



**HAL**  
open science

## Restauration de zones humides de tête de bassin versant -Programme de suivi des sites -Phytoremed / Restaur - Volet écotoxicologie - Biofilms campagne 2023

Soizic Morin, Fabien Bidabé, Romaric Le Barh, Débora Millan-Navarro

### ► To cite this version:

Soizic Morin, Fabien Bidabé, Romaric Le Barh, Débora Millan-Navarro. Restauration de zones humides de tête de bassin versant -Programme de suivi des sites -Phytoremed / Restaur - Volet écotoxicologie - Biofilms campagne 2023. INRAE UR EABX. 2023, pp.22. hal-04354366

**HAL Id: hal-04354366**

**<https://hal.inrae.fr/hal-04354366>**

Submitted on 19 Dec 2023

**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.



UR/1454

ÉCOSYSTÈMES AQUATIQUES  
& CHANGEMENTS GLOBAUX [EABX]

## Restauration de zones humides de tête de bassin versant – Programme de suivi des sites

**-Phytoremed / Restaur-**

**Volet écotoxicologie**

**Biofilms campagne 2023**

Soizic Morin<sup>1</sup>

Fabien Bidabé<sup>2</sup>

Romarc Le Barh<sup>1</sup>

Débora Millán-Navarro<sup>1</sup>

2023

<sup>1</sup> INRAE, UR EABX Ecosystèmes Aquatiques et Changements Globaux

<sup>2</sup> Syndicat Mixte du Bassin Versant des Lacs du Born (SMBVLB)

**Citation recommandée :**

Morin S., Bidabé F., Le Barh R., Millán-Navarro D. (2023) Restauration de zones humides de tête de bassin versant - Programme de suivi des sites (Phytoremed / Restaur). Volet écotoxicologie - Biofilms, campagne 2023. Rapport d'étude, INRAE EABX, Cestas. 22 p.

# Table des matières

<b>Table des matières.....</b>	<b>3</b>
<b>Phytoremed / Restaur - impacts écotoxicologiques sur les biofilms.....</b>	<b>4</b>
Objectifs principaux.....	5
<b>Méthodologies mises en œuvre.....</b>	<b>6</b>
Localisation des sites d'étude.....	6
Stratégie d'échantillonnage.....	7
Prélèvement et préparation des échantillons de biofilms.....	8
Composition organique et minérale des biofilms.....	10
Concentration en pigments photosynthétiques.....	10
Indice d'autotrophie.....	12
Proportions des différents groupes algaux.....	12
Activité photosynthétique efficace des biofilms.....	13
Analyse des données.....	13
<b>Résultats de la campagne de printemps 2023.....</b>	<b>15</b>
Composition organique et minérale des biofilms.....	15
Concentration en pigments photosynthétiques.....	16
Indice d'autotrophie.....	19
Proportions des différents groupes algaux.....	20
Activité photosynthétique efficace des biofilms.....	20
<b>Conclusions préliminaires.....</b>	<b>21</b>
<b>Bibliographie citée.....</b>	<b>23</b>

# Phytoremed / Restaur - impacts écotoxicologiques sur les biofilms

**A**u cours des quatre dernières décennies, les opérations de restauration des milieux aquatiques continentaux se sont multipliées et diverses méthodes d'évaluation biologique de la récupération des milieux ont été développées. Sous l'impulsion forte de la Directive Cadre européenne sur l'Eau (Directive 2000/60/CE) en matière de bio-indication, la nouvelle génération de méthodes d'évaluation de l'état écologique des masses d'eau fournit des opportunités de suivi scientifique des actions de restauration permettant de quantifier, et de mieux comprendre, la complexité des interactions entre les conditions environnementales dans un contexte de multi-stress et les réponses biologiques, avec l'objectif d'estimer le degré de réussite des opérations menées et de fournir aux gestionnaires des outils d'aide à l'interprétation, à la décision, et *in fine* à la gestion. Le développement ces dernières années de nouvelles approches d'écotoxicologie des communautés (Pesce et al. 2021) compense le manque de réalisme environnemental des tests écotoxicologiques conventionnels, en considérant la composition plurispécifique des biofilms et les interactions complexes qui s'opèrent entre les organismes à cette échelle (facilitation, compétition, prédation...). Ces approches offrent la possibilité de comprendre dans leur globalité les effets de stress seuls ou en mélange, dans les conditions d'exposition propres au terrain étudié (conditions physico-chimiques spécifiques des milieux, variabilité saisonnière), sur des organismes d'importance écologique majeure à la base des chaînes trophiques aquatiques.

Dans la continuité du projet « Phytoremédiation et drainage contrôlé » (2019-2020) lors duquel la qualité chimique des eaux a été documentée au niveau des zones humides restaurées par le Syndicat Mixte du Bassin Versant des Lacs du Born (SMBVLB), le volet « Impacts écotoxicologiques sur les biofilms » du projet « Restauration de zones humides de tête de bassin versant » (Phytoremed / Restaur) s'intéresse aux effets de contaminants tels que les pesticides sur des organismes périphytiques (biofilms) exposés *in situ* dans des conditions naturelles et collectés sur des substrats immergés dans les eaux des sites étudiés. Au sein de ces biofilms dont la biomasse est généralement dominée par les micro-algues, les diatomées sont abondantes et constituent parfois la quasi-totalité de la biodiversité algale. Les diatomées, micro-algues brunes présentant un squelette de silice, sont connues depuis longtemps pour leur contribution majeure à la production primaire au sein de nombreux écosystèmes lotiques, où le courant limite le développement des algues phytoplanctoniques et des macrophytes. Ainsi, par leur immersion permanente, leur sédentarité et leur position-clé à la base des chaînes trophiques, les biofilms intègrent de façon très précoce les variations physicochimiques du milieu qui se répercutent sur la composition de leurs communautés en développement selon les préférences écologiques des espèces et sur leur physiologie. A ce titre, les biofilms dans leur globalité et les diatomées plus particulièrement sont considérés depuis plusieurs années comme de bons outils d'évaluation révélateurs de contextes d'exposition à différents contaminants dans les hydrosystèmes (Coste et al. 2009, Morin et al. 2016). Les impacts des micropolluants peuvent s'observer au niveau du

fonctionnement de ces communautés (altération de la photosynthèse) et de leur structure (biomasse, composition taxonomique). L'analyse conjointe de descripteurs fonctionnels et structurels des biofilms exposés à l'amont et à l'aval des zones humides restaurées a pour objectif d'évaluer l'effet des pesticides présents dans cet hydrosystème sur le biote et de déterminer l'efficacité des zones humides dans l'abattement potentiel en pesticides dans le milieu au travers de l'atténuation de leurs effets écotoxiques.

---

## Objectifs principaux

L'objectif général de cette étude était d'évaluer l'état de santé des biofilms collectés en amont et aval des zones restaurées par le SMBVLB, afin d'évaluer l'efficacité des opérations mises en œuvre dans l'abattement de la pression en pesticides (notamment contamination au S-métolachlore). Les suivis ont été menés à différentes saisons présentant *a priori* des profils de contamination (et des conditions environnementales) contrastées. Les biofilms matures ont été collectés après un mois de colonisation *in situ* et divers descripteurs structurels et fonctionnels ont été analysés. Différentes méthodes ont été utilisées pour l'évaluation de la biomasse du biofilm. Chacune d'entre elle comporte des limites, dont l'importance dépend entre autre de la nature des espèces et des conditions du milieu. La détermination du poids sec et de sa fraction organique renseigne sur la quantité de biomasse en place. La mesure de la concentration en pigments chlorophylliens est une technique fréquemment employée pour estimer la biomasse algale des biofilms ; elle a été enrichie par une analyse de caractérisation microscopique des micro-organismes présents. En complément, l'évaluation des fonctions écologiques assurées par la composante algale des biofilms a été mesurée au travers de la détermination du niveau d'activité photosynthétique des communautés.

Les objectifs spécifiques des travaux menés étaient ainsi (1) d'évaluer les effets de la contamination du milieu sur les biofilms, et leur variabilité saisonnière et interannuelle, (2) de caractériser les modifications structurelles et physiologiques de l'amont vers l'aval des cours d'eau de la Gourgue et de l'Arreillet, et (3) de mettre en évidence, par des comparaisons entre amont et aval des zones tampons humides artificielles implantées, l'influence des opérations de restauration sur l'état de santé des biofilms.

