HAL
open science

Effets de pesticides sur l'activité et la diversité des communautés microbiennes d'un milieu lotique récepteur. Etudes in situ et expérimentales

Stéphane Pesce

To cite this version:

Stéphane Pesce. Effets de pesticides sur l'activité et la diversité des communautés microbiennes d'un milieu lotique récepteur. Etudes in situ et expérimentales. Biochimie, Biologie Moléculaire. Université Blaise Pascal - Clermont-Ferrand II, 2006. Français. NNT : . tel-00717397

HAL Id: tel-00717397

https://theses.hal.science/tel-00717397v1

Submitted on 12 Jul 2012

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

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

UNIVERSITE BLAISE PASCAL Année 2006
N° D.U. **1705**

Ecole Doctorale des Sciences de la Vie et de la Santé
N° d'ordre 449

THESE

Présentée à l'Université Blaise Pascal
en vue de l'obtention du grade de

DOCTEUR D'UNIVERSITE

(Spécialité : Ecologie Microbienne)

soutenue le 05 décembre 2006 par

Stéphane PESCE

Effets de pesticides sur l'activité et la diversité des communautés microbiennes d'un milieu lotique récepteur.

Etudes *in situ* et expérimentales

Composition du Jury :

AMBLARD Christian	Directeur de recherche CNRS, Clermont-Ferrand (Président)
MONTUELLE Bernard	Directeur de recherche CEMAGREF, Lyon (Rapporteur)
DE LA BROISE Denis	Maître de conférences, Université de Quimper (Rapporteur)
CAQUET Thierry	Chargé de recherche INRA, Rennes
BOHATIER Jacques	Professeur, Université d'Auvergne, Clermont I
FAJON Céline	Maître de conférences, Université Blaise Pascal, Clermont II
ARZUL Geneviève	Chargée de recherche IFREMER, Brest (membre invité)
BALIN-DELSOL Agnès	DRAF-SRPV Auvergne (membre invité)

Laboratoire de Biologie des Protistes
UMR CNRS 6023
Université Blaise Pascal, Clermont II

REMERCIEMENTS

Je remercie vivement les membres du jury qui ont accepté d'évaluer ce travail. Merci à Monsieur Montuelle et Monsieur De la Broise d'avoir bien voulu repousser à l'extrême la date d'envoi de mon manuscrit. J'adresse un remerciement plus particulier à Madame Arzul pour son formidable accueil lors de notre rencontre à Brest.
Je remercie Monsieur Christian Amblard de m'avoir accueilli au sein du laboratoire de Biologie des Protistes.
Que serait une thèse sans (co)directeur(s) de thèse? Merci à Jacques Bohatier et Céline Fajon, pour la liberté et la confiance qu'ils m'ont accordées depuis mon DEA, leur aide précieuse dans la recherche d'un financement et leur encadrement au cours de ces longues années. Céline, je te remercie également d'avoir su me guider efficacement lors de mes premiers pas d'enseignant à l'Université.

Je tiens également à exprimer ma gratitude à Monsieur Alain Berthier, Président et « homme à tout faire » du club de football de Ceyrat, pour m'avoir offert un emploi au sein de son association, me permettant lors de ma première année de thèse, de concilier travail et recherche. Merci Alain de m'avoir toujours accordé la flexibilité nécessaire pour pouvoir tout assumer. Sans cette opportunité, en serais-je là aujourd'hui?

Je remercie le Conseil Régional d'Auvergne de m'avoir attribué une Bourse pour me permettre d'effectuer cette thèse dans le domaine de l'Environnement.

Sans données chimiques, pas d'écotoxicologie… Notre collaboration avec Phyt'eauvergne, qui a donné naissance à ce projet, a été sans faille durant ces années. Je remercie tous les membres de ce groupe et plus particulièrement les deux "hommes de terrain", Christophe Bras et Olivier Raffin, rencontrés au bord de la rivière ou dans les nombreuses réunions, pour leur grande disponibilité et leur compétence. Merci également à Météo France et la DIREN Auvergne pour avoir mis à ma disposition les données concernant la pluviométrie et le débit.

Cette thèse effectuée dans la continuité de mon DEA est l'aboutissement de cinq années de recherche dans l'équipe d' "écotox". Je mesure pleinement la chance que j'ai eue d'avoir été "coocooné" au jour le jour, techniquement et affectivement, par tous les membres de cette équipe que je retrouvais avec un réel plaisir tous les matins.

Tout d'abord, je tiens à remercier Christophe, le compagnon des sorties sur le terrain, pour les longues heures qu'il a passées derrière le microscope à dénombrer les microalgues. Sans lui, il n'y aurait pas eu de "comptages phyto". Je n'oublie pas Samuel pour son aide lors des analyses physico-chimiques. J'en arrive à notre petit Caliméro… merci à toi Clarisse pour tes nombreux conseils et tes petites "blagounettes" lors des pauses café. Tes sachets de thé m'ont été précieux en période rédactionnelle ! Bureau d'en face : celui de ma « petite maman du labo ». Frédérique, depuis mon arrivée au sein de l'équipe tu t'es toujours occupée de moi avec le plus grand soin. J'ai souvent trouvé auprès de toi le réconfort dans les moments de doutes. Même si nous n'étions pas toujours d'accord sur tout, nos discussions quotidiennes ont contribué à mon évolution au fil du temps et me manqueront beaucoup… Et que dire de plus (ou de moins) pour toi Corinne. Aurais-je pu rêver meilleure guide pour m'initier aux joies de la "biomol". Je sais que je te dois énormément à ce niveau là, mais ça ne représente qu'une infime partie de tout ce que tu m'as apporté au cours de ces quatre années de "paillasse commune" (et même pas une seule engueulade !!!). Nathalie, je t 'associe à l'équipe de part ta proximité géographique. Je tenais à te remercier pour ta disponibilité inégalable, ton sourire permanent et ton ultime gentillesse. Qui ne rêverait pas d'avoir une secrétaire comme toi ? Merci également à Nicole, régulièrement attirée chez nous par les petits gâteaux, pour sa compagnie toujours très agréable.

Me voilà devant un exercice difficile. Isabelle, comment te remercier en quelques lignes au regard de toute l'aide que tu m'as apportée durant ces années ? Les longues nuits que tu as passées au labo pour me soutenir lors de ma rédaction et m'aider à tenir les délais (sans toi je n'y serais pas arrivé) résument à elles seules l'amitié profonde qui nous unis... J'ai bientôt fait le tour de l'équipe, il ne manque plus qu'Olivier, le petit dernier. « Loulou » avant de te laisser les clés du bureau (c'est toi le chef maintenant), je voulais te remercier pour les franches rigolades que nous avons partagées depuis ton arrivée. Notre cohabitation a été un réel plaisir et tu as assumé à merveille ton rôle d' « expert agricole ». Encore un peu d'entraînement à PFYC et l'élève pourra dépasser le maître ! J'en profite pour adresser une petite pensée à Nico (le lien sera vite trouvé par le concerné) qui s'est très bien intégré à nos cotés malgré son rôle ingrat de "Mister Qualité".

Puisque j'en suis aux "habitants" passés ou présents du bureau 1008, je tiens à te remercier Anne-Hélène pour ta joie de vivre et surtout ton énorme gentillesse. Je remercie dans leur ensemble tous les étudiants du laboratoire pour les divers échanges que nous avons eu, toujours dans la bonne humeur. J'adresse une mention spéciale aux membres du bureau bleu qui ont du supporter ma présence régulière (et surtout les blagues qui vont avec…), à

Emilie pour ses nombreuses visites en bas et à Cécile L. pour sa disponibilité et son accueil lors du « squattage » de son bureau pour les analyses phylogénétiques.

Je n'oublie pas les bons moments passés hors du labo avec Seb, Annie, les deux Marie (A. et C.), Catherine, Alex et Aurélie, Aurélie T., Charlie, Hicham…et j'en oublie sans doute. Un petit clin d'œil à M. Fonty, coéquipier de premier choix pour compléter la « triplette magique », victorieuse de la première édition du tournoi de pétanque du LBP (Ah si « votre Clermont Foot » pouvait en faire autant… !!!). Je pourrais citer encore beaucoup de monde tant la vie au laboratoire fut agréable. Merci à tous les membres du LBP pour tous ces bons moments.

Te voilà Docteur Lehours…(j'ai gardé le meilleur pour la fin). Ma petite Anne-Catherine, après dix années d'Amitié sincère depuis nos premiers pas sur les bancs de la fac jusqu'à la fin du doctorat (et tout ça pour me faire griller de quelques semaines à l'arrivée !), quoi dire de plus que tu ne saches déjà ? Merci pour TOUT…et bien plus encore !

J'adresse enfin mes plus sincères remerciements à tous mes proches extérieurs au monde si particulier de la recherche et qui jouent un rôle tellement important dans l'équilibre du thésard. A mes parents, pour la grande liberté qu'ils m'ont toujours accordée et leur soutien sans faille, à Frède pour son amour au quotidien (c'est promis je vais à présent t'aider à préparer notre mariage) et à toute ma famille et mes Amis, délaissés ces derniers temps…

Résumé

Effets de pesticides sur l'activité et la diversité des communautés microbiennes d'un milieu lotique récepteur.

Etudes *in situ* et expérimentales

RESUME : Les effets de pesticides sur les communautés algales et bactériennes d'un cours d'eau ont été appréciés en couplant des approches *in situ*, menée au cours de deux années, à des approches expérimentales en microcosmes, réalisées avec le diuron et le glyphosate (10 µg l^{-1}). La prédominance des herbicides affecte la biomasse et la diversité algale et induit une sélection prononcée dans la rivière où quatre genres majoritaires sont recensés. La sensibilité des communautés algales à un même pesticide varie suivant leur état physiologique et leur composition taxonomique. L'impact des herbicides sur le compartiment bactérien au niveau quantitatif (sur la densité, la production hétérotrophe et l'activité respiratoire) et qualitatif (diversité génétique), est majoritairement induit par des effets indirects. Il est plus perceptible dans les dispositifs expérimentaux où les bactéries ne peuvent bénéficier d'apports organiques allochtones et sont fortement tributaires de la production algale.

MOTS CLES :
écotoxicologie, milieux lotiques, pesticides, approche *in* situ, microcosmes, communautés microbiennes, microalgues, bactéries, écologie moléculaire

Effects of pesticides on microbial activity and diversity in a polluted lotic system.

In situ and experimental studies

ABSTRACT : The effects of pesticides on natural algal and bacterial communities from a French stream were investigated using an *in situ* approach, followed over two years, and using microcosms studies realized with the herbicides diuron and glyphosate (10 µg l^{-1}). The predominance of herbicides in the stream affects algal biomass and diversity and leads to a selection of four major genus. Algal communities sensitivity to a particular pesticide varies according to physiological state and taxonomic composition. The quantitative (i.e. cellular density, heterotrophic production and activity) and qualitative (i.e. genetic diversity) impact of herbicides on bacterial communities is principally due to indirect effects. This impact is more pronounced in microcosms where bacteria are more dependent on algal production in experimental systems due to the lack of allochthonous organic inputs .

KEY WORDS :
ecotoxicology, lotic systems, pesticides, *in* situ approach, microcosms, microbial communities, algae, bacteria, molecular ecology

Table des matières

TABLE DES MATIERES

LISTE DES ABBREVIATIONS 1

LISTE DES TABLEAUX ET FIGURES 3

INTRODUCTION GENERALE ET OBJECTIFS DE L'ETUDE 10

Chapitre A - CADRE SCIENTIFIQUE 13

A.I. Les pesticides 13
A.I.1. Rôle et utilisation 13
A.I.2. Classification des pesticides 13
A.I.3. Utilisation des pesticides en France 14

A.II. La pollution des eaux de surface par les pesticides 14
A.II.1. Application et transfert vers les milieux aquatiques 14
A.II.2. Approche réglementaire 15
A.II.3. La contamination des eaux superficielles françaises 17

A.III. Ecotoxicité des pesticides en milieu lotique 20
A.III.1. Fonctionnement général des écosystèmes lotiques 20
A.III.2. Cibles biologiques potentielles des pesticides en milieu lotique 23
A.III.2.1. Effets directs et indirects des pesticides 23
A.III.2.2. Le rôle des communautés microbiennes en milieu lotique 25
A.III.3. Impact des pesticides sur les organismes microbiens 27
A.III.3.1 Principales approches utilisées en écotoxicologie aquatique 27
A.III.3.1.a Les approches expérimentales 27
A.III.3.1.b Les études en milieu lotique naturel 29
A.III.3.2. Ecotoxicité des pesticides sur le compartiment microalgal 29
A.III.3.3. Ecotoxicité des pesticides sur le compartiment bactérien 30

A.IV. Contexte général de l'étude- Problématique 32
A.IV.1. Etat de la contamination des eaux en Auvergne 32
A.IV.2. Le cas particulier de la rivière Jauron 34
A.IV.2.1. Caractéristiques du bassin versant 34
A.IV.2.2. Principaux pesticides détectés dans le Jauron 35
A.IV.3. Ecotoxicité du diuron et du glyphosate sur les communautés microbiennes aquatiques 37

Chapitre B - MATERIEL ET METHODES 41

B.I. Site d'étude et stratégies d'échantillonnage 41
B.I.1. Les campagnes *in situ* 41
B.I.1.1. Objectif 41
B.I.1.2. Choix des stations de prélèvements 41

B.I.1.3. Echantillonnage 42
B.I.2. Les études expérimentales en microcosmes 43
B.I.2.1. Objectif 43
B.I.2.2. Calendrier des expériences 43
B.I.2.3. Constitution des microcosmes 44
B.I.2.4. Echantillonnage 45

B.II. Paramètres abiotiques mesurés 45
B.II.1. Dosage des pesticides 45
B.II.2. Mesure de la température, de l'oxygène dissous et du pH 46
B.II.3. Dosages des composés azotés et phosphorés 46
B.II.4. Dosage du carbone organique dissous (COD) 46
B.II.5. Mesure du débit et de la pluviométrie 47

B.III. Etude du compartiment algal planctonique (phytoplancton) et périphytique (phytobenthos) 48
B.III.1. Collecte du phytobenthos 48
B.III.2. Estimation de la biomasse algale 49
B.III.3. Mesure de l'abondance algale et analyse de la composition taxonomique 49

B.IV. Etude du compartiment bactérien 49
B.IV.1. Paramètres quantitatifs 49
B.IV.1.1. Mesure de l'abondance bactérienne 49
B.IV.1.1.a. Principe 49
B.IV.1.1.b. Protocole 50
B.IV.1.2. Estimation de la production bactérienne hétérotrophe 50
B.IV.1.2.a. Principe 50
B.IV.1.2.b. Protocole 50
B.IV.1.3. Estimation de la proportion de bactéries présentant une activité respiratoire 51
B.IV.1.3.a. Choix du marqueur d'activité 51
B.IV.1.3.b. Protocole 52
B.IV.2. Paramètres visant à analyser la composition de la communauté bactérienne 52
B.IV.2.1. Analyse de la structure de la communauté bactérienne par hybridation *in situ* (FISH) 52
B.IV.2.1.a. Principe 52
B.IV.2.1.b. Sondes oligonucléotidiques utilisées dans cette étude 53
B.IV.2.1.c. Hybridation et dénombrement 53
B.IV.2.2. Analyse de la diversité génétique de la communauté bactérienne par électrophorèse sur gel à gradient temporel de température (TTGE) 54
B.IV.2.2.a. Principe 54
B.IV.2.2.b. Extraction de l'ADN génomique (ADNg) 56
B.IV.2.2.c. Amplification par "Polymerase Chain Reaction" (PCR) 57

B.IV.2.2.d. Temporal Temperature Gel Gradient Electrophoresis (TTGE) 58
B.IV.2.2.e. Analyse des profils électrophorétiques 58
B.IV.2.3. Identification des espèces bactériennes par séquençage 59
B.IV.2.3.a. Excision des bandes et ré-amplification de l'ADN 59
B.IV.2.3.b. Construction des banques de clones 60
B.IV.2.3.c. Mini-préparation de l'ADN plasmidique et séquençage 60
B.IV.2.3.d. Analyses phylogénétiques 61

B.V. Traitement statistique **61**

Chapitre C – EVOLUTION DES COMMUNAUTES MICROBIENNES DANS UN COURS D'EAU SOUMIS A L'APPORT REGULIER DE PESTICIDES (JAURON, PUY-DE-DOME). COMPARAISON AU COURS DE DEUX ANNEES SUCCESSIVES (2003 ET 2004). **62**

C.I. Objectifs **62**

C.II. Influence des pesticides les communautés microbiennes au cours de l'année 2003 **63**
C.II.1. Résultats 63
C.II.1.1. Caractéristiques physico-chimiques des trois stations 63
C.II.1.2. Contexte de pollution 65
C.II.1.3. Evolution des concentrations en chlorophylle *a* dans la colonne d'eau 68
C.II.1.4. Evolution des densités phytoplanctoniques 69
C.II.1.5. Evolution de la structure de la communauté phytoplanctonique 70
C.II.1.6. Evolution de la production hétérotrophe et des densités bactériennes 71
C.II.1.7. Evolution de la fraction de bactéries CTC-positives 72
C.II.1.8. Evolution de la structure de la communauté bactérienne 72
C.II.1.9. Evolution de la diversité bactérienne 74
C.II.1.10. Analyse statistique 76
C.II.2. Discussion 78
C.II.2.1. Caractéristiques abiotiques des trois stations d'échantillonnage 78
C.II.2.2. Evolution des communautés microbiennes au niveau de la station référence 79
C.II.2.3. Effets d'une pollution de type chronique en zone agricole sur les communautés microbiennes 81
C.II.2.4. Effets d'une pollution urbaine, ponctuelle et aiguë, sur les communautés microbiennes 85

C.III. Influence des pesticides sur les communautés microbiennes au cours de l'année 2004. Comparaison avec 2003 **89**
C.III.1. Résultats 89

C.III.1.1. Caractéristiques physico-chimiques des trois stations 89
C.III.1.2. Contexte de pollution 91
C.III.1.3. Evolution des biomasses algales planctoniques 93
C.III.1.4. Evolution des biomasses algales périphytiques 94
C.III.1.5. Evolution des densités phytoplanctoniques 95
C.III.1.6. Evolution de la structure de la communauté phytoplanctonique 95
C.III.1.7. Evolution de la production hétérotrophe et des densités bactériennes 96
C.III.1.8. Evolution de la fraction de bactéries CTC-positives 97
C.III.1.9. Evolution de la diversité bactérienne 98
C.III.1.10. Analyse statistique 100
C.III.2. Discussion 102
C.III.2.1. Caractéristiques abiotiques générales des trois stations d'échantillonnage 102
C.III.2.2. Evolution « saisonnière » des communautés algales et bactériennes dans le Jauron 103
C.III.2.3. Impact d'une pollution d'origine agricole sur l'évolution des communautés algales et bactériennes 104
C.III.2.4. Impact d'une pollution d'origine urbaine sur l'évolution des communautés algales et bactériennes 107

Chapitre D – EFFETS INDIVIDUELS DE DEUX HERBICIDES (LE DIURON ET LE GLYPHOSATE) SUR LES COMMUNAUTES MICROBIENNES D'UN COURS D'EAU RECEPTEUR : ETUDES EN MICROCOSMES. 110

D.I. Validation du protocole expérimental 110
D.I.1. Choix du dispositif expérimental 110
D.I.2. Intégration de la fraction algale périphytique dans les études expérimentales 111
D.I.2.1. Objectifs des expériences préliminaires 111
D.I.2.2. Estimation de la variabilité taxonomique algale sur les substrats artificiels colonisés par le périphyton dans la rivière 112
D.I.2.3. Influence de la remise en suspension sur la réponse de la communauté périphytique à la présence du diuron. Comparaison avec le phytoplancton 113
D.I.2.3.a. Protocole expérimental 113
D.I.2.3.b. Résultats et discussion 115
D.I.2.4. Influence de la durée d'immersion des substrats artificiels sur la colonisation et la structure de la communauté périphytique 117
Synthèse des résultats 118

D.II. Caractérisation des effets du diuron 119
D.II.1. Introduction 119
D.II.2. Effets du diuron sur les communautés microbiennes

(expérience menée en 2004) 119
D.II.2.1. Conditions expérimentales 119
D.II.2.2. Résultats 120
D.II.2.2.a. Concentrations en diuron 120
D.II.2.2.b. Paramètres physico-chimiques 120
D.II.2.2.c. Chlorophylle *a* et densité algale 122
D.II.2.2.d. Structure de la communauté algale 122
D.II.2.2.e. Densité bactérienne et production hétérotrophe 124
D.II.2.2.f. Pourcentage de bactéries présentant une forte activité respiratoire (cellules CTC-positives) 124
D.II.2.2.g. Structure de la communauté bactérienne 125
D.II.2.2.h. Diversité bactérienne 126
D.II.2.2.i. Analyse phylogénétique 127
D.II.2.3. Discussion 134
D.II.2.3.a. Caractérisation de l'exposition des communautés microbiennes au diuron 134
D.II.2.3.b. Influence des conditions environnementales initiales sur la réponse des communautés microbiennes 135
D.II.2.3.c. Stimulation différée des communautés microbiennes en absence de diuron 136
D.II.2.3.d. Réponse des communautés microbiennes à la présence de diuron 139
Synthèse des résultats *141*
D.II.3. Effets du diuron sur des communautés microbiennes présentant des caractéristiques initiales différentes (expérience menée en 2003) – Comparaison avec les résultats décrits précédemment 141
D.II.3.1. Conditions expérimentales 141
D.II.3.2. Résultats et discussion 142
D.II.3.2.a. Cinétique du diuron 142
D.II.3.2.b. Contexte environnemental 143
D.II.3.2.c. Réponse de la communauté algale à la présence de diuron 145
D.II.3.2.d. Réponse de la communauté bactérienne à la présence de diuron 148
Synthèse des résultats *153*
D.II.4. Effets du diuron sur les communautés microbiennes en milieu lotique. Hypothèses émises à l'issue des études expérimentales 154
Conclusion *157*

D.III. Caractérisation des effets du glyphosate **157**
D.III.1. Introduction 157
D.III.2. Conditions expérimentales 158
D.III.3. Résultats 158
D.III.3.1. Evolution des concentrations en glyphosate 158
D.III.3.2. Evolution du contexte physico-chimique 159
D.III.3.3. Evolution de la biomasse algale 161

D.III.3.4. Structure initiale de la communauté algale 162
D.III.3.5. Evolution de la structure des communautés algales 162
D.III.3.6. Evolution de la production bactérienne hétérotrophe 164
D.III.3.7. Evolution de la diversité bactérienne 165

D.III.4. Discussion 166
D.III.4.1. Influence des variations saisonnières sur la cinétique du glyphosate 166
D.III.4.2. La réponse des communautés microbiennes printanières 168
D.III.4.3. La réponse des communautés microbiennes estivales 168
Synthèse des résultats *170*

CONCLUSIONS GENERALES ET PERSPECTIVES **171**

REFERENCES BIBIOGRAPHIQUES **181**

VALORISATION DES RESULTATS **201**

Liste des abréviations

LISTE DES ABREVIATIONS

ACP : Analyses en Composantes Principales
ADNg : Acide désoxyribonucléique génomique
AMPA : Aminomethylphosphonic Acid
ANOVA : Analysis of Variance
ARNr : Acide Ribonucléique ribosomal
BLAST : Basic Local Alignment Search Tool
CE_{50} : Concentration Efficace 50%
CFB : *Cytophaga-Flavobacterium-Bacteroides*
CFDA : Carboxyfluorescein Diacetate
Chlo *a* : Chlorophylle *a*
COD : Carbone Organique Dissous
COFRAC : Comité Français d'Accréditation
COP : Carbone Organique Particulaire
CTC : 5-cyano-2,3-ditolyltetrazolium chloride
CY3 : Indo-Carbo-Cyanine
DAPI : 4'-6 diamidino-2-phenylindole
DDASS : Direction Départementale des Affaires Sanitaires et Sociales
DGAL : Direction Générale de l'Alimentation
DGGE : Denaturing Gradient Gel Electrophoresis
DIREN: Direction Régionale de l'Environnement
DRAF : Direction Régionale de l'Agriculture et de la Forêt
EDTA : Ethylene-diamine-tetraacetic Acid
EPSPS : 5-enolpyruvylshikimate-3-phosphate synthase
ESO : Eaux souterraines
ESU : Eaux superficielles
FDA : Fluorescein Diacetate
FISH : Fluorescence In Situ Hybridization
HPLC : High Pressure Liquid Chromatography
IFEN : Institut Français de l'Environnement
INT : (2-(4-iodophenyl)-3-(4-nitrophenyl)-5-phenyltetrazolium chloride)
IPTG : Isopropyl-beta-D-thiogalactopyranoside
ISO : International Standardisation Organisation
LB : Luria Bertani
LBP : Laboratoire de Biologie des Protistes
NCBI : National Center for Biotechnology Information
NF NE : Norme Française Norme Européenne
PBS : Phosphate Buffered Saline
PCR : Polymerase Chain Reaction

PICT : Pollution-Induced Community Tolerance

RNase A : Ribonucléase A

SEHL : Laboratoire Santé-Environnement-Hygiène de Lyon

SIP : Stable Isotope Probing

STEP : Station d'épuration

TAE : Tris-Acétate-EDTA

TCA : Trichloroacetic Acid

TE : Tris-EDTA

TGGE : Temperature Gradient Gel Electrophoresis

TTGE : Temporal Temperature Gradient gel Electrophoresis

UPGMA : Unweighted Pair Group Method with Arithmetic mean

UV : Ultra Violet

VNC/VBNC : Viable Non Culturable Bacteria

Liste des tableaux et figures

LISTE DES TABLEAUX ET FIGURES

Chapitre A – Cadre scientifique

Tableaux

Tableau A-1 : Liste des 33 substances prioritaires notifiées dans la Directive Cadre Européenne sur l'Eau (DCE 2000/60/CE, annexe X).

Tableau A-2 : Réseaux d'observation et de suivi des pesticides dans les eaux continentales en 2002.

Tableau A-3 : Usages et doses d'application des molécules les plus souvent détectées (dans plus de 5% de leurs recherches) en Auvergne entre décembre 1997 et juin 2004.

Tableau A-4 : Teneurs en pesticides (µg l^{-1}) enregistrées dans le Jauron entre février 2000 et décembre 2002.

Tableau A-5 : Teneurs en pesticides (µg l^{-1}) enregistrées sur l'ensemble du réseau Phyt'eauvergne entre juin 2002 et juin 2003.

Tableau A-6 : Exemples de toxicité du glyphosate sous différentes formulations sur des microalgues.

Figures

Figure A-1 : Évolution des quantités de pesticides commercialisées en France entre 1996 et 2002.

Figure A-2 : Schématisation du transfert des pesticides hors des parcelles agricoles.

Figure A-3 : Répartition spatiale des points d'observation des pesticides dans les eaux superficielles en 2002.

Figure A-4 : Principales molécules quantifiées dans les eaux superficielles en 2002, tous réseaux confondus.

Figure A-5 : Qualité des cours d'eau français établie en 2002 à partir des dosages de pesticides effectués sur 624 points de mesure.

Figure A-6 : (a) Zonation d'un hydrosystème fluvial et (b) exemple d'ordination d'un cours d'eau selon le système proposé par Strahler (1957).

Figure A-7 : Schéma conceptuel du « continuum fluvial ».

Figure A-8 : Effets directs et indirects susceptibles de découler de la présence d'herbicides dans un milieu aquatique.

Figure A-9 : Schéma conceptuel du rôle du périphyton et de l'épiphyton dans le flux des nutriments.

Figure A-10 : Principales méthodologies utilisées en écotoxicologie aquatique.

Figure A-11 : Répartition par usage (A) et par pourcentage de détection (B) des 78 molécules trouvées dans les eaux superficielles du réseau Phyt'eauvergne entre décembre 1997 et juin 2004.

Figure A-12 : Localisation et caractéristiques du bassin versant du Jauron.

Figure A-13 : Structure du diuron.

Figure A-14 : Structure du glyphosate.

Figure A-15 : Evolution de l'utilisation estimée d'herbicides dans l'agriculture de 9 états de l'Ouest des Etats-Unis.

Chapitre B – Matériel et méthodes

Tableaux

Tableau B-1 : Calendrier des échantillonnages effectués pour les campagnes *in situ.*

Tableau B-2 : Sondes oligonucléotidiques utilisées pour l'hybridation *in situ.*

Tableau B-3 : Composition des solutions d'hybridation (A) et des solutions de lavage (B) pour l'hybridation avec chacune des sondes.

Tableau B-4 : Composition des solutions P1, P2 et P3 utilisées pour la mini-préparation de l'ADN plasmidique.

Figures

Figure B-1 : Localisation des stations de prélèvements choisies lors des campagnes *in situ.*

Figure B-2 : Photographie du dispositif expérimental utilisé pour les études en microcosmes.

Figure B-3 : Spectre lumineux des néons utilisés dans le dispositif expérimental.

Figure B-4 : Répartition des stations hydrométriques en service dans la région Auvergne (A) et vue de l'intérieur d'un coffre d'enregistrement et de transmission des données (B).

Figure B-5 : Carte de variabilité de la séquence du gène codant pour l'ARNr 16S chez *E. coli* et localisation des régions variables V1 à V9.

Figure B-6 : Schématisation du principe de l'électrophorèse sur gel à gradient temporel de température.

Figure B-7 : Exemples de possibilités offertes par les méthodes d'électrophorèse sur gel dénaturant dans l'étude de la structure des communautés bactériennes.

Chapitre C – Evolution des communautés microbiennes dans un cours d'eau soumis à l'apport régulier de pesticides (Jauron, Puy-de-Dôme). Comparaison au cours de deux années successives (2003 et 2004)

Tableaux

Tableau C-1 : Evolution des concentrations en pesticides (µg l^{-1}) dans la colonne d'eau du Jauron aux stations JAU1, JAU3 et JAU4 au cours de l'année 2003.

Tableau C-2 : Evolution des concentrations en pesticides (µg l^{-1}) dans la colonne d'eau du Jauron aux stations JAU1, JAU3 et JAU4 au cours de l'année 2004.

Figures

Figure C-1 : Relation entre la surface du bassin versant et les concentrations maximales en insecticides détectées dans des eaux de rivière.

Figure C-2 : Evolution moyenne (et écarts-types) de la température de l'eau (°C), de la concentration en oxygène dissous (mg l^{-1}) et du pH aux stations JAU1, JAU3 et JAU4 en 2003.

Figure C-3 : Evolution journalière du débit (▬ ; m^3 s^{-1}) à l'exutoire du bassin versant (JAU1) et de la pluviométrie (— ; mm) à la station météo France de Joze-bourg.

Figure C-4 : Evolution mensuelle des concentrations (mg l^{-1}) en N-NO_3 (A), N-NO_2 (B), N-NH_4 (C) et P-PO4 (D) aux stations JAU1 (■), JAU3 (○) et JAU4 (▲) en 2003.

Figure C-5 : Evolution mensuelle des concentrations (µg l^{-1}) en pesticides aux stations JAU1, JAU3 et JAU4 en 2003.

Figure C-6 : Evolution mensuelle des concentrations (µg l^{-1}) en chlorophylle *a* aux stations JAU1 (■), JAU3 (○) et JAU4 (▲) en 2003.

Figure C-7 : Evolution mensuelle des densités phytoplanctoniques (cell ml^{-1}) aux stations JAU1 (■), JAU3 (○) et JAU4 (▲) en 2003.

Figure C-8 : Abondance relative des différents genres phytoplanctoniques détectés mensuellement aux stations JAU1, JAU3 et JAU4 en 2003.

Figure C-9 : Evolution mensuelle de la production bactérienne hétérotrophe (x 10^4 cell ml^{-1} h^{-1}, A) et des densités bactériennes (x 10^6 cell ml^{-1}, B) aux stations JAU1 (■), JAU3 (○) et JAU4 (▲) en 2003.

Figure C-10: Evolution mensuelle du pourcentage de bactéries CTC-positives aux stations JAU1 (■), JAU3 (○) et JAU4 (▲) en 2003.

Figure C-11: Evolution mensuelle du pourcentage de bactéries ciblées par les sondes CF319a (CF), ALF1b (ALPHA), BET42a (BETA) et GAM42a (GAMMA) aux stations JAU1 (■), JAU3 (○) et JAU4 (▲) en 2003.

Figure C-12 : Evolution de la diversité bactérienne aux stations JAU1 (A), JAU3 (B) et JAU4 (C) en 2003, appréciée par une analyse « présence/absence » des profils TTGE selon la méthode DICE/UPGMA.

Figure C-13 : Analyse en composantes principales des données abiotiques et microbiennes récoltées aux stations JAU1 (A), JAU3 (B) et JAU4 (C) entre février et décembre 2003.

Figure C-14 : Evolution moyenne (et écarts-types) de la température de l'eau (°C), de la concentration en oxygène dissous (mg l^{-1}) et du pH aux stations JAU1, JAU3 et JAU4 en 2004.

Figure C-15 : Evolution journalière du débit (▬ ; m^3 s^{-1}) à l'exutoire du bassin versant (JAU1) et de la pluviométrie (— ; mm) à la station météo France de Joze-bourg.

Figure C-16 : Evolution mensuelle des concentrations (mg l^{-1}) en N-NO_3 (A), N-NO_2 (B), N-NH_4 (C) et P-PO4 (D) aux stations JAU1 (■), JAU3 (○) et JAU4 (▲) en 2004.

Figure C-17 : Evolution mensuelle des concentrations (µg l^{-1}) en pesticides aux stations JAU1 JAU3 et JAU4 en 2004.

Figure C-18 : Evolution mensuelle des concentrations (µg l^{-1}) en chlorophylle *a* planctonique aux stations JAU1 (■), JAU3 (○) et JAU4 (▲) en 2004.

Figure C-19 : Evolution mensuelle des concentrations (µg l^{-1}) en chlorophylle *a* périphytique aux stations JAU1 (■), JAU3 (○) et JAU4 (▲) en 2004.

Figure C-20 : Evolution mensuelle des densités phytoplanctoniques (cell ml^{-1}) aux stations JAU1 (■), JAU3 (○) et JAU4 (▲) en 2004.

Figure C-21 : Abondance relative des différents genres phytoplanctoniques détectés mensuellement aux stations JAU1, JAU3 et JAU4 en 2004.

Figure C-22 : Evolution mensuelle de la production bactérienne hétérotrophe (x 10^4 cell ml^{-1} h^{-1}, A) et des densités bactériennes (x 10^6 cell ml^{-1}, B) aux stations JAU1 (■), JAU3 (○) et JAU4 (▲) en 2004.

Figure C-23 : Evolution mensuelle du pourcentage de bactéries CTC-positives aux stations JAU1 (■), JAU3 (○) et JAU4 (▲) en 2004.

Figure C-24 : Evolution de la diversité bactérienne aux stations JAU1 (A), JAU3 (B) et JAU4 (C) en 2004, appréciée par une analyse « présence/absence » des profils TTGE selon la méthode DICE/UPGMA.

Figure C-25 : Analyse en composantes principales des données abiotiques et microbiennes récoltées aux stations JAU1 (A), JAU3 (B) et JAU4 (C) entre février et décembre 2004.

Chapitre D – Effets individuels de deux herbicides (le diuron et le glyphosate) sur les communautés microbiennes d'un cours d'eau récepteur : études en microcosmes

Tableaux

Tableau D-1 : Résultat de l'analyse de variance à un facteur utilisée pour comparer la diversité taxonomique entre les quatre lames.

Tableau D-2 : Moyennes (et intervalles) des paramètres abiotiques mesurés dans les trois types de microcosmes pendant les 10 jours d'expérience.

Tableau D-3 : Evolution des concentrations en diuron (µg l^{-1}) dans les trois microcosmes contaminés (D1, D2, D3).

Tableau D-4 : Bilan et rendement des différentes étapes entre l'excision des bandes et l'analyse des séquences.

Tableau D-5 : Résultats de l'analyse phylogénétique effectuée à l'aide du logiciel d'alignement BLASTn.

Tableau D-6 : Détection d'herbicides de la famille des phénylurées dans le Jauron au cours des six mois précédant les études expérimentales de 2003 (A) et 2004 (B).

Tableau D-7 : Conditions expérimentales utilisées pour apprécier les effets du glyphosate sur les communautés microbiennes prélevées en mars 2003, avril 2004 et août 2004.

Figures

Figure D-1 : Comparaison de la diversité taxonomique sur quatre lames (a, b, c, d) prélevées à JAU1 après deux semaines d'immersion et représentation des valeurs moyennes et des écarts-types obtenus pour l'ensemble des lames.

Figure D-2 : Dispositif expérimental utilisé pour définir la stratégie à adopter en vue de la mise en place des études expérimentales en microcosmes.

Figure D-3 : Densité algale et composition taxonomique lors de la mise en eau des trois types de microcosmes.

Figure D-4 : Evolution de la concentration en chlorophylle *a* (A), de la densité algale (B) et de la composition taxonomique (C) dans les trois types de microcosmes.

Figure D-5 : Comparaison de la densité et de la diversité taxonomique moyenne sur quatre lames prélevées après deux semaines d'immersion (A) et deux lames prélevées après trois semaines d'immersion (B).

Figure D-6 : Evolution moyenne (et écarts-types) du pH (A), du pourcentage de saturation en oxygène (B) et des concentrations (mg l^{-1}) en N-NO_3^- (C), N-NO_2^- (D), N-NH_4^+ (E) et P-PO_4^{3-} (F) dans les microcosmes témoins (○) et contaminés (■).

Figure D-7 : Evolution des concentrations minimales du carbone organique dissous (mg l^{-1}) dans les microcosmes témoins (○) et contaminés (■).

Figure D-8 : Evolution moyenne (et écarts-types) des concentrations (µg l^{-1}) en chlorophylle *a* (A) et de la densité algale (B) dans les microcosmes témoins (○) et contaminés (■).

Figure D-9 : Evolution de la composition taxonomique algale, représentée par l'abondance relative des genres détectés, dans les trois microcosmes témoins (T1, T2 et T3) et contaminés (D1, D2 et D3).

Figure D-10 : Evolution moyenne (et écarts-types) de la densité bactérienne (10^6 cell. ml^{-1}) (A) et de la production bactérienne hétérotrophe (10^4 cell. ml^{-1} h^{-1}) (B) dans les microcosmes témoins (○) et contaminés (■).

Figure D-11 : Evolution moyenne (et écarts-types) du pourcentage de bactéries CTC-positives dans les microcosmes témoins (○) et contaminés (■).

Figure D-12 : Evolution moyenne (et écarts-types) du pourcentage de bactéries appartenant aux principaux groupes phylogénétiques appréhendée par la méthode FISH à partir des sondes ALF1b (A), GAM42a (B), BET42a (C) et CF319a (D) dans les microcosmes témoins (○) et contaminés (■).

Figure D-13 : (A) Evolution des profils obtenus par TTGE dans les microcosmes témoins (T) et contaminés (D) à J0 (0), après 8 heures (8H) puis de J1 à J21 ; (B) dendrogramme calculé par la méthode DICE-UPGMA à partir du profil TTGE en tenant compte de l'intensité relative de chacune des bandes.

Figure D-14 : Choix des bandes d'intérêt excisées pour l'analyse phylogénétique.

Figure D-15 : Positionnement dans l'arbre phylogénétique des 9 clones issus de la bande D7 (4 clones D7a, 4 clones D7b et 1 clone D7c).

Figure D-16 : Positionnement dans l'arbre phylogénétique des différents groupes de clones correspondant aux 14 bandes excisées.

Figure D-17 : Visualisation de bactéries CTC-positives sur une cellule algale du genre *Navicula* (A) et sur un amas de débris organiques (B).

Figure D-18 : Evolution des concentrations en diuron (µg l^{-1}) dans les deux microcosmes contaminés : D1 (●) et D2 (▲).

Figure D-19 : Cinétique du diuron dans les deux microcosmes contaminés, D1 (●) et D2 (▲), entre J3 et J24.

Figure D-20 : Evolution moyenne (et écarts-types) du pH (A), du pourcentage de saturation en oxygène (B) et des concentrations (mg l^{-1}) en N-NO_3^- (C), N-NO_2^- (D), N-NH_4^+ (E) et P-PO_4^{3-} (F) dans les microcosmes témoins (○) et contaminés (■).

Figure D-21 : Evolution moyenne (et écarts-types) des concentrations (µg l^{-1}) en chlorophylle a (A) et de la densité algale (B) dans les microcosmes témoins (○) et contaminés (■).

Figure D-22 : Evolution moyenne (et écarts-types) de l'abondance (cell. ml^{-1}) des espèces appartenant aux genres *Navicula* (A), *Nitzschia* (B) et *Gomphonema* (C) dans les microcosmes témoins (○) et contaminés (■).

Figure D-23 : Evolution moyenne (et écarts-types) de la production bactérienne hétérotrophe (10^4 cell. ml^{-1} h^{-1}) (A), de la densité bactérienne (10^6 cell. ml^{-1}) (B) et du pourcentage de bactéries CTC-positives (C) dans les microcosmes témoins (○) et contaminés (■).

Figure D-24 : Evolution moyenne (et écarts-types) du pourcentage de bactéries appartenant aux principaux groupes phylogénétiques ciblés par la méthode FISH à partir des sondes ALF1b (A), GAM42a (B), BET42a (C) et CF319a (D) dans les microcosmes témoins (○) et contaminés (■).

Figure D-25 : Evolution des profils obtenus par TTGE dans les microcosmes témoins (T) et contaminés (D) entre J0 et J24.

Figure D-26 : Localisation des bandes communes aux deux expériences (2003 et 2004).

Figure D-27: Positionnement dans l'arbre phylogénétique des différents clones issus des bandes excisées en 2003 (préfixe 2003) et comparaison avec les résultats obtenus en 2004 (préfixe JAURON).

Figure D-28 : Structure du linuron.

Figure D-29 : Evolution moyenne (et écarts-types) de la concentration en glyphosate (µg l^{-1}) lors des études menées en mars 2003 (A), avril 2004 (B) et août 2004 (C).

Figure D-30 : Evolution moyenne (et écarts-types) du pH (1), du pourcentage de saturation en oxygène (2), des concentrations (mg l^{-1}) en N- NO_3 (3), N-NO_2 (4), N-NH_4 (5) et P-PO_4 (6) lors des études menées en mars 2003 (A), avril 2004 (B) et août 2004 (C) dans les microcosmes témoins (○) et contaminés (■).

Figure D-31 : Evolution moyenne (et écarts-types) de la concentration en chlorophylle *a* (µg l^{-1}) lors des études menées en mars 2003 (A), avril 2004 (B) et août 2004 (C) dans les microcosmes témoins (○) et contaminés (■).

Figure D-32 : Densités algales initiales (cell. ml^{-1}) et structure de la communauté lors des études menées en mars 2003 (A), avril 2004 (B) et août 2004 (C).

Figure D-33 : Evolution moyenne de la structure de la communauté algale lors de l'étude menée en mars 2003 dans les microcosmes témoins (T) et contaminés au glyphosate (G).

Figure D-34 : Evolution de la structure de la communauté algale lors de l'étude menée en août 2004 dans les trois microcosmes témoins (T1, T2, T3) et, en moyenne, dans les microcosmes contaminés au glyphosate (G).

Figure D-35 : Evolution moyenne (et écarts-types) de la production bactérienne hétérotrophe (10^4 cell. ml^{-1} h^{-1}) lors des études menées en mars 2003 (A), avril 2004 (B) et août 2004 (C).

Figure D-36 : (A) Evolution des profils obtenus par TTGE dans les microcosmes témoins (T) et contaminés (G) entre J0 et J21 en août 2004 ; (B) dendrogramme calculé par la méthode DICE-UPGMA à partir du profil TTGE d'après le critère présence/absence.

Introduction générale
et
Objectifs de l'étude

INTRODUCTION GENERALE ET OBJECTIFS DE L'ETUDE

Depuis plusieurs décennies, la communauté scientifique a pris conscience des dangers de l'emploi massif des pesticides, tant pour la santé humaine que pour l'environnement. La caractérisation des risques engendrés par ces polluants est donc devenue un « enjeu écotoxicologique » majeur.

En tant qu'écosystèmes récepteurs, suite au transfert des molécules, les milieux aquatiques, et notamment les systèmes lotiques situés dans des zones d'utilisation intensive de ces substances, sont particulièrement vulnérables. De nombreuses études ont ainsi mis en évidence la forte contamination des cours d'eau par les pesticides au cours des dernières années, notamment sur le territoire français (Garmouna *et al.*, 1997 ; Blanchoud *et al.*, 2004 ; IFEN, 2004 ; Phyt'eauvergne, 2004 ; Comoretto & Chiron, 2005). Ces analyses soulignent la nette prédominance des herbicides dans le panorama général de contamination (IFEN, 2004). Cette tendance très marquée est identique au niveau de la région Auvergne où les herbicides sont responsables de plus de 90% de la pollution totale en pesticides détectée dans ce secteur géographique au cours de la dernière décennie (Phyt'eauvergne, 2004).

De par leur forte homologie avec les végétaux directement ciblés par les herbicides, les producteurs primaires aquatiques sont particulièrement exposés à la toxicité de ces polluants. Parmi ces organismes autotrophes, les microorganismes photosynthétiques, qu'ils soient libres ou fixés, jouent un rôle primordial dans le fonctionnement des écosystèmes lotiques, en assurant notamment une part prépondérante de la production primaire (Gustavson *et al.*, 2003). En milieu lotique, les communautés microalgales et bactériennes présentent souvent une co-variation assez forte (Gao *et al.*, 2004), attribuable en partie à l'utilisation par les bactéries de la matière organique d'origine algale (Baines and Pace, 1991; Raymond and Bauer, 2001), à la capacité des bactéries à coloniser les cellules autotrophes (Rier and Stevenson, 2002) ou encore à la compétition entre ces deux communautés pour l'accès aux ressources nutritives (Caron, 1999 ; DeLorenzo *et al.*, 1999). Un impact important des pesticides sur les microalgues peut donc engendrer indirectement des modifications significatives au sein de la communauté bactérienne. Dans une moindre mesure, il est également envisageable que certains polluants puissent affecter directement quelques espèces bactériennes et modifier ainsi la diversité au sein de la population comme cela est parfois observé dans des écosystèmes terrestres (Johnsen *et al.*, 2001). Ces effets directs et/ou indirects peuvent avoir des répercussions importantes sur le fonctionnement de l'écosystème,

les bactéries hétérotrophes jouant un rôle primordial au niveau des flux nutritifs, en assurant la majorité du recyclage de la matière organique (Cole *et al.*, 1988).

La perturbation par les pesticides des communautés algales et bactériennes peut donc engendrer un dysfonctionnement de la boucle microbienne et se répercuter ainsi par cascade trophique sur les communautés biologiques des maillons supérieurs (Brock *et al.*, 2000). L'évaluation de l'impact des pesticides, et particulièrement des herbicides, sur ces deux communautés microbiennes dans les milieux lotiques représente de ce fait un enjeu environnemental de taille. Jusqu'à présent, les effets de ces polluants sur les compartiments microbiens ont été majoritairement caractérisés à partir de tests monospécifiques ou de travaux menés en microcosmes, à des niveaux d'intégration plus ou moins importants (DeLorenzo *et al*., 2001). Même si ces approches représentent des outils indispensables pour apprécier la toxicité des polluants, Schulz (2004) a récemment souligné le déficit important du nombre d'études réalisées en milieu naturel.

Ce déficit nous a donc conduit à développer une approche écotoxicologique *in situ* en choisissant comme site d'étude une rivière située en Auvergne, le Jauron, qui présente des propriétés particulièrement favorables à cette problématique. Milieu récepteur d'un bassin versant de taille modérée (environ 12000 hectares), cette rivière possède en effet, en amont, une portion faiblement contaminée et, en aval, des zones de pollution urbaine et agricole bien distinctes. Nous avons ainsi étudié mensuellement l'évolution des communautés microbiennes dans ce cours d'eau, en fonction des différents paramètres environnementaux, notamment le contexte de pollution par les pesticides. Nous avons comparé les résultats obtenus pendant deux années consécutives à trois stations d'échantillonnages présentant un niveau de contamination différent : (1) une station localisée en amont et qui collecte des eaux très faiblement polluées par des pesticides, (2) une station située en aval du rejet d'une station d'épuration, réceptrice de la pollution urbaine, et (3) une station située à l'exutoire du bassin versant dans une région de cultures intensives et assujettie majoritairement à une pollution d'origine agricole.

Malgré la nécessité évidente de développer des approches écotoxicologiques en milieu naturel, l'utilisation de systèmes expérimentaux simplifiés reste un outil de choix pour apprécier les effets des polluants à un niveau de contamination choisi et selon des paramètres contrôlés. Pour appuyer nos observations réalisées *in situ*, nous avons donc couplé cette étude à des approches en microcosmes visant à appréhender les effets individuels des molécules les plus détectées jusqu'ici dans le Jauron sur les communautés algales et bactériennes autochtones. Compte tenu des résultats du diagnostic chimique effectué sur le Jauron depuis

plusieurs années par un réseau de surveillance régional (Phyt'eauvergne, 2004), nous avons choisi d'appréhender expérimentalement l'impact du diuron, du glyphosate et de l'alachlore. Pour apprécier l'influence des conditions initiales et comparer la réponse des communautés microbiennes à une même molécule en fonction de paramètres environnementaux variables, trois expériences ont été menées avec le glyphosate et deux ont été réalisées avec le diuron et l'alachlore. Les analyses concernant les effets de cette dernière molécule n'ayant pas pu être menées à leur terme pendant le temps imparti pour la réalisation de cette thèse, les premiers résultats acquis, difficilement interprétables en l'état, ne seront pas présentés dans ce manuscrit.

Pour ces deux types d'approches complémentaires, l'impact des molécules sur les algues planctoniques et périphytiques a été appréhendé au niveau de la biomasse, de la densité cellulaire et de la structure générale des communautés par identification taxonomique. La réponse du compartiment bactérien a été appréciée à partir de paramètres quantitatifs comme la mesure de la densité cellulaire, l'estimation de la production hétérotrophe et l'évaluation de l'activité respiratoire, mais aussi qualitatifs, à l'aide de techniques issues de la biologie moléculaire, afin de percevoir les effets des pesticides sur la structure et la diversité génétique de cette communauté.

Ce mémoire s'organise en quatre chapitres principaux :

♦ **LE CHAPITRE A** décrit le cadre scientifique dans lequel s'inscrit cette thèse, faisant une synthèse concernant la contamination des cours d'eau français par les pesticides et relatant précisément le cheminement intellectuel ayant conduit à l'élaboration de ce travail (choix des compartiments biologiques étudiés, types d'approches utilisées, choix du site d'étude, molécules retenues pour les études expérimentales en microcosmes…) ;

♦ **LE CHAPITRE B** détaille les stratégies d'échantillonnages, les dispositifs expérimentaux adoptés, ainsi que les protocoles analytiques utilisés ;

♦ **LE CHAPITRE C** présente les résultats obtenus au cours des deux suivis annuels effectués dans le Jauron et discute des principales hypothèses émises à l'issue de cette étude *in situ* ;

♦ **LE CHAPITRE D** est consacré aux effets du diuron et du glyphosate sur les communautés microbiennes, appréhendés à l'aide d'une approche expérimentale en microcosmes ;

♦ **LA CONCLUSION GENERALE ET LES PERSPECTIVES** font l'objet d'une synthèse des principaux résultats acquis à partir des deux types d'approches. Quelques perspectives de recherche découlant de ce travail sont apportées en conclusion.

CHAPITRE A

Cadre scientifique

Chapitre A – CADRE SCIENTIFIQUE

A.I. Les pesticides

A.I.1. Rôle et utilisation

Le terme pesticide, couramment employé dans le langage commun et la littérature scientifique, est un anglicisme, issu du latin *pestis* (épidémie, fléau) et *coedere* (tuer), qui désigne une substance destinée à lutter contre des nuisances biologiques. Les pesticides, qu'ils soient naturels ou de synthèse, sont donc des produits biologiquement actifs présentant une toxicité pour un large spectre d'organismes considérés comme « nuisibles » (Multigner *et al.*, 2005).

Les pesticides sont majoritairement utilisés en agriculture (environ 90% des usages ; Boulet, 2005), mais peuvent également être employées dans d'autres secteurs professionnels (entretien de la voirie, des voies ferrées, des sites industriels, des parcs et jardins…) ou être destinés à un usage domestique ou thérapeutique.

A.I.2. Classification des pesticides

Les pesticides sont généralement classés selon la nature des organismes « nuisibles » ciblés. D'après Ramade (1998), on distingue ainsi :

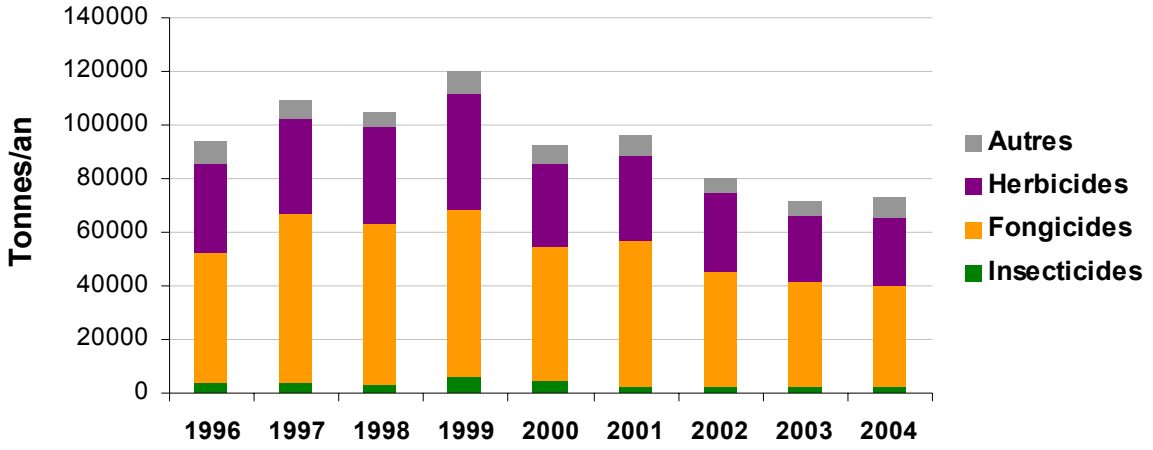
- les insecticides, utilisés contre les insectes « nuisibles »,
- les fongicides utilisés contre les champignons phytopathogènes ou vecteurs de mycoses animales ou humaines,
- les herbicides qui détruisent les plantes adventices des cultures et, de façon plus générale, toute végétation jugée indésirable,
- les acaricides qui détruisent les acariens,
- les nématicides employés contre les nématodes phytoparasites,
- les molluscicides ou hélicides qui détruisent les gastéropodes,
- les rodenticides qui tuent les rongeurs,
- les corvicides destinés à éliminer les oiseaux ravageurs.

Les pesticides peuvent également être classés en fonction de la famille chimique à laquelle appartiennent les substances actives. Compte tenu du nombre considérable de ces produits (près de 800 matières actives différentes dans plus de 6000 préparations commerciales ; IFEN, 2004), une grande diversité de familles chimiques est rencontrée. Au sein de ces dernières, les sulfonylurés, les organophosphorés, les carbamates, les triazines, les urées substituées et les phénols sont parmi les plus représentées.

A.I.3. Utilisation des pesticides en France

L'évolution des tonnages de substances actives commercialisées en France montre un tassement des ventes au cours de ces dernières années **(Fig. A-1)**. En 1999, celles-ci étaient de l'ordre de 120000 tonnes (répartition de vente : 52% pour les fongicides, 36% pour les herbicides et 5% pour les insecticides) contre moins 80000 tonnes à partir de 2002 (IFEN, 2004 et 2006). Cette tendance à la baisse résulte du développement de nouvelles substances s'utilisant à de plus faibles doses, mais également d'un emploi de plus en plus raisonné de ces composés, notamment en agriculture.

Figure A-1 : Évolution des quantités de pesticides commercialisées en France entre 1996 et 2004, (IFEN, 2004, 2006 ; données de l'Union des Industries de la Protection des Plantes, http://www.uipp.org/).



A.II. La pollution des eaux de surface par les pesticides

A.II.1. Application et transfert vers les milieux aquatiques

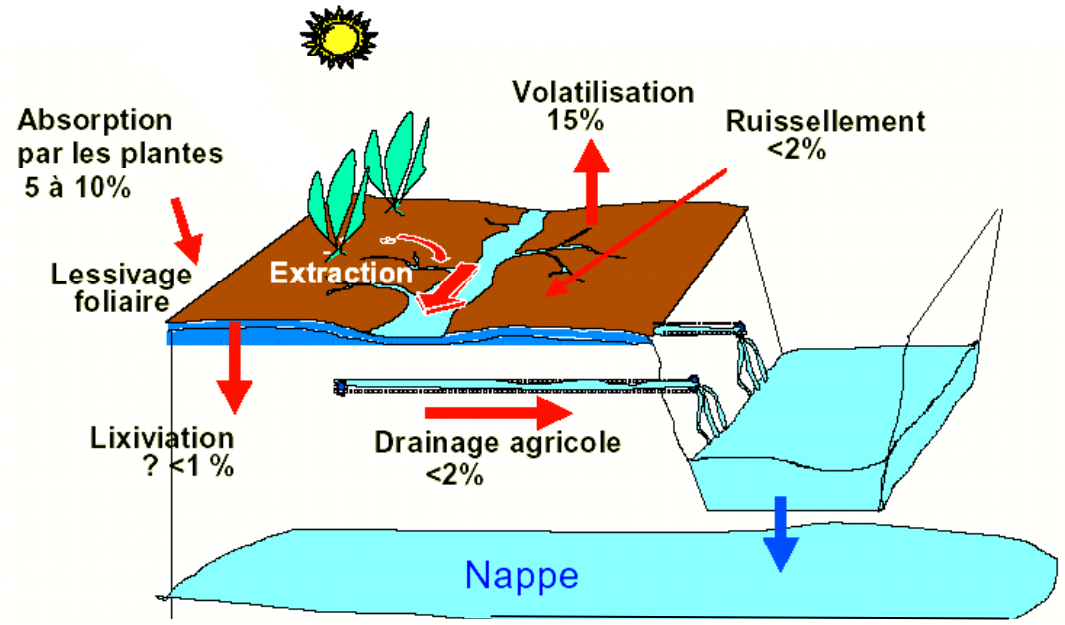
Les pesticides, utilisés comme produits phytosanitaires, peuvent être appliqués suivant deux méthodes, en fonction du type de formulation utilisée:

- soit par pulvérisation entraînant un recouvrement des parties aériennes des plantes et du sol (formulations sous forme liquide),
- soit par incorporation dans le sol (formulations sous forme de granulés).

Le transfert des produits phytosanitaires dans l'environnement dépend du type d'épandage pratiqué, des propriétés intrinsèques des produits épandus (solubilité, volatilité, polarité…), des doses utilisées, ainsi que des conditions pédoclimatiques caractérisant le milieu où ils sont introduits. Il est régi par divers mécanismes biotiques et abiotiques qui interfèrent, se conjuguent ou s'opposent.

Dès qu'ils ont atteint le sol ou la plante, les pesticides commencent à se dissiper selon deux processus majeurs : la dégradation (biotique et/ou abiotique pouvant conduire jusqu'à la minéralisation) et la dispersion. Les substances actives non dégradées ou leurs éventuels métabolites peuvent alors être absorbés par les plantes ou les organismes du sol, se retrouver piégés par rétention, se volatiliser, ou atteindre les eaux de surface ou souterraines par ruissellement et/ou lessivage (Van der Werf, 1996). Les principales voies de transfert des pesticides vers les milieux aquatiques et l'estimation de la part attribuée à chacune d'entre elles, sont représentées sur la **Figure A-2**.

Figure A-2 : Schématisation du transfert des pesticides hors des parcelles agricoles (Garon-Boucher Margoum, 2003 d'après Voltz, 2001).



A.II.2. Approche réglementaire

Les normes françaises relatives aux teneurs en produits phytosanitaires dans les milieux aquatiques s'appuient sur la Directive Cadre Européenne sur l'eau (DCE 2000/60/CE) du 23 octobre 2000. Cette directive constitue le cadre réglementaire de la politique de l'eau au niveau communautaire. Elle concerne tous les milieux aquatiques et tient compte de l'état biologique et de l'état chimique de ces écosystèmes.

La stratégie de lutte contre la pollution chimique des eaux (article 16) se concentre majoritairement autour de 33 substances (ou groupe de substances) définies par la décision n° 2455/2001/CE du 20 novembre 2001 comme « dangereuses prioritaires » ou « prioritaires ». Dans cette liste **(Tableau A-1)**, 6 herbicides (alachlore, atrazine, diuron, isoproturon, simazine, trifluraline) et 4 insecticides (chlorfenvinphos, chlorpyrifos, endosulfan, lindane) sont retrouvés.

Tableau A-1 : Liste des 33 substances prioritaires notifiées dans la Directive Cadre Européenne sur l'Eau (DCE 2000/60/CE, annexe X).

Famille Chimique	*Substances*	*Usages*
Métaux	Cadmium Mercure Nickel Plomb	Alliages, pigments, batteries, colorants, équipements électriques, peintures, amalgames dentaires, thermomètres, électrolyse des chlorures alcalins, acier inoxydable, tuyaux, additifs à l'essence…
Solvants chlorés	Chloroforme Dichloroéthane Dichlorométhane	Intermédiaire de synthèse, production de chlorure de vinyle, solvant, aérosol, agent d'expansion des mousses.
Hydrocarbures aromatiques	Benzène Naphtalène Anthracène Fluoranthène 5 autres HAP	Intermédiaire de la synthèse chimique, conservateur du bois, sous produits de la combustion
Chlorobenzène	Trichlorobenzène Pentachlorobenzène Hexachlorobenzène	Intermédiaires chimiques, solvants
Biocides	Pentachlorophénol TBT	
Pesticides	Alachlore Atrazine Diuron Isoproturon Simazine Trifluraline Chlorfenvinphos Chlorpyrifos Endosulfan Lindane	Herbicides, insecticides
Divers	Diphénylétherbromés Chloro-alcanes DEHP phtalate Hexachlorobutadiène Nonylphénols	Retardateurs de flamme, fluides de travail des métaux, plastifiant du PVC, production involontaire dans les processus industriels, intermédiaires dans la fabrication des détergents

Cette liste a été établie suivant une évaluation des risques présentés par ces substances pour ou *via* l'environnement aquatique à partir de trois critères principaux :

- les données concernant le danger intrinsèque de la molécule et, en particulier, son écotoxicité aquatique et sa toxicité pour l'Homme,
- les données de surveillance attestant une contamination étendue de l'environnement,
- d'autres facteurs pouvant indiquer la possibilité d'une contamination étendue de l'environnement (volume de production, volume et mode d'utilisation…).

La directive européenne prévoit des mesures visant à réduire progressivement les rejets, les émissions et les pertes des substances prioritaires et la suppression progressive des substances dangereuses prioritaires. Par exemple, l'utilisation du lindane est ainsi interdite depuis 1998 tandis que l'atrazine n'est plus distribué depuis le 30 septembre 2002 et son utilisation est interdite depuis le 30 septembre 2003.

Concernant l'eau destinée à la consommation, la norme française en vigueur est issue du décret 2001-1220 du 20 décembre 2001 et définit les limites suivantes :

- pour l'eau potable : 0,1 µg l^{-1} par pesticide et 0,5 µg l^{-1} pour l'ensemble des molécules,
- pour les eaux brutes utilisées pour produire de l'eau potable : 2 µg l^{-1} par pesticide et 5 µg l^{-1} pour l'ensemble des molécules.

A.II.3. La contamination des eaux superficielles françaises.

Depuis 1998, l'Institut Français de l'Environnement (IFEN) est chargé d'établir un bilan annuel de la contamination par les pesticides des eaux superficielles (cours d'eau et plans d'eau) et souterraines françaises.

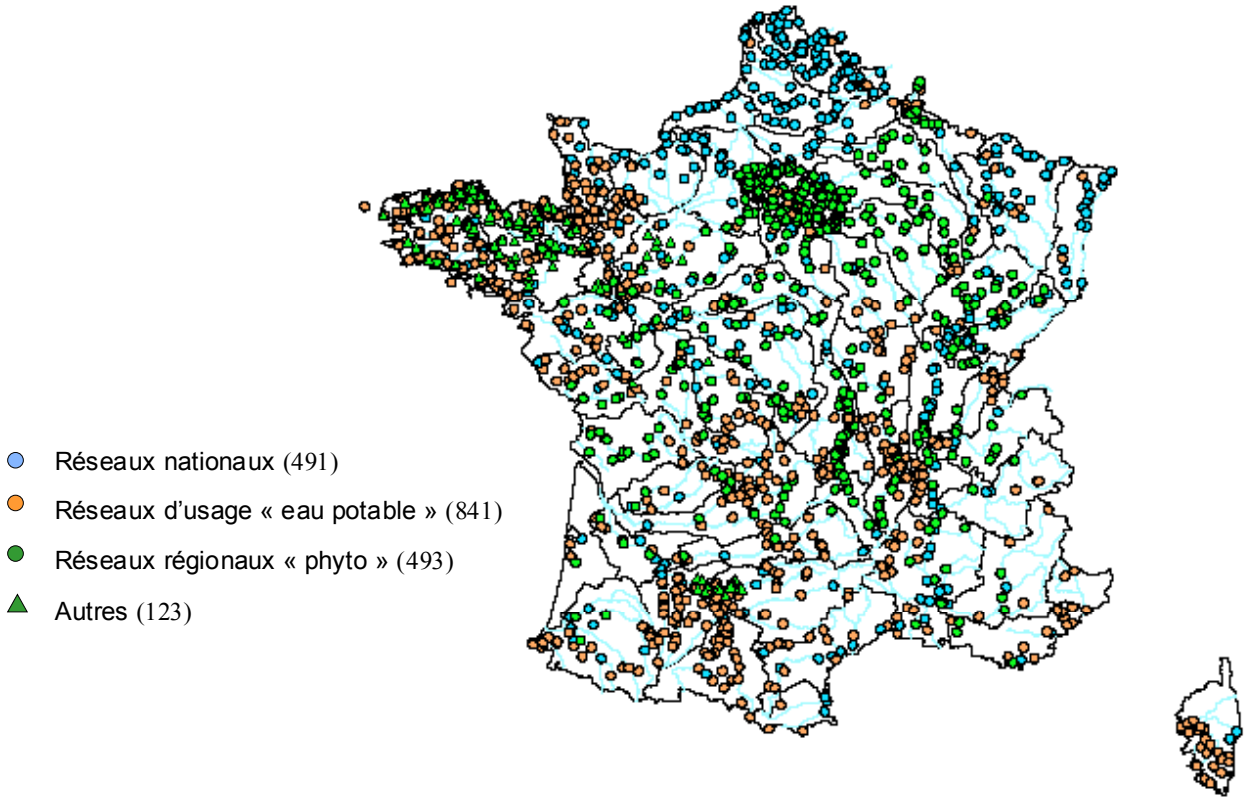
Tableau A-2 : Réseaux d'observation et de suivi des pesticides dans les eaux continentales en 2002 (IFEN, 2004).

	Réseaux nationaux de connaissance générale	Réseaux d'usage « eau potable »	Réseaux locaux
Emplacements des points d'observation	Eau de surface : points situés principalement sur les grandes rivières Eau souterraine : points repartis sur l'ensemble des grands types d'aquifères selon une densité fixée	Situés à l'endroit du captage où est prélevée la ressource destinée à la consommation. Les captages fortement contaminés sont exclus des sources d'approvisionnement et par conséquent de l'échantillon.	Généralement situés où la contamination est susceptible d'être importante compte tenu de la pression polluante et de la vulnérabilité des milieux.
Fréquences de prélèvements	Eau de surface : de 6 à 17 prélèvements par station et par an Eau souterraine : de 2 à 4 prélèvements par station et par an	La fréquence dépend de la population desservie par le captage échantillonné et est augmentée en cas de contamination des ressources. Eau de surface : de 3 à 17 prélèvements par station et par an Eau souterraine : de 2 à 4 prélèvements par an	La fréquence est resserrée autour des périodes d'application des produits. Eau de surface : de 2 à 4 prélèvements par station et par an. Eau souterraine : de 2 à 8 prélèvements par an.
Source de données	Agences de l'Eau DIREN	a) DDASS b) Producteurs d'eau (Générale des eaux, Lyonnaise des eaux)	a) Groupes régionaux « phyto » (Agences de l'Eau, DIREN, DDASS, DRAF) b) Réseaux départementaux (conseils généraux)
Nombre de stations	491 pour les eaux de surface et 1014 pour les eaux souterraines	a) 672 pour les eaux de surface et 1967 pour les aux souterraines b) 169 pour les eaux de surface et 637 pour les eaux souterraines	a) 493 pour les eaux de surface et 205 pour les eaux souterraines b) 123 pour les eaux de surface et 50 pour les eaux souterraines
Nombre d'analyses	681 938 pour les eaux de surface et 195 947 pour les eaux souterraines	a) 79 508 pour les eaux de surface et 104 648 pour les eaux souterraines b) 17 609 pour les eaux de surface et 20 246 pour les eaux souterraines	a) 345 115 pour les eaux de surface et 95 409 pour les eaux souterraines b) 28 557 pour les eaux de surface et 3 414 pour les eaux souterraines.

Les données disponibles concernant les eaux continentales proviennent de plusieurs réseaux d'observation qui peuvent être classés en trois catégories, en fonction de leurs objectifs **(Tableau A-2) :**

- les réseaux nationaux, qui contribuent à une connaissance générale des ressources en eau,
- les réseaux qui servent au contrôle des ressources destinées à la production d'eau potable suivant le cadre réglementaire,
- les réseaux qui s'attachent à une évaluation locale du taux de pesticides retrouvés dans les eaux.

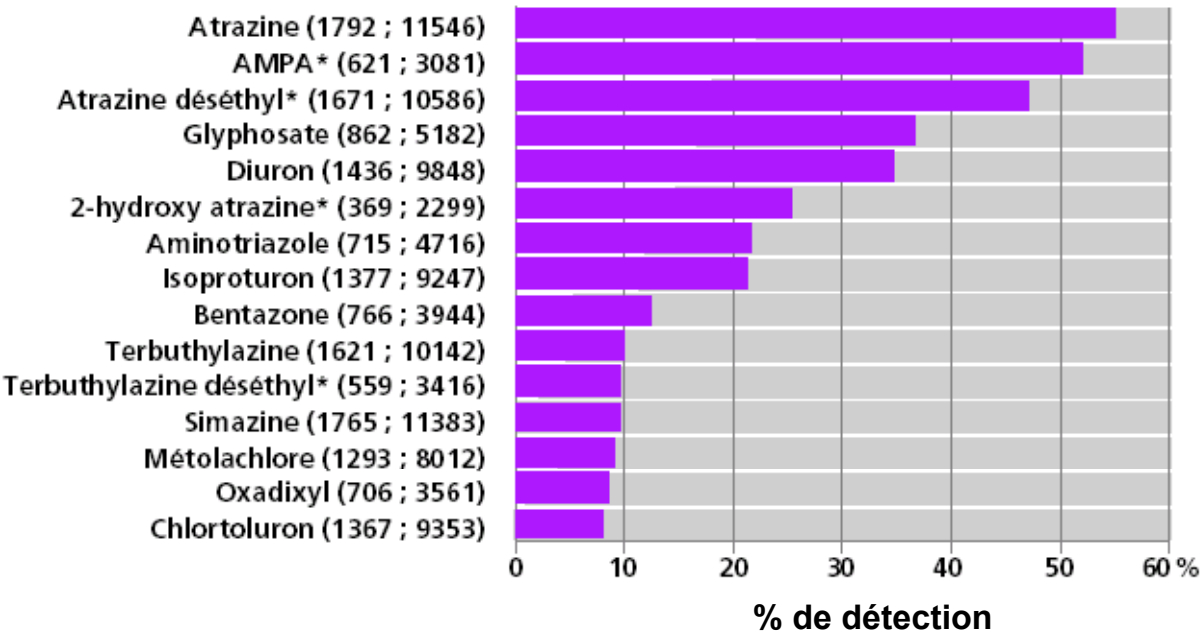
Figure A-3 : Répartition spatiale des points d'observation des pesticides dans les eaux superficielles en 2002 (IFEN, 2004).



Le sixième bilan, publié en 2004, synthétise les informations recueillies au cours de l'année 2002 au niveau des eaux superficielles (ESU) et des eaux souterraines (ESO). La répartition spatiale des points d'observations des pesticides au niveau des eaux superficielles est illustrée sur la **Figure A-3**. Les 15 molécules les plus fréquemment rencontrées au niveau de ces points sont répertoriées sur la **Figure A-4**. Parmi ces molécules, on retrouve, par ordre décroissant, une nette dominance de l'atrazine et de ses principaux produits de dégradation (Atrazine déséthyl, 2-hydroxy atrazine), la présence du glyphosate et de son métabolite l'AMPA (acide aminométhylphosphonique), ainsi que celle du diuron.

Figure A-4 : Principales molécules quantifiées dans les eaux superficielles en 2002, tous réseaux confondus (IFEN, 2004).

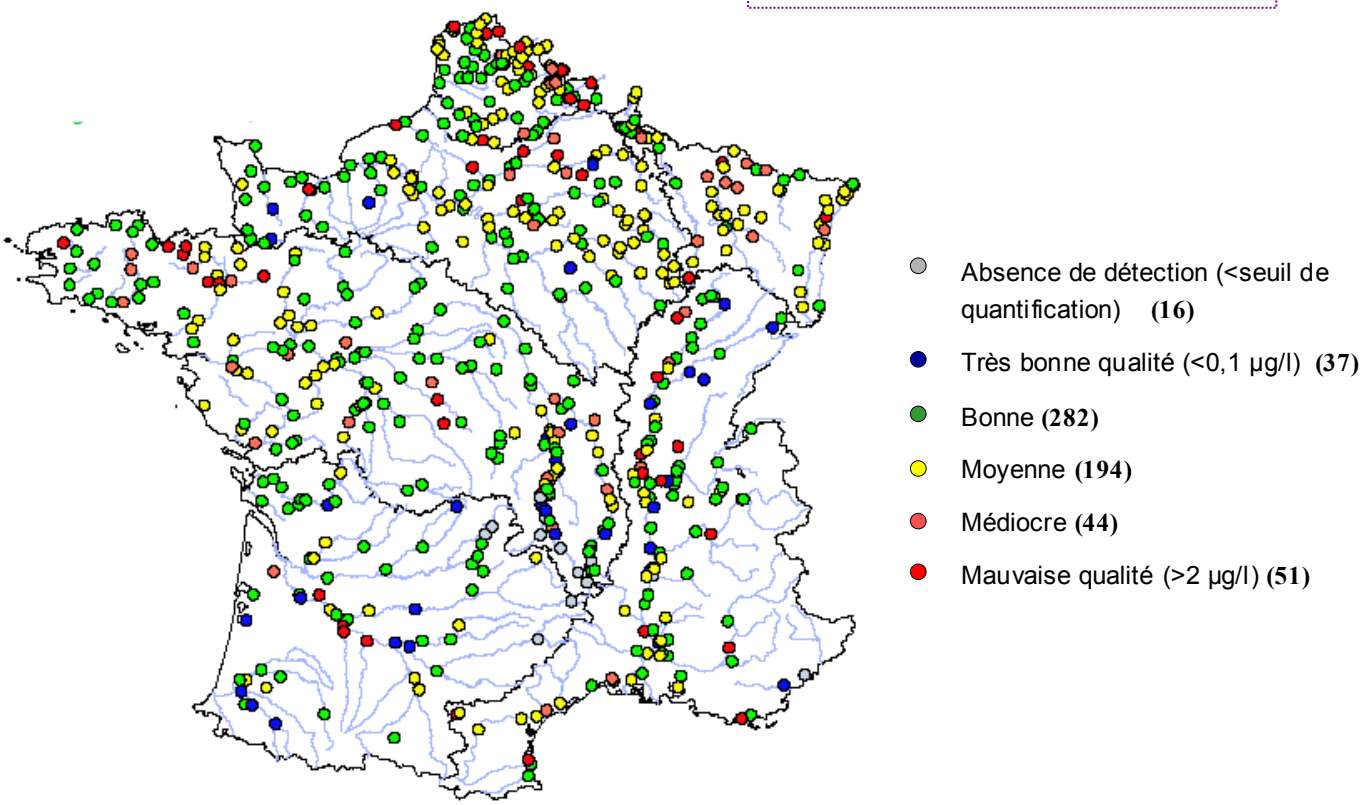
nom de la molécule (nombre de points d'observations, nombre de détections)
* : produits de transformation
AMPA : acide aminométhylphosphonique (métabolite principal du glyphosate)



Si on se penche plus spécifiquement sur l'état général des cours d'eau français, la présence des pesticides affecte la qualité des eaux de 94% des 624 points de mesure dits "interprétables", pour lesquels au moins quatre prélèvements sont réalisés sur une année (IFEN, 2004, **Fig. A-5**). Parmi ces points, 51 présentent ponctuellement des teneurs globales en pesticides supérieures à 2 $\mu g.l^{-1}$, susceptibles d'affecter la diversité biologique et qui rendent nécessaires les traitements spécifiques d'élimination des pesticides pour l'approvisionnement en eau potable. Les pesticides majoritairement responsables de la mauvaise qualité de ces points sont : l'aminotriazole, l'atrazine, le diuron, le glyphosate et l'isoproturon.

Figure A-5 : Qualité des cours d'eau français établie en 2002 à partir des dosages de pesticides effectués sur 624 points de mesure (IFEN, 2004).

(les points représentés sur cette carte excluent les points de prélèvement d'eau brute destinée à la production d'eau potable)



A.III. Ecotoxicité des pesticides en milieu lotique

A.III.1. Fonctionnement général des écosystèmes lotiques

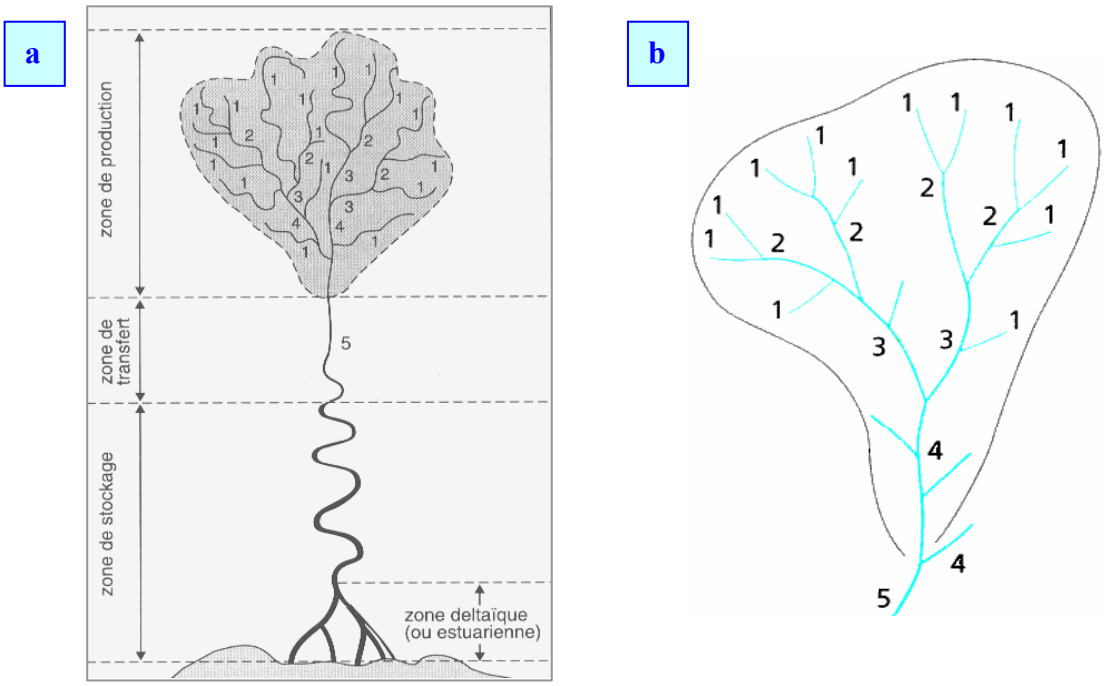
L'utilisation du système de Strahler (1957), permettant de classer les cours d'eau par ordre croissant en fonction de leur positionnement dans le bassin versant, est une des méthodes les plus utilisées pour caractériser un biotope lotique **(Fig. A-6b)**. Un cours d'eau est d'ordre 1 lorsqu'il prend sa source. La rencontre de deux cours d'eau de même ordre entraîne le passage à l'ordre supérieur. Ainsi, un tronçon d'ordre 3 est issu de la rencontre de deux rivières d'ordre 2.

Les écosystèmes lotiques sont d'autre part caractérisés par un gradient amont-aval de nature physico-chimique et biologique qui a donné naissance au concept de "continuum fluvial" (Vanotte *et al.*,1980). Ce concept souligne les interactions entre les propriétés "physiques" du cours d'eau (essentiellement la morphologie et l'hydrologie), l'origine de la

matière organique (autochtone ou allochtone) et ses caractéristiques (grossière ou fine), ainsi que la structure et le fonctionnement des différentes communautés biologiques.

D'amont en aval, trois zones majeures sont ainsi distinguées dans un écosystème lotique : la zone de production ou crénon, la zone de transfert ou rhitron et la zone de stockage ou potamon (Ramade, 1998, **Fig. A-6a**).

Figure A-6 : (a) Zonation d'un hydrosystème fluvial d'après Ramade (1998) et **(b)** exemple d'ordination d'un cours d'eau selon le système proposé par Strahler (1957).



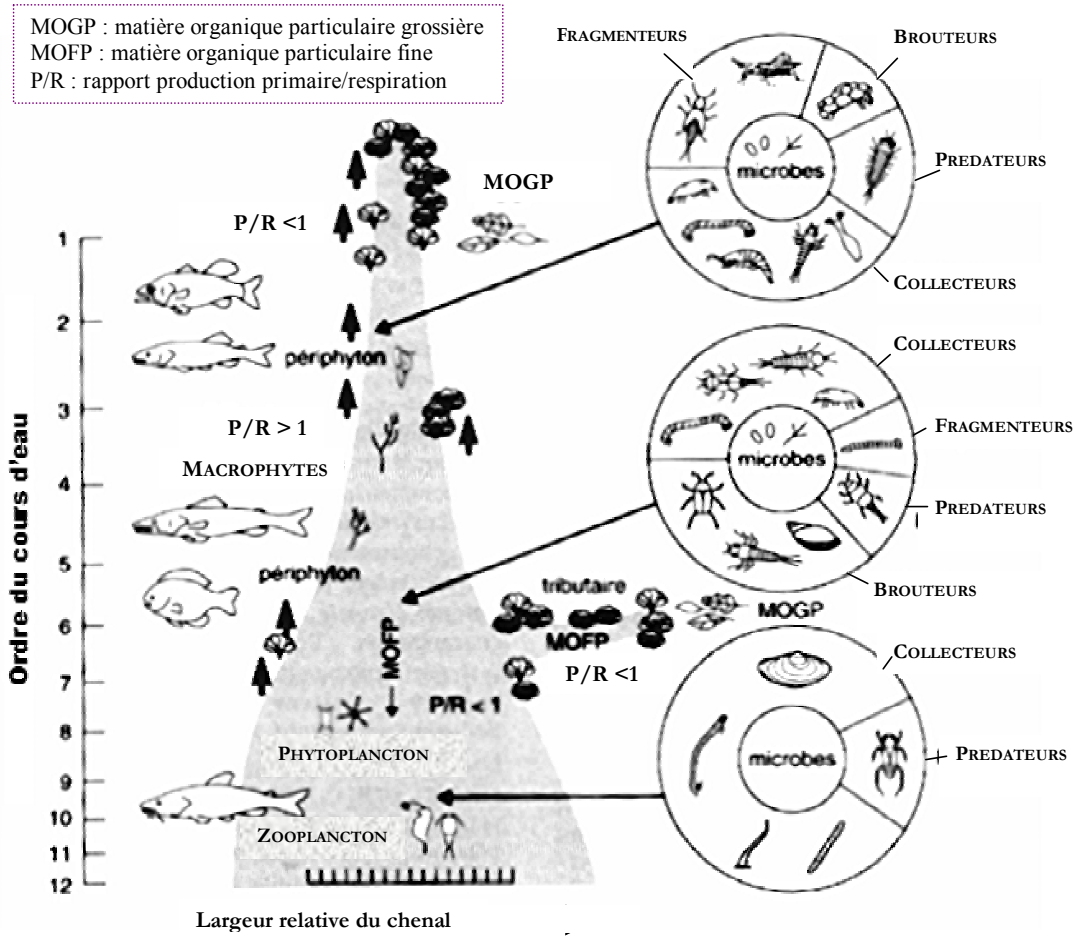
La **Figure A-7** illustre le concept du "continuum fluvial" en fonction de l'ordination du cours d'eau. Les cours d'eau d'ordre faible (≤ 3) se situent ainsi dans les zones amont du bassin versant et intègrent le crénon et la partie supérieure du rhitron. Dans cette zone, les producteurs primaires sont essentiellement représentés par des végétaux fixés aux rochers immergés (bryophytes aquatiques et algues vertes) et par du périphyton (dominance de diatomées). La principale source de matière organique est généralement allochtone et majoritairement constituée de particules grossières, en particulier des feuilles mortes. Les zones amont des cours d'eau fonctionnent donc le plus souvent de façon hétérotrophe (respiration > production primaire brute). Au sein de ces dernières, les peuplements animaux sont représentés par diverses groupes d'insectes rhéophiles[#] (trichoptères à fourreau, plécoptères, éphémères…) et pour les poissons, par une majorité de salmonidés (Ramade, 1998).

[#] désigne des espèces adaptées à vivre dans de forts courants

Dans la partie inférieure du rhitron, le lit mineur s'élargit, les macrophytes et le périphyton deviennent abondants. L'activité autotrophe augmente et en l'absence de rejet d'origine anthropique, la matière organique provient principalement de l'amont sous forme de particules fines. Ces rivières d'ordre intermédiaire (4 à 6) présentent ainsi généralement un fonctionnement autotrophe (Madigou, 2005).

Au niveau du potamon (ordre > 6), la zone riparienne[#] est restreinte par rapport à la largeur du cours d'eau et l'essentiel de la production primaire est assuré par le phytoplancton. Toutefois, la turbidité, résultant de l'accumulation de particules organiques fines, ainsi que l'augmentation de la profondeur réduisent la disponibilité de la lumière pour ces organismes phototrophes. L'écosystème est caractérisé, à nouveau, par une prédominance de l'activité hétérotrophe. La communauté animale se compose de divers types d'invertébrés (odonates, mollusques, larves de chironomidés, annélides oligochètes…) et le peuplement piscicole est constitué par plusieurs espèces appartenant généralement aux Cyprinidés et aux Percidés (Ramade, 1998).

Figure A-7 : Schéma conceptuel du « continuum fluvial » élaboré par Vanotte *et al.*, 1980 (Ramade, 1998 d'après Décamps & Naiman, 1989).



[#] désigne la partie située à la limite des rives

A.III.2. Cibles biologiques potentielles des pesticides en milieu lotique

A.III.2.1. Effets directs et indirects des pesticides

L'impact écotoxicologique des pesticides dans un écosystème lotique est régi par une multitude de facteurs interdépendants. Ces derniers qui incluent les propriétés des molécules polluantes mais également les caractéristiques biotiques et abiotiques du milieu récepteur conditionnent un panel d'effets directs et/ou indirects sur les organismes biologiques.

♦ LES EFFETS DIRECTS dépendent des propriétés intrinsèques des molécules (mode d'action, cibles potentielles, niveau de toxicité…) et correspondent aux manifestations de la toxicité d'une substance pour des organismes sensibles. Ils se traduisent généralement par une fragilisation de la population touchée ou par une baisse d'abondance (suite à une augmentation de la mortalité ou une réduction de la fertilité). De nombreuses études ont ainsi souligné les effets notables engendrés par les pesticides sur les macrophytes (Cuppen *et al.*, 1997 ; Graymore *et al.*, 2001 ; Nyström *et al.*, 2002 ; Lambert *et al.*, 2006) et les microorganismes photosynthétiques (voir pour revue DeLorenzo *et al.*, 2001). Ces producteurs primaires présentent en effet de fortes similitudes avec les organismes ciblés par ces substances.

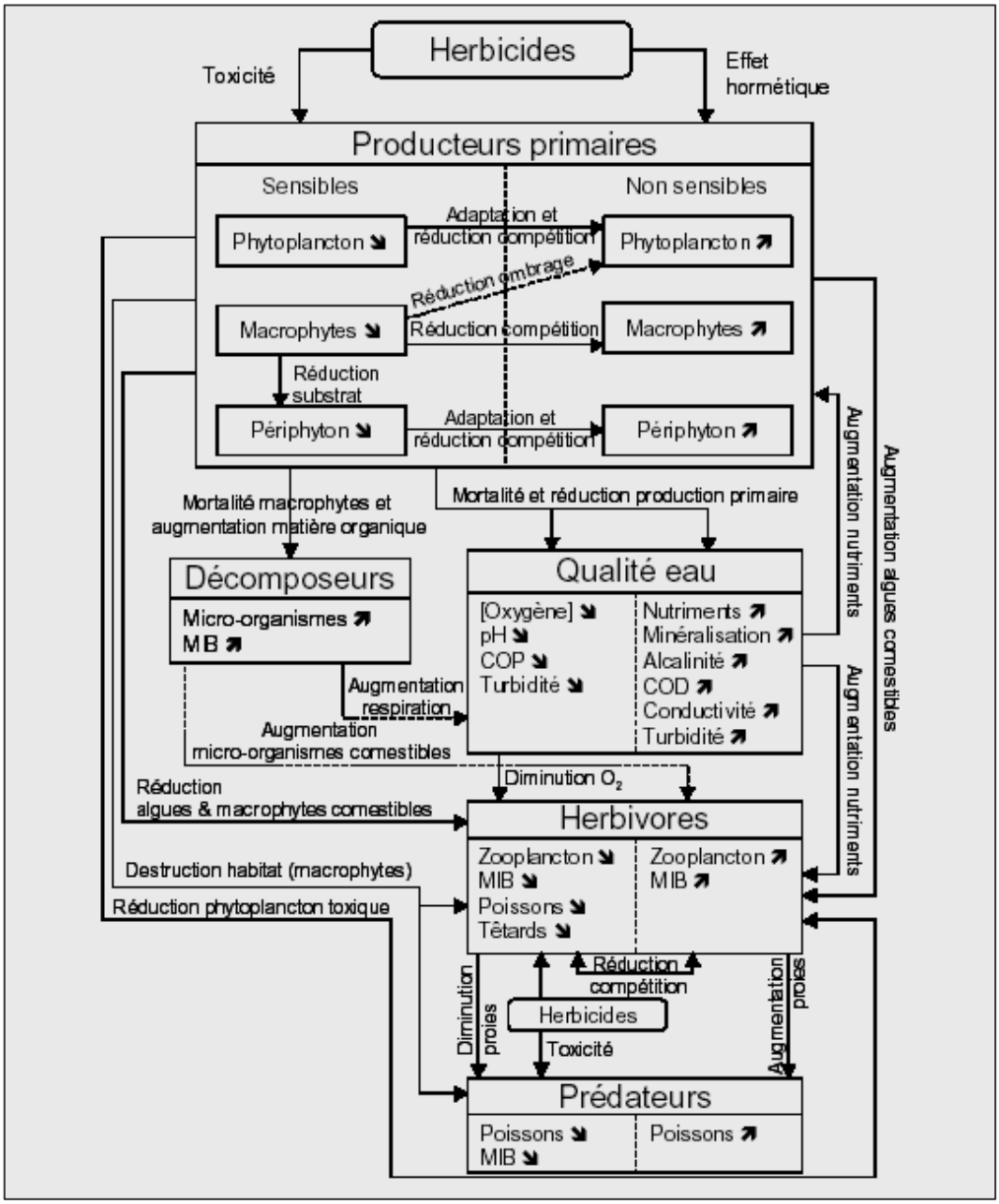
Les pesticides peuvent également entraîner, dans certains cas, le développement de capacités de tolérance au polluant au sein des communautés sensibles. Ce phénomène de PICT ("Pollution-Induced Community Tolerance", Blanck *et al.*, 1988), régulièrement observé en conditions expérimentales et en milieu naturel, particulièrement sur les communautés microbiennes périphytiques (voir pour revue Bérard *et al.*, 2002), souligne la capacité d'adaptation potentielle de certaines populations algales face à ces molécules.

