



**HAL**  
open science

# Approches expérimentales en canaux dynamiques de laboratoire sur les biofilms diatomiques de rivières : influence des conditions trophiques sur la toxicité d'herbicides agricoles

Stéphanie Couprie

► **To cite this version:**

Stéphanie Couprie. Approches expérimentales en canaux dynamiques de laboratoire sur les biofilms diatomiques de rivières : influence des conditions trophiques sur la toxicité d'herbicides agricoles. Sciences de l'environnement. 2009. hal-02592180

**HAL Id: hal-02592180**

**<https://hal.inrae.fr/hal-02592180v1>**

Submitted on 15 May 2020

**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.

ANNEE 2008-2009

**APPROCHES EXPERIMENTALES EN CANAUX DYNAMIQUES DE  
LABORATOIRE SUR LES BIOFILMS DIATOMIQUES DE  
RIVIERES : INFLUENCE DES CONDITIONS TROPHIQUES SUR  
LA TOXICITE D'HERBICIDES AGRICOLES**

---

**MEMOIRE**

POUR LE MASTER EAU - SANTE - ENVIRONNEMENT

Option Qualité des Ecosystèmes Aquatiques

Présenté et soutenu le 15 Octobre 2009

Par

COUPRIE Stéphanie

---

*Mémoire réalisé à la suite du stage effectué à*

Cemagref, Cestas

*Sous la direction de*

François DELMAS et Vincent ROUBEIX

*du*

1<sup>er</sup> avril au 30 septembre 2009

## Résumé

Les approches expérimentales en canaux dynamiques permettent d'étudier l'impact de la toxicité des herbicides agricoles, couplée à l'influence des facteurs trophiques, sur la communauté diatomique. Ces micro-algues sont des indicateurs biologiques connus et l'Indice Biologique Diatomées (IBD) est un outil d'évaluation de la qualité de l'eau largement utilisé dans le cadre de la Directive Cadre européenne sur l'Eau (DCE). Il est capable de mettre en évidence les pollutions trophiques et organiques, mais reste insuffisant concernant la détection d'effets des pollutions par les pesticides.

Ainsi, afin de compléter les connaissances sur ce sujet, des expérimentations contrôlées en aquariums ont été réalisées en appliquant des modalités variables de concentration en herbicides et en nutriments, d'un microcosme à l'autre. Après avoirensemencé chaque unité expérimentale avec une suspension périphtyque et observé une période de colonisation de trois semaines sur des substrats artificiels, le biofilm a été analysé en fonction de ses caractéristiques quantitatives (concentration en chlorophylle *a*, densité cellulaire de diatomées) et qualitatives (abondances relatives, IBD...).

Les résultats obtenus semblent montrer une répartition des espèces dépendante de leur affinité pour les milieux oligotrophes ou eutrophes mais la présence d'herbicide, à des concentrations environnementales rencontrées sur le terrain, ne semble pas avoir d'impacts majeurs sur la composition de la communauté diatomique.

**Mots clés :** Diatomées, Canaux dynamiques, Herbicides, Facteurs trophiques, Indice Biologique Diatomées, Qualité de l'eau

## Abstract

The experimental approaches in microcosms make it possible to study the impact of agricultural herbicides toxicity associated with the influence of trophic factors on diatoms community. These microalgae are well known biological indicators and the Diatoms Biological Index is a tool for evaluation of water quality, often used in the frame of the Water Framework Directive. This index is able to monitor trophic and saprobic pollution but it remains insufficient concerning pollution due to pesticides.

In order to improve knowledge on this subject, experiments in aquariums were realized with various levels of herbicides and nutrients concentration. After inoculation with a periphytic suspension in each experimental unit and about three weeks of colonization on artificial substrates, the biofilm was analyzed according to its quantitative characteristics (chlorophyll *a* concentration, density cellular of freshwater diatoms) and qualitative (species abundances, biological index...).

The study results showed a species distribution depending on their affinities for the oligotrophic or eutrophic conditions but the presence of herbicides did not seem to reveal major effects on the diatomic community with environmental realistic herbicides concentrations.

**Key words :** Freshwater diatoms, Dynamic microcosms, Herbicides, Trophic factors, Diatom Biological Index, Water quality

## Remerciements

Je remercie avant tout monsieur François DELMAS pour m'avoir offert l'opportunité de réaliser ce stage au sein de l'Unité de Recherche REBX (Réseau, Epuration et Qualité des Eaux) du Cemagref de Bordeaux et de m'avoir fait découvrir l'univers étonnant des diatomistes.

Je tiens à remercier sincèrement Vincent ROUBEIX pour ses conseils avisés, sa patience, sa motivation et ses idées toujours nouvelles... ainsi que Anne-Cécile, pour cette très sympathique collaboration...

Je tiens aussi à exprimer toute ma sympathie à Karine, Maud, Sébastien pour leur soutien, leur bonne humeur et tout particulièrement à Fany pour son aide précieuse dans le traitement statistique des données de ce mémoire.

J'aimerais remercier également Maryse BOUDIGUES, Muriel BONNET, Brigitte MECHIN, Sophie LISSALDE pour avoir réalisé toutes les analyses nécessaires à ces expérimentations ainsi que pour leur disponibilité lors de mes divers "Travaux Pratiques" au laboratoire de Chimie.

Enfin, merci à tous les membres de l'équipe REBX pour leur accueil et l'ambiance chaleureuse.

# SOMMAIRE

<b>RESUME</b> .....	<b>1</b>
<b>REMERCIEMENTS</b> .....	<b>2</b>
<b>SOMMAIRE</b> .....	<b>3</b>
<b>TABLE DES ILLUSTRATIONS</b> .....	<b>5</b>
<b>INTRODUCTION</b> .....	<b>7</b>
<b>PARTIE A. CADRE GENERAL DE L'ETUDE</b> .....	<b>9</b>
<b>I. POLLUTION ET PESTICIDES</b> .....	<b>9</b>
I.1 CONTEXTE SOCIETAL.....	9
I.2 USAGES DES HERBICIDES.....	9
I.2.1 Les principaux pesticides agricoles.....	9
I.2.2 Transfert des produits phytosanitaires vers les milieux aquatiques.....	10
I.3 CONTEXTE LEGISLATIF.....	12
I.4 CONTEXTE DU STAGE.....	13
<b>II. DIATOMÉES ET EVALUATION DE LA QUALITE DES EAUX</b> .....	<b>14</b>
II.1 LES DIATOMÉES : CARACTERES GENERAUX.....	14
II.1.1 Morphologie et cytologie.....	15
II.1.2 Multiplication et reproduction.....	16
II.1.3 Systématique.....	16
II.1.4 Ecologie.....	17
II.1.5 Quelques utilisations des diatomées.....	18
II.2 DIATOMÉES ET EVALUATION DE LA QUALITE DES EAUX.....	18
II.2.1 Principe de bioindication.....	18
II.2.2 Potentialités des diatomées pour la bioindication.....	19
II.2.3 Utilisation de l'Indice Biologique Diatomées en réseau de surveillance.....	19
<b>PARTIE B. MATERIEL ET METHODE</b> .....	<b>22</b>
<b>I. CONDITIONS EXPERIMENTALES CONTRÔLEES</b> .....	<b>22</b>
I.1 CANAUX EXPERIMENTAUX.....	22
I.1.1 Présentation du dispositif expérimental.....	22
I.1.2 Supports de colonisation des biofilms.....	23
I.1.3 Alimentation en eau.....	23
I.1.4 Conditions d'éclairage.....	24
I.1.5 Conditions de température.....	24
I.1.6 Conditions de courant.....	24
I.2 ENSEMENCEMENT.....	25
I.2.1 Prélèvement du matériel biologique.....	25
I.2.2 Stations d'échantillonnage.....	25
I.2.3 Ensemencement des canaux en biofilm.....	27
I.3 CONDITIONS TROPHIQUES ET APPORT EN NUTRIMENTS : L'AMBIANCE TROPHIQUE.....	27
I.4 CONDITIONS DE CONTAMINATION DE LA COLONNE D'EAU EN HERBICIDES : L'AMBIANCE TOXIQUE.....	29
I.4.1 Modalités de contamination.....	29
I.4.2 Les chloroacétanilides.....	29
<b>II. PROTOCOLE D'EXPERIMENTATION</b> .....	<b>32</b>
II.1 PLANNING DE PRELEVEMENTS.....	32
II.2 METHODES ANALYTIQUES.....	34
II.2.1 Analyses physico-chimiques.....	34
II.2.2 Analyses biologiques.....	35

<b>PARTIE C. RESULTATS ET DISCUSSION</b> .....	<b>40</b>
<b>I. 1<sup>ERE</sup> EXPERIMENTATION : IMPACT DU MILIEU TROPHIQUE ET DU S-METOLACHLORE SUR LES DIATOMEES</b> ..	<b>40</b>
I.1 CONDITIONS PHYSICO-CHIMIQUES .....	40
I.1.1 pH, température et conductivité .....	40
I.1.2 Concentration en s-métolachlore .....	41
I.1.3 Concentration en nutriments.....	42
I.2 ASPECTS BIOLOGIQUES .....	43
I.2.1 Analyses quantitatives de la biomasse .....	43
I.2.2 Analyses qualitatives .....	47
I.2.3. Traitement statistique des données.....	51
<b>II. 2<sup>DE</sup> EXPERIMENTATION : IMPACT DU MILIEU TROPHIQUE ET DE L'ACETOCHLORE SUR LES DIATOMEES</b> .....	<b>56</b>
II.1 CONDITIONS PHYSICO-CHIMIQUES .....	56
II.1.1 pH, température et conductivité .....	56
II.1.2 Concentration en acétochlore .....	56
II.1.3 Concentrations en nutriments .....	57
II.2 ASPECTS BIOLOGIQUES.....	58
II.2.1 Analyses quantitatives de la biomasse .....	58
II.2.2 Analyses qualitatives .....	60
II.2.3 Traitement statistique des données.....	63
<b>CONCLUSION GENERALE ET PERSPECTIVES</b> .....	<b>68</b>
<b>REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES</b> .....	<b>70</b>
<b>LISTE DES ANNEXES</b> .....	<b>72</b>

# TABLE DES ILLUSTRATIONS

## LISTE DES FIGURES

Figure 1. Devenir des produits phytosanitaires dans l'environnement .....	11
Figure 2. Variations morphologiques des diatomées d'après des observations au microscope d'algues vivantes ..	14
Figure 3. Diatomées en Microscopie Electronique à Balayage .....	15
Figure 4. Structure du frustule d'une diatomée.....	15
Figure 5. Illustration de la multiplication végétative.....	16
Figure 6. Représentation schématique de la systématique chez les diatomées .....	17
Figure 7. Classes de qualité d'eau selon le paramètre IBD.....	21
Figure 8. Vue du dessus des six canaux avec leur modalité trophique et toxique.....	23
Figure 9. Schéma du dispositif.....	25
Figure 10. Réseau hydrographique des coteaux de Gascogne.....	26
Figure 11. Protocole de prélèvement du biofilm sur des substrats artificiels .....	35
Figure 12. Evolution de la concentration en s-métolachlore au cours du temps en $\mu\text{g.l}^{-1}$ .....	41
Figure 13. Evolution de la concentration en chlorophylle <i>a</i> mesurée par la méthode spectrophotométrique .....	43
Figure 14. Evolution de la densité en chlorophylle <i>a</i> mesurée au benthofluoroProbe .....	443
Figure 15. Evolution de la Matière Sèche Sans Cendres au cours du temps en $\text{mg.cm}^{-2}$ .....	45
Figure 16. Evolution de la densité de diatomées au cours du temps (nombre de cellules / $\text{cm}^2$ ) .....	46
Figure 17. Evolution du biovolume spécifique au cours du temps en $\mu\text{m}^3$ .....	47
Figure 18. Représentation graphique en "secteurs" des abondances relatives des espèces dominantes à J 19.....	48
Figure 19. Arbre de classification des compositions spécifiques des communautés de diatomées à J 19.....	52
Figure 20. Analyse en Composantes Principales des compositions spécifiques en fonction du milieu trophique.....	53
Figure 21. Analyse en Composantes Principales des compositions spécifiques en fonction de la concentration en s-métolachlore à J19.....	55
Figure 22. Evolution de la concentration en acétochlore au cours du temps en $\mu\text{g.l}^{-1}$ .....	57
Figure 23. Evolution de la concentration en chlorophylle <i>a</i> au cours du temps en $\mu\text{g.cm}^{-2}$ .....	58
Figure 24. Evolution de la Matière Sèche Sans Cendres au cours du temps en $\text{mg.cm}^{-2}$ .....	59
Figure 25. Evolution de la densité de diatomées au cours du temps (nombre de cellules / $\text{cm}^2$ ) .....	60
Figure 26. Représentation graphique en "secteurs" des abondances relatives des espèces dominantes à J 21.....	61
Figure 27. Arbre de classification des compositions spécifiques des communautés de diatomées à J 21.....	64
Figure 28. Analyse en Composantes Principales des compositions spécifiques en fonction du milieu trophique.....	65
Figure 29. Analyse en Composantes Principales des compositions spécifiques en fonction de la concentration en acétochlore à J 21 .....	66

## LISTE DES PHOTOGRAPHIES

Photo 1. Conception des canaux expérimentaux .....	22
Photo 2. Bacs de refroidissement contenant les aquariums.....	24
Photo 3. Dispositif utilisé pour la collecte du périphyton .....	25
Photo 4. Grattage des lames à l'aide d'un racloir .....	25
Photo 5. Stations de Organ (1 et 2) et de Montmaurin (3) .....	27
Photo 6. Valise instrumentale .....	28
Photo 7. Cellule de Nageotte.....	38
Photo 8. Photographies de <i>Surirella Angusta</i> en vue valvaire et de <i>Ulnaria Ulna</i> en vue connective .....	39

## LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1. Caractéristiques des trois grandes classes de pesticides .....	10
Tableau 2. Récapitulatifs des valeurs limites pour l'eau potable .....	12
Tableau 3. Résultats de l'auto-analyseur (Laboratoire de Chimie du Cemagref) .....	23
Tableau 4. Paramètres physiques de l'eau des deux stations .....	26
Tableau 5. Concentrations des solutions-mères de nutriments .....	27
Tableau 6. Modalités d'enrichissement des canaux expérimentaux .....	28
Tableau 7. Valeurs des paramètres physiques obtenues avec la valise instrumentale lors de la 1 <sup>ère</sup> expérience .....	28
Tableau 8. Valeurs des paramètres physiques obtenues avec la valise instrumentale lors de la 2 <sup>de</sup> expérience .....	28
Tableau 9. Modalités de contamination en s-métolachlore des canaux expérimentaux (1 <sup>ère</sup> expérience) .....	29
Tableau 10. Modalités de contamination en acétochlore des canaux expérimentaux (2 <sup>de</sup> expérience) .....	29
Tableau 11. Caractéristiques physico-chimiques de l'acétochlore et du métolachlore .....	30
Tableau 12. Valeurs de pH et de conductivité à J0 lors de la 1 <sup>ère</sup> expérience dosées au laboratoire de chimie .....	40
Tableau 13. Evolution de la concentration en s-métolachlore au cours du temps en $\mu\text{g.l}^{-1}$ .....	41
Tableau 14. Concentration de la Matière Sèche Sans Cendres en $\text{mg.cm}^{-2}$ .....	45
Tableau 15. Evolution du biovolume moyen spécifique en $\mu\text{m}^3$ au cours du temps .....	47
Tableau 16. Valeurs des indices biologiques, de diversité et d'équitabilité à J 19 .....	50
Tableau 17. Valeurs de pH et de conductivité à J0 lors de la 2 <sup>de</sup> expérience dosées au laboratoire de chimie .....	56
Tableau 18. Evolution de la concentration en acétochlore au cours du temps en $\mu\text{g.l}^{-1}$ .....	56
Tableau 19. Concentration de la Matière Sèche Sans Cendres en $\text{mg.cm}^{-2}$ .....	59
Tableau 20. Valeurs des indices biologiques, de diversité et d'équitabilité à J 21 .....	62

# INTRODUCTION

La forte pression des activités anthropiques sur les écosystèmes aquatiques est en grande partie responsable de la dégradation de la qualité des ressources en eau et de la santé écologique des rivières.

La mise en place de la **Directive Cadre européenne sur l'Eau** du 23 octobre 2000 (**DCE**), qui définit les actions à mettre en œuvre pour atteindre le "bon état écologique" des masses d'eau d'ici 2015 au plan européen, impose de savoir estimer les caractéristiques des milieux aquatiques et d'évaluer l'efficacité des efforts de réhabilitation.

L'état des lieux des hydrosystèmes doit être réalisé à partir de paramètres physico-chimiques de la qualité de l'eau mais aussi à partir de critères biologiques, afin de mettre en place par la suite des plans de gestion adaptés. En effet, les mesures physiques et chimiques ne fournissent que des renseignements ponctuels sur l'état des écosystèmes. L'intégration globale dans le temps des altérations du milieu peut être obtenue par l'analyse des organismes aquatiques. Ces organismes étant en constantes interactions avec les composants de l'environnement aquatique, toute dégradation majeure aura une influence sur la composition des peuplements des rivières.

La Directive préconise l'utilisation de maillons biologiques clés comme descripteurs de l'état écologique des masses d'eau et l'étude des algues, en particulier les communautés de diatomées périphytiques<sup>(1)</sup> fait partie intégrante du programme de surveillance des cours d'eau.

Les diatomées, à la base de la chaîne trophique, sont d'excellents bioindicateurs de par leur ubiquité dans les communautés périphytiques et de par leur sensibilité à différents facteurs constitutifs de l'ambiance environnementale. Elles sont à l'origine de plusieurs indices biologiques (**IBD**, **IPS**)<sup>(2)</sup> qui sont des outils largement utilisés pour l'évaluation de la qualité des écosystèmes aquatiques. Mis au point pour détecter les pollutions organiques et trophiques, ils semblent inadaptés pour déceler les effets des pollutions par les pesticides (Othoniel, 2006) malgré l'introduction plus récente dans ces indices des formes anormales (Debenest, 2007) le plus souvent observées en cas de pollutions par les métaux.

Face à ce constat concernant les limites des bioindicateurs, de nombreuses études au **Cemagref** sont entreprises, afin d'apporter des éléments de contribution au développement d'un outil de détermination plus adapté au diagnostic des pollutions par les pesticides. C'est dans ce contexte que des expérimentations en canaux artificiels ont été initiées. Mon stage vient en accompagnement d'un travail de post-doctorat, réalisé par Vincent Roubéix au sein de l'Unité **REBX** (**R**éseau **E**puratif et **Q**ualité des **E**aux de **B**ordeaux).

Nous avons cherché à explorer les liens pouvant exister entre les descripteurs qualitatifs et quantitatifs du biofilm diatomique, avec la concentration en nutriments des eaux associée à la présence d'un contaminant. Devant la difficulté d'identifier les effets d'un polluant précis dans le milieu naturel sur les communautés de diatomées alors que toutes les autres conditions environnementales varient, il semble donc intéressant, pour étudier plus spécifiquement l'action d'un seul herbicide, d'utiliser des canaux dynamiques. La réalisation d'expériences en conditions contrôlées permet de confirmer ou d'infirmer les hypothèses

<sup>(1)</sup> Diatomées périphytiques : fixées à la surface des substrats immergés

<sup>(2)</sup> **IBD** : Indice Biologique Diatomées

**IPS** : Indice de Pollu-sensibilité Spécifique

issues des observations globales de terrain. Les études en laboratoire représentent effectivement le moyen de contrôler de nombreux paramètres et d'isoler ainsi les réponses aux facteurs étudiés.

Les concentrations en pesticides testées au cours de cette expérimentation, ont été fixées en cohérence avec des concentrations environnementales réalistes rencontrées au cours de campagnes de terrain, réalisées par le Cemagref, dans les Coteaux de Gascogne. Le choix des molécules (s-métolachlore et acétochlore) s'est également fait en fonction des pratiques agricoles de cette région. Pour répondre aux objectifs, deux concentrations en herbicide ont été testées, parallèlement à deux modalités trophiques (oligotrophe et eutrophe).

Dans ce mémoire, nous nous attacherons à décrire dans une première partie le cadre général de l'étude. Le premier chapitre fera état du contexte sociétal et réglementaire relatif à l'usage des pesticides agricoles et des problèmes de contamination des ressources en eaux (par ces molécules toxiques) servant de cadre au contexte global du stage. Le deuxième chapitre présentera les éléments de caractérisation d'un bioindicateur connu : les diatomées benthiques.

La partie suivante vise à décrire les dispositifs expérimentaux ainsi que les méthodes utilisées pour la mesure des paramètres physico-chimiques et biologiques étudiés.

Enfin, dans la dernière partie, les résultats obtenus seront exposés et discutés afin de mettre en évidence l'impact de certains pesticides sur le biofilm diatomique et l'influence des conditions trophiques sur la toxicité d'herbicides agricoles.

<sup>(1)</sup> Diatomées périphtiques : fixées à la surface des substrats immergés

<sup>(2)</sup> **IBD** : Indice Biologique Diatomées

**IPS** : Indice de Pollu-sensibilité Spécifique

## **PARTIE A. CADRE GENERAL DE L'ETUDE**

### **I. POLLUTION ET PESTICIDES**

#### **I.1 Contexte sociétal**

La forte pression des activités anthropiques, sur les écosystèmes aquatiques, est une importante cause de la dégradation de la qualité des ressources en eaux et de la santé écologique des rivières.

L'intensification de la production agricole, observée dans les dernières décennies, est la conséquence de modifications radicales des pratiques culturales. Cette mutation profonde a été basée sur l'accroissement de l'utilisation des engrais de synthèse et le recours de plus en plus fréquent à des produits phytosanitaires pour lutter contre les "mauvaises herbes", les ravageurs et les maladies...(Bernard, 2004).

L'évolution des pratiques agricoles s'est accompagnée de la hausse des rendements, mais aussi d'effets non intentionnels incontestables sur différentes composantes du milieu naturel. Les données acquises par les réseaux de surveillance de la qualité des eaux (superficielles et aquifères) témoignent de la dégradation progressive de la qualité, tant sur le plan des enrichissements en nutriments que de la présence de produits phytosanitaires. Selon le dernier rapport de l'Institut Français de l'ENVironnement (IFEN), la présence de pesticides, en 2006, a été détectée et quantifiée au moins une fois sur 90 % des stations utilisées pour le suivi des eaux de surface et sur 53 % des stations relatives aux eaux souterraines. Les teneurs mesurées sont parfois très faibles et ont dans ce cas peu d'incidence sur la qualité des eaux. Cela traduit néanmoins, une dispersion importante des pesticides et une présence généralisée dans les milieux aquatiques (IFEN, 2009).

Ainsi, les contaminations des eaux de surface par les produits phytosanitaires sont observées sur tout le territoire français, elles sont principalement dues aux triazines, en particulier l'atrazine, et en partie aux urées substituées dont le diuron et l'isoproturon. Les apports de ces substances exogènes, issues des activités agricoles, ont certainement des effets sur le fonctionnement des écosystèmes aquatiques, et peuvent provoquer un impact biologique sur l'état écologique des cours d'eau, au sens de la DCE : Directive Cadre Eau (2000/60/CE) (Bernard, 2004). La plupart des produits des deux familles précitées ont été progressivement retirés de l'homologation agricole depuis 2003.

#### **I.2 Usages des herbicides**

##### **I.2.1 Les principaux pesticides agricoles**

Les pesticides, qui comptent parmi les produits phytosanitaires ou phytopharmaceutiques, sont des poisons destinés à tuer les herbes (herbicides), les insectes (insecticides), à lutter contre les maladies (fongicides), ou à se débarrasser de divers animaux jugés nuisibles

(souricides, raticides...) (IFEN, 2009). Un pesticide est composé de deux types de substances, une ou plusieurs matières actives et un ou plusieurs additifs. Une matière active (glyphosate, atrazine...) confère au produit l'effet actif désiré, les adjuvants en optimisant l'efficacité et/ou les conditions de mise en œuvre.

Principales caractéristiques des trois grandes classes de pesticides :

Classe	Cibles	Familles de produits concernés	Mode d'action
<b>Fongicide</b>	Champignons Phytopathogènes	<ul style="list-style-type: none"> <li>▪ Soufre,</li> <li>▪ Carbamates,</li> <li>▪ Triazoles,</li> <li>▪ Dicarboximides,</li> <li>▪ Dérivés du benzène</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>▸ Trouble la respiration ou la biosynthèse de composés essentiels à la vie du champignon</li> </ul>
<b>Insecticide</b>	Insectes nuisibles	<ul style="list-style-type: none"> <li>▪ Organophosphorés,</li> <li>▪ Carbamates,</li> <li>▪ Pyréthriinoïdes</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>▸ Action principalement sur la transmission nerveuse, inhibition de l'acétylcholinestérase</li> </ul>
<b>Herbicide</b>	Mauvaises herbes	<ul style="list-style-type: none"> <li>▪ Carbamates,</li> <li>▪ Urées substituées,</li> <li>▪ Triazines,</li> <li>▪ Phytohormones,</li> <li>▪ Amides</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>▸ Action de contact direct ou action par pénétration systémique</li> <li>▸ Blocage de la division cellulaire</li> <li>▸ Inhibition de la photosynthèse</li> </ul>

Tableau 1. Caractéristiques des trois grandes classes de pesticides

## I.2.2 Transfert des produits phytosanitaires vers les milieux aquatiques

Les transferts sont généralement plus importants dans les premiers jours ou premières semaines suivant l'application, selon la persistance des produits. Ainsi, l'eau est l'un des principaux vecteurs du transfert de la contamination vers les hydrosystèmes de surface et souterrains. La dérive latérale des produits lors de l'épandage ainsi que la volatilisation peuvent aussi générer une contamination des eaux de surface, parfois à des distances très grandes du lieu d'application, au niveau de systèmes fragiles et protégés. La quantité de pesticides présents dans l'environnement est très difficile à évaluer d'autant plus que les phénomènes de dégradation peuvent donner des sous-produits inconnus, et dans certains cas, plus toxiques que le pesticide de départ.

Le devenir des produits phytosanitaires dans l'environnement va être régi selon quatre processus principaux :

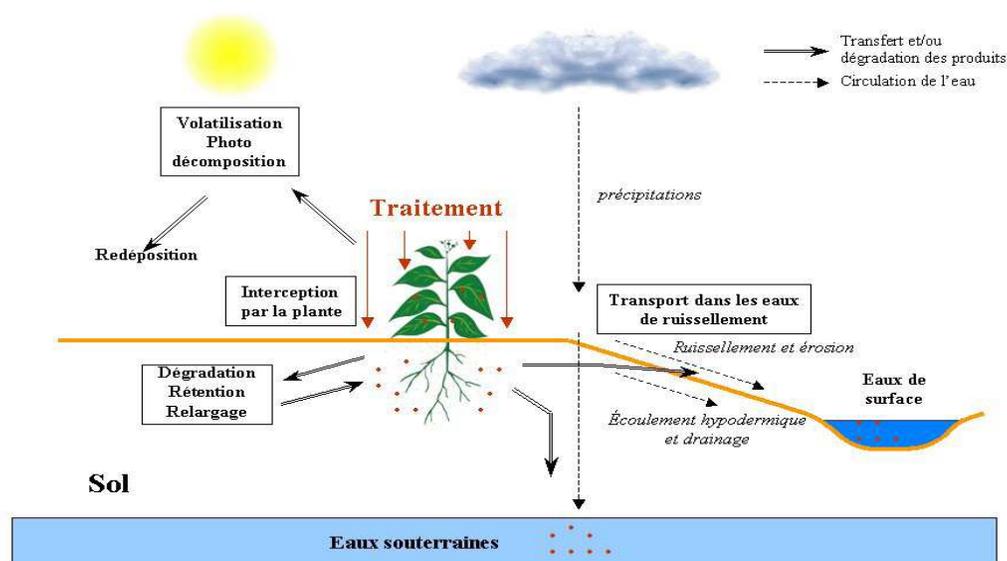


Figure 1. Devenir des produits phytosanitaires dans l'environnement

### 1) La dégradation :

Les trois principales voies de dégradation sont de nature photochimique, chimique ou biologique. Notons que la dégradation d'une molécule peut donner naissance à des métabolites qui sont plus toxiques et plus persistants que la molécule mère.

#### ▪ Dégradation photochimique : photodégradation

Ce processus concerne les composés présents à la surface du sol ou dans la couche photique de la masse d'eau et qui possèdent des propriétés photosensibles. Cette voie ne permet pas d'aboutir à la dégradation complète de la molécule, le caractère photosensible s'atténuant au cours des étapes de dégradation.

#### ▪ Dégradation chimique

Les réactions d'hydrolyse acide ou basique sont principalement mises en jeu dans cette voie de dégradation. Les matières organiques, les oxydes métalliques ou encore les argiles, sont les constituants du sol jouant le rôle de catalyseur. Les réactions d'oxydation (consommation d'oxygène) et de dissociation (rupture de certains groupements) contribuent également à la dégradation chimique des composés.