Ce rapport décrit les résultats obtenus en 2023, sous une forme comparable au rapport 2022 (Morin et al. 2022) pour en faciliter la lecture.

# Méthodologies mises en œuvre

**A**u cours de cette phase du projet Phytoremed / Restaur (2023), les expositions *in situ* des biofilms ont eu lieu à la fin du printemps 2023 correspondant à la période d'épandage des phytosanitaires représentant un risque de transfert des contaminants vers les eaux. Les échantillonnages ont été réalisés sur 8 sites, élargissant le panel des stations prospectées par rapport à 2021-2022. A l'issue d'un mois d'immersion des substrats de colonisation, les biofilms ont été prélevés en triplicats par site, pour examiner les effets des contaminants sur les caractéristiques fonctionnelles et structurales des communautés périphytiques. Ces suivis multi-sites, réalisés à des saisons contrastées, permettront d'évaluer d'une part un effet amont/aval des zones humides restaurées, et d'autre part la variabilité saisonnière liée aux conditions environnementales le long de ces gradients.

Sur chaque échantillon collecté nous avons mesuré au laboratoire : le poids sec et la fraction organique du biofilm, la concentration en pigments chlorophylliens par spectrophotométrie et les densités de microorganismes et la viabilité des diatomées en microscopie optique, ainsi que l'activité photosynthétique efficace de la communauté.

## Localisation des sites d'étude

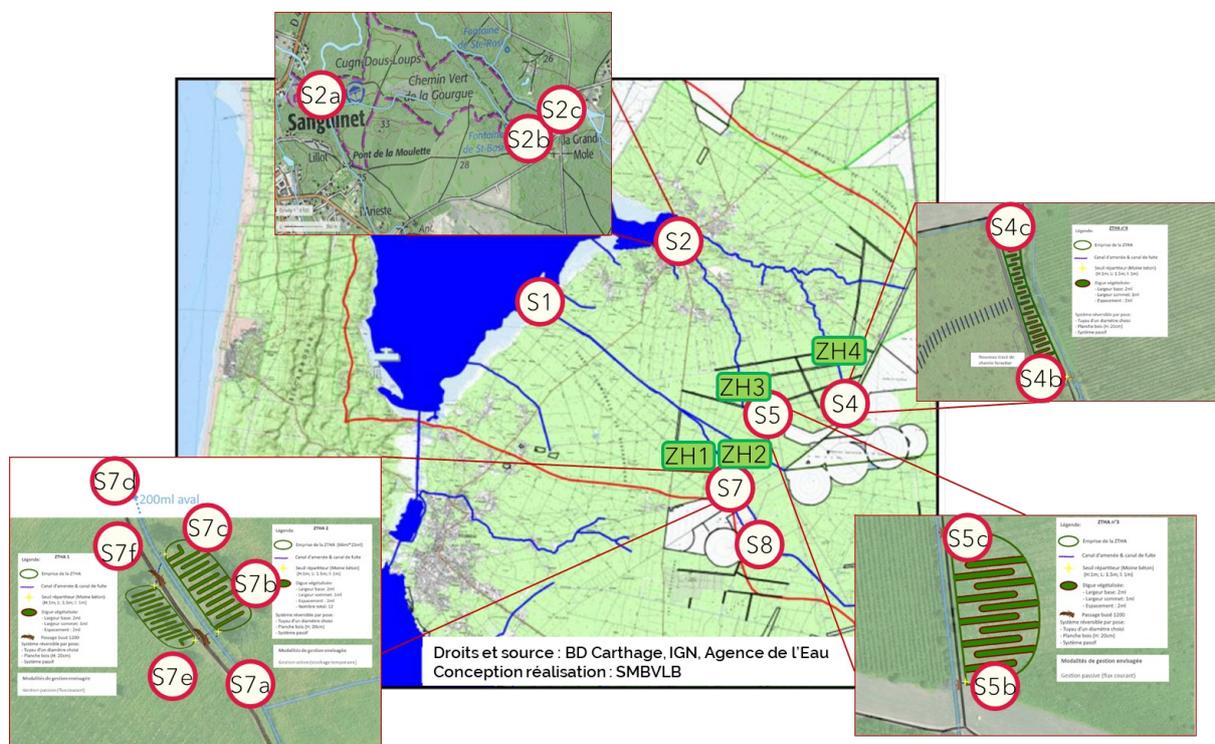


Figure 1 : Localisation des sites d'étude prévus dans le projet Phytoremed / Restaur (S<sub>x</sub> : sites d'échantillonnage, ZH : zones humides).

Les stations du site expérimental étudié, correspondant au bassin versant de la Gourgue et de l'Arreillet, ont été sélectionnées en fonction de leur accessibilité de façon à présenter un gradient de contamination phytosanitaire, entre l'amont et l'aval des zones tampons humides artificielles (ZTHA) implantées. Tous les points de suivi du projet Phytoremed / Restaur (sur la totalité de la durée du projet) sont présentés dans la [Figure 1](#). Les 8 sites échantillonnés lors de la campagne 2023 sont listés dans le [Tableau 1](#). La station S8 échantillonnée en 2022 a été supprimée car redondante avec la station S7a en aval immédiat de ce point, sans ZTHA intermédiaire mais avec présence d'un champ agricole entre les deux points pouvant influencer les réponses.

**Tableau 1 :** Liste des points de prélèvement prévus sur le projet Phytoremed / Restaur et détail des sites échantillonnés en 2023. Les coordonnées GPS correspondent au positionnement des cagettes utilisées comme support de colonisation pour les biofilms.

Nom du site	Code	Coordonnées GPS	Print. 2023
Canal de l'Arreillet (aval) (Ex S1)	S1	44.467409, -1.126553	X
Craste Moulieyre / Ruisseau de Caoué (aval) (Ex S2)	S2a	44.484756, -1.070190	X
Ruisseau la Gourgue, bras secondaire (bief moulin)	S2b		
Ruisseau la Gourgue, bras principal (chemin de la Mole aval, amont S2a)	S2c	44.483847, -1.054678	
Canal de Courlouze (amont) (Ex S4)	S4a	44.444501, -1.004694	X
ZTHA4 amont (Mise en place Sept 2022)	S4b		X
ZTHA4 Aval (Mise en place Sept 2022)	S4c		X
Parc Panneau solaire (Ex S5)	S5a	44.436744, -1.033842	X
ZTHA3 amont (Mise en place Sept 2022)	S5b		X
ZTHA3 Aval (Mise en place Sept 2022)	S5c		
Canal de l'Arreillet (chemin d'En Hill, amont) (Ex S7)	S7a	44.416262, -1.051259	X
ZTHA2 amont (rive droite)	S7b		
ZTHA2 aval (rive droite)	S7c		
Arreillet aval Passage à Gué	S7d		
ZTHA1 Amont (Rive gauche)	S7e		
ZTHA1 Aval (Rive gauche)	S7f		
Amont Arreillet (Ex S8)	S8		

## Stratégie d'échantillonnage

Le design expérimental mis en œuvre avait pour objectif de fixer et de contrôler les modalités de développement et d'exposition des biofilms (nature des substrats de colonisation, profondeur d'immersion de ces substrats, durée de colonisation, superficie de substrat colonisée) de façon à limiter les facteurs de variabilité potentiels pour étudier spécifiquement les effets des paramètres saisonniers (notamment température des eaux et lumière : photopériode, intensité lumineuse) et le niveau de contamination chimique du milieu.

Pour satisfaire ces conditions, notre choix s'est porté sur des substrats artificiels en verre, couramment utilisés autant en milieu naturel que pour les études de laboratoire. Ces supports inertes permettent un échantillonnage simple par raclage, rapide, et réduisant la variabilité liée au prélèvement. Ce type de substrat permet de réaliser des prélèvements quantitatifs (la superficie du substrat échantillonné étant fixée), dans des conditions relativement reproductibles d'un site à l'autre et d'une date à l'autre. Après colonisation des substrats, il est possible de comparer les communautés qui s'y sont établies sur une durée déterminée, qui sont représentatives du passé récent du milieu.

