intermédiaire d'une ARISA ;
- La densité bactérienne, par des comptages au DAPI.

### ***Protocole expérimental***

44 coupons sont immergés dans le canal artificiel après décollement du biofilm des parois du canal (biomasse en dérive qui sert à ensemercer les coupons). Les coupons y sont laissés durant un mois avant le début de l'expérimentation afin d'être colonisés par le biofilm installé.

Un prélèvement est réalisé à l'état initial (T0), puis à chaque fin d'assèchement (TX pour X semaines d'assèchement) et à chaque fin de remise en eau dans des aquariums séparés selon les durées d'assèchement testées (TX+13 pour chaque X semaines d'assèchement suivi de 13 jours de remise en eau). Le détail est illustré en Figure 9. L'eau utilisée pour les aquariums et les prélèvements de biofilm est l'eau du canal préalablement filtrée à 0,22 µm afin d'éviter des apports exogènes de biomasse.

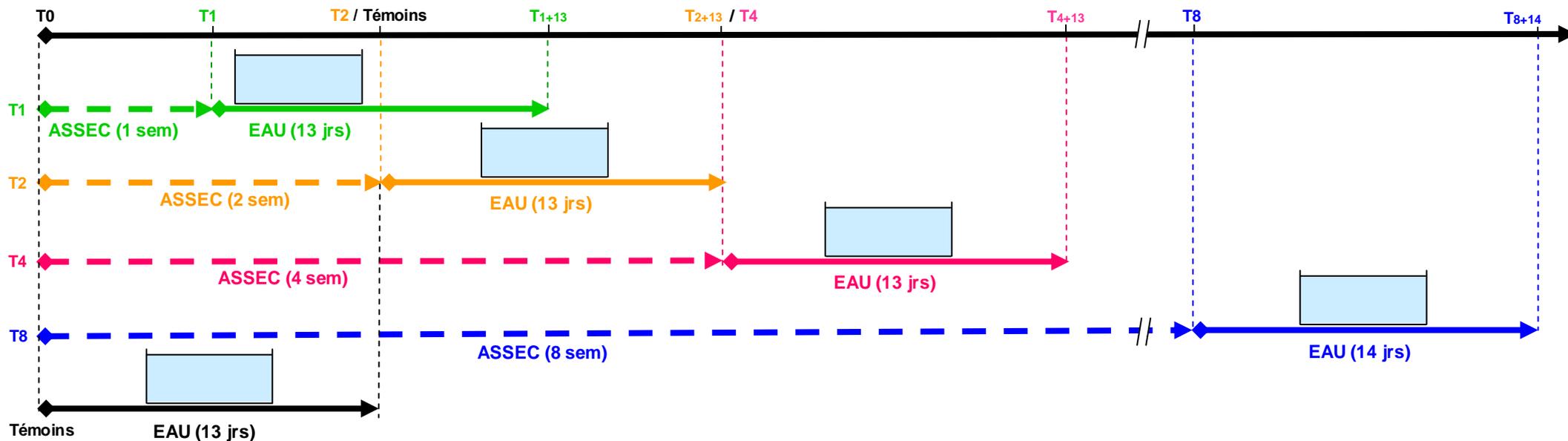


Figure 9 : Schéma récapitulatif de l'expérience réalisée à partir des coupons colonisés du canal artificiel. Avant T0, les substrats artificiels (coupons) sont installés durant un mois dans le canal afin d'être colonisés par le biofilm en place.

Pour chaque prélèvement (en fin d'assec ou de remise en eau), les biofilms de 4 coupons sont prélevés, soit 2 répliquats de 2 coupons. Les répliquats sont passés à l'Ultrathurax afin d'homogénéiser les agrégats de biofilm. Le protocole de prélèvement utilisé pour la réalisation des différentes analyses (ADN, bactéries, comptages, dosages de Chlorophylle *a* / phéophytine, Biolog) est détaillé en annexe 1. Les échantillons concernant les analyses ADN, les bactéries et les dosages de chlorophylle *a* / phéophytine sont exploités une fois l'expérience terminée, en attendant, elles sont stockées dans un congélateur à - 80°C. Les échantillons destinés au comptage sont fixés au glutaraldéhyde 3% et conservés à l'obscurité et à 4°C.

Une fois l'état initial effectué, la totalité des coupons devant subir les phases d'assèchement est sortie et déposée sur une plaque au-dessus du canal, sous le dispositif d'éclairage qui a été surélevé afin de conserver les conditions d'éclairement les plus proches possibles de celles du canal artificiel (Figure 8, a.).

Un témoin constitué de 4 coupons est également réalisé, il est transféré directement du canal artificiel vers un aquarium sans subir d'assèchement, au même moment où les autres coupons sont asséchés (Figure 8, b.).

Les mesures PhytoPAM sont effectuées en temps réel et l'extinction du signal est mesurée durant les 24 h suivant le début de l'assèchement jusqu'à l'extinction du signal, puis lors de la remise en eau à 0, 1, 6 et 13 jours pour chaque durée d'assèchement étudiée. Une quarantaine de mesures sont relevées sur les 4 mêmes coupons pour chaque durée d'assèchement.

Un témoin « négatif », composé de coupons propres et vierges, est également réalisé. Les coupons sont déposés dans un aquarium et suivis par l'intermédiaire du PhytoPAM, afin d'éliminer les éventuels biais liés au dispositif.

Enfin, quelques composés importants pour la croissance des algues sont dosés en début d'expérience afin de s'assurer qu'ils ne soient pas limitant : Fluorures ( $F^-$ ), chlorures ( $Cl^-$ ), nitrites ( $N-NO_2^-$ ), nitrates ( $N-NO_3^-$ ), sulfates ( $S-SO_4^{2-}$ ) et phosphates ( $P-PO_4^{3-}$ ).

### ***Suivi analytique***

Sur le compartiment phototrophe, la composition et l'activité photosynthétique sont suivies par l'intermédiaire du PhytoPAM, avec les mêmes références que celles utilisées lors de l'expérience préliminaire (voir I.). Pour rappel, le PhytoPAM permet de mesurer les proportions de micro-organismes photosynthétiques et l'efficacité maximale du photosystème II (activité photosynthétique) des différents groupes phototrophes étudiés : particulièrement les cyanobactéries et les diatomées dans notre étude, les algues vertes étant très négligeables. Les mesures sont

effectuées après une adaptation de 20 min à l'obscurité (conditions DAS), afin d'obtenir des données comparables.

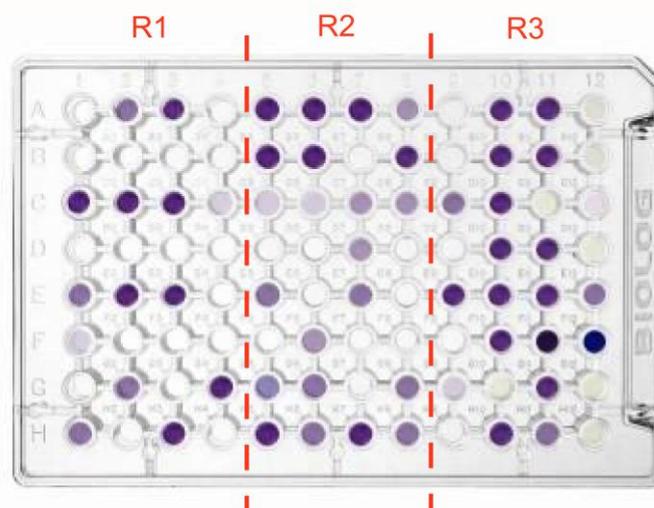
Ce suivi est associé à des comptages en microscopie inversée et à épifluorescence afin de différencier les algues mortes (sans chloroplaste ou sans fluorescence naturelle) et les algues vivantes.

L'identification des diatomées est en premier lieu réalisée sur un échantillon prélevé dans le canal et fixé au glutaraldéhyde 3 %. L'échantillon subit un traitement à base d'eau oxygénée et d'acide chlorhydrique afin de nettoyer les frustules de tous déchets organiques ou carbonatés. Il subit ensuite plusieurs cycles de décantation et rinçages et quelques gouttes du mélange sont séchées et montées entre lame et lamelle avec une résine à fort indice de réfraction (Naphrax, Northern Biological Supplies, Ltd., UK, RI=1,74). Les diatomées sont ensuite déterminées dans le but de faire un état des lieux des espèces présentes. Cet inventaire est ensuite utilisé comme support pour effectuer les comptages de l'expérience sur les échantillons bruts, en microscopie inversée, selon la méthode Utermöhl (Utermöhl, 1958). Lors de l'identification, 400 valves (efficacité de comptage comprise entre 0,968 et 0,991, calculée d'après Pappas and Stoermer (1996)) sont comptées en distinguant les valves vides des valves pleines. Un inventaire « GLOBAL » avec toutes les valves et un inventaire « CHLORO » avec seulement les valves pleines sont créés pour chaque comptage dans le logiciel OMNIDIA© (<http://omnidia.free.fr/>) utilisé en routine pour le calcul des indices. A titre indicatif, les indices biologiques sont également calculés.

Enfin, la croissance du biofilm phototrophe est mesurée par l'intermédiaire de dosages de la chlorophylle *a* et de la phéophytine. La chlorophylle *a* est extraite des échantillons en utilisant 5 mL d'acétone. Le surnageant est récupéré par centrifugation et on effectue les dosages à 663 et 750 nm. Puis, après acidification avec de l'HCl 1 N, les dosages sont refaits afin de déterminer les concentrations en phéophytine, produits de dégradation de la chlorophylle. Le calcul de leurs concentrations est basé sur les formules de Lorenzen (Lorenzen, 1967).

Concernant le compartiment hétérotrophe et procaryote, les diversités fonctionnelle et génétique procaryote et les densités bactériennes sont suivies.

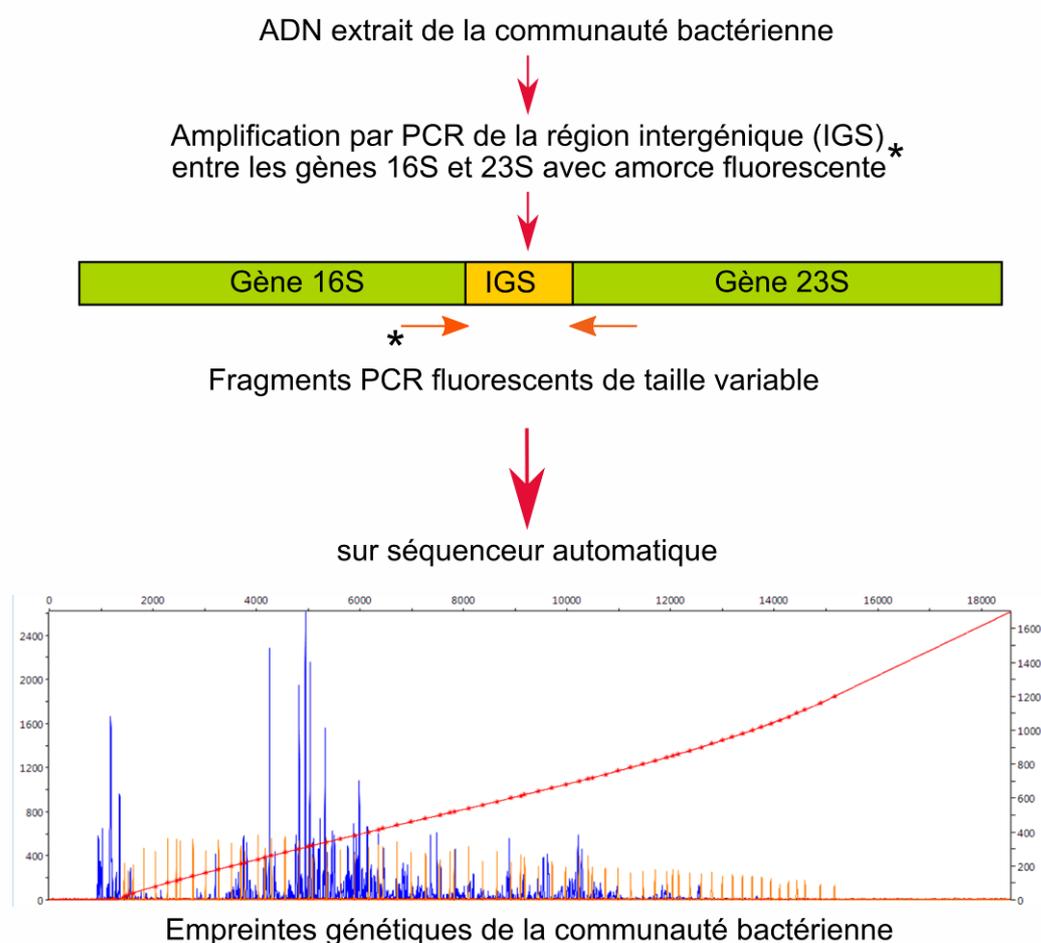
La diversité fonctionnelle est mesurée par spectrophotométrie à 590 nm, par l'intermédiaire de microplaques de Biolog (Miller and Rhoden, 1991) (Figure 10), 6 jours après l'incubation en enceinte à 18°C pour chaque échantillon.



**Figure 10 : Plaques de Biolog composée de 3 x 32 puits. R = réplicats.**

Les plaques de Biolog se présentent en triplicats de 32 puits. Ces 32 puits contiennent des substrats carbonés de différentes natures (polymère, acide aminé, amine, carbohydrate, acide carboxylique et composé phénolique) qui génèrent une coloration mauve lorsqu'ils sont consommés par les bactéries. Cette coloration se mesure par spectrophotométrie, le premier puits de chaque triplicat étant un blanc.

La diversité génétique est également suivie par l'intermédiaire d'une méthode d'empreintes génétiques, l'analyse ARISA (Automated Ribosomal Intergenic Spacer Analysis, (Fisher and Triplett, 1999)). Cette méthode repose sur le polymorphisme de la longueur de l'espace intergénique entre les gènes codant pour l'ARNr 16S et 23S, qui varie selon les espèces. L'ADN est amplifié par PCR grâce à une amorce fluorescente puis séparé par électrophorèse. En résulte la production de bandes de taille et d'intensité variable, l'intensité représentant l'abondance d'individus possédant une séquence de cette taille. Le principe est schématisé dans la Figure 11.



**Figure 11 : Principe de la méthode ARISA (Automated Ribosomal Intergenic Spacer Analysis), d'après Richaume, Pourcelot et al. (2006).**

Enfin, la diversité bactérienne est mesurée par l'intermédiaire de comptages au DAPI (molécule fluorescente se fixant à l'ADN) sur microscope à épifluorescence.

### ***Analyses statistiques***

Le logiciel PAST (Palaeontological Statistics, <http://folk.uio.no/ohammer/past/>) a été utilisé pour faire des analyses statistiques de type ACP et NPMANOVA sur les abondances spécifiques des diatomées, sur les données des Biolog et d'ARISA.

## 2. Résultats

### a. Données physico-chimiques

Les dosages de nutriments sont réalisés juste avant le début de l'expérimentation, les dosages sont comparés à une rivière du Tarn, le Laudot, en amont et en aval d'une STEP (Tableau 2).

**Tableau 2 : Dosages de nutriments avant le début de l'expérience, comparé à la rivière Laudot (Tarn).**

	F- (mg/L)	Cl- (mg/L)	N-NO <sub>2</sub> <sup>-</sup> (mg/L)	N-NO <sub>3</sub> <sup>-</sup> (mg/L)	S-SO <sub>4</sub> <sup>2-</sup> (mg/L)	P-PO <sub>4</sub> <sup>3-</sup> (mg/L)
Canal artificiel	0,1013	40,794	NA	71,107	35,152	0,207
Rivière Laudot Amont STEP	0,0738	5,679	NA	1,492	1,337	0,020
Rivière Laudot Aval STEP	0,2074	6,126	NA	1,493	1,530	0,023

Les valeurs physico-chimiques de base relevées dans le canal et les aquariums au cours de l'expérimentation sont stables au cours du temps (Tableau 3).

