



**HAL**  
open science

# Réponses structurelles et fonctionnelles des communautés microbiennes à des stress combinés dans la zone hyporhéique

Laura Kergoat

► **To cite this version:**

Laura Kergoat. Réponses structurelles et fonctionnelles des communautés microbiennes à des stress combinés dans la zone hyporhéique. Sciences du Vivant [q-bio]. Université Lyon I, 2023. Français. NNT: . tel-04230065v1

**HAL Id: tel-04230065**

**<https://theses.hal.science/tel-04230065v1>**

Submitted on 5 Oct 2023 (v1), last revised 28 Mar 2024 (v2)

**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.



**THESE de DOCTORAT DE  
L'UNIVERSITE CLAUDE BERNARD LYON 1**

**Ecole Doctorale N° 341  
Evolution, Ecosystème, Microbiologie et Modélisation**

**Discipline** : Ecotoxicologie Microbienne

Soutenue publiquement le 27/06/2023, par :

**Laura Kergoat**

---

**Réponses structurelles et fonctionnelles des communautés  
microbiennes à des stress combinés dans la zone  
hyporhéique**

---

Devant le jury composé de :

<b>Annette BÉRARD</b>	ICPEF HDR, INRAE Avignon	<i>Rapporteure</i>
<b>Gwenaël IMFELD</b>	Directeur de recherche CNRS, Institut Terre et Environnement, Strasbourg	<i>Rapporteur</i>
<b>Veronica RODRIGUEZ-NAVA</b>	Professeure des Universités, Université Claude Bernard Lyon 1	<i>Présidente du jury</i>
<b>Carmen CASADO-MARTINEZ</b>	Chargée de recherche, Centre Ecotox, Lausanne (Suisse)	<i>Examinatrice</i>
<b>Thibault DATRY</b>	Directeur de recherche, INRAE Villeurbanne	<i>Directeur de thèse</i>
<b>Chloé BONNINEAU</b>	Chargée de recherche, INRAE Cestas	<i>Co-directrice de thèse</i>
<b>Florian MERMILLOD-BLONDIN</b>	Directeur de recherche CNRS, Université Claude Bernard Lyon 1	<i>Membre invité (absent)</i>



*À ma grand-mère,*



## REMERCIEMENTS

J'aimerais tout d'abord remercier mes deux directeur.rice.s de thèse qui m'ont donné l'opportunité de réaliser ces travaux et qui m'ont accompagnée tout au long de cette aventure (et quelle aventure !) de la conception à sa valorisation. Un grand merci à toi Thibault pour ton soutien, ta bienveillance et tes précieux conseils qui m'ont permis de recentrer mon travail quand je m'éparpillais trop (un grand merci aussi pour ton miel qui m'a permis de traverser les hivers en échappant aux vilains virus !). Un immense merci à toi Chloé pour (la liste est longue !) tes conseils scientifiques avisés, ta patience à toute épreuve, ta façon de me pousser à aller toujours plus loin, ton soutien du quotidien, la transmission de ta maîtrise de R (outil incroyable que j'ai même fini par apprécier !), ta compréhension (et les échanges de trucs & astuces pour trouver le sommeil) et ton optimisme. Je te suis aussi reconnaissante de ne pas avoir hésité à mettre la main à la pâte quand il le fallait (ta boule à thé en a malheureusement fait les frais lors du remplissage des colonnes !). Pour tout cela mille mercis à tous les deux, je n'aurais pas pu mieux tomber !

Je souhaite aussi remercier l'équipe de choc d'Ecotoxicologie Microbienne Aquatique qui m'a accompagnée tout au long de ces 3 années de thèse. Merci tout d'abord à Bernard pour la bonne humeur que tu apportes dans l'équipe (Oh l'équipe !). Après 3 ans, je pense que je commence à maîtriser le jargon du Beaujolais (t'y c'nnaï ?). Merci aussi à toi pour ton aide au cours des manips même quand je t'annonçais un programme de 80 granulo à venir ! Je remercie aussi particulièrement Bernadette (notre agent secret infiltré !) qui m'a accompagnée dans la réalisation de toutes mes manips. Au-delà du laboratoire, je te remercie aussi pour ta bienveillance et ta capacité à détecter les coups de mou au premier coup d'œil. Je souhaite aussi remercier Christophe (notre Belge national !) pour ton aide à la mise en place des expériences, les heures passées au chromatogramme et tes corrections orthographiques. Je ne l'ai fait qu'une fois mais promis, je ne m'amuserai plus jamais à planquer tes chocolats ! Merci aussi à Stéphane (notre p'tit chef) pour m'avoir intégrée dans cette chouette équipe en Master 2 et pour tes conseils et ton soutien à chaque étape de mon parcours.

Je souhaite également remercier tout ceux qui ont été de passage en EMA. Tout d'abord merci à Florianne pour avoir été mon acolyte de sport mais aussi de piratage informatique. Ta bonne humeur et tes idées de génie ont égayé mes journées ! Je veux aussi remercier les autres thésard.e.s ayant partagé mon bureau : Ayanleh, Loren et Hélène, je vous

remercie pour nos moments de partage aussi bien les fous rires que les débats enflammés. Merci à Solène et Nesrine devenues des amies pour avoir introduit le poêle-pong et les concours de dessin comme disciplines officielles dans l'équipe, à Florian et Landry pour leur aide lors des coups de rush au laboratoire, à Joséphine pour ta bonne humeur, ta maîtrise absolue d'excel et notre lutte commune pour faire baisser le Bernardomètre ! Enfin je remercie Anaïs et Gilles que j'ai eu la chance de croiser en Master 2 et malheureusement seulement en visio au cours de la thèse à cause de la COVID.

Je remercie également l'équipe EcoFlows pour leur aide et leur soutien au cours de cette thèse. Je remercie particulièrement Abdel avec qui j'ai testé beaucoup de prototype avant d'aboutir à mon dispositif expérimental (on est devenu les rois de la plomberie !). Merci également à Guillaume pour m'avoir accompagnée pour faire des prélèvements de sédiments en pleine canicule ! Et merci à Teresa pour nos discussions prolongées après le yoga ou au détour d'un couloir, à Maxence et Bertrand pour les infos sur ce monde inconnu pour moi des macro-organismes et à tous les autres pour leur accueil chaleureux.

Je souhaite aussi dire merci à Matthieu, Corinne, Aymeric et Lysiane, collègues chimistes du LAMA pour leur aide à la conception des expériences, la réalisation des analyses, la valorisation (et leurs invitations aux apéros de couloirs !). Merci également à Emilie et Nathalie au CARRTEL qui ont réalisé les PCR et les librairies de séquençage (un grand merci Emilie pour tes lumières, ta disponibilité et ta patience pour m'initier au monde de la génomique !). Je remercie les membres supplémentaires de mon COPIL (Agnès Richaume, Florian Mermillod-Blondin, Rémi Clément, Hélène Guasch) pour leurs participations aux échanges et pour m'avoir aidée à recentrer mon travail quand c'était nécessaire.

Je remercie également la Fondation Rovaltain qui en finançant cette thèse m'a donné l'opportunité de réaliser ces travaux.

Merci également à Gwenaël Imfeld et Annette Bérard, rapporteur.e.s de cette thèse et aux examinateurs Veronica Rodriguez-Nava et Carmen Casado-Martinez pour l'évaluation de mon travail.

Enfin je souhaite remercier particulièrement mon compagnon Martin qui n'a jamais douté de mes capacités à réaliser cette thèse. Ton soutien et ta patience m'ont portée durant ces 3 années. J'ai aussi une pensée spéciale pour ma grand-mère qui m'a poussée à suivre

mon envie de me lancer dans ce travail recherche et qui n'est malheureusement plus là pour en voir son aboutissement. Je remercie aussi mes colocataires et amis pour leur joie de vivre et leurs petites attentions du quotidien. Je remercie Dr Picard pour son aide et sa compréhension quand j'en ai eu besoin. Je souhaite pour terminer remercier mes parents et ma sœur qui m'ont toujours soutenue dans les projets que j'entreprends.





## RÉSUMÉ

La zone hyporhéique située à l'interface entre eau de surface et eau souterraine joue un rôle important pour l'écosystème de la rivière. Les communautés microbiennes qui colonisent cette zone réalisent notamment la minéralisation de la matière organique participant ainsi au recyclage des nutriments dans les cours d'eau. Cependant, dans un contexte de changement global, les activités anthropiques sont susceptibles de perturber les communautés microbiennes et le fonctionnement de la zone hyporhéique. Ces stress de nature physique (*e.g.* colmatage, assèchement, réchauffement) ou chimique (*e.g.* pesticides, métaux, pharmaceutiques) sont souvent multiples dans les rivières et leurs effets combinés nécessitent d'être étudiés afin de mettre en évidence d'éventuelles interactions et prioriser les actions de gestion. Dans ce contexte, l'objectif principal de cette thèse était d'évaluer les effets de deux stress physiques fréquents dans les cours d'eau (assèchement et colmatage) sur la toxicité d'un contaminant métallique modèle (le cuivre) pour les activités et la structure microbienne dans le sédiment hyporhéique. Pour cela, deux expériences en mésocosmes constitués de colonnes remplies de sédiments reproduisant une zone hyporhéique ont été réalisées. La première expérience combinant colmatage et eau contaminée par du cuivre avait pour but d'évaluer l'effet du colmatage sur la distribution du cuivre dans la zone hyporhéique et d'appréhender les effets combinés de ces deux stress pour les communautés microbiennes du sédiment. Au cours de la deuxième expérience, des sédiments contaminés par du cuivre ont été exposés à 4 semaines d'assèchement et 4 semaines de remise en eau. L'objectif de cette expérience était de déterminer les effets du cuivre sur la résistance et la résilience des communautés microbiennes à l'assèchement. Ces expériences ont mis en évidence l'importance de la dimension verticale de la zone hyporhéique dans l'évaluation des stress combinés. L'exposition et les effets des stress physiques (colmatage et assèchement) sur les communautés microbiennes étaient importants en surface par rapport aux couches plus profondes. Au contraire, le cuivre a eu des effets variables tout au long de la colonne selon le compartiment contaminé (eau de surface ou sédiment). Lors de l'exposition à une combinaison de stress, un stress majoritaire influençait globalement les réponses microbiennes même si des interactions antagonistes ont été mises en évidence entre les stress à certaines profondeurs. La diversité bactérienne en surface était par exemple plus faible lorsque les communautés microbiennes étaient exposées au cuivre seul comparée au cuivre combiné à l'assèchement. Ces interactions s'expliquent notamment par une diminution de la biodisponibilité et donc de la toxicité du cuivre par les stress physiques. Globalement les communautés microbiennes en profondeur étaient préservées des effets des stress constituant un potentiel « réservoir » d'espèces sensibles. Ces résultats permettent d'apporter des connaissances sur le fonctionnement de la zone hyporhéique et sur la manière dont les effets des stress physiques et chimiques sur les communautés microbiennes du sédiment interagissent avec la dimension verticale de cette zone. Pour aller plus loin, ces résultats pourront être combinés à de la modélisation ou complétés avec des études de terrain afin de mieux prédire les effets des stress multiples sur les cours d'eau et aider les gestionnaires dans leurs actions de restauration.

**Mots clés : métal, assèchement, colmatage, interaction, sédiment, dimension verticale, ecotoxicologie microbienne**



## **ABSTRACT**

The hyporheic zone at the interface between surface water and groundwater plays an important ecological role for river ecosystem. The microbial communities in this zone mineralize organic matter contributing to nutrients recycling in the rivers. However, in a global change context, anthropic activities disturb the microbial communities and the hyporheic zone functioning. These physical (*e.g.* clogging, drying, warming) or chemical (*e.g.* pesticides, metals, pharmaceuticals) stressors are often multiple in rivers and their combined effects need to be studied to highlight possible interactions and prioritize management actions. In this context, the main objective of this thesis was to evaluate the effects of two frequent physical stressors in rivers (drying and clogging) on copper toxicity for microbial functions and structure in hyporheic sediment. To this end, two mesocosm experiments consisting of columns filled with sediments reproducing a hyporheic zone have been set up. The first experiment combined clogging and copper-contaminated-water in order to evaluate the clogging effect on the copper distribution in the hyporheic zone and to understand the combined effects of these two stressors for the microbial communities. In the second experiment, copper-contaminated sediments were exposed to 4 weeks of drying and 4 weeks of rewetting. The aim of this experiment was to determine the copper effects on the resistance and resilience of microbial communities to drying. These experiments highlighted the significance of the hyporheic vertical dimension to understand the combined stressors effects. The exposure and effects of physical stressors (clogging and drying) on microbial communities were significant in the surface compared to deeper layers. In contrary, copper had variable effects throughout the column depending on the contaminated compartment (surface water or sediment). In combination, one dominant stressor influenced microbial responses even though antagonistic interactions were found between stressors. For example, surface bacterial diversity was lower when microbial communities were exposed to copper alone compared to copper combined with drying. These interactions can be explained by a decrease of the copper bioavailability and toxicity caused by physical stressors. Overall, the microbial communities in depth were preserved from the stressors effects, representing a potential "reservoir" of sensitive species. These results provide insight on the hyporheic functioning and help understand how the effects of physical and chemical stressors on sediment microbial communities interact with the vertical dimension. To go further, these results could be combined with modeling or complemented with field studies to better predict the effects of multiple stressors on rivers and help restoration actions.

**Keywords:** metal, drying, clogging, interaction, sediment, subsurface, microbial ecotoxicology



## SOMMAIRE

<b>I- CADRE GÉNÉRAL .....</b>	<b>1</b>
<b>II- ÉTAT DE L'ART .....</b>	<b>4</b>
1. LES SÉDIMENTS DE LA ZONE HYPORHÉIQUE ASSURENT UN ROLE ÉCOLOGIQUE MAJEUR DANS L'ÉCOSYSTÈME DE LA RIVIÈRE GRACE AUX COMMUNAUTÉS MICROBIENNES .....	4
2. EFFETS DÉLÉTÈRES DES PRESSIONS CHIMIQUES SUR LES FONCTIONS MICROBIENNES DU SÉDIMENT : CAS DU CUIVRE.....	8
3. LES COMMUNAUTÉS MICROBIENNES DU SÉDIMENT HYPORHÉIQUE SONT EXPOSÉES A DES STRESS PHYSIQUES : CAS DU DÉPÔT DE SEDIMENTS FINS ET DE L'ASSÈCHEMENT .....	14
4. LES COURS D'EAU : UN ENVIRONNEMENT SOUS PRESSIONS MULTIPLES.....	21
<b>III- OBJECTIFS DE THÈSE.....</b>	<b>33</b>
<b>IV- MATÉRIEL &amp; MÉTHODES .....</b>	<b>35</b>
1. DISPOSITIF EXPÉRIMENTAL.....	35
2. CIRCULATION DU FLUX D'EAU .....	36
3. AVANTAGES ET LIMITES DES MÉSOCOSMES .....	37
4. MESURES RÉALISÉES AU COURS DE LA THÈSE.....	38
<b>V- CHAPITRE 1 : LE COLMATAGE MODULE LES EFFETS DU CUIVRE SUR LES COMMUNAUTÉS MICROBIENNES DU SÉDIMENT .....</b>	<b>40</b>
1. INTRODUCTION .....	43
2. MATERIAL AND METHODS .....	45
3. RESULTS .....	51
4. DISCUSSION.....	59
5. CONCLUSION .....	66
6. SUPPLEMENTARY MATERIAL.....	67
<b>VI- CHAPITRE 2 : LE CUIVRE MODIFIE LES RÉPONSES FONTIONNELLES DES COMMUNAUTÉS MICROBIENNES DU SÉDIMENT DE RIVIÈRE A L'ASSÈCHEMENT.....</b>	<b>69</b>
1. INTRODUCTION .....	71
2. MATERIAL AND METHODS .....	73
3. RESULTS .....	80
4. DISCUSSION.....	89
5. CONCLUSION .....	95
6. SUPPLEMENTARY MATERIAL.....	97
<b>VII- CHAPITRE 3 : L'ASSÈCHEMENT MODULE LES EFFETS DU CUIVRE SUR LA DIVERSITÉ BACTÉRIENNE SANS POUR AUTANT MODIFIER L'ACQUISITION DE TOLÉRANCE AU CUIVRE DES COMMUNAUTÉS MICROBIENNES DU SÉDIMENT.....</b>	<b>69</b>
1. MATERIEL ET METHODES.....	102
2. RESULTATS .....	106
3. DISCUSSION.....	109
4. CONCLUSION .....	113

<b>VIII- DISCUSSION ET PERSPECTIVES .....</b>	<b>114</b>
1. LA DIMENSION VERTICALE DE LA ZONE HYPORHÉIQUE EST ESSENTIELLE POUR MIEUX APPRÉHENDER L'ÉVALUATION DES STRESS MULTIPLES .....	114
2. LES CHANGEMENTS ENVIRONNEMENTAUX DOIVENT ÊTRE INTEGRÉS A L'ÉVALUATION DE LA BIODISPONIBILITÉ DES CONTAMINANTS DANS LES SÉDIMENTS .....	118
3. VERS UNE MEILLEURE COMPRÉHENSION DES EFFETS COMBINÉS DES STRESS PHYSIQUES ET CHIMIQUES DANS LES SÉDIMENTS .....	121
<b>IX- CONCLUSION .....</b>	<b>124</b>
<b>X- RÉFÉRENCES .....</b>	<b>114</b>

## ABRÉVIATIONS

ADN : acide désoxyribonucléique

ANOVA : analysis of variance

ARN : acide ribonucléique

BLAST : Basic Local Alignment Search Tool

BLM : Biotic Ligand Model

Cu : Cuivre

COD : Carbone Organique Dissous

DCE : Directive Cadre sur l'Eau

dw : dry weight

FROGS : Find Rapidly OTUs with Galaxy Solution

HAP : Hydrocarbure Aromatique Polycyclique

IBD : Indice Biologique Diatomées

INERIS : Institut national de l'environnement industriel et des risques

NQE : Norme de Qualité Environnementale

OUT : Operational Taxonomic Unit

PCR : Polymerase Chain Reaction

pH : potentiel hydrogène

PCB : polychlorobiphényles

PICT : Pollution Induced Community Tolerance

PNEC : Predicted No Effect Concentration

REACH : Registration, Evaluation and Authorisation of Chemicals

WFPS : water filled pore space





## LISTE DES FIGURES

**Figure I-1 :** Living Index Planet (LIP) du World Wide Fund for Planet (WWF) en 2016 pour les vertébrés

**Figure II-1 :** les différents types de zone hyporhéique (Source : Datry et al., 2008 d'après Malard et al., 2000)

**Figure II-2 :** diagenèse précoce et concentrations en éléments dissous le long d'un gradient sédimentaire oxi-anoxique

**Figure II-3 :** schéma des mécanismes de résistance et d'adaptation des micro-organismes aux métaux (Source : Lemire et al., 2013)

**Figure II-4 :** principe de l'approche pollution-induced-community-tolerance (PICT) appliqué au cuivre

**Figure II-5 :** processus microbiens dans la zone hyporhéique en fonction de la perméabilité des sédiments (Source : Datry et al., 2008)

**Figure II-6 :** évolution des processus microbiens lors d'un assèchement (D'après Pinto et al., 2021)

**Figure II-7 :** évolution des processus microbiens après remise en eau (D'après Pinto et al., 2021)

**Figure II-8 :** schéma des différents types d'interaction entre stress (d'après Côté et al., 2016)

**Figure II-9 :** mentions annuelles des 3 types d'interactions entre stress dans la littérature entre 1986 et 2014 (Source : Côté et al., 2016)

**Figure II-10 :** schéma illustrant le passage des métaux traces métalliques de la phase solide à dissoute en fonction du gradient de potentiel d'oxydo réduction dans la zone hyporhéique

**Figure IV-1 :** photographie des colonnes (A) et du dispositif de circulation d'eau (B) de l'expérience combinant assèchement et cuivre

**Figure IV-2 :** système de circulation d'eau pour une colonne.

**Figure IV-3 :** situation des mesocosmes dans un continuum d'outils d'évaluation des effets des stress

**Figure V-1:** schematic representation of the experimental setup reproducing the hyporheic zone in columns with the 3 treatments: (1) Reference, (2) Copper, (3) Clogged + Copper.

**Figure V-2:** average vertical water flow ( $\text{mL min}^{-1}$ ) during the experiment measured at the column outlet for the Reference ( $n = 4$ ), Copper ( $n = 5$ ), Clogged+Copper ( $n = 5$ ) treatments.

**Figure V-3:** proportion (mean  $\pm$  sd) of silt, clay ( $<50 \mu\text{m}$ ), fine sand ( $50\text{--}200 \mu\text{m}$ ), medium-grain sand ( $200\text{--}500 \mu\text{m}$ ) and coarse sand ( $>500 \mu\text{m}$ ) in the sediment samples collected at the 4 column depths (0–3 cm, 4–7 cm, 10–13 cm, 25–28 cm) in each treatment after 32 days of experiment.

**Figure V-4:** copper concentration ( $\text{mg kg}^{-1} \text{ dw}$ ) at 4 columns depth for each treatment after 32 days of experiment.

**Figure V-5:** nMDS representing the dissimilarity of bacterial community structure in sediment samples collected at 0–3 cm depth for each treatment after 32 days of experiment.

**Figure V-6:** nMDS representing the dissimilarity of bacterial community structure in sediment sampled at each depth for three treatments, after 32 days of experiment.

**Figure V-7:** microbial functional responses for each treatment in the first 3 cm of the column, after 32 days of experiment.

**Figure V-8:** copper concentration leading to a 50% reduction in  $\beta$ -glucosidase activity ( $EC_{50}$ ) and 99.432 % confidence interval determined after a 4 h acute toxicity test on sediment samples collected at two column depths (0–3 cm and 25–28 cm) in each treatment, after 32 days of experiment.

**Figure I-A3:** nMDS representing the dissimilarity of bacterial structures in sediment samples collected at 4–7 cm, 10–13 cm and 25–28 cm for each treatment.

**Figure VI-0 :** schéma du dispositif expérimental de l'expérience combinant colmatage et cuivre

**Figure VI-1 :** summary schema of the four treatments, sampling times (A) and sampling depths (B) during the experiment.

**Figure VI-2:** humidity (%),  $O_2$ ,  $NO_3^-$  concentration ( $mg.L^{-1}$ ) for each depth and treatment after 4 days of experiment (Day 4), during drying (Day 32) and after 0, 1, 2 or 24, 28 days of rewetting (Day 33, 34, 35 or 57, 61).

**Figure VI-3:** dissolved and particulate copper concentrations along sediment columns for each treatment and depth after 4 days of experiment (Day 4), during drying (Day 32) and after 1 day of rewetting (Day 34).

**Figure VI-4:** beta-glucosidase, leucine aminopeptidase, phosphatase activities for each depth (surface, medium and deep layer), each sampling time (Day 4, 32, 34, 61) and each treatment.

**Figure VI-5:** respiration and denitrification for each depth (surface, medium and deep layer) each sampling time (Day 4, 32, 34, 61) and each treatment.

**Figure VI-6:** inhibition percentage for Drying, Copper, theoretical Addition of Drying and Copper treatment and observed Drying+Copper combined treatment of several microbial functions during drying (Day 32) in the Surface layer.

**Figure VI-7:**  $CO_2$  emission for each treatment measured with Picarro instrument after 55 days of experiment (27 days after rewetting).

**Figure VI-8:** leaf mass loss rate ( $mg.day^{-1}$ ) for each treatment during the all experiment time in the Surface, Medium and Deep layers.

**Figure VI-A4:**  $CO_2$  emission for each treatment measured with Picarro instrument on the entire column after 39 and 50 days of experiment.

**Figure VII-1 :** rappel du design expérimental avec les 4 traitements testés, les temps de prélèvement (A) et les profondeurs prélevées (B)

**Figure VII-2 :** acquisition de tolérance au cuivre donnée par les CE50 ( $mg Cu.kg^{-1}$ ) à chaque temps de l'expérience (jour 4, 32, 34, 61) pour chaque profondeur (Surface, Milieu, Profond) et chaque traitement (Reference, Asséché, Cuivre, Asséché+Cuivre).

**Figure VII-3 :** indice de diversité (richesse spécifique et indice de Shannon) de la communauté bactérienne et archéale du sédiment aux 3 profondeurs des colonnes (Surface, Milieu, Profond) pour tous les traitements et aux 4 temps de prélèvement (Jour 4, 32, 34, 61).

**Figure VIII-1:** schéma récapitulatif des résultats de la thèse

## LISTE DES TABLES

**Tableau II-1** : publications portant sur les effets de combinaisons de stress sur les communautés microbiennes du sédiment entre 1980 et 2022

**Tableau II-2** : réponses structurelles et fonctionnelles des communautés microbiennes du sédiment à l'assèchement, au cuivre et au colmatage.

**Table V-1**: chemical parameters (means  $\pm$  sd) in water or sediment sampled at the four column depths for each treatment after 32 days of experiment.

**Tableau I-A1**: ions and dissolved organic carbon concentrations ( $\text{mg L}^{-1}$ ) measured in the water sampled from the 150L-tanks after 29 days of experiment.

**Tableau I-A2**: microbial activities for each treatment (Reference  $n=4$  ; Copper  $n=5$  ; Clogged+Copper  $n=5$ ) and each column depths measured at the end of the experiment.

**Table VI-A1**: proportion of clay-silt ( $< 50 \mu\text{m}$ ), fine ( $50-200 \mu\text{m}$ ), medium ( $200-500 \mu\text{m}$ ) and coarse sand ( $> 500 \mu\text{m}$ ) in sediment for each treatment (Reference, Copper, Drying, Drying+Copper) and each depth (Surface, Medium and Deep) at each time of the experiment (Day 4, 32, 34, 61).

**Table VI-A2**: physico-chemical parameters in sediment (organic matter, humidity and copper) and water samples (dissolved organic carbon, nitrate, dissolved copper) for each treatment (Reference, Copper, Drying, Drying+Copper) and each depth (Surface, Medium and Deep) at each sampling times.

**Table VI-A3**: microbial parameters (beta-glucosidase, phosphatase, leucine aminopeptidase, respiration, denitrification) for each treatment (Reference, Copper, Drying, Drying+Copper) and each depth (Surface, Medium and Deep) at each sampling times (Day 4, 32, 34, 61).

**Table VI-A5**: dissolved organic carbon (COD) and ions concentrations ( $\text{mg.L}^{-1}$ ) in water sampled in tanks on Day 13, 35 and 56.

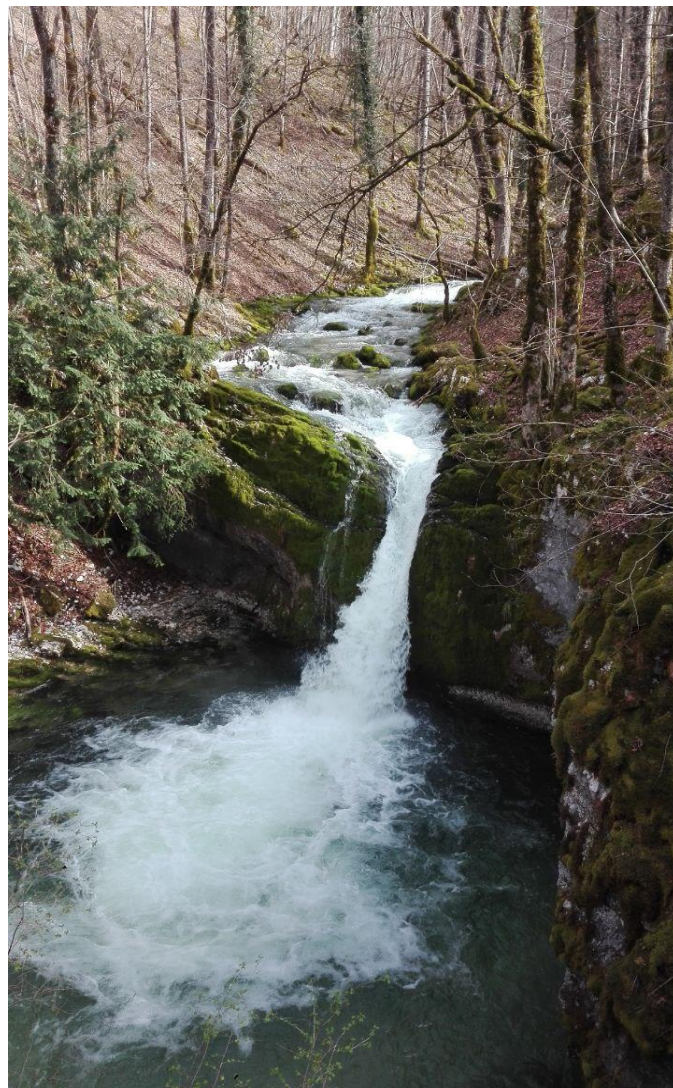
**Tableau VII-1** : détails des différents traitements réalisés au cours de l'expérience combinant cuivre et assèchement



---

# CADRE GÉNÉRAL & ÉTAT DE L'ART

---





## I- CADRE GENERAL

---

**Bien qu'ils représentent moins de 1 % de la surface terrestre, les cours d'eau constituent des réserves importantes de biodiversité.** Les rivières fournissent une hétérogénéité d'habitats qui permet notamment aux poissons de se reproduire au niveau de frayères, aux invertébrés de réaliser tout (*e.g.* gammarès) ou une partie (*e.g.* libellules) de leur cycle de vie. Les cours d'eau abritent également des communautés d'organismes microbiens qui même s'ils occupent moins visuellement le paysage que les macro-organismes, jouent un rôle écologique essentiel. Ces communautés microbiennes assurent notamment la production primaire et la dégradation de la matière organique (Findlay, 2010). La présence de ces micro-organismes permet de garantir le fonctionnement écologique des cours d'eau dont les populations humaines tirent des avantages appelés services écosystémiques (*e.g.* épuration naturelle des eaux souterraines et de surface) (Fischer et al., 2005).

**Cependant, les activités humaines menacent la biodiversité et les services écosystémiques rendus par les cours d'eau.** L'impact anthropique sur les cours d'eau a démarré dès le Néolithique avec le développement de l'exploitation minière pour la métallurgie. Une contamination au cuivre a par exemple été mise en évidence dans des sédiments de berges d'une rivière datés de 7000 ans dans le champ minier du Faynan dans le Sud de la Jordanie (Grattan et al., 2016). L'empreinte humaine n'a pas cessé depuis et s'est même intensifiée depuis la Révolution Industrielle, devenant significative à l'échelle de la Terre, ce qui a abouti à la désignation d'une nouvelle ère géologique appelée l'Anthropocène (Crutzen, 2006). Cette nouvelle ère, marquée par une perte drastique de la biodiversité, touche particulièrement les rivières par rapport aux écosystèmes terrestres ou marins (Fig. I-1) (Dudgeon, 2010) : un déclin de 83 % des populations a été mis en évidence entre 1970 et 2014 par le World Wide Fund for Nature's Living Planet Index. Cinq raisons principales ont été listées par Dudgeon et al., (2006) pour expliquer le déclin de la biodiversité de ces milieux aquatiques : la surpêche, la modification des flux d'eau, la destruction des habitats, la pollution des eaux et l'invasion par des espèces exotiques envahissantes. Cette liste a été actualisée en 2019 par d'autres auteur.e.s (Reid et al., 2019) avec 12 menaces pour la biodiversité qui sont apparues ou se sont intensifiées depuis 2006. Ces menaces concernent à la fois des stress biologiques (bloom algaux, maladies infectieuses, espèces exotiques envahissantes), chimiques (salinisation des eaux, diminution du calcium, contaminants



émergents, nanoparticules) et physiques (changement climatique, développement de l'hydroélectricité, lumière et bruit, microplastiques). Les pressions sur les écosystèmes sont donc multiples et cumulées et vont probablement s'accroître puisque le changement climatique, la croissance démographique et économique, la demande en eau et la régulation des flux d'eau pour les besoins des populations humaines vont augmenter dans les années à venir (Meybeck, 2003). Il est donc urgent de mieux évaluer les effets de ces multiples stress anthropiques sur l'écosystème de la rivière pour ensuite mettre en place des actions de conservation pertinentes.

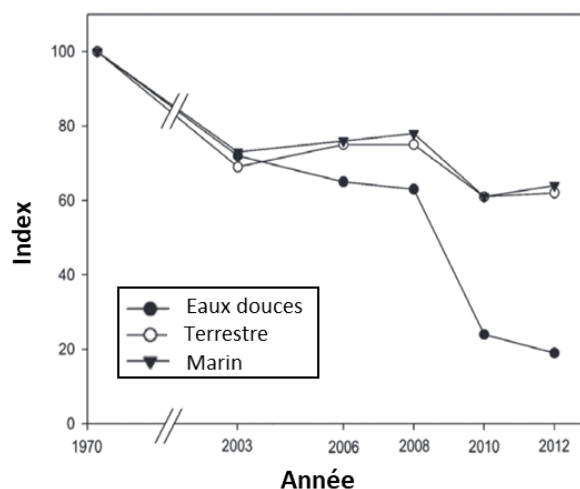


Figure I-1 : Living Index Planet (LIP) du World Wide Fund for Planet (WWF) en 2016 pour les vertébrés

**Les études scientifiques et réglementaires se basent généralement sur les effets d'un seul stress pour établir leurs préconisations malgré une réalité environnementale plus complexe.** Le règlement européen REACH (Registration, Evaluation and Authorisation of CHemicals) oblige depuis 2006 les industriels à enregistrer un rapport sur les effets sur la santé humaine et environnementale des substances existantes ou nouvelles qu'ils commercialisent. Cette réglementation concerne 30 000 substances dont le volume annuel de vente en Europe dépasse une tonne. Les bio-essais d'une substance sont réalisés sur des organismes modèles (e.g. poissons, daphnies ou algues). Ils permettent d'établir une PNEC (Predicted No Effect Concentration = concentration la plus forte de la substance n'ayant pas d'effet). Néanmoins, une des limites majeures de cette réglementation est son approche mono-stress et mono-spécifique puisqu'elle ne prend pas en compte l'interaction possible des effets de la substance avec d'autres pressions anthropiques déjà présentes dans les cours d'eau, ni la réponse/sensibilité de communautés multi-espèces. Pourtant les combinaisons des stress

peuvent aboutir à des « surprises écologiques » différentes d'une simple addition des effets. Par exemple, lors de tests au laboratoire, les effets combinés de l'antidépresseur fluoxétine et de la variation de la température étaient plus importants que les effets des 2 stress individuels sur le succès reproductif de daphnies (Barbosa et al., 2017). Des études sur les effets combinés des stress sont donc nécessaires pour anticiper de manière plus réaliste les effets des contaminants chimiques dans des milieux complexes, soumis à des pressions multiples (Darling and Cote, 2008).

**Dans ce contexte, mon travail de thèse vise à étudier les effets combinés d'un stress chimique et d'un stress physique sur les communautés microbiennes du sédiment.** J'ai choisi d'explorer la dimension verticale des sédiments (zone hyporhéique) qui est peu considérée par rapport aux études en surface (zone benthique). Le cuivre a été sélectionné comme contaminant chimique modèle. Ayant une affinité particulière pour la matière organique, il est fréquemment retrouvé dans les sédiments à des concentrations qui sont en moyenne de 48,5 mg Cu.kg<sup>-1</sup> dans les cours d'eau français (Mancioppi et al. 2010). Combinés au cuivre, j'ai choisi de m'intéresser aux effets de deux stress physiques fréquents dans les cours d'eau: le colmatage et l'assèchement. Ces deux stress entraînent des modifications physico-chimiques de l'environnement pouvant moduler la biodisponibilité/écotoxicité des métaux comme le cuivre pour les communautés microbiennes.



## II- ÉTAT DE L'ART

### 1. Les sédiments de la zone hyporhéique assurent un rôle écologique majeur dans l'écosystème de la rivière grâce aux communautés microbiennes

#### 1.1. La zone hyporhéique : une zone difficile à caractériser avec des limites qui varient dans le temps et dans l'espace

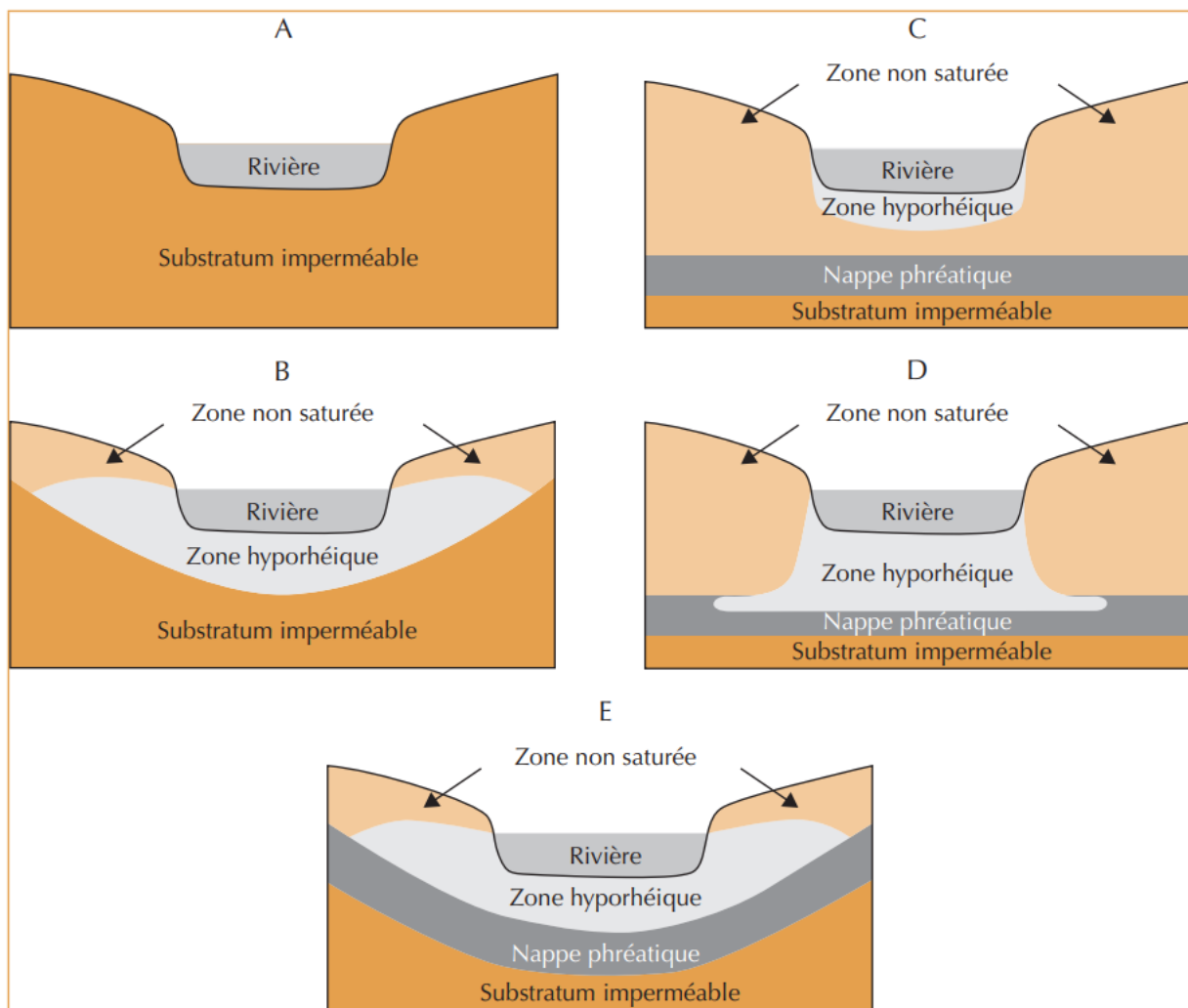


Figure II-1 : les différents types de zone hyporhéique (Source : Datry et al., 2008 d'après Malard et al., 2000)

La rivière n'est pas un drain étanche qui reçoit l'eau et la rejette directement à la mer (Datry et al., 2008). De l'amont à l'aval, des échanges entre le milieu souterrain et la surface ont lieu : l'eau s'infiltre dans les sédiments et émerge en surface à de multiples reprises. Cette zone d'infiltration a été étudiée pour la première fois par Orghidan en 1959 qui l'a appelée

« hyporhéique ». Les caractéristiques hydrologiques, thermiques, chimiques et métaboliques de cette zone sont uniques et spécifiques (Boulton et al., 1998). Elle abrite même une communauté d'organismes qui lui est propre, appelée « hyporheos » (Brunke and Gonser, 1997; Lewandowski et al., 2019). Aujourd'hui, de nombreuses disciplines (écologie, hydrologie, hydrogéologie, microbiologie, conservation) s'intéressent à la zone hyporhéique. Une définition commune à toutes ces disciplines est complexe à établir (Lewandowski et al., 2019). D'une manière générale, on peut résumer la zone hyporhéique à une zone de sédiment saturée en eau située en dessous et à côté de la rivière, contenant une certaine proportion d'eau de surface (White, 1993). Elle se situe juste au-dessous de la zone benthique et se distingue de cette dernière par une absence de luminosité et une diminution de la vitesse d'écoulement (Brunke and Gonser, 1997). Une limite peut être facilement définie entre benthique et hyporhéique mais ce n'est pas le cas pour l'interface entre eau souterraine et zone hyporhéique qui constitue un continuum hydrologique.

La zone hyporhéique est un espace dynamique dans le temps et l'espace. L'eau peut s'infiltrer sur des distances très variables : à l'échelle du centimètre en présence d'un obstacle (morceau de bois, rocher), du mètre (succession radier/mouille), jusqu'à la formation de « corridor hyporhéique » à l'échelle du kilomètre. La configuration spatiale de la zone hyporhéique est également variable d'amont en aval selon les contraintes morphologiques du cours d'eau. La zone hyporhéique peut être inexistante si la rivière coule directement sur un substratum imperméable (Fig. II-1). Elle peut également être constituée exclusivement d'eau de surface et ne pas avoir de contact avec la nappe phréatique (Fig. II-1, B et C). Enfin, des échanges hydrauliques peuvent avoir lieu entre l'eau de surface et la nappe phréatique (Fig. II-1, D) et un équilibre dynamique peut s'installer entre les deux compartiments (Fig. II-1, E). Généralement, en tête de bassin versant, la zone hyporhéique est réduite ou inexistante (Fig. II-1, A et B) tandis qu'en amont de la plaine alluviale, l'accumulation d'alluvions favorise les types C et D (Fig. II-1). En aval de plaine alluviale, la nappe phréatique est proche de la surface donc le type E prédomine (Fig. II-1, Datry et al., 2008). Ce profil est classiquement retrouvé d'amont en aval mais d'autres profils peuvent exister selon les contraintes géologiques traversées par le cours d'eau. La zone hyporhéique est une interface où se mixe un certain pourcentage d'eau de surface et d'eau souterraine qui peuvent varier au cours du temps et des saisons. En effet, lors des périodes de crues, le mix est constitué en majorité

d'eau de surface (« downwelling ») alors qu'en période d'étiage, l'eau souterraine domine ce mélange (« upwelling ») (Malard et al., 2000). La circulation de l'eau dépend également en grande partie des caractéristiques physico-chimiques du sédiment. La granulométrie fait varier la porosité/perméabilité et donc la conductivité hydraulique. La porosité est déterminée par la taille des grains du sédiment, leur distribution mais aussi leur forme et leur rugosité à la surface (Brunke and Gonser, 1997). La zone hyporhéique est donc extrêmement variable selon les conditions spatio-temporelles et la composition des sédiments. L'adoption de modèles statiques des concepts écologiques ne convient donc pas pour cet écosystème (Brunke and Gonser, 1997).

### **1.2. La zone hyporhéique est un hotspot de processus biogéochimiques assurés par les communautés microbiennes du sédiment**

La zone hyporhéique a été caractérisée de « river's liver » par certains auteur.e.s parce qu'elle assure un rôle d'épurateur des cours d'eau. En effet, la zone hyporhéique permet une rétention/transformation des nutriments et métaux ainsi qu'une dégradation des composants organiques traces (Lewandowski et al., 2019) garantissant ainsi une bonne qualité des eaux de surface et souterraines. La minéralisation de la matière organique et le recyclage des nutriments sont assurés par les communautés microbiennes du sédiment hyporhéique. Ces communautés microbiennes hétérotrophes sont composées de champignons, archées, bactéries, virus et d'une microfaune. Les bactéries composant ces communautés microbiennes sont particulièrement nombreuses dans le sédiment (van Beelen, 2003). Au cours du processus de minéralisation de la matière organique, les communautés microbiennes dégradent dans un premier temps les polymères complexes en monomères grâce à des enzymes hydrolytiques. Ces enzymes sont présentes soit au niveau de la membrane cytoplasmique et l'espace périplasmique (« ectoenzymes ») ou libres et adsorbés aux particules (« enzymes extracellulaires ou exo-enzymes »). Les composés résultant de l'hydrolyse enzymatique sont ensuite minéralisés par les communautés microbiennes via différents processus biogéochimiques. La disponibilité en substrat et en accepteurs d'électrons sont les principaux facteurs qui influencent ces processus (Fischer et al., 2005). Dans la zone hyporhéique, un gradient décroissant de la concentration en oxygène dissous existe de la surface vers la profondeur et entraîne un gradient de potentiel d'oxydo-réduction et une stratification des processus biogéochimiques appelé diagenèse précoce (Fig. II-2). En

fonction des valeurs des potentiels d'oxydo-réduction, on distingue 3 zones : oxique ( $> +100$  mV), suboxique (entre  $-100$  et  $+100$  mV) et anoxique ( $< -100$  mV). En zone oxique, la respiration et la nitrification utilisent l'oxygène comme dernier accepteur d'électrons et produisent respectivement du dioxyde de carbone ( $\text{CO}_2$ ) et des nitrates ( $\text{NO}_3^-$ ). La respiration aérobie est le mécanisme le plus efficace thermodynamiquement en présence d'oxygène, il est donc préférentiellement utilisé par les communautés hétérotrophes. Lorsque la concentration en oxygène diminue avec la profondeur dans la zone suboxique, le nitrate ( $\text{NO}_3^-$ ) joue le rôle d'accepteur d'électrons pour produire du diazote ( $\text{N}_2$ ) lors de la dénitrification. En zone anoxique, les formes oxydées du fer et du manganèse subissent une réduction dissimilatrice produisant l'apparition des ions réduits  $\text{Fe}^{2+}$  et  $\text{Mn}^{2+}$ . D'autres processus ont également lieu en anoxie comme la sulfato-réduction du sulfate ( $\text{SO}_4^{2-}$ ) en sulfure d'hydrogène ( $\text{H}_2\text{S}$ ) et la méthanogenèse (production de méthane  $\text{CH}_4$  à partir du  $\text{CO}_2$ ). La stratification des processus microbiens entraîne la formation de gradients d'oxygène, de nitrate et d'ammonium, de fer, de manganèse et de sulfate dans les sédiments avec la profondeur (Fig. II-2).

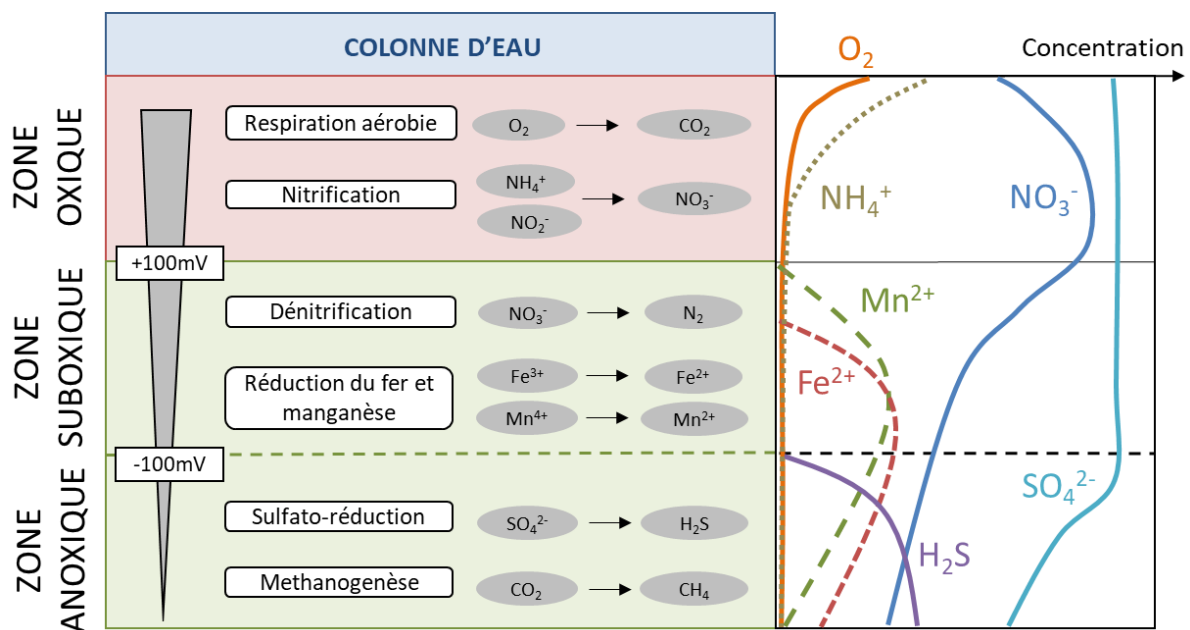


Figure II-2 : diagenèse précoce et concentrations en éléments dissous le long d'un gradient sédimentaire oxique-anoxique

Néanmoins, cette stratification dépend aussi de l'hétérogénéité du sédiment. Il peut donc y avoir à une même profondeur des micro zones aérobie et anaérobie avec une coexistence de dénitrification et nitrification par exemple. Les processus biogéochimiques

varient également dans le temps en fonction des flux d'eau qui traversent la zone hyporhéique (crue/étiage) mais aussi des rythmes circadiens d'oxygène et de nutriments dans l'eau de surface (Fischer et al., 2005). Globalement, les communautés microbiennes de la zone hyporhéique assurent donc des rôles essentiels dans la réalisation des cycles biogéochimiques des cours d'eau. Elles réalisent par exemple plus de 90 % de la respiration de la communauté d'organismes de la rivière (Brunke and Gonser, 1997). De plus, l'analyse des budgets biogéochimiques a permis de mettre en évidence que 37 à 76 % des apports totaux en azote étaient réduits essentiellement via la dénitrification microbienne, majoritairement dans les cours d'eau de 1<sup>er</sup> ordre (Fischer et al., 2005).

La zone hyporhéique joue également un rôle important dans le stockage temporaire des nutriments. La diminution de la vitesse d'écoulement permet en effet une rétention des nutriments par filtration/sorption lithologique. La zone hyporhéique peut donc être une source ou un réservoir de matière organique dissoute et particulaire selon la direction et la vitesse d'écoulement de l'eau et la granulométrie des sédiments (Brunke and Gonser, 1997). Similairement aux nutriments, les contaminants organiques et inorganiques peuvent être retenus dans la zone hyporhéique (Roling and van Verseveld, 2002 ; Gandy et al., 2007). La diminution de la vitesse d'écoulement dans cette zone riche en micro-organismes favorise un temps de contact important entre contaminants organiques et micro-organismes potentiellement capables de dégrader ces contaminants.

## **2. Effets délétères des pressions chimiques sur les fonctions microbiennes du sédiment : cas du cuivre**

Les principaux contaminants contribuant à la pollution du lit des cours d'eau sont des composés hydrophobes comme les PCB (polychlorinated-biphenyl) ou le DDT (dichlorodiphenyl-trichloroethane), des pesticides, des engrais, des métaux mais aussi des contaminants émergents comme les produits pharmaceutiques (Mohanavelu et al., 2022). Dans mes travaux de thèse, j'ai choisi de m'intéresser plus particulièrement au cas du cuivre qui est un composé utilisé depuis des centaines d'années pour ses propriétés biocides (purifiant pour l'eau, algicide, fongicide, nématocide, antibactérien, agent anti fouling) (Borkow and Gabbay, 2005). La contamination des rivières par le cuivre peut être ponctuelle (rejets industrielles, sites miniers, station d'épuration) ou diffuse (agriculture, ruissellement



routier) (Vendrell-Puigmitja et al., 2020; Comber et al., 2022). La pollution diffuse du cuivre liée à l'agriculture entraîne des niveaux de contamination modérés mais fréquents, notamment sur le territoire français (Mancioppi et al., 2010). C'est pourquoi j'ai choisi de concentrer mes travaux sur ce type de pollution.

## 2.1. Usage et devenir du cuivre en agriculture

Le cuivre est le composant principal de la bouillie bordelaise, utilisée depuis plus de 150 ans comme moyen de lutte contre les maladies cryptogamiques en agriculture notamment viticole. En effet le cuivre est efficace contre *Plasmopora viticola*, agent responsable du mildiou de la vigne. Originaire d'Amérique, le mildiou est apparu pour la première fois en France en 1878, causant de nombreux dégâts dans les vignobles français. Des vigneronns du Médoc avaient pour habitude de pulvériser du sulfate de cuivre dans les vignes pour éloigner les voleurs, ce qui a également eu pour effet une diminution de la présence du mildiou. À partir de cette observation, Alexis Millardet et Ulysse Gayon inventèrent la bouillie bordelaise composée d'un mélange de sulfate de cuivre et de chaux. Aujourd'hui, d'autres préparations à base de cuivre ont vu le jour (sulfate de cuivre tribasique, hydroxyde/oxyde/oxychlorure de cuivre) et son usage s'applique dans d'autres cultures que la vigne (maraîchage, vergers) et contre d'autres phytopathogènes (*e.g.* mildiou de pomme de terre, tavelure du pommier). Le cuivre est autorisé en agriculture conventionnelle et biologique mais, en ce qui concerne l'agriculture biologique, le cuivre est la seule matière active à effet fongicide fort à large spectre d'action autorisé. Les préparations à partir de cuivre sont de nos jours synthétisées chimiquement, on peut donc se poser la question de la légitimité de l'autorisation du cuivre en agriculture biologique qui interdit normalement l'utilisation des produits de synthèse. Un élément de réponse pourrait être le peu d'alternatives développées pour le moment, même si des pistes de recherche existent (agents biocides, agents de biocontrôle, résistances variétales, stimulateurs de défenses naturelles) (Andrivon and Savini, 2019). Faute d'autres solutions, le cuivre a bénéficié d'un renouvellement de son approbation par la Commission Européenne pour 7 ans le 27 novembre 2018 avec des doses à ne pas dépasser de 4 kg/hectare/an sur 7 ans par les agriculteurs.

Après épandage, une partie du cuivre se fixe dans les sols et la fraction qui n'est pas retenue rejoint les milieux aquatiques par lessivage/lixiviation (El Azzi et al., 2013). Une étude

récente estime que 8 kt de cuivre pénètrent chaque année dans les eaux douces de l'Union Européenne. Les principaux apports sont liés à des processus naturels (3,7 ktpa) mais une partie non négligeable provient de l'agriculture (1,8 ktpa) (Comber et al., 2022). Le cuivre se trouve sous forme dissoute ou particulaire dans le compartiment aquatique avec une limite entre les deux formes fixées à 0,45  $\mu\text{m}$ . Dans l'eau des zones agricoles, les concentrations en cuivre dissous peuvent dépasser 16  $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$  notamment dans des bassins versants viticoles comme dans le Beaujolais en France (Montuelle et al., 2010). Le cuivre ayant une affinité particulière pour la matière organique, il est rapidement fixé dans les sédiments (Lu and Allen, 2001). D'après le rapport de l'INERIS (Manciopi et al., 2010), dans les sédiments des rivières françaises, la concentration moyenne en cuivre mesurée sur une période de 28 ans était de 21,7  $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$  et la concentration médiane était de 48,5  $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$  (n=11 072). Cependant, ces concentrations peuvent être bien plus importantes selon le contexte : des concentrations en cuivre variant entre 18 et 209  $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$  ont par exemple été mesurées dans les sédiments d'un bassin versant de Galice en Espagne selon la proportion de vignes cultivées (Fernandez et al., 2015). Afin de préserver les écosystèmes aquatiques, certains états fixent une limite à ne pas dépasser : en France par exemple, l'arrêté du 9 août 2006 définit par exemple une concentration en cuivre maximale de 100  $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$  dans la fraction de sédiment sec < 2 mm. Ces réglementations s'appuient surtout sur des effets écotoxicologiques observés sur des macro-organismes benthiques tels que *Gammarus pulex* ou *Chironomus riparius*. Les concentrations létales chroniques médianes de cuivre après 28 à 35 jours d'exposition étaient par exemple de 151 à 327  $\text{mg Cu}\cdot\text{kg}^{-1}$  chez 5 organismes benthiques couramment utilisés pour les tests de toxicité des sédiments (*Gammarus pulex*, *Lumbriculus variegatus*, *Hyaella azteca*, *Chironomus riparius*, *Tubifex tubifex*) (Roman et al., 2007). Les communautés microbiennes réagissent à des concentrations en cuivre plus faibles que celles testées sur les macro-organismes pour établir des réglementations. Cela suggère que la réglementation n'est pas suffisamment protectrice vis-à-vis des communautés microbiennes (van Beelen and Doelman, 1997).