Pour chaque site étudié, des lames de verre vierges de grandes dimensions (25 cm×6 cm) ont ainsi été positionnées dans des cages en plastique ajouré (cinq à six lames par cage afin de prévenir les pertes), immergées dans la colonne d'eau (Figure 2). Ces cages étaient maintenues dans la zone photique, pendant un mois pour permettre leur colonisation par des biofilms matures. Selon les caractéristiques hydromorphologiques des sites, les cages ont été rattachées à la berge à l'aide de cordes ou fixées à des pieux spécifiquement implantés pour l'installation des dispositifs d'échantillonnage intégratif passif des contaminants dans les eaux par l'UMR EPOC-LPTC.



Figure 2 : Installation des substrats artificiels sur le terrain.

## Prélèvement et préparation des échantillons de biofilms

Pour les différentes campagnes, les prélèvements ont été réalisés après un mois d'immersion des substrats artificiels dans les eaux (Pose des cagettes le 04/05/2023 et récupération des lames le 07/06/2023). Les cagettes ont été récupérées et les lames colonisées collectées sur le terrain, immédiatement stockées avec un petit volume d'eau du site (pour éviter le dessèchement) dans des pochettes en plastique identifiées et conservées au frais (4°C) et à l'obscurité jusqu'à leur traitement et analyse dans un délai de 24 heures (réalisées le 08/06/2023).

Au laboratoire, trois répliqués de lames ont été individualisés pour la préparation des échantillons. Les substrats correspondants (recto-verso) ont été raclés à l'aide d'une lame de cutter et mis en suspension dans 50 mL d'eau minérale Evian. La mise en suspension de la biomasse, correspondant à une superficie donnée dans un volume standard d'eau,

facilite ensuite la conversion des différentes mesures réalisées en valeurs rapportées à une unité de surface. Chaque réplicat a été soigneusement homogénéisé, puis séparé en diverses aliquotes destinées aux analyses qualitatives et quantitatives des biofilms suivantes (Figure 3) : description de la biomasse en place, dosage des pigments photosynthétiques dans le biofilm, proportions des différents groupes algaux, analyses quantitatives et qualitatives des communautés micro-algales et activité photosynthétique efficace des biofilms. Les volumes utilisés pour chaque analyse aux différentes dates d'échantillonnage sont décrits dans le Tableau 2.



Figure 3 : Protocole de récolte du biofilm et devenir des échantillons.

Tableau 2 : Volumes de suspension de biofilm destinés aux différentes analyses, par campagne.

Volume de suspension utilisé	Printemps 2023
Quantification de la biomasse de biofilm	37 mL*
Quantification de la chlorophylle	10 mL
Analyses de la fluorescence chlorophyllienne et de l'activité photosynthétique	3 mL

\*excepté pour 2 réplicats du site S4b, riche en algues filamenteuses colmatant les filtres (volume filtré inférieur)

Sur ces biofilms, les niveaux d'expression de gènes impliqués dans le métabolisme énergétique, la photosynthèse, les mécanismes de défense contre le stress oxydant et la dégradation des polluants ont été déterminés par PCR quantitative en temps réel par l'UMR EPOC-EA. Pour les analyses de transcriptomique, les autres lames ont été raclées à l'aide d'une lame de cutter et l'équivalent en volume d'une grosse tête d'épingle de biofilm a été déposée dans un eppendorf de solution de stabilisation de l'ARN (RNAlater). Trois réplicats par site ont été collectés. Les eppendorfs en suspension dans le RNAlater ont été immédiatement placés dans l'obscurité à 4 °C, puis stockés dès le lendemain au congélateur (-20 °C) et transmis à l'UMR EPOC-EA.

## Composition organique et minérale des biofilms

La biomasse totale du biofilm (ou poids sec) et la fraction organique (matière sèche sans cendre) ont été mesurées conformément à la norme AFNOR NF EN 872. Chaque échantillon a été filtré sur un filtre en fibres de verre. Après séchage du filtre à 105 °C et pesée du résidu retenu sur le filtre, les échantillons ont été calcinés pendant 1 heure à 550 °C au four à moufle.

$$PS = \frac{m_{\text{étuve}} - m_{\text{filtre}}}{S} \quad \text{et} \quad MSSC = PS \times \left( 1 - \frac{m_{\text{four}} - m_{\text{filtre}}}{m_{\text{étuve}} - m_{\text{filtre}}} \right)$$

Avec :  $PS$  : poids sec ( $mg/cm^2$ ) ;  $MSSC$  : matière sèche sans cendre ( $mg/cm^2$ ) ;  $m_{\text{filtre}}$  : masse initiale du filtre vierge ( $mg$ ) ;  $m_{\text{étuve}}$  : masse du filtre après filtration de l'échantillon et passage à l'étuve ( $mg$ ) ;  $m_{\text{four}}$  : masse du filtre après passage au four ( $mg$ ) ;  $S$  : surface correspondante de support gratté ( $cm^2$ ).

## Concentration en pigments photosynthétiques

### Dosage de la chlorophylle $\alpha$ et des phéopigments

La chlorophylle  $a$  est un pigment spécifique du règne végétal contenu dans les chloroplastes, assurant la conversion de l'énergie lumineuse en énergie chimique lors de la photosynthèse. La concentration en chlorophylle constitue un indicateur de biomasse vivante de l'échelon primaire dans les environnements aquatiques. La concentration en phéopigments traduit la présence de formes dégradées des pigments chlorophylliens, elle est en relation directe avec la matière morte.

Le dosage spectrophotométrique de la concentration en pigments chlorophylliens a été réalisé selon un protocole modifié de la norme AFNOR NF T90-117. La suspension de biofilm a été filtrée et les organismes ont été recueillis sur un filtre GF/C et extraits dans l'acétone à 90% au bain à ultrasons. Après 10 min, les absorbances de l'extrait acétonique ont été mesurées au spectrophotomètre d'absorption moléculaire (UV-1800, Shimadzu) à deux longueurs d'onde prédéfinies (665 et 750 nm), avant et après acidification avec une goutte d'acide chlorhydrique au 1/2. Les concentrations en chlorophylle  $a$  ( $C_a$ ) et en indice phéopigments ( $P_a$ ) ont été déterminées d'après les équations de Lorenzen (1967) et exprimées en  $\mu g/cm^2$  :

$$C_a = 26,7 \times \left( (A_{0,665} - A_{0,750}) - (A_{a,665} - A_{a,750}) \right) \times \frac{V}{L \times S}$$
$$\text{et } P_a = 26,7 \times \left( 1,7 \times (A_{a,665} - A_{a,750}) - (A_{0,665} - A_{0,750}) \right) \times \frac{V}{L \times S}$$

Avec :  $C_a$  : Concentration en chlorophylle  $a$  ( $\mu g/cm^2$ ) ;  $P_a$  : Concentration en phéopigments ( $\mu g/cm^2$ ) ;  $A_{0,665}$ ,  $A_{0,750}$  : absorbances de l'extrait à 665 nm et 750 nm avant acidification ;  $A_{a,665}$ ,  $A_{a,750}$  : absorbances de l'extrait à 665 nm et 750 nm après acidification ;  $v$  : volume d'extrait acétonique ( $mL$ ) ;  $L$  : trajet optique de la cuve utilisée ( $cm$ ) ;  $S$  : surface correspondante de support gratté ( $cm^2$ ).

Un indicateur de vitalité, permettant d'apprécier la part de la matière vivante sur la matière morte, s'exprime comme le ratio entre  $C_a$  et  $P_a$ .

## Analyse détaillée de la composition pigmentaire

Les algues possèdent une diversité de pigments dont les plus importants sont les chlorophylles *a*, *b*, *c*, *d* et les caroténoïdes. La concentration en chlorophylle *a*, qui est le pigment photosynthétique le plus commun du règne végétal, peut être utilisée pour quantifier la biomasse autotrophe totale. La présence de pigments caractéristiques d'une classe algale permet d'identifier un groupe d'organismes et ainsi, de caractériser la structure de la communauté. En milieu aquatique, la chlorophylle *b* constitue un signal de la présence des algues vertes (chlorophycées, prasinophycées, euglénophycées), et la chlorophylle *c* indique les algues dites brunes (notamment les diatomées).