**Tableau 3 : Mesures physico-chimiques relevées au cours de l'expérience (n = 8).**

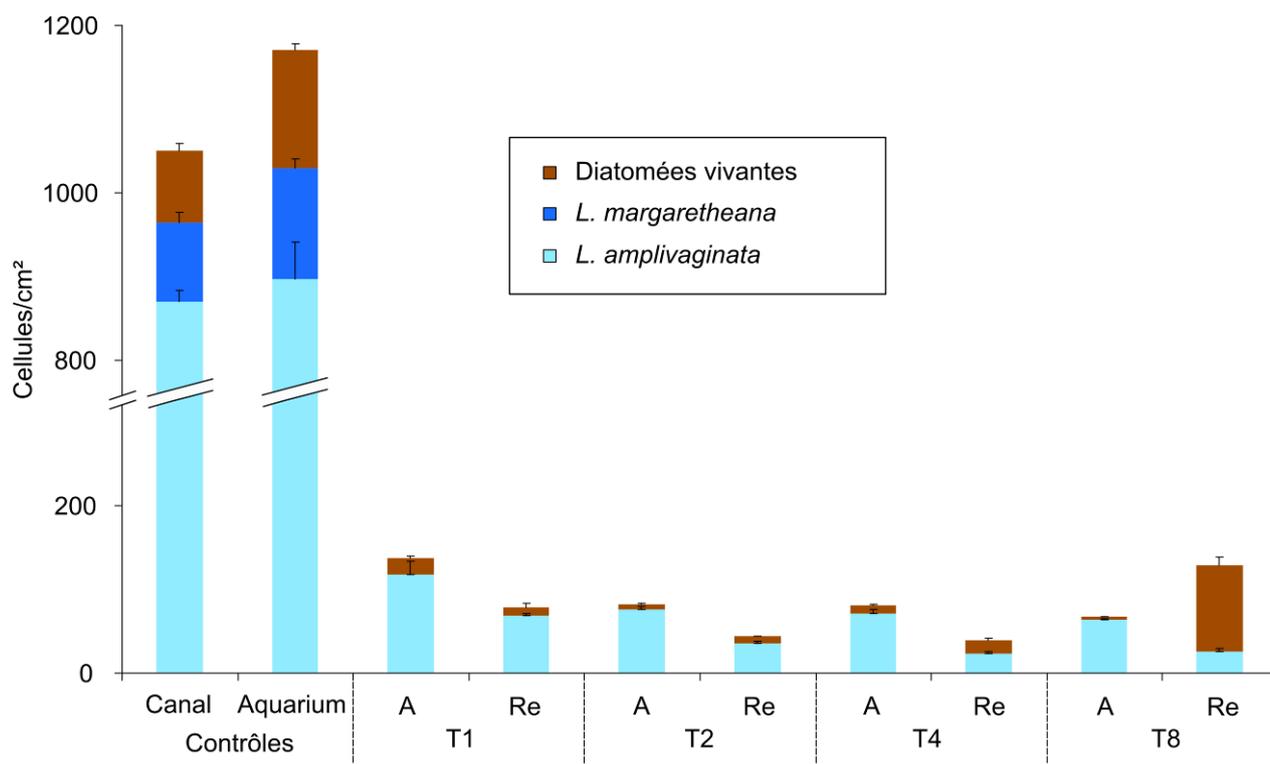
	Moyenne	Erreur standard
Température eau		
(°C)	15,9	± 2,2
%O <sub>2</sub>	93,1	± 2,4
[O <sub>2</sub> ] (mg/L)	9,06	± 0,22
Conductivité	1382	± 46

Les données de pH n'ont pas été relevées suite à un dysfonctionnement de la sonde.

### b. Compartiment phototrophe.

#### *Composition globale*

Les comptages globaux sont effectués par Alexandre Lamy (EcoLab) en triplicats (Figure 12). La biomasse globale est largement dominée par les cyanobactéries : *Leptolyngbia amplivaginata* et *L. margaretheana*. Le comptage des diatomées n'est pas détaillé ici et seuls les individus vivants sont représentés.

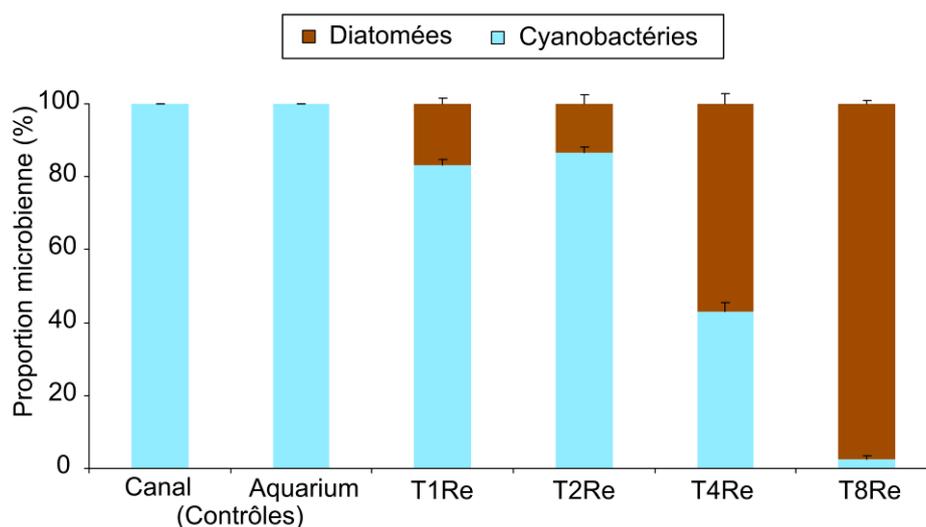


**Figure 12 : Comptages réalisés sur les différents échantillons après l'assèchement (A) et après la remise en eau (Re), pour chaque durée d'assèchement testée, comparés aux contrôles.**

On n'observe pas de modification de structure sur les échantillons contrôles suite au changement de milieu. L'assèchement entraîne une diminution de la biomasse, qui s'accroît avec sa durée et qui est visible tant sur les cyanobactéries que sur les diatomées. L'espèce *Leptolyngbia margaretheana* ne survit pas aux différents traitements d'assèchement testés.

En revanche, la biomasse des diatomées est favorisée et amplifiée par la durée de l'assèchement, alors que celle des cyanobactéries suit une tendance opposée.

Les données de composition obtenues à partir du PhytoPAM sont représentées dans la Figure 13.



**Figure 13 : Proportion microbienne détectée par le PhytoPAM après la remise en eau (Re), comparée aux contrôles.**

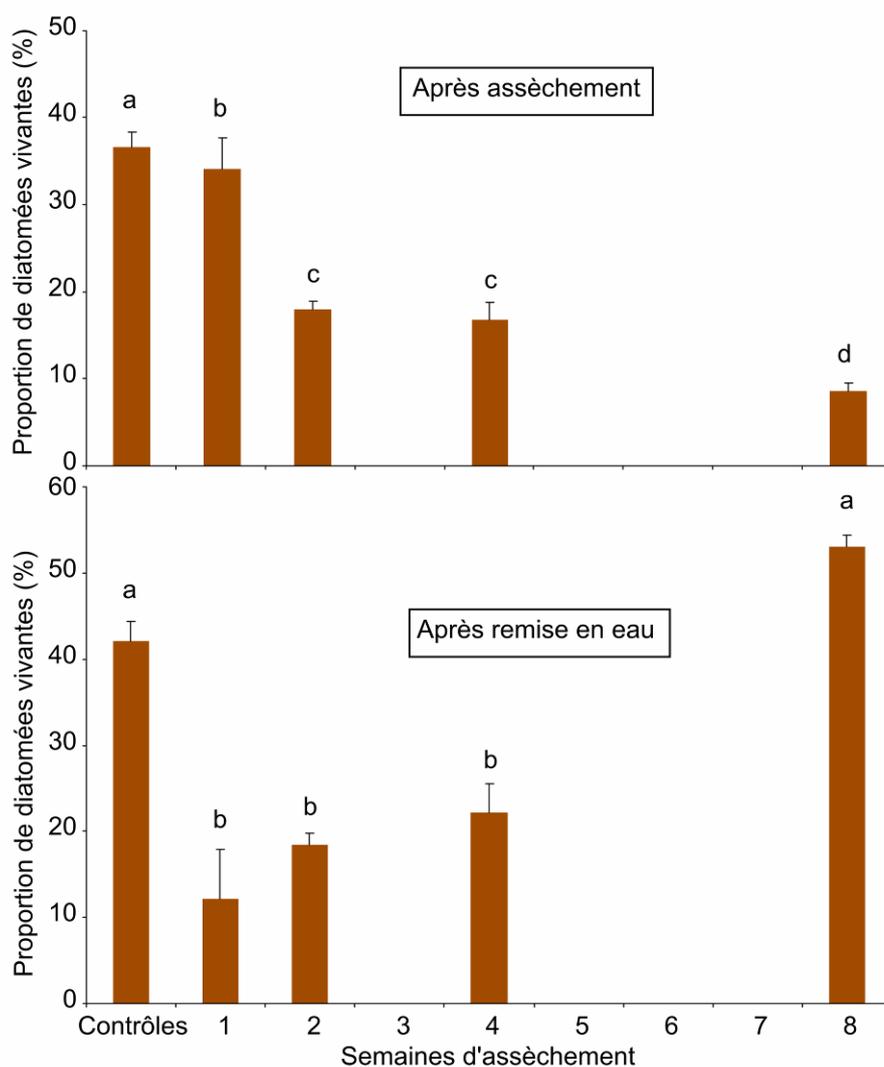
On observe que les proportions ne sont pas modifiées lors du changement de milieu, du canal vers l'aquarium (Contrôles). Cependant, la structure après assèchement puis remise en eau de 2 semaines est modifiée avec une transition visible des cyanobactéries au profit des diatomées. Cette transition est également visible sur le biofilm (Figure 14).



**Figure 14 : Modification visible de la structure du biofilm après 3 jours d'assèchement et 3 jours de remise en eau.**

Cette transition est d'autant plus marquée que la durée de l'assèchement est longue.

Les proportions de diatomées vivantes sur l'ensemble des comptages sont représentées dans la Figure 15. Les diatomées des contrôles n'ayant pas subi d'assèchement sont stables, on note simplement une légère croissance. Sur les données collectées à la fin de l'assèchement, les proportions de diatomées diminuent avec la longueur de l'assèchement, de manière significative.

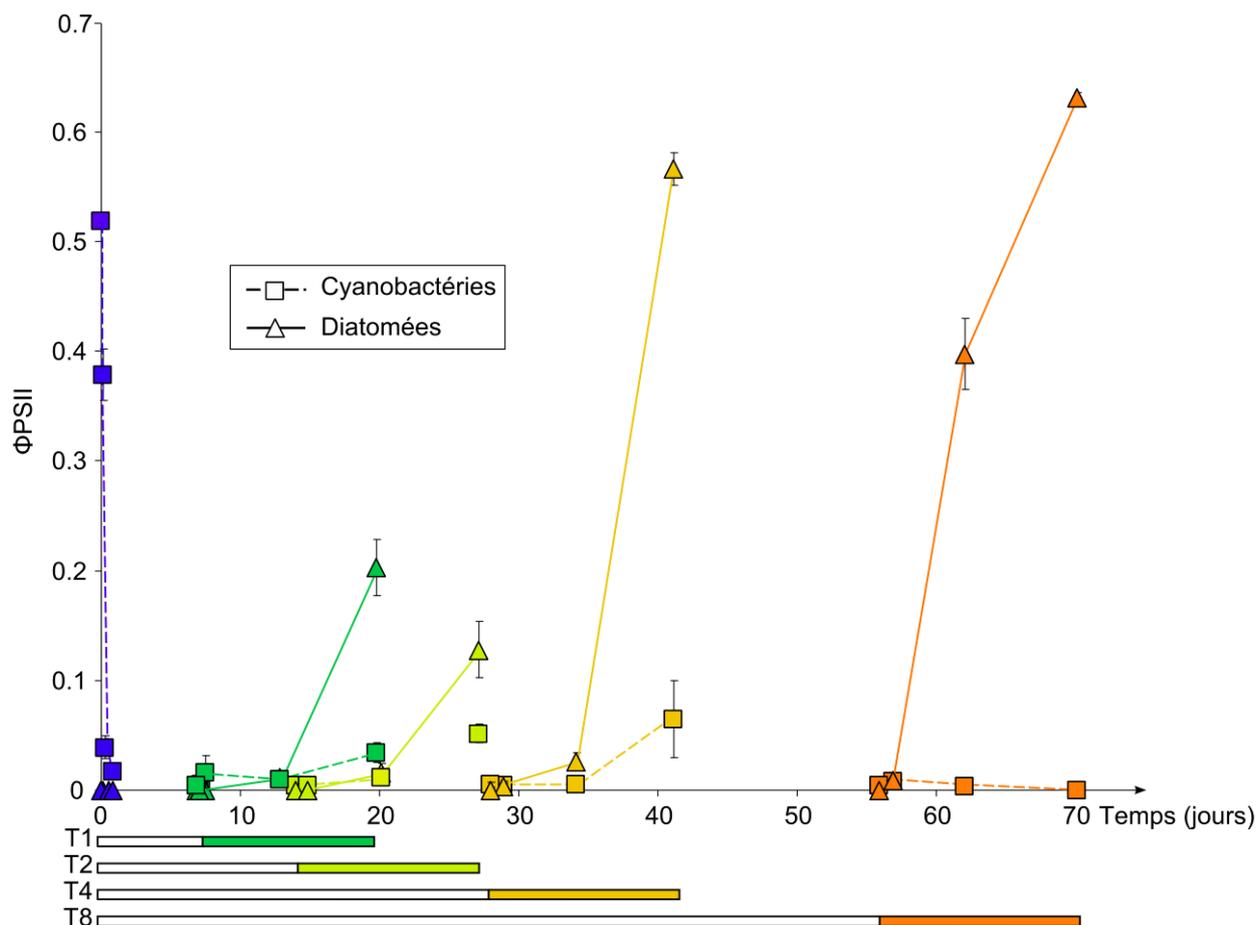


**Figure 15 : Evolution du pourcentage de diatomées vivantes en fonction de la durée de l'assèchement, après la fin de l'assèchement et après la fin de la remise en eau, comparé aux contrôles.**

Après la remise en eau de 2 semaines, on note une tendance inverse, avec les proportions de diatomées qui augmentent avec la durée de l'assèchement, jusqu'à dépasser les valeurs des témoins pour l'assèchement de 8 semaines.

### ***Activité photosynthétique***

L'activité photosynthétique du biofilm au cours de l'expérience, suivie par l'intermédiaire du PhytoPAM, est présentée dans la Figure 16. Le début de l'assèchement commence au temps 0, où l'on distingue clairement l'extinction du signal des cyanobactéries, celui des diatomées n'étant pas détectable par le PhytoPAM.



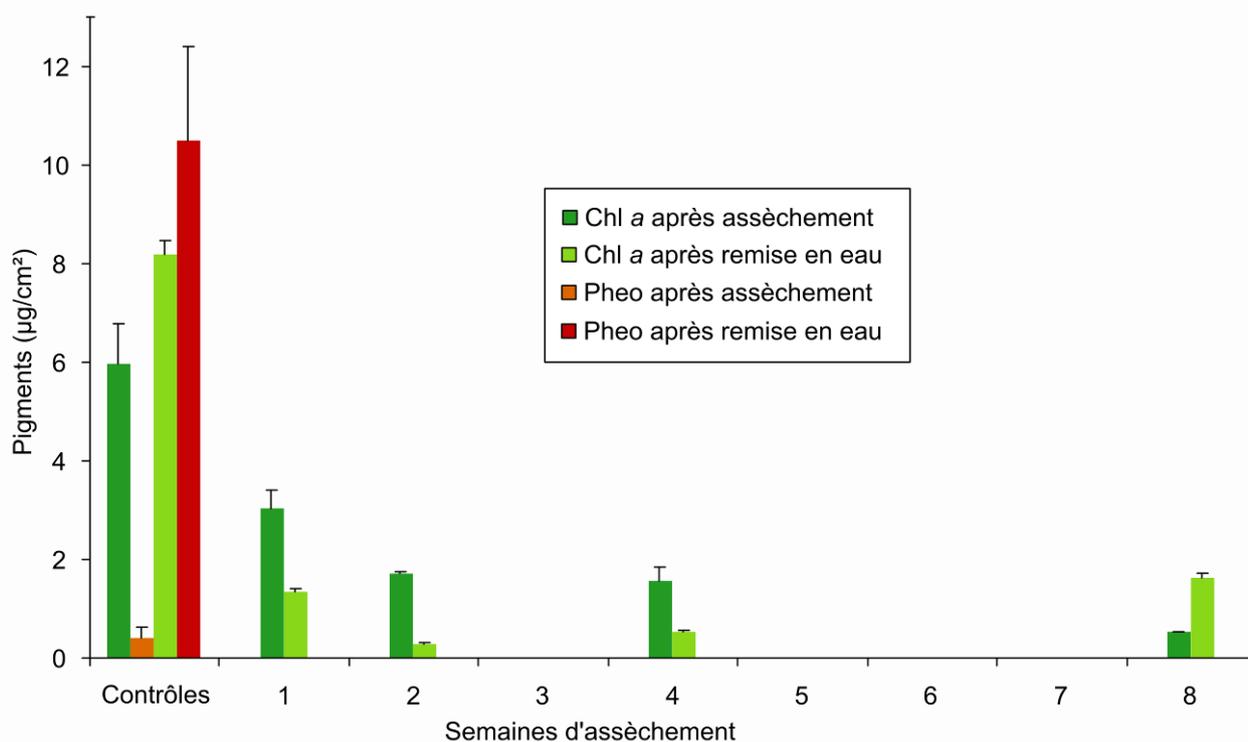
**Figure 16 : Activité photosynthétique du biofilm phototrophe au cours de l'expérience.**

Pour chaque durée d'assèchement, on observe une reprise de l'activité photosynthétique des diatomées, qui s'accroît avec la durée de l'assèchement (0,20 pour T1 contre 0,63 pour T8 en fin de remise en eau).