## 2.2. Effets négatifs du cuivre sur les fonctions et la structure microbiennes des sédiments

Le cuivre est un élément essentiel aux organismes vivants. C'est un cofacteur de nombreuses enzymes comme par exemple la cytochrome c oxydase impliquée dans la chaîne

respiratoire aérobie et la superoxyde dismutase impliquée dans la photosynthèse (Aguirre and Pilon, 2016; Llases et al., 2019). Cependant, il peut devenir toxique pour les organismes lorsque sa concentration dépasse un certain seuil. Les micro-organismes ont plusieurs moyens de résister à une forte concentration métallique (Fig. II-3) : pompe à efflux, transporteurs membranaires, séquestration intra- ou extra-cellulaire, modification de la spéciation du métal, by-pass métabolique (*e.g.* production de protéines alternatives qui ne fixent pas le cuivre), mécanisme de réparation des dommages cellulaires (Lemire et al., 2013). Malgré ces mécanismes de lutte, l'accumulation intracellulaire de cuivre entraîne la production d'espèces réactives de l'oxygène (ROS) qui causent des dommages à l'ADN et le dysfonctionnement de protéines telles que les enzymes impliquées dans la croissance cellulaire par exemple. Le cuivre peut aussi induire une peroxydation des lipides entraînant une augmentation de la perméabilité membranaire. Le cuivre a donc un effet biocide fort mais sa toxicité dépend en grande partie de sa spéciation qui conditionne sa biodisponibilité pour les organismes, la forme la plus toxique étant la forme soluble  $\text{Cu}^{2+}$  (Smolyakov et al., 2004). Dans les milieux aquatiques, la spéciation du cuivre dépend de nombreux paramètres environnementaux : pH, quantité de matière organique dissoute ou particulaire, température, compétition avec les ions  $\text{Ca}^{2+}$  et  $\text{Mg}^{2+}$ , présence d'autres métaux.

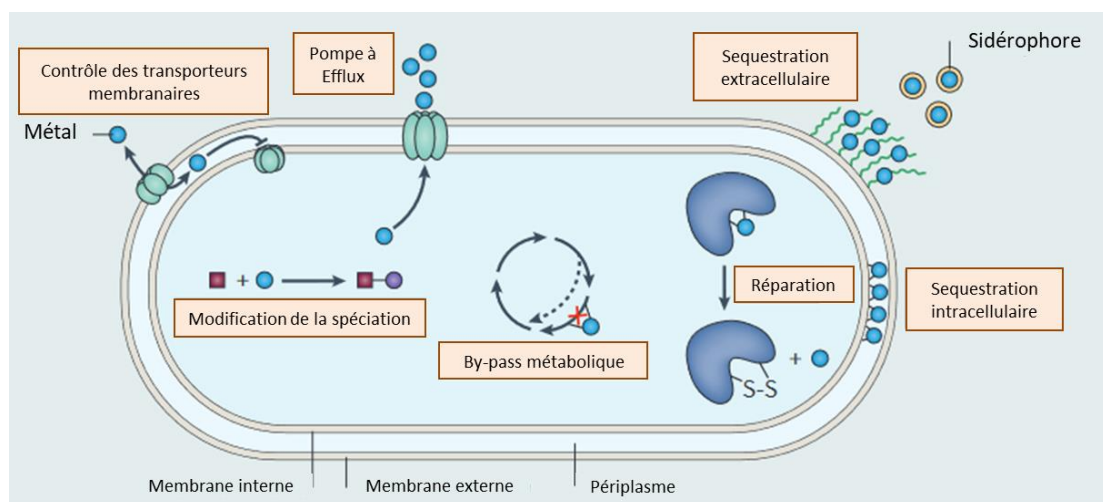


Figure II-3 : schéma des mécanismes de résistance et d'adaptation des micro-organismes aux métaux (Source : Lemire et al., 2013)

Une exposition chronique au cuivre a des effets négatifs sur les fonctions écologiques assurées par les communautés microbiennes du sédiment. La décomposition de la matière organique est affectée par la présence de cuivre (Fernandez et al., 2015). Une exposition de

communautés microbiennes du sédiment en mésocosme à 46 mg.kg<sup>-1</sup> de cuivre a par exemple entraîné une diminution de la dégradation de 77 % de différents substrats carbonés (Sutcliffe et al., 2019). De manière similaire, dès 7 jours d'exposition à 40 mg.kg<sup>-1</sup> de cuivre, les activités exo-enzymatiques (beta-glucosidase, leucine aminopeptidase, phosphatase) de communautés microbiennes sédimentaires en mésocosmes étaient diminuées de moitié (Mahamoud Ahmed et al., 2018). Le cuivre a aussi un effet sur la respiration et la dénitrification microbienne, suggérant un potentiel effet du cuivre sur les cycles du carbone et de l'azote dans les cours d'eau. Ainsi, Mahamoud Ahmed et al., (2018) ont montré une inhibition de la respiration durant 21 jours et de la dénitrification pendant 14 jours chez des communautés microbiennes du sédiment exposées à 40 mg.kg<sup>-1</sup> de cuivre en mésocosmes. Une inhibition quasiment complète (85 %) de la dénitrification après exposition de sédiments d'estuaire à 60 mg.kg<sup>-1</sup> de cuivre a également été montrée par Magalhães et al., (2011). L'annamox, qui est un processus du cycle de l'azote réalisé par des bactéries (Ammonia-Oxidizing Bacteria) et des archées (Ammonia-oxidizing Archaea), est inhibé en présence de cuivre : un impact sur l'activité ammonia monooxygénase a ainsi été démontré après une exposition à 50 mg.kg<sup>-1</sup> de cuivre dès 15 jours et persistant jusqu'à 100 jours (Wang et al., 2018).

L'exposition au cuivre entraîne également une modification de la composition microbienne des communautés exposées qui s'accompagne d'une diminution de la diversité microbienne. Ainsi, une diminution de la diversité des bactéries et archées a été mise en évidence après 21 jours d'exposition à 40 mg.kg<sup>-1</sup> (Mahamoud Ahmed et al., 2020). À une concentration similaire (46 mg.kg<sup>-1</sup>), Sutcliffe et al., (2019) ont montré une modification de la composition de la communauté microbienne et une baisse de l'indice de Shannon pour les traitements exposés au cuivre comparés au contrôle. La composition de la communauté bactérienne des sédiments de la baie de Jiaozhou en Chine a également été modifiée par la présence de cuivre : la proportion des phyla *Chloroflexi* et *Acidobacteria* étaient diminuée alors que les *Gammaproteobacteria* et *Planctomyces* ont légèrement augmentés (Zhao et al., 2014). Dans cette étude, l'indice de Shannon était 3,4 fois plus faible dans les sédiments exposés au cuivre par rapport au contrôle.

### 2.3. Acquisition de tolérance au cuivre par les communautés microbiennes du sédiment

La composition de la communauté microbienne d'un milieu est déterminée en partie par les conditions environnementales de ce milieu, y compris la présence de toxique. En effet, ce toxique exerce une pression de sélection sur la communauté microbienne entraînant une plus grande résistance à ce contaminant chez la communauté microbienne exposée, suivant le principe PICT (Pollution-Induced Community Tolerance) (Blanck et al., 1988). La tolérance au toxique peut être le résultat d'une sélection d'espèces tolérantes et/ou d'une adaptation fonctionnelle telle que la mise en place de système de détoxification (= phase de sélection, figure II-4-1). Un test de toxicité aiguë permet de détecter cette acquisition de tolérance (= phase de détection, figure II-4-2) : il consiste à exposer les communautés microbiennes à une concentration croissante en toxique pendant un temps court. Une mesure d'inhibition d'un paramètre biologique permet l'obtention de courbes dose-réponse. À partir de ces courbes dose-réponse, il est possible de déterminer un seuil de tolérance :  $CE_x$  qui correspond à la concentration efficace en toxique qui induit x % d'inhibition de l'activité mesurée (généralement 50 %).

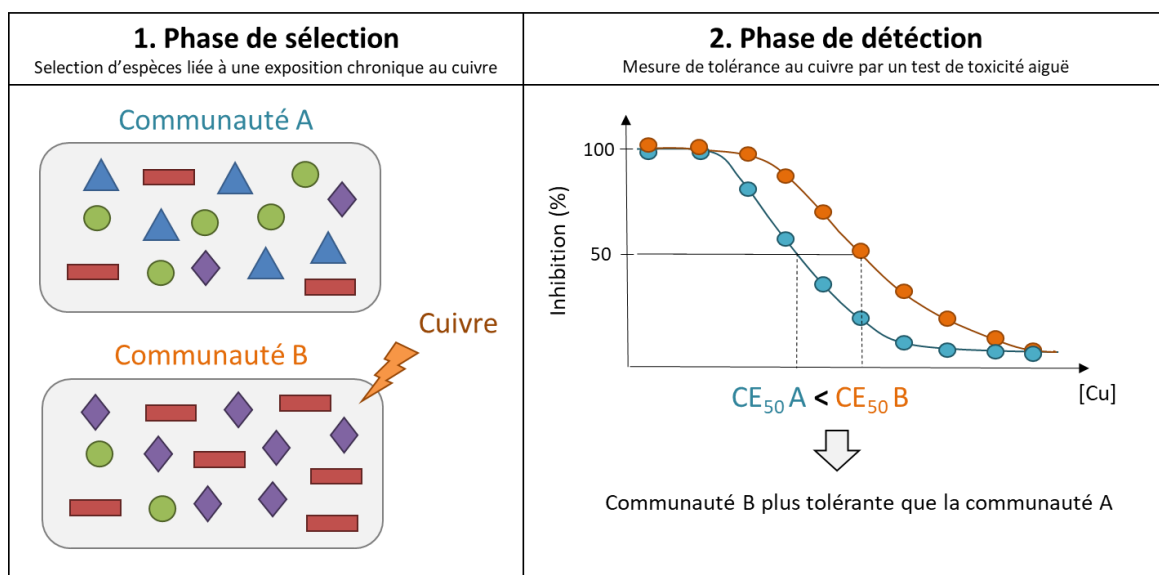


Figure II-4 : principe de l'approche pollution-induced-community-tolerance (PICT) appliqué au cuivre

Des études ont mis en évidence un lien entre exposition au cuivre et acquisition de tolérance au cuivre chez les communautés microbiennes dominées par les autotrophes (périphyton) (Tlili et al., 2011; Lambert et al., 2016). La tolérance au cuivre (estimée via la  $CE_{50}$ )

en utilisant la respiration comme variable réponse) était par exemple multipliée par 3,7 le long d'un gradient amont-aval de la rivière Morcille (France) avec une corrélation forte avec les concentrations en cuivre mesurées dans l'eau à cette période de l'année (Tlili et al., 2011). En revanche, peu d'études ont été réalisées dans le sédiment, exceptée une étude de Mahamoud Ahmed et al., (2020) qui a mis en évidence une acquisition de tolérance au cuivre après 21 jours d'exposition des sédiments à  $40 \text{ mg.kg}^{-1}$  de cuivre qui concordait avec un changement de la structure bactérienne et archéale. L'acquisition de tolérance au cuivre peut être dû à un changement de structure de la communauté mais elle pourrait aussi être liée à des adaptations fonctionnelles. Le transporteur membranaire du système Cus et l'ATPase CopA sont des exemples d'adaptations cellulaires permettant de résister au cuivre (Munson et al., 2000; Rensing et al., 2000). L'ensemble des études citées précédemment ont montré la sensibilité des communautés microbiennes à la contamination au cuivre dans les premiers centimètres du sédiment. Néanmoins, cette contamination est susceptible de s'étendre à l'ensemble de la zone hyporhéique par l'accumulation de sédiment contaminé (via par exemple l'érosion des sols agricoles) ou l'infiltration d'eau contaminée (Qin et al., 2022). À notre connaissance, il n'existe pas d'études s'intéressant aux effets du cuivre sur les communautés microbiennes aux différentes profondeurs de la zone hyporhéique.

### **3. Les communautés microbiennes du sédiment hyporhéique sont exposées à des stress physiques : cas du dépôt de sédiments fin et de l'assèchement**

Les activités anthropiques au niveau du bassin versant (chenalisation, constructions de barrages, retenues d'eau, destruction de la zone riparienne, agriculture intensive) mais aussi à l'échelle globale (émission de  $\text{CO}_2$ ) ont des conséquences physiques dans les cours d'eau (assèchement et crue extrêmes, colmatage, augmentation de la température, de la quantité d'UV, de la turbidité, acidification). Les communautés microbiennes des cours d'eau sont confrontées à l'ensemble de ces stress physiques. J'ai choisi de m'intéresser particulièrement à l'assèchement et au colmatage qui sont des stress physiques fréquemment rencontrés dans les cours d'eau et les plus communément associés au changement global (Wharton et al., 2017; Messenger et al., 2021).

### 3.1. Le dépôt de sédiment fins : un stress majeur dans les cours d'eau

Le dépôt de sédiments fins (< 2mm) et son infiltration dans la zone hyporhéique est un phénomène que l'on appelle aussi colmatage des rivières. Les cycles de colmatage/décolmatage font partie d'un processus naturel d'érosion/sédimentation des rivières qui permet un apport et un recyclage des nutriments. Cependant, les activités humaines entraînent un apport en sédiments fins important qui dépasse les capacités de transport des cours d'eau. Cette amplification du colmatage est causée par des activités anthropiques directement au niveau du cours d'eau (activité minières, construction et chasse de barrages, rejet de station d'épuration) ou indirectement au niveau du bassin versant lorsque l'érosion des sols est favorisée (urbanisation, déforestation, surpâturage et labour des cultures) (Hancock, 2002; Wharton et al., 2017).

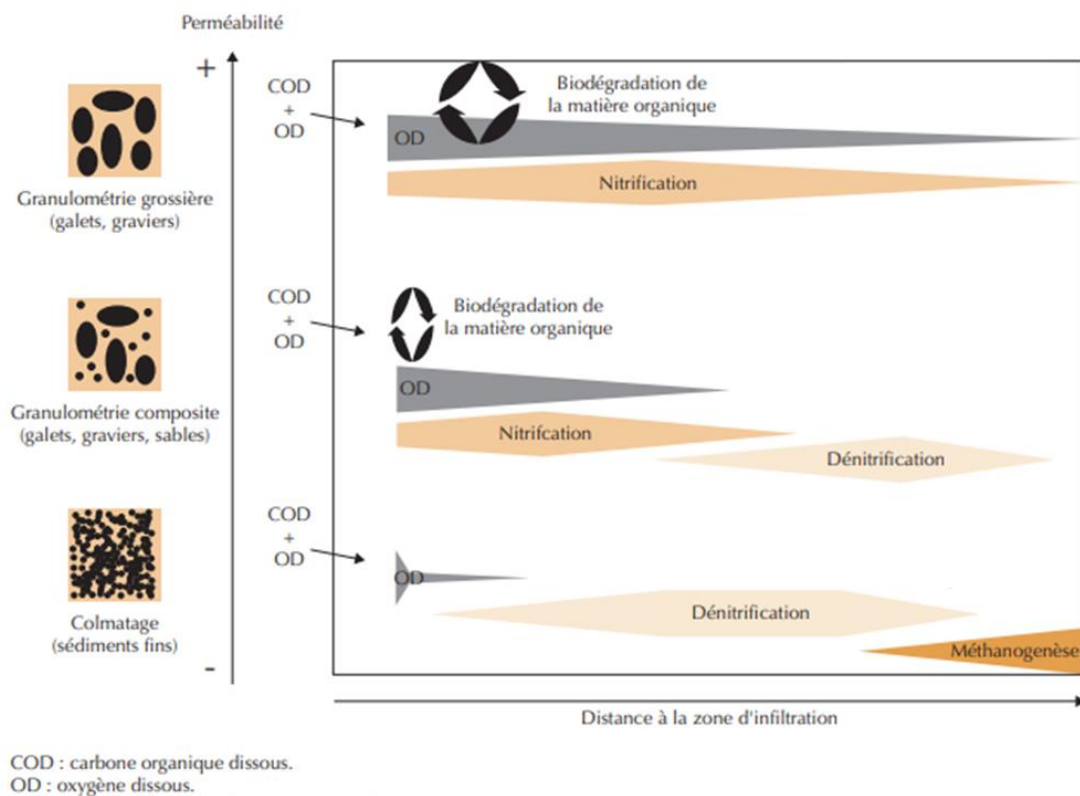


Figure II-5 : processus microbiens dans la zone hyporhéique en fonction de la perméabilité des sédiments (Source : Datry et al., 2008)

Le colmatage a des conséquences physiques directes sur les cours d'eau. Il réduit la porosité du sédiment entraînant une diminution de la perméabilité et des échanges entre surface, zone hyporhéique et eau souterraine (Brunke and Gonser, 1997). Le colmatage diminue également l'hétérogénéité des habitats et réduit l'accès des organismes aux couches

de sédiment profondes qui jouent un rôle refuge lors de perturbations en surface (Vander Vorste et al., 2016). Au niveau des processus biogéochimiques, le dépôt de sédiments fins réduit la perméabilité et les échanges d'oxygène dissous ce qui provoque le passage d'un fonctionnement aérobie à anaérobie des communautés microbiennes du sédiment (Fig. II-5). Une diminution de la respiration et de la nitrification et une augmentation de la dénitrification et de la méthanogenèse ont été observées après un dépôt de sédiments fins (Brunke and Gonser, 1997; Lefebvre et al., 2004; Datry et al., 2008; Navel et al., 2011). Le colmatage entraîne une diminution du flux d'accepteur d'électrons comme l'oxygène ce qui a pour conséquence une diminution globale de la dégradation de la matière organique (Fig. II-5). Une expérience en colonnes menée par Navel et al., (2011) a par exemple montré une diminution significative de 30 % de la dégradation de litière de feuilles après 50 jours d'exposition à un dépôt de 2 cm de sédiments fins en surface. Les changements fonctionnels liés à la diminution de la porosité dans la zone hyporhéique peuvent s'accompagner d'un changement de la structure microbienne. Ainsi, la composition microbienne de la rivière Usses (France) était différente selon la porosité du sédiment (variable de 1,2 à 12,6 % à 10 cm de profondeur) (Nogaro et al., 2013).

Néanmoins, les effets du colmatage ne suivent pas toujours ce schéma. Le colmatage peut aussi stimuler les activités microbiennes lorsque le taux et la disponibilité de la matière organique sont élevés. Une étude de Nogaro et al., (2007) a montré que les processus biogéochimiques (respiration, dénitrification, fermentation) et le métabolisme microbien (activités enzymatiques) étaient stimulés en cas de dépôt d'eaux pluviales riches en matière organique particulaire avec un rapport C/N faible. Une autre étude montre que les effets du colmatage dépendent de son homogénéité. Des carottes de sédiments ont été prélevées sur des sites colmatés et non colmatés de 3 rivières françaises (Usses, Drôme et Isère). Un colmatage homogène augmentait le temps de résidence de l'eau dans le sédiment ce qui augmentait les activités microbiennes contrairement à un colmatage hétérogène où les activités microbiennes étaient moins importantes à cause du flux d'eau élevé (Nogaro et al., 2010).



### 3.2. L'assèchement : un stress physique qui s'intensifie dans les cours d'eau

Les rivières intermittentes et éphémères dont le flux d'eau s'interrompt naturellement une partie de l'année représentent entre 51 et 60 % du réseau fluvial mondial (Messenger et al., 2021). Contrairement à ces cycles d'assèchements naturels et prévisibles de ces rivières intermittentes et éphémères, un nombre croissant de cours d'eau est soumis à des assèchements hydrologiques beaucoup plus intenses dans le temps et l'espace. L'augmentation de la sévérité des assèchements hydrologiques aussi bien pour les rivières pérennes que pour les rivières intermittentes et éphémères est causée en partie par l'augmentation des activités humaines de manière directe (e.g. besoin en irrigation pour l'agriculture, construction de barrages hydroélectriques) et indirecte (changement climatique). En effet, le changement climatique pourrait indirectement favoriser l'assèchement des cours d'eau par un réchauffement global de l'air, une baisse des précipitations et une augmentation de l'évapotranspiration (Messenger et al., 2021). Une modélisation appuyée par des données de terrain a par exemple été réalisée par Sauquet et al., (2021) pour prédire les assèchements à l'échelle régionale en France suivant différents scénarios du GIEC (Groupe d'experts intergouvernemental sur l'évolution du climat). Les résultats vont dans le sens d'une augmentation de l'étendue et de la durée des assèchements dans les régions de France où la probabilité d'assèchement était déjà élevée et des changements de saisonnalité dans les régions alpines.

Les conséquences écologiques de l'assèchement sont multiples. L'abaissement du niveau de l'eau entraîne une perte d'habitat pour les organismes aquatiques et une perte de connectivité entre les habitats (Sarremejane et al., 2022; Malish et al., 2023) ce qui modifie la diversité et la composition des communautés. L'assèchement provoque aussi une modification de la qualité de l'eau : augmentation de la température et de la conductivité, accumulation de la matière organique particulaire, diminution de l'oxygène dissous et augmentation des concentrations en contaminants (Ahmadi and Moradkhani, 2019). La structure et les fonctions des communautés microbiennes du sédiment sont également modifiées. Tout d'abord, une augmentation courte et intense des activités aérobies (respiration et nitrification) et une diminution de la dénitrification ont lieu au début de l'assèchement à cause d'une augmentation transitoire du taux d'oxygène dans les interstices du sédiment lors de l'abaissement du niveau d'eau (Fig II-6). Les concentrations en  $\text{NO}_3^-$ -N ont

par exemple été multiplié par 5 après 10 jours d'assèchement de sédiment en mésocosme tandis que les concentrations en  $\text{NH}_4^+\text{-N}$  étaient divisées par plus de 4 suggérant une augmentation de nitrification et une diminution de la dénitrification (Gómez et al., 2012). Ensuite, ces activités microbiennes chutent lorsque l'assèchement se prolonge (Paranaíba et al., 2020; Arce et al., 2021; Pinto et al., 2021; Schreckinger et al., 2021) (Fig. II-6). Cette cinétique a été mise en évidence, entre autres, par Arce et al., (2021) dans une expérience en mésocosmes sur des colonnes de sédiments. Après 11 jours d'assèchement, les émissions de  $\text{CO}_2$  des colonnes de sédiments étaient multipliées par 10 par rapport aux émissions avant assèchement puis elles diminuaient progressivement pour revenir à un niveau proche du départ après 9 semaines d'assèchement (Arce et al., 2021).

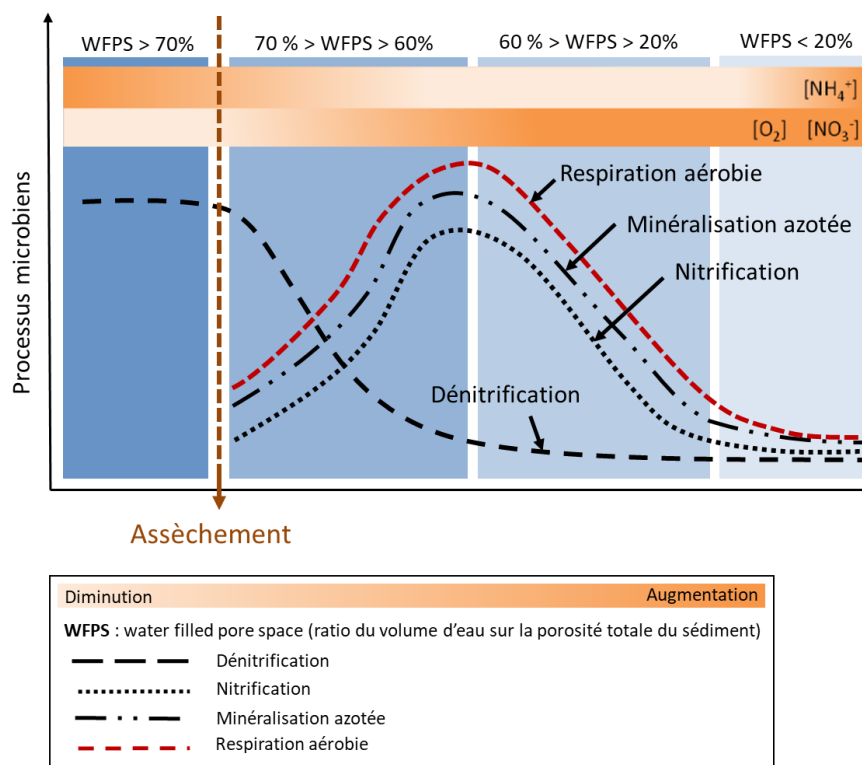


Figure II-6 : évolution des processus microbiens lors d'un assèchement (D'après Pinto et al., 2021)

L'assèchement prolongé entraîne globalement une diminution du métabolisme microbien. Ainsi, au cours d'une expérience d'assèchement de sédiment pendant 13 semaines en mésocosmes, les activités enzymatiques ont diminué de manière prononcée pour les aminopeptidases et un peu moins drastiquement pour les enzymes impliquées dans la dégradation des carbohydrates (Pohlen et al., 2013). Cette diminution du métabolisme microbien est susceptible d'affecter les processus écosystémiques auxquels les communautés

microbiennes contribuent comme de la décomposition de la matière organique. Par exemple, la décomposition de bâtons de bois disposés dans 20 cours d'eau de Catalogne (Espagne) et la biomasse fongique étaient diminués par les assèchements (surtout en surface par rapport à la subsurface à 15 cm de profondeur) (Arias-Real et al., 2020).

L'assèchement a également pour effet une modification de la structure de la communauté microbienne et une baisse de la diversité microbienne. Dans leur expérience d'assèchement en mésocosmes de 13 semaines, Pohlen et al., (2013) ont en effet montré une évolution de la composition de la communauté microbienne des sédiments vers la composition microbienne d'un sol (augmentation de la proportion des *Actinobacteria* et *Alphaproteobacteria* et diminution des *Bacteroidetes* et *Betaproteobacteria*). Une autre étude en mésocosme a mis en évidence une augmentation significative de la proportion des *Firmicutes* après 90 jours d'assèchement (Schreckinger et al., 2021). Cette même étude montre également une diminution significative de l'abondance et de la diversité bactérienne dès 30 jours d'assèchement. Le compartiment bactérien n'est pas le seul à être affecté par les effets des assèchements. Une étude réalisée sur 15 cours d'eau de Catalogne en Espagne soumis à différents régimes naturels d'intermittence a par exemple montré une relation inversement proportionnelle entre durée d'assèchement et richesse en espèces fongiques (Arias-Real et al., 2022). D'autre part, la composition des archées était particulièrement affectée (comparée aux bactéries et champignons) au cours d'un assèchement de longue durée (150 jours) de sédiments en mésocosmes (Gionchetta et al., 2019b).

Un autre pic des activités aérobies a lieu après remise en eau de sédiments asséchés grâce à un apport d'oxygène dans l'eau (Paranaíba et al., 2020) (Fig. II-7). Une augmentation de 32 à 66 fois de la respiration après remise en eau a par exemple été montrée sur 200 rivières intermittentes et éphémères à travers le monde (Fromin et al., 2010). Un pic de nitrification est également observé dans les premières phases de remise en eau avant de chuter pour laisser place à la dénitrification (Fig. II-7). L'ensemble de ces processus aboutissent à l'augmentation de la production et du lessivage de nitrate et à une augmentation des émissions de  $N_2O$  lors de la remise en eau des sédiments (Pinto et al., 2021). Ces pics d'émissions de  $CO_2$  et  $N_2O$  suggèrent que les cycles d'assèchement et de remise en eau contribuent de manière significative aux émissions de gaz à effet de serre. Le métabolisme microbien augmente également progressivement après remise en eau (Marxsen et al., 2010)

notamment grâce à la libération de nutriments résultant de la lyse cellulaire pendant l'assèchement (Arce et al., 2021). Une étude en mésocosme a par exemple mis en évidence la résilience des activités enzymatiques (aminopeptidases) en 10 à 14 jours après un assèchement des sédiments de 13 semaines (Pohlon et al., 2013). Contrairement aux réponses microbiennes fonctionnelles, après remise en eau, la composition structurale des communautés microbiennes ne revient pas à son état initial avant assèchement (Rees et al., 2006; Marxsen et al., 2010; Pohlon et al., 2013).

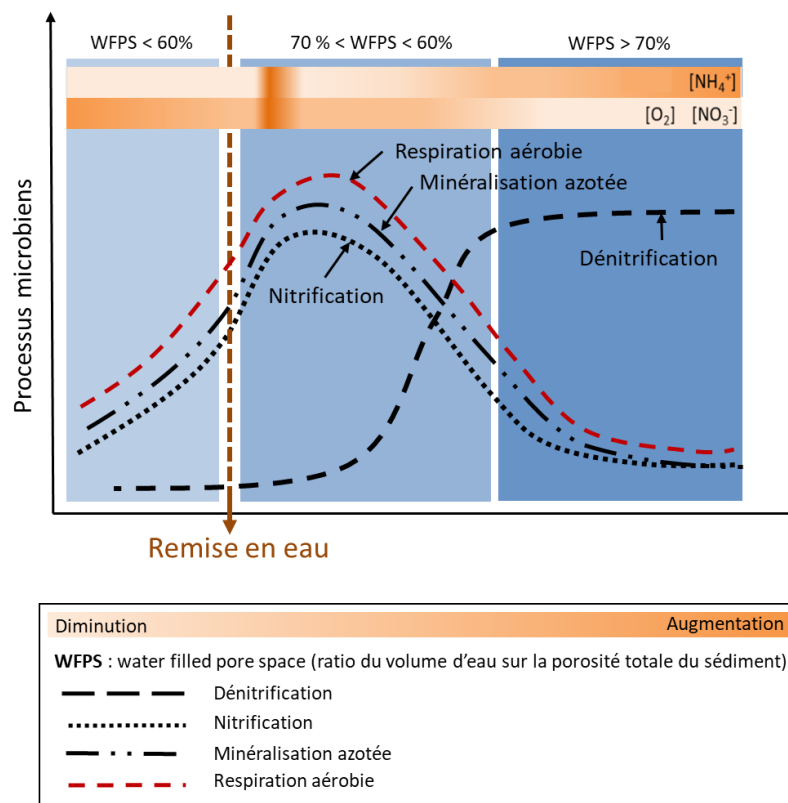


Figure II-7 : évolution des processus microbiens après remise en eau (D'après Pinto et al., 2021)

La zone hyporhéique joue un rôle majeur dans la modulation des effets de l'assèchement grâce notamment à une humidité résiduelle en profondeur (Marxsen et al., 2010). En effet, cette humidité résiduelle permet souvent aux communautés microbiennes de maintenir leur métabolisme actif alors qu'à la surface asséchée, les activités microbiennes sont drastiquement réduites. Après 105 jours d'assèchement en canaux, le taux d'humidité important dans la zone hyporhéique a par exemple permis de réduire les effets de l'assèchement sur les activités exo-enzymatiques (aminopeptidase, glucosidase, xylosidase, phosphatase) et la respiration bactérienne (Coulson et al., 2021). De la même manière, lors d'un assèchement de 165 jours en colonnes, les activités exo-enzymatiques (beta-D-

glucosidase, beta-D-xylosidase) étaient diminuées au moins de moitié en surface (0-5 cm) tandis qu'il n'y avait pas de différences par rapport au contrôle en profondeur (22-25 cm). Les auteurs expliquent cette différence notamment par un taux d'humidité plus élevé en profondeur (2,5 %) qu'en surface (0,5 %) (Gionchetta et al., 2019a). Les bactéries pourraient même utiliser la zone hyporhéique comme refuge lors de l'assèchement (Febria et al., 2012) comme c'est le cas pour les invertébrés (Vander Vorste et al., 2016) ce qui permet d'augmenter la possibilité de résilience après perturbation. Une étude a par exemple montré qu'une part de la communauté bactérienne (19 % des OTUs) était retrouvée à la fois dans l'eau interstitielle et les sédiments du cours d'eau intermittent Dewar au Canada suggérant une utilisation des sédiments hyporhéiques comme refuge (Febria et al., 2012). Cependant, cette étude n'a pas exploré le potentiel de cette zone refuge pour recoloniser les sédiments après assèchement. La vitesse, la durée de l'assèchement et le taux de précipitation sont aussi des paramètres qui influencent la résilience des fonctions microbiennes (Febria et al., 2012 ; Gionchetta et al., 2019a ; Arce et al., 2021).

#### **4. Les cours d'eau : un environnement sous pressions multiples**

##### **4.1. La réglementation ne prend pas en compte la réalité multi stress environnementale**

La Directive Cadre européenne sur l'Eau (2000/60/EC) vise à atteindre ou maintenir un « bon état écologique et chimique » des masses d'eau de surface et souterraine. Cet objectif avait d'abord pour date butoir 2015 avant d'être reporté à 2027. Afin d'améliorer la Directive Cadre sur l'Eau et d'atteindre les objectifs annoncés, des avancées scientifiques et techniques sont nécessaires, dont la prise en compte des interactions entre stress multiples qui n'est pas du tout considérée à l'heure actuelle (Ranjan and Shortle, 2017; Carvalho et al., 2019). Pourtant, la plupart des rivières européennes sont exposées au minimum à trois stress simultanément (Schäfer et al., 2016; Baattrup-Pedersen et al., 2019). Dans le cadre de la DCE, des seuils de contamination chimique à ne pas dépasser dans les écosystèmes aquatiques appelés Normes de Qualité Environnementales (NQE) ont été définis pour 41 substances prioritaires (annexe II de la directive 2008/105/EC). Ces normes ont été établies à partir de tests de toxicité standards (issus des recommandations de l'Organisation de Coopération et de Développement Économiques) mono-spécifiques en conditions optimales de culture

ou croissance de l'organisme, ce qui ne reflète pas la réalité écologique des cours d'eau. De plus, elles ne prennent pas en considération les interactions avec d'autres substances (effets cocktail) ou avec d'autres stress physiques affectant les cours d'eau (e.g. assèchement, colmatage, réchauffement). Ces interactions pouvant aboutir à des « surprises écologiques », il est essentiel de connaître les effets des stress combinés pour pouvoir prioriser les actions à mener, notamment pour les gestionnaires de bassins versants (Reid et al., 2019).

#### 4.2. Les stress combinés peuvent entraîner des changements écologiques inattendus

De nos jours, les écosystèmes sont exposés à des perturbations anthropiques multiples. Dans le cas le plus simple, les effets de ces perturbations s'additionnent (Fig. II-8). Par exemple, les effets combinés d'un réchauffement de l'eau (+1,6 °C), un assèchement et une exposition aux pesticides sur des communautés microbiennes épilithiques (sédiments grossiers) et épipsammiques (sédiments fins) en rivières artificielles s'additionnait pour 71 % des combinaisons (absence d'interaction) (Romero et al., 2019). Le modèle additif est le plus facilement prévisible pour les gestionnaires, mais ce n'est pas le seul modèle qui décrit les réponses aux stress multiples dans les écosystèmes. En effet, la réponse écologique peut être le résultat d'interactions complexes entre ces stress et ne coïncide pas toujours avec une simple addition des effets du stress A et B (Galic et al., 2018). Des adaptations du modèle additif ont notamment été nécessaires en fonction de la variable réponse étudiée. Par exemple, dans le cas de l'évaluation d'un taux de mortalité des organismes, les individus tués par le stress A ne peuvent pas être à nouveau tués par le stress B, il faut donc apporter une correction ( $A+B-(A \times B)$ ) qui correspond à un modèle appelé multiplicatif (Fig. II-8). Carrier-Belleau et al., (2021) ont par exemple utilisé cette correction avec succès pour l'évaluation du taux de mortalité de bivalves exposés pendant 1 à 3 mois aux effets combinés d'un réchauffement (+6 °C), d'une variation de salinité et d'un enrichissement en nutriments.

En revanche, il n'est pas possible d'appliquer ces modèles additif ou multiplicatif lorsqu'un seul stress domine les réponses aux combinaisons de stress (Dominance Fig. II-8). Le « simple comparative model » a été décrit par Folt et al., (1999). Ce modèle prédit que la combinaison des stress est égale à l'effet du stress qui a le plus d'effet. Morris et al., (2022) ont par exemple montré par une modélisation que les effets de la combinaison du réchauffement avec d'autres stress aquatiques étaient globalement le résultat des effets du

stress le plus fort. Dans les cas où ce modèle s'applique, les efforts devraient se concentrer sur le stress le plus important pour prédire et gérer les effets des combinaisons de stress.

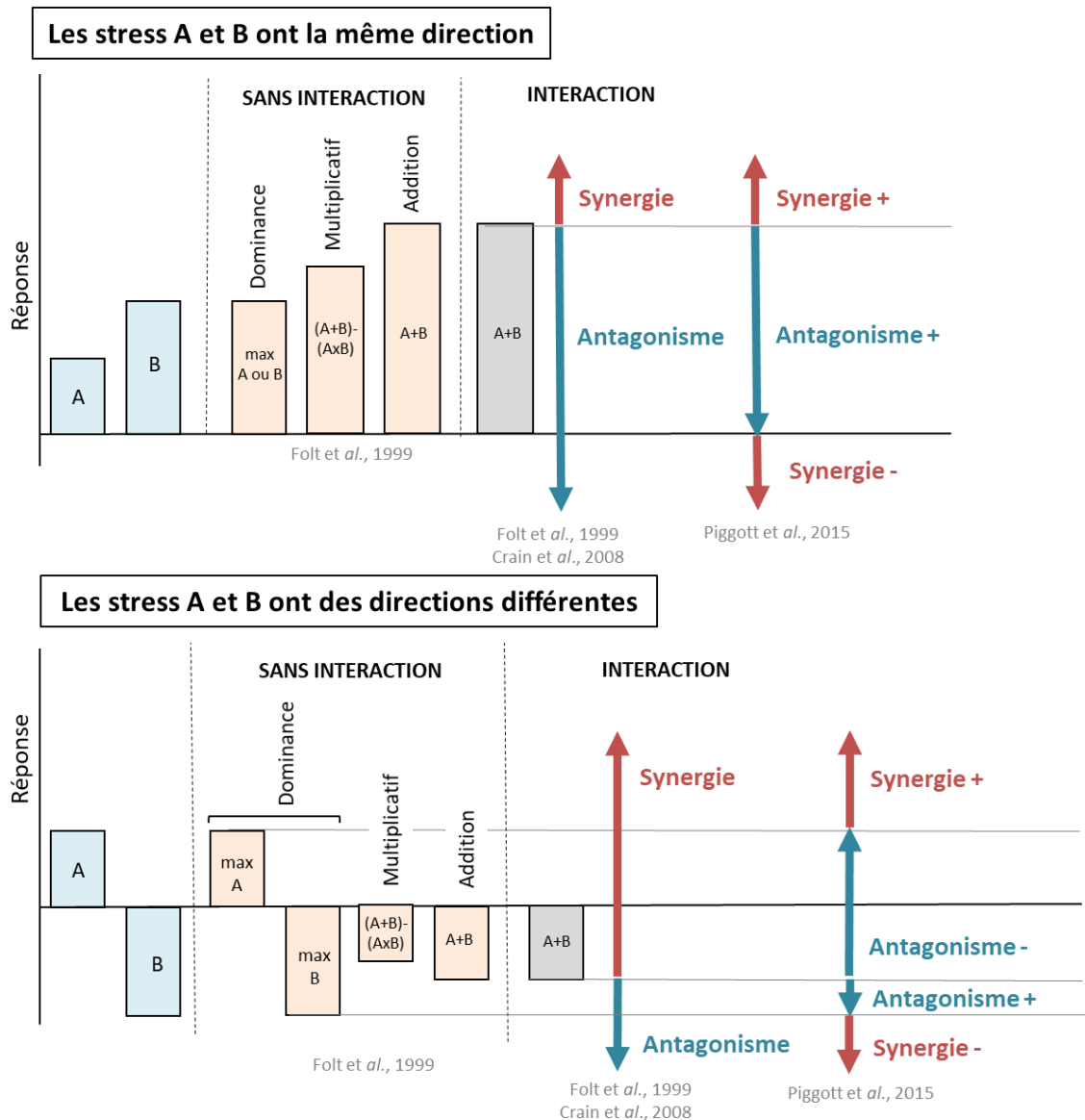


Figure II-8 : schéma des différents types d'interaction entre stress (d'après Côté et al., 2016)

Dans d'autres cas, le résultat ne correspond pas à un modèle additif, multiplicatif ou de dominance, ce qui laisse à penser une interaction entre les stress. Les interactions entre stress font l'objet d'un intérêt particulier en recherche et dans le monde opérationnel puisque leurs effets sont moins prévisibles qu'une simple addition des effets. Classiquement, on définit une interaction antagoniste quand les effets des stress multiples sont inférieurs à la somme/multiplication des effets individuels (Folt et al., 1999; Crain et al., 2008). Les effets combinés d'un assèchement et d'un enrichissement en nutriments sur des macro invertébrés étaient par exemple antagonistes après 28 jours d'exposition au stress en mésocosmes

(L'assèchement diminuait les effets de l'enrichissement en nutriments) (Loskotová et al., 2019). À l'inverse, lorsque l'interaction est synergique, les effets des stress multiples sont supérieurs à la somme/multiplication des effets individuels des stress (Folt et al., 1999; Crain et al., 2008). Par exemple, les effets d'une augmentation de la température et de la concentration en nitrates ont interagi de manière synergique sur la capacité aérobie du salmonidé d'eau douce (*Thymallus thymallus*) après 6 semaines d'expériences en aquariums (Opinion et al., 2020). Certains auteurs ont montré qu'il existe un seuil dans les interactions synergiques au-delà duquel les populations sont poussées à l'extinction via des boucles de rétroaction positive appelées « super synergie » (Brook et al., 2008; Côté et al., 2016). Ces définitions classiques du synergisme et de l'antagonisme sont adaptées lorsque les effets des 2 stress vont dans la même direction (Fig. II-8). Dans le cas où les effets individuels des 2 stress ont des directions opposées, les définitions ne sont pas exactes. En effet, dans ce cas, des effets synergiques peuvent alors être attribués à des effets combinés plus faibles que les effets individuels, ce qui semble paradoxal. Pour pallier à cela, Piggott et al., (2015) ont proposé une nouvelle classification qui inclut l'amplitude et le sens de la réponse (Fig. II-8). Il distingue 4 classes d'interactions possibles : antagoniste positif (+) ou négatif (-) et synergie positive (+) ou négative (-) (Fig. II-8). Ainsi, au fur et à mesure que les études des interactions entre stress se développent, les dénominations de ces interactions prolifèrent et nécessiteraient une harmonisation des termes pour éviter des confusions dans l'interprétation de résultats.

Les amplifications synergiques des effets peuvent entraîner des « surprises écologiques » difficilement prévisibles qui peuvent dégrader le fonctionnement des écosystèmes (Côté et al., 2016). Les interactions synergiques suscitent donc un intérêt particulier pour la communauté scientifique et les gestionnaires dans la priorisation des actions de restauration. Cet engouement entraîne même un biais dans la littérature scientifique avec une augmentation rapide du nombre d'articles citant dans leur titre ou abstract le mot « synergie » entre 1986 et 2014 (Côté et al., 2016) (Fig. II-8). Pourtant, le synergisme n'est pas plus répandu dans l'environnement que les autres types d'interactions. Dans l'exemple cité plus haut, des communautés microbiennes de sédiments grossiers (épilithiques) et de sédiments fins (épipsammiques) ont été exposés pendant 30 jours en canaux artificiels à une combinaison de 3 stress (réchauffement, une diminution du débit et un mélange de pesticides). Les analyses de la composition et des fonctions microbiennes ont



montré que 16 % des combinaisons de stress produisaient une interaction et que parmi ces interactions, 57 à 89 % étaient antagonistes et seulement 11 à 43 % étaient synergiques (Romero et al., 2019). Une méta analyse réalisée sur 112 publications évaluant l'impact de combinaisons de stress sur le taux de mortalité d'organismes aquatiques et terrestres a aussi mis en évidence que les interactions synergiques ne représentaient seulement qu'un tiers des interactions (Darling and Cote, 2008). D'autres auteurs ont même montré, dans une méta-analyse de 840 publications, une prévalence de l'antagonisme et du modèle additif dans la littérature (Tekin et al., 2020). Les interactions synergiques sont plus « populaires » que la mise en évidence d'interaction antagoniste. Pourtant, une relation antagoniste est tout aussi préoccupante : Brown et al., (2013) ont modélisé les effets de facteurs de stress locaux (mauvaise qualité de l'eau) et globaux (réchauffement) sur une population d'herbiers marins et de poissons. Dans le cas d'une synergie entre les stress, une eau de meilleure qualité améliorerait la situation tandis que ce n'était pas le cas si l'interaction était antagoniste, voire cela contribuait à dégrader davantage l'écosystème. Les gestionnaires doivent donc considérer toutes les interactions possibles dans les actions de restauration.

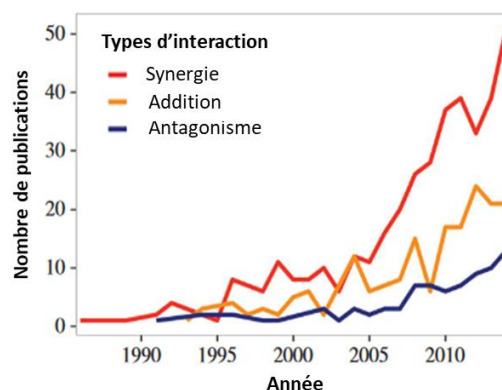


Figure II-9 : mentions annuelles des 3 types d'interactions entre stress dans la littérature entre 1986 et 2014 (Source : Côté et al., 2016)

Plusieurs facteurs peuvent expliquer une interaction synergique ou antagoniste entre stress. Les stress peuvent interagir entre eux dans l'environnement au niveau physico-chimique. Le taux de matière organique module par exemple la biodisponibilité des métaux pour les organismes (Pontoni et al., 2022). Des interactions peuvent aussi avoir lieu au niveau biologique entre les espèces présentes dans l'environnement (Thompson et al., 2018). La compétition, la prédation entre espèces générées par les stress combinés peuvent entraîner des effets différents de ceux attendus. Au contraire, le mutualisme conduit davantage à une

addition des effets des stress multiples (ou à une légère diminution par rapport à l'addition attendue des effets). La co-tolérance ou la co-sensibilité à des stress combinés peuvent aussi faire varier les interactions. L'exposition à un premier stress peut entraîner une résistance/tolérance à un deuxième stress (stress-induced community tolerance) ou au contraire accroître la sensibilité à un deuxième stress (stress-induced community sensitivity) (D. Vinebrooke et al., 2004). La sensibilité du crustacé *Gammarus pulex* à une élévation de la température était par exemple plus importante en laboratoire après une exposition à des pesticides en raison du coût énergétique adaptatif (Siddique et al., 2021). En cas de sensibilité accrue par un premier stress, la résilience des écosystèmes pourrait être érodée à long terme par la multiplicité des stress (Jaiswal et al., 2021).

#### **4.3. Les effets des stress multiples sur les communautés microbiennes du sédiment hyporhéique ont peu été étudiés jusqu'à présent.**

Une recherche sur le moteur de recherche Web Of Science avec les mots clés « multiple OR combined stress » « microbial communities » « sediment » et « river OR stream » a donné un total de 56 résultats. Seulement une vingtaine d'études sur les effets combinés des stress sur les communautés microbiennes du sédiment correspondait réellement aux critères fixés, ce qui démontre le peu d'informations qui existent jusqu'à présent sur ce sujet (Tab. II-1). La plupart de ces articles ont d'ailleurs été publiés dans les 10 dernières années, démontrant un intérêt récent pour les effets des stress multiples sur les communautés microbiennes du sédiment contrairement à d'autres organismes. Les effets des combinaisons de stress sur les invertébrés ont par exemple été davantage étudiés. Ces organismes sont d'ailleurs depuis longtemps utilisés comme espèces bio-indicatrices de la qualité des cours d'eau (Statzner and Bêche, 2010). L'indice invertébré multimétrique (I2M2) se basant sur des déterminations taxonomiques et l'analyse de traits biologiques d'invertébrés est par exemple utilisé dans le cadre de la DCE pour rendre compte de l'état écologique des cours d'eau. Néanmoins, au cours des dernières décennies, plusieurs indicateurs microbiens ont montré un potentiel important en tant qu'outil de diagnostic écologique comme le principe PICT cité précédemment (Paerl et al., 2003 ; Pesce et al., 2021). Les communautés microbiennes ont l'avantage d'être ubiquistes et elles ont un cycle de vie court. Elles s'adaptent donc rapidement aux changements environnementaux ce qui en fait des bioindicateurs intéressants (Pesce et al., 2021). De plus, de par leur diversité, les

communautés microbiennes ont une large gamme de sensibilité : les champignons aux fongicides, les micro-algues aux herbicides, les bactéries aux antibiotiques (Pesce et al., 2021). Pourtant, jusqu'à présent, seules les micro-algues ont suscité un intérêt particulier avec le développement de l'indice biologique des diatomées (IBD).

*Tableau II-1 : publications portant sur les effets de combinaisons de stress sur les communautés microbiennes du sédiment entre 1980 et 2022*

Publication	Stress physique	Stress chimique	Profondeur	Interaction
Romero et al., 2020	Réchauffement (1,6 °C)	Mix de pesticides	Benthique	Interaction
Romero et al., 2019	Réchauffement (1,6°C)	Mix de pesticides	Benthique	Antagonisme
Romero et al., 2020	Dessiccation	Effluents de STEP (riche en phosphate et nitrate)	Benthique	Interaction
Nuy et al., 2018	Dépôt de sédiment fins Faible vitesse d'écoulement	Salinisation	Benthique	Antagonisme
Rutere et al., 2020		Micropolluants organiques Taux de carbone organique	Hyporhéique	Interaction
Wang et al., 2018		Decabromodiphényl ether Cuivre	Benthique	Synergie
Ann et al., 2019	Vitesse d'écoulement Propriété du sédiment		Benthique	Interaction
Arsiti et al., 2016		Enrichissement en nutriments Contaminants émergents	Benthique	Antagonisme
Donato et al., 2020		Enrichissement en nitrate Salinisation	Benthique	Interaction
Mahamoud Ahmed et al., 2020		Cuivre Arsenic	Benthique	Pas d'interaction
Mahamoud Ahmed et al., 2018		Cuivre Arsenic	Benthique	Pas d'interaction
Juvigny-Khenafou et al., 2020	Dépôt de sédiments fins Faible vitesse d'écoulement	Enrichissement en nutriments	Benthique	Interaction
Gray et al., 2022		Mix d'antibiotiques Norfloxacine	Benthique	Pas d'interaction
Chen et al., 2022		Cuivre	Benthique	Interaction
García-ortega et al., 2011		Propetamphos Métal / Salinité	Benthique	Interaction
Johnston et al., 2016		Taux de matière organique Hydrocarbures (HAP) Carbonyl cyanide m-chlorophénylhydrazone (CCCP)	Benthique	Interaction
Colas et al., 2016		Stress physiques associés aux barrages	Hyporhéique	Pas d'interaction
Font et al., 2021	Réchauffement (+5°C) Faible vitesse d'écoulement		Benthique	Pas d'interaction
Bruder et al., 2015	Dépôt de sédiments fins Faible vitesse d'écoulement	Enrichissement en nutriments Dicyandiamide	Benthique	Interaction
Merrilliod-Blondin et al., 2013		Bioturbation	Hyporhéique	Interaction

D'autre part, l'étude des effets des stress physique et chimique (individuel ou en combinaison) sur les communautés microbiennes du sédiment est un domaine de recherche moins développé que pour d'autres compartiments comme le sol. Cette différence s'explique notamment par l'intérêt économique direct que représentent les communautés microbiennes des sols qui peuvent contribuer à l'augmentation des rendements des cultures agricoles (Saleem et al., 2019). Les études des effets des stress multiples ont donc été faites, jusqu'à présent, sur un nombre limité d'organismes et de compartiments. Les stress étudiés sont également peu diversifiés : la vingtaine d'études recensées sur les effets combinés de stress sur les communautés microbiennes du sédiment portent essentiellement sur une diminution de la vitesse d'écoulement, un apport en sédiment fin pour les stress physiques et un enrichissement en nutriments pour les stress chimiques (Tab. II-1). Il faut aussi noter que la plupart de ces études s'intéressent aux effets des stress multiples dans les premiers cm de sédiment (zone benthique). Au contraire, les conséquences des stress multiples sur les communautés microbiennes du sédiment en profondeur (zone hyporhéique) sont peu étudiées (3 études sur les 20 publications – Tab. II-1). La majorité des études font état d'une interaction entre les stress (15/20) mais ne précise pas toujours le type d'interaction (antagonisme ou synergisme). Certaines études ont toutefois mis en évidence une interaction antagoniste comme celle de Nuy et al., (2018) réalisée en mésocosme dans un cours d'eau. La composition de la communauté microbienne du sédiment exposée aux stress combinés était ainsi proche de celle du contrôle non exposé (contrairement aux stress testés individuellement). Au contraire, l'interaction était synergique entre les effets du cuivre et du retardateur de flamme (decabromodiphényl-ether) sur l'activité des communautés microbiennes réalisant l'oxydation de l'ammonium dans des sédiments prélevés dans une rivière de la baie Zhushan en Chine (Wang et al., 2018). Afin de mieux appréhender la réalité des stress multiples subies par les communautés microbiennes du sédiment, il est nécessaire de renforcer les connaissances sur les interactions entre stress physique et pressions chimiques dans ce compartiment. De plus, la dimension verticale de ces interactions dans la zone hyporhéique demande à être explorée pour mieux comprendre comment des stress en surface (*e.g.* colmatage, assèchement) peuvent se répercuter dans des zones plus profondes du sédiment. Dans ce contexte, ce travail de thèse porte sur les effets des interactions entre un stress chimique répandu : le cuivre et deux stress physiques également courants : l'assèchement ou le dépôt de sédiments fins dans la zone hyporhéique.

#### 4.4. Le cuivre est susceptible d'interagir avec d'autres facteurs de stress comme l'assèchement et le dépôt de sédiments fins

##### 4.4.1. La biodisponibilité des métaux varie en fonction de la profondeur de la zone hyporhéique

Le cuivre se présente sous différentes formes dans les sédiments :

- Sous forme libre  $\text{Cu}^{2+}$
- Précipité sous forme solide
- Complexé à des particules inorganiques : argiles, oxyhydroxyde de fer et manganèse
- Complexé à la matière organique dissoute ou particulaire: acide humique, acide fulvique, débris organiques
- Complexé à des ligands inorganiques :  $\text{OH}^-$ ,  $\text{Cl}^-$ ,  $\text{SO}_4^{2-}$ ,  $\text{HCO}_3^-$ ,  $\text{PO}_4^{3-}$

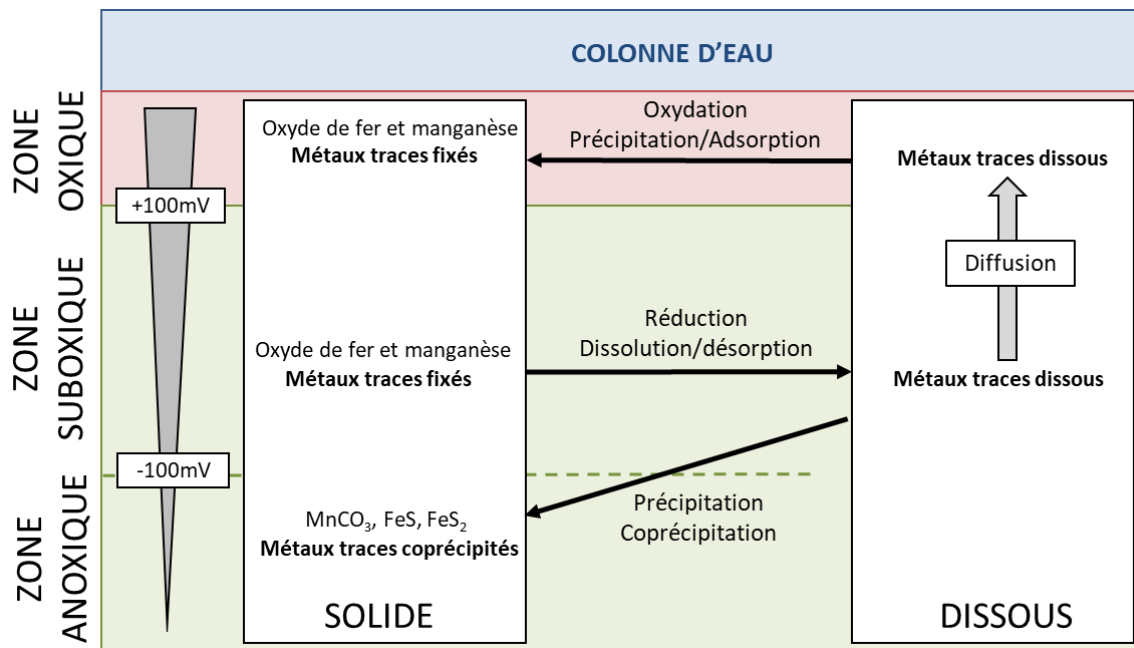


Figure II-10 : schéma illustrant le passage des métaux traces métalliques de la phase solide à dissoute en fonction du gradient de potentiel d'oxydo-réduction dans la zone hyporhéique

Le cuivre se trouve majoritairement sous forme complexée dans les sédiments (Knox et al., 2006) mais certaines conditions peuvent conduire à le rendre davantage biodisponible et donc toxique pour les organismes. Un gradient de potentiel redox décroissant avec la

profondeur existe dans la zone hyporhéique. Les transformations biogéochimiques assurées par les communautés microbiennes pour minéraliser la matière organique le long de cette zone font varier la biodisponibilité des métaux. Les réactions d'oxydo-réduction du fer et du manganèse entraînent par exemple une fixation des métaux traces en condition oxydante tandis que les conditions anoxiques favorisent la remise en solution de ces métaux (Fig. II-10). Les métaux traces dissous peuvent soit diffuser vers la surface pour être oxydés et réadsorbés sur les oxydes de fer et manganèse ou bien ils sont coprécipités avec le fer, le manganèse, les sulfures et les carbonates en profondeur (Fig. II-10).