L'analyse détaillée de la composition pigmentaire a été effectuée selon la méthode SCOR-Unesco (Unesco 1966) adaptée pour les communautés d'eaux douces. Les étapes d'extraction de la chlorophylle avec l'acétone et la filtration étaient communes avec la méthode décrite ci-dessus. La lecture de l'absorbance de l'extrait acétonique a été réalisée au spectrophotomètre (UV-1800, Shimadzu) à quatre longueurs d'onde (630, 647 et 664 et 750 nm). La lecture de l'absorbance à ces longueurs d'onde permet de calculer la quantité de chlorophylle grâce aux formules suivantes :

$$[\text{Chlo } a] = \left( 11,85 \times (A_{0,664} - A_{0,750}) - 1,54 \times (A_{0,647} - A_{0,750}) - 0,08 \times (A_{0,630} - A_{0,750}) \right) \times \frac{V}{L \times S}$$

$$[\text{Chlo } b] = \left( -5,43 \times (A_{0,664} - A_{0,750}) + 21,03 \times (A_{0,647} - A_{0,750}) - 2,66 \times (A_{0,630} - A_{0,750}) \right) \times \frac{V}{L \times S}$$

$$[\text{Chlo } c] = \left( -1,67 \times (A_{0,664} - A_{0,750}) - 7,6 \times (A_{0,647} - A_{0,750}) + 24,52 \times (A_{0,630} - A_{0,750}) \right) \times \frac{V}{L \times S}$$

Avec : [Chlo *a*, *b*, *c*] : Concentration en chlorophylle *a*, *b* ou *c* ( $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ ) ;  $A_{0,630}$ ,  $A_{0,647}$ ,  $A_{0,664}$ ,  $A_{0,750}$  : absorbances de l'extrait à 630, 647 et 664 et 750 nm sans acidification ;  $v$  : volume d'extrait acétonique (mL) ;  $L$  : trajet optique de la cuve utilisée (cm) ;  $S$  : surface correspondante de support gratté ( $\text{cm}^2$ ).

## Indice d'autotrophie

Les biofilms sont constitués d'organismes autotrophes (micro-algues) et hétérotrophes (bactéries, champignons, microméiofaune). L'indice d'autotrophie représente le rapport entre la biomasse du biofilm et la concentration en chlorophylle *a* (Weitzel 1979). Il traduit des changements dans les proportions relatives entre les communautés autotrophes et hétérotrophes. Une augmentation des valeurs de cet indice reflète une augmentation de la proportion d'organismes hétérotrophes, comparés à la fraction autotrophe.

L'indice d'autotrophie (IA) a été calculé afin d'étudier l'évolution des parts d'hétérotrophes et d'autotrophes présents dans le biofilm en fonction des sites et des saisons. Il a été obtenu à partir de la formule suivante :  $IA = \frac{MSSC}{C_a}$

Avec : IA : Indice d'autotrophie ; MSSC : matière sèche sans cendre ( $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ ) ;  $C_a$  : Concentration en chlorophylle a ( $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ ).

## Proportions des différents groupes algaux

La contribution relative des principaux groupes algaux (algues bleues ou cyanobactéries, algues vertes ou chlorophytes, algues brunes ou diatomées) à la fluorescence chlorophyllienne des échantillons a été caractérisée par la technique de fluorescence en lumière modulée à l'aide du fluorimètre Phyto-PAM (Heinz Walz GmbH, Allemagne ; Figure 4). La distinction entre les différents groupes algaux est basée sur la mesure de la fluorescence émise après excitation à quatre longueurs d'ondes (470, 520, 645 et 665 nm), choisies de manière à permettre une différenciation optimale entre cyanobactéries, algues vertes et diatomées. En effet, pour un échantillon ne contenant que des cyanobactéries presque aucun signal ne sera détecté avec une longueur d'excitation de 470 nm (pas de chlorophylle *b*) alors qu'un large signal sera détecté pour une longueur d'excitation de 645 nm (due à l'absorption de l'allophycocyanine). Un échantillon d'algues vertes émettra quant à lui un large signal à une longueur d'onde d'excitation de 470 nm (présence de chlorophylle *b*) et un faible signal avec une longueur d'onde d'excitation de 520 nm. Le signal des diatomées correspond aux longueurs d'ondes de 470 nm et 520 nm, en lien avec l'absorption de la chlorophylle *c*, de la fucoxanthine et des caroténoïdes. Ainsi, le logiciel associé à l'instrument exploite la signature spectrale des différents groupes algaux (obtenue à partir de cultures de référence par l'équipe de Mechthild Schmitt-Jansen, UFZ-Allemagne), et déconvolue le signal ré-émis pour caractériser la contribution à la biomasse algale totale de chaque groupe.

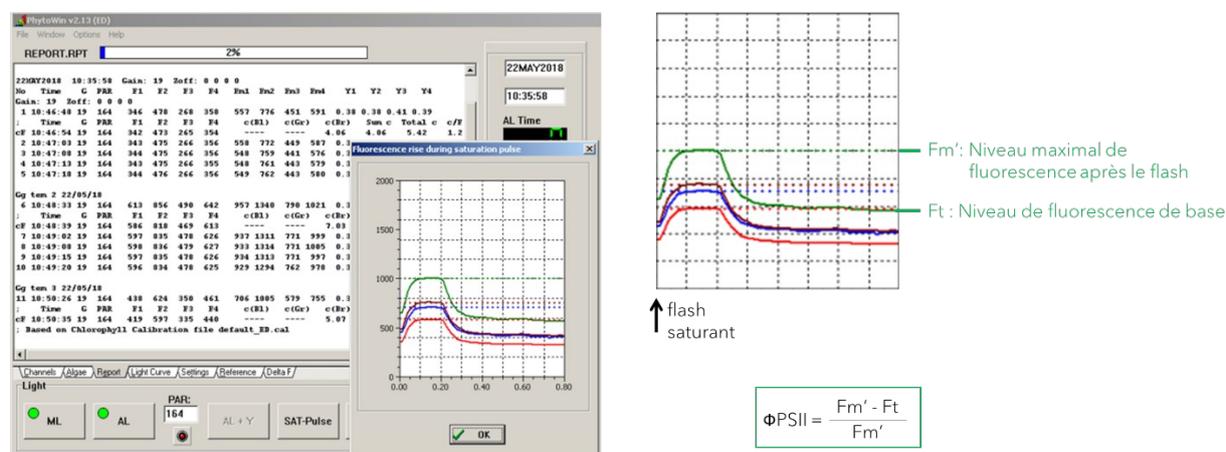


**Figure 4 :** Équipement pour les analyses de fluorimétrie en lumière modulée (Phyto-PAM).

La fluorescence des trois groupes algaux a été estimée à partir des suspensions d'échantillon de 3 mL acclimatées à la lumière du jour, puis placées dans des cuvettes en quartz et soumis à une lumière actinique ( $PAR = 164 \mu\text{mol quanta}/\text{m}^2/\text{s}$ ), en utilisant le mode PHYTO-ED (Emitter-Detector Unit). Les contributions des trois groupes algaux ont été exprimées en pourcentage (%) de la fluorescence de la chlorophylle totale.

## Activité photosynthétique efficace des biofilms

Les organismes photosynthétiques convertissent l'énergie lumineuse en énergie chimique. Le fluorimètre Phyto-PAM (Heinz Walz GmbH, Germany) permet de quantifier le rendement quantique de la photochimie du photosystème II (PSII), à partir de la mesure de la fluorescence réémise par les algues en réponse à un stimulus lumineux d'intensité contrôlée de faible durée. Le rendement photosynthétique renseigne sur l'état physiologique des micro-algues du biofilm. Les mesures du rendement quantique efficace de la photochimie du PSII ( $\Phi_{PSII}$ , valeur sans unité) ou activité photosynthétique efficace sont réalisées pour les échantillons de biofilm en suspension acclimatés à la lumière, dans les conditions décrites ci-dessus pour l'analyse des groupes algaux. Les valeurs de  $\Phi_{PSII}$  sont bornées entre 0 et 1, elles sont nulles ou proches de zéro dans le cas d'une inhibition totale de la photosynthèse et sont généralement de l'ordre de 0,5 pour des communautés naturelles en bon état de santé (voir par exemple : Chaumet 2018).



**Figure 5 :** Technique de mesure de la fluorescence chlorophyllienne en lumière modulée. A gauche : logiciel PhytoWin et mesure de l'activité photosynthétique (avec visualisation de la courbe de fluorescence obtenue). A droite : paramètres de la courbe utilisés pour le calcul du rendement photosynthétique  $\Phi_{PSII}$ .

## Analyse des données

L'interprétation des résultats issus des campagnes d'échantillonnage nécessite la mise en œuvre de tests statistiques. La comparaison des variables quantitatives a été réalisée par les méthodes statistiques suivantes. Les représentations graphiques représentent les moyennes et les erreurs-standards associées ( $n = 3$  si non spécifié). Les sites sont présentés par cours d'eau puis de l'amont vers l'aval.