Concernant les cyanobactéries, la tendance est inversée puisque leur activité photosynthétique est de l'ordre de 0,52 au début de l'assèchement et diminue très rapidement jusqu'à atteindre 0,04 après moins de 8 h d'assèchement. Au moment de la reprise, l'activité reste faible après 2 semaines de remise en eau et ne parvient pas à atteindre la valeur de 0,1, elle finit même par ne plus être détectable en fin de remise en eau pour le T8.

### ***Croissance du biofilm***

La croissance du biofilm est mesurée par l'intermédiaire de dosages de la chlorophylle *a* et de la phéophytine. Les résultats sont présentés dans la Figure 17.



**Figure 17 : Dosages de chlorophylle a et phéophytine en fonction de la durée de l'assèchement subi.**

Au regard des contrôles, on observe que le passage du canal vers l'aquarium induit une production de biomasse associée à une importante mortalité en fin de remise en eau. La quantité de chlorophylle diminue avec la durée de l'assèchement subi alors qu'en fin d'assèchement elle remonte progressivement à partir de 2 semaines d'assèchement subies.

Cette observation est corrélée avec l'évolution de la chlorophylle mesurée entre la fin de la remise en eau et la fin de l'assèchement (non représenté). Effectivement, elle est de l'ordre de 37 % pour les contrôles, négative pour les durées d'assèchement de 1 à 4 semaines puis fortement positive pour l'assèchement de 8 semaines (204 %).

### ***Communautés de diatomées et indices biologiques***

Sur l'ensemble des comptages, 20 taxons ont été identifiés. L'ACP est réalisée sur cette matrice dont les proportions ont été préalablement calculées (Figure 18).

4 taxons dominent largement les inventaires : *Achnanthydium minutissimum sensu lato*, *Achnanthydium exiguum*, *Germainiella* sp. (voir Chapitre III.) et *Eolimna minima*.

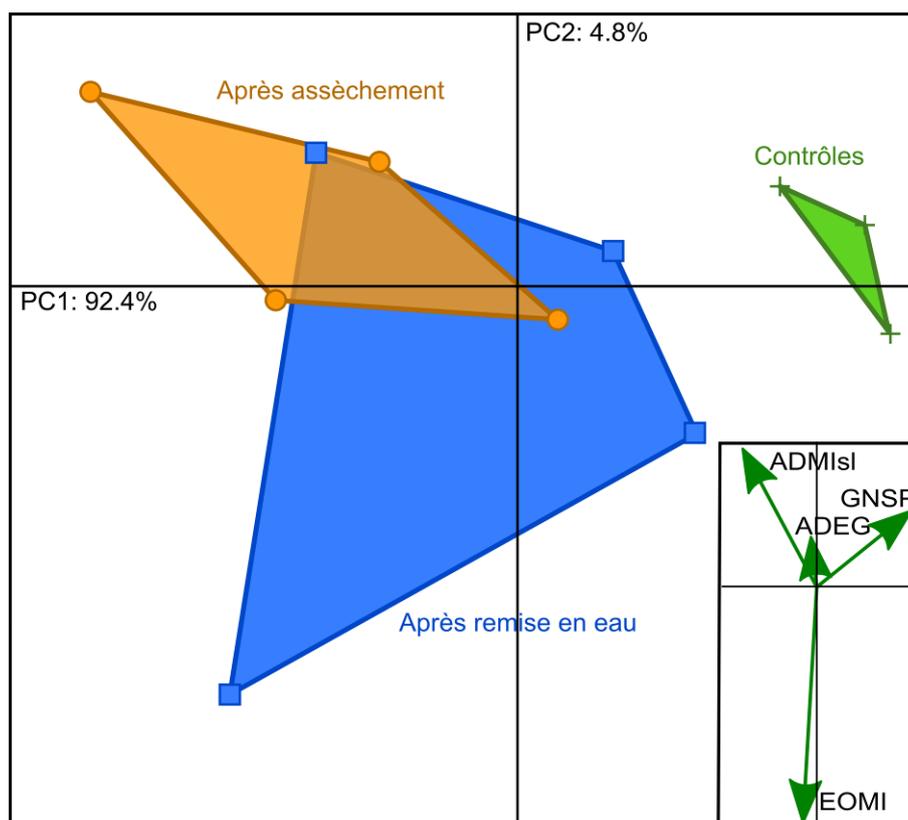


Figure 18 : ACP basée sur les proportions des communautés de diatomées.

ADEG : *Achnantheidium exiguum* ; ADMIsI : *Achnantheidium minutissimum sensu lato*; GNSP : *Germainiella* sp. ; EOMI: *Eolimna minima*.

Le passage en aquarium n'induit pas de changement au sein de la communauté contrôle. Cependant, on note un effet de l'assèchement et de la remise en eau sur les communautés par une dispersion des communautés et les communautés ayant subi des assèchements ne retrouvent pas leur composition initiale. *Germainiella* sp. est corrélé à la communauté contrôle.

La partie sur les indices biologiques est développée dans le Chapitre III.

### c. Compartiment procaryote.

#### ***Diversité fonctionnelle bactérienne***

L'analyse statistique (ACP) des communautés bactériennes obtenues par l'intermédiaire des microplaques de Biolog est présentée en Figure 19.

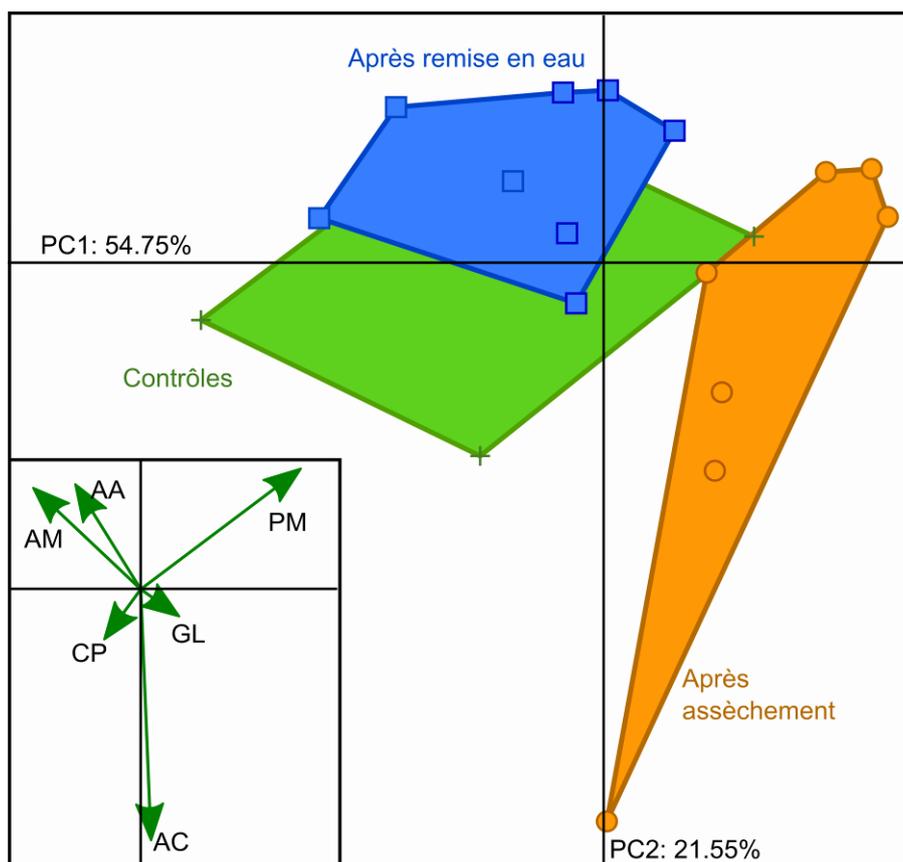


Figure 19 : ACP basée sur la diversité fonctionnelle des bactéries.

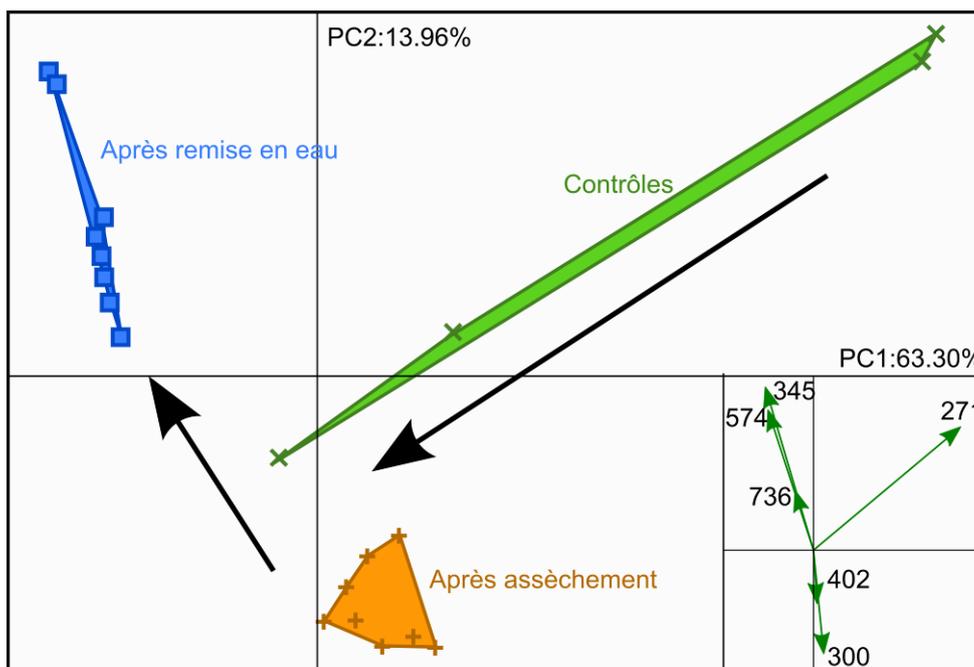
*Nature des substrats consommés* : AA : Acide aminé ; AC : Acide carboxylique ; AM : Amine ; GL : Glucide ; CP : Composé phénolique ; PM : Polymère.

L'un des réplicats en T8 présentait des résultats aberrants, il a donc été retiré de l'analyse. On note que les communautés contrôles et après remise en eau sont similaires alors que les communautés après assèchement sont significativement différentes des deux autres.

Les communautés bactériennes consomment principalement à la fin de l'assèchement des substrats de type polymère, glucides et acide carboxylique. Les communautés bactériennes contrôles et après remise en eau privilégient les substrats de type amine, acide aminé, polymère et composé phénolique.

### **Diversité génétique procaryote**

Elle est appréhendée par l'intermédiaire de l'ARISA sur laquelle on effectue une ACP (Figure 20).



**Figure 20 : ACP basée sur les données d'ARISA. Les chiffres correspondent à la longueur de l'OTU en paires de bases.**

On remarque que les effets de l'assèchement et du changement de milieu sont opposés. Le changement de milieu est visible sur les contrôles. L'effet de l'assèchement est très marqué sur l'OTU 271 mais il reste significatif lorsqu'on refait une analyse en le retirant. L'assèchement a un effet majeur sur les OTU 400 et 302 et la remise en eau sur les OTU 345, 574 et 736.

La diversité est également mesurée par l'intermédiaire de l'indice de Shannon, dont les valeurs sont indiquées dans le Tableau 4.

**Tableau 4 : Indices de Shannon sur le biofilm procaryote, en fonction des perturbations subies par le biofilm.**

Semaines d'assèchement		0	1	2	4	8
Etat initial dans le canal		0,93	0,93	0,93	0,93	0,93
Perturbations	Assèchement	-	3,55	3,41	3,38	2,82
	Changement de milieu	3,18	-	-	-	-
	Changement de milieu après assèchement	-	2,34	2,65	2,48	2,69

Avant une perturbation, le peuplement est peu équilibré alors qu'après une perturbation d'assèchement ou de changement de milieu le peuplement a un bon équilibre. Lorsque les deux perturbations se succèdent, on remarque que le peuplement est moins équilibré que lorsqu'il ne subit qu'une seule perturbation.

### *Densités bactériennes*

Les analyses de densités bactériennes sont faites par l'intermédiaire de comptage DAPI. A ce jour, le biofilm ayant séché, il est très difficile d'obtenir un étalement homogène permettant ce comptage. D'autres tests sont actuellement effectués.

## **2. Discussion**

### **a. Données physico-chimiques**

Les données physico-chimiques sont stables durant l'expérience et similaires entre l'eau du canal et l'eau des aquariums. Cette observation est cohérente puisque l'eau des aquariums provient du canal et subit une filtration au préalable à 0,22  $\mu\text{m}$ .

Les éléments nutritifs ne sont pas limitants pour la croissance du biofilm, l'eau ayant subi des enrichissements lors d'expérimentations antérieures. Si l'on se réfère à l'annexe 4 du « Guide technique : évaluation de l'état des eaux de surface continentales (cours d'eau, canaux, plans d'eau) », on obtient les limites physico-chimiques acceptables en milieu naturel. L'oxygénation, les nitrites et les phosphates définissent l'eau du canal comme « bonne » à « très bonne ». Les nitrates sont dans des proportions favorables à l'eutrophisation et la forte conductivité est principalement due à la présence conséquente d'ions chlorures.

### **b. Compartiment phototrophe**

Le biofilm phototrophe est essentiellement composé de diatomées et de cyanobactéries, les algues vertes étant négligeables, elles n'ont pas été prises en considération dans notre étude.

Les comptages et le suivi de biomasse par le PhytoPAM montrent les mêmes résultats. Les cyanobactéries sont très dominantes dans le biofilm de départ issu du canal et le changement de milieu (transition du canal vers l'aquarium) n'affecte pas la composition du biofilm (Figure 13). Les diatomées, minoritaires dans le biofilm initial, deviennent visibles lors de la remise en eau dès lors que le biofilm a subi une semaine d'assèchement. Cette modification de composition en faveur des diatomées s'accroît avec la durée de l'assèchement et semble durable.

Les diatomées sont également impactées par l'assèchement puisque le nombre de cellules comptées diminue avec la durée de l'assèchement. Cependant, la remise en eau leur est favorable puisque la quantité de cellules augmente avec la durée de l'assèchement. Ceci ne s'accompagne pas d'une modification significative de la structure des communautés de diatomées en fonction de la durée d'assèchement. On peut supposer qu'un assèchement plus long entraîne une sélection d'individus résistants et donc plus compétitifs.

Ce changement durable dans la composition globale (diatomées vs cyanobactéries) sans retour à la situation initiale après le retrait de la contrainte montre qu'il n'y a pas de résilience structurelle au sein du biofilm phototrophe.

Les données d'activité photosynthétique et de croissance sont corrélées aux données collectées sur la composition. En effet, le signal d'activité photosynthétique des cyanobactéries s'éteint rapidement après l'assèchement et celui des diatomées s'exprime davantage à la fin de la remise en eau, même pour une courte période d'assèchement. Plus la durée de l'assèchement est longue et plus le signal de fluorescence est dominé par les diatomées.

Pour l'assèchement de 8 semaines, le signal des cyanobactéries n'est plus détecté par le PhytoPAM en fin de remise en eau, au profit des diatomées qui s'expriment majoritairement.

Ce fort rebond d'activité et de croissance de la part des diatomées pour le long traitement d'assèchement appuie l'hypothèse faite lors de l'analyse de la composition globale, à savoir la sélection d'individus résistants par la contrainte d'assèchement. Cette pression de sélection par l'assèchement entrainerait la production d'une biomasse plus importante lors de la remise en eau. Cette situation a déjà été décrite dans le milieu naturel par Peterson (1986) sur des biofilms soumis à des contraintes de courant. Les pourcentages de diatomées vivantes après l'assèchement et après la remise en eau montrent des tendances opposées. Le taux de mortalité et la reprise de la croissance sont positivement corrélés à la durée d'assèchement, donc directement lié à l'intensité du stress. Associée aux résultats précédents, cette observation montre une résilience fonctionnelle du compartiment phototrophe, notamment concernant les diatomées.

### **c. Compartiment procaryote**

Les sources de carbone de la communauté bactérienne proviennent essentiellement du relargage de carbone organique dissous par les algues du fait de leur activité photosynthétique ainsi que de la lyse des cellules mortes. Tous les produits de dégradation de ces cellules ou les exsudats produits par celles-ci sont utilisables pour le développement bactérien.

Les résultats indiquent que les sources de carbone utilisées par le compartiment bactérien diffèrent entre les conditions de stress (fin d'assèchement) et les conditions normales (contrôles et fin de remise en eau).

Les sources de carbone telles que les acides aminés, amines et composés phénoliques sont plus facilement dégradables que les polymères (macromolécules tridimensionnelles), elles sont donc utilisées en priorité du fait de leur disponibilité. En période de stress, les sources de carbone deviennent limitées, les bactéries ayant la capacité de dégrader des polymères (plus énergivores)

sont alors sélectionnées. En effet, des molécules-cages, telles que l' $\alpha$ -cyclodextrine à la structure complexe, sont plus dégradées par les communautés issues des biofilms stressés.