#### **4.4.2. Colmatage et assèchement sont susceptibles de modifier la biodisponibilité du cuivre**

Les sédiments fins apportés par le colmatage ont une surface spécifique plus importante que des particules grossières et donc un pouvoir adsorbant important (Walling et al., 2003). C'est dans cette fraction fine des sédiments que les métaux sont généralement adsorbés. Néanmoins, les particules les plus fines peuvent aussi s'agréger entre elles et limiter l'adsorption des métaux (Horowitz and Elrick, 1987; Skorbiłowicz et al., 2020). Ainsi, dans les sédiments de la rivière Sokolda (Pologne), ce n'est pas la fraction la plus fine des sédiments (0,063 mm) qui contenait le plus de métaux mais la fraction de 1 à 0,1 mm qui contenait 80 % des métaux dosés (Skorbiłowicz et al., 2020). Les sédiments fins contiennent des argiles, oxydes et hydroxydes de fer et de manganèse et de la matière organique particulaire. Ces particules électronégatives présentent une grande réactivité et une forte capacité de sorption pour les éléments traces métalliques comme le cuivre. Le dépôt de sédiments fins constituant le colmatage peut donc être un réservoir potentiel de contamination métallique (Mohanavelu et al., 2022). D'autre part, le colmatage réduit les échanges d'oxygène dans la zone hyporhéique et provoque une anoxie en profondeur. L'anoxie, en modifiant le potentiel d'oxydo-réduction dans les sédiments, favorise la précipitation du cuivre notamment avec les sulfures (Rader et al., 2019). Le colmatage peut donc réduire la biodisponibilité du cuivre en assurant un rôle tampon. Cependant, ce stockage peut s'avérer être une bombe à retardement si un changement ultérieur des conditions physico-chimiques favorise le relargage des métaux. Les opérations de curage ré-oxygènent par exemple les sédiments et mènent à un relargage de métaux (Salomons et al., 1987).

Le changement climatique augmente l'intensité des cycles d'assèchement et de remise en eau (Sarremejane et al., 2022). Ce dernier phénomène peut aussi accroître la remise en solution de métaux. Ainsi, Paranaíba et al., (2020) ont mis en évidence une libération de fer, manganèse et zinc après un cycle d'assèchement/remise en eau de carottes de sédiments prélevées dans un réservoir du Sud du Brésil. Le lessivage du zinc était notamment plus de 1000 fois plus important dans les carottes de sédiment exposées à l'assèchement que dans les carottes références restées en eau. Un relargage de cadmium et de plomb a aussi été observé après 6 cycles d'assèchement/remise en eau de carottes de sédiments anoxiques prélevées à l'embouchure d'une rivière se déversant dans un lac en Chine (Liu et al., 2020). Les auteurs expliquent le relargage et une augmentation de la biodisponibilité du cadmium et du plomb par l'augmentation du taux d'oxygène et par conséquent du potentiel redox dans les carottes lors de la remise en eau. L'augmentation du potentiel d'oxydo-réduction a pour effet notamment une modification de la composition des minéraux à base de fer et de soufre, diminuant la sorption des métaux (Lynch et al., 2014; Ciszewski and Grygar, 2016). L'assèchement modifie aussi la composition moléculaire de la matière organique dissoute dans les sédiments ce qui peut augmenter la mise en solution de métaux. Par exemple, une augmentation de la dégradation des fractions labiles de la matière organique dissoute et une rétention des fractions avec une aromaticité et un poids moléculaire importante ont été montrées après 3 cycles d'assèchement/remise en eau de sédiment lors d'une expérience en mésocosme (Huang et al., 2022). Ces changements ont provoqué une diminution de la disponibilité du cadmium tandis que celles du cuivre et du zinc restaient inchangées. En changeant les conditions physico-chimiques de l'environnement, l'assèchement et le colmatage font donc varier la biodisponibilité des métaux comme le cuivre.

#### 4.4.3. Les effets combinés des stress physiques (colmatage, assèchement) et du cuivre sur les communautés microbiennes du sédiment sont susceptibles d'avoir des effets négatifs sur la minéralisation de la matière organique

Tableau II-2 : réponses structurelles et fonctionnelles des communautés microbiennes du sédiment à l'assèchement, au cuivre et au colmatage. Les flèches indiquent une diminution (↓) ou une augmentation (↑) de la réponse microbienne au stress. NA indique qu'aucune donnée n'a été trouvée.

	Assèchement	Cuivre	Colmatage
<b>Minéralisation de la matière organique</b>	↓	↓	↓
<b>Activités enzymatiques</b>	↓	↓	↑*
<b>Respiration</b>	↑ puis ↓	↓	↓
<b>Nitrification</b>	↑ puis ↓	NA	↓
<b>Dénitrification</b>	↓	↓	↑
<b>Diversité microbienne</b>	↓	↓	NA
<b>Composition microbienne</b>	modification	modification	modification

\*Si augmentation du taux de matière organique avec l'ajout de sédiments fins

L'assèchement, le colmatage et le cuivre ont tous des effets négatifs sur la minéralisation de la matière organique. Le cuivre et l'assèchement ont en commun des effets négatifs sur les activités enzymatiques et la dénitrification tandis que le cuivre et le colmatage ont des effets négatifs sur la respiration et probablement la nitrification. Une addition voire une synergie des effets de ces stress est donc probable pour ces activités microbiennes lorsque les stress sont combinés. Au contraire, le colmatage et le cuivre ont des effets opposés sur les activités enzymatiques et la dénitrification. Il serait donc possible d'observer une interaction antagoniste entre ces deux stress. L'assèchement entraîne un pic des processus aérobie (respiration, nitrification) suivi d'une diminution de ces activités. La combinaison avec le cuivre pourrait donc être antagoniste dans un premier temps puis synergique dans un deuxième temps. Les 3 stress entraînent une modification de la structure microbienne (et une diminution de la diversité microbienne pour l'assèchement et le cuivre). Il est possible que les combinaisons des stress physiques et du cuivre agissent comme des filtres environnementaux qui aboutissent à la création d'une communauté microbienne hybride entre les deux communautés microbiennes exposées aux stress individuels.





### III- OBJECTIFS DE THÈSE

---

Mon projet de thèse a porté sur l'évaluation des effets de la combinaison d'un stress physique (assèchement/colmatage) et du cuivre sur les communautés microbiennes du sédiment hyporhéique. Ces travaux comprenaient plusieurs **sous-objectifs** :

- Développer une approche expérimentale permettant d'étudier les réponses microbiennes à différentes profondeurs de la zone hyporhéique (gradient benthique-hyporhéique)
- Comprendre comment un stress physique (assèchement et colmatage) peut moduler la biodisponibilité du cuivre et sa toxicité pour les communautés microbiennes.
- Évaluer les interactions entre les effets combinés d'un stress physique (assèchement et colmatage) et du cuivre sur les fonctions et la structure microbienne du sédiment de la zone hyporhéique.
- Déterminer comment un stress en surface peut avoir des répercussions dans les couches plus profondes de la zone hyporhéique.

Dans le cadre de ces sous-objectifs, des **hypothèses globales** ont été émises :

- Les stress physiques (assèchement et colmatage) modifient la distribution et augmentent la biodisponibilité du cuivre dans la zone hyporhéique augmentant la toxicité pour les communautés microbiennes.
- Les effets des stress physiques (assèchement et colmatage) et du cuivre sur les communautés microbiennes du sédiment s'additionnent.
- Les communautés microbiennes en profondeur de la zone hyporhéique constituent un réservoir d'espèces sensibles lorsque les stress physiques (assèchement et colmatage) ou chimiques (cuivre) sont appliqués en surface.

Pour atteindre les objectifs et vérifier les hypothèses globales, une approche expérimentale en mésocosmes (colonnes de sédiment) a été réalisée au laboratoire. Deux expériences ont été réalisées au cours de cette thèse.

- (1) La première expérience constituant le **Chapitre 1** de ce manuscrit visait à déterminer les effets combinés du colmatage et d'une contamination au cuivre apportée par l'eau

sur les communautés microbiennes hyporhéiques du sédiment. Cette expérience m'a permis de tester les hypothèses suivantes :

- Le colmatage fixe le cuivre dans les premiers centimètres et limite la pénétration verticale du cuivre dans les sédiments hyporhéiques
- Le cuivre diminue la stimulation des activités microbiennes liée au colmatage dans les premiers centimètres de sédiments
- L'exposition au cuivre mène à une acquisition de tolérance au cuivre associée à une modification de la structure microbienne en surface
- Le colmatage limite la diffusion du cuivre et ses effets sur les communautés microbiennes en profondeur

(2) La deuxième expérience de la thèse avait pour objectif de déterminer les effets combinés de l'assèchement et d'une contamination au cuivre dans les sédiments sur les communautés microbiennes de la zone hyporhéique. Plusieurs hypothèses ont été émises et réparties dans ce manuscrit en deux parties distinctes avec d'une part les hypothèses portant sur les réponses fonctionnelles (○) présentées dans le **Chapitre 2** et d'autre part les hypothèses portant sur réponses structurelles (■) de la communauté microbienne développées dans le **Chapitre 3** :

- Pendant l'assèchement, les effets négatifs du cuivre et de l'assèchement sur les fonctions microbiennes s'additionnent en surface
- En profondeur, seuls les effets du cuivre sont observés parce que les effets de l'assèchement y sont moins importants (grâce à une humidité résiduelle)
- Après la remise en eau, la résilience des fonctions microbiennes est diminuée dans les sédiments exposés à une contamination par le cuivre à court et long terme
- La tolérance au cuivre est diminuée après exposition à un assèchement
- La diminution de cette tolérance au cuivre s'explique par une baisse de la diversité microbienne en réponse à l'assèchement

---

## MATÉRIEL & MÉTHODES

---





## IV- MATÉRIEL & MÉTHODES

### 1. Dispositif expérimental

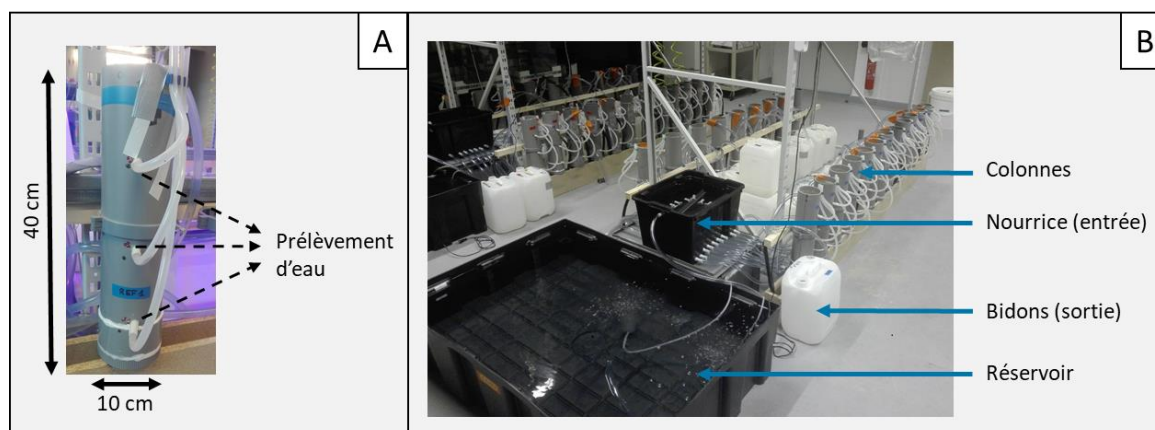


Figure IV-1 photographie des colonnes (A) et du dispositif de circulation d'eau (B) de l'expérience combinant assèchement et cuivre (Chapitre 2)

Pour répondre aux différents objectifs de la thèse, des expériences ont été réalisées en mésocosmes constitués de colonnes cylindriques de 10 cm de diamètre et 40 cm de hauteur (Fig. IV-1-A) remplies avec environ 30 cm de sédiment sableux provenant de la rivière Ain (France). Le sédiment de ce site a été choisi parce qu'il était majoritairement constitué de sable grossier ( $> 500 \mu\text{m}$ ) ou moyen ( $200\text{-}500 \mu\text{m}$ ) suffisamment drainant pour permettre le passage de l'eau à travers les colonnes. Ce sédiment a aussi l'avantage d'être peu contaminé en cuivre ( $[\text{Cu}] < 1,58 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ ). Étant donné que les organismes qui nous intéressent ont une taille de l'ordre du micron, le diamètre des tubes de 10 cm a été jugé suffisant pour éviter des effets de bord (Lewis and Sjöstrom, 2010). La profondeur de 40 cm a été choisie puisque les réactions biogéochimiques médiées par les communautés microbiennes sont généralement limitées à quelques dizaines de centimètres de profondeur dans les sédiments. Une étude de Mermillod-Blondin et al., (2005) a par exemple montré que des colonnes de 10x40 cm avaient des consommations d' $\text{O}_2$  et de  $\text{NO}_3^-$  proches de valeurs environnementales. Ce dispositif recréait le gradient aérobie-anaérobie avec la profondeur de la zone hyporhéique tout en conservant une hétérogénéité dans le sédiment avec des poches anaérobies où se sont produit dénitrification et fermentation. Les mésocosmes ont été réalisés à partir de tubes en PVC pour minimiser l'adsorption du cuivre sur les parois des colonnes au cours des expériences (Lewis and Sjöstrom, 2010). Des sorties à différentes profondeurs des colonnes

ont été ajoutées au dispositif afin de réaliser des prélèvements d'eau au cours des expériences.

## 2. Circulation du flux d'eau

Au cours des deux expériences que nous avons menées, un flux d'eau a traversé les colonnes du haut vers le bas. Pour cela, nous avons donc reproduit le modèle de colonne de filtration utilisé par Mermillod-Blondin et al., (2005) et Navel et al., (2011). L'eau de la « nourrice » alimentait les colonnes de sédiments puis, après avoir traversé la colonne, l'eau passait dans des colonnes de sortie dont le trop-plein était évacué dans des bidons (Chapitre 1) ou bien retombait directement dans des bidons de récupération (Chapitre 2) (Fig. IV-1-B et Fig IV-2). Parallèlement à ce système, les nourrices ont été alimentées en eau par un réservoir qui permettait de garantir un remplissage en continu jusqu'au trop-plein (Fig. IV-1-B et Fig IV-2). L'excédent de ce trop-plein retombait dans le réservoir par gravité. Un remplissage régulier en eau de ce réservoir a été réalisé tout au long des expériences.

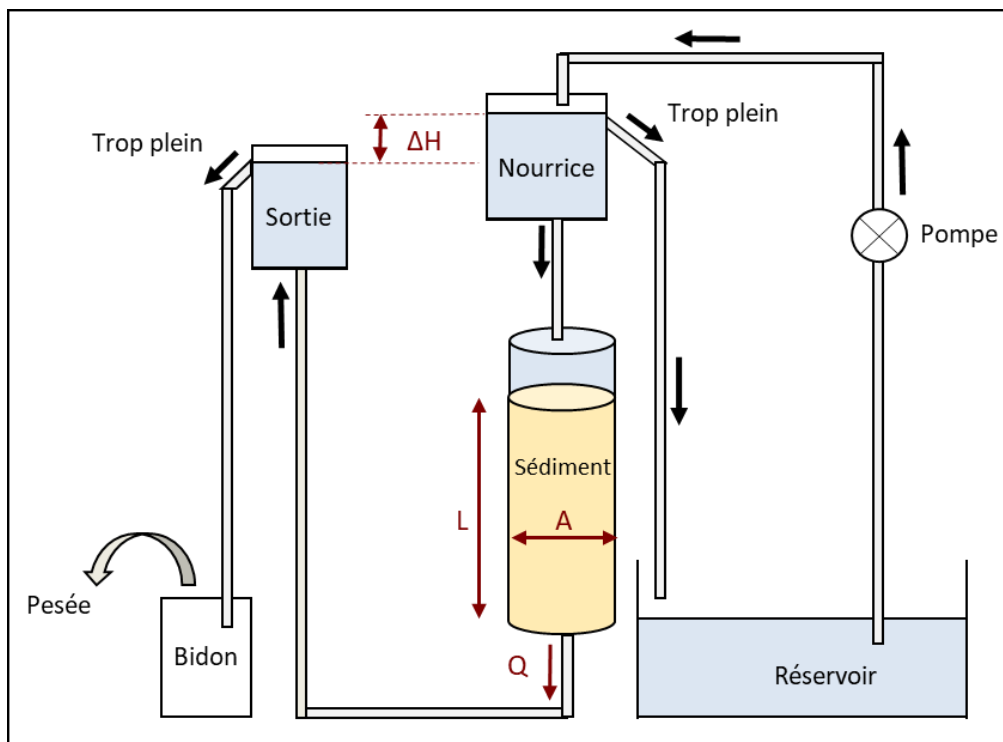
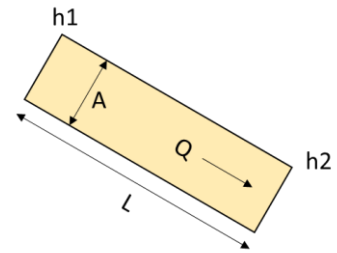


Figure IV-2 : système de circulation d'eau pour une colonne. Les flèches indiquent la direction du flux d'eau. Les lettres en rouge correspondent aux variables de l'équation de Darcy.

Par un principe de vases communicants, la différence de hauteur piézométrique entre les trop-pleins des nourrices et des sorties ( $\Delta H$ ) permettait d'entraîner un flux d'eau du haut vers le bas des colonnes.

Ce principe se base sur la loi de Darcy ( $Q = K.A. \Delta H/L$ ) qui permet de relier le débit d'un fluide traversant un milieu poreux à différentes variables :

- $Q$  : débit ( $m^3.s^{-1}$ )
- $K$  : conductivité hydraulique ( $m.s^{-1}$ )
- $A$  : surface de la section ( $m^2$ )
- $\Delta H$  : différences de hauteur piézométrique ( $h_1-h_2$ ) (m)
- $L$  : longueur traversée (m)



À partir de ce principe, nous avons pu adapter la différence de hauteur entre les trop-pleins de la nourrices et des sorties ( $\Delta H$ ) pour obtenir un renouvellement complet de l'eau dans les colonnes en 24 h, garantissant ainsi une oxygénation des sédiments correspondant à des valeurs environnementales (Malard and Hervant, 1999). La pesée régulière des bidons d'eau en sortie (en supposant une densité de l'eau de  $1 kg.L^{-1}$ ) nous a permis de s'assurer que le débit d'eau traversant les colonnes était suffisant.

### 3. Avantages et limites des mésocosmes

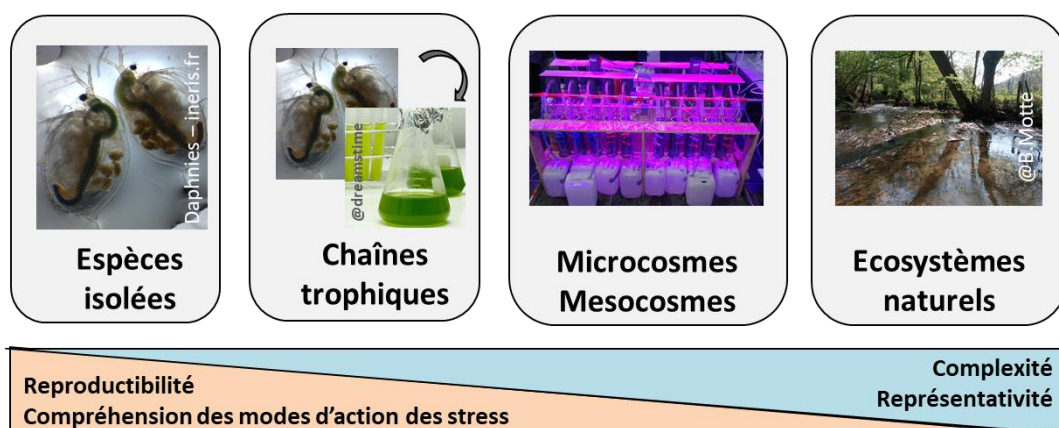


Figure IV-3 : situation des mesocosmes dans un continuum d'outils d'évaluation des effets des stress

L'approche en mésocosme a comme désavantage de manquer de représentativité et de réalisme écologique. Cependant, elle permet de réduire la complexité de l'écosystème et de



pouvoir relier directement les effets observés aux stress appliqués en contrôlant tous les autres paramètres environnementaux (Fig. IV-3). Les colonnes ont ainsi permis de reproduire avec succès les caractéristiques de la zone hyporhéique en conditions contrôlées, permettant de ne faire varier que 2 facteurs de stress pour mieux les étudier. Le dispositif en mésocosme utilisé au cours de cette thèse a aussi permis d'effectuer un suivi au cours du temps des paramètres physico-chimiques (mesures d'oxygène, pH, conductivité, dosages d'anions, cations et carbone organique dissous) dans les réservoirs d'eau et dans l'eau prélevée aux différentes profondeurs des colonnes (3 ou 4 profondeurs selon l'expérience). Ces prélèvements d'eau ont également permis de suivre au cours du temps les concentrations en cuivre dans l'eau traversant les colonnes et de pouvoir les corrélérer aux dosages du cuivre dans les sédiments. En revanche, cette approche nécessite un grand nombre de colonnes puisque des répliquats de colonnes devaient être sacrifiés à chaque temps de prélèvement de sédiment pour les analyses microbiologiques. Une autre limite a été la technique de prélèvement du sédiment à la cuillère qui a pu entraîner une déstructuration du sédiment. Les sédiments utilisés étant sableux et peu compacts, il n'a en effet pas été possible de réaliser un carottage.

#### 4. Mesures réalisées au cours de la thèse

Les méthodologies utilisées au cours de cette ont été listées ci-dessous et sont détaillées dans les chapitres de thèse

- **Fonctions microbiennes**
  - ✓ Respiration et dénitrification in vitro par chromatographie en phase gazeuse
  - ✓ Activités exo-enzymatiques (beta-glucosidase EC 3.2.1.21, phosphatase EC 3.1.3.1 and leucine aminopeptidase EC 3.4.11.1) par mesure de fluorescence après incubation avec un substrat marqué
- **Tolérance des communautés microbiennes au cuivre**
  - ✓ Principe du PICT (Pollution-Induced Community Tolerance) : exposition à des concentrations croissantes en cuivre et mesure de l'activité beta-glucosidase comme variable réponse
- **Structure et composition microbienne**
  - ✓ Extraction d'ADN et dosage au Qubit

- ✓ PCR (*Polymerase Chain Reaction*) ciblant l'espace intergénique 16S-23S et ARISA (*Automated method of Ribosomal Intergenic Spacer Analysis*) réalisées par la plateforme Biofidal (Villeurbanne)
- ✓ Préparation des librairies de séquençage réalisée au laboratoire CARTEl au Bourget-du-Lac.
- ✓ Séquençage du gène de l'ARNr 16S bactérien et archéen réalisé avec la technologie Illumina MiSeq par la plateforme Fasteris en Suisse
- **Analyses physico-chimiques**
  - ✓ Mesure de l'oxygène dissous, du pH, de la conductivité et de la température dans les réservoirs et les colonnes en utilisant des sondes
  - ✓ Mesure du taux de matière organique dans les sédiments par perte au feu
  - ✓ Granulométrie des sédiments par tamisages successifs (500 µm, 200 µm, 50 µm).
  - ✓ Taux d'humidité des sédiments
  - Les 3 mesures suivantes ont été réalisées par des collaborateurs du Laboratoire de chimie des milieux aquatiques (LAMA) à INRAE (Villeurbanne) :
  - ✓ Mesure du cuivre dissous dans l'eau et particulaire dans les sédiments (Thermo, iCAP TQ ICP-MS) en suivant la norme NF EN ISO 17294-2.
  - ✓ Le dosage des anions et cations a été réalisé par chromatographie ionique en suivant les normes NF EN ISO 10304-1 et NF EN ISO 14911 respectivement
  - ✓ Le carbone organique dissous a été mesuré par spectromètre UV-visible (le dosage d'un pool d'échantillon a été réalisé en suivant la norme EN ISO 1484 pour alimenter un algorithme chimiométrique PLS et la calibration du modèle)
- **Analyses statistiques**
  - ✓ Test de significativité (ANOVA, Shapiro-Wilk, Fligner)
  - ✓ Ajustement de courbes dose-réponses aux données des tests de toxicité aiguë et calcul des CE50 et des intervalles de confiance
  - ✓ Analyse multivariée (nMDS)
  - ✓ Analyses bioinformatiques des données de séquençage réalisées par Émilie Lyautey (CARTEl – Bourget-du-Lac)

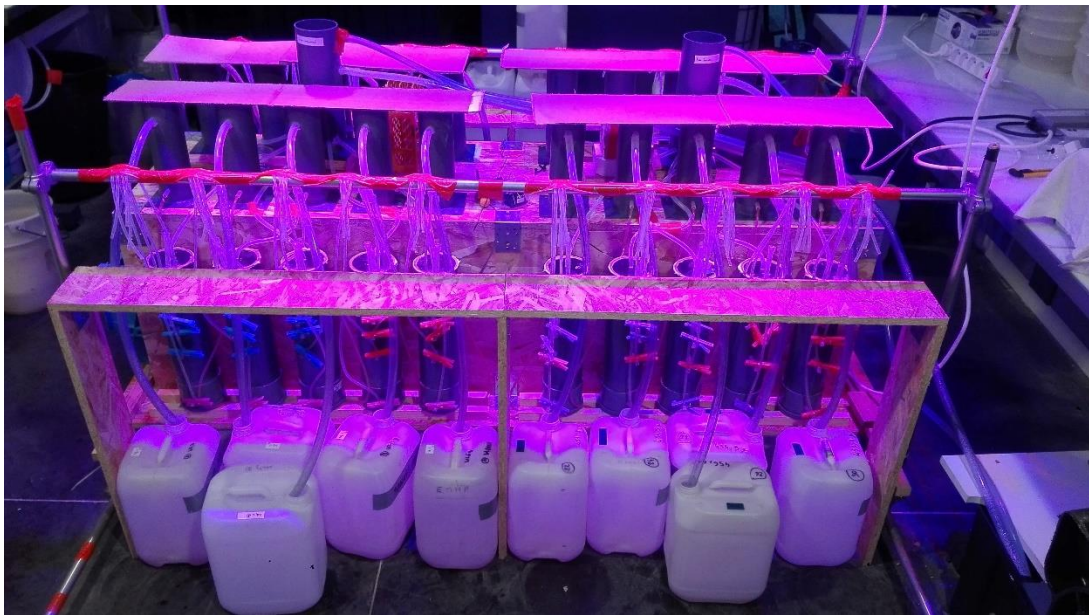


---

# CHAPITRE 1

Le colmatage module les effets du cuivre sur les communautés microbiennes du sédiment

---





## V- CHAPITRE 1 : Le colmatage module les effets du cuivre sur les communautés microbiennes du sédiment

---

Les stress qui entraînent des changements de conditions physico-chimiques dans les cours d'eau sont susceptibles de modifier la biodisponibilité des métaux et leur toxicité pour les organismes aquatiques. Le dépôt de sédiment fins ou colmatage en offrant de nombreux sites d'adsorption pour les métaux est susceptible de les capter en surface entraînant une toxicité importante pour les communautés microbiennes. L'objectif de ce premier chapitre de thèse était de mieux comprendre comment le colmatage peut fixer les métaux comme le cuivre (en tant que contaminant métallique modèle) et influencer sa diffusion dans la zone hyporhéique. Il s'agissait aussi d'évaluer les effets combinés du colmatage et du cuivre sur les réponses structurelles et fonctionnelles des communautés microbiennes du sédiment à différentes profondeurs de la zone hyporhéique. Les hypothèses suivantes ont été testées :

- Le colmatage fixe le cuivre dans les premiers centimètres et limite la pénétration verticale du cuivre dans les sédiments hyporhéiques
- Le cuivre diminue la stimulation des activités microbiennes liée au colmatage dans les premiers centimètres de sédiments
- L'exposition au cuivre mène à une acquisition de tolérance au cuivre associée à une modification de la structure microbienne en surface
- Le colmatage limite la diffusion du cuivre et ses effets sur les communautés microbiennes en profondeur

Pour atteindre ces objectifs, des colonnes ont été remplies avec une trentaine de centimètres de sédiments afin de reconstituer une hypothétique zone hyporhéique. Ces colonnes ont été exposées à un flux d'eau contaminée en cuivre avec ou sans présence d'un dépôt de sédiments fins (Fig V-0). Après 4 semaines d'exposition, des prélèvements de sédiments et d'eau ont été réalisés à 4 profondeurs des colonnes. Ces prélèvements ont permis d'évaluer l'effet du colmatage sur la distribution verticale du cuivre par des dosages dans l'eau et les sédiments. Les effets combinés du cuivre et du colmatage ont été mesurés sur les activités exo-enzymatiques (beta-glucosidase, phosphatase, leucine aminopeptidase), la respiration et la dénitrification in vitro, la structure microbienne (ARISA) et l'acquisition de tolérance au cuivre (Fig V-0).

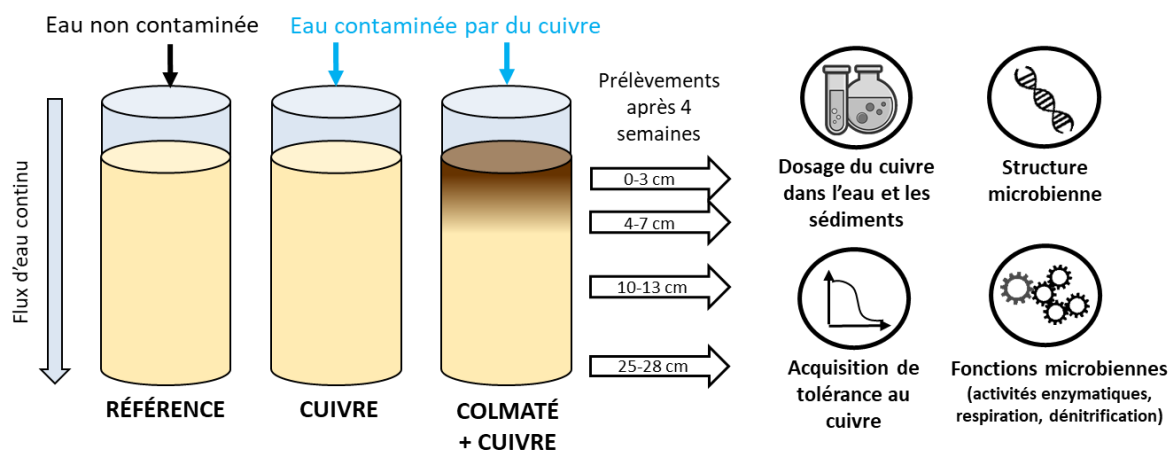


Figure V-0 : schéma du dispositif expérimental de l'expérience combinant colmatage et cuivre

L'ensemble des résultats ont été valorisés dans un article publié dans le Journal « Ecotoxicology ». Cette étude a montré comme principaux résultats que :

- Le cuivre était filtré dans les premiers centimètres de la zone hyporhéique avec ou sans ajout de sédiments fins.
- Le colmatage a stimulé les activités microbiennes (activités exo-enzymatiques, respiration, dénitrification) dans les premiers centimètres de la zone hyporhéique tandis qu'au contraire le cuivre a eu peu d'effets sur ces activités.
- Des concentrations environnementales en cuivre dans les premiers centimètres ont entraîné une acquisition de tolérance au cuivre sans changement de la structure microbienne.
- Les communautés microbiennes en profondeur de la zone hyporhéique sont protégées de la contamination par le cuivre présent dans l'eau de surface avec ou sans colmatage.

## Clogging modulates the copper effects on microbial communities of streambed sediments

Laura Kergoat<sup>1</sup>, Aymeric Dabrin<sup>1</sup>, Matthieu Masson<sup>1</sup>, Thibault Datry<sup>1</sup>, Chloé Bonnineau<sup>1</sup>

<sup>1</sup> INRAE, UR RiverLy, France

**Article published in Ecotoxicology (volume 32, pages 321–335)**

**DOI:** 10.1007/s10646-023-02641-y

**Keywords:** Hyporheic zone, cumulative stressors, copper tolerance acquisition, microbial structure and function, mesocosm, sediment

### **Abstract**

The hyporheic zone, *i.e.* the water-saturated sediment beneath and alongside the riverbed, is exposed to multiple stressors. Agricultural-watershed rivers are frequently exposed to two concomitant stressors: clogging and copper contamination. However, one stressor exposure can increase sensitivity to a second stressor. The aim of this study was to experimentally test the cumulative effects of these two stressors on copper distribution and structural and functional microbial communities responses in the hyporheic zone. A slow filtration column experiment was conducted to compare the effects of 3 treatments of increasing complexity: 'Reference', 'Copper-contaminated' (dissolved copper added at 191  $\mu\text{g L}^{-1}$ ), and 'Clogging+Copper' (dissolved copper + addition of 2 cm of fine sediment). Microbial community structure and activities were studied at 4 column sediment depths. The results showed that clogging did not modify the distribution of copper, which remained fixed in the first few centimetres. In the first few centimetres, clogging had a stimulating effect on microbial activities whereas copper had limited effects mainly on leucine aminopeptidase activity and microbial community tolerance to copper. The subsurface zone thus hosts significant different microbial communities from the communities in the deeper zones that were protected from surface stressors. This experiment confirms the valuable filtering role played by the hyporheic zone and shows that microbial responses are strongly correlated to microhabitat-scale physicochemical conditions in sediment.



## 1. Introduction

The hyporheic zone is broadly defined as the water-saturated sediments below and beside the riverbed (White, 1993). It plays an important ecological and hydrological role in river ecosystem functioning, and has even been dubbed “the river’s liver” (Fischer et al., 2005). This zone ensures intensive surface–subsurface exchanges of water, nutrients, organic matter and oxygen, and provides a habitat for various organisms (Boulton et al., 1998; Krause et al., 2017). It also hosts pivotal ecological functions provided by aquatic communities, such as the mineralization of organic matter and the retention or degradation of pollutants (Gandy et al., 2007). However, the hyporheic zone is also exposed to a number of anthropogenic stressors (Hancock, 2002) including physical (*e.g.* clogging, drying) and chemical (*e.g.* pesticides, pharmaceuticals, metals) alterations. These anthropogenic stressors act as abiotic environmental filters shaping the structure and function of aquatic biological communities (Lavorel and Garnier, 2002). There is a growing body of research on the responses of aquatic micro-organisms to individual stressors such as temperature (Freixa et al., 2017), drying (Febria et al., 2012), clogging (Navel et al., 2011), or contamination by organic (Jaeger et al., 2019) and inorganic (Feris et al., 2004) compounds, but combined effects of these stressors have rarely been investigated (Galic et al., 2018). Multiple stressors interactions can result in various possible outcomes (antagonistic, additive, synergistic and neutral), in particular exposure to one stressor can increase sensitivity to a second stressor. The energetic cost of tolerance to a stressor may indeed increase the organisms vulnerability to a second stressor (Clements et al., 2016). For example, diatoms downstream of the Riou-Mort River (France) historically exposed to metal contamination and nutrient enrichment were more vulnerable during a heat wave event (decreased diversity) than diatoms from an upstream reference site (Morin et al., 2015). Similarly, macroinvertebrates from a metal-polluted site were more susceptible to stonefly predation compared to macroinvertebrates from reference streams (Clements et al., 2016). There is clearly a need to investigate interactions among individual stressors in order to improve our understanding of how microbial communities cope with the multiple environmental stressors caused by human activities in river networks.

The effects of anthropogenic stressors on microbial communities in streambed sediments have been relatively well documented (*e.g.* Romero et al., 2020), compared to the microbial communities inhabiting the hyporheic zone. Clogging and copper (Cu) contamination are two

stressors that are often found simultaneously in river networks due to agricultural pressure. Indeed, copper is a key component of Bordeaux mixture, which is used as a fungicide in both conventional and organic farming. Nevertheless, the combined effects of clogging and Cu on hyporheic microbial communities have never been studied. Clogging is defined as the deposition of fine sediments onto the streambed and their gradual infiltration into the hyporheic zone (Descloux et al., 2010). These fine sediments typically originate from agriculture and forestry, urbanization or dam operations, but clogging is also accelerated by flow alterations such as the reduction of flow variability and flood events (Datry et al., 2008; Descloux et al., 2010). Clogging drastically reduces exchanges of water, oxygen, nutrients, organic matter and organisms between the surface water and the hyporheic zone (Boulton et al., 1998; Gayraud et al., 2002). In turn, the reduction of oxygen diffusion in the sediments results in a shift from aerobic to anaerobic microbial metabolism (Navel et al., 2011). Clogging can also stimulate microbial activities in the hyporheic zone, such as respiration, denitrification and exoenzymatic activities (Nogaro et al., 2007; Navel et al., 2011), and modify microbial structure (Nogaro et al., 2013). Copper leaches into river networks and is frequently found in streambed sediments at median concentration of 21.7 mg kg<sup>-1</sup> in France (n=11 072, Mancioppi et al., 2010) or 44.5 mg kg<sup>-1</sup> in the Yangtze river basin in China (n=27, Yi et al. 2011). Various toxicity thresholds have been proposed for Cu in sediment from 9.9 mg kg<sup>-1</sup> (Sediment Quality Criteria recommended by the Swiss Centre for Applied Ecotoxicology, Casado et al. 2022) to 149 mg kg<sup>-1</sup> (consensus-based Probable Effect Concentration from MacDonald et al., 2000), illustrating the on-going challenges in sediment ecotoxicology. Copper is usually bound to organic matter and fine sediments due to its particular affinity for these compounds (Lu and Allen, 2001). In contrast to clogging, exposure to copper generally causes a decrease in microbial activities such as respiration, denitrification, exoenzymatic activities, and mineralization of organic matter (Mahamoud Ahmed et al., 2018; Sutcliffe et al., 2019). Copper also has effects on bacterial diversity, and on bacterial copper tolerance acquisition at a concentration of 40 mg Cu kg<sup>-1</sup> of dry sediment (dw) (Mahamoud Ahmed et al., 2018, 2020). Given the affinity of copper for organic matter, clogging could increase copper fixation in the hyporheic zone and thus increase the ecotoxicological effects of copper on the microbial communities in this area.

To address these issues, we explored microbial community responses to cumulated effects of copper contamination and sediment clogging. Using mesocosms that reproduce the

hyporheic zone, we exposed microbial communities to copper-contaminated water only or to a combination of copper-contaminated water and clogging sediment. Functional and structural responses of microbial communities, such as microbial respiration, denitrification, exoenzymatic activities and acquisition of copper tolerance were assessed along the hyporheic profiles. We predicted that: **(1)** clogging would fix copper in the first few centimetres of sediment and thus limit the vertical penetration of copper down into the hyporheic sediments; **(2)** copper would reduce the clogging-induced stimulation on microbial activities in the first few centimetres of hyporheic sediments; **(3)** exposure to copper would lead to copper-induced community tolerance associated with a modification of microbial structure; **(4)** clogging would decrease copper diffusion and copper-induced community tolerance in the deeper layers.

## 2. Material and methods

### 2.1. Experimental setup

The experiment was carried out in mesocosms consisting of 15 PVC columns (10-cm-diameter, 40-cm-high) closed at the top by a transparent plate (Fig. V-1). Columns were filled with 28 cm of homogenized sandy sediment (dry weight proportion: 500–2000  $\mu\text{m}$ : 53.8%; 200–500  $\mu\text{m}$ : 32.7% ; 50–200  $\mu\text{m}$ : 10.8%; <50  $\mu\text{m}$ : 2.8%; organic matter: 1.4%) collected in the Ain River (France). To mimic clogging, a 2-cm layer of fine sediment (dry weight proportion: 500–2000  $\mu\text{m}$ : 5.0%; 200–500  $\mu\text{m}$ : 7.5%; 50–200  $\mu\text{m}$ : 35.3%; <50  $\mu\text{m}$ : 52.3%; organic matter: 16.8%) collected in the Albarine River (France) was added on the top of the sandy sediment of 5 columns from the Clogged+Copper treatment. In the other 10 columns (5 from the Reference treatment and 5 from the Copper treatment), a 2-cm layer of sandy sediment (the same sediment as the one used to fill the columns) was added. Before being added to the columns, the 2-cm layers of fine or sandy sediments were frozen at  $-80^{\circ}\text{C}$  overnight and thawed at room temperature for 24 hours to limit the development of invertebrates during the experiment. Then, 500 mL of water was added to the columns to facilitate filling with sediment. The experiment was started after 48h of sedimentation. A 10-cm water space was left above the sediment. Temperature and light sensors were placed in this 10-cm water space in one column per treatment.

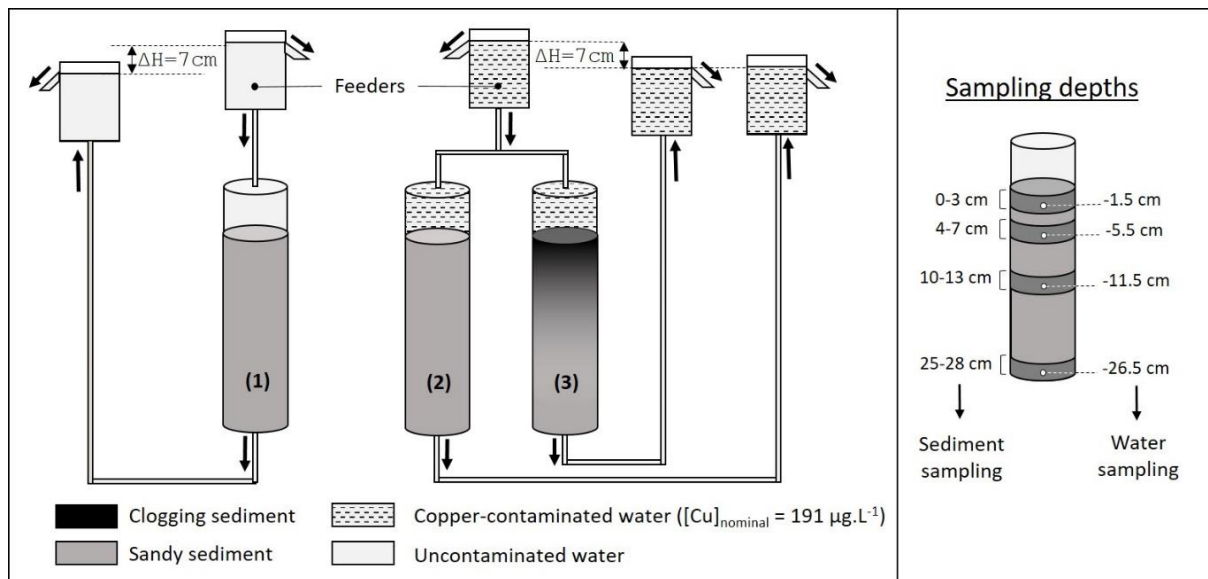


Figure V-1: schematic representation of the experimental setup reproducing the hyporheic zone in columns with the 3 treatments: (1) Reference, (2) Copper, (3) Clogged + Copper. Water sampling points at different depths are indicated by white points for water and by darker slices for sediment on the left part of the figure

The columns were exposed to a top-down water flow for 32 days at a constant temperature ( $19.72 \pm 0.59^\circ\text{C}$ ) and a 13:11 light/dark cycle and at a constant hydraulic head ( $\Delta H = 7\text{cm}$ ) (Fig. V-1). The water used for the experiment was a mixture of one third groundwater and two thirds demineralized water (Table V-A1). Two 150-L tanks containing either water contaminated with copper sulphate ( $\text{CuSO}_4, 5\text{H}_2\text{O}$ ) at a concentration of  $750 \mu\text{g L}^{-1}$  ( $[\text{Cu}]_{\text{nominal}} = 191 \mu\text{g L}^{-1}$ ) or uncontaminated water were used to fill the “Feeders” that supplied the columns (Fig. V-1). The copper concentration in the sandy sediment used to fill the columns (Ain River) was  $1.58 \text{ mg kg}^{-1} \text{ dw}$ . In both Copper and Clogged+Copper treatments, levels of dissolved copper contamination were chosen to reach a copper concentration close to the median levels in French rivers (Mancioppi et al. 2010) *i.e.* around  $20 \text{ mg kg}^{-1} \text{ dw}$  in column sediment after 32 days of exposure. The sediment used to reproduce a clogging had a copper concentration of  $30.2 \text{ mg kg}^{-1}$  which is close to the contamination levels expected in the rest of the column. The tanks were filled regularly to allow continuous water flow into the columns. The volume of water at the column’s outlet was weighed to determine the hydraulic discharge rate through the columns during the experiment, assuming that water density was  $1 \text{ kg L}^{-1}$ . The 15 columns were divided into 3 treatments:

1. **Reference:** columns filled with sandy sediment and exposed to uncontaminated water ( $n = 5$ ),
2. **Copper:** columns filled with sandy sediment and exposed to copper-contaminated water ( $n = 5$ ),
3. **Clogged+Copper:** columns filled with sandy sediment and a top layer of fine sediment and exposed to copper-contaminated water ( $n = 5$ ).

## 2.2. Water and sediment sampling

Water samples were taken from the tanks at each water renewal and stored at 4°C until DOC, dissolved Cu and ions analyses. At the end of the experiment (*i.e.* after 32 days of exposure), water was also collected from the columns at 4 different depths corresponding to the depths at which sediment layers were sampled (-1.5 cm for the 0-3 cm sediment layer, -5.5 cm for the 4-7 cm sediment layer, -11.5 cm for the 10-13 cm sediment layer, -26.5 cm for the 25-28 cm sediment layer, Fig. V-1) using Versilic© tubes placed at each column height. Water samples were collected in tubes placed at the same height as the outlet of the “Feeders” to keep the same flow rate. Water samples were stored at 4°C until analyses (Dissolved Organic Carbon: DOC, dissolved Cu, major ions).

At the end of the experiment (*i.e.* after 32 days of exposure), water flow was stopped, and once most of the water had trickled out from the columns, a plastic spatula was used to sample 3-cm slices of sediment at four different depths (0–3 cm, 4–7 cm, 10–13cm, 25-28 cm). These sediment samples were stored at 4°C until the following analyses: granulometry, organic matter content, Cu concentration, microbial activities (exoenzymatic activities, respiration and denitrification), copper-induced community tolerance (only for samples from 0-3 and 25-28 cm); and at -80°C until bacterial structure analyses.

## 2.3. Physicochemical characterization

### 2.3.1. Water analyses

Conductivity and pH were measured using portable meters (WTW, Germany) in tank water at each water renewal and in the water collected at the end of the experiment at each column depth. Dissolved oxygen was measured in tank water at each water renewal using a portable meter (WTW, Germany) and at each column depth after 25 days of experiment using an oxygen dipping probe (PreSens; Precision Sensing GmbH, Regensburg, Germany). Water samples collected for dissolved organic carbon (DOC), ions ( $\text{Cl}^-$ ,  $\text{NO}_2^-$ ,  $\text{NO}_3^-$ ,  $\text{PO}_4^{3-}$ ,  $\text{SO}_4^{2-}$ ,  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ ,  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{NH}_4^+$ ) and dissolved copper concentrations were systematically filtered at 0.45  $\mu\text{m}$  (Whatman Puradisc FP30 Syringe Filter) before analyses. DOC concentration was determined by UV-visible spectroscopy for all samples, in addition 10 samples were also measured following EN ISO 1484 standard method to feed PLS chemometrics algorithms allowing model

calibration. For dissolved copper analyses, each filtered sample was acidified at 0.5% (v/v) with nitric acid (Merck, Suprapur, 65%) to prevent adsorption before analysis by TQ ICP-MS (Thermo, iCAP TQ ICP-MS) according to NF EN ISO 17294-2 standard method.

### **2.3.2. Sediment analyses**

Sediment copper concentrations were determined at the four depths of each treatment after 32 days of experiment. After lyophilization, approximately 300 mg of crushed and homogenized sediment was analysed following protocol described in Mahamoud-Ahmed et al., (2018). Copper concentrations in sediment extracts were measured by TQ ICP-MS (Thermo, iCAP TQ ICP-MS) according to NF EN ISO 17294-2 standard method.

Organic matter content was determined in the sediments collected in the Ain and Albarine Rivers and at each of the four column depths. Each sample was dried (70°C, for 24 to 48h), ground for 30 minutes, weighed, and oven-dried at 550 °C for 1 hour. The samples were reweighed, and the observed mass loss was attributed to the organic matter content. For granulometry analyses, 100 g of each sample of sediment collected in the Ain and Albarine Rivers and at each column depth were sieved at 3 different mesh sizes (500 µm, 200 µm, 50 µm). Each fraction was dried at 50°C and weighed to determine the proportion of coarse sand (>500 µm), medium-grain sand (200–500 µm), fine sand (50–200 µm) and clay and silt (<50 µm) in each sample.

## **2.4. Microbial community analyses**

### **2.4.1. Bacterial community structure**

Total genomic DNA extraction from sediment samples was performed using the FastDNA® Spin kit for soil (MP Biomedicals, France) following the manufacturer's instructions. PCR (polymerase chain reaction) coupled with automated ribosomal intergenic spacer analysis (ARISA) was performed as described in (Lyautey et al., 2011) with modification of DNA quantity (20 ng of DNA for 50 µL-final volume). The PCR and ARISA analyses were carried out by BIOfidal (Vaulx-en-Velin, France). Amplicons of bacterial DNA were separated using ABI 3730xl sequencer with GS1200LIZ internal size standard (20–1200 bp) in order to obtain electrophoregrams.

#### **2.4.2. Respiration and denitrification**

Respiration and denitrification were measured in sediment collected from the four column depths using the method previously described by Foulquier et al., (2013) with several modifications: 10 g of wet sediment were put in 150 mL glass flasks and incubation were performed for 2h and 5h. Gas emission measurements were performed by gas chromatography (Agilent MicroGC 490) and expressed in  $\text{nmol CO}_2 \text{ h}^{-1} \text{ g}^{-1}$  for respiration and  $\text{nmol N}_2\text{O h}^{-1} \text{ g}^{-1}$  for denitrification.

#### **2.4.3. Exoenzymatic activities**

Three exoenzymatic activities ( $\beta$ -glucosidase EC 3.2.1.21, phosphatase EC 3.1.3.1 and leucine aminopeptidase EC 3.4.11.1) were measured by fluorometry in wet sediments sampled at the four depths of each column as described in Mahamoud-Ahmed et al., (2018). Exoenzymatic activity measurements were performed twice for each sample. Preliminary tests allowed us to determine the optimal substrate concentrations: 1250  $\mu\text{M}$  for 4-Methylumbelliferyl- $\beta$ -D-Glucopyranoside (MUF-Glu) and 4-methylumbelliferyl-phosphate (MUF-Pho) and 1750  $\mu\text{M}$  for L-leucine-7 amido-4-methylcoumarin hydrochloride (MCA-Leu). For each column depth and each treatment, standard curves of MUF (Sigma M1381, CAS No. 90-33-5) for  $\beta$ -glucosidase or phosphatase and MCA (Sigma A9891, CAS No. 26093-31-2) for leucine aminopeptidase were built from a mixture of the sediments from the 5 column replicates. These curves then served to convert fluorescence values into enzymatic activities expressed in  $\text{nmol of substrate h}^{-1} \text{ g}^{-1}$  of dry sediment.

#### **2.4.4. Copper-induced community tolerance**

An acute toxicity test was used to determine the copper-induced community tolerance by measuring  $\beta$ -glucosidase activity responses to increasing copper concentrations. This test was performed on sediment slices collected at 0–3 cm and 25–28 cm depth in the columns at the end of the experiment according to the protocol of Mahamoud-Ahmed et al., (2020). Seven dilutions of copper solution ( $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ ) were prepared using demineralized water (0, 1, 10, 100, 316.5, 1000, 3165, 10000  $\text{mg L}^{-1}$ ) and the optimal MUF-Glu concentration was 1250 $\mu\text{M}$ .

## 2.5. Data analyses

To test our first hypothesis that (1) copper concentration would be higher in the first few centimetres of sediment in Clogged+Copper columns than in Copper columns, we ran a one-way ANOVA between all the treatments followed by Tukey's post hoc test. The same test was used to test the influence of the different treatment on physicochemical parameters such as pH, conductivity, grain size, DOC, dissolved copper concentration and organic matter content in the sediment. To ensure normality of the distribution, data for dissolved oxygen was transformed ( $\ln(x+1)$ ). The effects of clogging on average vertical down-flow was tested by one-way ANOVA with "treatment" as the main factor, followed by Tukey's post hoc test. These parametric tests were performed after a Shapiro-Wilk test to confirm the normality of the ANOVA residuals and a Fligner-Killeen test for homoscedasticity of the data.

To determine significant differences between treatments in microbial activities (exoenzymatic activities, respiration, denitrification) at the same depth, we performed a one-way ANOVA followed by Tukey's post hoc test for each depth. The Q-Q plots of ANOVA residues were checked visually for normality. To ensure normality, microbial respiration and denitrification data were transformed ( $\ln(x)$  for respiration and  $\ln(x+1)$  for denitrification). These tests served to test hypothesis (2) that copper would reduce clogging-induced stimulation of microbial activity in the first few centimetres of hyporheic sediments. To test the effect of depth on microbial activities, a Repeated Measures ANOVA (RM-ANOVA) was performed for each activity and each treatment with a Bonferroni post hoc test.

To test hypothesis (3) exposure to copper would lead to copper-induced community tolerance associated with a modification of bacterial community structure, we analyzed the electrophoregrams obtained following PCR-ARISA using the Peak Scanner<sup>TM</sup> software v1.0 (Applied Biosystems) as described by Billard et al., (2015). The data were then binned using the 'interactive binner script' (Ramette, 2009) in R software to obtain a presence/absence matrix of OTUs. This matrix was then used to build a Bray-Curtis dissimilarity matrix and then perform nMDS using the "vegan" package (Oksanen et al., 2015) and "ggplot2" (Wickham et al., 2016). To test the effects of each treatment on bacterial structure, a permutational multivariate analysis of variance using distance matrices (ANOSIM) was performed using the "vegan" package (Oksanen et al., 2015) with 9999 permutations.



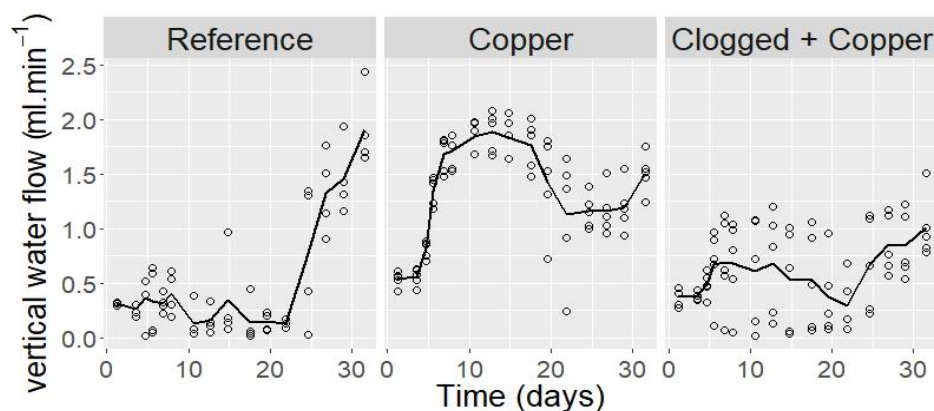
Finally, to address hypotheses about copper tolerance acquisition (3) (4), dose–response curves were modeled from the acute toxicity test using the R drc package (Ritz et al., 2015). For each depth,  $\beta$ -glucosidase activity was expressed as a percentage of the uncontaminated control. For each treatment, we visually evaluated the model that best fitted the data. For each dose–response, we applied a confidence interval of 99.432% (corresponding to  $\alpha = 0.005683045$ ) in order to obtain a global  $\alpha$  of 0.05 for the 9 comparisons between treatments.  $EC_{50}$ s were thus considered significantly different ( $\alpha < 0.05$ ) when the confidence intervals did not overlap (Scheffczyk et al., 2014).