♦ LES EFFETS INDIRECTS peuvent affecter ou au contraire favoriser des organismes ou des populations non concernés par la toxicité des molécules. Ces effets résultent généralement d'effets directs qui s'exercent sur d'autres organismes et qui peuvent entraîner des modifications des conditions physico-chimiques du milieu, telles qu'une baisse du pH ou de la teneur en oxygène (Flum & Shannon, 1987 ; Hartgers *et al.*, 1998), ou se manifester *via* la perturbation de processus écologiques tels que les relations proies-prédateurs ou les phénomènes de compétition (voir pour revue Fleeger *et al.*, 2003).

Les effets directs et indirects potentiels de la pollution d'un milieu aquatique par des herbicides sont illustrés sur la **Fig. A-8** qui correspond à une synthèse des effets observés en micro- et mésocosmes.

Figure A-8 : Effets directs et indirects susceptibles de découler de la présence d'herbicides dans un milieu aquatique (Alix *et al.*, 2005 d'après Brock *et al.*, 2000).

COD : carbone organique dissous ; COP : carbone organique particulaire ; MIB : macro-invertébrés benthiques



En milieu lotique, l'impact global des pesticides dépend ainsi des propriétés intrinsèques des molécules, de leurs interactions (Downing *et al.*, 2004), des concentrations biodisponibles et des durées d'exposition (Gustavson *et al.*, 2003 ; Dorigo *et al.*, 2004), de la composition des communautés, de la présence ou non de cibles potentielles, mais également de l'ensemble

des conditions environnementales (Guasch *et al.*, 1998) telles que les ressources nutritives (Barreiro Lozano & Pratt, 1994), la température (Bérard *et al.*, 1999b) ou la luminosité (Guasch & Sabater, 1998).

Le schéma conceptuel de Brock *et al.* (2000) **(Fig. A-8)** montre également que les communautés microbiennes constituent des cibles potentielles importantes pour les herbicides. Ces polluants peuvent en effet affecter directement les microorganismes photosynthétiques (phytoplanctoniques et périphytiques) mais engendrer également des effets indirects sur les microorganismes hétérotrophes.

A.III.2.2. Le rôle des communautés microbiennes en milieu lotique

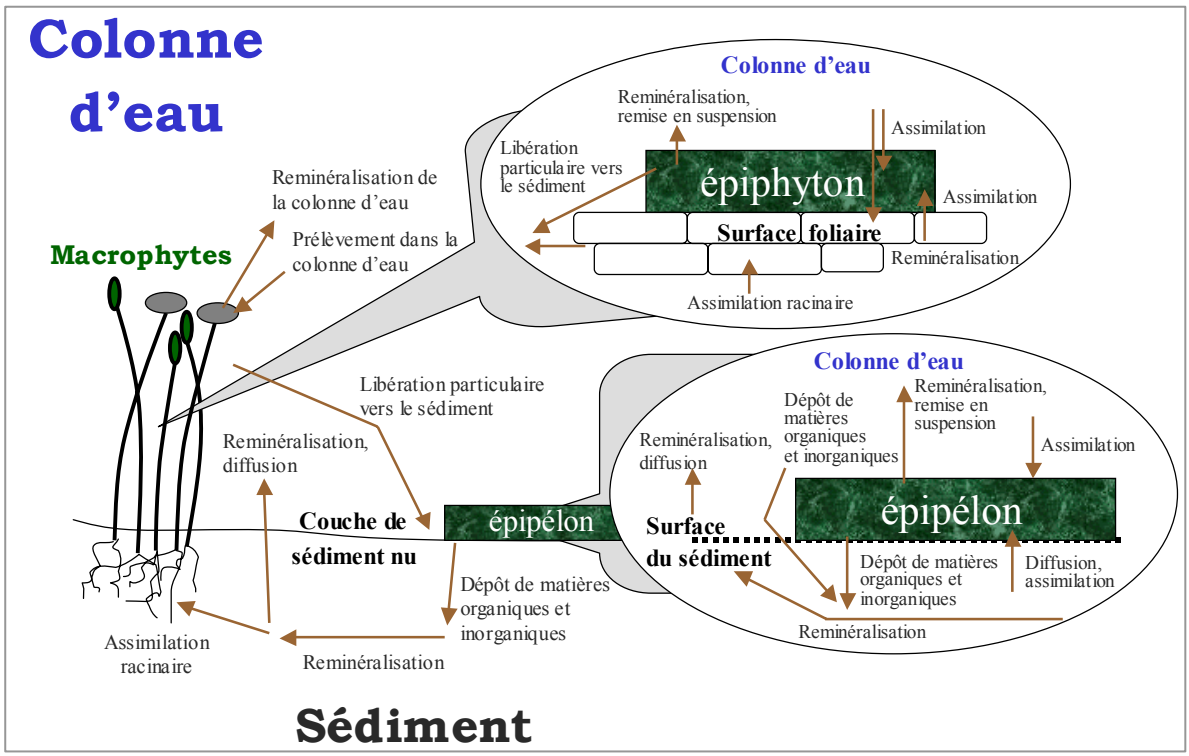
En milieu lotique, la production autotrophe est principalement assurée par les macrophytes et les microorganismes photosynthétiques, qu'ils soient fixés (périphyton) ou libres (phytoplancton). L'activité photosynthétique de ces différentes populations dépend de nombreux facteurs telles que la profondeur, la luminosité, la turbidité et les teneurs en nutriments. Ainsi, dans des cours d'eau de faible ordre (≤ 3), caractérisés par une faible profondeur et un courant assez important, les organismes périphytiques photosynthétiques assurent généralement une part prépondérante de la production primaire (Gustavson *et al.*, 2003).

Le périphyton représente un compartiment complexe, composé de microorganismes autotrophes (algues et cyanobactéries) et hétérotrophes (bactéries, champignons et protozoaires) (Masseret *et al.*, 1998 ; Madigou, 2005). Selon le substrat auquel il est associé, il peut porter des appellations plus spécifiques telles que épilithon (pierres et rochers), épiphyton (végétaux) ou épipélon (sédiments meubles) (Ramade, 1998). Compte tenu de sa position à l'interface entre le substrat et la colonne d'eau, il joue un rôle fondamental dans les cycles biogéochimiques (Hansson, 1990 ; Dodds, 2003) **(Fig. A-9)** et constitue souvent la principale ressource alimentaire pour les invertébrés benthiques (Gould & Gallagher, 1990 ; Hansson, 1992 ; Muñoz *et al.*, 2001). Les algues benthiques qui dominent la communauté périphytique représentent, en raison de leurs caractéristiques écologiques, des organismes bioindicateurs pertinents pour étudier la qualité des eaux courantes. Ainsi, peuvent être cités leur caractère sessile[#] les empêchant de migrer en cas de pollutions, leur sensibilité aux changements de l'environnement, leur cycle de vie relativement court entraînant une réponse rapide aux perturbations et une restauration rapide suite à celles-ci, leur forte diversité et leur présence dans l'ensemble des cours d'eau (McCormick & Stevenson 1998 ; Lavoie *et al.*, 2004).

[#] désigne des espèces vivant fixées à la surface d'un substrat inerte ou vivant

Même si leur rôle est généralement plus important dans les milieux lentiques, les microorganismes phytoplanctoniques participent également à la production primaire endogène, particulièrement lors des périodes de faible débit (Descy, 1993).

Figure A-9 : Schéma conceptuel du rôle du périphyton et de l'épiphyton dans le flux des nutriments (Traduit d'après Dodds, 2003).



Les communautés bactériennes hétérotrophes benthiques et planctoniques jouent pour leur part un rôle primordial dans le fonctionnement des écosystèmes aquatiques en participant à la dégradation de la matière organique (Van Hannen *et al.*, 1999) et en assurant la majorité de son recyclage (Cole *et al.*, 1988). Elles interviennent également dans le recyclage des substances inorganiques et contribuent ainsi au déroulement des cycles biogéochimiques qui assurent la circulation permanente de la matière, alternativement sous forme minérale et organique (Garland, 1997 ; Wetzel, 2001). Les champignons et, dans une moindre mesure, les protozoaires interviennent également dans la décomposition en participant, notamment, à la dégradation de la matière organique allochtone telle que les branchages (Goh & Hyde, 1996 ; Tsui *et al.*, 2001) et les litières foliaires (Gessner & Chauvet, 1994 ; Hieber & Gessner, 2002).

Outre le rôle primordial que joue la communauté bactérienne dans la dégradation de la matière organique autochtone et allochtone, cette dernière participe activement, au même titre que les champignons (Watanabe, 2001), aux processus de dégradation des polluants dans les milieux aquatiques (El-Dib & Abou-Waly, 1998 ; Četkauskaité *et al.*, 1998 ; Watanabe, 2001).

Ces activités de biodégradation conditionnent en partie l'impact de ces substances sur les communautés aquatiques, en particulier lorsque certains métabolites intermédiaires présentant un potentiel toxique supérieur à celui de la molécule mère sont produits (DeLorenzo *et al.*, 2001 *;* Tixier *et al.*, 2002).

En milieu lotique, une co-variation marquée entre les communautés microalgales et bactériennes est fréquemment notée (Gao *et al.*, 2004). L'étroite relation entre ces deux compartiments microbiens s'explique effectivement par l'utilisation préférentielle par les bactéries de la matière organique d'origine algale (Baines & Pace, 1991; Raymond & Bauer, 2001), par leur colonisation des cellules autotrophes (Rier & Stevenson, 2002), et par la compétition entre ces deux communautés pour l'accès aux ressources nutritives (Caron, 1999 ; DeLorenzo *et al.*, 1999). La composition spécifique au sein des communautés microalgales peut également conditionner en partie la diversité bactérienne (Van Hannen *et al.*, 1999 ; Pinhassi *et al.*, 2004).

A.III.3. Impact des pesticides sur les organismes microbiens

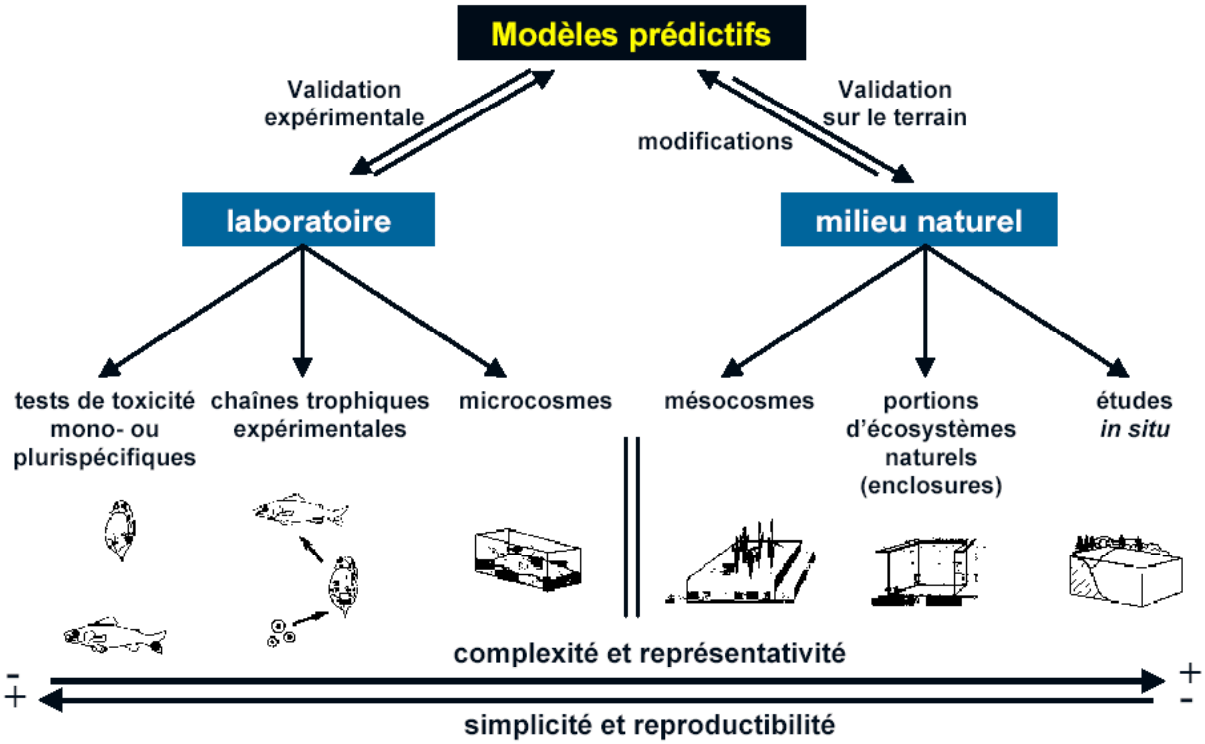
A.III.3.1 Principales approches utilisées en écotoxicologie aquatique

L'impact d'un composé xénobiotique sur les organismes peut être appréhendé à différents niveaux d'organisation biologique allant de la cellule à l'ensemble de la communauté, en intégrant ou non les interactions entre les différents niveaux trophiques (Guckert, 1996). Les méthodologies développées en écotoxicologie peuvent donc être distinguées par les différentes "dimensions" qui les caractérisent et par leur représentativité des processus naturels. Cette échelle d'intégration s'étend des tests monospécifiques aux études de terrain en passant par les expériences de laboratoire à l'aide de modèles écotoxicologiques comme les chaînes trophiques reconstituées et les écosystèmes expérimentaux (Boudou & Ribeyre, 1997). Chacune d'elles implique un degré de simplification plus ou moins important, associé à un niveau de compréhension des mécanismes étudiés et à un risque d'extrapolation **(Fig. A-10)**.

A.III.3.1.a Les approches expérimentales

Les tests d'écotoxicité monospécifiques sont essentiels pour estimer le danger des agents toxiques. La mise en œuvre aisée et la reproductibilité de ces études ont notamment permis de développer des tests standardisés afin d'apprécier la toxicité aiguë de molécules, particulièrement lors de la mise sur le marché de nouvelles substances chimiques.

Figure A-10 : Principales méthodologies utilisées en écotoxicologie aquatique (d'après Caquet *et al.*, 1989).



Les microorganismes représentent des modèles de choix pour la réalisation de ces bioessais. Ils sont ainsi utilisés pour certains tests normalisés tels que les tests de toxicité par inhibition de la croissance de l'algue verte unicellulaire d'eau douce *Pseudokirchneriella subcapitata* (test NF NE 28692) ou par mesure du taux d'extinction de la bioluminescence chez la bactérie *Vibrio fischeri* (test MICROTOX®, ISO 11348-3). La principale limite de ces tests est leur faible représentativité en milieu naturel et la nécessité de complexifier le niveau d'intégration à l'échelle de la communauté (Guckert, 1996) voire de l'écosystème (Kimball & Levin, 1985 ; Duke & Mount, 1991).

Le développement des tests plurispécifiques a conduit à la mise en place de systèmes expérimentaux permettant d'appréhender les effets des polluants sur des communautés appartenant à un ou plusieurs niveaux trophiques dans des conditions simplifiées et contrôlées. Ces dispositifs, appelés microcosmes ou mésocosmes en fonction de leur taille ou de leur localisation (intérieure ou extérieure ; Odum 1984), constituent des modèles pertinents pour étudier l'impact global de ces molécules dans le milieu aquatique. Ainsi, ils permettent d'évaluer les effets sur la biocénose (à moyen terme ou à long terme) ainsi que le devenir des substances chimiques dans le biotope (Boudou & Ribeyre, 1997) sans toutefois contaminer l'environnement naturel. Ces approches expérimentales permettent la détection d'effets directs

et/ou indirects en offrant la possibilité de disposer d'organismes ou d'écosystèmes témoins aux caractéristiques identiques ou proches de celles des organismes ou écosystèmes exposés aux pesticides. Elles facilitent en outre la caractérisation précise des effets par la présence de références comparables. L'appréciation de l'impact des pesticides en milieu lotique ne peut donc se faire qu'en tenant compte de la complémentarité entre ces diverses voies d'approches et en utilisant comme ultime étape la validation des résultats lors d'études *in situ*.

A.III.3.1.b Les études en milieu lotique naturel

Le nombre d'études écotoxicologiques réalisées dans les milieux naturels restent extrêmement limité (Schulz, 2004 ; Alix *et al.*, 2005), et cela en dépit de la nécessaire complémentarité de ces dernières pour valider les résultats expérimentaux et appréhender au mieux l'impact réel des pesticides dans les rivières. La difficulté de caractériser les effets des pesticides sur les communautés microbiennes dans les écosystèmes lotiques naturels explique en partie cet état de fait. La sensibilité des microorganismes aux variations de différents paramètres biotiques et/ou abiotiques, rend en effet complexe la discrimination des effets engendrés par les composés xénobiotiques de ceux liés aux variations environnementales naturelles et saisonnières.

Cette distinction peut être facilitée dans le cas de pollution très localisée en utilisant comme référence un point situé à proximité, en amont de la source de pollution. Plusieurs études ont ainsi mis en évidence l'impact de rejets industriels ou urbains sur les communautés microbiennes de cours d'eau récepteurs en comparant les données en amont et en aval du rejet d'eau usée (Montuelle *et al.*, 1996 ; Masseret *et al.*, 1998 ; Giorgi & Malacalza, 2002 ; Branco *et al.*, 2005). Cette approche est néanmoins difficilement applicable dans le cadre des études sur l'impact des pesticides en raison de la multiplicité des sources de contamination potentielle (agriculture, industrie, usage domestique…) et du caractère fréquemment diffus de la pollution. En outre, le début, la durée et l'intensité des événements de pollution sont difficilement prédictibles et dépendent de nombreux facteurs qui conditionnent le temps de transfert vers le milieu aquatique tels que le type d'application des pesticides, les caractéristiques du bassin versant, les conditions climatiques ou les propriétés physico-chimiques des polluants (Palma *et al.*, 2004).

A.III.3.2. Ecotoxicité des pesticides sur le compartiment microalgal

L'impact de nombreux pesticides a été apprécié sur différentes espèces de microalgues à partir de tests de toxicité réalisés *in vitro*. Les résultats obtenus lors de ces études sont regroupés dans diverses bases de données (ex. « The PAN Pesticides Database »,

www.pesticideinfo.org/Index.html ; « Agritox », http://www.dive.afssa.fr/agritox/index.php), ainsi que dans la revue de synthèse publiée en 2001 par DeLorenzo *et al.*.

Plusieurs critères peuvent être retenus pour étudier les effets des polluants sur les microorganismes photosynthétiques tels que les teneurs en chlorophylle *a*, le taux de croissance, la densité cellulaire, la composition spécifique ou la production primaire. Néanmoins, compte tenu du nombre et de la diversité des molécules considérées pour les études écotoxicologiques, il serait illusoire de proposer une description exhaustive des effets des pesticides sur les microalgues dans ce chapitre.

De manière générale, la présence de pesticides, et plus particulièrement de molécules herbicides, induit une diminution de l'activité photosynthétique, conduisant à une baisse de la biomasse et de la densité cellulaire. Des modifications de la structure des communautés algales résultant de la raréfaction ou de la disparition des espèces les plus sensibles ont également été observées (Pérès *et al.*, 1996 ; Gustavson *et al.*, 2003 ; Downing *et al.*, 2004). Ce déclin peut permettre à des espèces opportunistes plus tolérantes de se développer dans le milieu (Hartgers *et al.*, 1998 ; Devilla *et al.*, 2005). Le remplacement progressif des espèces sensibles par des espèces plus tolérantes, ainsi que la mise en place d'adaptations physiologiques ou génétiques chez certaines espèces, peut alors conduire à moyen terme à une augmentation de la tolérance aux pesticides chez les communautés algales (voir pour revue Bérard *et al.*, 2002).

Le compartiment microalgal peut également être indirectement stimulé par la présence de pesticides présentant une toxicité directe importante sur les organismes brouteurs (voir pour revue Fleeger *et al.*, 2003). Cela a été notamment observé avec la plupart des insecticides (Caquet *et al.*, 1992 ; Barry & Logan, 1998 ; Friberg-Jensen *et al.*, 2003), certains fongicides (Van den Brink *et al.*, 2000) ou lors de contaminations avec plusieurs pesticides appartenant à différentes catégories (Van Wijngaarden *et al.*, 2004).

A.III.3.3. Ecotoxicité des pesticides sur le compartiment bactérien

Si l'impact des pesticides sur les microorganismes photosynthétiques a fait l'objet de nombreuses études, peu de travaux (à l'exception de tests de toxicité monospécifiques) sont relatifs à l'effet de ces molécules sur les communautés bactériennes en milieu aquatique (DeLorenzo *et al.*, 2001).

Les limites méthodologiques ont longtemps restreint l'étude de la composante bactérienne. Ainsi, les effets des pesticides sur ces communautés n'ont été appréhendés qu'à partir de données acquises *via* des techniques culturales ou par des mesures de paramètres quantitatifs telles que la densité bactérienne ou la production hétérotrophe (estimation du taux d'incorporation de leucine ou de thymidine). Ainsi, Rajendran *et al.* (1990) ont mis en

évidence que l'insecticide endosulfan pouvait inhiber la croissance d'une population bactérienne estuarienne à partir d'une concentration de 2 µg l^{-1} et favoriser les espèces du genre *Pseudomonas*, présentant une meilleure résistance à cet insecticide. Ces résultats furent confirmés en 1999 par DeLorenzo *et al.* qui notèrent une réduction de l'abondance bactérienne malgré une légère stimulation du taux d'incorporation de thymidine tritiée dans un réseau trophique estuarien soumis à une exposition à l'endosulfan aux concentrations de 1 et 10 µg l^{-1}. Downing *et al.* (2004) n'ont observé quant à eux aucun effet de cet insecticide, introduit aux mêmes concentrations, sur la densité et la production bactérienne dans une communauté issue d'un canal traversant une zone d'agriculture intensive au sud de la Floride (USA). A l'inverse, Friberg-Jensen *et al.* (2003) ont mis en évidence que l'augmentation de l'abondance bactérienne dans une communauté pélagique lacustre était positivement corrélée avec la teneur en cyperméthrine (insecticide). Cette stimulation fut interprétée comme une conséquence indirecte de la réduction du nombre de prédateurs et donc d'une limitation du contrôle de type « top-down » sur les microorganismes.

La majorité des études visant à apprécier la réponse du compartiment bactérien suite à une exposition à des herbicides a, quant à elle, permis de mettre en évidence une stimulation indirecte de l'activité microbienne hétérotrophe. DeLorenzo *et al.* (1999) et Downing *et al.* (2004) ont ainsi observé une augmentation de la production bactérienne hétérotrophe dans des communautés aquatiques exposées à l'atrazine (50 à 250 µg l^{-1}). Cette stimulation fut attribuée au déclin des organismes autotrophes directement affectés par cet herbicide pouvant conduire à un relargage de matière organique dans le milieu et entraîner une diminution de la compétition vis-à-vis des ressources nutritives. Toutefois, aucun effet significatif d'un mélange de trois herbicides (atrazine, diuron et métolachlore) n'a été observé sur la densité et la production bactérienne (Hartgers *et al.* 1998). Ce résultat est probablement imputable à un impact modéré sur le compartiment algal.

Le compartiment bactérien peut également interagir directement avec les polluants en les utilisant comme substrat métabolique. Downing *et al.* (2004) ont ainsi noté une stimulation de la production bactérienne hétérotrophe suite à l'introduction d'un fongicide (20 µg l^{-1} de chlorothalonil) dans des microcosmes contenant 500 ml d'eau prélevée dans des canaux situés en Floride. Cette stimulation a été attribuée à l'utilisation de cette molécule comme substrat par les microorganismes.

L'émergence des outils d'écologie moléculaire dans les années 1990 a permis de réaliser des études relatives à l'impact des polluants sur la composition spécifique et la structure des communautés bactériennes (Muyzer, 1999 ; Dorigo *et al.*, 2005). Ces travaux ont principalement été conduits sur les communautés bactériennes du sol (voir pour revue

Johnsen *et al.*, 2001) et peu d'études concernent le milieu aquatique. En 2002, Sumpono a toutefois mis en évidence, à l'aide des méthodes d'hybridation fluorescente *in situ* (FISH) et d'électrophorèse sur gel à gradient temporel de température (TTGE), que l'introduction de diuron (10 mg l^{-1}) dans un système lagunaire expérimental pouvait entraîner des modifications significatives de la diversité bactérienne. Kostanjšek *et al.* (2005) ont également observé des variations spécifiques au sein de la communauté bactérienne par TTGE dans une zone lacustre soumise à une forte pollution agricole et notamment à l'apport régulier de divers pesticides.

A.IV. Contexte général de l'étude- Problématique

A.IV.1. Etat de la contamination des eaux en Auvergne

Depuis octobre 1996, un chargé d'étude a été désigné à la DRAF (Direction Régionale de l'Agriculture et de la Forêt) pour suivre la problématique de la qualité des eaux par rapport aux produits phytosanitaires en Auvergne. Un premier groupe de travail a ensuite été constitué à partir de représentants de la DIREN (Direction Régionale de l'Environnement) et de la DRASS (Direction Régionale des Affaires Sanitaires et Sociales) pour finalement conduire en 1997 à la constitution du groupe Phyt'eauvergne.

Ce groupe régional d'action contre les pollutions des eaux naturelles par les produits phytosanitaires compte aujourd'hui plus de 140 membres incluant des représentants de l'administration, des collectivités territoriales, des professions agricoles, des utilisateurs et des fabricants de produits phytosanitaires, des acteurs de l'eau ainsi que de la recherche et de l'enseignement. L'objectif de ce groupe est de surveiller et éventuellement de proposer des solutions pour la restauration de la qualité des eaux naturelles en Auvergne grâce à des analyses et des plans d'action élaborés et mis en œuvre en collaboration avec les différents acteurs cités précédemment. En 2004, le réseau mis en place par le groupe Phyt'eauvergne comportait 46 stations de prélèvement dont 27 en eaux superficielles et 19 en eaux souterraines, assujetties à une recherche systématique de 298 matières actives différentes (Phyt'eauvergne, 2004).

Entre décembre 1997 et juin 2004, 78 molécules ont ainsi été détectées dans les eaux superficielles auvergnates avec une nette prédominance des herbicides au niveau de la diversité des molécules (51 molécules soit 65,4%, **Fig. A-11A**) et surtout du nombre total de détection (91,5%, **Fig. A-11B**).

Figure A-11 : Répartition par usage **(A)** et par pourcentage de détection **(B)** des 78 molécules trouvées dans les eaux superficielles du réseau Phyt'eauvergne entre décembre 1997 et juin 2004 (Phyt'eauvergne, 2004).

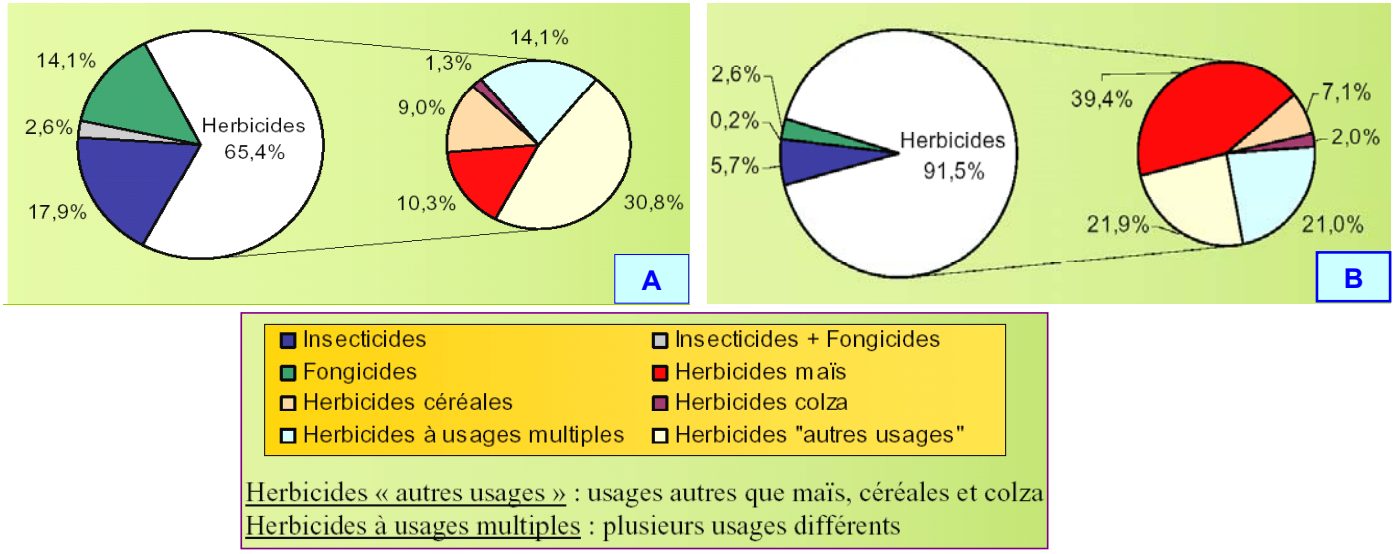


Tableau A-3 : Usages et doses d'application des molécules les plus souvent détectées (dans plus de 5% de leurs recherches) en Auvergne entre décembre 1997 et juin 2004 (Phyt'eauvergne, 2004)
PJT : Parcs, Jardins, Trottoirs.

Molécules	*% détection*	*Usages (dose d'application)*
AMPA	55.2	Métabolite du glyphosate
Atrazine	33.4	Herbicide : maïs-sorgho (toujours ≤ 1000 g/ha)- Interdit d'utilisation depuis septembre 2003
Glyphosate	19.3	Herbicide : nombreuses utilisations et doses variées
Diuron	12	Herbicide : luzerne (1600-1800 g/ha), asperge (1500-1600 g/ha), vigne-poirier-cognassier-nashi-pommier (600g/ha), toujours ≤ 1800 g/ha, PJT (1800 g/ha)
Pipéronyl butoxide	1.1	Insecticide (adjuvant) : nombreuses utilisations (agriculture, PJT, animaux domestiques, désinfections de locaux et de matériel). Dosage varié suivant l'utilisation.
Atrazine déséthyl	7.4	Métabolite de l'atrazine
Métolachlore	7.4	Herbicide : sorgho (1920 g/ha), maïs (3072 g/ha), soja-tournesol (2112 g/ha)
Alachlore	7.0	Herbicide : maïs-maïs doux (2400-2500 g/ha), soja (2500 g/ha)
Terbuthylazine	5.5	Herbicide : vigne (3125-30000 g/ha), maïs (625 g/ha), PJT (1110 g/ha)-interdit depuis septembre 2003 (sauf vigne : utilisation autorisée jusqu'au 30 juin 2004)
Oxadiazon	5.3	Herbicide : vigne-pêcher-pommier-prunier (2000 g/ha), œillet (4000 g/ha), tournesol-soja (750 g/ha), arbres et arbustes d'ornement (2400 g/ha), gazon de graminées (3600 g/ha), PJT (4500 g/ha)
Chlortoluron	5.1	Herbicide : blé tendre, orge d'hiver (dose maximale autorisée de 1800 g/ha depuis le 1er septembre 2004)

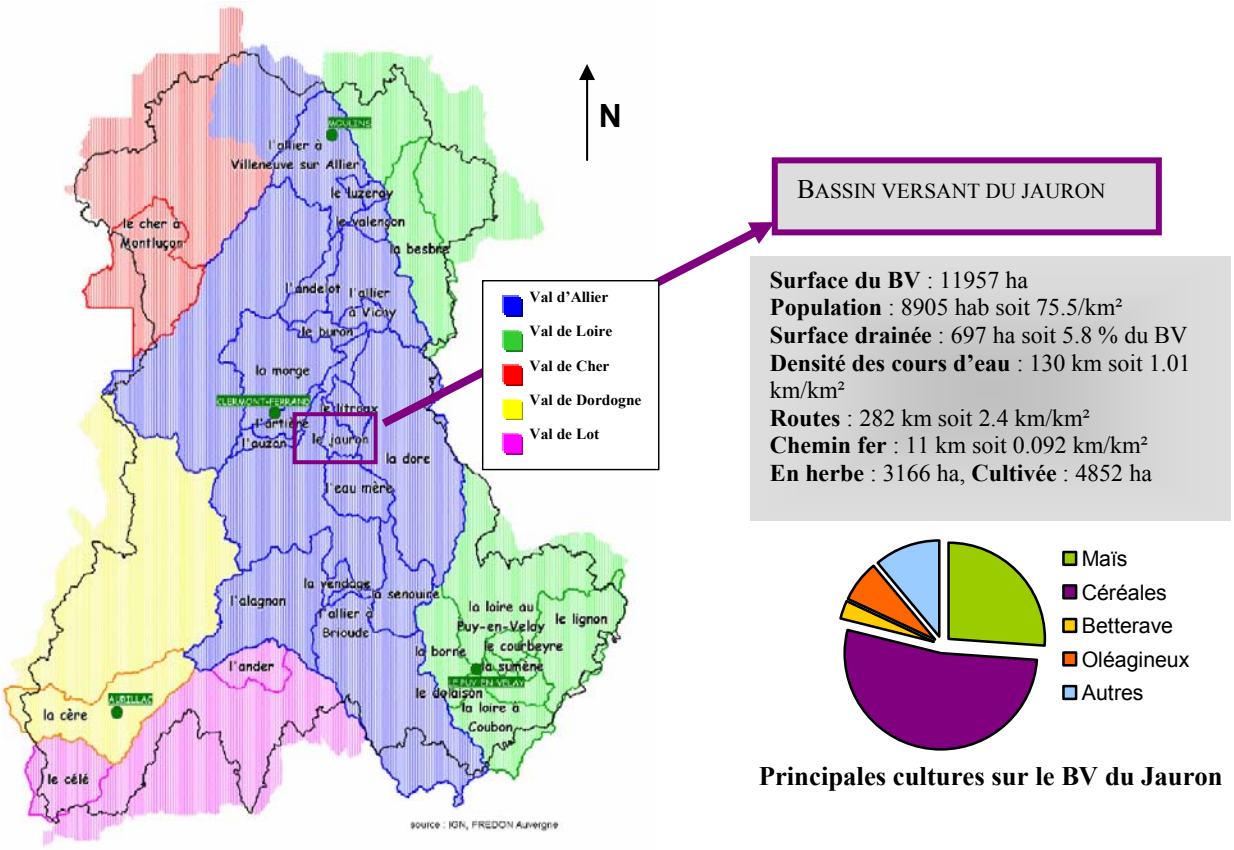
Sur l'ensemble des pesticides ciblés, 10 herbicides et 1 insecticide ont été détectés dans plus de 5% des eaux où ils étaient recherchés **(Tableau A-3)**. Parmi eux, le glyphosate et surtout l'AMPA, un de ses métabolites, qui ne sont recherchés que depuis avril et juin 2002, sont détectés régulièrement (respectivement dans 19,3% et 55,2% des analyses) à des concentrations généralement élevées. Il est d'ailleurs intéressant de noter que l'AMPA est rencontré plus souvent et à des concentrations généralement supérieures que sa molécule mère, le glyphosate, ce qui pose la question de son devenir et de ses effets dans l'environnement.

A.IV. 2. Le cas particulier de la rivière Jauron

A.IV.2.1. Caractéristiques du bassin versant

Le bassin versant du Jauron fait partie des bassins versants pilotes du groupe Phyt'eauvergne. Il fait ainsi l'objet d'un suivi chimique poussé et de plusieurs actions menées par ce groupe de surveillance et de prévention, telles que la sensibilisation des agriculteurs à l'aide de brochures pédagogiques et la présentation de techniques de désherbage alternatives, comme par exemple le "Waipuna" (eau chaude + amidon), aux services communaux.

Figure A-12 : Localisation et caractéristiques du bassin versant du Jauron (source Phyt'eauvergne).



Ce bassin versant du val d'Allier est centré sur Billom, ville de 4000 habitants environ, située à 25 kilomètres à l'est de Clermont-Ferrand **(Fig. A-12)**. Il présente une surface totale de 11957 hectares dont 67% sont utilisés en surface agricole (3166 ha enherbés et 4852 ha cultivés).

Les activités des 260 exploitations agricoles de ce bassin versant sont principalement liées à l'élevage dans le Livradois (zone amont), alors que la Limagne (zone aval) est dominée par les cultures de céréales (53%) et de maïs (26%) (Phyt'eauvergne, 2004). Différentes sources potentielles de pollution par les produits phytosanitaires sont recensées, à savoir les pratiques

agricoles d'élevage et de cultures, les pratiques non agricoles telles que l'entretien des voiries ou des voies ferrées et les rejets urbains, notamment au niveau de la ville de Billom.

A.IV.2.2. Principaux pesticides détectés dans le Jauron

De 2000 à 2002, les analyses, effectuées mensuellement au niveau de sept stations de prélèvements réparties sur le bassin versant du Jauron, ont permis de détecter 246 fois la présence de pesticides **(Tableau A-4)**. Ces analyses font d'autre part apparaître une prédominance des herbicides tant au niveau du nombre de détections (95% du nombre total de détections) que du taux de contamination total (97% de la concentration totale en pesticides, **Tableau A-4).**

Tableau A-4 : Teneurs en pesticides (µg.l^{-1}) enregistrées dans le Jauron entre février 2000 et décembre 2002 (source Phyt'eauvergne).

molécules	nombre de détections	concentration maximale	concentration totale	concentration moyenne	usage	date d'interdiction
Alachlore	25	1,70	7,48	0,30	herbicide maïs	
AMPA	1	0,92	0,92	0,92	metabolite du glyphosate	
Atrazine	64	2,92	18,42	0,29	herbicide maïs	sept-03
Atrazine déséthyl	10	0,30	0,76	0,08	metabolite de l'atrazine	
Chlortoluron	5	0,22	0,37	0,07	herbicide céréales	
Diazinon	1	0,08	0,08	0,08	insecticide	
Dinoterbe	1	0,12	0,12	0,12	herbicide maïs	1997
Diuron	13	4,21	8,89	0,68	herbicide "autres usages"	
Ethofumésate	6	0,24	0,70	0,12	herbicide "autres usages"	
Flurochloridone	2	0,05	0,09	0,04	herbicide "autres usages"	
Flusilazole	1	0,50	0,50	0,50	fongicide	
Glyphosate	1	0,35	0,35	0,35	herbicide à usage multiple	
Isoproturon	1	0,03	0,03	0,03	herbicide céréales	
Métazachlore	2	0,26	0,29	0,15	herbicide colza	
Métolachlore	39	0,69	7,97	0,20	herbicide maïs	
Oxadiazon	26	1,65	6,96	0,27	herbicide "autres usages"	
Phoxime	2	0,12	0,21	0,10	insecticide	
Procymidone	9	0,33	1,11	0,12	fongicide	
Propazine	1	0,03	0,03	0,03	herbicide "autres usages"	sept-03
Simazine	4	0,15	0,50	0,12	herbicide "autres usages"	sept-03
Terbuthylazine	28	3,51	8,44	0,30	herbicide "autres usages"	sept-03
Trifluraline	4	0,19	0,46	0,11	herbicide colza	

L'atrazine est la molécule la plus régulièrement détectée (64 détections), suivie du métolachlore (39), du terbuthylazine (28), de l'oxadiazon (26), de l'alachlore (25) et du diuron (13). Ce dernier présente la valeur la plus forte tant au niveau de la concentration totale mesurée (8,89 µg l^{-1}) que de la concentration ponctuelle maximale (4,21 µg l^{-1}). L'alachlore et le métolachlore présentent également des concentrations totales très élevées (respectivement 7,48 et 7,97 µg l^{-1}) avec cependant des valeurs ponctuelles maximales (respectivement 1,70 et 0,69 µg l^{-1}) plus faibles que celles du diuron.

Tableau A-5 : Teneurs en pesticides (µg.l^{-1}) enregistrées sur l'ensemble du réseau Phyt'eauvergne entre juin 2002 et juin 2003 (source Phyt'eauvergne)

molécules	nombre de détections	nombre de détections >0,1 µg/L
Acétochlore	3	2
Alachlore	2	2
Aminotriazole	4	4
AMPA	67	67
Atrazine	35	10
Atrazine déséthyl	4	1
Bromopropylate	2	0
Chlortoluron	17	7
Dichlobenil	3	3
Diflufenicanil	3	2
Diméthoate	2	2
Diuron	12	3
Ethofumésate	2	0
Fipronil	3	2
Flurochloridone	2	0
Glyphosate	27	27
HCH alpha	2	0
HCH béta	2	2
Iprodone	2	2
Isoproturon	5	3
Lénacile	2	2
Linuron	6	1
Méthabenzthiazuron	4	2
Métolachlore	4	3
Norflurazon	2	2
Oxadiazon	5	3
Oxadixyl	3	2
Piperonyl butoxide	4	2
Prométryne	13	4
Simazine	2	2
Tébutame	2	2
Terbuméton	2	2
Terbuthylazine	4	3
Terbuthylazine déséthyl	2	2

Le glyphosate et son principal métabolite, l'AMPA, sont fréquemment détectés dans les cours d'eau français (IFEN, 2004). En Auvergne, ces molécules ne sont recherchées que depuis juin 2002. Ceci explique leur unique détection sur le bassin versant du Jauron avant le mois de décembre de cette même année **(Tableau A-4)**. Les résultats des analyses menées entre juin 2002 et juin 2003 sur l'ensemble du réseau de surveillance auvergnat (Phyt'eauvergne, 2004) mettent en évidence la forte contamination des cours d'eau par ces deux molécules dont les concentrations sont systématiquement supérieures à la norme de potabilité **(Tableau A-3 et A-5)**.

Les résultats des analyses de pesticides effectuées avant le début du travail de thèse nous ont donc permis d'identifier les molécules les plus fréquemment et/ou intensément détectées dans le Jauron, susceptibles d'affecter les communautés biologiques au cours de notre étude. Huit molécules, appartenant à cinq grandes familles d'herbicides, semblent présenter un risque de pollution particulièrement important : l'atrazine et le terbuthylazine (triazines), le diuron (phenylurée), l'alachlore et le métolachlore (amides), l'oxadiazon (oxadiazole) ainsi que le glyphosate et son métabolite AMPA.

Bien que l'atrazine et le terbuthylazine présentent les nombres de détection les plus élevés dans le Jauron, leur interdiction depuis septembre 2003 laisse suggérer que ces molécules présenteront, à court ou moyen terme, un risque de contamination plus modéré.

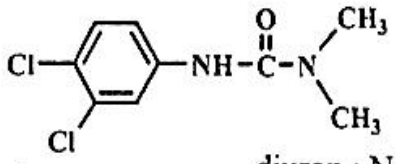
En raison de la classification du diuron et de l'alachlore comme substances prioritaires [Directive n° 2000/60/CE du Parlement européen, **(Tableau A-1)**], ces molécules ont spécialement retenu notre attention.

- Le diuron, essentiellement utilisé sur le bassin versant du Jauron comme herbicide de pré-levée en viticulture, est épandu à la fin du printemps. Les analyses chimiques révèlent ainsi une période récurrente de pollution par cette molécule qui s'étend principalement du mois de mai au mois d'août.
- L'alachlore est un herbicide de pré- et post-levée, utilisé pour la destruction des graminées annuelles et de nombreuses mauvaises herbes à larges feuilles en particulier dans les cultures de maïs. Sa période d'utilisation est donc beaucoup plus étendue que celle du diuron (début du printemps à la fin de l'été). Cette molécule est généralement retrouvée ponctuellement dans les eaux superficielles du bassin versant du Jauron, entre les mois d'avril et de décembre.
- Le glyphosate (et l'AMPA) constitue un des polluants majeurs des rivières françaises. Cet herbicide possède d'autre part un large spectre d'action [adventices (chiendent, ivraie...), plantes annuelles, bisannuelles, vivaces]. De ce fait, il est utilisé durant une grande partie de l'année dans de nombreux domaines (préparation des sols en vue de l'ensemencement, entretien des routes et des espaces verts, voies ferrées, jardins privés). Les analyses chimiques effectuées en Auvergne révèlent sa présence dans les eaux de surface à différentes périodes de l'année.

A.IV.3. Ecotoxicité du diuron et du glyphosate sur les communautés microbiennes aquatiques

♦ LE DIURON (N-(3,4-dichlorophényl)-N', N'-diméthylurée, **Fig. A-13**) est un herbicide de la famille des phenylurées, inhibiteur de la photosynthèse, mobile dans le xylème, à pénétration racinaire et action foliaire. Il empêche la réduction, par le Photosystème II, des transporteurs d'électrons oxydables par le Photosystème I, en agissant en amont de la chaîne constituée par ces deux systèmes fonctionnant en série (Ducruet, 1991).

Figure A-13 : Structure du diuron.



diuron : N-(3,4-dichlorophényl)-N',N'-diméthylurée

L'utilisation intensive de cet herbicide engendre une pollution des eaux de surface suite au ruissellement et au lessivage des sols (Garmouna *et al.*, 1997 ; Louchart *et al.*, 2000 ; Barra Caracciolo *et al.*, 2005), en zone agricole (Thurman *et al.*, 2000 ; Mitchell *et al.*, 2005) mais aussi en zone urbaine (Revitt *et al.*, 2002 ; Blanchoud *et al.*, 2004).

Des tests mono-spécifiques ont mis en évidence une forte toxicité du diuron sur les microalgues, qu'il soit utilisé seul ou combiné avec d'autres pesticides. Le niveau de toxicité varie cependant en fonction des espèces considérées et des critères choisis lors de ces tests (Flum & Shanon, 1987 ; Schafer *et al.*, 1994 ; DeLorenzo *et al.*, 2001 ; Védrine *et al.*, 2003). Parmi les phenylurées, le diuron est ainsi la molécule qui présente l'effet inhibiteur le plus important sur la reproduction de l'espèce phytoplanctonique dulcicole *Scenedesmus vacuolatus* ($CE50_{(24\ h)}$[#] = 6,60 µg l^{-1} ; Backhaus *et al.*, 2004). Des études menées à l'échelle de la communauté ont également démontré les effets néfastes du diuron sur les fractions planctoniques et périphytiques à des concentrations parfois inférieures à 1 µg l^{-1} (Molander & Blanck, 1992). Ces effets peuvent conduire à une diminution des teneurs en chlorophylle *a* et à une inhibition de la production primaire ou affecter la structure de la communauté en modifiant la diversité spécifique (Molander & Blanck, 1992 ; Hartgers *et al.*, 1998 ; Arrhenius *et al.*, 2004 ; Perschbacher & Ludwig, 2004). L'impact sur les organismes autotrophes peut alors perturber le fonctionnement de l'écosystème et entraîner une modification des conditions environnementales notamment une diminution significative des teneurs en oxygène dissous (Flum & Shannon, 1987 ; Hartgers *et al.*, 1998 ; Sumpono *et al.*, 2003).

Des tests effectués sur des bactéries bioluminescentes ont également démontré la toxicité potentielle du diuron sur les microorganismes hétérotrophes (Canna-Michaelidou & Nicolaou, 1996 ; Strachan *et al.*, 2001 ; Tixier *et al.*, 2001). Des études menées sur des écosystèmes terrestres ont mis en évidence un effet inhibiteur du diuron sur l'activité des communautés bactériennes (Prado & Airoldi, 2002) et un impact significatif sur leur diversité spécifique appréhendée à l'aide de la DGGE (El Frantoussi *et al.*, 1999). A notre connaissance, la seule étude visant à caractériser les effets du diuron sur des communautés bactériennes aquatiques naturelles a été effectuée par Sumpono (2002) dans un dispositif expérimental de type

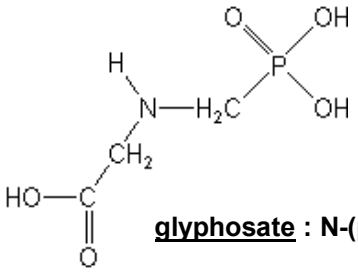
[#] concentration efficace qui affecte 50% des organismes durant 24 heures (suivant le critère de toxicité choisi)

« lagunage naturel ». Ces travaux ont montré que l'introduction de diuron, à la concentration de 10 mg l^{-1}, peut entraîner une augmentation de la densité bactérienne suite à une libération de matériel organique par les cellules autotrophes affectées par la présence de l'herbicide. L'analyse de la structure (par la méthode FISH) a montré une diminution significative de la proportion de cellules appartenant au groupe des CFB (*Cytophaga-Flavobacterium-Bacteroides*) et des modifications importantes de la diversité bactérienne ont été visualisées à l'aide de la TTGE. Cependant, très peu de données concernent l'impact du diuron à une concentration réaliste sur des communautés bactériennes de milieux lotiques naturels qui sont pourtant susceptibles d'être exposées régulièrement à la présence de cette molécule.

♦ LE GLYPHOSATE (N-(phosphonomethyl) glycine, **Fig. A-14**) est un herbicide à large spectre, non sélectif et systémique, commercialisé depuis une trentaine d'année (Baylis, 2000 ; Woodburn, 2000). Il est absorbé par les feuilles et les tissus souples de la tige et agit en inhibant l'activité d'une enzyme jouant un rôle clé dans la voie de biosynthèse des acides aminés aromatiques : la 5-enolpyruvylshikimate-3-phosphate synthase (EPSPS). En présence de glyphosate, la voie de biosynthèse des ces acides aminés, indispensables à la synthèse de protéines, s'interrompt (Baylis, 2000). Il tue alors pratiquement tous les types de plantes qui meurent en quelques jours ou quelques semaines.

Le glyphosate est l'un des herbicides les plus employés (Baylis, 2000 ; Woodburn, 2000 ; Kolpin *et al.*, 2006). Son usage dans l'agriculture, notamment aux Etats-Unis **(Fig. A-15),** ne cesse d'augmenter et compte tenu de son large spectre d'action, son utilisation est également très répandue en zone non agricole (Skark *et al.*, 1998 ; Blanchoud *et al.*, 2004 ; Kolpin *et al.*, 2006).

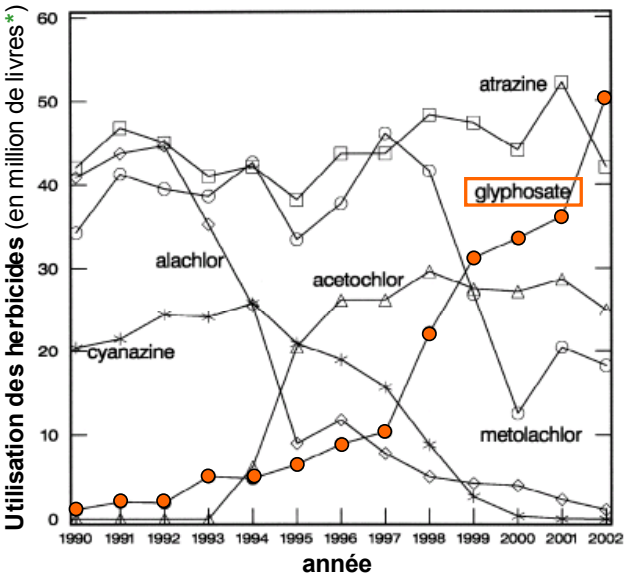
Figure A-14 : Structure du glyphosate.



glyphosate : N-(phosphonomethyl)glycine

Malgré un temps de demi-vie relativement court en milieu aquatique (environ 100 heures dans une eau de rivière ; Mallat & Barceló, 1998), les analyses effectuées récemment dans divers cours d'eau mettent en évidence l'exposition régulière des organismes aquatiques à cet herbicide (Blanchoud *et al.*, 2004 ; Skark *et al.*, 2004 ; Battaglin *et al.*, 2005 ; Kolpin *et al.*, 2006).

Figure A-15 : Evolution de l'utilisation estimée d'herbicides dans l'agriculture de 9 états de l'Ouest des Etats-Unis (Battaglin *et al.*, 2005) * 1 livre = 453,6 grammes.



La plupart des tests réalisés sur des microorganismes autotrophes ont mis en évidence la faible toxicité du glyphosate **(Tableau A-6)**. De plus, Sullivan *et al.* (1981) et Schaffer & Sebetich (2004) ont démontré que certaines espèces algales pouvaient être stimulées par la présence de cet herbicide. Toutefois, la plupart des études ont été réalisées à partir de cultures cellulaires et sur des périodes très courtes. Les résultats obtenus sont donc de ce fait difficilement extrapolables sur des communautés en milieu naturel.

Tsui & Chu (2003) ont également apprécié les effets du glyphosate sur la bactérie *Vibrio fischeri* à l'aide du test Microtox® (CE_{50}=15,8-177mg l^{-1} en fonction de la formulation). Récemment, Enrich-Prast (2006) a démontré que le glyphosate n'affectait que faiblement le processus de nitrification dans des sédiments aquatiques. A notre connaissance, il n'existe actuellement aucune étude ayant appréhendé l'impact du glyphosate sur l'activité et la diversité des communautés bactériennes aquatiques.

Tableau A-6 : Exemples de toxicité du glyphosate sous différentes formulations sur des microalgues.

Formulation	Organisme	Temps	Paramètre	CE 50 (mg Gly.l^{-1})	Référence
glyphosate	communauté périphytique	4h	fixation de carbone	8,9 - 89	Goldsborough & Brown, 1988
Rodeo®	*Ankistrodesmus sp.*	96h	densité cellulaire	0,07 - 0,41	Gardner *et al.* , 1997
glyphosate	*Scenedesmus acutus*	96h	taux de croissance	10,4 - 11,2	Sáenz *et al.* , 1997
glyphosate	*Scenedesmus quadricauda*	96h	taux de croissance	4,4 - 8,9	Sáenz *et al.* , 1997
Ron-do®	*Scenedesmus acutus*	96h	taux de croissance	8,4 - 9,7	Sáenz *et al.* , 1997
Ron-do®	*Scenedesmus quadricauda*	96h	taux de croissance	8,1 - 10,2	Sáenz *et al.* , 1997
glyphosate	*Selenastrum capricornutum*	96h	taux de croissance	22,8 - 26,7	Tsui & Chu, 2003
glyphosate	*Skeletonema costatum*	96h	taux de croissance	0,82 - 11,1	Tsui & Chu, 2003
Roundup®	*Selenastrum capricornutum*	96h	taux de croissance	2,36 - 8,14	Tsui & Chu, 2003
Roundup®	*Skeletonema costatum*	96h	taux de croissance	0,33 - 10,49	Tsui & Chu, 2003

CHAPITRE B

Matériel et méthodes

Chapitre B – MATERIEL ET METHODES

B.I. Site d'étude et stratégies d'échantillonnage

B.I.1. Les campagnes *in situ*

B.I.1.1. Objectif

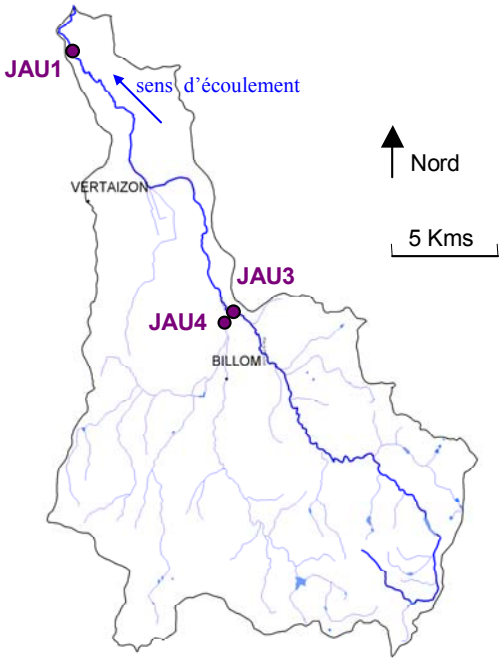
Deux campagnes d'échantillonnage de 11 mois ont été réalisées, sur le bassin versant du Jauron, en 2003 et 2004. L'objectif de ce travail était de suivre dans ce cours d'eau (d'ordre 1 à 4) régulièrement exposé à la présence de pesticides, l'évolution saisonnière des communautés microbiennes étudiées en fonction de l'ensemble des paramètres environnementaux et plus particulièrement du contexte global de pollution.

B.I.1.2. Choix des stations de prélèvements

Le bassin versant choisi, présente une région d'élevage en zone amont et différentes sources de pollution par les pesticides plus aval, relativement bien localisées, à savoir, les rejets urbains, principalement au niveau de la ville de Billom et les pratiques de cultures intensives à proximité de l'exutoire.

Les prélèvements ont été effectués sur le Jauron et un de ses affluents, l'Angaud, au niveau de trois stations, sélectionnées parmi sept points d'échantillonnage suivis chimiquement par le groupe Phyt'eauvergne. Le choix de ces trois stations a donc été effectué suivant les différentes pratiques d'utilisation des pesticides décrites ci-dessus **(Fig. B-1)**.

Figure B-1 : Localisation des stations de prélèvements choisies lors des campagnes *in situ.*



- la station codée "JAU1" correspond au point exutoire du bassin versant. Elle est située en zone de cultures intensives, à environ 100 mètres de la confluence avec la rivière Allier, et intègre l'ensemble de la pollution reçue par la rivière.
- la station codée "JAU3" est également située sur le Jauron. Elle est considérée comme représentative des pratiques agricoles de la zone amont du bassin versant qui ont recours à une utilisation de pesticides très limitée (majoritairement de l'élevage de moyenne montagne). Cette station a été choisie comme station référence faiblement polluée.
- la station codée "JAU4" est localisée sur l'Angaud. Elle est majoritairement alimentée par le rejet de la station d'épuration de Billom, situé à 30 mètres en amont et est de ce fait réceptrice de la pollution urbaine issue de cette localité.

B.I.1.3. Echantillonnage

Le calendrier des prélèvements suivi pour les deux campagnes *in situ* est détaillé dans le **Tableau B-1**.

Tableau B-1 : Calendrier des échantillonnages effectués pour les campagnes *in situ.*

	Année 2003	Année 2004
Février	17/02/2003	16/02/2004
Mars	24/03/2003	15/03/2004
Avril	14/04/2003	05/04/2004
Mai	20/05/2003	10/05/2004
Juin	16/06/2003	14/06/2004
Juillet	07/07/2003	12/07/2004
Août	18/08/2003	16/08/2004
Septembre	22/09/2003	13/09/2004
Octobre	13/10/2003	11/10/2004
Novembre	17/11/2003	15/11/2004
Décembre	09/12/2003	13/12/2004

L'eau a été échantillonnée aux différentes stations à l'aide d'un seau préalablement rincé trois fois dans la rivière, puis transférée dans une bouteille stérile de 2 litres en pyrex et conservée au froid dans une glacière pendant le trajet avant d'être maintenue à 4°C jusqu'aux analyses. Chacune des sorties a été réalisée en début de matinée afin de réduire au maximum l'influence des variations journalières avec une durée totale entre le premier prélèvement et le retour au laboratoire n'excédant pas deux heures. Certains paramètres physico-chimiques (pH, température et oxygène) ont été mesurés directement *in situ* à l'aide de sondes immergées dans la colonne d'eau **(voir le chapitre B.II)**.

B.I.2. Les études expérimentales en microcosmes

B.I.2.1. Objectif

Parallèlement aux campagnes *in situ*, des études expérimentales ont été réalisées afin d'appréhender, en conditions contrôlées, les effets des principaux pesticides rencontrés dans le Jauron (le diuron, le glyphosate et l'alachlore) sur les communautés microbiennes naturelles issues de ce cours d'eau. Pour chacune des molécules choisies, les expériences ont été menées à partir d'une exposition unique à une concentration théorique de 10 $\mu g\ l^{-1}$.

B.I.2.2. Calendrier des expériences

Chacune des études expérimentales a été programmée afin d'échantillonner les communautés biologiques à des périodes caractérisées, si possible, par l'absence de la molécule étudiée dans l'eau. Ceci a donc permis de constituer des microcosmes témoins non contaminés et de reproduire au mieux une pollution en milieu naturel. Le calendrier des études expérimentales a donc été établi en fonction des caractéristiques propres à chacune des molécules sélectionnées. Pour ce faire, les prélèvements ont été effectués juste avant les périodes théoriques d'épandage en se basant sur les pratiques agricoles et sur les résultats des analyses chimiques effectuées les années précédentes (données Phyt'eauvergne). Ces périodes d'épandage ainsi que le temps de transfert des molécules vers les cours d'eau peuvent toutefois varier d'une année à l'autre en fonction des conditions météorologiques et des pratiques culturales.

Le diuron a une période d'utilisation assez restreinte sur le bassin versant du Jauron (fin du printemps et/ou début de l'été). Deux expériences ont donc été menées en mars 2003 et en mai 2004, afin d'appréhender l'impact de cette molécule sur les communautés microbiennes prélevées avant l'épandage au cours de deux années successives.

Le glyphosate est actuellement une des molécules les plus régulièrement retrouvées dans les eaux de surface durant une grande partie de l'année. Trois expériences ont été menées au cours du mois d'avril (2003 et 2004) et du mois d'août (2004) pour apprécier son impact sur les communautés microbiennes en intégrant à la fois le facteur interannuel et le facteur saisonnier.

L'alachlore est retrouvé dans l'eau plus ponctuellement, mais à différentes périodes de l'année. Une expérience a été menée au cours du printemps (mai 2003) et une à la fin de l'été (septembre 2004) afin de comparer la réaction des organismes microbiens en fonction du paramètre saisonnier. Toutefois, les analyses n'ont pas été menées à leur terme et les résultats obtenus ne seront pas décrits dans ce manuscrit.

B.I.2.3. Constitution des microcosmes

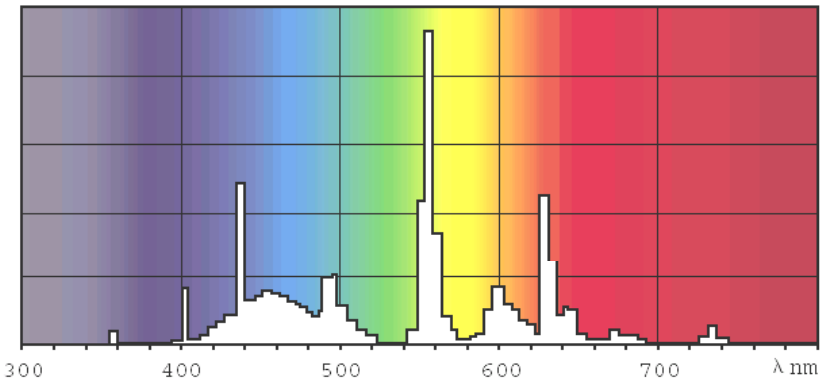
Pour chacune des études en microcosmes, les communautés microbiennes planctoniques et périphytiques ont été échantillonnées au niveau de la station "JAU1". Pour les microorganismes planctoniques, 25 litres d'eau ont été prélevés selon le procédé décrit précédemment. De retour au laboratoire, l'eau a été filtrée à 100 µm pour éliminer la majorité des organismes brouteurs puis homogénéisée dans un aquarium en verre d'une contenance totale de 50 litres. Le périphyton a été collecté à partir de substrats artificiels (lames de verre, **voir chapitre B.III.1.**) sauf pour l'expérience conduite avec le diuron en mai 2004 où les supports utilisés ont été vandalisés lors de la période de colonisation. Dans ce cas particulier, les organismes ont été prélevés directement sur des pierres présentant une surface totale équivalente à 10 lames de verre (environ 200 cm²). Les organismes périphytiques ont été remis en suspension par "grattage" **(voir chapitre B.III.1.)** dans un volume final de 600 ml d'eau de rivière, filtrée à 100 µm et homogénéisée.

Des Erlenmeyers de 3 litres (Duran Schott) contenant 2,23 litres de la colonne d'eau additionnés de 70 ml de la suspension obtenue après décollement du périphyton, ont servi de microcosmes. Des microcosmes contrôles, non contaminés, ont ainsi été constitués et le polluant a été ajouté dans les autres microcosmes à la concentration théorique finale de 10 µg l^{-1}. Les microcosmes (témoins et traités) ont été réalisés en duplicats pour les expériences effectuées en 2003 et en triplicats pour celles effectuées en 2004 **(Fig. B-2)**.

Figure B-2 : Photographie du dispositif expérimental utilisé pour les études en microcosmes.

Durant tout le suivi (21 à 24 jours suivant les expériences), les microcosmes ont été placés sur une plaque à agitation permanente, dans une étuve maintenue à une température constante et proche de celle mesurée *in situ* lors du prélèvement initial associé à chaque expérience **(Fig. B-2)**. L'éclairage, d'intensité constante (environ 4000 lux), a été assuré par trois néons "lumière du jour" qui délivrent une lumière blanche couvrant l'essentiel du spectre visible (Mazda Prestiflux TFP 18W JR/865, **Fig. B-3**). Le cycle nycthéméral a été adapté pour chacune des expériences en fonction de la période de l'année où elles se sont déroulées, pour reproduire au mieux les conditions naturelles d'éclairement.

Figure B-3 : Spectre lumineux des néons utilisés dans le dispositif expérimental (néon MAZDA Fluor TFP 18W JR /865 G13 ; données MAZDA).



B.I.2.4. Echantillonnage

A chaque temps d'échantillonnage, le volume d'eau nécessaire pour l'ensemble des analyses biotiques et abiotiques (200 à 300 ml suivant les paramètres mesurés) a été prélevé en conditions stériles et homogénéisé avant répartition. Les protocoles utilisés pour les différentes analyses sont décrits dans les paragraphes suivants.

B.II. Paramètres abiotiques mesurés

B.II.1. Dosage des pesticides

Les dosages de pesticides pour les campagnes *in situ* ont été réalisés par le laboratoire Santé-Environnement-Hygiène de Lyon (SEHL). Ce laboratoire a été choisi en 2000 par le groupe Phyt'eauvergne suite à un appel d'offre lancé auprès d'une dizaine de laboratoires d'analyses de résidus suivant un cahier des charges élaboré par la Direction Générale de l'Alimentation (DGAL). Il répond entre autre à une démarche qualité accréditée par le COFRAC (Comité Français d'Accréditation) selon le programme 100.1 ("Analyses physico-chimiques des eaux", **www.cofrac.fr**).

Au cours des années 2003 et 2004, près de 280 matières actives ont été recherchées lors des dosages chimiques effectués à partir du couplage de différentes techniques d'extraction et d'analyses (chaînes de chromatographie en phase liquide et gazeuse, couplage chromatographie / spectrométrie de masse…). Lors des études expérimentales, ce même laboratoire a été chargé du suivi analytique de chacune des molécules considérées (ainsi que de l'AMPA dans le cadre des expérimentations avec le glyphosate), utilisées sous forme de produits purs.

Pour les deux types d'études (*in situ* et expérimentales), les échantillons, destinés à l'analyse des pesticides (volumes variables en fonction des molécules recherchées et des recommandations du laboratoire d'analyse), ont été conservés à 4°C dans des bouteilles en verre fumé, afin de limiter les processus de bio- et de photo-transformation, jusqu'à analyse par le laboratoire accrédité.

B.II.2. Mesure de la température, de l'oxygène dissous et du pH

La température, la concentration en oxygène dissous et son pourcentage de saturation dans l'eau ont été mesurés à l'aide d'un oxymètre portable (WTW OXI 96). Le pH a été mesuré avec un pH-mètre muni d'une électrode de verre (Schott CG-818).

B.II.3. Dosages des composés azotés et phosphorés

Les concentrations en ammonium ($N\text{-}NH_4$), nitrites ($N\text{-}NO_2$), nitrates ($N\text{-}NO_3$) et orthophosphates ($P\text{-}PO_4$) ont été déterminées par dosages spectrophotométriques (spectrophotomètre Secoman S500) à l'aide des kits Spectroquants® (Merck) n° 1.14752.0001, 1.14773.0001, 1.14776.0001 et 1.14842.0001 respectivement, suivant les protocoles décrits par les fabricants.

B.II.4. Dosage du carbone organique dissous (COD)

Le dosage du carbone organique dissous a été réalisé suivant le protocole décrit par Fajon (1998). Trente millilitres d'échantillon ont été filtrés sur filtre Whatman GF/F, préalablement passé au four (500°C, 10 heures,) à l'aide d'une seringue en verre préalablement lavée avec un mélange sulfochromique et rincée abondamment à l'eau distillée. Le filtrat a été collecté dans deux ampoules en verre passées préalablement au four (500°C, 10 heures) et fixé avec du chlorure mercurique ($HgCl_2$, 5 $mg.l^{-1}$). Les ampoules ont été scellées à la flamme et stockées à l'obscurité à 4°C jusqu'aux analyses.

Le dosage a été réalisé sur un analyseur de carbone organique (TOC 5000, Shimatzu) fonctionnant selon le principe de l'oxydation catalytique à haute température. L'échantillon a été acidifié par l'ajout de 10 µl d'HCl 6N et décarbonaté par un bullage d'air pur (20% O_2)

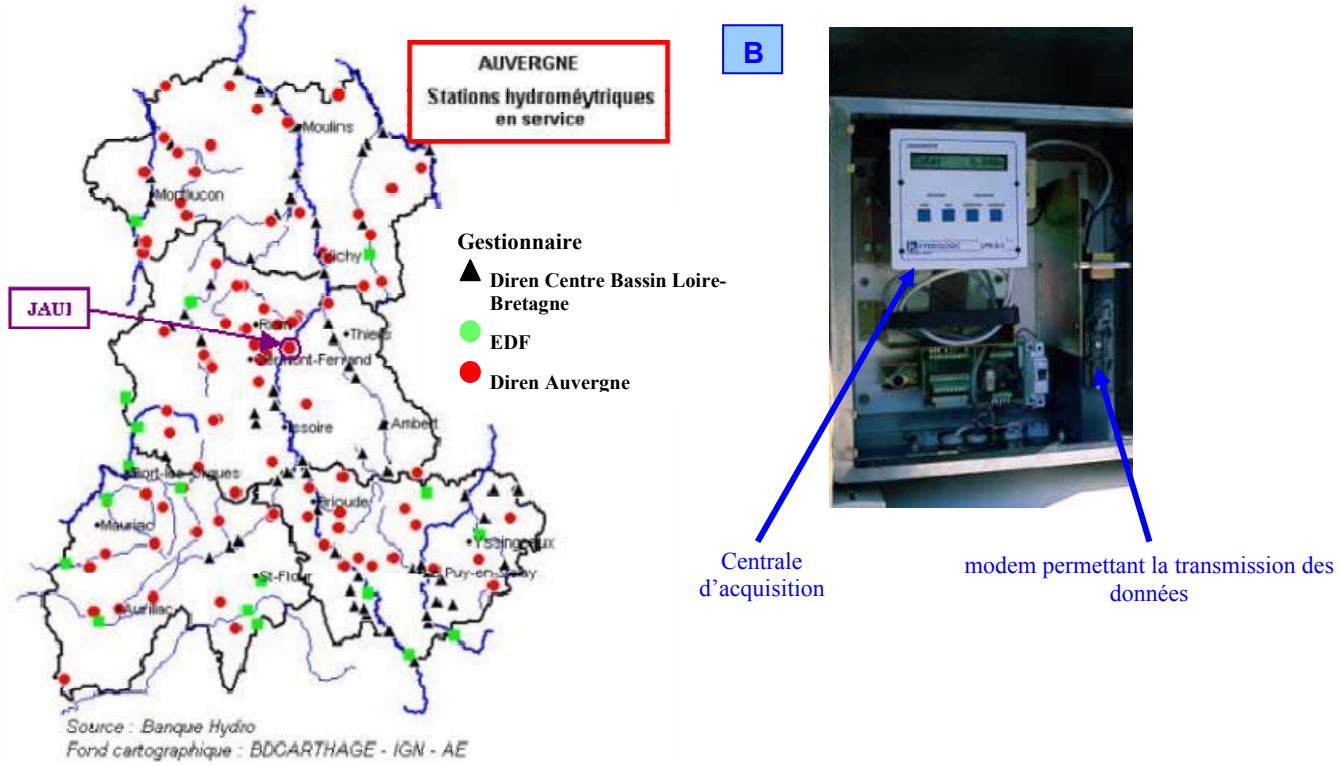
pendant 10 minutes afin d'éliminer le carbone inorganique dissous. Un volume de 100 µl a été alors injecté dans le tube à combustion chauffé à 680°C afin de décomposer le carbone en CO_2. La mesure du CO_2 a été effectuée au niveau d'une cellule de détection infrarouge non dispersif (NDIR) qui génère un pic dont l'aire est proportionnelle à la concentration en COD.

Suite à un problème de contamination des échantillons lors de leur conservation, les seuls résultats exploitables étaient ceux relatifs à l'étude menée en 2004 avec le diuron (*cf.* **Chapitre D.II**).

B.II.5. Mesure du débit et de la pluviométrie

La station "JAU1" est utilisée par la DIREN Auvergne comme station hydrométrique (code hydro K2714010) dans le cadre de la surveillance du niveau des cours d'eau dans le Puy-de-Dôme **(Fig. B-4A)**. De ce fait, elle est équipée d'une station d'acquisition permettant de mesurer automatiquement et d'enregistrer en continu le débit de l'eau **(Fig. B-4B)**. En 2003, ces données n'ont toutefois pu être récoltées entre le 31 juillet et le 10 novembre inclus, pour cause de vandalisme.

Figure B-4 : Répartition des stations hydrométriques en service dans la région Auvergne **(A)** et vue de l'intérieur d'un coffre d'enregistrement et de transmission des données **(B)**.



Les données de pluviométrie, mesurées quotidiennement à la station "Joze-bourg", située à environ 8 kilomètres au Nord-Est de la station "JAU1", ont été fournies par Météo France.

B.III. Etude du compartiment algal planctonique (phytoplancton) et périphytique (phytobenthos)

B.III.1. Collecte du phytobenthos

Le phytobenthos a été collecté sur des lames de verre (76 mm × 26 mm) fixées sur une plaque de plexiglas. L'utilisation de substrats artificiels permet de réduire l'hétérogénéité inhérente à l'utilisation de substrats naturels et facilite la comparaison entre plusieurs sites géographiques présentant des caractéristiques physiques différentes (Watanabe *et al.*, 1988 ; Aloi, 1990 ; Dorigo *et al.*, 2002). Les supports en verre présentent en outre l'avantage de posséder une surface uniforme, transparente et de taille précise à partir de laquelle il est aisé de décoller les organismes à l'aide d'une lamelle ou d'une lame de rasoir. Ils sont de ce fait souvent utilisés pour l'étude des communautés périphytiques (Guasch & Sabater, 1998 ; Masseret *et al.*, 1998 ; Dorigo *et al.*, 2002 ; Gustavson *et al.*, 2003). L'objectif de cette étude étant de suivre l'évolution du phytobenthos en fonction du contexte de pollution, les lames de verre ont été placées en position verticale, parallèlement au courant, afin de favoriser la croissance des espèces "véritablement" périphytiques et de limiter l'accumulation de matière détritique (Aloi, 1990 ; Masseret *et al.*, 1998). Les supports en plexiglas ont ainsi été fixés, à l'aide de piquets métalliques, au milieu du lit de la rivière à mi-hauteur de la colonne d'eau.

D'après Watanabe *et al.* (1988), les conditions environnementales ont un impact plus marqué durant la phase de colonisation des substrats, avant que la communauté périphytique ne tende vers un stade climacique[#]. En outre, une période courte permet de limiter la prolifération des macro-invertébrés et le phénomène de broutage. Les supports utilisés ont donc été immergés durant deux semaines **(voir chapitre D.I.2.)**, période de courte durée mais suffisante pour permettre la croissance des communautés algales (APHA, 1992 ; Guash & Sabater, 1998). Après colonisation, les lames de verre ont été récupérées et conservées au froid dans 30 ml d'eau distillée stérile durant le transport. Au laboratoire, chaque lame (10 par station) a été grattée à l'aide d'une lamelle et minutieusement rincée afin de détacher tous les organismes fixés et remettre ainsi en suspension le biofilm périphytique dans l'eau distillée. Pour chaque station, les échantillons issus des 10 lames ont été mélangés dans un volume final de 600 ml et homogénéisés avant l'analyse.

Au cours de l'année 2003, les supports ont été régulièrement sujets à vandalisme durant la période de colonisation. De ce fait, l'évolution du compartiment périphytique au cours de la première année d'étude n'a pu être appréhendée que de façon très ponctuelle.

[#] désigne ce qui se rapporte au climax c'est à dire au stade le plus évolué d'une succession écologique

B.III.2. Estimation de la biomasse algale

Les biomasses algales planctoniques et périphytiques ont été déterminées par mesures spectrophotométriques des teneurs en chlorophylle *a*. Cent cinquante à 500 ml de la colonne d'eau pour le phytoplancton et 10 à 50 ml du biofilm remis en suspension pour le phytobenthos ont été filtrés sur un filtre en fibre de verre type GF/F (Whatman, diamètre 25 mm). Le filtre a ensuite été immergé durant 1 minute dans l'azote liquide puis conservé à -80°C jusqu'à analyse. L'extraction des pigments a été réalisée à l'obscurité pendant un minimum de 12 heures en plongeant le filtre préalablement découpé en petits morceaux dans 3 ml d'acétone 90%. Après centrifugation pendant 15 minutes à 3000 g, le surnageant a été analysé par spectrophotométrie (SECOMAM S.500) d'après l'équation trichromatique de SCOR-UNESCO (1964).

La méthode spectrophotométrique nous a également permis d'effectuer une analyse pigmentaire plus large en évaluant notamment les teneurs en phaéopigments d'après l'équation de Lorenzen (1965). Toutefois, il a été montré que les valeurs obtenues par cette méthode, beaucoup moins résolutive qu'une analyse par HPLC, ne sont pas toujours très fiables et sont difficilement interprétables notamment pour l'appréciation de l'état physiologique des communautés algales (Louda & Monghkonsri, 2004). De ce fait, et au regard de certaines valeurs assez aberrantes, nous avons préféré ne pas en tenir compte dans notre travail.

B.III.3. Mesure de l'abondance algale et analyse de la composition taxonomique

Les échantillons à analyser (100 ml pour le phytoplancton et 30 ml pour le phytobenthos) ont été fixés au lugol (1%) et conservés à l'obscurité jusqu'à l'observation. Après sédimentation pendant une nuit d'un volume adapté pour chaque échantillon, l'identification (au niveau du genre) et le dénombrement des organismes a été effectué à l'aide d'un microscope inversé (Wild M40) d'après la méthode décrite par Utermöhl (1958).

B.IV. <u>Etude du compartiment bactérien</u>

B.IV.1. Paramètres quantitatifs

B.IV.1.1. Mesure de l'abondance bactérienne

B.IV.1.1.a. Principe

L'énumération directe des cellules bactériennes en microscopie à épifluorescence est une méthode largement utilisée en écologie aquatique (Kepner & Pratt, 1994). Le dénombrement des bactéries totales a été réalisé après marquage de l'ADN par un fluorochrome, le DAPI (4'-6 diamidino-2-phenylindole), spécifique des bases A-T. Sous excitation par une lumière U.V., le complexe ADN-DAPI fluoresce dans le bleu alors que le DAPI fixé sur du matériel "non-ADN" fluoresce dans le jaune (Porter & Feig, 1980).

B.IV.1.1.b. Protocole

Le protocole utilisé est celui décrit par Sumpono *et al.* (2003) d'après Hobbie *et al.* (1977). 2 ml d'échantillon ont été fixés au formaldéhyde (2% final) et conservés à l'obscurité à 4°C. Après marquage au DAPI (2,5 $\mu g.ml^{-1}$ final) pendant 20 minutes à l'obscurité, l'échantillon a été filtré sur membrane noire de porosité 0,22 µm (GTBP, Millipore) et les cellules bactériennes ont été dénombrées à l'aide d'un microscope à épifluorescence de type Olympus BH2 (filtre UV, UG1 DM 400).

B.IV.1.2. Estimation de la production bactérienne hétérotrophe

B.IV.1.2.a. Principe

Les méthodes les plus utilisées pour analyser la production bactérienne en milieu aquatique sont basées sur la mesure de la fréquence de division cellulaire (Hagström *et al.*, 1979 ; Newell & Christian, 1981), sur la détermination du taux de synthèse de l'ADN bactérien par incorporation de thymidine tritiée (Fuhrman & Azam, 1980, Riemann *et al.*, 1982) et sur la détermination du taux de synthèse protéique par incorporation de leucine tritiée (Kirchman *et al.*, 1985 ; Simon & Azam, 1989). Les deux premières méthodes correspondent à une estimation du taux de division bactérienne, alors que l'estimation de l'incorporation de leucine tritiée dans les protéines mesure un accroissement de la biomasse bactérienne.

B.IV.1.2.b. Protocole

Dans cette étude, la production hétérotrophe bactérienne a été estimée par incorporation de thymidine tritiée ([*methyl*-^{3}H] thymidine) suivant un protocole adapté de Fajon *et al.* (1999). La concentration saturante et le temps d'incubation optimal ont été déterminés à partir d'échantillons prélevés au début de l'étude.

La solution mère de thymidine tritiée présentant une activité spécifique de 86 $Ci.nmole^{-1}$ (Ammersham International,) a été ajoutée à 10 ml d'échantillon afin d'obtenir une concentration finale de 10 $nmole.l^{-1}$. Les échantillons, réalisés en duplicats, ont été incubés à température *in situ* pendant une heure. L'incorporation a été stoppée par ajout de 5 ml d'acide trichloroacétique (TCA, 20%) froid. Pour chaque duplicat, un témoin a été réalisé en ajoutant le TCA avant l'addition de ^{3}H-thymidine. Les macromolécules précipitées par le TCA ont été collectées par filtration sur membrane de porosité 0,22 µm (GSWP, Millipore). Les filtres ont alors été rincés cinq fois avec 2 ml de TCA froid (5%) et une fois avec 5 ml d'éthanol (70%) puis placés dans des fioles à scintillation contenant 5 ml de liquide scintillant (Ready safe, Beckman Coulter). Après une heure d'incubation à température ambiante, la radioactivité a été mesurée à l'aide d'un compteur à scintillation (Beckman Coulter, LS6500) à partir du

calcul du nombre de désintégrations par minute (dpm). La production bactérienne, exprimée en nmole de thymidine incorporée par litre et par heure, a été déterminée alors à partir de l'équation suivant :

$$\textbf{PRODUCTION} = [(dpm_{échantillon} - dpm_{témoin}) / (2{,}22.10^6 \times AS)] \times (1000 / V) \times (60 / t)$$

$dpm_{échantillon}$: nombre moyen de désintégrations par minute pour l'échantillon

$dpm_{témoin}$: nombre moyen de désintégrations par minute pour le témoin

AS : activité spécifique de la thymidine tritiée en $\mu Ci.nmole^{-1}$

$2{,}22.10^6$: facteur de conversion de dpm en µCi

V : volume incubé en ml

t : temps d'incubation en minutes

Ce taux d'incorporation a été converti en nombre de cellules produites par unité de temps et de volume à l'aide du facteur de conversion de $2 .10^{18}$ cellules bactériennes par molécule de thymidine tritiée incorporée (Bell, 1993).

B.IV.1.3. Estimation de la proportion de bactéries présentant une activité respiratoire

B.IV.1.3.a. Choix du marqueur d'activité

La détection en milieu naturel de la fraction de cellules bactériennes vivantes présentant une activité physiologique est d'un grand intérêt en écologie microbienne (Joux & Lebaron, 2000). Ces données n'ont longtemps été accessibles que *via* les méthodes culturales dont les limites ne se restreignaient qu'à la proportion de bactéries cultivables (Ward *et al.*, 1990). De nouvelles techniques ont été développées, au cours de la dernière décennie, afin d'étudier la fraction bactérienne dite "viable mais non cultivable" (VNC ou VBNC) (Barer & Harwood, 1999). Ces méthodologies sont basées sur des comptages directs à l'aide de divers fluorochromes. Différents critères sont utilisés pour déterminer la viabilité et éventuellement l'activité des bactéries :

- <u>présence de matériel génétique</u> : méthodes Nucc ("nucleoid-containing cells" ; Zweifel & Hagström, 1995 ; Choi *et al.*, 1996) et HDNA ("high DNA content" ; Gasol *et al.*, 1999 ; Grégori *et al.*, 2001 ; Lebaron *et al.*, 2001) ;
- <u>potentiel membranaire</u> : marquage à la rhodamine 123 (Kaprelyants & Kell, 1992 ; Porter *et al.*, 1995) ;
- <u>intégrité membranaire</u> : couplage entre un fluorochrome capable de pénétrer à travers toutes les membranes bactériennes, intactes ou endommagées (SYBR green, SYTO 9…) et l'iodure de propidium qui ne marque que les cellules altérées (Gasol *et al.*, 1999 ; Grégori *et al.*, 2001) ;

- activité estérase : utilisation de différents marqueurs tels que le diacétate de fluorescéine (FDA) ou le diacétate de carboxyfluorescéine (CFDA) (Porter *et al.*, 1995 ; Yamaguchi *et al.*, 1997 ; Catala *et al.*, 1999 ; Parthuisot *et al.*, 2000) ;
- activité respiratoire : utilisation de sels de tétrazolium qui s'intercalent dans la chaîne de transport d'électrons. Le marqueur le plus généralement utilisé est le 5-cyano-2,3-ditolyl tétrazolium chloride (CTC ; Rodriguez *et al.*, 1992 ; Choi *et al.*, 1996 ; Yamaguchi *et al.*, 1997 ; Berman *et al.*, 2001).

Dans cette étude, la mesure de l'activité respiratoire par marquage au CTC a été utilisée. Cette technique présente l'avantage de cibler la fraction bactérienne la plus active au sein de la communauté (Sherr *et al.*, 1999 ; Nielsen *et al.,* 2003) et d'être facilement détectable par microscopie à épifluorescence, même en présence de bactéries de petites tailles (Rodriguez *et al.*, 1992). De plus, l'activité respiratoire demeure l'un des critères les plus utilisés pour caractériser l'état physiologique des communautés bactériennes en milieu lotique (Yamaguchi *et al.*, 1997 ; Proctor & Souza, 2001 ; Klammer *et al.*, 2002 ; Araya *et al.*, 2003) ce qui favorise la comparaison des résultats obtenus avec ceux disponibles dans la littérature.

B.IV.1.3.b. Protocole

Après ajout d'une solution de CTC (Sigma, 5 mM final) et incubation à température ambiante pendant 4 heures, les échantillons (2 ml) ont été fixés avec du formaldéhyde (2% final) puis conservés à l'obscurité à 4°C (Joux & Lebaron, 1997). Avant l'observation, les cellules ont été marquées au DAPI (2,5 $\mu g.ml^{-1}$ final) comme décrit précédemment et filtrées sur membrane Nucléopore noire (GTBP Millipore). Le comptage des bactéries a été effectué à l'aide d'un microscope à épifluorescence (Olympus BH2) muni d'un filtre UV (UG1, DM400) pour le dénombrement des bactéries totales et d'un filtre B (BP490, DM500) pour le dénombrement des bactéries CTC-positives. Le pourcentage de bactéries présentant une activité respiratoire a été exprimé par le rapport entre le nombre de cellules CTC-positives et le nombre total de cellules marquées au DAPI.

B.IV.2. Paramètres visant à analyser la composition de la communauté bactérienne

B.IV.2.1. Analyse de la structure de la communauté bactérienne par hybridation *in situ* (FISH)

B.IV.2.1.a. Principe

Depuis une quinzaine d'années, les sondes oligonucléotidiques ciblant l'ARN ribosomal (ARNr) 16S ou 23S sont des outils fréquemment utilisés pour la détection *in situ* de groupes ou d'espèces bactériennes (Amann *et al.*, 1990, 2001). Les champs d'application de cette méthodologie sont vastes et incluent les domaines médicaux et environnementaux (voir pour

revue Moter & Göbel, 2000). La méthode FISH est utilisée "en routine" pour caractériser la structure globale des communautés bactériennes en milieu naturel, notamment dans les écosystèmes aquatiques, qu'ils soient marins (Glöckner *et al.*, 1999 ; Cottrell & Kirchman, 2000 ; Zubkov *et al.*, 2001), estuariens (Castle & Kirchman, 2004 ; Cottrell & Kirchman, 2004 ; Yokokawa *et al.*, 2004) ou d'eau douce (Glöckner *et al.*, 1999 ; Kenzaka *et al.*, 2001 ; Klammer *et al.*, 2002 ; Araya *et al.*, 2003).

B.IV.2.1.b. Sondes oligonucléotidiques utilisées dans cette étude

Quatre sondes oligonucléotidiques marquées à l'indo-carbo-cyanine (CY3 ; Glöckner *et al.*, 1996) ont été utilisées dans cette étude. Ces sondes sont spécifiques des bactéries appartenant aux sous-classes α-(Alf1b), β-(Bet42a), γ-(Gam42a) des Protéobactéries et aux genres *Cytophaga* et *Flavobacterium* (CF319a) **(Tableau B-2)**. Ces groupes taxonomiques ont été particulièrement ciblés en raison de leur prédominance dans les milieux aquatiques lotiques (Kenzaka *et al.*, 2001 ; Klammer *et al.*, 2002 ; Araya *et al.*, 2003).

Tableau B-2 : Sondes oligonucléotidiques utilisées pour l'hybridation *in situ*.

[a] Chez E. coli [b] Pourcentage de formamide (FA) utilisé dans le tampon d'hybridation

Sonde	Cible	Région ciblée [a]	Séquence (5' →3')	FA[b]	Référence
ALF1	*α- Proteobacteria*	16S, 19-35	GGT AAG GTT CTG CGC AGC	20	Manz *et al.* 1992
BET42a	*β- Proteobacteria*	23S, 1027-143	GCC TTC CCA CTT CGT TT	35	
GAM42a	*γ- Proteobacteria*	23S, 1027-1043	GCC TTC CCA CAT CGT TTT	35	
CF319a	*Cytophaga-Flavobacterium*	16S, 319-336	TGG TCC GTG TCT CAG TAC	35	Manz *et al.* 1996

B.IV.2.1.c. Hybridation et dénombrement

Quarante millilitres d'échantillon ont été fixés avec du paraformaldéhyde (3% final), incubés à 4°C pendant 16 à 24 heures puis centrifugés 25 minutes à 8000 rpm (centrifugeuse BECKMAN, rotor JA 14). Le culot a été rincé avec 20 ml de PBS 1X et à nouveau centrifugé pendant 25 minutes à 8000 rpm. Les cellules présentes dans le culot ont été conservées dans 1 ml d'un mélange PBS 1X/éthanol 70% (vol/vol) à -20°C jusqu'à l'hybridation.