En période de stress, le glycogène (polymère du glucose) et l'acide pyruvique (produits de dégradation du glucose) sont davantage consommés qu'en conditions normales. Ils sont probablement disponibles suite à la mort des cellules et formant l'essentiel des réserves bactériennes utiles en période de stress. La D-cellobiose (produit de dégradation de la cellulose) est également fortement consommée pour les mêmes raisons.

La diversité fonctionnelle potentielle bactérienne montre un retour à l'état initial après la contrainte d'assèchement, on observe donc une résilience fonctionnelle. Ces résultats démontrent la grande plasticité des bactéries, qui s'adaptent rapidement à de nouvelles conditions en fonction des ressources disponibles.

Les résultats d'ARISA montrent un effet du changement de milieu mais également un effet de l'assèchement. Ces effets ont une direction opposée mais les communautés subissant les contraintes de changement de milieu et d'assèchement restent relativement proches. Ils se traduisent essentiellement sur l'OTU 271, ce qui a entraîné une nouvelle analyse des données en ôtant cet OTU de la matrice. L'effet de l'assèchement était alors moins marqué mais tout de même significatif (résultats non présentés). Il n'a pas été possible d'identifier l'espèce correspondant à cet OTU, cependant, il pouvait s'agir d'une bactérie ou d'une cyanobactérie. A la lecture des comptages effectués sur le biofilm (Figure 12) il semblerait qu'il s'agisse d'une bactérie puisqu'aucune perte de biomasse n'est constatée après le changement de milieu des contrôles alors qu'elle est de plus de 70 % sur l'ARISA (résultats non représentés). Les comptages de densités bactériennes auraient pu aider à clarifier cette hypothèse mais ils n'ont pas pu être réalisés à cause de l'hétérogénéité des préparations.

Au regard des indices de Shannon présentés, on remarque que les biofilms sont dominés par une ou plusieurs espèces lorsqu'il n'y a pas de perturbation alors qu'ils sont équilibrés après une perturbation (conditions stables). Suite à une perturbation (changement de milieu, stress hydrique), on observe une perte de dominance avec une représentation des espèces dans la communauté qui est plus équilibrée. Ces résultats s'appuient sur les principes d'écologie classique où la structure de la communauté se réorganise après une perturbation.

On note également que la communauté est moins équilibrée lorsque deux perturbations se succèdent, ce qui pourrait être lié à une présélection d'espèces résistantes lors de la première perturbation.

### III. Conclusion générale

L'assèchement provoque une modification marquée et durable (dans le périmètre de l'expérience) sur les communautés, associée à une transition de dominance des biofilms par les cyanobactéries vers une dominance par les diatomées. La recroissance du biofilm, sans apport de la dérive, est d'autant plus marquée que la durée de l'assèchement subi a été longue, cet effet étant du principalement aux diatomées. On suppose que la contrainte plus longue favoriserait la sélection d'individus résistants qui se reproduiraient donc plus rapidement (sans phase de latence) lors du retour à des conditions plus favorables.

Si l'on compare les deux expériences réalisées (microcosme et mésocosme), on note des résultats convergents, avec cependant un décalage dans la transition microbienne. Effectivement, la transition a lieu au cours de l'assèchement sur l'expérience de microcosme alors qu'elle a lieu lors de la remise en eau concernant l'expérience de mésocosme. Ce décalage est probablement dû aux conditions d'expérimentation où l'assèchement a été brutal à la sortie du canal artificiel, « fixant » la communauté alors qu'il a été plus progressif lors de l'expérience sur les microplaques, fermées par un couvercle et du parafilm, maintenant ainsi des conditions d'humidité permettant l'évolution progressive des cultures.

La structure des communautés est impactée par les perturbations (indice de Shannon) et l'assèchement n'entraîne pas de résilience structurelle mais une résilience fonctionnelle des communautés. De plus, l'analyse de diversité fonctionnelle bactérienne montre une résilience fonctionnelle réalisée par des espèces différentes, la diversité génétique procaryote des contrôles étant différente de celle mesurée après la remise en eau. Les mêmes fonctions sont donc réalisées mais par des espèces différentes, ce qui témoigne d'une redondance fonctionnelle de la part des communautés bactériennes.

L'histoire du biofilm semble donc primordiale dans la structure des communautés puisque les contraintes contribuent à façonner la structure des communautés.

## Chapitre 2

***Impact de l'assèchement de biofilms sur les communautés de diatomées en milieu naturel :***

***Etude expérimentale en rivières non permanentes***



Les expériences en conditions contrôlées ont mis en évidence l'impact d'un assèchement sur la reviviscence des communautés microbiennes benthiques, uniquement à partir du biofilm sec.

Une étude des communautés de diatomées à plus grande échelle a été réalisée en milieu naturel, par l'intermédiaire d'une étude sur le Maureillas (Pyrénées-Orientales).

## **I. Objectifs**

L'expérience sur le Maureillas est une expérience réalisée sur une période de deux mois, en période d'étiage, sur une même station. Elle a pour objectif de mieux comprendre les dynamiques des peuplements de diatomées autour d'un épisode d'assèchement « provoqué » et le rôle relatif de la dérive et de la repousse à partir du biofilm sec lors de la remise en eau.

Dans ce but, différentes durées d'assèchement artificiel ont été testées (1, 2 et 4 semaines) et la phase de remise en eau a été suivie dans les 4 premières semaines.

## **II. Matériel et méthodes**

### **1. Site expérimental**

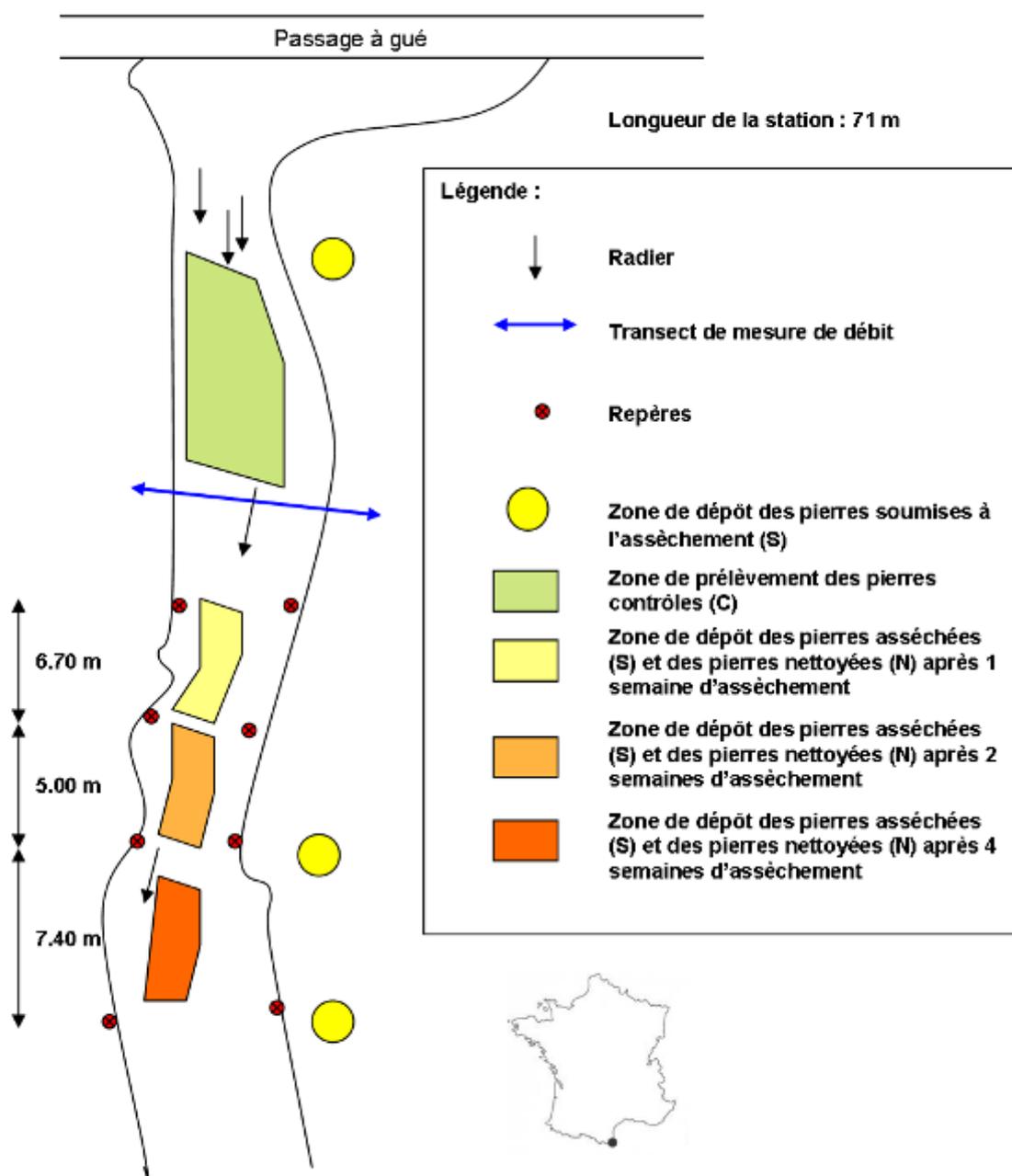
La station d'étude, d'une largeur approximative de 6 / 7 mètres est située à 600 mètres en aval de la station d'épuration (5200 EH) de la ville de Maureillas-las-Illas dans les Pyrénées-Orientales. Le Maureillas est un cours d'eau de la vallée du Tech, soumis à un régime pluvial méditerranéen d'une importante variabilité : précipitations en hiver et assèchement partiel ou total du lit du cours d'eau en été. Les conditions météorologiques sont stables durant toute la durée de l'expérience, seule une importante crue en fin d'expérience n'a pas permis de réaliser le dernier prélèvement.

Cette station a été choisie pour son accessibilité et sa disponibilité en substrats naturels du type galets.

### **2. Protocole expérimental**

Au début de l'expérience, des pierres couvertes de biofilm sont retirées du lit du cours d'eau et déposées sur la rive (conditions s'assèchement naturelles, notamment rayonnement solaire et variations de température), durant 1, 2 ou 4 semaines. La moitié d'entre elles, appelées « pierres sèches » (S) gardent leur biofilm intact tandis que les autres sont nettoyées avec de l'éthanol et une brosse métallique avant d'être rincées à l'eau déminéralisée afin de retirer le biofilm (« pierres nettoyées », N). Après la durée d'assèchement convenue, les deux types de pierres sont replacées dans la rivière et échantillonnées à 0 (sauf pour les pierres N), 1, 4, 8, 18 et 28 jours. Les « pierres

contrôles » (C), laissées dans le cours d'eau durant toute l'expérience, sont échantillonnées en même temps. La localisation des pierres est détaillée dans la Figure 21.



**Figure 21 : Schéma de la station d'étude.**

Pour chaque échantillon, 3 pierres sont grattées à l'aide d'une brosse à dents dans une bassine, et le biofilm est récolté dans un pilulier d'une contenance de 100 mL avant d'être fixé avec du glutaraldéhyde 1 %. Les différents échantillons sont stockés à 4° C dans l'obscurité jusqu'à la fin de l'expérience.

Dans le but de déterminer la surface échantillonnée, les pierres sont recouvertes d'une feuille d'aluminium moulée sur la surface grattée. Les feuilles d'aluminium sont ensuite pesées au milligramme près et leurs poids comparés à une courbe étalon réalisée à partir de feuilles d'aluminium de poids et surfaces connues. Le débit est mesuré à l'aide d'un courantomètre (voir transect dans la Figure 21) en accord avec « Le prélèvement d'échantillons en rivière » de l'Agence de l'Eau Loire-Bretagne (2006).

Des mesures physico-chimiques (conductivité, pH, température de l'eau, pourcentage de saturation en oxygène et concentration en oxygène dissous) sont effectuées à chaque prélèvement à l'aide d'une sonde multiparamètres Hannah HI 9828 (Tableau 5).

### 3. Analyses de laboratoire

Seules les diatomées sont comptées et déterminées dans les échantillons, en distinguant les frustules vides (diatomées mortes) et les frustules pleins (avec chloroplastes, diatomées potentiellement vivantes) (Gillett, Pan and Parker, 2009). Tout d'abord, les diatomées sont observées en microscopie optique (Leica DM 2500) à l'objectif x 100 à immersion, après nettoyage et montage des frustules entre lame et lamelle. Les échantillons sont digérés dans de l'eau oxygénée 30 % et de l'acide chlorhydrique 30 % avant d'être rincés plusieurs fois à l'eau déminéralisée et montés dans un milieu à fort indice de réfraction (Naphrax™), tel qu'indiqué dans les normes française (AFNOR, 2007) et européenne (CEN, 2004). Ce traitement permet une détermination aisée avant d'effectuer les comptages sur les échantillons non traités en microscopie inversée (Zeiss Axiovert 10) en se basant sur la méthode Utermöhl (Utermöhl, 1958). Les inventaires sont ensuite regroupés sur le logiciel OMNIDIA® (Lecointe, Coste and Prygiel, 1993) en distinguant les inventaires réalisés sur toutes les valves (« GLOBAL ») et ceux réalisés sur les valves avec les chloroplastes uniquement (« CHLORO »), un nombre d'au moins 400 valves est déterminé.

Les densités cellulaires des diatomées sont également obtenues pour chaque échantillon grâce au comptage d'au moins 1500 valves (sans détermination spécifique). Les différentes mesures de l'aire de comptage, du nombre de cellules sur la lame et la surface grattée des pierres permettent le calcul de la densité cellulaire, en séparant les frustules pleins des frustules vides.

### 4. Analyses statistiques

Les proportions spécifiques sont statistiquement analysées par l'intermédiaire du logiciel libre PAST (Paleontological Statistics ; <http://folk.uio.no/ohammer/past/>) en fonction de la durée de l'assèchement et du type de pierres étudié. Une matrice unique avec tous les inventaires est créée

en retirant les proportions inférieures à 5 % afin de minimiser le poids des espèces rares. Cette matrice est ensuite soumise à des ACP (Analyses en Composantes Principales) et des NPMANOVA (Analyses de variance non paramétriques) à un facteur.

### III. Résultats

Les données physico-chimiques étaient relativement stables au cours de l'expérience, les moyennes sont présentées dans le Tableau 5.

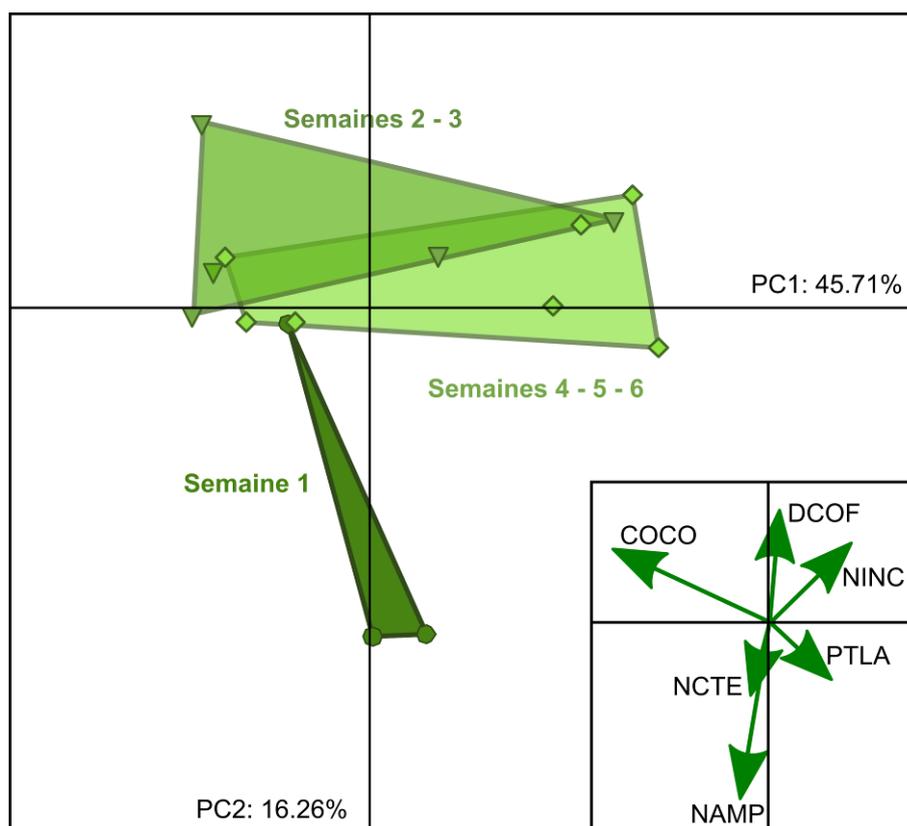
**Tableau 5 : Paramètres mesurés au cours de l'expérience (n = 14).**

Paramètres mesurés	Moyenne	Erreur standard
<b>Température (°C)</b>	15,94	±0,58
<b>O<sub>2</sub> (mg.L<sup>-1</sup>)</b>	8,85	±0,12
<b>O<sub>2</sub> (%)</b>	90,4	±1,2
<b>pH</b>	7,5	±0,1
<b>Conductivité (mS.cm<sup>-1</sup>)</b>	252	±9
<b>Débit (m<sup>3</sup>.s<sup>-1</sup>)</b>	31,0	±2,9

En prenant en compte seulement les comptages sur échantillons bruts, 48 comptages ont été réalisés et 96 inventaires obtenus (2 inventaires « CHLORO » et « GLOBAL » par échantillon). Une matrice regroupant 22 taxons est créée, dominée par 5 taxons représentant 63,2% des communautés en moyenne : *Cocconeis* spp., *Navicula cryptotenella*, *Nitzschia amphibia*, *Nitzschia inconspicua* et *Planothidium lanceolatum*.