Statistical analyses were performed using R software version 3.6.3 (R Core Team, 2020). Level of significance was set at  $\alpha < 0.05$ .

### 3. Results

#### 3.1. Physicochemical analyses

##### 3.1.1. Vertical water flow



*Figure V-2: average vertical water flow (mL min<sup>-1</sup>) during the experiment measured at the column outlet for the Reference (n = 4), Copper (n = 5), Clogged+Copper (n = 5) treatments. For each treatment and each date, circles correspond to the different replicates and lines indicate the mean values of the replicates.*

Column water flow varied over the course of the experiment and among column replicates (0.02 to 2.43 mL min<sup>-1</sup>; Fig. V-2). One replicate from the Reference treatment had a significantly higher vertical flow than the other replicates and so it was removed from all data analyses (data not shown). On the first part of the experiment (day 1 to 25), the average water flow in the Copper treatment ( $1.36 \pm 0.19$  mL min<sup>-1</sup>) was significantly higher (one-way ANOVA,

Tukey's post hoc test,  $p < 0.05$ ) than in the Reference ( $0.32 \pm 0.16 \text{ mL min}^{-1}$ ) and Clogged+Copper ( $0.54 \pm 0.31 \text{ mL min}^{-1}$ ) treatments which share similar water flows (one-way ANOVA, Tukey's post hoc test,  $p > 0.05$ ). On the second part of the experiment (day 25 to 32), average water flows of the Reference ( $1.58 \pm 0.35 \text{ mL min}^{-1}$ ) and Copper ( $1.29 \pm 0.20 \text{ mL min}^{-1}$ ) treatments were similar (one-way ANOVA, Tukey's post hoc test,  $p > 0.05$ ) and significantly higher than in the Clogger+Copper columns ( $0.90 \pm 0.25 \text{ mL min}^{-1}$ ; one-way ANOVA, Tukey's post hoc test,  $p < 0.05$  for Reference vs. Clogged+Copper,  $p = 0.1$  for Copper vs. Clogged+Copper).

### 3.1.2. Sediment characterization

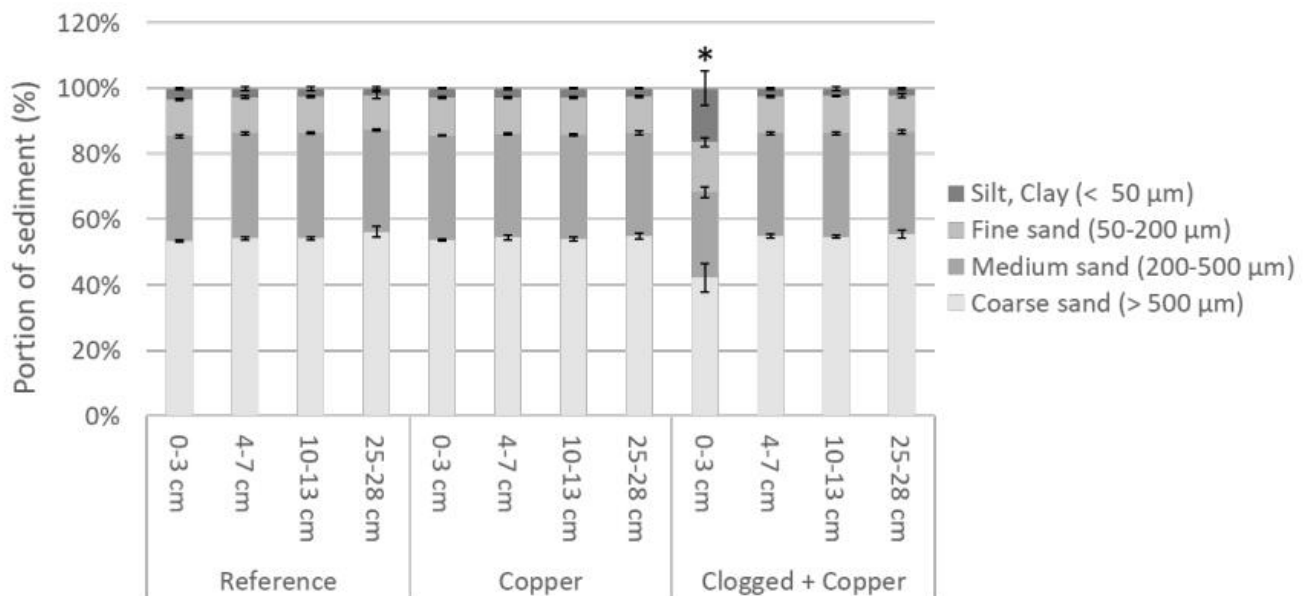


Figure V-3: proportion (mean  $\pm$  sd) of silt, clay ( $< 50 \mu\text{m}$ ), fine sand ( $50\text{--}200 \mu\text{m}$ ), medium-grain sand ( $200\text{--}500 \mu\text{m}$ ) and coarse sand ( $> 500 \mu\text{m}$ ) in the sediment samples collected at the 4 column depths (0–3 cm, 4–7 cm, 10–13 cm, 25–28 cm) in each treatment after 32 days of experiment. Asterisks indicate significant differences from the Reference treatment (one-way ANOVA, Tukey's post hoc test,  $p < 0.05$ )

In the Reference and Copper treatment, the grain size of the top 3 cm of sediment reflected the addition of fine sediments while the lower part of the columns ( $< 3$  cm) was homogenous across treatments. Thus, the proportion of clay, silt ( $< 50 \mu\text{m}$ ) and fine sand ( $50\text{--}200 \mu\text{m}$ ) was significantly higher in the first 3 cm of Clogged+Copper treatment than Copper and Reference treatments (Fig. V-3, Tukey's post hoc test,  $p < 0.05$ ). The addition of fine sediment also resulted in an input of organic matter in the top 3 cm of the

Clogged+Copper columns. Indeed, in the first 3 cm of sediment, organic matter content was significantly higher in the clogged columns (2.8%–5.6%) than in the unclogged columns (1 %-1.1 %) (Table V-1, Tukey’s post hoc test,  $p < 0.05$ ).

### 3.1.3. Copper distribution

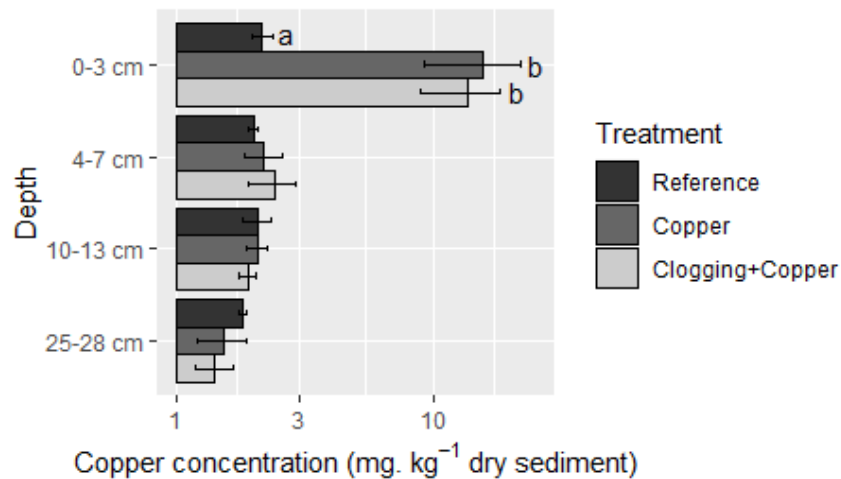


Figure V-4: copper concentration ( $\text{mg kg}^{-1} \text{ dw}$ ) at 4 columns depth for each treatment after 32 days of experiment. Different letters indicate significant differences between treatments (one-way ANOVA, Tukey’s post hoc test,  $p < 0.05$ )

Dissolved copper concentration averaged  $170.05 \pm 8.85 \mu\text{g L}^{-1}$  in the contaminated water tank during the experiment ( $n = 5$ ). Dissolved copper concentration decreased to an average of  $2.10 \pm 2.93 \mu\text{g L}^{-1}$  and  $0.27 \pm 0.11 \mu\text{g L}^{-1}$  within the first few centimetres (0-3 cm) of the Copper and Clogged+Copper columns, respectively (Table V-1). Dissolved copper concentration averaged  $1.10 \pm 0.28 \mu\text{g L}^{-1}$  in the uncontaminated water tank during the experiment ( $n = 5$ ), thus confirming the absence of unintentional copper contamination.

After 32 days, sediments from the Reference columns had a copper concentration that was as low as the sandy sediments of the Ain River ( $1.58 \text{ mg kg}^{-1} \text{ dw}$ ) at all depths tested (Fig. V-4). In columns exposed to dissolved copper (Copper and Clogged+Copper treatments), copper concentration in the sediment was not different in the first 3 cm with or without clogging (one-way ANOVA, Tukey’s post hoc test,  $p < 0.05$ ). This first-3cm copper concentration was about 8 times higher in both Copper and Clogged+Copper treatments than in Reference columns, with an average concentration of  $15.62 \pm 6.34 \text{ mg kg}^{-1} \text{ dw}$  for Copper and  $13.55 \pm 4.68 \text{ mg kg}^{-1} \text{ dw}$  for Clogged+Copper. In deeper sediments (25–28 cm), copper

concentrations remained low and similar between treatments indicating no diffusion of copper in depth whatever the treatment.

### 3.1.4. Water chemistry

*Table V-1: chemical parameters (means  $\pm$  sd) in water or sediment sampled at the four column depths for each treatment after 32 days of experiment. Different superscript letters (a, b, c) indicate significant differences between treatments (One-way ANOVA, Tukey's post hoc test,  $p < 0.05$ ) for conductivity, pH, DOC, organic matter content, dissolved oxygen, and dissolved copper.*

		Reference	Copper	Clogged+Copper
Temperature ( $^{\circ}$ C)		19.86 $\pm$ 0.51	19.74 $\pm$ 0.59	19.57 $\pm$ 0.62
Conductivity ( $\mu$ S $\text{cm}^{-1}$ )	0-3 cm	160.90 $\pm$ 1.74 <sup>a</sup>	178.30 $\pm$ 5.40 <sup>b</sup>	190.26 $\pm$ 3.31 <sup>c</sup>
	4-7 cm	177.20 $\pm$ 1.70 <sup>a</sup>	184.28 $\pm$ 4.23 <sup>ab</sup>	189.68 $\pm$ 4.77 <sup>b</sup>
	10-13 cm	185.15 $\pm$ 2.30 <sup>a</sup>	188.74 $\pm$ 2.21 <sup>ab</sup>	192.56 $\pm$ 5.15 <sup>b</sup>
	25-28 cm	190.15 $\pm$ 2.51	190.04 $\pm$ 1.19	202.90 $\pm$ 13.37
pH	0-3 cm	7.86 $\pm$ 0.05 <sup>a</sup>	7.56 $\pm$ 0.14 <sup>b</sup>	7.80 $\pm$ 0.03 <sup>a</sup>
	4-7 cm	7.87 $\pm$ 0.02 <sup>a</sup>	7.84 $\pm$ 0.05 <sup>a</sup>	7.73 $\pm$ 0.03 <sup>b</sup>
	10-13 cm	7.87 $\pm$ 0.04 <sup>a</sup>	7.89 $\pm$ 0.05 <sup>a</sup>	7.74 $\pm$ 0.04 <sup>b</sup>
	25-28 cm	7.79 $\pm$ 0.05 <sup>a</sup>	7.86 $\pm$ 0.02 <sup>b</sup>	7.75 $\pm$ 0.05 <sup>a</sup>
Dissolved organic carbon (mg $\text{L}^{-1}$ )	0-3 cm	0.58 $\pm$ 0.10 <sup>a</sup>	0.73 $\pm$ 0.06 <sup>a</sup>	1.58 $\pm$ 0.54 <sup>b</sup>
	4-7 cm	0.79 $\pm$ 0.12 <sup>a</sup>	0.66 $\pm$ 0.10 <sup>a</sup>	1.54 $\pm$ 0.53 <sup>b</sup>
	10-13 cm	1.06 $\pm$ 0.21 <sup>a</sup>	0.90 $\pm$ 0.23 <sup>a</sup>	1.79 $\pm$ 0.49 <sup>b</sup>
	25-28 cm	1.83 $\pm$ 0.25 <sup>a</sup>	1.64 $\pm$ 0.17 <sup>a</sup>	2.85 $\pm$ 0.88 <sup>b</sup>
Dissolved oxygen (mg $\text{L}^{-1}$ )	0-3 cm	8.50 $\pm$ 2.18 <sup>a</sup>	3.41 $\pm$ 1.42 <sup>b</sup>	1.11 $\pm$ 0.28 <sup>c</sup>
	4-7 cm	3.40 $\pm$ 2.34 <sup>a</sup>	1.68 $\pm$ 0.73 <sup>ab</sup>	0.55 $\pm$ 0.37 <sup>b</sup>
	10-13 cm	1.51 $\pm$ 1.01 <sup>ab</sup>	2.12 $\pm$ 1.64 <sup>a</sup>	0.45 $\pm$ 0.09 <sup>b</sup>
	25-28 cm	1.67 $\pm$ 1.29	1.76 $\pm$ 1.85	1.02 $\pm$ 0.44
Dissolved copper ( $\mu$ g $\text{L}^{-1}$ )	0-3 cm	0.37 $\pm$ 0.06	2.10 $\pm$ 2.93	0.27 $\pm$ 0.11
	4-7 cm	0.21 $\pm$ 0.10	0.27 $\pm$ 0.15	0.14 $\pm$ 0.05
	10-13 cm	0.15 $\pm$ 0.02	0.14 $\pm$ 0.10	0.12 $\pm$ 0.04
	25-28 cm	0.16 $\pm$ 0.21	0.11 $\pm$ 0.09	0.15 $\pm$ 0.15
Organic matter content (%)	0-3 cm	1.04 $\pm$ 0.05 <sup>a</sup>	1.07 $\pm$ 0.04 <sup>a</sup>	3.98 $\pm$ 1.08 <sup>b</sup>
	4-7 cm	1.06 $\pm$ 0.10	1.06 $\pm$ 0.08	1.01 $\pm$ 0.12
	10-13 cm	1.06 $\pm$ 0.08	1.09 $\pm$ 0.06	1.02 $\pm$ 0.10
	25-28 cm	0.97 $\pm$ 0.13	1.02 $\pm$ 0.10	0.95 $\pm$ 0.13

The addition of fine sediments to simulate clogging led to a higher concentration of DOC at all depths, and a lower concentration of dissolved oxygen in the water sampled at 0-3 cm and 4-7 cm of Clogged+Copper columns than in the Reference columns (Table V-1). At all

depths, DOC concentrations were about two times higher in Clogged+Copper treatments than in the Reference treatment. At 0-3 cm depth, dissolved oxygen was 7 times higher in the Reference treatment than in the Clogged+Copper treatment. At 4-7 and 10-13 cm, dissolved oxygen concentrations remained higher in Reference and Copper treatments than in Clogged+Copper treatments, whereas at the lowest depth sampled (25-28 cm), dissolved oxygen concentrations were not different between treatments. Slight differences were observed in conductivity and pH of the first centimetres of the different treatments. Indeed, in this section, the conductivity was slightly higher and the pH slightly lower in the Copper and Clogged+Copper treatments than in the Reference (Table V-1). The other physicochemical parameters were stable across the different treatments (Table V-1).

## 3.2. Microbial analyses

### 3.2.1. Bacterial diversity

In the first 3 cm of the columns, clogging strongly shaped bacterial community structure whereas copper had little effect (Fig. V-5, ANOSIM,  $p < 0.05$ ). No visual differences between treatments in bacterial structure were found at other depths in the columns (Fig. V-A3). However, microbial community structure was different in the first 3 cm from deeper layers in all treatments (Fig. V-6).

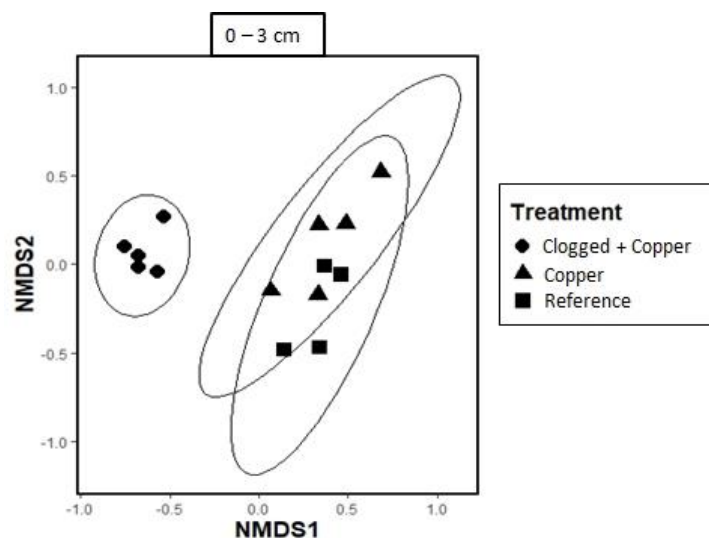


Figure V-5: nMDS representing the dissimilarity of bacterial community structure in sediment samples collected at 0–3 cm depth for each treatment after 32 days of experiment (stress: 0.093).

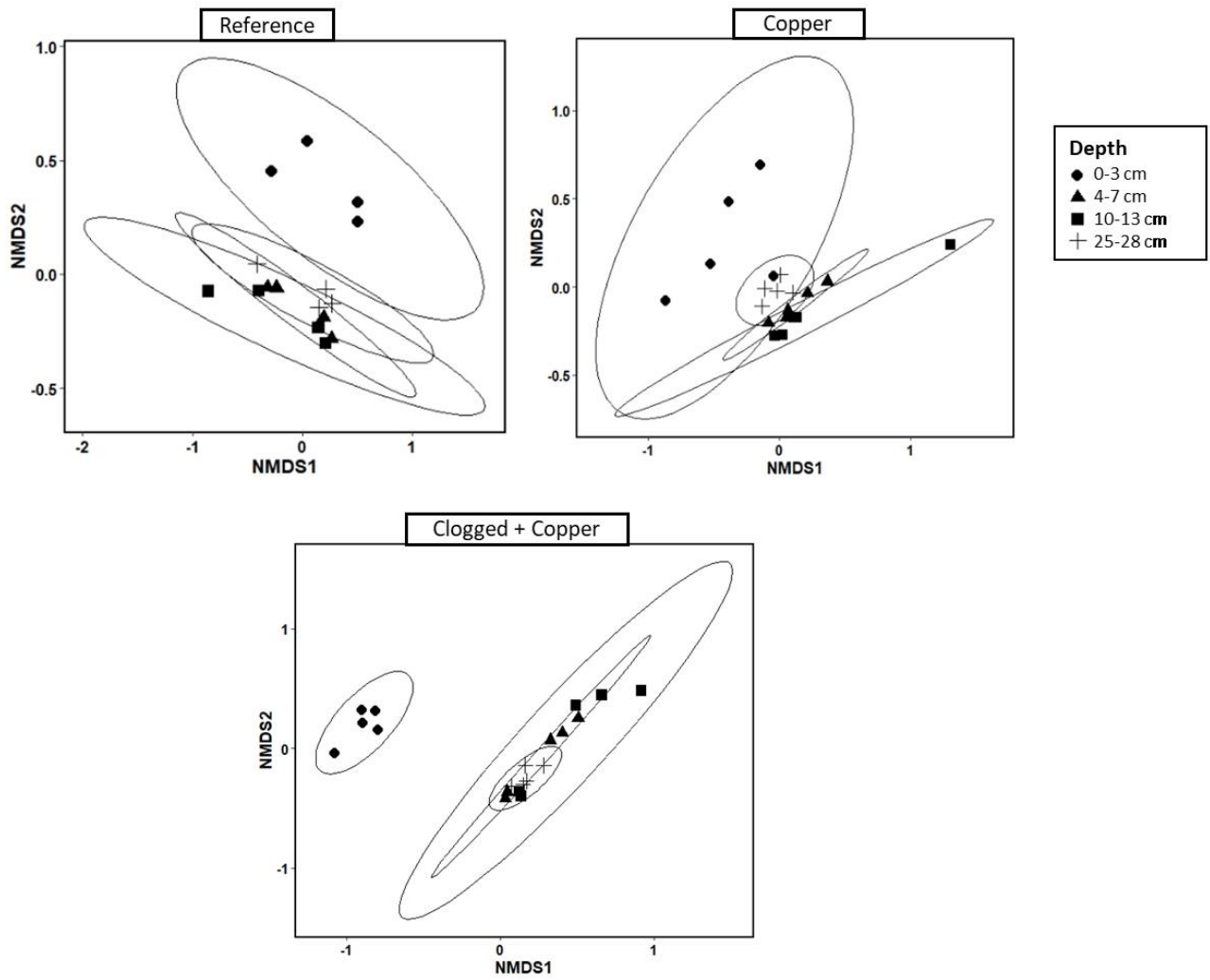


Figure V-6: nMDS representing the dissimilarity of bacterial community structure in sediment sampled at each depth for three treatments, after 32 days of experiment: Reference (stress value: 0.0613), Copper (stress value: 0.057) and Clogged+Copper (stress value: 0.031).

### 3.2.2. Microbial activities

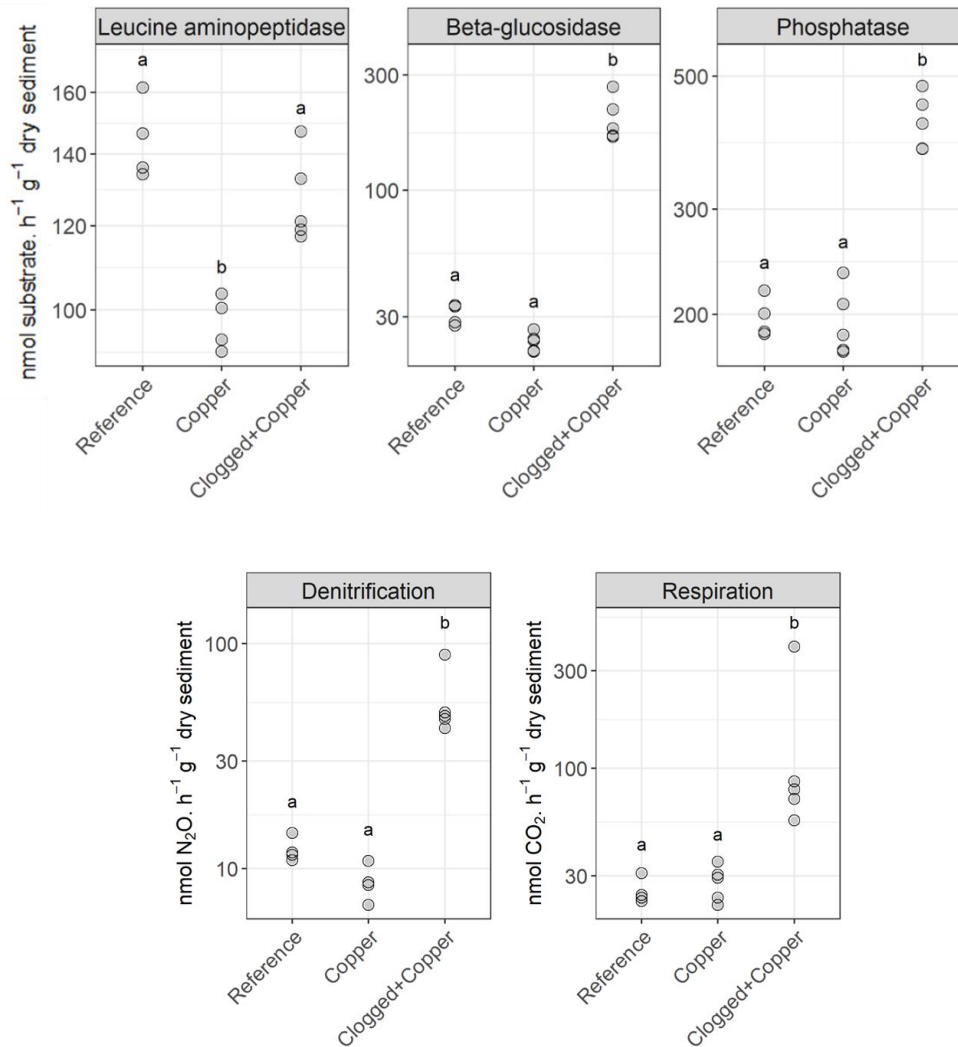


Figure V-7: microbial functional responses for each treatment in the first 3 cm of the column, after 32 days of experiment. Different letters (a,b) indicate significant differences between treatment (one-way ANOVA, Tukey's post hoc test,  $p < 0.05$ )

In the first 3 cm of sediment, clogging led to a significant increase in most microbial activities compared to the Reference treatment (Fig. V-7, Tukey's post hoc test,  $p < 0.05$ ). Respiration, denitrification and  $\beta$ -glucosidase activity were 5 to 6 times higher and phosphatase activity was 2 times higher in sediments of Clogged+Copper columns than in Reference columns (Tukey's post hoc test,  $p < 0.05$ ). In contrast, there were no differences in leucine aminopeptidase activity between Clogged+Copper and Reference column in the first 3 cm of sediments. Copper exposure significantly inhibited leucine aminopeptidase activity in the first 3 cm of sediment in columns exposed to copper alone and a decrease in  $\beta$ -glucosidase activity and denitrification is also observed even if those results are not significant (Fig. V-7,

Tukey's post hoc test,  $p < 0.05$ ). At lower column depths, there were only small differences in microbial activities between treatments. The main differences were at the lowest depth of 25–28 cm (Table V- A2). As observed on the upper layer of the columns, clogging was also found to slightly stimulate  $\beta$ -glucosidase and phosphatase activities while copper still slightly inhibited leucine aminopeptidase activity in microbial communities sampled at 25–28 cm.

### 3.2.3. Copper-induced community tolerance

Exposure to copper-contaminated water led to microbial community tolerance in the top 3 cm of sediment, but did not affect the tolerance of microbial communities from the deepest sediment layer in any of the treatments. Indeed,  $EC_{50}$  was 4.7 times higher in the first 3 cm of sediment from Copper-treatment columns than Reference columns (Fig. V-8). The addition of fine sediments combined with copper contamination also led to a higher copper tolerance than in Reference sediments.  $EC_{50}$  values were more than 30 times higher in the Clogged+Copper treatments than in Reference columns (Fig. V-8). For all treatments, sediment sampled at 25–28 cm showed no acquired copper tolerance in comparison with sediment from Reference columns.

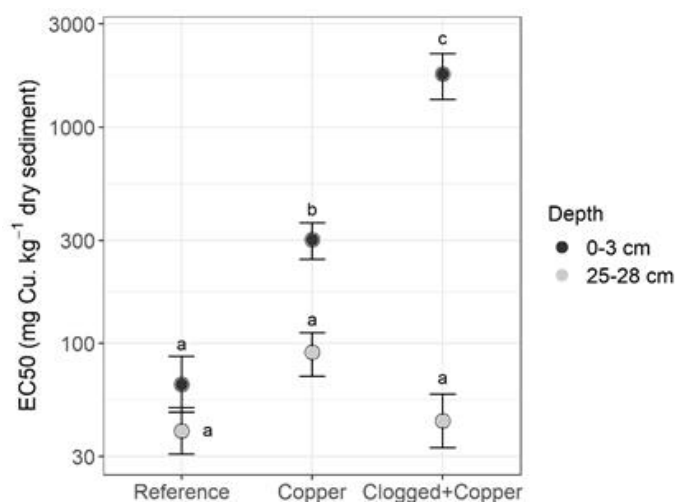


Figure V-8: copper concentration leading to a 50% reduction in  $\beta$ -glucosidase activity ( $EC_{50}$ ) and 99.432 % confidence interval determined after a 4h acute toxicity test on sediment samples collected at two column depths (0–3 cm and 25–28 cm) in each treatment, after 32 days of experiment. Different letters (a,b,c) indicate significant between-treatment differences ( $p < 0.05$ ) with no overlapping confidence intervals.



## 4. Discussion

River ecosystems are exposed to multiple anthropogenic stressors. According to the concept of environmental filters, these stressors shape organism assemblages (Lavorel and Garnier, 2002). Here, we quantified the effects on microbial communities of a first stressor (copper-contaminated-water) and a second stressor (clogging) cumulated with the first one. Our first hypothesis that clogging would modify vertical copper distribution (hypothesis 1) did not hold: at the copper concentrations tested here and with the sandy sediment used to fill our columns, inputs of dissolved copper remained essentially adsorbed in the first few centimetres of all sediments independently of clogging. These first few centimetres of sediment forming the interface between surface water and the hyporheic zone also showed particular patterns in terms of microbial function, structure and tolerance. Indeed, as expected in hypothesis 3, we found copper exposure-induced community tolerance in this microhabitat area. However, contrary to our hypothesis 3, the acquisition of tolerance was not necessarily accompanied by a change in microbial structure in the Copper treatment. The Clogged+Copper columns showed evidence of a copper exposure-induced community tolerance accompanied by a change in microbial structure, probably due to the addition with fine sediment of a new microbial community previously adapted to copper. Contrary to what we predicted in hypothesis 4, microbial community acquisition of copper tolerance was not found in the deeper layers of the columns whatever the treatment and despite the water flow through the columns. As expected, clogging had a stimulating effect on most microbial activities in the first few centimetres of sediment, whereas contrary to what was hypothesized (hypothesis 2), copper exposure had little effect on these activities.

### 4.1. Copper gets trapped in the first few centimetres of sediments regardless of the addition of fine sediments.

Given that copper is known to show a strong affinity for organic matter (Lu and Allen., 2001) and fine particles (Kim et al., 2020), we hypothesized that copper would be preferentially fixed in the fine organic sediments added to simulate clogging in this experiment (hypothesis 1). Our protocol effectively clogged the columns, as at the end of the experiment (*i.e.* after 32 days of experiment) water flow and oxygen concentrations were reduced in the first few centimetres of Clogged+Copper columns compared to Reference treatment columns.

These elements demonstrate clogging-induced reduction of vertical hyporheic exchanges, as observed by Navel et al., (2011). Nevertheless, we found no influence of clogging on the vertical distribution of copper in our experimental columns. Copper binding is known to be regulated by a number of factors, such as organic matter or grain size, which could explain the copper retention observed in the first few centimetres of columns with or without clogging. Organic matter is known to be the key element for copper fixation in sediments (Lu and Allen, 2001). Here, around 1% of organic matter was enough to induce most of the adsorption of dissolved copper that circulated through the columns. River sediments generally have more than 1% organic matter content, which means that most rivers exposed to copper contamination should have the capacity to retain copper in the first few centimetres of their streambeds. Sediment grain size is another key parameter determining copper retention. About 68.3%–87.4% of the first few centimetres of sediment was composed of medium-grain and coarse sand particles (between 0.2 and 2 mm) that can adsorb metals: Skorbiłowicz et al., (2020) for example showed that the 0.1–1 mm fraction adsorbed 80% of metals (Cu, Ni, Co) in the surface sediments of Sokolda River. Conversely, other authors have concluded that copper adsorption is generally more significant in the finest sediment fractions (Kim et al., 2020). It is thus possible that clays and silts may have played an important role in copper retention despite the fact that they only represented about 2.1–16.4% of particles in the first 3 cm of sediment. Quantifying copper concentrations in each grain size fraction would have provided a better understanding of copper distribution. It is also important to note that we used sandy sediment < 2mm to fill the columns, whereas rivers with streambeds composed of coarser particles would probably have a much lower contaminant retention capacity (Simpson et al., 2004).

Our study demonstrates that the hyporheic zone plays a filtering role by retaining copper in its first few centimetres. Indeed, we found a large difference in copper concentration between the top 3 cm ( $14.58 \pm 5.36$  mg Cu kg<sup>-1</sup>) and the much deeper depth 25–28 cm ( $1.48 \pm 0.27$  mg Cu kg<sup>-1</sup>) of the columns exposed to dissolved copper-contaminated water. Moreover, dissolved copper concentration dropped between the tank water and the first few centimetres of the columns, which supports the idea of adsorption in the subsurface. The hyporheic zone is known to play a filter role for contaminants. For example, Palumbo-Roe et al., (2017) showed an attenuation of chromium at the interface between river surface water

and interstitial water in the hyporheic zone. Also, a field study conducted by Fuller and Harvey, (2000) across 7 sites showed adsorption of dissolved metals (Co, Zn, Ni) in the hyporheic zone. However, the accumulation of contaminants in the first few centimetres of the hyporheic zone could be problematic in case of physicochemical variations. Indeed, a low dissolved oxygen concentration and a low pH can lead to a release of metals such as copper (Gandy et al., 2007). A copper desorption pulse that becomes highly bioavailable and toxic could have deleterious effects on organisms (Atkinson et al., 2007) and water quality (Lewandowski et al., 2019). In a restoration perspective, a recent technique was proposed for dredging clogged streambeds and removing fine sediments to restore vertical exchanges between surface water and the hyporheic zone (Ward et al., 2018) and thus limit flooding events. This technique could also help remove contaminants, particularly copper. Another technique for unclogging streams involves releasing water from dams to generate flow pulses and remobilize fine sediments (Loire et al., 2020). Remobilization of these particles could move contaminated sediments further downstream or deeper in the hyporheic zone. Studies are needed to monitor the fate of suspended solids (both longitudinally and vertically) during flood events in order to understand contaminant distribution and evaluate the consequences of such restoration practices on ecosystem contamination (Baborowski et al., 2004).

#### **4.2. Environmental concentrations of copper in the first few centimetres of sediment leads to tolerance acquisition without changes in microbial structure.**

We hypothesized a copper tolerance acquisition related to the copper distribution profile in sediment (in all the depth of the column for the "Copper" treatment and in the first cm of the "Clogged+Copper" columns, hypothesis 3 & 4). In our experiment, even if the copper distribution was different than expected, the tolerance acquisition to copper in the first few centimetres of column sediment appears to be strongly related to copper exposure. Despite similar copper concentrations in the first cm of the "Clogged+Copper" and "Copper" treatments, the  $EC_{50}$  is almost 10 times higher with clogging. This result could be due to a probable historical contamination of fine sediments used to reproduce clogging.

The tolerance acquisition related to copper exposure has already been demonstrated by previous authors. For example, Mahamoud Ahmed et al., (2020) found copper-induced community tolerance after 21 days in sediments exposed to copper at a nominal

concentration of  $40 \text{ mg.kg}^{-1} \text{ dw}$  compared to controls. However, to our knowledge, our study is the first to demonstrate microbial tolerance acquisition at relatively low copper concentration ( $14.58 \pm 5.36 \text{ mg Cu kg}^{-1}$ ), similar to the concentrations measured in a majority of French river sediments (Mancioppi et al., 2010). The current water quality guidelines give a probable copper effect concentration at  $149 \text{ mg Cu kg}^{-1}$  in freshwater ecosystems (MacDonald et al., 2000). This guideline's concentration does not take into account the effects on microbial communities occurring at much lower concentrations and it seems not protective enough for microbial communities.

Contrary to our expectations (hypothesis 3), exposure to copper-contaminated water did not modify microbial community structure, regardless of the treatment applied. However, other studies have reported a strong effect of copper on sediment microbial structure (Feris et al., 2003; Sutcliffe et al., 2019). A mesocosm study by Mahamoud Ahmed et al. (2020) found a change in bacterial structure in sediment that had been chronically spiked with copper at a concentration of  $40 \text{ mg kg}^{-1} \text{ dw}$ , but this concentration was twice as high as the concentration used here. Here, the Clogged+Copper columns showed a different microbial structure compared to the Reference treatment and a strong acquired tolerance to copper in the first few centimetres, probably due to the input of fine sediment used for clogging which had hosted a new microbial community historically exposed to copper contamination in the river.

We found no clear link between change in microbial structure and acquisition of tolerance to copper in the first few centimetres of copper-contaminated columns, whereas other authors have found a correlation (Ogilvie and Grant, 2008; Mahamoud Ahmed et al., 2020). In our study, acquisition of tolerance to copper was probably due to physiological adaptations such as copper resistance gene development (Besaury et al., 2016) rather than species selection. Such physiological adaptations represent an energetic cost to microbial communities that could limit their activities, as shown here with leucine aminopeptidase activity, which could make them more vulnerable to other stressors (Azarbad et al., 2016).

#### **4.3. Clogging stimulates microbial activities in the top few centimetres of sediment whereas copper had little effect**

Copper was filtered out from water in the first 3 cm of sediment, but it did not have strong inhibitory effects on microbial activities ( $\beta$ -glucosidase, phosphatase, respiration,

denitrification) at this depth in any of our treatments. Mahamoud Ahmed et al. (2018) had observed an inhibition of heterotrophic activities (phosphatase, leucine aminopeptidase,  $\beta$ -glucosidase) in sediment contaminated at 40 mg Cu kg<sup>-1</sup> dw, whereas copper contamination used here ( $15.62 \pm 6.34$  mg Cu kg<sup>-1</sup> in "Copper" treatment) only inhibited significantly leucine aminopeptidase activity and seemed to slightly inhibit denitrification and  $\beta$ -glucosidase.

As we hypothesized (hypothesis 2), and corroborating previous studies, we observed a stimulation of respiration, denitrification, and enzymatic activities (Nogaro et al., 2007; Navel et al., 2011) in the first three centimetres of the columns when clogging was added. Thus, clogging addition modulates the copper effects observed on microbial communities. This stimulatory effect may be related to a higher organic matter content in columns that received clogging sediment (Navel et al., 2011). For example, Nogaro et al. (2007) demonstrated that a sediment deposition rich in particulate organic matter could increase respiration, denitrification, and hydrolytic and dehydrogenase activities. Contrary to other activities, leucine aminopeptidase, which is involved in the nitrogen cycle (hydrolysis of the terminal NH<sub>2</sub> amino acid of peptides) was not stimulated as much as the other microbial activities in the "Clogged+Copper" treatment. Leucine aminopeptidase activity has been found to correlate positively with nitrogen content in a grassland soil (Cenini et al., 2016), so the low leucine aminopeptidase stimulation in the first 3 cm of sediment in clogged columns may be due to a low nitrogen content. Clogging generally led to a stimulation of microbial activities in the first few centimetres of sediment, which is likely to induce organic matter mineralization. A high mineralization rate can lead to an ecological succession of electron acceptors and a shift to anaerobic conditions, which can accentuate the oxygen depletion caused by clogging and thus have consequences on the resident hyporheic microbial communities (Nogaro et al., 2007). In the unclogged columns, we also observed higher exoenzymatic activities in the first 3 cm of sediment showing that the subsurface zone has specific features even without clogging.

The microbial community activities were thus driven by clogging, and the dissolved copper inputs were probably not high enough to modify this response. It is also possible that the four-week exposure time may have been long enough for microbial communities to adapt and recover their functional capacities, as observed by Mahamoud Ahmed et al. (2018) for denitrification and phosphatase activities after 21 days of exposure to copper. Further

experiments should focus on the time–course dynamics of microbial activities in response to exposure in order to identify the recovery mechanisms involved.

#### **4.4. The first 3 cm of the hyporheic zone is an active interface characterized by a unique microbial structure, higher microbial activities, and a specific pattern of tolerance acquisition**

In all treatments, microbial communities from the lower layers (4–7 cm, 10–13 cm, 25–28 cm) were relatively homogenous in terms of structure and function, whereas microbial communities from the upper layer of the columns had a distinct structure and higher microbial activities with or without clogging. Indeed, these first top centimetres at the surface water-hyporheic zone interface appear to be the most metabolically active. Specific environmental conditions, such as higher dissolved oxygen concentration in Reference and Copper treatments, likely explain these particularities, as previously shown by Fenchel and Finlay (2008). As aerobic respiration is energetically favourable for microbial communities, the first few centimetres of sediment in contact with dissolved oxygen in the surface water will play an important role in the degradation of organic matter (Dauwe et al., 2001). These results highlight the important role of this interface in river biogeochemistry.

In our experiment, this interface seemed particularly isolated from the deeper layer of sediment. In clogged treatments, the microbial communities brought by the fine clogging sediments remained localized in the first few centimetres of sediment, suggesting relatively limited coalescence, *i.e.* mixing of the microbial communities from the different sediments (Mansour et al., 2018) There was no transfer of microbial tolerance acquisition from the first few centimetres to the deeper layers (25–28 cm), whereas transfer of tolerance is likely to be possible in sediments notably through the horizontal transfer of metal or antibiotic resistance genes for example (Di Cesare et al., 2016). Previous studies have shown that coalescence is likely to occur at interfaces. For example, terrestrial microbial communities can mix with aquatic microorganisms after run-off into streams (Luo et al., 2020). Within the hyporheic zone, mixing of microbial communities can occur through exchanges between surface water and groundwater (Stegen et al., 2016). Nevertheless, local environmental parameters such as grain size (Nogaro et al., 2013) or organic matter content (Fagervold et al., 2014) also play an important role in shaping microbial community composition. Thus, in our experiment,

microbial community structure and function were mainly driven by local centimetre-scale environmental conditions rather than by coalescence processes.

The fact that copper contamination and copper-tolerant microbial communities remain localized in the top few centimetres of sediment provides valuable insights, notably that resistance gene transfer (*e.g.* metals, antibiotics) should be limited through the hyporheic zone. Several studies have focused on the lateral distribution of resistance genes along streambeds (Chu et al., 2018; Guo et al., 2018), but research is needed to explore the vertical distribution in the hyporheic zone. Our results also provide insight on sediment sampling strategies in streams. Current guidelines recommend sampling the top 2 to 3 cm of river sediment (Masson et al., 2015), but few studies have explored the vertical dimension, as it is done for core sampling in lake sediments. The first few centimetres of river sediment are the most metabolically-active stratum, so it should be analyzed separately from the deepest layers but the hyporheic deepest parts should not be avoided.

#### **4.5. Microbial communities from the deepest part of the hyporheic zone are protected from copper contamination with or without clogging sediment.**

Copper or clogging has no impact on microbial structure and function below the top few centimetres of sediment, since the stressors (copper and clogging) remained located at the surface water–hyporheic zone interface. Microbial communities located beneath the overlying hyporheic zone that remain protected from surface stressors could thus constitute a reservoir of sensitive species, as shown by the low tolerance to copper of the microbial communities from the deepest sediment depth in our study. This reservoir is important for the resilience of the hyporheic ecosystem, as it could provide a refuge and contribute to recolonization of the first few centimetres of sediment after a major stressor event that impacts microbial abundance and diversity at the surface like drying for example (Romaní et al., 2013).

The deeper layers of sediment can also be important for other organisms such as invertebrates. The hyporheic zone plays also a refuge role during surface perturbations (flooding, drying) (Vander Vorste et al., 2016). Nevertheless, storage and accumulation of pollutants in the first few centimetres of hyporheic sediments could have negative long-term consequences on the organisms that colonize this area. A high copper contamination of the

first few centimetres cm of the hyporheic zone could generate a toxic chemical barrier for invertebrates and thus limit vertical exchanges. Indeed, Roman et al., (2007) reported that the predicted no-effect concentration (PNEC) of copper for 5 types of invertebrates (*Lumbriculus variegatus*, *Tubifex tubifex*, *Gammarus pulex*, *Hyalella azteca*, *Chironomus riparius*) was between 3.3 and 47.1 mg Cu kg<sup>-1</sup> dw. These toxicity thresholds point to a risk for some of these invertebrates in most French rivers, where median copper concentration is 21.7 mg kg<sup>-1</sup> (Mancioppi et al., 2010). These invertebrate communities could therefore be impacted in the first few centimetres of a hyporheic zone that has been moderately contaminated by copper, as in our study. Moreover, this chemical barrier effect could be combined with the physical barrier effect caused by clogging, which also leads to a decrease in vertical exchanges for invertebrates (Mathers et al., 2019). Reduced access to the refuge area due to chemical contamination could accentuate the effects of physical clogging such as reduction of microbial abundances and modification of community structure (Gayraud et al., 2002).

## 5. Conclusion

This study provides important evidence that the first few centimetres of hyporheic sediment play a copper-filtering role with or without clogging. This interface between surface water and subsurface sediments trapped copper and limited its infiltration further down, thus protecting the microbial communities in deeper layers. Similarly, the acquisition of copper-induced community tolerance in the first few centimetres of sediment (with or without clogging) did not propagate in depth. Microbial coalescence processes remained limited in our study in which local environmental parameters were the main drivers of microbial responses. The study of the two stressors cumulated showed that clogging had a greater effect on microbial structure, function and tolerance in the first few cm than environmentally relevant copper concentrations. In conclusion, our study highlights the importance of taking into account the surface-hyporheic zone interface especially when designing sampling strategies for river monitoring or in stream restoration.



## 6. Supplementary material

*Tableau V-A1: ions and dissolved organic carbon concentrations (mg L<sup>-1</sup>) measured in the water sampled from the 150L-tanks after 29 days of experiment.*

[C] = mg L <sup>-1</sup>	Cl <sup>-</sup>	NO <sub>2</sub> <sup>-</sup>	NO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	PO <sub>4</sub> <sup>3-</sup>	SO <sub>4</sub> <sup>2-</sup>	Na <sup>+</sup>	K <sup>+</sup>	Mg <sup>2+</sup>	Ca <sup>2+</sup>	NH <sub>4</sub> <sup>+</sup>	Dissolved organic carbon (DOC)
Copper-contaminated water tank	3.9	< 0.05	2.39	< 0.10	12.4	3	< 1.0	2.5	24.8	< 0.02	0.41
Uncontaminated water tank	3.9	< 0.05	2.33	< 0.10	11.7	2.7	< 1.0	2.5	24.1	< 0.02	0.81

*Tableau V-A2: microbial activities for each treatment (Reference n=4 ; Copper n=5 ; Clogged+Copper n=5) and each column depths measured at the end of the experiment. Different superscript letters indicate significant differences between treatments (abc, one-way ANOVA , post hoc Tukey test, p<0.05) or between depths for each treatment (αβγ, RM-ANOVA, “depth”, post hoc Bonferroni test, p<0.05)*

	Depth	Reference	Copper	Clogged+Copper
Respiration (nmol CO <sub>2</sub> h <sup>-1</sup> g <sup>-1</sup> )	0-3 cm	25.25 ± 1.88 a	27.95 ± 2.46 a α	137.22 ± 64.23 b α
	4-7 cm	24.03 ± 2.67	20.30 ± 2.42 β	13.97 ± 4.89 β
	10-13 cm	31.17 ± 4.72	26.48 ± 5.10 αβ	16.53 ± 3.98 β
	25-28 cm	21.24 ± 7.15	30.76 ± 3.84 αβ	11.55 ± 4.10 β
Denitrification (nmol N <sub>2</sub> O h <sup>-1</sup> g <sup>-1</sup> )	0-3 cm	12.16 ± 0.78 a	8.71 ± 0.63 a	54.93 ± 8.69 b αβγ
	4-7 cm	13.58 ± 0.61	14.54 ± 2.23	17.16 ± 1.17 α
	10-13 cm	14.46 ± 1.46	28.71 ± 12.73	16.29 ± 1.16 β
	25-28 cm	7.79 ± 2.65 a	19.06 ± 1.99 b	12.06 ± 0.65 ab γ
β-glucosidase (nmol MUF h <sup>-1</sup> g <sup>-1</sup> )	0-3 cm	30.58 ± 1.52 a α	23.56 ± 0.93 a αβ	199.79 ± 19.27 b α
	4-7 cm	26.86 ± 1.39 α	24.24 ± 0.54 α	27.12 ± 0.86 β
	10-13 cm	20.33 ± 2.30 αβ	21.38 ± 1.06 αβ	25.18 ± 0.66 β
	25-28 cm	17.37 ± 0.92 a β	18.91 ± 0.68 ab β	21.40 ± 1.02 b β
Phosphatase (nmol MUF h <sup>-1</sup> g <sup>-1</sup> )	0-3 cm	198.06 ± 7.80 a α	194.93 ± 11.69 a α	420.59 ± 20.18 b α
	4-7 cm	154.03 ± 5.30 β	154.43 ± 2.46 α	154.20 ± 5.83 β
	10-13 cm	146.72 ± 5.18 αβ	136.30 ± 5.33 β	140.08 ± 2.36 β
	25-28 cm	125.19 ± 3.38 a β	123.62 ± 2.78 a β	137.10 ± 2.26 b β
Leucine aminopeptidase (nmol MCA h <sup>-1</sup> g <sup>-1</sup> )	0-3 cm	144.46 ± 6.30 a α	97.94 ± 2.28 b α	127.39 ± 5.60 a α
	4-7 cm	100.86 ± 2.98 β	99.59 ± 3.77 α	90.44 ± 3.09 β
	10-13 cm	72.37 ± 7.68 αβ	63.94 ± 4.34 β	76.38 ± 1.23 β
	25-28 cm	70.36 ± 3.34 a β	55.68 ± 1.73 b γ	80.66 ± 3.59 a β

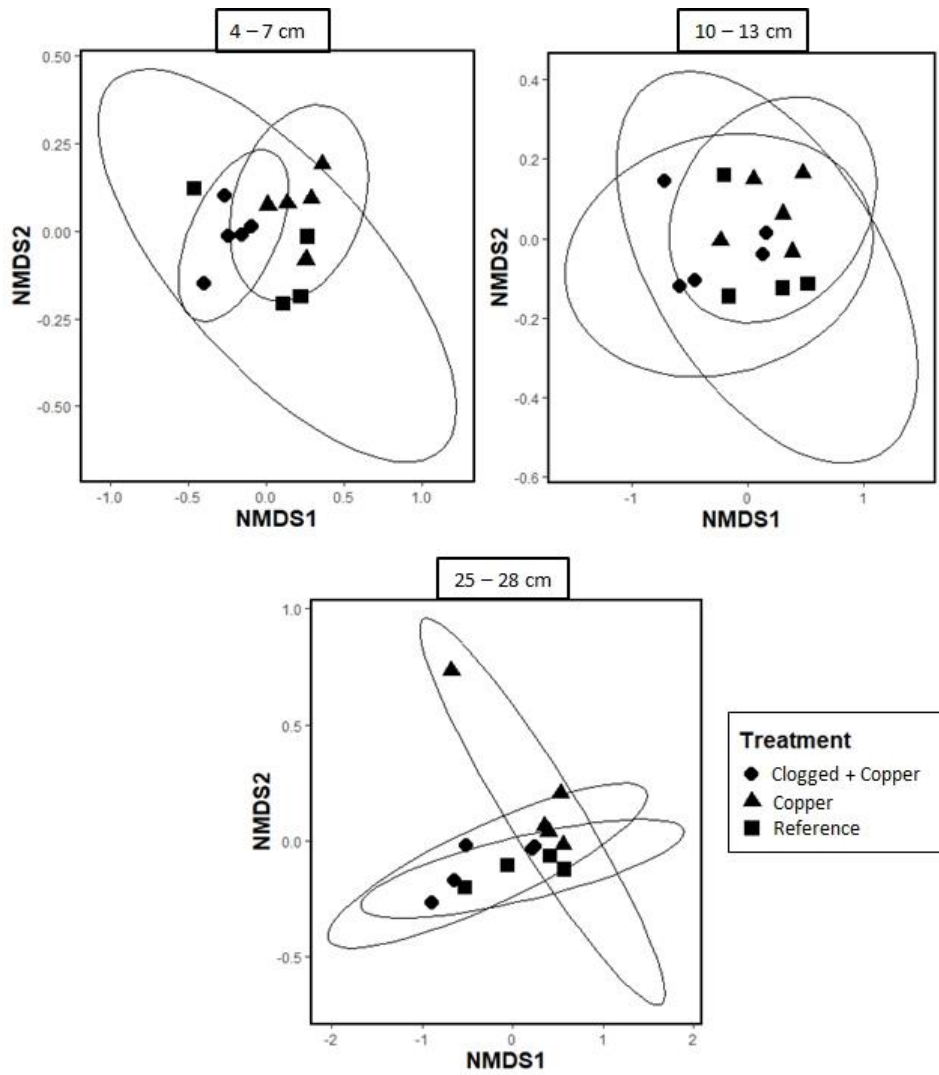


Figure V-A3: nMDS representing the dissimilarity of bacterial structures in sediment samples collected at 4–7 cm (stress value:0.0710), 10–13 cm (stress value:0.0485) and 25–28 cm (stress value:0.0213) for each treatment.



---

## CHAPITRE 2

Le cuivre modifie les réponses fonctionnelles des communautés microbiennes du sédiment de rivière à l'assèchement

---





## **VI- CHAPITRE 2 : le cuivre modifie les réponses fonctionnelles des communautés microbiennes du sédiment de rivière à l'assèchement**

---

Le premier chapitre de thèse a entre autre permis d'explorer le rôle filtre de contaminants joué par les premiers centimètres de la zone hyporhéique à travers une première expérience combinant cuivre et colmatage. La zone hyporhéique a également un rôle refuge pour les organismes lors de perturbations en surface comme l'assèchement (Vander Vorste et al., 2016). Ce rôle refuge a peu été mis en évidence pour les communautés microbiennes du sédiment et il a encore moins été exploré en combinaison avec un stress chimique. Pourtant les cycles d'assèchement et remise en eau augmentent la mobilisation des métaux (Paranaíba et al., 2020) et potentiellement la toxicité pour les communautés microbiennes rendant la combinaison des deux stress particulièrement intéressante à étudier. L'objectif de ce second chapitre était de comprendre comment la résistance et la résilience des fonctions microbiennes après un assèchement étaient modifiées par un contexte de contamination au cuivre dans la zone hyporhéique. Les hypothèses suivantes ont été formulées :

- Pendant l'assèchement, les effets négatifs du cuivre et de l'assèchement sur les fonctions microbiennes s'additionnent en surface
- En profondeur, seuls les effets du cuivre sont observés parce que les effets de l'assèchement y sont moins importants (grâce à une humidité résiduelle)
- Après la remise en eau, la résilience des fonctions microbiennes est diminuée dans les sédiments exposés à une contamination par le cuivre à court et long terme (1 jour et 4 semaines après remise en eau)

Le même dispositif en colonnes que celui présenté dans la partie Matériel et Méthodes et utilisé dans le Chapitre 1 a été mis en œuvre pour cette expérience. Contrairement à l'étude précédente dans laquelle la contamination au cuivre était apportée par l'eau, un spiking des sédiments par du cuivre a été réalisé préalablement au début de l'expérience à une concentration environnementale ( $[\text{Cu}]_{\text{nominale}} = 70 \text{ mg.kg}^{-1}$  de sédiment sec) (Fernández-Calviño et al., 2008). En effet, la première expérience nous a montré que le cuivre apporté par l'eau était capté dans les premiers centimètres de sédiment. Or, une contamination homogène dans toute la zone hyporhéique était nécessaire pour cette expérience afin de

reproduire une accumulation du cuivre le long de la colonne de sédiment. Les colonnes ont été ensuite exposées à 4 semaines d'assèchement et 4 semaines de remise en eau, avec ou sans contamination préalable des sédiments par du cuivre (Fig. VI-0). Les réponses fonctionnelles (activités exo-enzymatiques, respiration, dénitrification) des communautés microbiennes à ces stress combinés ont été évaluées avant assèchement (Jour 4), à la fin de la période d'assèchement (J32), au début (Jour 34) et à la fin (Jour 61) de la période de remise en eau.