L'hybridation a été réalisée suivant le protocole décrit par Araya *et al.* (2003). Un volume, variable selon la densité cellulaire, a été filtré sur un filtre blanc Millipore (GTTP) de porosité 0,22 µm, découpé ensuite en quatre sections destinées à l'hybridation des cellules bactériennes par une des quatre sondes décrites ci-dessus. Chaque section a été placée sur une lame de verre et recouverte avec 50 µl de tampon d'hybridation contenant la sonde **(Tableau B-3A)**. L'hybridation a été réalisée dans une boîte noire à 46°C pendant 90 min. Du papier Whatmann, humidifié avec le tampon d'hybridation (dépourvu de sonde), a été placé dans les

boîtes afin de prévenir la déshydratation des sections de filtre durant le processus d'hybridation.

Des sondes compétitrices non fluorescentes ont été utilisées en concentration double lors de l'hybridation avec les sondes BET42a et GAM42a, chacune de ces sondes servant de compétiteur mutuel l'une pour l'autre (Manz *et al.*,1992). A l'issu de l'étape d'hybridation, chaque section de filtre a été incubée 20 minutes à 48°C dans 20 ml d'une solution de lavage **(Tableau B-3B)**, préchauffée à cette température.

Tableau B-3 : Composition des solutions d'hybridation **(A)** et des solutions de lavage **(B)** pour l'hybridation avec chacune des sondes.

A

A	ALF1b	BET42a	GAM42a	CF319a
NaCl	0,9 M	0,9 M	0,9 M	0,9 M
Tris/HCl	20 mM	20 mM	20 mM	20 mM
SDS	0,01%	0,01%	0,01%	0,01%
Formamide	20%	35%	35%	35%
Sonde	2,5 ng μl^{-1}	2,5 ng μl^{-1}	2,5 ng μl^{-1}	2,5 ng μl^{-1}
Compétiteur		5 ng μl^{-1}	5 ng μl^{-1}	

B

B	ALF1b	BET42a	GAM42a	CF319a
NaCl	180 mM	40 mM	40 mM	40 mM
Tris/HCl	20mM	20mM	20mM	20mM
SDS	0,01%	0,01%	0,01%	0,01%
EDTA	5mM	5mM	5mM	5mM

Après séchage, les sections de filtre ont été placées sur une lame de verre en chambre humide (eau stérile) et recouvertes par 35 µl d'une solution de DAPI (10 µg l^{-1}). Après 20 minutes d'incubation à température ambiante et à l'obscurité, le DAPI en excès a été éliminé en filtrant progressivement 30 ml d'eau stérile sur les 4 sections. Les filtres ont été placés entre lame et lamelle dans un milieu glycérolé (huile Citifluor, Canterbury). Les bactéries sont dénombrées en microscopie à épifluorescence (Leica DM-IRB) sous filtre UV (DAPI) et sous filtre vert ($\lambda_{excitation}$ =512 nm ; $\lambda_{émission}$ = 615 nm). La proportion relative de chaque groupe ciblé a été exprimée par rapport au nombre total de bactéries marquées au DAPI.

B.IV.2.2. Analyse de la diversité génétique de la communauté bactérienne par électrophorèse sur gel à gradient temporel de température (TTGE).

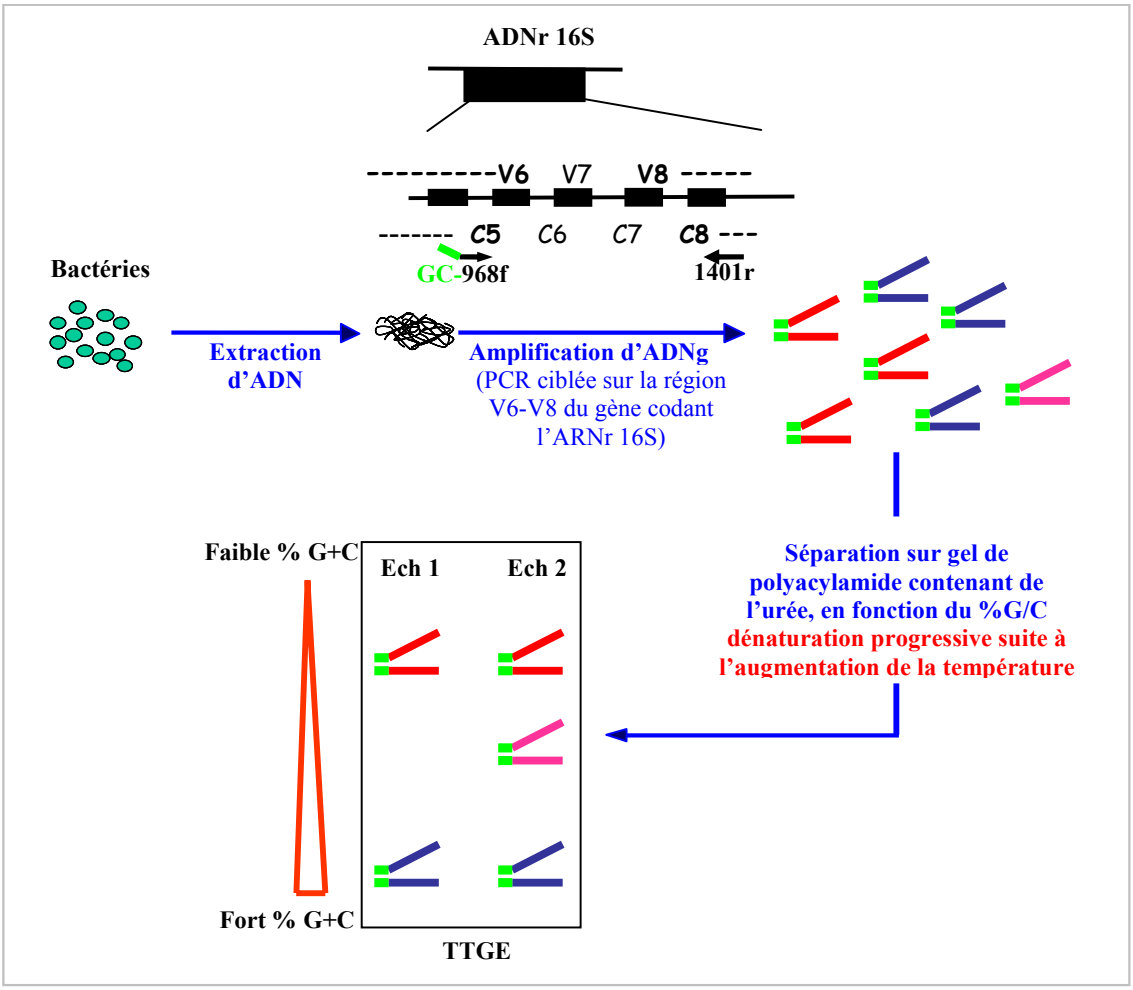
B.IV.2.2.a. Principe

L'émergence des méthodes dites "d'empreinte génétique", dans les années 1990, a permis une grande avancée dans l'étude de la diversité au sein des communautés microbiennes, mettant en évidence l'existence d'espèces bactériennes non encore décrites et non cultivables.

Muyzer *et al.* (1993) furent les premiers à appliquer la technique de migration de fragments d'ADN amplifiés à partir d'une région de l'ARNr 16S sur un gel de polyacrylamide en conditions dénaturantes (DGGE) afin de caractériser le profil génétique d'une communauté bactérienne.

Cette méthodologie permet la séparation de fragments de même taille mais présentant des séquences différentes. Cette séparation est basée sur la mobilité électrophorétique de molécules d'ADN doubles brins partiellement dénaturées, sur des gels dénaturants de polyacrylamide, en fonction d'un gradient linéaire de température (TTGE) ou d'agents dénaturants (DGGE). Lorsqu'une molécule d'ADN a atteint sa température de fusion (T_m), la migration de la molécule sur le gel est stoppée. Ainsi, des variations de séquences entre les fragments d'ADN (fonction du pourcentage G+C) conduisent à des variations de la T_m, et les fragments d'ADN présentant des séquences différentes stoppent leur migration à différentes positions sur le gel **(Fig. B-5)**.

Figure B-5 : Schématisation du principe de l'électrophorèse sur gel à gradient temporel de température.



Trois techniques sont ainsi fréquemment utilisées en écologie microbienne : l'électrophorèse sur gel de gradient dénaturant (DGGE : Denaturing Gradient Gel Electrophoresis ; Muyzer *et al.*, 1993), l'électrophorèse sur gel à gradient temporel de température (TTGE : Temporal Temperature Gradient Gel Electrophoresis ; Bosshard *et al.*, 2000) et l'électrophorèse sur gel à gradient de température (TGGE : Temperature Gradient Gel Electrophoresis ; Brümmer *et al.*, 2003). Ces techniques représentent des outils de choix pour l'analyse simultanée de plusieurs échantillons dans le cadre d'un suivi de l'évolution spatiale ou temporelle des communautés bactériennes (Muyzer, 1999), par exemple dans un contexte de pollution (Cody *et al.*, 2000 ; Brümmer *et al.*, 2003).

B.IV.2.2.b. Extraction de l'ADN génomique (ADNg)

Le protocole utilisé pour l'extraction d'ADNg suit celui décrit par Sumpono (2002). Quarante à 120 ml d'échantillon ont été centrifugés (18000 rpm, 30 min, 4°C ; centrifugeuse Beckman, rotor JA 20). Le culot a été repris dans 545 µl de tampon TE (Tris 10 mM, pH8/EDTA 1mM) à pH 8 et conservé à –20°C jusqu'à l'extraction.

Les bactéries ont été lysées par ajout de 25 µl de lysozyme (50 $mg.ml^{-1}$, Sigma) pendant 30 minutes à 37°C. Les protéines ont été solubilisées et digérées par addition de 30 µl de SDS 10% et 3 µl de protéinase K (5 $mg.ml^{-1}$, Sigma) à 37°C pendant 60 min. Cent microlitres de NaCl 5 M et 80 µl de CTAB/NaCl (1% poids/volume), préchauffés à 65°C, ont été ajoutés et le mélange a été placé 10 minutes à 65°C.

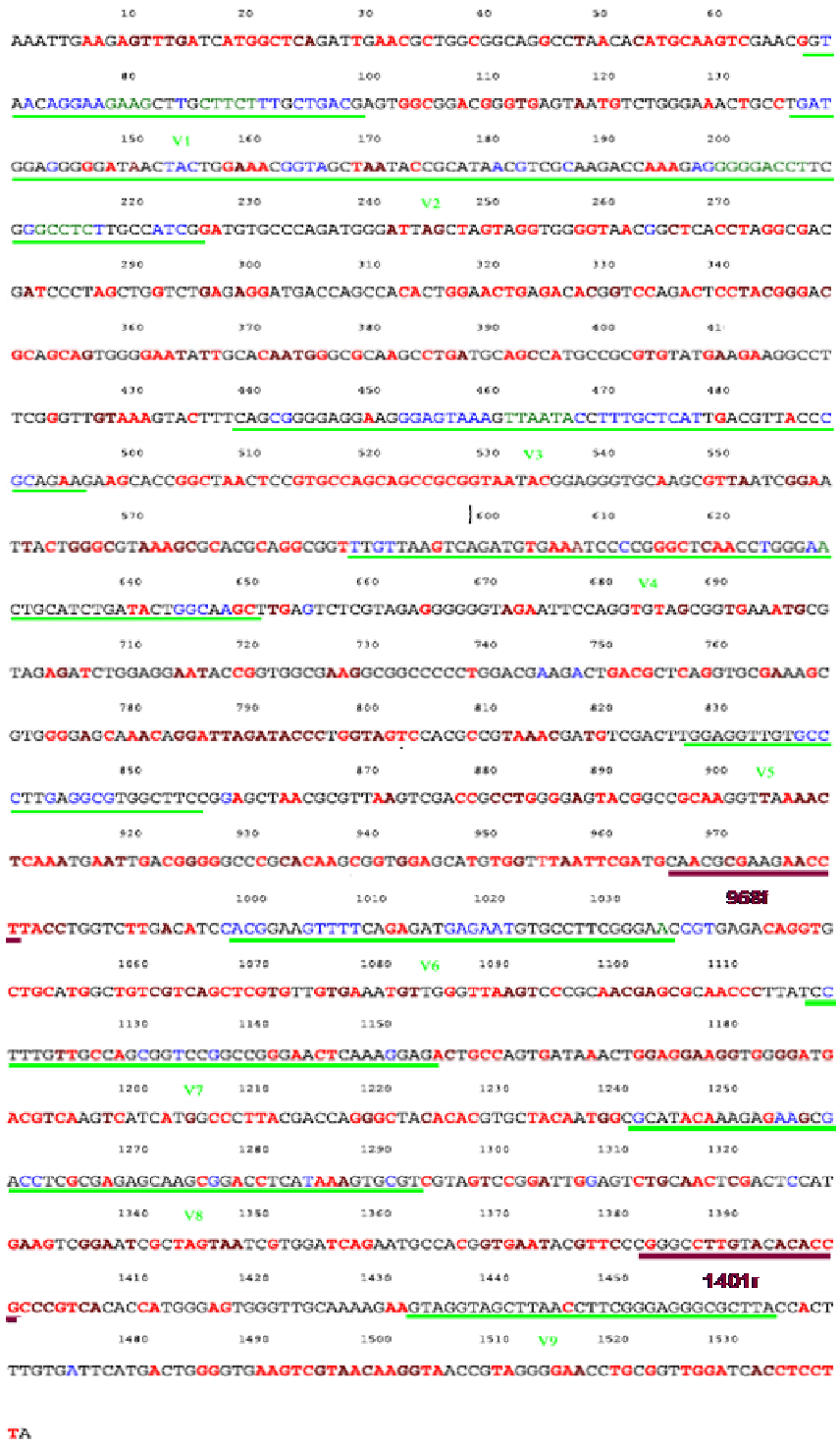
785 µl de chloroforme/alcool isoamylique (24:1) ont été ajoutés. Après centrifugation (18000 g, 15 min, 4°C), l'ADN contenu dans la phase aqueuse a été précipité par addition de 0,7 volume d'isopropanol. Le mélange a été plaçé à –20°C pendant un minimum de 45 minutes, puis centrifugé (18000 g, 15 min, 4°C). Le culot a été lavé avec 500 µl d'éthanol 70%, et centrifugé (18000 g, 10 min, 4°C). Le culot a été séché sous vide, repris dans 50 µl de tampon TE et conservé une nuit à 4°C pour permettre la dissolution des acides nucléiques dans le tampon.

Cinq microlitres de RNaseA (1 $mg.ml^{-1}$, Sigma) ont été ajoutés. Après une incubation de 30 minutes à 37 °C, 445 µl de TE, 50 µl d'acétate de sodium 3 M (pH 5,2) et 350 µl d'isopropanol ont été ajoutés. L'ADNg a été précipité comme précédemment décrit. L'intégrité de l'ADNg a été vérifiée par électrophorèse sur gel d'agarose 0,8% (Sigma), après coloration au bromure d'éthidium (0.5 $\mu g.ml^{-1}$).

B.IV.2.2.c. Amplification par "Polymerase Chain Reaction" (PCR)

Les régions variables V6 à V8 du gène codant pour l'ARNr 16S **(Fig. B-6)** ont été amplifiées par PCR à partir des amorces GC-968f (5'-CGC CCG GGG CGC GCC CCG GGC GGG GCG GGG GCA CGG GGG GAA CGC GAA GAA CCT-3') et 1401r (5'-CGG TGT GTA CAA GAC CC-3') selon un protocole adapté de Lay *et al.* (2004).

Figure B-6 : Carte de variabilité de la séquence du gène codant pour l'ARNr 16S chez *E. coli* et localisation des régions variables V1 à V9 (Baker *et al.*, 2003 d'après Van de Peer *et al.*, 1996).



CODE COULEUR
Totalement conservé
Conservé
Variable
Fortement variable
Variabilité> 75%
Régions variables
Primers utilisés

La séquence riche en GC ("queue GC" ou "GC-clamp") ajoutée à l'extrémité 5' de l'amorce 968f joue le rôle d'un domaine hautement fusionné évitant une dissociation complète des doubles brins d'ADN en simples brins lors de la migration (Myers *et al.*, 1985).

Les amplifications PCR ont été réalisées à partir d'un mélange réactionnel (volume final 50 µl) contenant du tampon (1X final), 2,5 mM de $MgCl_2$, 200 µM de chaque dNTP, 20 pmol de chaque amorce, 2,5 unités de Taq polymérase HotStar (Qiagen) et 1 à 5 µl d'ADN génomique suivant les échantillons. Les amplifications PCR ont été réalisées sur un thermocycleur (GeneAmp PCR system 2400, Perkin Elmer) selon le programme suivant :

1. DENATURATION INITIALE
   ET ACTVATION DE LA TAQ : 95°C, 15 min

2. DENATURATION : 97°C, 1 min **3. HYBRIDATION : 58°C, 1 min** **4. ELONGATION : 72°C, 1 min 30**	**30 cycles**

5. ELONGATION FINALE : 72°C, 10 minutes

La taille des produits d'amplification PCR (450 pb) et leur intégrité sont vérifiées sur gel d'agarose 2,5% (wt/vol). Le dosage des produits PCR a été réalisé par spectrofluorimétrie avec le Kit "DNA Quantitation kit fluorescence Assay" (Sigma).

B.IV.2.2.d. Temporal Temperature Gel Gradient Electrophoresis (TTGE)

Les produits d'amplification PCR (300 ng) ont été déposés dans les puits à l'aide d'un tampon de charge (blue gel loading dye, Promega) sur gel de polyacrylamide 8% contenant de l'urée (7 M), du tampon Tris Acétate EDTA (TAE, 1,25X), du Temed (0,06%) et de l'ammonium persulfate (6 ,25%). Après une pré-migration à 20 V et 66°C pendant 15 minutes, la migration a été effectuée pendant 17 h à 68 V, avec un incrément thermique de 0,2°C/h (66°C à 69,7°C) avec le Dcode™ System (Bio-Rad).

Les profils de migration ont ensuite été révélés après 30 min d'incubation à l'obscurité sous agitation légère dans une solution de GelStar (Nucleic Acid Gel Stain, 0,5 $\mu g.ml^{-1}$, BMA) et numérisés avec l'analyseur d'images Versa Doc™ Imaging System (Bio-Rad). Les profils TTGE obtenus ont été analysés avec le logiciel Quantity One-4.6 (Bio-Rad).

B.IV.2.2.e. Analyse des profils électrophorétiques

Les similarités entre les différents profils ont été calculées selon l'indice de Dice d'après les données présence/absence des bandes, avec la possibilité d'intégrer ou non l'intensité de

celles-ci afin d'augmenter le pouvoir d'interprétation des résultats (Muylaert *et al.*, 2002). A partir de la matrice obtenue, un dendrogramme a été construit suivant l'algorithme UPGMA (Unweighted Pair Group Method with Arithmetic mean).

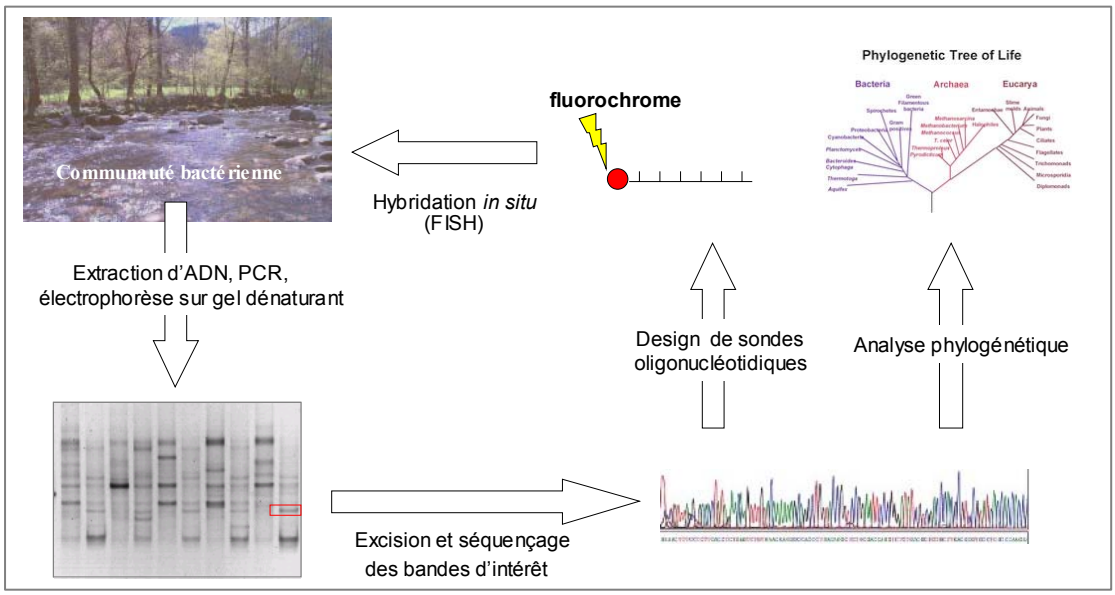
Pour permettre la comparaison de profils obtenus à partir de gels différents, une échelle a été constituée à partir de fragments de la même région d'ADNr 16S issus de souches bactériennes connues (*Alcaligenes faecalis*, *Flavobacterium aquatile, Kurthia zopfii, Stenotrophomonas maltophilia*) présentant un pourcentage de bases G+C différent sur la région amplifiée.

B.IV.2.3. Identification des espèces bactériennes par séquençage

B.IV.2.3.a. Excision des bandes et ré-amplification de l'ADN

La TTGE offre l'avantage d'identifier des membres de la communauté par séquençage des bandes d'intérêt excisées du gel. L'identification des bandes peut, notamment, permettre le dessin de sondes spécifiques utilisées secondairement pour cibler les populations d'intérêt dans leur environnement naturel par hybridation *in situ* (**Fig. B-7** ; Muyzer, 1999).

Figure B-7 : Exemples de possibilités offertes par les méthodes d'électrophorèse sur gel dénaturant dans l'étude de la structure des communautés bactériennes (modifié d'après Muyzer, 1999)



Les bandes d'intérêt, excisées du gel ont été incubées une nuit à 37°C dans 200 µl de tampon d'élution (acétate d'ammonium 0,5 M, EDTA 1 M pH 8). Après centrifugation (18000 g, 10 min), l'ADN contenu dans le surnageant a été précipité par ajout de 400 µl d'éthanol absolu et le mélange a été incubé au moins 1 heure à –20°C. Après centrifugation (18000 g, 15 min, 4°C), le culot a été repris dans 200 µl de tampon TE (pH 8) puis précipité au moins 1 heure à -20°C après addition de 25 µl d'acétate de sodium 3 M et de 160 µl d'isopropanol. Après centrifugation (18000 g, 15 min, 4°C), le culot a été lavé avec 500 µl d'éthanol 70%,

centrifugé (18000 g, 10 min, 4°C), séché sous vide, puis conservé à 4°C dans 25 µl de tampon TE (Sumpono, 2002).

L'ADN ainsi élué a été réamplifié par PCR à l'aide des amorces GC-968f et 1401r selon le protocole décrit précédemment. Afin de vérifier la pureté des bandes et la distance de migration par rapport au profil initial, ces amplicons ont été déposés sur gel de TTGE avec l'échantillon initial. Ces différentes étapes (découpage, réamplification et migration) sont répétées plusieurs fois jusqu'à obtention d'une bande unique.

Les amplicons ainsi purifiés ont été amplifiés par PCR (amorces 968f/1401r ; Filion *et al.*, 2004) à partir d'un mélange réactionnel (volume final 50 µl) contenant du tampon (1X final), 1,5 mM de $MgCl_2$, 200 µM de chaque dNTP, 10 pmol de chaque amorce, 2,5 unités de Taq Bioline (Abcyss) et 3,5 µl d'ADN. L'amplification a été effectuée selon le programme suivant : 95°C pendant 10 minutes ; 30 cycles comprenant une phase de dénaturation (30 secondes à 97°C), une phase d'hybridation (30 secondes à 58°C) et une phase d'élongation (45 secondes à 72°C) ; élongation finale (10 minutes à 72°C).

B.IV.2.3.b. Construction des banques de clones

Le fragment d'ADN réamplifié (amorce sans queue GC) a été cloné dans le plasmide pGEM-T-Easy (Promega) selon les instructions du fournisseur. La réaction de ligature a été incubée 16 heures à 4°C. La transformation a été réalisée dans des cellules compétentes *E. coli* XL1-Blue (Stratagene) par choc thermique. 5 µl de produit de ligature ont été incubés avec 100 µl de suspension de bactéries compétentes dans la glace pendant 20 minutes, placés à 42°C pendant 2 minutes puis remis 5 minutes dans la glace. Après ajout de 500 µl de milieu Luria Bertani (LB) liquide, les tubes ont été incubés à 37°C sous agitation pendant 1 heure. 150 µl de suspension ont alors été étalés sur boîtes de milieu LB gélosé contenant 100 µg ml^{-1} d'ampicilline, 40 µg ml^{-1} de 5-bromo-4-chloro-3-indoyl-β-D-galactopyranoside (X-gal) et de 32 µg ml^{-1} d'isopropyl-beta-D-thiogalactopyranoside (IPTG). Les boîtes ont été placées à 37°C pendant une nuit. Les colonies ont été sélectionnées par criblage blanc/bleu. Les colonies blanches ont alors été ensemencées dans 5 ml de LB liquide contenant 100 µg ml^{-1} d'ampicilline et cultivées une nuit à 37°C sous agitation.

B.IV.2.3.c. Mini-préparation de l'ADN plasmidique et séquençage

1,5 ml de la culture bactérienne ont été centrifugés (18000 g, 5 minutes), le culot a été repris dans 150 µl de solution P1 contenant de la RNase A (100 mg l^{-1}), 200 µl de tampon de lyse P2 et 150 µl de solution P3 **(Tableau B-4)**. Le mélange a été placé pendant 10 minutes dans la glace avant d'être centrifugé 30 minutes à 18000 g. Le surnageant contenant l'ADN plasmidique a été précipité avec ajout de 2 volumes d'éthanol absolu et incubé 1 heure à

-20°C. Après centrifugation (18000 g, 30 minutes, 4°C), le culot a été lavé avec 500 µl d'éthanol 70%, centrifugé (18000 g, 10 minutes, 4°C), séché sous vide, et repris dans 50 µl d'eau milliQ.

Tableau B-4 : Composition des solutions P1, P2 et P3 utilisées pour la mini-préparation de l'ADN plasmidique.

P1	Tris Base (6,06 g) ; $Na_2EDTA.2H_20$ (3,72 g) ; HCl (pour ajuster à pH 8) ; dH_2O (qsp 1L)
P2	NaOH (8 g) ; SDS 20% (50 ml) ; dH_2O (qsp 1L)
P3	acétate de potassium (294,5 g) ; acide acétique glacial (pour ajuster à pH 5,5) ; dH_2O (qsp 1L)

L'ADN plasmidique a été amplifié par PCR (amorces GC-968f/1401r). Les produits PCR ont été analysés par la méthode de TTGE comme décrit précédemment pour contrôler leur distance de migration éléctrophorétique par rapport à celle de la bande initiale. L'ADN plasmidique correspondant aux fragments et présentant une migration correcte a alors été dosé par spectrométrie (λ= 260 nm). Le séquençage a été réalisé par la société MWG-Biotech.

B.IV.2.3.d. Analyses phylogénétiques

Les séquences ont été préalablement analysées à l'aide du programme CHECK CHIMERA 2.7. (Ribosomal Database Project ; http://rdp.cme.msu.edu/) afin de détecter la présence éventuelle de séquences chimériques. Les séquences non suspectes ont été alignées avec les séquences d'ADNr 16S de la base de données GenBank à l'aide du programme BLASTn disponible sur le site de NCBI (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/ ; Altschul *et al*., 1990). L'insertion des séquences dans la base de données ARB (Ludwig *et al.,* 2004) a été réalisée après un alignement manuel des séquences et vérification de la structure secondaire de l'ARNr16S. L'insertion des nouvelles séquences a été réalisée sans modification de la topologie de l'arbre phylogénétique initial.

B.V. Traitement statistique

Lors des études *in situ*, les corrélations entre les différents paramètres (biotiques et abiotiques) ont été appréciées deux à deux à l'aide du coefficient de corrélation linéaire de Pearson et de manière globale à partir d'Analyses en Composantes Principales (ACP) à l'aide du logiciel R (version 1.7.1). Pour les études expérimentales, les résultats obtenus en présence ou non de polluant ont été comparés à l'aide d'analyses de variances (ANOVA) à deux facteurs (présence de pesticide/temps) en tenant compte de la répétition des mesures à l'aide du logiciel Minitab. Pour l'ensemble des études statistiques, le seuil de significativité a été fixé à p=0,05.
La normalité des données a été testée avec le logiciel Minitab et les valeurs ont été transformées selon la formule "log (x+1)" si nécessaire.

CHAPITRE C

Evolution des communautés microbiennes dans un cours d'eau soumis à l'apport régulier de pesticides (Jauron, Puy-de-Dôme).

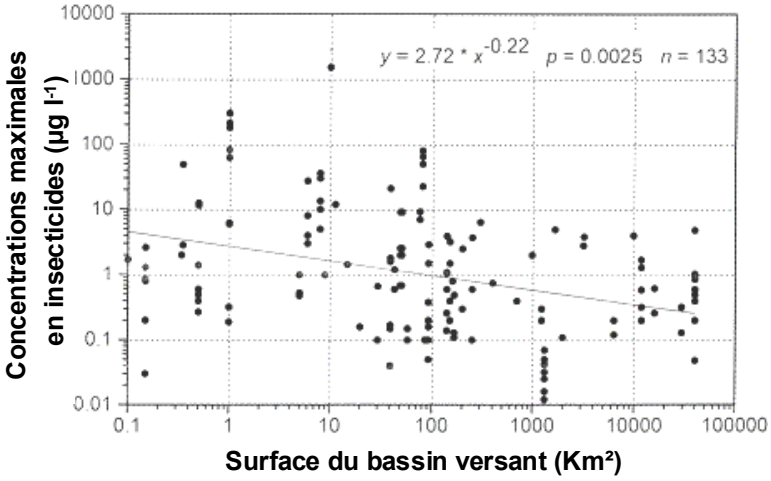
Comparaison au cours de deux années successives (2003 et 2004).

Chapitre C - EVOLUTION DES COMMUNAUTES MICROBIENNES DANS UN COURS D'EAU SOUMIS A L'APPORT REGULIER DE PESTICIDES (JAURON, PUY-DE-DOME). COMPARAISON AU COURS DE DEUX ANNEES SUCCESSIVES (2003 ET 2004).

C.I. Objectifs

L'impact des pesticides sur les communautés microbiennes a été largement appréhendé de manière expérimentale (voir par exemple pour revue DeLorenzo *et al.*, 2001 et Fleeger *et al.*, 2003) mais peu d'études décrivent ces effets dans des écosystèmes naturels (Dorigo *et al.*, 2002 ; 2004). Parmi ces écosystèmes, les rivières sont particulièrement polluées par les pesticides, surtout celles caractérisées par un petit bassin versant. Ainsi, dans une revue récente, Schulz (2004) a montré que la contamination des cours d'eau par les insecticides est généralement d'autant plus élevée que la surface du bassin versant correspondant est faible **(Fig. C-1)**.

Figure C-1 : Relation entre la surface du bassin versant et les concentrations maximales en insecticides détectées dans des eaux de rivière (d'après Schultz, 2004).



Le Jauron est une rivière présentant un bassin versant d'environ 120 km². La présence régulière de pesticides dans ses eaux, associée à des zones de pollution bien déterminées, en font un site de choix pour étudier l'impact de ces polluants dans le milieu naturel **(voir chapitre B.I.)**. Ce chapitre, est consacré à la caractérisation de l'évolution saisonnière des microorganismes, d'un point de vue quantitatif et qualitatif, en fonction du niveau de pollution par les pesticides, afin d'apprécier l'influence de ces molécules sur les communautés microbiennes algales et bactériennes .

Pour ce faire, l'activité et la diversité de ces deux communautés ont été mesurées et comparées au niveau de trois stations d'échantillonnage caractérisées par des profils de pollution différents **(voir chapitre B.I.2.2** et **Fig. B-2)**: la station **JAU1**, localisée à l'exutoire du bassin versant en zone de culture intensive (pollution agricole), la station **JAU4**, alimentée par le rejet de la station d'épuration de la ville de Billom (4300 habitants) et située sur un affluent du Jauron (pollution urbaine), et la station **JAU3**, située en aval d'une zone d'élevage de moyenne montagne et peu exposée à la présence de pesticides.

Ce travail a été mené à partir de prélèvements mensuels effectués pendant deux années successives (2003 et 2004). Les résultats obtenus au cours de ces deux années seront décrits et discutés séparément avant d'être comparés et analysés de manière globale. Le suivi effectué au cours de l'année 2004 a donné lieu à une publication (Pesce *et al.*, soumis[a]).

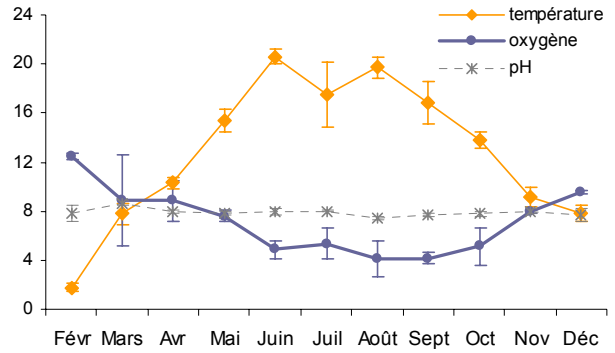
C.II. Influence des pesticides sur les communautés microbiennes au cours de l'année 2003

C.II.1. Résultats

C.II.1.1. Caractéristiques physico-chimiques des trois stations

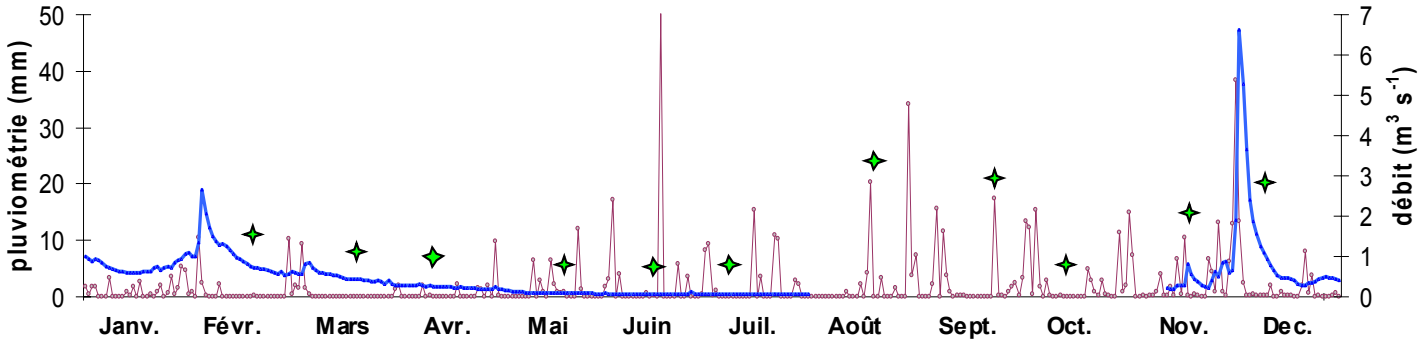
Au cours de l'année 2003 (année de forte canicule estivale), les évolutions moyennes de la température de l'eau, de la concentration en oxygène dissous et du pH aux trois stations de prélèvement sont illustrées sur la **Figure C-2**. La température de l'eau fluctue entre 1,8°C et 20,6°C. Le pH reste relativement stable avec des valeurs moyennes comprises entre 7,4 et 8,0. La concentration en oxygène dissous suit une évolution saisonnière classique, inversement corrélée à la température ($R=-0,82$; $n=33$; $p< 0,001$).

Figure C-2 : Evolution moyenne (et écarts-types) de la température de l'eau (°C), de la concentration en oxygène dissous (mg l^{-1}) et du pH aux stations JAU1, JAU3 et JAU4 en 2003.



Malgré des épisodes pluvieux importants, notamment au cours du mois de juin (50,2 mm de pluie le 17 juin), le débit mesuré à l'exutoire du bassin versant reste relativement stable et inférieur à 1 $m^3 s^{-1}$ entre le 15 février et le 30 juillet **(Fig. C-3)**. Toutefois, les mesures n'ont pas pu être effectuées entre le 31 juillet et le 10 novembre pour cause de vandalisme (destruction de l'appareillage de mesure automatique).

Figure C-3 : Evolution journalière du débit (▬ ; $m^3 s^{-1}$) à l'exutoire du bassin versant (JAU1) et de la pluviométrie (— ; mm) à la station météo France de Joze-bourg.
* Les étoiles vertes indiquent les dates d'échantillonnage



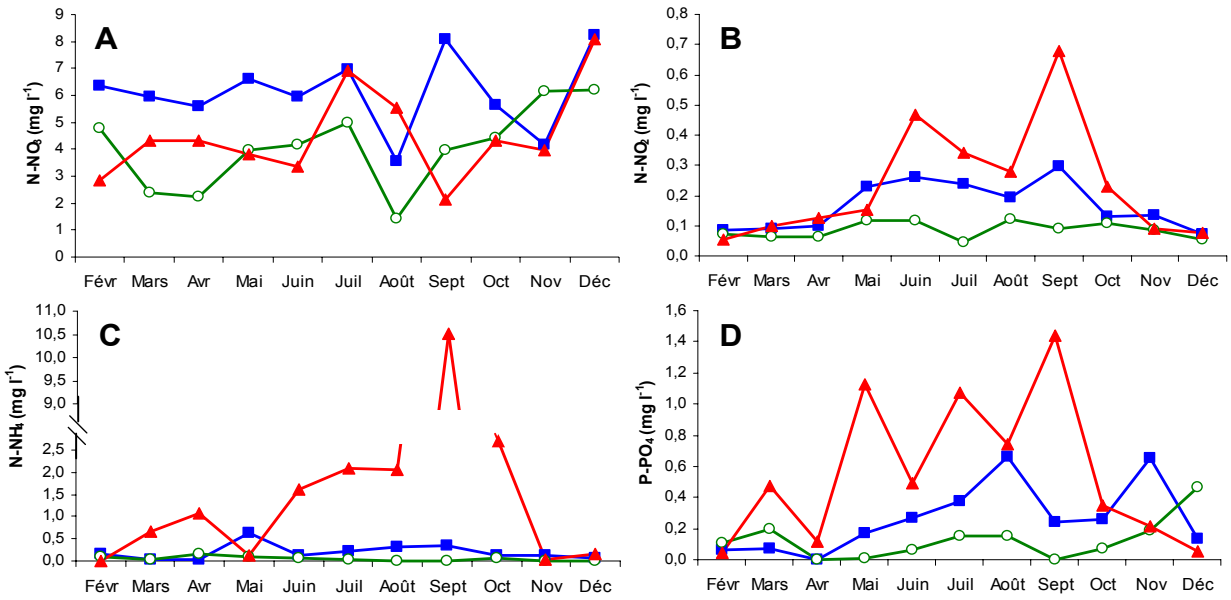
Le contexte nutritif illustré par les concentrations en composés inorganiques azotés et en orthophosphates, varie fortement au cours du temps, mais une distinction nette est enregistrée entre les trois stations d'échantillonnage **(Fig. C-4)**.

A la station JAU1, située en zone agricole, les nitrates qui constituent plus de 87% des ressources en azote inorganique, présentent des valeurs élevées comprises entre 3,5 et 8,3 mg N l^{-1} **(Fig. C-4A)**. Les teneurs en nitrites et en ammonium, respectivement inférieures à 0,32 mg N l^{-1} et 0,64 mg N l^{-1}, suivent une évolution caractérisée par une augmentation des valeurs entre mai et octobre **(Fig. C-4B et C-4C)**. Les concentrations en orthophosphates **(Fig. C-4D)**, supérieures à 0,1 mg P l^{-1} à partir du printemps, atteignent des valeurs particulièrement élevées en août (0,66 mg P l^{-1}) et en novembre (0,65 mg P l^{-1}). L'analyse de ces résultats met en évidence une bonne disponibilité en azote (majoritairement sous forme de nitrates) et en phosphore pour les communautés microbiennes sur la quasi-totalité de l'année.

A JAU3, les conditions nutritives sont plus faibles qu'aux deux autres stations. La différence la plus marquée est enregistrée au niveau des concentrations en orthophosphates qui, à l'exception de décembre (0,47 mg P l^{-1}), sont inférieures à 0,19 mg P l^{-1} sur l'ensemble du suivi **(Fig. C-4D)**.

A JAU4, site qui reçoit les rejets d'une station d'épuration (STEP), l'eau de la rivière présente des propriétés eutrophes caractérisées par des concentrations en orthophosphates très élevées (moyenne de 0,56 ± 0,48 mg P l^{-1}) surtout entre mai et septembre (0,49 à 1,44 mg P l^{-1} **Fig. C-4D**). Des pics en nitrites et en ammonium, qui atteignent respectivement 0,68 mg N l^{-1} **(Fig. C-4B)** et 10,52 mg N l^{-1} **(Fig. C-4C)** en septembre, sont également enregistrés en période estivale. L'irrégularité des concentrations observées, ainsi que la forte représentativité des différentes formes azotés, peut être expliquée par les variations de la nature des apports *via* le rejet de la STEP.

Figure C-4 : Evolution mensuelle des concentrations (mg l^{-1}) en N-NO_3 **(A),** N-NO_2 **(B)**, N-NH_4 **(C)** et P-PO4 **(D)** aux stations JAU1 (■), JAU3 (○) et JAU4 (▲) en 2003.



C.II.1.2. Contexte de pollution

Les dosages des pesticides mettent également en évidence une différence très nette entre les trois stations d'échantillonnage **(Fig. C-5 ; Tableau C-1)**.

A JAU1, la période de pollution s'échelonne majoritairement entre les mois d'avril et d'octobre. Elle peut être décrite comme une « vague de pollution », avec toutefois deux mois (mai et août) pour lesquels les concentrations sont plus faibles. Au niveau de cette station, située dans une zone de culture intensive, le résultat des analyses mensuelles fait apparaître une très nette dominance des herbicides qui représentent 95,8% des concentrations mesurées (contre 3,7% pour les fongicides et 0,5% pour les insecticides). Parmi ces herbicides, on retrouve majoritairement le glyphosate et surtout son principal produit de transformation, l'AMPA (acide aminométhylphosphonique), qui est détecté à six reprises dans l'année (0,21 à 4,17 µg l^{-1}) et qui assure à lui seul 61,8% de la pollution mesurée en 2003 à JAU1.

A JAU4, située en aval du rejet de la station d'épuration de Billom, 90,2% de la pollution mesurée est associée à la présence d'herbicides, 9,6% à celle d'insecticides et 0,2% à celle de fongicides. A cette station, les analyses chimiques mettent en évidence des pics de pollution, exceptionnellement élevés en avril, juillet et septembre (respectivement 17,4 µg l^{-1}, 15,3 µg l^{-1} et 12,7 µg l^{-1}). Les concentrations observées sont deux à trois fois plus fortes que les valeurs maximales observées à JAU1. On observe en avril une forte dominance de deux herbicides de la famille des amides : l'alachlore et le métolachlore. Le profil de pollution en juillet est relativement complexe (9 molécules distinctes) avec une forte proportion d'AMPA (49,4%), d'oxadiazon (20,3%) et de glyphosate (8,5%). En septembre, seuls quatre herbicides sont détectés avec une majorité d'AMPA (56,3%) et d'aminotriazole (39,6%). On constate également en octobre un épisode de pollution (3,46 µg l^{-1}) caractérisé par la forte présence d'un insecticide et d'un adjuvant, la perméthrine et le piperonyle butoxide.

A JAU3, les analyses chimiques effectuées mettent en évidence la présence exclusive d'herbicides avec des concentrations beaucoup plus faibles qu'à JAU1 et JAU4. Ainsi, les concentrations enregistrées restent inférieures ou proches des normes de potabilité (0,5 µg l^{-1} pour l'ensemble des molécules), à l'exception du mois de septembre où le glyphosate (0,23 µg l^{-1}) et surtout l'AMPA (1,01 µg l^{-1}) atteignent des concentrations relativement élevées. Compte tenu de ces résultats, cette station peut donc être considérée comme « station de référence » dans le cadre de notre suivi.

Figure C-5 : Evolution mensuelle des concentrations (µg l^{-1}) en pesticides aux stations JAU1, JAU3 et JAU4 en 2003.

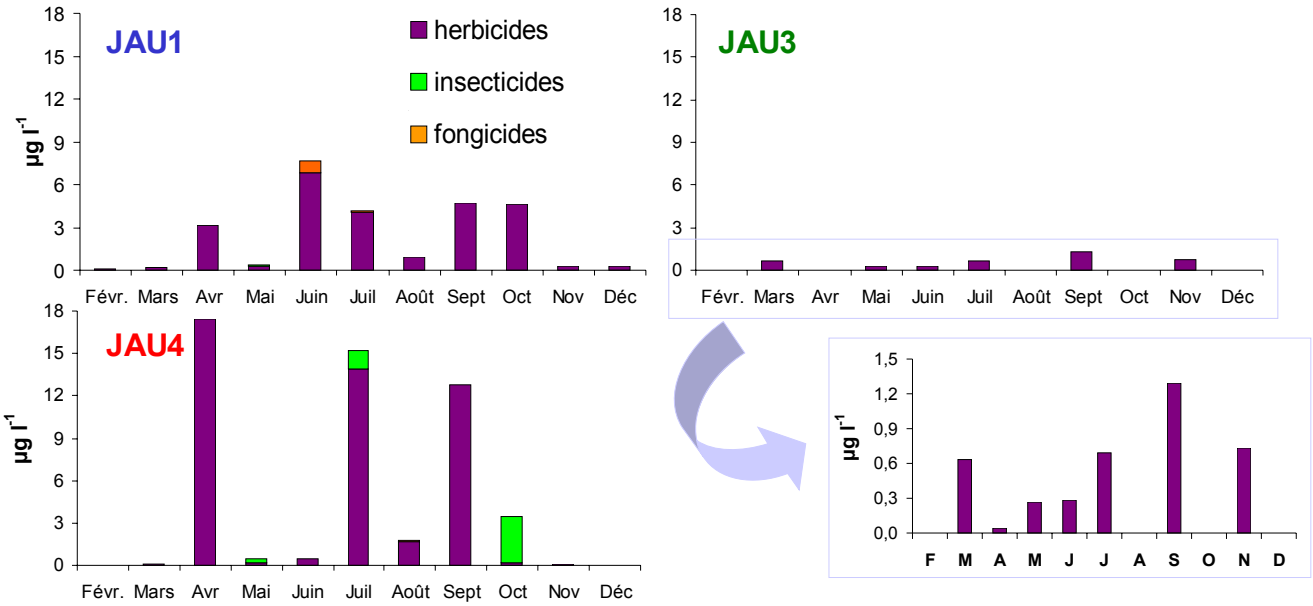


Tableau C-1 : Evolution des concentrations en pesticides (µg l^{-1}) dans la colonne d'eau du Jauron aux stations JAU1, JAU3 et JAU4 au cours de l'année 2003. (* : <seuil de détection)

JAU1	Févr.	Mars	Avr	Mai	Juin	Juil	Août	Sept	Oct	Nov	Déc
Alachlore (H)	*	*	*	0,07	*	*	0,08	*	*	*	*
AMPA (H)	*	*	1,80	*	2,83	3,47	*	3,76	4,17	*	0,21
Atrazine (H)	*	*	0,32	0,03	*	0,07	0,03	*	*	*	*
Diuron (H)	*	*	*	0,09	*	*	0,27	*	0,21	*	*
Glyphosate (H)	*	*	0,54	*	0,21	0,26		0,74	*	*	*
Linuron (H)	*	0,05	*	*	0,24	*	0,28	*	*	0,08	*
Métolachlore (H)	*	*	0,13	0,06	*	*	0,08	*	0,05	*	0,05
Norflurazon (H)	*	*	*	*	1,06	*	*	*	*	*	*
Oxadiazon (H)	*	*	*	*	*	0,26	0,10	0,20	0,15	0,17	*
Prométryne (H)	0,08	0,09	0,37	*	*	*	0,05	*	*	*	*
Simazine (H)	*	*	*	*	0,42	*	*	*	*	*	*
Terbumeton (H)	*	*	*	*	0,11	*	*	*	*	*	*
Terbuthylazin (H)	*	*	*	*	1,95	*	*	*	*	*	*
Total Herbicides	**0,08**	**0,14**	**3,16**	**0,25**	**6,82**	**4,06**	**0,89**	**4,70**	**4,58**	**0,25**	**0,26**
Chlorfenvinphos (I)	*	*	*	0,12	*	*	*	*	*	*	*
Fipronil (I)	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*
Total Insecticides	**0,00**	**0,00**	**0,00**	**0,12**	**0,00**	**0,00**	**0,00**	**0,00**	**0,00**	**0,00**	**0,00**
Oxadixyl (F)	*	*	*	*	0,84	0,07	*	*	*	*	*
Procymidone (F)	*	*	*	*	*	*	0,06	*	*	*	*
Total Fongicides	**0,00**	**0,00**	**0,00**	**0,00**	**0,84**	**0,07**	**0,06**	**0,00**	**0,00**	**0,00**	**0,00**

JAU3	Févr.	Mars	Avr	Mai	Juin	Juil	Août	Sept	Oct	Nov	Déc
AMPA (H)	*	*	*	*	*	0,17	*	1,01	*	*	*
Atrazine (H)	*	*	0,04	0,08	0,20	0,04	*	0,05	*	*	*
Bromacil (H)	*	*	*	0,06	*	*	*	*	*	*	*
Chlortoluron (H)	*	*	*	*	*	*	*	*	*	0,29	*
Diuron (H)	*	*	*	0,08	*	*	*	*	*	*	*
Glyphosate (H)	*	*	*	*	*	*	*	0,23	*	*	*
Linuron (H)	*	*	*	0,05	0,08	*	*	*	*	*	*
Metribuzine (H)	*	*	*	*	*	0,48	*	*	*	*	*
Monolinuron (H)	*	*	*	*	*	*	*	*	*	0,44	*
Trifluraline (H)	*	0,63	*	*	*	*	*	*	*	*	*
Total Herbicides	**0,00**	**0,63**	**0,04**	**0,27**	**0,28**	**0,69**	**0,00**	**1,29**	**0,00**	**0,73**	**0,00**

JAU4	Févr.	Mars	Avr	Mai	Juin	Juil	Août	Sept	Oct	Nov	Déc
Alachlore (H)	*	*	9,40	*	*	*	*	*	*	*	*
Aminotriazole (H)	*	*	*	*	*	0,87	*	5,03	*	*	*
AMPA (H)	*	*	*	*	*	7,56	*	7,15	*	*	*
Atrazine (H)	0,03	*	2,20	0,06	0,06	0,44	0,05	*	*	*	*
Chlortoluron (H)	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*
Diflufenicanil (H)	*	*	*	*	*	0,28	0,12	*	*	*	*
Diuron (H)	*	*	*	*	0,05		0,19	*	*	*	*
Glyphosate (H)	*	*	*	*	*	1,60	*	0,28	*	*	*
Linuron (H)	*	0,07	*	0,12	0,40	*	*	*	*	*	*
Métolachlore (H)	*	*	5,80	*	*	*	*	*	*	*	*
Oxadiazon (H)	*	*	*	*	*	3,10	1,28	0,28	0,15	0,06	*
Total Herbicides	**0,03**	**0,07**	**17,40**	**0,18**	**0,51**	**13,85**	**1,64**	**12,74**	**0,15**	**0,06**	**0,00**
Chlorfenvinphos (I)	*	*	*	0,19	*	*	*	*	*	*	*
Diazinon (I)	*	*	*	0,06	*	*	*	*	*	*	*
Fipronil (I)	*	*	*	*	*	0,06	*	*	*	*	*
Permethrine (I)	*	*	*	*	*	0,36	*	*	0,35	*	*
Piperonyle butoxide (I)	*	*	*	*	*	0,96	*	*	2,96	*	*
Total Insecticides	**0,00**	**0,00**	**0,00**	**0,25**	**0,00**	**1,38**	**0,00**	**0,00**	**3,31**	**0,00**	**0,00**
Procymidone (F)	*	*	*	*	*	*	0,09	*	*	*	*
Total Fongicides	**0,00**	**0,00**	**0,00**	**0,00**	**0,00**	**0,00**	**0,09**	**0,00**	**0,00**	**0,00**	**0,00**

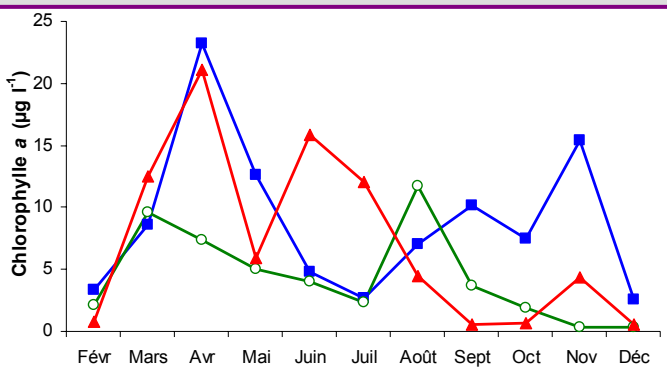
Sur la base de la fréquence d'échantillonnage utilisée, les trois stations étudiées peuvent donc être caractérisées par des profils de pollution distincts :

- ***JAU1 est soumise à une pollution de type « chronique », entre avril et octobre, engendrée majoritairement par la présence d'AMPA ;***
- ***JAU4 est caractérisée par une pollution de type « ponctuelle et aiguë » avec trois pics majoritaires d'herbicides en avril, juillet et septembre et deux pics moins importants en août (herbicides) et octobre (insecticides) ;***
- ***JAU3 présente des concentrations en pesticides proches du seuil de potabilité, très inférieures à celles observées à JAU1 et JAU4, et a donc été choisie comme station de référence.***

C.II.1.3. Evolution des concentrations en chlorophylle *a* dans la colonne d'eau

Les substrats artificiels utilisés pour la collecte du périphyton ayant été régulièrement vandalisés en 2003 **(voir chapitre B.III.1.)**, seule l'évolution du compartiment algal libre sera décrite et discutée en fonction du contexte de pollution. L'évolution des concentrations en chlorophylle *a* (chlo *a*) est illustrée sur la **Figure C-6**.

Figure C-6 : Evolution mensuelle des concentrations (µg l^{-1}) en chlorophylle *a* aux stations JAU1 (■), JAU3 (○) et JAU4 (▲) en 2003.



Au niveau des trois stations, les concentrations en chlorophylle *a* sont très faibles en période hivernale (0,3 à 3,4 µg l^{-1} en février et en décembre).

A JAU3, station de référence, un profil saisonnier « classique » est observé, caractérisé par un développement printanier (9,6 µg chlo *a* l^{-1} en mars) suivi d'une diminution des concentrations jusqu'à la fin de l'année. Une seconde augmentation est observée en août (11,7 µg chlo *a* l^{-1}) mais, à l'exception de ce « pic » estival, les concentrations mesurées à JAU3 (<10 µg l^{-1}) sont globalement plus faibles que celles mesurées aux deux autres stations.

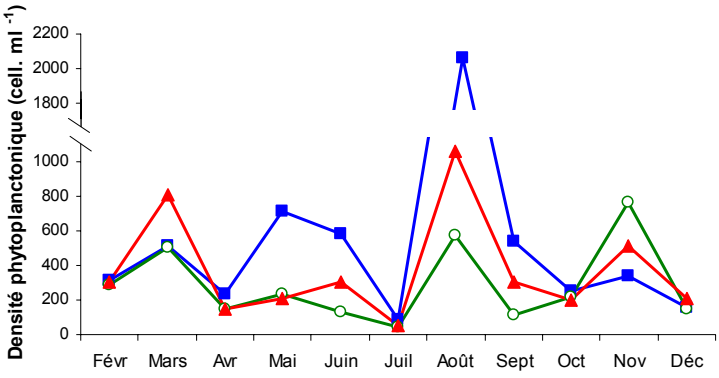
A JAU1, un bloom printanier deux fois plus intense qu'à JAU3, est enregistré entre février et avril (23,2 µg chlo *a* l^{-1}). Il est suivi dès le début de la vague de pollution, d'une forte chute des concentrations jusqu'en juillet (2,3 µg chlo *a* l^{-1}). Une reprise est toutefois observée dès la fin de l'été et sur la période automnale malgré une forte exposition des organismes aux pesticides. La teneur en chlorophylle *a* atteint 15,4 µg l^{-1} en novembre, du fait de la forte disponibilité en orthophosphates.

A JAU4, l'évolution de la biomasse algale présente plus d'irrégularités. Après la première efflorescence algale printanière, comparable à celle observée à JAU1, on enregistre à nouveau des biomasses algales élevées au cours de l'été (respectivement 15,9 et 12,1 µg chlo *a* l^{-1}, en juin et en juillet). Les fortes concentrations en chlo *a*, mesurées en avril et en juillet, sont détectées en même temps que des pics de pollution. Les chutes de biomasse, enregistrées entre avril et mai puis entre juillet et septembre sont donc consécutives à deux pics aigus de pollution. A l'exception d'une légère stimulation en novembre, les teneurs en chlorophylle *a* diminuent ainsi fortement depuis le début de l'été jusqu'à la fin de l'année où elles se maintiennent entre 0,5 et 4,5 µg l^{-1}.

C.II.1.4. Evolution des densités phytoplanctoniques

L'évolution des densités phytoplanctoniques aux trois stations est représentée sur la **Figure C-7**. Au niveau des stations JAU1 et JAU4, l'évolution des densités mesurées n'est pas corrélée avec celle de la chlo *a* ($p>0,05$). A JAU3, en revanche, densité et biomasse sont corrélées ($R=0,77$; $n=10$; $p<0,01$) malgré la forte densité cellulaire observée en novembre .

Figure C-7 : Evolution mensuelle des densités phytoplanctoniques (cell ml^{-1}) aux stations JAU1 (■), JAU3 (○) et JAU4 (▲) en 2003.



A JAU3 et JAU4, les densités phytoplanctoniques suivent une évolution parallèle, bien que celles mesurées à JAU4 soient généralement plus élevées. Au niveau de ces deux stations, trois pics démographiques (>500 cell. ml^{-1}) sont observés au cours de l'année, en mars, août et

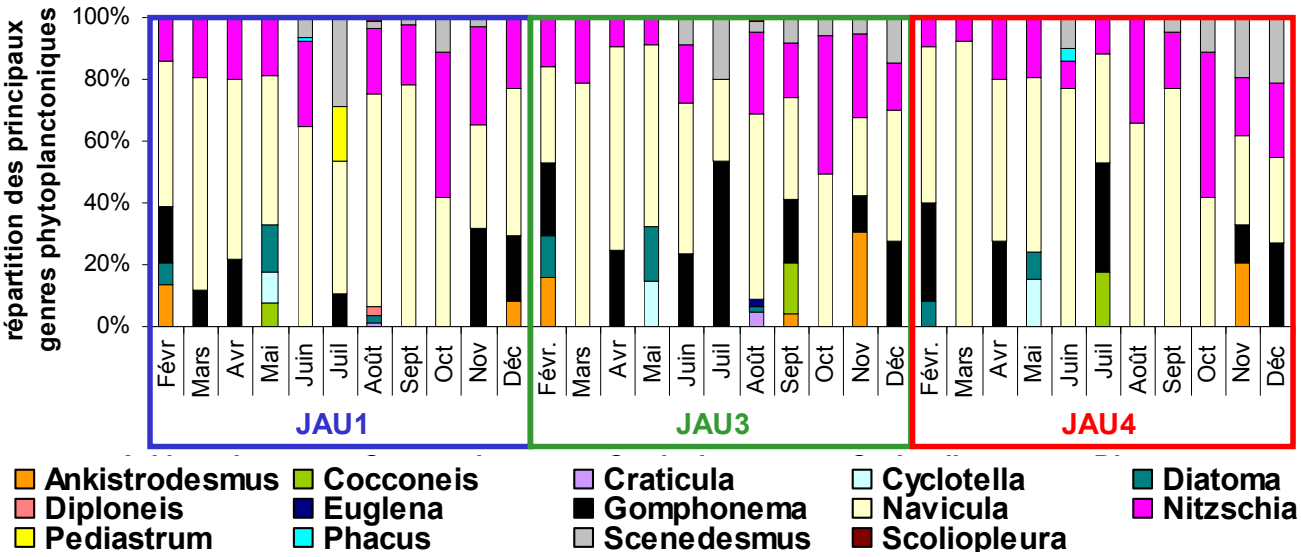
novembre. A JAU4, ces mois de fortes densités correspondent à des périodes de faible pollution et les densités minimales, enregistrées à cette station en avril, juillet, septembre et octobre, correspondent à des périodes de fortes teneurs en pesticides.

A JAU1, le nombre de cellules phytoplanctoniques est globalement plus élevé qu'aux deux autres stations, en particulier entre avril et septembre, et ceci malgré une forte chute de l'abondance algale en juillet. Durant cette période qui correspond pourtant à la vague de pollution à cette station, les densités sont ainsi deux à cinq fois supérieures à celles enregistrées au niveau de JAU3.

C.II.1.5. Evolution de la structure de la communauté phytoplanctonique

L'analyse taxonomique de la communauté algale a permis de détecter au niveau des trois stations, un total de 14 genres différents sur l'année **(Fig. C-8)** et de mettre en évidence la prédominance de deux genres majoritaires : le genre *Navicula*, constitutivement présent, et le genre *Nitzschia*, absent uniquement en juillet à JAU1 et JAU3. Ces deux genres, au même titre que les *Gomphonema*, bien représentés également mais de manière plus ponctuelle, appartiennent au groupe des diatomées pennées, largement prédominant (54-100%) tout au long de l'année, quelle que soit la station de prélèvement. Les Chlorophycées du genre *Scenedesmus* sont aussi détectées fréquemment à partir du mois de juin sur l'ensemble des stations.

Figure C-8 : Abondance relative des différents genres phytoplanctoniques détectés mensuellement aux stations JAU1, JAU3 et JAU4 en 2003.



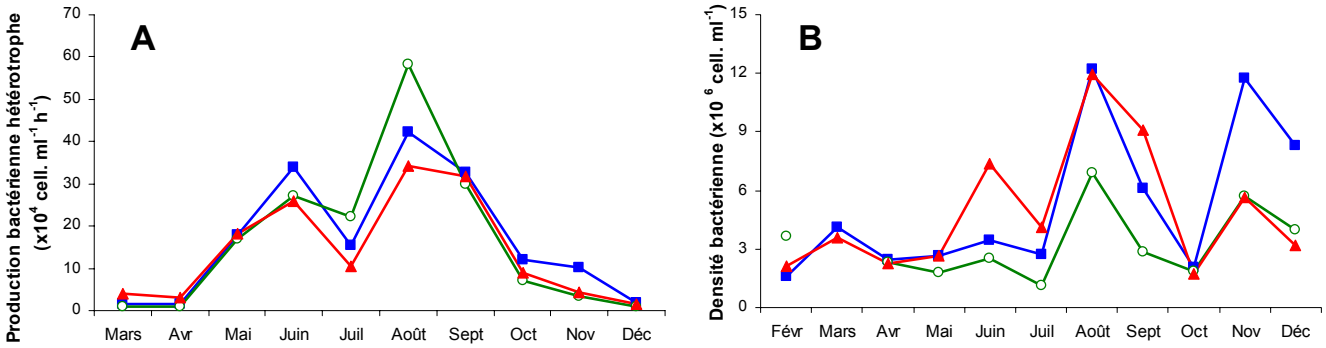
Il existe cependant quelques différences assez marquées entre les trois stations, essentiellement en période estivale. Sur l'ensemble de l'année, 13 genres sont détectés à JAU1, 11 à JAU3 et 9 à JAU4. En juillet, seuls deux genres sont communs aux trois stations (*Gomphonema* et *Navicula*). En août, la station JAU4 se distingue par une diversité très faible puisque seuls deux genres, *Navicula* et *Nitzschia*, sont recensés alors que la structure de la communauté, composée d'au moins six genres différents, est assez comparable à JAU1 et JAU3. En septembre, on observe également une forte différence entre la station de référence (six genres représentés) et les deux stations contaminées (trois genres).

C.II.1.6. Evolution de la production hétérotrophe et des densités bactériennes

La production **(Fig. C-9A)** et la densité **(Fig. C-9B)** bactériennes suivent globalement la même évolution (R=0,40 ; n=30 ; p<0,05) aux trois stations, la corrélation la plus forte existant au niveau de JAU4 (R=0,83 ; n=10 ; p<0,01).

La production bactérienne hétérotrophe semble majoritairement régulée par la température (R^2=0,65 ; n=30 ; p<0,001), sans différence marquée entre les trois stations. Les valeurs restent ainsi proches de 1.10^4 cell. ml^{-1} h^{-1} au cours des mois les plus froids et sont supérieures à $2,5.10^5$ cell. ml^{-1} h^{-1} à la fin du printemps (juin) et de l'été (août-septembre).

Figure C-9 : Evolution mensuelle de la production bactérienne hétérotrophe (x 10^4 cell ml^{-1} h^{-1}, **A**) et des densités bactériennes (x 10^6 cell ml^{-1}, **B**) aux stations JAU1 (■), JAU3 (○) et JAU4 (▲) en 2003.

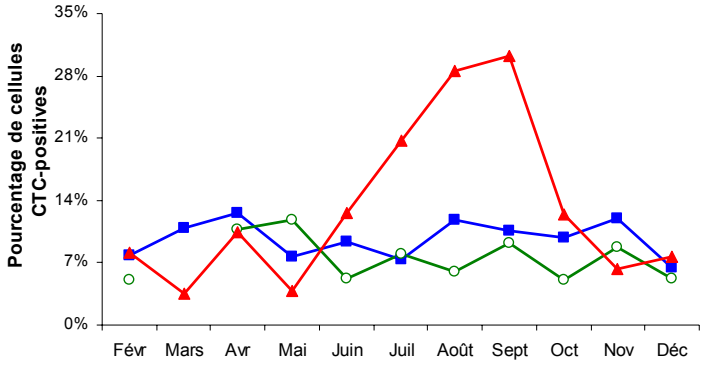


L'évolution des densités bactériennes est, quant à elle, très fortement corrélée avec celle des densités phytoplanctoniques (R^2=0,36 ; n=33 ; p<0,001) surtout à JAU3 (R^2=069 ; n=11 ; p<0,001). Les densités les plus faibles sont observées au niveau de la station de référence où elles fluctuent entre $1,5.10^6$ et $7,0.10^6$ cell. ml^{-1} au cours de l'année et présentent des valeurs maximales en août et en novembre. L'évolution observée à JAU1 suit la même tendance, mais les valeurs observées en août et en novembre sont beaucoup plus importantes et sont proches de $1,2.10^7$ cell. ml^{-1}. A JAU4, on enregistre une augmentation importante de la densité bactérienne à la fin du printemps (juin) et de l'été (août-septembre).

C.II.1.7. Evolution de la fraction de bactéries CTC-positives

Les bactéries CTC-positives représentent la fraction la plus active au sein de la communauté (Nielsen *et al.*, 2003 ; Sherr *et al.*, 1999). L'évolution de l'abondance relative de ces cellules est illustrée sur la **Figure C-10**.

Figure C-10: Evolution mensuelle du pourcentage de bactéries CTC-positives aux stations JAU1 (■), JAU3 (○) et JAU4 (▲) en 2003.



A JAU1 et à JAU3, le pourcentage de cellules CTC-positives reste relativement constant au cours de l'année et oscille entre 5,0% et 12,6%.

A JAU4, l'évolution de la proportion des cellules les plus actives suit une variation saisonnière très marquée, corrélée avec la température (R^2=0,66 ; n=11 ; p<0,05) et la production bactérienne (R=0,74 ; n=10 ; p<0,01). Dans les périodes les plus froides (février-mai et octobre-décembre), cette proportion est du même ordre que celle existant aux deux autres stations mais dès la fin du printemps, le pourcentage de cellules CTC-positives augmente fortement, simultanément à la chute des teneurs en chlorophylle *a*. Il est ainsi multiplié par 8 entre mai (3,9%) et septembre (30,2%).

C.II.1.8. Evolution de la structure de la communauté bactérienne

Les quatre sondes oligonucléotidiques choisies pour caractériser la structure de la communauté bactérienne (ALF1b, GAM42a, BET42a et CF319a) ont permis de cibler environ 35% à 70% des bactéries présentes dans la colonne d'eau à JAU1 et JAU3, et 65% à 95% des bactéries présentes à JAU4 **(Fig. C-11)**.

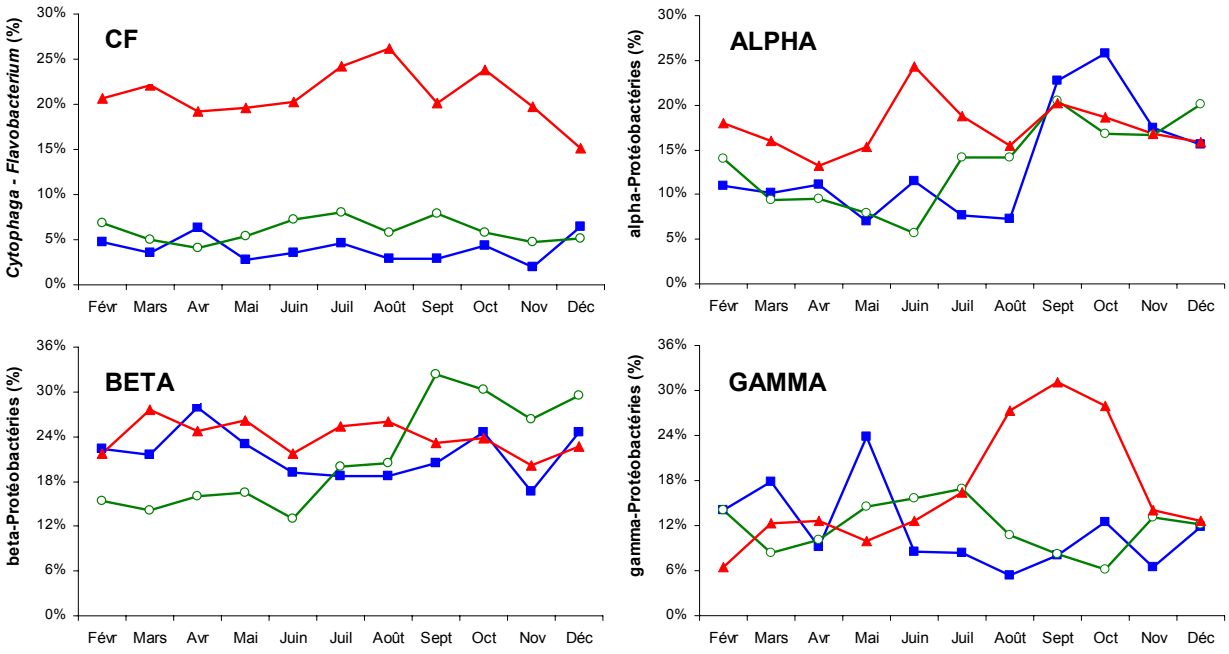
A JAU3, la proportion des cellules appartenant aux genres *Cytophaga* et *Flavobacterium* (CF) est assez stable et inférieure à 8% sur l'ensemble de l'année. Concernant les Protéobactéries, on observe une évolution saisonnière, marquée par trois périodes bien distinctes. (1) De février au début de l'été, les pourcentages associés aux trois subdivisions ciblées sont relativement stables. (2) Un remaniement important de la structure de la communauté bactérienne est enregistré en période estivale. Ainsi, l'abondance relative des α-

et des β-Protéobactéries est multipliée par trois environ entre juin et septembre alors que, dans le même temps, celle des γ-Protéobactéries diminue dans les mêmes proportions. (3) Le pourcentage associé à chacune de ces trois subdivisions se stabilise à la fin de l'automne et en hiver à des valeurs proches (γ-Protéobactéries) ou deux fois plus élevées (α- et β-Protéobactéries) que celles existant au début du cycle annuel.

A la station JAU1, on observe pour les α- et γ-Protéobactéries, et pour les CF, une répartition et une évolution du même type que celles décrites pour JAU3. Par opposition, les β-Protéobactéries sont deux fois plus représentées dès le début d'année et montrent un pourcentage relativement stable sur l'ensemble du suivi.

La station JAU4 se distingue fortement des deux autres stations. Les différences les plus marquées concernent les CF qui sont quatre à cinq fois plus représentées sur l'ensemble de l'année, et les γ-Protéobactéries. La proportion de ces dernières, du même ordre que celles existant aux deux autres stations au printemps et en hiver, triple en période estivale et devient proche de 30% entre août et octobre. Cette évolution est comparable à celle observée pour les cellules CTC-positives ($R=0,75$; $n=11$; $p<0,01$). Le pourcentage des α-Protéobactéries, compris entre 13% et 20%, est relativement stable pendant l'année à l'exception du mois de juin où ces bactéries représentent environ 25% de la population totale ciblée. L'évolution des β-Protéobactéries est voisine de celle observée à JAU1.

Figure C-11: Evolution mensuelle du pourcentage de bactéries ciblées par les sondes CF319a **(CF)**, ALF1b **(ALPHA)**, BET42a **(BETA)** et GAM42a **(GAMMA)** aux stations JAU1 (■), JAU3 (○) et JAU4 (▲) en 2003.



C.II.1.9. Evolution de la diversité bactérienne

La diversité bactérienne a été appréciée par l'analyse de la diversité génétique sur gels d'électrophorèse à gradient temporel de température (TTGE). Le nombre de bandes détectées sur les profils varie entre 27 et 38 à JAU1 **(Fig. C-12A)** et entre 19 et 34 à JAU3 **(Fig. C-12B)** alors qu'il est beaucoup plus stable à JAU4 (25 à 30, **Fig. C-12C**).

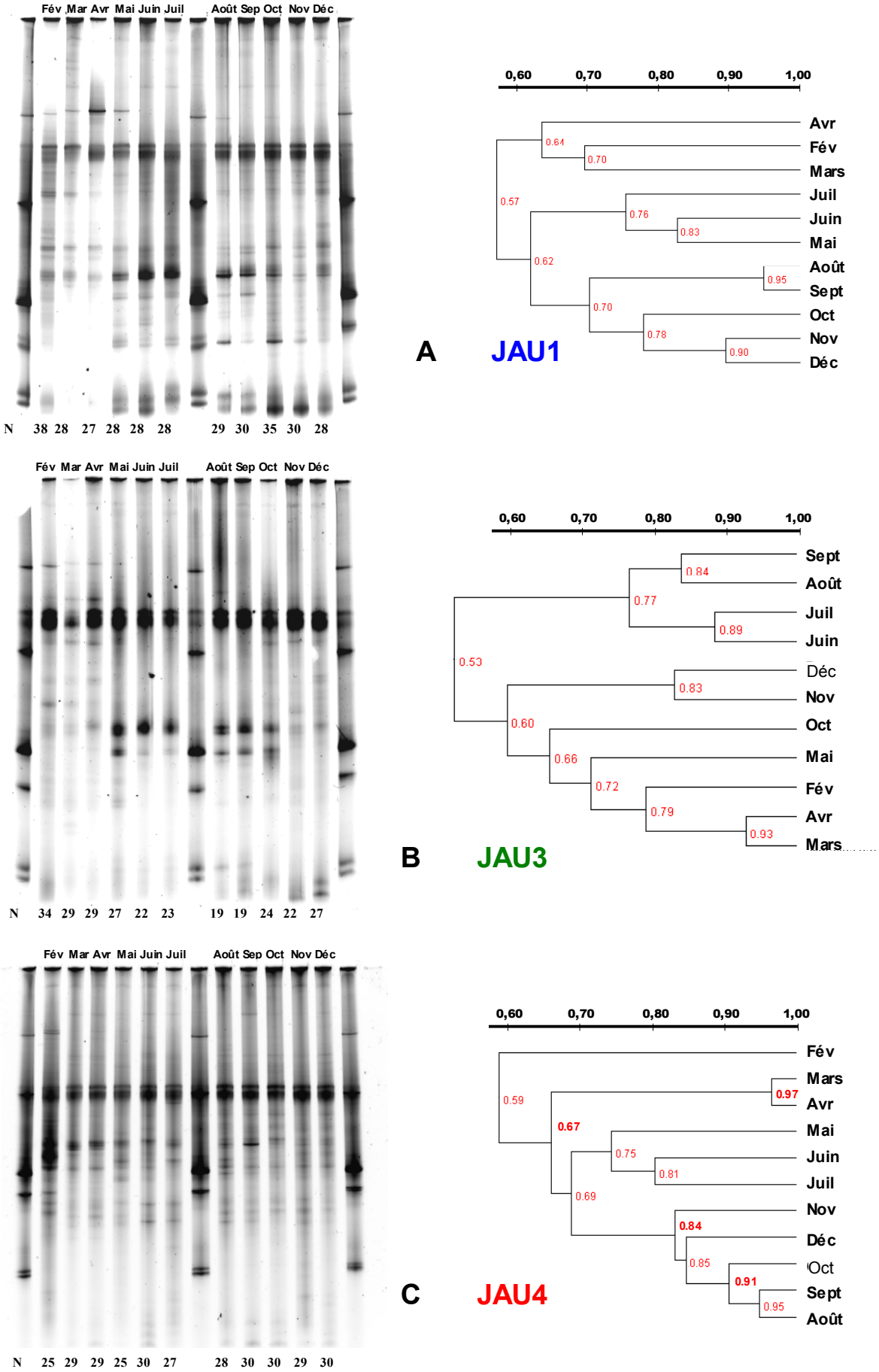
Lors de l'analyse des dendrogrammes construits à partir des profils de diversité observés dans le milieu naturel, il est difficile de définir *a priori* un seuil de similarité théorique pour caractériser un niveau de regroupement. Ainsi dans la littérature, le seuil de similarité choisi, parfois inférieur à 50% (Castle & Kirchman, 2004), semble relativement arbitraire et fortement variable selon les études (Kostanjšek *et al.*, 2005 ; Freitag *et al.*, 2006). Dans notre approche *in situ*, l'appréciation du niveau de regroupement s'est donc principalement basée sur la « géométrie » du dendrogramme, privilégiée par rapport au pourcentage de similarité.

A JAU3 **(Fig. C-12B)**, deux périodes sont clairement dissociées sur le dendrogramme. On retrouve ainsi un groupe constitué par les mois qui correspondent à la période la plus chaude de l'année (juin à septembre). Durant cette période, les pourcentages de similarité, supérieurs à 77%, soulignent une proximité des profils de diversité bactérienne (pour les espèces les plus dominantes). Le deuxième groupe est constitué des sept autres mois et fait apparaître une évolution progressive de la diversité au début et à la fin de l'année.

A JAU1**(Fig. C-12A)**, le dendrogramme décrit une évolution plus « saccadée ». Trois regroupements principaux sont ainsi illustrés (février-avril ; mai-juillet ; août-décembre). Les remaniements les plus importants au sein de la communauté bactérienne sont observés après les mois d'avril et de juillet.

A JAU4 **(Fig. C-12C)** la diversité bactérienne évolue également de manière « chaotique », surtout au début de l'année. La communauté bactérienne est ainsi fortement modifiée après le mois de février qui présente un profil assez singulier, différant de plus de 40% des autres profils. La diversité se stabilise entre mars et avril puis varie à nouveau de manière significative. Deux groupes se dessinent alors : un premier regroupant les mois de mai à juillet (similarité > 75%), et un second rassemblant les mois d'août à décembre (similarité > 84%), après qu'un remaniement important se soit produit entre juillet et août (similarité < 70%).

Figure C-12 : Evolution de la diversité bactérienne aux stations JAU1 **(A)**, JAU3 **(B)** et JAU4 **(C)** en 2003, appréciée par une analyse « présence/absence » des profils TTGE selon la méthode DICE/UPGMA. * **N**=nombre de bandes détectées sur la piste



C.II.1.10. Analyse statistique

Afin d'avoir une vision plus globale des résultats, une analyse en composantes principales (ACP) a été réalisée pour chacune des trois stations en intégrant l'ensemble des paramètres physiques, chimiques et biologiques mesurés **(Fig. C-13)**. Les deux premiers axes choisis pour représenter les résultats expliquent 46,5% (JAU1, **Fig. C-13A**), 49,2% (JAU3, **Fig. C-13B**) et 51,0% (JAU4, **Fig. C-13C**) de la variance totale.

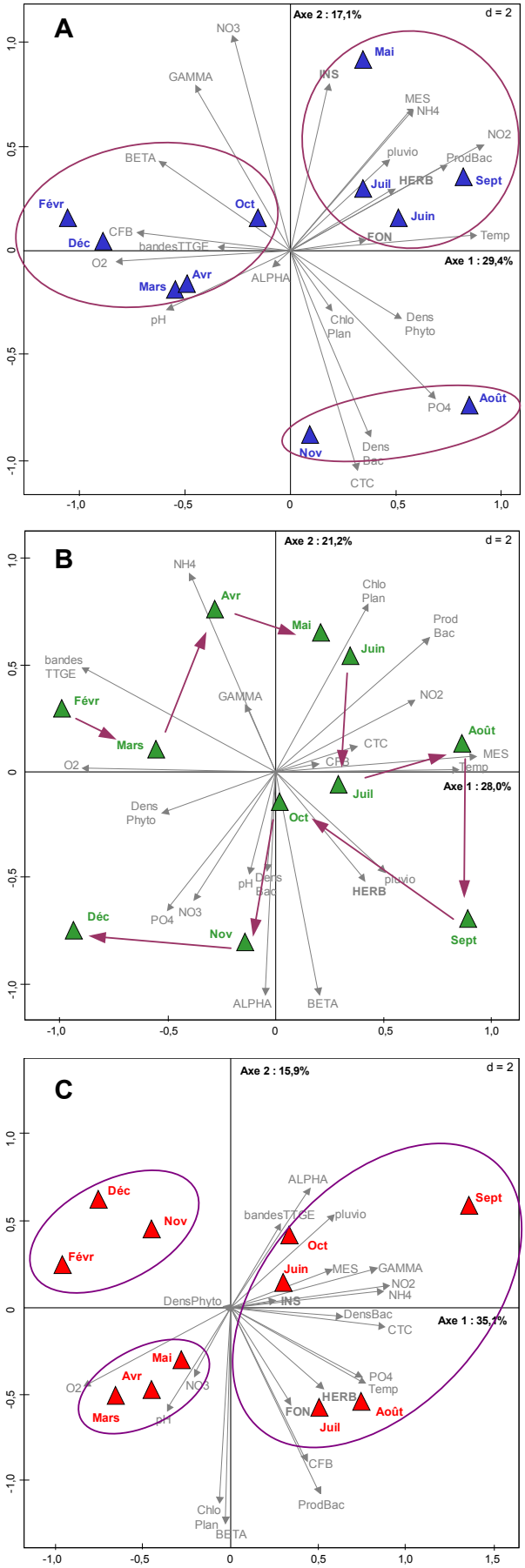
A JAU1 et JAU3, la température et les concentrations en oxygène dissous s'opposent sur le premier axe, qui explique environ 30% de la variance. A JAU3 **(Fig. C-13B)**, les mois sont répartis suivant ce premier axe d'après leur caractère saisonnier. L'ACP met en évidence une évolution progressive de l'écosystème au cours de l'année, compte tenu de l'ensemble des paramètres considérés, sans faire apparaître de regroupements particuliers.

A JAU1 **(Fig. C-13A)**, trois regroupements temporels sont révélés par l'ACP. Deux groupes dissocient ainsi clairement les mois les plus « froids » (février-avril et octobre-décembre) des mois les plus « chauds » (mai-septembre). Cependant, les mois d'août et de novembre, caractérisés par les plus fortes teneurs en orthophosphates et par des densités bactériennes élevées, se retrouvent relativement isolés et forment ainsi un troisième groupe.

A JAU4 **(Fig. C-13C)**, l'évolution de l'écosystème est fortement conditionnée par les conditions climatiques, mais aussi par les apports en nutriments qui proviennent vraisemblablement majoritairement de la station d'épuration. L'évolution de ces paramètres permet de distinguer d'une part les mois hivernaux, d'autre part les mois printaniers, et enfin la période de juin à octobre, caractérisée par de fortes teneurs en phosphates, nitrites et ammonium. Ces caractéristiques abiotiques engendrent en effet une forte productivité[#] microbienne, notamment au mois de septembre qui se retrouve discriminé au sein de ce groupe.

[#] en écologie, la productivité désigne la quantité de biomasse produite par unité de surface et par unité de temps (Ramade, 1998). **Dans ce manuscrit**, nous utiliserons ce mot en tant que *terme générique* pour désigner le niveau d'activité global de communautés microbiennes tel qu'il est perçu par l'ensemble des paramètres mesurés.

Figure C-13 : Analyse en composantes principales des données abiotiques et microbiennes récoltées aux stations JAU1 **(A)**, JAU3 **(B)** et JAU4 **(C)** entre février et décembre 2003.



Légende

ALPHA : alpha-Protéobactéries
BandesTTGE : nombre de bandes détectées par TTGE
BETA : beta-Protéobactéries

CFB : Cytophaga Flavobacterium
ChloPlan : chlorophylle a planctonique
CTC : bactéries CTC-positives
DensBac : densité bactérienne
DensPhyto : densité phytoplanctonique
FON : fongicides
GAMMA : gamma-Protéobactéries
HERB : herbicides
INS : insecticides
MES : matières en suspension
NH4 : ammonium
NO2 : nitrites
NO3 : nitrates
O2 : oxygène dissous
PH : pH
Pluvio : pluviométrie
PO4 : orthophosphates
ProdBac : production bactérienne
Temp : température

C.II.2. Discussion

C.II.2.1. Caractéristiques abiotiques des trois stations d'échantillonnage

Les stations de prélèvements sélectionnées pour ce travail sont proches géographiquement (distance maximale entre deux stations inférieure à 10 km). De ce fait, les variations du débit, mesuré uniquement à l'exutoire du bassin versant (JAU1), sont transposables aux deux autres stations et les conditions climatiques, telles que la température de l'air et la pluviométrie, sont sans doute similaires pour les trois sites. Le pH, l'oxygène dissous et la température de l'eau présentent effectivement de faibles variations entre les stations. A l'opposé, on observe une différence nette entre celles-ci au niveau du contexte de pollution par les pesticides et des conditions nutritives.

Les analyses de pesticides effectuées à la station de référence (JAU3) mettent en évidence un faible niveau de contamination. Ainsi, et à l'exception du mois de septembre, les concentrations totales de l'ensemble des polluants sont inférieures ou proches de la limite de potabilité des eaux de consommation (0,5 µg l^{-1}) durant tout le suivi. Cette portion de rivière est également caractérisée par les concentrations en orthophosphates les plus faibles, inférieures à 0,2 mg P l^{-1} de février à novembre.

A l'exutoire du bassin versant, on détecte la présence de pesticides tout au long de l'année (0,08 à 7,66 µg l^{-1}) avec une période de pollution plus significative entre avril et octobre. Dans cette zone de culture intensive, l'eau de la rivière est caractérisée par de fortes teneurs en nitrates (6,10 ± 1,43 mg l^{-1}) et en orthophosphates, surtout entre mai et novembre (0,17 à 0,65 mg P l^{-1}). Ces apports en nutriments dans les milieux aquatiques, spécialement en nitrates, sont fréquemment observés en Europe dans les zones agricoles (Salvia-Castellví *et al.*, 2005 ; Neal *et al.*, 2006), et sont majoritairement engendrés par les pratiques culturales nécessitant une forte quantité de fertilisants.

En aval du rejet de la station d'épuration de la localité de Billom, les apports en nutriments et en polluants sont beaucoup plus irréguliers et sont caractérisés par des pics ponctuels. Les analyses de pesticides font ainsi apparaître trois événements majeurs de pollution, en avril, en juillet et en septembre, avec des concentrations totales exceptionnellement hautes, comprises entre 12,7 et 17,4 µg l^{-1}, et deux autres moins importants (concentrations inférieures à 3,5 µg l^{-1}) en août et en octobre. Les concentrations en orthophosphates, qui sont les plus élevées à cette station, atteignent également des valeurs très fortes (supérieures à 1 mg P l^{-1}) en mai, en juillet et en septembre. Contrairement aux autres stations, de fortes variations sont enregistrées au niveau des concentrations en nitrites et en ammonium qui augmentent significativement entre juin et octobre pour atteindre respectivement des valeurs supérieures à 0,2 mg N l^{-1} et 1,6 mg N l^{-1}. L'ammonium est la

forme azotée inorganique majoritaire en septembre avec une concentration proche de 10,5 mg N l^{-1}, cinq fois plus importante que celle des nitrates. Les apports importants de nitrites, d'ammonium et de phosphates, enregistrés de mai à octobre dans la rivière, peuvent traduire un fonctionnement non optimal de la station d'épuration et donc un rejet important d'eau peu ou mal épurée, constituant une source potentielle majeure de ces composés (Montuelle *et al*., 1996 ; Masseret *et al.*, 1998). Ces flux de composés inorganiques sont vraisemblablement amplifiés par les fortes pluies, enregistrées à cette période, lors des jours précédant les prélèvements.

Nos résultats font donc apparaître de fortes différences entre les trois stations tant au niveau du contexte de pollution que des conditions nutritives. Ces différences sont directement liées aux caractéristiques du bassin versant et à l'origine des eaux de la rivière. En se basant sur la classification proposée par Dodds et al. (1998), la rivière est ainsi globalement caractérisée par des conditions mésotrophes (JAU3) à eutrophes (JAU1, JAU4) avec de fortes variations temporelles.

C.II.2.2. Evolution des communautés microbiennes au niveau de la station de référence

Lors des études écotoxicologiques en milieu naturel, une des difficultés majeures réside dans le choix d'un site pouvant servir de témoin, la « quête du référentiel » étant une interrogation pour de nombreux scientifiques. Dans notre étude, nous avons sélectionné, au regard des caractéristiques du bassin versant et des analyses chimiques effectuées depuis plusieurs années par le groupe Phyt'eauvergne, une station théoriquement peu exposée à la présence de pesticides. Excepté en mars, où la présence d'un herbicide (le trifuraline) n'est détectée qu'à cette seule station, les résultats des dosages mettent effectivement en évidence un niveau de pollution inférieur à celui des deux autres sites d'échantillonnage, malgré une concentration en AMPA supérieure à 1 µg l^{-1} en septembre. La présence ponctuelle de faibles teneurs en pesticides, et le contexte nutritif moins riche que celui existant aux deux autres stations, soulignent les limites des approches *in situ*, qui n'offrent souvent pas la possibilité de disposer d'un véritable témoin permettant d'apprécier très précisément les effets des polluants et de les discriminer avec certitude des variations liées à l'ensemble des autres contraintes environnementales.