#### ▪ Dégradation biologique : biodégradation

Il s'agit d'une voie de dégradation utilisant les micro-organismes contenus dans le sol ou l'eau. Ceux-ci disposent d'enzymes à faible spécificité qui peuvent être détournées de leur substrat naturel. Ce mécanisme dépend essentiellement de la chaleur, de l'humidité, et de la teneur en matière organique.

### 2) La rétention :

Une fois sur le sol, les molécules peuvent être adsorbées dans le sol sur la surface du complexe argilo-humique. Ce phénomène d'adsorption traduit le passage de la phase liquide

du sol à la phase solide. Le processus inverse est appelé la désorption. La rétention se traduit donc par une diminution de la disponibilité des molécules agrochimiques et par une réduction de leur entraînement sous forme dissoute par la phase liquide du sol.

### 3) La volatilisation :

La volatilisation représente le passage de la substance de la phase liquide ou solide (sol ou eau) à la phase gazeuse (air).

### 4) Le transfert par infiltration et ruissellement :

L'infiltration désigne la circulation d'une partie de l'eau de pluie, dite "pluie efficace", par gravité à travers le sol. Ces produits transportés seront donc essentiellement des molécules solubles dans l'eau, ou très faiblement adsorbées (Amalric et al., 2003).

## I.3 Contexte législatif

### ◆ Mise sur le marché

La réglementation concernant les produits phytosanitaires commence par celle relative à la mise sur le marché (directive européenne 91/414) d'un produit. Grâce à cette directive, les risques pour l'opérateur, le consommateur et l'environnement font désormais partie de l'homologation.

### ◆ Potabilité de l'eau en France

Concernant les pesticides, la législation européenne actuelle ne pose des valeurs limites que pour l'eau potable. La réglementation concernant les teneurs en pesticides dans les eaux destinées à la consommation humaine sont définies selon le tableau suivant :

Niveau de traitement	Substance individuelle * ( $\mu\text{g.l}^{-1}$ )	Somme des substances ( $\mu\text{g.l}^{-1}$ )
Eau pouvant être distribuée sans traitement spécifique « pesticides »	0,1 **	$\leq 0,5$
Eau nécessitant un traitement spécifique d'élimination des pesticides	$0,1 < \text{et} \leq 2$	$0,5 < \text{et} \leq 5$
Eau ne pouvant être distribuée qu'après autorisation du ministère chargé de la santé	$> 2$	$> 5$

**Tableau 2. Récapitulatifs des valeurs limites pour l'eau potable (Source : IFEN)**

\* y compris les métabolites

\*\* sauf aldrine, dieldrine, heptachlore, heptachlore époxyde : • concentration max admissible dans les eaux distribuées : 0.03  $\mu\text{g.l}^{-1}$   
• concentration max admissible dans les eaux brutes : 0.3  $\mu\text{g/l}$

### ◆ Directive Cadre européenne sur l'Eau du 23 Octobre 2000 (DCE)

Cette directive, qui vise à établir un cadre pour la gestion et la protection des eaux par district hydrographique, est appelée à jouer un rôle stratégique et fondateur en matière de la politique de l'eau en Europe. Elle fixe des objectifs ambitieux pour la préservation et la restauration de

l'état des masses d'eau. A court terme la DCE impose d'effectuer une diagnose initiale de l'état des milieux aquatiques, puis elle impose la restauration des milieux trop impactés par des effets anthropiques à une échelle de quinze ans.

En application de cette directive, il a été établi une liste de 41 substances prioritaires pour lesquelles devront être prises des mesures de réduction des rejets et des émissions d'ici 2015. Seize pesticides figurent parmi les substances prioritaires : il s'agit d'herbicides (alachlore, atrazine, diuron, isoproturon, simazine, trifluraline), d'insecticides (chlorpyrifos, endosulfan, hexachlorocyclohexane dont l'isomère actif le lindane, chlorfenvinphos, aldrine, dieldrine, endrine, isodrine, DDT) et d'un fongicide (hexachlorobenzène).

La réalisation d'un état des lieux des masses d'eau (eaux souterraines, cours d'eau, lacs, eaux côtières) prend en compte les caractéristiques physico-chimiques de l'eau (Bernard, 2004), mais se base aussi sur la réaction de maillons biologiques clés, les bio-indicateurs, tels que: les diatomées périphtiques, les macrophytes, les macro-invertébrés benthiques et les poissons.

#### I.4 Contexte du stage

Les Agences de l'Eau et le Cemagref ont mis au point un indice biologique, utilisant les diatomées benthiques, l'**Indice Biologique Diatomées (IBD)**, capable de mettre en évidence les pollutions organiques et trophiques, dans le cadre de l'application de la Directive Cadre sur l'Eau, concernant la surveillance des milieux aquatiques.

Au sein des écosystèmes aquatiques, les producteurs primaires auxquels appartiennent les micro-algues ont un rôle fondamental. Ces organismes sont connus pour être particulièrement sensibles aux pollutions. Par conséquent, toute perturbation à leur niveau peut avoir des répercussions sur les niveaux trophiques supérieurs. Ceci justifie en partie l'intérêt porté aux études d'impact des polluants (métaux, pesticides...), sur diverses espèces de microalgues. De nombreux travaux ont ainsi permis de mettre en évidence des perturbations de leur croissance, de leur morphologie, voire de certaines fonctions métaboliques. De plus, leur temps de génération étant relativement court, elles répondent rapidement à la présence de xénobiotiques, contrairement aux organismes supérieurs (Chouteau, 2004).

Les diatomées, microalgues unicellulaires, sont connues pour être spécifiquement de bons bio-indicateurs de pollution par les éléments trophiques (comme la fertilisation agricole) mais l'IBD a montré jusqu'à présent, certaines limites pour déceler les effets des pollutions d'origine agricole (Debenest, 2007). A ce titre, des études sont menées au Cemagref pour rechercher de nouveaux traits écologiques, afin d'améliorer la bio-indication, en vue de la mise en place d'indices multimétriques prenant mieux en compte les pollutions toxiques.

L'objectif du présent travail a donc été d'apporter des éléments de connaissances supplémentaires sur la sensibilité des diatomées face à l'influence des conditions trophiques sur une pollution par les herbicides agricoles.

Les essais ont été réalisés en canaux dynamiques pour évaluer l'impact sur ces microalgues de deux herbicides, le s-métolachlore et l'acétochlore, couplé à des conditions de trophie différente (milieu oligotrophe et eutrophe) afin d'obtenir des indications sur l'interaction entre les facteurs pesticides et nutriments.

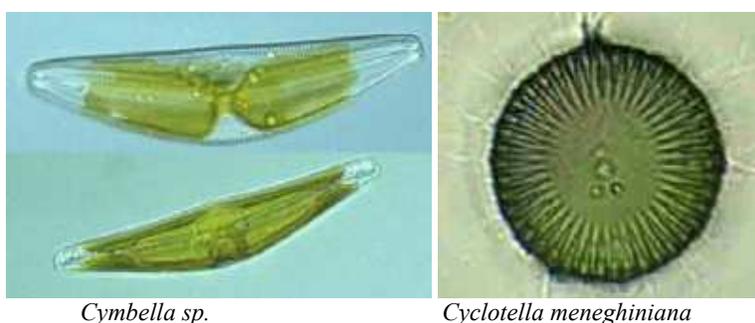
Les résultats obtenus sur le comportement du biofilm diatomique pourront venir compléter l'éventail des connaissances déjà acquises à ce sujet, qui permettent d'affiner chaque fois un peu plus les méthodes de diagnostic de l'état écologique des cours d'eau.

## II. DIATOMÉES ET EVALUATION DE LA QUALITE DES EAUX

### II.1 Les diatomées : caractères généraux

Les diatomées, (du grec *diatomos* « coupé en deux ») ou Bacillariophycées, sont des microalgues unicellulaires et eucaryotes appartenant à l'embranchement des Chromophytes (algues brunes). Elles sont principalement solitaires, mais peuvent aussi former des colonies rubanées, étoilées ou filamenteuses. Ces microalgues constituent la majeure partie du phytoplancton, en milieu marin comme en eaux douces, courantes ou stagnantes. Les espèces fixées de diatomées sont un constituant important des biofilms phytobenthique. Ce groupe algal joue donc un rôle primordial dans la production primaire de la planète.

#### FORMES SOLITAIRES



#### FORMES COLONIALES

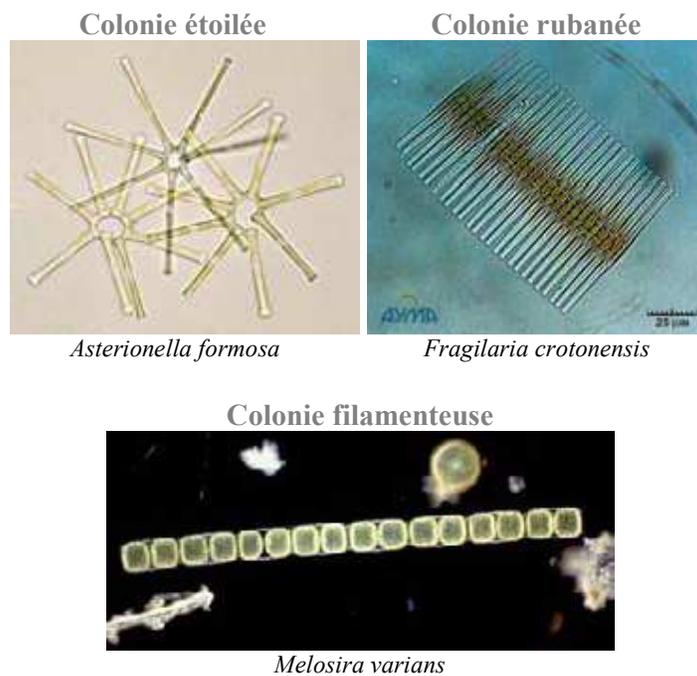
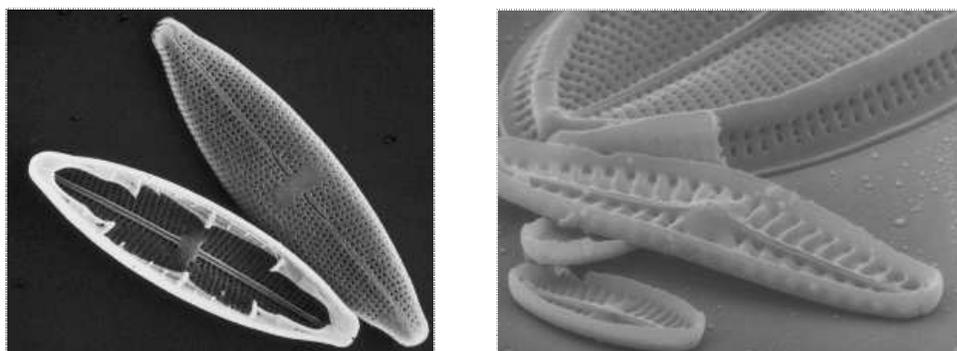


Figure 2. Variations morphologiques des diatomées (formes solitaires ou coloniales) d'après des observations au microscope photonique d'algues vivantes (Gold, 2002)

### II.1.1 Morphologie et cytologie



A gauche : 2 valves préparées, **vue interne et externe**, microscopie électronique à balayage (MEB)  
A droite : valves préparées, **vue latérale** (MEB)

**Figure 3. Diatomées en Microscopie Electronique à Balayage (Hürlimann & Niederhauser, 2007)**

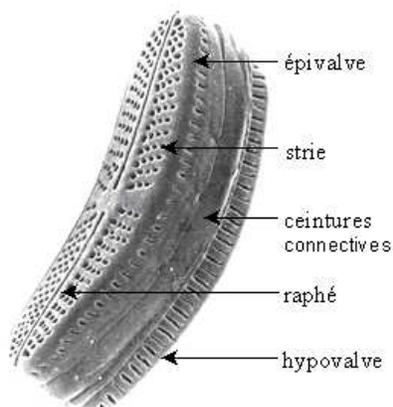
Les diatomées sont caractérisées par la présence d'une paroi très différenciée autour de la cellule (le **frustule**), principalement constituée de silice. Cette paroi externe est formée de deux valves emboîtées (l'**épivalve** et l'**hypovalve** de plus petite dimension), reliées entre elles par des **ceintures connectives** (l'**épicingulum** et l'**hypocingulum**) (Gold, 2002).

Ces valves présentent des ornements complexes et variables en fonction des espèces (**stries**, pores), visibles au microscope photonique, elles permettent l'identification des diatomées. A travers ces perforations, les diatomées excrètent des **substances extracellulaires polymériques**, qui forment une matrice organique autour du frustule (Round et al., 1990).

Elles jouent un rôle dans leur mobilité, leur adhésion au substrat, dans la formation des colonies et contre la dessiccation (Hoagland et al., 1993).

Au niveau intracellulaire, les diatomées possèdent les mêmes organites que les autres algues eucaryotes (noyau, mitochondries, appareil de Golgi, chloroplastes, vacuoles..) (Bernard, 2004).

Les chloroplastes présentent une couleur jaune pâle à brune, qui a déterminé le classement des diatomées dans le groupe des "algues brunes" et qui est due aux pigments caroténoïdes (beta-carotène, diatoxanthine, diadinoxanthine et fucoxanthine), masquant la couleur des chlorophylles (chlorophylles *a* et *c*) (Gold, 2002).



**Figure 4. Structure du frustule d'une diatomée (Round et al., 1990)**

## II.1.2 Multiplication et reproduction

Les diatomées possèdent deux modes de reproduction distincts : la multiplication végétative et la reproduction sexuée.

Elles se reproduisent le plus souvent par **multiplication végétative** qui se fait par bipartition après mitose. Le plan de division est parallèle aux valves. Chaque cellule fille conserve une valve de la cellule mère et fabrique la seconde (hypovalve) de plus petite taille (Bernard, 2004). Ce processus conduit à la réduction progressive de la taille des cellules au fil des générations jusqu'à l'atteinte d'une taille minimale (Figure 5, (Charier, 2006)

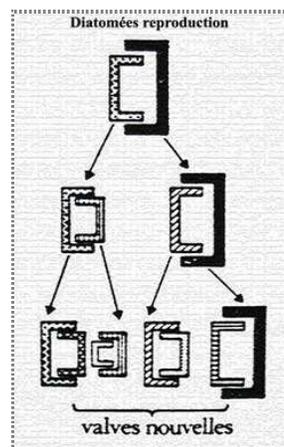


Figure 5. Illustration de la multiplication végétative

La **reproduction sexuée**, induite par la réduction de taille de la cellule mais aussi par les facteurs environnementaux optimaux (lumière, température, nature du substrat...), permet la restauration d'individus de taille normale (Gold, 2002). Les modalités de cette reproduction sexuée varient selon les espèces, mais l'auxosporulation (production d'auxospore ou cellule "oeuf") qui passe par la formation de gamètes mâles et femelles par méiose (Bernard, 2004) et qui donne naissance à une nouvelle diatomée, est toujours observée.

## II.1.3 Systématique

La classification des diatomées est basée sur les caractéristiques morphologiques du frustule en vue valvaire (de face), en vue connective (de profil), et sur l'ornementation des valves (stries, pores, ponctuations...) (Gold, 2002). Ces paramètres peuvent être observés en détail au microscope photonique après élimination du contenu cellulaire par traitement chimique (Bernard, 2004).

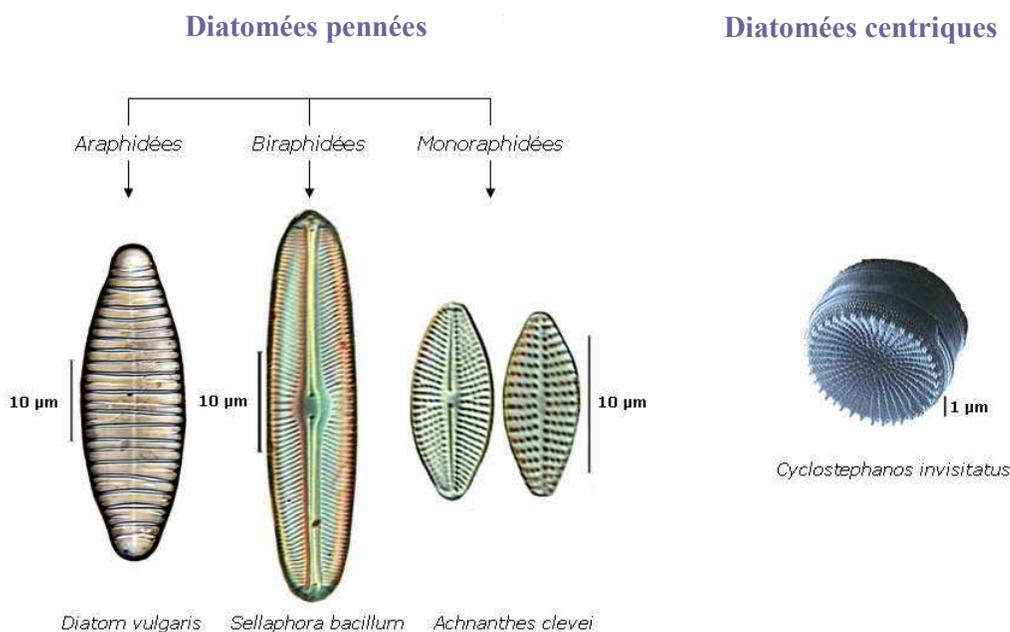


Figure 6. Représentation schématique de la systématique chez les diatomées

Les classifications des diatomées sont abondantes et révisées fréquemment. Nous nous baserons sur la classification de Krammer et Lange-Bertalot (Krammer & Lange-Bertalot, Eds. 1986-1991) distinguant deux ordres : les Centriques et les Pennées.

- Les **Centriques** : à symétrie axiale et portant des ornements radiaux ou concentriques,
- Les **Pennées**, à symétrie bilatérale, qui peuvent posséder une ligne interrompant les stries (**pseudo-raphé**) ou une fente longitudinale (**raphé**).

Les espèces sont différenciées en fonction de la présence et du nombre de raphés :

- les **araphidées**, sans raphé
- les **biraphidées**, avec un raphé sur chaque valve
- les **monoraphidées**, où seule une valve possède un raphé, l'autre valve ne présentant au plus qu'un pseudo raphé.

Les diatomées Centriques et Pennées diffèrent aussi par leur écologie et leur cycle de développement.

### II.1.4 Ecologie

Du fait de leur grande amplitude écologique, ces microalgues sont capables de coloniser tous les types de milieux aquatiques continentaux et marins, même les plus inhospitaliers et les plus pollués (mares temporaires, sources thermales, glace, bouées enduites de peinture antifouling...) (Gold, 2002).

Les diatomées présentent deux modes de vie différents :

- **Les diatomées planctoniques**, appartenant aux Centriques pour la plupart, elles vivent libres en suspension dans la colonne d'eau et constituent l'essentiel du phytoplancton lacustre, marin et des parties inférieures des cours d'eau (milieux lenticules).
- **Les diatomées benthiques**, constituées principalement d'espèces Pennées, vivent fixées à la surface de différents substrats immergés (**diatomées périphytiques**), à une profondeur

maximale correspondant à la zone euphotique des cours d'eau, où la lumière est suffisante pour assurer la photosynthèse. Ces micro-algues se développent au sein d'une matrice biologique complexe, le **biofilm**, qui comprend aussi des bactéries, des algues et des champignons, l'ensemble étant lié par des substances extracellulaires polymériques (notamment des polysaccharides) secrétées par ces microorganismes.

### II.1.5 Quelques utilisations des diatomées

#### ◆ Algues-fourrage

Les diatomées jouent un rôle fondamental à la base des chaînes trophiques comme source de nourriture pour de nombreux organismes brouteurs (protozoaires, macroinvertébrés, poissons benthophages) et les organismes filtreurs...

Les diatomées sont aussi utilisées pour l'alimentation de jeunes stades de bivalves marins et de crevettes en laboratoire et industriellement.

#### ◆ Ostréculture

L'espèce *Haslea ostrearia* produit un pigment bleu-vert responsable du verdissement des huîtres du bassin Marennes-Oléron. En plus de cette coloration, cette algue induit des qualités gustatives et organoleptiques.

#### ◆ Milieu industriel

A la mort des diatomées, les frustules siliceux s'accumulent avec les sédiments dans les fonds des océans et des lacs. Il se forme alors une roche sédimentaire appelée diatomite. Une fois tamisée, elle est utilisée en cosmétologie pour son caractère abrasif et absorbant ainsi que dans la fabrication de peintures, du papier, du béton, de vernis, de pneus, d'allumettes...(Prygiel & Coste, 2000).

#### ◆ Médecine légale

Ces micro-algues sont aussi utilisées par la police scientifique pour déterminer, notamment, l'origine par noyade de la mort (Debenest, 2007).

Enfin, les diatomées ont un intérêt tout particulier dans la bioindication de la qualité des eaux.

## II.2 Diatomées et évaluation de la qualité des eaux

### II.2.1 Principe de bioindication

Le suivi physico-chimique, dans le domaine de la surveillance de la qualité des eaux et des milieux aquatiques, est une pratique de base qui s'est complétée et perfectionnée avec l'évolution des techniques. Il existe des méthodes standards de mesure de la pénétration lumineuse, de la turbidité, de la conductivité électrique, de la salinité, de l'oxygène dissous, de la demande biologique en oxygène, des teneurs en nutriments, en métaux lourds, en pesticides...(Bernard, 2004). La mesure de ces paramètres permet de recueillir des informations simples, déterminées à une date donnée, mais ne fournit pas une vue d'ensemble de la santé de l'écosystème alors que les organismes aquatiques, en constante interaction avec leur écosystème, sont de ce fait capables de refléter les évolutions environnementales sur le court terme aussi bien que sur le long terme.

Le terme **bioindication** englobe les méthodes biologiques qui permettent de tirer des conclusions sur les conditions de l'environnement. Ces techniques se basent sur une population de végétaux ou d'animaux qui, du fait de leurs particularités écologiques, sont aptes à rendre compte de façon intégrée dans le temps de l'ambiance écologique régnant dans leur écosystème et qui peuvent révéler des modifications biotiques ou abiotiques de

l'environnement, dues notamment à des activités humaines (Hürlimann & Niederhauser, 2007).

### II.2.2 Potentialités des diatomées pour la bioindication

Les diatomées représentent une grande partie du volume du périphyton dans la plupart des écosystèmes aquatiques. Elles sont pourvues de nombreux avantages favorisant leur utilisation pour la bioindication :

- 1) leur **large répartition géographique**, leur distribution dans tous les types de milieu aquatique, ainsi que le grand nombre d'espèces ubiquistes, permettent la constitution d'une vaste base de données (Lecoïnte et al., 1993),
- 2) en tant que constituants du phytoplancton à la base des réseaux trophiques (**producteurs primaires**), ces organismes à cycle de développement très court (Baars, 1983) peuvent réagir directement et rapidement aux polluants (écoulements urbains, pulvérisation de pesticides...),
- 3) leur niveau d'organisation est également un point important. En effet, les **unicellulaires** (les bactéries, les protozoaires, les algues unicellulaires comme les diatomées...) sont immédiatement exposés aux pollutions du fait que le milieu environnant touche tout l'organisme (la cellule), contrairement aux organismes plus évolués, pluricellulaires (comme les mousses, les arbres, les invertébrés, les mammifères). Les unicellulaires réagissent ainsi plus vite aux changements de l'environnement que les organismes pluricellulaires (Hürlimann & Niederhauser, 2007),
- 4) leur taille microscopique permet un **échantillonnage relativement facile** et très rapide. Le protocole de préparation des lames permanentes est normalisé et l'outil diatomique est reconnu pour la bio-surveillance des cours d'eau (Bernard, 2004),
- 5) leur **rémanence**, assurée par leur squelette siliceux, favorise la conservation des informations. La possibilité de conserver les montages des échantillons collectés sur le long terme et leur stockage dans des bibliothèques permet d'assurer une certaine forme de traçabilité (Bernard, 2004),
- 6) la connaissance de la **durée de génération** est importante dans les méthodes de bioindication qui mettent en évidence les pollutions surtout par les changements d'espèces. Ainsi, les communautés de diatomées, dont la durée de génération va de un à quelques jours (Werner, 1977), peuvent réagir en deux semaines aux changements du milieu en modifiant leur composition spécifique (Hürlimann & Niederhauser, 2007).

Ces critères font par conséquent des diatomées d'excellents bioindicateurs généraux de la qualité des eaux des milieux lotiques. Ce constat s'est traduit par la mise en œuvre de méthodes permettant de caractériser l'état de santé des sites, à partir de croisement entre les renseignements fournis par ce compartiment écologique (Bernard, 2004).

### II.2.3 Utilisation de l'Indice Biologique Diatomées en réseau de surveillance

#### ◆ Objectif

Les études des diatomées représentent une démarche biologique qui permet de suivre dans le temps les effets de substances sur les espèces particulières et les communautés entières. Comme les cours d'eau abritent un grand nombre d'autres organismes, ces indications ne sont pas exhaustives. Les descriptions des états de santé doivent avoir une relation connue avec les paramètres chimiques qui traduisent les pollutions anthropiques.

Les indices diatomées sont des méthodes d'indication, utilisées pour décrire les états de santé des hydrosystèmes et contrôler des objectifs écologiques fixés face aux pollutions anthropiques (Hürlimann & Niederhauser, 2007).

### ◆ **Utilisation de l'IBD en réseau de surveillance**

Actuellement, de nombreuses méthodes permettant d'apprécier la qualité des eaux à partir de l'analyse des communautés de diatomées périphytiques ont été développées en Europe (Prygiel et al., 1999) et dans le monde entier. Ces méthodes s'appuient généralement sur les préférences écologiques des différentes espèces de diatomées, déterminées par des corrélations entre les communautés observées en milieu naturel et les différentes caractéristiques des habitats étudiés. Les diatomées sont des indicateurs biologiques utilisés pour la caractérisation du bon état écologique, en appui à la mise en place de la Directive Cadre sur l'Eau dans la phase de diagnostic.

L'Indice Biologique Diatomées (IBD) reste le plus utilisé en France. C'est une méthode indiciaire d'évaluation de la qualité biologique de l'eau, conçue pour une application à l'ensemble des cours d'eau, à l'exception des zones naturellement salées. La France a engagé en 1994 la mise au point d'une méthode biologique fondée sur les diatomées, utilisable sur l'ensemble des stations des réseaux de surveillance français. L'IBD est un indice de qualité générale de l'eau intégrant de nombreux paramètres chimiques (DBO<sub>5</sub>, DCO, NH<sub>4</sub>, NO<sub>3</sub>, NO<sub>2</sub>, P, PO<sub>4</sub>, chlorures) et physiques (pH, température, conductivité, matières en suspension) (Bernard, 2004).

La première version de l'IBD (Lenoir & Coste, 1996) a été établie sur un jeu de 1332 relevés réalisés sur la quasi-totalité du territoire français. De nombreux tests et applications réalisés entre 1994 et 1998 ont permis de couvrir l'ensemble du territoire français et de disposer de nouveaux relevés. C'est donc sur un total de 2704 relevés que l'Indice Biologique Diatomées a été bâti. L'IBD dont la mise au point a été lancée par les Agences de l'Eau et le Cemagref fait l'objet de la norme NF T 90-354 et une nouvelle version a été proposée en 2006. Un guide méthodologique d'aide à la mise en œuvre de l'IBD a également été réalisé par les Agences de l'Eau et le Cemagref (Prygiel & Coste, 2000). Ce guide détaille l'ensemble de la méthodologie IBD, depuis l'échantillonnage sur le terrain jusqu'à l'exploitation des données et comporte une clé d'identification originale des diatomées. Le développement de logiciels d'inventaire et de calcul des indices diatomiques, comme le logiciel "OMNIDIA" (Lecoite et al., 1993), a considérablement favorisé l'application de ces méthodes en Europe et dans le monde.

### ◆ **Détermination de l'IBD**

Les prélèvements réalisés entre mai et octobre offrent la meilleure adéquation avec les caractéristiques physico-chimiques de l'eau. Une attention particulière doit être apportée aux crues et étiages, il est donc nécessaire d'attendre un retour au niveau d'eau initial, avant de prélever l'échantillon. (Prygiel & Coste, 2000). L'IBD s'applique à tous les cours d'eau à condition que soient scrupuleusement respectées les recommandations pour l'échantillonnage. Le comptage de l'abondance relative de chaque taxon sous microscope photonique porte sur 400 individus. La détermination des taxons intervenant dans le calcul de l'IBD se fait simultanément. Un calcul de probabilité de présence du taxon représentatif du peuplement étudié pour chaque classe de qualité d'eau permet d'attribuer une note d'appréciation de l'échantillon en fonction des taxons les plus abondants (Charier, 2006).