#### 1. Communautés « contrôles »

Une ACP sur les proportions spécifiques en fonction du temps est réalisée sur les données obtenues suite au comptage de toutes les valves (« GLOBAL ») des 17 échantillons « C » collectés en 6 semaines. L'expérience dure près de deux mois, les communautés sont donc amenées à évoluer dans le temps en fonction des conditions environnementales. Les données, regroupées par semaine, sont représentées dans la Figure 22.

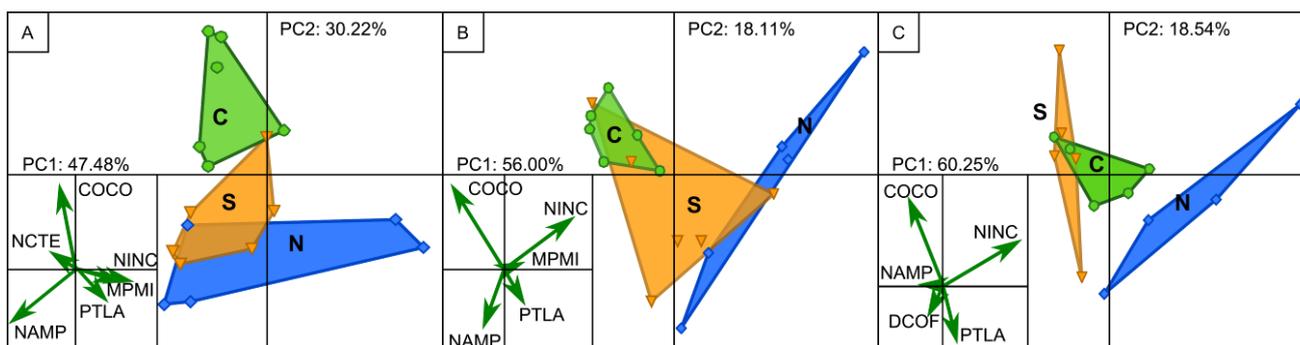


**Figure 22 : ACP sur les communautés « contrôles » de diatomées, en fonction des dates de prélèvement.**

Les résultats montrent que les communautés évoluent naturellement dans leur environnement, particulièrement les 2 à 3 premières semaines de l'expérience. Cette évolution temporelle se traduit essentiellement par des différences de proportions entre les espèces, les paramètres physico-chimiques de base suivis étant relativement stables sur la durée de l'expérience (Tableau 5).

## **2. Impact de l'assèchement sur les dynamiques des communautés de diatomées**

Les dynamiques de communautés sont exprimées à travers des analyses statistiques (ACP en Figure 23 et NPMANOVA en Tableau 6) sur toutes les valves, comme fait en routine.



**Figure 23 : ACP sur les communautés de diatomées, après 1 semaine (A), 2 semaines (B) et 4 semaines d'assèchement (C). Les points sont regroupés en fonction du traitement (C : Contrôles ; S : pierres asséchées ; N : pierres nettoyées).**

COCO: *Cocconeis* species; DCOF: *Diadesmis confervacea*; MPMI: *Mayamaea permitis*;  
 NINCE: *Navicula cryptotenella*; NAMP: *Nitzschia amphibia*; NINC: *N. inconspicua*; PTLA:  
*Planothidium lanceolatum*.

Après remise en eau, les communautés ayant subi 1 et 2 semaines d'assèchement ont des résultats similaires : les communautés sèches et nettoyées sont proches et significativement différentes des contrôles. Pour l'assèchement plus long (4 semaines), on remarque qu'elles sont toutes différentes entre elles.

Les données de l'ACP sont confirmées par les données des analyses de NPMANOVA présentées dans le Tableau 6.

**Tableau 6 : NPMANOVA sur les communautés de diatomées après 1, 2 et 4 semaines d'assèchement.**

Durée d'assèchement		Contrôles	Nettoyés
1 semaine	Nettoyés	<b>0,0043*</b>	-
	Secs	<b>0,0126*</b>	0,3289
2 semaines	Nettoyés	<b>0,0019*</b>	-
	Secs	<b>0,0122*</b>	0,0959
4 semaines	Nettoyés	<b>0,0394*</b>	-
	Secs	<b>0,0456*</b>	<b>0,0076*</b>

Les communautés des pierres « N » et « S » sont toujours différentes des communautés des pierres « C » pour les durées d'assèchement étudiées. *Cocconeis* spp. (regroupant principalement *C. placentula* var. *euglypta* et *C. placentula* var. *lineata*) est principalement corrélé aux

communautés contrôles et *Nitzschia amphibia*, *N. inconspicua* et *Planothidium lanceolatum* sont liées aux communautés des pierres « S » et « N ». *Cocconeis* et *Planothidium* appartiennent à la même guildes écologique, définie par Passy (2007). Les ratios entre ces deux genres sont de  $2,49 \pm 0,89$  pour une semaine d'assèchement,  $3,48 \pm 0,73$  pour deux semaines d'assèchement et  $1,75 \pm 0,45$  pour 4 semaines d'assèchement sur les pierres contrôles. Au contraire sur les pierres nettoyées, ils sont respectivement de  $0,54 \pm 0,09$ ,  $0,19 \pm 0,02$  et  $0,44 \pm 0,09$ .

Dans notre étude, les communautés soumises à des périodes d'assèchement ne retournent pas à l'état initial, même après 28 jours de remise en eau.

Des résultats similaires sont obtenus avec les données issues des comptages sur les diatomées avec chloroplastes, excepté pour la plus longue durée d'assèchement où la différence entre les communautés de diatomées des différents types de galets n'est pas significative (données non représentées).

### 3. Impact de l'assèchement sur les taux de mortalité et installation du biofilm

Le taux de mortalité des communautés de diatomées est calculé pour chaque durée d'assèchement testée et présenté dans la Figure 24.

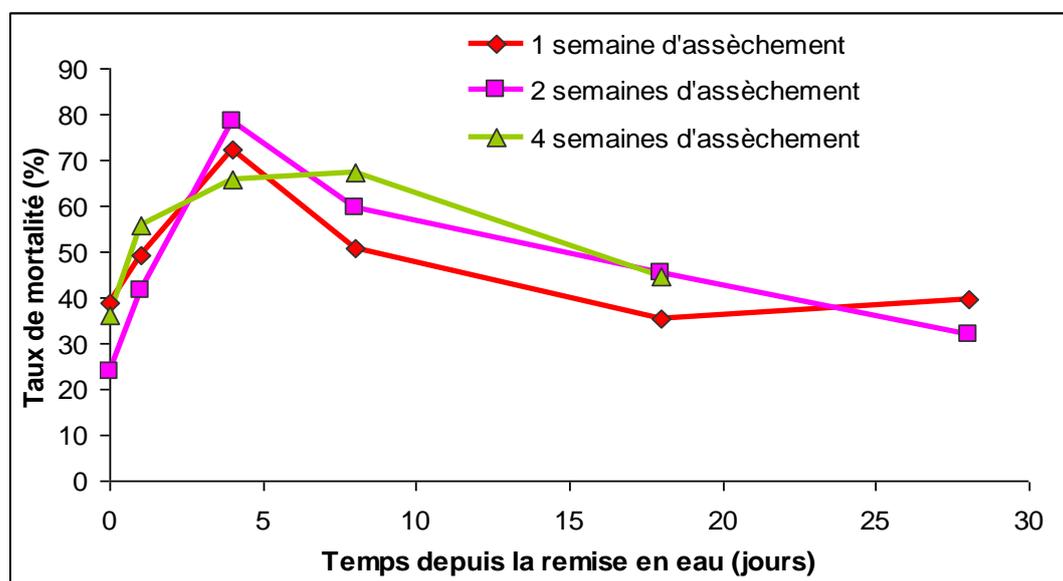
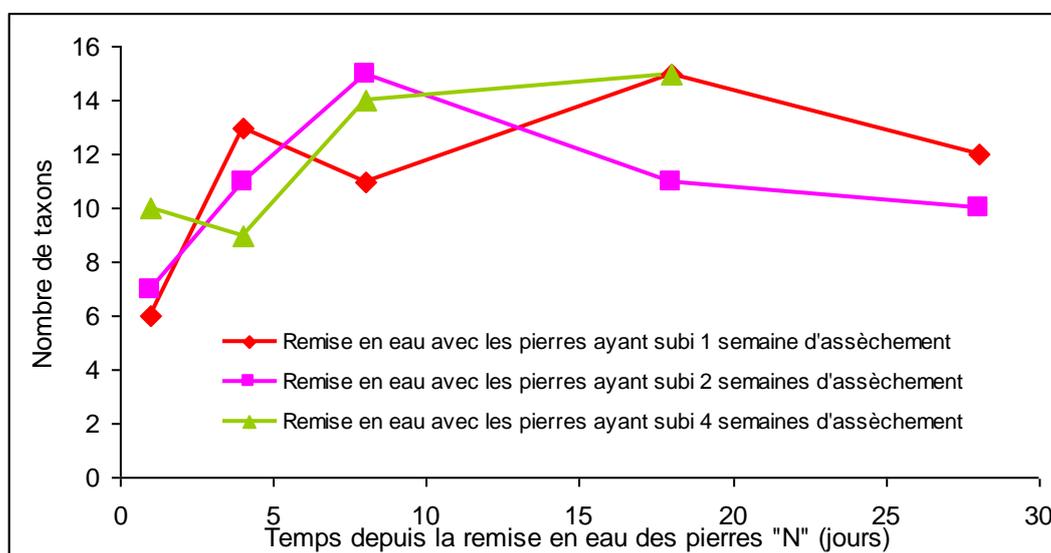


Figure 24 : Taux de mortalité des pierres « S » au cours des 28 jours de remise en eau, pour chaque durée d'assèchement.

L'assèchement induit un taux de mortalité relativement stable quelle que soit sa durée. Les taux de mortalité augmentent lors des premiers jours de remise en eau (J4) pour atteindre des taux compris

entre 65,7% et 78,3%. Ils sont respectivement de 38,7 %, 23,9 % et 36,2 % à la fin de chacune des périodes d'assèchement alors qu'il est de 44,9 % ( $\pm 3,8$  %) pour les communautés contrôles.

Dans le but de visualiser l'établissement des communautés de diatomées, la cinétique du nombre de taxons des pierres « N » durant la phase de remise en eau est représentée dans la Figure 25.



**Figure 25 : Evolution du nombre de taxons lors de la remise en eau sur les communautés des pierres nettoyées « N », pour chaque durée d'assèchement.**

La plus importante augmentation du nombre de taxons a lieu au cours de la première semaine après la remise en eau.

## IV. Discussion

### 1. Impact de l'assèchement sur les communautés de diatomées

Cette étude de terrain montre que les phases d'assèchement, même brèves, ont un impact significatif et durable sur les communautés de diatomées. Effectivement, une semaine d'assèchement est suffisante pour induire des modifications conséquentes sur les communautés de diatomées, avant et après la remise en eau. Ces modifications sont encore visibles après 4 semaines de remise en eau, ce qui correspond au temps nécessaire à la stabilisation d'un biofilm en conditions normales (Kelly *et al.*, 1998, Paule *et al.*, 2013). Une hypothèse pouvant expliquer nos résultats est que les nouvelles communautés se développant sur les pierres nettoyées et sèches n'auraient pas atteint l'équilibre au cours de la période d'incubation. Néanmoins, la cinétique du nombre de taxons s'établissant sur les substrats vierges montre une rapide stabilisation après seulement quelques jours de remise en eau.

A cela s'ajoute les analyses d'ACP qui montrent que les communautés des pierres contrôles et sèches ont des trajectoires complètement différentes, ce qui suggère que les différences observées persisteraient plus de 28 jours dans le milieu naturel. La séparation observée entre les communautés sèches et nettoyées d'un côté et les communautés contrôles de l'autre met en évidence l'importance de l'histoire du biofilm. En effet, les communautés contrôles sont établies, stables et soumises aux facteurs environnementaux, ce qui montre que des facteurs allogènes et autogènes influencent les communautés et leur trajectoire de succession.

Les inventaires obtenus en prenant en compte toutes les valves ou seulement les valves avec chloroplastes diffèrent légèrement, particulièrement pour l'assèchement de 4 semaines, ce qui peut avoir un intérêt dans l'utilisation des communautés de diatomées pour définir la qualité biologique de l'eau. Ces aspects seront abordés dans le chapitre 3, associés à l'utilisation des indices biologiques IBD et IPS dans le cadre de cette expérience.

## 2. Rôle de la dérive et du biofilm sec comme source cellulaire

Les communautés de diatomées sur les pierres sèches sont influencées par deux sources de cellules : la repousse à partir du biofilm sec et la dérive. A l'opposé, la seule source de cellules pour les communautés des pierres nettoyées est la dérive. Le fait que ces communautés soient étroitement liées après un assèchement de courte durée pourrait être expliqué par un apport notable de la dérive ou la combinaison des apports de la dérive et du biofilm sec. L'hypothèse posée est que les communautés de la dérive et celles des biofilms secs sont proches, ce qui pourrait expliquer la proximité entre les 2 types de biofilms. Après un long assèchement, les communautés dérivantes et du biofilm sec sont plus contrastées, ce qui pourrait s'expliquer par l'évolution naturelle des communautés installées que les communautés séchées hors du lit durant 4 semaines n'ont pas connu ou par l'évolution de la communauté dérivante. En effet, la dérive constitue un pool d'espèces dont certaines, toujours les mêmes, vont être sélectionnées par l'affinité au substrat nu, ainsi, le pool d'espèces dérivantes peut évoluer, contrairement aux espèces colonisant les pierres.

## 3. Analyse de la composition spécifique

Les espèces dominantes impliquées dans les communautés étudiées sont *Cocconeis* spp. Ehrenberg (essentiellement *Cocconeis placentula* var. *euglypta* (Ehrenberg) Grunow et *Cocconeis placentula* var. *lineata* (Ehrenberg) Van Heurck), *Nitzschia amphibia* Grunow f. *amphibia*, *Nitzschia inconspicua* Grunow et *Planothidium lanceolatum* (Brebisson ex Kützing) Lange-Bertalot. Ces espèces sont tolérantes et fréquentes dans les cours d'eau, particulièrement dans les environnements impactés. Au regard des guildes de Passy (2007), les espèces du genre *Cocconeis*

et *Planothidium* correspondent à la guildes « low profile » (LP) alors que les espèces du genre *Nitzschia* correspondent à la guildes « motile » (M). Les taxons appartenant à la guildes LP sont sensibles à l'apport de nutriments mais pas aux perturbations physiques, contrairement aux taxons de la guildes « high profile » (HP) dont les espèces du genre *Diatoma* ou *Fragilaria* font partie. Cette dernière guildes est faiblement représentée dans notre expérience, ce qui peut être lié à son statut de cours d'eau méditerranéen, à l'hydrologie naturellement perturbée. La guildes M, quant à elle, est capable d'éviter un stress lié aux nutriments grâce à sa capacité à sélectionner son habitat, elle couvre l'ensemble du gradient de perturbation. Nos résultats montrent que la remise en eau après un assèchement induit une modification dans la dominance de la guildes LP avec un changement de genre de *Cocconeis* vers *Planothidium*. Van Dam, Mertens and Sinkeldam (1994) ont décrit des valeurs indicatrices de l'écologie des diatomées d'eau douces des Pays-Bas et ont montré que les deux espèces du genre *Cocconeis* rencontrées dans notre expériences étaient moins fréquentes dans des milieux aérophiles que *Planothidium lanceolatum*, ce qui pourrait expliquer leur meilleure développement sur les substrats asséchés.

#### 4. Impact de l'assèchement sur le taux de mortalité

L'assèchement induit un certain taux de mortalité (65,7 à 78,3 %), estimé grâce au nombre de valves vides et avec chloroplastes comptées. Ces résultats sont assez surprenants puisqu'on s'attendrait davantage à des taux croissants avec la durée d'assèchement subie. Il semblerait que la mortalité la plus importante ait lieu durant les premiers jours de remise en eau (entre 1 et 7 jours) avant d'atteindre une certaine stabilité des proportions de diatomées mortes par rapport aux diatomées vivantes. L'hypothèse proposée serait un apport de valves mortes par la dérive, qui se déposeraient plus facilement dans les zones de radiers ou la brusque remise en eau qui induirait une importante lyse cellulaire. Un échantillonnage plus fréquent juste après la remise en eau pourrait permettre de vérifier cette hypothèse.