A la station définie comme référence, on observe une évolution classique de la communauté phytoplanctonique (Ibelings *et al.*,1998 ; Balbi, 2000) caractérisée par une efflorescence algale au printemps (mars) et une en été (août). L'atténuation, après le mois de mars, de la croissance phytoplanctonique, qui se poursuit jusqu'en avril au niveau des deux

autres stations, semble toutefois être induite par la présence de trifuraline dans le milieu. La stimulation des organismes autotrophes au cours du mois d'août est très certainement favorisée par un contexte environnemental général favorable, caractérisé notamment par une forte température de l'eau (18,9°C), une bonne disponibilité en orthophosphates (0,16 mg P l^{-1}) et l'absence totale de pesticides (pour les molécules recherchées et au seuil de détection utilisé). La présence d'AMPA en septembre paraît cependant limiter la durée de cette stimulation estivale et induire une diminution de la diversité taxonomique phytoplanctonique (seulement trois genres recensés en octobre).

Au niveau de cette station, les biomasses et les densités phytoplanctoniques suivent une évolution comparable, excepté en novembre où le nombre de cellules augmente significativement, suite notamment à un fort développement de Chlorophycées appartenant au genre *Scenedesmus*. Comme l'ont montré Ibelings *et al.* (1998) dans des rivières allemandes, c'est à la fin de l'été que la communauté phytoplanctonique présente une diversité maximale avec respectivement six et sept genres recensés en août et en septembre.

La production bactérienne hétérotrophe est fortement corrélée positivement à la température ($p<0,001$) et présente des valeurs maximales au cours de l'été avec un pic plus marqué en août. La forte influence de la température sur la production bactérienne dans des rivières tempérées a été démontrée depuis de nombreuses années (Servais, 1989 ; Findlay *et al.*, 1991). Malgré des variations temporelles significatives au niveau de la production hétérotrophe, avec des valeurs multipliées par environ 50 entre les périodes froides et l'été, la densité bactérienne et le pourcentage de cellules CTC-positives restent relativement stables sur l'ensemble du suivi. La proportion de bactéries actives, comprise entre 5 et 12%, est comparable à celle observée dans une rivière autrichienne par Klammer *et al.* (2002) avec un autre marqueur d'activité respiratoire à base de tétrazolium, l'INT (2-(4-iodophenyl)-3-(4-nitrophenyl)-5-phenyltetrazolium chloride). Yamaguchi *et al.* (1997) ont également obtenu au Japon des résultats similaires, avec un pourcentage moyen de bactéries CTC-positives compris entre 8% et 9% dans des petites rivières non polluées.

Sur un autre plan, nous avons observé une corrélation positive entre l'abondance bactérienne et l'abondance phytoplanctonique ($p<0,01$). De précédentes études menées en milieux lotiques ont fait état de relations variables entre les communautés algales et bactériennes en fonction des caractéristiques des rivières considérées (Findlay *et al.*, 1991 ; Rier & Stevenson, 2002 ; Castillo *et al.*, 2004 ; Gao *et al.*, 2004). D'après Rier & Stevenson (2001), les co-variations entre ces deux compartiments microbiens sont plus nettes lorsque la production autotrophe joue une part prépondérante dans le fonctionnement du cours d'eau par rapport aux apports allochtones.

A la station de référence, les bactéries appartenant aux sous classes α-, β- et γ-Protéobactéries et aux genres *Cytophaga* et *Flavobacterium* représentent au total environ 30% à 60% de la communauté. La forte représentation de ces différents groupes dans les rivières a déjà été soulignée par de nombreux auteurs (Kenzaka *et al.*, 1998 ; Klammer *et al.*, 2002 ; Araya *et al.*, 2003). Comme dans la plupart des milieux dulcicoles (Glöckner *et al.*, 1999 ; Araya *et al.*, 2003), nous avons observé une dominance des β-Protéobactéries (21,3 ± 7,1 %). Alors que la proportion d'espèces appartenant aux genres *Cytophaga* et *Flavobacterium* reste stable et relativement faible (6,0 ± 1,3 %) au cours de l'année, on observe une restructuration au sein des Protéobactéries pendant l'été. Ainsi, entre juin et septembre, les pourcentages des β- et des α- Protéobactéries sont multipliés par trois tandis que parallèlement la proportion de γ- Protéobactéries diminue dans les mêmes proportions. Ce remaniement estival engendre des variations importantes au niveau de la diversité bactérienne puisque l'analyse par TTGE met en évidence une forte distinction des profils obtenus pour les mois de juin à septembre, avec notamment une diminution du nombre de bandes détectées.

L'analyse en composantes principales, effectuée avec l'ensemble des paramètres abiotiques et biotiques, fait apparaître une évolution temporelle régulière pour cette station. D'après l'axe 1, qui explique 28% de la variance totale des données, le facteur le plus discriminant est la température, inversement corrélé aux teneurs en oxygène dissous. Il est intéressant de noter que le mois de septembre se retrouve relativement isolé, vraisemblablement du fait des teneurs en AMPA (1,01 µg l^{-1}) et en glyphosate (0,23 µg l^{-1}) enregistrées dans l'eau à cette période.

Globalement, on observe donc, au niveau de la station de référence, une évolution annuelle des communautés microbiennes relativement classique, très comparable à celles décrites dans la littérature pour les petites rivières non ou peu polluée.

Cependant , la communauté phytoplanctonique paraît assez sensible à la présence d'herbicides, qui semblent affecter la biomasse et induire une diminution de la diversité taxonomique à des concentrations totales relativement modérées (0,63 µg l^{-1} en mars et 1,29 µg l^{-1} en avril).

C.II.2.3. Effets d'une pollution de type chronique en zone agricole sur les communautés microbiennes

A l'exutoire du bassin versant, la présence de pesticides est observée tous les mois de l'année avec une très forte prédominance des herbicides tant au niveau du nombre de molécules identifiées (13/16) que des concentrations totales mesurées (environ 96% de la

pollution détectée). Ce constat est en cohérence avec les profils de pollution observés depuis plusieurs années dans de nombreux cours d'eau français (IFEN, 2004). Au cours de notre suivi, la période de contamination la plus forte s'échelonne globalement entre avril et octobre, avec toutefois des teneurs totales en pesticides assez limitées en mai (0,37 µg l^{-1}) et en août (0,95 µg l^{-1}). Le niveau de pollution le plus élevé est enregistré en juin (7,66 µg l^{-1}). Carabias-Martínez *et al.* (2003) ont également constaté dans une rivière espagnole située en zone agricole, la forte présence de pesticides lors du mois de juin, résultant de leur utilisation en traitement post-levée des cultures à la fin du printemps. Dans notre étude, le transfert des polluants vers le milieu aquatique et la détection maximale d'herbicides en juin ont probablement été favorisés par les épisodes pluvieux enregistrés à la fin du mois de mai (Blanchoud *et al.*, 2004).

Les molécules majoritairement responsables de la pollution détectée dans la zone agricole sont le glyphosate et surtout l'AMPA. Ces observations confirment l'utilisation prononcée du glyphosate et la forte contamination des eaux superficielles par cette molécule et par son principal métabolite, l'AMPA (Battaglin *et al.*, 2005 ; Kolpin *et al.*, 2006).

Au regard de l'évolution des teneurs en chlorophylle *a*, deux périodes semblent se dessiner au cours de la « vague » principale de pollution, la première s'échelonnant entre avril et juillet, mois où la biomasse algale est la plus faible, et la seconde entre juillet et octobre.

Le début de la période de pollution est associé à une diminution drastique de la biomasse algale. Après le bloom phytoplanctonique printanier, on constate ainsi une chute des concentrations en chlorophylle *a* qui décroissent d'un facteur neuf entre avril et juillet, malgré une augmentation régulière de la température et une bonne disponibilité en phosphore dans le milieu. Cette diminution, beaucoup plus marquée que celle observée à la station de référence, est attribuable en grande partie à la toxicité des herbicides à l'égard des microorganismes autotrophes (DeLorenzo *et al.*, 2001). Alors que la biomasse algale diminue très fortement durant cette période, la densité des cellules phytoplanctoniques est multipliée par trois entre avril et mai. Cette différence s'explique certainement par un remaniement taxonomique au sein de la communauté algale avec la disparition des espèces du genre *Gomphonomena* au profit du développement d'organismes plus petits, appartenant aux genres *Cyclotella* et *Cocconeis*. On constate en particulier que les espèces du genre *Cocconeis* ne sont présentes au mois de mai qu'à cette seule station. De par leur petite taille qui leur confère un fort potentiel de « stratèges r » (Dos Santos & Calijuri, 1998), notamment en présence de pesticides (Van Den Brink *et al.*, 2000), elles bénéficient vraisemblablement, de manière opportuniste, des modifications environnementales découlant de la contamination par les herbicides.

D'autre part, Van Den Brink *et al.* (1997) ont montré que des algues appartenant à ce même genre pouvaient survivre pendant deux semaines en présence de linuron (0,5 à 150 µg l^{-1}), en puisant dans leur propre réserve d'énergie. Cette utilisation du stock énergétique entraîne alors une diminution significative des biovolumes cellulaires qui pourrait également expliquer, en partie, la forte baisse de la concentration en chlorophylle *a* existant durant cette période.

Le mois de juillet, caractérisé par les plus faibles teneurs en chlorophylle *a* et une densité phytoplanctonique très faible, représente un mois charnière dans l'évolution de la communauté algale. La diminution du niveau de pollution en août et le contexte climatique et nutritif favorable entraînent une augmentation de la biomasse et surtout de la densité phytoplanctonique, qui devient supérieure à 2000 cell ml^{-1}. Les concentrations en chlorophylle *a* se maintiennent à des niveaux supérieurs à 7 µg l^{-1} après le mois d'août malgré de fortes teneurs en herbicides dans la rivière en septembre et en octobre (> 4,5 µg l^{-1}). Les polluants semblent donc avoir un effet moins marqué sur le phytoplancton. Cette différence ne peut pas être attribuée à la nature des molécules présentes, la pollution étant assurée majoritairement par la présence d'AMPA, comme au début de l'été. L'hypothèse la plus probable pour expliquer l'effet plus modéré de ce toxique, fait appel à un niveau de résistance plus important des organismes autotrophes présents, induit par leur exposition répétée à l'AMPA au cours de l'année (notion de PICT ; Bérard & Benninghoff, 2001). Dorigo *et al.* (2004) ont ainsi démontré que ce phénomène, généralement observé chez les organismes périphytiques, peut également être perçu en rivière pour le phytoplancton. La communauté phytoplanctonique est composée en septembre de seulement trois genres à JAU1 alors que six genres sont recensés à la station de référence. Les espèces appartenant à ces trois genres (*Navicula, Nitzschia* et *Scenedesmus*) sont vraisemblablement particulièrement résistantes à l'AMPA. Il est d'autre part intéressant de noter que l'épisode de pollution enregistré en septembre à la station de référence (concentration en AMPA supérieure à 1 µg l^{-1}), entraîne également, en octobre, la sélection de ces trois mêmes genres qui composent alors la totalité de la communauté.

En novembre, le retour à un seuil de pollution de l'eau très faible (<0,3 µg l^{-1}) associé à un pic d'orthophosphates (0,65 mg l^{-1}), stimule l'activité autotrophe, entraînant une augmentation de la biomasse algale, corrélée au développement des espèces du genre *Gomphonema*.

Globalement, au cours de l'année, aucune différence significative n'est enregistrée au niveau de la production hétérotrophe et de la densité bactérienne entre la station de référence et la station située en zone agricole, et ce malgré des contextes anthropiques très différents. L'impact des herbicides sur la communauté microbienne autotrophe n'engendre donc pas de fortes modifications quantitatives au sein de la communauté hétérotrophe. Cela s'explique peut-être par l'absence, dans cette section de rivière, d'interactions fortes entre l'activité bactérienne et la biomasse phytoplanctonique. A l'inverse, la température et les concentrations en phosphates influent positivement et fortement, de manière respective, sur la production hétérotrophe ($p<0,001$) et l'abondance bactérienne ($p<0,01$). Les flux de nutriments qui proviennent sans doute majoritairement des cultures, semblent donc jouer un rôle important dans le fonctionnement de l'écosystème. Ceci suggère un processus écologique de type « hétérotrophe » (respiration > production primaire) qui minimise les interactions algues-bactéries (Findlay *et al.*, 1991). Les microorganismes hétérotrophes sont par conséquent moins exposés aux effets indirects des herbicides découlant de l'impact sur les organismes autotrophes, notamment en terme de compétition pour les ressources, compte tenu de la forte disponibilité nutritive dans le milieu à partir de la fin du printemps.

L'importance de la fraction bactérienne présentant une forte activité respiratoire (bactéries CTC-positives) parait également indépendante du contexte de pollution et de l'impact des herbicides sur la communauté algale.

Concernant la structure générale de la communauté bactérienne, les hybridations *in situ* révèlent une légère diminution de la proportion des β- et des γ-Protéobactéries au cours de la période de forte pollution par rapport aux pourcentages enregistrés à la station de référence. A un niveau de résolution plus fin, l'analyse de la diversité génétique bactérienne par TTGE met en évidence un remaniement important au sein de la communauté après le premier événement majeur de pollution observé au mois d'avril. Si des variations notables semblent aussi se produire après les autres périodes majeures de pollutions (juin, juillet, septembre et octobre), il est cependant très difficile de lier avec certitude ces changements de diversité aux événements de pollution.

L'analyse en composante principale, effectuée avec l'ensemble des données abiotiques et microbiennes, permet de distinguer trois groupes. Le premier rassemble les mois de février, mars, avril, octobre et décembre, caractérisés par une température de l'eau inférieure ou égale à 10°C et par une forte teneur en oxygène. Le deuxième regroupe les mois d'août et de novembre, qui présentent de faibles niveaux de pollution, de fortes concentrations en orthophosphates et des densités microbiennes élevées. Le troisième groupe relie les mois de mai à septembre (à l'exception du mois d'août), caractérisés par des températures élevées,

associées à une forte production bactérienne. Ces mois correspondent également à la principale période de pollution par les herbicides.

C.II.2.4. Effets d'une pollution urbaine, ponctuelle et aiguë, sur les communautés microbiennes

En aval du rejet de la station d'épuration de Billom, l'apport de pesticides est enregistré de manière ponctuelle, mais à des concentrations très élevées. Trois pics de très forte pollution sont ainsi observés en avril, juillet et septembre.

Le premier pic (avril), qui est le plus important, correspond à la présence de trois herbicides : l'alachlore, le métolachlore, et l'atrazine. Les deux amides sont largement prédominantes et sont responsables de plus de 87% de la contamination. Ces molécules sont destinées à un usage essentiellement agricole (Tomlin, 1994 ; Gerecke *et al.*, 2002), mais leur présence dans les eaux résiduelles urbaines a déjà été signalée (Kolpin *et al.*, 2004). Les valeurs exceptionnellement élevées observées ne sont pas la conséquence d'événements pluvieux importants qui auraient pu être à l'origine du transfert de ces pesticides vers le milieu aquatique (Müller *et al.*, 1997 ; Gerecke *et al.*, 2002), car pendant les dix jours qui ont précédé le prélèvement mensuel, une pluviométrie inférieure à 4 mm d'eau a été enregistrée. Il est ainsi très difficile d'identifier les raisons de ce fort déversement de pesticides dans la rivière.

Entre avril et mai, la concentration en chlorophylle *a* est divisée par 3,5 alors que dans le même temps, la disponibilité en orthophosphates dans le milieu est multipliée par 10 et que le contexte climatique et nutritif global semble favorable aux microorganismes autotrophes. La chute drastique de la biomasse phytoplanctonique enregistrée dans le mois qui suit le pic printanier de pollution est donc très certainement attribuable à la présence des trois herbicides précités. Peu de données concernent les effets du métolachlore sur les communautés algales dulcicoles (Hartgers *et al.*, 1998) mais cet herbicide semble présenter une toxicité sur ces organismes deux à dix fois moins importante que celles de l'atrazine et de l'alachlore (Fairchild *et al.*, 1998). En 1997, Spawn *et al.* ont montré expérimentalement, à partir de communautés naturelles issues d'une rivière américaine, que l'alachlore peut affecter la biomasse algale à partir de concentrations proche de 10 $\mu g\ l^{-1}$. L'atrazine, qui est un des herbicides qui a été le plus considéré dans les études écotoxicologique, présente généralement des effets néfastes sur les algues à des concentrations plus élevées (voir pour revue DeLorenzo *et al.*, 2001). Toutefois, Carder & Hoagland (1998) ont mis en évidence une additivité des effets toxiques de ces deux herbicides sur les algues, les effets étant sans doute amplifiés dans notre cas par la présence de métolachlore.

Contrairement à la teneur en chlorophylle *a*, la densité cellulaire phytoplanctonique présente une faible valeur en avril, en même temps que la détection du pic de pollution. La forte similitude concernant l'évolution des densités phytoplanctoniques au niveau de cette station et au niveau de la station de référence suggère un effet limité des pesticides sur ce paramètre dans la zone urbaine. En avril comme en mai, la densité cellulaire algale et la structure de la communauté sont ainsi similaires à celles observées à la station non polluée. Ce résultat est en accord avec les conclusions de Spawn *et al.* (1997) qui n'ont observé un effet de l'alachlore sur la densité algale et la structure de la communauté qu'à partir d'une très forte concentration (30 µg l^{-1}).

Les autres pics de pollution observés en juillet et en septembre sont, comme en zone agricole, majoritairement dus à la présence de glyphosate et surtout d'AMPA, qui représentent à eux deux environ 60% de la pollution détectée lors des prélèvements. Ces résultats confirment les analyses effectuées en milieux urbains, révélant la présence accrue de ces molécules (Blanchoud *et al.*, 2004 ; Skark *et al.*, 2004 ; Kolpin *et al.*, 2006). Deux autres herbicides sont également prédominants à cette station à savoir l'oxadiazon (3,10 µg l^{-1} en juillet et 1,28 µg l^{-1} en août) et l'aminotriazole (5,03 µg l^{-1} en septembre), fréquemment détectés en milieux urbains du fait de leur utilisation dans les traitements de la voirie et des espaces verts (Ramwell *et al.*, 2002 ; Blanchoud *et al.*, 2004). La pollution urbaine engendre aussi un apport de molécules à propriétés insecticides, spécialement en juillet (1,38 µg l^{-1}) et en octobre (3,31 µg l^{-1}) avec une forte prédominance de la perméthrine et surtout du piperonyle butoxide. Les communautés microbiennes sont donc exposées, en zone urbaine, à une forte diversité de molécules qui peuvent présenter des effets très différents.

La présence d'herbicides en quantités importantes entre juillet et septembre affecte à nouveau la biomasse algale, qui diminue fortement consécutivement au pic enregistré en juillet et ceci jusqu'en octobre. Les concentrations en chlorophylle *a* sont alors divisées par 17, atteignant des valeurs très faibles (<1 µg l^{-1}) malgré des teneurs en orthophosphates importantes (0,35-1,44 mg P l^{-1}). La densité algale présente cependant des valeurs élevées en août suite au développement, comme dans la zone agricole polluée, des *Navicula* et des *Nitzschia*, ainsi qu'en septembre, avec le développement des *Scenedesmus*. La présence systématique et récurrente des espèces appartenant à ces genres en présence d'AMPA suggère une sélection de ces organismes et étaye l'hypothèse de leur pouvoir d'adaptation à cette molécule.

En novembre, la stimulation de l'activité autotrophe, illustrée par une augmentation d'un facteur huit de la teneur en chlorophylle *a* ne peut s'expliquer ni par une meilleure disponibilité nutritive par rapport à octobre, où les teneurs en composés azotés et phosphatés sont environ deux fois supérieures, ni par des conditions climatiques particulièrement favorables (5°C). Il est envisageable que ce développement autotrophe soit une conséquence indirecte des fortes concentrations en insecticides qui peuvent favoriser la croissance algale par suite du déclin des organismes brouteurs (Caquet *et al.*, 1992 ; Barry & Logan, 1998).

Comme en zone agricole, l'évolution quantitative du compartiment bactérien n'est pas significativement corrélée avec celle du phytoplancton. Au niveau de cette portion de rivière, cela s'explique vraisemblablement par la forte influence des rejets de la station d'épuration (matières organiques et minérales, apport de bactéries allochtones…) sur le fonctionnement de la composante procaryote.

Une stimulation très importante de l'activité respiratoire bactérienne est observée entre mai et septembre. La fraction des cellules CTC-positives atteint alors un pourcentage proche de 30%, exceptionnellement élevé pour un milieu lotique, même dans un environnement urbain eutrophe (Araya *et al.*, 2003). Dans le même temps, l'abondance relative des γ-Protéobactéries est multipliée par trois. Cette forte augmentation se produit durant une période caractérisée par une contexte nutritif très eutrophe et une température élevée, supérieure à 15°C. A proximité du rejet de la station d'épuration, la proportion des cellules appartenant à la subdivision γ des Protéobactéries est fortement corrélée à celle des cellules CTC-positives ($p<0,01$). Il est donc vraisemblable que certaines bactéries de ce groupe taxonomique, stimulées par les conditions abiotiques favorables, présentent un taux d'activité respiratoire très important. L'augmentation des teneurs en ammonium, qui atteignent des valeurs très élevées à la fin de l'été, est également corrélée avec celle de l'abondance relative des γ-Protéobactéries ($p<0,01$) et avec le pourcentage de cellules CTC-positives ($p<0,01$). Il est donc envisageable que ces bactéries jouent un rôle important dans le cycle de l'azote. Deux hypothèses peuvent alors être émises. (1) Ces bactéries pourraient être favorisées par les fortes teneurs en ammonium, ce qui suggèrerait leur intervention dans l'étape de nitrosation. Cependant, même si la majorité des bactéries nitrifiantes fait partie des Protéobactéries, les bactéries nitrosantes appartiennent essentiellement à la subdivision β et seul le genre *Nitrosococcus* est un représentant connu de la subdivision γ (Féray, 2000). (2) Ces bactéries pourraient être à l'origine de l'accumulation d'ammonium, suite à une forte activité de

décomposition. Dans ce cas, ces bactéries pourraient avoir une origine allochtone et provenir majoritairement des eaux usées.

La représentation maximale des γ-Protéobactéries, proche de 30%, est enregistrée entre juillet et septembre, dans une période marquée par de fortes concentrations en pesticides. Même si la stimulation de ce groupe taxonomique, associée à une forte activité respiratoire, semble majoritairement engendrée par un contexte nutritif favorable, il n'est pas à exclure que la présence des pesticides puisse influer en partie sur le développement de ces organismes.

Sur un autre plan, il est intéressant de constater que le pourcentage de *Cytophaga-Flavobacterium* est trois à quatre fois plus important en zone urbaine qu'au niveau des autres stations. Cette forte proportion, similaire à celle observée par Araya *et al.* (2003) dans une rivière urbaine eutrophe, s'explique certainement par leur fort potentiel d'utilisation des matières organiques de hauts poids moléculaires, abondantes dans les eaux usées (Kirchman, 2002). Leur distribution, comme celles des α- et β-Protéobactéries, semble évoluer indépendamment de la présence des polluants.

A la station réceptrice des eaux usées urbaines, l'apport simultané de nutriments et de pesticides dans le milieu, rend difficile la caractérisation des effets spécifiques des polluants sur les organismes microbiens, en particulier sur les bactéries. L'ACP, réalisée à partir des différents paramètres abiotiques mesurés, confirme le rôle important à la fois des apports en nutriments et en pesticides, sur l'évolution des communautés microbiennes.

Les fluctuations observées à l'aide de la TTGE au niveau de la diversité bactérienne sont similaires à celles observées en zone agricole malgré une pollution beaucoup plus intense et ponctuelle. Les variations importantes enregistrées après les deux premiers pics de pollution (avril et juillet) sont peut-être en partie imputables à la présence des pesticides.

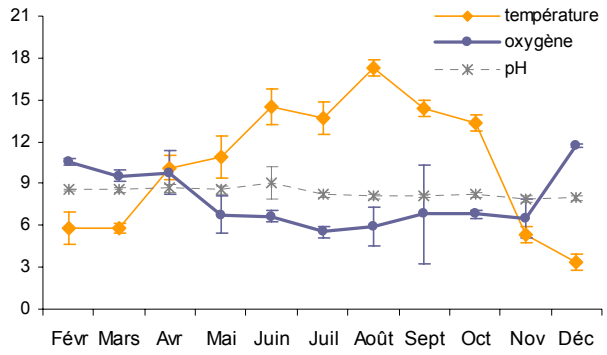
C.III. Influence des pesticides sur les communautés microbiennes au cours de l'année 2004. Comparaison avec 2003

C.III.1. Résultats

C.III.1.1. Caractéristiques physico-chimiques des trois stations

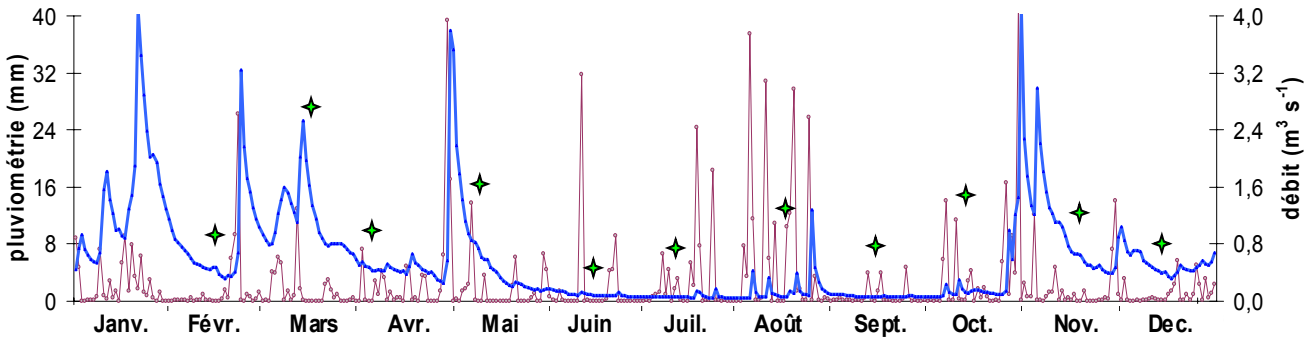
En 2004, la température de l'eau, comprise entre 3°C et 18°C, est légèrement inférieure à celle mesurée en 2003, notamment en été **(Fig. C-14)**. Comme l'année précédente, le pH est relativement stable et fluctue entre 7,6 et 8,9, sauf à JAU4 où il atteint 10,3 en septembre. La concentration en oxygène dissous suit, comme en 2003, une évolution saisonnière classique, inversement corrélée à la température (R=-0,76 ; n=33 ; p< 0,001).

Figure C-14 : Evolution moyenne (et écarts-types) de la température de l'eau (°C), de la concentration en oxygène dissous (mg l^{-1}) et du pH aux stations JAU1, JAU3 et JAU4 en 2004.



A l'exutoire du bassin versant, le débit fluctue fortement en début et en fin d'année (0,26 à 4,13 m^3 s^{-1}, **Fig. C-15**). Il reste cependant relativement stable et faible entre juin et octobre (<0,42 m^3 s^{-1}), sauf après les fortes pluies du mois d'août (195,3 mm d'eau en un mois).

Figure C-15 : Evolution journalière du débit (▬ ; m^3 s^{-1}) à l'exutoire du bassin versant (JAU1) et de la pluviométrie (— ; mm) à la station météo France de Joze-bourg.
* Les étoiles vertes indiquent les dates d'échantillonnage



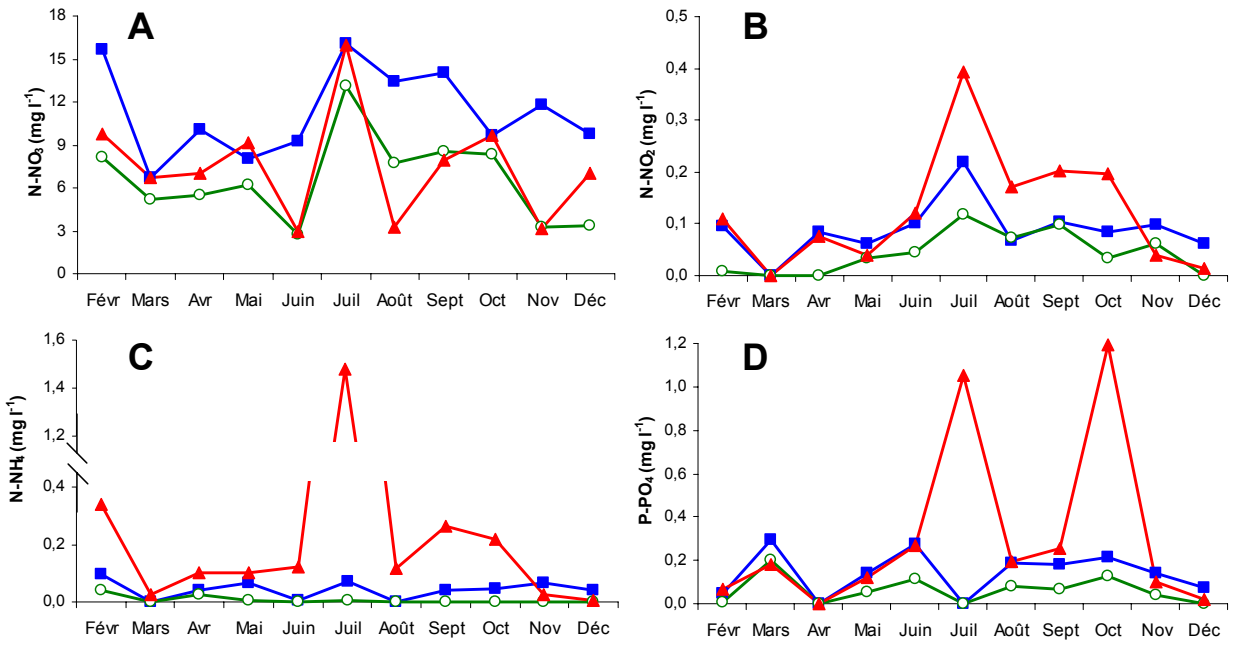
L'évolution des concentrations en azote inorganique et en orthophosphates est illustrée sur la **Figure C-16**. Globalement, le niveau trophique est assez comparable entre les deux années, sauf au niveau des nitrates, qui présentent des concentrations deux à trois fois plus élevées en 2004. La différenciation entre les trois stations est toutefois similaire à celle soulignée l'année précédente.

La station JAU3 présente ainsi le contexte nutritif le moins favorable pour les organismes microbiens, caractérisé notamment par des concentrations en orthophosphates inférieures à 0,2 mg P l^{-1} **(Fig. C-16D)** et une disponibilité en azote majoritairement sous forme de nitrates **(Fig. C-16A)** .

Comme en 2003, les concentrations en nitrates **(Fig. C-16A)** les plus élevées sont mesurées à JAU1, en zone agricole. A cette station, elles représentent plus de 98% des concentrations mesurées en composés inorganiques azotés. Mis à part en février, avril et juillet, les teneurs en orthophosphates (0,08-0,27 mg P l^{-1} ; **Fig. C-16D**), traduisent une bonne disponibilité en phosphore pour les microorganismes.

A JAU4, le contexte nutritif est très proche de celui enregistré à JAU1, sauf en juillet et en octobre où l'on enregistre de fortes concentrations en nitrites **(Fig. C-16B)**, en ammonium **(Fig. C-16C)**, et en orthophosphates (> 1 mg P l^{-1}) **(Fig. C-16D)**.

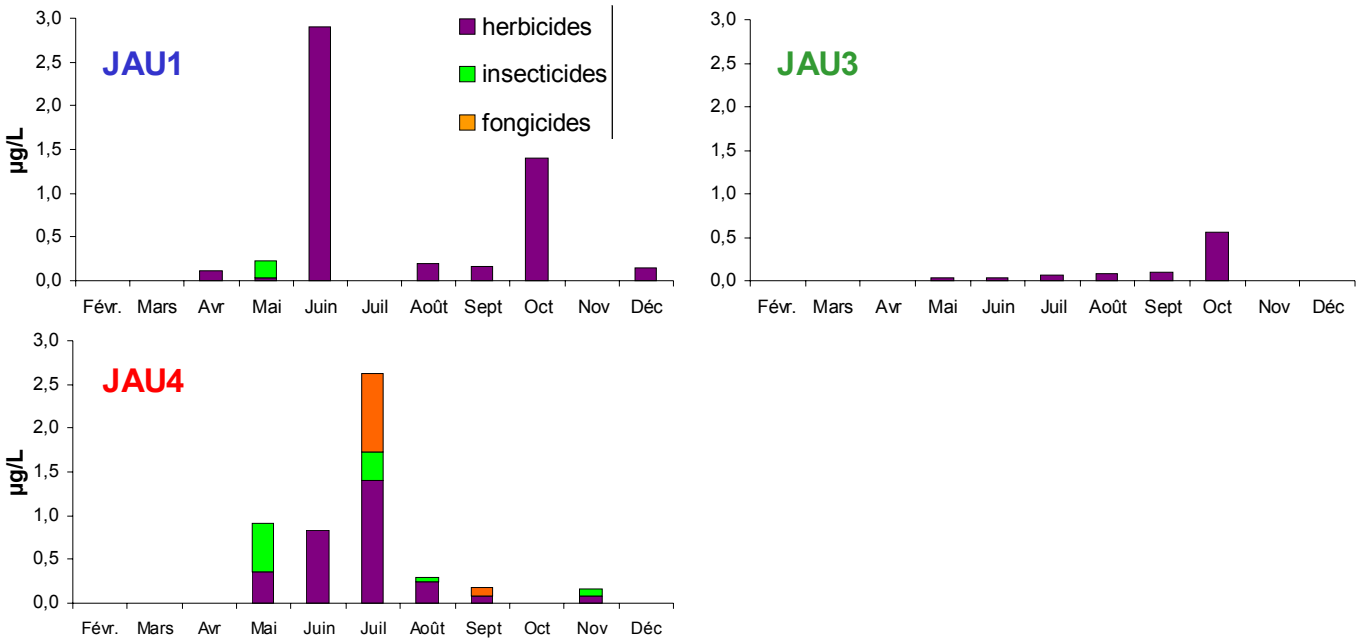
Figure C-16 : Evolution mensuelle des concentrations (mg l^{-1}) en N-NO_3 **(A),** N-NO_2 **(B)**, N-NH_4 **(C)** et P-PO4 **(D)** aux stations JAU1 (■), JAU3 (○) et JAU4 (▲) en 2004.



C.III.1.2. Contexte de pollution

En 2004, la présence de pesticides dans le Jauron n'a été détectée qu'à partir du mois d'avril **(Fig. C-17)**. Les niveaux de pollution, mais également les profils de pollution, enregistrés en zone agricole et urbaine sont assez différents de ceux observés en 2003.

Figure C-17 : Evolution mensuelle des concentrations (µg l^{-1}) en pesticides aux stations JAU1, JAU3 et JAU4 en 2004.



La station de référence (JAU3) est caractérisée par un niveau de pollution encore plus faible qu'en 2003 **(Fig. C-17B)**. Les concentrations en pesticides détectées entre mai et septembre sont comprises entre 0,03 et 0,11 µg l^{-1} et sont toujours inférieures au seuil de potabilité défini pour l'ensemble des molécules présentes (0,5 µg l^{-1}). Toutefois, ce seuil est légèrement franchi en octobre (0,55 µg l^{-1}), suite à la présence majoritaire de métazachlore à raison de 0,33 µg l^{-1} **(Tableau C-2)**.

A JAU1, l'analyse des polluants confirme la dominance des herbicides en zone agricole, ces molécules représentant plus de 96% de la pollution mesurée à cette station. Toutefois, la durée de la période de pollution (plus restreinte), ainsi que le niveau de contamination mesuré (cinq fois plus faible), sont très différents de la situation décrite en 2003 **(Fig. C-17A)**. En effet, seuls deux pics majoritaires sont observés en juin (2,90 µg l^{-1}) et en octobre (1,41 µg l^{-1}) et sont caractérisés principalement par la présence de glyphosate et surtout d'AMPA (plus de 80% de la pollution détectée) **(Tableau C-2)**. Les valeurs relevées les autres mois de l'année sont toujours inférieures au seuil de potabilité se référant à la concentration totale en pesticides.

A JAU4, la période de pollution pour laquelle les concentrations totales sont supérieures à 0,5 µg l^{-1} s'étale de mai à juillet **(Fig. C-17C)**. Elle est caractérisée par une répartition plus diversifiée entre les herbicides (60% des concentrations détectées), les insecticides (20%) et les fongicides (20%). Par rapport à 2003, le niveau de pollution est également très faible puisque la concentration maximale en pesticides, relevée en juillet (2,60 µg l^{-1} dont 37% de l'herbicide alachlore, 33% du fongicide procymidone et 13% de l'insecticide piperonyle), est environ six fois plus faible que celle mesurée l'année précédente **(Tableau C-2)**. En mai, la pollution (0,91 µg l^{-1}) est causée à 62% par l'insecticide phoxime et, en juin (0,83 µg l^{-1}), à 87% par le glyphosate et l'AMPA.

Tableau C-2 : Evolution des concentrations en pesticides (µg l^{-1}) dans la colonne d'eau du Jauron aux stations JAU1, JAU3 et JAU4 au cours de l'année 2004. (* : <seuil de détection)

JAU1	Févr.	Mars	Avr	Mai	Juin	Juil	Août	Sept	Oct	Nov	Déc
AMPA (H)	*	*	0,09	*	2,10	*	*	*	0,89	*	0,15
Atrazine (H)	*	*	0,03	0,04	0,15	*	0,03	0,03	0,04	*	*
Desethylatrazine (H)	*	*	*	*	0,05	*	*	*	*	*	*
Diuron (H)	*	*	*	*	0,07	*	*	*	0,07	*	*
Glyphosate (H)	*	*	*	*	0,22	*	*	*	0,26	*	*
Linuron (H)	*	*	*	*	*	*	*	0,08	*	*	*
Norflurazon (H)	*	*	*	*	*	*	*	*	0,15	*	*
Oxadiazon (H)	*	*	*	*	*	*	0,16	0,05	*	*	*
Sulcotrione (H)	*	*	*	*	0,31	*	*	*	*	*	*
Total Herbicides	**0,00**	**0,00**	**0,12**	**0,04**	**2,90**	**0,00**	**0,19**	**0,16**	**1,41**	**0,00**	**0,15**
Phoxime (I)	*	*	0,19	*	*	*	*	*	*	*	*
Total Insecticides	**0,00**	**0,00**	**0,19**	**0,00**	**0,00**	**0,00**	**0,00**	**0,00**	**0,00**	**0,00**	**0,00**

JAU3	Févr.	Mars	Avr	Mai	Juin	Juil	Août	Sept	Oct	Nov	Déc
Atrazine (H)	*	*	*	0,03	0,04	*	0,04	0,04	0,03	*	*
Desethylatrazine (H)	*	*	*	*	*	*	0,05	0,07	0,05	*	*
Linuron (H)	*	*	*	*	*	0,06	*	*	*	*	*
Metazachlore (H)	*	*	*	*	*	*	*	*	0,33	*	*
Metoxuron (H)	*	*	*	*	*	*	*	*	0,06	*	*
Oxadiazon (H)	*	*	*	*	*	*	*	*	0,08	*	*
Total Herbicides	**0,00**	**0,00**	**0,00**	**0,03**	**0,04**	**0,06**	**0,09**	**0,11**	**0,55**	**0,00**	**0,00**

JAU4	Févr.	Mars	Avr	Mai	Juin	Juil	Août	Sept	Oct	Nov	Déc
Alachlore (H)	*	*	*	*	*	0,97	*	*	*	*	*
Aminotriazole (H)	*	*	*	*	*	0,07	*	*	*	*	*
AMPA (H)	*	*	*	*	0,61	*	*	*	*	*	*
Atrazine (H)	*	*	*	0,04	0,11	0,05	0,03	0,03	*	*	*
Desethylatrazine (H)	*	*	*	*	*	0,05	0,05	0,05	*	*	*
Glyphosate (H)	*	*	*	*	0,11	0,19	*	*	*	*	*
Linuron (H)	*	*	*	0,06	*	*	*	*	*	0,08	*
Metolachlore (H)	*	*	*	0,25	*	*	*	*	*	*	*
Oxadiazon (H)	*	*	*	*	*	0,07	0,16	*	*	*	*
Total Herbicides	**0,00**	**0,00**	**0,00**	**0,35**	**0,83**	**1,40**	**0,24**	**0,08**	**0,00**	**0,08**	**0,00**
Phoxime (I)	*	*	*	0,56	*	*	0,05	*	*	0,08	*
Piperonyle (I)	*	*	*	*	*	0,33	*	*	*	*	*
Total Insecticides	**0,00**	**0,00**	**0,00**	**0,56**	**0,00**	**0,33**	**0,05**	**0,00**	**0,00**	**0,08**	**0,00**
Oxadixyl (F)	*	*	*	*	*	*	*	0,09	*	*	*
Procymidone (F)	*	*	*	*	*	0,87	*	*	*	*	*
Total Fongicides	**0,00**	**0,00**	**0,00**	**0,00**	**0,00**	**0,87**	**0,00**	**0,09**	**0,00**	**0,00**	**0,00**

En 2004, d'après les analyses effectuées mensuellement au niveau des trois stations, le Jauron semble « recevoir » moins de pollution que l'année précédente. Les modes de contamination décrits en 2003, pour JAU1 (plutôt chronique), et pour JAU4 (plutôt ponctuel et aigu), ne se sont pas renouvelés.

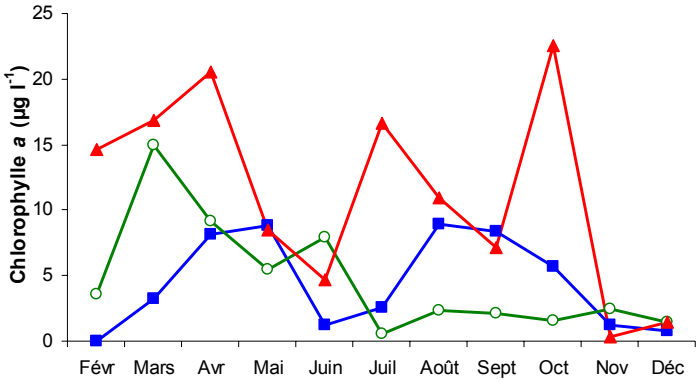
Les trois stations sont cependant encore bien différenciées :

- ***JAU3, qui présente un niveau de pollution encore plus faible qu'en 2003, peut être à nouveau considérée comme station de référence pour le suivi annuel ;***
- ***JAU1 est soumise à deux pics de pollution majeurs, en juin et octobre, dominés par la présence de glyphosate et d'AMPA ;***
- ***JAU4 est caractérisée par une courte « vague de pollution » s'étalant essentiellement entre mai et juillet, avec une présence significative d'herbicides, mais aussi d'insecticides et de fongicides.***

C.III.1.3. Evolution des biomasses algales planctoniques

L'évolution des concentrations en chlorophylle *a* (chlo *a*) dans la colonne d'eau est illustrée sur la **Figure C-18**.

Figure C-18 : Evolution mensuelle des concentrations (µg l^{-1}) en chlorophylle *a* planctonique aux stations JAU1 (■), JAU3 (○) et JAU4 (▲) en 2004.



A JAU3, l'évolution de la biomasse algale planctonique est relativement comparable à celle enregistrée en 2003, caractérisée par un développement printanier (15 µg chlo *a* l^{-1} en mars) puis une baisse jusqu'à la fin de l'année. La reprise d'activité photosynthétique, soulignée au mois d'août en 2003, est ici observée deux mois plus tôt, en juin.

A JAU1, les concentrations en chlo *a* sont inférieures à 9 µg l^{-1} et sont donc globalement deux à trois fois plus faibles qu'en 2003. La biomasse algale planctonique décrit une

évolution saisonnière, caractérisée par deux développements distincts, l'un au printemps (mars-mai) et l'autre à la fin de l'été (juillet-octobre). Aux mois de juin et octobre, caractérisés par des teneurs élevées en herbicides, les concentrations en chlorophlle *a* sont respectivement divisées par sept et par deux. Contrairement à 2003, où l'atteinte du compartiment algal est constatée après le début de la période de pollution , les fortes baisses de biomasse algale coïncident ici avec les pics de détection des polluants (au pas d'échantillonnage utilisé).

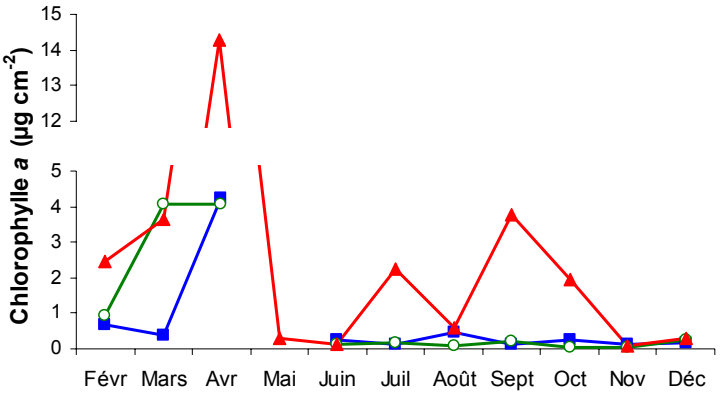
A JAU4, l'évolution de la biomasse algale planctonique met en évidence, comme en 2003, plusieurs efflorescences : un bloom printanier (>15 µg chlo *a* l^{-1} en mars-avril), un bloom estival (16,6 µg chlo *a* l^{-1} en juillet malgré un niveau de pollution maximal) et un bloom automnal (22,5 µg chlo *a* l^{-1} en octobre). Ces deux derniers sont enregistrés dans des périodes marquées par une forte disponibilité en composés azotés (>10 mg N l^{-}1) et phosphatés (>1 mg P l^{-1}). Comme au niveau de JAU1, la baisse de chlo *a* enregistrée en mai et en juin coïncide avec le début de la vague de pollution (au pas d'échantillonnage utilisé).

C.III.1.4. Evolution des biomasses algales périphytiques

A JAU3 et à JAU1, les biomasses algales périphytiques suivent une évolution similaire **(Fig. C-19)**. Les plus fortes concentrations en chlo *a* sont ainsi enregistrées en avril (4,23 µg cm^{-2}) et correspondent au développement printanier, puis elles restent inférieures à 0,50 µg cm^{-2} entre juin et décembre (les substrats ont été vandalisés en mai).

A JAU4, la biomasse algale périphytique est globalement supérieure à celle des deux autres stations et est caractérisée par un pic majeur en avril (14,30 µg chlo *a* cm^{-2}), et deux développements significatifs (> 2 µg chlo *a* cm^{-2}) en juillet et au début de l'automne (septembre-octobre). Ces efflorescences algales périphytiques sont détectées en même temps que celles du phytoplancton.

Figure C-19 : Evolution mensuelle des concentrations (µg l^{-1}) en chlorophylle *a* périphytique aux stations JAU1 (■), JAU3 (○) et JAU4 (▲) en 2004.



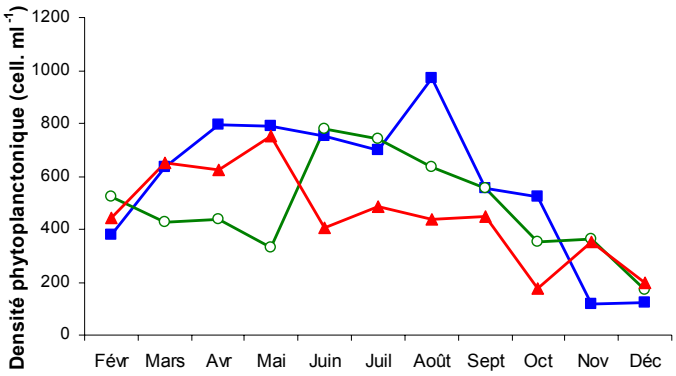
C.III.1.5. Evolution des densités phytoplanctoniques

Comme en 2003, l'évolution des densités phytoplanctoniques n'est pas reliée à celle de la biomasse algale **(Fig. C-20)**. Les profils obtenus sont toutefois très différents de ceux observés l'année précédente.

A JAU3 et à JAU1, les densités phytoplanctoniques suivent une évolution saisonnière positivement corrélée avec la température (respectivement R=0,66 ; n=11 ; p<0,05 et R=0,79 ; n=11 ; p<0,01). Globalement, à ces deux stations, les densités augmentent entre le printemps et la fin de l'été (330 à 970 cell. ml^{-1}), puis chutent environ d'un facteur quatre, dès le début de l'automne (< 200 cell ml^{-1} en décembre).

A JAU4, on enregistre, après un bloom printanier (750 cell ml^{-1} en mai), une diminution de la densité algale qui est divisée par deux entre mai et juin, ce qui correspond au début de la période de pollution. Elle se stabilise alors autour de 400 cell ml^{-1} jusqu'au début de l'automne où elle chute à nouveau avant l'hiver. La baisse de chlorophylle *a* enregistrée entre juillet et septembre n'est donc pas reliée à une diminution d'abondance.

Figure C-20 : Evolution mensuelle des densités phytoplanctoniques (cell ml^{-1}) aux stations JAU1 (■), JAU3 (○) et JAU4 (▲) en 2004.

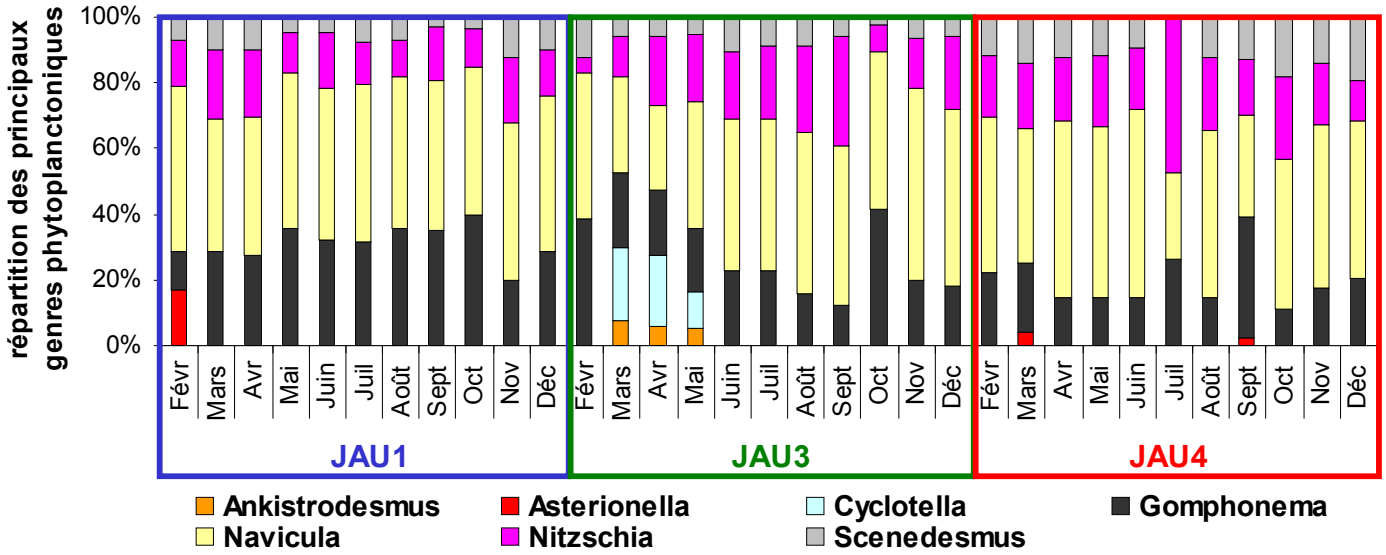


C.III.1.6. Evolution de la structure de la communauté phytoplanctonique

Sur l'ensemble des trois stations, seuls sept genres algaux ont été recensés en 2004, soit deux fois moins qu'en 2003 **(Fig. C-21)**. Parmi ces genres, quatre sont récurrents aux trois stations et présents toute l'année (pendant et hors périodes de pollution) à savoir *Gomphonema, Navicula*, *Nitzschia* et *Scenedesmus* (sauf à JAU4, en juillet, où le niveau de pollution est maximal). Les diatomées pennées sont donc encore largement prédominantes et représentent 87 à 97% de la communauté à JAU1, 64 à 98% à JAU3 et 81 à 99% à JAU4.

On observe à JAU3, au cours du printemps, un développement d'espèces appartenant aux genres *Ankistrodesmus* et *Cyclotella*, non détectés à JAU1 et JAU4. A l'inverse, des diatomées du genre *Asterionella* sont dénombrées ponctuellement à JAU1 et JAU4 alors qu'elles sont absentes à la station de référence.

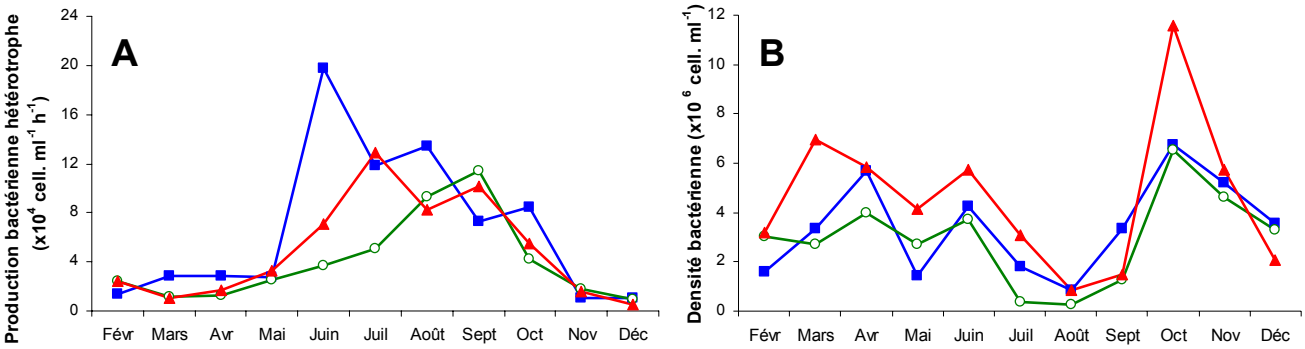
Figure C-21 : Abondance relative des différents genres phytoplanctoniques détectés mensuellement aux stations JAU1, JAU3 et JAU4 en 2004.



C.III.1.7. Evolution de la production hétérotrophe et des densités bactériennes

Comme en 2003, l'évolution de la production bactérienne hétérotrophe **(Fig. C-22A)** est positivement corrélée à celle de la température (R=0,73 ; n=33 ;p<0,001). Aux trois stations, ce paramètre bactérien décrit donc une évolution saisonnière très nette, caractérisée par de faibles valeurs en hiver et jusqu'à la fin du printemps (<4.10^4 cell. ml^{-1} h^{-1}) suivie d'une stimulation en période estivale. Les valeurs maximales ($1,35.10^5$ cell. ml^{-1} h^{-1}), obtenues en été, sont toutefois trois à quatre fois plus faibles que celles enregistrées en 2003, du fait probablement de la forte canicule enregistrée cette année là. A JAU1, une importante stimulation du compartiment bactérien est cependant observée après le mois de mai, parallèlement au déclin de la biomasse algale pendant la période de pollution la plus intense.

Figure C-22 : Evolution mensuelle de la production bactérienne hétérotrophe (x 10^4 cell ml^{-1} h^{-1}, **A**) et des densités bactériennes (x 10^6 cell ml^{-1}, **B**) aux stations JAU1 (■), JAU3 (○) et JAU4 (▲) en 2004.



Contrairement à 2003, aucune corrélation statistique n'est enregistrée, à partir des paramètres mesurés, entre le compartiment algal et la densité bactérienne, qui suit globalement une évolution très similaire au niveau des trois stations **(Fig. C-22B)**. Le nombre de cellules est compris entre 2.10^6 cell ml^{-1} et 6.10^6 cell ml^{-1}, sauf en période estivale où une légère baisse est observée. En octobre, une augmentation du nombre de cellules est toutefois enregistrée à JAU4, qui présente une densité deux fois plus importante ($1,2.10^7$ cell ml^{-1}) que celles des deux autres stations.

C.III.1.8. Evolution de la fraction de bactéries CTC-positives

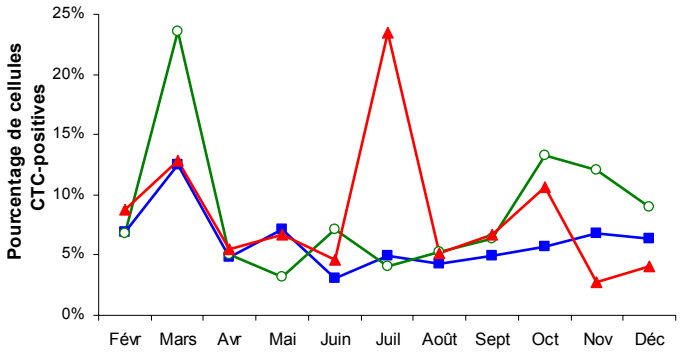
Le pourcentage de bactéries CTC-positives fluctue fortement au cours de l'année entre les trois stations **(Fig. C-23)**, sans corrélation évidente avec les paramètres microbiens précédemment décrits.

A JAU3, la proportion des cellules actives est comprise entre 3% et 7% d'avril à septembre. Un pic très important est enregistré en mars (23,6%) et une stimulation de l'activité est observée au début de l'automne, entraînant un doublement du pourcentage de bactéries CTC-positives (9,0% à 13,3% entre septembre et octobre).

A JAU1, après une augmentation printanière moins marquée (12,5% en mars), le pourcentage de bactéries CTC-positives se stabilise autour de 5% jusqu'à la fin de l'année. La forte stimulation observée en juin en terme de production hétérotrophe n'est donc pas décelable au niveau de la fraction bactérienne la plus active.

A JAU4, l'évolution de la proportion de cellules actives est très proche de celle décrite à JAU1 à l'exception des deux pics enregistrés en juillet, où le niveau de pollution est maximal, et en octobre, en parallèle aux fortes augmentations des teneurs en composés azotés et phosphatés.

Figure C-23 : Evolution mensuelle du pourcentage de bactéries CTC-positives aux stations JAU1 (■), JAU3 (○) et JAU4 (▲) en 2004.



C.III.1.9. Evolution de la diversité bactérienne

Au cours de l'année 2004, l'évolution qualitative de la communauté microbienne n'a été appréciée qu'à partir d'une analyse de la diversité génétique par TTGE **(Fig. C-24)**.

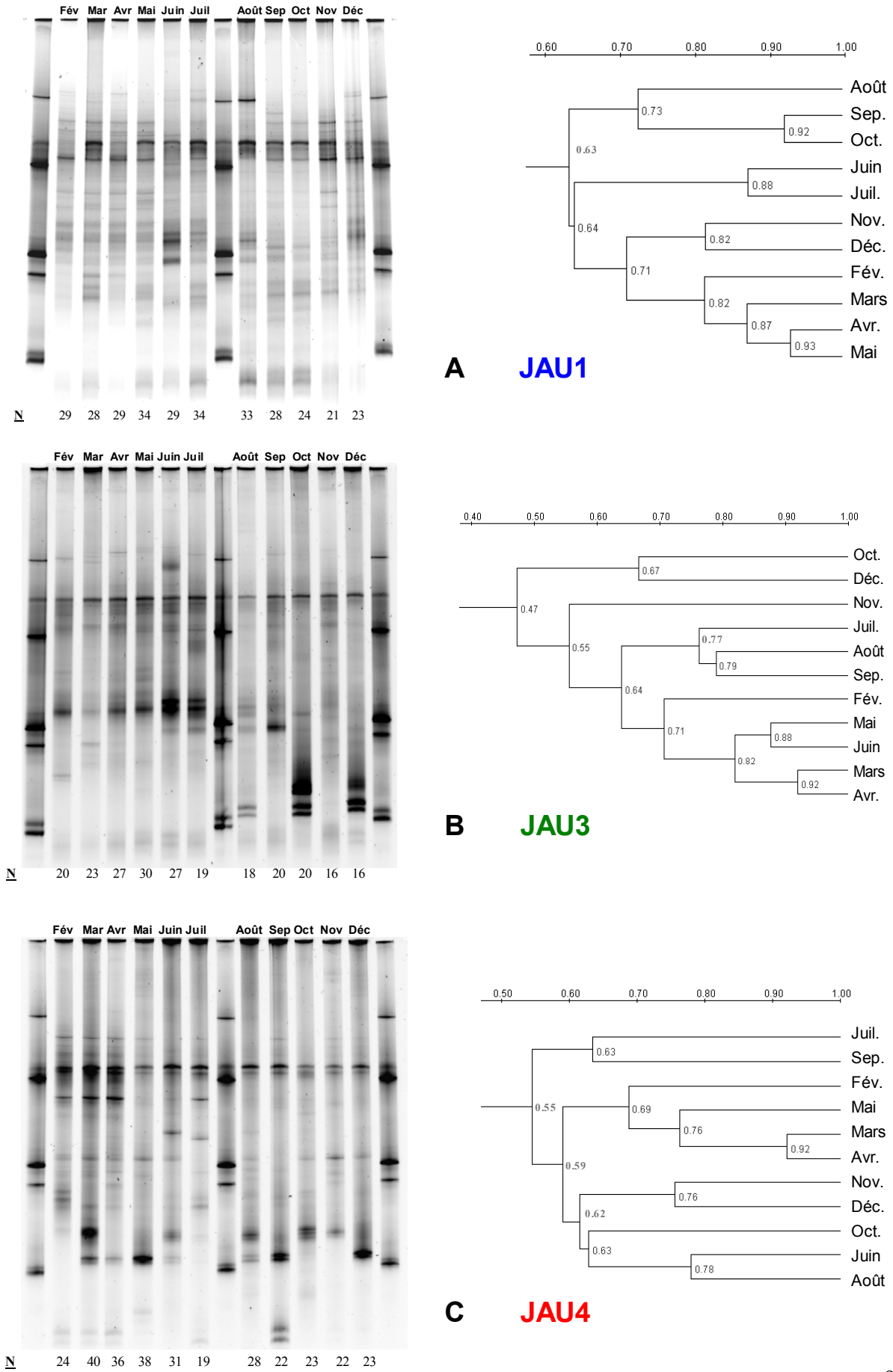
Le nombre de bandes détectées mensuellement sur les profils électrophorétiques est comparable à celui observé en 2003. Il varie entre 21 et 34 à JAU1 **(Fig. C-24A)**, entre 16 et 30 à JAU3 **(Fig. C-24B)** et entre 19 et 40 à JAU4 **(Fig. C-24C)**.

A JAU3 **(Fig. C-24B)**, le dendrogramme réalisé montre une évolution progressive de la diversité, illustrée par des variations graduelles au sein de la communauté bactérienne.

A JAU1 **(Fig. C-24A)**, l'analyse fait apparaître, pour un seuil de similarité supérieur à 70%, trois groupements principaux illustrant des variations saisonnières. Le premier réunit ainsi les mois correspondants aux périodes les plus froides (hiver et printemps), le second, juin et juillet, et le troisième, les mois d'août, septembre et octobre. Des variations importantes sont donc enregistrées au moment du premier pic de pollution (juin) et après l'épisode automnal de pollution (en octobre).

A JAU4 **(Fig. C-24C)**, d'importants remaniements de la diversité bactérienne sont observés à l'échelle mensuelle, notamment pendant les mois de mai à septembre, qui recouvrent la période principale de pollution par les pesticides (mai à juillet). La similarité entre les profils observés pour deux mois successifs est alors toujours inférieure à 60%. A l'opposé, la diversité de la communauté subit moins de remaniements au début (février à mai) et à la fin de l'année (novembre-décembre).

Figure C-24 : Evolution de la diversité bactérienne aux stations JAU1 **(A)**, JAU3 **(B)** et JAU4 **(C)** en 2004, appréciée par une analyse « présence/absence » des profils TTGE selon la méthode DICE/UPGMA. * **N**=nombre de bandes détectées sur la piste



C.III.1.10. Analyse statistique

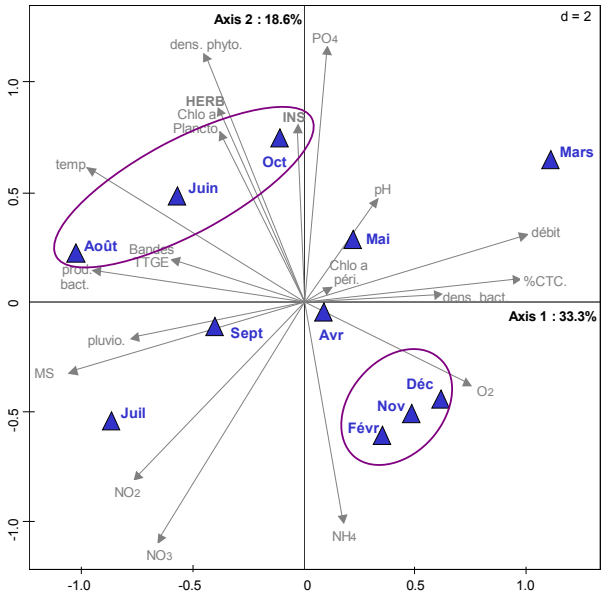
Afin d'avoir une vision plus globale des résultats, une analyse en composantes principales (ACP) a été réalisée, comme en 2003, pour chacune des trois stations en intégrant l'ensemble des paramètres physiques, chimiques et biologiques mesurés **(Fig. C-25)**. Les deux premiers axes choisis expliquent 52% à 58% de la variance totale, suivant les stations.

A JAU3 **(Fig. C-25B)**, l'ACP montre une évolution temporelle et régulière de l'écosystème, en fonction des paramètres considérés. Les mois semblent donc majoritairement répartis selon un caractère saisonnier.

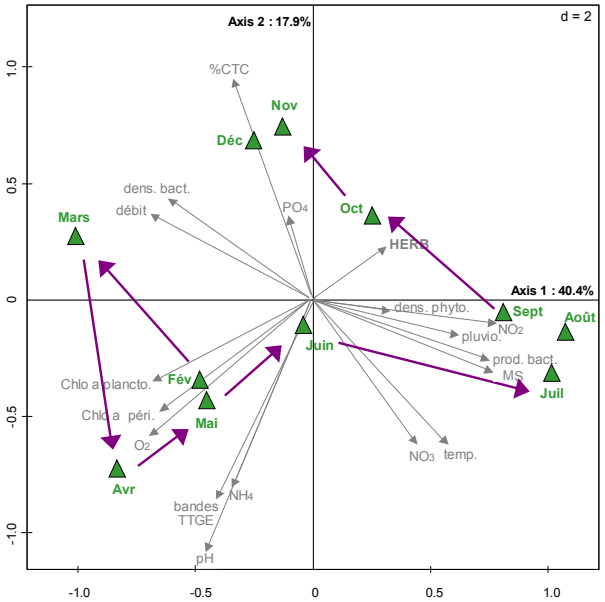
A JAU1 **(Fig. C-25A)**, l'ACP met en évidence, pour un seuil de similarité de 70%, deux regroupements principaux. Ces deux groupes rassemblent ainsi clairement, d'une part, les mois les plus « froids » (février, novembre et décembre) et d'autre part, les mois caractérisés par les plus fortes teneurs en pesticides (juin, août et octobre). Les cinq autres mois sont plus dispersés et sont répartis suivant les valeurs du débit, qui semble être un paramètre important dans le fonctionnement des communautés microbiennes (en 2003, il n'avait pas pu être intégré dans l'analyse du fait de l'absence de mesures pendant plusieurs mois).

A JAU4 **(Fig. C-25C)**, l'ACP distingue très nettement juillet des autres mois, de part ses fortes teneurs en pesticides et en nutriments, notamment en orthophosphates et en ammonium. L'analyse met également en évidence des homologies très marquées entre les mois de novembre et de décembre. Les huit autres mois sont, comme à JAU1, répartis en fonction du débit.

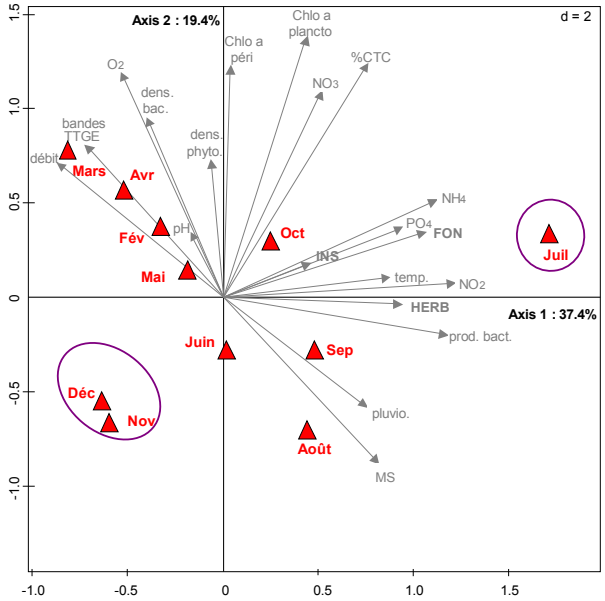
Figure C-25 : Analyse en composantes principales des données abiotiques et microbiennes récoltées aux stations JAU1 **(A)**, JAU3 **(B)** et JAU4 **(C)** entre février et décembre 2004.



A
JAU1



B
JAU3



C
JAU4

Légende

ALPHA : a-Protéobactéries
BandesTTGE : nombre de bandes détectées par TTGE
BETA : b-Protéobactéries

CFB : Cytophaga Flavobacterium
ChloPlan : chlorophylle a planctonique
CTC : bactéries CTC-positives
DensBac : densité bactérienne
DensPhyto : densité phytoplanctonique
FON : fongicides
GAMMA : g-Protéobactéries
HERB : herbicides
INS : insecticides
MS : matières sèches
NH4 : ammonium
NO2 : nitrites
NO3 : nitrates
O2 : oxygène dissous
PH : pH
Pluvio : pluviométrie
PO4 : orthophosphates
ProdBac : production bactérienne
Temp : température

C.III.2. Discussion

C.III.2.1. Caractéristiques abiotiques générales des trois stations d'échantillonnage

Même si les paramètres climatiques et nutritifs ont pu varier d'une année sur l'autre, en fonction notamment du contexte météorologique, les trois stations étudiées dans le cadre de ce travail présentent des caractéristiques abiotiques qui leur sont spécifiques. Elles peuvent ainsi être classées de manière très globale suivant un « gradient d'eutrophisation » (Dodds *et al.*, 1998) : station JAU3 (mésotrophe), station JAU1 (méso-eutrophe) et station JAU4 (eutrophe). La caractérisation trophique des différentes portions de cette rivière s'explique par les activités anthropiques sur le bassin versant. Les fortes teneurs en nitrates enregistrées au niveau de l'exutoire (JAU1) sont ainsi attribuables aux pratiques propres à l'agriculture intensive, tandis que la station située en zone urbaine (JAU4) est régulièrement soumise à des apports élevés en composés azotés et phosphorés, issus des rejets d'eau usée, en provenance de la ville de Billom.

A ce gradient d'eutrophisation, s'ajoute un gradient de contamination en pesticides, depuis la station de référence (JAU3), relativement peu exposée, jusqu'à la station JAU4, réceptrice d'eau chargée en polluants. Cependant, on enregistre en un an une baisse significative du niveau de pollution, cinq à dix fois plus faible en 2004. Plusieurs hypothèses, non exclusives, peuvent être émises pour expliquer la baisse des teneurs en pesticides détectées dans le Jauron entre les deux années :

(1) une utilisation moins conséquente de ces molécules sur le bassin versant du Jauron en 2004 ;
(2) un transfert vers le milieu aquatique plus limité en 2004, l'intervalle de temps entre les épisodes pluvieux et les périodes d'épandage des produits phytosanitaires étant un des facteurs qui conditionne fortement ce processus ;
(3) une différence liée au risque « d'erreurs » induit par le pas d'échantillonnage utilisé.

Les périodes et modes de pollution sont également différents entre les deux années. En zone de culture, on observe ainsi une contamination plutôt chronique en 2003 (avril à octobre) alors qu'elle est beaucoup plus ponctuelle en 2004. Toutefois, la nature de la pollution, dictée majoritairement par les pratiques agricoles, est fortement similaire entre les deux années :

- 2004 : 96% d'herbicides dont 65% d'AMPA et 10% de glyphosate ;
- 2003 : 84% d'herbicides dont 65% d'AMPA et 7% de glyphosate.

En zone urbaine, on observe une pollution ponctuelle et aiguë en 2003, alors qu'elle s'étale, de manière plus modérée, sur un trimestre en 2004 (mai à juillet). En revanche, la nature des polluants est ici très différentes entre les deux années :

- 2004 : 90% d'herbicides et 10% d'insecticides ;
- 2003 : 60% d'herbicides, 20% d'insecticides et 20% de fongicides.

Cette forte variation annuelle, perçue à la fois au niveau de la période de pollution et de la nature des polluants, traduit le caractère « plus aléatoire » d'une pollution d'origine non-agricole, qui est fonction du type d'activités associées à l'utilisation des pesticides (espaces verts publics ou privés, entretien de la voirie et des voies ferrées…).

C.III.2.2. Evolution « saisonnière » des communautés algales et bactériennes dans le Jauron

Au niveau de la station de référence, la biomasse phytoplanctonique, plus faible qu'aux deux autres stations du fait d'un contexte nutritif moins favorable, suit une évolution saisonnière « classique » (Balbi, 2000 ; Castillo *et al.*, 2004), globalement similaire au cours des deux années. Elle est caractérisée par un premier développement au début du printemps, puis un second en période estivale, l'intensité et la période d'apparition des efflorescences algales semblant, en partie, être fonction de la disponibilité en orthophosphates dans le milieu.

Malgré la forte similitude entre les deux années au niveau de l'évolution de la biomasse algale planctonique, de fortes variations sont observées au niveau de la densité phytoplanctonique et de la diversité taxonomique. En 2003, la communauté algale est ainsi relativement diversifiée (11 genres différents recensés) alors que seulement six genres composent cette communauté en 2004. Quatre genres (*Gomphonema, Navicula, Nitzschia* et *Scenedesmus*) semblent relativement ubiquistes et sont représentés globalement toute l'année lors des deux suivis, malgré les variations saisonnières.

L'évolution des teneurs en chlorophylle *a* périphytique n'a pu être évaluée qu'en 2004. Comme pour la communauté planctonique, la biomasse algale périphytique suit une évolution proche de celle décrite dans la littérature (Madigou, 2005), caractérisée par un développement printanier, puis de faibles valeurs, inférieures à 0,3 µg chlo *a* cm^{-2}, après le mois de juin.

Quelle que soit l'année considérée, le niveau de production bactérienne hétérotrophe, au niveau de la station de référence, est majoritairement conditionné par l'évolution de la température de l'eau et n'est pas systématiquement relié à celui du compartiment algal.

L'absence de co-variations fortes entre les communautés algales et bactériennes est généralement observée dans des sections de cours d'eau caractérisées par une faible biomasse algale, concernant notamment le périphyton (<5 µg chlo *a* cm^{-2} ; Rier & Stevenson, 2001), et où les apports allochtones jouent un rôle prépondérant sur l'activité de la communauté bactérienne.

Au cours des deux années successives, l'analyse par TTGE de la diversité bactérienne, montre une modification graduelle au sein de la communauté en fonction de l'évolution saisonnière des conditions environnementales. Cette évolution est illustrée par les résultats des deux analyses par ACP, qui semblent traduire, à partir des paramètres utilisés, une progression régulière de l'écosystème au cours de l'année.

Même si elle n'est pas tout à fait identique à celle observée l'année précédente, l'évolution des communautés microbiennes s'effectue donc de manière très progressive à la station de référence, en fonction des paramètres saisonniers.

C.III.2.3. Impact d'une pollution d'origine agricole sur l'évolution des communautés algales et bactériennes

Dans la zone agricole, les communautés microbiennes sont fortement exposées à la présence des herbicides, avec une nette prédominance du glyphosate et de l'AMPA. Le niveau total de contamination (cinq fois plus fort en 2003) et le mode d'exposition (de type chronique en 2003 et ponctuel en 2004) varient fortement au cours des deux années successives. Malgré cela, la contamination récurrente en herbicides au printemps affecte significativement la biomasse algale. Au pas d'échantillonnage réalisé, le délai constaté pour l'impact est toutefois variable entre les deux années, puisque les effets sont perçus consécutivement au pic de pollution en 2003 alors que la baisse de la biomasse est enregistrée simultanément au début de la vague de contamination en 2004. Cette différence est attribuable aux limites dues au pas d'échantillonnage utilisé pour les analyses chimiques qui, effectuées mensuellement, traduisent une situation ponctuelle et ne donnent aucune information, ni sur la durée de l'épisode de pollution, ni sur le niveau maximal de la contamination.

La réponse de la fraction algale fixée est différente de celle de la fraction planctonique. En effet, le maintien pendant six mois d'une faible biomasse algale périphytique, suite à une contamination ponctuelle en herbicides, suggère un effet plus chronique de ces polluants sur les algues fixées. Cette différence de « productivité » entre les fractions algales libres et fixées peut être attribuée aux propriétés du périphyton, qui, du fait de son caractère sessile, ne peut échapper aux événements successifs de contamination. La réponse du périphyton est par conséquent dépendante de nombreux facteurs, tels que la durée d'exposition et le délai entre

les pollutions successives, qui conditionne fortement la capacité de « récupération » des microorganismes (Gustavson *et al.*, 2003).

L'impact de la contamination d'origine agricole sur la biomasse algale n'est pas systématiquement associé à une diminution forte de la densité phytoplanctonique, ni à de fortes modifications de la composition taxonomique de la communauté algale, particulièrement en 2004. La plus faible diversité et la présence quasi-exclusive des genres *Gomphonema*, *Navicula*, *Nitzschia* et *Scenedesmus*, qui caractérisent alors cette communauté, suggèrent une forte résistance aux herbicides de la part de ces organismes. Cette hypothèse est cohérente avec les résultats observés en 2003. Comme l'ont montré précédemment Bérard *et al.* (1999a) et Dorigo *et al.* (2004), la composition taxonomique de la communauté conditionne fortement son niveau de sensibilité aux herbicides. D'autre part, la diminution de la teneur cellulaire en chlorophylle *a*, déjà observée notamment chez des organismes phytoplanctoniques exposés aux herbicides (DeLorenzo *et al.*, 2004), fait partie des hypothèses qui peuvent être avancées pour expliquer l'absence de relation marquée entre les concentrations en chlorophylle *a* et les densités cellulaires.

Quelle que soit la station considérée (JAU1 ou JAU3), la production bactérienne hétérotrophe suit une évolution saisonnière, conditionnée essentiellement par la température de l'eau. Entre 2003 et 2004, des différences d'intensité de cette production sont toutefois enregistrées pour les communautés évoluant dans la portion de rivière soumise à la contamination agricole et celles évoluant au niveau de la station de référence. Ainsi, la forte production enregistrée en juin 2004 à JAU1 ne peut pas être expliquée par des conditions climatiques plus favorables. La stimulation du compartiment bactérien est probablement engendrée dans ce cas par l'altération des microorganismes photosynthétiques suite au pic d'herbicides détecté en mai.

Même au sein d'une rivière où les interactions « algues-bactéries » ne sont pas très marquées, une altération notable du compartiment autotrophe par les herbicides peut donc engendrer une forte stimulation de l'activité bactérienne. Ce phénomène a déjà été observé (Downing *et al.*, 2004) et peut résulter (1) du relargage par les algues de matières organiques directement assimilables (Baines & Pace, 1991) ou (2) d'une diminution de la compétition entre ces deux compartiments pour les ressources (DeLorenzo *et al.*, 1999). La première hypothèse semble plausible du fait d'un contexte nutritif non limitant et de l'augmentation en juillet des teneurs en nutriments inorganiques qui suggèrent une forte activité de décomposition de la matière organique dans la période précédant le prélèvement. La forte production hétérotrophe n'est toutefois pas accompagnée d'une augmentation de la densité

bactérienne ou du pourcentage de bactéries CTC-positives. Servais *et al.* (2001) ont montré que ces deux paramètres ne sont pas forcément corrélés. D'autres explications peuvent être avancées telles qu'une pression de broutage par les protistes, notamment les nanoflagellés hétérotrophes, facteur primordial dans la régulation de l'abondance des bactéries, en particulier des plus actives (Del Giorgio *et al.*, 1997). Elle peut donc jouer un rôle déterminant dans la rivière, surtout au début et à la fin de l'été (Karrasch *et al.*, 2001).

Pour les deux années, les pics de pollution ou le début des périodes de contaminations plus chroniques coïncident généralement avec des bouleversements dans l'évolution graduelle annuelle de la diversité génétique bactérienne. Ainsi, en 2004, le pic majeur de pollution observé en juin s'accompagne d'une redistribution des espèces majoritaires au sein de la communauté bactérienne, le pourcentage de similarité entre mai et juin étant inférieur à 65%. Ces changements peuvent être induits par des changements du contexte nutritionnel suite à l'apport massif de détritus algaux dans le milieu (Van Hannen *et al.*, 1999) et/ou par le développement d'espèces bactériennes adaptées aux modifications environnementales engendrées par la présence des herbicides. Plusieurs études ont ainsi montré les effets de ces xénobiotiques sur la composition des communautés bactériennes au niveau du sol (El Fantroussi *et al.*, 1999 ; Johnsen *et al.*, 2001 ; Seghers *et al.*, 2003) mais peu de travaux concernent le milieu aquatique.

En zone agricole, la contamination régulière de la rivière par les herbicides, en particulier le glyphosate et l'AMPA, engendrent donc des perturbations au niveau des communautés microbiennes.

Les communautés autotrophes sont les plus exposées aux effets des polluants, compte tenu des propriétés toxiques des herbicides détectés. Les biomasses phytoplanctoniques sont affectées ponctuellement lors des événements majeurs de pollution, alors que l'effet semble plus chronique au niveau du périphyton qui présente des teneurs en chlorophylle a très faibles sur une grande partie de l'année. Certaines algues paraissent toutefois particulièrement indifférentes et/ou résistantes aux herbicides, notamment les espèces appartenant aux genres Nitzschia, Navicula, Gomphonema et Scenedesmus. Leur présence récurrente, et parfois exclusive, dans le Jauron aux périodes de fortes pollutions semble soutenir cette hypothèse.

L'impact des herbicides sur les communautés algales se répercute de manière moins systématique et/ou moins prononcée sur le compartiment bactérien. La stimulation de l'activité hétérotrophe suite au déclin des microorganismes autotrophes n'est pas toujours perceptible du fait vraisemblablement de l'apport allochtone de matière organique dans la

rivière, venant réduire ou masquer les relations de co-variation entre ces deux communautés. Cependant, l'analyse de la diversité génétique bactérienne met régulièrement en évidence des remaniements importants dans les périodes de forte pollution.

C.III.2.4. Impact d'une pollution d'origine urbaine sur l'évolution des communautés algales et bactériennes

En zone urbaine en 2004, (1) le niveau de contamination, dix fois plus faible, (2) le type de pollution, étalé principalement sur une période de seulement trois mois, entre mai et juillet, et (3) la nature et la diversité des pesticides détectés (60% d'herbicides, 20% d'insecticides et 20% de fongicides) sont très différents de la situation observée en 2003.

Malgré ces variations marquées du contexte de contamination, la biomasse phytoplanctonique évolue de manière similaire les deux années, en faisant apparaître trois périodes de fort développement et trois périodes de baisse majeure. Le déclenchement des efflorescences algales, leur durée et leur intensité sont principalement conditionnés par la forte disponibilité nutritive liée aux rejets d'eau usée. Les premières périodes de diminution de la biomasse qui surviennent à la fin du printemps et de l'été sont reliées aux périodes de contaminations. L'atteinte du compartiment algal survenant en hiver est, quant à elle, dictée par les conditions thermiques.

En dépit de l'altération évidente de l'activité autotrophe, l'absence de changements majeurs dans la composition taxonomique de la communauté phytoplanctonique en 2004 peut également être expliquée par la présence exclusive d'espèces appartenant aux genres *Gomphonema*, *Navicula*, *Nitzschia* et *Scenedesmus*.

Les biomasses algales planctoniques et périphytiques suivent, en zone urbaine, une évolution parallèle. La reprise de l'activité autotrophe périphytique, qui fait suite aux différents épisodes de contaminations, est certainement favorisée en partie par la forte teneur en nutriments, qui stimule la faculté de « récupération » du périphyton après l'impact des herbicides (Barreiro Lozano & Prat, 1994 ; Guasch *et al.*, 1998), et par la présence régulière d'insecticides, pouvant réduire significativement la pression de broutage sur ces organismes (Caquet *et al.*, 1992 ; Barry & Logan, 1998).

En 2004, l'événement majeur de pollution, enregistré en juillet (2,60 µg l^{-1}), est caractérisé par une grande diversité des molécules détectées. Cependant, les effets sur la communauté autotrophe sont relativement modérés. Deux hypothèses peuvent être émises pour expliquer ce résultat :

- (1) A cette période, la contamination est due à la présence de huit molécules, avec une prédominance de l'herbicide alachlore (0,97 µg l^{-1}), du fongicide procymidone (0,87 µg l^{-1}) et de l'insecticide piperonyle (0,33 µg l^{-1}). Théoriquement, les herbicides présentent une toxicité directe importante sur les microalgues alors, qu'au contraire, les insecticides peuvent indirectement favoriser le développement des communautés microbiennes autotrophes par suite d'une réduction du contrôle descendant exercé par certains brouteurs (Caquet *et al.*, 1992 ; Barry & Logan, 1998). Van den Brink *et al.* (2000) ont montré que les fongicides, au même titre que les insecticides, peuvent aussi présenter un effet négatif sur le zooplancton, engendrant alors un effet positif sur le phytoplancton. Peu d'informations sont actuellement disponibles quant aux effets d'un mélange de différents types de pesticides sur les communautés microbiennes aquatiques (Van Wijngaarden *et al.*, 2004) et les possibles interactions entre les molécules rencontrées (synergie, additivité, antagonisme…) restent inconnues.
- (2) Le pic de pollution est associé, à cette période, à des apports très importants en azote et en phosphore inorganiques qui peuvent alors exercer conjointement des effets positifs sur les microorganismes photosynthétiques.

Lors des deux années d'étude, aucune stimulation significative n'a été perçue au niveau de la production hétérotrophe ou de la densité bactérienne suite au déclin des communautés autotrophes. L'évolution de la communauté hétérotrophe est certainement influencée majoritairement par les rejets de la station d'épuration, qui représentent une source importante de composés inorganiques et organiques (Servais *et al.*, 1999). L'évolution du pourcentage de bactéries CTC-positives est d'ailleurs fortement corrélée à celle des teneurs en ammonium au cours des deux années ($p<0,001$).

La diversité bactérienne à cette station est également fortement conditionnée par les rejets de la station d'épuration. Les nombreux remaniements observés par TTGE au niveau de la diversité génétique peuvent être expliqués par les variations quantitatives et qualitatives des apports en nutriments et en matières organiques, mais aussi par l'apport en bactéries allochtones qui peuvent ainsi directement modifier la composition de la communauté (Cébron *et al.*, 2004).

En zone urbaine, la rivière est soumise à une forte contamination provenant des rejets d'eau usée issus de la station d'épuration, qui représentent une source majeure de pesticides mais aussi de divers composés inorganiques et organiques. Les apports simultanés en pesticides et en nutriments, mais aussi probablement en diverses matières

organiques et en microorganismes allochtones, rendent difficile la discrimination des effets engendrés par les polluants, particulièrement au niveau du compartiment bactérien.
Il semble cependant indéniable que les forts apports en herbicides génèrent dans la plupart des cas une chute des biomasses algales, notamment au printemps et en été. Les effets sont moins perceptibles en présence de profils de pollution plus complexes, du fait des interactions possibles entre les diverses molécules.

CHAPITRE D

Effets individuels de deux herbicides (le diuron et le glyphosate) sur les communautés microbiennes d'un cours d'eau récepteur :

Etudes en microcosmes

Chapitre D – EFFETS INDIVIDUELS DE DEUX HERBICIDES (LE DIURON ET LE GLYPHOSATE) SUR LES COMMUNAUTES MICROBIENNES D'UN COURS D'EAU RECEPTEUR : ETUDES EN MICROCOSMES.

D.I. Validation du protocole expérimental

D.I.1. Choix du dispositif expérimental

Les études à l'aide de systèmes simplifiés se révèlent indispensables pour appréhender les effets de polluants sur les communautés aquatiques dans des conditions expérimentales et de contamination contrôlées. De ce fait, les dispositifs de types microcosmes ou mésocosmes représentent des outils bien adaptés qui sont couramment utilisés en écotoxicologie aquatique **(voir chapitre A.III.4.1)**. Toutefois, dans ces études, le choix du dispositif employé s'avère primordial afin de trouver un compromis acceptable entre trois critères majeurs qui sont : la faisabilité, la représentativité (réalisme écologique) et l'interprétation des données (tenant compte de la reproductibilité et de la répétabilité des expérimentations) (Perez, 1995 ; Caquet *et al.*, 2001). Ce choix est généralement fortement conditionné par les caractéristiques biologiques du système (compartiment(s) choisi(s), complexité du réseau trophique…), le nombre de prélèvements et la durée de l'étude (Caquet *et al.*, 2000).

Pour ce travail de thèse, nous avons choisi d'appréhender les effets des pesticides sur deux compartiments microbiens, les microalgues et les bactéries (pour les raisons précédemment évoquées), dans des dispositifs de type microcosme, sans prendre en compte les interactions avec les niveaux trophiques supérieurs **(voir chapitre B.I.2.3)**. Ces microorganismes possèdent des cycles de vie courts, entraînant des réponses rapides aux changements environnementaux (McCormick & Stevenson R., 1998 ; Lavoie *et al.*, 2004). Nous avons donc défini une durée n'excédant pas 24 jours dans le cadre de nos études expérimentales. La taille réduite des microcosmes permet de travailler avec un bon niveau de réplication (Kangas & Adey, 1996). Afin de limiter la variabilité inter-microcosmes, nous avons utilisé un volume initial réduit (2,3 litres d'eau dans des erlens d'une capacité de 3 litres), permettant le maintien d'un volume final suffisant (35% du volume initial) pour éviter une dérive excessive des communautés lors des derniers jours de suivi (Fajon, 1998). Les microcosmes ainsi constitués ont été placés sous agitation continue à une température constante proche de celle de l'eau de la rivière, mesurée au moment de l'échantillonnage des communautés. Le cycle d'éclairement a été défini en fonction des conditions naturelles observées aux mêmes périodes **(voir chapitre B.I.2.3)**. La reproductibilité satisfaisante des résultats obtenus lors de travaux

antérieurs de DEA (Pesce, 2002 ; Le Jeune, 2003) a permis de valider ce dispositif expérimental.

D.I.2. Intégration de la fraction algale périphytique dans les études expérimentales

D.I.2.1. Objectifs des expériences préliminaires

Au regard du rôle primordial que jouent les microorganismes périphytiques dans les cours d'eau **(voir chapitre A.III.3)**, il est important d'intégrer cette communauté fixée dans les études visant à appréhender les effets des pesticides sur les communautés microbiennes en milieu lotique.

L'utilisation de substrats artificiels (lames, tuiles…), préalablement colonisés par les organismes périphytiques dans le milieu naturel et disposés directement dans les micro/méso-cosmes, est le procédé le plus communément employé dans les études expérimentales (Pérès *et al.*, 1996 ; Van den Brink *et al.*, 2000 ; Schmitt-Jansen & Altenburger R., 2005). Cette méthode, qui nécessite le prélèvement et l'analyse d'un ou plusieurs substrats lors de chaque échantillonnage, se révèle fastidieuse et impose une taille importante de microcosmes. Afin de définir au mieux la stratégie à adopter pour intégrer ce compartiment, et d'appréhender ainsi la réponse des microorganismes libres et fixés à la présence des herbicides, nous avons cherché à valider trois points importants.