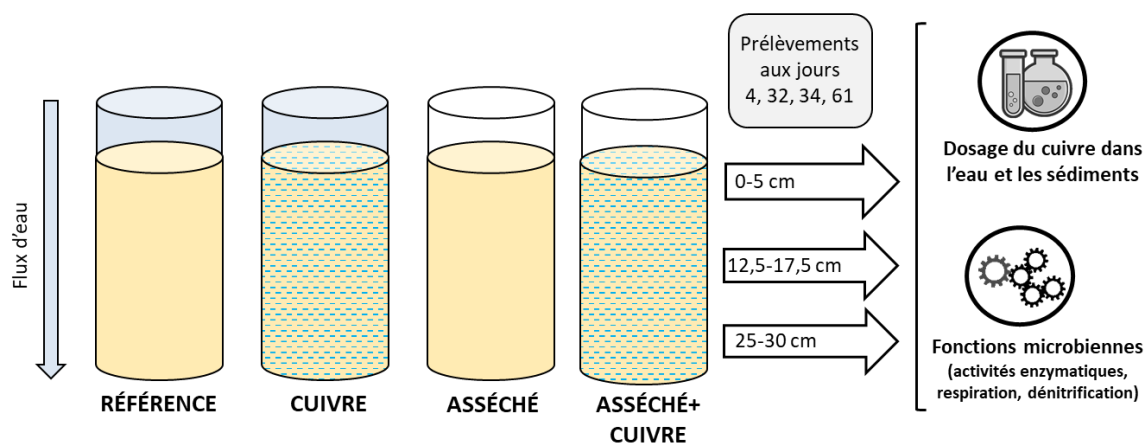


Figure VI-0 : schéma du dispositif expérimental de l'expérience combinant colmatage et cuivre

Les principaux résultats de cette expérience ont été rédigés sous forme d'article qui sera soumis prochainement dans le journal « Aquatic toxicology ». Ces résultats ont montré que :

- Les effets du cuivre sur les fonctions microbiennes persistent tout au long de l'expérience tandis que les effets de l'assèchement sont transitoires et une résilience a lieu après remise en eau.
- Les effets du cuivre et de l'assèchement combinés ne s'additionnent pas et les réponses microbiennes sont globalement influencées par un seul stress (assèchement pour la dénitrification et le cuivre pour les activités exo-enzymatiques).
- Des interactions antagonistes entre les deux stress ont été mises en évidence à la profondeur intermédiaire (Medium) pour les activités exo-enzymatiques
- La résilience des fonctions microbiennes est diminuée en présence de cuivre après la remise en eau.

# Copper alters the microbial responses to drying in streambed sediment

---

Laura Kergoat<sup>1</sup>, Aymeric Dabrin<sup>1</sup>, Matthieu Masson<sup>1</sup>, Thibault Datry<sup>1</sup>, Chloé Bonnineau<sup>1</sup>

<sup>1</sup> INRAE, UR RiverLy, France

## 1. Introduction

Intermittent rivers and ephemeral streams (IRES) with periodic natural water flow interruptions concern 51-60% of the total river and stream length. Drying events are expected to become increasingly frequent, extended in time and space due to human activities (climate change, water resource use) (Sauquet et al., 2021). Drying has negative effects on microbial functions in the river sediment. For example, a 13-week laboratory drying of streambed sediments collected in the Breitenbach river (Germany) resulted in a decrease of enzymatic activities particularly significant for aminopeptidases and less pronounced for carbohydrate-degrading enzymes (Pohlon et al., 2013). Another experiment showed that water content variations in sediments from a dried Mediterranean pond could influence CO<sub>2</sub> and N<sub>2</sub>O emissions which increased during early desiccation, decreased during drying and increased after rainfall (Fromin et al., 2010). A decrease of bacterial biomass production estimated with [<sup>3</sup>H] leucine incorporation was also demonstrated during a 46-day drying in sediments sampled in different temporary Mediterranean rivers (Amalfitano et al., 2008). Microbial functions resilience is generally observed after rewetting: for example, bacterial production and extracellular enzymatic activities of microbial communities collected in a dried river sediment (Breitenbach - Germany) reached a similar level as unaffected sediments after 4 days of rewetting (Marxsen et al., 2010).

Drying is not the only stress faced by aquatic microbial communities. Indeed, increasingly severe droughts and associated streambed drying will also take place in areas already exposed to chemical stressors such as pesticide contamination due to agriculture. Copper is a component of « Bordeaux mixture » used as a fungicide in conventional and organic agriculture, especially in vineyards to avoid downy mildew (*Plasmopara viticola*). Copper applied to agricultural surfaces is leached into watercourse during rainfall. Although applied in solution, the high affinity of copper to organic matter and particles results in accumulation



in sediment. Copper concentrations in sediment varying, for example, between 18 to 209 mg Cu.kg<sup>-1</sup> depending on the vineyard proportion in a Spanish watershed (Fernández-Calviño et al., 2008). Copper exposure decreases microbial functions: a decrease of respiration, denitrification and exoenzymatic activities was, for example, demonstrated during a 21-day experiment in artificial channels with sediments spiked by copper (40 mg Cu.kg<sup>-1</sup>) (Mahamoud Ahmed et al., 2018). However, the combination of copper and drying has not, to our knowledge, been explored in sediment.

The stressors combination can lead to a stronger (synergy) or weaker (antagonism) effect than the simple addition (Galic et al., 2018). In an agricultural watershed prone to severe irrigation needs and pesticides use, drying and stream contamination by copper are two concomitant stressors for sediment microbial communities. Previous studies have shown a potential synergistic effect of these stressors in soil microbial communities. Indeed, in soil exposed to copper contamination (800 and 3200 mg Cu.kg<sup>-1</sup>) and to ten cycles of drying and rewetting, a stronger decrease in respiration was found when stressors were combined compared to only one stressor exposure (Li et al., 2016). This study highlighted how copper contamination can reduced microbial resistance to drying in soil (Li et al., 2016). However, copper effects on resistance and/or resilience to drying of microbial communities in sediment matrix have never been shown even if the negative effects of both stressors on sediment microbial communities have been demonstrated individually. Moreover, most of the multiple stressors studies are carried out in the benthic zone. Stress effects in deeper sediment layers, called hyporheic zone (surface water-groundwater interface (Boulton et al., 1998)) are not well understood. However, microbial hyporheic communities ensure important ecological functions such as organic matter mineralization (Nogaro et al., 2007) and pollutant degradation (Gandy et al., 2007).

In this context, the objective of our study was to test whether the resistance/resilience of microbial functions after drying is decreased by copper contamination at different depths of the streams and rivers hyporheic sediment. More precisely, we made the following hypotheses: (1) during drying, the negative effects of copper and drying on microbial functions are additive in the surface layer; (2) in deeper layers, only the copper effects are observed because residual sediment humidity modulates those of drying on microbial functions; (3) after rewetting, the resilience of microbial functions decreased in hyporheic sediments

exposed to copper both on the short and long term. To test these hypotheses, an experiment was carried out using hyporheic mesocosm as columns filled with streambed sediments exposed to the two stressors individually or in combination: copper sediment spiking ( $83 \pm 14 \text{ mg Cu.kg}^{-1}$ ) or/and a drying during 4 weeks followed by 4 weeks rewetting.

## 2. Material and methods

### 2.1. Experimental setup

#### 2.1.1. Sediment sampling and Cu-spiking procedure

The sediment used for the experiment was collected during January 2022 (sieved  $< 5\text{mm}$ ) in the Ain river (France). This sediment was characterized by low level of copper concentrations ( $1.92 \text{ mg Cu.kg}^{-1}$ ) and by a particle size distribution dominated by the sandy fraction with 72% of sediment dry weight between 200 and 500  $\mu\text{m}$  (proportion of dry weight: 500-5000  $\mu\text{m}$ : 12.44%; 200-500  $\mu\text{m}$ : 72%; 50-200  $\mu\text{m}$ : 13.24%;  $<50 \mu\text{m}$ : 2.32%; organic matter: 1.4%). After sediment homogenization, 60 L of wet sediment (density:  $1.65 \text{ kg.L}^{-1}$  and humidity: 0.84%) was mixed with 40 L of water from Ain river previously spiked with 578 mL of a copper solution at  $39 \text{ g Cu.L}^{-1}$  of  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$  (*i.e.*  $10.0 \text{ g Cu.L}^{-1}$ ) in order to obtain a sediment with a nominal copper concentration of  $70 \text{ mg Cu.kg}^{-1} \text{ d.w.}$  The same procedure was applied on the reference sediment without copper addition. After 1h30 of homogenization, sediments were left 24h to settle and then supernatant was removed.

#### 2.1.2. Columns filling

The experiment was performed in hyporheic mesocosms consisting of PVC columns (40-cm-high, 10-cm-diameter). In total, 42 columns were divided into 4 treatments :

- **Reference:** exposed to uncontaminated water (n=12)
- **Copper:** filled with copper-spiked-contaminated-sediment (n=12)
- **Drying:** exposed to 4 weeks of drying and 4 weeks of rewetting (n=9)
- **Drying+Copper:** filled with copper-spiked-contaminated-sediment and exposed to 4 weeks of drying and 4 weeks of rewetting (n=9)

To reduce clogging at the bottom of the column, a 500  $\mu\text{m}$ -filter was fixed at the outlet and a 2 cm layer of gravel from the Ain river, sieved between 2 and 5 mm, was added at the bottom of each column. To facilitate the columns filling, 200 ml of water (one third groundwater and two thirds demineralized water) was first added to the columns. Then,  $4.21 \pm 0.02$  kg of sediment previously spiked (for Copper and Drying+Copper treatment) or not spiked (for Reference and Drying treatment) and homogenized was added to each column. During columns filling with sediment, three leaf bags per column were placed vertically at 3 depths (-2.5, -15, -27.5 cm). Leaf bags were prepared as follows: alder leaves were dried (7 days at  $50^\circ\text{C}$ ) and weighed to obtain the initial leaf mass, which ranged between 300 to 400 mg (mean  $325.68 \pm 2.36$  mg). The leaves were then rewetted during few minutes in groundwater and placed in 7 cm square leaf bags (mesh size: 250  $\mu\text{m}$ ). After columns filling, a 5 cm water height was left above the sediment. A temperature and luminosity sensor was put in the surface water of one column per condition. After 48h of sedimentation, water circulation was started.

### **2.1.3. Setting of experimental conditions**

The columns were exposed to a top-down water flow ( $1.75 \pm 1.28$  ml.min<sup>-1</sup>) at a constant temperature ( $19 \pm 2$  °C) and a 12h/12h light/dark cycle using LED lights (Radiometrix modules, total luminous flux 25116 lm). The experimental set up allowing the water to flow in the columns was similar to Navel et al. (2011) with a hydraulic head between 4 and 11.5 cm. To supply the columns with water, two 150L-tanks were regularly filled with water (one third groundwater and two third demineralized water). To measure the flow rates, the water at the column outlet was regularly weighed assuming a density of 1 kg.L<sup>-1</sup>. Half of the columns were dried on after 5 days of experiment (Fig. VI-1A) by stopping water arrival in the column. After 33 days of experiment, the water flow was restored in those columns to simulate rewetting. For the others columns water flow was kept constant during all the experiment.

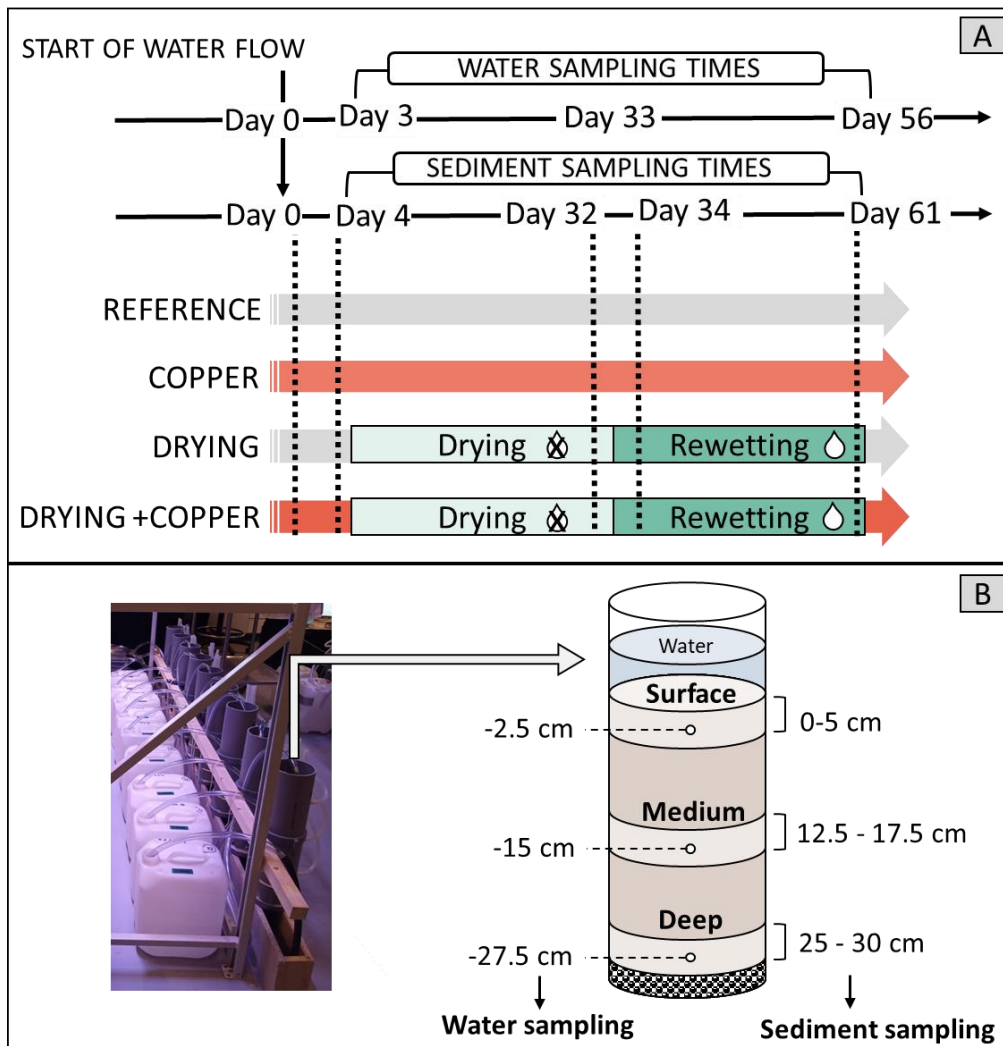


Figure VI-1: summary schema of the four treatments, sampling times (A) and sampling depths (B) during the experiment.

## 2.2. Water and sediment sampling

**Water samples** were collected at three different times (Fig. VI-1A): before drying (Day 3), a few hours after rewetting (Day 33) and after 3 weeks of rewetting (Day 56). At each sampling times, water samples were collected at 3 different columns depths (-2.5, -15, -27.5 cm) of 3 column replicates using Versilic© tubes placed at each depth (Fig. VI-1B). Water samples were also collected from the 150L-tanks on 3 times during the experiment (Day 13, 35 and 56). Prior to analyses, water samples were filtered at 0.45  $\mu\text{m}$  (Whatman Puradisc FP30 Syringe Filter). For dissolved copper measurements, a 0.5% (v/v) acidification with nitric acid (Merck, Suprapur, 65%) was performed to prevent adsorption before analyses.

**Sediment sampling** was realised at three different depths (0-5 cm, 12.5-17.5 cm, 25-30 cm), by collecting a slice of 5 cm thick sediment using a plastic spatula (Fig. VI-1B). Three columns were sacrificed at each sampling time: before drying (Day 4), after 4 weeks of drying (Day 32), after 1 day of rewetting (Day 34), and after 4 weeks of rewetting (Day 61) (Fig. VI-1A). Water and sediment samples collected were stored at 4°C until analyses.

## 2.3. Physicochemical characterization

### 2.3.1. Water analyses

Dissolved oxygen measurements were made at the 3 column depths (-2.5, -15, -27.5 cm) before drying (Day 4) and after rewetting (Day 33 and Day 57) using an oxygen dipping probe (PreSens; Precision Sensing GmbH, Regensburg, Germany). The pH, temperature and oxygen concentration were measured in the 150L-tank water once a week during the experiment. Dissolved copper concentrations were measured by TQ ICP-MS (Thermo, iCAP TQ ICP-MS) according to NF EN ISO 17294-2 standard method (Day 3 and 33). Dissolved organic carbon (DOC) and nitrate ( $\text{NO}_3^-$ ) measurements were performed at all column depths (Day 33 and 56) and in the tanks (Day 13, 35 and 56). These measurements were made on 30 samples by the NF EN ISO 1484 standard method and by UV-visible spectroscopy using PLS chemometrics algorithm for the other samples (including the previous 30 samples as training and validation samples).

### 2.3.2. Sediment analyses

Copper measurement was done at all depths in 3 columns Reference and Copper on Day 4 and in 3 columns Copper and Drying+Copper on Day 32 and 34. Sediments were dried and ground in an agate mortar followed by aqua regia ( $\text{HCl}$  and  $\text{HNO}_3$ ; 3:1 v/v) digestion assisted by microwave oven. Copper concentrations in sediment extracts were measured by TQ ICP-MS (Thermo, iCAP TQ ICP-MS) based on NF EN ISO 17294-2 standard method. Organic matter content was measured at all depths (0-5 cm, 12.5-17.5 cm, 25-30 cm) and at all sampling times (Day 4, 32, 34 and 61) using loss on ignition method at 550°C. Grain size analysis was performed on samples collected in the Ain river and at all depths and treatments for Day 4, 32 and 34 and only in the "Surface" and "Deep" layers for Day 61: 100 g of each sample was sieved at 3 different mesh sizes (500  $\mu\text{m}$ , 200  $\mu\text{m}$ , 50  $\mu\text{m}$ ) and each collected fraction was

dried at 50°C and weighed to obtain the proportion of coarse sand (>500 µm), medium sand (200-500 µm), fine sand (50-200 µm) and clay/silt (<50 µm). Humidity was determined for all treatments and all sampling times by weighting the sediment samples before and after drying (70°C during 24h).

## 2.4. Microbial community analyses

### 2.4.1. Exoenzymatic activities

Exoenzymatic activities (beta-glucosidase EC 3.2.1.21, leucine aminopeptidase EC 3.4.11.1 and phosphatase EC 3.1.3.1) were measured as described in Mahamoud Ahmed et al. (2018) in sediment sampled at the three depths (0-5 cm, 12.5-17.5 cm, 25-30 cm) for each treatment and sampling times (Day 4, 32, 34 and 61). Two technical replicates were made for each sample. The optimal substrate concentrations were determined with preliminary tests : 1750 µM for L-leucine-7 amido-4-methylcoumarin hydrochloride (MCA-Leu), 1000 µM for 4-Methylumbelliferyl-β-D-Glucopyranosid (MUF-Glu) and 4-methylumbelliferyl-phosphate (MUF-Pho). Standard curves of MCA (Sigma A9891, CAS No. 26093-31-2) for leucine aminopeptidase and MUF (Sigma M1381, CAS No. 90-33-5) for beta-glucosidase or phosphatase were built from a mixture of the 3 depths and the 3 replicates for each treatment and sampling times. These curves were used to convert fluorescence values into exoenzymatic activities expressed in nmol of substrate.h<sup>-1</sup>.g<sup>-1</sup> of dry sediment.

### 2.4.2. Respiration and denitrification

In vitro denitrification and respiration were measured in sediment sampled at each depth (0-5 cm, 12.5-17.5 cm, 25-30 cm) and sampling time (Day 4, 32, 34 and 61) using a method previously described by Foulquier et al. (2013) and modified as follows: 10 g of wet sediment in a 150 mL glass flasks were incubated for 2h and 5h under agitation, in the dark. Gas emissions were measured by gas chromatography (Agilent MicroGC 490) and expressed in ng C-CO<sub>2</sub>.h<sup>-1</sup>.g<sup>-1</sup> for respiration and ng N-N<sub>2</sub>O.h<sup>-1</sup>.g<sup>-1</sup> for denitrification.

An integrative measurement of CO<sub>2</sub> emissions was performed three times after rewetting (39, 50 and 55 experiment days) using the Picarro instrument G4301 supplemented with a PVC device that fitted on the columns top. Measurements were made for 10 minutes

for each replicate. The slope of each curve corresponded to CO<sub>2</sub> emissions in ppm.h<sup>-1</sup> converted into µg.L<sup>-1</sup>.h<sup>-1</sup> with an estimated average temperature of 20°C and a pressure of 1015 hPa using ideal gas law.

### 2.4.3. Leaf litter degradation

The leaf bags were collected at each sampling time and the leaves were rinsed, dried (7 days at 50°C) and weighed to obtain the final leaf mass. The decomposition rate (mg.day<sup>-1</sup>) was obtained by subtracting the final mass of the last sampling time (Day 61) from the initial mass divided by the number of days.

## 2.5. Data analyses

For all statistical analyses, R software version 4.1.3 (R Core Team 2022) was used and  $\alpha < 0.05$  was the significance level applied. The packages « rstatix » (Kassambara, 2021) and « stats » (included in R functionality) were used to perform ANOVA, Repeated Measures-ANOVA (RM-ANOVA) and post-hoc tests. For all parametric tests, the ANOVA residuals normality and the data homoscedasticity were checked using a Shapiro-Wilk test and a Fligner-Killeen test respectively. If necessary, data transformation was made (square root of the value) (*e.g.* nitrate and dissolved copper concentrations).

To test **the individual negative effects of copper and drying on microbial functions**, a Student t-test between Reference and Copper responses was made at Day 4 at each depth and a one-way ANOVA was run with treatment as the main factor and a Tukey's post hoc test for all microbial functions tested (exoenzymatic activities, potential respiration and denitrification, leaf litter degradation) at all depths on Day 32, 34 and 61.

To assess **additive negative effects of copper and drying on microbial functions in the surface layer (hypothesis 1)**, a theoretical addition of « Copper » and « Drying » responses on Day 32 was calculated (named « Addition ») for exoenzymatic activities, respiration and denitrification. A visual comparison of the Reference inhibition percentage was made between the microbial responses of the Drying+Copper treatment and the « Addition » (a difference was significant when the 95% confidence intervals did not overlap).

We have hypothesized that **in deeper layers, only the copper effects are observed because drying effects are less important due to residual humidity (hypothesis 2)**. To check that humidity was different between dried and undried columns, we ran a one-way ANOVA with treatment as the main factor followed by a Tukey's post hoc test on humidity values at each depth on Day 32. To show that the humidity was higher during drying in the surface than in the deeper layers, a RM-ANOVA was made with depth as the repeated factor and a pairwise post hoc test with Bonferroni adjustment on humidity values for each treatment on Day 32. To test if only copper effects were observed in the medium and deep layers on microbial functions (exoenzymatic activities, respiration, denitrification), a one-way ANOVA with treatment as the main factor followed by a Tukey's post hoc test was run on Day 32.

To test whether **after rewetting, the resilience of microbial functions is decreased when sediment are copper contaminated after short (1 day) and long term (4 weeks) (hypothesis 3)**, a one-way ANOVA with treatment as the main factor followed by a Tukey's post hoc test was performed. This test was made at all depth on Day 34 and 61 for exoenzymatic activities, respiration, denitrification, on Day 39, 50, 55 for CO<sub>2</sub> emission in the entire column and on leaf litter degradation data. To determine the effects of drying and rewetting on physico-chemical parameters in water (dissolved organic carbon, dissolved copper, nitrate concentration) and sediment (sediment concentration, grain size, % organic matter), a one-way ANOVA with treatment as the main factor followed by a Tukey's post hoc test was performed on these data for all water sampling times (except Day 4 : Student t-test) and all column depths.



### 3. Results

#### 3.1. Drying affects physico-chemistry of the column

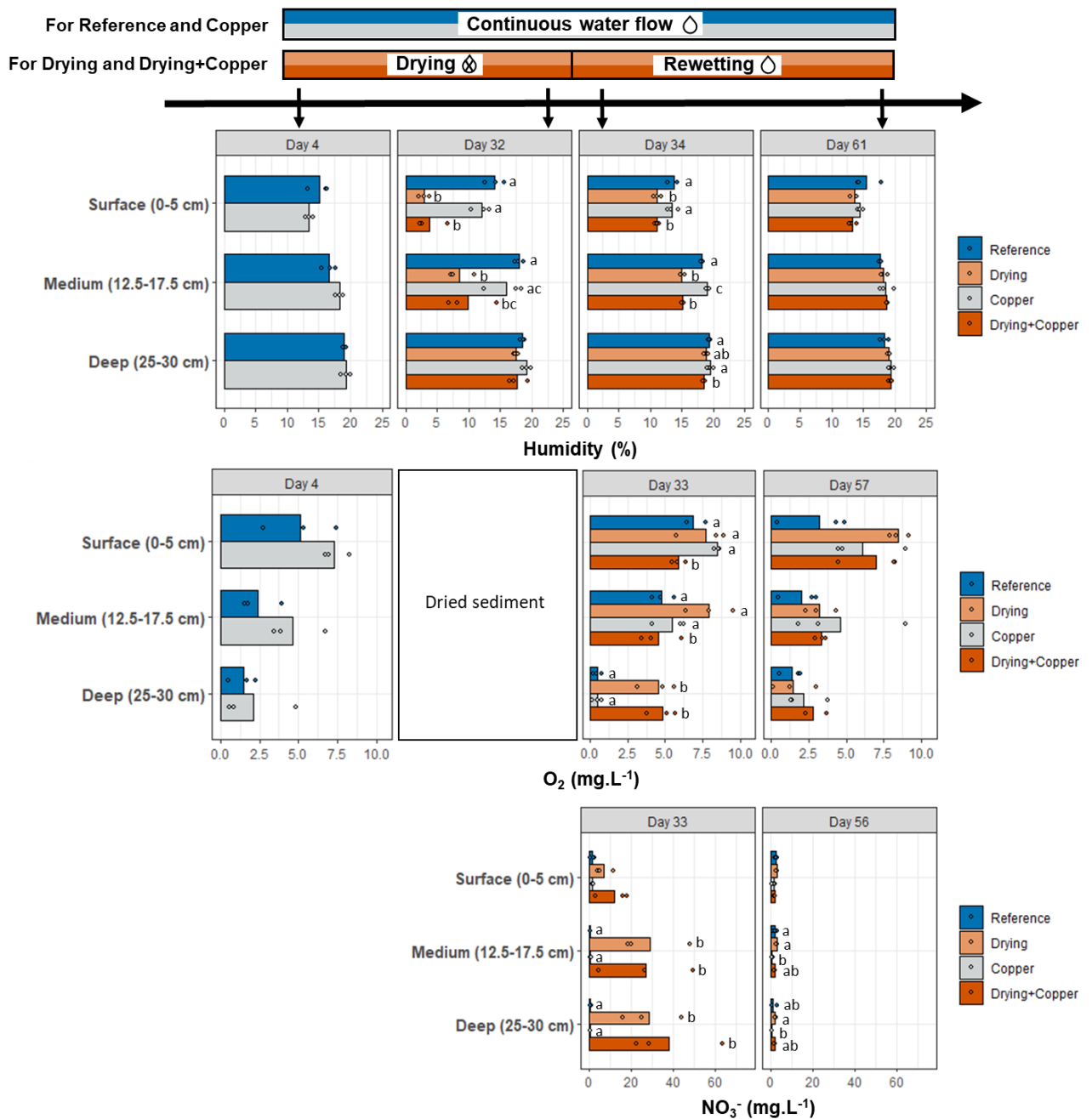


Figure VI-2: humidity (%),  $O_2$ ,  $NO_3^-$  concentration (mg.L<sup>-1</sup>) for each depth and treatment after 4 days of experiment (Day 4), during drying (Day 32) and after 0, 1, 2 or 24, 28 days of rewetting (Day 33, 34, 35 or 57, 61). Each point corresponds to one replicate, bar indicates the means (n=3).

During drying (Day 32), humidity percentage was divided by 3 in the surface layer and by 2 in the medium depth for dried columns compared to the Reference (One-way ANOVA, Treatment,  $p < 0.05$ ) (Fig. VI-2 ; Table VI-A2). These significant differences were still observed

with lesser extent one day after rewetting (Day 34). However, no significant difference between treatments was observed after 4 weeks of rewetting (Day 61).

A significant difference (One-way ANOVA, Treatment,  $p < 0.05$ ) in oxygen concentration was observed between treatments one day after rewetting (Day 33) in the deep layer : oxygen concentration was around 10 times higher in the dried treatments (Drying and Drying+Copper) compared to non-dried (Reference and Copper) columns (Fig. VI-2 ; Table VI-A2). No other significant differences were found at the other measurement times.

The dried columns had significantly higher nitrate concentration 3 days after rewetting (Day 33) at the medium and deep layers compared to the Reference and Copper treatments. No other differences were found for nitrate concentrations after 23 days of rewetting (Day 56) nor for dissolved organic carbon (DOC) at both times of measurement (Day 33 and 56) (Fig. VI-2 ; Table VI-A2). Mean concentrations were respectively  $7.09 \pm 12.80 \text{ mg.L}^{-1}$  and  $5.98 \pm 7.36 \text{ mg.L}^{-1}$  in all conditions and sampling times for nitrate and dissolved organic carbon concentrations during the experiment.

Drying and rewetting caused little changes in columns grain size and organic matter content between treatments (One-way ANOVA, Treatment,  $p < 0.05$ ) (Table VI-A1 & VI-A2). For all conditions, the clay-silt proportion and organic matter content were more important in surface than in the medium and deep layers even if not always significant (RM-ANOVA, Depth,  $p > 0.05$ ) (Table VI-A1 & VI-A2). Despite slight differences, the sediment was globally poor in organic matter (ranging from 0.82 to 1.90%) and mostly composed of medium sand between 200 and 500  $\mu\text{m}$  ( $71.60 \pm 0.80 \%$ ) for all sampling times, conditions and depths.

### 3.2. Drying did not influence vertical copper concentrations

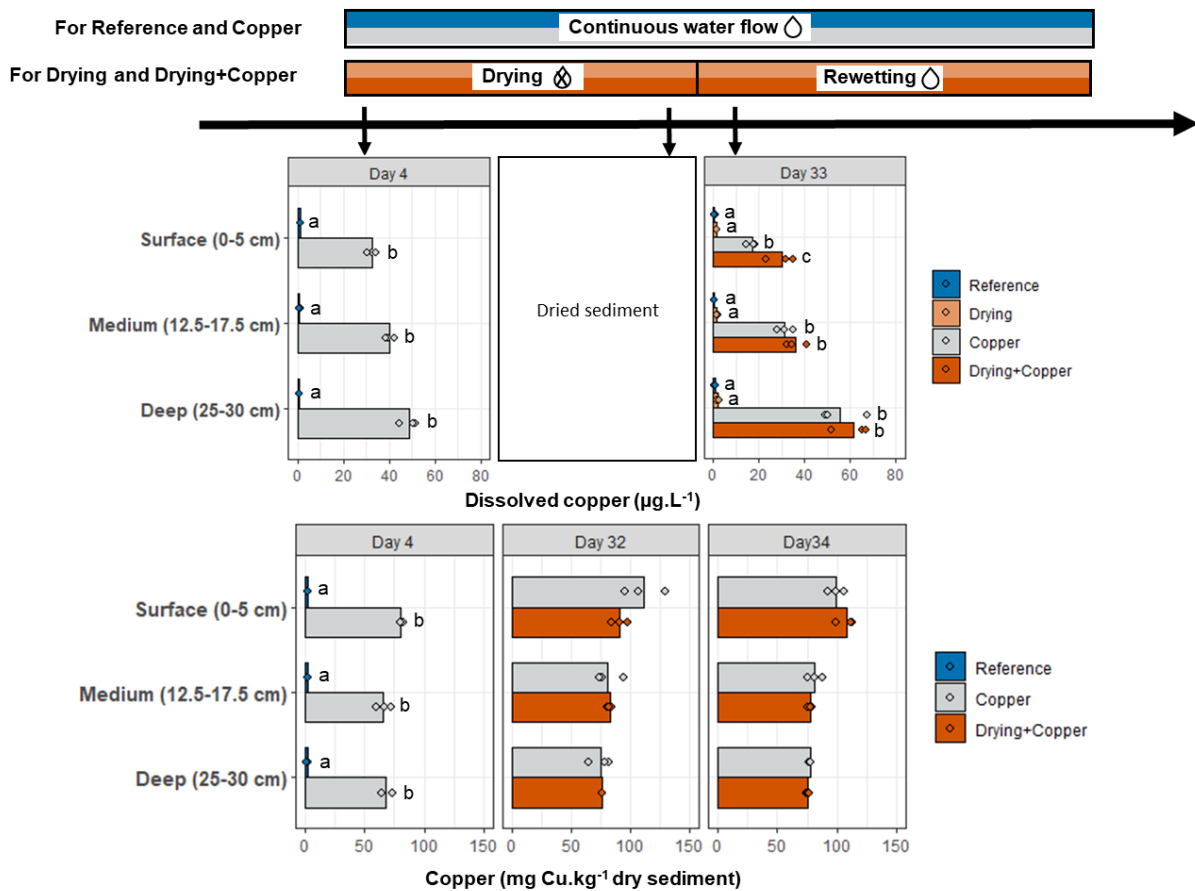


Figure VI-3: dissolved and particulate copper concentrations along sediment columns for each treatment and depth after 4 days of experiment (Day 4), during drying (Day 32) and after 1 day of rewetting (Day 34). Each point corresponds to one replicate, bars indicate the means (n=3).

Mean copper concentrations along sediment columns were  $71.20 \pm 8.14 \text{ mg Cu.kg}^{-1}$  in the Copper columns and  $2.07 \pm 0.26 \text{ mg Cu.kg}^{-1}$  in the Reference columns after the first 4 days of experiment (showing the success of copper spiking). At the following measuring times (Days 32 and 34), higher copper concentrations were globally measured compared to experiment start (Day 4) in copper spiked columns (Fig. VI-3). Indeed, in copper contaminated columns, copper concentrations increased from  $80.53 \pm 1.24 \text{ mg.kg}^{-1}$  (Day 4) to  $103.67 \pm 8.31 \text{ mg.kg}^{-1}$  (Day 34) at surface and from  $66.54 \pm 5.19 \text{ mg.kg}^{-1}$  to  $77.92 \pm 3.66 \text{ mg.kg}^{-1}$  at deepest layers (medium and deep combined).

Drying and rewetting had no effects on copper distribution in sediment : no significant difference was observed for each depth between the Copper and Drying+Copper treatments during drying (Day 32) and after 1 days of rewetting (Day 34) (Student t-test,  $p < 0.05$ )

(Table VI-A2). Globally, sediment copper concentration slightly decreased with depth while dissolved copper concentration increased with depth even if all results were not significant (RM-ANOVA, Depth,  $p > 0.05$ ) (Table VI-A2).

### 3.3. Microbial functional responses to stressor combination

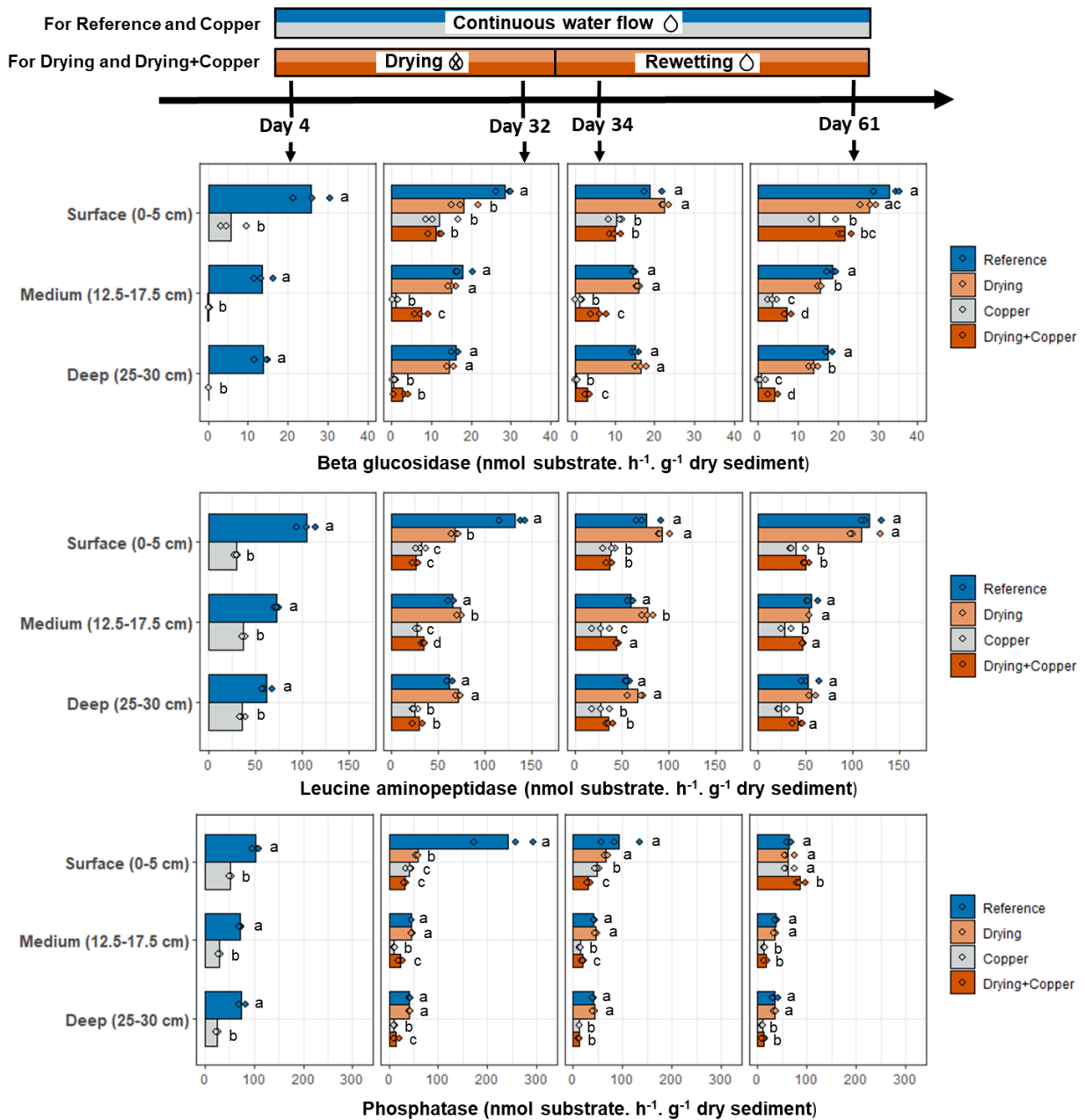


Figure VI-4: beta-glucosidase, leucine aminopeptidase, phosphatase activities for each depth (surface, medium and deep layer), each sampling time (Day 4, 32, 34, 61) and each treatment. Each point corresponds to one replicate, bar indicates the means ( $n=3$ ).

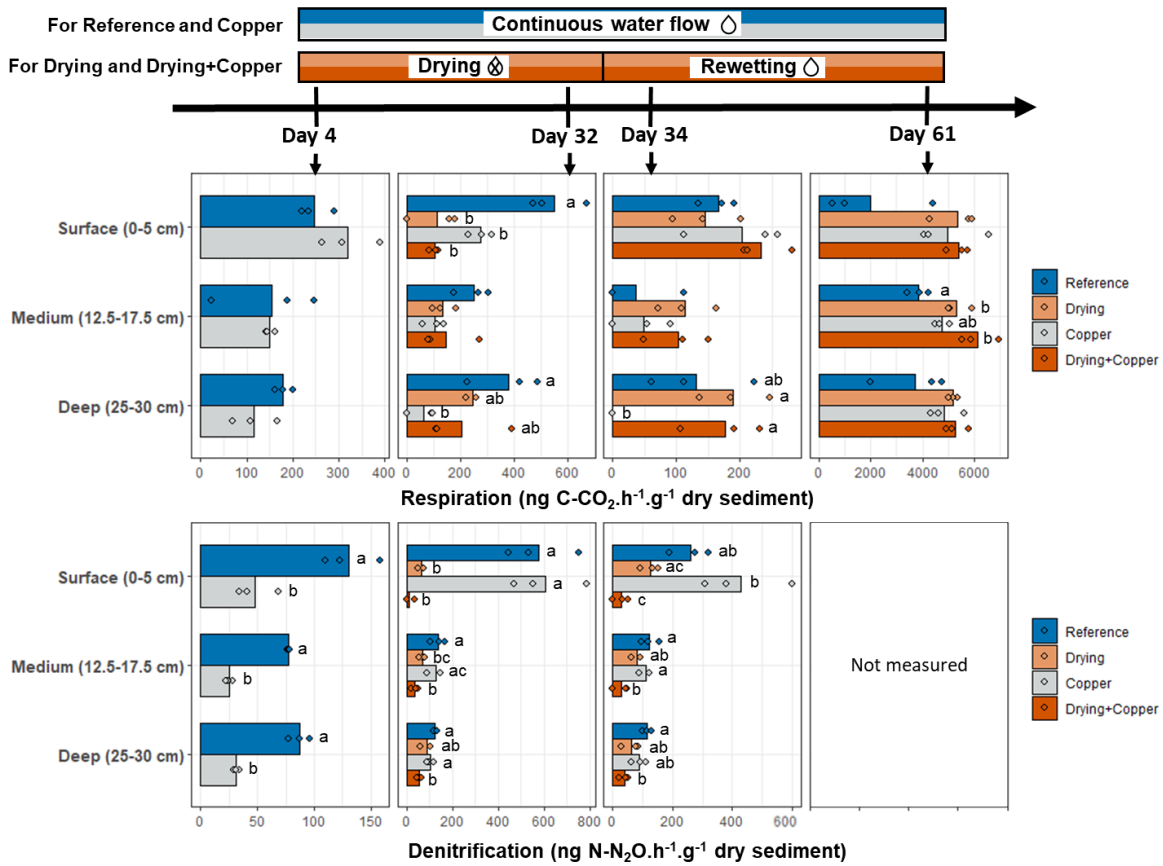


Figure VI-5: respiration and denitrification for each depth (surface, medium and deep layer) each sampling time (Day 4, 32, 34, 61) and each treatment. Each point corresponds to one replicate, bars indicate the means (n=3). Scales for the x-axis are different between sampling times.

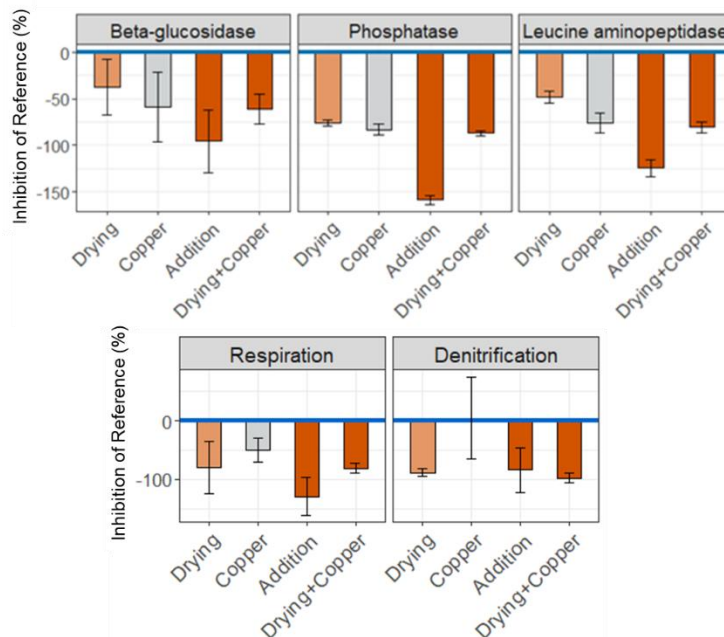


Figure VI-6: inhibition percentage for Drying, Copper, theoretical Addition of Drying and Copper treatment and observed Drying+Copper combined treatment of several microbial functions during drying (Day 32) in the Surface layer. Each bar corresponds to mean  $\pm$  95% confidence intervals. The blue line represents the Reference treatment.

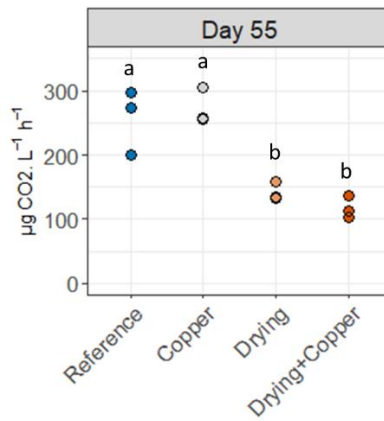


Figure VI-7: CO<sub>2</sub> emission for each treatment measured with Picarro instrument after 55 days of experiment (27 days after rewetting). Each point corresponds to one column replicate. Different letters indicate significant different results between treatments (One-way ANOVA, Treatment,  $p < 0.05$ )

### 3.3.1. Microbial communities activities in copper-contaminated sediment at the experiment start (Day 4)

Except respiration, all microbial activities decreased significantly in Copper treatment compared to the Reference after copper spiking at all depths (Day 4) (student t-test,  $p < 0.05$ ) (Fig. VI-4 and Fig. VI-5). Denitrification and phosphatase activity of the copper spiked columns are 2 to 3 times lower than the Reference for all depths. Copper effects were different depending on depth for the leucine aminopeptidase activity: it was 3.5 times lower in the surface layer and only 1.5 times lower in the medium and deep depths for the Copper treatment compared to Reference. Beta-glucosidase activity was the most affected by copper. This activity was 5 times lower in the surface layer compared to the Reference and it was almost totally inhibited at the other depths (medium and deep) for the Copper treatment.

### 3.3.2. Effects of drying on microbial communities activities in copper-contaminated sediment (Day 32)

On Day 32, a significant decrease of all microbial activities compared to the reference was observed in the surface layer for the Drying treatment (divided by around 2 for beta-glucosidase and leucine aminopeptidase, by 4 for phosphatase and respiration and by 9 for denitrification ; Fig. VI-4 and Fig. VI-5 ; Table VI-A3). In the medium and deep layers, there was no significant effect of Drying alone for all microbial activities except denitrification which was 50 % lower in Drying treatment compared to Reference in the medium layer (Table VI-A3).

Exoenzymatic activities were still inhibited by the Copper treatment all along the column at this sampling time while respiration was inhibited by Copper only in the surface layer (Fig. VI-5). Denitrification was no longer inhibited by copper on Day 32 since Copper treatment communities had a similar denitrification rate than Reference one (Fig. VI-5).

Phosphatase, leucine aminopeptidase, respiration (and beta-glucosidase even if not significant) inhibition percentage were on average 1.5 to 2 times lower for the Drying+Copper treatment than the theoretical Addition of Drying and Copper individual effects in the surface layer (Fig. VI-6) showing that microbial responses to Drying+Copper is no a simple addition. Indeed, only one stressor drive most microbial responses: for beta-glucosidase, phosphatase, leucine aminopeptidase activities there were no significant differences between the Drying+Copper and Copper treatment (but significant differences from Drying treatment) in the surface and deep layer (Fig. VI-4 ; Table VI-A3) indicating copper as the driving stressor for exoenzymatic activities at those depths. Denitrification was not significantly different between Drying and Drying+Copper treatment (but significantly different from Copper treatment) in the surface layer showing that drying was the most influencing stressor for this parameter in surface (Fig. VI-5 ; Table VI-A3). For respiration, the Drying+Copper combined led to a decrease by 81% compared to the reference treatment in the surface layer as important as the responses to both Drying (decrease by 79%) or Copper (decrease by 50%) without addition effects of the two stressors (Fig. VI-5 and Fig. VI-6).

Interactions between drying and copper were found when both stressors were combined: in the medium layer, exoenzymatic activities of the Drying+Copper treatment were slightly higher than the Copper treatment (but still remaining lower than Reference treatment). Thus, beta-glucosidase was inhibited by 94% after exposure to Copper but only by 42% after exposure to Drying+Copper in the medium layer (Fig. VI-4 ; Table VI-A3). Also, a respiration decrease by 84% with Copper alone was observed in the deep layer while the two stressors combined do not give a significant difference compared to the reference. Finally, Drying+Copper combined led to a significant decrease of denitrification rate compared to the Reference (by 3.71 and 2.36 times in the medium and deep layers respectively). This decrease of denitrification rate was more important for Drying+Copper treatment than for Drying or Copper treatments tested alone (Fig. VI-5 ; Table VI-A3) showing an interaction between stressors.

### **3.3.3. Microbial responses after 1 day of rewetting (Day 34)**

Exoenzymatic activities and respiration of the Drying treatment were no longer significantly different from Reference after 1 day of rewetting in the surface layer. However, leucine aminopeptidase activity in the medium layer of the Drying treatment was significantly higher (by 1.3 times) than the Reference treatment. At this sampling time, Copper still had negative effects compared to the Reference at all depths for exoenzymatic activities. Also, respiration in the deep layer of the Copper treatment was significantly lower than the Reference treatment (similarly to the observation on day 32) (Fig. VI-4 and Fig VI-5 ; Table VI-A3).

In the surface layer, the effects of Drying+Copper combined were not significantly different from the effect of Copper alone but significantly lower than Drying treatment effects for beta-glucosidase and leucine aminopeptidase (Table VI-A3). Phosphatase activity was 1.6 and 2.2 times lower in surface for Drying+Copper treatment compared to the Drying or Copper alone effects respectively (Fig. VI-4). As previously observed in the medium (for all exoenzymatic activities) and the deep layers (for beta-glucosidase), the Drying+Copper effects on microbial communities are lower than Copper alone effects (Fig. VI-4). Although Drying and Copper alone did not significantly decrease denitrification, Drying+Copper treatment resulted in a significant decrease between 73 and 89 % compared to Reference for all depths (Fig. VI-5 ; Table VI-A3).

### **3.3.4. Microbial responses after 27 days of rewetting (Day 61)**

After 27 days of rewetting, exoenzymatic activities of the Drying treatment globally reached a similar level as the Reference treatment, as previously observed on Day 34 (Fig. VI-4). Nevertheless, beta-glucosidase activity of the Drying columns was significantly lower than the Reference by 17% and 21% in the medium and deep layers respectively. Copper alone had still significant negative effects on beta-glucosidase, leucine aminopeptidase (for all depths) and phosphatase (only for medium and deep layers) (Fig. VI-4). Microbial responses to the Drying+Copper treatment showed similar results as Day 32. However, an increase of the phosphatase activity in surface for Drying+Copper treatment was observed while the two stressors had no significant effect individually compared to Reference (Fig. VI-4).



For all conditions and depths, respiration on Day 61 is more than 10 times higher compared to previous sampling times while on the contrary the values were too low for denitrification to be interpretable (Fig. VI-5). Similarly as for Day 34, no significant differences between treatments were found for respiration on Day 61 (except an increase by 37% in the medium layer for Drying+Copper compared to the Reference treatment) (Fig. VI-5 ; Table VI-A3). On the contrary, CO<sub>2</sub> emissions measurements taken with the Picarro instrument showed a significant decrease by around 2 times after 23 days of rewetting (Day 55) for columns exposed to drying (Drying and Drying+Copper) compared to Reference columns (Fig. VI-7). The same trend is observed after 7 and 18 days of rewetting although the results are not significant (Fig. VI-A4).

### 3.3.5. Leaf litter degradation

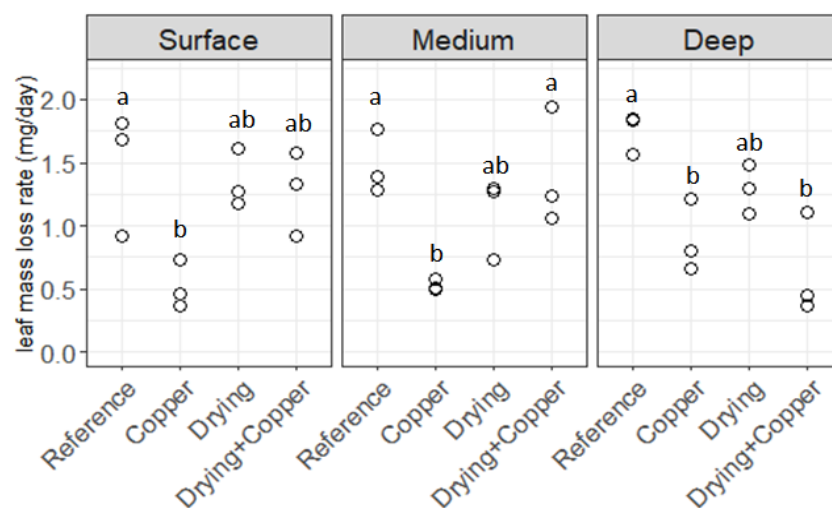


Figure VI-8: leaf mass loss rate ( $\text{mg}\cdot\text{day}^{-1}$ ) for each treatment during the all experiment time in the Surface, Medium and Deep layers. Each point corresponds to one column replicate. Different letters indicate significant different results between treatments (one-way ANOVA,  $p < 0.05$ ).

In Copper treatment, the leaf litter decomposition decreased at all depths compared to the Reference treatment (Fig. VI-8). In contrast, no significant differences between Drying+Copper and Reference treatments were observed except for the deep layer. Unlike Copper, Drying treatment had no significant effect on the leaf mass loss rate although a decrease is observed in the medium and deep layers.

## 4. Discussion

### 4.1. Results synthesis

The objective of this study was to test sediment copper contamination effects on the resistance and resilience of microbial functions after drying. Our hypotheses were built on the previously observed negative effects of copper and drying on microbial functions. In our experiment, the copper-contaminated sediment altered microbial functions at all depths during the whole experimentation period. In contrast, the drying period induced negative effects on microbial functions that were only significant at the surface layer. However, these negative effects on microbial functions were attenuated during the rewetting. We hypothesized an addition of the negative effects of drying and copper contamination in the surface layer that would be less intense in depth due to residual humidity. The results showed that the two stressors effects did not add up in the surface or deepest layers because one of the two stressors drives the microbial responses (drying for denitrification and copper for exoenzymatic activities) masking the other stressor effects. The residual humidity in the sediments could have reduced the drying effects in those layers and only the copper effects were observed except for denitrification which was more impacted by drying. The results obtained after rewetting confirm the second hypothesis, which was a decreased resilience of microbial functions in presence of copper. Therefore, the effects of sediments chemical contamination on aquatic ecosystems should be taken into account when studying the climate change consequences.

### 4.2. Negative copper effects on microbial functions persist over time

During the experiment, copper contamination in sediment ( $70 \text{ mg.kg}^{-1}$ ) globally had a negative effect on all microbial activities as previously shown for sediment microbial communities after 21 days of a similar copper exposure at  $43.6 \pm 2.6 \text{ mg Cu.kg}^{-1} \text{ dw}$  (Mahamoud Ahmed et al., 2018). The copper negative effects on exoenzymatic activities persisted at all depths during the 61 days of experiment which is 3 times longer than shown by Mahamoud Ahmed et al., (2018). In our experiment, the persistence of copper effects can be explained by the dissolved and sediment copper concentrations which remain high during the 61 days. Although copper appeared to have durable impact on exoenzymatic activities,

resilience of phosphatase activity (but not beta-glucosidase or leucine aminopeptidase) in surface layer was observed for microbial communities exposed to copper as demonstrated in Mahamoud Ahmed et al., (2018) study. The phosphatase activity resilience suggests a greater phosphate need for copper-exposed microbial communities because phosphate plays a central role in energy storage *via* ATP or even nucleic acid (DNA, RNA) production. This copper inhibition of microbial exoenzymatic activities (phosphatase, beta-glucosidase, leucine aminopeptidase) led to a decrease in leaf litter degradation related to copper exposure was observed during our experiment. Indeed, the exoenzymes are produced by sediment microbial communities to hydrolyze macromolecule from organic matter such as leaf litter (Sutcliffe et al., 2019). This inhibition of litter decomposition by copper have also been previously observed in channels with contaminated water at  $75 \mu\text{g Cu.L}^{-1}$  (Roussel et al., 2008). Also, leaf litter degradation was reduced by 40% in 17 streams near vineyards (Germany) with a positive correlation with copper concentrations in sediments ( $[\text{Cu}]_{\text{median}} = 120 \text{ mg.kg}^{-1}$ ) (Fernandez et al., 2015).

The absence of exoenzymatic activities resilience and the effects on leaf litter degradation due to copper exposure in our experiment is a worrying result since the copper concentrations tested ( $[\text{Cu}]_{\text{mean}} = 83.3 \pm 14.4 \text{ mg.kg}^{-1}$ ) are not so far from the mean concentration found in French river sediments for example ( $[\text{Cu}]_{\text{mean}} = 48.5 \text{ mg.kg}^{-1}$ ,  $n=11\ 072$ ) (Mancioppi et al. 2010). Similar to other studies, copper also had a negative effect on denitrification at the beginning of the experiment but a rapid resilience between Day 4 and 32 was observed (Mahamoud Ahmed et al., 2018). The copper effects on potential respiration were also transient by Day 32 of the experiment. Resilience may be due to structural adaptations by sensitive species elimination and tolerant species selection (Mahamoud Ahmed et al., 2020) or functional adaptations such as increasing membrane efflux systems (Besaury et al., 2016). These adaptations have an energetic cost that may explain transient effects on respiration (Azarbad et al., 2016). Microbial functions resilience is therefore dependent on the measured activity which highlights the importance of studying multiple markers to assess the effectiveness of a stream restoration project.