Schématiquement, le calcul de l'IBD se fait (Prygiel & Coste, 2000) :

- En calculant la fréquence pondérée d'un taxon représentatif du peuplement pour chacune des sept classes de qualité d'eau,
- En déterminant le barycentre des sept fréquences pondérées,

## PARTIE A. CADRE GENERAL DE L'ETUDE

- En transformant cette valeur comprise entre 1 et 7 en valeur comprise entre 1 et 20 (Figure 7).

Si le nombre de diatomées comptées est inférieur à 400, le calcul de l'indice ne peut être effectué.

IBD	$IBD \geq 17.0$	$17.0 > IBD \geq 13.0$	$13.0 > IBD \geq 9.0$	$9.0 > IBD \geq 5.0$	$IBD < 5.0$
Couleur	bleu	vert	jaune	orange	rouge
Qualité	<b>Excellente</b>	<b>Bonne</b>	<b>Passable</b>	<b>Médiocre</b>	<b>Mauvaise</b>

**Figure 7. Classes de qualité d'eau selon le paramètre IBD**

D'une façon générale, l'IBD peut être appliqué en vue de :

- Evaluer la qualité biologique d'une station définie (étude ponctuelle),
- Suivre l'évolution temporelle de la qualité biologique d'un cours d'eau (saisonniers ou pluriannuels),
- Suivre l'évolution spatiale de la qualité biologique d'un cours d'eau (comparaison entre amont et aval),
- Evaluer les conséquences d'une perturbation sur le milieu (comparaison entre l'amont et l'aval d'un rejet).

## PARTIE B. MATERIEL ET METHODE

Afin d'étudier les effets de certains facteurs trophiques croisés à des facteurs de contamination par des herbicides sur le développement des diatomées benthiques, des expériences en microcosmes ont été réalisées. Le principe consiste à incuber un échantillon de diatomées, prélevées initialement en rivière, dans des canaux artificiels après ajout de nutriments et d'herbicide, et à suivre le développement algal sur quelques semaines.

### I. CONDITIONS EXPERIMENTALES CONTRÔLEES

#### I.1 Canaux expérimentaux

L'objectif du travail était d'étudier les spécificités fonctionnelles des biofilms en fonction du statut trophique et du niveau de contamination en herbicide des canaux. Par conséquent, il était nécessaire de s'affranchir des autres facteurs qui interviennent dans la structuration de la communauté de diatomées, tels que la température, la lumière, le courant... afin de limiter au mieux les variabilités entre les aquariums.

Au préalable, une expérimentation menée par Vincent Roubex a permis la mise au point de ces différents paramètres.

##### I.1.1 Présentation du dispositif expérimental

Six aquariums en verre ont été mis à disposition dans le hall technologique du Cemagref. De section rectangulaire ouverte sur la face supérieure, d'une longueur de 65 cm et de 27.5 cm de largeur, ils ont été remplis d'un volume de 34 litres d'eau chacun (Photo1).



Photo 1. Conception des canaux expérimentaux

### I.1.2 Supports de colonisation des biofilms

Dans chaque canal sont fixées six lames de verre (6 cm x 26.6 cm) partiellement immergées, servant de substrats artificiels (surface colonisable de 124.8 cm<sup>2</sup> recto/verso : 6 cm x 10.4 cm x 2). Suspendues par un portoir, elles sont insérées verticalement, côte à côte sur deux rangées numérotées 1 et 2, parallèles au courant.

Le dispositif est présenté dans la figure 8 avec six aquariums identifiés de la façon suivante :

	1 <sup>ère</sup> expérience			2 <sup>ème</sup> expérience		
	Concentration en s-métolachlore (µg.l <sup>-1</sup> )			Concentration en acétochlore (µg.l <sup>-1</sup> )		
TROPHIE	Témoins : 0	5	30	Témoins : 0	0,5	5
OLIGOTROPHE	T Oligo	5 Oligo	30 Oligo	T Oligo	0,5 Oligo	5 Oligo
EUTROPHE	T Eutro	5 Eutro	30 Eutro	T Eutro	0,5 Eutro	5 Eutro

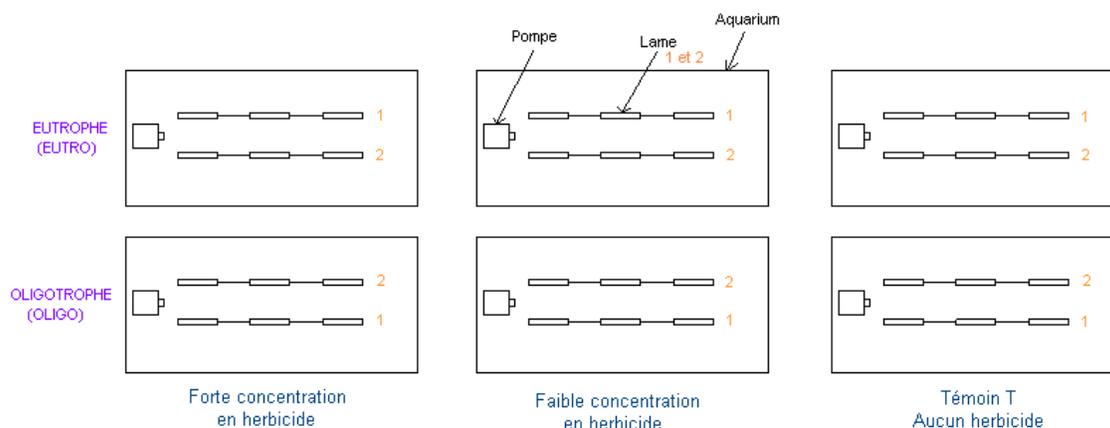


Figure 8. Vue du dessus des six canaux avec leur modalité trophique et toxique

### I.1.3 Alimentation en eau

Chaque microcosme a été rempli avec de l'eau pompée dans une rivière: la Gèze à Organ, station de référence suivie par le Cemagref (au niveau de la teneur en pesticides) et oligotrophe à sa source (faible concentration en nitrate et phosphate) (Tableau 3). Préalablement, cette eau a été filtrée (filtre de 1µm de porosité) pour limiter l'apport en sédiments, diatomées, algues vertes... Les pertes par évaporation ont été quotidiennement compensées par ajout d'eau distillée.

ORGAN (03/04/2009)	Analyse	Résultat	Unité	Seuil
	Nitrates (en NO <sub>3</sub> )	2,64	mg.l <sup>-1</sup>	0.3
	Nitrates (en N)	0,596129225	mg.l <sup>-1</sup>	0.07
	Nitrites (en NO <sub>2</sub> )	0,012	mg.l <sup>-1</sup>	0.005
	Nitrites (en N)	0,003652179	mg.l <sup>-1</sup>	0.002
	Azote ammoniacal (en NH <sub>4</sub> )	0	mg.l <sup>-1</sup>	0.005
	Azote ammoniacal (en N)	0	mg.l <sup>-1</sup>	0.004
	Azote minéral soluble (en N)	0,599781403	mg.l <sup>-1</sup>	0.08
	Orthophosphates (en P)	0	mg.l <sup>-1</sup>	0.02

Tableau 3. Résultats de l'auto-analyseur (Laboratoire de Chimie du Cemagref)

### I.1.4 Conditions d'éclairage

Les unités expérimentales ainsi définies, sont soumises à une photopériode de 14 h d'éclairement par 24 h, inversée par rapport à notre rythme jour/nuit afin de diminuer l'influence de la chaleur apportée par les néons.

Les aquariums ont été disposés deux par deux dans une enceinte fermée par un rideau noir et éclairés par deux rangées de néons disposées parallèlement à l'écoulement des pompes. Afin d'améliorer l'obscurité de la pièce, des panneaux en carton ont été placés à chaque fenêtre.

Le réglage de la photopériode est assuré par une minuterie :

Intensité lumineuse incidente :  $150 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$

Cycle 14/10 : 14 h de lumière de 18h à 8h  
10 h d'obscurité de 8h à 18h

### I.1.5 Conditions de température

Lors de la 1<sup>ère</sup> expérience, la température du local a été réglée par trois climatiseurs fixés à 18°C. La climatisation a été mise en route 24 h avant le lancement des essais. En moyenne la température de l'air ambiant a été maintenue entre 14°C et 18°C et celle de l'eau entre 21°C et 22°C avec quelques maximums à 23°C les jours de forte chaleur.

Pour la 2<sup>de</sup> expérience, nous avons opté pour des bacs de refroidissement. Trois grands bacs contenant chacun deux aquariums ont été alimentés par une cuve remplie d'eau, dont la température était maintenue à 18°C par un refroidisseur, ainsi le facteur température a été mieux maîtrisé à l'intérieur des aquariums, avec une moyenne de 19°C.



Photo 2. Bacs de refroidissement contenant les aquariums

### I.1.6 Conditions de courant

La vitesse des pompes au sein des canaux a été estimée grâce à un courantomètre à  $0,3 \text{ m.s}^{-1}$  en moyenne aux milieux des lames.

## I.2 Ensemencement

### I.2.1 Prélèvement du matériel biologique

Le périphyton a été échantillonné sur des substrats artificiels immergés pendant trois semaines, de façon à obtenir un biofilm mature. Des lames de verre ont ainsi été insérées par six dans des caisses en plastique ajourées et équipées de flotteurs en polystyrène permettant de les maintenir dans la zone photique. Ces cages ont été immergées dans le sens du courant et attachées aux supports disponibles (Morin et al., 2008).



Photo 3. Dispositif utilisé pour la collecte du périphyton.

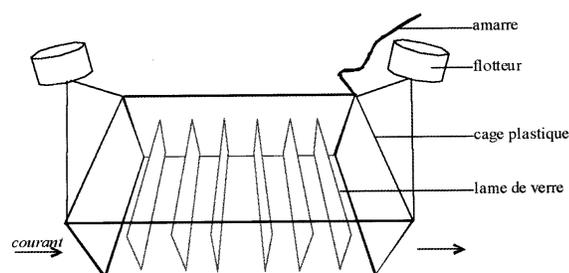


Figure 9. Schéma du dispositif (Morin et al., 2008)



Photo 4. Grattage des lames à l'aide d'un racloir

Un grattage des substrats à l'aide d'un racloir puis une mise en suspension dans 200 ml d'eau de source ont permis ainsi la préparation d'un "inoculum", qui servira à l'ensemencement des canaux.

### I.2.2 Stations d'échantillonnage

Les sorties terrain se sont faites dans le Gers, département situé dans la zone des coteaux de Gascogne (Debenest, 2007). Le cône de déjection de ce plateau est entaillé de rivières (Baïse, Gers, Save) qui irradiant sur toute la zone des coteaux de Gascogne, formant des vallées étroites orientées nord-sud (Debenest, 2007). Quelques cours d'eau prennent leur source sur les coteaux, alimentant les principales rivières de la zone (Figure10).

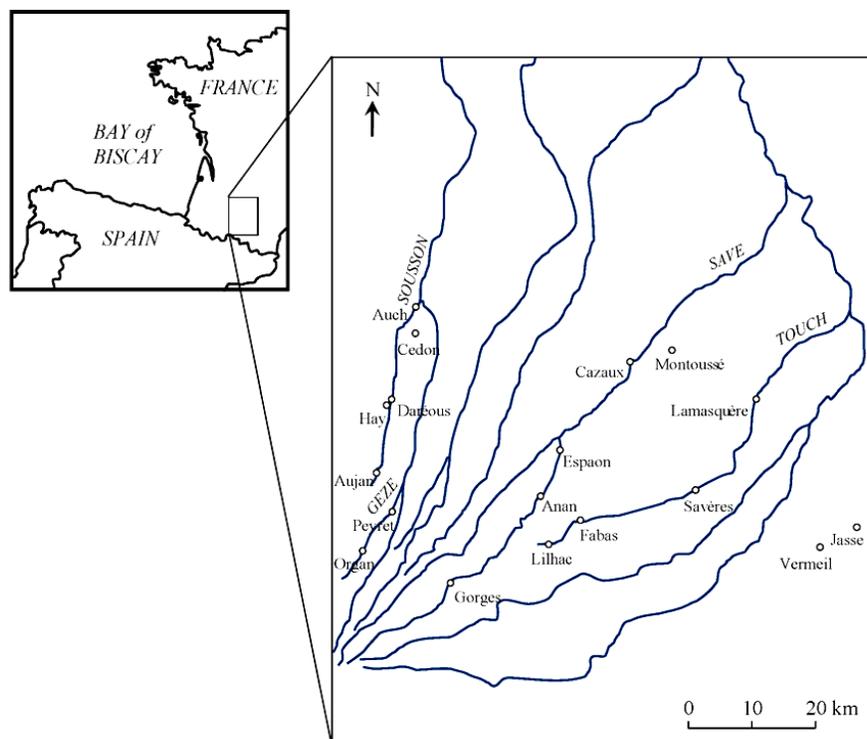


Figure 10. Réseau hydrographique des coteaux de Gascogne (Morin et al., 2008)

Deux cages en plastique ont été disposées dans deux stations considérées comme des stations de référence par le Cemagref :

- Organ où coule la Géze, un affluent du Sousson, lui même affluent du Gers,
- Montmaurin où coule la Save.

Lors de chaque prélèvement de matériel biologique, un échantillonnage d'eau a été effectué afin de mesurer les paramètres physiques de l'eau à l'aide d'appareils portatifs :

Paramètres physiques	Organ	Montmaurin
pH	7.20	7.20
Température (°C)	12	11.5
Conductivité* ( $\mu\text{S}\cdot\text{cm}^{-1}$ )	160	204

Tableau 4. Paramètres physiques de l'eau des deux stations

(\*) La minéralisation est mesurée indirectement, grâce à la conductivité ou passage du courant électrique dans l'eau qui est proportionnel à la teneur en minéraux dissous (les ions). L'unité de conductivité est le micro Siemens par centimètre. En deçà de  $400 \mu\text{S}\cdot\text{cm}^{-1}$  la minéralisation est faible et au-delà de  $600 \mu\text{S}\cdot\text{cm}^{-1}$ , la minéralisation est importante mais l'eau reste consommable (Sources : documents DDASS).



Photo 5. Stations de Organ (1 et 2) et de Montmaurin (3)

### I.2.3 Ensemencement des canaux en biofilm

Après avoir dopé l'eau des aquariums en nutriments et en herbicides, chaque unité expérimentale a étéensemencée avec 50 ml de suspension périphytique issue du mélange homogène des prélèvements des deux stations.

## I.3 Conditions trophiques et apport en nutriments : l'ambiance trophique

Une fois chaque microcosme rempli d'eau, le milieu expérimental a été complété en nutriments afin d'atteindre des conditions trophiques voulues et représentatives de certains milieux agricoles. A cet effet, des solutions concentrées en nutriments ont été préparées au laboratoire de chimie du Cemagref, en utilisant comme base le Milieu WC (ou de Woods Hole) de Guillard et Lorenzen (Guillard & Lorenzen, 1972) :

Macronutriments	mg.l <sup>-1</sup>	μmol.l <sup>-1</sup>	Micronutriments	mg.l <sup>-1</sup>	Vitamines	mg.l <sup>-1</sup>
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	8,71	50	Na <sub>2</sub> EDTA	4,36	Thiamine.HCl	0,1
NaNO <sub>3</sub>	68,01	800	FeCl <sub>3</sub> , 6H <sub>2</sub> O	3,15	Biotine	0,0005
Na <sub>2</sub> SiO <sub>3</sub> , 9H <sub>2</sub> O	227,36	800	CuSO <sub>4</sub> , 5H <sub>2</sub> O	0,01	B12	0,0005
NaHCO <sub>3</sub>	12,6	150	ZnSO <sub>4</sub> , 7H <sub>2</sub> O	0,022		
CaCl <sub>2</sub> , 2H <sub>2</sub> O	36,76	250	CoCl <sub>2</sub> , 6H <sub>2</sub> O	0,01		
MgSO <sub>4</sub> , 7H <sub>2</sub> O	36,97	150	MnCl <sub>2</sub> , 4H <sub>2</sub> O	0,18		
			Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> , 2H <sub>2</sub> O	0,006		
			H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	1		

Tableau 5. Concentrations des solutions-mères de nutriments

Les expérimentations en canaux dynamiques ont été testées avec deux ambiances trophiques différentes :

- Les canaux dynamiques "**Oligo**" ont été représentatifs d'un milieu **oligotrophe**, c'est à dire pauvre en substances nutritives.
- Les canaux dynamiques "**Eutro**" ont subi un enrichissement en nutriments afin de créer des conditions d'expérimentation eutrophes (Figure 8).

Selon Bremond et Perrodon, la teneur en silice nécessaire au développement des diatomées est de 5 mg.l<sup>-1</sup> de SiO<sub>2</sub> (Brémond & Perrodon, 1979). Mais la solution de silice étant très basique, il a fallu avant d'ensemencer les diatomées, neutraliser l'alcalinité des aquariums avec de l'acide chlorhydrique (HCl 20%) pour obtenir un pH légèrement inférieur à 8 dans chacun des canaux.

## PARTIE B. MATERIEL ET METHODE

Ainsi au final, un rapport de 10 est compté entre les concentrations en éléments nutritifs des conditions eutrophes et celles des milieux oligotrophes (Tableau 6).

Nutriments	Milieu oligotrophe	Milieu eutrophe
Nitrates (en NO <sub>3</sub> )	3,658 mg.l <sup>-1</sup>	37,386 mg.l <sup>-1</sup>
Nitrates (en N)	0,826 mg.l <sup>-1</sup>	8,442 mg.l <sup>-1</sup>
Orthophosphates (en K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> )	0,1742 mg.l <sup>-1</sup>	1,742 mg.l <sup>-1</sup>
Orthophosphates (en P)	0,031 mg.l <sup>-1</sup>	0,31 mg.l <sup>-1</sup>
Silice (en SiO <sub>2</sub> )	5,94 mg.l <sup>-1</sup>	59,756 mg.l <sup>-1</sup>

**Tableau 6. Modalités d'enrichissement des canaux expérimentaux**

Mesures initiales (à JO) réalisées avec la valise instrumentale (pHmètre, oxymètre et conductimètre) :



**Photo 6. Valise instrumentale**

◇ 1<sup>ère</sup> expérience avec le s-métolachlore :

Paramètres physiques	Aquariums oligotrophes			Aquariums eutrophes		
	T Oligo	5 Oligo	30 Oligo	T Eutro	5 Eutro	30 Eutro
T°C = 19°C						
pH (unité pH)	7,60	7,74	7,67	7,77	7,76	7,78
O <sub>2</sub> dissous (mg.l <sup>-1</sup> )	6,55	6,15	6,5	6,31	6,5	6,4
Conductivité électrique (μS.cm <sup>-1</sup> )	168	157	157	406	401	402

**Tableau 7. Valeurs des paramètres physiques des 12 aquariums obtenues avec la valise instrumentale lors de la 1<sup>ère</sup> expérience**

◇ 2<sup>ème</sup> expérience avec l'acétochlore :

Paramètres physiques	Aquariums oligotrophes			Aquariums eutrophes		
	T Oligo	0,5 Oligo	5 Oligo	T Eutro	0,5 Eutro	5 Eutro
T°C = 20°C						
pH (unité pH)	7,99	7,97	7,96	8	8,01	8,01
Conductivité électrique (μS.cm <sup>-1</sup> )	153	154	154	458	458	460

**Tableau 8. Valeurs des paramètres physiques des 12 aquariums obtenues avec la valise instrumentale lors de la 2<sup>de</sup> expérience**

(La concentration en oxygène dissous n'a pas été mesurée dans la 2<sup>de</sup> expérience, les résultats ayant été admis comme proches de ceux de la 1<sup>ère</sup> expérience).

## I.4 Conditions de contamination de la colonne d'eau en herbicides : l'ambiance toxique

### I.4.1 Modalités de contamination

Le choix des produits phytosanitaires testés s'est porté sur une même famille : les chloroacétamides (ou chloroacétanilides), avec le s-métolachlore et l'acétochlore. Ces deux substances actives herbicides sont homologuées sur différents types de grandes cultures et souvent retrouvées dans les cours d'eau des zones agricoles.

Le pesticide est injecté avant d'avoir inoculé les diatomées dans les aquariums. Pour cette opération, le volume à introduire dans les canaux est calculé à partir de la concentration en herbicide souhaitée, du volume total d'eau dans les aquariums (34 l) et de la concentration de la solution-mère en herbicide à disposition.

◇ 1<sup>ère</sup> expérience avec le **s-métolachlore** :

- Les aquariums **T Oligo** et **T Eutro** : n'ont pas été contaminés et nous ont servi de **Témoins**.
- Pour les deux aquariums **5 Oligo** et **5 Eutro** : la concentration désirée était de **5 µg.l<sup>-1</sup>**.
- Pour les aquariums **30 Oligo** et **30 Eutro** : la concentration a été fixée à **30 µg.l<sup>-1</sup>**.

	Aquariums T Oligo et T Eutro	Aquariums 5 Oligo et 5 Eutro	Aquariums 30 Oligo et 30 Eutro
Concentration en s-métolachlore (µg.l <sup>-1</sup> )	0	5	30
	0	5	30

Tableau 9. Modalités de contamination en s-métolachlore des canaux expérimentaux (1<sup>ère</sup> expérience)

◇ 2<sup>ème</sup> expérience avec l'**acétochlore** :

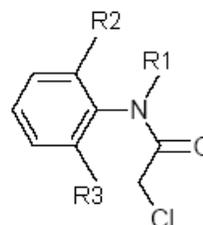
- Les aquariums **T Oligo** et **T Eutro** : les **Témoins**, n'ont pas été contaminés.
- Pour les deux aquariums **0.5 Oligo** et **0.5 Eutro** : la concentration souhaitée était de **0.5 µg.l<sup>-1</sup>**,
- Pour les aquariums **5 Oligo** et **5 Eutro** : la concentration a été fixée à **5 µg.l<sup>-1</sup>**.

	Aquariums T Oligo et T Eutro	Aquariums 0.5 Oligo et 0.5 Eutro	Aquariums 5 Oligo et 5 Eutro
Concentration en acétochlore (µg.l <sup>-1</sup> )	0	0.5	5
	0	0.5	5

Tableau 10. Modalités de contamination en acétochlore des canaux expérimentaux (2<sup>de</sup> expérience)

### I.4.2 Les chloroacétanilides

La structure des chloroacétanilides est basée sur un noyau aromatique relié à une fonction acétamide chlorée. Le noyau aromatique est disubstitué par deux groupements alkyles en R2 et R3, tandis qu'un troisième substituant R1, de type alkoxy, est relié à l'atome d'azote :



Herbicide	Solubilité	Koc*	Demi-vie
<b>Acétochlore</b>	fortement soluble	assez mobile	facilement dégradable
<b>Métolachlore</b>	fortement soluble	assez mobile	assez dégradable

**Tableau 11. Caractéristiques physico-chimiques de l'acétochlore et du métolachlore**

Koc (\*) : coefficient de partage carbone organique/eau, donne une indication sur l'aptitude de la molécule à être adsorbée ou désorbée sur la matière organique. Il représente le potentiel de rétention de cette substance active sur la matière organique du sol.

#### 1.4.2.a S-métolachlore

Selon la base de données sur les substances actives phytopharmaceutiques d'AGRITOX :

##### ◆ Identité

- Substance active : s-métolachlore
- Activité biologique principale : herbicide sélectif
- Famille chimique : chloroacetanilide ou chloroacétamide
- Composition isomérique : R/S 20/80
- Formule brute :  $C_{15} H_{22} Cl N O_2$
- Mode d'action : Le S-métolachlore, dont le site d'action est l'inhibition des élongases (enzymes qui catalysent les élongations des chaînes d'acides-gras nécessaires aux végétaux) est absorbé au niveau des racines et de la tigelle de l'adventice. Il stoppe la croissance des plantules, réduit la germination des graines et inhibe la division cellulaire.

##### ◆ Approche physico-chimique

Les caractéristiques physico-chimiques influencent les risques de transfert de cette substance active vers les eaux, et le risque de pollution des eaux :

- Solubilité dans l'eau : Fortement soluble
- Demi-vie (DT 50) : Assez dégradable
- Mobilité (Koc) : Assez mobile
- Etat physique : Liquide jaune clair

##### ◆ Utilisations

Ce désherbant sélectif est utilisé sur de nombreuses cultures de céréales, dont le maïs, le tournesol, le sorgho mais aussi le soja et les haricots... Sur le maïs, ce produit serait utilisé en pré-semis et en post-levée, c'est à dire entre fin mars et mai. Alors qu'il n'est pas homologué pour ces usages, le métolachlore pourrait également être utilisé comme désherbant total ou comme débroussaillant (en bordure de parcelle agricole ou dans les fossés), en substitution aux triazines récemment retirées d'homologation.

##### ◆ Approche toxicologique et écotoxicologique

- Sur le plan de la toxicité pour l'homme, la dose journalière acceptable (DJA) est de l'ordre de : 0,03 mg/kg/j.
  - Concernant la toxicité pour les algues, la Concentration Létale à 50 % (CL 50) est de : 0,01 mg.l<sup>-1</sup>.
  - Le phytoplancton regroupe les espèces les plus sensibles avec une NOEC\* de 20 µg.l<sup>-1</sup> au niveau spécifique.
- (NOEC\* : "No Observed Effect Concentration" ou concentration sans effet observable. Il s'agit de la plus haute concentration testée pour laquelle l'effet n'est significativement pas différent des contrôles).

- Classement toxicologique : - Irritant (Xi) 

- Dangereux pour l'environnement 

◆ **Approche réglementaire**

- Le métolachlore: est interdit,
- Le s-métolachlore : isomère actif du métolachlore, est quant à lui toujours autorisé pour le désherbage,
- Molécule non inscrite sur la liste des substances prioritaires dangereuses de la Directive Cadre européenne sur l'Eau.

Mis en évidence tout au long de l'année dans les eaux superficielles, les pics sont généralement observés à la suite des traitements de printemps. Un bruit de fond persiste tout au long de l'année. Les eaux souterraines sont quant à elles et dans le cas général peu dégradées par cette substance. Toutefois, il a été mis en évidence à plusieurs reprises sur certains points de nappes très vulnérables. Avec le retrait de l'atrazine, il est important de suivre l'évolution du s-métolachlore dans les eaux.

**I.4.2.b Acétochlore**

Selon la base de données sur les substances actives phytopharmaceutiques d'AGRITOX :

◆ **Identité**

- Substance active : acétochlore
- Activité biologique principale : herbicide sélectif
- Famille chimique : Chloroacétamides
- Formule brute :  $C_{14} H_{20} N O_2 Cl$
- Mode d'action : Inhibition des élongases perturbant la synthèse des acides gras.

◆ **Approche physico-chimique**

Les caractéristiques physico-chimiques influencent les risques de transfert de cette substance active vers les eaux, et le risque de pollution des eaux :

- Solubilité dans l'eau : Fortement soluble
- Demi-vie (DT 50) : Facilement dégradable
- Mobilité (Koc) : Assez mobile
- Etat physique : Liquide visqueux

◆ **Utilisations**

Cette substance n'est plus utilisée seule mais en association avec d'autres substances actives. Efficace contre les graminées et de nombreuses dicotylédones, elle est utilisée essentiellement pour le désherbage du maïs avant la levée des adventices. Avec le retrait de l'atrazine, l'acétochlore est désormais un herbicide de pré-levée largement employé. Facilement dégradable, les transferts semblent être uniquement printaniers.

◆ **Approche toxicologique et écotoxicologique**

- Sur le plan de la toxicité pour l'homme, la dose journalière acceptable (DJA) est de l'ordre de : 0,02 mg/kg/j.
- Concernant la toxicité pour les algues, la Concentration Létale à 50 % (CL 50) est de : 0,0013 mg.l<sup>-1</sup> et une NOEC de 0.00059 (mg.l<sup>-1</sup>).
- Classement toxicologique : - Nocif (Xn) 
- Dangereux pour l'environnement 

◆ **Approche réglementaire**

- L'acétochlore : cette substance active est autorisée pour la France dans la composition de préparations bénéficiant d'une autorisation de mise sur le marché,
- Molécule non inscrite sur la liste des substances prioritaires dangereuses de la Directive Cadre européenne sur l'Eau.