Les analyses statistiques et en particulier les corrélations entre résultats biologiques et caractéristiques environnementales (physico-chimie, concentrations en micropolluants) seront réalisées en fin de projet, une fois la totalité du jeu de données acquis.

# Résultats de la campagne de printemps 2023

Lors de la campagne printanière de 2023, les substrats ont été déposés pour la colonisation du biofilm sur huit sites sur le bassin-versant de la Gourgue (6 stations) et de l'Arreillet (2 stations).

La structure des biofilms a été décrite au travers de paramètres globaux (poids sec, biomasse organique) et plus spécifiques de la composante algale des biofilms (concentrations en pigments photosynthétiques, proportions des différents groupes algaux, densités de cellules). La composante diatomique n'étant pas largement dominante dans tous les échantillons (campagnes et sites) d'après les mesures de fluorescence réalisées au Phyto-PAM en 2021 et 2022, l'analyse taxonomique des communautés envisagée initialement avait été remplacée par une caractérisation plus fine des différents groupes de micro-algues présents (dosage des chlorophylles *a*, *b* et *c*). En 2023, les diatomées ne dominaient que quelques échantillons, pour les mêmes raisons que lors des campagnes précédentes et par souci de comparaison inter-campagnes, la quantification fine des classes de chlorophylles a donc été poursuivie. Au niveau fonctionnel, l'activité photosynthétique efficace de la composante algale a été mesurée le lendemain de chacune des dates de récupération des échantillons.

## Composition organique et minérale des biofilms

### Campagne 2023

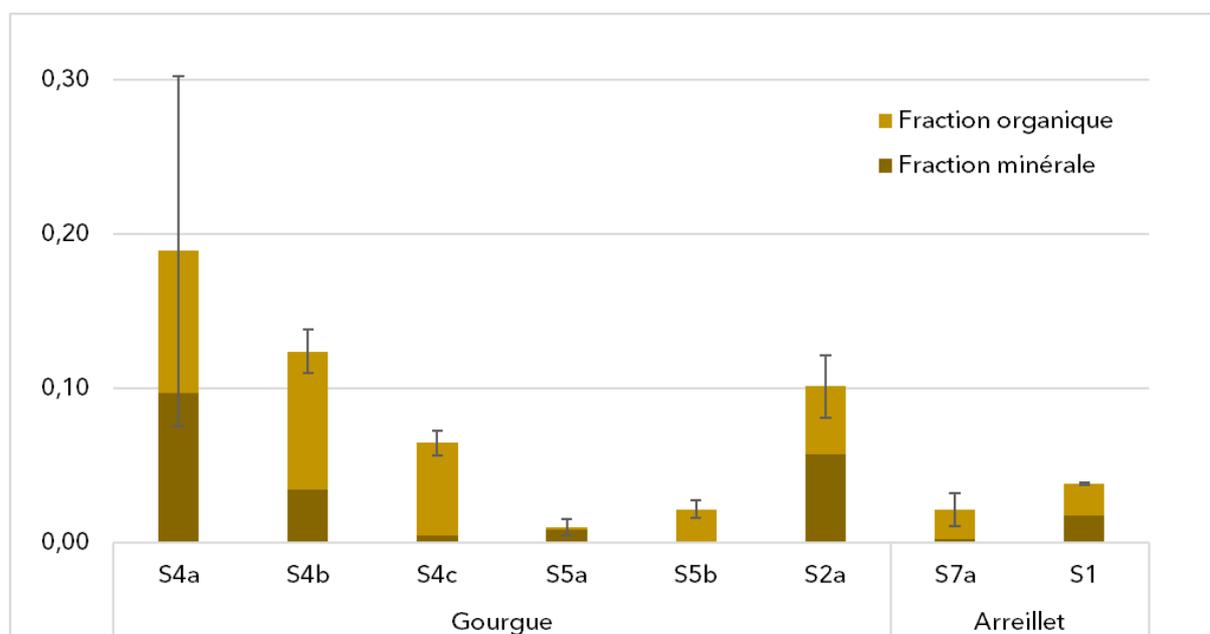


Figure 6 : Poids secs moyens (avec distinction entre les fractions organique et minérale de la biomasse) (mg/cm<sup>2</sup>) des biofilms collectés lors de la campagne de printemps 2023 (8 stations). Les barres d'erreur correspondent aux erreurs-standards associées aux poids secs totaux.

Comme pour les campagnes précédentes, les biomasses colonisées sur un mois sur l'Arreillet étaient globalement plus faibles que sur la Gourgue (Figure 6), pour le poids sec (en moyenne : 0,03 mg/cm<sup>2</sup> pour les sites de l'Arreillet, vs. 0,09 mg/cm<sup>2</sup> pour les sites de la Gourgue) comme pour la biomasse organique des biofilms, ou matière sèche sans cendre (en moyenne : 0,02 mg/cm<sup>2</sup> pour les sites de l'Arreillet, vs. 0,05 mg/cm<sup>2</sup> pour les sites de la Gourgue). Le long de la Gourgue, on observe un gradient de biomasse décroissante de l'amont vers l'aval jusqu'à S5a, suivi d'une reprise de la croissance à l'exutoire. A noter que pour le site S4b, les aliquotes de biofilm prélevées pour deux des répliquats n'ont pas pu être filtrées en totalité en raison d'un colmatage des filtres par des algues filamenteuses abondantes.

De manière similaire, la contribution de la fraction organique au poids sec des biofilms diminuait de l'amont (S4a) vers l'aval jusqu'à S5a (composé à 100% de matière minérale pour 2 des répliquats), traduisant une plus forte rétention de particules minérales dans les biofilms. Plus à l'aval (S5b et S2a), on note l'augmentation de la fraction organique dans les biofilms. Pour la Gourgue, la part organique représentait  $64 \pm 8 \%$  du poids sec en moyenne, et  $73 \pm 10 \%$  sur l'Arreillet, sans différence statistique.

## Concentration en pigments photosynthétiques

### Campagne 2023

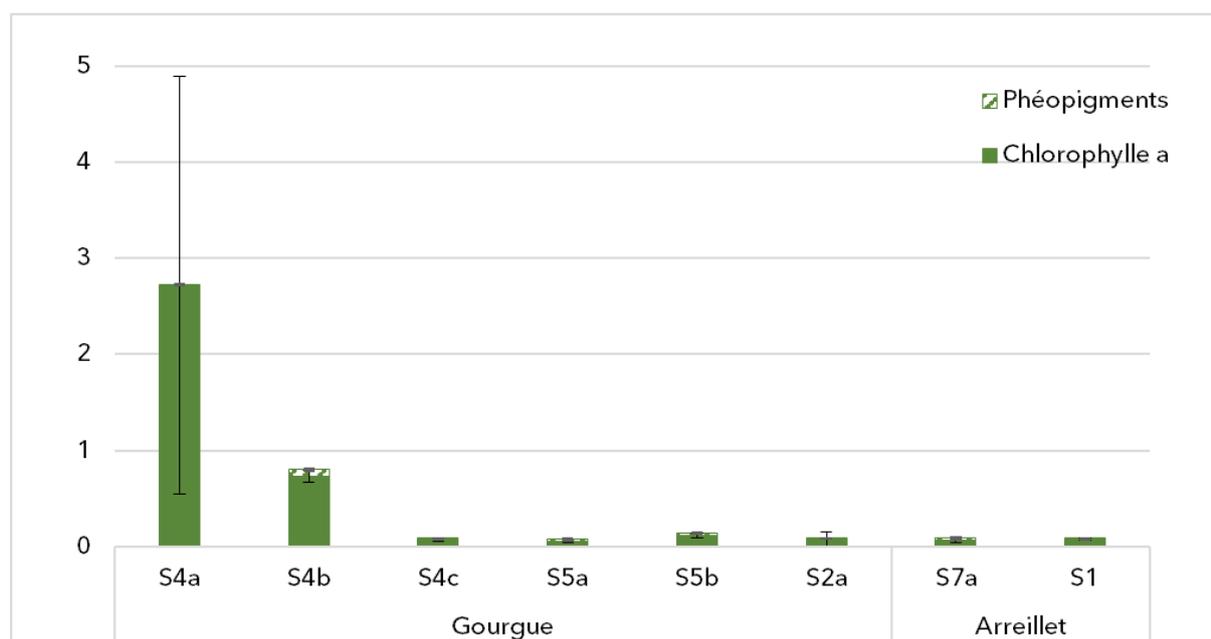


Figure 7 : Concentrations moyennes ( $\pm$  erreurs-standards) en chlorophylle a et en phéopigments ( $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ ) dans les biofilms collectés lors de la campagne de printemps 2023 (8 stations).