#### 4.3. Drying alters microbial functions on the sediment surface that quickly disappeared after rewetting

In the surface layer, negative effects of drying were significant on denitrification as already observed in other studies (Pinto et al., 2021). Denitrifying communities are facultative anaerobic so when oxygen is available, they prefer aerobic respiration which is more energetically efficient (Chen and Strous, 2013). Drying classically led to oxygen input possibly inhibiting denitrification (Pinto et al., 2021). Despite this hypothetical oxygen increase in the dried columns, respiration was decreased during drying (Paranaíba et al., 2020) probably due to a decrease in microbial abundance (Schreckinger et al., 2021) or to the adaptive cost necessary to resist drying. Drying also had negative effects in the surface layer on exoenzymatic activities as previously shown in a mesocosm experiment after 30 days of sediment drying (Schreckinger et al., 2021). Consistent with our hypothesis, the effects of drying were less important in deeper layers due to higher humidity than in the surface layer as previously shown by Coulson et al. (2021). The negative drying effects on microbial functions depend mainly on the residual sediments moisture content. A lower water content in the sediments of the Mulargia River - Italy (0.42 %) compared to the Breitenbach River - Germany (16.1 %) resulted, for example, in a decreased resilience of microbial functions (bacterial production, exoenzymatic activity) after rewetting sediments collected during a drying period (Marxsen et al., 2010). In our experiment, the average surface moisture content ( $3.39 \pm 1.73$  %) was similar to the Mulargia River, showing that our observations in hyporheic mesocosms could be coherent with the natural environment.

On the first day of rewetting, the resilience of microbial functions of communities exposed to drying alone was observed in the surface layer. Other authors do not find a resilience of beta-glucosidase, phosphatase, leucine aminopeptidase activities after 4 days of rewetting of sediment cores taken from a dried river (Breitenbach - Germany) (Marxsen et al., 2010; Pohlen et al., 2013). Contrary to our observations, these authors described a decrease in phosphatase activity after rewetting probably due to phosphate solubilization that no longer makes phosphatase production necessary (Pohlen et al., 2013). Organic matter such as humic acid is a driver of phosphatase activity (Freitas et al., 2014). This phosphate solubilization is unlikely in our experiment because organic matter content in sediment or dissolved organic carbon were low (on average  $1.05 \pm 0.16$  % for organic matter content in sediments and  $6 \pm 7.4$  mg.L<sup>-1</sup>

for dissolved organic carbon, all treatments, depths and times combined). Our different results compared to the literature can be explained by the sediments characteristics (grain size, quality and quantity of organic matter content), influencing the microbial functions resilience after rewetting. Respiration resilience after rewetting is for example driven by sediment grain size, organic matter content, and C/N ratio (von Schiller et al., 2019). To go further and identify sediment characteristics influencing microbial community responses to drying, studies on different sediment types are needed. After rewetting, a CO<sub>2</sub> emission pulse is usually observed (Fromin et al., 2010; von Schiller et al., 2019; Paranaíba et al., 2020) but this was not the case in our experiment. On the contrary, a decrease in CO<sub>2</sub> emissions in dried columns compared to the Reference was measured after 28 days of rewetting. However, an increase in dissolved oxygen concentration was not observed at all columns depths (only the deep layer) after rewetting, possibly explaining why aerobic processes such as respiration were not favoured in medium and surface layers. This decrease in CO<sub>2</sub> emissions is also probably a result of the drying negative effects over time. Although respiration was not boosted, nitrification has probably increased given the high nitrate concentration measured after rewetting which has also been observed in other studies (Pinto et al., 2021). In a long term perspective, microbial functions destabilization caused by drying could have consequences on ecosystem services provided by sediment microbial communities such as mineralization of organic matter (Fischer et al., 2005) or contaminants degradation (Gandy et al., 2007).

Different results were obtained for CO<sub>2</sub> emissions between those measured in gas chromatography and these with the Picarro instrument. On the one hand, the *in vitro* respiration measured in gas chromatography did not seem to be affected by drying after rewetting since no difference between treatments was found on the re-suspended and agitated sediment. On the other hand, CO<sub>2</sub> emission measured with the Picarro at the column scale was reduced indicating that physico-chemical constraints limited the *in vitro* respiration. Preferential water pathways in the column or low oxygenation may be the cause of these differences. Thus, the microbial communities had the *in vitro* for respiration but could not achieve it in the columns. This result highlights the difference between *in situ* integrative measurements and *in vitro* laboratory measurements and the value of coupling these two techniques (Borton et al., 2018).

#### 4.4. The microbial responses of a copper contaminated sediment to drying are mostly driven by one stressor but also show antagonistic interactions

**The microbial response of copper-contaminated sediment to drying period is not a simple addition of the individual responses.** During drying, one of the two stressors drives the microbial responses for most of the parameters tested. The effects of drying were significant on denitrification while the copper effects were limited in intensity on this parameter. On the contrary, copper seemed to have more inhibitory effect on exoenzymatic responses than drying. Thus, denitrification and exoenzymatic activities were impacted in opposite ways by drying and copper. It is not unusual for biological parameters to respond differently to the same stressor. For example, the pigment content and growth responses of *Lemna minor* to herbicide contamination were opposite (Cedergreen et al., 2007). These results demonstrate the complexity in finding good indicators of anthropogenic disturbance in streams and highlight the importance of considering multiple parameters to assess the stressors effects in a stream management and restoration context. In the case of copper contamination, for example, denitrification has already been shown to be a poorly sensitive indicator (vanBeelen and Doelman, 1997) in contrast to carbon use (Mahamoud Ahmed et al., 2018; Sutcliffe et al., 2019), which coincides with our observations.

**The dominance of copper or drying on microbial responses hide possible synergistic or antagonistic interactions between stressors.** The term "antagonism" is commonly used when the combined effects of several stressors are less than the sum of the effects caused by the two stressors individually (Folt et al., 1999). However, this definition can also correspond to the dominance of one of the two stressors. It is difficult to distinguish a dominance model from an antagonistic interaction model (Côté et al., 2016) as in our case for denitrification or exoenzymatic activities during drying in the surface layer. It is also difficult to distinguish between a simple addition or interaction when the sum of the effects of the two stressors exceeds 100% inhibition of the Reference response (Folt et al., 1999). For example, during drying, the summed effects of the two stressors for phosphatase in the surface layer give an inhibition percentage of the Reference above 100% and the two stressors tested individually also give values close to 100%, so it is impossible to conclude whether there is an interaction or not. To go further, gradients of copper concentrations and duration/intensity of drying could be performed to detect possible interactions. By testing different concentrations of

toxicant and nutrients, other author (Piccardi et al., 2019) have shown that with a high concentration of toxicant and a low level of resources, positive interactions took place between 4 species of microorganisms (both species benefited from the degradation of the toxins) while on the contrary when the resource concentration increased and the toxicity decreased, the interactions became negative. Interactions can be synergistic or antagonistic depending on the intensity of the stressors tested hence the importance of testing intensity gradients.

**Although most of the responses were dominated by a single stressor in the surface layer, interactions were observed at other depths.** Antagonistic effects were demonstrated in the medium layer for exoenzymatic activities. At this depth, the stressors effects may have been lower than in the other depths: the drying effects were less important in the medium than in surface layer, and the dissolved (bioavailable) copper concentration in the residual water may also have been lower of the medium layer than in deep layer. The theory of higher dissolved copper concentration in residual water of deeper layers seems to be supported by the lower rate of leaf litter degradation in deep layer than at the other two depths when stressors are combined. Based on the exoenzymatic activities results, the medium layer preserved from the most intense effects of the two stressors could constitute a refuge zone from which microbial communities could recolonize the impacted areas after drying (Febria et al., 2012; Romaní et al., 2013). On the one hand, these results highlight the need to consider the vertical aspect of sediments in risk assessment and interaction detection (Peralta-Maraver et al., 2018). On the other hand, these results also call for taking into account antagonistic interactions. According to Côté et al., (2016), out of 616 selected publications, 69% mention the term synergy, 35% additive effects and only 15% the term antagonistic. Indeed, synergistic processes probably attract more interest since this interaction type results in an amplification of the stressors effects compared to the sum of the individual effects which can therefore have adverse consequences on the ecosystems. But the study of antagonistic relationships are also necessary in order to prioritize river management and restoration actions.

#### **4.5. Copper decreases microbial functions resilience after rewetting**

All microbial functions impacted by drying recovered to the same level as the reference on the first day of rewetting. This recovery was not observed when drying was combined with

copper for exoenzymatic activities and denitrification. Although, rewetting did not result in high copper desorption (dissolved copper having a higher toxic potential on organisms) contrary to what could be observed for trace metal elements in other studies (Liu et al., 2020; Paranaíba et al., 2020). Thus, copper appears to decrease the resilience of microbial functions after rewetting. Other studies with other molecules or on soil microbial communities have shown similar results. For example, copper inhibited exoenzymatic activities (beta-glucosidase, phosphatase, leucine aminopeptidase) in soil exposed to copper chloride (CuO) at concentrations of 800 and 3200 mg Cu.kg<sup>-1</sup> of soil and undergoing 10 cycles of drying-rewetting (Li et al., 2016). An impact of Triclosan (100 µg.L<sup>-1</sup>) on the resilience of photosynthetic efficiency, bacterial and diatom viability, phosphate uptake of periphytic microbial communities was shown after 1 week of decreased water flow and two days of drying (Proia et al., 2013). Nevertheless, few studies have focused on this effect in the sediment, which remains an understudied compartment. However, climate change will lead to more frequent and intense drought episodes in river (Lake, 2003). In a long term perspective, copper contamination could destabilize microbial communities in sediments exposed to repeated drying and compromise its resilience after drying. These microbial communities contribute strongly to the mineralization of organic matter (Krause et al., 2017) and the degradation of pollutants (Gandy et al., 2007) which allows sediment purification. Destabilization of this river purification system could impact the groundwater quality that supplies drinking water. The increase in the drying intensity due to climate change will be difficult to control, but the river copper contamination can be more easily avoided at the local level by management measures.

## 5. Conclusion

During drying, the microbial responses to the two combined stressors are not just an addition of the individual effects. In the surface layer, the microbial responses were driven by single stressor dominance while interactions were observed in deeper layers. After rewetting, copper inhibited microbial functions resilience that would occur without copper contamination. In a long term perspective, copper could destabilize the microbial purification system of rivers that will be exposed to increasingly intense drought in the future due to global change. Copper toxicity has been known since antiquity, but the molecular mechanisms are



not yet clearly understood. Given the increasing popularity of organic farming, which authorizes the use of copper as a pesticide in France for example, more studies should be carried out on the mechanisms and impact of this metal in aquatic ecosystems, particularly when combined with physical stress, such as drying.

## 6. Supplementary material

Table VI-A1: proportion of clay-silt (<50  $\mu\text{m}$ ), fine (50-200  $\mu\text{m}$ ), medium (200-500  $\mu\text{m}$ ) and coarse sand (>500  $\mu\text{m}$ ) in sediment for each treatment (Reference, Copper, Drying, Drying+Copper) and each depth (Surface, Medium and Deep) at each time of the experiment (Day 4, 32, 34, 61). Letters « a,b,c » indicate significant differences between treatments for each depth and sampling time (One-way ANOVA, Treatment,  $p < 0.05$  except for Day 4 : Student t-test,  $p < 0.05$ ) and «  $\alpha, \beta$  » indicate significant differences between depths for each treatment and sampling time (RM-ANOVA, Depth,  $p < 0.05$ ).

	Time	Depth	Reference	Copper	Drying	Drying+Copper
Clay silt (%)	Day 4	Surface (-2.5 cm)	4.2 ± 0.4	3.2 ± 0.1 $\alpha$		
		Medium (-15 cm)	2.1 ± 0.2	2.2 ± 0.1 $\alpha$		
		Deep (-27.5 cm)	1.8 ± 0.2	1.9 ± 0.1 $\beta$		
	Day 32	Surface (-2.5 cm)	4.2 ± 0.5 $\alpha$	3.8 ± 0.7 $\alpha\beta$	2.8 ± 0.4	2.7 ± 0.2
		Medium (-15 cm)	1.6 ± 0.2 a $\beta$	2.3 ± 0.2 b $\alpha$	2.4 ± 0.1 b	2.3 ± 0.1 b
		Deep (-27.5 cm)	1.9 ± 0.2 $\alpha\beta$	1.9 ± 0.2 $\beta$	2.0 ± 0.3	1.9 ± 0.2
	Day 34	Surface (-2.5 cm)	2.6 ± 0.2 $\alpha$	3.4 ± 0.3	3.9 ± 0.5	3.4 ± 0.2 $\alpha$
		Medium (-15 cm)	1.8 ± 0.2 $\alpha\beta$	2.2 ± 0.2	2.4 ± 0.1	1.9 ± 0.0 $\beta$
		Deep (-27.5 cm)	1.9 ± 0.1 $\beta$	2.0 ± 0.0	1.9 ± 0.2	1.5 ± 0.4 $\alpha\beta$
	Day 61	Surface (-2.5 cm)	2.5 ± 0.5	3.5 ± 0.4	3.8 ± 0.2 $\alpha$	3.4 ± 0.2 $\alpha$
		Medium (-15 cm)	NA ± NA	NA ± NA	NA ± NA	NA ± NA
		Deep (-27.5 cm)	2.4 ± 0.2	2.0 ± 0.2	1.8 ± 0.3 $\beta$	1.8 ± 0.1 $\beta$
Fine sand (%)	Day 4	Surface (-2.5 cm)	13.9 ± 0.2	14.5 ± 0.3		
		Medium (-15 cm)	13.6 ± 0.3	13.9 ± 0.3		
		Deep (-27.5 cm)	14.0 ± 0.3	13.7 ± 0.4		
	Day 32	Surface (-2.5 cm)	14.0 ± 0.0	15.0 ± 0.5	14.3 ± 0.2	14.2 ± 0.0
		Medium (-15 cm)	14.2 ± 0.1	13.8 ± 0.2	14.2 ± 0.1	14.0 ± 0.3
		Deep (-27.5 cm)	14.1 ± 0.2	14.3 ± 0.4	14.2 ± 0.1	14.3 ± 0.3
	Day 34	Surface (-2.5 cm)	14.4 ± 0.3	14.6 ± 0.3	14.9 ± 0.1	14.7 ± 0.2
		Medium (-15 cm)	14.4 ± 0.2	14.6 ± 0.1	14.4 ± 0.3	14.5 ± 0.1
		Deep (-27.5 cm)	14.9 ± 0.2	14.5 ± 0.0	14.4 ± 0.2	14.5 ± 0.2
	Day 61	Surface (-2.5 cm)	15.0 ± 0.8	15.2 ± 0.2	14.6 ± 0.0	14.9 ± 0.2
		Medium (-15 cm)	NA ± NA	NA ± NA	NA ± NA	NA ± NA
		Deep (-27.5 cm)	15.1 ± 0.4	14.1 ± 0.3	14.6 ± 0.1	14.6 ± 0.1
Medium sand (%)	Day 4	Surface (-2.5 cm)	70.6 ± 0.3	71.4 ± 0.3		
		Medium (-15 cm)	72.4 ± 0.2	72.3 ± 0.6		
		Deep (-27.5 cm)	72.2 ± 0.2	72.5 ± 0.5		
	Day 32	Surface (-2.5 cm)	70.8 ± 0.2 ab	70.3 ± 0.4 a	71.9 ± 0.3 b	71.4 ± 0.2 ab
		Medium (-15 cm)	72.2 ± 0.4	71.8 ± 0.4	71.7 ± 0.1	71.7 ± 0.6
		Deep (-27.5 cm)	72.0 ± 0.2	72.2 ± 0.2	72.4 ± 0.1	71.7 ± 0.4
	Day 34	Surface (-2.5 cm)	71.7 ± 0.1 a	70.7 ± 0.1 b	70.4 ± 0.1 b	70.8 ± 0.3 b
		Medium (-15 cm)	71.9 ± 0.2	71.8 ± 0.3	71.8 ± 0.1	71.9 ± 0.3
		Deep (-27.5 cm)	71.8 ± 0.2 a	72.0 ± 0.1 ab	72.7 ± 0.2 b	72.5 ± 0.1 b
	Day 61	Surface (-2.5 cm)	70.9 ± 0.4	70.5 ± 0.3	70.4 ± 0.1	70.6 ± 0.3
		Medium (-15 cm)	NA ± NA	NA ± NA	NA ± NA	NA ± NA
		Deep (-27.5 cm)	71.1 ± 0.5	72.1 ± 0.2	71.7 ± 0.3	72.0 ± 0.3
Coarse sand (%)	Day 4	Surface (-2.5 cm)	11.4 ± 0.4	11.0 ± 0.2		
		Medium (-15 cm)	11.9 ± 0.5	11.6 ± 0.2		
		Deep (-27.5 cm)	12.0 ± 0.4	11.9 ± 0.1		
	Day 32	Surface (-2.5 cm)	11.0 ± 0.4	10.9 ± 0.1	11.0 ± 0.2	11.6 ± 0.3
		Medium (-15 cm)	12.0 ± 0.4	12.1 ± 0.5	11.7 ± 0.1	11.9 ± 0.2
		Deep (-27.5 cm)	12.0 ± 0.3	11.6 ± 0.6	11.3 ± 0.4	12.0 ± 0.4
	Day 34	Surface (-2.5 cm)	11.3 ± 0.4	11.3 ± 0.1	10.8 ± 0.3	11.1 ± 0.2
		Medium (-15 cm)	11.9 ± 0.3	11.4 ± 0.1	11.4 ± 0.3	11.7 ± 0.2
		Deep (-27.5 cm)	11.5 ± 0.1	11.5 ± 0.1	11.0 ± 0.1	11.4 ± 0.4
	Day 61	Surface (-2.5 cm)	11.6 ± 0.2 a	10.8 ± 0.2 b	11.2 ± 0.1 ab	11.0 ± 0.2 ab
		Medium (-15 cm)	NA ± NA	NA ± NA	NA ± NA	NA ± NA
		Deep (-27.5 cm)	11.4 ± 0.2	11.9 ± 0.3	12.0 ± 0.2	11.7 ± 0.3

Table VI-A2: physico-chemical parameters in sediment (organic matter, humidity and copper) and water samples (dissolved organic carbon, nitrate, dissolved copper) for each treatment (Reference, Copper, Drying, Drying+Copper) and each depth (Surface, Medium and Deep) at each sampling times.

Letters « a,b,c » indicate significant differences between treatments for each depth and sampling times (One-way ANOVA, Treatment,  $p < 0.05$  except for Day 4 : Student t-test,  $p < 0.05$ ) and «  $\alpha, \beta, \gamma$  » indicate significant differences between depths for each treatment and sampling time (RM-ANOVA, Depth,  $p < 0.05$ )

	Time	Depth	Reference	Copper	Drying	Drying+Copper
Organic matter (%)	Day 4	Surface (-2.5 cm)	1.4 ± 0.1	1.3 ± 0.0 $\alpha$		
		Medium (-15 cm)	1.1 ± 0.1	1.1 ± 0.1 $\alpha\beta$		
		Deep (-27.5 cm)	0.9 ± 0.0	1.1 ± 0.0 $\beta$		
	Day 32	Surface (-2.5 cm)	1.2 ± 0.1	1.2 ± 0.1	1.0 ± 0.1	1.1 ± 0.1
		Medium (-15 cm)	0.9 ± 0.1	1.0 ± 0.0	1.0 ± 0.1	1.0 ± 0.0
		Deep (-27.5 cm)	0.9 ± 0.0	0.9 ± 0.1	0.9 ± 0.1	0.9 ± 0.1
	Day 34	Surface (-2.5 cm)	1.3 ± 0.3	1.2 ± 0.1 $\alpha$	1.1 ± 0.0	1.2 ± 0.1
		Medium (-15 cm)	1.0 ± 0.1	1.1 ± 0.0 $\beta$	1.0 ± 0.0	1.0 ± 0.0
		Deep (-27.5 cm)	0.9 ± 0.1	1.0 ± 0.1 $\alpha\beta$	1.0 ± 0.1	0.9 ± 0.1
	Day 61	Surface (-2.5 cm)	1.1 ± 0.0	1.2 ± 0.1	1.1 ± 0.0 $\alpha$	1.1 ± 0.0
		Medium (-15 cm)	1.0 ± 0.1	1.0 ± 0.0	0.9 ± 0.0 $\beta$	1.1 ± 0.0
		Deep (-27.5 cm)	1.0 ± 0.0	1.0 ± 0.1	1.0 ± 0.0 $\alpha\beta$	0.9 ± 0.1
Dissolved organic carbon (mg.L <sup>-1</sup> )	Day 33	Surface (-2.5 cm)	14.1 ± 8.8	6.0 ± 0.5	18.1 ± 12.5	5.8 ± 0.4
		Medium (-15 cm)	5.2 ± 0.9	7.2 ± 1.8	5.7 ± 0.3	5.6 ± 0.7
		Deep (-27.5 cm)	6.3 ± 0.6	16.5 ± 10.3	7.1 ± 1.0	7.6 ± 0.5
	Day 56	Surface (-2.5 cm)	1.5 ± 0.1	8.6 ± 6.9	1.2 ± 0.5	1.1 ± 0.1 $\alpha$
		Medium (-15 cm)	2.7 ± 0.4	5.1 ± 1.4	1.2 ± 0.2	2.2 ± 0.2 $\beta$
		Deep (-27.5 cm)	3.5 ± 0.9	6.7 ± 1.6	1.6 ± 0.3	2.9 ± 0.2 $\alpha\beta$
Nitrate (mg.L <sup>-1</sup> )	Day 33	Surface (-2.5 cm)	1.7 ± 0.6	1.8 ± 0.2 $\alpha$	7.0 ± 2.4	12.2 ± 4.6
		Medium (-15 cm)	0.5 ± 0.0 a	0.7 ± 0.2 a $\alpha\beta$	28.8 ± 9.5 b	26.8 ± 13.0 b
		Deep (-27.5 cm)	0.7 ± 0.2 a	0.5 ± 0.0 a $\beta$	28.4 ± 8.2 b	37.9 ± 12.8 b
	Day 56	Surface (-2.5 cm)	2.6 ± 0.2	1.5 ± 0.5	2.9 ± 0.1	2.0 ± 0.1
		Medium (-15 cm)	2.2 ± 0.6 a	0.8 ± 0.3 b	2.9 ± 0.1 a	2.0 ± 0.1 ab
		Deep (-27.5 cm)	1.4 ± 0.9	0.5 ± 0.0	2.4 ± 0.2	2.0 ± 0.1
Humidity (%)	Day 4	Surface (-2.5 cm)	15.2 ± 1.0	13.5 ± 0.4 $\alpha$		
		Medium (-15 cm)	16.6 ± 0.6	18.3 ± 0.3 $\beta$		
		Deep (-27.5 cm)	19.0 ± 0.1	19.3 ± 0.4 $\gamma$		
	Day 32	Surface (-2.5 cm)	14.2 ± 0.9 a	12.0 ± 0.8 a $\alpha$	2.9 ± 0.5 b $\alpha$	3.9 ± 1.4 b $\alpha$
		Medium (-15 cm)	17.9 ± 0.4 a	16.0 ± 1.8 ac $\alpha\beta$	8.6 ± 1.2 b $\alpha\beta$	9.8 ± 2.3 bc $\alpha\beta$
		Deep (-27.5 cm)	18.6 ± 0.2	19.2 ± 0.4 $\beta$	17.4 ± 0.2 $\beta$	17.6 ± 0.9 $\beta$
	Day 34	Surface (-2.5 cm)	13.8 ± 0.5 $\alpha$	13.5 ± 0.5 $\alpha$	11.2 ± 0.4 $\alpha$	11.1 ± 0.2 $\alpha$
		Medium (-15 cm)	18.1 ± 0.1 $\alpha$	19.0 ± 0.2 $\beta$	15.0 ± 0.2 $\beta$	15.1 ± 0.1 $\beta$
		Deep (-27.5 cm)	19.4 ± 0.1 $\beta$	19.5 ± 0.3 $\gamma$	18.8 ± 0.2 $\gamma$	18.5 ± 0.1 $\gamma$
	Day 61	Surface (-2.5 cm)	15.4 ± 1.2	14.5 ± 0.2 $\alpha$	13.6 ± 0.3 $\alpha$	13.3 ± 0.4 $\alpha$
		Medium (-15 cm)	17.7 ± 0.1	18.6 ± 0.7 $\beta$	18.3 ± 0.3 $\beta$	18.7 ± 0.1 $\beta$
		Deep (-27.5 cm)	18.3 ± 0.4	19.4 ± 0.3 $\gamma$	19.0 ± 0.1 $\gamma$	19.3 ± 0.2 $\gamma$
Dissolved copper (µg.L <sup>-1</sup> )	Day 3	Surface (-2.5 cm)	1.0 ± 0.1 a	32.2 ± 1.1 b $\alpha$		
		Medium (-15 cm)	0.8 ± 0.1 a	40.1 ± 1.1 b $\alpha\beta$		
		Deep (-27.5 cm)	0.7 ± 0.1 a	48.5 ± 2.2 b $\beta$		
	Day 33	Surface (-2.5 cm)	0.7 ± 0.1 a	17.0 ± 1.2 b	1.5 ± 0.1 a	30.0 ± 3.5 c $\alpha$
		Medium (-15 cm)	0.5 ± 0.0 a	31.4 ± 2.1 b	1.6 ± 0.2 a	36.0 ± 2.7 b $\alpha\beta$
		Deep (-27.5 cm)	0.8 ± 0.2 a	55.4 ± 6.0 b	1.9 ± 0.3 a	61.3 ± 4.8 b $\beta$
Copper in sediment (mg Cu.kg <sup>-1</sup> )	Day 4	Surface (-2.5 cm)	2.3 ± 0.1 a	80.5 ± 0.7 b		
		Medium (-15 cm)	2.0 ± 0.1 a	65.9 ± 3.6 b		
		Deep (-27.5 cm)	1.9 ± 0.1 a	67.2 ± 3.0 b		
	Day 32	Surface (-2.5 cm)		110.7 ± 9.8 $\alpha$		90.8 ± 3.8 $\alpha\beta$
		Medium (-15 cm)		81.2 ± 6.5 $\beta$		82.4 ± 0.7 $\alpha$
		Deep (-27.5 cm)		74.9 ± 5.2 $\alpha\beta$		76.4 ± 0.1 $\beta$
	Day 34	Surface (-2.5 cm)		99.3 ± 4.2		108.0 ± 4.6
		Medium (-15 cm)		81.4 ± 3.5		77.5 ± 1.2
		Deep (-27.5 cm)		77.5 ± 0.5		75.3 ± 0.9
Oxygen (mg.L <sup>-1</sup> )	Day 4	Surface (-2.5 cm)	5.1 ± 1.4	7.3 ± 0.5		
		Medium (-15 cm)	2.4 ± 0.7	4.7 ± 1.0		
		Deep (-27.5 cm)	1.5 ± 0.5	2.1 ± 1.4		
	Day 33	Surface (-2.5 cm)	6.9 ± 0.4 ab $\alpha$	8.5 ± 0.1 a $\alpha$	7.7 ± 1.0 ab $\alpha$	5.9 ± 0.3 b
		Medium (-15 cm)	4.8 ± 0.4 ab $\beta$	5.5 ± 0.7 ab $\alpha$	7.9 ± 0.9 a $\alpha$	4.5 ± 0.8 b
		Deep (-27.5 cm)	0.5 ± 0.2 a $\gamma$	0.5 ± 0.2 a $\beta$	4.5 ± 0.7 b $\beta$	4.9 ± 0.6 b
	Day 57	Surface (-2.5 cm)	3.2 ± 1.4	6.1 ± 1.5	8.5 ± 0.4 $\alpha$	7.0 ± 1.3
		Medium (-15 cm)	2.0 ± 0.8	4.6 ± 2.2	3.2 ± 0.6 $\beta$	3.3 ± 0.2
		Deep (-27.5 cm)	1.4 ± 0.4	2.1 ± 0.8	1.4 ± 0.8 $\beta$	2.8 ± 0.5

*Table VI-A3: microbial parameters (beta-glucosidase, phosphatase, leucine aminopeptidase, respiration, denitrification) for each treatment (Reference, Copper, Drying, Drying+Copper) and each depth (Surface, Medium and Deep) at each sampling times (Day 4, 32, 34, 61). Letters « a,b,c » indicate significant differences between treatments for each depth and sampling time (One-way ANOVA, Treatment,  $p < 0.05$  except for Day 4 : Student t-test,  $p < 0.05$ ) and «  $\alpha, \beta, \gamma$  » indicate significant differences between depths for each treatment and sampling time (RM-ANOVA, Depth,  $p < 0.05$ ).*

	Time	Depth	Reference	Copper	Drying	Drying+Copper
Beta-glucosidase (nmol substrate.h <sup>-1</sup> .g <sup>-1</sup> )	Day 4	Surface (-2.5 cm)	26.0 ± 2.7 a	5.8 ± 2.0 b		
		Medium (-15 cm)	13.7 ± 1.4 a	0.1 ± 0.1 b		
		Deep (-27.5 cm)	13.7 ± 1.1 a	0.0 ± 0.0 b		
	Day 32	Surface (-2.5 cm)	28.6 ± 1.1 a $\alpha$	11.9 ± 2.5 b	18.0 ± 2.0 b	11.2 ± 1.1 b $\alpha\beta$
		Medium (-15 cm)	17.8 ± 1.4 a $\alpha\beta$	1.1 ± 0.5 b	15.1 ± 0.5 a	7.4 ± 1.0 c $\alpha$
		Deep (-27.5 cm)	16.2 ± 0.5 a $\beta$	0.6 ± 0.2 b	14.5 ± 0.5 a	2.7 ± 1.0 b $\beta$
	Day 34	Surface (-2.5 cm)	18.9 ± 1.4 a	10.5 ± 1.0 b $\alpha$	22.5 ± 0.5 a $\alpha$	10.1 ± 0.8 b
		Medium (-15 cm)	14.7 ± 0.1 a	1.1 ± 0.5 b $\beta$	15.9 ± 0.2 a $\beta$	6.1 ± 1.1 c
		Deep (-27.5 cm)	15.1 ± 0.5 a	0.3 ± 0.2 b $\beta$	16.5 ± 0.8 a $\alpha\beta$	3.1 ± 0.3 c
	Day 61	Surface (-2.5 cm)	33.0 ± 2.1 a	15.4 ± 2.1 b $\alpha$	27.7 ± 1.1 ac $\alpha$	21.6 ± 0.9 bc $\alpha$
		Medium (-15 cm)	18.6 ± 0.7 a	3.5 ± 0.7 b $\beta$	15.5 ± 0.3 c $\beta$	7.2 ± 0.6 d $\beta$
		Deep (-27.5 cm)	17.6 ± 0.5 a	0.8 ± 0.6 b $\gamma$	13.9 ± 0.7 c $\beta$	4.0 ± 0.8 d $\beta$
Phosphatase (nmol substrate.h <sup>-1</sup> .g <sup>-1</sup> )	Day 4	Surface (-2.5 cm)	103.6 ± 4.3 a $\alpha$	51.2 ± 2.0 b $\alpha$		
		Medium (-15 cm)	72.5 ± 1.3 a $\alpha\beta$	29.5 ± 1.6 b $\beta$		
		Deep (-27.5 cm)	74.3 ± 4.0 a $\beta$	24.8 ± 1.3 b $\gamma$		
	Day 32	Surface (-2.5 cm)	240.8 ± 36.3 a	41.0 ± 3.5 b $\alpha$	57.9 ± 1.5 c $\alpha$	31.8 ± 1.5 d $\alpha$
		Medium (-15 cm)	45.5 ± 0.2 a	10.0 ± 0.9 b $\beta$	46.6 ± 1.1 a $\alpha\beta$	22.6 ± 2.8 c $\beta$
		Deep (-27.5 cm)	41.9 ± 0.8 a	10.3 ± 0.8 b $\beta$	42.1 ± 0.4 a $\beta$	14.5 ± 2.9 b $\beta$
	Day 34	Surface (-2.5 cm)	91.6 ± 22.4 a	47.8 ± 2.4 b $\alpha$	66.8 ± 1.8 ab $\alpha$	30.4 ± 2.4 c $\alpha$
		Medium (-15 cm)	42.1 ± 0.7 a	13.9 ± 1.0 b $\beta$	46.1 ± 1.5 a $\alpha$	19.9 ± 1.3 c $\alpha\beta$
		Deep (-27.5 cm)	40.9 ± 0.6 a	11.7 ± 0.2 b $\beta$	42.8 ± 1.3 a $\beta$	11.7 ± 0.7 b $\beta$
	Day 61	Surface (-2.5 cm)	62.8 ± 2.7 a $\alpha$	62.2 ± 6.3 a $\alpha$	62.5 ± 6.7 a	86.5 ± 5.5 b $\alpha$
		Medium (-15 cm)	36.5 ± 0.9 a $\beta$	13.1 ± 0.6 b $\beta$	34.9 ± 1.2 a	17.0 ± 2.6 b $\beta$
		Deep (-27.5 cm)	35.0 ± 3.1 a $\alpha\beta$	9.4 ± 0.7 b $\gamma$	34.0 ± 1.8 a	11.7 ± 1.9 b $\beta$
Leucine aminopeptidase (nmol substrate.h <sup>-1</sup> .g <sup>-1</sup> )	Day 4	Surface (-2.5 cm)	104.7 ± 6.0 a	30.2 ± 1.0 b		
		Medium (-15 cm)	73.4 ± 1.4 a	37.9 ± 1.1 b		
		Deep (-27.5 cm)	62.0 ± 3.0 a	36.2 ± 1.8 b		
	Day 32	Surface (-2.5 cm)	131.9 ± 8.8 a $\alpha$	31.4 ± 3.3 b	68.0 ± 2.0 c $\alpha$	25.5 ± 1.9 b
		Medium (-15 cm)	64.7 ± 1.9 a $\alpha\beta$	26.9 ± 1.5 b	73.3 ± 1.5 c $\beta$	33.9 ± 0.8 d
		Deep (-27.5 cm)	61.3 ± 2.2 a $\beta$	24.8 ± 1.8 b	71.4 ± 1.3 a $\alpha\beta$	29.4 ± 3.7 b
	Day 34	Surface (-2.5 cm)	76.3 ± 8.0 a	37.8 ± 3.9 b	93.4 ± 3.8 a	37.2 ± 1.9 b
		Medium (-15 cm)	59.4 ± 1.7 a	27.8 ± 5.5 b	77.6 ± 3.4 c	44.8 ± 0.8 a
		Deep (-27.5 cm)	55.5 ± 1.3 a	27.9 ± 5.5 b	66.4 ± 5.3 a	36.4 ± 2.2 b
	Day 61	Surface (-2.5 cm)	118.4 ± 6.5 a	39.8 ± 5.4 b	109.7 ± 10.1 a	50.8 ± 2.0 b
		Medium (-15 cm)	56.0 ± 3.8 a	28.0 ± 3.4 b	54.3 ± 0.1 a	47.2 ± 0.5 a
		Deep (-27.5 cm)	53.5 ± 5.9 a	24.3 ± 2.9 b	56.7 ± 2.5 a	42.8 ± 3.2 a
Respiration (ng CO <sub>2</sub> .h <sup>-1</sup> .g <sup>-1</sup> )	Day 4	Surface (-2.5 cm)	247.4 ± 21.3	320.5 ± 37.4		
		Medium (-15 cm)	153.2 ± 66.7	149.5 ± 5.7		
		Deep (-27.5 cm)	179.8 ± 10.9	114.8 ± 28.0		
	Day 32	Surface (-2.5 cm)	548.5 ± 61.8 a	276.2 ± 25.7 b	112.9 ± 56.7 b	102.8 ± 10.4 b
		Medium (-15 cm)	248.7 ± 37.5 a	103.0 ± 23.3 b	133.8 ± 25.5 b	146.0 ± 62.8
		Deep (-27.5 cm)	378.6 ± 78.5 a	62.1 ± 31.1 b	246.0 ± 12.1 ab	205.7 ± 94.3 ab
	Day 34	Surface (-2.5 cm)	166.5 ± 16.4	203.6 ± 46.6	146.0 ± 30.8 $\alpha\beta$	233.7 ± 24.6
		Medium (-15 cm)	37.3 ± 37.3	48.5 ± 26.4	114.0 ± 26.5 $\alpha$	103.4 ± 29.5
		Deep (-27.5 cm)	131.9 ± 47.5 a	0.0 ± 0.0 b	189.9 ± 31.8 a $\beta$	176.4 ± 36.7 a
	Day 61	Surface (-2.5 cm)	1988.5 ± 1220.0	4943.6 ± 803.4	5335.0 ± 523.4	5395.5 ± 236.5
		Medium (-15 cm)	3837.2 ± 237.6 a	4724.3 ± 161.5 ab	5318.2 ± 304.0 bc	6099.4 ± 420.4 c
		Deep (-27.5 cm)	3700.0 ± 859.5	4851.7 ± 394.3	5172.1 ± 89.7	5279.5 ± 262.2
Denitrification (ng N <sub>2</sub> O.h <sup>-1</sup> .g <sup>-1</sup> )	Day 4	Surface (-2.5 cm)	130.4 ± 14.5 a	47.9 ± 10.3 b		
		Medium (-15 cm)	77.6 ± 0.7 a	25.1 ± 1.6 b		
		Deep (-27.5 cm)	87.0 ± 5.3 a	31.5 ± 1.3 b		
	Day 32	Surface (-2.5 cm)	577.1 ± 90.3 a	603.7 ± 94.0 a	65.5 ± 8.4 b	11.5 ± 11.5 b
		Medium (-15 cm)	138.0 ± 18.6 a	127.0 ± 19.0 ab	69.4 ± 7.4 bc	37.2 ± 8.2 c
		Deep (-27.5 cm)	124.2 ± 3.7 a	101.4 ± 7.4 a	87.8 ± 14.9 ab	52.6 ± 5.3 b
	Day 34	Surface (-2.5 cm)	261.2 ± 38.9 ab	430.0 ± 87.9 b	125.8 ± 17.7 ac	29.1 ± 15.5 c
		Medium (-15 cm)	123.8 ± 17.8 a	112.3 ± 11.1 a	82.3 ± 9.3 ab	29.8 ± 14.9 b
		Deep (-27.5 cm)	114.5 ± 8.7 a	88.9 ± 13.6 ab	64.2 ± 17.7 ab	39.7 ± 9.1 b

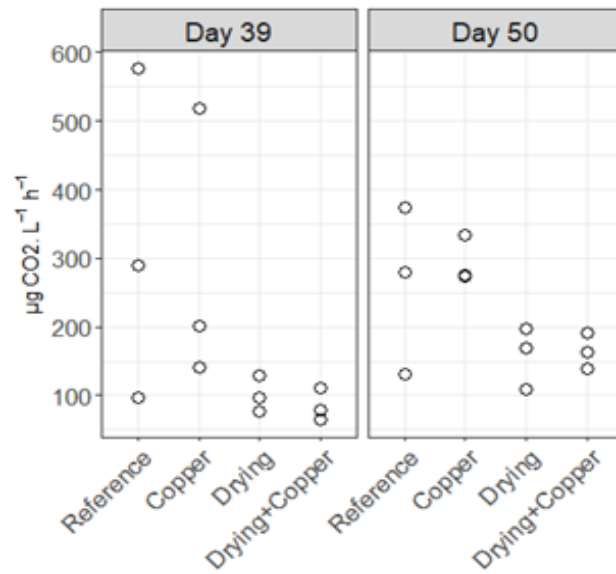


Figure VI-A4: CO<sub>2</sub> emission for each treatment measured with Picarro instrument on the entire column after 39 and 50 days of experiment. Each point corresponds to one column replicate.

Table VI-A5: dissolved organic carbon (COD) and ions concentrations (mg.L<sup>-1</sup>) in water sampled in tanks on Day 13,35 and 56.

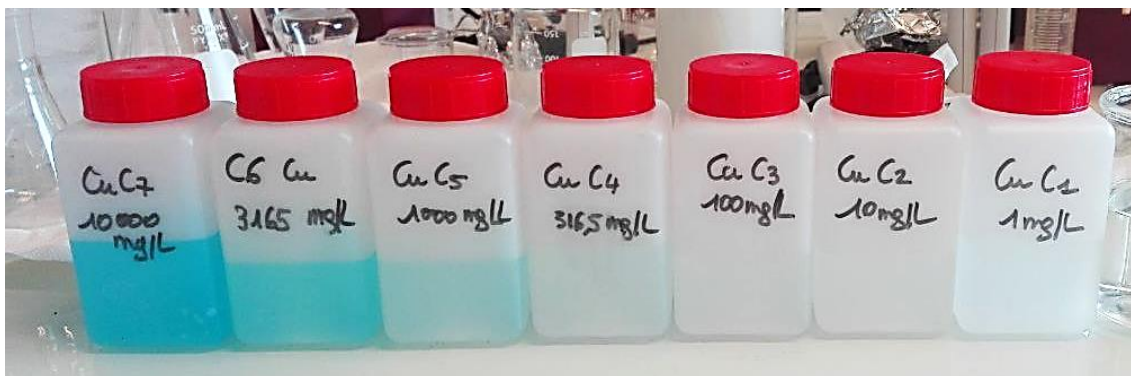
Sampling time	[C] = mg/L	COD	Cl <sup>-</sup>	NO <sub>2</sub> <sup>-</sup>	NO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	PO <sub>4</sub> <sup>3-</sup>	SO <sub>4</sub> <sup>2-</sup>	Na <sup>+</sup>	K <sup>+</sup>	Mg <sup>2+</sup>	Ca <sup>2+</sup>	NH <sub>4</sub> <sup>+</sup>
Day 13	Tank Reference/Drying	1.15	4.47	<0,05	2.82	<0,10	13	3.2	<1	2.68	26.1	<0,02
Day 13	Tank Drying/Drying+Copper	1.2	4.17	<0,05	2.62	<0,10	12.5	2.94	<1	2.6	25.6	<0,02
Day 35	Tank Reference/Drying	1.57	4.46	<0,05	2.85	<0,1	13.3	3.11	<1	2.65	26.3	0.02
Day 35	Tank Drying/Drying+Copper	1.91	3.95	<0,05	2.27	<0,1	11.7	2.81	<1	2.38	23.5	<0,02
Day 56	Tank Reference/Drying	1.43	3.27	<0,05	2.15	<0,1	9.64	2.49	<1	1.89	18.6	0.04
Day 56	Tank Drying/Drying+Copper	4.13	2.79	<0,05	1.76	<0,1	8.29	2.23	<1	1.66	16.3	<0,02

---

## CHAPITRE 3

L'assèchement module les effets du cuivre sur la diversité bactérienne sans pour autant modifier l'acquisition de tolérance au cuivre des communautés microbiennes du sédiment

---





## VII- CHAPITRE 3 : L'assèchement module les effets du cuivre sur la diversité bactérienne sans pour autant modifier l'acquisition de tolérance au cuivre des communautés microbiennes du sédiment

---

Les résultats obtenus dans le Chapitre 2 ont montré que le cuivre pouvait modifier les réponses fonctionnelles des communautés microbiennes du sédiment de la zone hyporhéique à l'assèchement. Pour aller plus loin et déterminer si la même tendance est observée au niveau structurel, les effets combinés du cuivre et de l'assèchement sur la diversité bactérienne et archéale ont été explorés dans ce chapitre basé sur la même expérience en mésocosme que celle du Chapitre 2. Les changements fonctionnels engendrés par l'exposition à un stress peuvent en effet s'accompagner d'une modification structurelle des communautés microbiennes. Par exemple, au cours d'une expérience en mésocosme, une baisse à la fois des activités microbiennes (exo-enzymatiques, respiration, dénitrification) et de la diversité bactérienne et archéale a été mise en évidence dans des sédiments contaminés par du cuivre ( $40 \text{ mg.kg}^{-1}$ ) après 21 jours en mésocosme (Mahamoud Ahmed et al., 2018, 2020). L'assèchement a aussi des effets négatifs sur la diversité microbienne qui sont susceptibles de s'ajouter à ceux du cuivre. La richesse en OTUs (Operational Taxonomic Unit) de communautés microbiennes du sédiment était par exemple fortement corrélée négativement avec les périodes d'assèchement de la rivière intermittente Dewar au Canada (Febria et al., 2012). La perte de diversité microbienne après exposition à un stress physique ou chimique peut être liée à une acquisition de tolérance de la communauté à ce stress avec une perte d'espèces sensibles au profit d'espèces tolérantes. L'étude de Ahmed et al., (2020) citée précédemment avait par exemple montré à la fois une diminution des indices de Shannon et de richesse spécifique et une augmentation des CE50, montrant une acquisition de tolérance au cuivre dans les traitements exposés au cuivre pendant 21 jours comparés au contrôle. La tolérance des communautés microbiennes des cours d'eau à des stress chimiques peut être diminuée par des périodes d'assèchement. Par exemple, l'association d'un réchauffement de l'eau et d'un assèchement ont modifié la sensibilité de biofilms phototrophes à un mélange chimique de nitrate, cuivre et pesticides (Courcoul et al., 2022). Les effets de la combinaison d'un stress chimique et de l'assèchement sur les communautés microbiennes est donc un champ de recherche à approfondir afin d'anticiper d'éventuelles co-sensibilités des communautés microbiennes aux deux stress. Dans ce contexte, l'objectif de ce chapitre était d'évaluer les



effets de l'assèchement sur la perte de diversité et l'acquisition de tolérance au cuivre pour les communautés microbiennes à différentes profondeurs de la zone hyporhéique. Pour cela, une expérience en mésocosme a été mise en point (Chapitre 2) afin de tester les hypothèses suivantes : (1) La tolérance au cuivre est diminuée après exposition à un assèchement ; (2) la diminution de cette tolérance au cuivre s'explique par une baisse de la diversité microbienne provoquée par l'assèchement

## 1. Matériel et méthodes

### 1.1. Rappel des conditions de l'expérience

Les analyses suivantes ont été réalisées lors de l'expérience décrite dans le Chapitre 2. Pour rappel, au cours de cette expérience des colonnes en PVC ont été remplies avec  $4,21 \pm 0,02$  kg de sédiment. Le sédiment de la moitié de ces colonnes avait été préalablement spiké avec une solution de cuivre  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$  pour atteindre une concentration nominale de cuivre de  $70 \text{ mg.kg}^{-1}$ . Les colonnes ont été exposées à un flux d'eau continu du haut vers le bas. Après 5 jours d'expérience, la moitié des colonnes ont été asséchées puis remises en eau après 33 jours d'expérience. Un total de 42 colonnes étaient divisées en 4 traitements différents (Tableau VII-1).

*Tableau VII-1 : détails des différents traitements réalisés au cours de l'expérience combinant cuivre et assèchement*

Traitements	Sédiment spikés avec du cuivre ( $70 \text{ mg.kg}^{-1}$ )	Exposition à un assèchement de 4 semaines et une remise en eau de 4 semaines
REFERENCE (n=12)		
CUIVRE (n=12)	✓	
ASSÉCHÉ (n=9)		✓
ASSÉCHÉ+CUIVRE (n=9)	✓	✓

Des prélèvements d'eau et de sédiments ont été faits avant assèchement, à la fin de la période d'assèchement, quelques heures et quelques semaines après remise en eau (Jour 3, 33 et 56 pour les prélèvements d'eau et Jour 4, 32, 34, 61 pour les prélèvements de sédiments) à 3 profondeurs différentes (Surface, Milieu et Profond) pour trois réplicats de colonnes à chaque temps (Fig. VII-1).

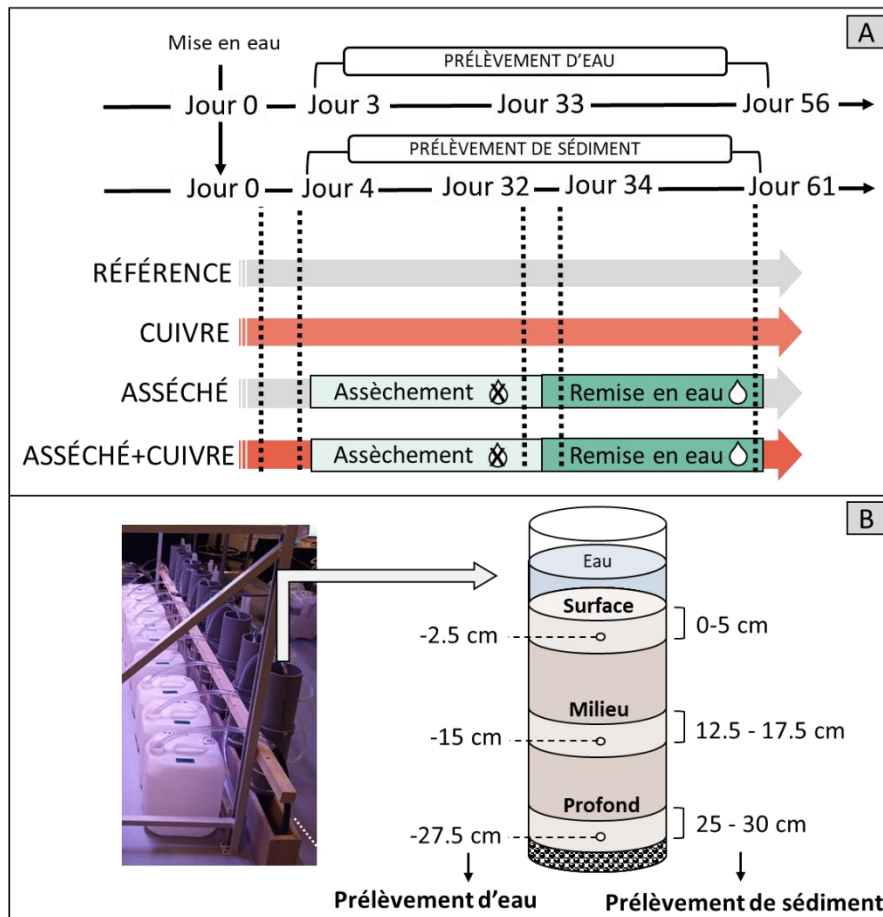


Figure VII-1 : rappel du design expérimental avec les 4 traitements testés, les temps de prélèvement (A) et les profondeurs prélevées (B)

## 1.2. Test de toxicité aiguë pour déterminer la tolérance de la communauté induite par la contamination au cuivre (principe PICT)

Un test de toxicité aiguë a été réalisé pour les échantillons de sédiment prélevés à toutes les profondeurs des colonnes (Surface, Milieu, Profond) et tous les temps de mesure (Jour 4, 32, 34, 61) pour toutes les conditions étudiées (Référence, Cuivre, Asséché, Asséché+Cuivre). Pour cela, l'activité exoenzymatique beta-glucosidase (EC 3.2.1.21) a été mesurée dans les échantillons de sédiments exposés à des concentrations croissantes en cuivre pendant 4h suivant un protocole adapté de Mahamoud et al., (2020). Au total, 7 dilutions d'une solution de cuivre ( $\text{CuSO}_4, 5\text{H}_2\text{O}$ ) ont été préparées avec de l'eau déminéralisée. Deux gammes différentes ont été réalisées entre le premier prélèvement au Jour 4 (0 ; 1 ; 10 ; 100 ; 500 ; 1000 ; 5000 ; 10 000  $\text{mg.L}^{-1}$ ) et les autres temps de mesure aux Jours 32, 34 et 61 (0 ; 1 ; 10 ; 100 ; 316,5 ; 1000 ; 3165 ; 10 000  $\text{mg.L}^{-1}$ ) afin de mieux encadrer les valeurs de CE50 attendues. L'activité beta-glucosidase a été évaluée en mesurant la fluorescence en présence

du substrat 4-methylumbelliferyl- $\beta$ -D-glucopyranoside (MUF-Glu) (Foulquier et al., 2013) dont la concentration optimale avait été déterminée au préalable (1500  $\mu$ M). En plus du substrat MUF-Glu, les échantillons de sédiment (1,2 g) ont été exposés pendant 4 h à 1 mL de chaque dilution de solution de cuivre dans le noir sous agitation. L'arrêt de la réaction a été fait avec 0,3 mL de tampon (pH 10,4 - glycine 0,05 M +  $\text{NH}_4\text{OH}$  0,2 M). Après centrifugation, (5000 x g pendant 5 minutes), 300  $\mu$ L du surnageant de chaque échantillon a été transféré dans une microplaque pour mesurer la fluorescence au lecteur de microplaque (Synergy HT BioTek Instruments) avec une longueur d'excitation à 360 nm et d'émission à 460 nm. Les unités de fluorescence ont été converties en nmol de substrat. $\text{h}^{-1}.\text{g}^{-1}$  de sédiment sec en utilisant des courbes standard de la MUF (Sigma M1381, CAS No. 90-33-5) réalisées dans des conditions similaires à l'exposition.

### 1.3. Séquençage haut débit du gène codant l'ARNr 16S et analyses bio-informatiques

Les ADN génomiques totaux ont été extraits des échantillons de sédiment (masse fraîche utilisée) à l'aide du kit FastDNA® Spin kit for soil (MP Biomedicals, France) en suivant les indications du fabricant. Les extraits ont été quantifiés en fluorimétrie à l'aide du kit de dosage d'ADNdb HS Qubit (Invitrogen). L'amplification de la région d'intérêt a été effectuée par PCR (*Polymerase Chain Reaction*) avec le couple d'amorce 515F (5'-GTGYCAGCMGCCGCGGTA-3') et 909R (5'-CCCCGYCAATTCMTTTRAGT-3') ciblant la région V4-V5 hypervariable du gène codant l'ARNr 16S des Bactéries et d'une partie des Archées (Wang and Qian, 2009). Une procédure de double indexage des amorces a été réalisée afin d'ajouter des index uniques (8 bases) à chacune des amorces utilisées (Kozich et al., 2013). L'amplification par des PCR indépendantes a été réalisée en triplicat pour chaque échantillon à partir de 5 ng d'ADN pour chaque réaction. Après vérification de la spécificité de l'amplification par électrophorèse sur gel d'agarose et dosage de l'ADN amplifié à l'aide du kit Qubit présenté plus haut, tous les échantillons ont été poolés de manière équimolaire. Ce mélange a ensuite été purifié en utilisant des billes magnétiques (Clean PCR beads – Clean NA). Une solution contenant 1  $\mu$ g d'amplicons à la concentration de 33 ng  $\mu\text{L}^{-1}$  a été transmis à l'entreprise Fasteris (Suisse) pour la prestation de séquençage massif. Fasteris a réalisé la ligation des adaptateurs Illumina et le séquençage MiSeq (2x250 pb) (au total 8,921 x 10<sup>6</sup> de séquences ont été obtenues). Le «barcode sorting» a été réalisé en utilisant le script Perl et un script interne de Fasteris. Les adaptateurs ont été retirés grâce à l'outil Trimmomatic (Bolger et al., 2014). L'assemblage des

reads a été fait à l'aide de l'outil ea-utils (Aronesty et al., 2011). Ces 3 dernières étapes ont également été réalisées par l'entreprise Fasteris. L'analyse des données a ensuite été faite en utilisant l'outil FROGS (Find Rapidly OTUs with Galaxy Solution) implémenté sous Galaxy par la plateforme bioinformatique MIGALE (UMR MaIAGE - INRAE). Au cours du pre-process, seules les séquences sans aucun mésappariement au niveau des amorces et ayant une taille comprise entre 340 et 450 pb ont été conservées. Les séquences comprenant des N ont été éliminées. Le clustering des séquences a été fait par la méthode SWARM (Mahé et al., 2015) avec au maximum une seule base de différence ( $d = 1$ ). Les chimères ont été retirées en utilisant les packages vchime et vsearch (Rognes et al., 2016). Plusieurs filtres de qualité ont ensuite été appliqués. Les séquences synthétiques PhiX ajoutées par Fasteris ont été retirées. Le nombre minimum de fois où l'on s'attend à retrouver la séquence correspondant au nombre de réplicats était de 3. Le seuil d'abondance relative minimum a été fixé à 0,005% d'après (Bokulich et al., 2013). L'affiliation a été réalisée grâce à un BLAST dans la base de données SILVA (Small Subunit version 138) (Quast et al., 2013) avec un seuil d'identité minimum fixé à 95 %. Les chloroplastes et mitochondries ont été retirés. D'après les courbes de raréfaction, le seuil de raréfaction a été établi à  $n = 10\ 575$  reads. Cette normalisation a abouti au retrait des échantillons suivants du traitement Référence du jeu de données : 2 réplicats de la profondeur Milieu et 1 réplicat des profondeurs Surface et Profond au Jour 34 ainsi qu'un réplicat de la profondeur Milieu au Jour 61. La table d'occurrence a ensuite permis de calculer la richesse spécifique et l'indice de Shannon pour chaque échantillon.