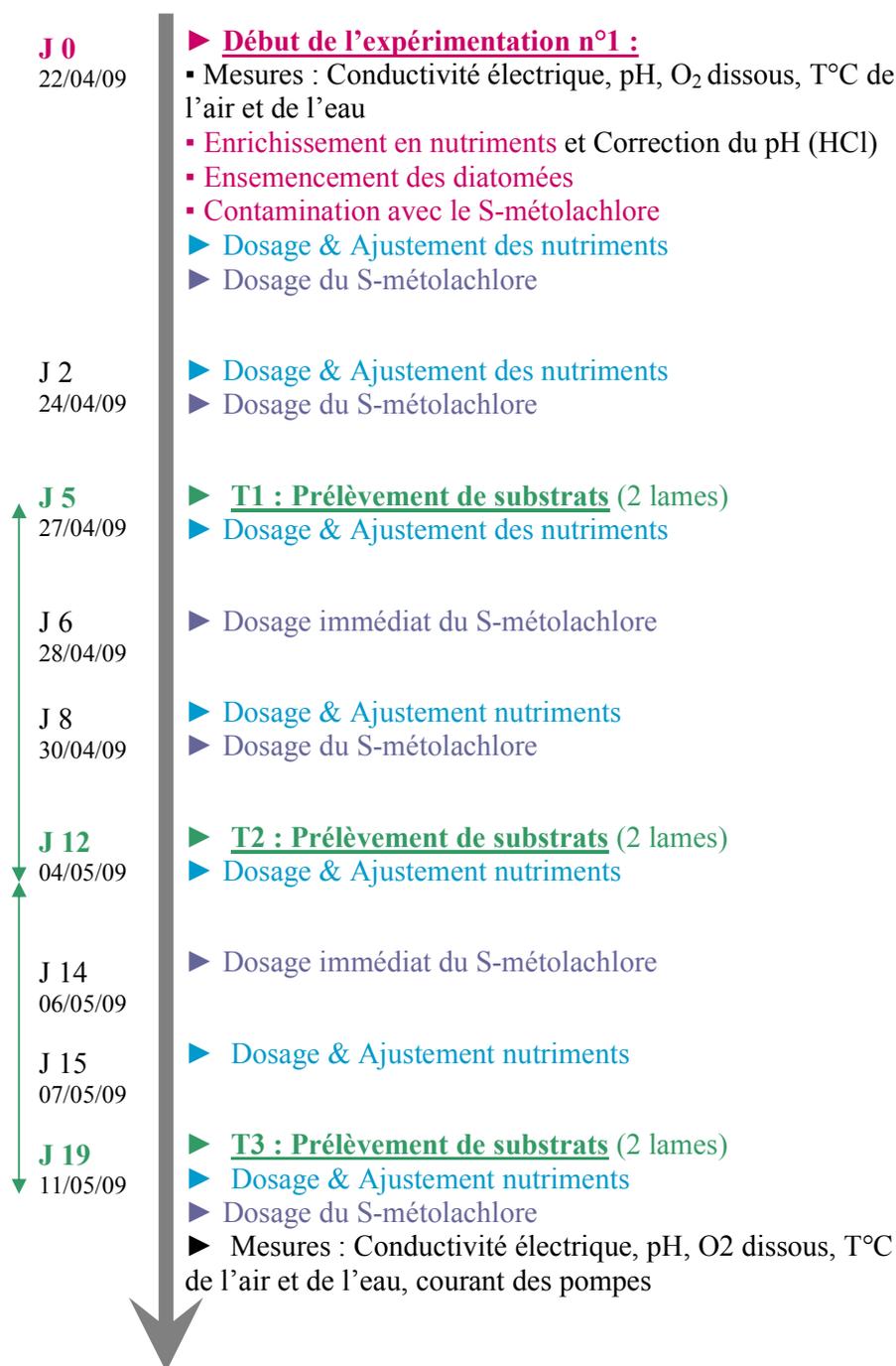
## II. Protocole d'expérimentation

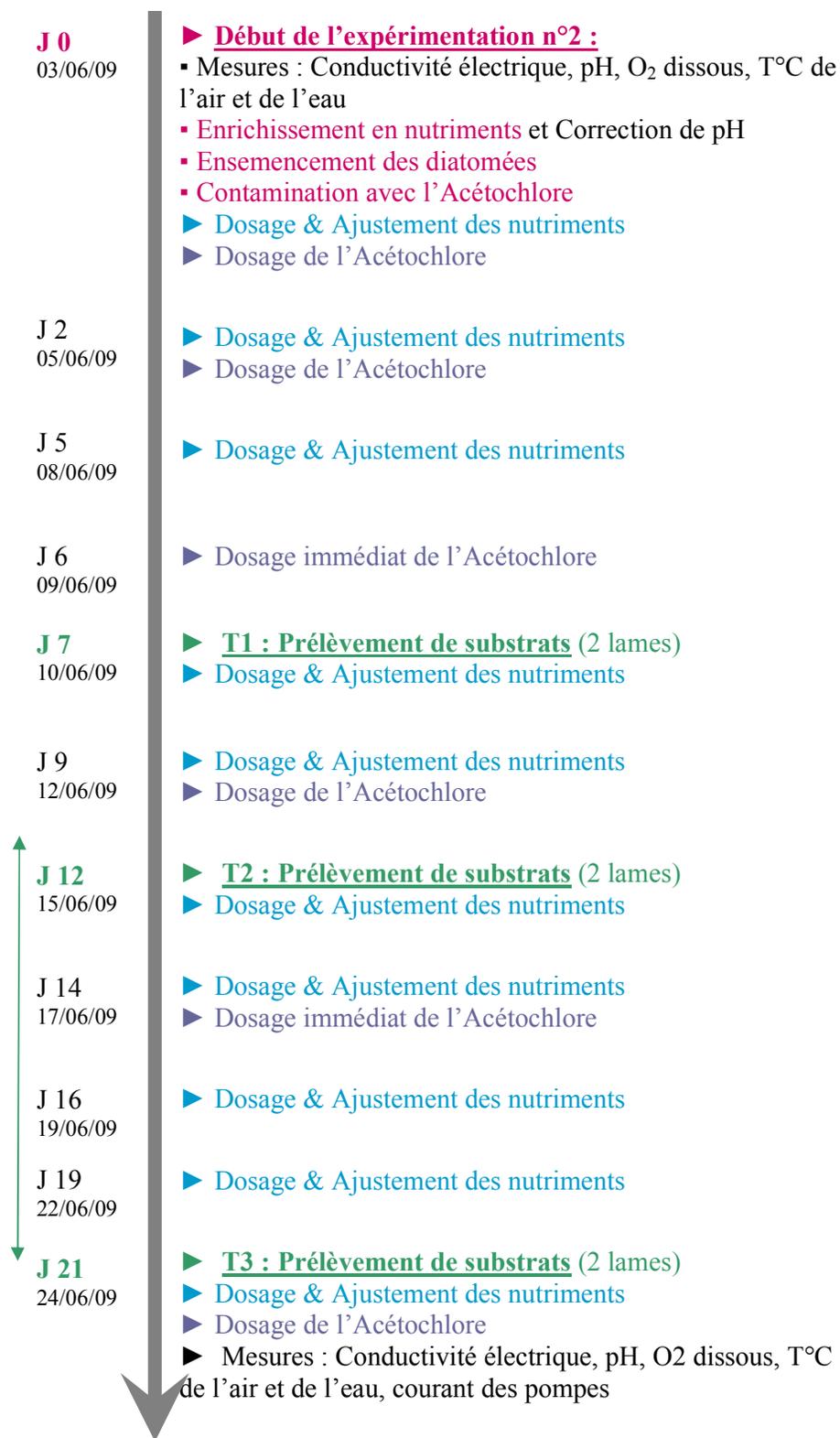
### II.1 Planning de prélèvements

Les deux essais ont duré chacun environ trois semaines :

- 1<sup>ère</sup> expérience (essais avec le s-métolachlore) : du 22/04/09 au 11/05/09
- 2<sup>ème</sup> expérience (essais avec l'acétochlore) : du 03/06/09 au 24/06/09

Un suivi et une maintenance des canaux expérimentaux ont été effectués selon la chronologie suivante :





## II.2 Méthodes analytiques

Les méthodes analytiques mises en jeu dans ce travail ont concerné principalement les dosages physico-chimiques : la température, la teneur en nutriments (facteur de contrôle potentiel de la croissance algale), la concentration en herbicide et les analyses biologiques comme : la détermination de la chlorophylle *a*, la Matière Sèche Sans Cendres (indicateurs de la biomasse planctonique) ainsi que la densité cellulaire et l'abondance relative au sein de la communauté diatomique.

### II.2.1 Analyses physico-chimiques

#### **1. La mesure de la température de l'eau et de l'air**

La température de l'eau dans les canaux ainsi que la température ambiante du hall technologique sont des mesures qui ont été prises quotidiennement afin de surveiller d'éventuelles augmentations.

#### **2. Dosage du phosphore**

Le phosphore étant l'élément nutritif le plus limitant dans la croissance des diatomées, sa mesure a été essentielle pour suivre sa consommation algale et calculer la quantité de nutriments à rajouter dans chaque aquarium, afin de maintenir les concentrations initiales constantes au cours des expériences ( $0.03 \text{ mg.l}^{-1}$  pour les aquariums oligotrophes et  $0.3 \text{ mg.l}^{-1}$  pour les eutrophes).

Tous les trois jours, un échantillon de 30ml d'eau a été prélevé à l'aide d'une seringue en verre sur laquelle est fixé un petit filtre ( $0.45\mu\text{m}$ ). L'orthophosphate (phosphate inorganique et soluble) a été mesuré selon la norme NF T90-023 par une méthode de colorimétrie (ANNEXE 1). Le principe consiste en la réaction des ions orthophosphates avec une solution acide contenant des ions de molybdate et d'antimoine pour former un complexe d'antimonyl-phosphomolybdate. Les polyphosphates et certains composés organophosphorés sont dosés après transformation (par hydrolyse par l'acide sulfurique) en orthophosphates. En présence d'acide ascorbique, il se forme un complexe de molybdène fortement coloré en bleu. La mesure de l'absorbance à une longueur d'onde de 890 nm de ce complexe, au spectrophotomètre Lambda 2 Perkin Elmer à double faisceau, permet de doser la concentration en orthophosphates présents.

#### **3. Dosage complémentaire des formes minérales des nutriments : azote, phosphore et silice**

Chaque semaine un prélèvement d'eau de 100 ml a été apporté au laboratoire de chimie pour obtenir un dosage complet, selon les méthodes normalisées AFNOR, en : nitrates, nitrites, azote, orthophosphates et silice ainsi que des paramètres physico-chimiques : pH, conductivité électrique... afin de vérifier ces constantes (ANNEXE 1).

#### **4. Dosage des herbicides**

Les herbicides font l'objet d'un suivi régulier. Tous les trois jours, un volume de 20 ml a été prélevé dans un flacon en verre, à l'aide de la seringue en verre et de son filtre ( $0.45 \mu\text{m}$ ) puis il a été stocké au froid, avant leur analyse en Chromatographie Liquide Haute Performance (CLHP) par le laboratoire de chimie du Cemagref.

La technique d'analyse des herbicides au laboratoire de Chimie est une l'HPLC / MS / MS dont les appareils associés sont pour la partie HPLC une Ultimate 3000 de chez Dionex et pour la partie MS/MS (spectrométrie de masse en tandem) un API2000 de chez Applied Biosystems / MDS Sciex.

## II.2.2 Analyses biologiques

Les analyses biologiques du substrat artificiel ont été réalisées selon un planning de prélèvement :

- A J 5, J 12 et J 19 pour la 1<sup>ère</sup> expérience.
- A J 7, J 12 et J 21 pour la 2<sup>de</sup> expérience. Pour cette dernière, après observation visuelle et avec l'aide du fluoroProbe, d'un ralentissement de la pousse du biofilm sur les lames, nous avons décidé d'espacer d'avantage le temps de prélèvements.

Pour chaque prélèvement, deux des six lames de chaque aquarium (douze lames au total) ont été retirées et raclées dans un volume de 200 ml d'eau minérale et la suspension a été homogénéisée au vortex. Les lames de verre ont été choisies en fonction de leur emplacement sur le portoir : une de chaque rangée avec une proche du courant de la pompe et l'autre plus éloignée, de façon à croiser les facteurs susceptibles d'influencer le développement du biofilm (lumière, courant...).

Le biofilm mis en suspension dans de l'eau minérale est ajusté à un volume de 200 ml. A partir de ce volume, des aliquots sont prélevés et dévolus à différentes analyses :

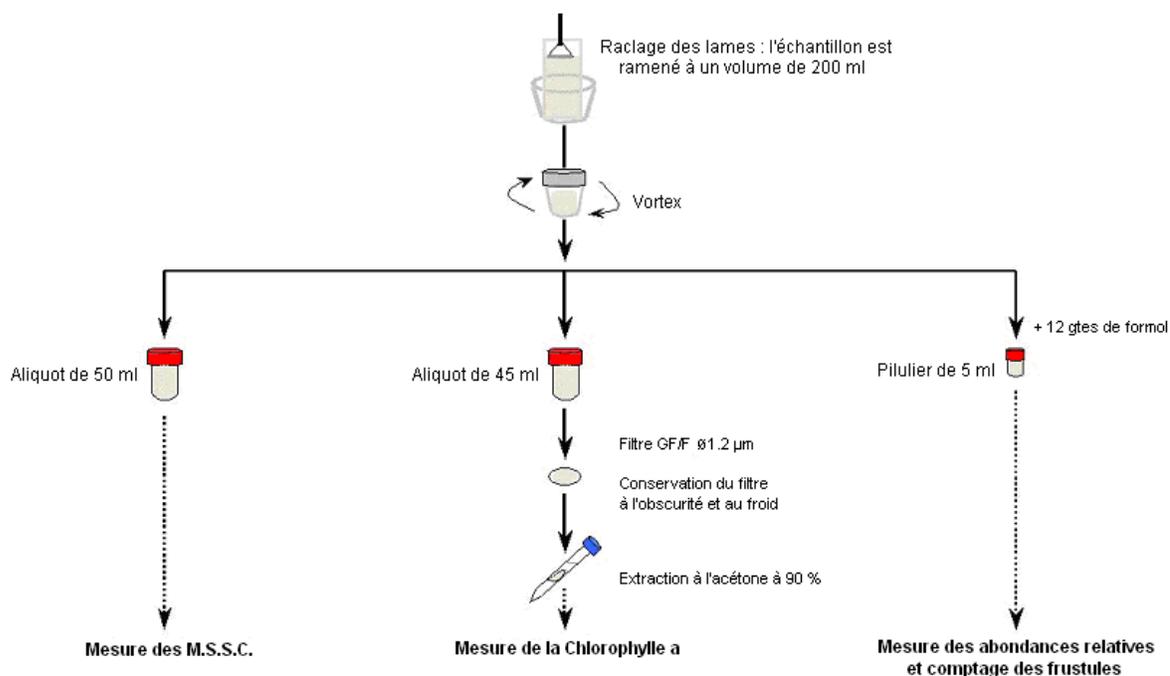


Figure 11. Protocole de prélèvement du biofilm sur des substrats artificiels selon (Debenest, 2007) modifié

A partir de cet échantillon, 50 ml ont été prélevés pour doser la Matière Sèche Sans Cendres, 45 ml pour doser la concentration en chlorophylle *a* et 5 ml, fixé avec du formaldéhyde, pour remplir un pilulier afin de réaliser ultérieurement l'identification et le dénombrement des espèces au microscope. Les 100 ml restant ont servi pour les mesures au fluoroProbe par Anne-Cécile Martins-Azevedo.

Le fluoroProbe bbe Moldaenke est un instrument de mesure très sensible pour la détermination des groupes d'algues et l'analyse de la chlorophylle totale. Il détermine de manière rapide les concentrations en chlorophylle en mode benthique ou planctonique. En plus de déterminer la teneur en chlorophylle, la sonde détecte également la présence d'algues et les distribue en différentes classes spectrales d'algues (cyanobactéries, algues vertes, diatomées, et cryptophytes). Cela permet à l'instrument d'analyser l'apparition et la distribution des algues sur le site sans avoir à recourir au laboratoire.

### II. 2.2.a Chlorophylle a

La chlorophylle est le pigment assimilateur principal des végétaux supérieurs. Il se situe dans les chloroplastes des cellules et intervient dans la photosynthèse pour intercepter l'énergie lumineuse, première étape dans la conversion de cette énergie en énergie chimique. Il existe plusieurs formes de chlorophylle différenciables selon leur structure chimique. La chlorophylle *a* existe chez tous les végétaux, la chlorophylle *b* se trouve chez les Chromophytes (végétaux supérieurs) et les Chlorophycées (algues vertes). Deux autres pigments existent chez les Diatomées et certaines Cyanobactéries, respectivement les chlorophylles *c* et *d* (Charier, 2006). La quantité de chlorophylle *a* permet donc d'avoir une estimation de la biomasse algale totale présente au sein du biofilm et la chlorophylle *c* estime la biomasse des algues brunes, les diatomées.

La biomasse algale totale est estimée par spectrophotométrie selon la norme NF T90-117 (ANNEXE 1). Cette méthode présente une sensibilité et une précision satisfaisantes pour le dosage de la chlorophylle *a*. Comme précédemment, un aliquot de 45 ml a été prélevé à partir de la suspension de départ et filtré sur un filtre Whatman GF/F de 47 mm de diamètre (porosité : 1.2µm). Ensuite le filtre a été placé dans un tube pour être congelé afin de pouvoir faire les mesures ultérieurement.

Par la suite, pour extraire la chlorophylle du filtre, un volume de 5 ml d'acétone à 90% a été ajouté dans le tube entouré de papier aluminium, afin de maintenir le filtre dans l'obscurité et d'éviter la dégradation de la chlorophylle par la lumière. Les tubes ont ensuite été disposés dans un bain à ultra-sons qui va faciliter l'extraction.

L'extraction de la chlorophylle *a* été faite par filtration sous vide, après broyage manuel du filtre, à l'aide d'une tige en verre. L'ensemble du dispositif a été rincé à l'acétone et les échantillons extraits (dont le volume final de l'extrait acétonique est noté : *v*) ont été passés successivement au spectrophotomètre aux deux longueurs d'onde 665 et 750 nm (Charier, 2006). Afin de tenir compte des produits de dégradation de la chlorophylle (phéopigments), qui interfèrent dans le dosage par absorption aux mêmes longueurs d'onde que la chlorophylle *a*, deux mesures successives de l'absorbance de l'extrait sont réalisées en intercalant une acidification de l'échantillon à l'acide chlorhydrique. L'acidification permet de convertir l'ensemble de la chlorophylle de l'échantillon en phéopigments et d'appliquer ensuite les facteurs de correction.

Les calculs de concentration en chlorophylle *a* sont réalisés d'après les équations de Lorenzen (Lorenzen, 1967).

La concentration en chlorophylle *a* en µg.l<sup>-1</sup> est donnée par l'équation :

$$Chla = \frac{27 \times ((\lambda_{665} - \lambda_{750}) - (\lambda_{a_{665}} - \lambda_{a_{750}})) \times v}{l \times V}$$

- $\lambda_{665}$  et  $\lambda_{750}$  : Absorbances à 665 nm et 750 nm avant acidification
- $\lambda_{a_{665}}$  et  $\lambda_{a_{750}}$  : Absorbances à 665 nm et 750 nm après acidification

- $v$  : Volume final de l'extrait acétonique (ml)
- $V$  : Volume d'eau filtré (45 ml)
- $l$  : Trajet optique de la cuve utilisée (1 cm)
- 27 : Facteur déterminé expérimentalement

L'ensemble étant rapporté au volume initial de 200 ml, dans lequel a été raclée la lame et à sa surface (124,8 cm<sup>2</sup>), pour obtenir un résultat de chlorophylle  $a$  en  $\mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-2}$ .

### II.2.2.b Matière Sèche Sans Cendres

La Matière Sèche Sans Cendres (MSSC) caractérise la biomasse globale du biofilm, elle est représentée par le calcul de la matière organique à partir des mesures de matières en suspension et minérales. Ce paramètre est notamment intéressant pour suivre l'évolution du développement du biofilm, lorsque celui-ci est soumis à divers stress environnementaux.

L'aliquot de 50 ml, conservé au frais, a été analysé le lendemain selon une méthode interne au laboratoire qui ne fait pas l'objet d'une procédure normalisée (Figure 11).

Dans un 1<sup>er</sup> temps, les filtres ont été calcinés au four à 550°C pendant 1h puis passés au dessiccateur. Après avoir été numérotés et pesés (P1), chaque échantillon a été filtré sous dépression (pompe à vide) puis les filtres passés à l'étuve (110°C) pendant 1heure minimum. Une deuxième pesée (P2) a été effectuée avant le passage au four pendant 1h. Une dernière pesée (P3) est alors réalisée :



Le poids de la Matière Sèche Sans les Cendres (MSSC) s'obtient par une méthode basée sur la différence de pesée entre les concentrations en Matières En Suspension (MES) et en Matières Minérales (MM) (Charier, 2006). La concentration en matière sèche sans cendre, aussi appelée Matière Organique (MO) s'obtient par le calcul suivant :

Soit  $V$  : Volume de l'échantillon filtré (50 ml)

$$MES = \frac{(P2 - P1)}{V}$$

$$MM = \frac{(P3 - P1)}{V}$$

$$MSSC = MO = \frac{(P2 - P3)}{V}$$

Ensuite le calcul doit être rapporté au volume initial de la suspension périphytique (0.2 l) et en fonction de la superficie de la lame grattée (124.8 cm<sup>2</sup>) pour obtenir un résultat en  $\text{mg}\cdot\text{cm}^{-2}$ .

### II.2.2.c Observations microscopiques : comptage des cellules et abondance relative

Comme nous l'avons vu précédemment, à chaque temps d'échantillonnage du périphyton, les substrats artificiels ont été prélevés au niveau de chaque système expérimental. Immédiatement après leur prélèvement, les substrats ont été raclés à l'aide d'une lame de

rasoir, et les biofilms périphytiques récupérés à leur surface ont été rassemblés dans un récipient. Les **analyses quantitatives et qualitatives** des communautés de diatomées [Gold] ont été effectuées à partir d'un échantillon de 5ml, conservé dans un pilulier, auquel ont été rajoutées 12 gouttes de formol, sous la hotte, pour la conservation.

Le protocole de dénombrement des espèces et de préparation des lames de comptage fait l'objet de la norme NF T 90-354, de juin 2000.

### **1. Techniques de préparation des lames pour microscope**

La préparation débarrasse l'échantillon de diatomées de la matière organique (cytoplasme des diatomées, autres organismes, détritux) et du calcaire. L'échantillon préparé ne devrait plus contenir que les squelettes siliceux, à savoir les valves des diatomées ou des fragments de valves, ainsi que des composants minéraux. Une fraction de cet échantillon est ensuite montée entre lame et lamelle dans un baume synthétique (en général Naphrax). Les diatomées sont ensuite déterminées et comptées (Hürlimann & Niederhauser, 2007).

**Procédés de préparation des échantillons** au laboratoire d'hydrobiologie du Cemagref :

- dans un tube à essai : déposer 3 ml d'échantillon, après agitation au vortex du pilulier, puis élimination des composants organiques par oxydation (dégradation chimique avec 14 ml de peroxyde d'hydrogène) et chauffage au four à sable pendant plus d'une heure,
- lavage avec de l'eau distillée et trois cycles de centrifugation (3750 Rotations Par Minute),
- remise en suspension de culot avec 1ml d'eau distillée (pour éliminer toute trace d'eau oxygénée qui nuirait à leur observation) afin d'obtenir une suspension légèrement trouble,
- sur une lamelle ronde, déposer avec une pipette 0.5 ml de la solution et laisser évaporer pendant la nuit à température ambiante,
- inclusion dans le baume synthétique pour les préparations permanentes : déposer une goutte de résine réfringente, le Naphrax, sur la lame, appliquer la lamelle sur celle-ci et placer l'ensemble sur une plaque chauffante en exerçant une légère pression afin d'éliminer les bulles,
- étiquetage et archivage des lames préparées,

Le travail au microscope comprend la détermination des espèces et le comptage des valves de diatomées. Comme les petites ornements des valves des diatomées, les caractères de détermination reconnaissables au microscope optique, atteignent les limites du pouvoir de résolution du microscope photonique, il est nécessaire de travailler avec une très bonne optique, à un grossissement de 1000 et à l'huile à immersion (Hürlimann & Niederhauser, 2007).

### **2. Analyse quantitative : Comptage des cellules (nombre de cellules par cm<sup>2</sup>)**

Le dénombrement des algues a été réalisé au moyen d'une cellule de comptage de type cellule de Nageotte, divisée en 40 champs rectangulaires et d'un volume total de 50 mm<sup>3</sup>. Après homogénéisation au vortex de l'échantillon de périphyton, une partie aliquote (125 µl) a été déposée sur la cellule de Nageotte, et les diatomées contenues dans les 40 champs ont été dénombrées (Gold, 2002).

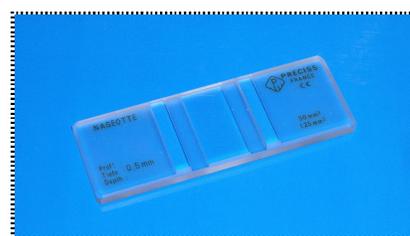


Photo 7. Cellule de Nageotte

Le critère de comptage se base sur la recherche des frustules intacts. Cependant, la technique ne permet pas de différencier les cellules mortes des vivantes (Charier, 2006). La densité des diatomées sur les substrats, en nombre de cellules par  $\text{cm}^2$ , a été estimée par la formule :

$$\text{Densité cellulaire} = \frac{(A \times 6/50) \times (200/5)}{S}$$

Soit :

- $A$  : Nombre de cellules dénombrées sur la cellule de Nageotte (40 champs) correspondant à la moyenne des 2 lames d'un aquarium
- 6 ml : Volume du pilulier (5 ml) + 1ml de formol
- $50 \text{ mm}^3$  : Volume de la cellule de Nageotte
- 200 ml : Volume de l'eau minérale dans laquelle a été grattée la lame
- 5 ml : Volume du pilulier
- $S$  : Surface de la partie immergée de la lame de verre ( $124.8 \text{ cm}^2$ )

### **3. Analyse qualitative : détermination des abondances relatives**

La détermination des diatomées demande, en plus de l'équipement technique, de l'expérience et une pratique régulière. L'effort de détermination par Vincent Roubeix a porté sur environ 400 valves de diatomées identifiées dans chaque échantillon, au niveau du genre ou de l'espèce.

L'identification a fait appel aux ouvrages les plus récents de la Süßwasserflora (Krammer & Lange-Bertalot, Eds. 1986-1991) et à la flore réalisée par Michel Coste pour la mise en place de l'Indice Biologique Diatomées, illustrée par des microphotographies (Prygiel & Coste, 2000).

Les résultats d'abondance relative de chaque taxon représenté par échantillon ont ensuite été rapportés en pour mille et représentés sous la forme d'une représentation graphique (Figure 18) pour les espèces les plus dominantes.

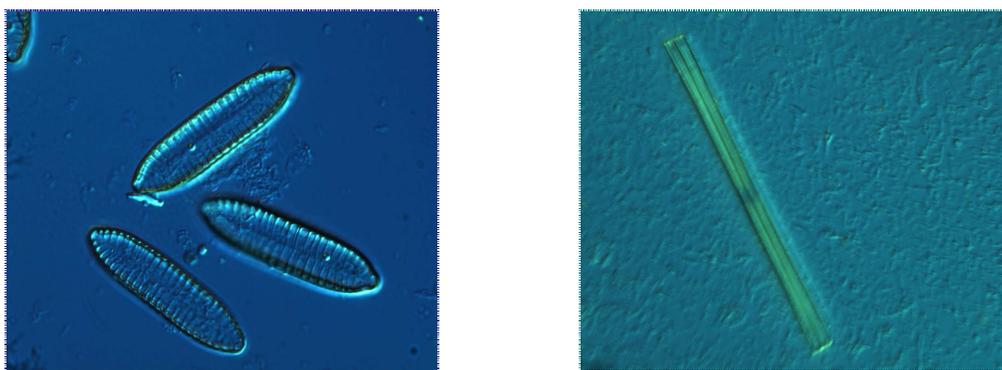


Photo 8. Photographies de *Surirella Angusta* en vue valvaire (à gauche) et de *Ulnaria Ulna* en vue connective (à droite) prises avec la caméra du microscope photonique (Logiciel Kappa)

## PARTIE C. RESULTATS ET DISCUSSION

Cette dernière partie est consacrée à la présentation, à l'interprétation et à la discussion des résultats relatifs à nos deux expérimentations en canaux artificiels. Les résultats obtenus regroupent deux types de données, celles caractérisant les communautés de diatomées périphytiques (chlorophylle, matières en suspension, densité cellulaire de diatomées, abondances relatives des espèces...) et celles définissant les conditions physico-chimiques du milieu (pH, température, conductivité, concentrations en herbicides et en nutriments...).

L'objectif de cette partie est d'identifier l'effet intégré des toxiques et des facteurs trophiques sur l'évolution du biofilm colonisé sur substrats artificiels et particulièrement sur les caractéristiques structurelles des communautés de diatomées benthiques.