Les biomasses algales des biofilms d'un mois, estimées par les concentrations en chlorophylle a, étaient comme pour les biomasses totales inférieures sur l'Arreillet comparé à la Gourgue (Arreillet :  $0,07 \pm 0,01$  ; Gourgue :  $0,62 \pm 0,39$  ; Figure 7). Alors que les concentrations étaient similaires entre l'amont et l'aval sur l'Arreillet, on observait au contraire une diminution des concentrations en chlorophylle le long de la Gourgue.

Les biomasses algales des biofilms d'un mois collectés sur les sites S4a et S4b, estimées par les concentrations en chlorophylle *a*, étaient largement supérieures (>10 fois plus élevées) au printemps 2023 (Figure 7) que lors du printemps précédent (2022), traduisant des conditions environnementales (température, luminosité, physicochimie) plus favorables au développement algal en particulier à l'amont. En moyenne, les concentrations en chlorophylle *a* étaient plus élevées sur la Gourgue comparée à l'Arreillet, ce qui confirme les résultats observés pour la fraction organique de la biomasse (Figure 6).

Les concentrations en phéopigments représentaient généralement une part faible des pigments chlorophylliens (<15 % en moyenne), traduisant un bon état de l'équipement pigmentaire. Les concentrations en phéopigments étant nulles dans de nombreux réplicats d'échantillons, le calcul de l'indicateur de vitalité était impossible dans la moitié des sites (notés n.d. sur la Figure 8). La contribution des phéopigments à la concentration totale en pigments chlorophylliens était la plus élevée (autour de 20 %) dans les sites aval de la Gourgue (S5a, S5 b et S2a), indiquant une dégradation, et/ou un moindre renouvellement, de ces pigments.

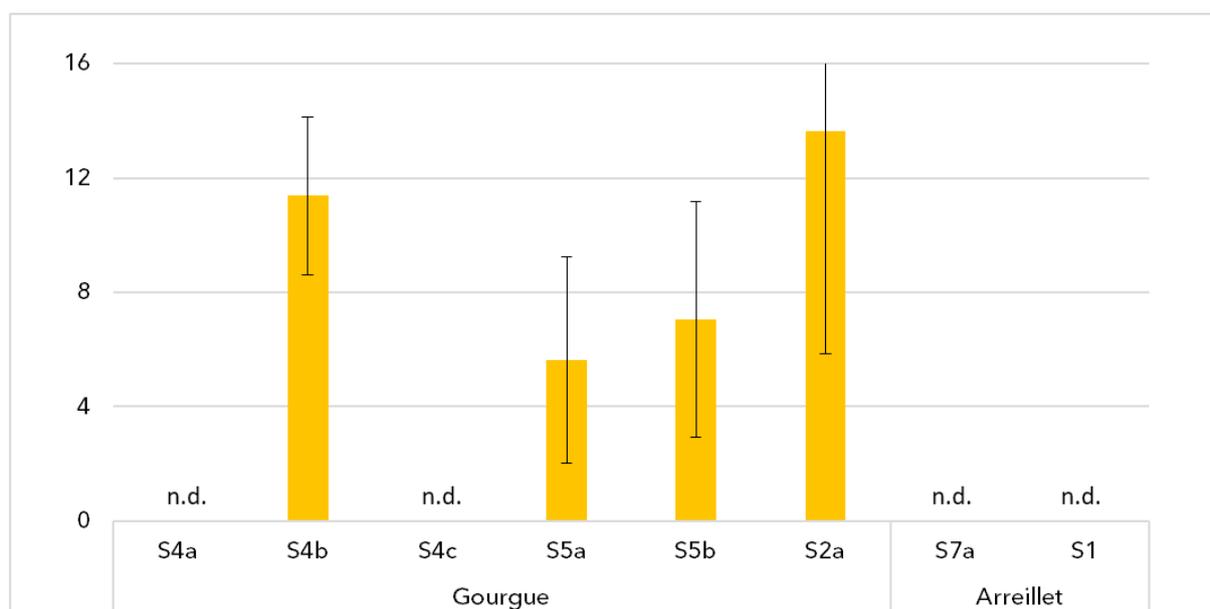


Figure 8 : Valeurs moyennes (± erreurs-standards) de l'indicateur de vitalité des biofilms collectés lors de la campagne de printemps 2023 (8 stations). n.d. : non déterminé, en raison de concentrations en phéopigments nulles dans au moins un des réplicats de biofilms collectés.

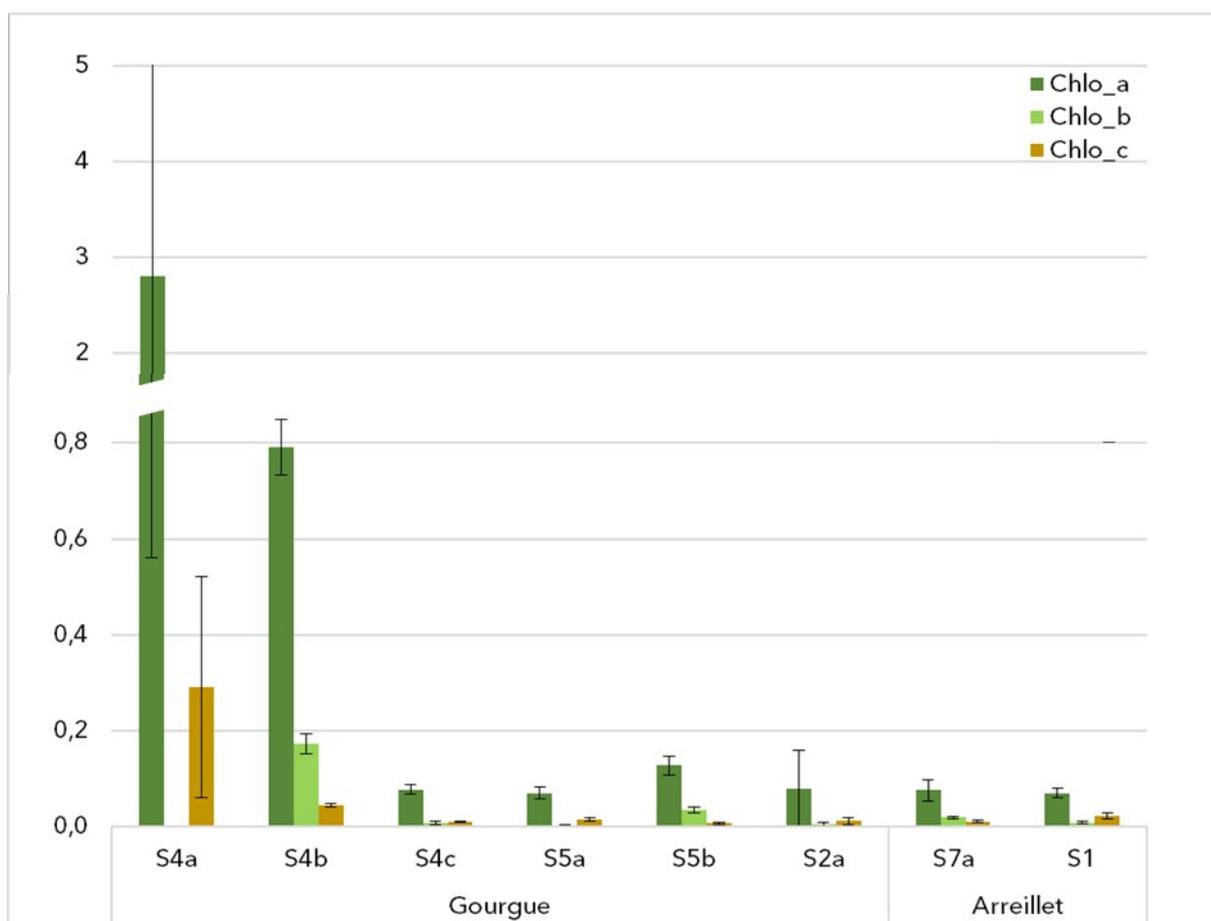


Figure 9 : Concentrations moyennes ( $\pm$  erreurs-standards) en chlorophylle *a*, *b* et *c* ( $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ ) dans les biofilms collectés lors de la campagne de printemps 2023 (8 stations).