#### **1.4. Analyse statistique des données**

Pour déterminer des différences d'acquisition de tolérance au cuivre (hypothèse 1), des courbes dose-réponses ont été modélisées à partir du test de toxicité aiguë en utilisant le package drc (Ritz et al., 2015). Pour chaque condition étudiée (Référence, Cuivre, Asséché, Asséché+Cuivre), l'activité beta-glucosidase a été exprimée en pourcentage des contrôles non contaminés au cuivre (C0). Le modèle qui représente le plus les données a été sélectionné visuellement pour chaque traitement parmi plusieurs modèles utilisés classiquement pour décrire des courbes dose-réponses (log-logistique, Weibull, Brain-cousens, modèle de régression asymptotique). Un intervalle de confiance de 98,305 % pour le jour 4 et 99,149 % pour les Jours 32, 34 et 61 (correspondant à un  $\alpha = 0,017$  par comparaison pour le Jour 4 et un  $\alpha = 0,008$  pour les Jours 32, 34 et 61) a été déterminé pour chaque CE50

afin d'obtenir un alpha global de 0,05 % pour 3 et 6 comparaisons, respectivement. Une différence de CE50 est significative entre les traitements lorsque les intervalles de confiance ne se superposent pas (Scheffczyk et al., 2014).

Pour déterminer des différences significatives des indices de biodiversité entre les traitements (hypothèse 2), une one-way ANOVA a été réalisée ( $\alpha < 0,05$ ) suivie d'un test post hoc de Tukey pour les Jours 32 à toutes les profondeurs et au Jour 61 pour les profondeurs Surface et Profond. Un test de Shapiro-Wilk suivi si besoin d'une observation des qqplot ont été faits pour confirmer la normalité des résidus de l'ANOVA. L'homoscedasticité des données a été vérifiée par le test de Fligner-Killeen. Ces tests n'ont pas pu être réalisés pour les profondeurs auxquelles il manquait des réplicats (retirés du jeu de données au cours de l'analyse bioinformatique des séquences).

Toutes les analyses ont été réalisées avec le logiciel R version 4.1.3 (R Core Team, 2020).

## 2. Résultats

### 2.1. Effets combinés de l'assèchement et du cuivre sur l'acquisition de tolérance au cuivre

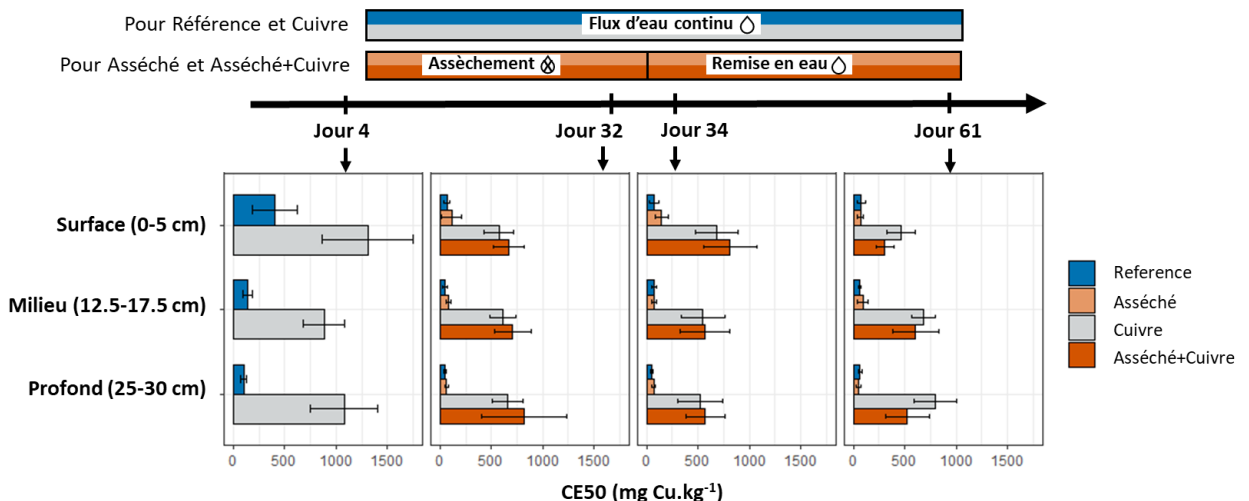


Figure VII-2 : acquisition de tolérance au cuivre donnée par les CE50 (mg Cu.kg<sup>-1</sup>) à chaque temps de l'expérience (jour 4, 32, 34, 61) pour chaque profondeur (Surface, Milieu, Profond) et chaque traitement (Reference, Asséché, Cuivre, Asséché+Cuivre). Les barres d'erreur sont des intervalles de confiance à 98,305 % pour le Jour 4 et 99,149 % pour les jours 32, 34 et 61.

**Effet des traitements sur l'acquisition de tolérance au cuivre :** une acquisition de tolérance au cuivre en lien avec l'exposition au cuivre a été observée dès le début de l'expérience (Jour 4) ( $p < 0,05$ ) (Fig. VII-2). À ce temps de prélèvement, la CE50 était en effet 3,2 fois plus importante pour le traitement Cuivre par rapport au traitement Référence en Surface. Cette différence était encore plus marquée aux autres profondeurs avec une CE50 multipliée par 6,3 et 10,8 respectivement pour les profondeurs Milieu et Profond par rapport à la Référence. L'acquisition de tolérance au cuivre s'est prolongée tout au long de l'expérience pour les traitements contaminés par du cuivre (Cuivre et Asséché+Cuivre) par rapport aux traitements non exposés (Référence et Asséché) ( $p < 0,05$ ) (Fig. VII-2). Les CE50 étaient en moyenne 10 fois plus fortes pour les traitements Cuivre et Asséché+Cuivre comparées au traitement Référence pour les échantillons prélevés aux Jours 32, 34 et 61 (toutes profondeurs confondues). Toutefois, au dernier temps de mesure (Jour 61), ces CE50 étaient seulement 6 et 4 fois plus importantes pour les traitements Cuivre et Asséché+Cuivre par rapport à la Référence en Surface. L'assèchement n'a pas eu d'effet sur l'acquisition de tolérance au cuivre (Fig. VII-2). En effet, aucune différence n'a été mise en évidence entre les CE50 des traitements Référence et Asséché d'une part et Cuivre et Asséché+Cuivre d'autre part quelle que soit la profondeur ou le temps de mesure (Jour 32, 34 ou 61) ( $p < 0,05$ ).

**Effet du temps d'exposition et de la profondeur sur l'acquisition de tolérance au cuivre :** une diminution de l'acquisition de tolérance au cuivre au cours du temps a été observée pour les traitements exposés au cuivre (Cuivre et Asséché+Cuivre) en Surface et, dans une moindre mesure, aux profondeurs Milieu et Profond (Fig. VII-2). Une baisse significative comprise en 65 et 77 % des CE50 a notamment été montrée entre le premier (Jour 4) et dernier temps (Jour 61) de l'expérience en Surface pour ces traitements ( $p < 0,05$ ). La profondeur semble également avoir un effet sur l'acquisition de tolérance au cuivre pour le traitement Référence qui a une CE50 entre 3 et 4 fois plus importante en Surface par rapport aux profondeurs Milieu et Profond au début de l'expérience (Jour 4) ( $p < 0,05$ ) (Fig. VII-2).

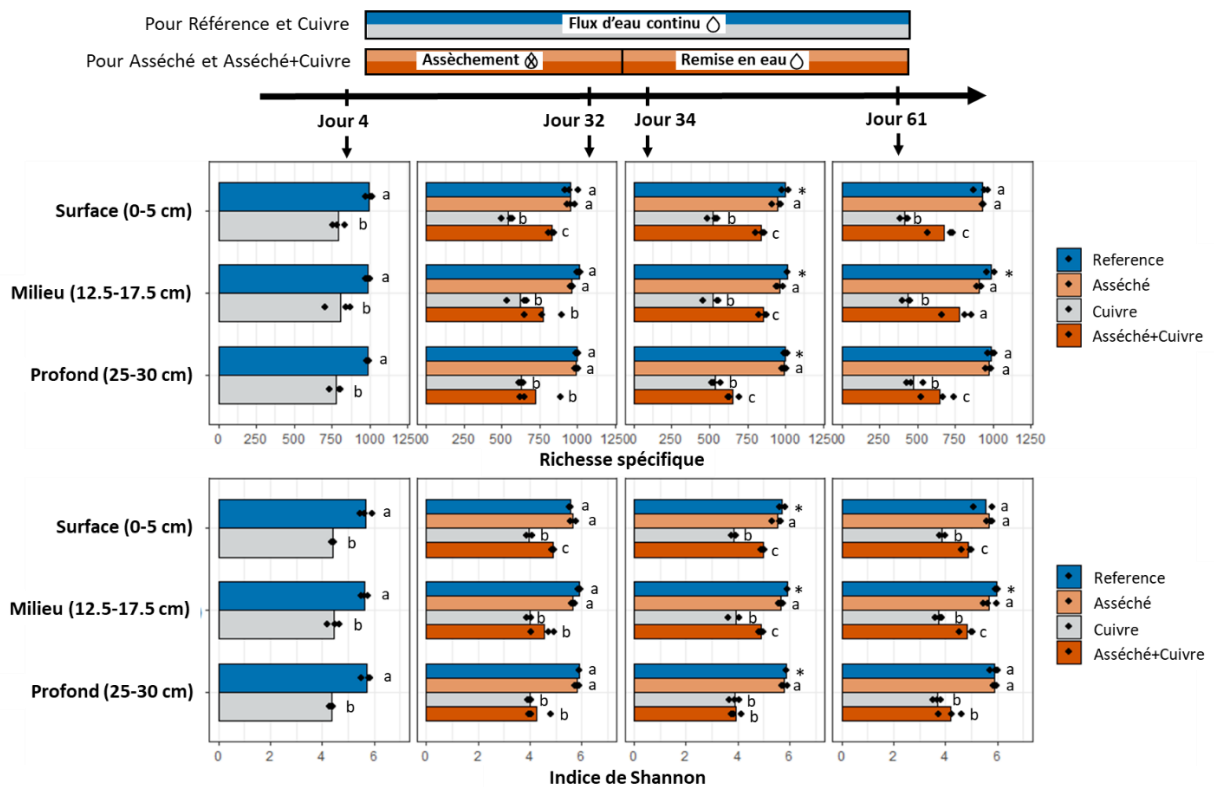


Figure VII-3 : indice de diversité (richesse spécifique et indice de Shannon) de la communauté bactérienne et archéale du sédiment aux 3 profondeurs des colonnes (Surface, Milieu, Profond) pour tous les traitements et aux 4 temps de prélèvement (Jour 4, 32, 34, 61). Des lettres différentes indiquent des différences statistiquement significatives entre les traitements (ANOVA entre les 4 traitements pour les Jours 32, 34 et 61 et test de Student entre les traitements Référence et Cuivre au Jour 4,  $p < 0,05$ ). Les traitements avec une \* n'ont pas été pris en compte dans les analyses statistiques puisqu'ils n'avaient pas le même nombre de réplicats que les autres traitements.

## 2.2. Effets individuels de l'assèchement et du cuivre sur la diversité bactérienne et archéale

L'exposition au cuivre a entraîné une baisse de la diversité alpha dès le début de l'expérience (Jour 4). La richesse spécifique et l'indice de Shannon était en effet diminués d'environ 20% pour le traitement Cuivre par rapport au traitement Référence à toutes les profondeurs après 4 jours d'exposition au cuivre (Fig. VII-3). L'effet négatif du cuivre sur la diversité bactérienne et archéale s'est prolongé et amplifié au cours de l'expérience. La richesse spécifique du traitement Cuivre a baissé de 43,2 % par rapport à la Référence après 32 jours d'expérience et a continué de diminuer jusqu'à 55,1 % au bout de 61 jours (Fig. VII-3). Une tendance similaire est observée aux deux autres profondeurs Milieu et Profond. Contrairement au cuivre, l'assèchement seul a eu peu d'effet sur la perte de diversité alpha tout au long de l'expérience. La richesse spécifique et l'indice de Shannon du traitement

Asséché sont en effet proches du traitement Reference à tous les temps de mesures et à toutes les profondeurs (Fig. VII-3).

### 2.3. Effets combinés de l'assèchement et du cuivre sur la diversité bactérienne et archéale

Les effets sont variables en fonction de la profondeur lorsque les deux stress sont combinés (Asséché+Cuivre). En Surface, le traitement combiné Asséché+Cuivre a des effets négatifs sur la diversité bactérienne et archéale moins important que le cuivre seul. La diminution de l'indice de Shannon par rapport à la Référence est par exemple en moyenne de 30 % en Surface pour le traitement Cuivre alors qu'elle est seulement d'environ 14 % pour le traitement Asséché+Cuivre (Jour 32, 34, 61). Contrairement à la Surface, l'assèchement ne diminue pas les effets du cuivre à la couche Profond : les indices de Shannon et la richesse spécifique ne sont en effet pas significativement différents entre les traitements Cuivre et Asséché+Cuivre (Jours 32, 34, 61) à cette profondeur.

## 3. Discussion

### 3.1. L'exposition au cuivre a des effets importants sur la tolérance au cuivre et la biodiversité microbienne, contrairement à l'assèchement

**Une acquisition de tolérance au cuivre corrélée à l'exposition à ce métal a été mise en évidence.** Ces résultats sont en accord avec ma première étude reliant exposition au cuivre dissous et acquisition de tolérance microbienne dans la zone hyporhéique (Kergoat et al., 2023 – Chapitre 1) ainsi qu'avec la littérature (Ogilvie and Grant, 2008; Mahamoud Ahmed et al., 2020). Des communautés microbiennes de sédiments exposés durant 21 jours à une concentration nominale en cuivre de  $40 \text{ mg.kg}^{-1}$  étaient par exemple 7 fois plus tolérantes au cuivre (pour l'activité beta-glucosidase) que celles qui n'avaient pas été exposées (Ahmed et al., 2020). Une autre étude réalisée sur des sédiments d'un estuaire anglais a également montré une forte corrélation entre la contamination au cuivre (allant de  $0,61$  à  $783 \mu\text{g.L}^{-1}$  dans l'eau interstitielle) et l'acquisition de tolérance à ce métal (Ogilvie and Grant, 2008).

**Au cours de cette expérience, l'acquisition de tolérance au cuivre s'est accompagnée d'une perte de diversité bactérienne et archéale.** Au contraire, lors de l'expérience



combinant colmatage et cuivre (Chapitre 1), une acquisition de tolérance avait été observée en surface sans modification de la structure microbienne. Cependant, les concentrations en cuivre dans les sédiments étaient seulement de  $15,62 \pm 6,34 \text{ mg Cu.kg}^{-1}$  dans les sédiments et de  $2,10 \pm 2,93 \text{ } \mu\text{g.L}^{-1}$  dans l'eau (pour le traitement Cuivre). C'est environ 6 fois moins dans les sédiments et 12 fois moins dans l'eau que les concentrations mesurées au cours de l'expérience combinant assèchement et cuivre (Chapitre 2). Il existe probablement un seuil de toxicité du cuivre à partir duquel des changements structurels ont lieu et s'accompagnent d'une perte de diversité bactérienne et archéale.

En revanche, allant dans le même sens que nos résultats, une baisse de la richesse spécifique et de l'indice de Shannon avait été observée au cours d'une étude en mésocosme dès les premiers jours d'exposition (21 jours au total) des sédiments à  $40 \text{ mg Cu.kg}^{-1}$  (Ahmed et al., 2020). De la même manière, une étude de Sutcliffe et al., (2019) a montré que les communautés microbiennes étaient différentes du contrôle après 118 jours d'exposition en mésocosme à une concentration de  $46 \text{ mg Cu.kg}^{-1}$ . Cette baisse de diversité peut être due à la disparition d'espèces sensibles qui n'ont pas pu s'adapter à la présence de cuivre. Les espèces tolérantes au cuivre ont été sélectionnées et ont colonisées l'espace laissé libre par les espèces sensibles (ce qui explique l'acquisition de tolérance au cuivre observée). Pour aller plus loin, il serait intéressant de déterminer quelles espèces tolérantes ont été sélectionnées par l'exposition au cuivre. Ces espèces pourraient en effet avoir un intérêt particulier dans le domaine médical puisque des systèmes communs existent entre la résistance aux métaux et la résistance aux antibiotiques (Baker-Austin et al., 2006). Le cuivre pourrait notamment être utilisé contre des bactéries multi-résistantes aux antibiotiques (Djoko et al., 2015).

**La tolérance microbienne au cuivre et la biodiversité bactérienne et archéale diminuent au cours du temps en surface des traitements exposés au cuivre** bien que les concentrations en cuivre aient peu évoluées au cours de l'expérience (Fig. IV-3). L'exposition au cuivre sur le long terme a pu affecter progressivement les espèces sensibles mais aussi tolérantes entraînant à la fois une baisse de la tolérance et de la diversité. On peut alors s'interroger sur les effets d'une exposition au cuivre dans l'environnement bien plus longue que les 61 jours de notre expérience. En effet, le cuivre s'accumule et il est rémanent dans l'environnement. Des signes d'une contamination anthropique de cuivre (rejet d'usine de rayonne et galvanoplastie) datant des années entre 1920 et 1990 sont par exemple toujours visibles dans

les carottes sédimentaires du lac Orta (Italie). Des concentrations en cuivre entre 3500 et 4500 mg Cu.kg<sup>-1</sup> correspondant aux années 1950 ont notamment été mesurées dans ces carottes (Vignati et al., 2016).

Contrairement au scénario environnemental d'accumulation graduelle du cuivre dans l'environnement, la technique du spiking utilisée dans cette étude provoque une contamination abrupte des sédiments. Ce scénario de contamination peut expliquer la perte importante de biodiversité observée dans les traitements exposés au cuivre de notre étude. Une perte de diversité plus importante avait par exemple été montrée après une contamination abrupte d'un sol par rapport à une contamination progressive sur 26 mois (McTee et al., 2019). Afin de compléter mes observations et mieux comprendre comment le cuivre influence la biodiversité microbienne sur le long terme, des suivis au cours du temps pourraient être réalisés dans les sédiments des cours d'eau fréquemment exposés à une contamination au cuivre (*e.g.* à proximité de vignobles) comme cela a déjà été fait pour les sols (de Boer et al., 2012).

**Contrairement au cuivre, l'assèchement a eu peu d'effet sur l'acquisition de tolérance au cuivre et la diversité bactérienne et archéale.** Il a pourtant été montré que l'assèchement pouvait augmenter ou diminuer la tolérance microbienne à un autre stress. Par exemple, au cours d'une expérience en mésocosme, des biofilms majoritairement composés de microalgues (périphytique) ont été exposés à un mix de produits pharmaceutiques et une période d'assèchement d'une semaine. Le résultat de cette étude montre que l'assèchement a augmenté la sensibilité de la communauté algale (photosynthèse) aux produits pharmaceutiques alors qu'au contraire il augmentait la tolérance des communautés bactériennes (beta-glucosidase) à ces produits (Corcoll et al., 2015). D'autre part, l'absence d'effet de l'assèchement sur la diversité bactérienne et archéale ne coïncide pas avec ce qui a déjà été montré dans la littérature. En effet, une diminution des indices de Shannon et de la richesse spécifique a par exemple été mise en évidence après 90 jours d'assèchement de sédiments en mésocosmes (Schreckinger et al., 2021). De la même manière, une modification de la composition archéale dans des sédiments en mésocosme a été montrée après 150 jours d'assèchement (Gionchetta et al., 2019b). Les archées font en effet preuve d'une adaptation particulièrement importante lorsqu'elles sont exposées à des perturbations hydrologiques. Cette étude met aussi en évidence une augmentation de l'abondance des *Thermoplasta*

(archées), *Actinobacteria* et *Bacilli* (bactéries) (Gionchetta et al., 2019b). Cela est un signe d'une transition vers une composition microbienne que l'on peut retrouver dans les sols. Malgré l'absence d'effet sur la diversité alpha, il serait intéressant de compléter l'analyse des données de biodiversité en se focalisant sur l'assignation taxonomique pour mettre en évidence d'éventuels changements de la communauté microbienne, notamment l'apparition d'espèces bactériennes typiques de sols.

### **3.2. Lorsque les deux stress sont combinés, la réponse de la diversité bactérienne et archéale varie en fonction de la profondeur.**

Lors de l'assèchement (jour 32), les deux stress combinés ont eu moins d'effet en Surface sur la diversité bactérienne et archéale qu'en présence de cuivre seul. L'assèchement semble donc diminuer les effets du cuivre sur la diversité bactérienne et archéale. Ces résultats coïncident partiellement avec les observations faites au niveau fonctionnel. En effet, le cuivre avait plus d'effet seul que combiné à l'assèchement sur les activités exo-enzymatiques (beta-glucosidase, leucine aminopeptidase, phosphatase) au Jour 32 mais uniquement à la profondeur Medium (et non en Surface comme montré pour la diversité bactérienne et archéale) (Chapitre 2). Le résultat obtenu pour la biodiversité est probablement dû au fait qu'en Surface le taux d'humidité chute dans les colonnes pendant l'assèchement, réduisant la proportion de cuivre sous forme dissoute et donc biodisponible pour les communautés microbiennes. Au contraire, aux niveaux Milieu et Profond, l'effet du cuivre sur la diversité bactérienne est similaire avec ou sans assèchement. À cette profondeur, le taux d'humidité est resté plus élevé qu'en surface pendant l'assèchement (Fig. VI-2). La biodisponibilité et la toxicité du cuivre pour les communautés microbiennes étaient donc plus fortes en profondeur qu'en surface. Ce résultat met en évidence que les communautés microbiennes en profondeur peuvent être davantage fragilisées par les contaminants pendant l'assèchement.

En revanche, le résultat après remise en eau est plus surprenant. Les deux stress combinés ont toujours moins d'effet que le cuivre seul sur la diversité bactérienne et archéale en Surface (idem assèchement) mais aussi à la profondeur du Milieu. Pourtant, on aurait pu supposer que la remise en eau contribuerait à remettre en solution le cuivre et augmenterait la toxicité pour les communautés microbiennes. Or, la concentration en cuivre dissous est comparable avant assèchement (Surface :  $32,2 \pm 1,1 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ ) et après remise en eau

(Surface :  $30,0 \pm 3,5 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ ) (Fig. VI-3) Au cours d'une expérience en colonnes de sédiment contaminés par du zinc, un cycle d'assèchement/remise en eau a au contraire entraîné la libération de 8 fois plus zinc par rapport aux colonnes restées en eau (Paranaíba et al., 2020). Des carottes de sédiment prélevées dans une zone littorale de la rivière Nanfei en Chine ayant été exposées à 6 cycles d'assèchement/remise en eau ont aussi abouti à une augmentation de la biodisponibilité du cadmium et du plomb (Liu et al., 2020). Il est possible qu'une durée d'expérience plus longue ou un nombre de cycles d'assèchement/remise en eau plus important aurait également entraîné une augmentation de la biodisponibilité du cuivre et une toxicité pour les communautés microbiennes. D'autre part, l'assèchement en réduisant la quantité de cuivre biodisponible durant 4 semaines, a aussi pu permettre une contamination plus progressive par rapport aux colonnes restées en eau après le spiking limitant ainsi la perte de diversité bactérienne et archéale.

#### **4. Conclusion**

Le cuivre testé individuellement a entraîné une acquisition de tolérance au cuivre et une perte de diversité bactérienne tandis qu'au contraire l'assèchement n'a pas eu d'effet sur ces deux variables. Lorsque les deux stress sont combinés, l'assèchement diminue les effets du cuivre sur la diversité bactérienne et archéale en Surface pendant et après l'assèchement. La mise en évidence de cet « antagonisme » entre le cuivre et l'assèchement permet de mieux comprendre les interactions dans la réponse des communautés microbiennes du sédiment aux stress multiples.



---

# DISCUSSION ET PERSPECTIVES

---





## VIII- DISCUSSION ET PERSPECTIVES

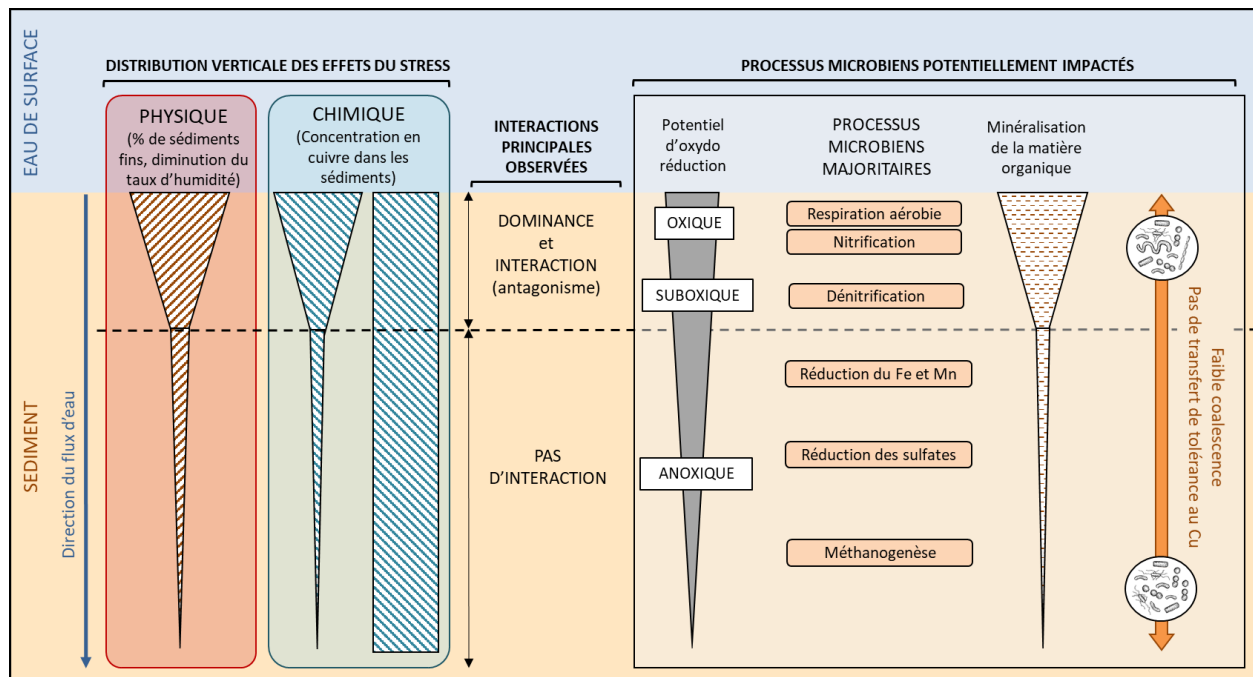


Figure VIII-1 : schéma récapitulatif des résultats de la thèse

### 1. La dimension verticale de la zone hyporhéique est essentielle pour mieux appréhender l'évaluation des stress multiples

Les effets des stress anthropiques sur les communautés microbiennes du sédiment sont variables selon la profondeur de la zone hyporhéique. Les effets des stress physiques sur les communautés microbiennes du sédiment sont importants en surface où l'exposition est la plus forte. Les résultats ont en effet montré que les effets de l'assèchement et du colmatage sur les communautés microbiennes étaient plus importants dans les 3 à 5 premiers cm que dans les couches plus profondes des colonnes. D'autres études ont également montré que les organismes situés en surface de la zone hyporhéique sont davantage impactés par le dépôt de sédiments fins (Navel et al., 2011), l'assèchement (Schreckinger et al., 2021) mais aussi par les crues (Romani et al., 1998) ou l'élévation de température (Vander Vorste et al., 2017). Contrairement aux stress physiques, les stress chimiques ont des effets sur les communautés microbiennes à toutes les profondeurs du sédiment. Ces effets dépendent de la biodisponibilité des contaminants variable selon les conditions physico-chimiques. D'après nos résultats, l'impact du cuivre sur les communautés microbiennes était aussi important en surface qu'en profondeur lorsque les concentrations en cuivre dans les sédiments étaient



homogènes le long de la colonne. Les effets du cuivre sur les communautés microbiennes étaient même plus importants en profondeur qu'en surface au cours de l'assèchement. En revanche, les effets du cuivre sur les communautés microbiennes étaient plus importants en surface comparé à la profondeur lorsque la contamination était apportée par l'eau en downwelling (filtration du cuivre dans les premiers cm). La direction du flux d'eau et la morphologie des cours d'eau jouent un rôle important dans la distribution des contaminants conditionnant les réponses microbiennes. Il a par exemple été montré que la direction des échanges hyporhéiques conditionne la pollution azotée (Wang et al., 2018), mais aussi la pollution organique aux chlorobenzènes (Greenberg et al., 2002). Pour compléter mes résultats qui ne prennent en compte qu'une seule direction du flux d'eau (downwelling) et gagner en réalité écologique, il serait intéressant de tester mes hypothèses dans d'autres configurations, comme l'upwelling.

Globalement, les communautés microbiennes en surface sont exposées aux stress physiques tandis que les communautés microbiennes en profondeur en sont préservées. Au contraire, les stress chimiques peuvent avoir des effets à toutes les profondeurs de la zone hyporhéique. Les zones d'interaction entre les stress physiques et chimiques sont donc susceptibles d'être localisées essentiellement en surface (Fig. VIII-1). Or, les gradients physico-chimiques (nutriments, oxygène) verticaux dans la zone hyporhéique entraînent une stratification fonctionnelle et structurelle des communautés microbiennes. Les fonctions microbiennes susceptibles d'être les plus impactées par les interactions entre stress physiques et chimiques sont donc la respiration et la dénitrification qui s'exercent en surface dans les zones aérobies et à l'interface aérobie/anaérobie, respectivement (Fig. VIII-1). Au contraire, les processus microbiens anaérobies plus en profondeur (réduction du fer et du manganèse, réduction du sulfate, méthanogenèse) sont davantage épargnés par ces stress. Or, la minéralisation de la matière organique par les communautés microbiennes en surface est plus efficace qu'en profondeur. En effet, au cours d'une expérience de 83 jours en mésocosme, les micro-organismes dans les sédiments de surface utilisaient un panel varié de substrats tandis qu'à 50 cm de profondeur, les communautés microbiennes dégradait essentiellement des composés azotés (acides aminés et acides carboxyliques) (Freixa et al., 2016). L'accumulation des stress chimiques associés aux stress physiques en surface peut donc faire redouter une minéralisation peu efficace de la matière organique et un lessivage important dans les nappes

phréatiques des substrats carbonés notamment. On peut aussi conclure qu'étant donné la stratification des stress physiques et chimiques ainsi que des processus microbiens, il n'est pas possible de se baser sur des résultats obtenus en surface pour évaluer les risques et prendre des décisions de gestion qui concernent toute la dimension verticale du cours d'eau. D'autant plus qu'au cours des expériences, une stratification des réponses microbiennes a été observée sur une profondeur de seulement 30 cm. On peut donc imaginer que cette stratification des réponses biologiques est encore plus importante lorsque la zone hyporhéique est plus profonde. De plus, seul le flux d'eau provenant de la surface (condition de downwelling) a été considéré dans cette thèse sans tenir compte des apports de la nappe phréatique qui peuvent avoir des effets sur les communautés microbiennes (Sliva and Williams, 2005). Pourtant, l'évaluation de l'exposition et des effets des stress chimiques et physiques sur les organismes des cours d'eau est généralement réalisée sur les premiers centimètres de sédiment (Mahamoud Ahmed et al., 2018; Wang et al., 2021). En amont des cours d'eau, la zone hyporhéique est réduite et directement sur le substratum imperméable. Cependant, des études sur les couches profondes de la zone hyporhéique (par carottage) pourraient être réalisées en aval des cours d'eau où le lit de la rivière est plus large et profond, constitué de particules plus fines qu'en amont et où eau de surface et souterraine se mélangent. C'est d'ailleurs généralement en aval que les stress se cumulent (*e.g.* lessivage de contaminants, apport en sédiments fins et nutriments, urbanisation). Une étude en mésocosme a en effet mis en évidence que les stress combinés (apport en sédiments fins et enrichissement en nutriments) qui s'exercent dans les affluents d'un cours d'eau ont des conséquences importantes pour les écosystèmes réceptacles en aval (dispersion des invertébrés) (Chara-Serna and Richardson, 2021). L'étude de carottes de sédiments permettraient ainsi de mieux comprendre comment les effets des stress multiples en surface se répercutent sur la diversité et les fonctions microbiennes en profondeur via les flux d'eau qui traversent la zone hyporhéique (Nogaro et al., 2010). La zone où se mélangent eau de surface et eau souterraine est notamment intéressante puisque son altération par des stress multiples peut avoir des conséquences sur la potabilité de l'eau.

Au cours des expériences menées lors de cette thèse, les premiers centimètres de sédiment (y compris dans les traitements Référence) avaient une structure et un fonctionnement microbien qui se démarquaient nettement par rapport au reste de la colonne

qui était relativement homogène. La coalescence (*i.e.* mélange de communautés à l'interface entre deux écosystèmes) entre les différentes strates de sédiment était faible (Fig. VIII-1). La stratification verticale des conditions physico-chimiques dans la zone hyporhéique joue un rôle de filtre environnemental pour les communautés microbiennes. Cette idée coïnciderait avec le principe énoncé par Martinus Wilhelm Beijerinck et Bass Becking selon lequel : « everything is everywhere: but the environment selects ». Des flux continus de micro-organismes entre les compartiments existent et l'environnement agit comme un filtre sélectionnant ces flux. Un continuum microbien entre le sol, l'eau de surface et les sédiments a par exemple été mis en évidence après séquençage de 500 échantillons de ces milieux (Hermans et al., 2020). Il est donc possible que des échanges aient eu lieu dans la dimension verticale entre les différentes strates de la zone hyporhéique. Il serait intéressant de creuser l'idée d'une migration des communautés microbiennes en profondeur lors de perturbations en surface. Pour aller plus loin, des analyses de diversité plus poussées pourraient être faites pour savoir à quel point les communautés microbiennes apportées par le colmatant peuvent migrer dans le sédiment en profondeur via les flux d'eau traversant des mésocosmes. Le rôle refuge de la zone hyporhéique est bien connu pour les invertébrés mais il reste encore méconnu pour les communautés microbiennes. Il a seulement été montré que la zone hyporhéique jouait un rôle refuge pour les bactéries dans le cadre d'assèchement en utilisant comme vecteur l'eau interstitielle (Febria et al., 2012; Harjung et al., 2019). Il serait intéressant d'aller plus loin pour savoir si cette communauté microbienne ayant trouvé refuge en profondeur est capable de recoloniser la surface après assèchement. Une expérience en mésocosme simulant un assèchement puis une remise en eau permettrait par une analyse de diversité microbienne beta dans l'eau interstitielle entre les différentes profondeurs de confirmer ou non cette recolonisation en surface et le rôle de réservoir microbien de la zone hyporhéique. Il est également possible de s'interroger sur le rôle « réservoir de micro-organismes sensibles » des couches profondes de la zone hyporhéique dans le cas de perturbations chimiques en surface. Pour cela, une expérience en mésocosme au cours de laquelle les sédiments seraient exposés à un flux d'eau contaminée par du cuivre pourrait par exemple être mise en place. Après exposition au cuivre, les premiers centimètres de sédiments seraient extraits des mésocosmes et remplacés par du sédiment stérile. Des analyses de diversité permettraient de savoir si la communauté microbienne en profondeur a

recolonisé les premiers centimètres de sédiment montrant ainsi le rôle « réservoir » des couches plus profondes.

## **2. Les changements environnementaux doivent être intégrés à l'évaluation de la biodisponibilité des contaminants dans les sédiments**

La toxicité des contaminants pour les organismes aquatiques dépend de leur biodisponibilité. Dans le cas des métaux, la biodisponibilité pour les organismes est variable selon leur spéciation. L'ion libre  $\text{Cu}^{2+}$  est souvent pris comme indicateur de toxicité puisqu'il est directement biodisponible pour les organismes (Eriksen et al., 2001). Il s'agit par exemple d'un bon prédicteur de toxicité pour la respiration microbienne dans les sols (Dumestre et al., 1999). La fixation à des ligands organiques (*e.g.* acides humiques, acides fulviques) et inorganiques (*e.g.* oxydes de fer et de manganèse, argiles, phosphates, sulfates, carbonates), au contraire, réduit la biodisponibilité du cuivre. Plusieurs facteurs peuvent faire varier les passages du cuivre entre la phase libre et la phase liée à des ligands (*e.g.* pH, potentiel redox, force ionique, température, compétition avec des ions divalents comme  $\text{Ca}^{2+}$  ou  $\text{Mg}^{2+}$ ). Les sédiments des cours d'eau sont soumis à des stress physiques, comme l'assèchement et le colmatage qui peuvent faire varier ces différents paramètres et la biodisponibilité du cuivre. Nos résultats suggèrent en effet que ces deux stress n'ont soit pas d'effet soit diminuent globalement la biodisponibilité du cuivre. La combinaison du cuivre et de l'assèchement a notamment montré une diminution des effets du cuivre sur les communautés microbiennes en surface. Le retrait de l'eau dans les colonnes a probablement réduit la proportion de cuivre dissous et donc sa toxicité pour les communautés microbiennes. Pour confirmer ce résultat, il serait intéressant de mesurer la concentration en cuivre dissous dans l'eau interstitielle résiduelle dans les sédiments au cours de l'assèchement. Après assèchement, la remise en eau n'a pas contribué à une remobilisation du cuivre confirmant une forte sorption du cuivre dans les sédiments, malgré une faible teneur en matière organique du sédiment (< 1,39 % dans le sédiment sableux de l'Ain). De la même manière, au cours de l'expérience combinant cuivre et colmatage, le cuivre s'est fixé aux ligands disponibles dès les premiers centimètres de sédiments sans effet particulier du colmatage. Il serait intéressant d'identifier les ligands qui ont favorisé la sorption du cuivre au cours de expériences. L'hypothèse la plus probable est une sorption à la matière organique, étant donné la forte affinité du cuivre pour ces

composés (Lu and Allen, 2001). Les acides humiques et fulviques notamment, contiennent beaucoup de groupes fonctionnels qui réagissent avec le cuivre (Town and Powell, 1993; Xu et al., 2016). Néanmoins, les argiles et les oxydes de fer et de manganèse sont également susceptibles d'interagir avec le cuivre (Stone and Droppo, 1996). Connaître les ligands et le type de liaison du cuivre à ces ligands permettrait de mieux anticiper sa désorption en cas de changements environnementaux.

Le sédiment peut être un réservoir ou une source de cuivre selon les conditions physico-chimiques. D'autres stress physiques tels que le colmatage et l'assèchement pourraient entraîner une désorption massive du cuivre. Le changement climatique auquel nous faisons face entraîne notamment une augmentation de la température de l'eau de surface (Marshall and Randhir, 2008). Ces changements de température pourraient entraîner un relargage de cuivre biodisponible toxique pour les organismes comme observé par Wu et al., (2017) pour le fer. Une augmentation du relargage de fer soluble liée à l'augmentation de la température a ainsi été montrée dans une carotte prélevée dans le réservoir Miyun en Chine (Wu et al., 2017). Pour aller plus loin dans l'étude des conséquences des stress physiques sur la biodisponibilité des métaux, des approches de modélisation pourraient faciliter les prédictions et les décisions pour les gestionnaires. Le Biotic Ligand Model (BLM) permet par exemple de prédire la spéciation/biodisponibilité des métaux pour les organismes en prenant en compte un certain nombre de paramètres de l'eau de surface (*e.g.* présence de ligands biotiques et abiotiques, compétition avec des cations, pH, température et alcalinité). Ce modèle repose sur l'hypothèse selon laquelle la toxicité d'un métal est dépendante de la part d'ions libres dans le milieu (modèle de l'ion libre – Morel 1983). Ce modèle applicable à l'eau de surface ne peut cependant être utilisé pour les sédiments puisqu'il ne prend notamment pas en compte la matière organique particulaire. Il peut en revanche être combiné à un modèle de partition entre eau interstitielle et sédiment pour prédire la toxicité des sédiments (Di Toro et al., 2005). Ces modèles sont à l'heure actuelle peu développés pour les sédiments et ne sont pour le moment pas simples à utiliser à des fins réglementaires (Väänänen et al., 2018). Il faudrait également intégrer les effets de stress physiques et les effets mélange avec d'autres contaminants à ces modèles (*e.g.* modèle multibiotique multimétallique – Santore and Ryan, 2015) pour se rapprocher de la réalité multi stress des cours d'eau. Les effets des stress physiques (assèchement et colmatage) sur la biodisponibilité du cuivre par exemple

pourraient être intégrés aux Biotic Ligand Model et comparés à des résultats obtenus sur le terrain par des prélèvements de sédiment afin de valider les résultats du modèle.

La zone hyporhéique joue un rôle de filtre pour les métaux. Les résultats obtenus au cours de cette thèse ont par exemple montré que le cuivre était capté dans les premiers centimètres de sédiments. Une atténuation du chrome dans un cours d'eau urbain en Écosse a également été mise en évidence à l'interface entre eau de surface et sédiments. Les concentrations moyennes de chrome passaient en effet de  $1100 \text{ mg.L}^{-1}$  dans l'eau de surface à  $5 \text{ mg.L}^{-1}$  dans l'eau interstitielle (Palumbo-Roe et al., 2017). La matière organique joue un rôle important dans la rétention des métaux mais d'autres ligands émergents pourraient interagir de manière importante avec ces composés. Des études montrent en effet que les microplastiques dont la présence augmente dans les sédiments des cours d'eau pourraient interagir avec les métaux (Holmes et al., 2014; Kumar et al., 2021). Les effets de ces interactions sur les communautés microbiennes du sédiment n'ont pas encore été étudiés à l'heure actuelle et nécessiteraient des efforts de recherche. Une seule étude en mésocosme a mis en évidence une augmentation de la biodisponibilité du plomb (spiking à  $445,56 \text{ mg kg}^{-1}$ ) pour les communautés microbiennes en présence de 5 et 10 % de polyéthylène dans des sédiments (Liu et al., 2020). Cette augmentation de la biodisponibilité du plomb a induit des modifications de la composition microbienne des sédiments sans pour autant affecter les activités enzymatiques étudiées (dehydrogenase, urease). En s'inspirant de cette expérience, les effets combinés du cuivre et des microplastiques sur la structure microbienne pourraient être évalués au cours d'une expérience en laboratoire.

Globalement, la zone hyporhéique joue donc un rôle de filtre important pour les métaux. En revanche, des contaminants plus mobiles comme les contaminants organiques peuvent atteindre les nappes phréatiques. Certains contaminants organiques sont connus pour s'adsorber aux sédiments (PCBs, HAPs) tandis que d'autres, plus hydrophiles, peuvent directement traverser la zone hyporhéique (certains pesticides, composés pharmaceutiques et vétérinaires). Des dosages chimiques et la modélisation de l'écoulement des eaux souterraines d'une rivière du Danemark ont par exemple permis de mettre en évidence le transport dans la zone hyporhéique de composés pharmaceutiques (sulfonamides, barbituriques et éthyle uréthane) provenant d'une ancienne usine pharmaceutique (Balbarini et al., 2020). Bien qu'il existe des études portant sur la fréquence et les

concentrations en contaminants retrouvés dans les nappes, leurs effets sur les communautés microbiennes en profondeur de la zone hyporhéique sont beaucoup moins explorés. Pour cela, des prélèvements sur le terrain pourraient être faits à différentes profondeurs de la zone hyporhéique (eau interstitielle et sédiment) notamment à l'amont et l'aval de sites susceptibles de rejeter ces polluants (station d'épuration, région agricole) afin d'évaluer, d'une part les polluants présents et d'autre part leurs effets sur les fonctions et la structure microbienne.

### **3. Vers une meilleure compréhension des effets combinés des stress physiques et chimiques dans les sédiments**

Les cours d'eau sont exposés à une multitude de stress physiques et chimiques. Les effets combinés de ces stress ne correspondent pas toujours à une addition des effets. Nos résultats ont montré qu'un stress dominait la plupart des réponses microbiennes dans le sédiment. Le colmatage en surface stimulait par exemple de manière importante toutes les activités microbiennes. Au contraire, le cuivre avait des effets négatifs peu marqués sur ces activités. L'assèchement diminuait la dénitrification et la respiration en surface tandis que les effets du cuivre étaient principalement observés sur les activités enzymatiques. Le modèle de dominance d'un stress pourrait être un des modèles les plus présent dans l'environnement. Une revue bibliographique de Morris et al., (2022) a en effet montré que les effets significatifs de la combinaison d'un réchauffement et d'autres stress environnementaux (296 combinaisons expérimentales) sur les écosystèmes d'eau douce étaient généralement liés à un seul stress. Les gestionnaires pourraient donc se focaliser sur le stress qui engendre le plus d'effet sur les organismes pour la restauration de la majorité des cours d'eau.

Bien que le modèle de dominance soit répandu dans l'environnement, des interactions (synergique ou antagoniste) peuvent avoir lieu entre les stress. Beaucoup d'efforts ont été faits pour mettre en évidence des relations synergiques entre stress. Ce type d'interaction est en effet particulièrement préoccupante pour les écosystèmes et nécessite donc des prédictions pour les gestionnaires des cours d'eau. Néanmoins les interactions antagonistes sont tout aussi présentes dans l'environnement. Après avoir recensé 840 combinaisons de stress, Tekin et al., (2020) ont par exemple conclu que l'antagonisme et l'addition des stress étaient plus fréquemment retrouvés dans la littérature que la synergie. En concordance avec

ces observations, le seul type d'interaction observé au cours de ma thèse est un effet antagoniste entre l'assèchement et le cuivre. En réduisant la biodisponibilité du cuivre, l'assèchement réduit les effets de ce métal sur la diversité bactérienne et archéale à la surface des colonnes de sédiment. Le même phénomène est observé à la profondeur intermédiaire pour l'activité beta-glucosidase. Pour aller plus loin dans la détection d'interaction, il pourrait être intéressant de tester des gradients de stress (concentration en cuivre, intensité d'assèchement et de colmatage). En effet l'intensité des stress peut faire varier le type d'interaction. Des interactions entre les effets de la salinité, la turbidité (stresseurs anthropiques), la température et le dénivelé (facteurs environnementaux) sur la richesse des macroinvertébrés (*Ephemeroptera*, *Plecoptera* and *Trichoptera*) ont par exemple été évaluées pour 4658 cours d'eau australiens (Kefford et al., 2022). Cette étude a montré que les gradients environnementaux faisaient varier les interactions du synergisme à l'antagonisme entre les différents stress.

Des études de terrain sont nécessaires pour aller plus loin que les 3 stress étudiés dans cette thèse et rendre compte des réponses microbiennes dans un environnement complexe. Une caractérisation des stress subis, de leurs interactions et des réponses microbiennes à différentes profondeurs du sédiment pourrait être mise en relation sur plusieurs sites en s'inspirant de protocoles développés pour les macro-invertébrés. Par exemple, au cours de l'étude de Lemm and Feld, (2017), 125 échantillons de macro invertébrés (*Ephemeroptera*, *Plecoptera* and *Trichoptera*) et des données d'hydromorphologie du site, de physico-chimie et les données de pressions liées à l'utilisation des terres ont été collectés dans un ensemble de rivières d'Europe centrale. Les interactions entre les principaux stress (utilisation des terres agricoles, occupation urbaine, sédiments fins, concentration en ortho-phosphate) ont été établies pour plusieurs traits des macro-invertébrés (*e.g.* respiration, alimentation, stades aquatiques, reproduction, durée du cycle de vie, taille) en utilisant un modèle de régression linéaire généralisé (GLM). Cette étude a permis de mettre en évidence des interactions antagoniste ou synergiques pour 20 % des combinaisons modélisées et une addition des effets pour 80 % d'entre elles. Leur méthodologie développée pour des macro-invertébrés pourrait être appliquée aux communautés microbiennes en utilisant des traits microbiens structurels ou fonctionnels (*e.g.* diversité microbienne, respiration, dénitrification, dégradation de litières de feuilles). En effet, l'avantage d'utiliser des micro-organismes est leur rôle écologique



important, une sensibilité importante aux contaminants et des capacités d'adaptation rapide aux changements dans leur environnement, ce qui en font un bon outil de diagnostic écologique.

Au-delà des interactions entre stress physiques et chimiques, les interactions entre micro-organismes sont peu prises en compte dans les processus d'évaluation écotoxicologique. Dans le cadre de la DCE, le seul indice microbien réglementaire prend seulement en compte les diatomées (Indice Biologique Diatomées – IBD) et ignore les interactions de ces organismes avec des compétiteurs (autres algues vertes et brunes) ou prédateurs (organismes brouteurs). Or, il serait intéressant de prendre davantage en compte les interactions multi espèces dans le cadre de l'exposition à des stress multiples afin de gagner en réalisme écologique. Un nouvel indice prenant en compte les interactions entre espèces (Mt-IBI) a par exemple été développé par Zhu et al., (2021). Les effets de constructions de barrages en série sur le microbiote benthique ont été évalués le long de la rivière Hanjiang en Chine. L'ADN environnemental des bactéries, protozoaires et métazoaires de 15 sites différents a été identifié par métabarcoding. Les résultats montrent que l'indice Mt-IBI était fortement lié à la présence de barrages (2,11-3,81 du côté du réservoir et 5,79 en aval sans construction de barrage). Cet indice pourrait être adapté pour prendre en compte les interactions entre stress multiples.

## IX- CONCLUSION

---

Dans un objectif global de restauration et préservation des cours d'eau, il est important de dépasser la dimension 2D de la rivière et de prendre en compte la dimension verticale des sédiments non seulement au niveau hydraulique mais aussi au niveau biologique. La compréhension des processus microbiens aux différentes profondeurs de la zone hyporhéique et leurs réponses aux stress combinés est en effet essentielle pour aider les gestionnaires des cours d'eau à prioriser leurs actions. Les connaissances apportées par ce travail de thèse s'inscrivent aussi dans un contexte plus large de recherche d'outil de diagnostic écologique. La modélisation facilement mise en œuvre par rapport à des études de terrain nécessite en effet la compréhension des effets des stress de manière expérimentale. L'approche en mésocosme développée au cours de cette thèse pourrait être mise à profit afin de mieux comprendre les interactions entre les stress, déterminer ceux qui ont le plus d'effets sur les communautés et leurs répercussions en profondeur.



---

# RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

---



## X- REFERENCES

---

- Aguirre, G., and Pilon, M. (2016). Copper Delivery to Chloroplast Proteins and its Regulation. *Front. Plant Sci.* 6, 1250. doi: 10.3389/fpls.2015.01250.
- Ahmadi, B., and Moradkhani, H. (2019). Revisiting hydrological drought propagation and recovery considering water quantity and quality. *Hydrol. Process.* 33, 1492–1505. doi: 10.1002/hyp.13417.
- Amalfitano, S., Fazi, S., Zoppini, A., Barra Caracciolo, A., Grenni, P., and Puddu, A. (2008). Responses of Benthic Bacteria to Experimental Drying in Sediments from Mediterranean Temporary Rivers. *Microb. Ecol.* 55, 270–279. doi: 10.1007/s00248-007-9274-6.
- Ann, V., Freixa, A., Butturini, A., and Romani, A. M. (2019). Interplay between sediment properties and stream flow conditions influences surface sediment organic matter and microbial biomass in a Mediterranean river. *Hydrobiologia* 828, 199–212. doi: 10.1007/s10750-018-3812-8.
- Arce, M. I., Bengtsson, M. M., von Schiller, D., Zak, D., Täumer, J., Urich, T., et al. (2021). Desiccation time and rainfall control gaseous carbon fluxes in an intermittent stream. *Biogeochemistry* 155, 381–400. doi: 10.1007/s10533-021-00831-6.
- Arias-Real, R., Gutierrez-Canovas, C., Munoz, I., Pascoal, C., and Menendez, M. (2022). Fungal Biodiversity Mediates the Effects of Drying on Freshwater Ecosystem Functioning. *Ecosystems* 25, 780–794. doi: 10.1007/s10021-021-00683-z.
- Arias-Real, R., Muñoz, I., Gutierrez-Cánovas, C., Granados, V., Lopez-Laseras, P., and Menéndez, M. (2020). Subsurface zones in intermittent streams are hotspots of microbial decomposition during the non-flow period. *Sci. Total Environ.* 703, 135485. doi: 10.1016/j.scitotenv.2019.135485.
- Aristi, I., Casellas, M., Elosegi, A., Insa, S., Petrovic, M., Sabater, S., et al. (2016). Nutrients versus emerging contaminants—Or a dynamic match between subsidy and stress effects on stream biofilms. *Environ. Pollut.* 212, 208–215. doi: 10.1016/j.envpol.2016.01.067.
- Aronesty, E., (2011). *ea-utils* : "Command-line tools for processing biological sequencing data"; <https://github.com/ExpressionAnalysis/ea-utils>
- Atkinson, C. A., Jolley, D. F., and Simpson, S. L. (2007). Effect of overlying water pH, dissolved oxygen, salinity and sediment disturbances on metal release and sequestration from metal contaminated marine sediments. *Chemosphere* 69, 1428–1437. doi: 10.1016/j.chemosphere.2007.04.068.
- Azarbad, H., van Gestel, C., Niklińska, M., Laskowski, R., Röling, W., and van Straalen, N. (2016). Resilience of Soil Microbial Communities to Metals and Additional Stressors: DNA-Based Approaches for Assessing “Stress-on-Stress” Responses. *Int. J. Mol. Sci.* 17, 933. doi: 10.3390/ijms17060933.
- Baatrup-Pedersen, A., Larsen, S. E., Rasmussen, J. J., and Riis, T. (2019). The future of European water management: Demonstration of a new WFD compliant framework to support sustainable management under multiple stress. *Sci. Total Environ.* 654, 53–59. doi: 10.1016/j.scitotenv.2018.11.008.

- Baborowski, M., von Tumpling, W., and Friese, K. (2004). Behaviour of suspended particulate matter (SPM) and selected trace metals during the 2002 summer flood in the River Elbe (Germany) at Magdeburg monitoring station. *Hydrol. Earth Syst. Sci.* 8, 135–150. doi: 10.5194/hess-8-135-2004.
- Baker-Austin, C., Wright, M. S., Stepanauskas, R., and McArthur, J. V. (2006). Co-selection of antibiotic and metal resistance. *Trends Microbiol.* 14, 176–182. doi: 10.1016/j.tim.2006.02.006.
- Balbarini, N., Frederiksen, M., Rønde, V., Møller, I., Sonne, A. T., McKnight, U. S., et al. (2020). Assessing the Transport of Pharmaceutical Compounds in a Layered Aquifer Discharging to a Stream. *Groundwater* 58, 208–223. doi: 10.1111/gwat.12904.
- Barbosa, M., Inocentes, N., Soares, A. M. V. M., and Oliveira, M. (2017). Synergy effects of fluoxetine and variability in temperature lead to proportionally greater fitness costs in *Daphnia*: A multigenerational test. *Aquat. Toxicol.* 193, 268–275. doi: 10.1016/j.aquatox.2017.10.017.
- Besaury, L., Pawlak, B., and Quillet, L. (2016). Expression of copper-resistance genes in microbial communities under copper stress and oxic/anoxic conditions. *Environ. Sci. Pollut. Res.* 23, 4013–4023. doi: 10.1007/s11356-014-3254-4.
- Billard, E., Domaizon, I., Tissot, N., Arnaud, F., and Lyautey, E. (2015). Multi-scale phylogenetic heterogeneity of archaea, bacteria, methanogens and methanotrophs in lake sediments. *Hydrobiologia* 751, 159–173. doi: 10.1007/s10750-015-2184-6.
- Blanck, H., Wängberg, S.-Å., and Molander, S. (1988). Pollution-Induced Community Tolerance—A New Ecotoxicological Tool. in *Functional Testing of Aquatic Biota for Estimating Hazards of Chemicals* (ASTM International), 219–230. doi: 10.1520/STP26265S.
- Bokulich, N. A., Subramanian, S., Faith, J. J., Gevers, D., Gordon, J. I., Knight, R., et al. (2013). Quality-filtering vastly improves diversity estimates from Illumina amplicon sequencing. *Nat. Methods* 10, 57–59. doi: 10.1038/nmeth.2276.
- Bolger, A. M., Lohse, M., and Usadel, B. (2014). Trimmomatic: a flexible trimmer for Illumina sequence data. *Bioinformatics* 30, 2114–2120. doi: 10.1093/bioinformatics/btu170.
- Borkow, G., and Gabbay, J. (2005). Copper as a Biocidal Tool. *Curr. Med. Chem.* 12, 2163–2175. DOI: 10.2174/0929867054637617
- Borton, M. A., Hoyt, D. W., Roux, S., Daly, R. A., Welch, S. A., Nicora, C. D., et al. (2018). Coupled laboratory and field investigations resolve microbial interactions that underpin persistence in hydraulically fractured shales. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 115, E6585–E6594. doi: 10.1073/pnas.1800155115.
- Boulton, A. J., Findlay, S., Marmonier, P., Stanley, E. H., and Valett, H. M. (1998). THE FUNCTIONAL SIGNIFICANCE OF THE HYPORHEIC ZONE IN STREAMS AND RIVERS. *Annu. Rev. Ecol. Syst.* 29, 59–81. doi: 10.1146/annurev.ecolsys.29.1.59.
- Brook, B. W., Sodhi, N. S., and Bradshaw, C. J. A. (2008). Synergies among extinction drivers under global change. *Trends Ecol. Evol.* 23, 453–460. doi: 10.1016/j.tree.2008.03.011.