### I. 1<sup>ère</sup> EXPERIMENTATION : IMPACT DU MILIEU TROPHIQUE ET DU S-METOLACHLORE SUR LES DIATOMEES

#### I.1 Conditions physico-chimiques

##### I.1.1 pH, température et conductivité

Ce premier tableau présente les paramètres physico-chimiques de départ (J 0) mesurés dans chaque aquarium :

Paramètres physiques	Aquariums oligotrophes			Aquariums eutrophes		
	T Oligo	5 Oligo	30 Oligo	T Eutro	5 Eutro	30 Eutro
pH (unité pH)	7.81	7.93	7.88	7.97	7.97	7.98
Conductivité électrique à 25°C ( $\mu\text{S.cm}^{-1}$ )	142	143	143	431	426	428

**Tableau 12. Valeurs de pH et de conductivité à J 0 lors de la 1<sup>ère</sup> expérience dosées au laboratoire de chimie**

Sur la durée de l'étude, la colonne d'eau pour les six aquariums a présenté des pH légèrement alcalins (7.90 +/- 0.10) avec une conductivité moyenne de 160  $\mu\text{S.cm}^{-1}$  dans les milieux oligotrophes, de 403  $\mu\text{S.cm}^{-1}$  dans les eutrophes et sa température a affiché environ 21.5°C (avec un minimum à 18°C et un maximum à 24°C au cours des trois semaines d'expérience).

L'influence de la **température** de l'eau sur le peuplement diatomique est difficile à mettre en évidence par le simple fait que ce facteur n'est pas indépendant des autres paramètres environnementaux. Un changement de température modifie à la fois l'oxygénation, la

viscosité de l'eau, la solubilité et la diffusion des composants chimiques. Ce paramètre agit donc plus ou moins indirectement sur le métabolisme des diatomées.

Le **pH** est également un paramètre déterminant pour la distribution des diatomées par ses effets induits sur la solubilité de différentes substances et sur la disponibilité du carbone. Ainsi peuvent être distinguées des espèces acidophiles, neutrophiles et alcaliphiles (Prygiel & Coste, 2000).

L'objectif étant de réduire au maximum une éventuelle hétérogénéité de colonisation de substrats entre les canaux et de se rapprocher au mieux des conditions naturelles : la lumière, la température, le pH... ont été relativement constants et homogènes d'un aquarium à l'autre pendant toute la durée de l'expérience.

### 1.1.2 Concentration en s-métolachlore

Les mesures de la concentration en s-métolachlore sont inscrites dans le tableau suivant :

Dates	Concentration en s-métolachlore ( $\mu\text{g.l}^{-1}$ )					
	T Oligo	T Eutro	5 Oligo	5 Eutro	30 Oligo	30 Eutro
22/04/2009	0	0	5,36	4,47	27,7	29
24/04/2009	ND*	ND	4,49	3,91	22,8	20,9
30/04/2009	ND	ND	4,27	3,85	22	23,4
06/05/2009	ND	ND	3,95	4,31	19,5	20,9
11/05/2009	ND	ND	5,43	3,89	21,2	19,9
<b>Moyenne intégrée</b>	<b>0.00</b>	<b>0.00</b>	<b>4,43</b>	<b>4,03</b>	<b>21,64</b>	<b>21,98</b>

Tableau 13. Evolution de la concentration en s-métolachlore au cours du temps en  $\mu\text{g.l}^{-1}$

(\*) ND : Non Déterminé

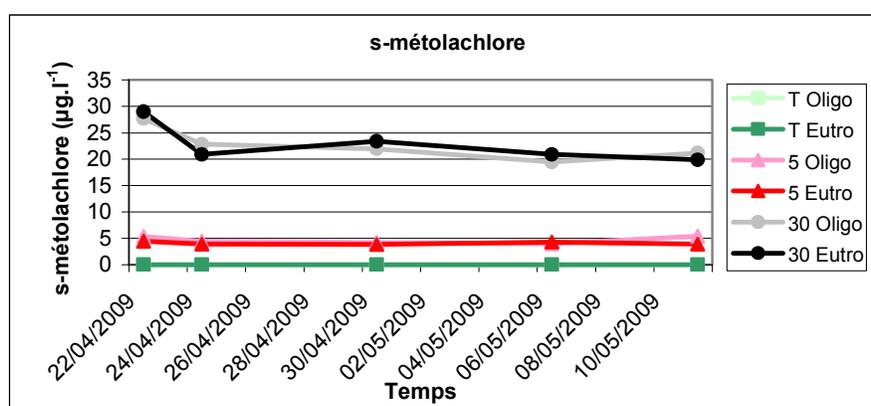


Figure 12. Evolution de la concentration en s-métolachlore au cours du temps en  $\mu\text{g.l}^{-1}$

Les analyses (Tableau 13) ont mis en évidence une légère baisse continue des concentrations en s-métolachlore pour les deux modalités 5 et 30  $\mu\text{g.l}^{-1}$ , avec une moyenne pondérée des concentrations sur 19 jours de l'ordre de 4,43  $\mu\text{g.l}^{-1}$  dans l'aquarium **5 Oligo**, de 4,03  $\mu\text{g.l}^{-1}$  dans le **5 Eutro** et de l'ordre de 21,64  $\mu\text{g.l}^{-1}$  dans le **30 Oligo** et de 21,98  $\mu\text{g.l}^{-1}$  dans le **30 Eutro**.

Suite à un problème technique, les analyses des pesticides par chromatographie liquide n'ont pas pu être effectuées dans les délais. Ceci nous a empêchés de doper les aquariums en herbicide afin de maintenir un dosage constant.

La baisse enregistrée de la concentration en s-métolachlore peut s'expliquer par ses propriétés physicochimiques. Le s-métolachlore ( $\log Kow = 3,05$ ) est une substance active légèrement hydrophobe ( $\log Kow > 3$ ) qui s'adsorbe sur les parois, la pompe, les matières en suspension et par-là même probablement sur le biofilm, c'est pourquoi nous avons pris soin de filtrer l'eau de la rivière avant de remplir les canaux, afin de limiter l'apport en matières en suspension. Des analyses de concentration dans le biofilm de certains herbicides ont souligné le potentiel d'accumulation de cette matrice biologique (Margoum et al., 2006). Par conséquent, même si les concentrations dans les eaux du s-métolachlore se sont avérées plus faibles au cours du temps dans les canaux, les diatomées ont pu être exposées à ces molécules dans le biofilm.

Les molécules ont aussi pu être dégradées par la lumière apportée par les néons même si en ce qui concerne le s-métolachlore la photodégradation est relativement longue (75 jours).

Enfin l'herbicide a également pu être métabolisé par le biofilm et constituer ainsi une source d'azote pour les micro-organismes comme le suggèrent certains auteurs pour l'isoproturon (Peres et al., 1996).

### **I.1.3 Concentration en nutriments**

Tout au long de notre expérience, la croissance de la biomasse s'accompagne d'une consommation de nutriments. L'enrichissement en phosphate stimule fortement le développement algal en mésocosmes eutrophes par rapport aux milieux faiblement enrichis. Ceci est clairement illustré par la figure 13, représentant la quantité de chlorophylle *a* par  $cm^2$  sur les lames au cours du temps.

Dans les milieux aquatiques d'eau douce, l'**azote** et surtout le **phosphore** sont les facteurs les plus fréquemment limitants. La classification de Van Dam, basée sur la richesse en nutriments, permet d'opposer les espèces hypereutrophes, abondantes dans les eaux où les éléments nutritifs sont en excès, des espèces oligotrophes sélectives des eaux pauvres en nutriments (Van Dam et al., 1994).

La **silice**, sous forme dissoute, est un nutriment important utilisé par les organismes aquatiques siliceux, dont les diatomées. Le besoin en silice varie d'une espèce à une autre mais également au sein d'une même espèce, selon son stade de développement. Certaines espèces faiblement silicifiées se développent normalement en présence de faibles quantités de silice. D'autres, au contraire, requièrent des concentrations en silice plus importantes et peuvent présenter des formes anormales si la silice devient un élément limitant. L'enrichissement en silice des eaux permet donc le développement d'une flore dominée par les diatomées (Prygiel & Coste, 2000). C'est pourquoi, nous avons maintenu constantes les conditions initiales en nutriments durant toute la durée des essais.

## I.2 Aspects biologiques

Les réponses des communautés périphytiques sont estimées par la mesure de la perturbation de paramètres qualitatifs et quantitatifs.

Trois **descripteurs** globaux **quantitatifs** ont permis de rendre compte plus ou moins parfaitement de la quantité de biomasse de biofilms en place, à chaque date de prélèvement, sur les substrats artificiels :

- La quantité de **chlorophylle a** par unité de surface, susceptible de représenter l'importance de la colonisation algale dans les biofilms ayant colonisé les substrats.
- La quantité de **matière sèche sans cendres**, rendant compte quantitativement de la production biologique totale mise en place sur ces lames.
- La **densité cellulaire** de diatomées par unité de surface.

Concernant l'aspect **qualitatif** de la croissance du biofilm, nous avons pris en considération les biodescripteurs suivants :

- L'**abondance relative** au sein de la communauté diatomique.
- Les **caractéristiques écologiques** dominantes du compartiment des diatomées.
- Les **indices biologiques diatomées** : IBD et IPS.

### I.2.1 Analyses quantitatives de la biomasse

#### I.2.1.a Chlorophylle a

Le graphique ci-dessous, représentant l'évolution de la concentration en chlorophylle *a* par unité de surface (Tableau : ANNEXE 2), permet d'établir certaines trajectoires globalement cohérentes pour représenter l'évolution de la biomasse algale dans le temps et en fonction de l'ambiance générale en nutriments des différents aquariums.

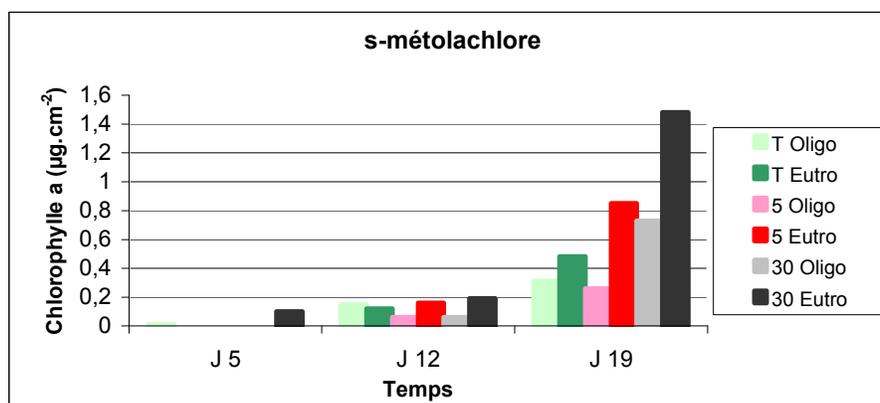


Figure 13. Evolution de la concentration en chlorophylle *a* au cours du temps, mesurée par la méthode spectrophotométrique (NF T90-117)

En premier lieu, on observe l'influence de la durée des essais sur la réponse des biofilms. Pour chaque aquarium, la concentration en chlorophylle *a* est croissante au cours du temps.

De plus, les cinétiques de croissance de la biomasse algale périphytique, établies en conditions oligotrophes et eutrophes semblent cohérentes avec les dynamiques attendues, selon le schéma proposé par (Biggs, 1996). Par contre, nous ne possédons pas assez de dates d'échantillonnage pour situer la phase de plateau qui suit normalement la phase de croissance exponentielle, illustrant les conditions de limitations (par exemple, le facteur de diffusion au sein du biofilm augmentant avec l'âge et l'épaisseur du biofilm) (Othoniel, 2006).

Enfin, nous constatons sur cette figure que la croissance algale est favorisée par une disponibilité nutritive plus élevée, ce qui se traduit par une production de biomasse plus importante en conditions eutrophes (**30 Eutro** et **5 Eutro** surtout).

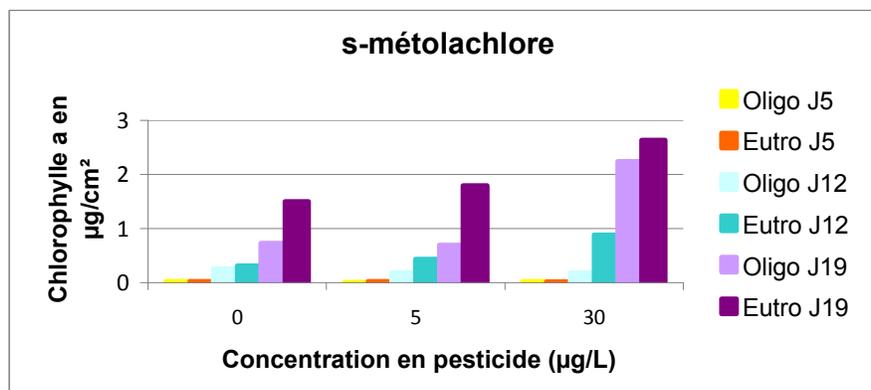


Figure 14. Evolution de la densité de chlorophylle *a* mesurée au benthofluoroProbe par Anne-Cécile Martins-Azevedo

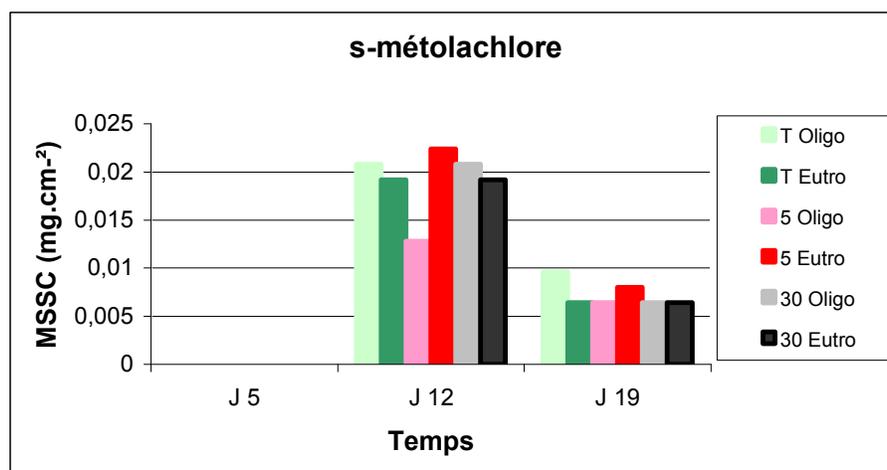
Parallèlement, les mesures de chlorophylle *a* réalisées avec le FluoroProbe bbe en mode benthique (Figure 14) affichent les mêmes tendances. La densité en chlorophylle *a* est toujours plus élevée en milieu eutrophe qu'oligotrophe en fonction du temps, ce qui s'explique par l'apport de nutriments indispensables à la croissance de ces végétaux (P, N, silice, vitamines...) en plus grande quantité et ce quelle que soit la concentration en pesticide. En effet, contrairement à ce qu'il pouvait être prévu, la production algale au cours de la colonisation semble être plus importante dans les aquariums à plus forte concentration en herbicide (comme pour les canaux : **30 Eutro**, **5 Eutro** et **30 Oligo**), avec un détachement du pilote **5 Oligo** dont la colonisation reste ralentie par rapport aux autres microcosmes (les valeurs concernant tous les paramètres quantitatifs restent nettement inférieures). Ce constat a déjà été observé au cours d'essais en microcosme, en testant les effets de faible concentration en diuron sur la croissance du biofilm (Ricart et al., 2009). A des concentrations environnementales réalistes, il a été observé que l'exposition à un herbicide inhibiteur de la photosynthèse entraîne une augmentation de la concentration en chlorophylle *a* au sein du biofilm périphytique. L'auteur évoque l'hypothèse d'une adaptation des microalgues pour compenser la réduction de l'efficacité photosynthétique due à une forte pression environnementale, en ajustant leur concentration intracellulaire en chlorophylle *a*. Il en conclut alors, que la concentration en chlorophylle *a* ne serait pas un indicateur fiable des effets des herbicides sur la biomasse algale.

D'autre part, certains auteurs évoquent le fait que les espèces eutrophes sont connues pour leur tolérance aux herbicides, ce qui se retrouve dans nos résultats avec un maximum de concentration en chlorophylle *a* dans les aquariums les plus enrichis en nutriments (**30 Eutro** et **5 Eutro**).

## I. 2.1.b Matière Sèche Sans Cendres

Les calculs de la Matière Sèche Sans Cendres, qui correspond à la fraction organique du biofilm dans sa totalité (algues, bactéries, champignons, débris éventuels...) sont représentés dans le tableau 14.

Dates	27/04/2009		04/05/09		11/05/09	
Lames	MSSC par lame (mg.cm <sup>-2</sup> )	MSSC Moyenne des 2 lames (mg.cm <sup>-2</sup> )	MSSC par lame (mg.cm <sup>-2</sup> )	MSSC Moyenne des 2 lames (mg.cm <sup>-2</sup> )	MSSC par lame (mg.cm <sup>-2</sup> )	MSSC Moyenne des 2 lames (mg.cm <sup>-2</sup> )
T Oligo 1	0	0	0,0192	0,0208	0,0096	0,0096
T Oligo 2	0		0,0224		0,0096	
T Eutro 1	0	0	0,016	0,0192	0,0096	0,0064
T Eutro 2	0		0,0224		0,0032	
5 Oligo 1	0	0	0,0096	0,0128	0,0096	0,0064
5 Oligo 2	0		0,016		0,0032	
5 Eutro 1	0	0	0,0192	0,0224	0,0064	0,008
5 Eutro 2	0		0,0256		0,0096	
30 Oligo 1	0	0	0,016	0,0208	0,0064	0,0064
30 Oligo 2	0		0,0256		0,0064	
30 Eutro 1	0	0	0,016	0,0192	0,0032	0,0064
30 Eutro 2	0		0,0224		0,0096	

Tableau 14. Concentration de la Matière Sèche Sans Cendres en mg.cm<sup>-2</sup>Figure 15. Evolution de la Matière Sèche Sans Cendres au cours du temps en mg.cm<sup>-2</sup>

Les valeurs observées de teneurs en matière sèche sans cendres sont relativement comparables d'un canal à l'autre. En effet, pour ce paramètre, mis à part pour l'aquarium **5 Oligo**, où une valeur légèrement plus faible est observée, les résultats obtenus dans les canaux témoins (**T Oligo** et **T Eutro**) ne se sont pas avérés significativement différents de ceux relevés dans les autres canaux.

Contrairement à la concentration en chlorophylle qui augmente progressivement dans le temps, les concentrations en matière organique ne sont pas corrélées. Elles ont subi une

croissance jusqu'à J 12 puis elles ont chuté par la suite dans tous les canaux expérimentaux pour atteindre des valeurs finales relativement faibles autour de 0,007 mg MSSC.cm<sup>-2</sup>. Une éventuelle limitation en nutriments (azote et silice principalement) ou un effet thermique sont des hypothèses évoquées pour expliquer l'atteinte rapide de la phase de sénescence.

### I.2.1.c Densité en diatomées benthiques

Le comptage microscopique des diatomées sur la cellule de Nageotte (ANNEXE 3) est exprimé en nombre de cellules par cm<sup>2</sup> puis illustré par le graphique suivant.

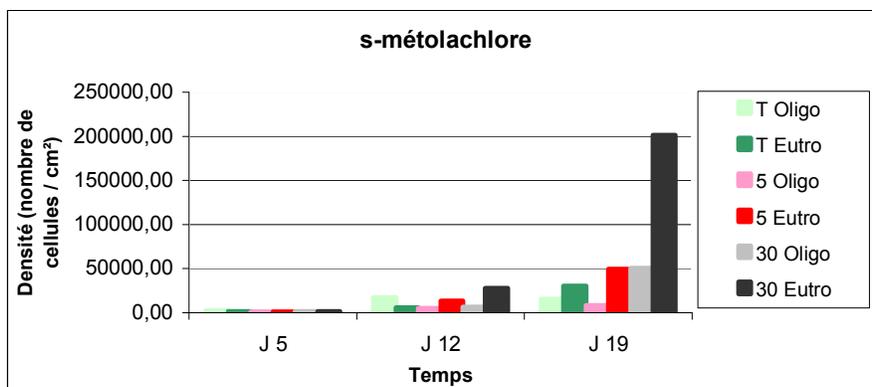


Figure 16. Evolution de la densité de diatomées au cours du temps (nombre de cellules / cm<sup>2</sup>)

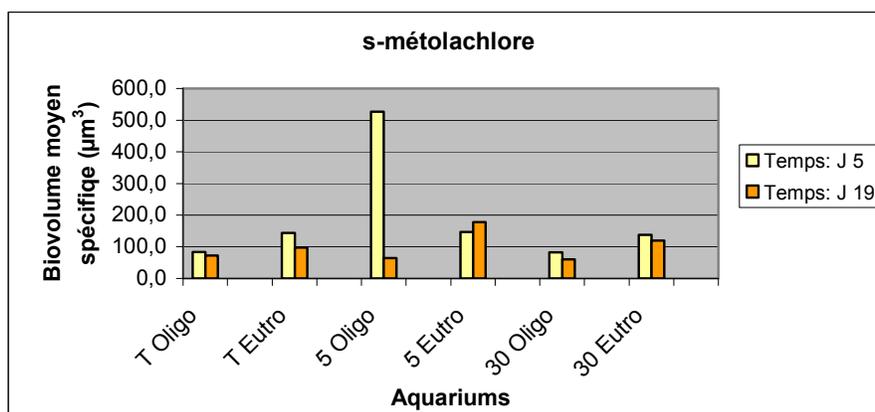
Les deux paramètres quantitatifs chlorophylle *a* et densité cellulaire ont suivi globalement la même tendance. Comme pour l'évolution de la concentration en chlorophylle (Figure 13), la densité cellulaire reste de manière générale plus faible dans les pilotes oligotrophes que dans les milieux eutrophes, due probablement à la limitation des nutriments disponibles. Dans les milieux contaminés, le nombre de diatomées par mm<sup>2</sup> s'accroît de façon nettement plus importante que dans les canaux témoins (avec à J 19, pour le pilote **T Eutro** : 300 diatomées par mm<sup>2</sup> contre 2013 diatomées par mm<sup>2</sup> dans le pilote **30 Eutro**). Ce qui rappelle le "phénomène d'Hormésis", concept désignant certaines substances qui peuvent avoir à faible dose des effets protecteurs alors qu'elles sont considérées toxiques à dose plus forte. Ce principe est également appelé "réponse adaptative".

De plus, l'analogie entre les deux graphiques traduit la constance de la proportion des différents groupes algaux formant le biofilm au cours du temps, avec probablement une dominance des diatomées étant donné la couleur brune du biofilm se développant sur les lames, caractéristique des communautés de diatomées.

### I.2.1.d Biovolume moyen spécifique

Après avoir recherché dans la littérature le biovolume spécifique des différentes espèces de diatomées rencontrées au cours de l'expérimentation, il a été possible de calculer le biovolume spécifique moyen, au niveau de chacune des lames, connaissant les abondances relatives de chaque taxon pour un échantillon de 400 individus.

Temps		J 5	J 5	J 19	J 19
Aquariums	Lames	Biovolume moyen spécifique par lame ( $\mu\text{m}^3$ )	Biovolume moyen spécifique par aquarium ( $\mu\text{m}^3$ )	Biovolume moyen spécifique par lame ( $\mu\text{m}^3$ )	Biovolume moyen spécifique par aquarium ( $\mu\text{m}^3$ )
T Oligo	T Oligo 1	66,9	83,6	77,2	72,1
	T Oligo 2	100,3		67,1	
T Eutro	T Eutro 1	129,0	144,0	109,7	97,6
	T Eutro 2	158,9		85,4	
5 Oligo	5 Oligo 1	231,9	526,5	66,9	63,8
	5 Oligo 2	821,2		60,8	
5 Eutro	5 Eutro 1	113,7	146,2	255,3	177,8
	5 Eutro 2	178,6		100,2	
30 Oligo	30 Oligo 1	82,8	82,6	56,6	60,9
	30 Oligo 2	82,4		65,1	
30 Eutro	30 Eutro 1	119,0	137,1	111,3	118,9
	30 Eutro 2	155,2		126,6	

Tableau 15. Evolution du biovolume moyen spécifique en  $\mu\text{m}^3$  au cours du tempsFigure 17. Evolution du biovolume spécifique au cours du temps en  $\mu\text{m}^3$ 

L'observation qui ressort de ce graphique (Figure 17) est que le biovolume moyen des espèces diminue pendant l'expérience. Parallèlement, la figure 16 nous montre que le nombre de diatomées augmente entre J 5 et J 19. Il semble donc se dessiner une prédominance de la croissance des plus petites espèces au cours du temps.

## 1.2.2 Analyses qualitatives

L'utilisation de substrats artificiels permet de réaliser une approche comparative qualitative, puisque toutes les communautés échantillonnées ont connu une période de colonisation identique et que les substrats sont également de surface identique.

## I. 2.2.a Abondance relative

Certaines observations peuvent être faites à partir de l'illustration de la proportion des abondances relatives des espèces formant le biofilm au niveau de chaque lame (Figure 18) :

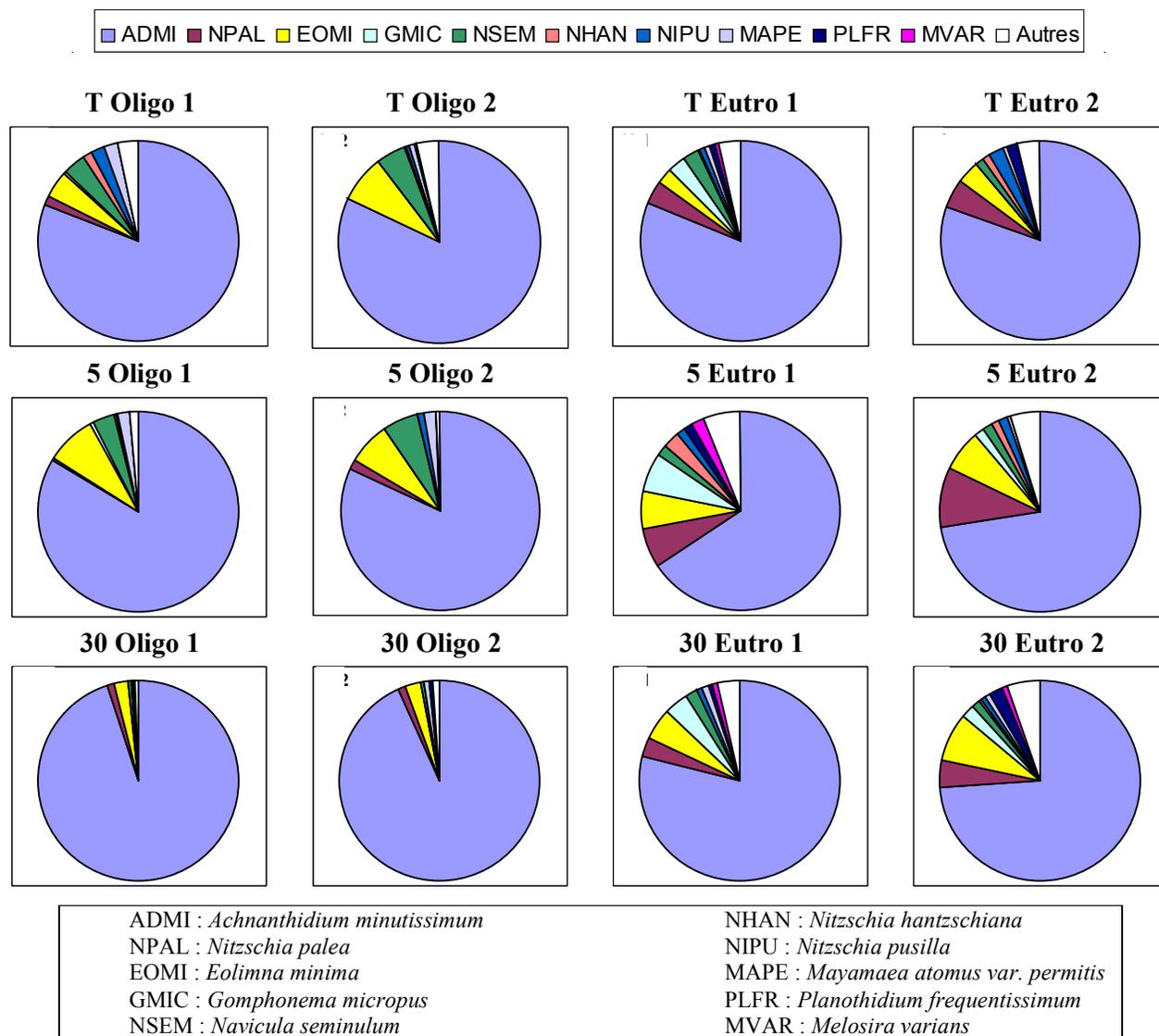


Figure 18. Représentation graphique en "secteurs" des abondances relatives des espèces dominantes à J 19

- Lors de l'expérimentation, la composition spécifique en termes d'espèces dominantes ne semble pas très éloignée d'un réplicat à l'autre au cours de l'expérimentation.
- Cette analyse floristique des diatomées montre que *Achnantheidium minutissimum* (ADM I), espèce de petite taille, reste majoritairement représentée quel que soit le canal considéré au cours du temps. En effet, cette espèce est reconnue dans la littérature pour être indifférente au niveau trophique et fréquemment rencontrée au cours d'expérience en canaux dynamiques. La littérature scientifique mentionne que les petites espèces sont des espèces pionnières, les premières à coloniser les substrats. La stratégie de ces espèces "opportunistes" pour survivre s'appuierait sur un taux élevé de multiplication leur permettant de croître plus rapidement et de coloniser précocement les substrats, même dans des conditions peu favorables (Debenest, 2007). D'autre part, plusieurs études en conditions semi-contrôlées (microcosmes) ont aussi souligné qu'une exposition à un herbicide, comme l'atrazine ou l'isoproturon, favorisait le

développement des petites espèces, notamment *Acanthidium minutissimum* (ADMI). Dans des conditions de forte pollution toxique, ces espèces seraient alors les seules à maintenir un taux de reproduction suffisant pour continuer à croître. Une autre explication avancée serait que les petites espèces présentent des concentrations en gammaglutamylcysteinyl-glycine (GSH), une molécule anti-oxydante, cinq à dix fois supérieures comparées aux grandes espèces. Certains auteurs suggèrent que la sensibilité des algues à des herbicides comme l'atrazine est à relier à leur capacité de bioconcentration. Plus leur biovolume est élevé, plus elles seraient susceptibles d'accumuler cet herbicide. Le schéma d'une colonisation primaire des substrats par de petites espèces plutôt que par des grandes espèces, dans des milieux pollués ou non, est donc discuté dans la communauté scientifique (Debenest, 2007).