Les résultats obtenus par l'analyse des différentes structures chimiques de chlorophylle confirment les tendances de biomasse algales observées en Figure 7. La signature pigmentaire (Figure 9) indique la présence d'algues vertes (chlorophylle *b*) et de diatomées (chlorophylle *c*), dans des proportions variables selon les sites. La concentration élevée en chlorophylle *b* sur le site S4b concorde avec la présence observée macroscopiquement d'algues filamenteuses responsables des colmatages des filtres pour l'analyse des poids secs des biofilms (section Composition organique et minérale des biofilms).

# Indice d'autotrophie

## Campagne 2023

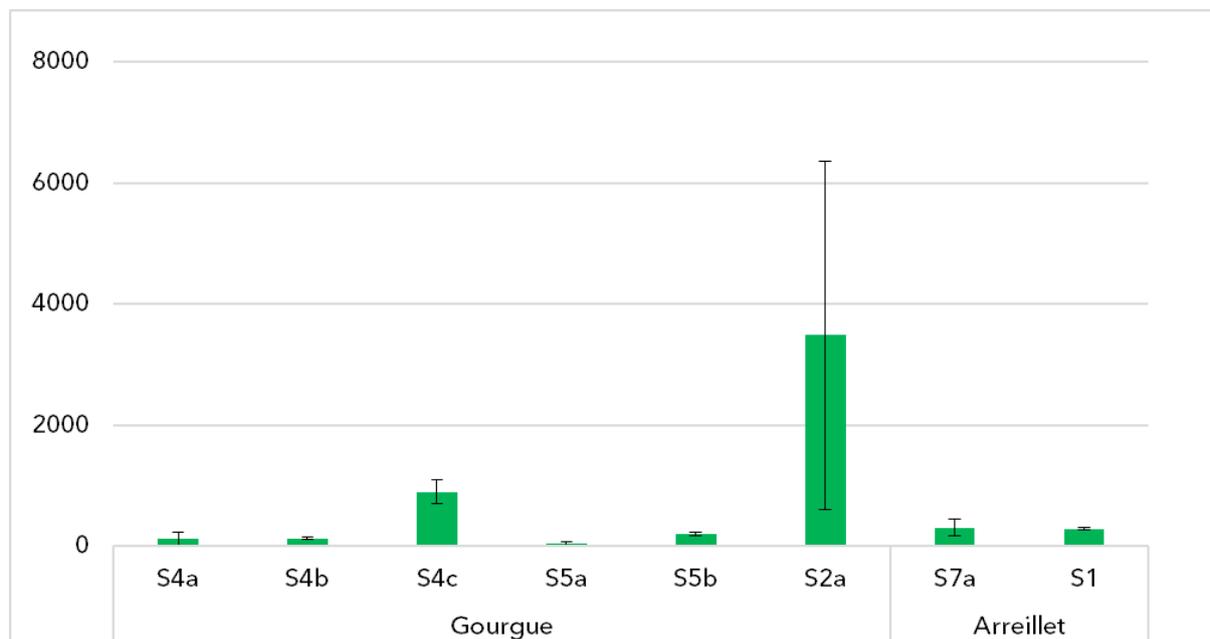


Figure 10 : Valeurs moyennes ( $\pm$  erreurs-standards) de l'indice d'autotrophie calculées pour les biofilms collectés lors de la campagne de printemps 2023 (8 stations).

La valeur de l'indice d'autotrophie était supérieure à 100, ce qui traduit des conditions hétérotrophes, souvent associées à des niveaux de pollution organique (Weitzel 1979), excepté sur le site S5a. Ces valeurs étaient plus élevées, et plus variables entre stations, sur la Gourgue ( $808 \pm 457$ ) que sur l'Arreillet ( $292 \pm 60$ ). En particulier, les valeurs élevées de l'indice aux sites S4c (aval ZTH4) et S2a (exutoire), indiquant une augmentation de la contribution de la biomasse hétérotrophe à la biomasse totale des biofilms (c'est-à-dire une réduction de la part de la composante algale) contribuaient à la forte hétérogénéité des valeurs. Ces résultats sont complémentaires des tendances observées pour la biomasse totale (Figure 6) et les concentrations en chlorophylle *a* mesurées dans les biofilms (Figure 7) : ils montrent ainsi une forte hétérotrophisation des communautés microbiennes aux sites S4c et S2a (aval ZTH4 et exutoire) caractérisées par des biomasses totales intermédiaires et des biomasses algales réduites.

Des valeurs élevées de l'indice d'autotrophie en S2 avaient déjà été rapportées sur les campagnes précédentes (2021 et 2022), du même ordre de grandeur. Ces données devront être analysées au regard des conditions environnementales (physicochimiques notamment) des sites.

## Proportions des différents groupes algaux

### Campagne 2023

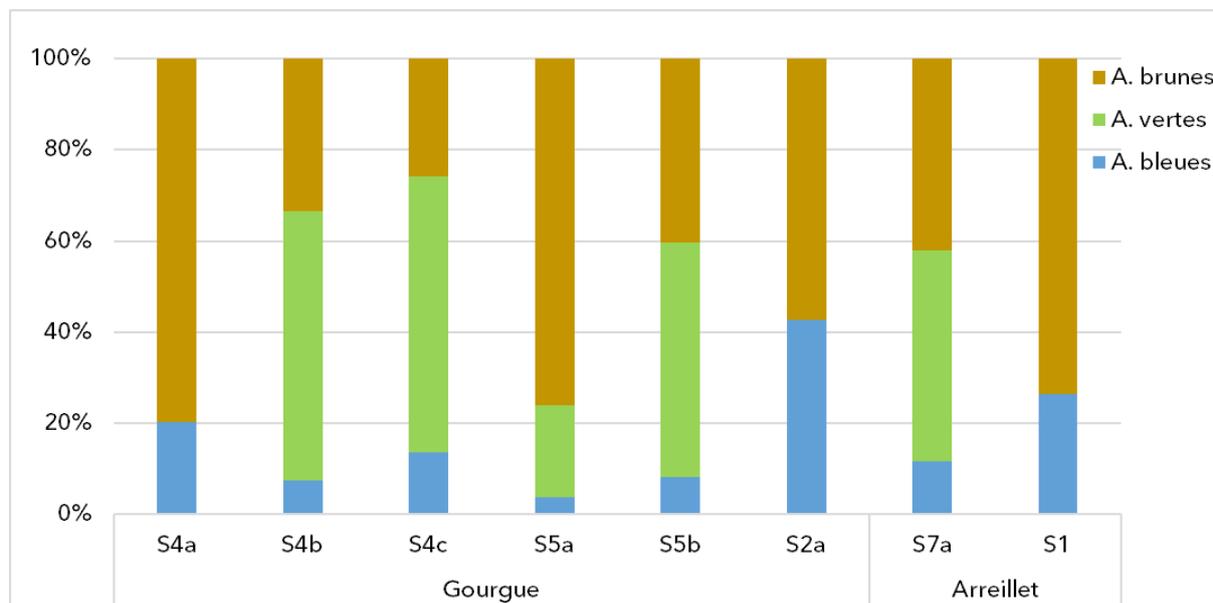


Figure 11 : Contribution relative des différents groupes algaux (%) à la fluorescence des biofilms collectés lors de la campagne de printemps 2023 (8 stations).

A partir des analyses de fluorimétrie, les variations dans la composition taxonomique étaient observables entre les cours d'eau et entre l'amont et l'aval (Figure 11). Le long de la Gourgue, les algues vertes étaient indétectables dans les biofilms du site le plus en amont (S4a) avec cette méthode, et étaient quantifiées dans tous les sites aval et généralement dominantes, excepté à l'exutoire (S2a). De même sur l'Arreillet, une disparition des algues vertes était observée à l'aval (S1), alors qu'elles constituaient presque 50 % de la communauté à l'amont (S7a). Globalement, les résultats obtenus au Phyto-PAM étaient concordants avec les analyses pigmentaires (Figure 9). Un pourcentage modéré de cyanobactéries (algues bleues) était mis en évidence, dans des proportions similaires aux échantillonnages réalisés au printemps 2022, mais variables selon les sites.