- Brown, C. J., Saunders, M. I., Possingham, H. P., and Richardson, A. J. (2013). Managing for Interactions between Local and Global Stressors of Ecosystems. *PLOS ONE* 8, e65765. doi: 10.1371/journal.pone.0065765.
- Bruder, A., Salis, R. K., McHugh, N. J., and Matthaei, C. D. (2016). Multiple-stressor effects on leaf litter decomposition and fungal decomposers in agricultural streams contrast between litter species. *Funct. Ecol.* 30, 1257–1266. doi: 10.1111/1365-2435.12598.
- Brunke, M., and Gonser, T. (1997). The ecological significance of exchange processes between rivers and groundwater. *Freshw. Biol.* 37, 1–33. doi: 10.1046/j.1365-2427.1997.00143.x.
- Carrier-Belleau, C., Drolet, D., McKindsey, C. W., and Archambault, P. (2021). Environmental stressors, complex interactions and marine benthic communities' responses. *Sci. Rep.* 11, 4194. doi: 10.1038/s41598-021-83533-1.
- Carvalho, L., Mackay, E. B., Cardoso, A. C., Baattrup-Pedersen, A., Birk, S., Blackstock, K. L., et al. (2019). Protecting and restoring Europe's waters: An analysis of the future development needs of the Water Framework Directive. *Sci. Total Environ.* 658, 1228–1238. doi: 10.1016/j.scitotenv.2018.12.255.
- Cedergreen, N., Abbaspoor, M., Sørensen, H., and Streibig, J. C. (2007). Is mixture toxicity measured on a biomarker indicative of what happens on a population level? A study with *Lemna minor*. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 67, 323–332. doi: 10.1016/j.ecoenv.2006.12.006.
- Cenini, V. L., Fornara, D. A., McMullan, G., Ternan, N., Carolan, R., Crawley, M. J., et al. (2016). Linkages between extracellular enzyme activities and the carbon and nitrogen content of grassland soils. *Soil Biol. Biochem.* 96, 198–206. doi: 10.1016/j.soilbio.2016.02.015.
- Chara-Serna, A. M., and Richardson, J. S. (2021). Multiple-Stressor Interactions in Tributaries Alter Downstream Ecosystems in Stream Mesocosm Networks. *Water* 13, 1194. doi: 10.3390/w13091194.
- Chen, J., and Strous, M. (2013). Denitrification and aerobic respiration, hybrid electron transport chains and co-evolution. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Bioenerg.* 1827, 136–144. doi: 10.1016/j.bbabi.2012.10.002.
- Chen, X., Chen, J., Yu, X., Sanganyado, E., Wang, L., Li, P., et al. (2022). Effects of norfloxacin, copper, and their interactions on microbial communities in estuarine sediment. *Environ. Res.* 212, 113506. doi: 10.1016/j.envres.2022.113506.
- Chu, B. T. T., Petrovich, M. L., Chaudhary, A., Wright, D., Murphy, B., Wells, G., et al. (2018). Metagenomics Reveals the Impact of Wastewater Treatment Plants on the Dispersal of Microorganisms and Genes in Aquatic Sediments. *Appl. Environ. Microbiol.* 84, e02168-17. doi: 10.1128/AEM.02168-17.
- Ciszewski, D., and Grygar, T. M. (2016). A Review of Flood-Related Storage and Remobilization of Heavy Metal Pollutants in River Systems. *Water, Air, Soil Pollut.* 227, 239. doi: 10.1007/s11270-016-2934-8.
- Clements, W. H., Kashian, D. R., Kiffney, P. M., and Zuellig, R. E. (2016). Perspectives on the context-dependency of stream community responses to contaminants. *Freshw. Biol.* 61, 2162–2170. doi: 10.1111/fwb.12599.



- Colas, F., Baudoin, J.-M., Chauvet, E., Clivot, H., Danger, M., Guérold, F., et al. (2016). Dam-associated multiple-stressor impacts on fungal biomass and richness reveal the initial signs of ecosystem functioning impairment. *Ecol. Indic.* 60, 1077–1090. doi: 10.1016/j.ecolind.2015.08.027.
- Comber, S., Deviller, G., Wilson, I., Peters, A., Merrington, G., Borrelli, P., et al. (2022). Sources of copper into the European aquatic environment. *Integr. Environ. Assess. Manag.* n/a. doi: 10.1002/ieam.4700.
- Corcoll, N., Casellas, M., Huerta, B., Guasch, H., Acuna, V., Rodriguez-Mozaz, S., et al. (2015). Effects of flow intermittency and pharmaceutical exposure on the structure and metabolism of stream biofilms. *Sci. Total Environ.* 503, 159–170. doi: 10.1016/j.scitotenv.2014.06.093.
- Côté, I. M., Darling, E. S., and Brown, C. J. (2016). Interactions among ecosystem stressors and their importance in conservation. *Proc. R. Soc. B Biol. Sci.* 283, 20152592. doi: 10.1098/rspb.2015.2592.
- Coulson, L. E., Schelker, J., Attermeyer, K., Griebler, C., Hein, T., and Weigelhofer, G. (2021). Experimental desiccation indicates high moisture content maintains hyporheic biofilm processes during drought in temperate intermittent streams. *Aquat. Sci.* 83, 46. doi: 10.1007/s00027-021-00799-3.
- Courcoul, C., Leflaive, J., Ferriol, J., and Bouletreau, S. (2022). The sensitivity of aquatic microbial communities to a complex agricultural contaminant depends on previous drought conditions. *Water Res.* 217, 118396. doi: 10.1016/j.watres.2022.118396.
- Crain, C. M., Kroeker, K., and Halpern, B. S. (2008). Interactive and cumulative effects of multiple human stressors in marine systems. *Ecol. Lett.* 11, 1304–1315. doi: 10.1111/j.1461-0248.2008.01253.x.
- Crutzen, P. J. (2006). “The ‘Anthropocene,’” in *Earth System Science in the Anthropocene*, eds. E. Ehlers and T. Krafft (Berlin, Heidelberg: Springer), 13–18. doi: 10.1007/3-540-26590-2\_3.
- D. Vinebrooke, R., L. Cottingham, K., Norberg, J., Marten Scheffer, I. Dodson, S., C. Maberly, S., and Sommer, U. (2004). Impacts of multiple stressors on biodiversity and ecosystem functioning: the role of species co-tolerance. *Oikos* 104, 451–457. doi: 10.1111/j.0030-1299.2004.13255.x.
- Darling, E. S., and Cote, I. M. (2008). Quantifying the evidence for ecological synergies. *Ecol. Lett.* 11, 1278–1286. doi: 10.1111/j.1461-0248.2008.01243.x.
- Datry, T., Dole-Olivier, M. J., Marmonier, P., Claret, C., Perrin, J. F., Lafont, M., et al. (2008). La zone hyporhéique, une composante à ne pas négliger dans l'état des lieux et la restauration des cours d'eau. 17.
- Dauwe, B., Middelburg, J. J., and Herman, P. M. J. (2001). Effect of oxygen on the degradability of organic matter in subtidal and intertidal sediments of the North Sea area. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 215, 13–22. doi: 10.3354/meps215013.
- de Boer, T. E., Tas, N., Braster, M., Temminghoff, E. J. M., Roling, W. F. M., and Roelofs, D. (2012). The Influence of Long-Term Copper Contaminated Agricultural Soil at Different pH Levels on Microbial Communities and Springtail Transcriptional Regulation. *Environ. Sci. Technol.* 46, 60–68. doi: 10.1021/es2013598.

- Descloux, S., Datry, T., Philippe, M., and Marmonier, P. (2010). Comparison of Different Techniques to Assess Surface and Subsurface Streambed Colmation with Fine Sediments. *Int. Rev. Hydrobiol.* 95, 520–540. doi: 10.1002/iroh.201011250.
- Di Cesare, A., Eckert, E. M., and Corno, G. (2016). Co-selection of antibiotic and heavy metal resistance in freshwater bacteria. *J. Limnol.* 75, 59–66. doi: 10.4081/jlimnol.2016.1198.
- Di Toro, D. M., McGrath, J. A., Hansen, D. J., Berry, W. J., Paquin, P. R., Mathew, R., et al. (2005). Predicting sediment metal toxicity using a sediment biotic ligand model: methodology and initial application. *Environ. Toxicol. Chem.* 24, 2410–2427. doi: 10.1897/04-413r.1.
- Djoko, K. Y., Goytia, M. M., Donnelly, P. S., Schembri, M. A., Shafer, W. M., and McEwan, A. G. (2015). Copper(II)-Bis(Thiosemicarbazonato) Complexes as Antibacterial Agents: Insights into Their Mode of Action and Potential as Therapeutics. *Antimicrob. Agents Chemother.* 59, 6444–6453. doi: 10.1128/AAC.01289-15.
- Donato, M., Johnson, O., Steven, B., and Lawrence, B. A. (2020). Nitrogen enrichment stimulates wetland plant responses whereas salt amendments alter sediment microbial communities and biogeochemical responses. *PLOS ONE* 15, e0235225. doi: 10.1371/journal.pone.0235225.
- Dudgeon, D. (2010). Prospects for sustaining freshwater biodiversity in the 21st century: linking ecosystem structure and function. *Curr. Opin. Environ. Sustain.* 2, 422–430. doi: 10.1016/j.cosust.2010.09.001.
- Dudgeon, D., Arthington, A. H., Gessner, M. O., Kawabata, Z.-I., Knowler, D. J., Leveque, C., et al. (2006). Freshwater biodiversity: importance, threats, status and conservation challenges. *Biol. Rev.* 81, 163–182. doi: 10.1017/S1464793105006950.
- Dumestre, A., Sauvé, S., McBride, M., Baveye, P., and Berthelin, J. (1999). Copper speciation and microbial activity in long-term contaminated soils. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 36, 124–131. doi: 10.1007/s002449900451.
- El Azzi, D., Viers, J., Guiesse, M., Probst, A., Aubert, D., Caparros, J., et al. (2013). Origin and fate of copper in a small Mediterranean vineyard catchment: New insights from combined chemical extraction and delta Cu-65 isotopic composition. *Sci. Total Environ.* 463, 91–101. doi: 10.1016/j.scitotenv.2013.05.058.
- Eriksen, RS., Nowak, B., & Van Dam, RA., (2001) Copper speciation and toxicity in contaminated estuary. SUPervising Scientist Report 163, *Supervising Scientist, Darwin*
- Fagervold, S. K., Bourgeois, S., Pruski, A. M., Charles, F., Kerherve, P., Vetion, G., et al. (2014). River organic matter shapes microbial communities in the sediment of the Rhone prodelta. *ISME J.* 8, 2327–2338. doi: 10.1038/ismej.2014.86.
- Febria, C. M., Beddoes, P., Fulthorpe, R. R., and Williams, D. D. (2012). Bacterial community dynamics in the hyporheic zone of an intermittent stream. *ISME J.* 6, 1078–1088. doi: 10.1038/ismej.2011.173.
- Fenchel, T., and Finlay, B. (2008). Oxygen and the Spatial Structure of Microbial Communities. *Biol. Rev.* 83, 553–569. doi:10.1111/j.1469-185X.2008.00054.x.

- Feris, K. P., Ramsey, P. W., Frazar, C., Rillig, M., Moore, J. N., Gannon, J. E., et al. (2004). Seasonal Dynamics of Shallow-Hyporheic-Zone Microbial Community Structure along a Heavy-Metal Contamination Gradient. *Appl. Environ. Microbiol.* 70, 2323–2331. doi: 10.1128/AEM.70.4.2323-2331.2004.
- Fernandez, D., Voss, K., Bundschuh, M., Zubrod, J. P., and Schaefer, R. B. (2015). Effects of fungicides on decomposer communities and litter decomposition in vineyard streams. *Sci. Total Environ.* 533, 40–48. doi: 10.1016/j.scitotenv.2015.06.090.
- Fernández-Calviño, D., Rodríguez-Suárez, J. A., López-Periago, E., Arias-Estévez, M., and Simal-Gándara, J. (2008). Copper content of soils and river sediments in a winegrowing area, and its distribution among soil or sediment components. *Geoderma* 145, 91–97. doi: 10.1016/j.geoderma.2008.02.011.
- Findlay, S. (2010). Stream microbial ecology. *J. North Am. Benthol. Soc.* doi: 10.1899/09-023.1.
- Fischer, H., Kloep, F., Wilzcek, S., and Pusch, M. T. (2005). A River's Liver – Microbial Processes within the Hyporheic Zone of a Large Lowland River. *Biogeochemistry* 76, 349–371. doi: 10.1007/s10533-005-6896-y.
- Folt, C. L., Chen, C. Y., Moore, M. V., and Burnaford, J. (1999). Synergism and antagonism among multiple stressors. *Limnol. Oceanogr.* 44, 864–877. doi: 10.4319/lo.1999.44.3\_part\_2.0864.
- Font, R. A., Khamis, K., Milner, A. M., Smith, G. H. S., and Ledger, M. E. (2021). Low flow and heatwaves alter ecosystem functioning in a stream mesocosm experiment. *Sci. Total Environ.* 777, 146067. doi: 10.1016/j.scitotenv.2021.146067.
- Foulquier, A., Volat, B., Neyra, M., Bornette, G., and Montuelle, B. (2013). Long-term impact of hydrological regime on structure and functions of microbial communities in riverine wetland sediments. *FEMS Microbiol. Ecol.* 85, 211–226. doi: 10.1111/1574-6941.12112.
- Freitas, J., Duarte, B., and Caçador, I. (2014). Biogeochemical drivers of phosphatase activity in salt marsh sediments. *J. Sea Res.* 93, 57–62. doi: 10.1016/j.seares.2014.04.002.
- Freixa, A., Acuña, V., Casellas, M., Pecheva, S., and Romaní, A. M. (2017). Warmer night-time temperature promotes microbial heterotrophic activity and modifies stream sediment community. *Glob. Change Biol.* 23, 3825–3837. doi: 10.1111/gcb.13664.
- Freixa, A., Rubol, S., Carles-Brangari, A., Fernandez-Garcia, D., Butturini, A., Sanchez-Vila, X., et al. (2016). The effects of sediment depth and oxygen concentration on the use of organic matter: An experimental study using an infiltration sediment tank. *Sci. Total Environ.* 540, 20–31. doi: 10.1016/j.scitotenv.2015.04.007.
- Fromin, N., Pinay, G., Montuelle, B., Landais, D., Ourcival, J. M., Joffre, R., et al. (2010). Impact of seasonal sediment desiccation and rewetting on microbial processes involved in greenhouse gas emissions. *Ecohydrology* 3, 339–348. doi: 10.1002/eco.115.
- Fuller, C. C., and Harvey, J. W. (2000). Reactive Uptake of Trace Metals in the Hyporheic Zone of a Mining-Contaminated Stream, Pinal Creek, Arizona. *Environ. Sci. Technol.* 34, 1150–1155. doi: 10.1021/es990714d.

- Galic, N., Sullivan, L. L., Grimm, V., and Forbes, V. E. (2018). When things don't add up: quantifying impacts of multiple stressors from individual metabolism to ecosystem processing. *Ecol. Lett.* 21, 568–577. doi: 10.1111/ele.12923.
- Gandy, C. J., Smith, J. W. N., and Jarvis, A. P. (2007). Attenuation of mining-derived pollutants in the hyporheic zone: A review. *Sci. Total Environ.* 373, 435–446. doi: 10.1016/j.scitotenv.2006.11.004.
- García-Ortega, S., Holliman, P. J., and Jones, D. L. (2011). Effects of salinity, DOM and metals on the fate and microbial toxicology of propetamphos formulations in river and estuarine sediment. *Chemosphere* 83, 1117–1123. doi: 10.1016/j.chemosphere.2011.01.030.
- Gayraud, S., Herouin, E., and Philippe, M. (2002). The clogging of stream beds: A review of mechanisms and consequences on habitats and macroinvertebrate communities. *Bull. Francais Peche Piscic.*, 339–355. doi: 10.1051/kmae:2002039.
- Gionchetta, G., Oliva, F., Menendez, M., Lopez Laseras, P., and Romani, A. M. (2019a). Key role of streambed moisture and flash storms for microbial resistance and resilience to long-term drought. *Freshw. Biol.* 64, 306–322. doi: 10.1111/fwb.13218.
- Gionchetta, G., Romani, A. M., Oliva, F., and Artigas, J. (2019b). Distinct responses from bacterial, archaeal and fungal streambed communities to severe hydrological disturbances. *Sci. Rep.* 9, 13506. doi: 10.1038/s41598-019-49832-4.
- Gómez, R., Arce, M. I., Sánchez, J. J., and del Mar Sánchez-Montoya, M. (2012). The effects of drying on sediment nitrogen content in a Mediterranean intermittent stream: a microcosms study. *Hydrobiologia* 679, 43–59. doi: 10.1007/s10750-011-0854-6.
- Grattan, J. P., Adams, R. B., Friedman, H., Gilbertson, D. D., Haylock, K. I., Hunt, C. O., et al. (2016). The first polluted river? Repeated copper contamination of fluvial sediments associated with Late Neolithic human activity in southern Jordan. *Sci. Total Environ.* 573, 247–257. doi: 10.1016/j.scitotenv.2016.08.106.
- Gray, A. D., and Bernhardt, E. (2022). Are nitrogen and carbon cycle processes impacted by common stream antibiotics? A comparative assessment of single vs. mixture exposures. *PLoS One* 17, e0261714. doi: 10.1371/journal.pone.0261714.
- Greenberg, M. S., Burton, G. A., and Rowland, C. D. (2002). Optimizing interpretation of in situ effects of riverine pollutants: Impact of upwelling and downwelling. *Environ. Toxicol. Chem.* 21, 289–297. doi: 10.1897/1551-5028(2002)021<0289:OIOISE>2.0.CO;2.
- Guo, X., Liu, X., Niu, Z., Lu, D., Zhao, S., Sun, X., et al. (2018). Seasonal and spatial distribution of antibiotic resistance genes in the sediments along the Yangtze Estuary, China. *Environ. Pollut.* 242, 576–584. doi: 10.1016/j.envpol.2018.06.099.
- Hancock, P. J. (2002). Human Impacts on the Stream-Groundwater Exchange Zone. *Environ. Manage.* 29, 763–781. doi: 10.1007/s00267-001-0064-5.
- Harjung, A., Perujo, N., Butturini, A., Romani, A. M., and Sabater, F. (2019). Responses of microbial activity in hyporheic pore water to biogeochemical changes in a drying headwater stream. *Freshw. Biol.* 64, 735–749. doi: 10.1111/fwb.13258.

- Hermans, S. M., Buckley, H. L., Case, B. S., and Lear, G. (2020). Connecting through space and time: catchment-scale distributions of bacteria in soil, stream water and sediment. *Environ. Microbiol.* 22, 1000–1010. doi: 10.1111/1462-2920.14792.
- Holmes, L. A., Turner, A., and Thompson, R. C. (2014). Interactions between trace metals and plastic production pellets under estuarine conditions. *Mar. Chem.* 167, 25–32. doi: 10.1016/j.marchem.2014.06.001.
- Horowitz, A. J., and Elrick, K. A. (1987). The relation of stream sediment surface area, grain size and composition to trace element chemistry. *Appl. Geochem.* 2, 437–451. doi: 10.1016/0883-2927(87)90027-8.
- Huang, M., Zhou, M., Li, Z., Ding, X., Wen, J., Jin, C., et al. (2022). How do drying-wetting cycles influence availability of heavy metals in sediment? A perspective from DOM molecular composition. *Water Res.* 220, 118671. doi: 10.1016/j.watres.2022.118671.
- Jaeger, A., Coll, C., Posselt, M., Mechelke, J., Rutere, C., Betterle, A., et al. (2019). Using recirculating flumes and a response surface model to investigate the role of hyporheic exchange and bacterial diversity on micropollutant half-lives. *Environ. Sci. Process. Impacts* 21, 2093–2108. doi: 10.1039/C9EM00327D.
- Jaiswal, D., Pandey, U., Mishra, V., and Pandey, J. (2021). Integrating resilience with functional ecosystem measures: A novel paradigm for management decisions under multiple-stressor interplay in freshwater ecosystems. *Glob. Change Biol.* 27, 3699–3717. doi: 10.1111/gcb.15662.
- Johnston, P., G., Kalik, Z., and Johnston, C. G. (2016). Effect of carbonyl cyanide m-chlorophenylhydrazone (CCCP) on microbial activity and polycyclic aromatic hydrocarbons (PAH) degradation in contaminated river sediments. *Environ. Earth Sci.* 75, 778. doi: 10.1007/s12665-016-5568-7.
- Juvigny-Khenafou, N. P. D., Piggott, J. J., Atkinson, D., Zhang, Y., Wu, N., and Matthaei, C. D. (2021). Fine sediment and flow velocity impact bacterial community and functional profile more than nutrient enrichment. *Ecol. Appl.* 31, e02212. doi: 10.1002/eap.2212.
- Kassambara, A. (2023). rstatix: Pipe-Friendly Framework for Basic - Statistical Tests. R package version 0.7.2. <https://CRAN.R-project.org/package=rstatix>
- Kefford, B. J., Nichols, S. J., and Duncan, R. P. (2022). The cumulative impacts of anthropogenic stressors vary markedly along environmental gradients. *Glob. Change Biol.* doi: 10.1111/gcb.16435.
- Kergoat, L., Dabrin, A., Masson, M., Datry, T., and Bonnineau, C. (2023). Clogging modulates the copper effects on microbial communities of streambed sediments. *Ecotoxicology* 32, 321–335. doi: 10.1007/s10646-023-02641-y.
- Kim, S., Yang, D. S., and Kim, Y. S. (2020). Distribution of metal contamination and grain size in the sediments of Nakdong River, Korea. *Environ. Monit. Assess.* 192, 502. doi: 10.1007/s10661-020-08475-z.

- Knox, A. S., Paller, M. H., Nelson, E. A., Specht, W. L., Halverson, N. V., and Gladden, J. B. (2006). Metal distribution and stability in constructed wetland sediment. *J. Environ. Qual.* 35, 1948–1959. doi: 10.2134/jeq2006.0017.
- Kozich, J. J., Westcott, S. L., Baxter, N. T., Highlander, S. K., and Schloss, P. D. (2013). Development of a Dual-Index Sequencing Strategy and Curation Pipeline for Analyzing Amplicon Sequence Data on the MiSeq Illumina Sequencing Platform. *Appl. Environ. Microbiol.* 79, 5112. doi: 10.1128/AEM.01043-13.
- Krause, S., Lewandowski, J., Grimm, N. B., Hannah, D. M., Pinay, G., McDonald, K., et al. (2017). Ecohydrological interfaces as hot spots of ecosystem processes. *Water Resour. Res.* 53, 6359–6376. doi: 10.1002/2016WR019516.
- Kumar, R., Sharma, P., Manna, C., and Jain, M. (2021). Abundance, interaction, ingestion, ecological concerns, and mitigation policies of microplastic pollution in riverine ecosystem: A review. *Sci. Total Environ.* 782, 146695. doi: 10.1016/j.scitotenv.2021.146695.
- Lake, P. S. (2003). Ecological effects of perturbation by drought in flowing waters. *Freshw. Biol.* 48, 1161–1172. doi: 10.1046/j.1365-2427.2003.01086.x.
- Lambert, A. S., Dabrin, A., Morin, S., Gahou, J., Foulquier, A., Coquery, M., et al. (2016). Temperature modulates phototrophic periphyton response to chronic copper exposure. *Environ. Pollut.* 208, 821–829. doi: 10.1016/j.envpol.2015.11.004.
- Lavorel, S., and Garnier, E. (2002). Predicting changes in community composition and ecosystem functioning from plant traits: revisiting the Holy Grail. *Funct. Ecol.* 16, 545–556. doi: 10.1046/j.1365-2435.2002.00664.x.
- Lefebvre, S., Marmonier, P., and Pinay, G. (2004). Stream regulation and nitrogen dynamics in sediment interstices: comparison of natural and straightened sectors of a third-order stream. *River Res. Appl.* 20, 499–512. doi: 10.1002/rra.765.
- Lemire, J. A., Harrison, J. J., and Turner, R. J. (2013). Antimicrobial activity of metals: mechanisms, molecular targets and applications. *Nat. Rev. Microbiol.* 11, 371–384. doi: 10.1038/nrmicro3028.
- Lemm, J. U., and Feld, C. K. (2017). Identification and interaction of multiple stressors in central European lowland rivers. *Sci. Total Environ.* 603–604, 148–154. doi: 10.1016/j.scitotenv.2017.06.092.
- Lewandowski, J., Arnon, S., Banks, E., Batelaan, O., Betterle, A., Broecker, T., et al. (2019). Is the Hyporheic Zone Relevant beyond the Scientific Community? *Water* 11, 2230. doi: 10.3390/w11112230.
- Lewis, J., and Sjöström, J. (2010). Optimizing the experimental design of soil columns in saturated and unsaturated transport experiments. *J. Contam. Hydrol.* 115, 1–13. doi: 10.1016/j.jconhyd.2010.04.001.
- Li, J., Wang, J.-T., Hu, H.-W., Ma, Y.-B., Zhang, L.-M., and He, J.-Z. (2016). Copper pollution decreases the resistance of soil microbial community to subsequent dry-rewetting disturbance. *J. Environ. Sci.* 39, 155–164. doi: 10.1016/j.jes.2015.10.009.

- Liu, C., Kong, M., Zhang, L., Chen, K., Gu, X., and Hao, X. (2020). Metal bioavailability during the periodic drying and rewetting process of littoral anoxic sediment. *J. Soils Sediments* 20, 2949–2959. doi: 10.1007/s11368-020-02634-y.
- Llases, M.-E., Morgada, M. N., and Vila, A. J. (2019). Biochemistry of Copper Site Assembly in Heme-Copper Oxidases: A Theme with Variations. *Int. J. Mol. Sci.* 20, 3830. doi: 10.3390/ijms20153830.
- Loire, R., Piégay, H., Malavoi, J.-R., Kondolf, G. M., and Melun, G. (2020). Les lâchers morphogènes depuis un barrage justification opérationnelle et protocole d'intervention. *Houille Blanche* 106, 66–75. doi: 10.1051/lhb/2020030.
- Loskotová, B., Straka, M., and Pařil, P. (2019). Sediment characteristics influence benthic macroinvertebrate vertical migrations and survival under experimental water loss conditions. *Fundam. Appl. Limnol.* 193, 39–49. doi: 10.1127/fal/2019/1138.
- Lu, Y., and Allen, H. E. (2001). Partitioning of copper onto suspended particulate matter in river waters. *Sci. Total Environ.* 277, 119–132. doi: 10.1016/S0048-9697(00)00868-8.
- Luo, X., Xiang, X., Yang, Y., Huang, G., Fu, K., Che, R., et al. (2020). Seasonal effects of river flow on microbial community coalescence and diversity in a riverine network. *Fems Microbiol. Ecol.* 96, fiae132. doi: 10.1093/femsec/fiae132.
- Lyautey, E., Cournet, A., Morin, S., Boulêtreau, S., Etcheverry, L., Charcosset, J.-Y., et al. (2011). Electroactivity of Phototrophic River Biofilms and Constitutive Cultivable Bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.* 77, 5394–5401. doi: 10.1128/AEM.00500-11.
- Lynch, S. F. L., Batty, L. C., and Byrne, P. (2014). Environmental Risk of Metal Mining Contaminated River Bank Sediment at Redox-Transitional Zones. *Minerals* 4, 52–73. doi: 10.3390/min4010052.
- MacDonald, D. D., Ingersoll, C. G., and Berger, T. A. (2000). Development and Evaluation of Consensus-Based Sediment Quality Guidelines for Freshwater Ecosystems. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 39, 20–31. doi: 10.1007/s002440010075.
- Magalhães, C. M., Machado, A., Matos, P., and Bordalo, A. A. (2011). Impact of copper on the diversity, abundance and transcription of nitrite and nitrous oxide reductase genes in an urban European estuary: Impact of copper on denitrifier diversity and function. *FEMS Microbiol. Ecol.* 77, 274–284. doi: 10.1111/j.1574-6941.2011.01107.x.
- Mahé, F., Rognes, T., Quince, C., de Vargas, C., and Dunthorn, M. (2015). Swarm v2: highly-scalable and high-resolution amplicon clustering. *PeerJ* 3, e1420. doi: 10.7717/peerj.1420.
- Mahamoud Ahmed, A., Lyautey, E., Bonnineau, C., Dabrin, A., and Pesce, S. (2018). Environmental Concentrations of Copper, Alone or in Mixture With Arsenic, Can Impact River Sediment Microbial Community Structure and Functions. *Front. Microbiol.* 9, 1852. doi: 10.3389/fmicb.2018.01852.
- Mahamoud Ahmed, A., Tardy, V., Bonnineau, C., Billard, P., Pesce, S., and Lyautey, E. (2020). Changes in sediment microbial diversity following chronic copper-exposure induce community copper-tolerance without increasing sensitivity to arsenic. *J. Hazard. Mater.* 391, 122197. doi: 10.1016/j.jhazmat.2020.122197.

- Malard, F., and Hervant, F. (1999). Oxygen supply and the adaptations of animals in groundwater. *Freshw. Biol.* 41, 1–30. doi: 10.1046/j.1365-2427.1999.00379.x.
- Malard, F., Ward, J. V., and Robinson, C. T. (2000). “An expanded perspective of the hyporheic zone,” in *International Association of Theoretical and Applied Limnology, Vol 27, Pt 1, Proceedings*, ed. W. D. Williams (Stuttgart: E Schweizerbart’sche Verlagsbuchhandlung), 431–437.
- Malish, M. C., Gao, S., Kopp, D., Hong, Y., Allen, D. C., and Neeson, T. (2023). Small increases in stream drying can dramatically reduce ecosystem connectivity. *Ecosphere* 14, e4450. doi: 10.1002/ecs2.4450.
- Mancioppi, L., Padox, J. M., Hennebert, P., (2010). Qualité chimique des sédiments fluviaux en France. Synthèse des bases de données disponibles. RAPPORT D’ÉTUDE 03/06/2010. N° INERIS-DRC-10-105335-04971A
- Mansour, I., Heppell, C. M., Ryo, M., and Rillig, M. C. (2018). Application of the microbial community coalescence concept to riverine networks. *Biol. Rev.* 93, 1832–1845. doi: 10.1111/brv.12422.
- Marshall, E., and Randhir, T. (2008). Effect of climate change on watershed system: a regional analysis. *Clim. Change* 89, 263–280. doi: 10.1007/s10584-007-9389-2.
- Marxsen, J., Zoppini, A., and Wilczek, S. (2010). Microbial communities in streambed sediments recovering from desiccation. *Fems Microbiol. Ecol.* 71, 374–386. doi: 10.1111/j.1574-6941.2009.00819.x.
- Masson, M., (2015) Synthèse bibliographique sur la faisabilité des sondes spectrophotométriques pour la caractérisation in situ de la matière organique. Rapport Aquaref - 22 p.
- Mathers, K. L., Hill, M. J., Wood, C. D., and Wood, P. J. (2019). The role of fine sediment characteristics and body size on the vertical movement of a freshwater amphipod. *Freshw. Biol.* 64, 152–163. doi: 10.1111/fwb.13202.
- McTee, M., Bullington, L., Rillig, M. C., and Ramsey, P. W. (2019). Do soil bacterial communities respond differently to abrupt or gradual additions of copper? *FEMS Microbiol. Ecol.* 95, fiy212. doi: 10.1093/femsec/fiy212.
- Mermillod-Blondin, F., Mauclaire, L., and Montuelle, B. (2005). Use of slow filtration columns to assess oxygen respiration, consumption of dissolved organic carbon, nitrogen transformations, and microbial parameters in hyporheic sediments. *Water Res.* 39, 1687–1698. doi: 10.1016/j.watres.2005.02.003.
- Mermillod-Blondin, F., Foulquier, A., Gilbert, F., Navel, S., Montuelle, B., Bellvert, F., et al. (2013). Benzo(a)pyrene inhibits the role of the bioturbator *Tubifex tubifex* in river sediment biogeochemistry. *Sci. Total Environ.* 450–451, 230–241. doi: 10.1016/j.scitotenv.2013.02.013.
- Messenger, M. L., Lehner, B., Cockburn, C., Lamouroux, N., Pella, H., Snelder, T., et al. (2021). Global prevalence of non-perennial rivers and streams. *Nature* 594, 391–397. doi: 10.1038/s41586-021-03565-5.
- Meybeck, M. (2003). Global analysis of river systems: from Earth system controls to Anthropocene syndromes. *Philos. Trans. R. Soc. B-Biol. Sci.* 358, 1935–1955. doi: 10.1098/rstb.2003.1379.



- Mohanavelu, A., Shrivastava, S., and Naganna, S. R. (2022). Streambed pollution: A comprehensive review of its sources, eco-hydro-geo-chemical impacts, assessment, and mitigation strategies. *Chemosphere* 300, 134589. doi: 10.1016/j.chemosphere.2022.134589.
- Montuelle, B., Dorigo, U., Bérard, A., Volat, B., Bouchez, A., Tlili, A., et al. (2010). The periphyton as a multimetric bioindicator for assessing the impact of land use on rivers: an overview of the Ardières-Morcille experimental watershed (France). *Hydrobiologia* 657, 123–141. doi: 10.1007/s10750-010-0105-2.
- Morel, F.M.M., Hering, J. G., (1983). Principles of Aquatic Chemistry. John Wiley & Sons, Somerset, NJ, États-Unis, 446 p. ISBN: 978-0-471-54896-6
- Morin, S., Bonet, B., Corcoll, N., Guasch, H., Bottin, M., and Coste, M. (2015). Cumulative Stressors Trigger Increased Vulnerability of Diatom Communities to Additional Disturbances. *Microb. Ecol.* 70, 585–595. doi: 10.1007/s00248-015-0602-y.
- Morris, O. F., Loewen, C. J. G., Woodward, G., Schaefer, R. B., Piggott, J. J., Vinebrooke, R. D., et al. (2022). Local stressors mask the effects of warming in freshwater ecosystems. *Ecol. Lett.* 25, 2540–2551. doi: 10.1111/ele.14108.
- Munson, G. P., Lam, D. L., Outten, F. W., and O’Halloran, T. V. (2000). Identification of a copper-responsive two-component system on the chromosome of Escherichia coli K-12. *J. Bacteriol.* 182, 5864–5871. doi: 10.1128/JB.182.20.5864-5871.2000.
- Navel, S., Mermillod-Blondin, F., Montuelle, B., Chauvet, E., Simon, L., and Marmonier, P. (2011). Water–Sediment Exchanges Control Microbial Processes Associated with Leaf Litter Degradation in the Hyporheic Zone: a Microcosm Study. *Microb. Ecol.* 61, 968–979. doi: 10.1007/s00248-010-9774-7.
- Nogaro, G., Datry, T., Mermillod-Blondin, F., Descloux, S., and Montuelle, B. (2010). Influence of streambed sediment clogging on microbial processes in the hyporheic zone: Influence of clogging on microbial processes. *Freshw. Biol.* 55, 1288–1302. doi: 10.1111/j.1365-2427.2009.02352.x.
- Nogaro, G., Datry, T., Mermillod-Blondin, F., Foulquier, A., and Montuelle, B. (2013). Influence of hyporheic zone characteristics on the structure and activity of microbial assemblages. *Freshw. Biol.* 58, 2567–2583. doi: 10.1111/fwb.12233.
- Nogaro, G., Mermillod-Blondin, F., Montuelle, B., Boisson, J.-C., Bedell, J.-P., Ohannessian, A., et al. (2007). Influence of a stormwater sediment deposit on microbial and biogeochemical processes in infiltration porous media. *Sci. Total Environ.* 377, 334–348. doi: 10.1016/j.scitotenv.2007.01.093.
- Nuy, J. K., Lange, A., Beermann, A. J., Jensen, M., Elbrecht, V., Roehl, O., et al. (2018). Responses of stream microbes to multiple anthropogenic stressors in a mesocosm study. *Sci. Total Environ.* 633, 1287–1301. doi: 10.1016/j.scitotenv.2018.03.077.
- Ogilvie, L. A., and Grant, A. (2008). Linking pollution induced community tolerance (PICT) and microbial community structure in chronically metal polluted estuarine sediments. *Mar. Environ. Res.* 65, 187–198. doi: 10.1016/j.marenvres.2007.10.002.

- Oksanen, J., Blanchet, F. G., Friendly, M., Kindt, R., Legendre, P., McGlenn, D., Minchin, P. R., O'Hara, R. B., Simpson, G. L., Solymos, P., Henry, M., Stevens, H., Szoecs, E., Wagner, H., (2020). *vegan: Community Ecology Package*. R package version 2.5-7. <https://CRAN.R-project.org/package=vegan>
- Opinion, A. G. R., Boeck, G. D., and Rodgers, E. M. (2020). Synergism between elevated temperature and nitrate: Impact on aerobic capacity of European grayling, *Thymallus thymallus* in warm, eutrophic waters. *Aquat. Toxicol.* 226, 105563. doi: 10.1016/j.aquatox.2020.105563.
- Paerl, H. W., Dyble, J., Moisaner, P. H., Noble, R. T., Piehler, M. F., Pinckney, J. L., et al. (2003). Microbial indicators of aquatic ecosystem change: current applications to eutrophication studies. *Fems Microbiol. Ecol.* 46, 233–246. doi: 10.1016/S0168-6496(03)00200-9.
- Palumbo-Roe, B., Banks, V. J., Bonsor, H. C., Hamilton, E. M., and Watts, M. J. (2017). Limitations on the role of the hyporheic zone in chromium natural attenuation in a contaminated urban stream. *Appl. Geochem.* 83, 108–120. doi: 10.1016/j.apgeochem.2017.02.011.
- Paranaíba, J. R., Quadra, G., Josué, I. I. P., Almeida, R. M., Mendonça, R., Cardoso, S. J., et al. (2020). Sediment drying-rewetting cycles enhance greenhouse gas emissions, nutrient and trace element release, and promote water cytogenotoxicity. *PLOS ONE* 15, e0231082. doi: 10.1371/journal.pone.0231082.
- Peralta-Maraver, I., Reiss, J., and Robertson, A. L. (2018). Interplay of hydrology, community ecology and pollutant attenuation in the hyporheic zone. *Sci. Total Environ.* 610–611, 267–275. doi: 10.1016/j.scitotenv.2017.08.036.
- Pesce, S., Bonnineau, C., Artigas, J., Martin-Laurent, F., and Morin, S. (2021). Les communautés microbiennes benthiques pour le diagnostic de l'impact écologique des micropolluants dans les cours d'eau. *Sciences Eaux & Territoires, 2021, Directive cadre européenne sur l'eau Bilan de vingt années de recherche pour la reconquête de la qualité des masses d'eau*, 37, pp.92-99. 10.14758/SETREVUE.2021.4.17. hal-03521585
- Piccardi, P., Vessman, B., and Mitri, S. (2019). Toxicity drives facilitation between 4 bacterial species. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 116, 15979–15984. doi: 10.1073/pnas.1906172116.
- Piggott, J. J., Townsend, C. R., and Matthaei, C. D. (2015). Reconceptualizing synergism and antagonism among multiple stressors. *Ecol. Evol.* 5, 1538–1547. doi: 10.1002/ece3.1465.
- Pinto, R., Weigelhofer, G., Brito, A. G., and Hein, T. (2021). Effects of dry-wet cycles on nitrous oxide emissions in freshwater sediments: a synthesis. *PeerJ* 9, e10767. doi: 10.7717/peerj.10767.
- Pohlen, E., Fandino, A. O., and Marxsen, J. (2013). Bacterial Community Composition and Extracellular Enzyme Activity in Temperate Streambed Sediment during Drying and Rewetting. *Plos One* 8, e83365. doi: 10.1371/journal.pone.0083365.
- Pontoni, L., La Vecchia, C., Boguta, P., Sirakov, M., D'Aniello, E., Fabbricino, M., et al. (2022). Natural organic matter controls metal speciation and toxicity for marine organisms: a review. *Environ. Chem. Lett.* 20, 797–812. doi: 10.1007/s10311-021-01310-y.
- Proia, L., Vilches, C., Boninneau, C., Kantiani, L., Farré, M., Romani, A. M., et al. (2013). Drought episode modulates the response of river biofilms to triclosan. *Aquat. Toxicol.* 127, 36–45. doi: 10.1016/j.aquatox.2012.01.006.

- Qin, C., Xu, X., and Peck, E. (2022). Sink or source? Insights into the behavior of copper and zinc in the sediment porewater of a constructed wetland by peepers. *Sci. Total Environ.* 821, 153127. doi: 10.1016/j.scitotenv.2022.153127.
- Quast, C., Pruesse, E., Yilmaz, P., Gerken, J., Schweer, T., Yarza, P., et al. (2013). The SILVA ribosomal RNA gene database project: improved data processing and web-based tools. *Nucleic Acids Res.* 41, D590-596. doi: 10.1093/nar/gks1219.
- Rader, K. J., Carbonaro, R. F., Hullebusch, E. D. van, Baken, S., and Delbeke, K. (2019). The Fate of Copper Added to Surface Water: Field, Laboratory, and Modeling Studies. *Environ. Toxicol. Chem.* 38, 1386–1399. doi: 10.1002/etc.4440.
- Ramette, A. (2009). Quantitative community fingerprinting methods for estimating the abundance of operational taxonomic units in natural microbial communities. *Appl. Environ. Microbiol.* 75 2495-2505. doi:10.1128/AEM.02409-08.
- Ranjan, R., and Shortle, J. (2017). Protecting and Restoring Aquatic Ecosystems in Multiple Stressor Environments. *Water Econ. Policy.* doi: 10.1142/S2382624X16500119.
- Rees, G. N., Watson, G. O., Baldwin, D. S., and Mitchell, A. M. (2006). Variability in sediment microbial communities in a semipermanent stream: impact of drought. *J. North Am. Benthol. Soc.* 25, 370–378. doi: 10.1899/0887-3593(2006)25[370:VISMCI]2.0.CO;2.
- Reid, A. J., Carlson, A. K., Creed, I. F., Eliason, E. J., Gell, P. A., Johnson, P. T. J., et al. (2019). Emerging threats and persistent conservation challenges for freshwater biodiversity. *Biol. Rev.* 94, 849–873. doi: 10.1111/brv.12480.
- Rensing, C., Fan, B., Sharma, R., Mitra, B., and Rosen, B. P. (2000). CopA: An Escherichia coli Cu(I)-translocating P-type ATPase. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 97, 652–656. doi: 10.1073/pnas.97.2.652.
- Ritz, C., Baty, F., Streibig, J. C., and Gerhard, D. (2015). Dose-Response Analysis Using R. *PLOS ONE* 10, e0146021. doi: 10.1371/journal.pone.0146021.
- Rognes, T., Flouri, T., Nichols, B., Quince, C., and Mahé, F. (2016). VSEARCH: a versatile open source tool for metagenomics. *PeerJ* 4, e2584. doi: 10.7717/peerj.2584.
- Roling, W. F. M., and van Verseveld, H. W. (2002). Natural attenuation: What does the subsurface have in store? *Biodegradation* 13, 53–64. doi: 10.1023/A:1016310519957.
- Roman, Y. E., De Schamphelaere, K. A. C., Nguyen, L. T. H., and Janssen, C. R. (2007). Chronic toxicity of copper to five benthic invertebrates in laboratory-formulated sediment: Sensitivity comparison and preliminary risk assessment. *Sci. Total Environ.* 387, 128–140. doi: 10.1016/j.scitotenv.2007.06.023.
- Romaní, A. M., Amalfitano, S., Artigas, J., Fazi, S., Sabater, S., Timoner, X., et al. (2013). Microbial biofilm structure and organic matter use in mediterranean streams. *Hydrobiologia* 719, 43–58. doi: 10.1007/s10750-012-1302-y.
- Romani, A. M., Butturini, A., Sabater, F., and Sabater, S. (1998). Heterotrophic metabolism in a forest stream sediment: surface versus subsurface zones. *Aquat. Microb. Ecol.* 16, 143–151. doi: 10.3354/ame016143.

- Romero, F., Acuña, V., Font, C., Freixa, A., and Sabater, S. (2019). Effects of multiple stressors on river biofilms depend on the time scale. *Sci. Rep.* 9, 15810. doi: 10.1038/s41598-019-52320-4.
- Romero, F., Acuña, V., and Sabater, S. (2020). Multiple Stressors Determine Community Structure and Estimated Function of River Biofilm Bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.* 86. doi: 10.1128/AEM.00291-20.
- Roussel, H., Chauvet, E., and Bonzom, J.-M. (2008). Alteration of leaf decomposition in copper-contaminated freshwater mesocosms. *Environ. Toxicol. Chem.* 27, 637–644. doi: 10.1897/07-168.1.
- Rutere, C., Posselt, M., and Horn, M. A. (2020). Fate of Trace Organic Compounds in Hyporheic Zone Sediments of Contrasting Organic Carbon Content and Impact on the Microbiome. *Water* 12, 3518. doi: 10.3390/w12123518.
- Saleem, M., Hu, J., and Jousset, A. (2019). “More Than the Sum of Its Parts: Microbiome Biodiversity as a Driver of Plant Growth and Soil Health,” in *Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics, Vol 50*, ed. D. J. Futuyma (Palo Alto: Annual Reviews), 145–+. doi: 10.1146/annurev-ecolsys-110617-062605.
- Salomons, W., de Rooij, N. M., Kerdijk, H., and Bril, J. (1987). Sediments as a source for contaminants? *Hydrobiologia* 149, 13–30. doi: 10.1007/BF00048643.
- Santore, R. C., and Ryan, A. C. (2015). Development and application of a multimetal multibiotic ligand model for assessing aquatic toxicity of metal mixtures. *Environ. Toxicol. Chem.* 34, 777–787. doi: 10.1002/etc.2869.
- Sarremejane, R., Messenger, M. L., and Datry, T. (2022). Drought in intermittent river and ephemeral stream networks. *Ecohydrology* 15. doi: 10.1002/eco.2390.
- Sauquet, E., Beaufort, A., Sarremejane, R., and Thirel, G. (2021). Predicting flow intermittence in France under climate change. *Hydrol. Sci. J.* 66, 2046–2059. doi: 10.1080/02626667.2021.1963444.
- Schäfer, R. B., Kühn, B., Malaj, E., König, A., and Gergs, R. (2016). Contribution of organic toxicants to multiple stress in river ecosystems. *Freshw. Biol.* 61, 2116–2128. doi: 10.1111/fwb.12811.
- Scheffczyk, A., Frankenbach, S., Jänsch, S., and Römbke, J. (2014). Comparison of the effects of zinc nitrate-tetrahydrate and tributyltin-oxide on the reproduction and avoidance behavior of the earthworm *Eisenia andrei* in laboratory tests using nine soils. *Appl. Soil Ecol.* 83, 253–257. doi: 10.1016/j.apsoil.2014.03.017.
- Schreckinger, J., Mutz, M., Mendoza-Lera, C., and Frossard, A. (2021). Attributes of Drying Define the Structure and Functioning of Microbial Communities in Temperate Riverbed Sediment. *Front. Microbiol.* 12, 676615. doi: 10.3389/fmicb.2021.676615.
- Siddique, A., Shahid, N., and Liess, M. (2021). Multiple Stress Reduces the Advantage of Pesticide Adaptation. *Environ. Sci. Technol.* 55, 15100–15109. doi: 10.1021/acs.est.1c02669.
- Simpson, S. L., Maher, E. J., and Jolley, D. F. (2004). Processes controlling metal transport and retention as metal-contaminated groundwaters efflux through estuarine sediments. *Chemosphere* 56, 821–831. doi: 10.1016/j.chemosphere.2004.04.001.

- Skorbiłowicz, E., Skorbiłowicz, M., and Misztal, W. (2020). Distribution of Nickel, Copper and Cobalt in the Grain Fractions of Bottom Sediments of the Sokołda River and its Tributaries (Poland). *J. Ecol. Eng.* 21, 88–96. doi: 10.12911/22998993/113146.
- Sliva, L., and Williams, D. D. (2005). Exploration of riffle-scale interactions between abiotic variables and microbial assemblages in the hyporheic zone. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.* 62, 276–290. doi: 10.1139/F04-190.
- Smolyakov, B. S., Zhigula, M. V., Ryzhikh, A. P., Sinityna, E. V., Ermolaeva, N. I., and Fedotova, A. A. (2004). Copper (II) Speciation in a Freshwater Ecosystem. *Water Resour.* 31, 55–63. doi: 10.1023/B:WARE.0000013573.08909.c3.
- Statzner, B., and Bêche, L. A. (2010). Can biological invertebrate traits resolve effects of multiple stressors on running water ecosystems? *Freshw. Biol.* 55, 80–119. doi: 10.1111/j.1365-2427.2009.02369.x.
- Stegen, J. C., Fredrickson, J. K., Wilkins, M. J., Konopka, A. E., Nelson, W. C., Arntzen, E. V., et al. (2016). Groundwater–surface water mixing shifts ecological assembly processes and stimulates organic carbon turnover. *Nat. Commun.* 7, 11237. doi: 10.1038/ncomms11237.
- Stone, M., and Droppo, I. G. (1996). Distribution of lead, copper and zinc in size-fractionated river bed sediment in two agricultural catchments of southern Ontario, Canada. *Environ. Pollut.* 93, 353–362. doi: 10.1016/S0269-7491(96)00038-3.
- Sutcliffe, B., Hose, G. C., Harford, A. J., Midgley, D. J., Greenfield, P., Paulsen, I. T., et al. (2019). Microbial communities are sensitive indicators for freshwater sediment copper contamination. *Environ. Pollut.* 247, 1028–1038. doi: 10.1016/j.envpol.2019.01.104.
- Tekin, E., Diamant, E. S., Cruz-Loya, M., Enriquez, V., Singh, N., Savage, V. M., et al. (2020). Using a newly introduced framework to measure ecological stressor interactions. *Ecol. Lett.* 23, 1391–1403. doi: 10.1111/ele.13533.
- Thompson, P. L., MacLennan, M. M., and Vinebrooke, R. D. (2018). Species interactions cause non-additive effects of multiple environmental stressors on communities. *Ecosphere* 9, e02518. doi: 10.1002/ecs2.2518.
- Tlili, A., Marechal, M., Montuelle, B., Volat, B., Dorigo, U., and Bérard, A. (2011). Use of the MicroResp™ method to assess pollution-induced community tolerance to metals for lotic biofilms. *Environ. Pollut.* 159, 18–24. doi: 10.1016/j.envpol.2010.09.033.
- Town, R., and Powell, H. (1993). Ion-Selective Electrode Potentiometric Studies on the Complexation of Copper(ii) by Soil-Derived Humic and Fulvic-Acids. *Anal. Chim. Acta* 279, 221–233. doi: 10.1016/0003-2670(93)80321-B.
- Väänänen, K., Leppänen, M. T., Chen, X., and Akkanen, J. (2018). Metal bioavailability in ecological risk assessment of freshwater ecosystems: From science to environmental management. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 147, 430–446. doi: 10.1016/j.ecoenv.2017.08.064.
- van Beelen, P. (2003). A review on the application of microbial toxicity tests for deriving sediment quality guidelines. *Chemosphere* 53, 795–808. doi: 10.1016/S0045-6535(03)00716-1.

- vanBeelen, P., and Doelman, P. (1997). Significance and application of microbial toxicity tests in assessing ecotoxicological risks of contaminants in soil and sediment. *Chemosphere* 34, 455–499. doi: 10.1016/S0045-6535(96)00388-8.
- Vander Vorste, R., Mermillod-Blondin, F., Hervant, F., Mons, R., and Datry, T. (2017). *Gammarus pulex* (Crustacea: Amphipoda) avoids increasing water temperature and intraspecific competition through vertical migration into the hyporheic zone: a mesocosm experiment. *Aquat. Sci.* 79, 45–55. doi: 10.1007/s00027-016-0478-z.
- Vander Vorste, R., Mermillod-Blondin, F., Hervant, F., Mons, R., Forcellini, M., and Datry, T. (2016). Increased depth to the water table during river drying decreases the resilience of *Gammarus pulex* and alters ecosystem function: Increased Depth to Water Table Decreases Resilience and Alters Function. *Ecohydrology* 9, 1177–1186. doi: 10.1002/eco.1716.
- Vendrell-Puigmitja, L., Abril, M., Proia, L., Espinosa Angona, C., Ricart, M., Oatley-Radcliffe, D. L., et al. (2020). Assessing the effects of metal mining effluents on freshwater ecosystems using biofilm as an ecological indicator: Comparison between nanofiltration and nanofiltration with electrocoagulation treatment technologies. *Ecol. Indic.* 113, 106213. doi: 10.1016/j.ecolind.2020.106213.
- Vignati, D. A. L., Bettinetti, R., and Marchetto, A. (2016). Long-term persistence of sedimentary copper contamination in Lake Orta: potential environmental risks 20 years after liming. *J. Limnol.* 75, 107–119. doi: 10.4081/jlimnol.2016.1232.
- Von Schiller, D., Datry, T., Corti, R., Foulquier, A., Tockner, K., Marce, R., et al. (2019). Sediment Respiration Pulses in Intermittent Rivers and Ephemeral Streams. *Glob. Biogeochem. Cycles* 33, 1251–1263. doi: 10.1029/2019GB006276.
- Walling, D. E., Owens, P. N., Carter, J., Leeks, G. J. L., Lewis, S., Meharg, A. A., et al. (2003). Storage of sediment-associated nutrients and contaminants in river channel and floodplain systems.
- Wang, Y., and Qian, P.-Y. (2009). Conservative Fragments in Bacterial 16S rRNA Genes and Primer Design for 16S Ribosomal DNA Amplicons in Metagenomic Studies. *PLOS ONE* 4, e7401. doi: 10.1371/journal.pone.0007401. *Appl. Geochem.* 18, 195–220. doi: 10.1016/S0883-2927(02)00121-X.
- Wang, L., Li, Y., Niu, L., Zhang, W., Zhang, H., Wang, L., et al. (2018). Response of ammonia oxidizing archaea and bacteria to decabromodiphenyl ether and copper contamination in river sediments. *Chemosphere* 191, 858–867. doi: 10.1016/j.chemosphere.2017.10.067.
- Wang, L., Li, Y., Zhao, Z., Cordier, T., Worms, I. A., Niu, L., et al. (2021). Microbial community diversity and composition in river sediments contaminated with tetrabromobisphenol A and copper. *Chemosphere* 272, 129855. doi: 10.1016/j.chemosphere.2021.129855.
- Ward, A. S., Morgan, J. A., White, J. R., and Royer, T. V. (2018). Streambed restoration to remove fine sediment alters reach-scale transient storage in a low-gradient fifth-order river, Indiana, USA. *Hydrol. Process.* 32, 1786–1800. doi: 10.1002/hyp.11518.
- Wharton, G., Mohajeri, S. H., and Righetti, M. (2017). The pernicious problem of streambed colmation: a multi-disciplinary reflection on the mechanisms, causes, impacts, and management challenges. *WIREs Water* 4, e1231. doi: 10.1002/wat2.1231.
- Wickham, H., ggplot2: Elegant Graphics for Data Analysis. Springer-Verlag New York, 2016.

- White, D. S. (1993). Perspectives on Defining and Delineating Hyporheic Zones. *J. North Am. Benthol. Soc.* 12, 61–69. doi: 10.2307/1467686.
- Wu, Q., Qi, J., and Xia, X. (2017). Long-term variations in sediment heavy metals of a reservoir with changing trophic states: Implications for the impact of climate change. *Sci. Total Environ.* 609, 242–250. doi: 10.1016/j.scitotenv.2017.04.041.
- Xu, J., Tan, W., Xiong, J., Wang, M., Fang, L., and Koopal, L. K. (2016). Copper binding to soil fulvic and humic acids: NICA-Donnan modeling and conditional affinity spectra. *J. Colloid Interface Sci.* 473, 141–151. doi: 10.1016/j.jcis.2016.03.066.
- Yi, Y., Yang, Z., and Zhang, S. (2011). Ecological risk assessment of heavy metals in sediment and human health risk assessment of heavy metals in fishes in the middle and lower reaches of the Yangtze River basin. *Environ. Pollut.* 159, 2575–2585. doi: 10.1016/j.envpol.2011.06.011.
- Zhao, Y.-G., Feng, G., Bai, J., Chen, M., and Maqbool, F. (2014). Effect of copper exposure on bacterial community structure and function in the sediments of Jiaozhou Bay, China. *World J. Microbiol. Biotechnol.* 30, 2033–2043. doi: 10.1007/s11274-014-1628-x.
- Zhu, M., Yang, N., Li, Y., Zhang, W., Wang, L., Niu, L., et al. (2021). Assessing the effects of cascade dams on river ecological status using multi-species interaction-based index of biotic integrity (Mt-IBI). *J. Environ. Manage.* 299, 113585. doi: 10.1016/j.jenvman.2021.113585.