## V. Conclusions

Cette étude illustre l'impact marqué et durable de l'assèchement, même court, sur la structure des communautés de diatomées. Aucun retour à l'état initial n'est constaté, quelle que soit la durée d'assèchement subie.

Elle tente également de comparer les contributions relatives de la dérive et de la repousse à partir du biofilm sec dans les dynamiques de recolonisation et met en évidence l'importance de l'histoire du biofilm dans les réponses des communautés à la contrainte d'assèchement. Des expériences de translocation permettraient sur des durées courtes la distinction des apports cellulaires de la dérive et de la repousse à partir du biofilm sec. On pourrait ainsi mimer une modification du milieu au

cours de la période d'assèchement qui pourrait arriver dans le cas de l'assèchement partiel d'un cours d'eau.

Les aspects de bioindication de cette étude sont développés dans le chapitre 3.



## Chapitre 3

***Etude de la valeur indicatrice des communautés de diatomées de rivières asséchées et approche taxonomique.***



Dans ce chapitre, la bioindication en cours d'eau asséchés est abordée par l'étude de cours d'eau subissant des assèchements chaque année dans les départements de la Charente et de la Charente-Maritime. Cette approche est complétée par les aspects de bioindication des études présentées dans les chapitres précédents, en mésocosme (Chapitre 1) et sur le Maureillas (Chapitre 2), et également par des aspects taxonomiques.

## **I. Etude de l'effet d'un assèchement naturel sur la structure des communautés de diatomées – comparaisons interannuelles pour la physico chimie (facteurs structurants) et la structure des communautés, en fonction de l'existence d'un assèchement (Charente et Charente-Maritime).**

Cette expérience de terrain est plus appliquée et basée sur l'utilisation du protocole en routine (IBD : Indice Biologique Diatomées ; AFNOR (2007)) en France dans le cadre de la Directive Cadre sur l'Eau (2000/60/EC ; Parlement européen (2000)) et sa potentielle adaptation aux rivières asséchées.

### **1. Objectifs**

Le but de cette étude est de comprendre l'effet de l'assèchement sur les communautés de diatomées et les conséquences sur les indices utilisés en routine (IBD / IPS). Pour cela, les données physico-chimiques et biologiques collectées sur plusieurs années (2007 – 2012) dans le cadre des suivis de qualité de rivière gérés par l'Agence de l'Eau Adour-Garonne, sont comparées statistiquement.

### **2. Acquisition et exploitation des données**

Au moins 3 campagnes de prélèvements étaient prévues, avant, pendant et après des situations d'assèchement. Les stations sélectionnées subissent chaque année des assèchements ou ruptures d'écoulement plus ou moins longs, de 1 à 4 mois en moyenne.

Les prélèvements sont effectués conformément à la norme NF T 90-354 datant de décembre 2007 (AFNOR, 2007). Le protocole est adapté aux rivières dont le lit est asséché, où le prélèvement est effectué de la même manière mais à l'aide d'eau déminéralisée.

Les prélèvements sont effectués sur des pierres (substrat stables, durs et inertes) ou par essorage de végétaux. Ils sont réalisés en faciès lotique dans le cas des cours d'eau en eau et au milieu du lit ou aux endroits où d'anciennes traces d'écoulement ont été décelées dans le cas de cours d'eau asséchés (algues séchées sur les pierres, point le plus bas du centre du lit, petites rigoles, traces d'un niveau d'eau sur les pierres, etc...). En l'absence de faciès lotique sur la station ou en cas de

rupture d'écoulement, les substrats sont délicatement rincés afin d'éliminer les MES et/ou valves mortes déposés. Pour chaque prélèvement, une surface d'environ 100 cm<sup>2</sup> ou plus est prospectée sur au moins 5 pierres/galets différents.

Les diatomées sont récoltées par grattage de la surface supérieure des substrats à l'aide de brosses à dents. Afin d'éviter toute interférence entre deux échantillons, les brosses sont systématiquement remplacées à chaque relevé. L'échantillonnage est réalisé au centre du lit du cours d'eau grâce au port de cuissardes.

Le matériel biologique prélevé est immédiatement fixé au glutaraldéhyde 1% dans un pilulier à double cape en polyéthylène translucide pour chaque station. Ces fixateurs sont choisis pour leurs propriétés conservatrices concernant les contenus cellulaires. Les renseignements suivants sont portés sur chaque flacon : code station, nom du cours d'eau, commune, date et heure du prélèvement, nom du préleveur, conservateur.

Des mesures *in situ* (température, concentration en oxygène dissous, pourcentage de saturation en oxygène, conductivité et pH) sont également effectuées à l'aide d'une sonde multiparamètres HANNAH dans les cours d'eau en eau et une fiche de description de la station est systématiquement remplie.

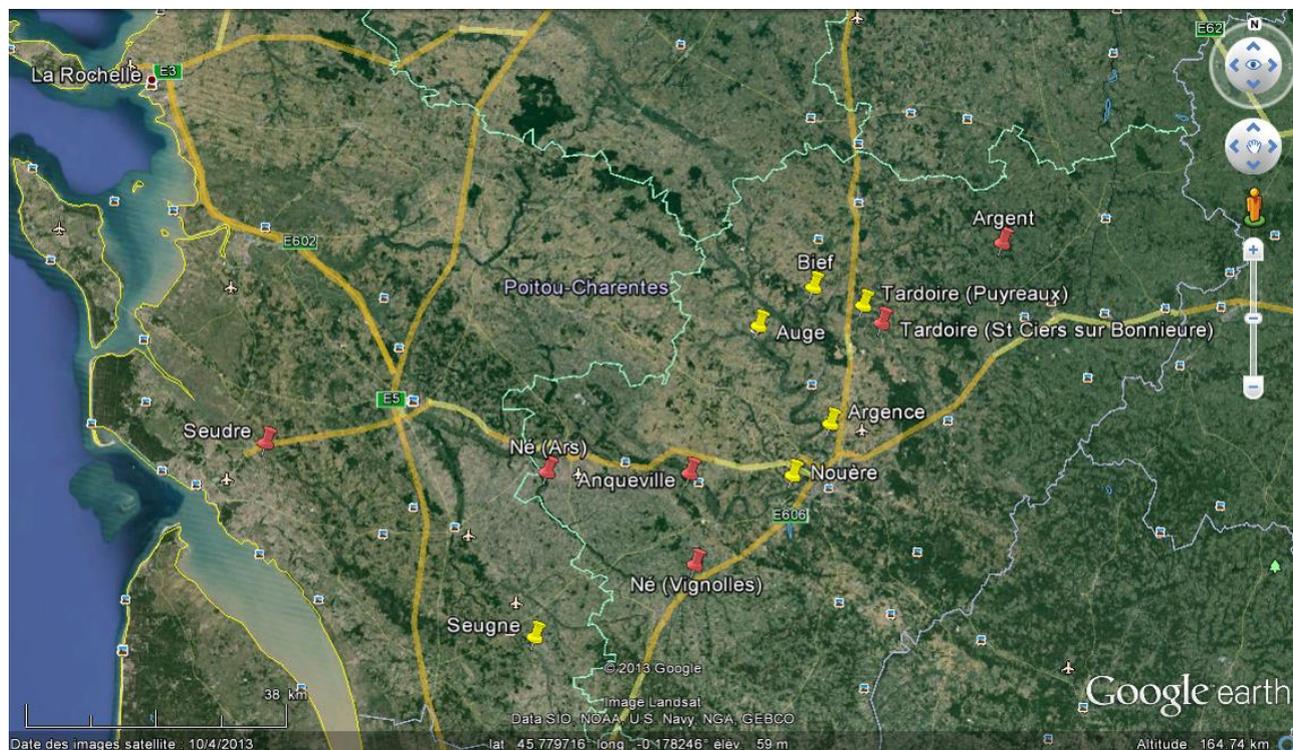
Des comptages sont ensuite réalisés sur des lames d'échantillons traités afin de faciliter la détermination des espèces. Le traitement, la fabrication de lames et le comptage ont été réalisés de la même façon que lors de l'expérience sur le Maureillas (voir Chapitre II. 3.), en accord avec la norme NF T90-354. Ces inventaires sont utilisés lors du comptage sur les échantillons bruts, où les valves pleines avec chloroplastes, sont différenciées des valves vides, à l'aide d'un microscope inversé. Quatre cents valves sont comptées et les inventaires sont saisis dans le logiciel OMNIDIA<sup>®</sup>. Pour chaque échantillon, on distingue un inventaire « GLOBAL » d'un inventaire « CHLORO » où seules les valves pleines sont comptabilisées.

Les données physico-chimiques collectées par l'Agence de l'Eau font l'objet d'un tri assez conséquent avant de pouvoir être exploités statistiquement.

Les analyses statistiques sont réalisées grâce au logiciel PAST et les données physico-chimiques sont représentées par l'intermédiaire du logiciel d'hydrochimie DIAGRAMMES (<http://www.lha.univ-avignon.fr/LHA-Logiciels.htm>), développé par le Laboratoire d'Hydrogéologie d'Avignon. Ce dernier permet entre autres de créer des diagrammes de Piper ou de Schöeller-Berkaloff.

### 3. Résultats

Une liste de 12 stations subissant des assèchements ou des ruptures d'écoulement chaque année a été fournie par l'Agence de l'Eau. Sur ces 12 stations, 6 étaient en rupture d'écoulement et 6 ont été asséchés (Figure 26).



**Figure 26 : Localisation des stations d'étude en Charente et Charente-Maritime. Rouge : stations ayant subi un assèchement estival ; Jaune : stations n'ayant pas subi d'assèchement estival.**

Trois campagnes étaient initialement prévues et les conditions de terrain étant aléatoires, une campagne supplémentaire a été effectuée au cours de l'assèchement. Le récapitulatif de suivi des stations est présenté dans le Tableau 7 et les fiches stations sont disponibles en annexes 2, 3, 4 et 5.

**Tableau 7 : Récapitulatif des stations suivies. En orange : les stations qui n'ont pas subi d'assèchement ; en gras : les dates où le prélèvement a été effectué en assec.**

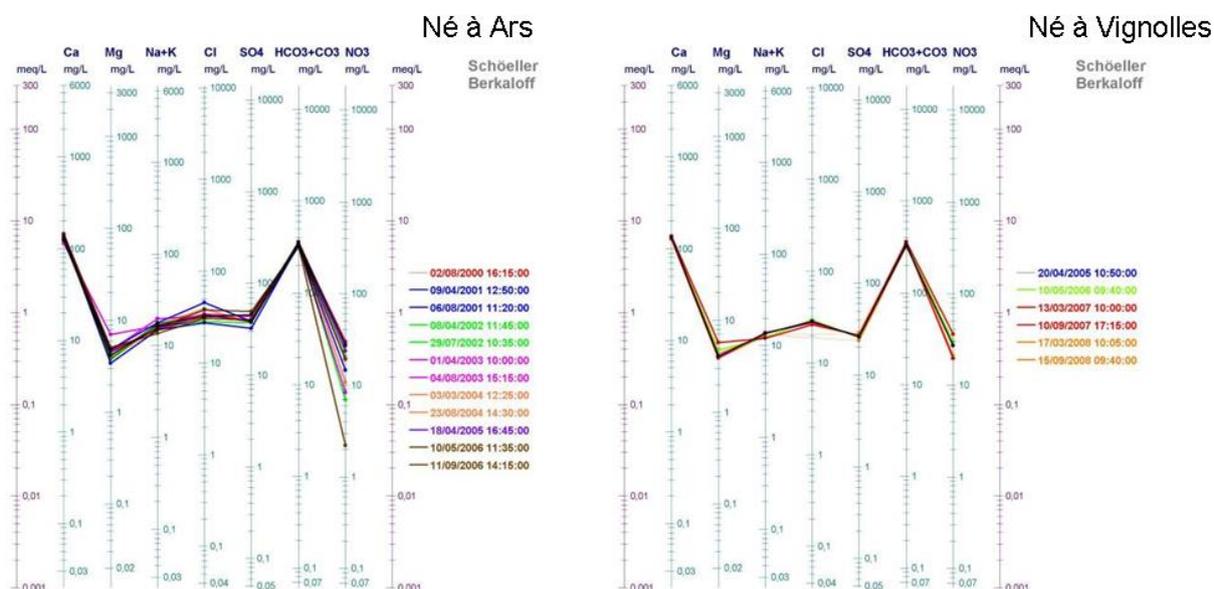
Nom	Station	Commune	Coordonnées (Lambert II étendu)		Campagne 1	Campagne 2	Campagne 3	Campagne 4
			X	Y				
SEUDRE	Saujon	SAUJON	395515	6514867	25/05/2011	08/08/2011	27/10/2011	01/02/2012
NE	Ars	ARS	436799	6510151	25/05/2011	05/08/2011	<b>27/10/2011</b>	01/02/2012
ANQUEVILLE	Natrie	GRAVES ST AMANT	457728	6509754	25/05/2011	<b>08/08/2011</b>	<b>27/10/2011</b>	01/02/2012
AUGE	Marcillac- Lanville	MARCILLAC LANVILLE	468015	6531422	25/05/2011	08/08/2011	28/10/2011	01/02/2012
BIEF	Luxé	LUXE	476077	6537033	25/05/2011	08/08/2011	28/10/2011	01/02/2012
TARDOIRE	Cotes de la Boissière	ST CIERS SUR BONNIEURE	486094	6531667	<b>26/05/2011</b>	<b>08/08/2011</b>	<b>28/10/2011</b>	02/02/2012
TARDOIRE	Fonclaireau	PUYREAUX	483408	6534295	26/05/2011	/	/	/
ARGENT	Vieux- Cérier	ST LAURENT DE CERIS	503875	6543273	26/05/2011	09/08/2011	<b>28/10/2011</b>	02/02/2012
ARGENCE	La Grange	BALZAC	478384	6516882	26/05/2011	09/08/2011	27/10/2011	02/02/2012
NOUERE	Cheneuzac	LINARS	472786	6509330	26/05/2011	09/08/2011	27/10/2011	02/02/2012
NE	Pont Brac	VIGNOLLES	458351	6496290	26/05/2011	<b>09/08/2011</b>	<b>27/10/2011</b>	02/02/2012
SEUGNE	La Vallade	CHAMPAGNAC	434746	6485825	<b>26/05/2011</b>	<b>09/08/2011</b>	<b>27/10/2011</b>	02/02/2012
<b>Préleveur :</b>					<b>A. Barthès</b>	<b>S. Coulon</b>	<b>S. Coulon</b>	<b>J. Barthès</b>

Les stations prélevées en situation d'assèchement sont signifiées en gras dans le tableau. L'année 2011 a été particulière puisque les assèchements ont eu lieu très précocement, perturbant la première campagne de prélèvement qui a dû être avancée de deux mois par rapport aux années précédentes. Malgré cette précaution, deux stations étaient déjà asséchées lors de la première campagne « avant assèchement ».

Les données physico-chimiques sont triées concernant les stations de notre étude. Actuellement, les données sur les inventaires de diatomées réalisés au cours des années précédentes sont collectées. Le panel de données a été élargi aux autres stations localisées sur les rivières ayant été asséchées au cours de nos prélèvements : le Né, l'Anqueville, l'Argent, la Tardoire et la Seugne. Une fois le point fait sur les inventaires, les données physico-chimiques des autres stations seront également traitées.

Les données physico-chimiques acquises sur les stations étudiées ont d'ores et déjà permis la création des profils physico-chimiques de nos stations. Seules les rivières semblent différer entre elles, en effet, les deux stations du Né présentées dans la Figure 27 ont des profils superposés malgré leur localisation différente (environ 33 kilomètres de linéaire de cours d'eau). Ces

observations seront à confirmer avec la création d'autres profils physico-chimiques sur d'autres stations.



**Figure 27 : Diagrammes de Schöeller-Berkaloff sur les données interannuelles de deux stations du Né.**

Il existe cependant un effet de la saison, lié entre autres à la luminosité et la température de l'eau, sur les communautés de diatomées. Afin de s'affranchir de cet effet « saison », les analyses statistiques seront réalisées sur les données physico-chimiques et biologiques de la même période sur des années différentes, sèches et en eau. Ces analyses nous permettront de mettre en évidence différences éventuelles de structure des communautés liées à l'assèchement (taxons favorisés par cette contrainte, approche taxonomique).

L'analyse complète de cette étude sera réalisée au cours du premier semestre 2014 et sera disponible dans la version finale du manuscrit de thèse.

## II. Etude de la bioindication en mésocosme.

L'étude des biofilms microbiens en mésocosme est détaillée dans le chapitre 1. Concernant les aspects de bioindication, c'est plus particulièrement le compartiment des diatomées qui est étudié grâce aux inventaires réalisés sur les valves pleines et vides.