Dans notre expérience, il ne se dégage pas de profil particulier de colonisation de ADMI en fonction de la concentration en s-métolachlore.

- Un accroissement de *Eolimna minima* (EOMI), également de petite taille, a été observé dans tous les aquariums indépendamment du milieu de trophie et de la concentration en herbicide.
- Certains taxons comme *Nitzschia palea* (NPAL), espèce connue dans la littérature pour être rencontrée dans les milieux eutrophes, augmentent essentiellement dans tous les canaux enrichis en éléments nutritifs, entre J 5 et J 19. De même, l'abondance de *Navicula seminulum* (NSEM), considérée comme une espèce eutrophe, suit une évolution croissante de J 5 à J 19 dans tous les milieux eutrophes alors que dans les milieux pauvres en nutriments, sa croissance chute de J 12 à J 19.

Les résultats de ces études ont révélé certaines différences de structure entre les communautés de diatomées des canaux oligotrophes et celles des milieux eutrophes, par contre, il ne se dessine pas de démarcation sensible des communautés en fonction des différentes concentrations en herbicide.

### **I 2.2.b Autoécologie : Caractéristiques écologiques dominantes**

Le calcul de l'IBD et des caractéristiques écologiques peuvent se faire manuellement ou en utilisant divers logiciels appropriés dont le programme "Omnidia version 3" :

- Base de données taxinomiques de 9173 taxons,
- Calcul de 13 indices dont IBD,
- Extraction des caractéristiques écologiques pour 9 paramètres chimiques et physiques selon la classification de Van Dam,

Parmi les différents paramètres proposés, nous nous sommes intéressés au pH, au statut trophique et à la N-hétérotrophie, c'est-à-dire l'affinité des diatomées envers l'azote organique (N org), marqueur de pollution de l'eau. Cet indicateur permet de classer les diatomées en quatre catégories correspondant à un degré de pollution de l'eau croissant :

- N-autotrophes sensibles à de faibles concentrations en N org,
- N-autotrophes tolérantes à de fortes concentrations en N org,
- N-hétérotrophes facultatives, qui nécessitent périodiquement des concentrations élevées en N org,
- N-hétérotrophes obligatoires, qui nécessitent en continu des concentrations élevées en N organique (Othoniel, 2006).

Tous les canaux suivent la même tendance, à savoir une composition du biofilm constituée d'une majorité de communautés **autotrophes tolérantes**, **neutrophiles** et **indifférentes** à l'enrichissement en nutriments des eaux.

**I 2.2.c Indices biologiques, Diversité et Equitabilité**

Les résultats des indices biologiques, de diversité et d'équitabilité issus du logiciel "Omnidia" sont répertoriés dans le tableau ci-après.

Lames	IPS*	IBD	DIVERSITE	EQUITABILITE
T Oligo 1	16.4	17.7	1.36	0.33
T Oligo 2	16.9	17.8	1.25	0.29
T Eutro 1	16.0	18.0	1.36	0.33
T Eutro 2	15.5	17.9	1.37	0.34
5 Oligo 1	17.4	18.0	1.02	0.29
5 Oligo 2	16.1	17.5	1.05	0.35
5 Eutro 1	14.5	16.9	2.15	0.48
5 Eutro 2	13.6	17.0	1.69	0.39
30 Oligo 1	18.8	19.2	0.40	0.13
30 Oligo 2	18.7	19.0	0.56	0.16
30 Eutro 1	16.1	17.7	1.48	0.34
30 Eutro 2	15.4	17.4	1.75	0.39

**Tableau 16. Valeurs des indices biologiques, de diversité et d'équitabilité à J 19 (Omnidia)**

(\*) L'IPS varie de 1 à 20 suivant le degré de pollution de l'eau : 1 à 5 : pollution très forte, 5 à 9 : pollution forte, 9 à 13 : pollution moyenne, 13 à 17 : pollution modérée, 17 à 20 : pollution faible

### 1. Indice Biologique Diatomées et Indice de Polluo-sensibilité Spécifique

L'évaluation de la qualité biologique globale par le calcul de l'IBD, utilisé par les Agences de l'Eau, repose sur l'abondance des espèces inventoriées dans un catalogue de taxons définis, leur sensibilité à la pollution (organique, saline ou eutrophisation) et leur faculté à être présentes dans des milieux très variés. Le calcul de l'IPS prend en compte de son côté, la totalité des espèces présentes dans les inventaires et cet indice est basé sur la pondération "abondance-sensibilité spécifique".

Ces deux indices, permettant de donner une note à la qualité biologique de l'eau variant de 1 (eaux très polluées) à 20 (eaux pures) sont un outil d'investigation pratique de l'évaluation de la qualité des eaux, mis à la disposition des gestionnaires des milieux aquatiques.

L'application de ces deux indices diatomiques montre que pour l'ensemble des pilotes, l'eau est estimée de bonne qualité biologique. L'IBD estime la qualité excellente tandis que les valeurs de l'IPS sont légèrement plus faibles.

Dans le tableau 16, les meilleures notes de l'IBD sont obtenues pour l'aquarium **30 Oligo** dont le peuplement est dominé par *Achnantheidium minutissimum* (ADMI), espèce polluo-sensible indicatrice d'un milieu peu perturbé (Figure 18). Il s'agit pourtant d'un des aquariums à la plus forte concentration en herbicide (30 µg.l<sup>-1</sup>).

A l'inverse la présence de *Nitzschia palea* (NPAL) dans l'aquarium **5 Eutro** (63.73 % sur la lame **5 Eutro 1** et 95.59 % sur **5 Eutro 2**), caractéristique des milieux eutrophes et de moins bonne qualité, impose un plus faible résultat pour l'IPS (IPS de 13 à 17 : pollution modérée). Cet aquarium compte en effet une présence effective en s-métolachlore (5 µg.l<sup>-1</sup>) mais cette tendance n'est pas observée dans les aquariums de plus fortes concentrations. Il semble donc que ces indices n'aient pas permis, au cours de l'expérimentation, de noter correctement la pollution due à la présence de pesticides.

Le calcul de l'indice diatomique IPS est également intéressant pour statuer sur l'homogénéité des communautés de diatomées du biofilm des canaux, sur la base de l'homologie des profils écologiques des espèces présentes. Les indices donnent les mêmes notes si les espèces présentes sont identiques ou si ce sont des espèces différentes, mais avec une homologie de profil écologique (Othoniel, 2006). Ainsi, au niveau de chaque réplikat intra-canal, les valeurs restent proches, cela est d'autant plus visible pour les lames **30 Oligo 1** et **30 Oligo 2** qui détiennent une communauté diatomique très voisine (avec respectivement 950,47 % de ADMI, 21,23 % de EOMI, 11,79 % de NPAL pour la lame **30 Oligo 1** et 932,47 % de ADMI, 24,66 % de EOMI et 11,21 % de NPAL pour la lame **30 Oligo 2**).

### **2. Diversité et Equitabilité**

**L'indice de diversité** est un coefficient traduisant le degré de diversité d'une communauté. Il existe une multitude d'indices mais le plus couramment utilisé est celui de **Shannon et Weaver (H')**. Il exprime l'importance relative du nombre des espèces abondantes dans un milieu donné. Ainsi, plus la proportion des espèces rares est forte et celle des espèces abondantes réduite, plus l'indice de diversité est grand. L'indice est minimum quand tous les individus appartiennent à la même espèce ; il est maximum quand chaque individu représente une espèce distincte. Les résultats du tableau 16 permettent de remarquer que la diversité est plus importante dans les microcosmes enrichis en nutriments que dans les oligotrophes et cette augmentation est d'autant plus marquée dans les milieux pollués par rapport aux témoins **T Eutro 1** et **T Eutro 2**.

Les résultats concernant les effets des pesticides sur la diversité des communautés algales sont relativement contrastés. Certains auteurs rapportent une diminution de la diversité au sein des communautés algales exposées à de l'isoproturon, à des concentrations élevées de l'ordre de 40 à 160  $\mu\text{g.l}^{-1}$ . A l'inverse il a été observé, à des concentrations plus faibles (2  $\mu\text{g.l}^{-1}$ ), une augmentation de la diversité par rapport aux communautés témoins, les herbicides réorganisant la structure des communautés en favorisant certaines espèces sans éliminer les espèces initiales. Ce qui peut être lié à la théorie adaptative de l'Hormesis, définie comme la stimulation de certains phénomènes biologiques par des doses faibles de toxique, dont les effets altèrent ces mêmes mécanismes à doses plus élevées.

**L'indice d'équitabilité** ou d'**équirépartition** peut varier de 0 à 1, il est maximal quand les espèces ont des abondances identiques dans le peuplement et il est minimal quand une seule espèce domine tout le peuplement. Il reste relativement faible et constant dans tous les canaux et notamment d'un réplikat à l'autre, en raison de la prédominance bien marquée de ADMI. L'indice obtient donc une note très faible au niveau des réplikats **30 Oligo 1** et **30 Oligo 2**, avec une abondance de ADMI respectivement égale à 950.47 % et 932.74 %.

### **I 2.3. Traitement statistique des données**

Un certain nombre de travaux récents permettent de souligner la difficulté de travailler avec de vrais réplikats, c'est-à-dire indépendants les uns des autres (ce qui équivaldrait à utiliser un trop grand nombre de canaux) et proposent alors de considérer les prélèvements effectués au sein d'un même canal comme tels (Volatier, 2004). La méthode, si elle ne répond pas de manière rigoureuse aux conditions d'application des tests statistiques, permet de comparer les données dans des conditions expérimentales réalistes (coût, temps, place...).

### ◆ Classification Ascendante Hiérarchique (CAH)

Pour les données relatives à l'étude des communautés de diatomées, une classification ascendante hiérarchique a été effectuée à l'aide du logiciel "R", afin de comparer la composition spécifique des communautés de diatomées collectées au sein de chaque lame. L'interprétation des résultats se fera uniquement sur le temps T3 (J 19), car pour les deux premiers temps J 5 et J 12 la tendance n'a probablement pas pu encore se dessiner.

Les résultats obtenus du T3 sont présentés sous la forme d'un arbre de classification (dendrogramme) (Figure 19). La proximité des lames sur le graphique est d'autant plus importante que leur ressemblance est forte vis-à-vis de l'ensemble des variables qui les caractérisent. Le dendrogramme permet de mettre en évidence une certaine similarité entre les communautés des répliquats (**5 Oligo 1 ; 5 Oligo 2**), (**T Eutro 1 ; T Eutro 2**) et (**30 Oligo 1 ; 30 Oligo 2**). Pour les autres lames, elles sont regroupées en une sous-classe et leur ressemblance est plus distincte d'un répliquat à l'autre. Ceci traduit le côté aléatoire de la colonisation au sein d'un même aquarium ou l'influence d'un autre facteur moins bien maîtrisé, tel que la lumière par exemple...

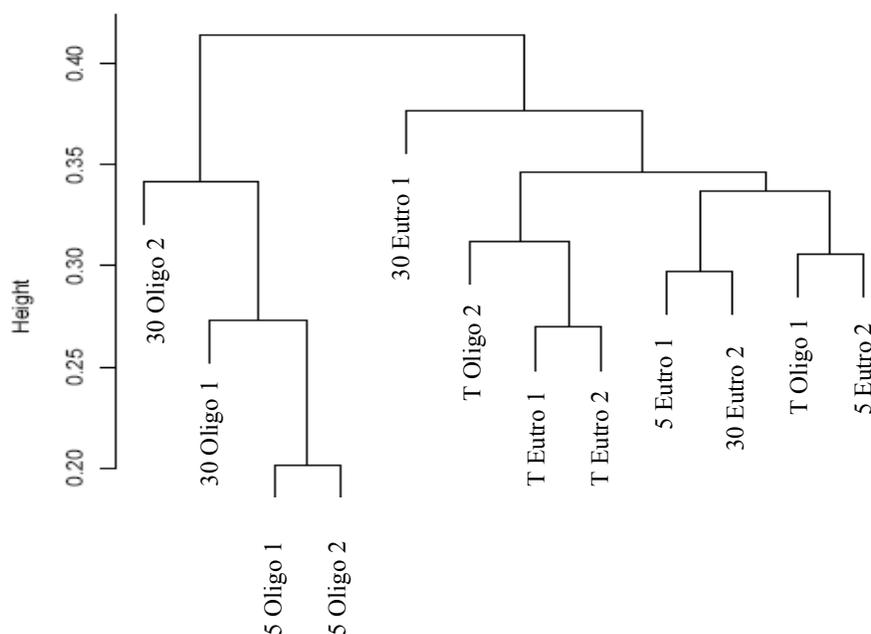


Figure 19. Arbre de classification des compositions spécifiques des communautés de diatomées collectées sur chaque lame à J 19

### ◆ Analyse en Composantes Principales (ACP)

L'ordonnement des données d'abondance relative a été réalisé par un traitement classique d'Analyse en Composantes Principales (ACP). Cette analyse permet d'essayer de dégager les grands traits structuraux de la communauté de diatomées en fonction du milieu trophique puis du gradient de concentration en herbicide.

#### 1. Effet de la "trophie" :

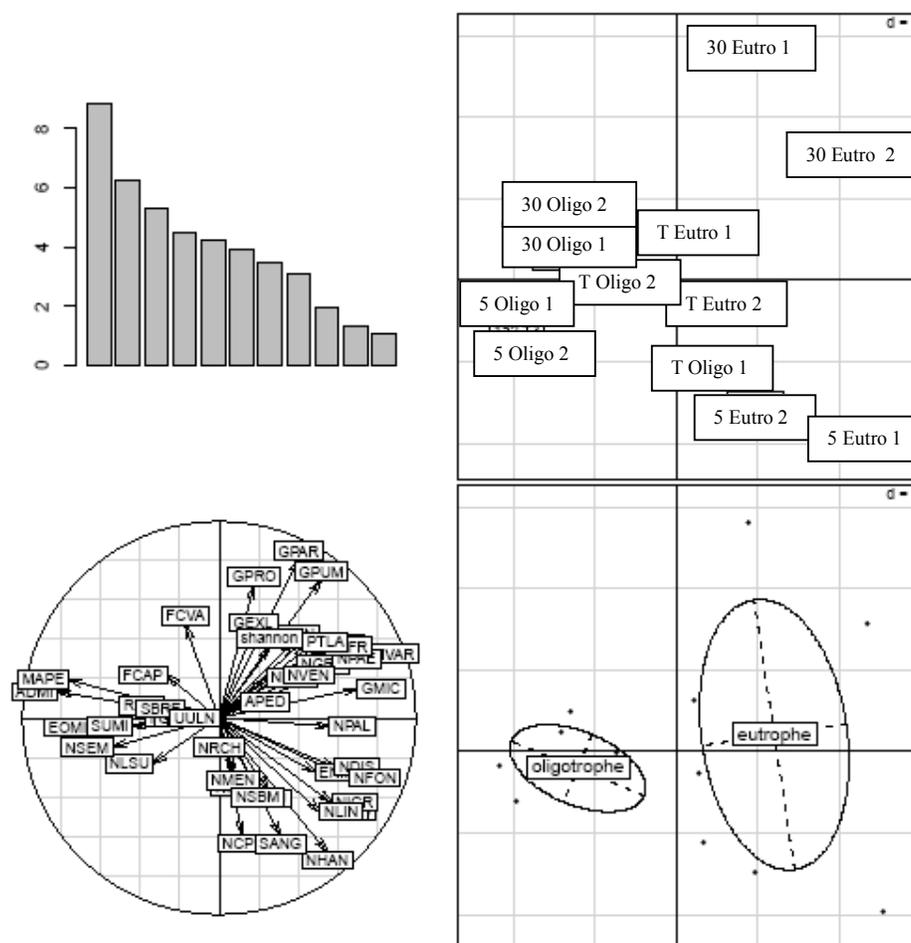


Figure 20. Analyse en Composantes Principales des compositions spécifiques en fonction du milieu Trophique à J 19

▪ En haut à gauche : **Graph 1 - Graphique des valeurs propres**

▪ En haut à droite : **Graph 2 - Représentation des échantillons**

▪ En bas à gauche : **Graph 3 - Représentation de la flore**

▪ En bas à droite : **Graph 4 - Représentation de la variable "trophie"**

#### Graphique 1 : " Graphique des valeurs propres"

Ce graphique est important car il permet d'apprécier la qualité des résultats. Le pourcentage d'inertie représente le pourcentage d'informations représentées par les axes, autrement dit la capacité que l'analyse a eu à trouver une structure dans le jeu de données (35 % reste une valeur acceptable). Chaque barre représente la valeur propre de l'axe correspondant, pour cette expérience on s'appuiera sur les axes 1 et 2, car ce sont les plus informatifs.

### Graphique 2 : Représentation des échantillons

Plus les échantillons sont proches spatialement dans le plan, plus leur composition floristique est comparable. Les répliqués restent regroupés sur le plan de façon plus ou moins marquée selon les aquariums (comme le confirme l'illustration par le dendrogramme). Ceci traduit une ressemblance de colonisation par les diatomées entre certaines lames et une répartition plus disparate pour d'autres, avec tout de même un rassemblement des échantillons de part et d'autre de l'axe en fonction de leur milieu trophique.

### Graphique 3 : Représentation de la flore

Plus les espèces sont proches spatialement parlant, plus elles sont corrélées, c'est-à-dire qu'elles sont retrouvées souvent ensemble dans les échantillons. Celles se trouvant à l'intersection des deux axes sont indépendantes (faible corrélation) avec les autres espèces et elles ne participent pas à la structuration du jeu de données. Cela permet ainsi de définir des groupements floristiques.

### Graphique 4 : Représentation de la variable "trophie"

Cette représentation graphique permet de visualiser deux groupes distincts entre les individus. L'ellipse de gauche rassemble les espèces à caractère oligotrophe et celle de droite les diatomées retrouvées le plus souvent dans un milieu eutrophe. Cependant les points sont relativement dispersés sur le graphique ce qui impose une certaine prudence dans l'interprétation des résultats.

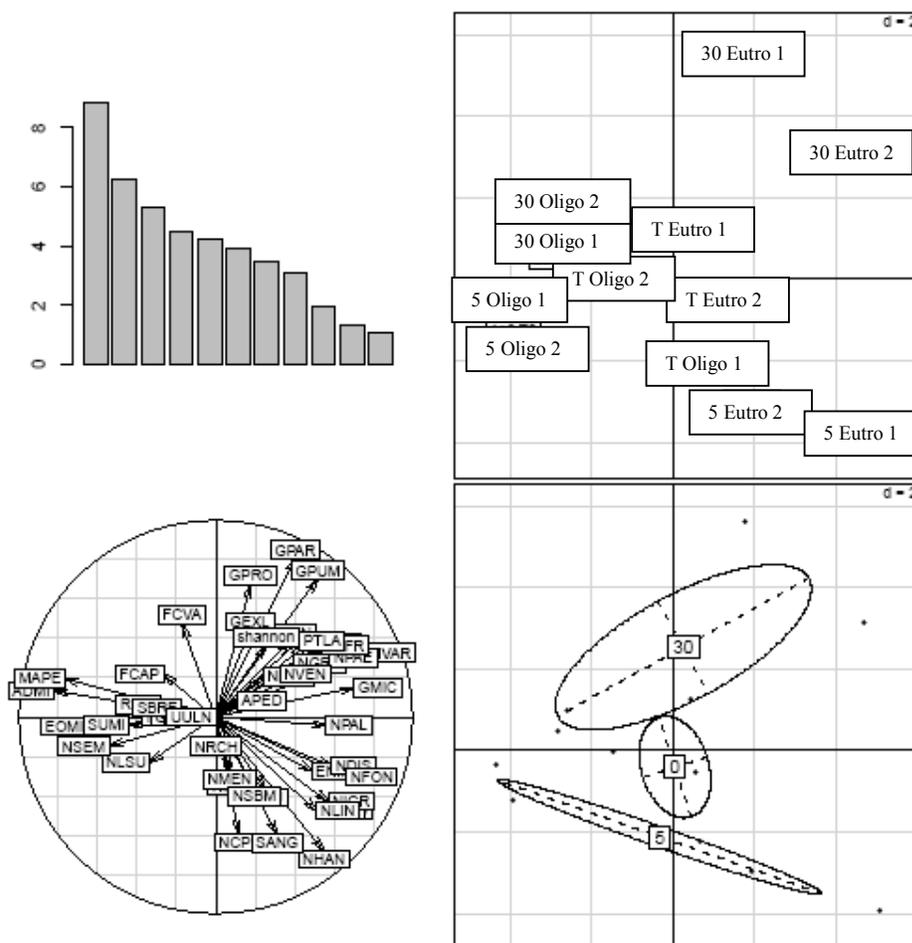
Il semble qu'une sélection des communautés soit observée en fonction de l'influence de la trophie (plus les cercles sont grands, plus l'hétérogénéité à l'intérieur du groupe est importante, ce qui traduit des structures de communautés de diatomées moins caractéristiques pour l'eutrophie que pour l'oligotrophie).

Le milieu oligotrophe apparaît ainsi corrélé avec les différentes espèces se trouvant à gauche sur le graphique 3, comme ADMI, MAPE, EOMI, NSEM, FCAP. Certains profils écologiques sont conformes avec les données bibliographiques, en effet *Fragilaria capucina* (FCAP) oligo-mésotrophe, est caractéristique des milieux peu chargés en nutriments, *Achnantheidium minutissimum* (ADMI) est connu pour être indifférente au niveau trophique. Par contre, certains profils ne sont pas en accord avec la littérature, *Mayamaea atomus* (MAPE), *Eolimna minima* (EOMI) et *Navicula seminulum* (NSEM) sont plutôt tolérantes au milieu eutrophe.

A l'inverse le paramètre "eutrophe", représenté sur la partie droite du graphique 4, paraît corrélé avec les espèces se trouvant à droite du graphique 3 : *Gomphonema parvulum* (GPAR), *Gomphonema micropus* (GMIC), *Nitzschia palea* (NPAL), *Nitzschia fonticola* (NFON), *Nitzschia capitellata* (NCPL), *Melosira varians* (MVAR) dont les profils trophiques attribués par cette analyse sont conformes aux résultats bibliographiques.

L'oligotrophie induit le développement d'un petit nombre de taxons, des espèces plus compétitives ou moins exigeantes d'un point de vue de la présence en nutriments, profitant probablement de l'absence des autres espèces pour se développer fortement.

L'eutrophie au contraire amène une forte diversité. Ce constat est appuyé par l'apparente corrélation de l'indice de Shannon (l'indice de diversité) avec les conditions eutrophes, comme nous l'avons observé précédemment dans le tableau 16. Le nombre de ces espèces, ayant besoin de plus d'éléments nutritifs pour se développer, est donc plus important mais leur abondance relative doit en théorie être modérée car elles sont en forte compétition interspécifique.

2. **Effet de l'herbicide :**

**Figure 21. Analyse en Composantes Principales des compositions spécifiques en fonction de la concentration en s-métolachlore à J 19**

▪ En haut à gauche : **Graph 1 - Graphique des valeurs propres**

▪ En haut à droite : **Graph 2 - Représentation des échantillons**

▪ En bas à gauche : **Graph 3 - Représentation de la flore**

▪ En bas à droite : **Graph 4 - Représentation de la variable "herbicide"**

Ici, seul le **graphique 4** change par rapport à la figure 20.

Au niveau de ce graphique, il est difficile d'établir un lien direct entre la sélection des espèces (graphique 3) et la concentration en s-métolachlore dans le milieu. L'allongement de l'ellipse traduit une forte hétérogénéité des points dans le plan. Il est possible que ce facteur ait une influence mais elle semble moins prononcée que celle exercée par la trophie.

De plus, une durée des expériences fixée à une échelle de temps de trois semaines est peut-être un facteur limitant pour observer l'impact des herbicides sur la communauté de diatomées. A plus long terme, l'influence de la pollution aurait peut-être été plus prononcée. De même la question du nombre des réplicats se pose pour évaluer une véritable tendance.

## II. 2<sup>de</sup> EXPERIMENTATION : IMPACT DU MILIEU TROPHIQUE ET DE L'ACETOCHLORE SUR LES DIATOMEES

### II.1 Conditions physico-chimiques

#### II.1.1 pH, température et conductivité

Les caractéristiques physico-chimiques de l'eau prélevée dans les canaux à J 0 sont présentées ci-dessous.

Paramètres physiques	Aquariums oligotrophes			Aquariums eutrophes		
	T Oligo	0,5 Oligo	5 Oligo	T Eutro	0,5 Eutro	5 Eutro
pH (unité pH)	7.63	7.68	7.67	7.95	8	7.99
Conductivité électrique à 25°C ( $\mu\text{S}.\text{cm}^{-1}$ )	153	154	154	458	458	460

Tableau 17. Valeurs de pH et de conductivité à J0 lors de la 2<sup>de</sup> expérience dosées au laboratoire de chimie

Grâce à la mise en place du système de refroidissement de l'eau des aquariums, le facteur "température" a pu être mieux maîtrisé qu'au cours de la 1<sup>ère</sup> expérience, les valeurs restant constantes et voisines de 19°-20°C tout au long des essais. Le pH est resté légèrement alcalin, surtout dans les aquariums eutrophes, du à l'ajout d'une quantité de silice plus importante. Les nutriments étant apportés en plus grande quantité aux milieux eutrophes, la conductivité (traduisant la teneur en minéraux dissous) y est plus élevée ( $458 \mu\text{S}.\text{cm}^{-1}$ ) que dans les milieux oligotrophes ( $154 \mu\text{S}.\text{cm}^{-1}$ ). Ainsi, l'homogénéité des conditions physiques a été respectée d'un pilote à l'autre au cours de l'expérience.

#### II.1.2 Concentration en acétochlore

Les résultats du laboratoire de chimie concernant la concentration en acétochlore dans chaque microcosme sont indiqués dans le tableau 18.

dates	Concentration en acétochlore ( $\mu\text{g}.\text{l}^{-1}$ )					
	T Oligo	T Eutro	0,5 Oligo	0,5 Eutro	5 Oligo	5 Eutro
03/06/2009	ND	ND	0,251	0,24	2,11	1,77
09/06/2009	0,129	0	0,217	0,27	2,11	1,77
12/06/2009	0	0	0,1868	0,1852	2,11	1,77
17/06/2009	0	0	0,211	0,197	1,79	1,68
24/06/2009	0	0	0,167	0,1402	2,38	1,69
<b>Moyenne intégrée</b>	0.00	0.00	0.21	0.21	2.06	1.73

Tableau 18. Evolution de la concentration en acétochlore au cours du temps en  $\mu\text{g}.\text{l}^{-1}$

(\*) ND : Non Déterminé

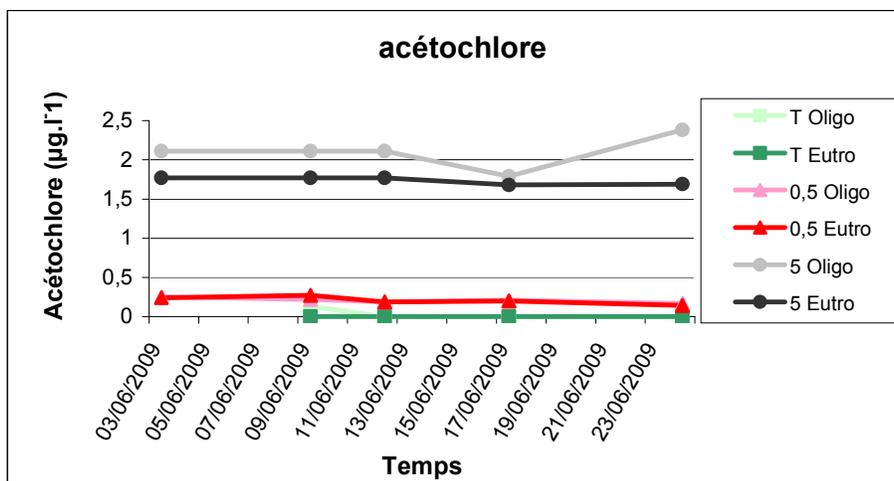


Figure 22. Evolution de la concentration en acétochlore au cours du temps en  $\mu\text{g.l}^{-1}$

Les concentrations mesurées quelques jours après l'ajout d'acétochlore, sont inférieures à celles attendues ( $0,5 \mu\text{g.l}^{-1}$  pour les aquariums les moins concentrés et  $5 \mu\text{g.l}^{-1}$  pour les aquariums les plus pollués). De plus, au cours du temps une baisse marquée des concentrations pour les modalités **0,5 Oligo** et **0,5 Eutro** a été observée. Les valeurs mesurées se sont avérées alors faibles, de l'ordre en moyenne de  $0,21 \mu\text{g.l}^{-1}$  pour les canaux les plus faiblement contaminés et de  $2,06 \mu\text{g.l}^{-1}$  et  $1,73 \mu\text{g.l}^{-1}$  pour les aquariums les plus concentrés. Comme pour la 1<sup>ère</sup> expérience, les résultats de la CLHP ayant tardé à être révélés, aucun rajout d'effluent n'a pu être effectué pour conserver la concentration initiale.