(1) Nous avons apprécié la variabilité entre chacune des lames utilisées comme substrats lors de leur colonisation par le périphyton dans le Jauron. Ce paramètre se révèle en effet primordial pour vérifier la nécessité d'utiliser des réplicats et pour définir, le cas échéant, le nombre de lames à utiliser pour intégrer cette variabilité.

(2) Nous avons ensuite apprécié la réponse de la communauté algale périphytique à la présence d'un herbicide, le diuron, lorsque les organismes sont toujours fixés à leur substrat (lame de verre) ou lorsqu'ils ont été préalablement décollés et remis en suspension. Cette dernière méthode, qui a l'avantage d'assurer l'homogénéité de la communauté avant l'introduction du polluant, peut toutefois présenter quelques inconvénients. Certaines cellules peuvent être affectées physiologiquement lors du grattage des lames à l'aide de la lamelle et peuvent alors devenir sénescentes ou plus sensibles aux polluants suite à leur fragilisation. Il est aussi envisageable qu'une partie de la communauté puisse se fixer sur un nouveau substrat et coloniser ainsi rapidement les parois du microcosme. Dans ce cas, un prélèvement effectué uniquement dans la colonne d'eau ne permettrait pas d'intégrer ces organismes dans les analyses. La remise en suspension du matériel fixé peut également conduire à une libération de composés inorganiques dans la colonne d'eau, notamment de phosphore, initialement retenus dans la matrice périphytique (Dodds, 2003). Ces différents points ont donc été évalués

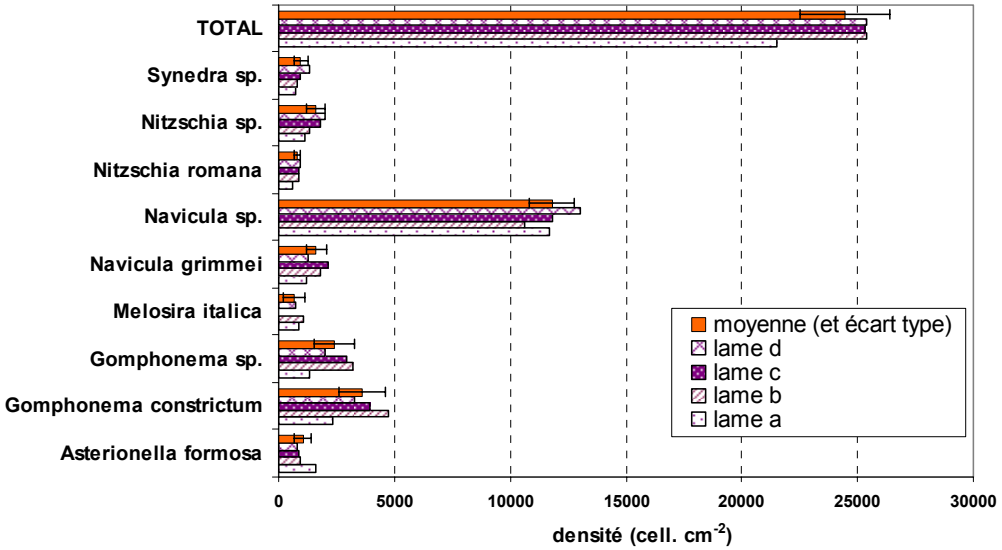
afin de définir au mieux la stratégie à adopter pour appréhender, de manière rigoureuse et « pratique », les effets des polluants sur le périphyton dans nos expériences en microcosmes. Les réponses des communautés algales périphytiques, en fonction de l'approche utilisée (maintenues sur substrat ou mises en suspension) ont alors été comparées entre elles, mais aussi à celle de la communauté phytoplanctonique afin d'apprécier parallèlement la sensibilité de ces différents compartiments au polluant.

(3) Nous avons aussi souhaité apprécier l'influence du temps de colonisation des lames sur la densité et la diversité algale, à partir de substrats immergés pendant deux et trois semaines dans le Jauron, durées qui sont les plus utilisées dans la littérature (Watanabe *et al.*, 1988 ; Guash & Sabater, 1998 ; Dorigo *et al.*, 2002 ; Rier & Stevenson, 2002 ; Bernhardt & Likens, 2004)

D.I.2.2. Estimation de la variabilité taxonomique algale sur les substrats artificiels colonisés par le périphyton dans la rivière

Cette estimation a été réalisée en février 2003, à partir de lames immergées dans le Jauron à la station JAU1. L'objectif n'étant pas ici, de déterminer le temps optimal de colonisation des substrats, nous avons opté pour la durée la plus fréquemment signalée dans la littérature. Quatre lames (codées a, b, c et d), fixées sur le même support de colonisation, ont donc été prélevées après deux semaines de colonisation. L'analyse taxonomique de la communauté algale a été effectuée par identification et comptages au microscope (40 champs observés pour chaque lame).

Figure D-1 : Comparaison de la diversité taxonomique sur quatre lames (a, b, c, d) prélevées à JAU1 après deux semaines d'immersion et représentation des valeurs moyennes et des écarts-types obtenus pour l'ensemble des lames.



Les résultats obtenus pour chacune des quatre lames ainsi que les moyennes et les écarts-types sont présentés sur la **Figure D-1**. La densité algale totale mesurée sur chacune des lames varie entre $2{,}15.10^4$ et $2{,}54.10^4$ cellules par cm² et est comparable aux densités observées par Gold *et al.* (2003) sur des substrats colonisés pendant deux semaines en rivière. La communauté algale périphytique est composée exclusivement de diatomées, avec une dominance des espèces pennées du genre *Navicula* et *Gomphonema* qui représentent respectivement 49 à 60% et 17 à 31% de l'ensemble des cellules dénombrées.

Une analyse de la variance à un facteur a été effectuée pour apprécier la variabilité entre les lames **(Tableau D-1)**. Au seuil de significativité statistique de 5%, aucune différence significative n'est observée entre les quatre lames à l'exception du genre *Melosira*, absent sur une d'entre elles (lame c). Au seuil de 10%, on observe également des différences pour *Navicula sp*. et pour les espèces du genre *Gomphonema*. Ces résultats témoignent donc d'une composition taxonomique relativement proche mais différente entre les quatre lames. Compte tenu de ces possibles variations, l'intégration de plusieurs lames semble préférable lors de l'introduction des organismes périphytiques dans nos dispositifs expérimentaux.

Tableau D-1 : Résultat de l'analyse de variance à un facteur utilisée pour comparer la diversité taxonomique entre les quatre lames.
* au seuil de 5%

	F	Probabilité	Valeur critique pour F *
Asterionella formosa	1,30	0,28	2,66
Gomphonema constrictum	**2,53**	**0,06**	**2,66**
Gomphonema sp.	**2,34**	**0,08**	**2,66**
Melosira italica	**3,21**	**0,02**	**2,66**
Navicula grimmei	0,81	0,49	2,66
Navicula sp.	**2,24**	**0,09**	**2,66**
Nitzschia romana	0,33	0,80	2,66
Nitzschia sp.	0,98	0,40	2,66
Synedra sp.	0,72	0,54	2,66

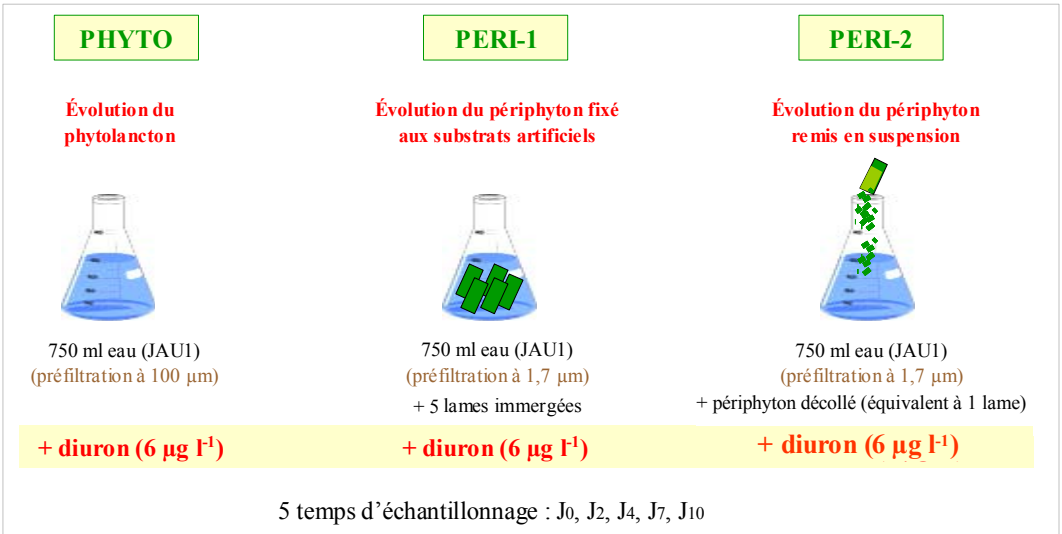
D.I.2.3. Influence de la remise en suspension sur la réponse de la communauté périphytique à la présence du diuron. Comparaison avec le phytoplancton

D.I.2.3.a. Protocole expérimental

Pour appréhender d'une part, l'effet du détachement des algues périphytiques sur la réponse de ces organismes à la présence d'un herbicide, et comparer d'autre part, leur sensibilité avec celle du phytoplancton, une expérience a été menée en mars 2003 à l'aide de microcosmes (erlens de 1 litre), contaminés au diuron, à la concentration nominale de 6 $\mu g\ l^{-1}$. Trois types de dispositifs **(Fig. D-2)** ont été utilisés :

- Microcosme codé *« PHYTO »*, destiné à suivre l'évolution du phytoplancton en présence du diuron et constitué de 750 ml d'eau, filtrée à 100 µm pour éliminer les organismes brouteurs ;
- Microcosme codé *« PERI-1 »*, destiné à suivre l'évolution du périphyton, fixé sur lame, en présence du diuron. Cinq lames préalablement colonisées sont placées dans 750 ml d'eau filtrée à 1,7 µm (élimination du phytoplancton et des brouteurs). Une lame est prélevée de manière aléatoire lors de chaque échantillonnage ;
- Microcosme codé *« PERI-2 »*, destiné à suivre l'évolution du périphyton, remis en suspension, en présence du diuron. Quatre lames préalablement colonisées ont été grattées délicatement à l'aide d'une lamelle, afin de remettre le périphyton en suspension. Après homogénéisation, un quart de cette suspension (soit l'équivalent d'une lame : 9,88 cm²) est introduit dans 750 ml d'eau filtrée à 1,7 µm (élimination du phytoplancton et des brouteurs). Cette équivalence nous a permis de calculer par une simple conversion et à partir des résultats obtenus sur la lame prélevée dans le microcosme PERI-1, les valeurs théoriques (exprimées dans la même unité) qui devraient être observées dans le microcosme PERI-2.

Figure D-2 : Dispositif expérimental utilisé pour définir la stratégie à adopter en vue de la mise en place des études expérimentales en microcosmes.

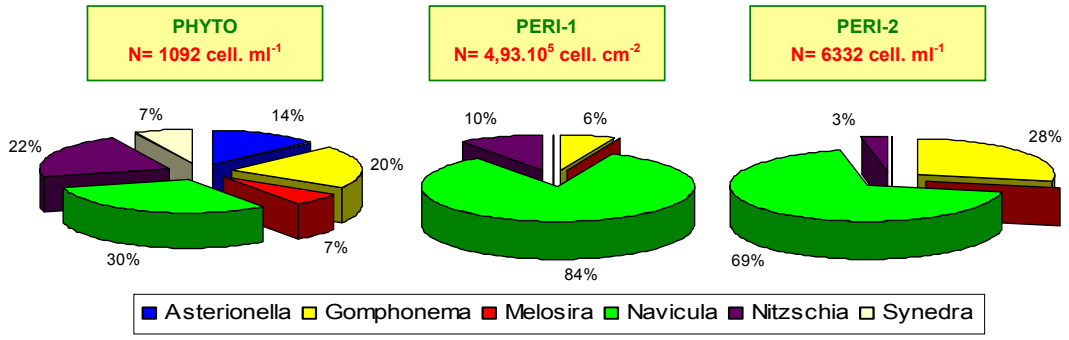


Les trois microcosmes ont été placés pendant 10 jours sous agitation continue à 8°C (température de l'eau mesurée *in situ* au moment du prélèvement des communautés à JAU1), avec une photopériode 12h/12h. Les paramètres abiotiques (oxygène et éléments nutritifs) et biologiques (teneur en chlorophylle *a*, densité algale et identification taxonomique) considérés pour ce travail préliminaire, ont été mesurés selon le pas d'échantillonnage suivant : Jours 0, 2, 4, 7 et 10. Les résultats obtenus ont été comparés entre les différents contextes expérimentaux.

D.I.2.3.b. Résultats et discussion

Dans un premier temps, nous avons comparé la densité et la composition taxonomique algale initiale (à J0) dans les trois types de microcosmes **(Fig. D-3)**. La composition taxonomique de la communauté algale diffère fortement entre la fraction planctonique où six genres sont représentés (PHYTO) et la fraction périphytique où seulement trois genres principaux sont recensés (PERI-1 et PERI-2).

Figure D-3 : Densité algale et composition taxonomique lors de la mise en eau des trois types de microcosmes.



On observe également une différence notable entre les deux microcosmes « PERI » au niveau de l'abondance relative des principaux genres représentés (*Gomphonema*, *Navicula*, *Nitzschia*). Compte tenu de la variabilité décrite précédemment, cette différence est peut-être attribuable à une faible représentativité de la lame prélevée à J0 dans le microcosme PERI-1.

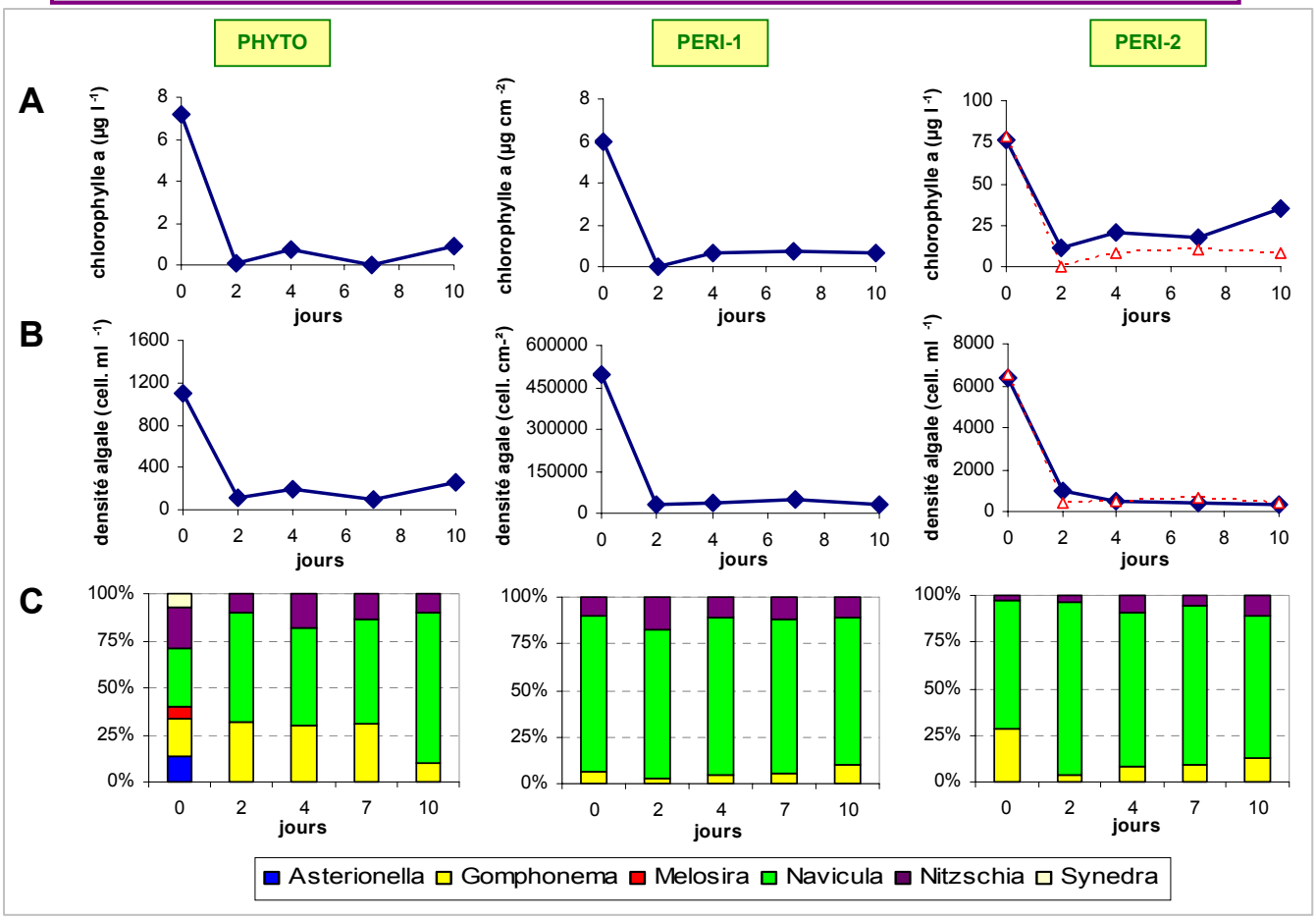
Sur un autre plan, si on calcule, à partir de la densité mesurée sur la lame prélevée dans le microcosme PERI-1 ($4{,}93.10^5$ cell.cm^{-2}), la valeur qui devrait être observée dans le microcosme PERI-2 suivant le protocole utilisé (densité équivalente à une lame de 9,88 cm² mise en suspension dans 750 ml d'eau), on obtient une densité théorique de 6494 cell. ml^{-1} très proche de la valeur trouvée (6332 cell. ml^{-1}). Les densités initiales obtenues à partir des deux contextes (PERI-1 et PERI-2) sont donc relativement similaires.

La **Figure D-4** illustre l'évolution des communautés algales, dans les trois contextes, en présence de diuron au cours du suivi. Les communautés algales planctoniques et périphytiques suivent une évolution comparable dans les trois types de microcosmes. Les teneurs en chlorophylle *a* **(Fig. D-4A)** et les densités cellulaires **(Fig. D-4B)** mettent ainsi en évidence un fort déclin des organismes autotrophes dans les deux premiers jours puis une stabilisation de la communauté jusqu'à la fin de l'expérience. Ce déclin peut vraisemblablement être principalement attribué à la présence de diuron car les conditions abiotiques mesurées ne semblent pas être défavorables aux microorganismes **(Tableau D-2)**. Les effets de l'herbicide sont donc perceptibles pour le phytoplancton et le périphyton avec une intensité et un délai globalement identique.

La densité algale théorique contenue dans PERI-2, calculée selon les explications précédentes à partir des valeurs mesurées dans PERI-1 et représentée à l'aide des pointillés rouges **(Fig. D-4B)**, est très proche de celle observée. Les densités algales dans les microcosmes PERI-1 et PERI-2 sont donc similaires sur l'ensemble du suivi. La remise en suspension des organismes périphytiques ne semble donc pas avoir d'incidence importante sur l'évolution quantitative de la communauté.

Cela suggère (1) que les cellules périphytiques remises en suspension ne sont globalement pas plus sensibles au diuron que les cellules fixées sur lame et (2) que le nombre de cellules susceptibles de coloniser la surface des microcosmes et d'échapper ainsi aux prélèvements effectués dans la colonne d'eau est extrêmement limité.

Figure D-4 : Evolution de la concentration en chlorophylle *a* **(A)**, de la densité algale **(B)** et de la composition taxonomique **(C)** dans les trois types de microcosmes.
--△-- valeurs théoriques calculées à partir des valeurs obtenues dans le microcosme PERI-1



Une légère différence est tout de même observée au niveau de la biomasse algale. En effet, les concentrations théoriques en chlorophylle *a*, calculées à partir des valeurs obtenues sur les lames prélevées dans le microcosme PERI-1, sont deux à quatre fois inférieures à celles mesurées dans le microcosme PERI-2 **(Fig. D-4A)**. Malgré une densité cellulaire très

proche, la biomasse algale est significativement supérieure au sein de la communauté périphytique remise en suspension. Toutefois, cette différence est enregistrée dès le deuxième jour et les biomasses algales suivent ensuite une évolution relativement parallèle dans les deux types de microcosmes. Hormis cette différence, la remise en suspension des cellules périphytiques ne semble pas engendrer de fortes variations au niveau de la composition taxonomique de la communauté **(Fig. D-4C)**.

Malgré un nombre de taxons initial supérieur au sein de la communauté phytoplanctonique, les compositions taxonomiques observées en fin d'expérience sont très proches dans les trois types de microcosmes **(Fig. D-4C)** et mettent en évidence une évolution algale comparable dans les fractions planctoniques et périphytiques.

L'évolution des paramètres abiotiques au cours du suivi ne fait pas apparaître de différence significative entre les trois contextes **(Tableau D-2)**. La remise en suspension du matériel périphytique ne semble donc pas, comme nous avions pu l'envisager, engendrer des modifications perceptibles des conditions environnementales, notamment au niveau de la disponibilité des nutriments.

Tableau D-2 : Moyennes (et intervalles) des paramètres abiotiques mesurés dans les trois types de microcosmes pendant les 10 jours d'expérience (<sd : inférieur au seuil de détection).

	PHYTO	PERI-1	PERI-2
oxygène dissous (mg l^{-1})	**9,8** (8,9 - 11,0)	**10,1** (9,4 - 11,0)	**10,1** (9,2 - 11,1)
$N\text{-}NO_3$ (mg l^{-1})	**5,39** (3,24 - 6,39)	**5,09** (3,44 - 6,39)	**5,08** (3,66 - 6,43)
$N\text{-}NO_2$ (mg l^{-1})	**0,07** (0,04 - 0,11)	**0,07** (0,04 - 0,09)	**0,07** (0,04 - 0,11)
$N\text{-}NH_4$ (mg l^{-1})	**0,04** (0,02 - 0,12)	**0,03** (0,02 - 0,04)	**0,03** (0,02 - 0,05)
$P\text{-}PO_4$ (mg l^{-1})	**0,08** (0,03 - 0,12)	**0,07** (<sd - 0,12)	**0,07** (<sd - 0,13)

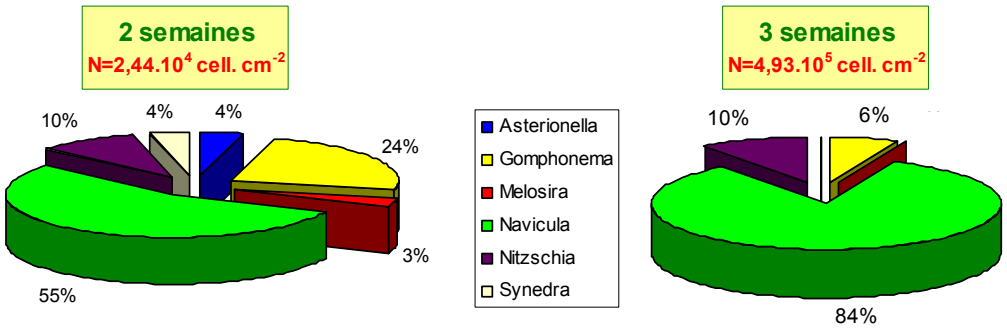
D.I.2.4. Influence de la durée d'immersion des substrats artificiels sur la colonisation et la structure de la communauté périphytique

Pour définir la durée de colonisation des substrats par le périphyton dans le Jauron, nous avons comparé la densité et la composition taxonomique des communautés ayant colonisé les substrats pendant deux semaines à celles ayant colonisé les substrats pendant trois semaines **(Fig. D-5)**.

Les résultats obtenus mettent en évidence des changements dans la composition périphytique pendant la troisième semaine de développement sur les substrats artificiels. Ce remaniement est attribué à un fort développement des espèces appartenant au genre *Navicula,* qui deviennent largement prédominantes au sein de la communauté (69-84%), au détriment notamment des genres *Asterionella, Melosira* et *Synedra* qui disparaissent totalement. La disparition des espèces minoritaires au profit de genres opportunistes a déjà été soulignée par

Gold *et al.*, en 2003. Cette forte croissance des organismes adaptés s'accompagne généralement d'une augmentation significative de la densité algale dans le biofilm au cours des troisième et quatrième semaines de colonisation (Rodriguez, 1987 ; Gold *et al.*, 2003). Effectivement, dans le Jauron, la densité algale sur les substrats artificiels a été multipliée par 20 entre le 14ème jour de colonisation ($2{,}44.10^4$ cell. cm^{-2} ; **Fig. D-5A**) et le 21ème jour ($4{,}93.10^5$ cell. cm^{-2} ; **Fig. D-5B**).

Figure D-5 : Comparaison de la densité et de la diversité taxonomique moyenne sur quatre lames prélevées après deux semaines d'immersion **(A)** et deux lames prélevées après trois semaines d'immersion **(B)**.



Pour obtenir une diversité maximale lors de la collecte du périphyton, une durée de colonisation de deux semaines nous semble donc préférable. Watanabe *et al.* (1988) ont d'ailleurs montré que les communautés périphytiques sont plus sensibles aux variations environnementales lors de la phase de colonisation des substrats, avant qu'elles n'atteignent un stade climacique. Compte tenu de notre approche écotoxicologique, ce facteur est très important pour percevoir au mieux les effets des pesticides sur la fraction algale périphytique.

Synthèse des résultats

Ces travaux préliminaires nous ont permis de tirer plusieurs conclusions applicables pour la suite de notre travail :

- la variabilité entre les lames colonisées est limitée mais nécessite d'être prise en compte. Cela nous à conduit à envisager l'utilisation d'un mélange de périphyton issu de plusieurs lames,
- la remise en suspension du périphyton dans les microcosmes permet de faciliter la réalisation des études expérimentales sans l'altérer et sans fortement influer sur la réponse du compartiment algal et sur les caractéristiques abiotiques du milieu,
- une durée de colonisation de deux semaines des substrats artificiels par le périphyton permet d'obtenir un compromis acceptable entre une bonne richesse spécifique et une biomasse suffisante pour les analyses.

D.II. Caractérisation des effets du diuron

D.II.1. Introduction

Le diuron (N-(3,4-dichlorophényl)-N', N'-diméthylurée) est un herbicide fréquemment rencontré dans les rivières françaises, notamment dans le Jauron **(voir chapitres A.II.3. et A.IV.2.2)**. Nous avons donc cherché à évaluer les effets du diuron à la concentration de 10 µg l^{-1}, représentative d'événements de pollutions extrêmes en milieux naturels (Nitschke & Schüssler, 1998 ; Thurman *et al*., 2000 ; Mitchell *et al*., 2005), sur des communautés algales et bactériennes (planctoniques et périphytiques) prélevées dans le Jauron (JAU1). Une approche expérimentale en microcosmes a ainsi été mise en place durant le printemps, à une période précédant l'épandage du diuron.

Cette expérience a été reproduite deux fois, sur deux années consécutives (2003 et 2004), afin d'intégrer l'éventuelle variabilité du contexte environnemental et de l'état initial des communautés et de valider plus rigoureusement les hypothèses émises quant à l'effet du diuron sur les communautés biologiques étudiées. Compte tenu des réponses observées, nous avons choisi de présenter les résultats de l'expérience menée en 2004 en premier dans ce manuscrit, puis de les comparer à ceux obtenus en 2003. L'étude menée en 2004 a donné lieu à deux articles (Pesce *et al.*, 2006 ; Pesce *et al.*, soumis[b]).

D.II.2. Effets du diuron sur les communautés microbiennes (expérience menée en 2004)

D.II.2.1. Conditions expérimentales

Le protocole expérimental utilisé pour les études en microcosmes est décrit dans le **chapitre B.I.2.** En 2004, les effets du diuron ont été appréhendés sur des communautés prélevées le 11 mai dans le Jauron. Durant la période de colonisation du périphyton, les substrats artificiels ont été vandalisés. Pour cette étude, les organismes périphytiques ont donc été collectés directement sur des pierres localisées au centre du lit de la rivière **(voir chapitre B.I.2.3**.). Les trois microcosmes contaminés au diuron à la concentration nominale de 10 µg l^{-1} (D1, D2 et D3) et les trois microcosmes témoins (T1, T2 et T3) ont été maintenus à la température de 14°C et soumis à une photopériode 12h/12h. L'expérience a été conduite pendant 21 jours et les échantillonnages ont été effectués aux jours 0, 1, 3, 6, 10, 14 et 21. Toutefois, certains paramètres bactériens ont été mesurés dans les premières heures du suivi (8h et 16h) pour apprécier les effets liés notamment au confinement sur ces microorganismes.

D.II.2.2. Résultats

D.II.2.2.a. Concentrations en diuron

Aucune trace de diuron n'a été détectée dans l'eau du Jauron utilisée pour constituer les microcosmes. L'évolution des concentrations en diuron dans les trois microcosmes expérimentalement contaminés est détaillée dans le **Tableau D-3**.

Les concentrations initiales mesurées dans ces trois microcosmes sont comparables (8,20 ± 0,17 µg l^{-1}) et inférieures à la concentration théorique attendue (10 µg l^{-1}). Ces concentrations restent relativement stables sur l'ensemble du suivi (8,15 ± 0,15 µg l^{-1}) et mettent en évidence une forte persistance de la molécule dans la colonne d'eau durant les 21 jours d'expérience.

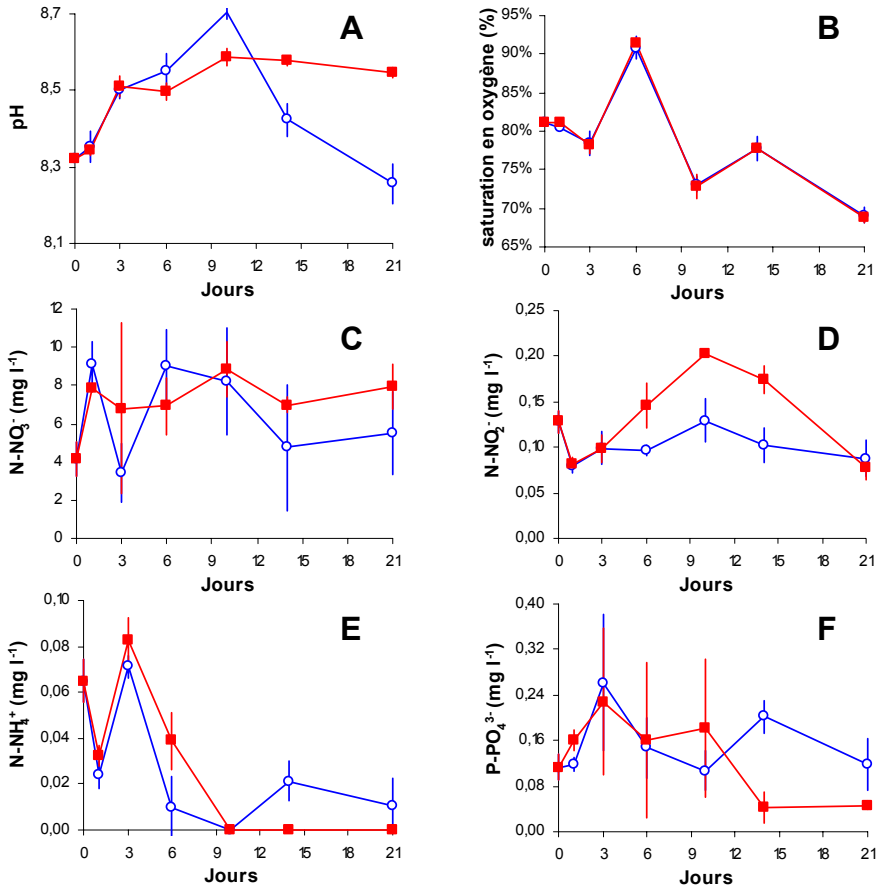
Tableau D-3 : Evolution des concentrations en diuron (µg l^{-1}) dans les trois microcosmes contaminés (D1, D2, D3).

microcosme	J_0	J_1	J_3	J_6	J_{10}	J_{14}	J_{21}
D1	8,3	8,4	8,4	8,1	8,1	8,2	8,4
D2	8,3	7,9	8,0	8,1	8,0	8,3	8,1
D3	8,0	8,1	8,0	8,0	8,3	8,1	8,1
moyenne	**8,2**	**8,3**	**8,2**	**8,1**	**8,2**	**8,2**	**8,3**

D.II.2.2.b. Paramètres physico-chimiques

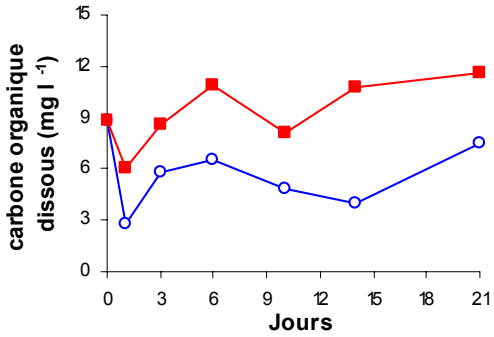
L'évolution des paramètres physico-chimiques mesurés est illustrée dans la **Figure D-6**. Le pH **(Fig. D-6A)** reste proche de 8,5 dans les microcosmes contaminés sur l'ensemble du suivi alors qu'il diminue légèrement dans les témoins à partir du 10ème jour (8,26 ± 0,05 à J21). Les concentrations en oxygène dissous varient de façon similaire pour l'ensemble des microcosmes et atteignent un pic au 6ème jour (environ 92% de saturation) avant de diminuer durant les deux dernières semaines jusqu'à environ 69% de saturation à J21 **(Fig. D-6B)**. Les teneurs en nitrates varient fortement entre tous les microcosmes et restent élevées sur l'ensemble du suivi (>3,4 mg N l^{-1}) sans différence significative entre les microcosmes témoins et contaminés **(Fig. D-6C)**. Les concentrations en nitrites **(Fig. D-6D)** se maintiennent à un niveau constant et relativement faible dans les témoins (0,10 ± 0,02 mg N l^{-1}) et augmentent significativement ($p<0,01$) dans les microcosmes contaminés entre J3 et J10 (0,20 ± 0,00 mg N l^{-1}). Les niveaux initiaux en ammonium sont proches de 0,06 mg N l^{-1} et chutent fortement après le 3ème jour sans différence significative entre les deux types de microcosmes **(Fig. D-6E)**. Les teneurs en orthophosphates **(Fig. D-6F)** fluctuent fortement dans tous les microcosmes durant les 10 premiers jours (0,11 à 0,26 mg l^{-1}) et diminuent légèrement dans les microcosmes contaminés au cours de la dernière semaine (0,05 ± 0,01 mg P l^{-1} à J21).

Figure D-6 : Evolution moyenne (et écarts-types) du pH **(A)**, du pourcentage de saturation en oxygène **(B)** et des concentrations (mg l^{-1}) en $N\text{-}NO_3^-$ **(C)**, $N\text{-}NO_2^-$ **(D)**, $N\text{-}NH_4^+$ **(E)** et $P\text{-}PO_4^{3-}$ **(F)** dans les microcosmes témoins (○) et contaminés (■).



Sur toute la durée de l'expérience, les teneurs en carbone organique dissous suivent une évolution parallèle **(Fig. D-7)** dans les deux types de microcosmes mais les valeurs enregistrées dans les témoins (2,74 à 7,44 mg l^{-1}) sont en moyenne deux fois plus faibles que celles obtenues dans les microcosmes contaminés (6,07 à 11,65 mg l^{-1}).

Figure D-7 : Evolution des concentrations minimales du carbone organique dissous (mg l^{-1}) dans les microcosmes témoins (○) et contaminés (■).

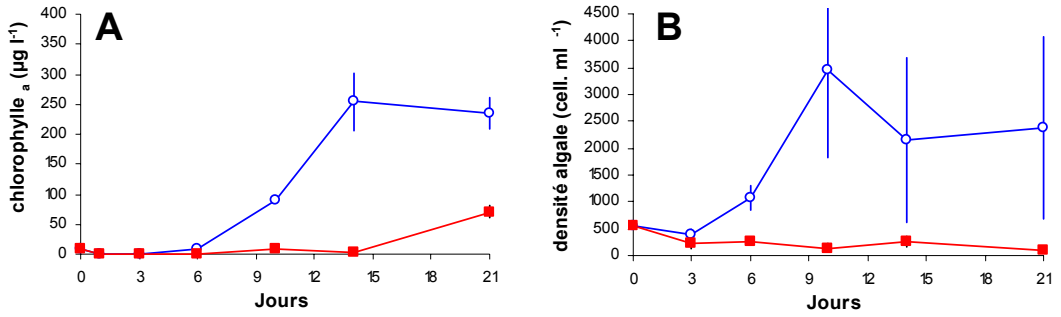


L'ensemble des paramètres abiotiques mesurés semble donc traduire des conditions environnementales globalement favorables au développement des communautés microbiennes sur toute la durée de l'expérience.

D.II.2.2.c. Chlorophylle *a* et densité algale

La **Figure D-8A** illustre les effets du diuron sur les teneurs en chlorophylle *a* (chlo *a*). Deux périodes sont clairement dissociées au cours de l'expérience. Durant les six premiers jours, les concentrations en chlo *a* restent proches du seuil de détection et inférieures à 9 µg l^{-1} dans tous les microcosmes, malgré une bonne disponibilité nutritive. Après le sixième jour, les concentrations augmentent très fortement dans les témoins (254,5 ± 48,2 µg l^{-1} à J14) alors qu'elles se maintiennent à un faible niveau en présence de diuron. Cet herbicide entraîne donc une diminution significative des concentrations en chlo *a* aux jours 10, 14 et 21 ($p<0,001$) malgré une augmentation sensible dans les microcosmes contaminés en fin de suivi (71,0 ± 10,3 µg l^{-1} à J21).

Figure D-8 : Evolution moyenne (et écarts-types) des concentrations (µg l^{-1}) en chlorophylle *a* **(A)** et de la densité algale **(B)** dans les microcosmes témoins (○) et contaminés (■).

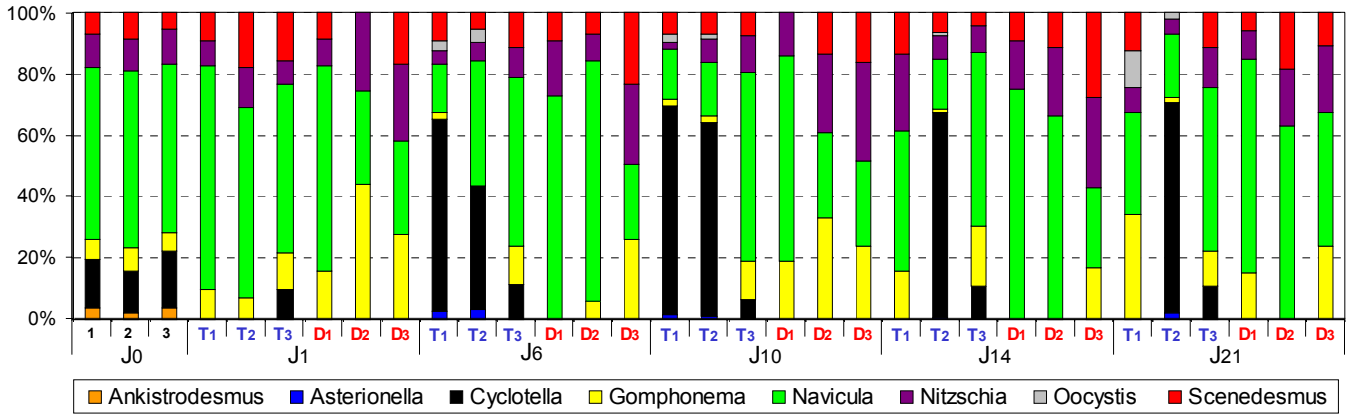


Parallèlement aux concentrations en chlo *a*, la densité algale augmente fortement dans les témoins après le sixième jour avec toutefois une forte variabilité entre les trois microcosmes **(Fig. D-8B)**. La valeur maximale est enregistrée au dixième jour dans le microcosme T2 (> 4500 cell. ml^{-1}) alors que la présence de diuron limite de manière significative la densité algale qui varie entre 555 (± 48) cellules par ml à J0 et 90 (± 18) cellules par ml à J21.

D.II.2.2.d. Structure de la communauté algale

Six genres composent la communauté algale initiale issue de la colonne d'eau et de la remise en suspension du périphyton des substrats naturels collectés dans le Jauron **(Fig. D-9)**. Cette communauté est majoritairement constituée de diatomées pennées (*Navicula, Nitzschia* et *Gomphonema*), de diatomées centriques (*Cyclotella*) et de Chlorophyceae (*Scenedesmus* et *Ankistrodesmus*) qui représentent respectivement environ 74%, 16% et 10% de l'abondance relative initiale, avec une forte dominance des espèces du genre *Navicula* (56,1 ± 1,3 %).

Figure D-9 : Evolution de la composition taxonomique algale, représentée par l'abondance relative des genres détectés, dans les trois microcosmes témoins (T1, T2 et T3) et contaminés (D1, D2 et D3).



En présence de diuron, la structure de la communauté reste relativement constante et homogène entre les triplicats sur l'ensemble du suivi. Ainsi dans les microcosmes contaminés, la communauté est représentée par quatre genres (*Gomphonema, Navicula, Nitzschia* et *Scenedesmus*) avec une dominance marquée de la part des diatomées pennées (72 à 100%). A l'inverse, la structure de la communauté varie fortement entre les trois microcosmes témoins à partir du sixième jour. Cette forte variabilité, que nous avons également observée au niveau de la densité algale **(Fig. D-8B)**, s'explique en grande partie par l'apparition d'un bloom d'espèces appartenant au genre *Cyclotella* dans deux microcosmes (T1 et T2). Ce genre devient alors prédominant dans ces deux microcosmes au dixième jour (62-68%), avant de diminuer fortement et de disparaître dans le microcosme T1 au cours de la dernière semaine. Le genre *Navicula* est également bien représenté dans les témoins (16 à 73% en fonction de l'importance de *Cyclotella*) et est toujours plus abondant que dans les microcosmes contaminés. A partir du sixième jour, trois genres (*Asterionella*, *Cyclotella* et *Oocystis*) sont détectés uniquement (ponctuellement ou continuellement) dans les témoins et ne semblent pas pouvoir se développer en présence de diuron.

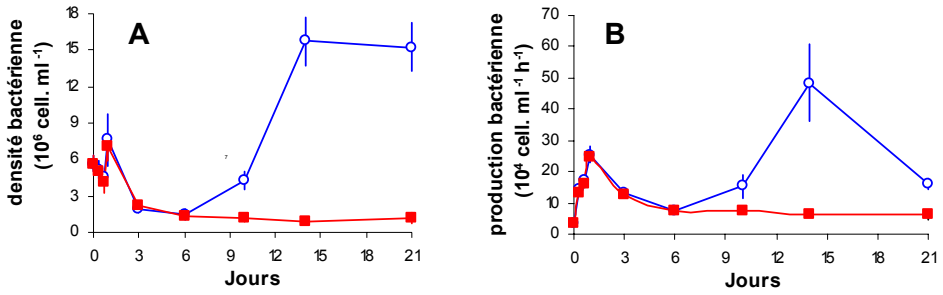
Le diuron inhibe donc l'activité microbienne autotrophe en maintenant les biomasses et les densités algales à leurs faibles niveaux initiaux et ce, pendant toute la durée de l'expérience. L'effet du diuron est également perçu d'un point de vue qualitatif au niveau de la composition taxonomique de la communauté algale. Ainsi, la plupart des organismes identifiés dans les témoins sont moins abondants (Gomphonema, Navicula, Nitzschia et Scenedesmus) ou absents (Asterionella, Cyclotella et Oocystis) dans les microcosmes contaminés.

En l'absence de contaminant, un important bloom est enregistré à partir du sixième jour, alors que les conditions nutritives semblent pourtant favorables dès la mise en route de l'expérience.

D.II.2.2.e. Densité bactérienne et production hétérotrophe

La densité bactérienne initiale est de l'ordre de 6.10^6 cell. ml^{-1} **(Fig. D-10A)**. Lors des premières heures suivant la constitution des microcosmes, l'état de confinement, associé aux conditions abiotiques favorables, engendre une forte stimulation de la productivité bactérienne. Ainsi, durant le premier jour, le taux d'incorporation de thymidine tritiée est multiplié par 7 et la production atteint environ $2,5.10^5$ cell. ml^{-1} h^{-1} à J1 dans les deux types de microcosmes **(Fig. D-10B)**. Entre J1 et J6, la densité et la production hétérotrophe bactérienne diminuent et se stabilisent respectivement autour de $1,5.10^6$ cell. ml^{-1} et $7,5.10^4$ cell. ml^{-1} h^{-1} sans différence significative entre les microcosmes témoins et contaminés.

Figure D-10 : Evolution moyenne (et écarts-types) de la densité bactérienne (10^6 cell. ml^{-1}) **(A)** et de la production bactérienne hétérotrophe (10^4 cell. ml^{-1} h^{-1}) **(B)** dans les microcosmes témoins (○) et contaminés (■).



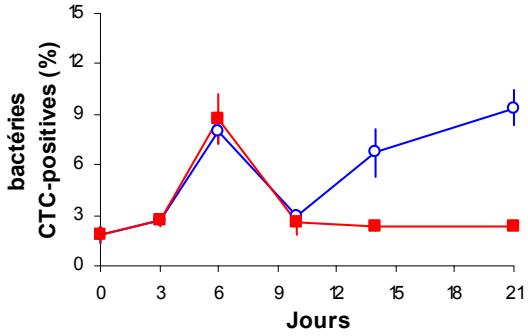
Dans les microcosmes témoins, le bloom algal enregistré après le sixième jour est associé à une stimulation de l'activité bactérienne hétérotrophe. Les concentrations en chlorophylle *a* sont ainsi corrélées psitivement avec les valeurs de densité ($R=0,86$; $p<0,001$) et de production hétérotrophe bactériennes ($R=0,64$; $p<0,01$) qui sont multipliées respectivement par 10 et par 15 entre J6 et J14. Toutefois, la production bactérienne hétérotrophe diminue au cours de la dernière semaine ce qui entraîne une stabilisation de la densité bactérienne autour de $1,5.10^7$ cell. ml^{-1} dans les trois témoins. A l'opposé, dans les microcosmes contaminés, la densité et la production bactériennes restent constantes après J6 et se maintiennent à des niveaux respectivement inférieurs à $1,5.10^6$ cell. ml^{-1} et 8.10^4 cell. ml^{-1} h^{-1}.

D.II.2.2.f. Pourcentage de bactéries présentant une forte activité respiratoire (cellules CTC-positives)

Le pourcentage initial de bactéries CTC-positives est de l'ordre de 2% **(Fig. D-11)**. Cette proportion augmente jusqu'au sixième jour (8,4 ± 1,1 %) avant de revenir à son niveau initial à J10. La fraction de cellules CTC-positives semble donc être favorisée par le contexte environnemental en début d'expérience dans tous les microcosmes, indépendamment de la présence de diuron. Toutefois après J6, le pourcentage de bactéries CTC-positives augmente

significativement dans les témoins (6,8 ± 1,4 % à J14 et 9,4 ± 1,0 % à J21) alors qu'il reste inférieur à 3% dans les microcosmes contaminés jusqu'à la fin de l'expérience.

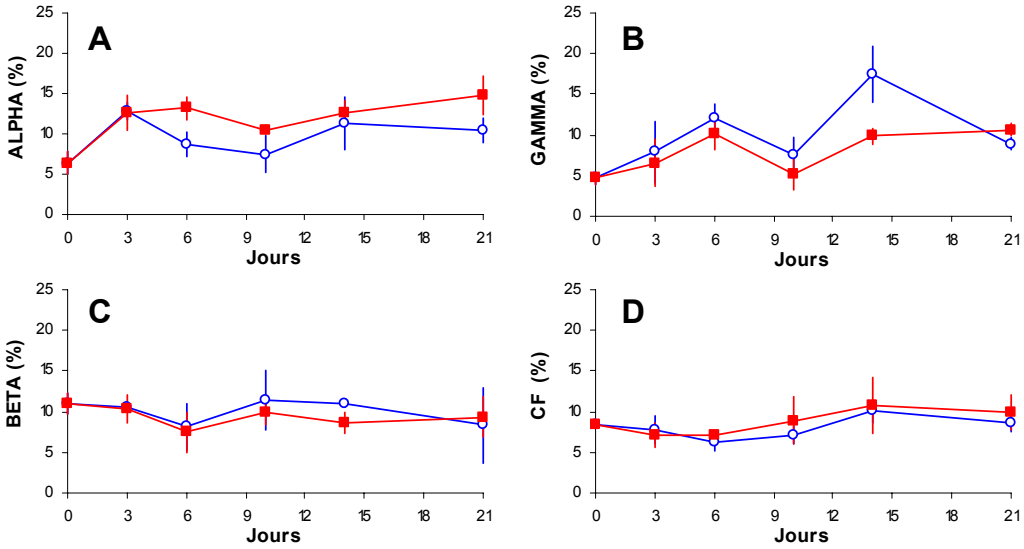
Figure D-11 : Evolution moyenne (et écarts-types) du pourcentage de bactéries CTC-positives dans les microcosmes témoins (○) et contaminés (■).



D.II.2.2.g. Structure de la communauté bactérienne

L'évolution de l'abondance relative des sous-classes alpha-, gamma-, beta-Protéobactéries et du groupe *Cytophaga-Flavobacterium* est illustrée dans la **Figure D-12**. Au début de l'expérience, les bactéries appartenant à ces quatre groupes représentent respectivement 6,4%, 4,7%, 11,0% et 8,5% des cellules totales. La proportion totale de cellules ciblées à l'aide des sondes utilisées varie entre 28% et 57% au cours du suivi. Cependant, la distribution des quatre groupes reste relativement stable pendant les 21 jours de suivi, sans différence statistique globale entre les microcosmes témoins et contaminés (p>0,05).

Figure D-12 : Evolution moyenne (et écarts-types) du pourcentage de bactéries appartenant aux principaux groupes phylogénétiques appréhendée par la méthode FISH à partir des sondes ALF1b **(A)**, GAM42a **(B)**, BET42a **(C)** et CF319a **(D)** dans les microcosmes témoins (○) et contaminés (■).

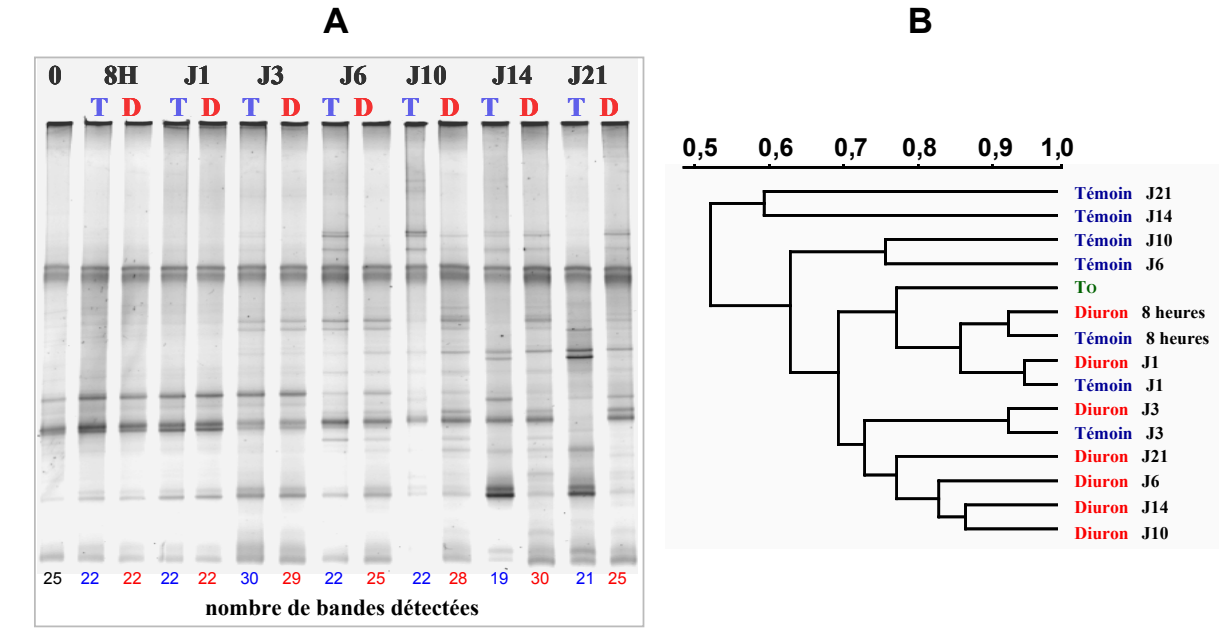


Toutefois, le développement des γ-Protéobactéries semble quelque peu inhibé par la présence de diuron car la proportion de bactéries appartenant à cette sous-classe augmente significativement entre J10 (7,6 ± 2,0 %) et J14 (17,4 ± 3,4 %) dans les témoins alors qu'elle reste proche de 10% dans les microcosmes contaminés **(Fig. D-12B)**. A l'inverse, la proportion de α-Protéobactéries est légèrement supérieure dans les microcosmes contaminés **(Fig. D-12A)** dès le sixième jour et jusqu'à la fin du suivi.

D.II.2.2.h. Diversité bactérienne

Pour faciliter l'analyse et la comparaison de l'évolution de la diversité bactérienne en présence ou non de diuron, l'ADN génomique extrait de chaque réplicat a été mélangé avant l'amplification par PCR, après vérification de la reproductibilité des profils entre les microcosmes. Les profils TTGE finalement obtenus sont présentés sur la **Figure D-13A**.

Figure D-13 : (A) Evolution des profils obtenus par TTGE dans les microcosmes témoins (T) et contaminés (D) à J0 (0), après 8 heures (8H) puis de J1 à J21 ; **(B)** dendrogramme calculé par la méthode DICE-UPGMA à partir du profil TTGE en tenant compte de l'intensité relative de chacune des bandes.



L'analyse des profils révèle 19 à 30 bandes par piste avec un nombre total de 43 bandes distinctes. Une matrice de similarité à été calculée à partir du coefficient de DICE en intégrant l'intensité relative de chacune des bandes. Le dendrogramme, obtenu à partir de cette matrice à l'aide de la méthode UPGMA, met en évidence des changements dans la diversité bactérienne qui se produisent de manière successive au cours de périodes clairement différenciées **(Fig. D-13B)**. Jusqu'au troisième jour, la diversité bactérienne est sensiblement identique entre les microcosmes témoins et contaminés (similarité > 93%). Durant cette

période, deux remaniements importants sont observés indépendamment de la présence de diuron. Le premier intervient dans les premières heures, juste après la constitution des microcosmes, et coïncide avec la période de stimulation de la productivité bactérienne, puis un deuxième changement est enregistré entre J1 et J3.

A partir du toisième jour, la diversité bactérienne diverge fortement entre les microcosmes témoins et les microcosmes contaminés. Ainsi, entre J3 et J6, les profils évoluent plus fortement dans les microcosmes témoins (similarité = 64%) qu'en présence de diuron. Cette divergence est encore plus marquée après le sixième jour. En effet, alors que la diversité reste relativement stable dans les microcosmes contaminés jusqu'à la fin de l'expérience (similarité > 78%), de forts remaniements associés à une baisse du niveau de diversité (moins de 22 bandes détectées après J6) sont observés dans les témoins, notamment lors de la dernière semaine (similarité = 53%).

La présence de diuron entraîne donc une inhibition de la productivité microbienne hétérotrophe en maintenant la densité, la production et l'activité bactérienne à de faibles niveaux pendant toute la durée de l'expérience et en limitant le nombre de variations enregistrées en terme de diversité spécifique, alors qu'une stimulation du compartiment bactérien est générée dans les témoins par l'apparition du bloom algal.

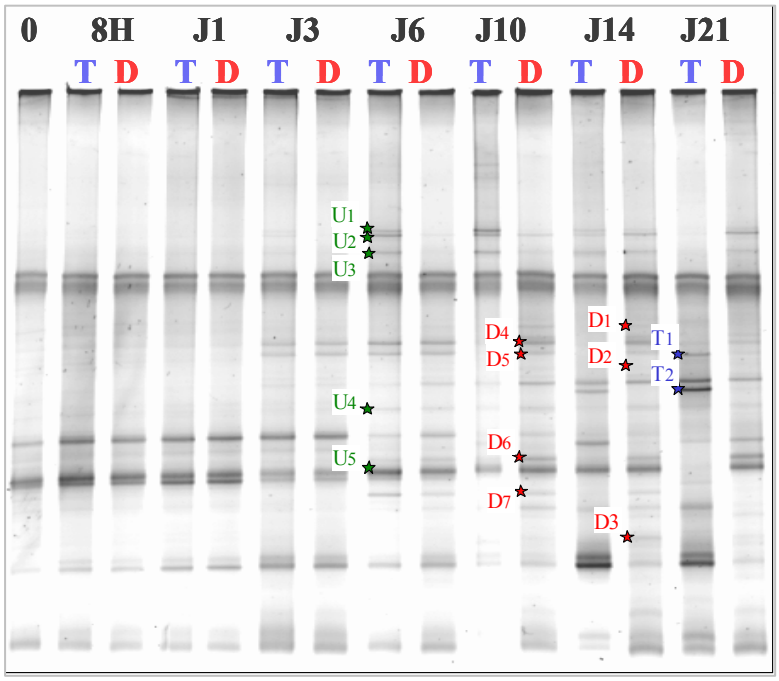
D.II.2.2.i. Analyse phylogénétique

● *Sélection des bandes dites « d'intérêt » lors de l'analyse des profils TTGE*

La forte dichotomie enregistrée après six jours, entre les microcosmes témoins et contaminés **(Fig. D-13B)**, illustre une diversité bactérienne différente entre ces deux contextes. Cette différence peut être expliquée, (1) dans les témoins, par le développement exclusif de certaines espèces favorisées par le bloom algal et, (2) dans les traités, par la raréfaction ou la disparition d'espèces directement ou indirectement sensibles au diuron et/ou le développement d'espèces indifférentes ou particulièrement résistantes à ce polluant.

Nous avons donc tenté d'identifier certaines de ces espèces en sélectionnant et excisant les « bandes d'intérêt » à partir des profils de TTGE obtenus et en séquençant le fragment d'ADN correspondant. Pour faciliter l'analyse, les bandes qui deviennent visibles ou ne se maintiennent qu'en présence de diuron ont été codées « D », celles qui sont visibles uniquement dans les témoins sont codées « T » et celles qui semblent ubiquistes sont codées « U » **(Fig. D-14)**.

Figure D-14 : Choix des bandes d'intérêt excisées pour l'analyse phylogénétique.



Les bandes D1 à D3 sont uniquement visibles dans les microcosmes contaminés alors que les bandes D4 à D7 ne se maintiennent qu'en présence du diuron et disparaissent dans les témoins. A l'opposé, les bandes T1 et T2 ne deviennent visibles en fin d'expérience que dans les microcosmes non contaminés et sont probablement associées à des bactéries favorisées par les changements environnementaux enregistrés suite au bloom algal.

Les bandes U1 à U5 semblent, quant à elles, correspondre à des espèces ubiquistes, présentes dans les deux types de microcosmes. Toutefois, ces bandes présentent une dynamique intéressante. En effet, les bandes U1 à U3 sont repérables d'abord dans les témoins à partir de J3, et deviennent plus intenses à J6 et J10 dans ces microcosmes. La bande U4 est détectée dans les deux types de microcosmes à J6 tandis que la bande U5 est largement prédominante dans les deux contextes sur toute la durée de l'expérience, mis à part à J21 dans les témoins.

● *Aspects méthodologiques*

Chacun de ces 14 fragments a été excisé puis purifié avant le clonage par une succession d'au moins trois PCR-TTGE. Un minimum de quatre clones correspondant à chacune des bandes purifiées a été réamplifié et soumis à une nouvelle TTGE pour vérifier la distance de migration par rapport à la bande initiale, avant d'être séquencé.

La multiplication des étapes de PCR-TTGE, permettant de purifier au maximum les fragments excisés avant le clonage, nous a permis d'obtenir environ 70% de clones (85/126) présentant une distance de migration électrophorétique similaire à la bande mère **(Tableau D-4)**. En 2005, Zhang *et al.* ont montré, à l'aide de la TGGE, que seulement 10 à 60% de leurs fragments clonés, sans étape de purification préalable, présentaient une migration identique à la bande dont ils étaient issus. D'après eux, ce biais est associé à la présence de fragments d'ADN simple brin. Nos résultats semblent indiquer que la multiplication des étapes de purification, qui est une méthode utilisée régulièrement avec ce type d'approche (Castle & Kirchman, 2004 ; Macur *et al.*, 2004), permet de diminuer significativement la proportion de clones incorrects. En réduisant la présence de fragments simple brin avant la migration par TGGE, Zhang *et al.* (2005) ont obtenu un rendement encore plus efficace, atteignant une proportion finale de clones corrects comprise entre 70 et 100%. Leur méthode qui consiste à séparer préalablement les fragments double brin des fragments simple brin à l'aide d'une électrophorèse « classique », semble peu contraignante puisqu'elle ne nécessite qu'une seule étape de purification. De ce fait, elle constitue probablement une alternative intéressante pour ce type d'approche.

Dans tous les cas, nos résultats confirment qu'il est nécessaire, lors d'une étude phylogénétique à partir de bandes excisées, de vérifier la distance de migration des clones obtenus par comparaison avec le profil initial, avant d'effectuer l'analyse des séquences (Riemann *et al.*, 1999 ; Crump *et al.*, 2003 ; Zhang *et al.*, 2005).

Tableau D-4 : Bilan et rendement des différentes étapes entre l'excision des bandes et l'analyse des séquences.
* séquences exploitables = séquences complètes et non suspectées d'être chimériques

bandes excisées	nombre de clones soumis à une TTGE	migrations incorrectes (%)	nombre de clones séquencés	séquences exploitables*
D1	5	40,0%	3	**3**
D2	6	0,0%	4	**2**
D3	11	27,3%	7	**4**
D4	4	0,0%	4	**4**
D5	6	50,0%	3	**2**
D6	12	66,7%	4	**2**
D7	22	54,5%	10	**9**
T1	6	0,0%	4	**2**
T2	12	33,3%	5	**4**
U1	10	20,0%	8	**6**
U2	15	26,7%	8	**4**
U3	6	0,0%	4	**2**
U4	5	0,0%	4	**4**
U5	6	50,0%	3	**2**

Pour chacune des bandes excisées, trois à dix clones ont été séquencés afin de tenir compte de la présence de fragments multiples dans une même bande (Sekiguchi *et al.*, 2001). Sur un total de 71 séquences, 50 ont finalement pu être utilisées pour effectuer l'analyse phylogénétique. Pour les autres clones (29,5%), le séquençage a échoué (totalement ou partiellement) ou révélé des séquences identifiées comme potentiellement chimériques.

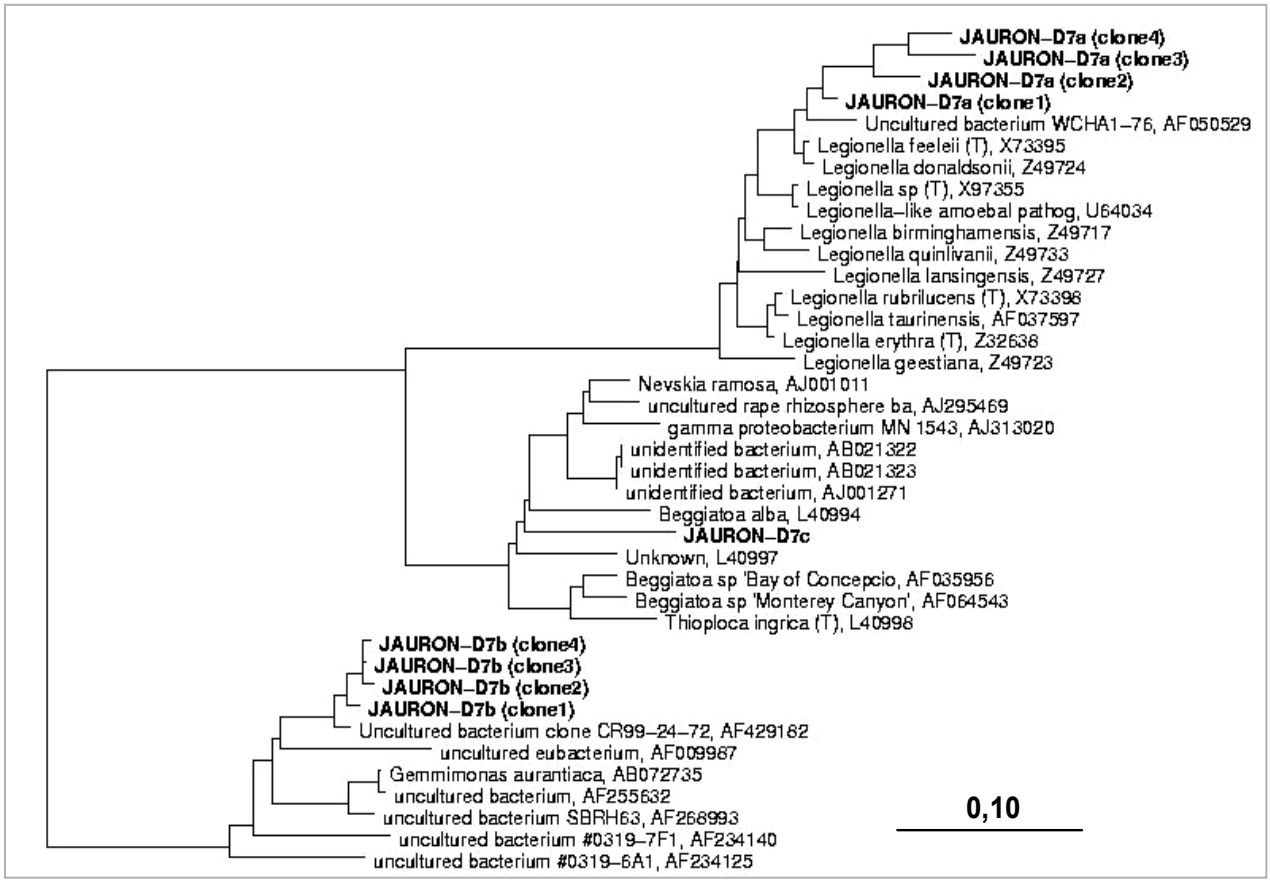
Les résultats de l'analyse effectuée avec le logiciel BLASTn montrent que quatre bandes, supposées être uniques, renferment des fragments différents qui sont alignés préférentiellement avec des séquences distinctes **(Tableau D-5)**: les bandes D3 (4 types de clones: a, b, c et d), D7 (3 types de clones: a, b et c), U1 et U3 (2 types de clones: a et b). Dans les 10 autres cas, les différents clones obtenus à partir de la même bande initiale sont affiliés à la même séquence. Toutefois, même dans cette situation, les séquences obtenues ne sont jamais identiques entre elles à 100% et présentent parfois des pourcentages d'homologie faibles (par exemple 83,9 à 92,9% entre les quatre clones représentant la bande U2) malgré leur alignement préférentiel avec la même séquence.

Tableau D-5 : Résultats de l'analyse phylogénétique effectuée à l'aide du logiciel d'alignement BLASTn.

bandes		nombres de clones correspondants	(similarité entre les clones)	séquences les plus proches	description taxonomique	réferences	similarité maximale
JAURON-D1		3	(91.5 - 99.5%)	Uncultured bacterium FukuS27 **(AJ290012)**	Verrucomicrobia	Glöckner *et al.*, 2000	99,1%
JAURON-D2		2	(98.4%)	Cellvibrio gandavensis sp. R4069 **(AJ289162)**	Gamma proteobacteria	Lednicka *et al.*, 2000	99,1%
JAURON-D3	a	1		Uncultured bacterium clone ELB19-149 **(DQ015821)**	non classifiée	Glatz *et al.*, 2006	96,3%
	b	1		Unidentified eubacterium clone BSV65 **(AJ229213)**	non classifiée	Hengstmann *et al.*, 1999	98,1%
	c	1		Uncultured bacterium clone CR99-2-01 **(AF429187)**	non classifiée	Sekiguchi *et al.*, 2002	90,4%
	d	1		Uncultured gamma proteobacterium clone Nubeena227 **(AY499921)**	Gamma proteobacteria	Bissett *et al.*, 2006	<90%
JAURON-D4		4	(98.9 - 99.3%)	Uncultured verrucomicrobium DEV019 **(AJ401117)**	Verrucomicrobia	Manen and Falquet, 2002	98,9%
JAURON-D5		2	(94.3%)	Uncultured bacterium DSSD95 **(AY328792)**	non classifiée	Williams *et al.*, 2004	99,8%
JAURON-D6		2	(91.7%)	Uncultured bacterium clone 259ds10 **(AY212708)**	non classifiée	Simpson *et al.*, 2004	98,4%
JAURON-D7	a	4	(92.0 - 94.7%)	Uncultured eubacterium WCHA1-76 16S **(AF050529)**	Gamma proteobacteria	Dojka *et al.*, 1998	97,2%
	b	4	(98.6 - 99.3%)	Uncultured bacterium clone CR99-24-72 **(AF429182)**	non classifiée	Sekiguchi *et al.*, 2002	98,6%
	c	1		Uncultured bacterium clone LCA105 **(AM176825)**	non classifiée	unpublished	90,7%
JAURON-T1		2	(99.5%)	Parachlamydia-related symbiont UWE25 **(BX908798)**	Chlamydiae	Horn *et al.*, 2004	92,1%
JAURON-T2		4	(92.0 - 97.2%)	Parachlamydia acanthamoebae strain Seine **(DQ309029)**	Chlamydiae	unpublished	92,2%
JAURON-U1	a	5	(86.2 - 93.3%)	pas d'alignement significatif (<85% similarité)			
	b	1		Uncultured alpha proteobacterium clone JG34-KF-416	Alpha proteobacteria	Selenska-Pobell *et al.*, 2002	94,5%
JAURON-U2		4	(83.9 - 92.9%)	Uncultured gamma proteobacterium clone ST8-18D **(DQ419169)**	Gamma proteobacteria	unpublished	93,8%
JAURON-U3	a	1		Uncultured bacterium clone 259ds10 **(AY212708)**	non classifiée	Simpson *et al.*, 2004	<90%
	b	1		pas d'alignement significatif (<85% similarité)			
JAURON-U4		4	(98.6 - 99.5%)	Uncultured bacterium clone SM-OTU70 **(AY321231)**	non classifiée	Filion *et al.*, 2004	93,1%
JAURON-U5		2	(98.8%)	Uncultured actinobacterium clone ST11-6 **(DQ316367)**	Actinobacteria	Allgaier & Grossart, 2006	99,8%

L'alignement avec BLASTn permet d'affilier 10 des 21 groupes de clones avec des séquences présentant une description taxonomique. Dans un premier temps, nous avons vérifié que les clones regroupés (c'est-à-dire ceux qui ont les mêmes séquences les plus proches) sont bien positionnés au même endroit dans l'arbre phylogénétique construit avec le logiciel ARB. Cette vérification s'est avérée concluante (voir pour exemple la **Figure D-15**) et nous avons ainsi décidé de ne conserver qu'un seul clone par groupe (celui positionné sur la branche la plus courte) afin de faciliter l'analyse de l'arbre phylogénétique.

Figure D-15 : Positionnement dans l'arbre phylogénétique des 9 clones issus de la bande D7 (4 clones D7a, 4 clones D7b et 1 clone D7c).



Les séquences issues d'une même bande ne sont jamais similaires à 100% et trois types de résultats sont enregistrés :

(1) des séquences qui présentent une forte homologie entre elles (>98%) et qui peuvent être considérées comme identiques (par exemple les clones D4),

(2) des séquences différentes entre elles (similarité <98%) mais qui présentent le meilleur alignement par BLASTn avec la même séquence (par exemple les clones T2). Ces séquences représentent sans doute des organismes très proches phylogénétiquement mais qui ne peuvent pas être dissociés à partir des données disponibles dans GenBank.

Cette hypothèse semble être confirmée par les regroupements observés dans le premier arbre phylogénétique construit avec l'ensemble des séquences (par exemple pour les clones D7a, **Fig. D-15**),

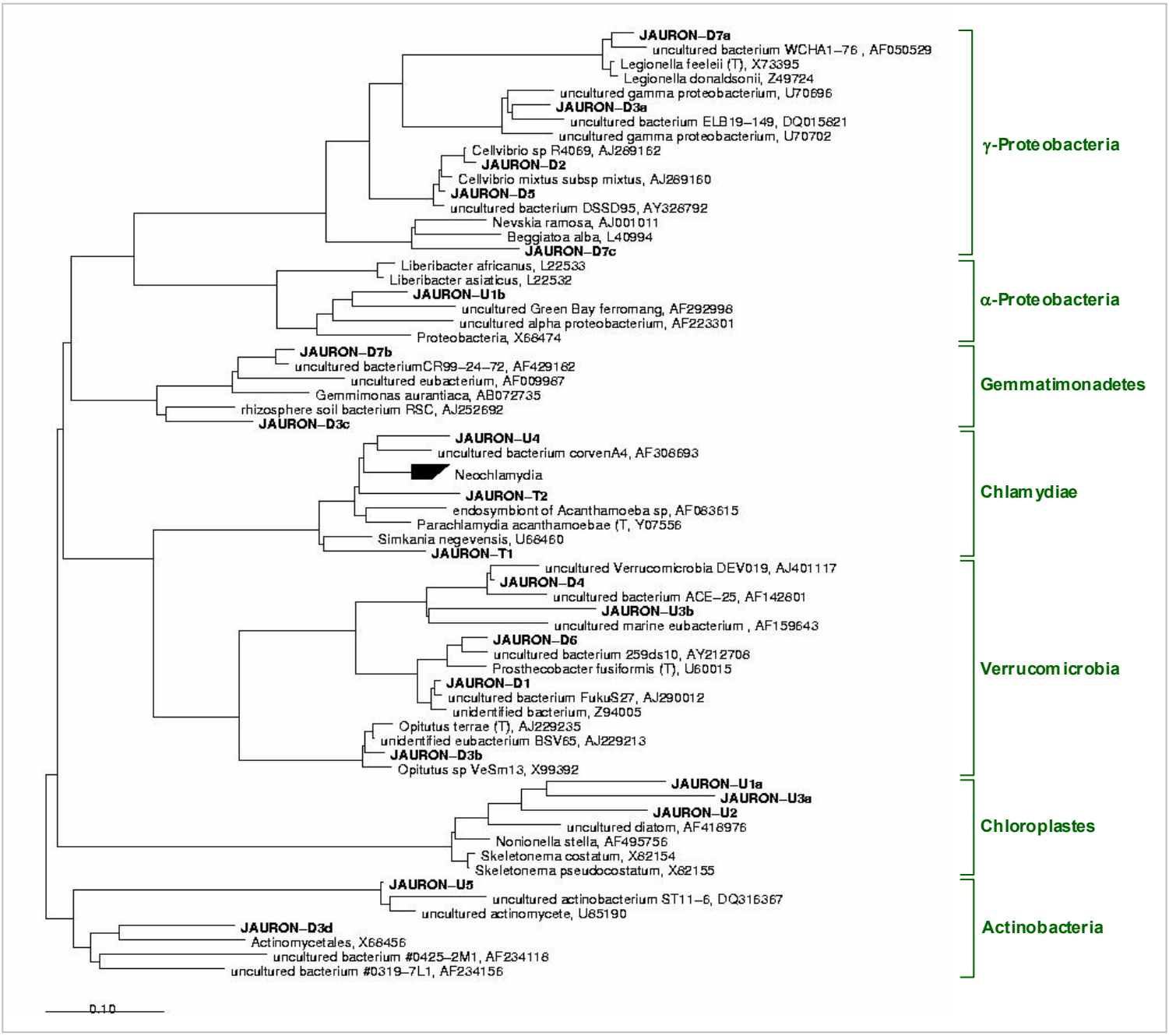
(3) des séquences dissemblables affiliées à des organismes différents (par exemple les 4 clones D3) et qui témoignent d'une co-migration de séquences distinctes dans une même bande (Sekiguchi *et al.*, 2001 ; Crump *et al.*, 2003 ; Zhang *et al.*, 2005).

● *Résultats de l'analyse phylogénétique*

A l'exception des clones D3d et U2, le positionnement phylogénétique obtenu avec le logiciel ARB **(Fig. D-16)** concorde avec les résultats de l'alignement par BLASTn **(Tableau D-5)**. L'arbre fait apparaître une nette dissociation entre (1) les espèces associées aux microcosmes contaminés (bandes « D ») et (2) celles associées aux témoins (bandes « T »).

(1) Les espèces représentées par des bandes qui apparaissent ou qui se maintiennent uniquement en présence de diuron sont réparties au sein de quatre phyla : les *Proteobacteria*, les *Verrucomicrobia*, les *Gemmatimonadetes* et les *Actinobacteria*. Les clones D2, D3a, D5, D7a et D7c sont identifiés comme des membres de la sous-classe gamma des Protéobactéries. Ainsi, les clones D2 et D5 présentent respectivement une forte similarité (>99%) avec les espèces *Cellvibrio gandavansis* (R4069) et *Cellvibrio mixtus* de la famille des *Pseudomonadaceae*. Le clone D7a est identifié comme une espèce du genre *Legionella* et est proche (97,2%) d'une bactérie non cultivée, issue d'un aquifère pollué (Dojka *et al.*, 1998). Le clone D7c est regroupé avec des bactéries appartenant aux genres *Beggiatoa* et *Nevskia* et le clone D3a, qui présente une homologie importante (96,3%) avec une bactérie originaire d'un lac continuellement gelé (Glatz *et al.*, 2006), est affilié avec des *γ-Proteobacteria* non classifiées. Le phylum *Verrucomicrobia* est également bien représenté dans les microcosmes contaminés. Les clones D1 et D6 appartiennent au genre *Prosthecobacter* et affichent une forte similarité (>98%) avec des bactéries respectivement issues d'un lac méso-acidotrophe (Glöckner *et al.*, 2000) et d'un cours d'eau de l'Ohio (Simpson *et al.*, 2004). Le clone D3b est identifié comme une espèce du genre *Opitutus* et les clones D4 présentent une similarité proche de 99% avec une bactérie non identifiée. Les clones D3c et D7b correspondent à des membres du groupe 1 du phylum des *Gemmatimonadetes* qui compte encore peu de représentants cultivés (Hugenholtz *et al.*, 2001 ; Zhang *et al.*, 2003). D'après l'alignement par BLASTn, la séquence la plus proche du clone D3d correspond à une γ-*Proteobacteria* non cultivable. Toutefois, le pourcentage de similarité est inférieur à 90% et ce clone se retrouve positionné au sein du phylum des *Actinobacteria* dans l'arbre phylogénétique construit.

Figure D-16 : Positionnement dans l'arbre phylogénétique des différents groupes de clones correspondant aux 14 bandes excisées.



(2) Les deux bandes qui deviennent très intenses dans les témoins après le « bloom » algal correspondent à des espèces affiliées à deux familles appartenant au phylum des *Chlamydiae* : les *Simkaniaceae* (clones T1) et les *Parachlamydiaceae* (clones T2).

(3) Les clones U1a, U2 et U3a qui apparaissent de manière plus marquée dans les témoins à partir du sixième jour sont réunis dans l'arbre et sont assimilés à des séquences codant l'ARNr 16S de chloroplastes. Les clones U1b et U3b sont, quant à eux, regroupés avec des bactéries issues de l'environnement qui appartiennent respectivement aux α-*Proteobacteria* et aux *Verrucomicrobia*. La bande U4 qui apparaît également à partir de J6 est positionnée dans

le phylum des *Chlamydiae*, à proximité d'une bactérie de la famille des *Parachlamydiaceae*, découverte dans des échantillons respiratoires humains (Corsaro *et al.*, 2001). Enfin, la bande U5, largement prédominante dès le début de l'expérience, correspond à des espèces affiliées au phylum des *Actinobacteria* et présentant une très forte similarité (>99%) avec des bactéries issues de milieux lacustres, appartenant aux Actinomycétales (Hiorns *et al.*, 1997 ; Allgaier & Grossart, 2006).

D.II.2.3. Discussion

D.II.2.3.a. Caractérisation de l'exposition des communautés microbiennes au diuron

Dans les trois microcosmes contaminés, les concentrations en diuron restent stables et proches de 8 µg l^{-1} sur l'ensemble du suivi. Dès le début de l'expérience, cette valeur est inférieure de 20% à celle théoriquement attendue dans les microcosmes (10 µg l^{-1}). La diminution immédiate des teneurs en diuron dans des dispositifs expérimentaux a déjà été soulignée par plusieurs auteurs (Hartgers *et al.*, 1998 ; Haynes *et al.*, 2000 ; Sumpono *et al.*, 2003). Ce phénomène récurrent peut être attribué à un piégeage rapide de la molécule par adsorption ou absorption. La stabilité des concentrations mesurées suggère toutefois qu'aucun phénomène de désorption ne se produit au cours de l'expérience et qu'à l'opposé, la molécule ne subit aucune transformation significative (biotique ou abiotique) durant cette période. Cette observation est en contradiction avec les résultats de Hartgers *et al.* (1998) qui ont mesuré, en mésocosmes, un temps de demi-vie du diuron dans la colonne d'eau variant entre 6 et 39 jours, en fonction de la concentration initiale choisie (0,15 à 15 µg l^{-1}). De même Haynes *et al.* (2000) ont constaté dans l'eau une diminution de l'ordre de 15% au bout de 5 jours des teneurs en diuron, introduit aux concentrations initiales de 10 et 100 µg l^{-1}. La présence de sédiment dans leurs dispositifs expérimentaux est sans doute un facteur important pour expliquer cette diminution compte tenu du piégeage possible de la molécule sur cette fraction solide (Sumpono *et al.*, 2003). L'absence de biodégradation dans nos microcosmes s'explique probablement par une durée d'expérience trop courte pour permettre l'induction de systèmes enzymatiques spécifiques à la dégradation du diuron chez des bactéries issues d'un milieu aquatique naturel (Četkauskaité *et al.*, 1998 ; El-Dib & Abou-Waly, 1998). Dans cette étude, les communautés microbiennes sont donc soumises à une exposition forte et constante au diuron durant les 21 jours du suivi.

D.II.2.3.b. Influence des conditions environnementales initiales sur la réponse des communautés microbiennes

Malgré une intoxication chronique et constante au diuron, les effets de cet herbicide n'apparaissent qu'après un délai de six jours, en empêchant la mise en place d'une forte productivité microbienne. Ce « retard d'impact » peut certainement être attribué aux propriétés initiales de l'eau et aux caractéristiques des communautés biologiques échantillonnées dans la rivière. En effet, plusieurs auteurs ont montré que le niveau trophique du milieu et l'état physiologique des organismes peuvent influencer fortement la réponse des communautés face à une pollution par des pesticides en conditionnant leur niveau de sensibilité et leurs capacités de récupération post-contamination (Barreiro Lozano & Pratt, 1994 ; DeLorenzo *et al*., 2001 ; Wendt-Rasch *et al*., 2004).

L'eau, prélevée dans la rivière et utilisée pour constituer initialement les microcosmes, est caractérisée par de fortes concentrations en phosphates (>0,1 mg P l^{-1}) et en composés azotés inorganiques (>3,7 mg N l^{-1}) qui lui confèrent des propriétés méso-eutrophes, d'après la classification de Dodds *et al.* (1998). Toutefois, la teneur en chlorophylle *a* et la densité bactérienne mesurées au début de l'expérience, sont sensiblement inférieures à celles rencontrées dans des rivières caractérisées par des conditions nutritives et climatiques similaires (Dodds *et al*., 1998 ; Liu & Leff, 2002 ; Dorigo *et al*., 2004). Cette faible productivité microbienne, illustrée notamment par une proportion de bactéries CTC-positives limitée (environ 2%), reflète probablement un état physiologique déficient des communautés lors du prélèvement initial. Plusieurs facteurs environnementaux, telles la présence de xénobiotiques ou encore une forte pression de type "top-down" (Muñoz *et al.*, 2001) ciblée généralement sur les cellules les plus actives (Del Giorgio *et al.*, 1997), peuvent conduire à un affaiblissement des organismes microbiens dans la rivière.

Une forte stimulation de l'activité bactérienne hétérotrophe est toutefois observée dès la mise en place des microcosmes, entraînant une augmentation de la production et des densités bactériennes mais aussi quelques remaniements au niveau de la diversité. Cette simulation est certainement induite par le confinement des ressources dans les microcosmes facilitant ainsi l'assimilation des nutriments par les bactéries (Brandt *et al*., 2004 ; Pinhassi *et al*., 2004). De plus, elle est associée à une diminution des teneurs en carbone organique dissous, ce qui suggère une forte consommation de carbone par les microorganismes hétérotrophes.

Cependant, cette forte productivité n'est que transitoire et la production bactérienne diminue après 24 heures, entraînant une chute de la densité cellulaire à un niveau inférieur à la valeur initiale et marquant ainsi le début d'une phase de latence jusqu'au sixième jour. Durant cette période, les productivités microbiennes, autotrophe et hétérotrophe, restent à un seuil

très bas dans tous les microcosmes malgré le maintien de conditions abiotiques favorables. Les premiers jours correspondent probablement à une phase d'adaptation des communautés aux conditions expérimentales. On observe ainsi quelques changements au niveau de la répartition des taxons algaux et de la diversité bactérienne, entre le premier et le trosième jour, ce qui suggère une sélection des microorganismes les mieux adaptés au contexte environnemental. Ces variations interviennent indépendamment de la présence de diuron, et les effets de la molécule sont limités ou faiblement perceptibles avant le sixième jour.

L'analyse de la diversité bactérienne par TTGE met en évidence la présence d'une bande (U5) largement prédominante dès le début de l'expérience dans les deux types de microcosmes. Cette bande est associée à une espèce du phylum *Actinobacteria* très proche de deux bactéries du groupe des *Actinomycetales*. La forte intensité de cette bande n'est pas surprenante compte tenu de l'abondance des *Actinobacteria* dans les cours d'eau (Branco *et al.*, 2005 ; Klausen *et al.*, 2005).

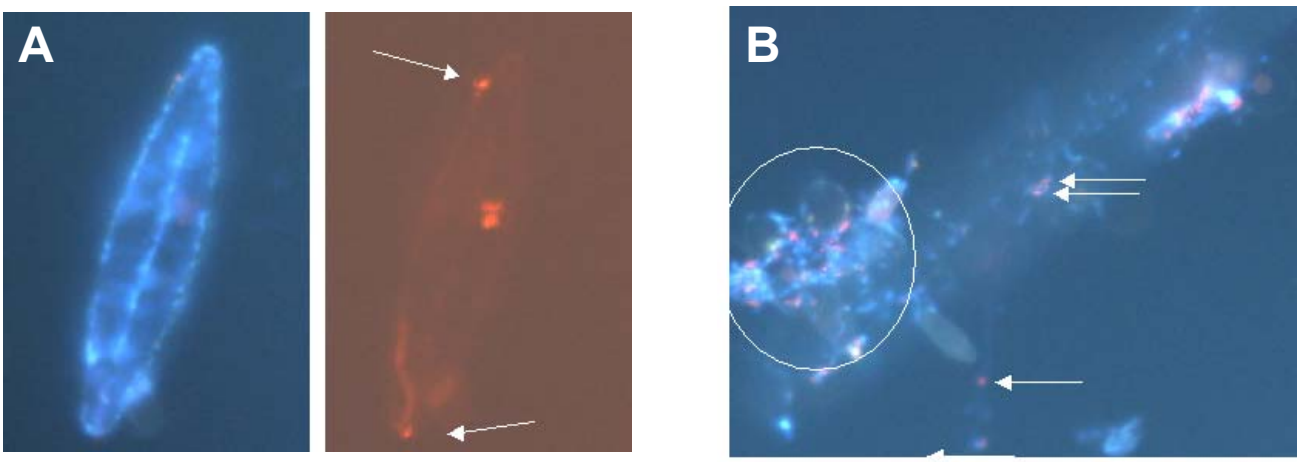
D.II.2.3.c. Stimulation différée des communautés microbiennes en absence de diuron

Au cours de la deuxième semaine, un important bloom algal est observé dans les trois microcosmes témoins. Ce fort développement autotrophe est certainement favorisé par les teneurs élevées en nutriments et les conditions expérimentales telles que le maintien d'une température modérée (14°C), l'agitation continue (Pinhassi *et al*., 2004), la petite taille des microcosmes (Sanford *et al.*, 2001) et l'élimination des principaux prédateurs lors du prélèvement initial (filtration à 100 µm). Le délai d'apparition de ce bloom est comparable à celui observé dans des microcosmes enrichis en nutriments (Smith *et al.*, 1995 ; Fajon *et al.*, 1999 ; Riemann *et al.*, 2000 ; Pinhassi *et al.*, 2004) ou dans des dispositifs expérimentaux soumis à l'apport d'insecticides, entraînant une baisse de la pression de broutage sur les organismes autotrophes suite au déclin du zooplancton (Caquet *et al.*, 1992 ; Barry & Logan, 1998). Les espèces du genre *Cyclotella* semblent particulièrement bien adaptées à ces conditions environnementales et deviennent largement prédominantes dans deux des trois microcosmes témoins. Cette forte croissance confirme le caractère opportuniste de ces organismes déjà mis en évidence par Van den Brink *et al.* (2000).

La production hétérotrophe et la densité bactérienne sont fortement corrélées avec la biomasse phytoplanctonique. Cette corrélation a fréquemment été soulignée dans la littérature (Bird & Kalff, 1984 ; White *et al*., 1991 ; Smith *et al*., 1995 ; Castillo *et al.*, 2004 ; Pinhassi *et al*., 2004) notamment lorsque l'écosystème est caractérisé par une forte disponibilité nutritive (Muylaert *et al*., 2002). Au cours de la dernière semaine, la fraction de bactéries CTC-

positives est également stimulée par le contexte environnemental. Les observations microscopiques, faites au moment du dénombrement de ces cellules, suggèrent que l'augmentation du taux d'activité respiratoire est majoritairement due à une stimulation des bactéries associées aux algues **(Fig. D-17A)** ou aux débris organiques **(Fig. D-17B)**. Elles présentent ainsi généralement des taux d'activité supérieurs à ceux des bactéries libres (Smith *et al.*, 1995), notamment en cas de fort développement diatomique (Riemann *et al.*, 2000) et d'accumulation de détritus algaux (Sherr *et al.*, 2002). Cependant, une baisse de la production bactérienne est observée dans la dernière semaine. Cette réduction d'activité, probablement liée à une diminution des teneurs en orthophosphates (Brett *et al.*, 1999 ; Fajon *et al.*, 1999), entraîne alors une stabilisation de la densité bactérienne.