### 1. Matériel et méthodes

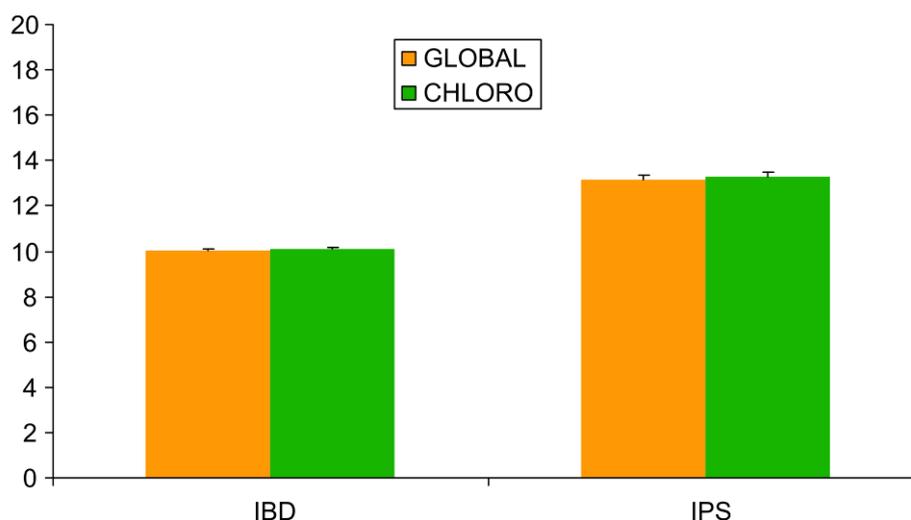
La méthodologie permettant l'acquisition des inventaires sur les diatomées est décrite dans le chapitre 1. II. 2., b., *Suivi analytique*. Deux inventaires sont réalisés pour chaque échantillon, un inventaire « CHLORO » avec uniquement les valves pourvues d'un chloroplaste et un inventaire « GLOBAL » avec la totalité des valves prises en compte. Ces inventaires sont intégrés dans le logiciel OMNIDIA<sup>®</sup> permettant le calcul des notes indicielles, dont l'IBD (Indice Biologique Diatomées ; Coste *et al.* (2009)) et l'IPS (Indice de Polluosensibilité Spécifique ; CEMAGREF (1982)) utilisés couramment dans les suivis de routine.

### 2. Résultats et discussion

Sur toute la durée de l'expérience, 20 taxons ont été identifiés dans le biofilm issu du canal et ont tous été pris en compte dans le calcul des notes indicielles. Quatre taxons dominent cependant la communauté de diatomées : *Achnanthydium exiguum*, *Achnanthydium minutissimum sensu lato*, *Germainiella* sp. et *Eolimna minima*.

*Germainiella* sp. est une nouvelle espèce qui fera l'objet d'une description *via* une publication au cours du premier semestre 2014. Ce genre contient actuellement deux espèces *G. enigmatica* et *G. enigmaticoides*, qui sont généralement en faibles proportions dans les inventaires, ce qui n'est pas le cas dans notre mésocosme où elle est majoritaire dans certains de nos comptages (jusqu'à plus de 80% sur les contrôles issus du canal). Les caractéristiques de cette espèce sont développées dans la partie « Publications ».

Les notes IBD et IPS (/20), utilisées couramment pour l'évaluation de la qualité biologique, sont présentées dans la Figure 28 pour chacun des deux inventaires « CHLORO » et « GLOBAL ».



**Figure 28 : Moyennes des notes IBD et IPS (n = 17). GLOBAL, notes calculées sur les inventaires avec toutes les valves ; CHLORO, notes calculées sur les inventaires avec seulement les chloroplastes.**

On remarque que la totalité des notes obtenues sont similaires quelle que soit la méthode de comptage (prise en compte ou non de la présence de chloroplastes). Cette information est pertinente pour l'utilisation des indices en routine en situation d'assèchement. Cependant, ces résultats sont à interpréter avec précaution étant donné la faible diversité de nos échantillons.

Les différences visibles entre l'IBD et l'IPS s'expliquent par les espèces prises en compte dans le calcul des indices. En effet, 2 espèces des 4 dominantes ne sont pas prises en compte dans l'IBD alors qu'elles le sont pour l'IPS. Concernant nos identifications, l'espèce *Germianiella* sp a été identifiée en « GERM », correspondant au code attribué au genre *Germianiella* dans le logiciel OMNIDIA©, étant donné qu'aucun code n'est prévu pour cette espèce. Concernant l'espèce *Achnanthydium minutissimum sensu lato*, seul le code « ADMI » attribué pour *A. minutissimum sensu stricto* est disponible mais ne correspond pas à notre taxon, ce qui biaise les notes. Nous avons donc fait le choix de rentrer ce taxon dans OMNIDIA© sous le code « ACHD » attribué au genre *Achnanthydium*. Les deux autres taxons dominants n'ont posé aucun problème d'identification. De ce fait, les codes tels que « GERM » et « ACHD » ne sont pas pris en compte dans l'IBD, qui est alors calculé sur un nombre très restreint d'espèces dans nos inventaires. Par exemple, concernant l'identification faite sur l'échantillon « contrôles » du canal où toutes les valves étaient prises en compte, seules 77 valves sur 415 comptées ont été intégrées dans le calcul de l'IBD. Ces valves non intégrées dans l'IBD sont toutefois intégrées dans le calcul de l'IPS et exprimées par une sensibilité plus ou moins forte à la pollution. Ces subtilités sont donc la cause de la différence observée entre les notes IBD et IPS.

Les communautés de diatomées sont généralement plus diversifiées dans le milieu naturel, cependant ces problèmes de taxonomie sont également rencontrés. De nombreuses espèces font partie de « complexes d'espèces » correspondant au « sens large » et il est parfois difficile de les associer au profil de l'espèce au « sens strict » sans accès au microscope électronique à balayage et / ou à de la bibliographie très spécialisée.

Suite à l'étude des 4 espèces structurant les communautés de diatomées dans notre étude, on a pu mettre en évidence l'évolution opposée d'*Achnantheidium minutissimum sensu lato* et de *Germainiella* sp. En effet, à la fin de la période d'assèchement, *Germainiella* sp. domine le biofilm sur les échantillons contrôles, puis de nouveau avec la durée de l'assèchement alors qu'*A. minutissimum sensu lato* domine le biofilm sur les échantillons ayant subi de courts assèchements.

### **III. Etude de la bioindication en milieu naturel : Etude sur le Maureillas.**

L'étude des communautés de diatomées détaillée dans le chapitre 2 a montré que l'assèchement avait un impact sur la structure des communautés. Les notes indicielles calculées pour chaque échantillon vont permettre de déterminer si l'assèchement a également un impact sur les méthodes de bioindication.

#### **1. Matériel et méthodes**

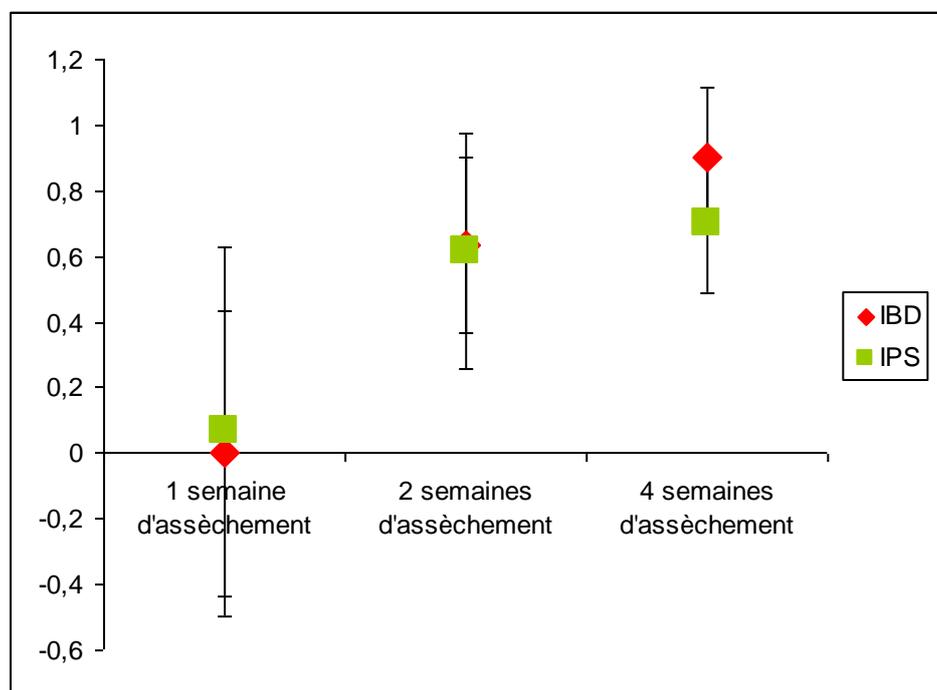
Le protocole expérimental et la technique d'identification sont décrits dans le chapitre 2, II. 3.. Les échantillons prélevés sont constitués de 3 pierres regroupées et la méthode de calcul des indices est la même que décrite précédemment, par la distinction de deux inventaires « GLOBAL » et « CHLORO » pour chaque échantillon prélevé. Les inventaires sont ensuite intégrés dans le logiciel OMNIDIA® dans le but de calculer les notes indicielles (IBD / IPS).

#### **2. Résultats**

Les notes IBD et IPS sont calculées pour chaque durée d'assèchement et chaque type de pierres ce qui représente 96 notes, 48 inventaires basés sur toutes les valves et 48 inventaires basés sur les valves avec chloroplastes.

L'écart maximal entre les notes des pierres « contrôles » est de 2 points pour l'IBD et 1,9 points pour l'IPS sur les deux mois de l'expérience. Les notes calculées sur les inventaires « CHLORO » et « GLOBAL » sont similaires ( $p$  (IBD) =  $p$  (IPS) = 0,8124). Les notes d'IBD calculées sur les communautés contrôles sont stables sur toute la durée de l'expérience avec une moyenne de 11 / 20 (Erreur standard  $\pm$  0,33) ce qui correspond à une qualité biologique « moyenne » au regard des

exigences de la DCE (Directive Cadre sur l'Eau ; Parlement européen (2000)). La différence moyenne des notes IBD et IPS calculées sur les contrôles (non soumis à une période d'assèchement) et sur le biofilm sec, en valeur absolue, est présentée dans la Figure 29.



**Figure 29 : Différence moyenne des notes IBD et IPS en valeur absolue, calculée sur toutes les valves, entre les communautés sèches et les communautés contrôles.**

Cette différence augmente légèrement avec la durée de l'assèchement sans toutefois avoir de conséquences sur l'estimation de la qualité biologique. Elle est au maximum de 0,9 point pour l'IBD et 0,6 point pour l'IPS et concerne l'assèchement de 4 semaines.

### 3. Discussion

L'impact de l'assèchement a été mesuré sur les notes indicielles de l'IBD et de l'IPS, par l'intermédiaire de deux méthodes (valves avec chloroplastes seulement ou toutes les valves) et aucune différence significative n'a été observée. L'IBD révèle une qualité biologique « moyenne » associée à une importante présence d'espèces cosmopolites telles que *Nitzschia amphibia* ou *Planothidium lanceolatum*. La différence moyenne des notes des contrôles et des pierres avec biofilm sec, augmente légèrement avec la durée de l'assèchement ce qui montre que l'assèchement a un effet léger sur les notes même si il n'entraîne pas de modification de la qualité biologique. Les valeurs présentées sont en valeur absolue, les différences peuvent être négatives ou positives (pas de tendance observée). Cependant, ces résultats peuvent être liés au contexte particulier de notre étude, où la station d'échantillonnage est située en aval du rejet d'une station d'épuration. En effet, au moment de notre expérience, on a noté une présence importante d'*Escherichia coli* (2190 CFU /

100 mL), de phosphore total (0,58 mg.L<sup>-1</sup>) et d'orthophosphates (1,59 mg.L<sup>-1</sup>) au mois de septembre 2011 (Rouquet and Barthès, 2012). Les taxons présents sur notre station sont tolérants à un enrichissement organique et leurs profils écologiques sont associés à des valeurs indicatrices basses. La présence importante de taxons tolérants explique la robustesse des notes. Il serait alors intéressant de tester cette expérience dans un cours d'eau de meilleure qualité avec de nombreux taxons sensibles à forte valeur indicatrice.

Concernant l'application du protocole IBD (AFNOR, 2007), l'échantillonnage doit être effectué sur 5 pierres minimum afin de limiter les risques d'hétérogénéité du milieu. Dans notre expérience, pour des problèmes de logistique, le choix a été fait de n'utiliser que 3 pierres, avec le risque d'augmenter cette incertitude. Ceci pourrait avoir un impact sur les proportions de valves vides et pleines et donc sur les identifications associées, mais nos résultats semblent fiables puisque les indices calculés sur les contrôles sont restés stables durant toute l'expérience. De plus, les analyses statistiques présentées dans le chapitre 2 montrent que les données obtenues sur les proportions spécifiques sont groupées par type de pierres testées.

## IV. Conclusions

Les études menées sur les biofilms de mésocosme et en milieu naturel ont montré que l'assèchement avait un impact marqué et durable sur les communautés de diatomées, sans pour autant avoir une incidence notable sur les notes indicatrices utilisées dans les suivis de routine en France (IBD / IPS). Cependant, nos études ont été faites dans des milieux particuliers, soit en mésocosme pour étudier spécifiquement la reviviscence d'un biofilm séché sans l'apport de dérive, l'indice n'étant pas adapté à des milieux fermés non naturels, soit en milieu naturel où le protocole n'a pas été respecté (3 pierres au lieu de 5).

Dans les deux cas cependant, le comptage sur la totalité des valves et sur les chloroplastes seulement a montré des résultats similaires dans l'ensemble sauf dans un cas de l'étude du Maureillas (assèchement de 4 semaines). Ce double comptage avait pour intérêt de déterminer la mortalité induite par l'assèchement ou encore la persistance d'espèces après un épisode d'assèchement. Les données qui seront exploitées l'année prochaine sur les communautés de Charente et Charente-Maritime permettront de discuter de façon plus précise ces premiers résultats. En effet, le jeu de données étudié est plus important, avec la garantie d'un protocole IBD conformément appliqué (sauf pour le cas de prélèvement sur des pierres asséchées), et les rivières étudiées ont des qualités biologiques variables.

Toutefois, ces premiers résultats mettent également en évidence les problèmes rencontrés par les opérateurs, que ce soit concernant l'identification des diatomées ou l'encodage des espèces dans

OMNIDIA® ou encore le manque d'informations précises sur la situation hydrologique précédant un prélèvement. En effet, on a montré que l'histoire du biofilm avait des conséquences sur la structure des communautés, or un opérateur qui arrive sur une station qu'il ne connaît pas ne sait pas si la pierre qu'il prélève a subi un assèchement dans les jours précédents. Plusieurs interrogations restent en suspend pour le moment, sur l'incidence de ce manque d'information et l'impact sur la modification des communautés sur les notes indicielles.

Enfin, l'assèchement pouvant être brutal ou progressif, l'évolution de la structure pourra être différente par une sélection brutale d'individus ou une adaptation progressive par une transition spécifique au cours de l'assèchement, ce qui n'a pas été testé dans le cadre de nos expériences.



# Conclusion générale

## *Conclusions et perspectives*



## I. Conclusion générale

L'objectif de ce travail était de définir les dynamiques de recolonisation et les capacités de reviviscence et de bioindication du biofilm phototrophe, en particulier le compartiment des diatomées, suite à un épisode d'assèchement. Concernant les aspects de bioindication, l'objectif était de savoir si, dans un contexte d'accroissement du nombre de cours d'eau asséchés en période estivale, le protocole IBD utilisé en routine en France était adaptable aux milieux asséchés.

L'assèchement impacte de façon conséquente et durable les communautés benthiques à toutes les échelles, même lorsqu'il est de courte durée. Cependant, on n'observe pas de résilience structurelle lors de la remise en eau mais une résilience fonctionnelle. Sur les communautés procaryotes, ces observations sont couplées à une redondance fonctionnelle où des fonctions similaires sont observables alors que la structure du biofilm a changé. Lors de la remise en eau suivant un assèchement, plusieurs sources cellulaires sont mises en évidence, la repousse à partir du biofilm sec et l'apport de biomasse par la dérive. Concernant la repousse à partir du biofilm sec, l'assèchement, qu'il soit brutal ou progressif, agit comme une contrainte de sélection qui est favorable aux diatomées au détriment des cyanobactéries, dans l'étude conduite en microcosme et mésocosme. En milieu naturel, la dérive semble représenter une source importante de recolonisation dans l'expérience conduite sur le Maureillas. Dans tous les cas, nos résultats montrent que l'histoire du biofilm est déterminante dans l'évolution des communautés benthiques.

La compréhension des dynamiques de recolonisation et des capacités de reviviscence du biofilm sec permet de mieux appréhender la possibilité d'une bioindication dans ces milieux. En effet, les communautés évoluent différemment en fonction des facteurs autogènes et allogènes auxquels elles sont soumises au sein d'une même station, ce qui peut avoir une influence sur les données récoltées sur le terrain. Cet aspect là reste encore à définir en fonction de l'impact de ces changements structuraux sur les inventaires. Sur les données récoltées à l'heure actuelle sur des milieux peu diversifiés ou composés d'espèces tolérantes à l'apport en matière organique, rien n'indique que l'assèchement puisse avoir un impact visible sur la qualité biologique de l'eau. Les données à analyser l'année prochaine sur les échantillons de la Charente et de la Charente-Maritime nous apporteront plus d'informations, y compris d'un point de vue taxonomique. Il sera ensuite possible de discuter de l'adaptation du protocole IBD à des cours d'eau asséchés.