Cette faible concentration peut être due à des erreurs de manipulation, à un certain facteur d'incertitude de la CLHP et à des réactions chimiques qui peuvent engendrer des pertes ou des transformations de l'acétochlore :

- adsorption sur les matières en suspension, sur les parois ou la pompe....
- biodégradation par certaines bactéries
- phénomène de photolyse ou d'hydrolyse éventuellement.

### II.1.3 Concentrations en nutriments

Nous avons étudié la croissance de biofilms, soumis à des enrichissements artificiels en phosphore, azote et silice à travers deux modalités (oligotrophe et eutrophe), différenciées par la valeur des ajouts en nutriments réalisés. Ces expérimentations visent à obtenir des éléments de réponse concernant l'effet des concentrations "brutes" en nutriments sur la croissance des biofilms (Figure 23).

En régime hydraulique stable et en conditions saturantes d'éclairement, le développement des biofilms est dépendant de la concentration en éléments nutritifs du milieu. Ainsi, le taux de croissance des biofilms peut être représentatif de la qualité de l'eau. Toutefois, même s'il est attendu qu'un lien existe entre la productivité du biofilm et la composition chimique du milieu, il manque une relation plus quantitative, qui pourrait servir de base d'appui dans les démarches de gestion de l'eau (Othoniel, 2006).

## II. 2 Aspects biologiques

### II 2.1 Analyses quantitatives de la biomasse

#### II 2.1.a Chlorophylle a

Nous nous intéressons ici, à l'influence du milieu trophique et de la présence d'herbicide sur la production de chlorophylle *a* par la communauté algale au sein des canaux dynamiques (ANNEXE 4).

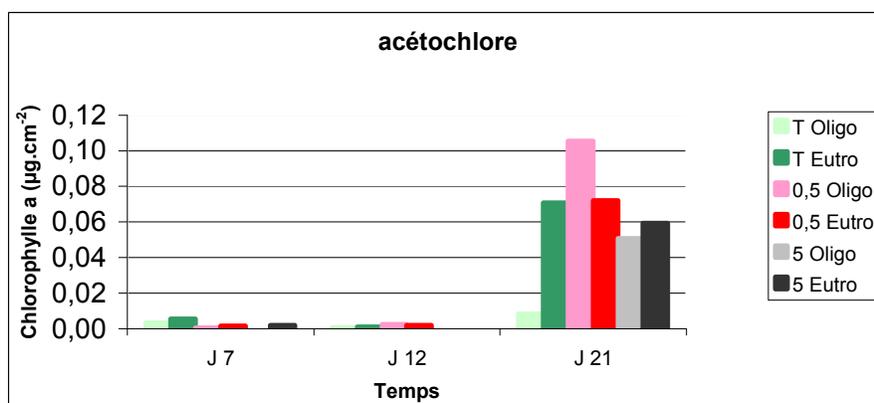


Figure 23. Evolution de la concentration en chlorophylle *a* au cours du temps en  $\mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-2}$

Le canal **0,5 Oligo** présente des valeurs plus élevées que celles des autres canaux concernant la concentration en chlorophylle *a* ainsi que pour la densité cellulaire (Figure 25).

En revanche, au sein du canal **T Oligo**, la biomasse n'évolue que très peu au cours du temps. En effet, au cours de l'expérimentation, nous avons observé un trouble blanchâtre de l'eau au niveau de l'aquarium **T Oligo**. Nous avons alors soupçonné une contamination bactérienne, qui nous a été confirmée après une observation microscopique d'un échantillon d'eau, par un spécialiste en microbiologie. Il a identifié une forte présence de bactéries en amas et de Vorticelles (ciliés péritriches : protozoaires caractérisés par leur pédoncule contractile). Les bactéries ont pu alors rentrer en compétition avec les diatomées au niveau des nutriments et empêcher leur croissance. Ceci explique également la forte consommation en éléments nutritifs observée dans ce microcosme au cours des essais. Cet aquarium ne sera donc pas pris en compte dans nos observations.

Lors du 1<sup>er</sup> essai, la croissance algale semblait être favorisée par une forte disposition en nutriments. Cette observation ne peut être faite à partir du graphique (Figure 23) de la 2<sup>de</sup> expérience. Cependant, les résultats obtenus ne sont pas du même ordre de valeur. La concentration en chlorophylle *a* obtenue à J 19 est de  $1,48 \mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-2}$  pour la 1<sup>ère</sup> expérience et de  $0,10 \mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-2}$  à J 21 pour la 2<sup>de</sup>. Ce retard de croissance ne permet donc pas d'en conclure certaine tendance.

L'hypothèse expliquant ce phénomène de retard serait éventuellement la différence de régulation de la température entre les deux expériences. En effet, au cours du 2<sup>ème</sup> essai, la température de l'eau a été mieux maîtrisée ( $19^{\circ}$ - $20^{\circ}$  C) grâce à l'installation du refroidisseur. De plus, la présence des grands bacs noirs contenant les aquariums a pu atténuer la luminosité et ralentir la croissance algale. Ainsi, les facteurs température et luminosité ont du jouer en faveur d'un ralentissement de la croissance des diatomées et les prélèvements du biofilm à J 7 et J 12 ont alors été réalisés trop précocement.

## II.2.1.b Matière Sèche Sans Cendres

Les mesures de Matière Sèche Sans les Cendres (MSSC) au niveau de chaque lame puis la moyenne calculée au sein de chacun des aquariums sont résumées dans le tableau suivant.

Dates	10/06/2009		15/06/2009		24/06/2009	
Lames	MSSC par lame (mg.cm <sup>-2</sup> )	MSSC Moyenne des 2 lames (mg.cm <sup>-2</sup> )	MSSC par lame (mg.cm <sup>-2</sup> )	MSSC Moyenne des 2 lames (mg.cm <sup>-2</sup> )	MSSC par lame (mg.cm <sup>-2</sup> )	MSSC Moyenne des 2 lames (mg.cm <sup>-2</sup> )
T Oligo 1	0,0240	0,0248	0,0224	0,0256	0,0096	0,0112
T Oligo 2	0,0256		0,0288		0,0128	
T Eutro 1	0,0096	0,0112	0,0160	0,0160	0,0160	0,0144
T Eutro 2	0,0128		0,0160		0,0128	
0,5 Oligo 1	0,0112	0,0088	0,0128	0,0144	0,0096	0,0128
0,5 Oligo 2	0,0064		0,0160		0,0160	
0,5 Eutro 1	0,0064	0,0072	0,0192	0,0192	0,0128	0,0128
0,5 Eutro 2	0,0080		0,0192		0,0128	
5 Oligo 1	0,0096	0,0088	0,0192	0,0192	0,0096	0,0144
5 Oligo 2	0,0080		0,0192		0,0192	
5 Eutro 1	0,0000	0,0000	0,0192	0,0192	0,0160	0,0144
5 Eutro 2	0,0000		0,0192		0,0128	

Tableau 19. Concentration de la Matière Sèche Sans Cendres en mg.cm<sup>-2</sup>

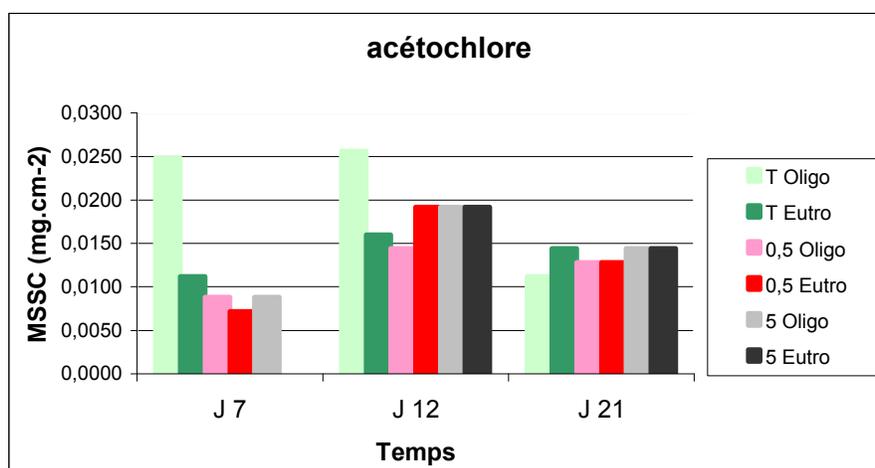


Figure 24. Evolution de la Matière Sèche Sans Cendres au cours du temps en mg.cm<sup>-2</sup>

Toutes les concentrations en matière sèche sans cendre augmentent de J 7 à J 12 puis diminuent à J 21. Ce profil a également été observé au cours de la 1<sup>ère</sup> expérience.

La production en matière organique de l'aquarium **T Oligo** est plus forte à J 7 et J 12, due probablement à la contamination bactérienne observée au départ de l'expérience, qui intervient dans le calcul de la matière organique du biofilm.

### II.2.1.c Densité en diatomées benthiques

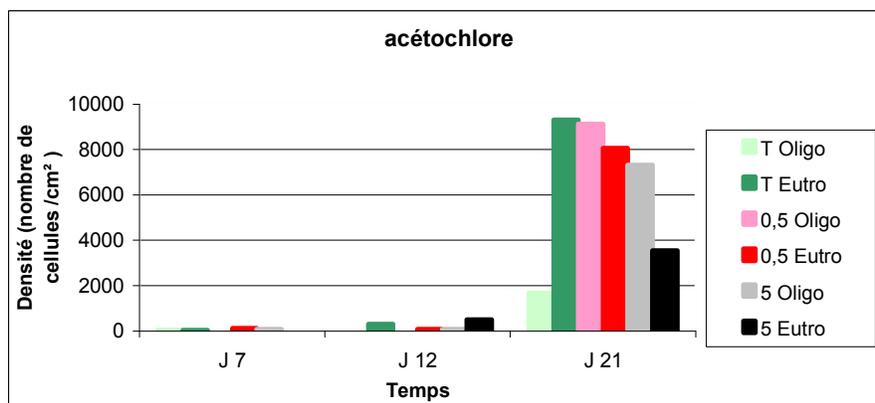


Figure 25. Evolution de la densité de diatomées au cours du temps (nombre de cellules / cm<sup>2</sup>)

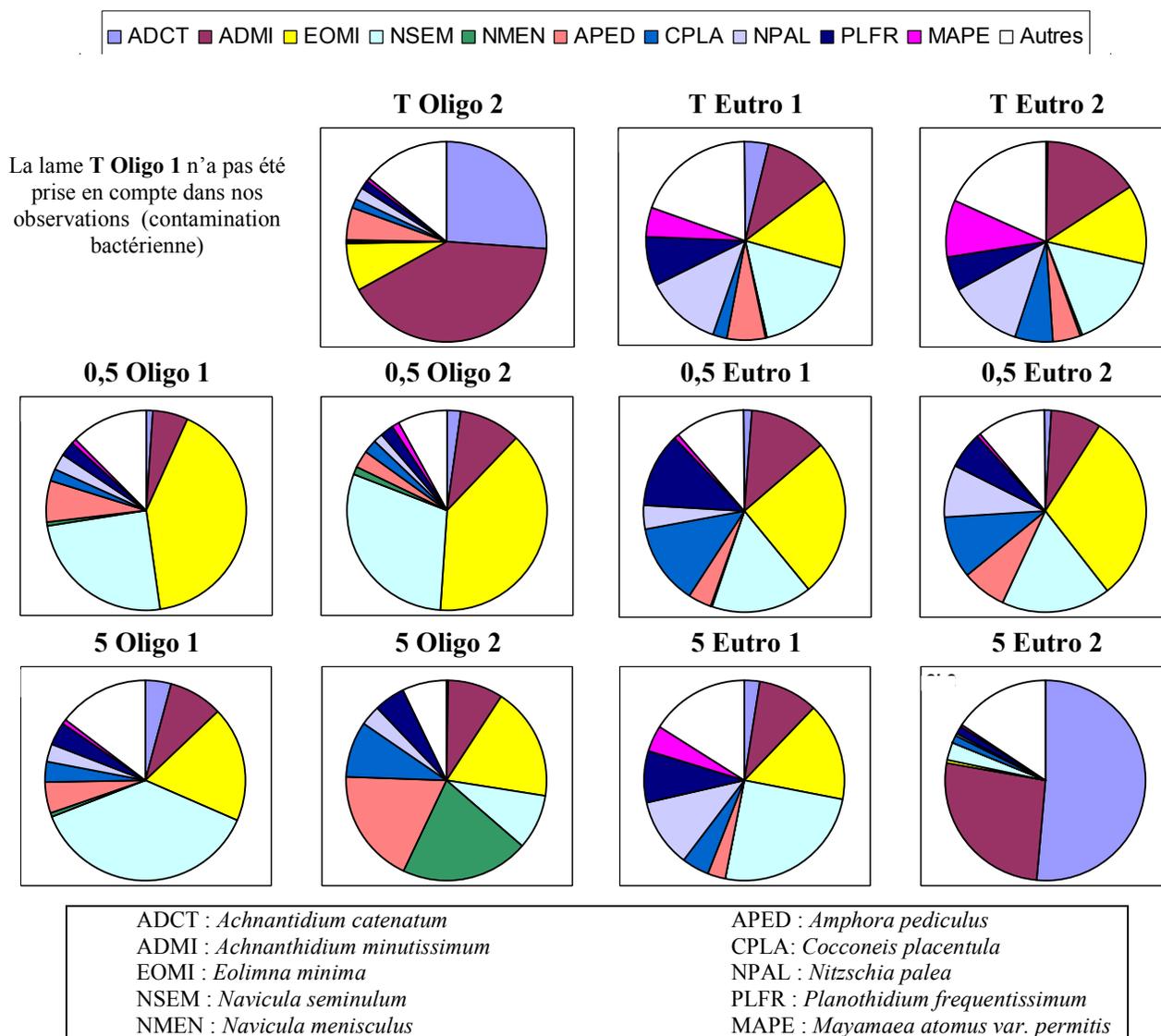
Comme nous l'avons observé dans la 1<sup>ère</sup> expérience, les deux graphiques (Figures 23 et 25) suivent le même profil, ce qui peut traduire le fait que chaque groupe d'algues conserve la même proportion au cours des essais.

Par contre, contrairement à l'expérimentation précédente, la distinction au niveau de la densité cellulaire de diatomées entre les canaux à caractères oligotrophes et eutrophes n'est pas apparente. Cependant, on se trouve à un niveau de colonisation plus précoce dans le temps que pour la 1<sup>ère</sup> expérimentation, il ne s'agit donc que d'une tendance de départ (ANNEXE 5).

## II.2.2 Analyses qualitatives

### II.2.2.a Abondance relative

La colonisation des diatomées sur les substrats ayant été ralentie au cours de l'expérience, seul le 3<sup>ème</sup> temps (J 21) a fait l'objet d'un inventaire diatomique, dont la représentation en "secteurs" est illustrée par la Figure 26 (ainsi la comparaison des biovolumes moyens spécifiques entre J 7 et J 21 n'a pu être réalisée, comparativement à la 1<sup>ère</sup> expérimentation).



**Figure 26.** Représentation graphique en "secteurs" des abondances relatives des espèces dominantes à J 21

Contrairement à l'expérience précédente testant l'impact du s-métolachlore sur la composition floristique, *Achnanthydium minutissimum* (ADMI) n'est pas majoritaire au sein du biofilm des différents substrats (mise à par la lame **T Oligo 2**). En revanche, les espèces *Navicula seminulum* (NSEM) et *Eolimna minima* (EOMI) sont en plus forte abondance que dans la 1<sup>ère</sup> expérimentation. Sur les lames **T Oligo 2** et **5 Eutro 2**, certaines espèces marginales sont prédominantes comme *Achnanthydium catenatum* (ADCT), de plus les taxons identifiés sur les lames **5 Eutro 1** et **5 Eutro 2** sont très hétérogènes au sein d'un même aquarium ce qui laisse supposer une certaine fluctuation due au hasard des colonisations environnementales.

D'après cette représentation graphique (Figure 26), il ne se dégage pas, de façon évidente, de différenciation notable dans la structure de la composition floristique des biofilms en fonction du gradient de trophie et de pollution en herbicide.

### II.2.2.b Autoécologie : Caractéristiques écologiques dominantes

Les classifications de Van Dam et al (1994) sont utilisées afin de définir les caractéristiques auto-écologiques du peuplement de diatomées. Les résultats des caractéristiques écologiques traduisent une plus grande hétérogénéité au sein des communautés de la 2<sup>ème</sup> expérience.

- En fonction du pH, les diatomées des différents aquariums se partagent en espèces :
  - **Neutrophiles** (pH optimum voisin de 7) plus abondantes pour les lames : **T Oligo 2 ; 5 Oligo 1 ; 5 Eutro 1 et 5 Eutro 2,**
  - **Alcaliphiles** (pH optimum > 7) : plus nombreuses sur les lames **T Eutro 1 ; T Eutro 2 ; 0,5 Oligo 1 ; 0,5 Oligo 2 ; 0,5 Eutro 1 ; 0,5 Eutro 2 ; 5 Oligo2,**
- Concernant le caractère "N-Hétérotrophie" (affinité envers l'azote organique), les diatomées se séparent en deux groupes :
  - **Autotrophes tolérantes** : plus abondantes sur les lames de verre **T Oligo 2 ; T Eutro 1 ; T Eutro 2 ; 0,5 Eutro 1 ; 5 Oligo 2 ; 5 Eutro 2**
  - **Hétérotrophes facultatives** : plus nombreuses sur les lames **0,5 Oligo 1 ; 0,5 Oligo 2 ; 0,5 Eutro 2 ; 5 Oligo 1 ; 5 Eutro 1,**
- Selon le statut trophique, les taxons se regroupent en espèces :
  - **Indifférentes** (les diatomées se multiplient aussi bien en milieu eutrophe qu'oligotrophe) : uniquement pour les deux lames **T Oligo 2 et 5 Eutro 2,**
  - **Eutrophes** : pour toutes les autres lames.

Ces résultats des caractéristiques écologiques traduisent une plus grande hétérogénéité au sein de la communauté de la 2<sup>ème</sup> expérience.

### II.2.2.c Indices biologiques, Diversité et Equitabilité

Les valeurs concernant les indices biologiques, la diversité et l'équitabilité données par le logiciel "Omnidia" sont classées dans le tableau 20.

Lames	IPS	IBD	DIVERSITE	EQUITABILITE
T Oligo 2	16.4	17.9	2.89	0.57
T Eutro 1	7.9	10.7	3.93	0.77
T Eutro 2	8.4	11.0	3.75	0.76
0,5 Oligo 1	9.0	10.3	2.91	0.59
0,5 Oligo 2	9.0	10.1	2.61	0.63
0,5 Eutro 1	10.4	12.0	3.31	0.70
0,5 Eutro 2	8.8	11.2	3.26	0.70
5 Oligo 1	8.3	9.9	3.21	0.63
5 Oligo 2	11.9	13.2	3.17	0.75
5 Eutro 1	7.5	10.0	3.60	0.71
5 Eutro 2	17.2	18.9	2.28	0.54

Tableau 20. Valeurs des indices biologiques, de diversité et d'équitabilité à J 21 (Omnidia)

#### 1. Indice Biologique Diatomées et Indice de polluo-sensibilité Spécifique

Contrairement à l'expérimentation testant les effets du s-métolachlore, les indices biologiques IPS et IBD dans le tableau ci-dessus sont de moins bonne qualité.

Les lames **T Oligo 2** et **5 Eutro 2** présentent les plus fortes valeurs d'IBD, 17.9 et 18.9 (excellente qualité), alors que la moyenne sur les autres lames de verre se situe autour de 10.9 (qualité passable). Ces bons résultats peuvent être expliqués notamment par la forte présence de *Achnanthydium minutissimum* (ADMI), indicateur de bonne qualité, (avec 41 % d'abondance pour **T Oligo 2** et 26.3 % pour **5 Eutro 2** et seulement 9.3 % pour **5 Oligo 2** par exemple) ainsi que la présence de *Achnanthydium catenatum* (ADCT), espèce indicatrice également de bonne qualité (26 % pour **T Oligo 2** et 51.5 % pour **5 Eutro 2**).

A l'inverse, la présence en forte abondance de *Navicula seminulum* (NSEM), connue pour être présente dans les milieux de moins bonne qualité, peut traduire les mauvaises notes obtenues pour l'IBD (0.2 % et 2.8 % pour **T Oligo 2** et **5 Eutro 2** en comparaison à 37.8 % pour **5 Oligo 1**).

### **2. Diversité et Equitabilité**

Le tableau 20 nous indique que la diversité au sein de tous les aquariums de cette nouvelle expérience (comprise entre 2.28 et 3.93) est plus large que dans l'expérimentation précédente (Indice de Shannon variant de 1.04 à 2). Plus la diversité et l'équitabilité sont faibles en raison de la dominance des deux *Achnanthydium* (révélateur de bonne qualité) au sein de la composition floristique, plus les indices biologiques sont forts (**T Oligo 2** et **5 Eutro 2**).

#### **II.2.3 Traitement statistique des données**

##### **◆ Classification Ascendante Hiérarchique (CAH)**

Afin de nous aider à établir les grands traits structuraux qui se dégagent du tableau rassemblant les inventaires floristiques de chaque aquarium, nous avons utilisé la méthode de la Classification Ascendante Hiérarchique qui permet de représenter les proximités entre les réplicats par des regroupements en classes.

Le dendrogramme obtenu (Figure 27) permet de distinguer, plus nettement que sur la représentation graphique (Figure 26), une certaine analogie entre les réplicats (**0,5 Oligo 1 ; 0,5 Oligo 2**) ; (**0,5 Eutro 1 ; 0,5 Eutro 2**) ; (**T Eutro 1 ; T Eutro 2**) ; (**5 Oligo 1 ; 5 Oligo 2**). Les lames **T Oligo 2** et **5 Eutro 2** sont proches sur l'arbre de classification ce qui est cohérent avec ce que nous avons décrit précédemment, à savoir que leur composition floristique apparaît relativement voisine.

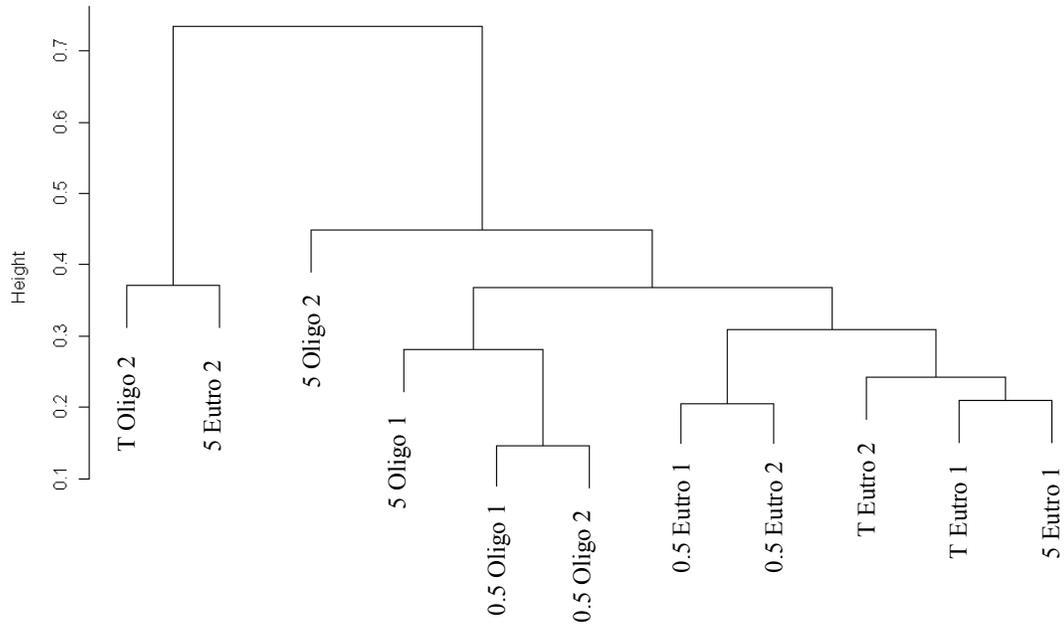


Figure 27. Arbre de classification des compositions spécifiques des communautés de diatomées collectées sur chaque lame au temps (J 21)

#### ◆ Analyse en Composantes Principales (ACP)

Comme nous l'avons vu auparavant, l'Analyse en Composantes Principales permet de tracer les grandes lignes définissant la structure de la population diatomique, selon la concentration en nutriments et en pesticides des canaux expérimentaux.

1. Effet de la "trophie" :

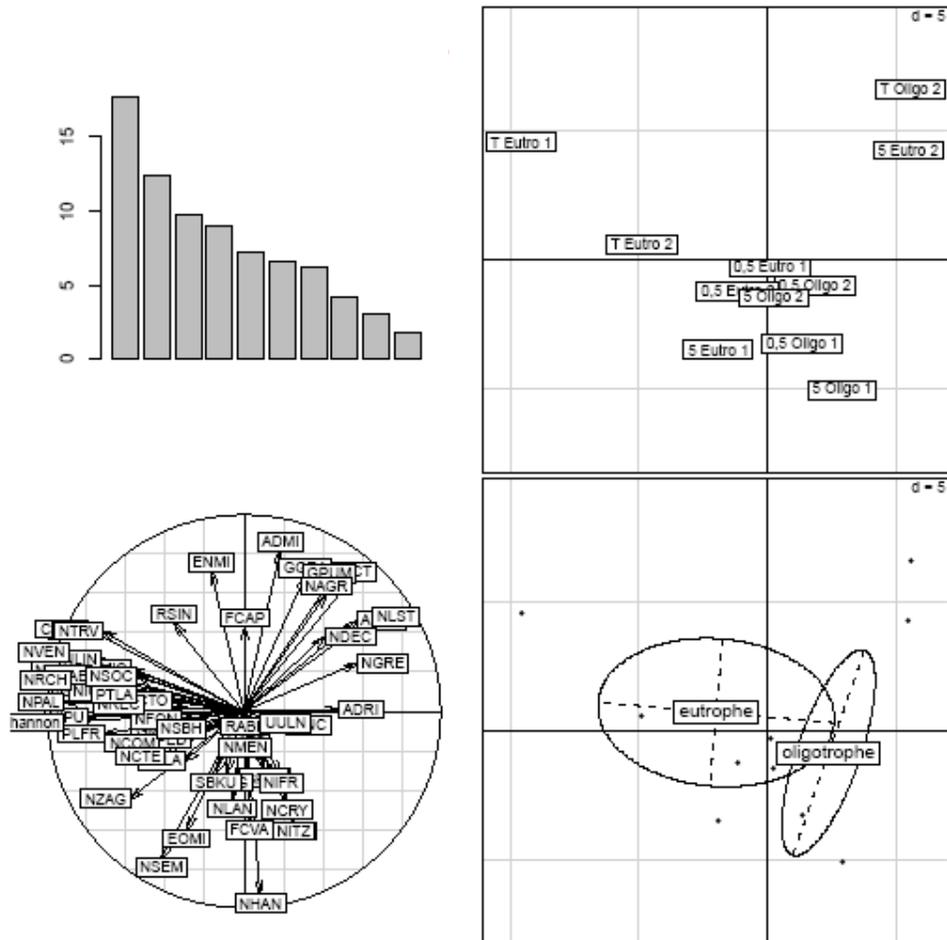


Figure 28. Analyse en Composantes Principales des compositions spécifiques en fonction du milieu Trophique à J 21

- En haut à gauche : **Graph 1 - Graphique des valeurs propres**
- En haut à droite : **Graph 2 - Représentation des échantillons**
- En bas à gauche : **Graph 3 - Représentation de la flore**
- En bas à droite : **Graph 4 - Représentation de la variable "trophie"**

Graphique 1 : Graphique des valeurs propres

L'ACP se limite à l'étude du plan engendré par les deux premiers facteurs de l'analyse dont le pourcentage d'inertie cumulée permet d'expliquer 39 % de la variance totale.