Figure D-17 : Visualisation de bactéries CTC-positives sur une cellule algale du genre *Navicula* **(A)** et sur un amas de débris organiques **(B).**



Le fort développement bactérien, consécutif au bloom algal, est accompagné de changements dans la composition spécifique de cette communauté. L'hybridation *in situ* permet de visualiser uniquement une augmentation de la proportion de bactéries appartenant à la sous-classe des γ-Protéobactéries entre le 10ème et le 14ème jour. L'analyse de la diversité par TTGE se montre beaucoup plus résolutive et fait apparaître des remaniements dans la communauté dès l'apparition du bloom algal. Cette différence de résolution souligne les limites de l'utilisation de sondes associées à des grands groupes phylogénétiques pour caractériser les variations dans la structure taxonomique de la communauté bactérienne et confirme la nécessité d'utiliser des sondes spécifiques de groupes bactériens plus ciblés ou de privilégier des techniques moléculaires plus fines d'empreintes génétiques telle que la TTGE (Muyzer, 1999). Les remaniements majeurs observés au sein de la communauté bactérienne après le sixième jour sont très probablement associés aux changements de composition

taxonomique de la communauté algale (Pinhassi *et al.*, 2004) entraînant une modification de la nature de la matière organique fraîche assimilable par les bactéries (Van Hannen *et al.*, 1999). La baisse du niveau de diversité à partir du sixième jour dans les témoins (moins de 22 bandes détectées à partir du 6ème jour) semble suggérer une dominance des espèces bactériennes les plus favorisées par le fort développement autotrophe.

Ainsi, les bandes T1 et T2 représentent ainsi probablement des bactéries de ce type. Ces deux bandes correspondent à des bactéries du phylum des *Chlamydiae*. Ce groupe taxonomique, considéré comme relativement ubiquiste dans la littérature, renferme des espèces qui présentent un stade de parasitisme cellulaire obligatoire (Corsaro *et al.*, 2001 ; Horn *et al.*, 2004). La bande T2 est associée à des espèces de la famille des *Parachlamydiaceae* qui regroupe des bactéries parasites de protozoaires du genre *Acanthamoebae*, abondants dans de nombreux milieux aquatiques et qui présentent un stade de résistance sous forme de kyste (Fritsche *et al.*, 2000). Les clones issus de la bande T1 renferment des fragments correspondant à des espèces proches de *Simkania negevensis*, une bactérie qui se développe également chez des amibes libres (Corsaro *et al.*, 2001). La prolifération de ces espèces dans les erlens témoins peut être liée à un développement significatif de protozoaires qui auraient échappé à la filtration initiale et qui seraient favorisés par l'apparition du bloom algal.

Les bandes U1, U2 et U3 deviennent visibles à partir du sixième jour et présentent une intensité plus marquée dans les témoins jusqu'à J14. L'analyse phylogénétique révèle que ces bandes renferment des séquences codant l'ARNr 16S de chloroplastes. La présence de séquences de ce type a déjà été observée dans des études antérieures, notamment en cas d'accumulation de détritus algaux (DeLong *et al.*, 1993 ; Rappé *et al.*, 1998) et semble directement induite par le fort développement des microorganismes autotrophes. Il est intéressant de constater que ces séquences n'ont pas pu être correctement identifiées avec le logiciel BLASTn, ce qui est très probablement lié à un déficit de séquences codant l'ARNr 16S plastidique dans la banque de données GenBank. Les bandes U1 et U3 renferment également des fragments correspondant à des espèces regroupées avec des séquences environnementales affiliées respectivement aux α-*Proteobacteria* et aux *Verrucomicrobia*. Enfin la bande U4, qui apparaît aussi après six jours, est associée à une espèce proche d'une bactérie non cultivable de type corvenA4, qui représente un nouveau genre de la famille des *Parachlamydiaceae* (Corsaro *et al.*, 2001).

D.II.2.3.d. Réponse des communautés microbiennes à la présence de diuron

Le diuron, introduit à la concentration nominale de 10 µg l^{-1}, inhibe significativement le développement des organismes autotrophes en maintenant les concentrations en chlorophylle *a* et les densités algales à de faibles niveaux, sur l'ensemble du suivi. Les espèces des genres *Asterionella* et *Oocystis* paraissent particulièrement sensibles et ne sont plus détectables que dans les microcosmes témoins. Toutefois, la toxicité du diuron semble affecter principalement les espèces du genre *Cyclotella* qui disparaissent totalement dans les trois microcosmes contaminés alors qu'elles se développent fortement dans les témoins. Ce résultat est en opposition avec les observations de Hartgers *et al.* (1998) qui ont enregistré une augmentation de l'abondance de *Cyclotella* dans des microcosmes contaminés par un mélange de trois herbicides (atrazine, diuron et métolachlore), à des concentrations supérieures à celle que nous avons utilisées. Ils ont supposé que ce phénomène était induit par des effets indirects tels que le relargage de nutriments ou une diminution de la compétition pour les ressources suite au déclin des espèces algales les plus sensibles à ces polluants. Compte tenu des propriétés de notre écosystème (bonne disponibilité des ressources et faible densité algale cellulaire), les effets toxiques directs du diuron sur les *Cyclotella* sont très probablement supérieurs à ces effets indirects potentiels.

A l'opposé, les espèces du genre *Navicula* semblent moins affectées par l'herbicide et restent prédominantes au sein de la communauté pendant toute la durée de l'expérience.

L'effet toxique du diuron s'exerce donc sur les organismes autotrophes et engendre indirectement un effet négatif sur la communauté bactérienne. En effet, en inhibant le développement des organismes photosynthétiques, le diuron limite l'accumulation de matière organique autochtone d'origine algale qui représente une source nutritive majeure, facilement assimilable par les bactéries (Baines & Pace, 1991 ; Raymond & Bauer, 2001). Notre résultat est donc différent de celui de DeLorenzo *et al.* (1999) qui avait observé une forte stimulation du compartiment bactérien suite à une chute massive de l'activité autotrophe (diminution du taux de photosynthèse, réduction des biomasses et des densités algales…) résultant de la présence d'herbicides de la famille des triazines. Les auteurs ont alors attribué cette stimulation à un meilleur accès des bactéries aux ressources nutritives suite à une baisse de la compétition avec les organismes autotrophes. Dans notre étude et compte tenu de la stabilité de la densité pendant toute l'expérience, l'herbicide agit en bloquant le développement de la communauté autotrophe mais ne semble pas véritablement entraîner la sénescence d'une fraction importante de cellules algales.

Compte tenu de l'inhibition indirecte de l'activité hétérotrophe, les changements au niveau de la structure et de la diversité bactérienne sont beaucoup moins marqués dans les microcosmes contaminés. La distribution des quatre groupes phylogénétiques ciblés par FISH reste relativement constante et les profils de diversité obtenus par TTGE présentent entre eux une similarité supérieure à 78% sur l'ensemble du suivi. Le niveau de diversité reste également relativement stable au cours de l'expérience, le nombre de bandes détectables sur le gel TTGE variant entre 25 et 30 bandes du 6ème au 21ème jour. Ces différences sont attribuables à la visualisation de bandes qui correspondent probablement, pour certaines d'entre elles, à des espèces bactériennes particulièrement bien adaptées à la présence de diuron, notamment celles qui se maintiennent (par exemple D4, D5, D6 et D7) et surtout celles qui deviennent visibles (par exemple D1, D2 et D3) uniquement dans les microcosmes contaminés.

Parmi elles, on retrouve une majorité de γ-*Proteobacteria*, notamment des membres du genre *Cellvibrio* qui appartient à la famille des *Pseudomonadaceae*. Cette famille comprend de nombreuses bactéries impliquées dans la biodégradation des herbicides, comme celles qui appartiennent au genre *Pseudomonas* (Mandelbaum *et al*., 1995 ; El Fantroussi, 2000 ; Dejonghe *et al*., 2003). La capacité de certaines d'entre elles, issues du sol, à dégrader le diuron (El Deeb *et al.*, 2000) ou à se développer sur un milieu fortement enrichi avec cette molécule (Koneva, 2004) a ainsi été démontrée. De plus, une espèce du genre *Pseudomonas* dotée de propriétés de biodégradation du diuron a récemment été isolée dans notre laboratoire à partir d'un échantillon du Jauron (Batisson *et al.*, soumis). Cette souche, référencée dans GenBank sous le numéro DQ983422, présente une homologie supérieure à 93% avec nos deux séquences (clones D2 et D5). Parmi les *γ-Protéobactéria*, le genre *Legionella*, fréquemment rencontré dans les biofilms de rivière (Manz *et al.,* 1999 ; Sheehan *et al.,* 2005), est également représenté par une espèce (clone D7a) très proche d'une bactérie rencontrée dans un milieu aquatique pollué par des solvants (Dojka *et al.*, 1998). Ceci peut suggérer un fort potentiel d'adaptation face aux pollutions chimiques. Le phylum des *Verrucomicrobia* est également bien représenté dans les microcosmes contaminés (clones D1, D3b, D4 et D6). Malgré l'abondance des membres de ce phylum dans les écosystèmes aquatiques dulcicoles (Boucher *et al.*, 2006), il n'existe, à notre connaissance, aucune étude décrivant les effets d'herbicides de type phénylurées sur ces bactéries, et le faible nombre de souches cultivables (Hugenholtz *et al.*, 1998) limite les connaissances sur leur capacité à résister aux polluants voire à les dégrader. Cette remarque s'applique aussi aux espèces appartenant au phylum des *Gemmatimonadetes* (clone D3c et D7b) qui paraissent également favorisées par la présence du diuron. D'après nos résultats, il semblerait donc intéressant d'étudier plus spécifiquement

la réponse des bactéries appartenant à ces deux groupes taxonomiques (*Verrucomicrobia* et *Gemmatimonadetes*) lors de pollution de milieux aquatiques lotiques par des pesticides.

Synthèse des résultats

Cette étude expérimentale a mis en évidence deux périodes clairement différenciées au cours du suivi :

- Pendant les six premiers jours, une phase de latence est observée, durant laquelle les communautés algales et bactériennes présentent une faible productivité malgré des conditions abiotiques favorables, et ceci indépendamment de la présence de diuron ;
- A partir du 6ème jour, un important bloom algal est enregistré uniquement en absence de diuron. Cette forte activité autotrophe stimule alors le compartiment bactérien et génère une forte activité hétérotrophe associée à de nombreux remaniements au sein de la communauté avec notamment le développement d'organismes appartenant au phylum des *Chlamydiae*. Le diuron (10 µg l^{-1}) affecte les microorganismes autotrophes et empêche l'apparition du bloom algal. Cet effet direct engendre alors une inhibition de l'activité microbienne hétérotrophe qui reste à un faible niveau tout au long de l'expérience. Cependant, quelques espèces bactériennes semblent favorisées par la présence de diuron, en particulier certaines appartenant aux γ-*Proteobacteria*, aux *Verrucomicrobia* et aux *Gemmatimonadetes*.

D.II.3. Effets du diuron sur des communautés microbiennes présentant des caractéristiques initiales différentes (expérience menée en 2003) – Comparaison avec les résultats décrits précédemment

D.II.3.1. Conditions expérimentales

Afin d'apprécier de manière plus perspicace les effets du diuron sur les communautés microbiennes et de valider ou non les hypothèses émises précédemment, une seconde expérience a été mise en place. Cette étude a été menée à partir de communautés échantillonnées le 24 mars 2003 à la même station et placées dans des conditions expérimentales similaires. Les organismes périphytiques ont été récoltés sur des substrats artificiels colonisés pendant 2 semaines **(voir chapitre B.I.3.5.)**. Les microcosmes, réalisés en duplicat, ont été maintenus à 8°C avec une photopériode 12h/12h pour reproduire au mieux les conditions naturelles. Les différents paramètres ont été mesurés aux jours 0, 1, 3, 7, 10, 14 et 24.

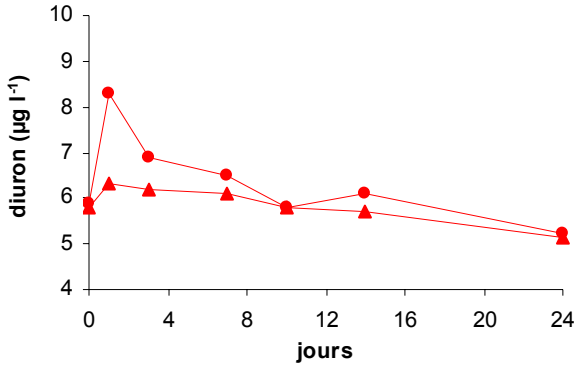
Afin de faciliter l'analyse des résultats observés, les réponses des communautés microbiennes au cours de cette expérience seront présentées, discutées et directement comparées avec celles précédemment décrites.

D.II.3.2. Résultats et discussion

D.II.3.2.a. Cinétique du diuron

Aucune trace de diuron n'a été détectée sur le prélèvement d'eau initial. Comme en 2004, les concentrations initiales dès la mise en place des deux microcosmes contaminés (5,85 ± 0,07 µg l^{-1}) sont inférieures à la valeur théorique attendue de 10 µg l^{-1} **(Fig. D-18)**. On enregistre cependant une augmentation des concentrations pendant les premières vingt-quatre heures, surtout dans le microcosme D1. Cette observation semble corroborer l'hypothèse d'un piégeage rapide de la molécule lors de son introduction dans les microcosmes avec, dans le cas présent, la libération d'une fraction dans la colonne d'eau pendant le premier jour. En 1995, Kasai & Hanazato ont ainsi remarqué dans leurs mésocosmes que la concentration en herbicide (simetryne) atteignait dans l'eau sa valeur maximale 24 heures après son introduction.

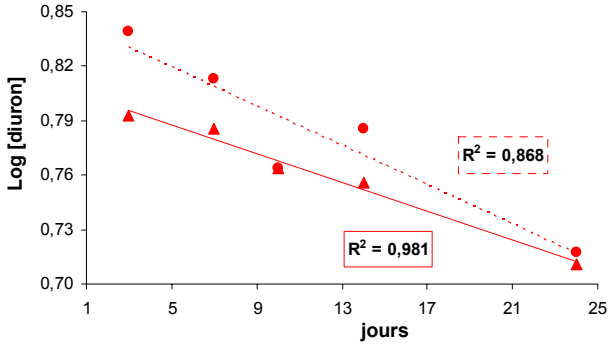
Figure D-18 : Evolution des concentrations en diuron (µg l^{-1}) dans les deux microcosmes contaminés : D1 (●) et D2 (▲).



Au-delà de 24 heures, les valeurs diminuent progressivement au cours de l'expérience et sont inférieures de 12% aux valeurs initiales mesurées dans les deux microcosmes en fin de suivi. Le dispositif d'éclairage étant identique à celui utilisé en 2004, il semble peu probable qu'une photodégradation plus importante ait été enregistrée au cours de l'expérience menée en 2003. Hormis les fluctuations enregistrées le premier jour, il est intéressant de noter que la disparition du diuron semble suivre une cinétique de premier ordre **(Fig. D-19).** Ces résultats sont comparables à ceux obtenus par El-Dib & Abou-Waly (1998) lors de l'étude de la biodégradation de deux herbicides de la famille des phénylurées (le dicuran et le patoran) par

des bactéries prélevées dans le Nil (Egypte). Toutefois, ils n'ont observé un début de dégradation qu'après une période d'acclimatation de l'ordre de 40 jours, nécessaire aux microorganismes pour leur permettre d'adapter leur arsenal enzymatique à la dégradation du diuron.

Figure D-19 : Cinétique du diuron dans les deux microcosmes contaminés, D1 (●) et D2 (▲), entre J3 et J24



Comparaison de l'exposition des communautés microbiennes au diuron entre les deux expériences

Comme en 2004, les communautés microbiennes sont soumises à une exposition chronique sur toute la durée de l'expérience. Toutefois et contrairement à l'expérience décrite précédemment, la concentration en diuron diminue de manière linéaire dans les deux microcosmes. Dans l'hypothèse d'une biodégradation et compte tenu de l'absence d'une période d'adaptation, nos résultats suggèreraient donc, au moment de l'échantillonnage, la présence dans le Jauron de microorganismes susceptibles d'être impliqués dans la dégradation de ce polluant.

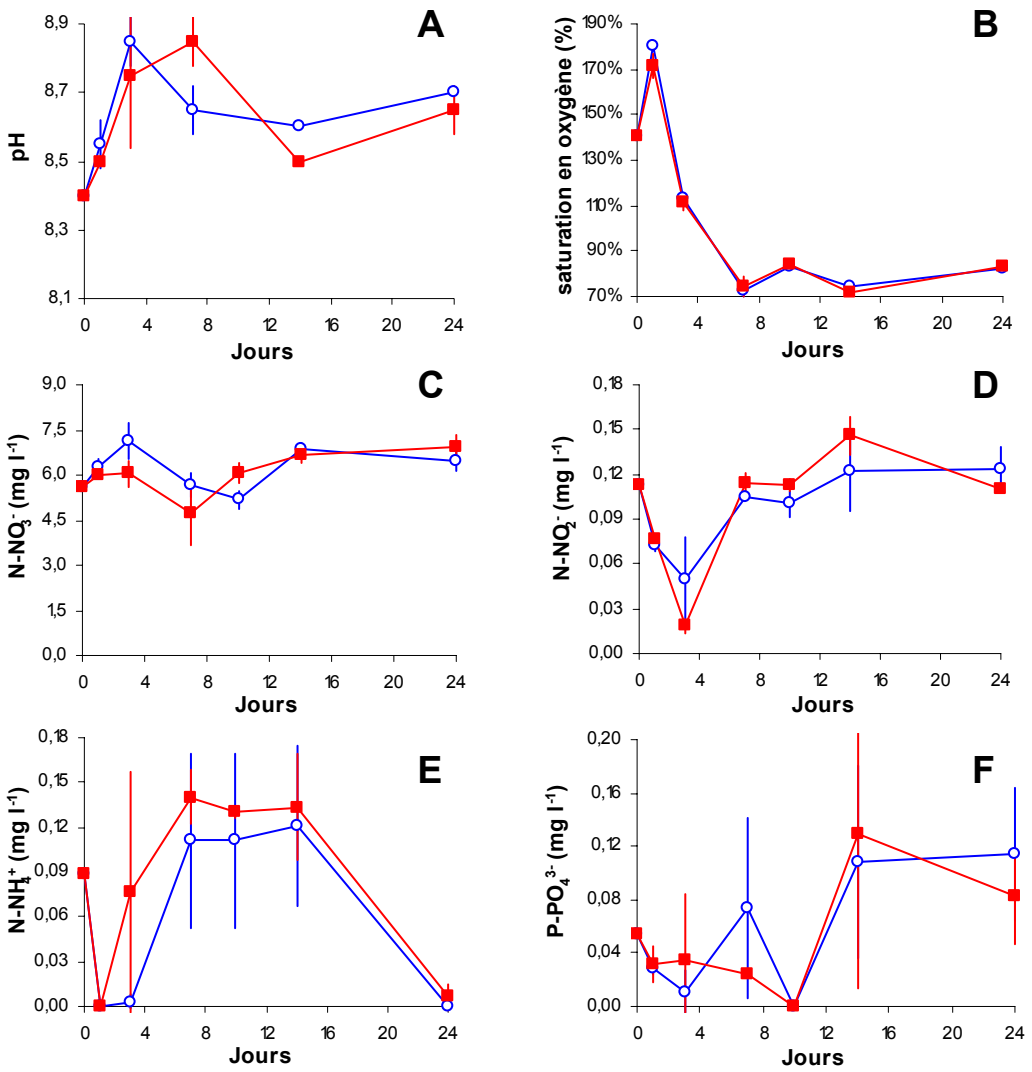
D.II.3.2.b. Contexte environnemental

L'évolution des paramètres physico-chimiques mesurés est illustrée dans la **Figure D-20**. Tous ces paramètres suivent une évolution similaire dans les deux types de microcosmes et aucune différence significative n'est enregistrée sur l'ensemble du suivi entre les témoins et les contaminés. Le pH initial de 8,4 augmente dans les trois premiers jours avant de se stabiliser entre 8,5 et 8,7 après J7 **(Fig. D-20A)**. Le pourcentage de saturation en oxygène, très élevé pendant les trois premiers jours (110-180%), se stabilise entre 70% et 90% lors des deux dernières semaines **(Fig. D-20B)**. Les teneurs en nitrates sont relativement constantes dans tous les microcosmes et restent proches de 6 mg N l^{-1} sur l'ensemble du suivi **(Fig. D-20C)**. Les concentrations en nitrites **(Fig. D-20D)** chutent dans les trois premiers jours (0,03 ± 0,02 mg N l^{-1} à J3) puis se stabilisent à un niveau proche de la valeur initiale (0,11 mg N l^{-1}) dès le

septième jour. Les teneurs en ammonium varient fortement entre tous les microcosmes indépendamment de la présence de diuron, mais ont tendance à augmenter durant la 2ème semaine (0,07 – 0,15 mg N l^{-1}) alors qu'elles sont proches du seuil de détection (0,01) en début et en fin d'expérience **(Fig. D-20E)**. Les concentrations en orthophosphates sont de l'ordre de 0,05 mg P l^{-1} **(Fig. D-20F)** en début d'expérience et fluctuent fortement indépendamment de la présence de diuron. Aussi, deux périodes semblent se dessiner. Pendant la 1ère semaine, les valeurs restent faibles et sont inférieures au seuil de détection (0,01 mg P l^{-1}) à J10 puis augmentent significativement lors des deux dernières semaines (0,05 – 0,21 mg P l^{-1}).

Comparaison des conditions abiotiques initiales entre les deux expériences

Figure D-20 : Evolution moyenne (et écarts-types) du pH **(A)**, du pourcentage de saturation en oxygène **(B)** et des concentrations (mg l^{-1}) en N-NO_3^- **(C)**, N-NO_2^- **(D)**, N-NH_4^+ **(E)** et P-PO_4^{3-} **(F)** dans les microcosmes témoins (○) et contaminés (■).



La valeur initiale du pH (8,4) ainsi que les concentrations en composés azotés (5,57 mg N-NO_3 l^{-1} ; 0,11 mg N-NO_2 l^{-1} ; 0,09 mg N-NH_4 l^{-1}) sont comparables à celles enregistrées en 2004 (pH 8,3 ; 4,15 mg N-NO_3 l^{-1} ; 0,13 mg N-NO_2 l^{-1} ; 0,079 mg N-NH_4 l^{-1}). Ces paramètres suivent une évolution similaire dans les deux expériences.

Le pourcentage en oxygène dissous, bien que plus élevé dans cette expérience, traduit, comme en 2004, une oxygénation convenable du système (saturation >70%).

Les principales différences entre les deux années sont attribuées aux teneurs en orthophosphates, deux fois plus faibles en 2003 (0,054 mg P l^{-1}) qu'en 2004 (0,113 mg P l^{-1}) et à la température (6°C de moins en 2003).

D.II.3.2.c. Réponse de la communauté algale à la présence de diuron

En 2003, malgré une disponibilité en orthophosphates (54 µg l^{-1}) deux fois moins élevée qu'en 2004 et une eau plus froide (8°C *vs* 14°C), la concentration en chlorophylle *a* (24 µg l^{-1}, **Fig. D-21A**) et la densité algale (2600 cell. ml^{-1}, **Fig. D-21B**) initiales sont respectivement trois et cinq fois plus importantes que dans l'expérience décrite précédemment. Ces niveaux de biomasse et d'abondance algale sont plus en adéquation avec les conditions nutritives régnantes (Dodds *et al.,* 1998 ; Liu & Leff, 2002 ; Dorigo *et al*., 2004). La teneur élevée en oxygène enregistrée en début d'expérience (140%) suggère également une forte activité photosynthétique traduisant un état physiologique satisfaisant de la communauté algale. Ces résultats semblent donc soutenir l'hypothèse émise lors de la précédente étude, à savoir l'existence d'un état physiologique initial déficient des microorganismes autotrophes.

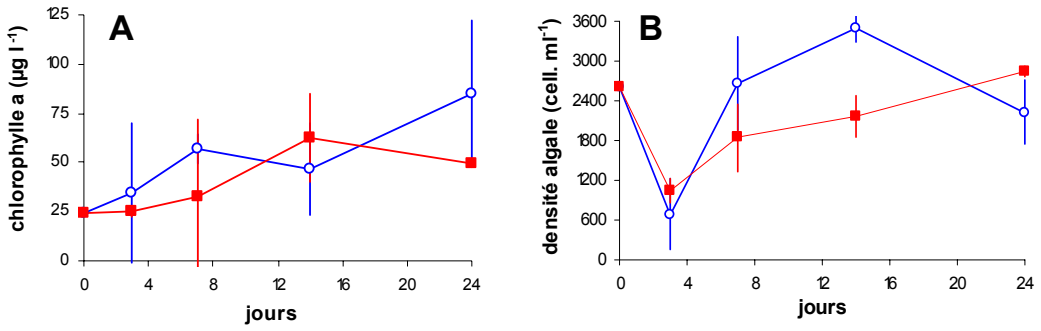
Au début de l'expérience, trois genres seulement sont représentés au sein de la communauté algale, à savoir les genres *Navicula*, *Nitzschia* et *Gomphonema* **(Fig. D-22)**. Le niveau de diversité est donc plus faible qu'en 2004, où six genres étaient initialement recensés. Il est intéressant de noter que les trois genres initialement présents dans cette expérience correspondent à ceux qui résistaient à la présence de diuron en 2004 et composaient l'essentiel de la communauté algale en fin d'expérience, après 21 jours d'exposition à ce polluant.

Compte tenu des propriétés initiales de la communauté algale, aucune phase de latence n'est observée en début d'expérience. Les concentrations en chlorophylle *a*, malgré de forte variations entre les microcosmes, augmentent progressivement du premier au dernier jour sans différence statistique entre les microcosmes témoins et contaminés **(Fig. D-21A)**. Cette augmentation progressive de la biomasse algale dans les microcosmes contaminés pourrait éventuellement expliquer en partie la diminution de la concentration en diuron qui peut se

retrouver piégé suite à son adsorption sur ces organismes autotrophes (Peterson *et al.*, 1997). Cependant, l'absence de désorption durant le suivi semble donner peu de crédit à cette hypothèse et tendrait plus vers l'hypothèse d'une biodégradation de la molécule.

L'augmentation de la biomasse algale est moins importante que celle enregistrée en 2004 après six jours en absence de diuron. Cette différence d'intensité s'explique probablement par les conditions abiotiques décrites précédemment (température et teneurs en orthophosphates plus faibles), moins favorables à l'apparition d'un bloom algal.

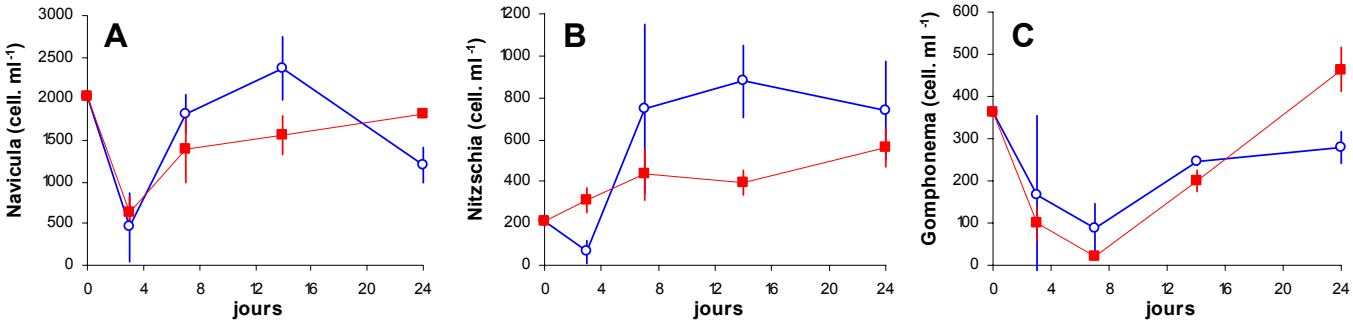
Figure D-21 : Evolution moyenne (et écarts-types) des concentrations (µg l^{-1}) en chlorophylle a **(A)** et de la densité algale **(B)** dans les microcosmes témoins (○) et contaminés (■).



Malgré une augmentation régulière de la biomasse, la densité algale est caractérisée par deux périodes distinctes, et ce dans les deux contextes **(Fig. D-21B)**. Pendant les trois premiers jours, une baisse de l'abondance (densité cellulaire divisée par trois environ), probablement induite par le confinement (« bottle effect » ; Bérard *et al.*, 1999a), est enregistrée dans tous les microcosmes. Elle conduit à une diminution des concentrations en oxygène **(Fig. D-20B)**. Au-delà du troisième jour, la densité algale augmente significativement pour atteindre des valeurs maximales la dernière semaine. Cette reprise démographique s'accompagne d'une forte consommation en phosphore inorganique à la fin de la première semaine **(Fig. D-20F)**.

Une légère différence entre les deux contextes (non soutenue par l'analyse statistique) est toutefois observée au 14ème jour, où le nombre de cellules est environ deux fois plus important en absence de diuron. Il est envisageable que cette différence soit due à la présence de l'herbicide. Cependant, cette hypothèse semble peu probable compte tenu du délai d'apparition des effets et du caractère très transitoire de cette différence.

Figure D-22 : Evolution moyenne (et écarts-types) de l'abondance (cell. ml^{-1}) des espèces appartenant aux genres *Navicula* **(A)**, *Nitzschia* **(B)** et *Gomphonema* **(C)** dans les microcosmes témoins (○) et contaminés (■).



L'évolution des densités des *Navicula* **(Fig. D-22A)**, genre majoritaire dans les deux types de microcosmes (53% à 78%), et des *Nitzschia* **(Fig. D-22B)** suivent globalement celle de la densité totale. Après une forte décroissance pendant la première semaine, l'abondance des *Gomphonema* augmente de manière très prononcée jusqu'à la fin du suivi, quelque soit le contexte. Le développement des espèces appartenant à ces trois genres suggère donc la présence d'organismes indifférents ou particulièrement résistants face à l'effet toxique du diuron. Il est envisageable que l'absence d'effet s'explique par une exposition préalable à cette molécule ou à des herbicides présentant des propriétés chimiques comparables (notion de PICT ; Bérard *et al.*, 2002 ; Seguin *et al.*, 2002 ; Dorigo *et al.*, 2004). La faible diversité taxonomique (3 genres recensés contre 6 en 2004 où la densité était pourtant quatre fois plus faible) observée dès le début de l'expérience semble corroborer cette hypothèse. En effet, plusieurs auteurs ont souligné l'effet des herbicides sur la richesse spécifique des organismes autotrophes suite à la sélection des espèces plus résistantes au détriment des plus sensibles (Dahl & Blanck, 1996 ; Pérès *et al.*, 1996 ; DeLorenzo *et al.*, 1999).

Comparaison des effets du diuron sur la communauté algale entre les deux expériences

Contrairement aux résultats observés en 2004, la biomasse algale augmente régulièrement en présence de diuron. Malgré une chute démographique lors des trois premiers jours, les densités algales sont également stimulées dans tous les microcosmes et aucun effet du diuron n'est perceptible sur la structure de la communauté. L'herbicide n'affecte donc pas significativement le compartiment autotrophe.

Deux hypothèses majeures peuvent expliquer cette différence de réponse des microorganismes photosynthétiques à la présence de diuron entre les deux expériences :

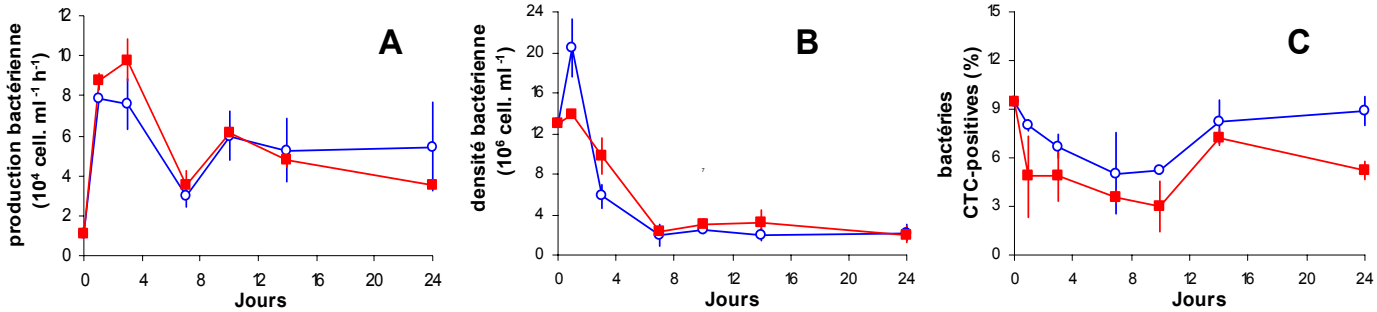
> ***(1) en 2003, la communauté algale semble présenter un état initial physiologique plus satisfaisant qu'en 2004, ce qui lui confère une plus grande résistance face à la toxicité du polluant***

et/ou (2) en 2003, la communauté algale, moins diversifiée, est composée exclusivement d'espèces qui paraissent particulièrement résistantes au diuron.

D.II.3.2.d. Réponse de la communauté bactérienne à la présence de diuron

La production bactérienne initialement proche de 1,1.10^4 cell. ml^{-1} h^{-1} est fortement stimulée dès la mise en place expérimentale (multiplication par 7 pendant les premières 24 heures), et ce dans tous les microcosmes **(Fig. D-23A)**. Cette stimulation est récurrente dans nos études en microcosmes et résulte certainement du confinement des ressources. Après trois jours, le niveau de production diminue puis se stabilise autour 5.10^4 cell. ml^{-1} h^{-1} lors des deux dernières semaines. Cette évolution est identique dans les deux types de microcosmes et est donc indépendante de la présence de diuron. Contrairement aux résultats obtenus en 2004, où le développement algal enregistré après six jours dans les témoins stimulait fortement le compartiment bactérien, l'évolution de la production hétérotrophe n'est pas, ici, significativement corrélée à celle du compartiment autotrophe.

Figure D-23 : Evolution moyenne (et écarts-types) de la production bactérienne hétérotrophe (10^4 cell. ml^{-1} h^{-1}) **(A)**, de la densité bactérienne (10^6 cell. ml^{-1}) **(B)** et du pourcentage de bactéries CTC-positives **(C)** dans les microcosmes témoins (○) et contaminés (■).



La densité bactérienne initiale est de l'ordre de 1,3.10^7 cell. ml^{-1} **(Fig. D-23B)**. Après une légère augmentation pendant 24 heures, parallèle à celle de la production, le nombre de bactéries diminue dans les deux contextes jusqu'à J7 et se stabilise entre 1,9.10^6 cell. ml^{-1} et 3,2.10^6 cell. ml^{-1} sans différence significative entre les microcosmes témoins et contaminés.

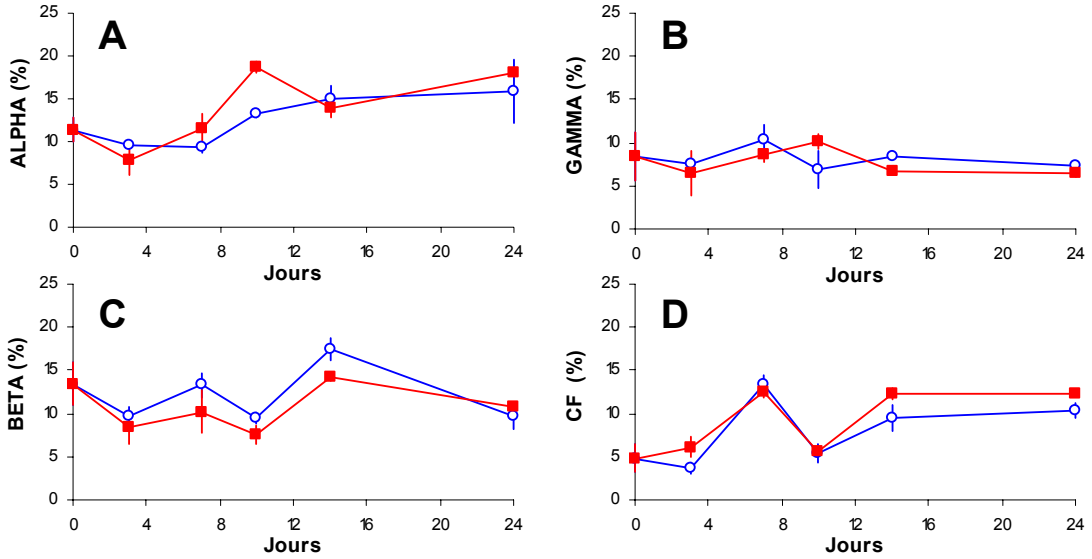
D'un point de vue quantitatif, la présence du diuron n'engendre donc aucun impact significatif sur le compartiment bactérien. Comme DeLorenzo *et al.* (1999), nous avons montré précédemment que lorsqu'il avait lieu, cet impact découlait majoritairement d'effets indirects suite à l'altération des organismes autotrophes. Dans l'expérience présente, compte tenu des effets limités du diuron sur la communauté algale, il n'est donc pas étonnant de ne pas observer de conséquence sur la densité et la production hétérotrophe bactérienne. Le lien

entre ces deux communautés *via* le carbone organique dissous n'a pas pu être établi suite à une contamination des échantillons destinés à l'analyse de ce paramètre.

La proportion initiale de cellules CTC-positives, proche de 10%, est cinq fois plus importante que celle observée en 2004 et suggère une fraction de bactéries actives importante **(Fig. D-23C)**. Durant toute l'expérience, la proportion de cette fraction cellulaire est environ 2 fois plus élevée en absence de diuron. D'après l'analyse par ANOVA, cette différence est statistiquement significative sur l'ensemble de l'expérience ($p<0,05$). La fraction de bactéries CTC-positives semble donc être affectée suite à l'exposition au diuron. Cette fraction regroupant les bactéries présentant l'activité respiratoire la plus importante au sein de la communauté (Nielsen *et al.,* 2003 ; Sherr *et al.*, 1999), il est donc envisageable que l'activité soit directement inhibée par la présence de diuron. Cette inhibition, enregistrée dès le début de l'expérience, a déjà été mise en évidence dans le sol (Prado & Airoldi, 2002) mais, à notre connaissance, il n'existe aucune donnée relative aux milieux aquatiques dulcicoles.

Les effets du diuron sur la communauté bactérienne ont également été appréciés d'un point de vue structural. Les sondes utilisées pour l'hybridation *in situ* permettent de cibler une proportion totale de bactéries (28% à 51% ; **Fig. D-24)** comparable à celle calculée en 2004 (28% à 57%).

Figure D-24 : Evolution moyenne (et écarts-types) du pourcentage de bactéries appartenant aux principaux groupes phylogénétiques ciblés par la méthode FISH à partir des sondes ALF1b **(A)**, GAM42a **(B)**, BET42a **(C)** et CF319a **(D)** dans les microcosmes témoins (○) et contaminés (■).

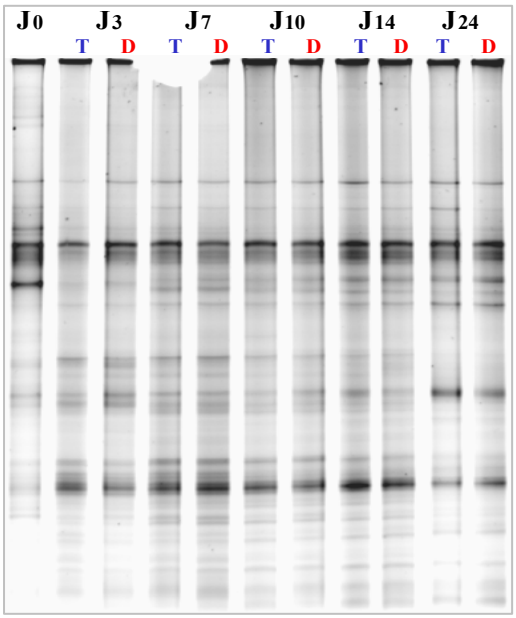


L'évolution de l'abondance relative des bactéries appartenant aux quatre groupes ciblés ne fait pas apparaître ici non plus de différence entre les microcosmes témoins et contaminés. Les fluctuations enregistrées au sein des subdivisions α (9-19% ; **Fig. D-24A**), γ (6-11% ;

Fig. D-24B) et β (8-18% ; **Fig. D-24C**) des Protéobactéries et du groupe des *Cytophaga-Flavobacterium* (3-14% ; **Fig. D-24D**) sont donc indépendantes de la présence de diuron.

Le gel obtenu par TTGE met également en évidence des profils similaires qui traduisent une stabilité importante de la diversité à partir du 3ème jour dans tous les microcosmes **(Fig. D-25)**. Malgré un pouvoir plus résolutif, l'analyse de la diversité bactérienne par TTGE ne décrit pas non plus de différence significative entre les communautés soumises ou non à la présence du diuron.

Figure D-25 : Evolution des profils obtenus par TTGE dans les microcosmes témoins (T) et contaminés (D) entre J0 et J24.

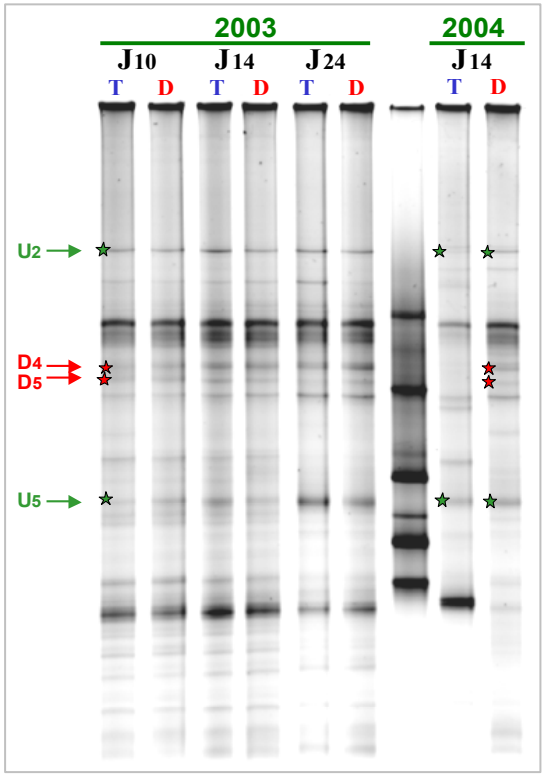


L'impact du diuron perçu sur la fraction bactérienne la plus active (bactéries CTC-positives) ne semble donc pas être lié à des modifications importantes au niveau de la structure taxonomique de la communauté. Les techniques d'empreinte génétique sur gel en conditions dénaturantes permettant de détecter les espèces qui représentent au moins 1% de la communauté totale (Muyzer *et al.*, 1993 ; Murray *et al.*, 1996), le diuron ne présente donc pas une toxicité suffisante sur les espèces bactériennes majoritaires pour entraîner la disparition de bandes. Une nouvelle fois, cette observation suggère la présence, dès le début de l'étude, de bactéries particulièrement bien adaptées à la présence de cet herbicide et peut expliquer en partie le court délai d'adaptation observé avant la biodégradation du diuron.

L'absence d'effet notable du diuron sur la structure de la communauté algale qui peut conditionner fortement la diversité bactérienne (Van Hannen *et al.*, 1999 ; Pinhassi *et al.*, 2004), est également un facteur important pouvant expliquer la forte similitude entre les profils de diversité obtenus en présence ou non de diuron.

L'absence de différence marquée entre ces profils ne nous a pas permis de définir, dans cette expérience, de bandes dites « d'intérêt ». Toutefois, la confrontation des gels obtenus au cours des deux expériences nous a révélé des similitudes entre les profils de diversité observés. Dans cette expérience, nous avons ainsi remarqué des bandes présentant les mêmes distances de migration que certaines bandes séquencées en 2004, à savoir les bandes U2, D4, D5 et U5 **(Fig. D-26)**. Compte tenu des phénomènes de co-migration, décrits précédemment **(voir chapitre D.II.2.2.i.)**, les espèces représentées par ces bandes ne sont peut-être pas identiques à celles identifiées en 2004. Afin de vérifier si les bandes correspondent à des espèces identiques au cours des deux années, elles ont été excisées dans le but de comparer les séquences obtenues avec celles décrites précédemment.

Figure D-26 : Localisation des bandes communes aux deux expériences (2003 et 2004).

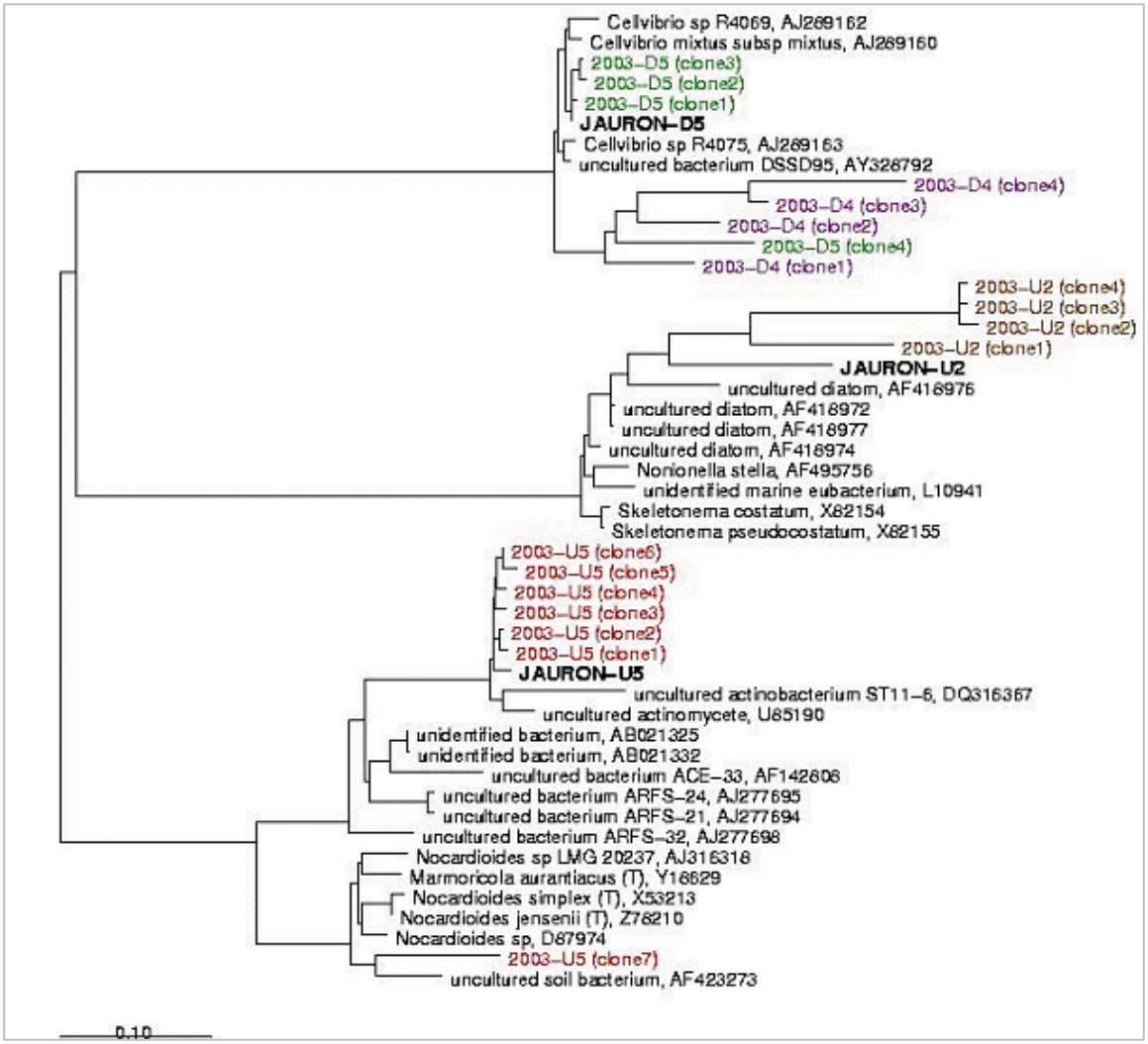


Les fragments d'ADN ont été purifiés et clonés suivant le même protocole qu'en 2004. Pour chaque bande, 4 à 7 séquences ont été obtenues et insérées dans l'arbre phylogénétique construit précédemment à l'aide du logiciel ARB.

Pour les bandes D5 et U5, respectivement 3 clones (sur 4) et 6 clones (sur 7) sont très proches des séquences rencontrées en 2004 **(Fig. D-27)**. Comme nous l'avons déjà souligné, nos résultats confirment qu'une même bande peut correspondre à plusieurs espèces. C'est le cas par exemple pour la bande U5. En effet, un des sept clones isolés à partir de cette bande se trouve, comme les six autres, affilié à l'ordre des *Actinomycetales* mais se distingue par sa proximité avec les bactéries du genre *Nocardioides*.

Les quatre clones issus de la bande D4, qui présentent des variations importantes entre eux, sont regroupés au sein de la famille des *Pseudomonadaceae* (γ-*Proteobacteria*) et sont très différents des clones obtenus en 2004, affiliés au phylum des *Verrucomicrobia* **(Fig. D-16**, clones codés JAURON-D4**)**. Enfin, comme en 2004, les clones U2 sont identifiés comme des séquences du gène de l'ARNr 16S de chloroplastes. Toutefois une distance importante est observée sur l'arbre phylogénétique entre les séquences obtenues au cours des deux années.

Figure D-27: Positionnement dans l'arbre phylogénétique des différents clones issus des bandes excisées en 2003 (préfixe 2003) et comparaison avec les résultats obtenus en 2004 (préfixe JAURON)



Sur les quatre bandes choisies, deux représentent effectivement des organismes qui peuvent être considérés comme identiques à ceux rencontrés en 2004 : la bande U5 (*Actinobacteria – Actinomycetales*) et la bande D5 (γ-*Proteobacteria – Pseudomonadaceae – Cellvibrio*). Comme en 2004, la bande U5 présente une intensité importante dès le début de l'expérience et se maintient sur l'ensemble du suivi. L'espèce de l'ordre des *Actinomycetales* qui lui est associée semble être prédominante dans l'écosystème puisqu'elle est bien représentée dans la rivière au cours des deux années successives. En 2004, la bactérie du

genre *Cellvibrio*, associée à la bande D5, devenait abondante à partir du troisième jour et semblait être favorisée par la présence de diuron. En 2003, cette bande devient visible à partir de J7 et présente une intensité similaire dans les deux types de microcosmes. Dans l'étude précédente, sa disparition (ou son caractère minoritaire) dans les microcosmes témoins était donc liée vraisemblablement à un développement d'espèces favorisées par l'apparition du bloom algal et devenant alors majoritaires. Le développement de cette espèce, observé pendant la première semaine au cours des deux années successives, semble traduire un caractère opportuniste en rapport avec le confinement engendré par le dispositif expérimental. Comme en 2004, la bande U2 regroupe également des fragments correspondant à des séquences d'origine chloroplastique qui sont présents dès le début de l'expérience, du fait certainement de la forte densité algale dans la rivière lors du prélèvement initial.

L'existence d'espèces pérennes qui sont présentes au cours des deux années successives traduit une stabilité notable au sein de la communauté bactérienne. Cette stabilité peut être masquée par l'analyse TTGE car certaines espèces sont parfois faiblement représentées dans la rivière et ne sont pas détectables à l'aide de cette méthode. C'est le cas notamment de la bande D5, absente initialement au cours des deux années et qui devient visible au cours de la première semaine.

Synthèse des résultats

Cette deuxième étude expérimentale visant à apprécier les effets du diuron sur des communautés microbiennes prélevées à la même période de l'année (printemps) a révélé des résultats très différents de ceux obtenus en 2004.

En effet, la productivité microbienne initiale étant très supérieure à celle enregistrée précédemment et la composition taxonomique algale très différente, le diuron n'engendre aucune inhibition sur les microorganismes autotrophes. Aucune différence n'est ainsi perçue entre les microcosmes traités et les témoins, ni au niveau des concentrations en chlorophylle *a* qui augmentent progressivement au cours du suivi, ni au niveau de la structure de la communauté algale composée uniquement de trois genres dominants (*Navicula, Nitzschia* et *Gomphonema*), qui se maintiennent ou se développent, indifféremment à la présence de diuron.

L'absence d'effet direct important sur le compartiment algal limite donc l'impact indirect du diuron sur les microorganismes hétérotrophes. Seule une fraction bactérienne, vraisemblablement la plus active, semble être affectée négativement par la présence du diuron (diminution du pourcentage de cellules CTC-positives). Aucune différence significative n'est enregistrée au niveau de la production, de la densité et de la diversité appréciée par les méthodes FISH et TTGE.

D.II.4. Effets du diuron sur les communautés microbiennes en milieu lotique. Hypothèses émises à l'issue des études expérimentales

Nous avons cherché à appréhender les effets du diuron sur les communautés microbiennes du Jauron à partir de deux études en microcosmes menées à un an d'intervalle environ (mars-avril 2003 et mai 2004). Les résultats obtenus diffèrent fortement d'une année sur l'autre malgré un protocole expérimental identique. En 2003, les effets du diuron sont ainsi très limités alors que la présence de l'herbicide engendre en 2004 une inhibition importante de l'activité microbienne autotrophe et hétérotrophe.

La réponse des microorganismes face à l'exposition à un polluant dépend de nombreux facteurs abiotiques tels que les ressources nutritives (Barreiro Lozano & Pratt, 1994 ; Pratt & Barreiro, 1998 ; DeLorenzo *et al.*, 2001), la température (Bérard *et al.*, 1999b) ou la luminosité (Guash & Sabater, 1998). Dans nos deux expériences, les communautés microbiennes ont été placées dans les mêmes conditions de luminosité et d'agitation. Les conditions abiotiques initiales mesurées sont relativement similaires, les seules variations sensibles étant enregistrées au niveau des concentrations en orthophosphates et de la température choisie. Ces paramètres influencent fortement le niveau de sensibilité du phytoplancton face aux herbicides. Une température plus élevée et une meilleure disponibilité en phosphates augmentent ainsi généralement les capacités de résistance des organismes (Bérard *et al.*, 1999b ; Pratt & Barreiro, 1998). Ces résultats sont en contradiction avec nos observations. Les différences très nettes observées au niveau des effets du diuron ne peuvent donc pas être majoritairement imputables aux caractéristiques physico-chimiques du milieu.

Les paramètres biologiques mesurés lors de la mise en place des microcosmes ont mis en évidence des variations importantes entre les deux expériences, spécialement au niveau de la communauté autotrophe, directement exposée à la toxicité de l'herbicide. Les effets du diuron ont donc été appréhendés sur des communautés algales différentes, tant d'un point de vue taxonomique que physiologique.

(1) Une de ces communautés (2004) est caractérisée par une faible biomasse et une densité cellulaire limitée suggérant un état initial relativement déficient, potentiellement attribuable à une exposition à un facteur de stress dans la rivière. Après six jours de récupération en absence de polluant, cette communauté est susceptible de reprendre une activité photosynthétique entraînant un bloom algal. Les effets du diuron sur une telle communauté ne sont perceptibles qu'après un délai d'une semaine et se résument à contraindre directement la reprise du développement des microorganismes autotrophes et à engendrer indirectement une forte inhibition de l'activité bactérienne hétérotrophe. La présence de diuron induit également une sélection au sein de cette communauté algale,

initialement composée de six genres principaux, en empêchant le maintien ou le développement d'espèces « plus sensibles » appartenant aux genres *Cyclotella*, *Asterionnella* et *Oocystis* et en favorisant le développement de celles appartenant aux genres, *Navicula, Nitzschia*, *Gomphonema* et *Scenedesmus*. La diversité bactérienne est également affectée par la présence du diuron. Quelques espèces bactériennes, dont certaines appartiennent au phylum des *Verrucomicrobia* et à la subdivision *γ-Proteobacteria*, semblent ainsi être favorisées par la présence du diuron.

(2) L'autre communauté autotrophe (2003) présente, dès la mise en place expérimentale, une biomasse élevée et un nombre important de cellules. D'après ces observations et celles obtenues lors de l'étude menée *in situ* dans le Jauron **(voir chapitre C.II.1.3.)**, il est fortement envisageable qu'elle soit, lors du prélèvement initial, en pleine phase de bloom printanier. Les organismes autotrophes se trouvent donc vraisemblablement dans un état physiologique satisfaisant. La croissance de la communauté algale, composée initialement de seulement trois genres principaux (*Navicula, Nitzschia* et Gomphonema), se poursuit au cours de l'expérience en présence ou non du diuron. L'herbicide ne présente donc aucun effet direct notable sur la productivité et la structure de la communauté autotrophe. Cela limite les effets indirects sur le compartiment hétérotrophe et seules les cellules bactériennes les plus actives semblent être affectées par la présence de diuron, sans entraîner de modification majeure au niveau de la diversité. La diminution des concentrations en diuron observée dès les premiers jours pourrait être due à l'activation de processus de biodégradation, suggérant ainsi la présence initiale d'espèces bactériennes « prédisposées » à intervenir dans ces mécanismes.

Ces résultats soulignent donc le rôle primordial des caractéristiques biologiques des communautés dans leur réponse à une exposition aux polluants. Plusieurs paramètres peuvent expliquer la résistance plus marquée de la communauté échantillonnée en 2003.

L'état physiologique initial de la communauté autotrophe conditionne fortement sa sensibilité aux polluants (DeLorenzo *et al.*, 2004). La communauté algale la plus résistante a vraisemblablement été prélevée en période de bloom durant laquelle son état physiologique est optimal (Madariaga, 2002) et où les organismes peuvent présenter des capacités individuelles de résistance élevée face à un stress telle qu'une exposition à un herbicide.

La structure initiale de la communauté influe également fortement sur sa réponse face à un polluant (Bérard *et al.*, 1999a ; Dorigo *et al.*, 2004). La communauté peu sensible au diuron est constituée, dès la mise en place expérimentale, de trois des genres qui semblent être parmi les plus résistants à cette molécule (*Navicula, Nitzschia*, *Gomphonema*). La méthode de prélèvement des organismes périphytiques, collectés sur des substrats artificiels en 2003 et sur

des substrats naturels en 2004, peut éventuellement expliquer en partie les différences observées au niveau de la composition taxonomique de la communauté algale. Dans la littérature, les points de vue concernant la représentativité des substrats artificiels par rapport aux substrats naturels divergent parfois (Lavoie *et al.*, 2004) mais plusieurs auteurs considèrent que les substrats en verre reflètent le mieux les conditions naturelles (voir pour revue Aloi, 1990 ; Danilov & Ekelund, 2001).

Dans la rivière, la composition taxonomique est conditionnée par un ensemble de paramètres biotiques et abiotiques (Guasch *et al.*, 1998). Cet « historique » des communautés dans le milieu naturel, notamment en terme d'exposition aux polluants, joue également un rôle déterminant dans leur niveau de sensibilité face à ces molécules. En 2004, Dorigo *et al.* ont ainsi démontré que la réponse de communautés algales lotiques, planctoniques et périphytiques, face à des expositions aiguës en atrazine et en isoproturon, reflétait les évènements de pollutions auxquels elles avaient été précédemment soumises dans le milieu naturel (notion de PICT). Ce phénomène a été vérifié avec le diuron sur des communautés périphytiques marines (Molander & Blanck,1992).

Tableau D-6 : Détection d'herbicides de la famille des phénylurées dans le Jauron au cours des six mois précédant les études expérimentales de 2003 **(A)** et 2004 **(B)**. (données Phyt'eauvergne)

A

Date	Molécule	Concentration (µg l^{-1})	Station
14/10/2002	Diuron	0,053	JAU2
14/10/2002	Diuron	0,055	JAU4
09/12/2002	Chlortoluron	0,033	JAU1
09/12/2002	Chlortoluron	0,029	JAU2
09/12/2002	Chlortoluron	0,039	JAU4
09/12/2002	Chlortoluron	0,051	JAU5
24/03/2003	Linuron	0,070	JAU4
24/03/2003	**Linuron**	**0,050**	**JAU1**

B

Date	Molécule	Concentration (µg l^{-1})	Station
17/11/2003	Chlortoluron	0,291	JAU3
17/11/2003	Linuron	0,075	JAU1
17/11/2003	Monolinuron	0,442	JAU3
10/05/2004	Linuron	0,064	JAU4

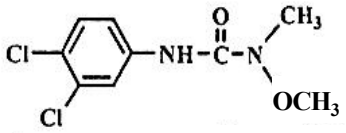
La réaction des communautés microbiennes en 2003 (résistance des organismes autotrophes, mise en place rapide de mécanismes de dégradation de la molécule) évoque une possible exposition au diuron ou à un xénobiotique aux propriétés chimiques proches, dans le milieu naturel, avant le début de l'expérience.

D'après les analyses effectuées dans le Jauron, les dernières traces de diuron ont été détectées environ cinq mois avant le prélèvement initial, aux stations JAU2 et JAU4 **(Tableau D-6A)**. Toutefois, la fréquence d'échantillonnage (1 mois) a pu masquer l'existence

d'évènements de pollution au diuron même si le transfert de cette molécule dans la rivière avant le début du printemps semble peu probable compte tenu des périodes de son utilisation.

En revanche, la présence de linuron a été détectée dans l'eau utilisée pour constituer les microcosmes **(Tableau D-6A)**. Cet herbicide appartient aussi à la famille des phénylurées et présente une formule chimique **(Fig.D-28)** et un mode d'action comparables au diuron (Tomlin, 1994). L'exposition des microorganismes à cette molécule dans le Jauron laisse supposer qu'ils aient pu développer des capacités de résistance aux phénylurées.

Figure D-28 : Structure du linuron.



Linuron : N'-(3,4-dichlorophényl)-N-methoxy-N-methylurea

Conclusion :

L'ensemble de nos résultats montre donc que le diuron peut présenter, à une concentration réaliste (10 µg l^{-1}), un potentiel toxique important sur les communautés microbiennes du Jauron. Toutefois la gravité de l'impact, très variable, est fonction des caractéristiques environnementales (biotiques et abiotiques) de la rivière avant et au moment de la contamination. Cela souligne qu'il est très difficile de généraliser les effets des pesticides et que les études écotoxicologiques doivent prendre en compte un grand nombre de paramètres pour appréhender correctement la réponse des communautés microbiennes face à un polluant, à l'échelle de l'écosystème.

D.III. Caractérisation des effets du glyphosate

D.III.1. Introduction

Même s'il ne fait pas partie de la liste des substances définies comme prioritaires par la Directive Européenne concernant les milieux aquatiques, le glyphosate est actuellement un des polluants majeurs des eaux de surface (IFEN, 2004 ; Skark *et al.*, 2004 ; Battaglin *et al.*, 2005 ; Kolpin *et al.*, 2006). Dans le Jauron, il est généralement détecté dès le printemps et jusqu'à la fin de l'automne de façon plus ou moins régulière **(voir chapitre C)**. Nous avons vu précédemment que la réponse des communautés microbiennes face aux herbicides peut

varier fortement selon leurs caractéristiques initiales. Pour appréhender les effets du glyphosate sur les communautés algales et bactériennes, nous avons donc mis en place trois expériences en microcosmes : deux effectuées à partir de communautés prélevées au printemps à un an d'intervalle afin de comparer leur réponse dans des conditions environnementales assez proches, et une troisième réalisée en période estivale pour apprécier l'importance des variations saisonnières, notamment au niveau des conditions climatiques et nutritives.

D.III.2. Conditions expérimentales

Pour chacune des trois études, les conditions expérimentales utilisées sont décrites dans le **Tableau D-7**.

Tableau D-7 : Conditions expérimentales utilisées pour apprécier les effets du glyphosate sur les communautés microbiennes prélevées en mars 2003, avril 2004 et août 2004.

	24 mars - 17 avril 2003	13 avril - 4 mai 2004	17 août - 7 septembre 2004
réplicats	2	3	3
température	8°C	9°C	14°C
photopériode	12h/12h (7h-19h)	12h/12h (7h-19h)	13h/11h (7h-20h)
échantillonnage	jours 0, 1, 3, 7, 10, 14, 24	jours 0, 1, 3, 6, 9, 14, 21	jours 0, 1, 3, 6, 10, 14, 21

D.III.3. Résultats

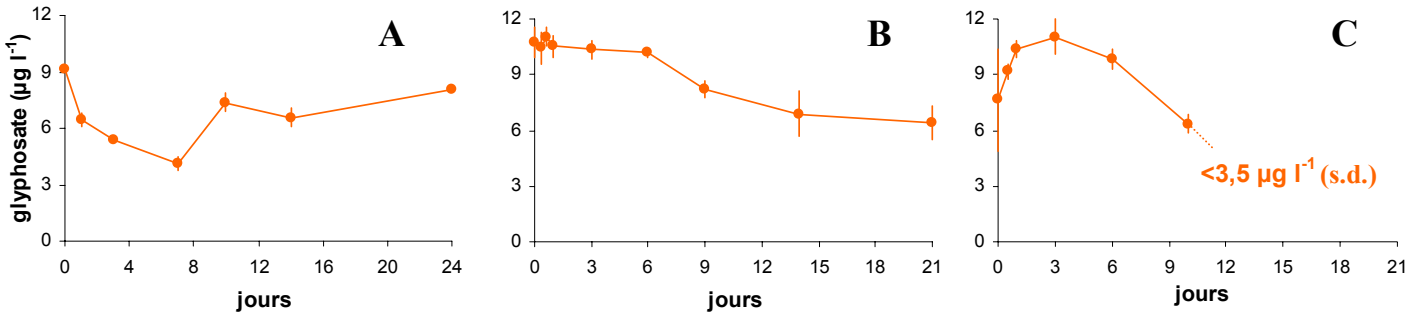
D.III.3.1. Evolution des concentrations en glyphosate

Les concentrations en glyphosate mesurées lors de la mise en place des expériences printanières sont proches de la valeur initiale théorique de 10 µg l^{-1} introduite dans les microcosmes **(Fig. D-29A et D-29B)**. Suivant l'année considérée, elles évoluent différemment au cours du suivi.

Ainsi, en 2003 **(Fig. D-29A)**, les concentrations diminuent de 65% pendant la première semaine. Une augmentation est ensuite enregistrée au cours des 14 derniers jours et les valeurs finales obtenues sont proches de 8 µg l^{-1}. A l'opposé, en 2004 **(Fig. D-29B)**, les concentrations restent stables et proches de la valeur initiale pendant six jours avant de diminuer jusqu'à la fin de l'expérience où elles sont comprises entre 5,4 et 7,0 µg l^{-1} dans les trois microcosmes contaminés (diminution d'environ 40%).

Lors de l'expérience estivale, la concentration initiale moyenne en glyphosate mesurée est de 7,63 µg l^{-1} **(Fig. D-29C)**. Les concentrations maximales sont enregistrées à J3, puis les teneurs en glyphosate diminuent rapidement. Elles sont alors proches de 6,3 µg l^{-1} à J10 et deviennent inférieures au seuil de détection (3,5 µg l^{-1}) jusqu'à la fin du suivi.

Figure D-29 : Evolution moyenne (et écarts-types) de la concentration en glyphosate (µg l^{-1}) lors des études menées en mars 2003 **(A)**, avril 2004 **(B)** et août 2004 **(C)**. (s.d. = seuil de détection)



La cinétique du glyphosate varie donc fortement entre les trois expériences. Les communautés printanières sont ainsi exposées à une contamination chronique en glyphosate globalement supérieure à 6 µg l^{-1}, pendant toute la durée du suivi.
A l'inverse, en été, les teneurs enregistrées lors de la dernière semaine sont très faibles et inférieures au seuil de détection.

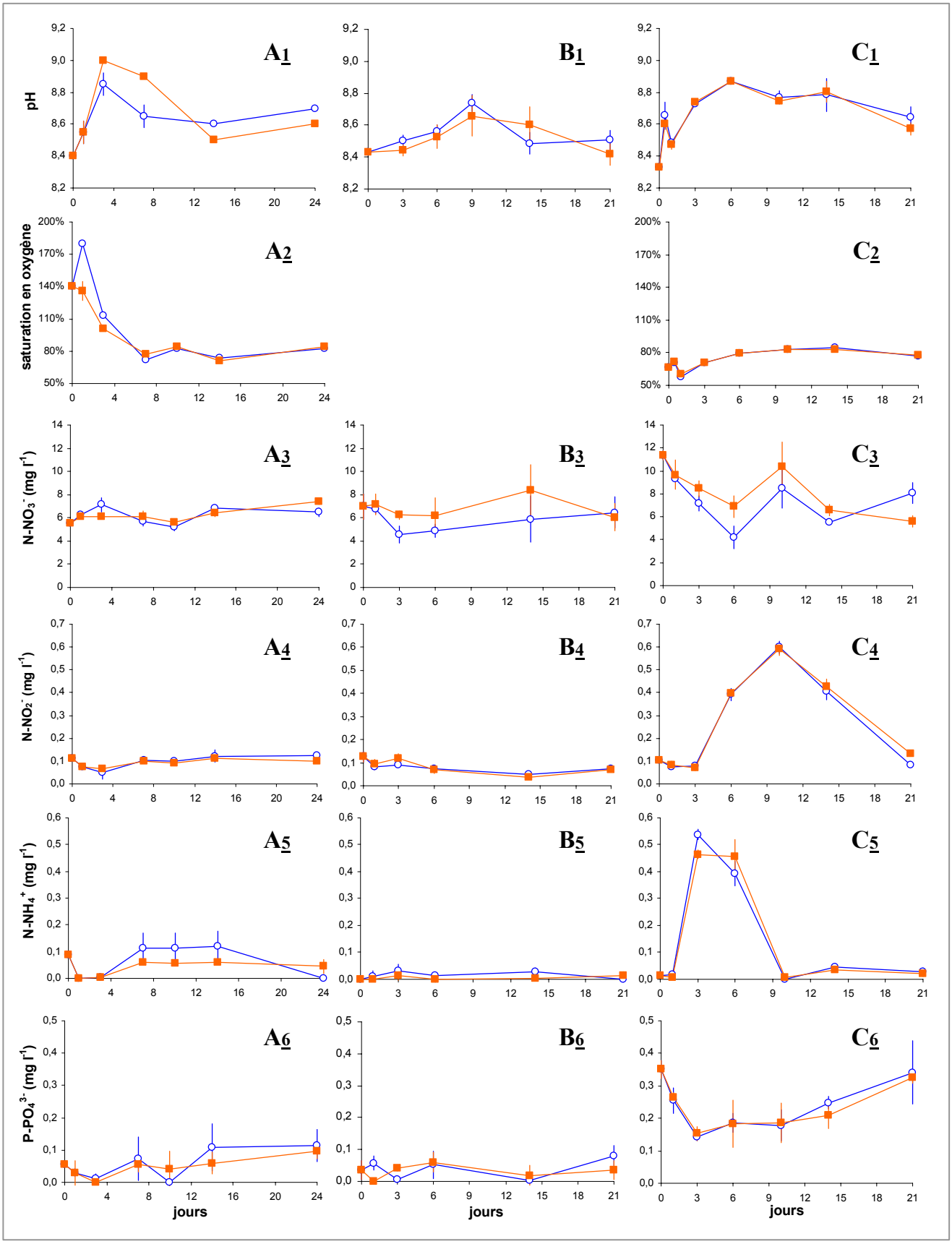
D.III.3.2. Evolution du contexte physico-chimique

L'évolution des différents paramètres physico-chimiques mesurés, illustrée sur la **Figure D-30**, ne fait apparaître aucune différence significative entre les microcosmes témoins et traités au cours des trois expériences.

Les valeurs initiales obtenues lors de l'échantillonnage printanier effectué au cours des deux années successives **(Fig. D-30A et D-30B)** reflètent un contexte environnemental similaire, caractérisé par un pH de l'ordre de 8,4 et des teneurs en azote inorganique et en orthophosphates respectivement proches de 6 mg N l^{-1} et 50 µg P l^{-1}. Ces teneurs restent relativement stables sur toute la durée des deux expériences et suggèrent une utilisation et/ou un relargage d'azote ou de phosphore limités (ou équilibrés).

Au cours de l'été **(Fig. D-30C)**, le milieu présente des caractéristiques beaucoup plus eutrophes, avec des concentrations en nitrates supérieures à 11 mg N l^{-1} et une disponibilité en orthophosphates proche de 350 µg P l^{-1}. L'évolution de ce dernier paramètre traduit une utilisation importante de phosphates pendant les trois premiers jours puis un relargage progressif jusqu'à la fin de l'expérience. Au niveau de l'azote, les nitrates, largement majoritaires, sont assimilés pendant les six premiers jours (diminution de l'ordre de 50%). L'azote est ensuite relargué sous forme d'ammonium (environ 0,5 mg N l^{-1} à J3 et J6) puis transformé en nitrites (0,6 mg N l^{-1} à J10) selon le cycle de l'azote classique. L'oxydation des nitrites engendre alors une hausse des teneurs en nitrates (proches de la valeur initiale à J10), qui sont de nouveau utilisés en fin d'expérience.

Figure D-30 : Evolution moyenne (et écarts-types) du pH **(1)**, du pourcentage de saturation en oxygène **(2)**, des concentrations (mg l^{-1}) en N- NO_3 **(3)**, N-NO_2 **(4)**, N-NH_4 **(5)** et P-PO_4 **(6)** lors des études menées en mars 2003 **(A)**, avril 2004 **(B)** et août 2004 **(C)** dans les microcosmes témoins (○) et contaminés (■).



Les paramètres physico-chimiques mesurés traduisent deux situations printanières similaires et un contexte beaucoup plus eutrophe en été. Quels que soient le scénario observé et le paramètre considéré, aucune différence significative n'est enregistrée entre les microcosmes témoins et contaminés. L'ajout du glyphosate, à raison de 10 µg l^{-1}, n'a donc pas de répercussion sur le contexte physico-chimique global.

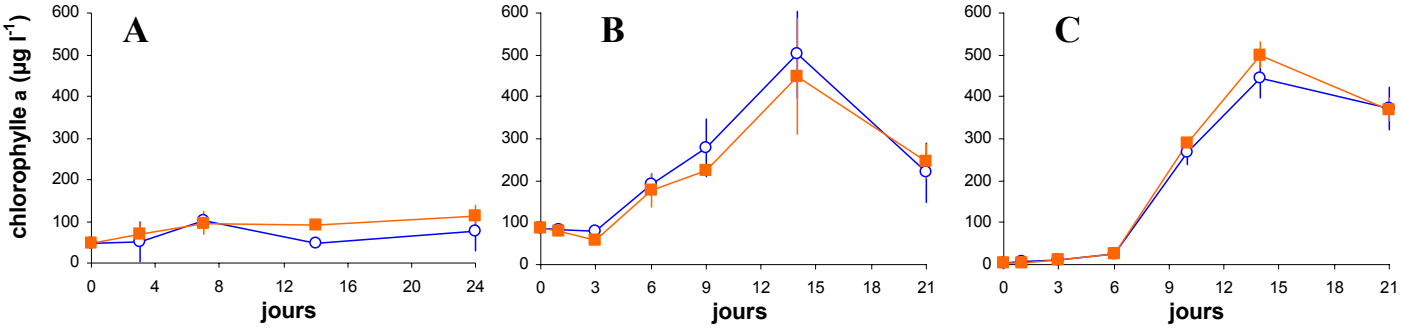
D.III.3.3. Evolution de la biomasse algale

L'évolution des biomasses algales met en évidence trois situations différentes en fonction des expériences **(Fig. D-31)**. Toutefois et quel que soit le cas considéré, les résultats ne font pas apparaître de différence majeure entre les microcosmes témoins et contaminés.

Dans les deux expériences printanières, les concentrations initiales en chlorophylle *a* sont élevées (environ 47 µg l^{-1} en 2003, **Fig. D-31A**) voire très élevées (87 µg l^{-1} en 2004, **Fig. D-31B**). Dans le premier cas, on observe une légère et régulière augmentation de la biomasse, au cours du suivi **(Fig. D-31A)**, alors qu'en 2004, une efflorescence importante est enregistrée à partir du troisième jour indépendamment de l'ajout du glyphosate. Les concentrations atteignent alors environ 400 µg l^{-1} à J14, et restent proches de 200 µg l^{-1} en fin d'expérience **(Fig. D-31B)**.

Au cours de l'expérience menée en été 2004, l'évolution est différente car les concentrations initiales en chlorophylle *a* sont très faibles, inférieures à 10 µg l^{-1} **(Fig. D-31C)**. Un bloom d'une amplitude comparable à celui décrit précédemment est également observé dans tous les microcosmes. Malgré une température plus élevée et une disponibilité nutritive plus importante, il n'apparaît toutefois qu'après un délai d'environ une semaine et les valeurs restent relativement stables au cours de la dernière semaine du suivi.

Figure D-31 : Evolution moyenne (et écarts-types) de la concentration en chlorophylle *a* (µg l^{-1}) lors des études menées en mars 2003 **(A)**, avril 2004 **(B)** et août 2004 **(C)** dans les microcosmes témoins (○) et contaminés (■).

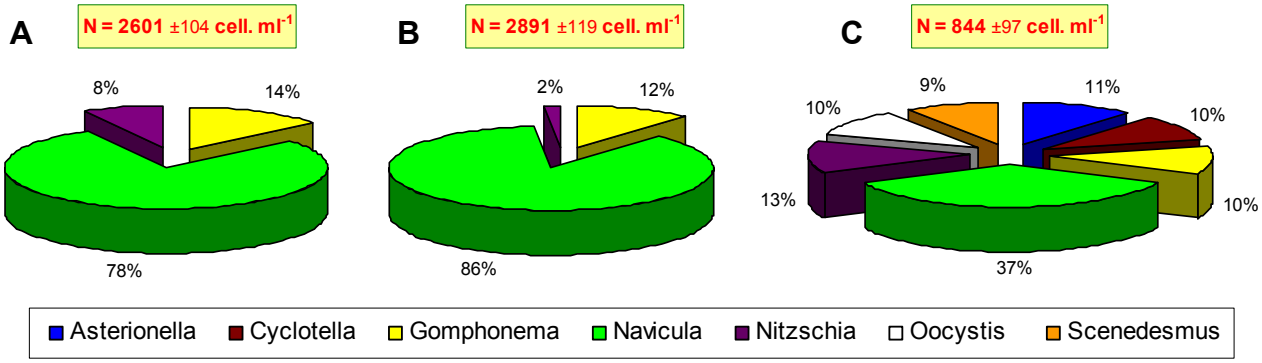


L'évolution des biomasses algales est très différente au cours des trois expériences. Cependant, dans tous les cas, le glyphosate (10 µg l^{-1}) n'a pas d'effet significatif sur l'évolution quantitative de la communauté autotrophe.

D.III.3.4. Structure initiale de la communauté algale

Pour tenter d'expliquer les différences observées au niveau de l'évolution des biomasses algales entre les trois expériences, nous avons comparé les densités et la structure des communautés algales lors de la mise en place des microcosmes **(Fig. D-32)**.

Figure D-32 : Densités algales initiales (cell. ml^{-1}) et structure de la communauté lors des études menées en mars 2003 **(A)**, avril 2004 **(B)** et août 2004 **(C)**.



Dans les deux expériences printanières **(Fig. D-32A et D-32B)**, les densités algales initiales sont très comparables et élevées, comprises entre 2500 et 3000 cell. ml^{-1}. Dans les deux cas, la communauté est composée uniquement de trois genres appartenant aux diatomées pennées (*Navicula*, *Nitzschia* et *Gomphonema*), avec une forte prédominance du genre *Navicula*.

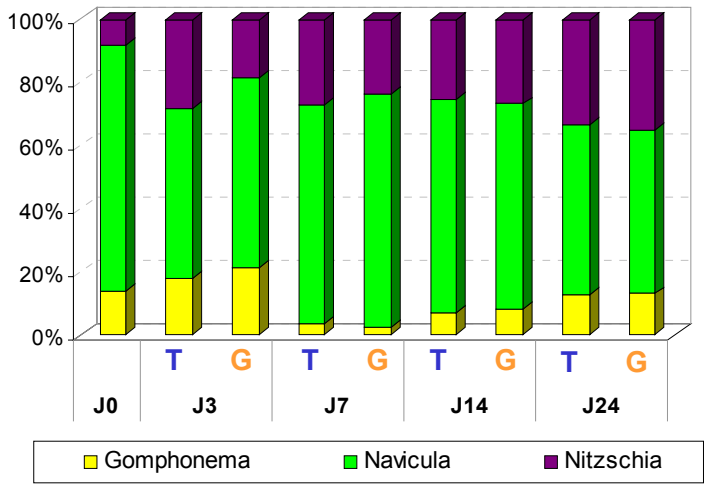
En été **(Fig. D-32C)**, la densité est proche de 850 cell. ml^{-1} et la communauté est composée de sept genres avec une prédominance marquée des diatomées pennées (71%).

Le dénombrement des cellules et l'analyse taxonomique des communautés algales, effectuée à l'échelle du genre, mettent en évidence deux situations initiales printanières similaires, caractérisées par une densité cellulaire importante (proche de 3000 cell. ml^{-1}) et une faible diversité (trois genres). Ces résultats ne peuvent donc pas expliquer les différences perçues au niveau de l'évolution de la biomasse lors des deux suivis.
La communauté algale estivale présente, quant à elle, une densité cellulaire trois fois plus faible et une diversité plus élevée puisque sept genres sont recensés.

D.III.3.5. Evolution de la structure des communautés algales

Au cours de l'expérience printanière menée en 2003, l'évolution de la communauté algale dans les microcosmes contaminés au glyphosate est quasi-identique à celle observée dans les témoins **(Fig. D-33)**. La composition de la communauté algale n'ayant pas été caractérisée en avril 2004, son évolution ne sera pas présentée ici.

Figure D-33 : Evolution moyenne de la structure de la communauté algale lors de l'étude menée en mars 2003 dans les microcosmes témoins **(T)** et contaminés au glyphosate **(G)**.



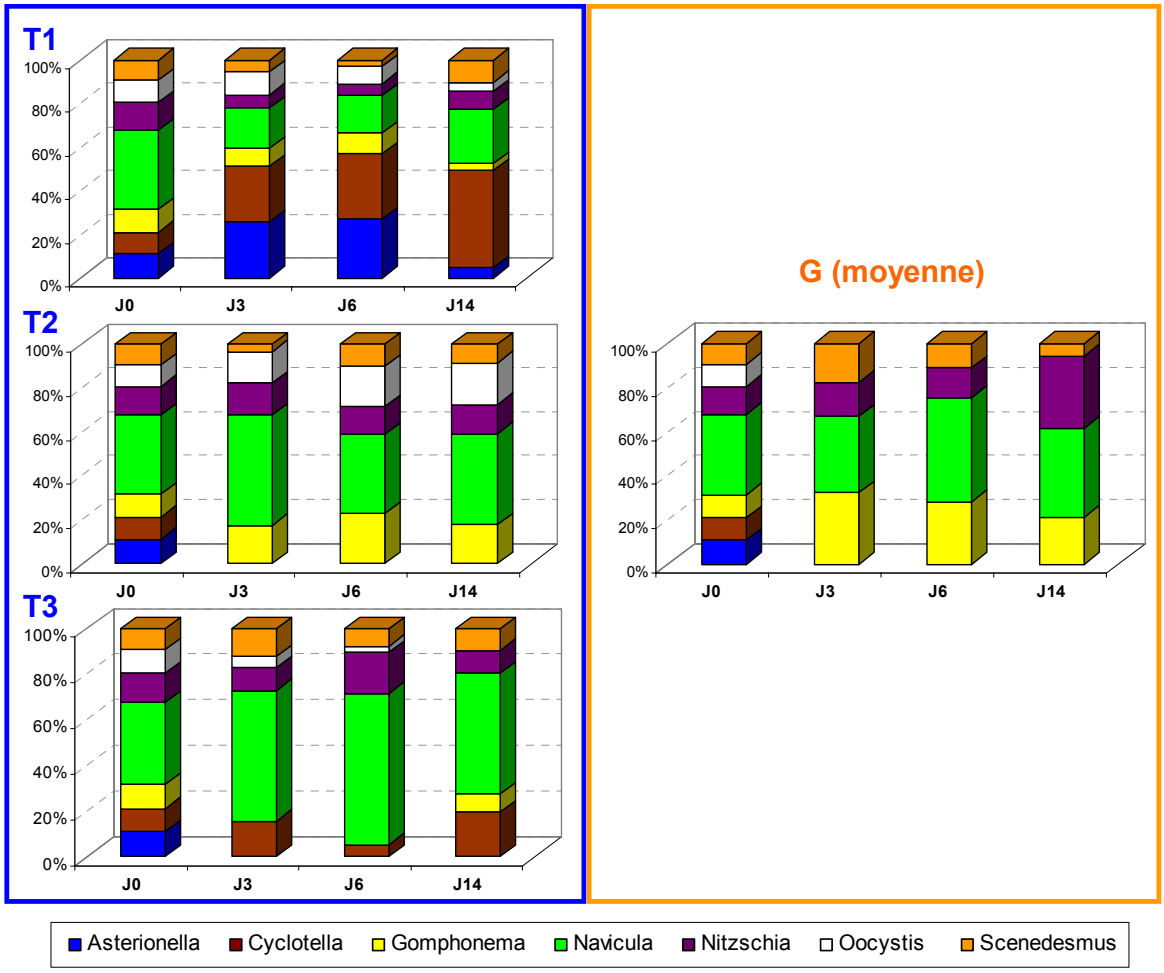
Dans l'expérience estivale, la structure de la communauté varie fortement entre les trois microcosmes non contaminés. Les évolutions sont donc détaillées pour chacun de ces microcosmes (T1, T2 et T3) sur la **Figure D-34**. Une différenciation nette de la composition taxonomique des communautés entre les trois microcosmes est observée trois jours après la mise en place expérimentale. La structure des communautés reste généralement conservée jusqu'à la fin du suivi. Ces fortes fluctuations inter-microcosmes, peu perceptibles au niveau de la chlorophylle *a* totale **(Fig. D-31C)**, peuvent être le résultat d'une forte compétition entre les différents groupes taxonomiques en absence de polluant, lors de la mise en place des microcosmes.

En revanche, trois jours après l'introduction du glyphosate, la structure de la communauté, représentée par les genres *Navicula*, *Nitzschia, Gomphonema* et *Scenedesmus*, reste relativement conservée sur l'ensemble du suivi sans différence significative entre les trois microcosmes contaminés. Dès le début de l'expérience, les espèces appartenant aux genres *Asterionella*, *Cyclotella* et *Oocystis* disparaissent. Ce dernier genre, qui se maintient dans tous les microcosmes témoins, semble être le plus affecté par la présence du glyphosate qui influe donc fortement sur le développement algal en entraînant une sélection des espèces les mieux adaptées à cette contrainte environnementale.

La présence de glyphosate n'engendre aucun effet perceptible sur la communauté algale printanière prélevée en 2003 ; les trois genres recensés (Navicula, Nitzschia et Gomphonema) évoluant de manière similaire dans les microcosmes témoins et contaminés.

En été, le polluant semble au contraire jouer un rôle important dans l'évolution structurelle de la communauté algale en empêchant notamment le maintien des espèces appartenant au genre Oocystis et en engendrant une forte sélection des espèces appartenant aux genres Navicula, Nitzschia, Gomphonema et Scenedesmus.

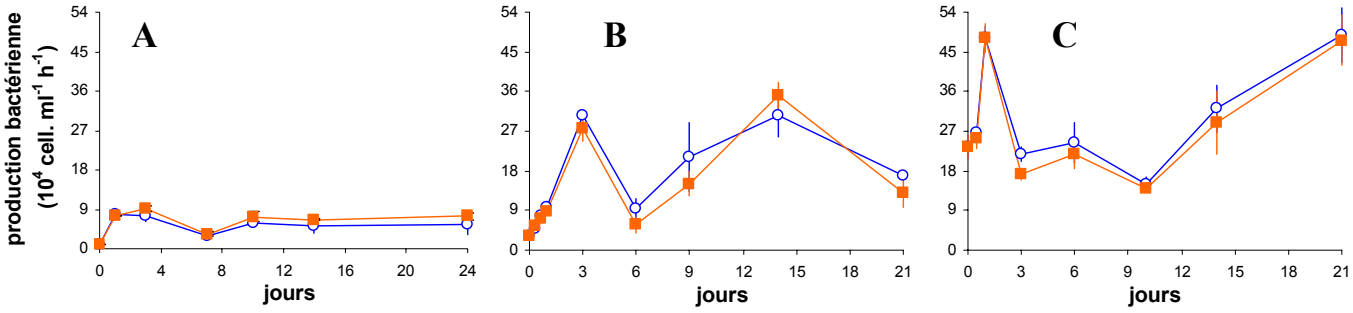
Figure D-34 : Evolution de la structure de la communauté algale lors de l'étude menée en août 2004 dans les trois microcosmes témoins **(T1, T2, T3)** et, en moyenne, dans les microcosmes contaminés au glyphosate **(G)**.



D.III.3.6. Evolution de la production bactérienne hétérotrophe

Comme pour les biomasses algales, l'évolution de la production hétérotrophe n'est pas similaire dans les trois contextes expérimentaux et ne met en évidence aucune différence significative entre les microcosmes témoins et contaminés **(Fig. D-35)**. Dans tous les cas, une stimulation de la production bactérienne, d'intensité et de durée variables, est enregistrée durant les premiers jours. Ce phénomène, qui est récurrent dans toutes nos études en microcosmes, est lié au confinement des ressources.

Figure D-35 : Evolution moyenne (et écarts-types) de la production bactérienne hétérotrophe (10^4 cell. ml^{-1} h^{-1}) lors des études menées en mars 2003 **(A)**, avril 2004 **(B)** et août 2004 **(C)**.



Les résultats mettent clairement en évidence la corrélation entre les deux compartiments microbiens, autotrophe et hétérotrophe. Dans l'expérience menée en 2003 **(Fig. D-35A)**, la production bactérienne reste, comme les concentrations en chlorophylle *a*, relativement modérée et constante sur l'ensemble du suivi.

Au cours des deux expériences menées en 2004 **(Fig. D-35B et D-35C)**, l'apparition du bloom algal engendre, après un délai d'environ trois jours, une augmentation de la production bactérienne. Au printemps, l'augmentation de la production bactérienne est stoppée à la fin du bloom algal (J14), alors qu'elle se prolonge jusqu'à la fin de l'expérience en été.

A l'exception de la stimulation bactérienne initiale, engendrée par le confinement des ressources, l'évolution de la production bactérienne hétérotrophe est corrélée à l'évolution de la biomasse algale et est indépendante de l'introduction du glyphosate.