Cependant, le chapitre consacré à la bioindication a permis la mise en évidence des problèmes rencontrés par les opérateurs en routine, que ce soit pour le prélèvement ou l'identification des taxons. En effet, malgré l'importance de l'histoire du biofilm, notamment son degré de maturation, les opérateurs n'ont que peu d'informations sur la situation hydrologique précédant leur venue.

L'identification et l'intégration de données dans OMNIDIA<sup>®</sup> est parfois difficile puisque les profils des espèces au sens strict définis dans le logiciel ne correspondent pas nécessairement aux espèces au sens strict décrites dans la littérature, ce qui peut introduire un biais dans les valeurs indicielles. Toutefois, au regard de nos premières analyses, il semblerait que la prise en compte de valves mortes dans les comptages utilisés en routine soit valable.

## II. Perspectives

Devant l'augmentation du nombre de cours d'eau asséchés en période estivale, pour des raisons climatiques ou anthropiques, il devient nécessaire de s'intéresser à l'impact de l'assèchement sur les communautés et leur bioindication. Aujourd'hui, la bioindication est essentielle dans le suivi de qualité des rivières en France et en Europe, les gestionnaires sont confrontés de façon croissante à des problèmes d'acquisition de données sur certaines stations, du fait de la non application du protocole normalisé sur un lit asséché. Les diatomées ayant des frustules persistants, il est intéressant de constater que ceux-ci sont toujours présents sur les pierres, même après plusieurs semaines d'assèchement, ce qui fait des diatomées un témoin de la situation hydrologique passée. Malgré cette possibilité, un travail à plus grande échelle est nécessaire dans l'application d'un protocole IBD adapté. Le protocole de prélèvement mis en place durant la thèse ont permis d'acquérir des données exploitables, cependant, le risque de détérioration du biofilm par piétinement serait à prendre en considération. Le biofilm n'aurait alors pas de possibilité de se renouveler avant un prélèvement. Il faudrait également tester les profils écologiques des taxons rencontrés, notamment sur des assèchements progressifs où des espèces plus aérophiles pourraient s'installer avant un assèchement total du lit. Pour ces raisons, il pourrait être intéressant de mettre en place des suivis en réalisant des prélèvements sur des cours d'eau asséchés, afin de constituer un jeu de données exploitable.

D'autres expériences complémentaires pourraient être mises en place afin de visualiser l'impact de l'assèchement sur l'histoire du biofilm et la bioindication. Effectivement, une rivière subissant un assèchement partiel présente des pierres asséchées et des pierres qui restent en eau, si la qualité de l'eau est modifiée durant cette période, on peut se demander de quelle manière les communautés évolueraient au moment de la remise en eau, sachant qu'elles n'auraient pas la même histoire. On pourrait aussi se demander dans quelle mesure les notes indicielles seraient impactées et quel délai d'attente est nécessaire afin d'avoir un prélèvement conforme aux exigences de la Directive Européenne.

Ce travail est un travail préliminaire dont l'évolution dépendra de l'acquisition de données supplémentaires qui permettront de valider la pertinence de l'utilisation des biofilms secs dans la bioindication et l'éventuelle adaptation des outils disponibles.



# Publications

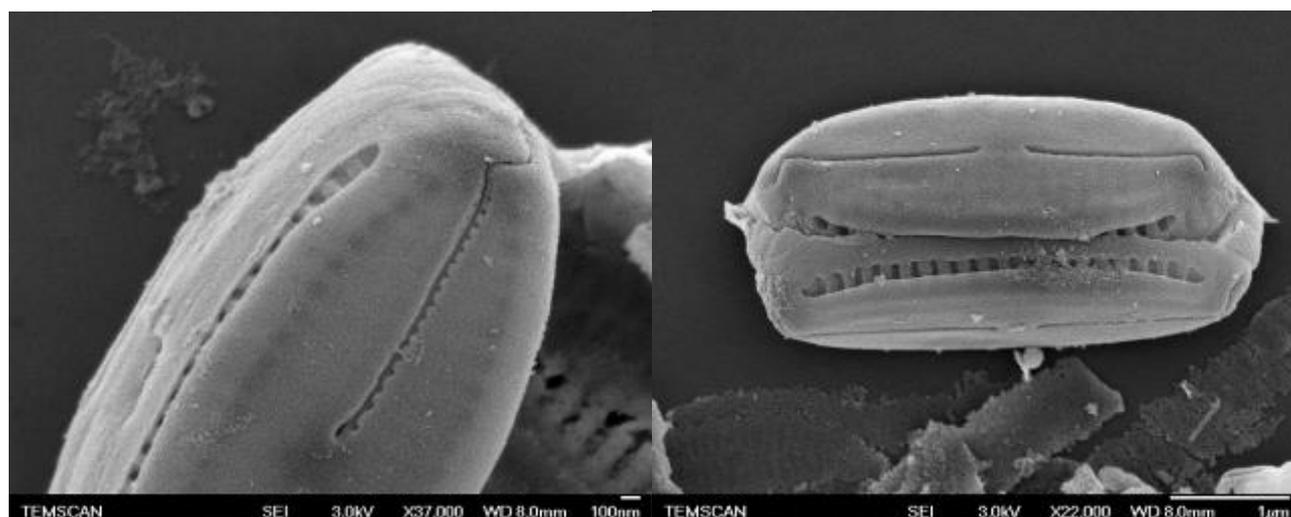
***Articles en préparation, soumis et acceptés***  
***Communications et participation à des colloques***



## I. Publications

- **Article I.** : Synthèse bibliographique en partie rédigée, elle décrit les stratégies de résistance à l'assèchement des biofilms phototrophes et les dynamiques de recolonisation associées (Introduction de la thèse).
- **Article II.** : Article sur l'impact de l'assèchement sur des biofilms microbiens de microcosme et mésocosme – en préparation, *Microbial Ecology* (Chapitre 1 de la thèse).
- **Article III.** : Barthès A., Leflaive J., Coulon S., Peres F., Rols J.L. and Ten-Hage L., Impact of drought on diatom communities and the consequences for the use of diatom index values in the Maureillas river (Pyrénées-Orientales, France)., *River Research and Applications* – soumis (Chapitre 2 de la these, Annexe 10).
- **Article IV.** : Article sur l'étude des cours d'eau de Charente et Charente-Maritime, valorisation statistique des données physico-chimiques et biologiques et bioindication – à définir en fonction des résultats, début 2014 (Chapitre 3 de la thèse).
- **Article V.** : Description de l'espèce du canal expérimental : *Germainiella* sp. (Annexe de la thèse).

Ce genre compte seulement 2 espèces décrites *G. enigmatica* et *G. enigmaticoides*, en général peu représenté dans les inventaires. Notre espèce est très représentée dans le mésocosme et de petite taille, de l'ordre de 3 à 5 µm. Des photographies en microscopie électronique à balayage (MEB, Figure 30) et à transmission (MET) sont en cours d'acquisition. Les stries ne sont pas visibles en microscopie optique car elles sont recouvertes d'une fine couche de silice appelée conopeum.



**Figure 30 : Taxon inconnu, dominant dans le canal artificiel en microscopie électronique à balayage (MEB).**

- **Article VI.** : Pérès F., Barthès A., Ponton E., Coste M., Ten-Hage L. and Le Cohu R. (2012), *Achnantheidium delmontii* sp. nov., a new species from French rivers, *Fottea*. (Annexe de la thèse).

Les abstracts du colloque de l'ADLaF et du CE-Diatom (Annexes 7 et 8) ont fait l'objet d'une publication (ISSN 978-2-7466-6166-0).

## II. Posters et communications

- **10th International Phycological Congress – IPC10 (4-10 août 2013, Orlando, Floride, USA):**  
**Barthès A.**, Leflaive J., Peres F., Rols J.L. et Ten-Hage L., *Importance of dry biofilm as a refuge during a drought episode - A mesocosm study.* (Barthès et al., 2013) <http://ipc10.intphycsoc.org/> (poster, Annexe 6)
- **32<sup>e</sup> colloque de l'Association des Diatomistes de Langue Française - ADLaF (16-18 septembre 2013, Thonon-les-Bains, France) :**  
**Barthès A.**, Leflaive J., Peres F., Rols J.L. et Ten-Hage L., *Impact d'un assec sur un biofilm de mésocosme : conséquences pour les communautés algales et bactériennes et sur les indices utilisés (IBD/IPS) en routine.* [https://colloque.inra.fr/cediatom\\_adlaf\\_2013/](https://colloque.inra.fr/cediatom_adlaf_2013/) (communication orale, Annexe 7)
- **7th Central European Diatom Meeting (18-20 septembre 2013, Thonon-les-Bains, France) :**  
**Barthès A.**, Leflaive J., Coulon S., Peres F., Rols J.L. et Ten-Hage L., *Impact of drought on diatom communities and the consequences for their use in bioindication in river Maureillas (Pyrénées-Orientales, France).* [https://colloque.inra.fr/cediatom\\_adlaf\\_2013/](https://colloque.inra.fr/cediatom_adlaf_2013/) (poster, Annexe 8)

- **6e Journées thématiques du Réseaux National Biofilm : Les Biofilms, Remue-Ménage aux Interfaces – RNB (19-21 novembre 2013, Pau, France) :**

**Barthès A.**, Leflaive J., Peres F., Rols J.L. et Ten-Hage L., *Biofilms phototrophes de rivières intermittentes : simulation d'un assec en mésocosme, capacité de reviviscence et résilience fonctionnelle*. [https://colloque2.inra.fr/reseau\\_national\\_biofilm](https://colloque2.inra.fr/reseau_national_biofilm) (communication orale, Annexe 9)

- **Joint Aquatic Sciences Meeting 2014 – JASM 2014 (18-23 mai 2014, Portland, Oregon, USA) :** à venir. <http://aslo.org/meetings/portland2014/sessions/index.php> -  
<http://www.freshwater-science.org/Annual-Meeting/2014-Portland---JASM.aspx> -  
[www.aslo.org/meetings/portland2014/](http://www.aslo.org/meetings/portland2014/) (poster)



# Références



AFNOR (2007) NF T90-354: Water quality — Determination of the Diatom Biological Index (DBI). AFNOR.

Agence de l'Eau Loire-Bretagne (2006) Le prélèvement d'échantillons en rivière - Techniques d'échantillonnage en vue d'analyses physico-chimiques. In: *La mesure de débit*. p. 132. Agence de l'Eau Loire-Bretagne, Orléans.

Barthès, A., Leflaive, J., Peres, F., Rols, J.L. & Ten-Hage, L. (2013) Importance of dry biofilm as a refuge during a drought episode - A mesocosm study In: *10th International Phycological Congress*, Orlando, Florida.

CEMAGREF (1982) Étude des Méthodes Biologiques d'appréciation Quantitative de la Qualité des Eaux. p. 218. Agence de l'Eau Rhône-Méditerranée-Corse, Lyon.

CEN (2004) EN 13946: Water quality - Guidance standard for the routine sampling and pre-treatment of benthic diatoms from rivers. European Standard.

Coste, M., Boutry, S., Tison-Rosebery, J. & Delmas, F. (2009) Improvements of the Biological Diatom Index (BDI): Description and efficiency of the new version (BDI-2006). *Ecological Indicators*, **9**, 621-650.

Fisher, M.M. & Triplett, E.W. (1999) Automated approach for ribosomal intergenic spacer analysis of microbial diversity and its application to freshwater bacterial communities. *Applied and Environmental Microbiology*, **65**, 4630-4636.

Gillett, N., Pan, Y.D. & Parker, C. (2009) Should only live diatoms be used in the bioassessment of small mountain streams? *Hydrobiologia*, **620**, 135-147.

Kelly, M.G., Cazaubon, A., Coring, E., Dell' Uomo, A., Ector, L., Goldsmith, B., Guasch, H., Hurlimann, J., Jarlman, A., Kawecka, B., Kwandrans, J., Laugaste, R., Lindstrom, E.A., Leitao, M., Marvan, P., Padisak, J., Pipp, E., Prygiel, J., Rott, E., Sabater, S., van Dam, H. & Vizinet, J. (1998) Recommendations for the routine sampling of diatoms for water quality assessments in Europe. *Journal of Applied Phycology*, **10**, 215-224.

Kilham, S.S., Kreeger, D.A., Lynn, S.G., Goulden, C.E. & Herrera, L. (1998) COMBO: a defined freshwater culture medium for algae and zooplankton. *Hydrobiologia*, **377**, 147-159.

Lecoite, C., Coste, M. & Prygiel, J. (1993) OMNIDIA - Software for taxonomy, calculation of diatom indexes and inventories management. *Hydrobiologia*, **269**, 509-513.

Lorenzen, C.J. (1967) Determination of chlorophyll and pheopigments: Spectrophotometric equations. *Limnology and oceanography*, **12**, 343-346.

Miller, J.M. & Rhoden, D.L. (1991) Preliminary evaluation of Biolog, a carbon source utilization method for bacterial identification. *Journal of Clinical Microbiology*, **29**, 1143-1147.

Pappas, J.L. & Stoermer, E.F. (1996) Quantitative method for determining a representative algal sample count. *Journal of Phycology*, **32**, 693-696.

- Parlement européen, C. (2000) Directive 2000/60/EC établissant un cadre pour une politique communautaire dans le domaine de l'eau., pp. 1-73. Journal Officiel des Communautés Européennes.
- Passy, S.I. (2007) Diatom ecological guilds display distinct and predictable behavior along nutrient and disturbance gradients in running waters. *Aquatic Botany*, **86**, 171-178.
- Paule, A., Roubéix, V., Lauga, B., Duran, R., Delmas, F., Paul, E. & Rols, J.L. (2013) Changes in tolerance to herbicide toxicity throughout development stages of phototrophic biofilms cultivated in rotating annular bioreactor. *Aquatic Toxicology*, (in press).
- Peterson, C.G. (1986) Effects of Discharge Reduction on Diatom Colonization below a Large Hydroelectric Dam. *Journal of North American Benthological Society*, **5**, 278-289.
- Roháček, K. & Barták, M. (1999) Technique of the Modulated Chlorophyll Fluorescence: Basic Concepts, Useful Parameters, and Some Applications. *Photosynthetica*, **37**, 339-363.
- Rouquet, P. & Barthès, J. (2012) Suivi de la qualité des cours d'eau du bassin versant du Tech et des petits fleuves côtiers. ASCONIT Consultants, Toulouges, France.
- Stanier, R.Y., Kunisawa, R., Mandel, M. & Cohenbaz, G. (1971) Purification and properties of unicellular blue-green algae (Order Chroococcales). *Bacteriological Reviews*, **35**, 171-205.
- Utermöhl, H. (1958) Zur vervollkommnung der quantitativen Phytoplankton-Methodik. *Mitteilungen der Internationalen Vereinigung für Theoretische and Angewandte Limnologie*, **9**, 1-38.
- Van Dam, H., Mertens, A. & Sinkeldam, J. (1994) A coded checklist and ecological indicator values of freshwater diatoms from The Netherlands. *Netherland Journal of Aquatic Ecology*, **28**, 117-133.

# ANNEXES

*Voir CD joint*



**Annexe 1** : Protocole utilisé pour le prélèvement et la préparation des échantillons de l'expérience de mésocosme.

**Annexe 2** : Fiches stations – Campagne 1 : avant assèchement – Terrain Adour-Garonne – Mai 2011.

**Annexe 3** : Fiches stations – Campagne 2 : en cours d'assèchement – Terrain Adour-Garonne – Août 2011.

**Annexe 4** : Fiches stations – Campagne 3 : en cours d'assèchement – Terrain Adour-Garonne – Octobre 2011.

**Annexe 5** : Fiches stations – Campagne 4 : après assèchement – Terrain Adour-Garonne – Février 2012.

**Annexe 6a** : Abstract – Poster IPC10, Floride – Août 2012.

**Annexe 6b** : Poster – IPC10, Floride – Août 2012.

**Annexe 7a** : Abstract – ADLaF, Thonon-les-Bains, France – Septembre 2013.

**Annexe 7b** : Présentation orale – ADLaF, Thonon-les-Bains, France – Septembre 2013.

**Annexe 8a** : Abstract – 7th CE-Diatom, Thonon-les-Bains, France – Septembre 2013.

**Annexe 8b** : Poster – 7th CE-Diatom, Thonon-les-Bains, France – Septembre 2013.

**Annexe 9a** : Abstract – RNB, Pau, France – Novembre 2013.

**Annexe 9b** : Présentation orale – RNB, Thonon-les-Bains, France – Novembre 2013.

**Annexe 10** : Article soumis dans *River Research and Applications* - Barthès A., Leflaive J., Coulon S., Peres F., Rols J.L. and Ten-Hage L., Impact of drought on diatom communities and the consequences for the use of diatom index values in the Maureillas river (Pyrénées-Orientales, France).