Graphique 2 : Représentation des échantillons

Comme le montre le dendrogramme, la représentation graphique des échantillons dans le plan indique que quelques répliquats sont proches et que d'autres sont très éloignés de part leur composition floristique. D'autre part l'ensemble des aquariums sont regroupés de part et d'autre de l'axe central en fonction de leur caractère trophique (à gauche les canaux eutrophes et à droite les oligotrophes).



#### **Graphique 4 : Représentation de la variable " herbicide "**

Sur ce dernier graphique, les cercles regroupant les canaux contaminés par 0.5 et 5  $\mu\text{g.l}^{-1}$  d'acétochlore se chevauchent. Les points sont fortement dispersés, mais une petite tendance à la démarcation des communautés venant des aquariums les plus concentrés peut être observée. Cependant, il reste difficile d'associer à ces ellipses des groupements floristiques précis du graphique 3. La description des communautés diatomiques au travers des abondances relatives de chaque espèce et du gradient de concentration en acétochlore des canaux ne permet donc pas de conclure à un impact direct de l'herbicide sur cette population algale.

Ainsi, à des concentrations en herbicide proches de celles relevées sur le terrain, les essais en canaux dynamiques n'ont pas permis de mettre en évidence un effet sur la composition floristique spécifique. Cependant quelques nuances sont à apporter, à savoir que les essais ont été réalisés sur une durée courte de trois semaines et non sur une échelle de temps saisonnière, comme souvent observé dans la nature. D'autre part, le fait même de travailler en canaux expérimentaux sélectionne incontestablement certaines espèces qui ne sont alors par représentatives de la communauté de diatomées périphtyques rencontrée dans les rivières.

## CONCLUSION GENERALE ET PERSPECTIVES

L'objectif fixé étant de travailler dans le sens d'une recherche de qualification et de quantification de la communauté de diatomées en fonction de deux facteurs croisés (trophique et toxique), nous avons cherché à explorer les relations pouvant exister entre la productivité du biofilm diatomique ainsi que ses biodescripteurs qualitatifs par rapport à une variation de la concentration en nutriments et en herbicide au sein de six canaux dynamiques.

Parmi les différents paramètres étudiés, la biomasse algale, ainsi que la densité cellulaire sont apparues comme potentiellement sensibles à la charge en nutriments (N et P) de la colonne d'eau. De même, le suivi des abondances relatives de la communauté périphytique a permis de noter une évolution légèrement marquée de la composition en espèces en fonction de l'état trophique du milieu.

Les résultats obtenus ont souligné également le manque de sensibilité des indices biologiques diatomées vis-à-vis des pollutions par les pesticides au cours de nos essais. Il semble qu'aucun lien n'ait pu être établi entre les notes de qualité des eaux calculées et les concentrations en herbicides. Cela semblerait confirmer le fait que l'IBD ne permet pas d'estimer correctement l'intensité des pollutions par les pesticides dans les cours d'eau. Ces indices ne prennent pas en compte, par exemple, certains facteurs comme la vitalité des cellules sur laquelle ces toxiques peuvent avoir un impact important. En effet, de par la méthode de préparation des échantillons pour l'identification et le dénombrement des espèces nécessaires à leur calcul, ces indices ne font pas la différence entre les cellules vivantes et mortes (Debenest, 2007).

Concernant l'influence de facteurs croisés "herbicide" et "trophie", certains auteurs soulignent que les espèces eutrophes seraient plus résistantes aux pesticides. Cependant, suite à l'exposition des diatomées à des herbicides de la famille des chloroacétamides, l'inventaire diatomique de nos expériences n'a pas permis de mettre en évidence de réponse de la communauté par rapport aux canaux témoins. La répartition des espèces semble due à un hasard de colonisation (peut-être influencée par les conditions micro-locales entre les lames), ce qui semble rassurant pour l'environnement. A savoir qu'aux concentrations testées dans nos essais, la responsabilité des composés toxiques sur la dégradation de la communauté diatomique ne peut pas être clairement établie.

Ces résultats ne sont que des hypothèses, la question de la validité des résultats obtenus sur substrats artificiels par rapport au compartiment des diatomées sur le substrat naturel se pose. Il reste difficile d'extrapoler les données expérimentales aux écosystèmes "rivières", sachant que tous les hydrosystèmes sont différents et qu'ils ne répondent pas de manière identique à un même stress (Volatier, 2004). De nombreux auteurs s'interrogent sur la capacité des canaux à simuler les écosystèmes aquatiques et pensent que la taille et la complexité doivent être suffisantes pour assurer le maintien des caractéristiques écologiques fondamentales. Ainsi, les microcosmes ne doivent pas être perçus comme une copie de l'environnement naturel mais une représentation simplifiée de celui-ci. Les conditions expérimentales en système artificiel diffèrent forcément des conditions de vie des organismes en milieu naturel, ce qui peut engendrer l'émergence de propriétés propres à ce système. En effet, certaines espèces comme *Achanthidium minutissimum* (ADMI), fréquemment

rencontrées au cours de nos essais, sont plus spécifiquement présentes dans les expériences en canaux.

La complexité des essais provient aussi de la difficulté de contrôler des paramètres externes influant sur l'évolution des variables biologiques mesurées. L'utilisation de canaux dynamiques en écotoxicologie nécessite de réduire l'hétérogénéité inter-canal car les effets sont évalués par référence aux canaux témoins (Volatier, 2004). Les facteurs sur lesquels nous nous sommes penchés : luminosité, courant de la pompe, pH... ont été maintenus de façon constante au cours du temps.

Un temps de colonisation adapté à l'étude est également un des paramètres déterminants sur le réalisme des résultats. Nous nous sommes fixés une durée de trois semaines, comme nous l'avons souvent observé dans d'autres essais. Ce temps d'exposition semble suffisant pour indiquer les premières tendances de l'évolution des communautés diatomiques mais pas assez pour extrapoler les résultats à une pollution chronique par les pesticides.

Grâce à ces outils prédictifs aussi simples que possibles et aussi complexes que nécessaires (Volatier, 2004), l'utilisation d'aquariums pour étudier certaines propriétés des écosystèmes naturels semble donc très intéressante.

Les essais de colonisation du biofilm périphytique sur substrat artificiel ainsi que l'interprétation des résultats se sont révélés complexes. La caractérisation de la répartition des espèces en fonction de leur préférence trophique a permis de mettre en évidence une discrimination entre les canaux de différentes modalités (oligotrophe et eutrophe). L'ensemble des données permet également de suggérer qu'une exposition à des pesticides agricoles, en concentrations environnementales réalistes, ne semble pas avoir eu d'influence au cours de nos essais.

Les renseignements obtenus, grâce aux essais en canaux artificiels, qui visent à travailler dans des conditions dynamiques sur des écosystèmes expérimentaux, permettent progressivement l'avancement des connaissances concernant les outils d'évaluation de la qualité des milieux aquatiques.

## REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Amalric, L., N. Baran, R. Jeannot, J. C. Martin & C. Mouvet, 2003. Les mécanismes de transfert de produits phytosanitaires du sol vers les nappes et les méthodes d'analyse des produits phytosanitaires dans les eaux. BRGM/RP-51590-FR: 116.
- Baars, J. W., 1983. Autoecological investigations on freshwater diatoms. 1. Generation times of some species. Arch. Hydrobiol Suppl. 67: 11-18.
- Bernard, A., 2004. Utilisation des diatomées benthiques comme bioindicateurs de l'état écologique des cours d'eau de la zone des Coteaux de Gascogne : Etude d'impact des activités agricoles. Sciences et Techniques. Université de Corse Pasquale Paoli, Corte: 24 + annexes.
- Biggs, B. J. F., 1996. "Patterns in benthic algae of streams". In Algal Ecology - Freshwater Benthic Ecosystems, R.J. Stevenson, M.L. Bothwell & R.L. Lowe (eds), San Diego, Academic Press: 31-56.
- Brémond, R. & C. Perrodon, 1979. Paramètres de la qualité des eaux. Ministère de l'environnement et du cadre de vie, deuxième édition: 257.
- Charier, A., 2006. Impact des pollutions agricoles toxiques sur les diatomées benthiques : étude in situ et analyse expérimentale des principales altérations. Unité de formation et de recherche des sciences pharmaceutiques. Univ. Bordeaux II Victor Segalen, Bordeaux 2: 52 + annexes.
- Chouteau, C., 2004. Développement d'un biocapteur conductimétrique bi-enzymatique à cellules algales. Sciences et Techniques du Déchet. INSA, Lyon: 180.
- Debenest, T., 2007. Caractérisation de l'impact des pollutions agricoles sur les diatomées benthiques. Univ. Bordeaux I Ecole Doct. Sciences et environnements, Bordeaux 232 + annexes.
- Gold, C., 2002. Etude des effets de la pollution métallique (Cd/Zn) sur la structure des communautés de diatomées périphytiques des cours d'eau. Approches expérimentales in situ et en laboratoire. Géosciences et Sciences de l'Environnement. Univ. Bordeaux I Ecole Doct. Sciences du vivant, Bordeaux: 175 + annexes.
- Guillard, R. R. L. & C. J. Lorenzen, 1972. Yellow-green algae with chlorophyllide c. Journal of Phycology 8: 10 -14.
- Hoagland, K. D., J. R. Rosowski, M. R. Gretz & S. C. Roemer, 1993. Diatom extracellular polymeric substances: function, fine structure, chemistry, and physiology. J. Phycol 29: 537-566.
- Hürlimann, J. & P. Niederhauser, 2007. Méthodes d'analyse et d'appréciation des cours d'eau. Diatomées Niveau R (région). État de l'environnement n° 0740. Office fédéral de l'environnement, Berne: 132.
- Krammer, K. & H. Lange-Bertalot, Eds. 1986-1991, Bacillariophyceae 1. Teil: Naviculaceae. 876 p.; 2 Teil : Bacillariaceae, Epithemiaceae, Surirellaceae, 596 p.; 3 Teil : Centrales, Fragilariaceae, Eunotiaceae, 576 p.; 4 Teil : Achnantheaceae. Kritische Ergänzungen zu Navicula (Lineolatae) und Gomphonema. 437 p. Süßwasserflora von Mitteleuropa . Stuttgart., G. Fischer verlag.
- Lecoq, C., M. Coste & J. Prygiel, 1993. Omnidia - Software for Taxonomy, Calculation of Diatom Indexes and Inventories Management. Hydrobiologia 269: 509-513.

- Lenoir, A. & M. Coste, 1996. Development of a practical diatom index of overall water quality applicable to the French national water Board network. In Whitton, B. A. & E. Rott (eds.), *Use of Algae for monitoring rivers II*. Studia Student. G.m.b.H., Innsbruck Austria 17-19 Sept. 95: 29-43.
- Lorenzen, C. J., 1967. "Determination of chlorophyll and pheopigments: spectrophotometric equations". *Limnology and Oceanography* 12: 343-346.
- Margoum, C., M. Barasc, N. Faure, M. Coquery & B. Montuelle, 2006. Développement d'une méthode de dosage des pesticides dans les biofilms pour évaluer leur impact environnemental. Groupe Français des Pesticides, Strasbourg.
- Morin, S., T. Duong, S. Boutry & M. Coste, 2008. Modulation de la toxicité des métaux vis-à-vis du développement des biofilms de cours d'eau (bassin versant de Décazeville, France). *Cryptogamie, Algol.* 29 (3): 201-216.
- Morin, S., M. Bottin, N. Mazzellaa, F. Macary, F. Delmas & M. Coste, 2008. Linking diatom community structure to pesticide input as evaluated through a spatial contamination potential (Phytopixal): a case study in the Neste system (South-West France). 20th International Diatom Symposium, Dubrovnik, HRV, 7-13 September 2008.
- Othoniel, C., 2006. La croissance du biofilm photosynthétique : un indicateur du statut trophique des rivières ? , *Biogéochimie de l'Environnement*. Université Bordeaux 1, Bordeaux: 273.
- Peres, F., D. Florin, T. Grollier, A. Feurtet Mazel, M. Coste, F. Ribeyre, M. Ricard & A. Boudou, 1996. Effects of the phenylurea herbicide isoproturon on periphytic diatom communities in freshwater indoor microcosms. *Environmental pollution* 94: 141-152.
- Prygiel, J., M. Coste & J. Bukowska, 1999. Review of the major diatom-based techniques for the quality assessment of rivers. State of the art in Europe. *Use of algae for monitoring rivers III*, Douai France, Agence de l'Eau Artois Picardie: 224-238.
- Prygiel, M. & M. Coste, 2000. Guide méthodologique pour la mise en oeuvre de l'Indice Biologique Diatomées NF T90-354. Agences de l'Eau, Cemagref Bordeaux: 134.
- Ricart, M., D. Barceló, A. Geiszinger, H. Guasch, M. L. d. Alda, A. M. Romani, G. Vidal, M. Villagrana & S. Sabater, 2009. Effects of low concentrations of the phenylurea herbicide diuron on biofilm algae and bacteria. *Chemosphere* 76 (10): 1392 -1401.
- Round, F. E., R. M. Crawford & D. G. Mann, 1990. *The Diatoms: Biology and Morphology of the genera*. Cambridge Univ. Press Ed. Cambridge: 747.
- Van Dam, H., A. Mertens & J. Sinkeldam, 1994. "A coded checklist and ecological indicator values of freshwater diatoms from the Netherlands". *Netherlands Journal of Aquatic Ecology* 28 (1): 117-133.
- Volatier, L., 2004. Réponses d'une communauté périphtyque à un effluent complexe : études en bio-essais et en canaux artificiels. *Sciences et Techniques du Déchet*. Univ. Lyon Ecole Doct. Sciences Appliquées, Lyon: 291 + annexes.
- Werner, D., 1977. *The Biology of Diatoms*. Botanical Monographs. Blackwell, Oxford.

### Liens Internet divers :

- AGRITOX : <http://www.dive.afssa.fr/agritox/index.php>.
- IFEN, 2009. Les pesticides dans les eaux - Bilan annuel - <http://www.ifen.fr/donnees-essentielles/eau/les-pesticides-dans-les-eaux.htm> (Dernière mise à jour Janvier 2009).
- R Development Core Team (2009). *R: A language and environment for statistical computing*. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. ISBN 3-900051-07-0, URL <http://www.R-project.org>.

## LISTE DES ANNEXES

ANNEXE 1. Paramètres mesurés et normes .....	73
ANNEXE 2. Concentration en chlorophylle a mesurée à J5, J12 et J19 de la 1 <sup>ère</sup> expérience .....	74
ANNEXE 3. Comptage microscopique des diatomées à J5, J12 et J19 de la 1 <sup>ère</sup> expérience .....	75
ANNEXE 4. Concentration en chlorophylle a mesurée à J7, J12 et J21 de la 2 <sup>de</sup> expérience.....	76
ANNEXE 5. Comptage microscopique des diatomées à J7, J12 et J21 de la 2 <sup>de</sup> expérience .....	77

## ANNEXE 1

### Paramètres mesurés et normes

Paramètres mesurés	Unité	Méthode d'analyse et Dates de normalisation	Equipement utilisé
<b>pH</b>		NF T 90.008 02/01	TITRINO METROHM
<b>Conductivité</b>	$\mu\text{S.cm}^{-1}$	NF EN 27 888 01/94	CONDUCTIMETRE METROHM
<b>Orthophosphate</b>	$\text{mg.l}^{-1}$	NF T90-023 09/82	Spectrophotomètre LAMBDA 2 PERKIN ELMER
<b>Nitrate</b>	$\text{mg.l}^{-1}$	NF EN ISO 13395 10/96	Auto-analyseur EVOLUTION II ALLIANCE
<b>Nitrite</b>	$\text{mg.l}^{-1}$	NF EN ISO 13395 10/96	Auto-analyseur EVOLUTION II ALLIANCE
<b>Ammonium</b>	$\text{mg.l}^{-1}$	NF EN ISO 11732 08/97	Auto-analyseur EVOLUTION II ALLIANCE
<b>Silice</b>	$\text{mg.l}^{-1}$	NF T 90-007 02/01	Spectrophotomètre LAMBDA 2 PERKIN ELMER
<b>Chlorophylle <i>a</i></b>	$\text{mg.l}^{-1}$	NF T 90-117 12/99	Spectrophotomètre LAMBDA 2 PERKIN ELMER

## ANNEXE 2

### Concentration en chlorophylle a mesurée aux dates de prélèvement J5, J12, et J19 de la 1<sup>ère</sup> expérience (s-métolachlore)

Temps Prélèvement substrat	Lames	Chlorophylle a dans la suspension ( $\mu\text{g.l}^{-1}$ )	Chlorophylle a sur la lame ( $\mu\text{g.cm}^{-2}$ )	Chlorophylle a Moyenne des 2 lames ( $\mu\text{g.cm}^{-2}$ )	Aquariums
J 5	T Oligo 1	6,41	0,01	0,01	<b>T Oligo</b>
J 5	T Oligo 2	6,73	0,01		
J 5	T Eutro 1	8,10	0,01	0	<b>T Eutro</b>
J 5	T Eutro 2	3,07	0,00		
J 5	5 Oligo 1	1,76	0,00	0	<b>5 Oligo</b>
J 5	5 Oligo 2	3,78	0,00		
J 5	5 Eutro 1	3,78	0,00	0	<b>5 Eutro</b>
J 5	5 Eutro 2	7,85	0,01		
J 5	30 Oligo 1	2,03	0,00	0	<b>30 Oligo</b>
J 5	30 Oligo 2	3,54	0,00		
J 5	30 Eutro 1	6,14	0,00	0,01	<b>30 Eutro</b>
J 5	30 Eutro 2	7,29	0,01		
J 12	T Oligo 1	94,56	0,15	0,15	<b>T Oligo</b>
J 12	T Oligo 2	93,24	0,15		
J 12	T Eutro 1	56,52	0,09	0,12	<b>T Eutro</b>
J 12	T Eutro 2	92,07	0,15		
J 12	5 Oligo 1	15,66	0,03	0,06	<b>5 Oligo</b>
J 12	5 Oligo 2	54,90	0,09		
J 12	5 Eutro 1	75,12	0,12	0,16	<b>5 Eutro</b>
J 12	5 Eutro 2	125,76	0,20		
J 12	30 Oligo 1	41,94	0,07	0,06	<b>30 Oligo</b>
J 12	30 Oligo 2	34,38	0,06		
J 12	30 Eutro 1	86,52	0,14	0,19	<b>30 Eutro</b>
J 12	30 Eutro 2	148,50	0,24		
J 19	T Oligo 1	196,68	0,32	0,31	<b>T Oligo</b>
J 19	T Oligo 2	189,54	0,30		
J 19	T Eutro 1	319,41	0,51	0,48	<b>T Eutro</b>
J 19	T Eutro 2	283,80	0,45		
J 19	5 Oligo 1	194,10	0,31	0,26	<b>5 Oligo</b>
J 19	5 Oligo 2	128,04	0,21		
J 19	5 Eutro 1	380,16	0,61	0,85	<b>5 Eutro</b>
J 19	5 Eutro 2	685,20	1,10		
J 19	30 Oligo 1	533,88	0,86	0,73	<b>30 Oligo</b>
J 19	30 Oligo 2	378,72	0,61		
J 19	30 Eutro 1	1317,24	2,11	1,48	<b>30 Eutro</b>
J 19	30 Eutro 2	535,41	0,86		

## ANNEXE 3

**Tableau récapitulatif du comptage microscopique des diatomées sur la cellule de Nageotte aux dates de prélèvement J5, J12, et J19 de la 1<sup>ère</sup> expérience (s-métolachlore)**

Temps Prélèvement substrat	Lames	Nombre de diatomées sur la cellule de Nageotte	Nombre de cellules Moyenne des 2 lames	Nombre de diatomées dans la solution de 200 ml	Densité cellulaire (nombre de diatomées par cm <sup>2</sup> )	Aquariums
J 5	T Oligo 1	139	132	316800	2538,46	<b>T Oligo</b>
J 5	T Oligo 2	125				
J 5	T Eutro 1	88	69	165600	1326,92	<b>T Eutro</b>
J 5	T Eutro 2	50				
J 5	5 Oligo 1	63	46,5	111600	894,23	<b>5 Oligo</b>
J 5	5 Oligo 2	30				
J 5	5 Eutro 1	41	55,5	133200	1067,31	<b>5 Eutro</b>
J 5	5 Eutro 2	70				
J 5	30 Oligo 1	45	70,5	169200	1355,77	<b>30 Oligo</b>
J 5	30 Oligo 2	96				
J 5	30 Eutro 1	119	76	182400	1461,54	<b>30 Eutro</b>
J 5	30 Eutro 2	33				
J 12	T Oligo 1	303	451,5	2167200	17365,38	<b>T Oligo</b>
J 12	T Oligo 2	600				
J 12	T Eutro 1	84	149,5	717600	5750,00	<b>T Eutro</b>
J 12	T Eutro 2	215				
J 12	5 Oligo 1	28	128,5	616800	4942,31	<b>5 Oligo</b>
J 12	5 Oligo 2	229				
J 12	5 Eutro 1	242	347	1665600	13346,15	<b>5 Eutro</b>
J 12	5 Eutro 2	452				
J 12	30 Oligo 1	207	164,5	789600	6326,92	<b>30 Oligo</b>
J 12	30 Oligo 2	122				
J 12	30 Eutro 1	710	718	3446400	27615,38	<b>30 Eutro</b>
J 12	30 Eutro 2	726				
J 19	T Oligo 1	351	402	1929600	15461,54	<b>T Oligo</b>
J 19	T Oligo 2	453				
J 19	T Eutro 1	830	781	3748800	30038,46	<b>T Eutro</b>
J 19	T Eutro 2	732				
J 19	5 Oligo 1	181	221	1060800	8500,00	<b>5 Oligo</b>
J 19	5 Oligo 2	261				
J 19	5 Eutro 1	1096	1284,5	6165600	49403,85	<b>5 Eutro</b>
J 19	5 Eutro 2	1473				
J 19	30 Oligo 1	1162	1313	6302400	50500,00	<b>30 Oligo</b>
J 19	30 Oligo 2	1464				
J 19	30 Eutro 1	6947	5236	25132800	201384,62	<b>30 Eutro</b>
J 19	30 Eutro 2	3525				

## ANNEXE 4

### Concentration en chlorophylle a mesurée aux dates de prélèvement J7, J12, et J21 de la 2<sup>de</sup> expérience (acétochlore)

Temps Prélèvement substrat	Lames	Chlorophylle a dans la suspension ( $\mu\text{g.l}^{-1}$ )	Chlorophylle a sur la lame ( $\mu\text{g.cm}^{-2}$ )	Chlorophylle a Moyenne des 2 lames ( $\mu\text{g.cm}^{-2}$ )	Aquariums
J 7	T Oligo 1	1,26	0,00	0,00	<b>T Oligo</b>
J 7	T Oligo 2	7,245	0,01		
J 7	T Eutro 1	11,31	0,01	0,01	<b>T Eutro</b>
J 7	T Eutro 2	2,52	0,00		
J 7	0,5 Oligo 1	0,72	0,00	0,00	<b>0,5 Oligo</b>
J 7	0,5 Oligo 2	0,72	0,00		
J 7	0,5 Eutro 1	3,24	0,00	0,00	<b>0,5 Eutro</b>
J 7	0,5 Eutro 2	0,39	0,00		
J 7	5 Oligo 1	0	0,00	0,00	<b>5 Oligo</b>
J 7	5 Oligo 2	0	0,00		
J 7	5 Eutro 1	0	0,00	0,00	<b>5 Eutro</b>
J 7	5 Eutro 2	0	0,00		
J 12	T Oligo 1	0	0,00	0,00	<b>T Oligo</b>
J 12	T Oligo 2	1,8	0,00		
J 12	T Eutro 1	1,56	0,00	0,00	<b>T Eutro</b>
J 12	T Eutro 2	0	0,00		
J 12	0,5 Oligo 1	0,945	0,00	0,00	<b>0,5 Oligo</b>
J 12	0,5 Oligo 2	2,25	0,00		
J 12	0,5 Eutro 1	0,99	0,00	0,00	<b>0,5 Eutro</b>
J 12	0,5 Eutro 2	1,44	0,00		
J 12	5 Oligo 1	0	0,00	0,00	<b>5 Oligo</b>
J 12	5 Oligo 2	1,65	0,00		
J 12	5 Eutro 1	0,945	0,00	0,00	<b>5 Eutro</b>
J 12	5 Eutro 2	1,5	0,00		
J 21	T Oligo 1	3,24	0,01	0,01	<b>T Oligo</b>
J 21	T Oligo 2	7,2	0,01		
J 21	T Eutro 1	12,3	0,02	0,07	<b>T Eutro</b>
J 21	T Eutro 2	75,9	0,12		
J 21	0,5 Oligo 1	51,48	0,08	0,11	<b>0,5 Oligo</b>
J 21	0,5 Oligo 2	80,325	0,13		
J 21	0,5 Eutro 1	48,375	0,08	0,07	<b>0,5 Eutro</b>
J 21	0,5 Eutro 2	41,58	0,07		
J 21	5 Oligo 1	28,8	0,05	0,05	<b>5 Oligo</b>
J 21	5 Oligo 2	34,56	0,06		
J 21	5 Eutro 1	54,75	0,09	0,06	<b>5 Eutro</b>
J 21	5 Eutro 2	19,32	0,03		

## ANNEXE 5

... récapitulatif du comptage microscopique des diatomées sur la cellule de Nageotte aux dates de prélèvement J7, J12, et J21 de la 2<sup>de</sup> expérience (acétochlore)

Temps Prélèvement substrat	Lames	Nombre de diatomées sur la cellule de Nageotte	Nombre de cellules Moyenne des 2 lames	Nombre de diatomées dans la solution de 200 ml	Densité cellulaire (nombre de diatomées par cm <sup>2</sup> )	Aquariums
J 7	T Oligo 1	6	3	7200	57,69	<b>T Oligo</b>
J 7	T Oligo 2	0				
J 7	T Eutro 1	2	2	4800	38,46	<b>T Eutro</b>
J 7	T Eutro 2	ND <sup>(1)</sup>				
J 7	0,5 Oligo 1	0	0	0	0	<b>0,5 Oligo</b>
J 7	0,5 Oligo 2	ND				
J 7	0,5 Eutro 1	6	6	14400	115,38	<b>0,5 Eutro</b>
J 7	0,5 Eutro 2	ND				
J 7	5 Oligo 1	4	4	9600	76,92	<b>5 Oligo</b>
J 7	5 Oligo 2	ND				
J 7	5 Eutro 1	0	0	0	0	<b>5 Eutro</b>
J 7	5 Eutro 2	ND				
J 12	T Oligo 1	0	0	0	0	<b>T Oligo</b>
J 12	T Oligo 2	ND				
J 12	T Eutro 1	8	8	38400	307,69	<b>T Eutro</b>
J 12	T Eutro 2	ND				
J 12	0,5 Oligo 1	0	0	0	0	<b>0,5 Oligo</b>
J 12	0,5 Oligo 2	ND				
J 12	0,5 Eutro 1	2	2	9600	76,92	<b>0,5 Eutro</b>
J 12	0,5 Eutro 2	ND				
J 12	5 Oligo 1	2	2	9600	76,92	<b>5 Oligo</b>
J 12	5 Oligo 2	ND				
J 12	5 Eutro 1	10	13	62400	500	<b>5 Eutro</b>
J 12	5 Eutro 2	16				
J 21	T Oligo 1	15	43,5	208800	1673,08	<b>T Oligo</b>
J 21	T Oligo 2	72				
J 21	T Eutro 1	128	242	1161600	9307,69	<b>T Eutro</b>
J 21	T Eutro 2	356				
J 21	0,5 Oligo 1	114	237,5	1140000	9134,62	<b>0,5 Oligo</b>
J 21	0,5 Oligo 2	361				
J 21	0,5 Eutro 1	164	209,5	1005600	8057,69	<b>0,5 Eutro</b>
J 21	0,5 Eutro 2	255				
J 21	5 Oligo 1	156	190	912000	7307,69	<b>5 Oligo</b>
J 21	5 Oligo 2	224				
J 21	5 Eutro 1	103	92	441600	3538,46	<b>5 Eutro</b>
J 21	5 Eutro 2	81				

<sup>(1)</sup> ND : Non Déterminé