D.III.3.7. Evolution de la diversité bactérienne

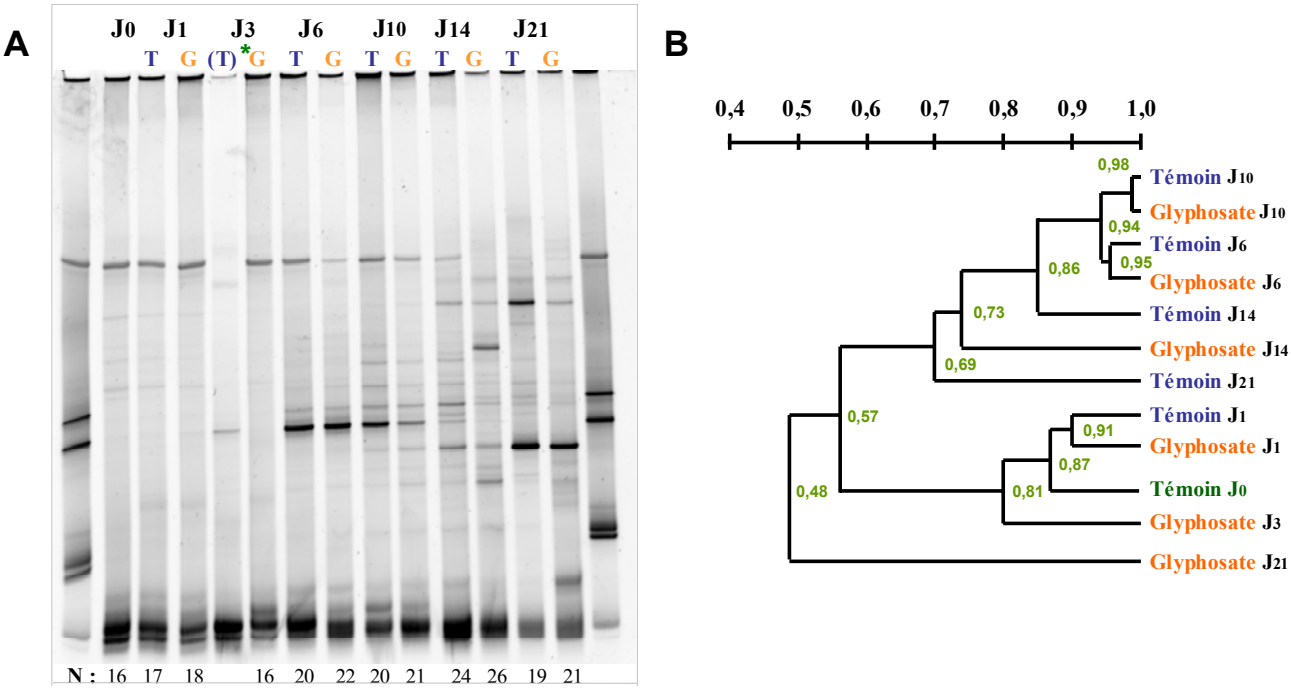
Pour appréhender les éventuels effets du glyphosate sur la communauté bactérienne sous un angle qualitatif, nous avons choisi d'analyser la diversité génétique directement par TTGE ; la méthode par hybridation *in situ* ne s'étant pas révélée suffisamment discriminante lors des premières expériences sur les effets du diuron.

L'analyse des profils de diversité obtenus lors des deux expériences menées au printemps ne révèle pas de différence notable entre les communautés des microcosmes témoins et contaminés au glyphosate.

Par opposition, l'évolution de la communauté estivale fait apparaître, en fin de suivi, des différences importantes entre les microcosmes témoins et contaminés **(Fig. D-36)**. Six jours après la mise en place expérimentale, un remaniement important de la diversité est observé au sein de la communauté bactérienne, à la fois dans les microcosmes témoins et traités. Pendant les dix premiers jours, la diversité bactérienne est sensiblement identique entre les microcosmes témoins et contaminés (similarité ≥ 91%).

Après le dixième jour qui marque le début d'une forte activité hétérotrophe **(Fig. D-35C)**, la diversité des communautés bactériennes dans les microcosmes contaminés évolue différemment de celle observée dans les microcosmes témoins (similarité <75% à J14). En fin d'expérience, ces différences de diversité sont encore plus accentuées, le pourcentage de similarité entre les profils observés dans les témoins et ceux observés dans les traités étant inférieurs à 50%.

Figure D-36 : (A) Evolution des profils obtenus par TTGE dans les microcosmes témoins (T) et contaminés (G) entre J0 et J21 en août 2004 ; **(B)** dendrogramme calculé par la méthode DICE-UPGMA à partir du profil TTGE d'après le critère présence/absence.
* Le profil incorrect, correspondant aux microcosmes témoins à 3 jours n'a pas été considéré dans l'analyse ; **N** = nombre de bandes détectées sur la piste correspondante



L'étude de la diversité bactérienne par TTGE ne révèle pas d'effet significatif du glyphosate sur les communautés printanières. En revanche, en été 2004, la composition de la communauté bactérienne est modifiée après dix jours d'exposition au glyphosate.

D.III.4. Discussion

D.III.4.1. Influence des variations saisonnières sur la cinétique du glyphosate

Plusieurs facteurs biotiques et abiotiques semblent conditionner la cinétique du glyphosate dans les microcosmes.

Au cours de l'expérience printemps 2003, la concentration en glyphosate est divisée de moitié pendant les six premiers jours d'expérience. Cette diminution ne peut vraisemblablement pas être expliquée uniquement par des processus de transformation (biotique et/ou abiotique). En revanche, l'hypothèse d'un piégeage-relargage du glyphosate, soutenue par une augmentation au cours de la deuxième semaine des concentrations, semble plus probable pour expliquer la cinétique de cette molécule au cours de l'expérience. Son pouvoir d'adsorption, spécialement sur la matière organique, a d'ailleurs été souligné par de nombreux auteurs (Carlisle & Trevors, 1988 ; Mallat & Barcelǒ, 1998).

Pour l'expérience menée au printemps 2004, les concentrations en glyphosate sont relativement constantes pendant la première semaine. La forte diminution des teneurs en polluant (de l'ordre de 40%) enregistrée lors des deux dernières semaines coïncide avec le fort développement des communautés microbiennes autotrophes et hétérotrophes. Deux hypothèses non exclusives peuvent donc être émises. (1) La sénescence des algues en situation de post-bloom peut engendrer une libération importante de matière organique dans le milieu, augmentant ainsi le taux d'adsorption de la molécule en fin d'expérience et/ou (2) la chute des teneurs en glyphosate peut être la résultante d'une dégradation bactérienne importante.

L'évolution du glyphosate lors de l'expérience menée en été 2004, semble conforter ces hypothèses. Après un fort processus de « piégeage-relargage » pendant les six premiers jours, les concentrations en glyphosate chutent de manière drastique, atteignant des concentrations inférieures à la limite de détection. Cette cinétique est plus en adéquation avec les données rencontrées dans la littérature, Giesy *et al.* (2000) ayant reporté un temps de demi-vie du glyphosate compris généralement entre 7 et 14 jours en milieu aquatique. La disparition du glyphosate coïncidant à nouveau avec le développement de la communauté bactérienne, il est possible que la biodégradation puisse jouer un rôle sur cette cinétique, au même titre que les processus d'adsorption. La température élevée peut favoriser la dégradation du glyphosate par les bactéries en fragilisant les liaisons moléculaires (Mallat & Barcelǒ, 1998) mais aussi en stimulant l'activité hétérotrophe. De plus, la présence de glyphosate (0,19 $\mu g\ l^{-1}$), détectée au niveau de la station d'échantillonnage un mois avant le début de l'expérience, peut avoir induit le développement d'espèces bactériennes dotées de capacités de dégradation de ce produit. Toutefois aucune trace d'AMPA, principal produit de dégradation du glyphosate, n'a pu être détectée.

D.III.4.2. La réponse des communautés microbiennes printanières

L'impact du glyphosate a été évalué sur des communautés printanières prélevées dans le Jauron à un an d'intervalle. Les analyses physico-chimiques réalisées ont mis en évidence un contexte abiotique initial de type mésotrophe (Dodds *et al.*, 1998), similaire pour les deux expériences. Bien que les communautés microbiennes ne présentent pas les mêmes évolutions au sein des microcosmes en 2003 et 2004, le glyphosate, à la concentration initiale de 10 µg l^{-1}, ne semble engendrer aucune modification ou altération d'ordres physiologique ou taxonomique.

L'absence de bloom algal en 2003 ne peut pas être expliquée par des caractéristiques très différentes entre les communautés. En effet, elles présentent initialement la même composition taxonomique avec trois genres principaux (*Navicula, Nitzschia* et *Gomphonema*), les mêmes niveaux élevés de biomasse et évoluent dans des contextes environnementaux caractérisés par des conditions thermiques et nutritives similaires. Dans le Jauron, elles étaient exposées lors de leur prélèvement initial à des concentrations similaires en herbicides, de l'ordre de 0,14 µg l^{-1} avec cependant une différence notable au niveau de la nature des molécules présentes : la prométryne (0,09 µg l^{-1}) et le linuron (0,05 µg l^{-1}) en 2003 ; l'AMPA (0,09 µg l^{-1}) et l'atrazine (0,03 µg l^{-1}) en 2004. Compte tenu des faibles niveaux de pollution détectés, il est peu probable que les molécules rencontrées en 2003 aient pu influer de manière forte sur la communauté algale. Il est donc difficile, au niveau des paramètres mesurés, d'expliquer les différences de développement observées entre les deux communautés algales. D'autres facteurs, tels qu'une pression de broutage exercée par du petit zooplancton ayant échappé à la filtration lors de l'échantillonnage effectué en 2003, pourraient expliquer l'absence de développement algal lors de cette expérience (Jochem *et al.*, 2004).

D.III.4.3. La réponse des communautés microbiennes estivales

Les conditions abiotiques initiales observées lors de l'expérience estivale, ainsi que les caractéristiques physiologiques et taxonomiques de la communauté algale sont différentes de celles décrites précédemment. Le milieu est ainsi caractérisé par une température environ deux fois plus élevée qu'au printemps et une disponibilité en composés inorganiques azotés et phosphorés qui traduisent un contexte eutrophe. Malgré ce contexte nutritif favorable, la communauté algale est caractérisée par une densité cellulaire trois fois plus faible qu'au printemps et surtout une biomasse inférieure à 10 µg chlo *a* l^{-1}. La communauté algale semble donc présenter un état physiologique déficient lors de la mise en place expérimentale qui pourrait être lié à la présence d'herbicides (oxadiazon : 0,16 µg l^{-1} ; atrazine : 0,03 µg l^{-1}) lors de l'échantillonnage.

Dans ce contexte, le glyphosate, introduit à la concentration de 10 µg l^{-1}, n'induit pas d'effet néfaste sur l'activité des communautés microbiennes puisqu'elles connaissent un fort développement dans tous les microcosmes (biomasse algale multipliée par 50 ; production bactérienne hétérotrophe multipliée par 3), après un temps d'adaptation d'environ une semaine.

Toutefois, si le glyphosate ne perturbe pas la croissance de la communauté algale, qui connaît un développement en adéquation avec les conditions environnementales du milieu, il semble avoir des répercussions importantes sur sa structure en entraînant notamment la disparition des espèces appartenant au genre *Oocystis*, présentes dans tous les microcosmes témoins. L'analyse taxonomique en fin d'expérience révèle la dominance de quatre genres tolérants voire adaptés à la présence du xénobiotique à savoir *Navicula*, *Nitzschia, Gomphonema* et *Scenedesmus*.

Si le glyphosate n'affecte pas la production bactérienne hétérotrophe, fortement liée à l'évolution de la biomasse algale, il engendre des modifications de la diversité bactérienne perceptibles après le dixième jour. Deux hypothèses majeures peuvent expliquer ces effets :

(1) la composition taxonomique algale, différente entre les microcosmes témoins et contaminés, peut engendrer des variations au niveau de la diversité bactérienne (Van Hannen *et al.*, 1999 ; Pinhassi *et al.*, 2004). Ces variations seraient alors induites par un effet indirect du glyphosate ;

(2) la disparition du glyphosate peut, comme nous le supposons, résulter en partie d'une dégradation bactérienne. Les espèces impliquées dans ce mécanisme peuvent donc être stimulées, se développer et devenir majoritaires dans les microcosmes contaminés. Les variations seraient alors induites par un effet direct du glyphosate.

Synthèse des résultats

Cette étude nous a permis d'appréhender les effets du glyphosate (10 µg l^{-1}) dans trois situations distinctes, tant au niveau des conditions abiotiques que microbiennes. Plusieurs conclusions peuvent être émises :

(1) Le glyphosate n'affecte significativement ni la biomasse algale, ni la production hétérotrophe, quel que soit le contexte nutritif (mésotrophe ou eutrophe), l'état physiologique initial de la communauté algale et la composition taxonomique de celle-ci.

(2) La présence de glyphosate peut conditionner la structure de la communauté algale en empêchant le développement d'organismes appartenant à des genres « sensibles » (*Oocystis)* au profit de genres plus « résistants » (*Navicula*, *Nitzschia, Gomphonema* et *Scenedesmus*).

(3) La présence de glyphosate peut engendrer des variations au niveau de la diversité bactérienne soit par effet indirect suite au remaniement de la communauté algale, soit par effet direct en stimulant le développement d'espèces impliquées dans les processus de dégradation de cet herbicide. La biodégradation pourrait être favorisée par une température élevée et la présence de bactéries préalablement « adaptées » après exposition à ce polluant dans le milieu naturel.

Conclusions générales
et
Perspectives

CONCLUSIONS GENERALES ET PERSPECTIVES

Dans le cadre de ce travail, nous avons évalué **l'impact de pesticides sur l'activité et la structure des communautés algales et bactériennes** d'une rivière soumise de façon récurrente à la présence de ces polluants, en **couplant une approche en milieu naturel à des études expérimentales** en microcosmes.

♦ L'APPROCHE EN MILIEU NATUREL

Le premier volet de cette thèse, mené à partir d'une approche *in situ* est, à notre connaissance, une des études pionnières en écotoxicologie reliant **un constat écologique**, réalisé d'après l'évaluation des niveaux d'activité et de diversité de deux communautés microbiennes, à **un diagnostic chimique complet** de l'état de pollution d'un cours d'eau par les pesticides. Le déficit très important concernant les impacts de pesticides à l'échelle des écosystèmes a d'ailleurs été récemment souligné par Schulz (2004) et par un rapport d'expertise INRA/CEMAGREF (Alix *et al.*, 2005).

Ce type d'approche s'avère difficile à mettre en place, de par les nombreuses contraintes qui lui sont associées. Le coût élevé des analyses chimiques et le délai d'obtention des résultats compte tenu du nombre d'échantillons à considérer, représentent des limites majeures. D'autre part, l'évolution des communautés biologiques, soumises à de nombreuses pressions anthropiques, est contrôlée par une multitude de facteurs biotiques et abiotiques, qui interfèrent entre eux, et qu'il est très difficile d'intégrer en totalité lors d'une approche écosystémique. Ces difficultés ont probablement réfréné de nombreux scientifiques qui ont privilégié alors les études expérimentales, moins longues, permettant de découpler les processus écologiques, de cibler les compartiments biologiques et donc de caractériser plus spécifiquement les effets des polluants sur ces derniers. Cependant, ces études en conditions simplifiées présentent d'indéniables biais, en raison de leur abstraction de l'environnement naturel.

Conscients des difficultés et des limites inhérentes aux approches en milieu naturel, nous avons choisi pour site d'étude la rivière Jauron pour laquelle la source de contamination potentielle est exclusivement liée à la présence de pesticides. Effectivement, les activités sur le bassin versant de cette rivière sont essentiellement agricoles et aucun site industriel ne peut représenter une autre source majeure de pollution du milieu aquatique (solvants ou métaux lourds, par exemple). En outre, le Jauron étant considéré comme bassin versant pilote par un réseau de surveillance régional de la pollution des eaux par les produits phytosanitaires

(Phyt'eauvergne), nous avons pu disposer des résultats d'analyses réalisées en sept points de la rivière depuis plusieurs années (plus de 280 molécules recherchées), mettant en évidence une forte contamination en herbicides. Ce recul nous a permis de définir précisément notre étude, notamment au niveau des communautés biologiques à considérer, de la fréquence d'échantillonnage à réaliser et du choix des stations de prélèvements représentatives de la pollution.

L'étude, réalisée au cours de deux années consécutives (2003 et 2004) dans ce milieu « naturel[#]», nous a permis d'apprécier les effets, sur l'activité et sur la diversité des communautés microbiennes, des activités anthropiques et notamment l'utilisation de pesticides, dans une zone agricole et une zone urbaine. Les résultats issus de notre travail ont permis de montrer que la sévérité de l'impact est fonction de la nature des pesticides mais aussi des différents apports allochtones en composés organiques et inorganiques.

Dans le Jauron, la période de pollution la plus significative s'étend du mois d'avril au mois d'octobre, coïncidant avec la principale période d'épandage des pesticides sur le bassin versant. Cependant, le niveau de contamination enregistré s'est avéré cinq à dix fois plus faible au cours de la deuxième année du suivi. Une trentaine de molécules ont été détectées sur l'ensemble des prélèvements effectués sur les deux années avec une large prédominance des substances à propriétés herbicides. L'intensité de la contamination comme la nature des polluants se sont avérées différentes entre les deux stations étudiées.

En zone agricole (JAU1), les communautés biologiques du Jauron ont été exposées à la présence quasi-exclusive d'herbicides (concentration maximale proche de 7,5 µg l^{-1}). La substance majoritairement détectée a été l'**AMPA** à des concentrations huit fois plus fortes que sa molécule mère, le glyphosate. De ce fait, ce métabolite a représenté à lui seul près des deux tiers de la pollution mesurée au cours des deux années.

En zone urbaine (JAU4), les communautés biologiques, bien qu'exposées majoritairement aux herbicides, ont été soumises également à des concentrations importantes en insecticides et en fongicides (concentrations maximales en pesticides supérieures à 17 µg l^{-1}). Des pics de contamination par l'**alachlore**, l'**aminotriazole**, l'**AMPA** et le **métolachlore** ont parfois été détectés (teneurs supérieures à 5 µg l^{-1}).

[#] *peut-on encore véritablement parler de « milieu naturel » au regard de la forte influence des activités anthropiques sur le fonctionnement de cet écosystème?* ***(remarque personnelle de l'auteur)***

De par la prédominance des herbicides dans le Jauron, les communautés algales ont donc été exposées à la toxicité des polluants. **C'est au printemps, qui coïncide toujours avec la première période de pollution, que nous avons observé les effets les plus marqués sur la communauté autotrophe.** La présence des herbicides affecte, immédiatement ou après un léger délai, l'efflorescence algale printanière, concernant aussi bien la communauté libre que la communauté fixée.

En zone agricole, l'évolution de la biomasse phytoplanctonique au cours du reste de l'année est ensuite fortement conditionnée par le niveau de pollution en herbicides. Compte tenu du caractère sessile des algues, la biomasse périphytique est quant à elle plus sévèrement affectée suite à une exposition prolongée et répétée des cellules aux polluants. En zone urbaine, l'impact des herbicides sur les communautés algales est atténué par l'effet antagoniste des insecticides et par l'effet stimulant lié aux apports allochtones en nutriments, *via* les rejets de la station d'épuration.

Toutefois, quelles que soient la nature des polluants, l'intensité de la contamination et la période de pollution, **quatre genres phytoplanctoniques sont systématiquement identifiés au niveau des deux stations étudiées.** Trois appartiennent au groupe des diatomées pennées (***Navicula*, *Nitzschia*** et ***Gomphonema***) et un au groupe des chlorophycées (***Scenedesmus***). La présence prédominante et récurrente dans la rivière Jauron de ces organismes montre leur **tolérance aux pesticides**.

Les effets indirects des pesticides sur le compartiment bactérien sont plus difficilement perceptibles dans le Jauron. Les chutes de biomasses algales, qui sont consécutives aux pics de pollution et qui entraînent vraisemblablement un relargage conséquent de matière organique dans le milieu, ne sont généralement pas associées à une stimulation de la production bactérienne hétérotrophe. Le faible niveau d'interaction entre les communautés microbiennes autotrophes et hétérotrophes résulte probablement d'un contexte nutritif (organique et inorganique) généralement non limitant pour ces microorganismes (Madigou, 2005). Ce phénomène est encore plus marqué en zone urbaine où l'évolution des communautés bactériennes est influencée majoritairement par la nature et l'intensité des rejets d'eau usée.

L'analyse de la communauté bactérienne, à une échelle taxonomique assez large (méthode FISH) ou à un niveau de résolution plus fin (méthode TTGE), a toutefois permis de visualiser de **forts remaniements de diversité lors des principales périodes de pollution**. Cependant, même si ces variations sont certainement conditionnées en partie par la présence de pesticides, il est très difficile de caractériser et de quantifier l'influence exacte de ces polluants sur l'évolution de la communauté.

♦ LES ETUDES EXPERIMENTALES EN MICROCOSMES

Nous avons choisi d'effectuer, en parallèle à l'approche *in situ*, des **approches expérimentales en microcosmes** afin de reproduire dans des conditions contrôlées, des situations de contamination réalistes par des herbicides (10 µg l^{-1}). Ces expériences, menées à partir de **communautés naturelles prélevées dans le Jauron** ont permis d'analyser les interactions entre les polluants et les communautés biologiques avec plus de précision, sur un pas de temps plus restreint, dans un contexte simplifié où l'influence des multiples facteurs environnementaux se trouve minimisée. Compte tenu des résultats des analyses chimiques effectuées dans le Jauron avant le début du travail de thèse, nous avons sélectionné trois molécules fréquemment rencontrées dans le Jauron susceptibles d'être bien représentées dans le panel de polluants détectés au cours des deux années d'études : le **diuron**, le **glyphosate** et l'alachlore. Pour les raisons évoquées précédemment, les résultats concernant les effets de l'alachlore n'ont pas été présentés dans le cadre de ce mémoire.

Comme dans le milieu naturel, ce sont les microorganismes autotrophes qui sont les plus sensibles aux herbicides choisis. Pour un même polluant, nous avons enregistré des variations importantes au niveau de l'intensité et du délai de la réponse au cours des différentes expériences. Nos résultats ont ainsi montré que **le niveau de sensibilité d'une communauté algale naturelle est conditionné** par, (1) **son stade de développement** (« pré » ou « post » bloom…), (2) **son état physiologique** et (3) **sa composition taxonomique**. L'importance de ces différents paramètres liés au passé des communautés dans la rivière, notamment en terme d'exposition aux polluants, a déjà été suggérée dans la littérature (Bérard *et al.*, 1999a ; DeLorenzo *et al.*, 2004 ; Dorigo *et al.*, 2004).

Sur des communautés printanières qui présentent une forte biomasse et sont composées principalement des genres *Navicula*, *Nitzschia* et *Gomphonema*, le diuron et le glyphoste n'entraînent aucun effet perceptible.

Sur des communautés plus diversifiées, qui présentent de faibles biomasses au regard du contexte nutritif et thermique, suggérant un état physiologique déficient, **le diuron se révèle être plus toxique que le glyphosate**. A la concentration de 10 µg l^{-1}, le diuron, sur 21 jours d'exposition, contraint ainsi le développement algal et maintient la biomasse et la densité cellulaire à leurs faibles niveaux initiaux. Cet herbicide réduit la diversité taxonomique puisque seulement quatre genres, *Navicula*, *Nitzschia*, *Gomphonema* et *Scenedesmus*, persistent en présence du polluant alors que les espèces des genres *Asterionella*, *Oocystis* et surtout *Cyclotella* semblent particulièrement sensibles au diuron.

Introduit à la même concentration (10 µg l^{-1}), le glyphosate n'affecte pas la croissance d'une communauté algale présentant des caractéristiques physiologiques et taxonomiques comparables. En revanche, il agit de manière similaire au diuron, en réduisant la diversité taxonomique aux seuls genres cités précédemment et en empêchant le développement et/ou le maintien d'espèces plus sensibles, en particulier celles appartenant au genre *Oocystis*.

Nos résultats issus de l'approche expérimentale en microcosmes ont permis de confirmer la forte résistance aux herbicides des genres algaux *Navicula*, *Nitzschia*, *Gomphonema* et *Scenedesmus*, soulignée lors de l'approche en milieu naturel. L'absence d'impact du glyphosate, à la concentration de 10 µg l^{-1}, sur la biomasse algale semble indiquer que les effets perçus lorsqu'il se trouve associé à l'AMPA en milieu naturel sont majoritairement dus à ce produit de dégradation. Dans la littérature, peu de données concernent les effets de l'AMPA sur les microorganismes autotrophes mais quelques auteurs décrivent ce métabolite comme moins toxique que sa molécule mère (Carlisle & Trevors, 1998 ; Giesy *et al.*, 2000).

Les interactions algues-bactéries sont beaucoup plus perceptibles dans les dispositifs expérimentaux où les microorganismes hétérotrophes ne peuvent bénéficier d'apports organiques allochtones et sont fortement tributaires de la charge de matière organique initiale puis de celle libérée par le compartiment algal.

En maintenant la communauté algale à son faible niveau initial, le diuron limite également le développement bactérien et ne modifie que très faiblement la diversité génétique de cette communauté. Quelques espèces bactériennes, appartenant aux *γ-Proteobacteria*, aux *Verrucomicrobia* et aux *Gemmatimonadetes*, semblent toutefois être favorisées par le maintien de conditions stables et la présence de diuron.

Dans le Jauron, la contamination par le diuron (à raison de 10 µg l^{-1}), de communautés microbiennes préalablement affaiblies (soit par des événements antérieurs de pollution, des carences nutritives, ou encore une forte pression de broûtage) **pourrait donc avoir de fortes répercussions sur l'écosystème en retardant voire en empêchant la « récupération » des organismes autotrophes** et la reprise d'une production primaire et secondaire, différant alors le retour à un état d'équilibre.

Le glyphosate n'ayant pas (ou peu) d'effet sur la biomasse algale, la production hétérotrophe n'est pas influencée indirectement par la présence du polluant. En revanche, cet herbicide peut engendrer des variations au niveau de la diversité bactérienne soit par effet indirect, suite à la simplification de la composition de la communauté algale, soit par effet

direct en stimulant le développement d'espèces impliquées dans les processus de dégradation de cet herbicide.

Dans le cas du glyphosate, les effets sur les communautés microbiennes, moins démonstratifs qu'avec le phénylurée, ne sont perçus qu'au niveau qualitatif, à l'aide d'outils offrant une fine résolution.

♦ LIMITES DES APPROCHES UTILISEES

Une des principales difficultés des études écotoxicologiques *in situ* réside dans l'opportunité de pouvoir disposer d'un site géographique pouvant être considéré comme référence. La réalisation de notre étude a été rendue possible du fait de la présence d'une station très peu exposée à la présence de pesticides, ce qui nous a permis, en partie, de définir pour les communautés étudiées, une évolution saisonnière « modèle », peu influencée par les polluants. La difficulté majeure à laquelle nous avons été confrontés concerne les caractéristiques physico-chimiques, distinctes entre les trois stations, malgré leur proximité géographique et qui ont complexifié l'interprétation des résultats et la discrimination des effets des polluants. Les fortes variations des conditions environnementales sur des secteurs géographiques limités, témoignent d'une forte influence anthropique (Madigou, 2005).

Une des limites, non spécifique à l'écotoxicologie et qui touche plus généralement le domaine de l'écologie microbienne, concerne le pas de temps d'échantillonnage. Afin de percevoir les grandes tendances au niveau de la dynamique des communautés microbiennes et de leur réponse à la présence de pesticides, nous avons choisi de réaliser un suivi étendu à deux années consécutives. Compte tenu de cette durée et, par voie de conséquence, du nombre d'échantillons à analyser, et également du coût des analyses chimiques, un pas de temps d'échantillonnage mensuel nous a semblé être pertinent pour asseoir une base solide dans ce type d'étude.

Il s'avère donc que la conception d'études *in situ* requiert une connaissance assez fine du milieu étudié, en particulier des activités anthropiques sur le bassin versant, et un historique précis du diagnostic chimique des eaux. Ces connaissances sont en effet primordiales pour définir au mieux les stations et les périodes d'échantillonnages. Il semble donc indispensable de développer des collaborations pluridisciplinaires en partenariat avec les différents réseaux de surveillance pour mettre en place et multiplier des études communes, pouvant répondre à la fois à une problématique chimique (causes) et biologique (effets).

Quoi qu'il en soit, les études expérimentales restent nécessaires pour comprendre les mécanismes de toxicité directe et/ou indirecte. Le développement de dispositifs

expérimentaux « réalistes », visant à réduire au mieux les biais inhérents à l'utilisation de microcosmes (« bottle effect », Pernthaler & Amann, 2005) représente ainsi une alternative intéressante aux approches écosystémiques. Dans le cadre des milieux lotiques, l'emploi de rivières artificielles, parallèles au cours d'eau étudié et alimentées directement par celui-ci, semble une solution bien adaptée (Madigou, 2005). En écotoxicologie, ces dispositifs soulèvent toutefois un problème majeur qui concerne le devenir du polluant « injecté » en continu dans le dispositif.

♦ PERSPECTIVES

Les principales perspectives qui découlent de ce travail de recherche s'inscrivent dans une double démarche : à court terme, exploiter les données collectées lors des expériences et qui n'ont pas pu être analysées, eu égard aux contraintes de temps ; à plus long terme, améliorer les outils utilisés dans les deux types d'approches privilégiés.

Parmi les perspectives à court terme, l'analyse des résultats obtenus lors des expériences menées avec l'alachlore peut s'avérer intéressante du fait de la présence de cette molécule dans le Jauron en avril 2003 à une concentration (9,40 $\mu g\ l^{-1}$) proche de celle utilisée dans nos dispositifs expérimentaux. Dans ce cas précis, la comparaison de la diversité génétique bactérienne observée *in situ* et expérimentalement dans les microcosmes en présence de l'alachlore, pourrait s'avérer une première indication concernant le développement d'espèces particulièrement adaptées à cette molécule.

Il serait intéressant d'identifier les espèces devenues majoritaires en présence de glyphosate lors de l'expérience menée en été 2004 **(voir chapitre D.III.3.7)** et qui pourraient être impliquées dans la dégradation de ce polluant. L'élaboration de sondes oligonucléotidiques ou d'amorces PCR ciblant spécifiquement ces organismes permettrait alors d'apprécier *in situ*, à l'aide des méthodes FISH ou de PCR quantitative, l'influence du glyphosate, en fonction de sa concentration dans le milieu, sur le développement de ces organismes.

Cette démarche a dores et déjà été mise en place à partir de deux souches bactériennes isolées à partir de communautés bactériennes du Jauron et qui présentent un fort potentiel de dégradation du diuron (Batisson *et al.*, soumis). Nous allons vérifier leur présence lors des deux expériences en microcosmes que nous avons menées avec le diuron pour caractériser leur cinétique en présence de ce polluant (et éventuellement conforter l'hypothèse de biodégradation émise en 2003). La spécificité des amorces dessinées à partir des séquences

obtenues est actuellement en cours de tests. L'identification d'un gène de fonction à partir de ces souches pourrait s'avérer spécialement intéressante dans le but de développer des bioindicateurs de la pollution au diuron.

Perspectives à plus long terme :

Un effort doit être fait pour **multiplier les approches *in situ*** afin d'appréhender avec plus de justesse les dysfonctionnements biologiques induits en milieu lotique par la présence des pesticides. Dans ce type de démarche, le choix des compartiments biologiques étudiés s'avère primordial. Nous avons montré que la prédominance des herbicides justifie pleinement le suivi des communautés algales et bactériennes, de par les effets directs et indirects. Il serait néanmoins intéressant d'étendre ce travail au maillon trophique supérieur (zooplancton et macroinvertébrés benthiques) pour intégrer les régulations de types « top-down » sur ces deux compartiments et appréhender les effets indirects découlant de la présence ponctuelle d'insecticides.

D'un point de vue analytique, le dosage de la chlorophylle *a* s'avère être un outil plus discriminant que le dénombrement des cellules pour visualiser les effets des polluants sur l'évolution quantitative des communautés. Le niveau de résolution utilisé pour l'identification taxonomique a permis de mettre en évidence l'existence de genres particulièrement résistants ou au contraire plus sensibles aux polluants étudiés. Il serait intéressant d'identifier plus précisément les espèces correspondantes. Au regard de ces deux points, l'idéal serait donc de coupler une identification microscopique, effectuée au niveau de l'espèce, à des estimations de biovolume pour pouvoir apprécier la biomasse réelle des communautés. Cependant, ce travail est long, fastidieux et nécessite des connaissances importantes en terme de détermination taxonomique. Une alternative intéressante pourrait être une analyse taxonomique de la communauté par HPLC à partir de la signature pigmentaire des organismes, technique développée ces dernières années au sein du Laboratoire de Biologie des Protistes (LBP) (Vera, 2005), couplée à une analyse moléculaire par TTGE ou clonage-séquençage (Dorigo, 2002), afin d'étudier à la fois l'évolution quantitative et qualitative des communautés algales.

Au niveau du compartiment bactérien, nous avons constaté qu'il est difficile, dans le cadre d'études en milieu naturel où de multiples facteurs environnementaux interagissent, d'identifier précisément les causes aux très nombreuses variations de diversité observées avec un outil fin tel que la TTGE. Les méthodes quantitatives (estimation de la production hétérotrophe) et semi-quantitatives (analyse de la structure de la communauté par FISH) semblent donc, dans un premier temps, être plus informatives des changements taxonomiques

et/ou fonctionnels et/ou physiologiques occasionnés par les pesticides en milieu naturel. L'utilisation de la cytométrie en flux, actuellement en cours de développement au LBP, représente une perspective intéressante. Elle permettra ainsi d'élargir l'analyse structurale de la communauté à d'autres groupes taxonomiques (selon différentes échelles de résolution allant du phylum à l'espèce), notamment ceux ayant particulièrement attiré notre attention lors des études expérimentales (phylum des *Verrucomicrobia*, famille des *Pseudomonadaceae*…). Elle offrira également la possibilité de cibler des groupes fonctionnels connus ou d'utiliser divers marqueurs d'activité pas toujours exploitables par microscopie en épifluorescence avec des bactéries de petites tailles.

Compte tenu de l'importance des effets indirects sur les microorganismes hétérotrophes, il serait également important d'appréhender plus précisément les interactions « algues-bactéries » *via* la matière organique en caractérisant précisément la quantité et la nature du carbone organique dissous. Cette caractérisation pourrait nous permettre de cibler des fonctions bactériennes associées aux processus de décomposition qu'il serait pertinent de considérer.

Les approches expérimentales se révèlent indispensables pour comprendre les mécanismes de toxicité.

D'après nos résultats, il paraît primordial d'étudier expérimentalement les effets de l'AMPA afin d'évaluer le risque écotoxicologique engendré par la présence massive, dans les écosystèmes aquatiques, de ce produit de dégradation, qui n'apparaît pas dans la liste des substances définies comme prioritaires par la Directive Cadre Européenne.

La complexité des profils de pollution en milieu naturel, notamment la présence simultanée de plusieurs types de pesticides, rend difficile l'interprétation des résultats. Des efforts doivent donc être faits pour multiplier les approches à partir de combinaisons de polluants afin d'apprécier les phénomènes d'additivité, de synergie ou d'antagonisme. L'utilisation de formulations commerciales pourrait également s'avérer utile pour apprécier avec plus de pertinence le risque réel de l'utilisation de ces produits chimiques.

Le développement continuel de nouvelles substances chimiques doit inciter la communauté scientifique à rester perpétuellement en éveil afin d'être en mesure d'alerter rapidement les pouvoirs publics en cas de risques écotoxicologiques majeurs.

Nous avons vu que l'état physiologique initial des communautés algales conditionne fortement leur réponse face à un polluant. Il s'avère donc nécessaire d'évaluer celui-ci à partir notamment du dosage des phaéopigments (par HPLC) et de l'ATP. Une caractérisation plus

fine de la diversité taxonomique serait également appréciable. Le niveau de sensibilité des organismes que nous avons identifiés comme « résistants » ou « sensibles » pourrait être testé à partir de cellules isolées de communautés naturelles du Jauron.

Au niveau du compartiment bactérien, l'utilisation d'outils moléculaires fins tels que la TTGE se révèle pertinente dans les études expérimentales du fait de conditions plus contrôlées qui favorisent une interprétation plus aisée des profils de diversité. Nous avons constaté en microcosmes que les effets des herbicides sur les microorganismes hétérotrophes découlent majoritairement d'effets indirects. Cependant, nous avons émis l'hypothèse d'une inhibition directe du diuron sur la fraction bactérienne la plus active. A partir de souches isolées du Jauron, il pourrait être informatif de tester la toxicité de cette molécule à l'aide de différents marqueurs d'activités (CTC, marqueurs d'activités enzymatiques, marqueurs d'intégrité membranaire…). Les effets directs pourraient également être évalués à partir de microcosmes dépourvus de cellules algales.

Les hypothèses émises en terme de biodégradation, spécialement avec le glyphosate, pourraient également être testées suite à l'isolement et la mise en culture de souches « résistantes » en présence de cette molécule. L'utilisation de pesticides marqués par des isotopes stables (méthode SIP) permettrait également de suivre le devenir des molécules et d'identifier les bactéries capables de les métaboliser. Cependant, si cette méthode semble très prometteuse, il est actuellement très difficile, en raison de son coût, de l'étendre au suivi des molécules complexes comme les pesticides.

Références bibliographiques

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

ALIX A., BARRIUSO E., BEDOS C., BONICELLI B., CAQUET T., DUBUS I., GASCUEL C., GRIL J.J. & VOLTZ M., 2005. Devenir et transfert des pesticides dans l'environnement et impacts biologiques, *In :* Aubertot J.N., Barbier J.M., Carpentier A., Gril J.J., Guichard L., Lucas P., Savary S., Savini I. & Voltz M. (Eds). Pesticides, agriculture et environnement. Réduire l'utilisation des pesticides et limiter leurs impacts environnementaux. *Rapport d'Expertise scientifique collective, INRA et CEMAGREF* (France).

ALOI J.E., 1990. A critical review of recent freshwater periphyton field methods. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.* **47** : 656-670.

ALTSCHUL S.F., GISH W., MILLER M., MYERS E.W. & LIPMAN D.J., 1990. Basic local alignment search tool. *J. Mol. Biol.* **215** : 403-410.

AMANN R., KRUMHOLZ L. & STAHL D.A., 1990. Fluorescent-oligonucleotide probing of whole cells for determinative, phylogenetic, and environmental studies in microbiology. *J. Bacteriol.* **172** : 762-770.

AMANN R., FUCHS B.M. & BEHRENS S., 2001. The identification of microorganisms by fluorescence in situ hybridization. *Curr. Opin. Biotech.* **12** : 231-236.

APHA (American Public Health Association), 1992. Standards methods for the examination of water and wastewater, 19th editionµ. APHA. Washington D.C., USA, 1193 pp.

ARAYA R., TANI K., TAKAGI T., YAMAGUCHI N. & NASU M., 2003. Bacterial activity and community composition in stream water and biofilm from an urban river determined by fluorescent in situ hybridization and DGGE analysis. *FEMS Microbiol. Ecol.* **43** : 111-119.

ARRHENIUS A., GRONVALL F., SCHOLZE M., BACKHAUS T. & BLANCK H., 2004. Predictability of the mixture toxicity of 12 similarly acting congeneric inibitors of photosystem II in marine periphyton and epipsammon communities. *Aquat. Toxicol.* **68** : 351-367.

BACKHAUS T., FAUST M., SCHOLZE M., GRAMATICA P., VIGHI M. & GRIMME L.H., 2004. Joint algal toxicity of phenylurea herbicides is equally predictable by concentration addition and independent action. *Environ. Toxicol. Chem.* **23** : 258-264.

BAINES, S.B. & PACE, M.L., 1991. The production of dissolved organic matter by phytoplankton and its importance to bacteria: Patterns across marine and freshwater systems. *Limnol. Oceanogr.* **36** : 1078-1090.

BAKER J.C., SMITH J.J. & COWAN D.A., 2003. Review and re-analysis of domain-specific 16S primers. *J. Microb. Methods.* **55** : 541-555.

BALBI D.M., 2000. Suspended chlorophyll in the River Nene, a small nutrient-rich river in eastern England: long-term and spatial trends. *Sci. Total. Environ.* **251/252** : 401-421.

BARER M.R. & HARWOOD C.R., 1999. Bacterial viability and culturability. *Adv. Microb. Physiol.* **41** : 93-137.

BARRA CARACCIOLO A., GIULIANO G., GRENNI P., GUZZELLA L., POZZONI F., BOTTONI P., FAVA L., CROBE A., ORRU M. & FUNARI E., 2005. Degradation and leaching of the herbicides metolachlor and diuron: a case study in an area of Northern Italy. *Environ. Pollut.* **134** : 525-534.

BARREIRO LOZANO R. & PRATT J.R., 1994. Interaction of toxicants and communities : the role of nutrient. *Environ. Toxicol. Chem.* **13** : 361-368.

BARRY M.J. & LOGAN D.C., 1998. The use of temporary pond microcosms for aquatic toxicity testing: direct and indirect effects of endosulfan on community structure. *Aquat. Toxicol.* **41** : 101-124.

BASU B.K. & PICK F.R., 1997. Factors related to heterotrophic bacterial and flagellate abundance in temperate rivers. *Aquat. Microb. Ecol.* **12** : 123-129.

BATISSON I., PESCE S., BESSE-HOGGAN P., SANCELME M. & BOHATIER J. Isolation and characterization of diuron-degrading bacteria from lotic surface water. *Microbial. Ecol.* (en révision)

BATTAGLIN W.A., KOLPIN D.W., SCRIBNER E.A., KUIVILA K.M. & SANDSTROM M.W., 2005. Glyphosate, other herbicides, and transformation products in midwestern streams, 2002. *J. Am. Water Resourc. Assoc.* **41** : 323-332.

BAYLIS A.D., 2000. Why glyphosate is a global herbicide: strengths, weaknesses and prospects. *Pest. Manag. Sci.* **56** : 299-308.

BELL R.T., 1993. Estimating production of heterotrophic bacterioplankton via incorporation of tritiated thymidine, *In:* Kemp P.F., Sherr B. F., Sherr E. B. & Cole J.J. (Eds.), Handbook of methods in aquatic microbial ecology. *Lewis Publishers*, Boca Raton, Fla., pp. 495-503.

BERARD A., PELTE T. & DRUART J.C., 1999a. Seasonal variability in the sensitivity to atrazine of Lake Geneva phytoplankton community structure. *Arch. Hydrobiol.* **145** : 277-295.

BERARD A., LEBOULANGER C. & PELTE T., 1999b. Tolerance of *Oscillatoria limnetica* Lemmermann to atrazine in natural phytoplankton populations and in pure culture: influence of season and temperature. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* **37** : 472-479.

BERARD A. & BENNINGHOFF C., 2001. Pollution-induced community tolerance (PICT) and seasonal variations in the sensitivity of phytoplankton to atrazine in nanocosms. *Chemosphere* **45** : 427-437.

BERARD A., DORIGO U., HUMBERT J.-F., LEBOULANGER C. & SEGUIN F. 2002. La méthode PICT (Pollution-Induced Community Tolerance) appliquée aux communautés algales: intérêt comme outil de diagnose et d'évaluation du risque écotoxicologique en milieu aquatique. *Annales de Limnologie* **38** : 247-261.

BERMAN T., KAPLAN B., CHAVA S., VINER Y., SHERR B.F. & SHERR E.B., 2001. Metabolically active bacteria in Lake Kinneret. *Aquat. Microb. Ecol.* **23** : 213-224.

BERNHARDT E.S. & LIKENS G.E., 2004. Controls on periphyton biomass in heterotrophic streams. *Freshwater Biol.* **49** : 14-27.

BIRD D.F. & KALFF J., 1984. Empirical relationships between bacterial abundance and chlorophyll concentration in fresh and marine waters. *Can. J. Aquat. Sci.* **41** : 1015-1023.

BISSETT A., BOWMAN J. & BURKE C., 2006. Bacterial diversity in organically-enriched fish farm sediments. *FEMS Microbiol. Ecol.* **55** : 48-56.

BLANCHOUD H., FARRUGIA F. & MOUCHEL J.M., 2004. Pesticide uses and transfers in urbanised catchments. *Chemosphere* **55** : 905-913.

BLANCK H, WANGBERG S. & MOLANDER S., 1988. Pollution-induced community tolerance: a new ecotoxicological tool, *In:* Cairns J.J. & Pratt J.R. (Eds), Functional testing of aquatic biota for estimating hazards of chemicals, *American Society for Testing and Materials*, Philadelphia, pp. 219-230.

BOCQUET J.C., MY J. & MICHEL P., 2005. Données économiques sur le marché des produits phytosanitaires, *In:* Regnault-Roger C. (Ed.), Enjeux phytosanitaires pour l'agriculture et l'environnement. *Tec & Doc*, Lavoisier, pp. 835-848.

BOSSHARD P.P., SANTINI Y., GRUTER D., STETTLER R. & BACHOFEN R., 2000. Bacterial diversity an community composition in the chemocline of the meromictic alpine Lake Cadagno as revealed by 16S rDNA analysis. *FEMS Microbiol. Ecol.* **31** : 173–182.

BOUCHER D., JARDILLIER L. & DEBROAS D., 2006. Succession of bacterial community composition over two consecutive years in two aquatic systems: a natural lake and a lake-reservoir. *FEMS Microbiol. Ecol.* **55** : 79-97.

BOUDOU A. & RIBEYRE F., 1997. Aquatic ecotoxicology: from the ecosystem to the cellular and molecular levels. *Environ. Health Perspect.* **105** : 21-35.

BOULET A., 2005. Lutte contre la pollution des eaux par les pesticides utilisés en zones non agricoles : analyse et synthèse des actions engagées et recommandations. Institut National Agronomique de Paris.

BRANCO R., CHUNG A.-P., VERISSIMO A. & MORAIS P.V., 2005. Impact of chromium-contaminated wastewaters on the microbial community of a river. *FEMS Microbiol. Ecol.* **54** : 35–46.

BRANDT K.K., JØRGENSEN N.O.G., NIELSEN T.H. & WINDING A., 2004. Microbial community-level toxicity testing of linear alkylbenzene sulfonates in aquatic microcosms. *FEMS Microbiol. Ecol.* **49** : 229-241.

BRETT, M.T., LUBNOW, F.S., VILLAR-ARGAIZ, M., MULLER-SOLGER, A., GOLDMAN, C.R., 1999. Nutrient control of bacterioplankton and phytoplankton dynamics. *Aquat. Ecol.* **33** : 135-145.

BROCK T.C.M., LAHR J. & VAN DEN BRINK P.J., 2000. Ecological risk assessment of pesticides in freshwater ecosystems. Part 1: Herbicides. Alterra-Report 088, Wageningen, The Netherlands.

BRUMMER I.H.M., FELSKE A. & WAGNER-DOBLER I., 2003. Diversity and seasonal variability of β-Proteobacteria in biofilms of polluted rivers : analysis by temperature gradient gel electrophoresis and cloning. *Appl. Environ. Microbiol.* **69** : 4463-4473.

CALLGAIER M. & GROSSART H.-P., 2006. Diversity and seasonal dynamics of A*ctinobacteria* populations in four lakes in Northeastern Germany. *Appl. Envir. Microbiol.* **72** : 3489-3497.

CANNA-MICHAELIDOU S. & NICOLAOU A.S., 1996. Evaluation of the genotoxicity potential (by Mutatox™ test) of ten pesticides found as water pollutants in Cyprus. *Sci. Total. Environ.* **193** : 27-35.

CAQUET T., THYBAUD E. & LE BRAS S., 1989. Utilisation de mésocosmes pour l'étude du comportement et des effets biologiques des composés phytosanitaires en milieux aquatiques. Application à la deltaméthrine. *Med. Fac. Land. Univ. Gent.* **54** : 1049-1060.

CAQUET T., THYBAUD E., LE BRAS S., JONOT O. & RAMADE F., 1992. Fate and biological effects of lindane and deltamethrin in freshwater mesocosms. *Aquat. Toxicol.* **23** : 261-278.

CAQUET T., LAGADIC L., MONOD G., LACAZE J.-C. & COUTE A., 2001. Variability of physicochemical and biological parameters between replicated outdoor freshwater lentic mesocosms. *Ecotoxicology*. **10** : 51-66.

CARABIAS-MARTINEZ R., RODRIGUEZ-GONZALO E., FERNANDEZ-LAESPADA M.E., CALVO-SERONERO L. & SANCHEZ-SAN ROMAN F.J., 2003. Evolution over time of the agricultural pollution of waters in an area of Salamanca and Zamora (Spain). *Wat. Res.* **37** : 928-938.

CARDER J.P. & HOAGLAND K.D., 1998. Combined effects of alachlor and atrazine on benthic algal communities in artificial streams. *Environ. Toxicol. Chem.* **17** : 1415-1420.

CARLISLE S.M. & TREVORS J.T., 1988. Glyphosate in the environment. *Wat. Air Soil Pollut.* 39 : 409-412.

CARON D.A., 1999. Inorganic nutrients, bacteria, and the microbial loop. *Earth Environ. Sci.* **28** : 295-298.

CARR G.M., MORIN A. & CHAMBERS P.A., 2005. Bacteria and algae in stream periphyton along a nutrient gradient. *Freshwater Biol.* **50** : 1337-1350.

CASTILLO M.M., ALLAN J.D., SINSABAUGH R.L. & KLING G.W., 2004. Seasonal and interannual variation of bacterial production in lowland rivers of the Orinoco basin. *Freshwater Biol.* **49** : 1400-1414.

CASTLE D. & KIRCHMAN D.L., 2004. Composition of estuarine bacterial communities assessed by denaturing gradient gel electrophoresis and fluorescence in situ hybridization. *Limnol. Oceanogr.* **2** : 303-314.

CATALA P., PARTHUISOT N., BERNARD L., BAUDART J., LEMARCHAND K. & LEBARON P., 1999. Effectiveness of CSE to counterstain particles and dead bacterial cells with permeabilised membranes : application to viability assessment in waters. *FEMS Microb. Lett.* **178** : 219-226.

CEBRON A., COCI M., GARNIER J. & LAANBROEK H.J., 2004. Denaturing gradient gel electrophoretic analysis of ammonia-oxidizing bacterial community structure in the lower Seine river: impact of Paris wastewater effluents. *Appl. Environ. Microbiol.* **70** : 6726-6737.

CETKAUSKAITE A., GRIGONIS U. & BERZINSKIENE J., 1998. Biodegradation: Selection of suitable model. *Ecotox. Environ. Saf.* **40** : 19-28.

CHOI J.W., SHERR E.B. & SHERR B.F., 1996. Relation between presence-absence of a visible nucleoid and metabolic activity in bacterioplankton cells. *Limnol. Oceanogr.* **41** : 1161-1168.

CODY D.G., HEATH R.T. & LEFF L.G., 2000. Characterization of benthic bacterial assemblages in a polluted stream using denaturing gradient gel electrophoresis. *Hydrobiologia* **432** : 207-215.

COLE J.J., FINDLAY S. & PACE M., 1988. Bacterial production in fresh and saltwater ecosystems: a cross-system overview. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* **43** : 1-10.

COMORETTO L. & CHIRON S., 2005. Comparing pharmaceutical and pesticide loads into a small Mediterranean river. *Sci. Total Environ.* **349** : 201-210.

CORSARO, D., VENDITTI, D., VALASSINA, M., 2001. A new Chlamydia-like 16S rDNA sequence from a clinical sample. *Microbiology* **147** : 515-516.

COTTRELL M.T. & KIRCHMAN D.L., 2000. Natural assemblages of marine proteobacteria and members of the *Cytophaga-Flavobacter* cluster consumig low- and high-molecular-weight dissolved organic matter. *Appl. Environ. Microbiol.* **66** : 1692-1697.

COTTRELL M.T. & KIRCHMAN D.L., 2004. Single-cell analysis of bacterial growth, cell size, and community structure in the Delaware estuary. *Aquat. Microb. Ecol.* **34** : 139-149.

CRUMP B.C., KLING G.W., BAHR M. & HOBBIE J.E., 2003. Bacterioplankton community shifts in an Arctic Lake correlate with seasonal changes in organic matter source. *Appl. Environ. Microbiol.* **69** : 2253–2268.

CUPPEN J.G.M., VAN DEN BRINK P.J., VAN DER WOUDE H., ZWAARDEMAKER N. & BROCK T.C.M., 1997. Sensitivity of Macrophyte-Dominated Freshwater Microcosms to Chronic Levels of the Herbicide Linuron. *Ecotox. Environ. Saf.* **38** : 25-35.

DAHL B. & BLANCK H., 1996. Toxic effects of the antifouling agent irgarol 1051 on periphyton communities in coastal water microcosms. *Mar. Pollut. Bull.* **32** : 342-350.

DANILOV R.A. & EKELUND N.G.A., 2001. Comparison of usefulness of three types of artificial substrata (glass, wood and plastic) when studying settlement patterns of periphyton in lakes of different trophic status. *J. Microbiol. Meth.* **45** : 167-170.

DECAMPS H. & NAIMAN R.J., 1989. L'écologie des fleuves. *La Recherche*. **20** : 310-319.

DEJONGHE W., BERTELOOT E., GORIS J., BOON N., CRUL K., MAERTENS S., HOFTE M., DE VOS P., VERSTRAETE W. & TOP E.M., 2003. Synergistic degradation of linuron by a bacterial consortium and isolation of a single linuron-degrading *Variovorax* strain. *Appl. Environ. Microbiol.* **69** : 1532-1541.

DEL GIORGIO P.A., PRAIRIE Y.T. & BIRD D.F., 1997. Coupling between rates of bacterial production and the abundance of metabolically active bacteria in lakes, enumerated using CTC reduction and flow cytometry. *Microb. Ecol.* **34** : 144-154.

DELONG E.F., FRANKS D.G. & ALLDREDGE A.L., 1993. Phylogenetic diversity of aggregate-attached vs. free-living marine bacterial assemblages. *Limnol. Oceanogr.* **38** : 924-934.

DELORENZO M.E., SCOTT G.I. & ROSS P.E., 1999. Effects of the agricultural pesticides atrazine, deethylatrazine, endosulfan, and chlorpyrifos on an estuarine microbial food web. *Environ. Toxicol. Chem.* **18** : 2824-2835.

DELORENZO M.E., SCOTT G.I. & ROSS P.E., 2001. Toxicity of pesticides to aquatic microorganisms: a review. *Environ. Toxicol. Chem.* **20** : 84-98.

DELORENZO M.E., LEATHERBURY M., WEINER J.A., LEWITUS A.J. & FULTON M.H., 2004. Physiological factors contributing to the species-specific sensitivity of four estuarine microalgal species exposed to the herbicide atrazine. *Aquat. Ecos.Health Man* **7** : 137-146.

DESCY J.P., 1993. Ecology of the phytoplankton of the River Moselle: effects of disturbances on community structure and diversity. *Hydrobiologia* **249** : 111-116.

DEVILLA R.A., BROWN M.T., DONKIN M. & READMAN J.W., 2005. The effects of a PSII inhibitor on phytoplankton community structure as assessed by HPLC pigment analyses, microscopy and flow cytometry. *Aquat. Toxicol.* **71** : 25-38.

DODDS W.K., JONES J.R. & WELCH E.B., 1998. Suggested classification of stream trophic state: distributions of temperate stream types by chlorophyll, total nitrogen and phosphorus. *Wat. Res.* **32** : 1455-1462.

DODDS W.K., 2003. The role of periphyton in phosphorus retention in shallow freshwater aquatic sytems. Minireview. *J. Phycol.* **39** : 840-849.

DOJKA M.A., HUGENHOLTZ P., HAACK S.K. & PACE N.R., 1998. Microbial diversity in a hydrocarbon- and chlorinated-solvent- contaminated aquifer undergoing intrinsic bioremediation. *Appl. Environ. Microbiol.* **64** : 3869-3877.

DORIGO U., BERARD A. & HUMBERT J.F., 2002. Comparison of eukaryotic phytobenthic community composition in a polluted river by partial 18S rRNA gene cloning and sequencing. *Microb. Ecol.* **44** : 372-380.

DORIGO U., BOURRAIN X., BERARD A. & LEBOULANGER C., 2004. Seasonal changes in the sensitivity of river microalgae to atrazine and isoproturon along a contamination gradient. *Sci. Total Environ.* **318** : 101-114.

DORIGO U., VOLATIER L. & HUMBERT J.F., 2005. Molecular approaches to the assessment of biodiversity in aquatic microbial communities. *Wat. Res.* **39** : 2207-2218.

DOS SANTOS A.C.A. & CALIJURI M.C., 1998. Survival strategies of some species of the phytoplankton community in the Barra Bonita Reservoir (São Paulo, Brazil). *Hydrobiologia* **367** : 139-152.

DOWNING H.F., DELORENZO M.E., FULTON M.H., SCOTT G.I., MADDEN C.J. & KUCKLICK J.R., 2004. Effects of the agricultural pesticides atrazine, chlorothanil, and endosulfan on South Florida microbial assemblages. *Ecotoxicology* **13** : 245-260.

DUCRUET J.M., 1991. Les inhibiteurs du photosystème II. *In :* Scalla R. (Ed.), Les herbicides: mode d'action et principes d'utilisation. *INRA*, Paris, pp. 80-88.

DUKE T.W. & MOUNT D.I., 1991. Toxic Effects on Individuals, Populations and Aquatic Ecosystems and Indicators of Exposure to Chemicals. *In:* Tardiff R.G. and Goldstein B. (Eds), Methods for Assessing Exposure of Human and Non-Human Biota. SCOPE 46. *John Wiley and Sons*, New York, pp. 393-404.

EL DEEB B.A., SOLTAN S.M., ALI A.M. & ALI K.A., 2000. Detoxification of the herbicide diuron by *Pseudomonas sp. Folia Microbiol.* **45** : 211-216.

EL-DIB M.A. & ABOU-WALY H.F., 1998. Biodegradation of some triazines and phenylureas in surface waters. *Wat. Res.* **32** : 1881-1887.

EL FANTROUSSI S., VERSCHUERE L., VERSTRAETE W. & TOP E.M., 1999. Effects of phenylurea herbicides on soil microbial communities estimated by analysis of 16S rRNA gene fingerprints and community-level physiological profiles. *Appl. Environ. Microbiol.* **65** : 982-988.

EL FANTROUSSI S., 2000. Enrichment and molecular characterization of a bacterial culture that degrades Methoxy-Methyl urea herbicides and their aniline derivatives. *Appl. Environ. Microbiol.* **66** : 5110-5115.

ENRICH-PRAST A., 2006. Effects of pesticides on nitrification in aquatic sediment. *Braz. J. Biol.* **66** : 405-412.

FAIRCHILD J.F., RUESSLER D.S. & CARLSON A.R., 1998. Comparative sensitivity of five species of macrophytes and six species of algae to atrazine, metribuzin, alachlor, and metolachlor. *Environ. Toxicol. Chem.* **17** : 1830-1834.

FAJON C., 1998. Etude de la production et de la dégradation de composés organiques extracellulaires en Mer Adriatique du Nord. Thèse, Université Paris 6.

FAJON C., CAUWET G., LEBARON P., TERZIC S., AHEL M., MALEJ A., MOZETIC P. & TURK V., 1999. The accumulation and release of polysaccharides by planktonic cells and the subsequent bacterial response during a controlled experiment, *FEMS Microbiol. Ecol.* **29** : 351-363.

FERAY C., 2000. Nitrification en sédiment d'eau douce : incidence de rejets de station d'épuration sur la dynamique des communautés nitrifiantes. Thèse, Université Lyon 1.

FILION M., HAMELIN R.C., BERNIER L. & ST-ARNAUD M., 2004. Molecular profiling of rhizosphere microbial communities associated with healthy and diseased black spruce (*Picea mariana*) seedlings grown in a nursery. *Appl. Environ. Microbiol.* **70** : 3541-3551.

FINDLAY S., PACE M.L., LINTS D., COLE J.J., CARACO N.F. & PEIERLS B., 1991. Weak coupling of bacterial and algal production in a heterotrophic ecosystem: The Hudson River estuary. *Limnol. Oceanogr.* **36** : 268-278.

FLEEGER J.W., CARMAN K.R. & NISBET R.M., 2003. Indirect effects of contaminants in aquatic ecosystems. *Sci. Total Environ.* **317** : 207-233.

FLUM T.F. & SHANNON L.J., 1987. The effects of three related amides on microecosystem stability. *Ecotox. Environ. Saf.* **13** : 239-252.

FREITAG T.E., CHANG L. & PROSSER J.I., 2006. Changes in the community structure and activity of betaproteobacterial ammonia-oxidizing sediment bacteria along a freshwater-marine gradient. *Environ. Microbiol.* **8** : 684-696.

FRIBERG-JENSEN U., WENDT-RASCH L., WOIN P. & CHRISTOFFERSEN K., 2003. Effects of the pyrethroid insecticide, cypermethrin, on a freshwater community studied under field conditions. I. Direct and indirect effects on abundance measures of organisms at different trophic levels. *Aquat. Toxicol.* **63** : 357-371.

FRITSCHE T.R., HORN M., WAGNER M., HERWIG R.P., SCHLEIFER K.-H. & GAUTOM R.K., 2000. Phylogenetic diversity among geographically dispersed *Chlamydiales* endosymbionts recovered from clinical and environmental isolates of *Acanthamoeba* spp. *Appl. Environ. Microbiol.* **66** : 2613-2619.

FUHRMAN J.A. & AZAM F., 1980. Bacterioplankton secondary production estimates for coastal waters of British Columbia, Antarctica and California. *Appl. Environ. Microbiol.* **39** : 1085-1095.

GAO X., OLAPADE O.A., KERSHNER M.W. & LEFF L.G., 2004. Algal-bacterial co-variation in streams: A cross-stream comparison. *Arch. Hydrobiol.* **159** : 253-261.

GARDNER S.C., GRUE C.E., GRASSLEY J.M., LENZ L.A., LINDENAUER J.M. & SEELEY M.E., 1997. Single species algal (*Ankistrodesmus*) toxicity tests with Rodeo® and Garlon®3A. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* **59** : 492-499.

GARLAND J.L., 1997. Analysis and interpretation of community-level physiological profiles in microbial ecology. *FEMS Microbiol. Ecol.* **24** : 289-300.

GARMOUMA M., BLANCHARD M., CHESTERIKOFF A., ANSART P. & CHEVREUIL, M., 1997. Seasonal transport of herbicides (triazines and phenylureas) in a small stream draining an agricultural basin: Mélarchez (France). *Water Res.* **31** : 1489-1503.

GARON-BOUCHER MARGOUM C., 2003. Contribution à l'étude du devenir des produits phytosanitaires lors d'écoulement dans les fossés : caractérisation physico-chimique et hydrodynamique. Thèse. Université Joseph Fourier. Grenoble I.

GASOL J.M., ZWEIFEL U.L., PETERS F., FUHRMAN J.A. & HAGSTROM Å, 1999. Significance of size and nucleic acid content heterogeneity as measured by flow cytometry in natural planktonic bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.* **65** : 4475-4483.

GERECKE A.C., SCHARER M., SINGER H.P., MULLER S.R., SCHWARZENBACH R.P., SAGESSER M., OCHSENBEIN U. & POPOW G. , 2002. Sources of pesticides in surface waters in Switzerland: pesticide load through wastewater treatment plants-current situation and reduction potential. *Chemosphere* **48** : 307-315.

GESSNER M.O. & CHAUVET E., 1994. Importance of Stream Microfungi in Controlling Breakdown Rates of Leaf Litter. *Ecology* **75** : 1807-1817.

GIESY J.P., DOBSON S. & SOLOMON K.R., 2000. Ecotoxicological risk assessment for roundup herbicide. *Rev. Environ. Contam. Toxicol.* **167** : 35-120.

GIORGI A. & MALACALZA L., 2002. Effect of an industrial discharge on water quality and periphyton structure in a pampean stream. *Environ. Monitor. Assess.* **75** : 107-119.

GLATZ R.E., LEPP P.W., WARD B.B. & FRANCIS C.A., 2006. Planktonic microbial community composition across steep physical/chemical gradients in permanently ice-covered Lake Bonney, Antarctica. *Geobiology* **4** : 53-67.

GLOCKNER F.O., AMANN R., ALFREIDER A., PERNTHALER J., PSENNER R., TREBESIUS K. & SCHLEIFER K.H., 1996. An in situ protocol for detection and identification of planktonic bacteria. *Syst. Appl. Microbiol.* **19** : 403-406.

GLOCKNER F.O., FUCHS B.M. & AMANN R., 1999. Bacterioplankton compositions of lakes and oceans : a first comparison based on fluorescence in situ hybridization. *Appl. Environ. Microbiol.* **65** : 3721-3726.

GLOCKNER F.O., ZAICHIKOV E., BELKOVA N., DENISSOVA L., PERNTHALER J., PERNTHALER A. & AMANN R., 2000. Comparative 16S rRNA analysis of lake bacterioplankton reveals globally disturbed phylogenetic clusters including an abundant group of *Actinobacteria*. *Appl. Environ. Microbiol.* **66** : 5053-5065.

GOH T.K. & HYDE K.D., 1996. Biodiversity of freshwater fungi. *J. Indus. Microbiol.* **17** : 328-345.

GOLD C., FEURTET-MAZEL A., COSTE M. & BOUDOU A., 2003. Impacts of Cd and Zn on the development of periphytic diatom communities in artificial streams located along a river pollution gradient. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* **44** : 189-197.

GOLDSBOROUGH L.G. & BROWN D.J., 1988. Effect of glyphosate (Roundup® formulation) on periphytic algal photosynthesis. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* **41** : 253-260.

GRAYMORE M., STAGNITTI F. & ALLINSON G., 2001. Impacts of atrazine in aquatic ecosystems. *Environ. Int.* **26** : 483-495.

GREGORI G., CITTERIO S., GHIANI A., LABRA M., SGORBATI S., BROWN S. & DENIS M., 2001. Resolution of viable and membrane-compromised bacteria in freshwater and marine waters based on analytical flow cytometry and nuleic acid double staining. *Appl. Environ. Microbiol.* **67** : 4662-4670.

GOULD D.M. & GALLAGHER E.D., 1990. Field measurement of specific growth rate, biomass, and primary production of benthic diatoms of Savin Hill Cove, Boston. *Limnol. Oceanogr.* **35** : 1757-1770.

GUASCH H., IVORRA N., LEHMAN V., PAULSSON M., REAL M. & SABATER S., 1998. Community composition and sensitivity of periphyton to atrazine in flowing waters: the role of environmental factors. *J. Appl. Phycol.* **10** : 203-213.

GUASCH H. & SABATER S., 1998. Light history influences the sensitivity to atrazine in periphytic algae. *J. Phycol.* **34** : 233-241.

GUCKERT J.B., 1996. Toxicity assessment by community analysis. *J. Microbiol. Meth.* **25** : 101-112.

GUSTAVSON K., MOHLENBERG F. & SCHLUTER L., 2003. Effects of exposure duration of herbicides on natural stream periphyton communities and recovery. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* **45** : 48-58.

HAGSTROM A., LARSSON U., HORSTEDT P. & NORMARK S., 1979. Frequency of dividing cells, a new approach to the determination of bacterial growth rates in aquatic environments. *Appl. Environ. Microbiol.* **37** : 805-812.

HANSSON L.A., 1990. Quantifying the impact of periphytic algae on nutrient avaibility for phytoplankton. *Freshwat. Biol.* **24** : 265-273.

HANSSON L.A., 1992. Factors regulating periphytic algal biomass. *Limnol. Oceanogr.* **37** : 322-328.

HARTGERS E.M., AALDERINK G.H., VAN DEN BRINK P.J., GYLSTRA R., WIEGMAN J.W.F. & BROCK T.C.M., 1998. Ecotoxicological threshold levels of a mixture of herbicides (atrazine, diuron and metolachlor) in freshwater microcosms. *Aquat. Ecol.* **32** : 135-152.

HAYNES D., RALPH P., PRANGE J. & DENNISON B., 2000. The impact of the herbicide diuron on photosynthesis in three species of tropical seagrass. *Mar. Pollut. Bull.* **41** : 288-293.

HENGSTMANN U., CHIN K.J., JANSSEN P.H. & LIESACK W., 1999. Comparative phylogenetic assignment of environmental sequences of genes encoding 16S rRNA and numerically abundant culturable bacteria from an anoxic rice paddy soil. *Appl. Environ. Microbiol.* **65** : 5050-5058.

HIEBER M. & GESSNER M.O., 2002. Contribution of stream detritivores, fungi, and bacteria to leaf breakdown based on biomass estimates. *Ecology* **83** : 1026-1038.

HIORNS W.D., METHE B.A., NIERZWICKI-BAUER S.A. & ZEHR J.P., 1997. Bacterial diversity in Adirondack mountain lakes as revealed by 16S rRNA gene sequences. *Appl. Environ. Microbiol.* **63** : 2957-2960.

HOBBIE J.E., DALEY R.J. & JASPERS S., 1977. Use of nucleopore filters for counting bacteria by fluorescence microscopy. *Appl. Environ. Microbiol.* **33** : 1225-1228.

HORN M., COLLINGRO A., SCHMITZ-ESER S., BEIER C.L., PURKHOLD U., FARTMANN B., BRANDT P., NYAKATURA G.J., DROEGE M., FRISHMAN D., RATTEI T., MEWES H.-W. & WAGNER M., 2004. Illuminating the evolutionary history of Chlamydiae. *Science* **304** : 728-730.

HUGENHOLTZ P., GOEBEL B.M. & PACE N.R., 1998. Impact of culture-independent studies on the emerging phylogenetic view of bacterial diversity. *J. Bacteriol.* **180** : 4765-4774.

HUGENHOLTZ P., TYSON G.W., WEBB R.I., WAGNER A.M., BLACKALL L.L., 2001. Investigation of candidate division TM7, a recently recognized major lineage of the domain Bacteria with no known pure-culture representatives. *Appl. Environ. Microbiol.* **67** : 411-419.

IBELINGS B., ADMIRAAL W., BIJKERK R., IETSWAART T. & PRINS H., 1998. Monitoring of algae in Dutch rivers: does it meet its goals? *J. Appl. Phycol.* **10** : 171-181.

IFEN, 2004. Les pesticides dans les eaux : sixième bilan annuel, données 2002. Institut Français de l'Environnement (www.ifen.fr).

IFEN, 2006. Les pesticides dans les eaux : données 2003 et 2004. Institut Français de l'Environnement (www.ifen.fr).

JOCHEN F.J., MCCARHY M.J. & GARDNER W.S., 2004. Microbial ammonium cycling in the Mississippi River plume during the drought spring of 2000. *J. Plankton Res.* **26** : 1265-1275.

JOHNSEN K., JACOBSEN C.S., TORSVIK V. & SORENSEN J., 2001. Pesticide effects on bacterial diversity in agricultural soils - a review. *Biol. Fertil. Soils* **33** : 443-453.

JOUX F. & LEBARON P., 1997. Ecological implications of an improved direct viable count method for aquatic bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.* **63** : 3643-3647.

JOUX F. & LEBARON P., 2000. Use of fluorescent probes to assess physiological functions of bacteria at single-cell level. *Microbes Infect.* **2** : 1523-1535.

JURGENS K., PERNTHALER J., SCHALLA S. & AMANN R., 1999. Morphological and compositional changes in a planktonic bacterial community in response to enhanced protozoan grazing. *Appl. Environ. Microbiol.* **65** : 1241-1250.

KANGAS P. & ADEY W., 1996. Mesocosms and ecological engineering. *Ecol. Eng.* **6** : 1-5.

KAPRELYANTS A.S. & KELL D.B., 1992. Rapid assessment of bacterial viability and vitality by rhodamine 123 and flow cytometry. *J. Appl. Bacteriol.* **72** : 410-422.

KARRASCH B., MEHRENS M., ROSENLOCHER Y. & PETERS K., 2001. The dynamics of phytoplankton, bacteria and heterotrophic flagellates at two banks near Magdeburg in the River Elbe (Germany). *Limnologica* **31** : 93-107.

KASAI F. & HANAZATO T., 1995. Effects of the triazine herbicide, simetryn, on freshwater plankton communities in experimental ponds. *Environ. Pollut.* **89** : 197-202.

KENZAKA T., YAMAGUCHI N., TANI K. & NASU M., 1998. rRNA-targeted fluorescent in situ hybridization analysis of bacterial community structure in river water. *Microbiology* **144** : 2085-2093.

KENZAKA T., YAMAGUCHI N., PRAPAGDEE B., MIKAMI E. & NASU M., 2001. Bacterial community composition and activity in urban rivers in Thailand and Malaysia. *J. Health Sci.* **47** : 353-361.

KEPNER R.L. & PRATT J.R., 1994. Use of fluorochromes for direct enumeration of total bacteria in environmental samples : Past and present. *Microb. Rev.* **58** : 603-615.

KIMBALL K.D. & LEVIN S.A., 1985. Limitations of laboratory bioassays : the need for ecosystem-level testing. *BioSciences* **35** : 165-171.

KIRCHMAN D.L., 2002. The ecology of *Cytophaga-Flavobacteria* in aquatic environments. *FEMS Microbiol. Ecol.* **39** : 91-100.

KLAMMER S., POSCH T., SONNTAG B., GRIEBLER C., MINDL B. & PSENNER R., 2002. Dynamics of bacterial abundance, biomass, activity, and community composition in the oligotrophic Traunsee and the Traun River (Austria). *Water Air Soil Pollut.* **2** : 137-163.

KLAUSEN C., NICOLAISEN M.H., STROBEL B.W., WARNECKE F., NIELSEN J.L. & JORGENSEN N.O.G., 2005. Abundance of actinobacteria and production of geosmin and 2-methylisoborneol in Danish streams and fish ponds. *FEMS Microbiol. Ecol.* **52** : 265-278.

KOLPIN D.W., SKOPEC M., MEYER M.T., FURLONG E.T. & ZAUGG S.D., 2004. Urban contributions of pharmaceuticals and other organic wastewater contaminants to streams during differing flow conditions. *Sci. Total Environ.* **328** : 119-130.

KOLPIN D.W., THURMAN E.M., LEE E.A., MEYER M.T., FURLONG E.T. & GLASSMEYER S.T., 2006. Urban contributions of glyphosate and its degradate AMPA to streams in the United States. *Sci. Total Environ.* **354** : 191-197.

KONEVA N.D., 2004. Characterization and *in situ* monitoring of atrazine-transforming bacteria. *Microbiology* **73** : 763-767.

KOSTANJSEK R., LAPANJE A., DROBNE D., PEROVIC S., PEROVIC A., ZIDAR P., STRUS J., HOLLERT H. & KARAMAN G., 2005. Bacterial community structure analyses to assess pollution of water and sediments in the Lake Shkodra/Skadar, Balkan Peninsula. *Environ. Sci. Pollut. Res. Int.* **12** : 361-368.

LAMBERT S.J., THOMAS K.V. & DAVY A.J., 2006. Assessment of the risk posed by the antifouling booster biocides Irgarol 1051 and diuron to freshwater macrophytes. *Chemosphere* **63** : 734-743.

LAMBERTI G.A. & STEINMAN A.D., 1997. A comparison of primary production in stream ecosystems. *J. N. Am. Benthol. Soc.* **16** : 95-104.

LAVOIE I., VINCENT W.F., PIENITZ R. & PAINCHAUD J., 2004. Benthic algae as bioindicators of agricultural pollution in the streams and rivers of southern Québec (Canada). *Aquat. Ecosys. Health Manag.* **7** : 43-58.

LAY C., SUTREN M., LEPERCQ P., JUSTE C., RIGOTTIER-GOIS L., LHOSTE E., LEMEE R., LE RUYET P., DORE J., ANDRIEUX C., 2004. Influence of Camembert consumption on the composition and metabolism of intestinal microbiota: a study in human microbiota-associated rats. *Br. J. Nut.* **92** : 429-438.

LEBARON P., SERVAIS P., AGOGUE H., COURTIES C. & JOUX F., 2001. Does the high nucleic acid content of individual bacterial cells allow us to discriminate between active cells an inactive cells in aquatic systems? *Appl. Environ. Microbiol.* **67** : 1775-1782.

LEDNICKA D., MERGAERT J., CNOCKAERT M.C. & SWINGS J., 2000. Isolation and identification of cellulolytic bacteria involved in the degradation of natural cellulosic fibres. *Syst. Appl. Microbiol.* **23** : 292-299.

LE JEUNE A.-H., 2003. Effets du diuron (et de ses éventuels produits de biotransformation) sur l'activité et la diversité des communautés phytoplanctoniques et bactériennes : approche en microcosmes. Rapport de DEA, Université Blaise Pascal, Clermont II.

LEMKE M.J. & LEFF L.G., 1999. Bacterial populations in an anthropogenically disturbed stream : comparison of different seasons. *Microb. Ecol.* **38** : 234-243.

LIU J. & LEFF L.G., 2002. Temporal changes in the bacterioplankton of a Northeast Ohio (USA) river. *Hydrobiologia* **489** : 151-159.

LORENZEN C.J., 1965. Determination of chlorophylls and phaeopigments: spectrophotometric equations. *Limnol. Oceanogr.* **12** : 343 – 346.

LOUCHART X., VOLTZ M. & ANDRIEUX, P., 2000. Temporal variation in the availability of diuron to transport by overland flow. *C.R. Acad. Sci. Ser. 2, Earth Planet. Sci.* **331** : 475-481.

LOUDA J.W. & MONGHKONSRI P., 2004. Comparison of spectrophotometric and HPLC estimations of chlorophylls-*a*, -*b*, -*c* and pheopigments in Florida Bay seston. *Florida Scientist* **67** : 281-292.

LUDWIG W., STRUNK O., WESTRAM R., RICHTER L., MEIER H., YADHUKUMAR, BUCHNER A., LAI T., STEPPI S., JOBB G., FORSTER W., BRETTSKE I., GERBER S., GINHART A.W., GROSS O., GRUMANN S., HERMANN S., JOST R., KONIG A., LISS T., LUßMANN R., MAY M., NONHOFF B., REICHEL B., STREHLOW R., STAMATAKIS A., STUCKMANN N., VILBIG A., LENKE M., LUDWIG T., BODE A. & SCHLEIFER K-H., 2004. ARB: a software environment for sequence data. *Nucleic Acids Res.* **32** : 1363-1371.

MACUR R.E., JACKSON C.R., BOTERO L.M., MCDERMOTT T.R. & INSKEEP W.P., 2004. Bacterial populations associated with the oxidation and reduction of arsenic in an unsaturated soil. *Environ. Sci. Technol.* **38** : 104-111.

MADARIAGA I., 2002. Short-term variations in the physiological state of phytoplankton in a shallow temperate estuary. *Hydrobiologia* **475/476** : 345-358.

MADIGOU E., 2005. Influence du statut trophique de cours d'eau sur les fonctionnalités microbiennes des biofilms (épipsammon et épilithon). Thèse. Université Claude Bernard. Lyon I.

MALLAT E. & BARCELÓ D., 1998. Analysis and degradation study of glyphosate and of aminomethylphosphonic acid in natural waters by means of polymeric and ion-exchange solid-phase extraction columns followed by ion chromatography-post-column derivatization with fluorescence detection. *J. Chromatogr.* **823** : 129-136.

MANDELBAUM R.T., ALLAN D.L. & WACKETT L.P., 1995. Isolation and characterization of a *Pseudomonas sp.* that mineralizes the s-triazine herbicide atrazine. *Appl. Environ. Microbiol.* **61** : 1451-1457.

MANEN J.F. & FALQUET J., 2002. The cpcB-cpcA locus as a tool for the genetic characterization of the genus *Arthrospira* (Cyanobacteria): evidence for horizontal transfer. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **52** : 861-867.

MANZ W., AMANN R., LUDWIG W., WAGNER M. & SCHLEIFER K.H., 1992. Phylogenetic oligodeoxynucleotide probes for the major subclasses of *Proteobacteria* : Problems and solutions. *Syst. Appl. Microbiol.* **15** : 593-600.

MANZ W., AMANN R., LUDWIG W., VANCANNEYT M. & SCHLEIFER K.H., 1996. Application of a suite of 16S rRNA-specific oligonucleotide probes designed to investigate bacteria of the phylum *Cytophaga–Flavobacter–Bacteroides* in the natural environment. *Microbiology* **142** : 1097-1106.

MANZ W., WENDT-POTTHOFF K., NEU T.R. & LAWRENCE J.R., 1999. Phylogenetic composition, spatial structure, and dynamics of lotic bacterial biofilms investigated by fluorescent *in situ* hybridization and confocal laser scanning microscopy. *Microb. Ecol.* **37** : 225-237.

MASSERET E., AMBLARD C. & BOURDIER G., 1998. Changes in the structure and metabolic activities of periphytic communities in a stream receiving treated sewage from a waste stabilization pond. *Water Res.* **32** : 2299-2314.

McCORMICK P. & STEVENSON R., 1998. Periphyton as a tool for ecological assessment and management in the Florida Everglades. *J. Phycol.* **34** : 726-733.

MITCHELL C., BRODIE J. & WHITE I., 2005. Sediments, nutrients and pesticide residues in event flow conditions in streams of the Mackay Whitsunday Region, Australia. *Mar. Pollut. Bull.* **51** : 23-36.

MOLANDER S. & BLANCK H., 1992. Detection of pollution-induced community tolerance (PICT) in marine periphyton communities established under diuron exposure. *Aquat. Toxicol.* **22** : 129-144.

MONTUELLE B., VOLAT B., TORIO-FERNANDEZ M.M. & NAVARRO E., 1996. Changes in *Nitrobacter* serotypes biodiversity in a river: impact of a wastewater treatment plant discharge. *Water Res.* **30** : 1057-1064.

MOTER A. & GOBEL U.B., 2000. Fluorescence in situ hybridization (FISH) for direct visualization of microorganisms. *J. Microbiol. Meth.* **41** : 85-112.

MULLER S.R., BERG M., ULRICH M.M. & SCHWARZENBACH R.P., 1997. Atrazine and its primary metabolites in Swiss Lakes: input characteristics and long-term behavior in the water column. *Environ. Sci. Technol.* **31** : 2104-2113.

MULTIGNER L., CORDIER S. & JEGOU B., 2005. Effets adverses des produits phytosanitaires sur la santé humaine, *In:* Regnault-Roger C. (Ed.), Enjeux phytosanitaires pour l'agriculture et l'environnement. *Tec & Doc*, Lavoisier, pp. 243-259.

MUNOZ I., REAL M., GUASCH H., NAVARRO E. & SABATER S., 2001. Effects of atrazine on periphyton under grazing pressure. *Aquat. Toxicol.* **55** : 239-249.

MURRAY A.E., HOLLIBAUGH J.T. & ORREGO C., 1996. Phylogenetic compositions of bacterioplankton from two California estuaries compared by denaturing gradient electrophoresis of 16S rDNA fragments. *Appl. Environ. Microbiol.* **62** : 2676-2680.

MUYLAERT K., VAN DER GUCHT K., VLOEMANS N., DE MEESTER L.D., GILLIS M. & VYVERMAN W., 2002. Relationship between bacterial community composition and bottom-up versus top-down variables in four eutrophic shallow lakes. *Appl. Environ. Microbiol.* **68** : 4740-4750.

MUYZER G., DE WAAL E.C. & UITTERLINDEN A.G., 1993. Profiling of complex microbial populations by denaturing gradient gel electrophorsis analysis of polymerase chain reaction-amplified genes encoding for 16S rRNA. *Appl. Environ. Microbiol.* **59** : 695-700.

MUYZER G., 1999. DGGE/TGGE a method for identifying genes from natural ecosystems. *Curr. Opin. Microbiol.* **2** : 317-322.

MYERS R.M., FISCHER S.G., LERMAN L.S. & MANIATIS T., 1985. Nearly all single base substitutions in DNA fragments joined to a GC-clamp can be detected by denaturing gradient gel electrophoresis. *Nucleic Acids Res.* **13** : 3131-3145.

NEAL C., JARVIE H.P., NEAL M., HILL L. & WICKHAM H., 2006. Nitrate concentrations in river waters of the upper Thames and its tributaries. *Sci. Total. Environ.* **365** : 15-32.

NEWELL S.Y. & CHRISTIAN R.R., 1981. Frequency of dividing cells as an estimator of bacterial productivity. *Appl. Environ. Microbiol.* **42** : 23-31.

NIELSEN J.L., DE MURO M.A. & NIELSEN P.H., 2003. Evaluation of the redox dye 5-cyano-2,3-tolyl-tetrazolium chloride for activity studies by simultaneous use of microautoradiography and fluorescence in situ hybridization. *Appl. Environ. Microbiol.* **69** : 641-643.

NIKKILA A., PAULSSON M., ALMGREN K., BLANCK H. & KUKKONEN J.V.K., 2001. Atrazine uptake, elimination and bioconcentration by periphyton communities and *Daphnia magma*: effects of dissolved organic carbon. *Environ. Toxicol. Chem.* **20** : 1003-1011.

NITSCHKE L. & SCHUSSLER W., 1998. Surface water pollution by herbicides from effluents of waste water treatment plants. *Chemosphere* **36** : 35-41.

NYSTROM B., BECKER-VAN SLOOTEN K., BERARD A., GRANDJEAN D., DRUART J.C. & LEBOULANGER C., 2002. Toxic effects of Irgarol 1051 on phytoplankton and macrophytes in Lake Geneva. *Wat. Res.* **36** : 2020-2028.

ODUM E.P., 1984. The mesocosm. *BioScience* **34** : 558-562.

PALMA G., SANCHEZ A., OLAVE Y., ENCINA F., PALMA R. & BARRA R., 2004. Pesticide levels in surface waters in an agricultural-forestry basin in Southern Chile. *Chemosphere* **57** : 763-770.

PARTHUISOT N., CATALA P., LEMARCHAND K., BAUDART J. & LEBARON P., 2000. Evaluation of ChemChrome V6 for bacterial viability assessment in waters. *J. Appl. Microbiol.* **89** : 370-380.

PERES F., FLORIN D., GROLLIER T., FEURTET-MAZEL A., COSTE M., RIBEYRE F., RICARD M. & BOUDOU A., 1996. Effects of the phenylurea herbicide isoproturon on periphytic diatom communities in freshwater indoor microcosms. *Environ. Pollut.* **94** : 141-152.

PEREZ K.T., 1995. Role and significance of scale to ecotoxicology, *In* : Cairns J. Jr. & Niederlehner B.R. (Eds) Ecotoxicological toxicity testing: Scale, complexity and relevance. *Boca Raton, FL : Lewis Publishers*, pp. 49-72.

PERSCHBACHER P.W. & LUDWIG G.M., 2004. Effects of diuron and other aerially applied cotton herbicides and defoliants on the plankton communities of aquaculture ponds. *Aquaculture* **233** : 197-203.

PESCE S., 2002. Effets du diuron et de ses produits de transformation sur l'activité et la diversité des communautés phytoplanctoniques et bactériennes : approche expérimentale en microcosmes. Rapport de DEA, Université Blaise Pascal, Clermont II.

PESCE S., FAJON C., BARDOT C., BONNEMOY F., PORTELLI C. & BOHATIER J., 2006. Effects of the phenylurea herbicide diuron on natural riverine microbial commnities in an experimental study. *Aquat. Toxicol.* **78** : 303-314.

PESCE S., FAJON C., BARDOT C., BONNEMOY F., PORTELLI C. & BOHATIER J. Response of algal and bacterial communities to agricultural and urban pesticide contamination events in a French stream. *Environ. Microbiol.* **soumis[a]**.

PESCE S., BARDOT C., BOHATIER J., BATISSON I., LEHOURS A.C. & FAJON C. A phylogenetic approach of the effects of diuron in microcosms on a natural riverine bacterial community composition using PCR-TTGE analysis. *Microbial. Ecol.* **soumis[b]**.

PETERSON H.G., BOUTIN C., FREEMARK K.E. & MARTIN P.A., 1997. Toxicity of hexazinone and diquat to green algae, diatoms, cyanobacteria and duckweed. *Aquat. Toxicol.* **39** : 111-134.

PHYT'EAUVERGNE (groupe régional d'action contre les pollutions des eaux naturelles par les produits phytosanitaires), 2004. Substances actives phytosanitaires dans les eaux naturelles de la région Auvergne - décembre 1997/juin 2003. Phyt'eauvergne.

PINHASSI J., SALA M.M., HAVSKUM H., PETERS F., GUADAYOL Ò., MALITS A. & MARRASE C., 2004. Changes in bacterioplankton composition under different phytoplankton regimens. *Appl. Environ. Microbiol.* **70** : 6753-6766.

PORTER K.G. & FEIG Y.S., 1980. The use of DAPI for identifying and counting aquatic microflora. *Limnol. Oceanogr.* **25** : 943-948.

PORTER J., DIAPER J., EDWARDS C. & PICKUP R., 1995. Direct measurements of natural planktonic bacterial cmmunity viability by flow cytometry. *Appl. Environ. Microbiol.* **61** : 2783-2786.

PRADO A.G.S. & AIROLDI C., 2002. The toxic effect on soil microbial activity caused by the free or immobilized pesticide diuron. *Thermochim. Acta* **394** : 155-162.

PRATT J.R. & BARREIRO R., 1998. Influence of trophic status on the toxic effects of a herbicide : a microcosm study. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* **35** : 404-411.

PROCTOR L.M. & SOUZA A., 2001. Method for enumeration of 5-cyano-2,3-ditoyl tetrazolium chloride (CTC)-active cells and cell-specific CTC activity of benthic bacteria in riverine, estuarine and coastal sediments. *J. Microbiol. Meth.* **43** : 213-222.

RAJENDRAN R., RAJENDRAN N., VENUGOPALAN V.K., 1990. Effect of organochlorine pesticides on the bacterial population of a trophical estuary. *Microbiol. Lett.* **44** : 57-63.

RAMADE F., 1998. Dictionnaire encyclopédique des sciences de l'eau. *Ediscience International*, Paris.

RAMWELL C.T., HEATHER A.I.J. & SHEPHERD A.J., 2002. Herbicide loss following application to a roadside. *Pest. Manag. Sci.* **58** : 695-701.

RAPPE M.S., SUZUKI M.T., VERGIN K.L. & GIOVANNONI S.J., 1998. Phylogenetic diversity of ultraplankton plastid small-subunit rRNA genes recovered in environmental nucleic acid samples from the Pacific and Atlantic coasts of the United States. *Appl. Environ. Microbiol.* **64** : 294-303.

RAYMOND P.A. & BAUER J.E., 2001. Use of ^{14}C and ^{13}C natural abundances for evaluating riverine, estuarine, and coastal DOC and POC sources and cycling: a review and synthesis. *Org. Cheochem.* **32** : 469-485.

REVITT D.M., ELLIS J.B. & LLEWELLYN N.R., 2002. Seasonal removal of herbicides in urban runoff. *Urban Water* **4** : 13-19.

RIEMANN B., FUHRMAN J.A. & AZAM F., 1982. Bacterial secondary production in freshwater measured by ^{3}H-thymidine incorporation method. *Microb. Ecol.* **8** : 101-114.

RIEMANN L., STEWARD G.F., FANDINO L.B., CAMPBELL L., LANDRY M.R. & AZAM, F., 1999. Bacterial community composition during two consecutive NE Monsoon periods in the Arabian Sea studied by denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) of rRNA genes. *Deep-Sea Res. II* **46** : 1791-1811.

RIEMANN L., STEWARD G.F. & AZAM F., 2000. Dynamics of bacterial community composition and activity during a mesocosm diatom bloom. *Appl. Environ. Microbiol.* **66** : 578-587.

RIER S.T. & STEVENSON R.J., 2001. Relation of environmental factors to density of epilithic lotic bacteria in 2 ecoregions. *J. N. Am. Benthol. Soc.* **20** : 588-600.

RIER S.T. & STEVENSON R.J., 2002. Effects of light, dissolved organic carbon, and inorganic nutrients on the relationship between algae and heterotrophic bacteria in stream periphyton. *Hydrobiologia* **489** : 179-184.

RODRIGUEZ G.G., PHIPPS D., ISHIGURO K. & RIDGWAY H.F., 1992. Use of a fluorescent redox probe for direct visualization of actively respiring bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.* **58** : 1801-1808.