## Activité photosynthétique efficace des biofilms

### Campagne 2023

Les communautés algales des biofilms collectés sur l'Arreillet et la Gourgue présentaient des rendements photosynthétiques typiques d'organismes naturels en bonne santé (autour de 0,5 ; Figure 12), à l'exception des sites S4a, S5a et S2a de la Gourgue où une réduction de l'activité photosynthétique était notable (autour de 0,3). Des valeurs similaires avaient été reportées à l'exutoire de la Gourgue lors des campagnes précédentes.

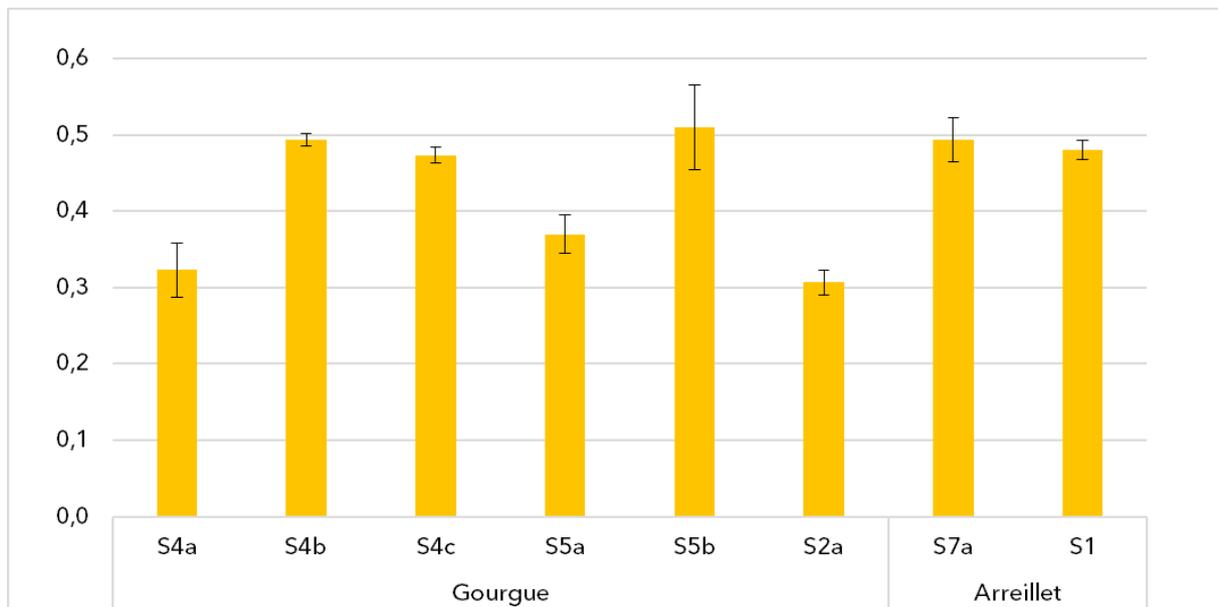


Figure 12 : Activité photosynthétique efficace moyenne ( $\pm$  erreurs-standards) dans les biofilms collectés lors de la campagne de printemps 2023 (8 stations).

## Conclusions intermédiaires

**D**ans l'ensemble, les résultats de ce nouveau suivi mettent en évidence des différences de croissance, de composition et d'état physiologique des biofilms entre les cours d'eau, les stations, et les campagnes réalisées.

Au printemps, les conditions environnementales sont naturellement favorables à la croissance des microalgues (température et disponibilité de la lumière en augmentation), on observe une biomasse algale plus élevée qu'en hiver, et supérieure en 2023 par rapport aux biofilms collectés en 2022.

Au niveau structurel et fonctionnel, des différences sont observées de l'amont vers l'aval des deux cours d'eau, avec sur la Gourgue une individualisation des sites S4c (en aval de la ZTH4) et S2a (exutoire). Ces caractéristiques seront à analyser au regard des conditions environnementales prévalentes au niveau de ces stations (notamment ombrage local, disponibilité en nutriments, niveau de contamination en micropolluants), une fois le jeu de données complet acquis. Ces analyses seront également à comparer aux impacts écotoxiques éventuellement observés sur les populations de gammarès, pour une meilleure compréhension des phénomènes d'altération observés.

## Remerciements

Les auteurs remercient le Pole Végétation Aquatique (réfèrent : Jacky Vedrenne) de l'ISC XPO (DOI : 10.17180/brey-mr38) et le Laboratoire des Biomarqueurs (réfèrent : Nicolas Mazzella di Bosco) de l'UR EABX pour la mise à disposition des laboratoires et équipements nécessaires à la réalisation des analyses de cette étude.

Un grand merci à Nicolas Delorme et Laura Garnero (UR RiverLy), Céline Charbonnier (UMR EPOC-ECOBIOC), à Jérôme Giraudel et à Nathalie Tapie (UMR EPOC-LPTC) pour leur soutien logistique dans l'organisation et la réalisation des campagnes d'échantillonnage.

## Bibliographie citée

- Centre d'Expertise en Analyse Environnementale du Québec.** 2012. Détermination de la chlorophylle a : méthode par fluorométrie, MA. 800 – Chlor. 1.0, Rév. 2. Ministère du Développement durable, de l'Environnement et des Parcs du Québec, 16 p.
- Chaumet B.** 2018. Transfert et distribution des pesticides dans les biofilms en lien avec les effets toxiques associés. PhD thesis - Univ. Bordeaux, Ecole Doctorale Sciences et Environnements.
- Coste M, Boutry S, Tison-Rosebery J, Delmas F.** 2009. Improvements of the Biological Diatom Index (BDI): Description and efficiency of the new version (BDI-2006). *Ecological Indicators* 9: 621-650.
- Jakob T, Schreiber U, Kirchesch V, Langner U, Wilhelm C.** 2005. Estimation of chlorophyll content and daily primary production of the major algal groups by means of multiwavelength-excitation PAM chlorophyll fluorometry: performance and methodological limits. *Photosynthesis Research* 83: 343-361.
- Koblížek M, Kaftan D, Nedbal L.** 2001. On the relationship between the non-photochemical quenching of the chlorophyll fluorescence and the Photosystem II light harvesting efficiency. A repetitive flash fluorescence induction study. *Photosynthesis Research* 68: 141-152.
- Kromkamp J, Domin A, Dubinsky Z, Lehmann C, Schanz F.** 2001. Changes in photosynthetic properties measured by oxygen evolution and variable chlorophyll fluorescence in a simulated entrainment experiment with the cyanobacterium *Planktothrix rubescens*. *Aquatic Sciences* 63: 363-382.
- Leitão M, Couté A.** 2005. Guide pratique des Cyanobactéries planctoniques du Grand Ouest de la France: Agence de l'eau Seine Normandie.
- Lorenzen CJ.** 1967. Determination of chlorophyll and pheopigments: spectrophotometric equations. *Limnology and Oceanography* 12: 343-346.
- Morin S., Bidabé F., Eon M., Jan G., Millán Navarro D.** (2023) Restauration de zones humides de tête de bassin versant – Programme de suivi des sites (Phytoremed / Restaur). Volet écotoxicologie - Biofilms, campagnes 2021-2022. Rapport d'étude, INRAE EABX, Cestas. 22 p.
- Morin S, Rosebery J, Van de Vijver B, Schoefs B.** 2016. Advances in diatom biodiversity and ecology. *Botany Letters* 163: 69-70.
- Morin S, Proia L, Ricart M, Bonnineau C, Geislinger A, Ricciardi F, Guasch H, Romaní A, Sabater S.** 2010. Effects of a bactericide on the structure and survival of benthic diatom communities. *Vie et Milieu (Life and Environment)* 60: 109-116.
- Pesce S, Bonnineau C, Artigas J, Martin-Laurent F, Morin S.** 2021. Les communautés microbiennes benthiques pour le diagnostic de l'impact écologique des micropolluants dans les cours d'eau. *Sciences Eaux & Territoires* 37: 92-99.
- Unesco.** 1966. Determination of photosynthetic pigments in sea-water. Paris.
- Weitzel RL.** 1979. Periphyton measurements and applications. In Weitzel RL, ed. *Methods and measurements of periphyton communities: a review*, ASTM STP 690. American Society for Testing and Materials, Philadelphia, Pennsylvania, 3-33.