RODRIGUEZ M.A., 1987. Estimating periphyton growh parameters using simple models. *Limnol. Oceanogr.* **32** : 458-464.

SÁENZ M.E., DI MARZIO W.D., ALBERDI J.L. & DEL CARMEN TORTORELLI M., 1997. Effects of technical grade and a commercial formulation of glyphosate on algal population growth. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* **59** : 638-644.

SALVIA-CASTELLVÍ M., IFFLY J.F., VANDER BORGHT P. & HOFFMANN L., 2005. Dissolved and particulate nutrient export from rural catchments: a case study from Luxembourg. *Sci. Total Environ.* **344** : 51-65.

SANFORD A., MORGAN J., EVANS D. & DUCKLOW H., 2001. Bacterioplankton dynamics in estuarine mesocosms: effects of tank shape and size. *Microb. Ecol.* **41** : 45-55.

SCHAFER H., HETTLER H., FRITSCHE U., PITZEN G., RODERER G. & WENZEL A., 1994. Biotests using unicellular algae and ciliates for predicting long-term effects of toxicants. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* **27** : 64-81.

SCHAFFER J.D. & SEBETICH M.J., 2004. Effects of aquatic herbicides on primary productivity of phytoplankton in the laboratory. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* **72** : 1032-1037.

SCHMITT-JANSEN M. & ALTENBURGER R., 2005. Toxic effects of isoproturon on periphyton communities – a microcosm study. *Estuar. Coast. Shelf Sci.* **62** : 539-545.

SCHULZ R., 2004. Field studies on exposure, effects, and risk mitigation of aquatic nonpoint-source insecticide pollution: a review. *J. Environ. Qual.* **33** :419-448.

SCOR-UNESCO, 1964. Determination of photosynthetic pigments. *Report of Working group 17*. Unesco, Paris, 12 pp.

SEGHERS D., VERTHE K., REHEUL D., BULCKE R., SICILIANO S.D., VERSTRAETE W. & TOP E.M., 2003. Effect of long-term herbicide applications on the bacterial community structure and function in an agricultural soil. *FEMS Microbiol. Ecol.* **46** : 139-146.

SEGUIN F., LE BIHAN F., LEBOULANGER C. & BERARD A., 2002. A risk assessment of pollution : induction of atrazine tolerance in phytoplankton communities in freshwater outdoor mesocosms, using chlorophyll fluorescence as an endpoint. *Wat. Res.* **36** : 3227-3236.

SEKIGUCHI H., TOMIOKA N., NAKAHARA T. & UCHIYAMA H., 2001. A single band does not always represent single bacterial strains in denaturing gradient gel electrophoresis analysis. *Biotechnol. Lett.* **23** : 1205-1208.

SEKIGUCHI H., WATANABE M., NAKAHARA T., XU B. & UCHIYAMA H., 2002. Succession of bacterial community structure along the Changjiang River determined by denaturing gradient gel electrophoresis and clone library analysis. *Appl. Environ. Microbiol.* **68** : 5142-5150.

SELENSKA-POBELL S., FLEMMING K., TZVETKOVA T., RAFF J., SCHNORPFEIL M. & GEISSLER A., 2002. Bacterial communities in uranium mining waste piles and their interactions with heavy metals. *In:* Merkel, B.J. (Ed.), Uranium in the aquatic environment, Berlin, *Springer*, 455-464.

SERVAIS P., 1989. Bacterioplanktonic biomass and production in the river Meuse (Belgium). *Hydrobiologia* **174** : 99-110.

SERVAIS P., GARNIER J., DEMARTEAU N., BRION N. & BILLEN G., 1999. Supply of organic matter and bacteria to aquatic ecosystems through waste water effluents. *Wat. Res.* **33** : 3521-3531.

SERVAIS P., AGOGUE H., COURTIES C., JOUX F. & LEBARON P., 2001. Are the actively respiring cells (CTC+) those responsible for bacterial production in aquatic environments? *FEMS Microbiol. Ecol.* **35** : 171-179.

SHEEHAN K.B., HENSON J.M. & FERRIS M.J., 2005. *Legionella* species diversity in an acidic biofilm community in Yellowstone National Park. *Appl. Environ. Microbiol.* **71** : 507-511.

SHERR B.F., DEL GIORGIO P. & SHERR E.B., 1999. Estimating abundance and single-cell characteristics of respiring bacteria via the redox dye CTC. *Aquat. Microb. Ecol.* **18** : 117-131.

SHERR E.B., SHERR B.F. & VERITY P.G., 2002. Distribution and relation of total bacteria, active bacteria, bacterivory, and volume of organic detritus in Atlantic continental shelf waters off Cape Hatteras NC, USA. *Deep-Sea Res. II* **49** : 4571-4585.

SIMON M. & AZAM F., 1989. Protein content and protein synthesis rates of planktonic marine bacteria. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* **51** : 201-213.

SIMPSON J.M., SANTO DOMINGO J.W. & REASONER D.J., 2004. Assessment of equine fecal contamination : the search for alternative bacterial source-tracking targets. *FEMS Microbiol. Ecol.* **47** : 65-75.

SKARK C., ZULLEI-SEIBERT N., SCHOTTLER U. & SCHLETT C., 1998. The occurence of glyphosate in surface water. *Int. J. Environ. Anal. Chem.* **70** : 93-104.

SKARK C., ZULLEI-SEIBERT N., WILLME U., GATZEMANN U. & SCHLETT C., 2004. Contribution of non-agricultural pesticides to pesticide load in surface water. *Pest. Manag. Sci.* **60** : 525-530.

SMITH D.C., STEWARD G.F., LONG R.A. & AZAM, F., 1995. Bacterial mediation of carbon fluxes during a diatom bloom in a mesocosm. *Deep-Sea Res. II* **42** : 75-97.

SPAWN R.L., HOAGLAND K.D. & SIEGFRIED B.D., 1997. Effects of alachlor on an algal community from a midwestern agricultural stream. *Environ. Toxicol. Chem.* **16** : 785-793.

STRACHAN G., PRESTON S., MACIEL H., PORTER A.J.R. & PATON G.I., 2001. Use of bacterial biosensors to interpret the toxicity and mixture toxicity of herbicides in freshwater. *Wat. Res.* **35** : 3490-3495.

STRAHLER A.N., 1957. Quantitative analysis of watershed geomorphology. *Geophys. Union Trans.* **38** : 913-920.

SULLIVAN D.S., SULLIVAN T.P. & BISALPUTRA T., 1981. Effects of Roundup® herbicide on diatom populations in the aquatic environment of a coastal forest. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* **26** : 91-96.

SUMPONO, 2002. Effet du diuron sur les populations microbiennes aquatiques d'un milieu récepteur potentiel, étude expérimentale en microcosme de laboratoire. Caractérisation à l'aide de technique de biologie moléculaire. Thèse, Université Blaise Pascal, Clermont II.

SUMPONO, PEROTTI P., BELAN A., FORESTIER C., LAVEDRINE B. & BOHATIER J., 2003. Effect of diuron on aquatic bacteria in laboratory-scale wastewater treatment ponds with special reference to *Aeromonas* species studied by colony hybridization. *Chemosphere* **50** (3) : 445-455.

THURMAN E.M., BASTIAN K.C. & MOLLHAGEN T., 2000. Occurrence of cotton herbicides and insecticides in playa lakes of the High Plains of West Texas. *Sci. Total Environ.* **248** : 189-200.

TIXIER C., SANCELME M., BONNEMOY F., CUER A. & VESCHAMBRE H., 2001. Degradation products of a phenylurea herbicide, diuron: synthesis, ecotoxicity, and biotransformation. *Environ. Toxicol. Chem.* **20** : 1381-1389.

TIXIER C., SANCELME M., AIT-AISSA S., WIDEHEM P., BONNEMOY F., CUER A., TRUFFAUT N. & VESCHAMBRE H., 2002. Biotransformation of phenylurea herbicides by a soil bacterial strain, *Arthrobacter* sp. N_2: structure, ecotoxicity and fate of diuron metabolite with soil fungi. *Chemosphere* **46** : 519-526.

TOMLIN C. (Ed.), 1994. The pesticide manual, tenth edition. *British Crop Protection Council*, Surrey, UK.

TSUI C.K.M., GOH T.K., HYDE K.D. & HODGKISS I.J., 2001. New records or species of *Dictyochaeta, Endophragmiella* and *Ramichloridium* from submerged wood in Hong Kong freshwater. *Cryptogamie Mycol.* **22** : 139-145.

TSUI M.T.K. & CHU L.M., 2003. Aquatic toxicity of glyphosate-based formulations: comparison between different organisms and the effects of environmental factors. *Chemosphere* **52** : 1189-1197.

UTERMOHL H., 1958. Zur vervolkommung der quantitativen phytoplankton-methodik. *Mit. Int. Verein. Theor. Angew. Limnol.* **9** : 1-38.

VAN DEN BRINK P.J., HARTGERS E.M., FETTWEIS U., CRUM S.J.H., VAN DONK E. & BROCK T.C.M., 1997. Sensitivity of macrophyte-dominated freshwater microcosms to chronic levels of the herbicide linuron. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* **38** : 13-24.

VAN DEN BRINK P.J., HATTINK J., BRANSEN F., VAN DONK E. & BROCK T.C.M., 2000. Impact of the fungicide carbenzamin in freshwater microcosms. II. Zooplankton, primary producers and final conclusions. *Aquat. Toxicol.* **48** : 251-264.

VAN DE PEER Y., CHAPELLE S. & DE WACHTER R., 1996. A quantitative map of nucleotide substitution rates in bacterial rRNA. *Nucleic Acids Res.* **24** : 3381–-3391.

VAN DER WERF H.M.G., 1996. Assessing the impact of pesticides on the environment. *Agr. Ecosyst. Environ.* **60** : 81-96.

VAN HANNEN E., MOOIJ W., VAN AGTERVELD M.P., GONS H.J. & LAANBROEK H.J., 1999. Detritus-Dependent Development of the Microbial Community in an Experimental System: Qualitative Analysis by Denaturing Gradient Gel Electrophoresis. *Appl. Environ. Microbiol.* **65** : 2478-2484.

VANOTTE R.L., MINSHALL G.W., CUMMINS K.W., SEDELL J.R. & CUSHING C.E., 1980. The river continuum concept. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.* **37** : 130-137.

VAN WIJNGAARDEN R.P.A., CUPPEN J.G.M., ARTS G.H.P., CRUM S.J.H, VAN DEN HOORN M.W., VAN DEN BRINK P.J. & BROCK T.C.M., 2004. Aquatic risk assessment of a realistic exposure to pesticides used in bulb crops: a microcosm study. *Environ. Toxicol. Chem.* **23** : 1479-1498.

VEDRINE C., LECLERC J.C., DURRIEU C. & TRAN-MINH C., 2003. Optical whole-cell biosensor using *Chlorella vulgaris* designed for monitoring herbicides. *Biosens. Bioelectron.* **18**, 457-463.

VOLTZ M., 2001. Facteurs clés du transfert des produits phytosanitaires vers les eaux superficielles, *In* : Colloque du SIMA.

WARD D.M., WELLER R. & BATESON M.M., 1990. 16S rRNA sequences reveal numerous uncultivated microorganisms in a natural environment. *Nature* **345** : 63-65.

WATANABE T., CAPBLANCQ J. & DAUTA A., 1988. Utilisation de bioessais « in situ » (substrats artificiels) pour caractériser la qualité des eaux de rivières à l'aide du périphyton. *Annls Limnol.* 24 : 111-125.

WATANABE K., 2001. Microorganisms relevant to bioremediation. *Curr. Opin. Biotechnol.* **12** : 237-241.

WEINBAUER M.G., 2004. Ecology of prokaryotic viruses. *FEMS Microbiol. Rev.* **28** : 127-181.

WENDT-RASCH L., VAN DEN BRINK P.J., CRUM S.J.H. & WOIN P., 2004. The effects of a pesticide mixture on aquatic ecosystems differing in trophic status: responses of the macrophyte *Myriophyllum spicatum* and the periphytic algal community. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* **57** : 383-398.

WETZEL R.G., 2001. Bacterioplankton. *In*: Wetzel R.G. (Ed.), Limnology. Lake and river ecosystems, 3rd ed. Academic Press, New York, pp. 489-525.

WHITE P.A., KALFF J., RASMUSSEN J.B. & GASOL J.M., 1991. The effects of temperature and algal biomass on bacterial production and specific growth rate in freshwater and marine habitats. *Microb. Ecol.* **21** : 99-118.

WILLIAMS M.M., DOMINGO J.W., MECKES M.C. & KELTY C.A., 2004. Phylogenetic diversity of drinking water bacteria in a distribution system simulator. *J. Appl. Microbiol.* **96** : 954-964.

WOODBURN A.T., 2000. Glyphosate: production, pricing and use worldwide. *Pest. Manag. Sci.* **56** : 309-312.

YAMAGUCHI N., KENZAKA T. & NASU M., 1997. Rapid in situ enumeration of physiologically active bacteria in river waters using fluorescent probes. *Microbes Environ.* **12** : 1-8.

YOKOKAWA T., NAGATA T., COTTRELL M.T. & KIRCHMAN D.L., 2004. Growth rate of the major phylogenetic bacterial groups in the Delaware estuary. *Limnol. Oceanogr.* **49** : 1620-1629.

ZHANG H., SEKIGUCHI Y., HANADA S., HUGENHOLTZ P., KIM H., KAMAGATA Y. & NAKAMURA K., 2003. *Gemmatimonas aurantiaca* gen. nov., sp. nov., a gram-negative, aerobic, polyphosphate-accumulating micro-organism, the first cultured representative of the new bacterial phylum Gemmatimonadetes phyl. nov. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **53** : 1155-1163.

ZHANG X., YAN X., GAO P., WANG L., ZHOU Z. & ZHAO L., 2005. Optimized sequence retrieval from single bands of temperature gradient gel electrophoresis profiles of the amplified 16S rDNA fragments from an activated sludge system. *J. Microbiol. Methods* **60** : 1-11.

ZUBKOV M.V., FUCHS B.M., BURKHILL P.H. & AMANN R., 2001. Comparison of cellular and biomass specific activities of dominant bacterioplankton groups in stratified waters of the Celtic Sea. *Appl. Environ. Microbiol.* **67** : 5210-5218.

ZWEIFEL U.L. & HAGSTROM A, 1995. Total counts of marine bacteria include a large fraction of non-nucleoid-containing bacteria (ghosts). *Appl. Environ. Microbiol.* **61** : 2180-2185.

Valorisation des résultats

VALORISATION DES RESULTATS

Une partie des résultats de ce travail de thèse a fait l'objet de publications scientifiques et/ou de communications en congrès nationaux et internationaux.

PUBLICATIONS :

PESCE S., FAJON C., BARDOT C., BONNEMOY F., PORTELLI C. & BOHATIER J., 2006. Effects of the phenylurea herbicide diuron on natural riverine microbial communities in an experimental study. *Aquat. Toxicol.* 78 : 303-314.

PESCE S., FAJON C., BARDOT C., BONNEMOY F., PORTELLI C. & BOHATIER J. Response of algal and bacterial communities to agricultural and urban pesticide contamination events in a French stream. *Environ. Microbiol.* (Soumis).

PESCE S., BARDOT C., BOHATIER J., BATISSON I., LEHOURS A.C. & FAJON C. A phylogenetic approach of the effects of diuron in microcosms on a natural riverine bacterial community composition using PCR-TTGE analysis. *Microbial. Ecol.* (Soumis).

COMMUNICATIONS ORALES EN CONGRES NATIONAUX ET INTERNATIONAUX :

PESCE S., FAJON C., BARDOT C., BONNEMOY F., PORTELLI C. & BOHATIER J., 2006 Ecotoxicité du diuron en milieu lotique : la réponse du compartiment bactérien d'un cours d'eau récepteur. Etude expérimentale en microcosmes.
8ème Conférence Internationale des Limnologues d'Expression Française. Hammamet, Tunisie.

PESCE S., FAJON C., BARDOT C., BONNEMOY F., PORTELLI C. & BOHATIER J., 2005. Impact du diuron sur l'activité et la structure de communautés microbiennes issues d'un milieu aquatique lotique récepteur : le Jauron (Puy-de-Dôme).
7èmes Journées d'Ecologie Fonctionnelle, Super-Besse.

PESCE S., FAJON C., BARDOT C., BONNEMOY F., PORTELLI C. & BOHATIER J., 2004. Influence de produits phytosanitaires sur les communautés microbiennes planctoniques au sein d'un milieu aquatique lotique récepteur : le Jauron (Puy de Dôme, France).
47ème Congrès de l'Association Française de Limnologie, Besançon.

PESCE S., FAJON C., MAILHOT G., BARDOT C. & PORTELLI C., 2003. Impact du diuron et de ses produits de transformation sur l'activité et la diversité des communautés phytoplanctoniques et bactériennes : approche expérimentale en microcosmes.
41ème Réunion du Groupement des Protistologues de Langue Française, Clermont-Ferrand.

COMMUNICATIONS AFFICHEES EN CONGRES INTERNATIONAUX :

PESCE S., FAJON C., BARDOT C., BONNEMOY F., PORTELLI C. & BOHATIER J., 2006. Ecotoxicology of the herbicide diuron : the response of natural riverine microbial communities in aquatic microcosms.
Workshop "Analytical Chemistry and Ecotoxicology", Genève, Suisse.

PESCE S., FAJON C., BARDOT C., BONNEMOY F., PORTELLI C., BATISSON I., BOHATIER J., 2005.Effects of diuron on natural riverine phytoplanktonic and bacterial communities in experimental study.
9th Symposium on Aquatic Microbial Ecology, Helsinki,Finlande.

PESCE S., FAJON C., MAILHOT G., BARDOT C., BONNEMOY F., BOHATIER J., 2003. Effects of Diuron on physiological activity and structure of natural bacteria community determined by fluorescent *in situ* hybridization and TTGE analysis in experimental study.
7th International Conference of the Aquatic Ecosystem Health and Management Society, Lyon.

AUTRES TRAVAUX

Certaines études, réalisées parallèlement au travail décrit dans ce manuscrit à partir de collaborations scientifiques, ont également été valorisées.

PUBLICATIONS :

LEHOURS A.C., BARDOT C., GUEDON A., **PESCE S.**, DEMEURE G., SARGOS D. & FONTY G., 2006. Successions des communautés bactérienne en réponse à l'anoxie dans l'hypolimnion d'un lac eutrophe : le lac d'Aydat (Auvergne). *Bulletin de la Société Française de Microbiologie* (Sous presse).

BATISSON I., **PESCE S.**, BESSE-HOGGAN P., SANCELME M. & BOHATIER J. Isolation and characterization of diuron-degrading bacteria from lotic surface water. *Microbial. Ecol.* (En révision).

LEHOURS A.C., BARDOT C., PELISSON P.F., GUEDON A., **PESCE S.**, DEMEURE G., SARGOS D. & FONTY G. Successionnal changes in bacterial community assemblages in response to anoxia in the hypolimnion of an eutrophic lake. *Oikos* (soumis).

COMMUNICATIONS ORALES EN CONGRES NATIONAL :

LEHOURS A.C., BARDOT C., GUEDON A., GUEDON A., **PESCE S.**, DEMEURE G., SARGOS D. & FONTY G., 2006. Succession des communautés bactériennes en réponse à l'anoxie dans l'hypolimnion d'un lac eutrophe et dimictique : le lac d'Aydat.
Congrès « Anaerobe » de la Société Française de Microbiologie, Lille.

COMMUNICATIONS AFFICHEES EN CONGRES INTERNATIONAUX :

BATISSON I., **PESCE S.,** GUYOT S., BOHATIER J., 2006. Etude de la diversité bactérienne aquatique soumise à l'impact de pesticides : isolement et identification de souches « adaptées » au diuron.
8ème Conférence Internationale des Limnologues d'Expression Française. Hammamet, Tunisie.

BATISSON I., **PESCE S.,** GUYOT S., BOHATIER J., 2006. TTGE analysis of aquatic bacterial diversity exposed to pesticides in laboratory microcosm conditions.
9th Symposium on Aquatic Microbial Ecology, Helsinki,Finlande.

LEHOURS A.C., BARDOT C., PELISSON P.F., GUEDON A., **PESCE S.**, DEMEURE G., SARGOS D. & FONTY G., 2006. Successionnal changes in bacterial community assemblages in response to anoxia in the hypolimnion of an eutrophic lake.: Lake Aydat (France).
International Symposium of Microbial Ecology, Viennne, Autriche.

ELSEVIER

Aquatic Toxicology 78 (2006) 303–314

AQUATIC TOXICOLOGY

www.elsevier.com/locate/aquatox

Effects of the phenylurea herbicide diuron on natural riverine microbial communities in an experimental study

Stéphane Pesce, Céline Fajon *, Corinne Bardot, Frédérique Bonnemoy, Christophe Portelli, Jacques Bohatier

Laboratoire de Biologie des Protistes, UMR CNRS 6023, Université Blaise Pascal, 63177 Aubière Cedex, France

Received 16 January 2006; received in revised form 16 March 2006; accepted 19 March 2006

Abstract

The effects of the phenylurea herbicide diuron ($10\,\mu g\,l^{-1}$) on natural riverine microbial communities were investigated using a three-week laboratory microcosm study. During the first six days, a latency period was observed both in the algal and the bacterial communities despite favorable abiotic conditions and independently of diuron exposure. From the second week, an intense algal bloom (chlorophyll *a* concentrations and cell abundances) was observed in the uncontaminated microcosms but not in the treated microcosms. The bloom stimulated the bacterial community and led to an increase in heterotrophic bacterial production ([^{3}H]thymidine incorporation), activity (CTC reduction) and cell abundance. In parallel, shifts in bacterial community composition were recorded by polymerase chain reaction (PCR)–temporal temperature gradient gel electrophoresis (TTGE) analysis, whereas no major variation was detected using the fluorescent in situ hybridization (FISH) method. In the treated microcosms, the diuron acted not by damaging the initial communities but by inhibiting the algal bloom and indirectly maintaining constant bacterial conditions throughout the experiment. These inhibitory effects, which were recorded in terms of abundance, activity and diversity, suggest that exposure to diuron can decrease the recovery capacities of microbial communities and delay the resumption of an efficient microbial food web despite favorable environmental conditions.
© 2006 Elsevier B.V. All rights reserved.

Keywords: Community analysis; Bacteria; Microalgae; Microcosm; Diuron; Lotic system

1. Introduction

Pollution of aquatic ecosystems by pesticide contamination is a major environmental concern. Numerous studies have been conducted to determine the occurrence of these xenobiotics in European streams and rivers (e.g. Gerecke et al., 2002; Carabias-Martínez et al., 2003; Cerejeira et al., 2003). In France, the Jauron River (Puy de Dôme), a first- and second-order stream located 25 km SE of Clermont-Ferrand, is monitored by a pesticide pollution watch net. This river which is characterized by meso-eutrophic conditions in spring and summer (Fajon et al., unpublished data) is frequently polluted by numerous chemical compounds, especially the phenylurea herbicide diuron (3-(3,4-dichlorophenyl)-1,1-dimethylurea). This molecule was detected 20 times between 2000 and 2003 (monthly sampling) in six sampling sites located on the Jauron river with a range from 0.05 to $4.21\,\mu g\,l^{-1}$ (Phyt'eauvergne, 2004). In French rivers diuron is detected in 38% of surface waters and its concentration ranges from 0.05 to $20.3\,\mu g\,l^{-1}$ (IFEN, 2000). This substituted urea herbicide used for total control of weeds and mosses inhibits photosynthesis by preventing oxygen production (Wessels and Van der Veen, 1956) and blocks electron transfer at photosystem II of photosynthetic microorganisms and plants. The intensive use of this xenobiotic leads to surface water contamination by soil leaching and overland flow (Garmouma et al., 1997; Louchart et al., 2000; Barra Caracciolo et al., 2005) in agricultural (Thurman et al., 2000; Mitchell et al., 2005) and urban areas (Revitt et al., 2002; Blanchoud et al., 2004). The toxic properties of diuron mean that this contamination poses significant toxicological risk to resident aquatic organisms. Because of their physiological characteristics, planktonic and periphytic microalgae represent potential primary targets for herbicides in lotic ecosystems. Previous studies based on single-species toxicity tests have reported a wide variation in algal sensitivity to

* Corresponding author. Tel.: +33 473407465; fax: +33 473407670.
E-mail address: celine.fajon@univ-bpclermont.fr (C. Fajon).

0166-445X/$ – see front matter © 2006 Elsevier B.V. All rights reserved.
doi:10.1016/j.aquatox.2006.03.006

diuron, whether used individually or mixed with other pesticides (Flum and Shannon, 1987; Schafer et al., 1994; DeLorenzo et al., 2001). Furthermore, diuron has proved to be the most toxic phenylurea for the reproduction of the green freshwater alga *Scenedesmus vacuolatus* (Backhaus et al., 2004). Studies carried out at community level have also shown that diuron can affect planktonic and periphytic microalgae by reducing chlorophyll *a* levels and primary productivity and by modifying community structure and species richness (Molander and Blanck, 1992; Arrhenius et al., 2004; Perschbacher and Ludwig, 2004). Bioluminescent-based bacterial biosensors have shown that diuron can also be directly toxic to certain bacterial species (Canna-Michaelidou and Nicolaou, 1996; Strachan et al., 2001; Tixier et al., 2001). Primary productivity and its processing by the food web create a heterogeneous environment of particulate, colloidal and dissolved organic matter (Riemann et al., 2000). We hypothesize that following diuron exposure, the alteration of photosynthesis mechanism leading to cell lysis could contribute to increase the organic matter. In aquatic ecosystems, bacterial populations play an essential role in the biodegradation of organic matter and in nutrient cycling. A variation in the organic matter content and in its composition (bioavailability) can induce pronounced changes in bacterial abundance, productivity, enzymatic activities and bacterial diversity (Van Hannen et al., 1999; Riemann et al., 2000; Crump et al., 2003). An inefficiency of bacterial degradation could lead to accumulation of organic matter. So diuron can indirectly disturb bacterial communities and, related to the key role played by these microorganisms in aquatic environments, subsequently alter the stability of the ecosystem (Flum and Shannon, 1987; Perschbacher and Ludwig, 2004). Although the toxicology, fate and chemistry of phenyl urea herbicide have been widely studied (El Fantroussi et al., 1999; Prado and Airoldi, 2002), the only studies on its community effects concern soil ecosystems. Diuron has been shown to have effects on soil bacterial community structure (El Fantroussi et al., 1999) and decrease bacterial activity (Prado and Airoldi, 2002). There is little documented evidence on the impact of diuron on activity and diversity at bacterial community level in aquatic ecosystems (Sumpono et al., 2003). Until recently, the bacterial communities were studied by conventional methods based on cultivation and subsequent measurements of metabolic activities. Among microbial communities, all the cells do not express the same sensitivities towards pollutants such as diuron. The use of molecular approaches based on the separation of ribosomal gene sequences directly amplified from community DNA on denaturing gel according to their melting properties (as TTGE method) allows to monitor the structural diversity of microbial communities (Muyzer, 1999).

The aim of our ecotoxicological approach was therefore to assess the impact of diuron on two biological communities, the algal and bacterial ones. Toxicity assessment focused on the diversity and activity of natural periphytic and planktonic microorganisms derived from a French stream, the Jauron River. To understand and follow these effects step by step, a laboratory microcosm study was conducted for 21 days to reproduce a realistic single exposure to diuron (10 $\mu g\,l^{-1}$) under fully controlled conditions.

2. Materials and methods

2.1. Microcosms and experimental design

Six 3-l Pyrex Erlenmeyer laboratory flask microcosms were used to investigate the influence of diuron exposure on natural microbial communities responses. Twenty-five liters of stream water and five stones randomly chosen on the river bed were collected from the Jauron River (Puy de Dôme, France) on 11 May, 2004. This sampling time was chosen before spread of diuron, according to agricultural practices on the Jauron watershed basin, in order to precede water contamination by this herbicide. At the laboratory, the water was immediately filtered through a 100 μm nylon mesh net to eliminate most of the algal grazers, homogenized in a basin, and 2.23 l was transferred into each of the six microcosms. An epilithon suspension was prepared from the five stones collected: the stones (approximate total surface area of 200 cm^2) were carefully scraped with a slide (Aloi, 1990), and the epilithon was scrubbed and resuspended in a total volume of 600 ml of river water. This suspension was also filtered through a 100 μm nylon mesh net, homogenized, and 70 ml was added into each of the previously filled microcosms.

At the start of the experiment, three microcosms were contaminated by diuron to give an initial nominal concentration of 10 $\mu g\,l^{-1}$ representing high levels detected in natural streams (Blanchoud et al., 2004; Mitchell et al., 2005). The remaining three microcosms were used as replicate controls.

The six microcosms were installed on a permanent agitator plate in a climate room at a constant temperature of 14 °C (to reproduce the temperature measured in situ) with a 12-h light:12-h dark cycle (fluorescent tubes, Mazda Prestiflux, total light intensity about 4000 lx). The experiment was conducted for 21 days. For each parameter, samples were collected on days 0, 1, 3, 6, 10, 14 and 21.

2.2. Water quality parameters

Diuron concentration in the three contaminated microcosms was measured at each sampling time by liquid chromatography and mass spectrometry. Samples were analyzed by direct injection (5 μl) using a C18 column (15 cm × 2.1 mm, 5 μM particle diameter) with ammonium acetate (pH 6.5) mobile phase. A control was performed at the start of the experiment to check the absence of diuron in the river. Dissolved oxygen (DO) and pH were measured in the morning at the start of the photoperiod using a WTW oxygen meter (OXI96) and a Schott pH-meter (CG818), respectively. Concentrations of N-NH_4, N-NO_3, N-NO_2 and P-PO_4 were determined by spectrophotometric assays (Secoman S500) using Merck Spectroquant® test kits 1.14752.0001, 1.14773.0001, 1.14776.0001 and 1.14842.0001, respectively. Dissolved organic carbon (DOC) concentrations were measured with an integrated system including a Shimadzu TOC 5000 carbon analyzer according to the protocol described by Fajon et al. (1999).

2.3. Chlorophyll a levels and phytoplankton cell counts

Samples for photosynthetic pigment analyses (50 ml) were filtered onto glass fiber filters (25-mm GF/F; Whatman) and frozen at −80 °C. Chlorophyll *a* (Chl *a*) was extracted for 24 h with 90% acetone and measured by spectrophotometry according to the methods recommended by the SCOR-UNESCO Working Group 17 (1966). For qualitative and quantitative analysis of phytoplankton, 30 ml samples were fixed with Lugol's iodine solution (2%, final concentration) and cells were calculated with an inverted microscope using sedimentation chambers. Algal cells were identified to genus level.

2.4. Bacterial abundance

Bacterial abundance was determined using epifluorescence microscopy (Kepner and Pratt, 1994). Samples (2 ml) were fixed with formaldehyde (2%, final concentration) and analyzed by DAPI-staining according to the protocol previously described by Sumpono et al. (2003).

2.5. Bacterial physiological activity

The most metabolically active bacteria were determined as those able to reduce the tetrazolium salt 5-cyano-2,3-ditolyl tetrazolium chloride (CTC) which is commonly used to detect cells with an effective respiratory electron transport chain (Del Giorgio et al., 1997). Samples (2 ml) were stained by incubation with a CTC solution (Polysciences, 5 mM, final concentration) at ambient temperature for 4 h and then fixed with formaldehyde (2%, final concentration). Total bacteria were DAPI-stained as described previously, and counted using a microscope (Olympus BH2) equipped with adapted filter blocks (Rodriguez et al., 1992).

2.6. Bacterial heterotrophic production

The heterotrophic production of the bacterial community was estimated by the rate of incorporation of tritiated thymidine (Bell, 1993). Methyl-[^{3}H]thymidine (86 Ci mmol l^{-1}, Amersham) was added to the samples at a final concentration of 10 nM. Sub-samples (10 ml) were incubated in duplicate at ambient temperature in darkness. Two blanks were also processed and immediately fixed with trichloroacetic acid (TCA; Sigma, 10%, final concentration). After incubation for 1 h, the sub-samples were fixed with TCA (10%, final concentration), filtered onto 0.22 μm pore-size cellulose ester membrane filters (Millipore GS, 25 mm filter diameter) and washed on filters five times with 2 ml of ice-cold 5% TCA and once with 5 ml of ethanol 70%. The filters were then placed in a 5 ml scintillation cocktail and screened for radioactivity using a liquid scintillation counter (Beckman Coulter, LS6500). Thymidine incorporation rates were converted into microbial production using a theoretical conversion factor of 2×10^{18} cells produced per mole of thymidine incorporated (Bell, 1993).

Table 1
Oligonucleotide probes used in this study

Probe	Specificity	Target position[a]	FA[b] (%)	Reference
ALF1b	α subclass of Proteobacteria	16S, 19–35	20	Manz et al. (1992)
BET42a	β subclass of Proteobacteria	23S, 1027–1043	35	Manz et al. (1992)
GAM42a	γ subclass of Proteobacteria	23S, 1027–1043	35	Manz et al. (1992)
CF319a	*Cytophaga–Flavobacterium* cluster of CFB phylum	16S, 319–336	35	Manz et al. (1996)

[a] *E. coli* numbering.
[b] Percentage of formamide (FA) in hybridization buffer.

2.7. Bacterial community structure

The global phylogenetic structure of the bacterial community was investigated by fluorescent in situ hybridization (FISH) with oligonucleotide probes specific for detection of four major phylogenetic groups (Amann et al., 1995). Samples (40 ml) were fixed overnight in paraformaldehyde (3%, final concentration) and centrifuged (8500 × *g*, 4 °C) for 25 min. The resulting pellet was washed with 20 ml of sterile PBS 1×, centrifuged (8500 × *g*, 4 °C) for 25 min, dried, resuspended in 1 ml ethanol 70%/PBS 1× (v/v) and kept at −20 °C until hybridization. Probes were used to detect bacteria of the α-subdivision (ALF1b), β-subdivision (BET42a) and γ-subdivision (GAM42a) of Proteobacteria and of the *Cytophaga–Flavobacterium* cluster (CF319a) due to the predominance of these groups in river waters (Kenzaka et al., 2001; Klammer et al., 2002; Araya et al., 2003). Probe specificities, hybridization conditions and references are given in Table 1. The probes were fluorescently labeled with the indocarbocyanine dye Cy3 (MWG-Biotech). Probes BET42a and GAM42a were used with competitor probes as described previously (Manz et al., 1992). An appropriate volume was filtered on a 0.22 μm polycarbonate filter (Millipore, GTTP). Hybridization and DAPI-staining were performed as described by Araya et al. (2003). Finally, filter sections were mounted on glass slides with Citifluor oil, and the slides were observed with an inverted Leica epifluorescence microscope (1000× magnification) equipped with a filter for UV excitation (DAPI) and green excitation (Cy3).

2.8. Bacterial community diversity

The genetic diversity of the bacterial community was determined by temporal temperature gradient gel electrophoresis (TTGE) of polymerase chain reaction (PCR) amplified 16S rRNA genes (Muyzer, 1999).

2.8.1. DNA extraction and purification

Genomic DNA was extracted following the method described by Langenheder et al. (2003), with slight modifications. Samples (40 ml) were immediately centrifuged (15,000 × *g*, 4 °C) for 45 min and the resulting pellet was resuspended in 545 μl

TE buffer (pH 8). Cells were lysed with lysozyme (Sigma, 2 mg ml^{-1}, 30 min at 37 °C) and then mixed with sodium dodecyl sulfate (SDS, final concentration 0.5%) and proteinase K (Sigma, final concentration 100 μg ml^{-1}), and incubated for 1 h at 37 °C. Cell debris, proteins and humic substances were removed by adding a solution of cetyltrimethylammonium bromide (CTAB) and NaCl (1%, w/v, and 0.7 M, respectively) for 10 min at 65 °C. CTAB–protein/polysaccharide complexes were extracted with 1 volume of CHCl3/isoamylalcohol (24:1) after centrifugation (10,000 × *g*, 4 °C, 5 min). Nucleic acids were precipitated with ice-cold isopropanol, washed with 70% ethanol, then dried and dissolved overnight in 50 μl of TE buffer (pH 8) at 4 °C. RNAs were eliminated by incubation with Rnase A (Sigma, final concentration 100 μg ml^{-1}) for 30 min at 37 °C. Genomic DNA was precipitated by adding 0.1 volume sodium acetate (3 M, pH 5.2) and 0.6 volume ice-cold isopropanol, washed with 70% ethanol, dried, suspended in 50 μl TE buffer, and stored at 4 °C.

2.8.2. PCR amplification

A 16S rRNA gene fragment was amplified by PCR using the primers (MWG-Biotech) GC-968f (5′-CGC CCG GGG CGC GCC CCG GGC GGG GCG GGG GCA CGG GGG GAA CGC GAA GAA CCT-3′) and 1401r (5′-CGG TGT GTA CAA GAC CC-3′) to amplify the V6–V8 regions (Lay et al., 2004). The GC-clamp was attached to the 968f primer to prevent complete melting of amplicons during TTGE (Sheffield et al., 1989). The PCR mix (50 μl) contained 1× PCR buffer, 2.5 mM $MgCl_2$, 200 μM of each dNTP, 20 pmol of each primer, 2.5 units of HotStart Taq DNA polymerase (Qiagen) and 5 μl of genomic DNA. The samples were amplified in a GeneAmp PCR system 2400 thermocycler (Perkin-Elmer) using the following program: 95 °C for 15 min, 30 cycles at 97 °C for 1 min, 58 °C for 1 min and 72 °C for 90 s, and finally 72 °C for 15 min. PCR products were analyzed by electrophoresis on 0.8% agarose gel (w/v) containing ethidium bromide. DNA was quantified by Fluorescence Assay (DNA quantitation Kit—Sigma).

2.8.3. Temporal temperature gradient gel electrophoresis

Electrophoresis was performed as previously described by Lay et al. (2004) using a Dcode Universal Mutation Detection System (Bio-Rad). Three hundred nanograms of PCR products was loaded on an 8% polyacrylamide gel (w/v) containing 7 M urea, 1.25× Tris–acetate–EDTA (TAE), 0.06% TEMED and 0.06% ammonium persulfate (w/v). Seven liters of 1.25× TAE was used as electrophoresis buffer. At the beginning of electrophoresis, the voltage was set at a constant 20 V for 15 min. Electrophoresis was run for 17 h at 68 V with a temperature ranging from 66 to 69.7 °C and a ramp rate of 0.2 °C/h. The reference patterns consisted of a mixture of V6–V8-amplified 16S rDNA fragments of four bacterial strains (*Alcaligenes faecalis*, *Flavobacterium aquatile*, *Kurthia zopfii* and *Stenotrophomonas maltophilia*). After electrophoresis, the gels were stained in the dark by immersion for 1 h in a Gel Star nucleic acid gel stain bath (BMA) and digitized using a Versa Doc™ Imaging System (Bio-Rad). Image analysis of TTGE gels was performed using QUANTITY ONE-4.6 software (Bio-Rad). Based on band presence/absence and band weighting (band density) analysis, a dendrogram was constructed using the DICE coefficient and the unweighted pair group method using arithmetic averages (UPGMA).

2.9. Statistical analysis

Statistical analysis of the effects of diuron on physicochemical and biological parameters was performed using a two-way (diuron × time) analysis of variance (ANOVA) with repeated measures (i.e. microcosms). Statistical significance was set at $p = 0.05$ and analysis was computed using the Minitab package.

3. Results

3.1. Diuron concentrations and physicochemical parameters

As expected, no diuron was detected at the initial sampling time in the riverine water used to inoculate the microcosms (data not shown). The evolution of diuron concentrations in the treated microcosms is shown in Table 2. The concentrations in the three replicates were very similar (8.15 ± 0.15 μg l^{-1}), slightly lower than those expected (10 μg l^{-1}) and remained constant over the 21 days, thus revealing a high persistence of the herbicide in the water.

Temporal changes of the different physicochemical parameters measured are illustrated in Fig. 1. pH values remained close to 8.50 in the treated microcosms and decreased slightly from day 10 (8.26 ± 0.05 on day 21) in the controls ($p < 0.05$) (Fig. 1A). Dissolved oxygen concentrations displayed a similar time course in treated and control microcosms. The concentrations peaked at day 6 (about 92% of saturation) and decreased during the second part of the experiment (Fig. 1B). Nitrate concentrations were high (>3.4 mg N l^{-1}) and showed between-replicate variation during the course of the experiment, but there was no correlation with diuron exposure (Fig. 1C). Nitrite concentrations remained at a constant low level (0.10 ± 0.02 mg N l^{-1}) in the control microcosms and increased between days 3 and 10 (0.20 ± 0.00 mg N l^{-1}) in the treated microcosms ($p < 0.01$) (Fig. 1D). Initial ammonia levels were close to 0.06 mg N l^{-1} and dropped sharply after the third day, without statistical difference between control and treated microcosms (Fig. 1E). Orthophosphate content fluctuated in all the microcosms during the first 10 days (0.11–0.26 mg l^{-1}) and decreased slightly in the treated microcosms during the last week of the experiment (0.05 ± 0.01 mg N l^{-1} on day 21). However, there was no statistically significant difference for this parameter

Table 2
Evolution of diuron concentrations in the three treated microcosms (μg l^{-1})

Replicate no.	Day 0	Day 1	Day 3	Day 6	Day 10	Day 14	Day 21
a	8.3	8.4	8.4	8.1	8.1	8.2	8.4
b	8.3	7.9	8.0	8.1	8	8.3	8.1
c	8.0	8.1	8.0	8.0	8.3	8.1	8.1

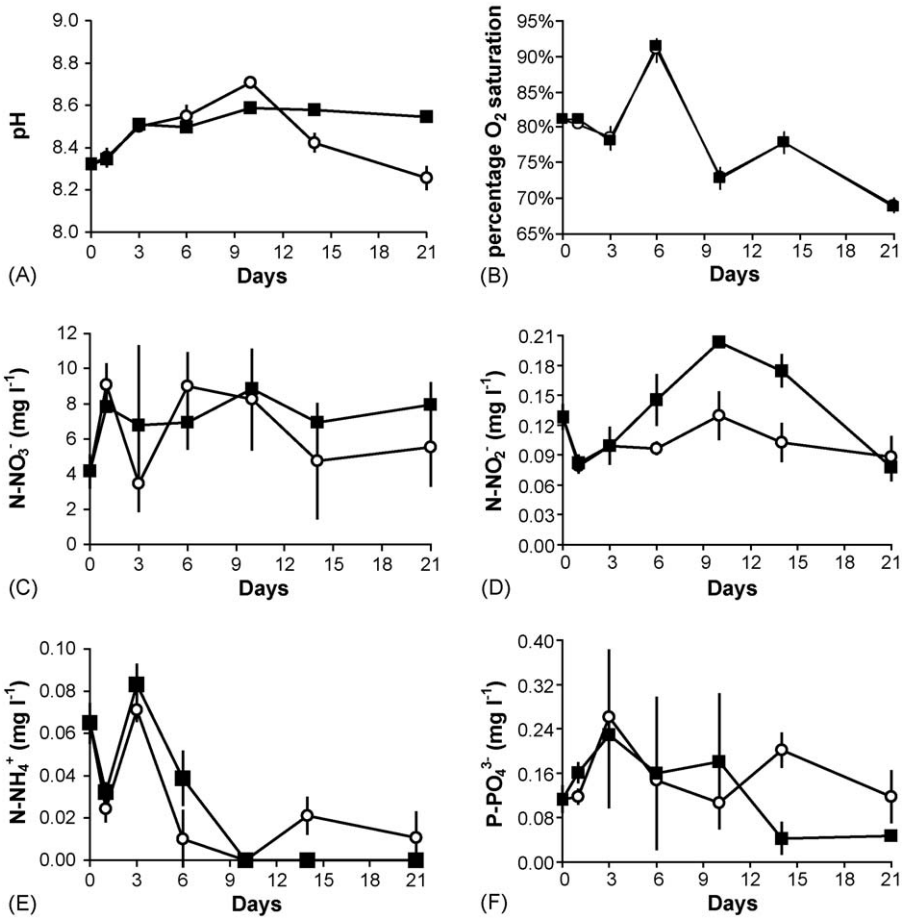


Fig. 1. Evolution of pH values (A), dissolved oxygen (B), and N-NO_3^- (C), N-NO_2^- (D), N-NH_4^+ (E) and P-PO_4^{3-} (F) concentrations in control (◯) and treated microcosms (■). Data are presented as means ± S.D. calculated from the three replicate microcosms.

between control and treated microcosms. Throughout the course of the experiment, dissolved organic carbon content (Fig. 2) followed a parallel evolution in the six microcosms but was significantly lower in control (2.74–7.44 mg l^{-1}) than in treated microcosms (6.07–11.65 mg l^{-1}). During the three weeks of the study, abiotic water conditions seemed favorable to microbial communities in all the microcosms.

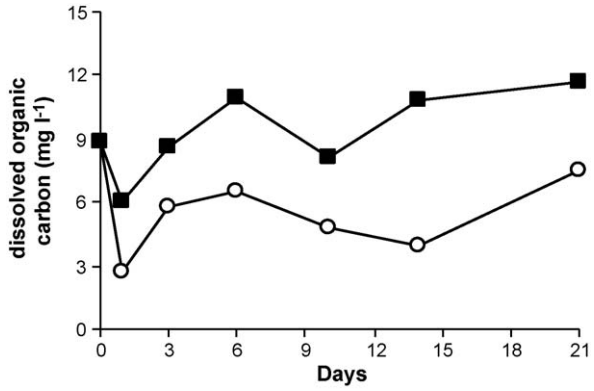


Fig. 2. Evolution of minimum dissolved organic carbon concentrations in control (◯) and treated microcosms (■).

3.2. Chlorophyll a concentrations and algal abundances

Fig. 3A shows the effects of diuron addition on Chl *a* concentrations. Two periods were clearly distinguished during the experiment. During the first six days, Chl *a* concentrations were close to the detection threshold and below 9 μg l^{-1} in all the microcosms, despite the high nutrient contents. After the sixth day, Chl *a* concentrations increased sharply in control microcosms (254.5 ± 48.2 μg l^{-1} on day 14), whereas they remained low in the treated microcosms for the duration of the experiment. Chl *a* concentrations were thus significantly lower in communities exposed to diuron than in controls on days 10, 14 and 21 ($p < 0.001$). An increase of Chl *a* contents was, however, noticed in the diuron exposure microcosms at the final sampling time (71.0 ± 10.3 μg Chl *a* l^{-1} on day 21).

As expected from the changes in Chl *a* concentrations, algal density increased strongly from day 6 in the control microcosms, with high variability between replicates (Fig. 3B). The peak value was recorded in the second control microcosm on day 10 (>6500 cells ml^{-1}). In contrast, diuron exposure kept algal density at a low level. In the treated microcosms, cell abundances were slightly lower than the initial value in the subsequent sample (555.5 ± 47.8 cells ml^{-1}) and decreased throughout the experiment until day 21 (90.1 ± 18.0 cells ml^{-1}).

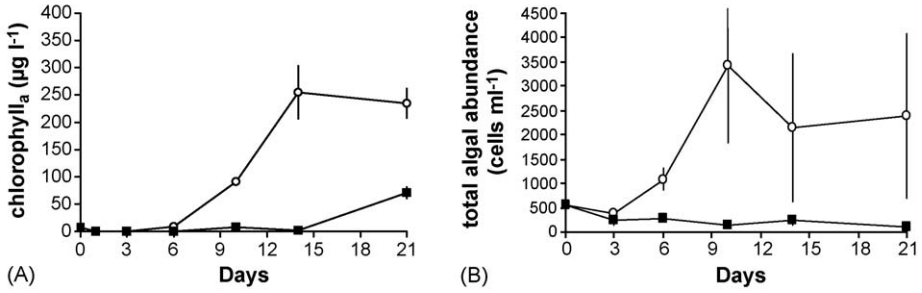


Fig. 3. Average evolution (±S.D.) of chlorophyll *a* concentrations (A) and total algal abundance (B) in control (◯) and treated (■) microcosms.

The diuron exposure clearly prevented the algal bloom observed in controls, maintaining low Chl *a* concentrations and small algal cells abundances throughout the duration of the experiment.

3.3. Algal community structure

The initial algal community consisted of six major genera stemming from the stream water column and from the scrubbed stones (Fig. 4). The community was dominated by pennate diatoms (*Navicula*, *Nitzschia* and *Gomphonema*), centric diatoms (*Cyclotella*) and Chlorophyceae (*Scenedesmus* and *Ankistrodesmus*), which is consistent with common algal composition in streams (Dorigo et al., 2004; Leira and Sabater, 2005). Their initial relative abundances were about 74, 16 and 10%, respectively, with a predominance of the *Navicula* genus (56.1 ± 1.3%). In the diuron exposure microcosms, the community structure remained relatively stable and homogeneous between replicates throughout the experiment. Under diuron exposure, the algal community consisted of four genera (*Gomphonema*, *Navicula*, *Nitzschia* and *Scenedesmus*) with a high predominance of pennate diatoms (72–100%). In contrast, the community structure presented high variability between the three control replicates from the second week, as noted with total algal abundances. Indeed, from day 6, a bloom of the *Cyclotella* species appeared in two control microcosms. This genus was thus the most predominant in these microcosms at day 10 (62–68%) but this dominance persisted in only one of these microcosms during the last week. The *Navicula* species were also well represented in controls throughout the experiment (16–73% according to *Cyclotella* abundance) and were always more abundant than in treated microcosms. From day 6, three algal genera (*Asterionella*, *Cyclotella* and *Oocystis*) were only present, either permanently or on a point-to-point basis, within the control microcosms and were not able to develop under diuron exposure. The herbicide thus affected algal community composition, and most of the genera identified were less abundant in treated microcosms compared to the controls during the 21 days of the experiment, despite similar nutritive conditions.

3.4. Bacterial density and heterotrophic production

Initial bacterial density was about 6×10^6 cells ml^{-1} (Fig. 5A). From the start of the study, the containment effects coupled with favorable abiotic conditions strongly stimulated bacterial productivity (Sanford et al., 2001). Thus, during the first day, the incorporation rate of [^{3}H]thymidine increased seven-fold and production reached about 25×10^4 cells ml^{-1} h^{-1} (Fig. 5B) in control and treated microcosms. Between days 1 and 6, bacterial density and heterotrophic bacterial production decreased and stabilized at around 1.5×10^6 cells ml^{-1} and 7.5×10^4 cells ml^{-1} h^{-1}, respectively. No difference was observed between control and treated microcosms for these two parameters during the first six days.

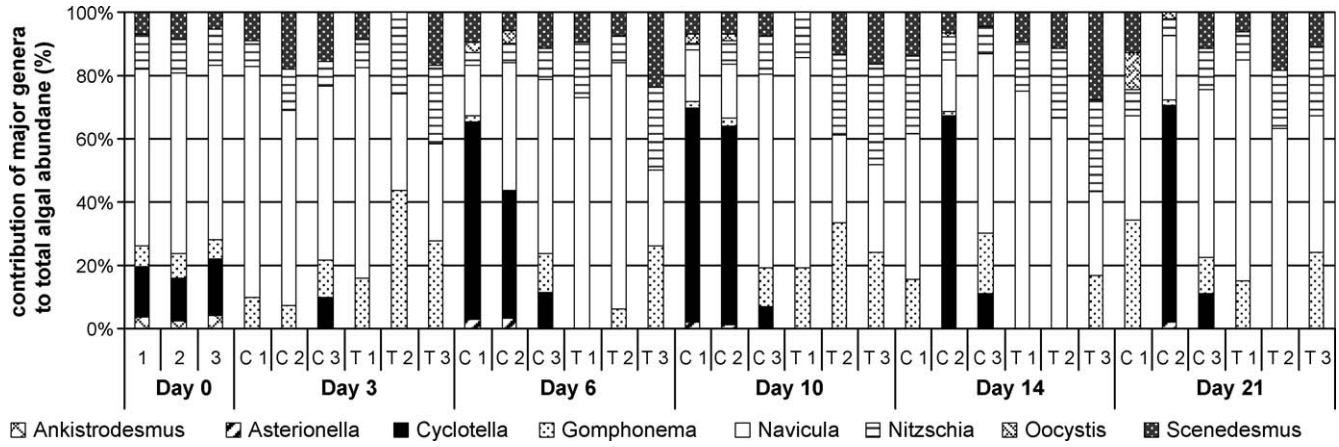


Fig. 4. Evolution of algal community composition in control (C1, C2 and C3) and treated (T1, T2 and T3) microcosms from days 0 to 21.

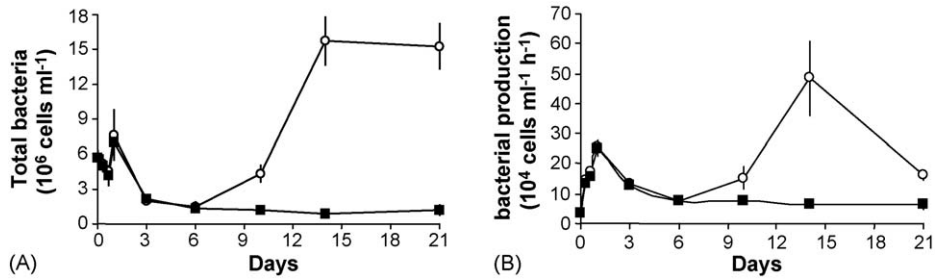


Fig. 5. Average evolution (±S.D.) of total bacteria (A) and bacterial production (B) in control (◯) and treated (■) microcosms.

In controls, the algal bloom recorded from day 6 was correlated with a recovery in bacterial productivity ([Chl *a*] correlated with bacterial counts ($r^2 = 0.735$, $p < 0.001$) and bacterial production ($r^2 = 0.4125$ $p < 0.01$)). In these microcosms, total bacterial abundance and heterotrophic bacterial production increased approximately 10-fold and 15-fold, respectively, and peaked on day 14. Nevertheless, between days 14 and 21, bacterial production declined, whereas bacterial densities stabilized in all three control microcosms. In the treated microcosms, bacterial abundance and production remained lower than 1.5×10^6 cells ml^{-1} and 8.0×10^4 cells ml^{-1} h^{-1}, respectively, during the last two weeks.

3.5. Bacterial physiological activity

Initial relative abundance of CTC-positive bacteria cells was about 2% (Fig. 6). The fraction of CTC-positive bacteria seemed to be favored by the experimental device independently of diuron contamination, and increased until day 6 (8.4 ± 1.1%) before returning to a level close to the initial threshold on day 10. In the control microcosms, the fraction of CTC-positive bacteria cells increased again on day 14 (6.8 ± 1.4%) and day 21 (9.4 ± 1.0%), whereas it remained below 3% until the end of the experiment in the treated microcosms.

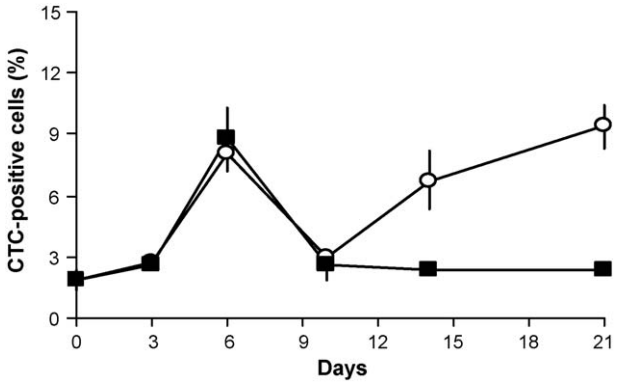


Fig. 6. Average evolution (±S.D.) of percentage of CTC-positive bacteria in control (◯) and treated (■) microcosms.

3.6. Bacterial community structure

Fig. 7 shows the temporal changes of relative abundances of the main subclasses of the bacterial groups. The proportion of DAPI-stained cells which were hybridized with all the four probes tested fluctuated between 28 and 57% (data not shown). Characterization of the initial bacterial community revealed that about 6.4% of the cells were detected by

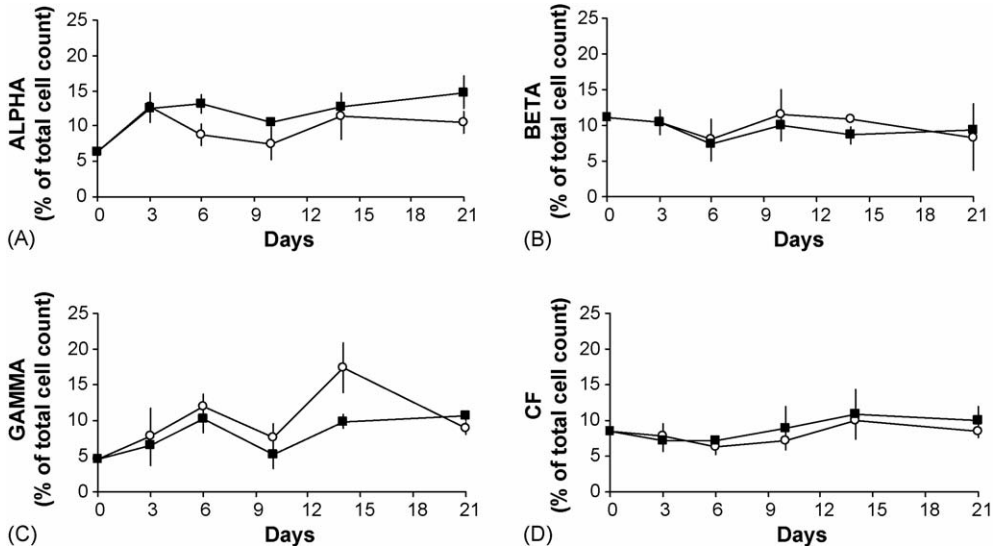


Fig. 7. Average evolution (±S.D.) of relative abundance of the main phylogenetic groups determined by FISH using ALF1b (A), BET42a (B), GAM42a (C) and CF319a (D) in control (◯) and treated (■) microcosms.

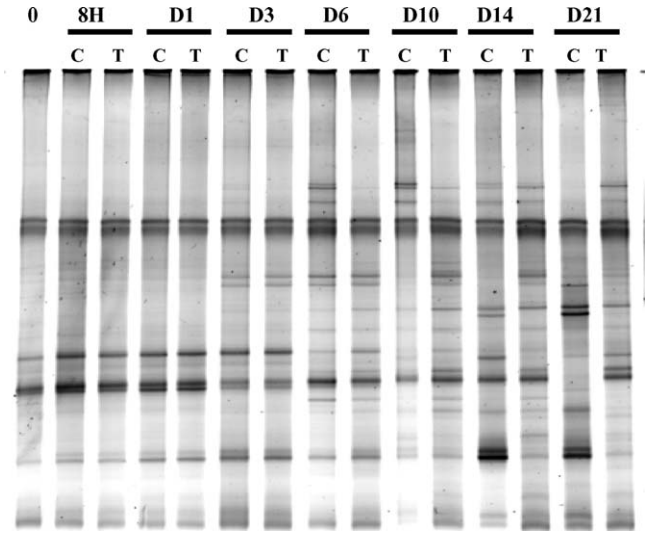


Fig. 8. Average evolution of temporal temperature gradient gel electrophoresis profiles for PCR-amplified 16S rDNA from the V6 to V8 regions in control (C) and treated (T) microcosms at day 0 (0), 8 h (8H) and from day 1 (D1) to day 21 (D21).

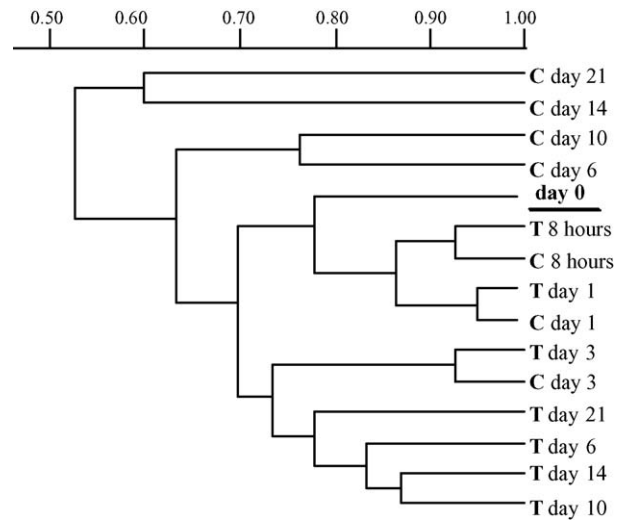


Fig. 9. UPGMA cluster analysis of DICE distance matrix calculated from TTGE banding patterns (based on presence/absence and band weighting).

a fluorescently labeled, rRNA-targeted oligonucleotide specific for the α-Proteobacteria, compared to 11.0% for the β-Proteobacteria, 4.7% for the γ-Proteobacteria and 8.5% for the *Cytophaga–Flavobacterium* cluster. The distribution of the targeted groups remained relatively stable throughout the experiment. The bacterial community structure determined by FISH did not reveal a significant difference between control and treated microcosms ($p > 0.05$). However, the fraction of γ-Proteobacteria seemed to be slightly affected by the diuron exposure during the second week of the experiment, especially at day 14 (Fig. 7C), whereas the proportion of α-Proteobacteria was slightly higher in treated microcosms than in controls (Fig. 7A).

3.7. Bacterial community diversity

We first tested the reproducibility of DNA extraction, PCR amplification and TTGE separation of amplified fragments between triplicates in the control and treated microcosms. Until day 14, the replicates generated identical banding patterns, and at day 21 only small variations were recorded between control triplicates, whereas there was no difference between the three treated microcosms (data not shown).

In order to analyze and compare the average changes of the community in the control and treated microcosms, genomic DNA extracted from replicates were pooled before PCR amplification. TTGE profiles of the bacterial community compositions over time are shown in Fig. 8. TTGE analysis revealed 19–30 bands for each sample (averaging about 24) with a total of 43 separately distinguishable bands. Similarity of patterns was calculated using the DICE coefficient with weighting of band intensities to avoid loss of information when only presence–absence data are used (Muylaert et al., 2002). Unweighted pair grouping with mathematical averages was used for clustering (Fig. 9). Cluster analysis indicated that changes in the composition of the bacterial assemblages occurred according to several dissociated periods. Until day 3, communities sampled in diuron exposure and control microcosms were very similar (similarity > 93%). During this period, two shifts in bacterial diversity were recorded independently of diuron exposure, one during the first 24 h, parallel to the stimulated bacterial productivity resulting from implementation of the microcosms, and the second between days 1 and 3. At day 3, diversity profiles recorded in control and treated microcosms were still very similar (similarity = 93%).

From day 6, bacterial community diversity varied strongly between control and treated microcosms. Between days 3 and 6, it remained relatively stable in the treated microcosms (similarity = 74%), whereas numerous changes were recorded in the control microcosms (similarity = 64%). After day 6, only few variations were recorded in the treated microcosms (similarity > 78%), whereas bacterial community diversity was still strongly changed in the controls, especially at the two last sampling times (similarity = 53%).

4. Discussion

4.1. Contamination context

The aim of our experimental microcosm study was to assess the impact of the phenylurea herbicide diuron (realistic pollution, 10 $\mu g\,l^{-1}$) on natural microbial communities collected from a potential diuron-receiving lotic system. In the three treated microcosms, diuron concentrations remained close to 8 $\mu g\,l^{-1}$ (20% lower than theoretical value) throughout the experiment. This recurrent immediate decrease in experimental studies has been already pointed out by several authors (Hartgers et al., 1998; Haynes et al., 2000; Sumpono et al., 2003) and it seems conceivable that it could be attributed to fast trapping by molecular adsorption or absorption. The persistence of the herbicide suggests that neither transformation (biotic or abiotic), significant degradation (too short delay for

induction of specific enzyme systems, according to Četkauskaité et al., 1998) nor significant desorption or release of diuron took place. The natural riverine microorganisms were thus exposed to a constant and acute contamination during 21 days but the effects of this herbicide were recorded only from day 6. The herbicide prevented the implementation and development of a productive system on and after the sixth day. The lapse before the effects revealed themselves was probably due to the properties of the initial ecosystem and microbial communities. Indeed, several authors have reported that ecosystem structure and community nutrient status can influence the final effects of pesticide exposure, both in terms of impact magnitude and recovery capacities following contamination (Barreiro Lozano and Pratt, 1994; DeLorenzo et al., 2001; Wendt-Rasch et al., 2004).

4.2. Properties of initial ecosystem and microbial communities

The initial river water used was characterized by high concentrations of phosphates (>0.1 mg P l^{-1}) and inorganic nitrogen compounds (>3.7 mg N l^{-1}) and could be considered as a mesotrophic–eutrophic boundary according to Dodds et al. (1998). However, initial chlorophyll *a* contents and bacterial densities were slightly lower than those generally found in streams with similar nutrient availability and climatic conditions (Dodds et al., 1998; Liu and Leff, 2002; Dorigo et al., 2004). These limited total microbial densities associated with low rates of CTC-positive bacteria reflect a physiological decline within the communities. Numerous environmental factors (pollution, natural environmental stress, grazing pressure, etc.) could lead to damages to microbial communities in the stream, but we did not identify a source of these possible disturbances.

Nevertheless, immediately after the microcosms were filled, we recorded a sudden acceleration in heterotrophic production. It seems to be a consequence of resources confinement and gains in bacterial nutrient uptake, generally observed in microcosm experiments (Brandt et al., 2004; Pinhassi et al., 2004). The parallel decrease in DOC concentrations is evidence of high carbon utilization, almost certainly corresponding to a fraction directly available for utilization by heterotrophic microorganisms (Eiler et al., 2003). However, this bacterial stimulation was only transient, and heterotrophic bacterial production dropped after the first 24 h.

4.3. No microbial response to herbicide addition during the first six days

Between days 1 and 6, a latency phase characterized by low activity was observed in both algal and bacterial communities in all the microcosms, despite favorable abiotic conditions. This period almost certainly reflects the time required by the microorganisms to acclimatize to the experimental conditions. During this stabilization period, the impact of diuron on the communities was either limited or barely perceptible.

4.4. Herbicide effects on the microbial communities from the sixth day

4.4.1. Untreated microcosms

During the second week, an intense algal bloom, favored by the high nutrient levels, moderate temperature (14 °C), mixing regimen (Pinhassi et al., 2004) and microcosm size (Sanford et al., 2001), was observed in the three uncontaminated microcosms only. The delay before this bloom can be compared with patterns observed in nutrient-enriched microcosm studies (Smith et al., 1995; Fajon et al., 1999; Riemann et al., 2000; Pinhassi et al., 2004) or following the disturbance of zooplankton populations and reduction of grazing pressure after contamination of aquatic ecosystems by insecticides (Caquet et al., 1992; Barry and Logan, 1998). Among phytoplanktonic community, *Cyclotella* species seemed to be particularly well adapted, becoming widely predominant in two of the three control microcosms. The opportunist character of the *Cyclotella* species has been already underlined by Van den Brink et al. (2000).

Bacterial production and density were positively correlated with phytoplankton biomass as underlined by numerous authors (Bird and Kalff, 1984; White et al., 1991; Smith et al., 1995; Castillo et al., 2004; Pinhassi et al., 2004), especially under high-nutrient conditions (Muylaert et al., 2002). At days 14 and 21, the fraction of CTC-active bacteria was also stimulated. Our microscopic observations suggested that this increase was due to the high activity rate of the phytoplankton-associated bacteria (data not shown) as it was previously shown by Sherr et al. (2002) and Smith et al. (1995), especially after a diatom bloom (Riemann et al., 2000). Bacterial development was associated with shifts in community composition. The FISH method only highlighted a significant increase in the percentage of γ-Proteobacteria between days 10 and 14. Diversity analysis revealed significant modifications in the bacterioplankton during the algal bloom, including appearance, disappearance or changes in the relative abundance (i.e. band intensity) of phylotypes in the TTGE patterns. These changes recorded after day 6 were certainly linked to changes in algal community composition (Pinhassi et al., 2004) and consequently modifications in sources of available detritus (Van Hannen et al., 1999). The reduction of heterotrophic activity during the last week, probably in connection with the decrease in orthophosphate concentrations (Brett et al., 1999; Fajon et al., 1999), stabilized the bacterial density.

4.4.2. Diuron exposure microcosms

Diuron is ranked as one of the most toxic phenylureas for algae (Arrhenius et al., 2004; Backhaus et al., 2004). In aquaculture pond mesocosms, this pollutant led to a drop in dissolved oxygen concentrations (Flum and Shannon, 1987; Hartgers et al., 1998; Sumpono et al., 2003). Molander and Blanck (1992) showed that diuron inhibited the photosynthesis of a marine periphyton community at a concentration of 3.2 nM (0.736 μg l^{-1}), which is approximately 11-fold lower than the concentrations measured in our microcosms. In our study, the intoxication level, which is representative of several pollution thresholds recorded in natural environments (Nitschke and Schüssler, 1998; Thurman et al., 2000; Mitchell et al., 2005),

clearly inhibited algal development within the microcosms (very low algal density and chlorophyll *a* content) but had no effect on dissolved oxygen levels. The preservation of a high oxygenation level (>70% of saturation) was certainly favored by the agitation mode used in our experimental design. Diuron inhibited the reproduction of *Asterionella* and *Oocystis* but the strongest impact was recorded on *Cyclotella*, leading to their total disappearance, whereas they bloomed in the control microcosms. This result conflicts with the results reported by Hartgers et al. (1998). The increase in *Cyclotella* abundance recorded in their microcosms treated with a mixture of herbicides (atrazine, diuron and metolachlor) was explained by indirect effects (release of nutrients and/or reduction of competition after the decay of sensitive species). In our study, direct toxic effects of diuron seem to be higher than these possible indirect potential positive effects following the exposure to diuron. This direct inhibition on primary producers generated an indirect negative effect on bacterial community. Indeed, heterotrophic production remained low, due to the persistence of weak algal productivity. By preventing algal cellular reproduction and consequently community growth, diuron indirectly limited the release of dissolved organic substances by phytoplankton, which is an important source of high quality carbon for bacteria (Baines and Pace, 1991; Raymond and Bauer, 2001) and the renewal of bacterial activity. However, an increase in bacterial activity following herbicide treatment has been reported by DeLorenzo et al. (1999) and was explained by a decrease in nutrient competition from phototrophs. Given the high nutrient levels in our microcosms, resource competition did not represent a limiting factor for microbial growth. The introduction of diuron has not led directly and/or indirectly to strong changes in bacterioplankton structure and diversity. The distribution of the four main phylogenetic bacterial groups remained relatively constant and TTGE patterns presented a similarity higher than 78% throughout the experiment. Some of bands which were maintained or appeared only in the diuron exposure microcosms could correspond to bacterial species that are either adapted or resistant to novel environmental conditions following diuron exposure. Sequencing of these bands may contain important phylogenic information in relation to environmental changes, and is under investigation at our laboratory.

Our results showed that natural microbial communities characterized initially by low level of activity maintained this low productivity and their taxonomic diversity when they were exposed to diuron (realistic pollution, $10\,\mu g\,l^{-1}$). Without this contamination, the favorable abiotic conditions (nutrient availability, favorable temperature and no grazing pressure) led to microbial bloom and modified the microbial diversity. However, the recovery of microbial communities was not immediate since the microorganisms required one week to acclimatize to the experimental conditions. Our results underline the importance of the initial physiological state of microorganisms in the response delay to herbicide exposure. The exposure to diuron can decrease the recovery capacities of microbial communities and delay the resumption of an efficient microbial food web despite favorable environmental conditions. According to these observations, diuron application could have a strong impact on weak microbial communities in natural ecosystems subjected to similar contamination levels. It concerns essentially small-ordered streams or rivers located on edge of agricultural fields or urban areas which are likely to be strongly affected by diuron runoff, especially after high rainfall events. Moreover, in natural polluted streams, aquatic microorganisms are not only exposed to individual pesticides but also pesticide mixtures, confronting them with numerous environmental pressures (predators, climatic and nutrient conditions). The frequency of pollution events that can affect the community or on the contrary lead to tolerance induction is doubtless also a determining factor in community responses following pollutant exposure. According to the ecological functions of microorganisms, it could then lead to indirect effects on higher trophic levels organisms and therefore on the whole ecosystem.

Acknowledgements

The authors wish to thank Phyt'eauvergne for in situ pesticide analysis and technical collaboration. Financial support for S. Pesce was provided by the Conseil Régional d'Auvergne. We also thank Isabelle Batisson for carefully proofreading the manuscript.

References

Aloi, J.E., 1990. A critical review of recent freshwater periphyton field methods. Can. J. Fish. Aquat. Sci. 47, 656–670.

Amann, R., Ludwig, W., Schleifer, K.H., 1995. Phylogenetic identification and in situ detection of individual microbial cells without cultivation. Microbiol. Rev. 59, 143–169.

Araya, R., Tani, K., Takagi, T., Yamaguchi, N., Nasu, M., 2003. Bacterial activity and community composition in stream water and biofilm from an urban river determined by fluorescent in situ hybridization and DGGE analysis. FEMS Microbiol. Ecol. 43, 111–119.

Arrhenius, Ǻ., Grönvall, F., Scholze, M., Backhaus, T., Blanck, H., 2004. Predictability of the mixture toxicity of 12 similarly acting congeneric inhibitors of photosystem II in marine periphyton and epipsammon communities. Aquat. Toxicol. 68, 351–367.

Backhaus, T., Faust, M., Scholze, M., Gramatica, P., Vighi, M., Grimme, L.H., 2004. Joint algal toxicity of phenylurea herbicides is equally predictable by concentration addition and independent action. Environ. Toxicol. Chem. 23, 258–264.

Baines, S.B., Pace, M.L., 1991. The production of dissolved organic matter by phytoplankton and its importance to bacteria: patterns across marine and freshwater systems. Limnol. Oceanogr. 36, 1078–1090.

Barra Caracciolo, A., Giuliano, G., Grenni, P., Guzzella, L., Pozzoni, F., Bottoni, P., Fava, L., Crobe, A., Orrù, M., Funari, E., 2005. Degradation and leaching of the herbicides metolachlor and diuron: a case study in an area of northern Italy. Environ. Pollut. 134, 525–534.

Barreiro Lozano, R., Pratt, J.R., 1994. Interaction of toxicants and communities: the role of nutrients. Environ. Toxicol. Chem. 13, 361–368.

Barry, M.J., Logan, D.C., 1998. The use of temporary pond microcosms for aquatic toxicity testing: direct and indirect effects of endosulfan on community structure. Aquat. Toxicol. 41, 101–124.

Bell, R.T., 1993. Estimating production of heterotrophic bacterioplankton via incorporation of tritiated thymidine. In: Kemp, P.F., Sherr, B.F., Sherr, E.B., Cole, J.J. (Eds.), Handbook of Methods in Aquatic Microbial Ecology. Lewis Publishers, Boca Raton, FL, pp. 495–503.

Bird, D.F., Kalff, J., 1984. Empirical relationships between bacterial abundance and chlorophyll concentration in fresh and marine waters. Can. J. Aquat. Sci. 41, 1015–1023.

Blanchoud, H., Farrugia, F., Mouchel, J.M., 2004. Pesticide uses and transfers in urbanised catchments. Chemosphere 55, 905–913.

Brandt, K.K., Jørgensen, N.O.G., Nielsen, T.H., Winding, A., 2004. Microbial community-level toxicity testing of linear alkylbenzene sulfonates in aquatic microcosms. FEMS Microbiol. Ecol. 49, 229–241.

Brett, M.T., Lubnow, F.S., Villar-Argaiz, M., Müller-Solger, A., Goldman, C.R., 1999. Nutrient control of bacterioplankton and phytoplankton dynamics. Aquat. Ecol. 33, 135–145.

Canna-Michaelidou, S., Nicolaou, A.S., 1996. Evaluation of the genotoxicity potential (by Mutatox^{TM} test) of ten pesticides found as water pollutants in Cyprus. Sci. Total Environ. 193, 27–35.

Caquet, T., Thybaud, E., Le Bras, S., Jonot, O., Ramade, F., 1992. Fate and biological effects of lindane and deltamethrin in freshwater mesocosms. Aquat. Toxicol. 23, 261–278.

Carabias-Martínez, R., Rodríguez-Gonzalo, E., Fernández-Laespada, M.E., Calvo-Seronero, L., Sánchez-San Román, F.J., 2003. Evolution over time of the agricultural pollution of waters in an area of Salamanca and Zamora (Spain). Water Res. 37, 928–938.

Castillo, M.M., Allan, J.D., Sinsabaugh, R.L., Kling, G.W., 2004. Seasonal and interannual variation of bacterial production in lowland rivers of the Orinoco basin. Freshwater Biol. 49, 1400–1414.

Cerejeira, M.J., Viana, P., Batista, S., Pereira, T., Silva, E., Valério, M.J., Silva, A., Ferreira, M., Silva-Fernandes, A.M., 2003. Pesticides in Portuguese surface and ground waters. Water Res. 37, 1055–1063.

Četkauskaité, A., Grigonis, U., Beržinskiené, J., 1998. Biodegradation: selection of suitable model. Ecotoxicol. Environ. Saf. 40, 19–28.

Crump, B.C., Kling, G.W., Bahr, M., Hobbie, J.C., 2003. Bacterioplankton community shifts in an Arctic lake correlate with seasonal changes in organic matter source. Appl. Environ. Microbiol. 69, 2253–2268.

Del Giorgio, P.A., Prairie, Y.T., Bird, D.F., 1997. Coupling between rates of bacterial production and the abundance of metabolically active bacteria in lakes, enumerated using CTC reduction and flow cytometry. Microb. Ecol. 34, 144–154.

DeLorenzo, M.E., Scott, G.I., Ross, P.E., 1999. Effects of the agricultural pesticides atrazine, deethylatrazine, endosulfan, and chlorpyrifos on an estuarine microbial food web. Environ. Toxicol. Chem. 18, 2824–2835.

DeLorenzo, M.E., Scott, G.I., Ross, P.E., 2001. Toxicity of pesticides to aquatic microorganisms: a review. Environ. Toxicol. Chem. 20, 84–98.

Dodds, W.K., Jones, J.R., Welch, E.B., 1998. Suggested classification of stream trophic state: distributions of temperate stream types by chlorophyll, total nitrogen and phosphorus. Water Res. 32, 1455–1462.

Dorigo, U., Bourrain, X., Bérard, A., Leboulanger, C., 2004. Seasonal changes in the sensitivity of river microalgae to atrazine and isoproturon along a contamination gradient. Sci. Total Environ. 318, 101–114.

Eiler, A., Langenheder, S., Bertilsson, S., Tranvik, L.J., 2003. Heterotrophic bacterial growth efficiency and community structure at different natural organic carbon concentrations. Appl. Environ. Microbiol. 69, 3701–3709.

El Fantroussi, S., Verschuere, L., Verstraete, W., Top, E.M., 1999. Effects of phenylurea herbicides on soil microbial communities estimated by analysis of 16S rRNA gene fingerprints and community-level physiological profiles. Appl. Environ. Microbiol. 65, 982–988.

Fajon, C., Cauwet, G., Lebaron, P., Terzic, S., Ahel, M., Malej, A., Mozetic, P., Turk, V., 1999. The accumulation and release of polysaccharides by planktonic cells and the subsequent bacterial response during a controlled experiment. FEMS Microbiol. Ecol. 29, 351–363.

Flum, T.F., Shannon, L.J., 1987. The effects of three related amides on microecosystem stability. Ecotoxicol. Environ. Saf. 13, 239–252.

Garmouma, M., Blanchard, M., Chesterikoff, A., Ansart, P., Chevreuil, M., 1997. Seasonal transport of herbicides (triazines and phenylureas) in a small stream draining an agricultural basin: Mélarchez (France). Water Res. 31, 1489–1503.

Gerecke, A.C., Schärer, M., Singer, H.P., Müller, S.R., Schwarzenbach, R.P., Sägesser, M., Ochsenbein, U., Popow, G., 2002. Sources of pesticides in surface waters in Switzerland: pesticide load through waste water treatment plants—current situation and reduction potential. Chemosphere 48, 307–315.

Hartgers, E.M., Aalderink, G.H., Van den Brink, P.J., Gylstra, R., Wiegman, J.W.F., Brock, T.C.M., 1998. Ecotoxicological threshold levels of a mixture of herbicides (atrazine, diuron and metolachlor) in freshwater microcosms. Aquat. Ecol. 32, 135–152.

Haynes, D., Ralph, P., Prange, J., Dennison, B., 2000. The impact of the herbicide diuron on photosynthesis in three species of tropical seagrass. Mar. Pollut. Bull. 41, 288–293.

IFEN, 2000. Les pesticides dans les eaux. Institut français de l'environnement, France.

Kenzaka, T., Yamaguchi, N., Prapagdee, B., Mikami, E., Nasu, M., 2001. Bacterial community composition and activity in urban rivers in Thailand and Malaysia. J. Health Sci. 47, 353–361.

Kepner, R.L., Pratt, J.R., 1994. Use of fluorochromes for direct enumeration of total bacteria in environmental samples: past and present. Microb. Rev. 58, 603–615.

Klammer, S., Posch, T., Sonntag, B., Griebler, C., Mindl, B., Psenner, R., 2002. Dynamics of bacterial abundance, biomass, activity, and community composition in the oligotrophic Traunsee and the Traun River (Austria). Water Air Soil Pollut. 2, 137–163.

Langenheder, S., Kisand, V., Wikner, J., Tranvik, L.J., 2003. Salinity as a structuring factor for the composition and performance of bacterioplankton degrading riverine DOC. FEMS Microbiol. Ecol. 45, 189–202.

Lay, C., Sutren, M., Lepercq, P., Juste, C., Rigottier-Gois, L., Lhoste, E., Lemée, R., Le Ruyet, P., Doré, J., Andrieux, C., 2004. Influence of Camembert consumption on the composition and metabolism of intestinal microbiota: a study in human microbiota-associated rats. Br. J. Nutr. 92, 429–438.

Leira, M., Sabater, S., 2005. Diatom assemblages distribution in Catalan rivers, NE Spain, in relation to chemical and physiographical factors. Water Res. 39, 73–82.

Liu, J., Leff, L.G., 2002. Temporal changes in the bacterioplankton of a northeast Ohio (USA) river. Hydrobiologia 489, 151–159.

Louchart, X., Voltz, M., Andrieux, P., 2000. Temporal variation in the availability of diuron to transport by overland flow. C.R. Acad. Sci. Ser. 2, Earth Planet. Sci. 331, 475–481.

Manz, W., Amann, R., Ludwig, W., Wagner, M., Schleifer, K.H., 1992. Phylogenetic oligodeoxynucleotide probes for the major subclasses of Proteobacteria: problems and solutions. Syst. Appl. Microbiol. 15, 593–600.

Manz, W., Amann, R., Ludwig, W., Vancanneyt, M., Schleifer, K.H., 1996. Application of a suite of 16S rRNA-specific oligonucleotide probes designed to investigate bacteria of the phylum Cytophaga–Flavobacter–Bacteroides in the natural environment. Microbiology 142, 1097–1106.

Mitchell, C., Brodie, J., White, I., 2005. Sediments, nutrients and pesticide residues in event flow conditions in streams of the Mackay Whitsunday Region, Australia. Mar. Pollut. Bull. 51, 23–36.

Molander, S., Blanck, H., 1992. Detection of pollution-induced community tolerance (PICT) in marine periphyton communities established under diuron exposure. Aquat. Toxicol. 22, 129–144.

Muylaert, K., Van der Gucht, K., Vloemans, N., De Meester, L., Gillis, M., Vyverman, W., 2002. Relationship between bacterial community composition and bottom-up versus top-down variables in four eutrophic shallow lakes. Appl. Environ. Microbiol. 68, 4740–4750.

Muyzer, G., 1999. DGGE/TGGE a method to identifying genes from natural ecosystems. Curr. Opin. Microbiol. 2, 317–322.

Nitschke, L., Schüssler, W., 1998. Surface water pollution by herbicides from effluents of waste water treatment plants. Chemosphere 36, 35–41.

Perschbacher, P.W., Ludwig, G.M., 2004. Effects of diuron and other aerially applied cotton herbicides and defoliants on the plankton communities of aquaculture ponds. Aquaculture 233, 197–203.

Phyt'eauvergne, 2004. Rapport d'activité du groupe régional d'action contre la pollution des eaux naturelles par les produits phytosanitaires, année 2003. Phyt'eauvergne, France.

Pinhassi, J., Sala, M.M., Havskum, H., Peters, F., Guadayol, Ò., Malits, A., Marrasé, C., 2004. Changes in bacterioplankton composition under different phytoplankton regimens. Appl. Environ. Microbiol. 70, 6753–6766.

Prado, A.G.S., Airoldi, C., 2002. The toxic effect on soil microbial activity caused by the free or immobilized pesticide diuron. Thermochim. Acta 394, 155–162.

Raymond, P.A., Bauer, J.E., 2001. Use of ^{14}C and ^{13}C natural abundances for evaluating riverine, estuarine, and coastal DOC and POC sources and cycling: a review and synthesis. Organic Geochemistry 32, 469–485.

Revitt, D.M., Ellis, J.B., Llewellyn, N.R., 2002. Seasonal removal of herbicides in urban runoff. Urban Water 4, 13–19.

Riemann, L., Steward, G.F., Azam, F., 2000. Dynamics of bacterial community composition and activity during a mesocosm diatom bloom. Appl. Environ. Microbiol. 66, 578–587.

Rodriguez, G.G., Phipps, D., Ishiguro, K., Ridgway, H.F., 1992. Use of a fluorescent redox probe for direct visualization of actively respiring bacteria. Appl. Environ. Microbiol. 58, 1801–1808.

Sanford, A., Morgan, J., Evans, D., Ducklow, H., 2001. Bacterioplankton dynamics in estuarine mesocosms: effects of tank shape and size. Microb. Ecol. 41, 45–55.

Schafer, H., Hettler, H., Fritsche, U., Pitzen, G., Roderer, G., Wenzel, A., 1994. Biotests using unicellular algae and ciliates for predicting long-term effects of toxicants. Ecotoxicol. Environ. Saf. 27, 64–81.

SCOR-UNESCO Working Group 17, 1966. Determination of Photosynthetic Pigments in Sea-Water. Monogr. Oceanogr. Method, vol. 1. UNESCO, Paris, pp. 9–15.

Sheffield, V.C., Cox, D.R., Lerman, L.S., Myers, R.M., 1989. Attachment of a 40-base-pair G + C-rich sequence (GC-clamp) to genomic DNA fragments by the polymerase chain reaction results in improved detection of single-base changes. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 86, 232–236.

Sherr, E.B., Sherr, B.F., Verity, P.G., 2002. Distribution and relation of total bacteria, active bacteria, bacterivory, and volume of organic detritus in Atlantic continental shelf waters off Cape Hatteras, NC, USA. Deep-Sea Res. II 49, 4571–4585.

Smith, D.C., Steward, G.F., Long, R.A., Azam, F., 1995. Bacterial mediation of carbon fluxes during a diatom bloom in a mesocosm. Deep-Sea Res. II 42, 75–97.

Strachan, G., Preston, S., Maciel, H., Porter, A.J.R., Paton, G.I., 2001. Use of bacterial biosensors to interpret the toxicity and mixture toxicity of herbicides in freshwater. Water Res. 35, 3490–3495.

Sumpono, Perotti, P., Belan, A., Forestier, C., Lavedrine, B., Bohatier, J., 2003. Effect of diuron on aquatic bacteria in laboratory-scale wastewater treatment ponds with special reference to *Aeromonas* species studied by colony hybridization. Chemosphere 50, 445–455.

Thurman, E.M., Bastian, K.C., Mollhagen, T., 2000. Occurrence of cotton herbicides and insecticides in playa lakes of the high plains of west Texas. Sci. Total Environ. 248, 189–200.

Tixier, C., Sancelme, M., Bonnemoy, F., Cuer, A., Veschambre, H., 2001. Degradation products of a phenylurea herbicide, diuron: synthesis, ecotoxicity, and biotransformation. Environ. Toxicol. Chem. 20, 1381–1389.

Van den Brink, P.J., Hattink, J., Bransen, F., Van Donk, E., Brock, T.C.M., 2000. Impact of the fungicide carbendazim in freshwater microcosms. II. Zooplankton, primary producers and final conclusions. Aquat. Toxicol. 48, 251–264.

Van Hannen, E.J., Mooij, W., Van Agterveld, M.P., Gons, H.J., Laanbroek, H.J., 1999. Detritus-dependant development of the microbial community in an experimental system: qualitative analysis by denaturing gradient gel electrophoresis. Appl. Environ. Microbiol. 65, 2478–2484.

Wendt-Rasch, L., Van den Brink, P.J., Crum, S.J.H., Woin, P., 2004. The effects of a pesticide mixture on aquatic ecosystems differing in trophic status: responses of the macrophyte *Myriophyllum spicatum* and the periphytic algal community. Ecotoxicol. Environ. Saf. 57, 383–398.

Wessels, J.S.C., Van der Veen, R., 1956. The action of some derivatives of phenylurethan and of 3-phenyl-1,1-dimethylurea on the Hill reaction. Biochem. Biophys. Acta 19, 548–549.

White, P.A., Kalff, J., Rasmussen, J.B., Gasol, J.M., 1991. The effects of temperature and algal biomass on bacterial production and specific growth rate in freshwater and marine habitats. Microb. Ecol. 21, 99–118.

Effets de pesticides sur l'activité et la diversité des communautés microbiennes d'un milieu lotique récepteur.
Etudes *in situ* et expérimentales

RESUME : Les effets de pesticides sur les communautés algales et bactériennes d'un cours d'eau ont été appréciés en couplant des approches *in situ*, menée au cours de deux années, à des approches expérimentales en microcosmes, réalisées avec le diuron et le glyphosate (10 µg l^{-1}). La prédominance des herbicides affecte la biomasse et la diversité algale et induit une sélection prononcée dans la rivière où quatre genres majoritaires sont recensés. La sensibilité des communautés algales à un même pesticide varie suivant leur état physiologique et leur composition taxonomique. L'impact des herbicides sur le compartiment bactérien au niveau quantitatif (sur la densité, la production hétérotrophe et l'activité respiratoire) et qualitatif (diversité génétique), est majoritairement induit par des effets indirects. Il est plus perceptible dans les dispositifs expérimentaux où les bactéries ne peuvent bénéficier d'apports organiques allochtones et sont fortement tributaires de la production algale.

MOTS CLES :
écotoxicologie, milieux lotiques, pesticides, approche *in* situ, microcosmes, communautés microbiennes, microalgues, bactéries, écologie moléculaire

Effects of pesticides on microbial activity and diversity in a polluted lotic system.
In situ and experimental studies

ABSTRACT : The effects of pesticides on natural algal and bacterial communities from a French stream were investigated using an *in situ* approach, followed over two years, and using microcosms studies realized with the herbicides diuron and glyphosate (10 µg l^{-1}). The predominance of herbicides in the stream affects algal biomass and diversity and leads to a selection of four major genus. Algal communities sensitivity to a particular pesticide varies according to physiological state and taxonomic composition. The quantitative (i.e. cellular density, heterotrophic production and activity) and qualitative (i.e. genetic diversity) impact of herbicides on bacterial communities is principally due to indirect effects. This impact is more pronounced in microcosms where bacteria are more dependent on algal production in experimental systems due to the lack of allochthonous organic inputs .

KEY WORDS :
ecotoxicology, lotic systems, pesticides, *in* situ approach, microcosms, microbial communities, algae, bacteria, molecular ecology